

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik des
Dr. von Haunerschen Kinderspitals,
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Oliver Muensterer

Generierung von BCORL1-mutierten Lebertumorzellen mittels CRISPR/Cas9

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Sigl

aus
Starnberg

Jahr
2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler
Mitberichtserstatter: Prof. Dr. Enrico De Toni
Prof. Dr. Dominik Paquet
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2022

Eidesstattliche Versicherung

Sebastian Sigl

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Generierung von BCORL1-mutierten Lebertumorzellen mittels CRISPR/Cas9

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Klinik der Universität München, 10. Juni 2022

Sebastian Sigl

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatoblastom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Histopathologische Klassifikation	1
1.1.3	Klinik und Diagnostik	2
1.1.4	Einteilung der Tumorstadien	3
1.1.5	Therapie	5
1.2	Genetik des Hepatoblastoms	7
1.2.1	Mit dem Hepatoblastom assoziierte syndromale Erkrankungen	7
1.2.2	Die Rolle somatischer Mutationen (CTNNB1, NFE2L2 und TERT) im Hepatoblastom	7
1.3	Transkriptionelle Regulation	9
1.3.1	Gegenspiel von Koaktivatoren und Korepressoren	9
1.3.2	Die Rolle eines Korepressors	9
1.3.3	Acetylierung der Histone	10
1.3.4	Eigenschaften von <i>BCORL1</i> (BCL6 Corepressor Like 1)	10
1.3.5	Die Rolle von <i>BCOR</i> und <i>BCORL1</i>	10
1.4	Generierung eines gezielten Genknockouts	11
1.4.1	Zinkfinger-Nukleasen (ZFN)	11
1.4.2	Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)	12
1.4.3	CRISPR/Cas9	12
2	Aufgabenstellung	13
3	Materialien	14
3.1	Patientenproben	14
3.2	Verwendete Organismen	14
3.2.1	Eukaryotische Zelllinien	14
3.2.2	Prokaryotische Zellen	14

3.3	Zellkulturmedien	15
3.4	Medien für Bakterienkultur	15
3.5	Chemikalien und Reagenzien	16
3.6	Primer	17
3.7	Plasmide	17
3.8	Antikörper	19
3.9	Enzyme	19
3.10	Größenstandards	20
3.11	Antibiotika	20
3.12	Puffer	20
3.13	Kits	22
3.14	Verbrauchsmaterialien	22
3.15	Geräte	23
3.16	Software	24
4	Methoden	25
4.1	Molekulargenetische Methoden	25
4.1.1	DNA-Isolation aus Zellen	25
4.1.2	DNA-Isolation aus Gewebe	25
4.1.3	RNA-Isolation	26
4.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
4.1.5	Reverse Transkription von RNA in cDNA	26
4.1.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
4.1.7	Sanger-Sequenzierung	27
4.1.8	Quantitative Echtzeit PCR (qPCR)	27
4.1.9	Proteinisolierung	28
4.1.10	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
4.1.11	SDS-PAGE und Western Blot	29
4.1.12	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	29
4.1.13	Design der guide-RNA für CRISPR/Cas9	30
4.1.14	CRISPR/Cas9 Plasmidklonierung	30
4.1.15	Transformation	31
4.1.16	Isolation der Plasmid-DNA	32
4.2	Zellbiologische Methoden	32
4.2.1	Eukaryotische Zelllinien	32
4.2.2	Passagieren der Zellkulturen	32
4.2.3	Auszählen eukaryotischer Zellen	32
4.2.4	Transfektion	33

4.2.5	Einzelzell-Klonierung	33
4.2.6	MTT - Test	33
4.2.7	Immunhistochemische Färbung	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Mutationscreening auf <i>BCORL1</i> -Mutationen in Hepatoblastompatienten .	35
5.2	Expression von <i>BCORL1</i> und <i>CDH1</i> in den Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B	36
5.3	<i>BCORL1</i> Überexpression	37
5.3.1	Ermittlung der Transfektionsrate	37
5.3.2	Quantitative Bestimmung der exogenen Expression und Nachweis des Fusionsproteins im Western Blot	37
5.3.3	Zellmorphologie der BCoR-L1 überexprimierten Zelllinie HUH7 . . .	38
5.4	Etablierung eines <i>BCORL1</i> -Knockouts mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems	38
5.4.1	Beschreibung des Transfektionsplasmids	39
5.4.2	Ermittlung der Puromycinkonzentration zur Selektion positiv trans- fizierter Zellen	40
5.4.3	Design der Schnittstellen der DNA und Effizienz des Knockouts . . .	40
5.4.4	Kontrolle der Einzellzellklone auf einen klonalen Knockout	42
5.5	Analysen des <i>BCORL1</i> -Knockouts	42
5.5.1	Phänotyp der HUH7-Knockout-Zelllinie	42
5.5.2	Proliferationsanalysen mittels MTT-Tests	43
5.5.3	Immunhistochemische Färbungen auf die Zelladhäsionsmarker β - Catenin und E-Cadherin	43
5.6	RNA-Sequenzierungsdaten der <i>BCORL1</i> - Knockoutzellen	45
6	Diskussion	48
6.1	Im Hepatoblastom treten gehäuft <i>BCORL1</i> -Mutationen auf	48
6.2	Expression von BCoR-L1 in unterschiedlichen Zelllinien	49
6.3	Funktionalität des CRISPR/Cas9-Systems zur Generierung eines Knockouts	50
6.3.1	Vorteile des CRISPR/Cas9-Systems	50
6.3.2	Hindernisse des CRISPR/Cas9-Systems	50
6.3.3	Effizienz der Etablierung eines Knockouts von <i>BCORL1</i> in Leber- tumorzellen mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems	52
6.4	Veränderungen des tumorbiologischen Zellverhaltens nach einem <i>BCORL1</i> -Knockout	52
6.4.1	Einstellung eines makroskopisch veränderten Wachstumsverhaltens in HUH7-Zellen nach <i>BCORL1</i> -Knockout	53

6.4.2	Langsamere Proliferation der <i>BCORL1</i> -Knockout-Zelllinien im Vergleich zu HUH7-Wildtypzellen	55
6.4.3	Möglicher Zusammenhang eines <i>BCORL1</i> -Knockouts mit der Redifferenzierung zu Tumorstammzellen	56
6.5	Veränderungen der Genexpressionslevel in Lebertumorzellen nach einem <i>BCORL1</i> -Knockout	56
6.5.1	RNA-Sequenzierungsdaten der HUH7 Knockout-Zelllinie zeigen eine veränderte Expression von Genen der Zelladhäsion und der Zellverbindung	56
6.5.2	Ein <i>BCORL1</i> -Funktionsverlust induziert die Expression von <i>KRT 19</i> und <i>KRT 15</i>	57
7	Zusammenfassung	59
	Abkürzungsverzeichnis	60
	Literaturverzeichnis	65
	Danksagung	81

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Hepatoblastom

1.1.1 Epidemiologie

Das Hepatoblastom (HB) ist eine sehr selten auftretende, maligne Tumorerkrankung der Leber mit einer Inzidenz von 1,6 Fällen pro einer Million Kinder unter 14 Jahren [1]. Allerdings macht es ca. 1 % aller pädiatrischer Tumorerkrankungen aus und ist der häufigste Lebertumor des Kindesalters [2,3]. Das Hepatoblastom betrifft überwiegend Säuglinge und Kleinkinder bis zum dritten Lebensjahr, womit das Hepatoblastom nach dem Neuroblastom und dem Nephroblastom der dritthäufigste abdominelle Tumor dieser Altersgruppe ist [4]. Erstmals beschrieben wurde ein Kind mit einem Hepatoblastom im Jahr 1898 [5]. Obgleich es meist sporadisch auftritt, kommt es selten im Rahmen von genetischen Erkrankungen wie zum Beispiel dem Beckwith-Wiedemann Syndrom, dem Edward's Syndrom oder der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) zum Auftreten eines Hepatoblastoms [6–8].

1.1.2 Histopathologische Klassifikation

Das Hepatoblastom ist ein epithelialer Tumor, welcher in fünf Kategorien (fetal, embryonal, makrotrabekulär, kleinzellig undifferenziert und cholangioblastisch) entsprechend der unterschiedlichen Stadien der Leberentwicklung eingeteilt wird [9]. In Ausnahmefällen kommt es zu Mischformen aus entweder mesenchymalen Derivaten und / oder teratoiden Zellen. Hierbei können Osteoide, Skelettmuskulatur oder Knorpel, sowie Plattenepithel, neuroektodermale Strukturen oder Drüsengewebe Teil des Tumors sein (siehe Tabelle 1.1). Das gut differenzierte fetale Hepatoblastom korreliert mit einer besseren Prognose. Gleichzeitig wird spekuliert, dass das embryonale Hepatoblastom aufgrund einer höheren Proliferationsrate eine etwas schlechtere Prognose besitzt, was bisher nicht belegt werden konnte [10–12]. In Einzelfällen kann es histologisch auch zu einem Mischbild aus Charakte-

Tabelle 1.1: Histopathologische Klassifikation des Hepatoblastoms [9]

Epithelial	
Fetal	„gut differenziert“: gleichförmig (10-20 μm im Durchmesser), runder Zellkern, Stränge mit minim mitotischer Aktivität (≤ 2 pro 10/400 Mikroskopfelder), extramedullare Hämatopoese „überfüllt“ oder mitotisch aktiv (>2 pro 10/400 Mikroskopfelder), auffällige Nukleoli, weniger Glykogen „pleomorph“ oder schlecht differenzierte, moderate Anisonukleose, hoher N/C (Nukleusanzahl pro Zytoplasmaanteil), Nukleoli „anaplastisch“ Nukleusvergrößerung und Pleomorphismus, Hyperchromasie, abnormale Mitose
Embryonal	10-15 μm im Durchmesser, hoher N/C, abgewinkelte Nukleoli, primitive Tubuli, extramedullare Hämatopoese
Makrotrabekular	epitheliales Hepatoblastom (fetal oder embryonal) wachsend in Trabekeln von >5 Zellen Dicke (zwischen den Sinusoiden)
Kleinzellig undifferenziert	5-10 μm im Durchmesser, kein architektonisches Muster, minimales, blasses, amphophiles Zytoplasma, runde bis ovale Nuklei mit feinem Chromatin und unauffälligen Nukleoli, +/- Mitose, muss von malignen, INI1-negativen Rhabdoidtumoren differenziert werden
Cholangioblastisch	Gallengänge, normalerweise in der Peripherie von epithelialen Inseln
Gemischt	
Stromale	Spindelzellen, Osteoid, Skelettmuskel, Knorpel
Teratoid	gemischt, primitives Endoderm, Plattenepithel, neuroektodermale Strukturen, Melanin, Drüsengewebe

ristika von Hepatoblastom und hepatozellulärem Karzinom (HCC) kommen. Diese werden als maligne transitionelle Leberzelltumore bezeichnet. Klinisch zeigen diese Tumore ein zum HCC ähnlich aggressives Verhalten mit Gefäßinvasion und Fernmetastasierung [13].

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Klinisch präsentiert sich das Hepatoblastom meist durch eine asymptomatische Hepatomegalie (siehe Abbildung 1.1).

Weitere Symptome können Gewichtsverlust, Inappetenz, Müdigkeit, Schmerzen und Ikterus sein [14]. Schon länger ist eine Assoziation des Hepatoblastoms mit Frühgeburtlichkeit und einem sehr niedrigen Geburtsgewicht (<1.500 g) bekannt [15, 16]. Die Diagnostik besteht aus Blutproben und Bildgebung, wobei hier die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie eine Schlüsselrolle spielen. Im Blut spielt vor allem der Tu-



Abbildung 1.1: links: Patient mit Hepatoblastom bei massiver Hepatomegalie; rechts: Hepatektomie-Präparat

mormarker Alpha-Feto-Protein (AFP) eine wichtige Rolle als diagnostischer und prognostischer Marker, indem erhöhte Werte $>1.000.000$ ng/ml oder sehr niedrige Werte <100 ng/ml eine schlechtere Prognose andeuten [17]. Auch beta-human Chorion-Gonadotropin (β -HCG) spielt als Tumormarker eine wichtige Rolle und ist in ca. 20 % erhöht. Zum Ausschluss einer viralen Genese sollten im Blut Antikörper gegen Hepatitis-Viren, sowie deren Antigene analysiert werden. Zusätzlich sollte zum Ausschluss eines Neuroblastoms CEA, NSE sowie Katecholamine im Urin bestimmt werden [18]. Falls bei einem Kind im Alter zwischen sechs Monaten und drei Jahren ein Lebertumor auffällt, kann bei erhöhtem Plasma-AFP (>1.000 ng/ml und mindestens über der 3-fachen Altersnorm) auf eine Biopsie zur Diagnosesicherung des Hepatoblastoms verzichtet werden [4]. In anderen Fällen kann eine Tumorbiopsie offen, laparoskopisch oder als perkutane Stanzbiopsie gewonnen werden. Von einer Feinnadelpunktion ist allerdings abzusehen [18].

1.1.4 Einteilung der Tumorstadien

Es gibt weltweit vier große Konsortien, die an Lebererkrankungen der Kindheit forschen. Die europäische internationale „Society of Pediatric Oncology group“ (SIOPEL), die nord-amerikanische „Children’s Oncology Group“ (COG) und nationale Arbeitsgruppen in Deutschland „Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie“ (GPOH) und in Japan „Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor“ (JPLT). Diese kooperieren eng mit den Arbeitsgruppen IPSO (International Society of Paediatric Surgical Oncology) und IPSA (International Pediatric Transplant Association), um die Stadieneinteilung und Therapieentscheidungen zu treffen. Jede dieser Gruppen geht nach eigenen Stan-

dards vor, die jedoch zunehmend zusammengelegt werden. So wurde durch SIOPEL ein Tumorstadien-System „PRE-Treatment tumor EXTension“ (PRETEXT) entwickelt, welches über die Jahre weiter verfeinert wurde.

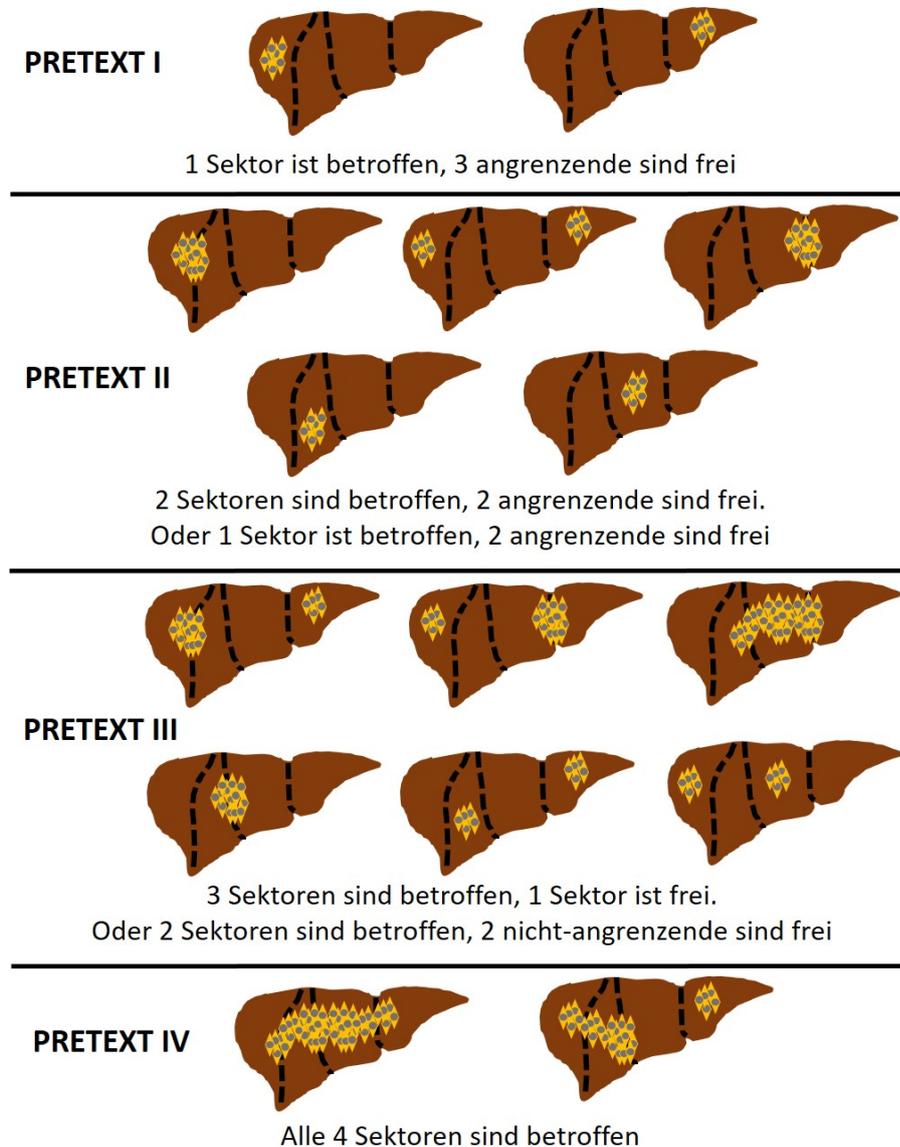


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der PRETEXT-Einteilung je nach Lage und Ausdehnung des Tumors. Eigene Darstellung nach Trobaugh-Lotrario et al. [19]

Die Stadieneinteilung des Hepatoblastoms vor einer Therapie erfolgt von Region zu Region unterschiedlich. Die verbreitetste Methode ist nach der Gruppe SIOPEL, dessen Einteilung mittels Blutproben, CT oder MRT erfolgt [20]. Die PRETEXT-Klassifikation wird verwendet, um die Tumorausdehnung mittels CT oder MRT vor Therapiebeginn zu bestimmen und bietet somit eine effektivere Vergleichbarkeit zwischen Studien der unterschiedlichen

Arbeitsgruppen. Die Klassifikation zeigt eine gute Reproduzierbarkeit [21] und einen guten prognostischen Wert bei Kindern mit Hepatoblastom [21–23]. PRETEXT wird vor allem in von SIOPEL durchgeführten Studien als Risikostratifizierung verwendet. Die meisten anderen Gruppen verwenden die Klassifikation ausschließlich für diagnostische Schritte und benutzen ein anderes Einteilungs-Verfahren. Die Klassifikation unterteilt sich in vier Kategorien (I-IV), welche die Anzahl der betroffenen Lebersektoren beschreibt (siehe Abbildung 1.2). Die extrahepatische Ausdehnung wird, wie in Tabelle 1.2 gezeigt, mit zusätzlichen Buchstaben beschrieben. [20, 21].

Tabelle 1.2: 2005 PRETEXT Einteilung: Zusätzliche Kriterien nach Roebuck et al. [20]

Beteiligung des Lobus caudatus	C	C1 Tumor mit Beteiligung des Lobus caudatus C0 Alle anderen Patienten	Alle C1 Patienten sind mindestens PRETEXT II
Extrahepatische intraabdominelle Beteiligung	E	E0 Kein Nachweis einer abdominellen Tumorausbreitung (außer M oder N) E1 Direkte Ausbreitung des Tumors in benachbarte Organe oder das Zwerchfell E2 Peritoneale Knoten	Bei Aszites zusätzlich Suffix „a“
Fokalität des Tumors	F	F0 Patienten mit solitärem Tumor F1 Patienten mit zwei oder mehr Tumoren	
Tumorruptur oder Blutung	H	H0 Alle anderen Patienten H1 Bildgebung oder klinische Befunde einer intraperitonealen Blutung	
Fernmetastasen	M	M0 Keine Fernmetastasen M1 Alle Metastasen (außer E und N)	Suffix je nach Lokalisation
Lymphknoten (LK) Metastasen	N	N0 Keine LK-Metastasen N1 Nur abdominelle LK-Metastasen N2 Extraabdominelle LK-Metastasen	
Beteiligung der Portalvene	P	P0 Keine Beteiligung P1 Beteiligung von entweder des rechten oder linken Asts der Portalvene P2 Beteiligung des Hauptstamms	Bei intravasikulärem Wachstum Suffix „a“
Beteiligung der Vena cava inferior (IVC) und/oder der Vv. hepaticae	V	V0 Keine Beteiligung der Venae hepaticae oder der IVC V1 Beteiligung einer V. hepatica, nicht IVC V2 Beteiligung zweier Vv. hep., nicht IVC V3 Beteiligung aller 3 Vv. hep. +/- IVC	Bei intravasikulärem Wachstum Suffix „a“

Die PRETEXT-Klassifikation wird auch nach zwei Zyklen neoadjuvanter Chemotherapie verwendet, um die Ausdehnung des Tumors zu beschreiben, was dann POSTTEXT-Klassifikation (post-treatment extension) genannt wird [24].

Metastasen

Hepatoblastompatienten mit hämatogen gestreuten Metastasen werden als M1 klassifiziert. Typischerweise manifestieren sich Metastasen des Hepatoblastoms in der Lunge und stellen sich in der Computer-Tomographie als meist mehrfach auftretende, >5 mm, runde, klar begrenzte Raumforderungen dar, mit einer meist subpleuralen Lage. Metastasen in weiteren Organen finden sich beim Hepatoblastom nur selten, zeigen sich jedoch häufiger beim hepatozellulären Karzinom. Hierbei kann es zu Hirn-, Knochen-, oder Knochenmarksmetastasierung kommen. Dabei wird zusätzlich zur Bezeichnung M1 die Kategorien p (pulmonal), s (skeletal), c (zentrales Nervensystem), m (Knochenmark) oder x (weitere Lokalisationen) hinzugefügt. Somit wird ein Hepatoblastom bei einem Kind mit alleinigen Lungenmetastasen als M1p beschrieben. Patienten ohne Nachweise einer hämatogenen Streuung werden als M0 klassifiziert.

Lymphknotenmetastasen entlang der Vena porta hepatis sowie andere abdominelle Lymphknotenstationen sind selten. Die Differenzierung zwischen einer benignen Lymphknotenvergrößerung und einer Metastase kann nur durch eine Biopsie gestellt werden. Hierbei rät die SIOPEL-Gruppe allerdings aufgrund der möglichen Komplikationen aktiv von einer standardmäßig durchgeführten Biopsie ab. Kinder ohne Lymphknotenmetastasen werden als N0 klassifiziert, diejenigen mit ausschließlich abdomineller Beteiligung (unterhalb des Zwerchfells und oberhalb des Ligamentum inguinale) als N1 und diejenigen mit extra-abdomineller Lymphknotenmetastasierung als N2 [20].

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Hepatoblastoms setzt sich aus verschiedenen Bausteinen zusammen. Aus chirurgischer Sicht ist eine Biopsie routinemäßig zu empfehlen und eine präoperative (neoadjuvante) Chemotherapie durchzuführen, da es die Resektion vereinfacht. Eine primäre Resektion ist selten indiziert und nur bei kleinen solitären Tumoren und PRETEXT I und ggf. II möglich [18]. Durch eine Cisplatin-haltige neoadjuvante Chemotherapie konnte gezeigt werden, dass es bei bis zu 90 % zu einer verbesserten Resektabilität kommt [25]. Insgesamt kann durch dieses Verfahren der prä- und postoperativen Chemotherapie und Operation eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von knapp 80 % erreicht werden [26]. Auch Lungenmetastasen sollten reseziert werden, wobei sich die Prognose der Patienten durch die Metastasen verschlechtert [27]. Die Chemotherapie muss je nach Risikostratifizierung individuell auf den Patienten abgestimmt werden und unterliegt ständiger Fortentwicklung [23, 28, 29]. In seltenen, schwerwiegenden Fällen ist eine Lebertransplan-

tation nötig, falls das Hepatoblastom mehr als 3 Sektoren der Leber betrifft oder sich zentral und in zu engem Bezug zu den großen Venen befindet [30].

Risikostratifizierung, Chemotherapie und Prognose

Zur Stratifizierung welches Chemotherapieverfahren verwendet wird, werden drei Risikogruppen ermittelt (siehe Abbildung 1.3). Dabei werden je nach PRETEXT-Stadium

	Sehr gering	Gering	Intermediär	Hoch				
PRETEXT I	<ul style="list-style-type: none"> • M - • VPEFR - • Resektabel bei D 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • VPEFR - • Nicht resektabel bei D 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • VPEFR + • < 8 Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • VPEFR + • > 8 Jahre 	Oder:	☐ M +		
PRETEXT II	<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 8 Jahre • AFP > 100 • VPEFR - • Resektabel bei D 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 8 Jahre • AFP > 100 • VPEFR - • Nicht resektabel bei D 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 8 Jahre • AFP > 100 • VPEFR + 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 8 Jahre • AFP < 100 	Oder:	☐ M -	Oder:	☐ M +
PRETEXT III		<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 8 Jahre • AFP > 1000 • VPEFR - 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 8 Jahre • AFP > 1000 • VPEFR + 	Oder:	☐ M -	☐ < 8 Jahre	☐ AFP 101 - 1000	
PRETEXT IV			<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 3 Jahre • AFP > 100 	<ul style="list-style-type: none"> • M - • < 3 Jahre • AFP < 100 	Oder:	☐ M -	☐ > 3 Jahre	

Abbildung 1.3: Risikostratifizierung nach Meyers et al. [31]. AFP Grenzwerte in ng/ml, bei D = bei Diagnose, M und VPEFR siehe Tabelle 1.2

Fernmetastasen (M), Alter, Höhe des AFP und extrahepatische Beteiligungen (VPEFR) berücksichtigt. Ein sehr geringes Risiko besitzen Patienten in PRETEXT Stadium I oder II ohne Fernmetastasen oder extrahepatischer Beteiligung und insbesondere mit einem resektablen Hepatoblastom bei Diagnosestellung. Sobald Fernmetastasen (M+) vorhanden sind, werden diese Patienten in die Hochrisikogruppe eingeteilt. Allgemein lässt sich anhand der Risikogruppen die 5-Jahres-Überlebensrate abschätzen. Diese beträgt in Risikogruppe 1 (sehr gering und gering): $\geq 89\%$, in Risikogruppe 2 (intermediär): $50-88\%$ und in Risikogruppe 3 (hoch): $\leq 50\%$ [31]. Generell werden eine Vielzahl an Chemotherapeutika eingesetzt. Hierbei kommt meist Cisplatin zum Einsatz, welches mit Carboplatin, Doxorubicin, Ifosfamid, Etoposid, Vincristin, 5-Fluorouracil und Irinotecan kombiniert wird. In Risikogruppe 1 wird derzeit von der GPOH die Kombinationstherapie von präoperativ 2-3x Cisplatin und Doxorubicin (PLADO) und postoperativ 1x PLADO empfohlen [32]. Auch eine Monotherapie von Cisplatin ist möglich [33]. In Risikogruppe 2 ist der Standard eine Therapie präoperativ mit einer 4-maligen Gabe von Cisplatin alternierend mit Carboplatin/Doxorubicin 3-malig und postoperativ Carboplatin/Doxorubicin 2-malig alternierend mit Cisplatin 1-malig [34]. In Risikogruppe 3 erfolgt eine Kombination aus präoperativ Cisplatin/Doxorubicin 3-malig und Carboplatin/Doxorubicin 1-malig, postoperativ Carboplatin/Doxorubicin einmalig [35].

Als nächste große internationale Studie wird aktuell an der PHITT-Studie (Paediatric Hepatic International Tumour Trial) gearbeitet, die sowohl eine Therapieoptimierung als auch molekulargenetische Alterationen mit prognostischer Signifikanz prospektiv prüfen soll.

1.2 Genetik des Hepatoblastoms

1.2.1 Mit dem Hepatoblastom assoziierte syndromale Erkrankungen

Obwohl viele Fälle nur sporadisch auftreten, gibt es eine deutlich erhöhte Inzidenz des Hepatoblastoms in Patienten mit syndromalen Erkrankungen [36]. Die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP), eine autosomal rezessive Erkrankung, die mit einer Manifestation von zahlreichen Kolonpolypen einhergeht und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), welches sich als überproportionales Größenwachstum vor allem der inneren Organe manifestiert, sind die zwei verbreitetsten mit dem Hepatoblastom assoziierten Syndrome. Patienten mit FAP tragen eine Keimbahnmutation des adenomatösen polyposis coli- (APC) Tumorsuppressorgens, was zur Entwicklung der Kolonpolypen und der weiteren Progression zu einem Kolonkarzinom führen kann. Das Risiko eines Hepatoblastoms in einem Kind mit FAP liegt bei 0,4 % [37]. Beckwith-Wiedemann-Patienten tragen meist eine Variation des kurzen Armes des Chromosoms 11. Hierbei ist zum Beispiel bei Patienten mit der Chromosom 11p15.5 uniparentalen Isodisomie (UPD) bekannt, dass ein erhöhtes Risiko besteht einen embryonalen Tumor zu entwickeln [38]. An diesem Lokus, Chromosom 11p15.5, liegt das *IGF2* Gen, welches bei einer Veränderung ein für das BWS charakteristisches Bild des Großwuchs, Fehlbildungen und Entstehung von Tumoren hervorruft. Für Patienten mit dem Beckwith-Wiedemann Syndrom ist das Risiko ein Hepatoblastom zu bekommen 2.280-mal größer als das gesunder Kinder [6].

1.2.2 Die Rolle somatischer Mutationen (CTNNB1, NFE2L2 und TERT) im Hepatoblastom

Die Vermutung, dass vergleichsweise wenig genetische Veränderungen bis zur Ausbildung eines malignen Phänotyps der Leberzellen nötig sind, konnte mittlerweile bestätigt werden. Das Hepatoblastom weist mit nur drei Aberrationen pro Tumor die niedrigste Mutationsrate bislang systematisch sequenzierter Tumorentitäten auf [39].

CTNNB1 zeigt die höchste Mutationsrate im Hepatoblastom

Es hat sich herausgestellt, dass in 50-90 % der Fälle eine Mutation im Gen *CTNNB1* (β -Catenin) liegt, welches eine zentrale Rolle im Wnt-Signalweg einnimmt. Dies ist eine

der höchsten Mutationsraten, die in menschlichen Neoplasien gefunden wurde [40]. Interessanterweise zeigten leberspezifische Knockout-Mäuse mit aktiviertem *CTNNB1* Hepatoblastom-ähnliche Tumore der Leber [41]. β -Catenin spielt eine entscheidende Rolle in der Zelladhäsion, indem es an E-Cadherin bindet. Außerdem beeinflusst es die Zellproliferation durch die regulatorische Funktion im WNT-Signalweg [42]. Somatische Mutationen von Genen, die wie zum Beispiel *APC*, *AXIN1* und *AXIN2* Teil des Abbaukomplexes sind, wurden ebenfalls in seltenen Fällen in Hepatoblastomen gefunden [43–45]. Interessanterweise sind diese Genmutationen von *CTNNB1*, *AXIN1* und *AXIN2* auch im adulten hepatozellulären Karzinomen beschrieben [44, 46], was die Rolle des aktivierten WNT-Signalwegs in der Entstehung von Lebertumoren aller Altersgruppen unterstreicht [47].

NFE2L2 Mutationen kommen im Hepatoblastom und HCC vor

Bei Whole-Exome Sequencing Analysen an Hepatoblastomen und TLCT zeigte sich die zweitgrößte Anreicherung von Mutationen, nach den bereits bekannten *CTNNB1*-Genmutationen (hier 72,5 %), bei dem Transkriptionsfaktor *NFE2L2/NRF2* (nuclear factor-erythroid-2-related-factor-2) mit einer Mutationsrate von 9,8 % [39]. Dieser ist verantwortlich für die Aktivierung von Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress und spielt damit eine entscheidende Rolle im Prozess des zellulären Überlebens [48]. Allerdings wurde gezeigt, dass *NFE2L2* nicht nur das Überleben gesunder Zellen fördert, sondern ebenfalls das von Tumorzellen, da vor allem Tumorzellen oxidativen Stress ausgesetzt sind und *NFE2L2* zusätzlich Schutz vor Chemotherapeutika [49] und Strahlentherapie [50] bietet. Vor allem der Fund von Mutationen von *NFE2L2* zusammen mit *CTNNB1* nicht nur im Hepatoblastom und TLCT, sondern auch in pädiatrischen HCCs [51] unterstreicht die mögliche Relevanz der gemeinsam auftretenden Mutationen in der Entstehung pädiatrischer Lebertumore.

Mutationen des TERT-Promoters spielen in der Transition vom Hepatoblastom zum HCC eine Rolle

Als dritthäufigste gefundene Mutation zeigte sich in der von Eichenmüller et al. durchgeführten Studie die Telomerase-reverse-Transkriptase (*TERT*) mit einer Mutationsrate von 5,9 % [39]. Es ist bereits bekannt, dass in Lebertumoren des Erwachsenenalters Mutationen des TERT-Promoters als die frühesten genetischen Veränderungen zu finden sind, da sie sich bereits in präkanzerösen Läsionen zeigen und sich im Anschluss in der Regel in ein HCC weiterentwickeln [52]. Bei Kindern lassen sich die Mutationen des TERT-Promoters allerdings nur in den transitionellen Leberzelltumoren und nicht im Hepatoblastom darstellen [39]. Dies deutet darauf hin, dass Kinder im Gegensatz zu Erwachsenen erst bei einer Tumorprogression vom Hepatoblastom in Richtung TLCT und HCC diese

Mutation erwerben.

1.3 Transkriptionelle Regulation

1.3.1 Gegenspiel von Koaktivatoren und Korepressoren

Die allgemeine transkriptionelle Maschinerie einer Zelle hängt von zwei entscheidenden Faktoren ab, der Aktivierung oder Deaktivierung der Genexpression durch DNA-gebundene Aktivatoren oder Repressoren [53]. Ko-Aktivatoren oder -Repressoren interagieren mit DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren, um Multiproteinkomplexe zu rekrutieren. Diese beeinflussen durch eine Veränderung der Chromatinstruktur die Transkription des Zielgens [54]. Da Korepressoren bereits auf epigenetischer Ebene die Transkription inaktivieren, sind diese für die Tumorentstehung und dessen ungehemmtes Wachstum von entscheidender Bedeutung [55]. In Tumorzellen können erhöhte Expressionslevel von Korepressoren zu einer signifikanten Repression der Zielgenexpression führen. Am ehesten geschieht dies, wie in Abbildung 1.4 gezeigt, durch die Verhinderung des positiven mRNA-Transkriptionszyklus [55]. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in Tumoren auch eine Funktionsverlustmutation eines Korepressors für die Onkogenese relevant ist [56]. Deshalb nehmen Korepressoren einen immer größer werdenden Teil der Tumorforschung ein, da versucht wird sie als potentielle Therapieziele einzusetzen [57].

1.3.2 Die Rolle eines Korepressors

Korepressoren interagieren in Multiproteinkomplexen, um ihre Funktion wie die Bindung der DNA, Deacetylierung der Histone und Modulierung der Methylierung über CpG-bindende Proteine ausüben zu können. Derselbe Korepressor kann in unterschiedlichen Multiproteinkomplexen auftreten und gleichzeitig agieren in einem Multiproteinkomplex unterschiedliche Korepressoren. Die wichtigste Rolle eines Korepressors ist die Vermittlung der Bindung des Multiproteinkomplexes an DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren [58].

1.3.3 Acetylierung der Histone

In der Aktivierung der Transkription spielt sowohl die Acetylierung von Histonen als auch die Deacetylierung zur Deaktivierung der Transkription eine wichtige Rolle. Die Acetylierung des Histonschwanzes sorgt für eine offenere Chromatinstruktur und ist somit einfacher für Transkriptionsfaktoren erreichbar. Gegenätzlich verhindert eine Deacetylierung die Öffnung des Chromatins und sorgt somit für eine geringere Transkription [59,60]. Für die Acetylierung und die Deacetylierung verantwortlich sind Histon-Acetyltransferasen und Deacetylasen (HDACs). Unter den HDACs gibt es vielfältige Subtypen und Formen, die für die Katalyse verantwortlich sind [61].

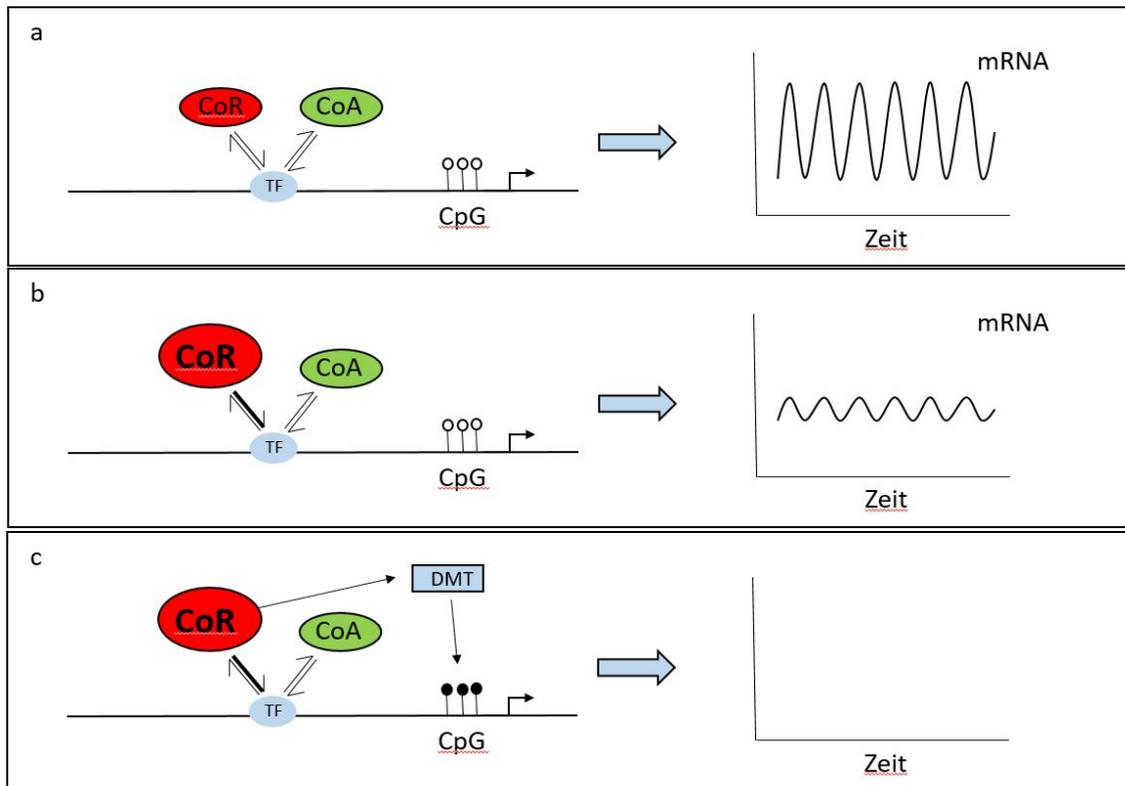


Abbildung 1.4: Model der Inaktivierung der Genexpression durch Korepressoren

Abbildung a zeigt die Balance zwischen Koaktivatoren (CoA) und Korepressoren (CoR) im normalen System. Diese werden dabei im dauerhaften Wechselspiel vom Transkriptionsfaktor (TF) rekrutiert, was in der alternierenden, hochvariablen Expression der mRNA (rechts) resultiert.

Abbildung b zeigt, dass bei einer erhöhten Aktivierung des Korepressors in beispielsweise Tumorzellen die Flexibilität der mRNA-Expression verloren geht und den Transkriptionszyklus limitiert.

Abbildung c verdeutlicht, dass bei dauerhafter Repression durch den Korepressor eine Chromatinstrukturierung entsteht. Dabei wird der CpG-Methylierungs-Komplex (u.a. die DNA-Methyltransferase (DMT)) aktiviert, der zu einer dauerhaften Stummschaltung des Gens führt. Diese ist stabil und kann genetisch vererbt werden. Eigene Darstellung nach Thorne et al. [55]

1.3.4 Eigenschaften von *BCORL1* (BCL6 Corepressor Like 1)

BCORL1 (BCL6 like Corepressor 1) ist ein 1711 Aminosäuren langes, auf dem X - Chromosom liegendes Gen [62]. Als Korepressor sorgt BCoR-L1 in der Bindung an Promoterregionen für eine Repression des Zielgens. Um diese Funktion ausüben zu können, wird BCoR-L1 über eine Kernlokalisierungssequenz nach intranukleär rekrutiert. Für BCoR-L1 konnte eine Interaktion mit den Histon Acetyltransferasen und Deacetylasen (HDACs) der Klasse II (HDAC4, HDAC5 und HDAC7) gezeigt werden. BCoR-L1 besitzt außerdem eine PXDLS Domäne, wodurch eine Modulation der Repression über die Bindung mit dem C-terminal binding protein (CtBP) erfolgt. Ohne diese Interaktion mit CtBP kann BCoR-L1 seine Funktion als Korepressor nicht wahrnehmen. Über diesen engen Bezug konnte für ein bekanntes Zielgen der CtBP-Repression, E-Cadherin, eine Repression durch BCoR-L1

gezeigt werden [62]. E-Cadherin ist ein entscheidender Faktor für die Zelladhäsion [63] und vor allem bei invasiv wachsenden Tumoren häufig reprimiert [64, 65]. Da BCoR-L1 über CtBP diese Funktion übernehmen kann, könnte eine Veränderung von *BCORL1* das Tumerverhalten beeinflussen [62]. Bisher konnten Mutationen von *BCORL1* in zahlreichen Tumorentitäten dargestellt werden. So wurden in myelodysplastischen Syndromen [66], der akuten myeloischen Leukämie [67], Mamma-Karzinomen [68] und in intrakraniellen Keimzelltumoren [69] Mutationen von *BCORL1* gefunden.

1.3.5 Die Rolle von *BCOR* und *BCORL1*

Das Gen *BCOR* (BCL6 Corepressor) ist genauso wie *BCORL1* auf dem X-Chromosom lokalisiert. Es agiert durch Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren als Corepressor von BCL6 [62] und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der frühen Embryonalentwicklung und Hämatopoese [70], sowie in mesenchymalen Stammzellfunktionen [71]. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Corepressoren unterscheiden sie sich in wesentlichen Punkten. BCoR interagiert im Gegensatz zu BCoR-L1 mit BCL6, sie besitzen unterschiedliche Expressionslevel in humanem Gewebe und unterscheiden sich in ihrer Lokalisation in subnukleären Strukturen [72]. Dies weist auf eine unterschiedliche Funktion der beiden Corepressoren hin.

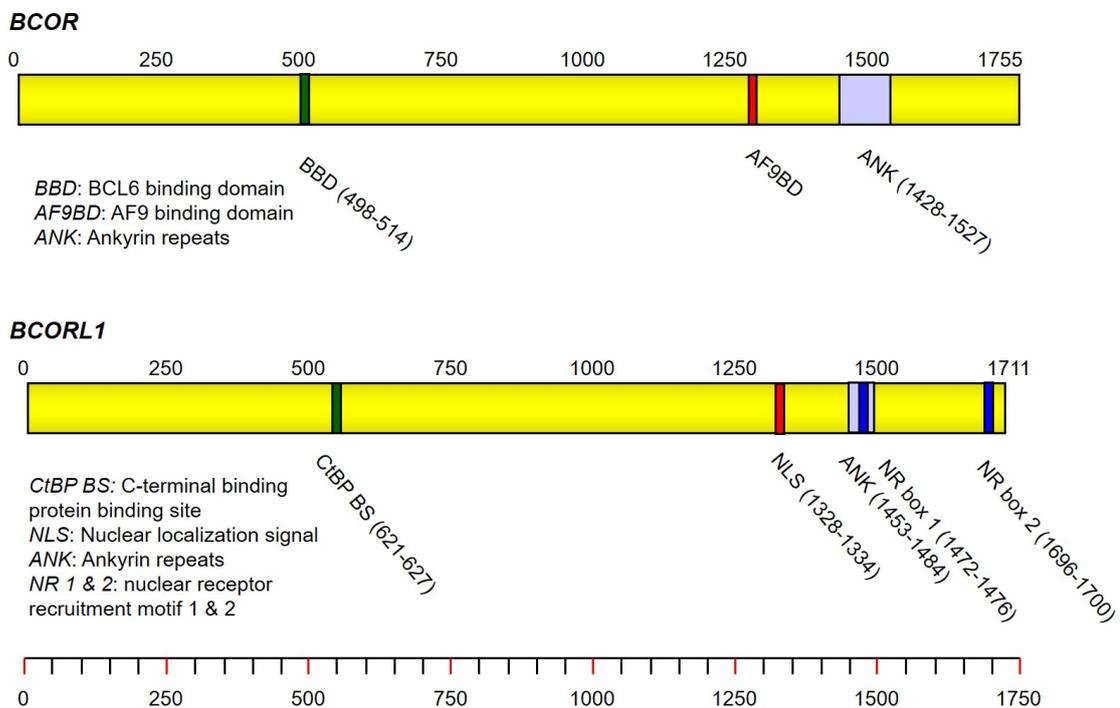


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von *BCOR* (oben) und *BCORL1* (unten) mit den jeweiligen funktionellen Domänen und Länge in Aminosäuren. Eigene Darstellung nach Pagan et al. [62]

1.4 Generierung eines gezielten Genknockouts

Die Möglichkeit das komplexe Genom präzise modulieren zu können, eröffnet seit den 1990er Jahren neue Möglichkeiten in der Biologie und zeigt seither rasante Fortschritte [73]. Um einen Knockout eines Gens zu erstellen, wird ein DNA-Doppelstrangbruch durch eine zugeführte Nuklease induziert. Da dies an einer geplanten Stelle innerhalb des Genoms stattfinden soll, muss dieser Komplex zielgerichtet an die Lokalisation herangeführt werden. Dies erfolgt über die Basencodierung der DNA und der Herstellung von gezielten Gegensträngen, die an die gewünschten Stellen des Genoms binden und die Nuklease dorthin transportieren. Nach erfolgtem Transport wird der DNA-Doppelstrang durch die Nuklease geschnitten und somit der DNA-Code unterbrochen. Durch die DNA-Reperaturmechanismen wird die DNA durch Insertionen und Deletionen erneut zusammengefügt. Allerdings erfolgt dies meist auf Kosten des korrekten Leserasters und somit einem Verschiebung des Basencodes. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Transkription und letztendlich zu einer fehlerhaften Translation mit meist einem Abbau des resultierenden Proteinteils.

1.4.1 Zinkfinger-Nukleasen (ZFN)

Zinkfinger-Nukleasen sind eine Fusion aus erstellten Zinkfinger-DNA-Bindedomänen und einer unspezifischen Nuklease [74]. Die Zinkfinger-DNA-Bindedomänen funktionieren über einen Komplex aus drei Zinkfingern, welche jeweils drei Basen erkennen. Die angehängte Endonuklease FokI wird durch die DNA-bindenden Zinkfinger an eine spezifische Lokalisation des Genoms geführt [75]. Da die FokI Schnitt-Domäne nur als Dimer aktiv ist, muss ein zweiter Zinkfinger-Nuklease-Komplex in einer Art „Rücken-an-Rücken“ Formation an die Zielstelle binden [76]. Die Schnittstelle erfolgt zwischen den Zinkfinger-Monomeren. Während der Nutzung der Zinkfinger-Nukleasen wurde jedoch eine erhöhte Zytotoxizität festgestellt [77–79]. Dies war auf eine erhöhte Rate von Nebenzielen im Genom und ungewollten Doppelstrangbrüchen zurückzuführen. Da jedoch vor allem für einen therapeutischen Einsatz der Genom-Veränderungen eine hohe Spezifität und möglichst wenige Nebenziele benötigt werden, zeigt sich diese Methode in der Anwendung als problematisch.

1.4.2 Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)

Ähnlich zu den Zinkfinger-Nukleasen bestehen auch TALENs aus einer DNA-Bindedomäne und einer künstlich hergestellten Endonuklease FokI. Ursprünglich in *Xanthomonas proteobacteria* entdeckt, bestehen TALEs aus Monomeren mit variablen Sequenzwiederholungen (sog. tandem repeats) [80, 81], die für die Bindung der DNA verantwortlich sind. Im Vergleich zu ZFNs sind TALENs einfacher und schneller zu erstellen und besitzen eine deutlich breitere Variabilität. Dadurch können TALENs an fast alle Bereiche der DNA

binden. Zusätzlich zeigt die Verwendung von TALENs deutlich weniger Nebenziele und eine geringere Zytotoxizität als dies bei ZFNs bekannt ist [82,83].

1.4.3 CRISPR/Cas9

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) sind DNA - Abschnitte, in denen sich kurze, wiederholende Basenabfolgen befinden. Diese spielen vor allem in Prokaryonten eine wichtige Rolle. Das erste Mal beschrieben wurden diese Sequenzen 1987 in *E.coli* Bakterien [84], wobei der eigentliche Name CRISPR erst 2002 durch R. Jansen et al. geprägt wurde [85]. Die Funktion dieser sich wiederholenden Sequenzen,

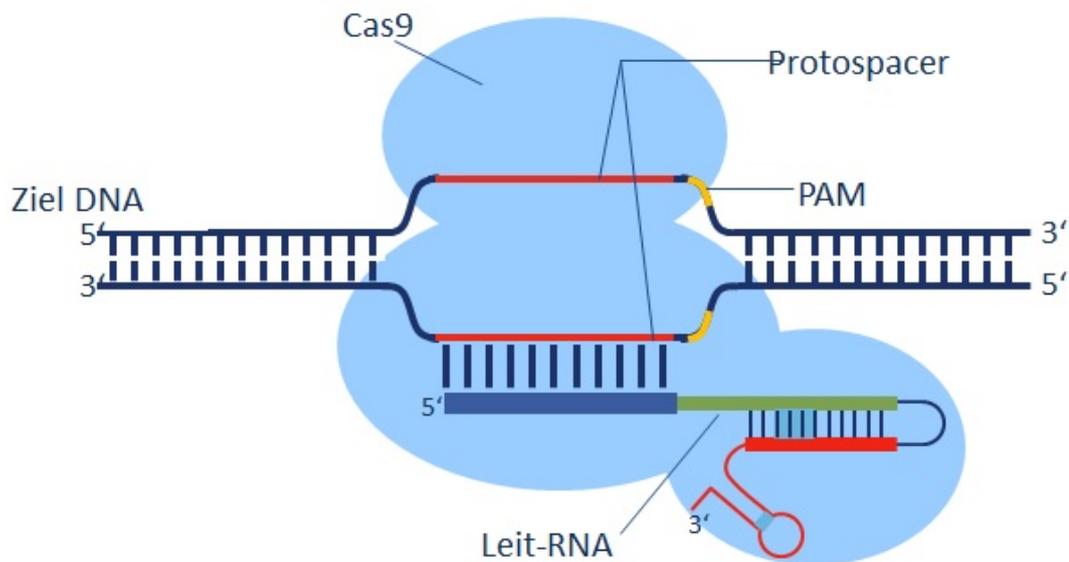


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Bindung des Cas9 Proteins an den Zielbereich des zu modulierenden DNA-Abschnitts mithilfe der guide RNA (Leit-RNA) und der PAM-Sequenz. Bild: Karin Garber, Open Science - Lebenswissenschaften im Dialog (CC BY-SA 3.0 AT)

die Bakterien vor Fremd-DNA schützen, wurde 2005 durch FJ. Mojica beschrieben [86]. Von Phagen eingebaute DNA wird durch eine sogenannte single guide RNA zusammen mit einem Cas9-Komplex erkannt. Durch die enzymatische Funktion der Cas9 als Endonuklease kann diese gezielt einen DNA-Doppelstrangbruch erzeugen. Für die Aktivierung der Cas9 ist ein PAM-Motiv (englisch protospacer adjacent motif) der Sequenz NGG notwendig. Anhand dieser Sequenz kann die Schnittstelle genau berechnet werden. Der DNA Reparaturmechanismus ruft anschließend Deletionen oder Insertionen hervor, die zu einem Leserasterverschub und somit zu einem früheren Stopcodon führen können.

Kapitel 2

Aufgabenstellung

Obwohl das Hepatoblastom der häufigste Lebertumor des Kindesalters ist, ist trotz eines bereits vorhandenen Verständnisses für die Entstehung des Tumors der Grund von Metastasierung oder besonders schweren Verlaufsformen weitestgehend unerforscht. Das Hepatoblastom zeigt vergleichsweise wenige Mutationen in den Zellen eines einzelnen Tumors. Deshalb wecken Genomanalysen der Hepatoblastompatienten Hoffnung, entscheidende Genmutationen zu identifizieren, die prognostisch und eventuell therapeutisch genutzt werden können.

Da in einer Whole-Exome-Sequencing Analyse von Hepatoblastomproben eine *BCORL1*-Mutation auffiel, war das erste Ziel dieser Arbeit, ein erweitertes *BCORL1*-Mutationscreening in Hepatoblastomfällen durchzuführen. Hierfür sollten aus 54 Patientenproben die Exons von *BCORL1* mittels PCR amplifiziert und per Sanger-Sequenzierung auf Mutationen untersucht werden.

In einem nächsten Schritt sollte die Auswirkung eines C-terminalen Verlusts des BCoR-L1 Proteins in Lebertumorzellen mittels eines durch CRISPR/Cas9 hergestellten Knock-Out-Modells analysiert werden. Anhand dieses Modells sollten funktionelle Analysen durchgeführt, sowie RNA-Sequenzierungsdaten erhoben werden, um ein genaueres Verständnis des Einflusses einer *BCORL1*-Mutation auf die Progression des Hepatoblastoms zu bekommen.

Zusammenfassend sollten diese Versuche, nachdem von *BCORL1* eine relevante Mutationsrate im Hepatoblastom nachgewiesen werden konnte, ein Modell erzeugen, in dem durch ein funktionsunfähiges BCoR-L1-Protein neue Erkenntnisse über die Rolle von *BCORL1*-Mutationen im Hepatoblastom gewonnen werden können.

Kapitel 3

Materialien

3.1 Patientenproben

Da in dieser Arbeit Hepatoblastomgewebe von Patienten der kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals verwendet wurde, wurde im voraus von jedem Patienten oder ggf. deren Erziehungsberechtigten eine Einverständniserklärung unterzeichnet und das Studienprotokoll von der Ethikkommission der LMU-München genehmigt (Antragsnummer 341-11).

3.2 Verwendete Organismen

3.2.1 Eukaryotische Zelllinien

HepT1 Homo sapiens	Hepatoblastom	Prof. Dr. Torsten Pietsch, Universität Bonn [87]
HUH6 Homo sapiens	Hepatoblastom	JCRB, Osaka, Japan
HUH7 Homo sapiens	Hepatozelluläres Karzinom	JCRB, Osaka, Japan
HepG2 Homo sapiens	Hepatoblastom	ATCC, Manassas, USA
Hep3B Homo sapiens	Hepatozelluläres Karzinom	ATCC, Manassas, USA
Hek293 Homo sapiens	Human Embryonic Kidney	ATCC, Manassas, USA

3.2.2 Prokaryotische Zellen

Subcloning Efficiency TM DH5 α TM Competent Cells	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
--	----------------------------

3.3 Zellkulturmedien

RPMI-1640 Medium (engl. Roswell Park Memorial Institute Medium)

RPMI-1640 Medium (1x) + GlutaMAXTM I (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde für die Zellkultur mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) versetzt.

DMEM Medium (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Es wurde DMEM-Medium (1x) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamine (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) für die Zellkultur verwendet.

Einfriermedium

Das Einfriermedium wurde aus folgenden Bestandteilen hergestellt:

50 ml FBS, 40 ml DMEM Medium (mit 1 % P/S), 12,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

3.4 Medien für Bakterienkultur

LB-Medium (Luria/Miller)

Es wurde 25 g Trockenmedium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,2) in 1 l ddH₂O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 55°C wurde das Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) hinzugegeben.

LB-Agar (Luria/Miller)

Es wurden 40 g Agar (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar, pH 7,2) in 1 l ddH₂O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 55°C wurde das Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) hinzugegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Es wurde bei Raumtemperatur ausgehärtet.

3.5 Chemikalien und Reagenzien

5x First Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
10x Buffer for T4 DNA Ligase with 10mM ATP	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
10x Hot Start PCR Buffer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Albumine Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bio Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x), ohne CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr), 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MTT formazan powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roti-Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Random-Hexamere	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tri Reagent RNA Isolation Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
UltraPure TM DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
VectashieldR with DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

3.6 Primer

Sequenzierungsprimer zur Mutationsanalyse

Tabelle 3.1 zeigt die Bezeichnungen (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (fw) in 5'-3'-Richtung und des Rückwärts Primers (rv), die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren (Amplikonlänge incl. Primer) und die Lage der Primer innerhalb der BCORL1-Exons (Ex) an. Die Primer wurden von der Firma Eurofins, Ebersberg synthetisiert.

Targetoligonukleotide für CRISPR/Cas9

In Tabelle 3.2 sind die Bezeichnungen, die Funktion und Sequenz in 5'-3'-Richtung aller für CRISPR/Cas9 verwendeter Targetoligonukleotide angegeben. Die Sequenzen CACC (Top-Strand) und AAAC (Bottom-Strand) fungieren als sticky-ends.

Sequenzierungsprimer zur Bestätigung des erfolgreichen Frameshifts durch CRISPR/Cas9

Tabelle 3.3 zeigt die benötigten Sequenzierungsprimer, um einen erfolgreich erzeugten Frameshift durch CRISPR/Cas9 zu bestätigen.

qPCR Expressionsprimer

In Tabelle 3.4 werden die verwendeten Expressionsprimer zur Durchführung der qPCR dargestellt.

3.7 Plasmide

eSpCas9(1.1)-2A-Puro	Dr. Lars Koenig (LMU München)
pEGFP-C1-BCORL1	Pagan et. al. [62]
pSpCas9(BB)-2A-GFP	Addgene #48138, Cambridge, MA, USA

Bez	Sequenz	AL	Lok
Li 3-1	fw: *CGTCTTCCGAGACCTGGTT rv: CCTGTTTGCTCATTGTTGGTGT	399	Ex3
Li 3-3	fw: *GACTGCTCCTGGACTCCACTC rv: GCTGAAACTGGGACTGAAAGC	521	Ex3
Li 3-5	fw: *GCTTTCAGTCCCAGTTTCAGC rv: ACAGGGAGCGTAAGAGTGGAG	528	Ex3
Li 3-7	fw: TTTCTCCTCCACTCTTACGCTCC rv: *GCGCTGAGACCTAGACAGGAC	587	Ex3
Li 3-8	fw: ATCTGTCCTCCAAGTCCAACC rv: *CGGGCTGGAGTATATCGTTTC	499	Ex3
Li 3-10	fw: GAAACGATATACTCCAGCCCG rv: *CAGAGGTGGCTCTCTGATTCC	528	Ex3
Li 3-13	fw: GCAGGAGACACGAAGCCTAAG rv: *GGTCACAGGAGGTTGCTATCC	594	Ex3
Li 4	fw: ATGCCTCTAGGTCAGAAACGG rv: *TTTCCAGAGTGAAGGAGTCAGC	368	Ex4
Li 5	fw: *ACCACCTGGAAACACTCATTG rv: AAAGTCTCAACCAGATTTTCG	343	Ex5
Li 6	fw: *CTCCTAGTCCAGGGCATTCCAC rv: GGCAGCTGGAGATCATAGCAC	599	Ex6
Li 7	fw: *CCCAAAGTCCTCTGATTTCATCT rv: ACTCAAGCTAACATCCTGCCA	593	Ex7
M13	GTAAAACGACGGCCAGT		

Tabelle 3.1: Sequenzierungsprimer zur Mutationsanalyse. Die mit * gekennzeichneten Primer wurden jeweils um die M13-Sequenz GTAAAACGACGGCCAGT verlängert, um anschließend den M13 Primer zur Sequenzierung verwenden zu können.

Bezeichnung	Funktion	Sequenz
BCORL1 KO Oligo1_T	Oligo 1 Top-Strand	¹ GGAGGCGGGATATATACCAG
BCORL1 KO Oligo1_B	Oligo 1 Bottom-Strand	² CTGGTATATATCCCCTCC
BCORL1 KO Oligo2_T	Oligo 2 Top-Strand	¹ GTCCAAAGCCTTTACTCCGG
BCORL1 KO Oligo2_B	Oligo 2 Bottom-Strand	² CCGGAGTAAAGGCTTTGGAC

Tabelle 3.2: Auflistung aller für CRISPR/Cas9 verwendeter Targetoligonukleotide. An die jeweiligen Sequenzen wurden sogenannten sticky-ends ¹ und ² zusätzlich hinzugefügt. ¹ ≡ CACC; ² ≡ AAAC

U6 Primer	fw: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC
BCORL1 Ex4_Oligo1	fw: CCCCTGGTTACCACTAACTTCA rv: CACAGAAAATGCATACGGGTAA
BCORL1 Ex4_Oligo2	fw: AGTGCTACAGAAAACTTGGGC rv: TGTAGGGGCTGGAGTAAAGATG

Tabelle 3.3: CRISPR/Cas9 Sequenzierungsprimer

Gen	Sequenz
BCORL1	fw: GGGCCAACGTGAACTGCA rv: CCCATAGGACAGCAGGAGCC
CDH1	fw: CGAGAGCTACACGTTACGG rv: TTGTCGACCGGTGCAATCT
TBP	fw: GCCCGAAACGCCGAATAT rv: CCGTGGTTCGTGGCTCTCT

Tabelle 3.4: *qPCR Expressionsprimer*

3.8 Antikörper

Goat anti-rabbit TRITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Goat anti-mouse TRITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mouse anti-EGFP Tag	Biorbyt Ltd., San Francisco, CA, USA
Mouse anti-human β -catenin	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Rabbit anti-human β -actin	Cell Signaling Technology, Leiden, NLD
Rabbit anti-human Bcorl1	Acris Antibodies GmbH, Herford
Rabbit anti-human E-Cadherin	Cell Signaling Technology, Leiden, NLD
Rabbit anti-human FAK	Biorbyt Ltd., San Francisco, CA, USA
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP	DakoCytomotion GmbH, Hamburg
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP	DakoCytomotion GmbH, Hamburg

3.9 Enzyme

BpiI (BbsI)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ExoSAP-IT	Affymetrix, Inc., Cleveland, OH, USA
Maxima Hot Start Taq DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SuperScriptR II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.10 Größenstandards

Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Gene Ruler TM 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Page Ruler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

3.11 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Puromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.12 Puffer

TBE-Puffer

89 mM TRIS, pH 8,0
2 mM EDTA
89 mM Borsäure

Proteinlysepuffer

0,5 % Triton X-100
1 mM Natriumorthovanadat in PBS
1 Proteaseinhibitortablette (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pro 10 ml

Blockierungspuffer

0,1 % Tween 20 in PBS
5 % Milchpulver in PBS

STE-Puffer

10 mM TRIS, pH 8,0
0,1 M NaCl
1 % SDS
1 mM EDTA, pH 8,0

PBS-T Westernblot Waschpuffer

0,1 % Tween 20 in PBS

MTT1 Lösung

0,5 mg/ml in PBS

MTT2 Lösung

10 % SDS mit 1 % HCL

Lysepuffer für Proliferationsassay

10 % SDS

1 M HCl

Laemmli Puffer

TRIS (25 mM)

Glycin (192 mM)

SDS (0,1

PFA-Lösung

3 % PFA in PBS

PBS+-Lösung

1 % BSA in PBS

PBS/Triton-Lösung

0,15 % Triton X-100 in PBS

Lyse Lösung (P2 Puffer)

0.2 M NaOH

1% SDS

Neutralisierungs Puffer (P3 buffer)

3 M KOAc (pH 6.0)

Für 100 ml Lösung, 60 ml 5 M Kaliumacetat

11.5 ml Essigsäure und 28.5 ml H_2O

3.13 Kits

ECL Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences Corp., Buckinghamshire, UK
PureLink TM Genomic DNA Mini Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
QIAGEN DNA Blood and Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

3.14 Verbrauchsmaterialien

Biosphere Filtertips (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser, rund, 12 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
KOVA 10 Zählkammer Raster	Hycor Biomedical Inc., Garden Grove, CA, USA
Kryoröhrchen, Nalgene	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Novex Wedge Well 4-20 % Tris-Glycine Gel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipette (Glas)	BRAND GmbH und Co. KG, Wertheim
PCR - 96 well Platten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,1 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
PCR Tube Strips 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen (94x16 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	SARSTEDT AG und Co. KG, Nümbrecht
Plastik-Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Plastik-Reaktionsgefäß (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Quarzküvette QS 10 mm	Hellma GmbH und Co. KG, Mühlheim
Trans-Blot Turbo Transfer Pack Mini format 0,2 μ m PVDF	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkultur Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	NUNC GmbH und Co. KG, Langenselbold
Zellkultur Platten (6, 12, 24, 48, 96 well)	NUNC GmbH und Co. KG, Langenselbold
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.15 Geräte

Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Autoklav DX 65	Systec GmbH, Wetttenberg
AccuJet Pro Pipette	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Axiovert 200M Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
AxioCam MRm	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	Kisker Biotech GmbH und Co. KG, Steinfurt
Chemiluminescence Detection Module DIANA	Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt
CO2 Inkubator MCO-20AIC	SANYO Electric Co. Ltd., Tokio, Japan
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Feinwaage TE 1245	Sartorius AG, Göttingen
Gelkammer MiniR Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelkammer Wide MiniR Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GelJet Imager Version 2004	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
GENios Microplatreader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
HERAsafe Zellkulturabzug	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Inkubationsschüttler Excella E 24	New Brunswick Scientific Co. Inc., NY, USA
Inkubator	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach
Kamera PowerShot G6	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Micropipetten Research (10 μ l, 100 μ l, 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Micropipetten Research plus (10 μ l, 100 μ l, 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg

Mini Centrifuge GMC-060	LMS Co Ltd., Tokyo, Japan
Mini Centrifuge MCF-2360	LMS Co Ltd., Tokyo, Japan
NanoDrop 1000 instrument	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PowerPac Basic TM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttler Rock-N-Roller	Kisker Biotech GmbH und Co. KG, Steinfurt
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Stickstofftank ARPEGE 140/170	Air Liquide Deutschland GmbH, Kirchen
Trans-BlotR Turbo TM Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultra low Freezer (-80 °C) MDF-U55V	SANYO Electric Co. Ltd., Tokio, Japan
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., NY, USA
Waage Vic-1501	Acculab Corporation, Edgewood, NY, USA
Wasserbad GFL 1083	GFL Technology, Wien, Österreich

3.16 Software

- Chromas Version 1.45 (Conor McCarthy, Southport, QLD, Australia)
- ChopCHop Version 1 [88]
- DAVID Version 6.7 (Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics, Frederick, MD, USA)
- GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., CA, USA)
- ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA)
- Eppendorf Mastercycler ep realplex 2 (Eppendorf AG, Hamburg)
- SnapGene software (Insightful Science, San Diego, CA, USA)

Kapitel 4

Methoden

4.1 Molekulargenetische Methoden

4.1.1 DNA-Isolation aus Zellen

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben abtrypsiniert und bei 1.200 UpM für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Tube überführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 1000 μ l STE-Puffer resuspendiert und mit 50 μ g/ml Proteinase K für 2-3 Stunden bei 55 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 500 μ l Phenol mehrmals invertiert und für 10 min bei 3.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Hierbei erfolgte die Phasentrennung. Danach wurde die wässrige Phase in ein neues Tube überführt und die organische Phase mit der Interphase verworfen. Um restliches Phenol aus der Lösung zu extrahieren wurde 500 μ l Chloroform zugegeben und durch Invertieren des Tubes gemischt. Die Probe wurde erneut für 10 min bei 3.000 UpM und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die nun gelösten Nukleinsäuren wurden mit 1500 μ l 100 % Ethanol bei -20 °C für mindestens 10 min inkubiert und anschließend bei 12.000 UpM und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Um das Pellet nicht zu lösen wurde der Ethanol-Überstand vorsichtig abgeschüttet. Das Pellet wurde mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen und nochmals bei 12.000 UpM und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgeschüttet und das Pellet bei Raumtemperatur im überkopf stehendem Tube getrocknet. Die DNA wurde mit 20 μ l Nuklease freiem Wasser bei 60 °C für 10 min gelöst und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

4.1.2 DNA-Isolation aus Gewebe

Um DNA aus Gewebe zu isolieren wurde das Genomic DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei -20 °C konnte die aufgereinigte DNA über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

4.1.3 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml TRIzol in ein 2 ml Tube abgeschabt. Es folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurden 400 μ l Chloroform hinzugegeben und für 15 s gevortext. Nach einer Ruhezeit von 3 min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4 °C für 15 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Bei diesem Prozess entstehen 3 Phasen. Die obere lösliche Phase enthält die RNA, wobei sich in den beiden unteren die DNA und die Proteine ablagern. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und die RNA mit 100 % Isopropanol gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation von 15 min bei 13.000 UpM wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde noch einmal bei 7.500 UpM für 5 min zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Pellet getrocknet, bis es glasig wird und bei 55 °C mit dH₂O gelöst. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

4.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurde mittels Photometrie im ultravioletten Licht bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet. Da DNA und RNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (OD^{260}) besitzen, Proteine jedoch bei 280 nm, können diese anhand dieser Bestimmung voneinander unterschieden werden. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm (OD^{280}) lässt eine Aussage über die Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol zu. Dabei soll der Quotient OD^{260} / OD^{280} in ddH₂O bei reiner DNA bei 1,8 und bei reiner RNA bei 2,0 liegen.

$$\text{Lambert-Beersches Gesetz: } E_A = \varepsilon_A \cdot c \cdot d$$

E_A : Extinktion

ε_A : Extinktionskoeffizient

c: Konzentration

d: Schichtdicke

Zur Messung der Extinktion mit Hilfe eines BioPhotometer wurde die Lösung in 50facher Verdünnung in eine Quarzküvette pipettiert. Alternativ erfolgte die Messung direkt mit 1 μ l der Probe mittels NanoDrop.

4.1.5 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Es wurden 2 μ g der isolierten und aufgereinigten RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt. Diese wurden mit RNase freiem Wasser auf 7 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 5 μ l

Random Hexamere Primer (20 ng/ μ l) vermenget. Es folgte eine Inkubation über 10 min bei 70 °C. Danach wurde eine Mischung aus 4 μ l 5 x 1st strand -Puffer, 2 μ l 0,1 M DTT und 1 μ l 10 mM dNTPs hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweiminütiger Erhitzung der Proben bei 42 °C wurde 1 μ l SuperScript II (200 U/ μ l) in die Proben gegeben und über eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Nach einer Erhitzung auf 70 °C für 10 min wurden die Proben mit dH₂O auf 100 μ l aufgefüllt und bei -20 ° gelagert.

4.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation der einzelnen Exone des *BCORL1*-Gens verwendet. Pro 20 μ l Reaktionsansatz nutzten wir 50 ng genomische DNA, je 500 nM der vorwärts und rückwärts Primer, 400 μ M dNTPs, 1,2 mM MgCl₂, 2,0 μ l Puffer und 0,05 units/ μ l Hot Start Taq DNA-Polymerase. Folgendes PCR-Programm wurde, wie in Tabelle 4.1, ausgeführt:

Tabelle 4.1: PCR-Programm

Erste Denaturierung		5min	95°C
35 Zyklen	Denaturierung	30 s	95°C
	Annealing	30 s	variabel
	Elongation	1min	72°C
	Finale Elongation	10min	72°C
Hold		bis Ende	4°C

Die Annealing Temperatur für die Primer Li 3-1, Li 3-3, Li 3-7, Li 3-8, Li 3-10, Li 3-13, Li 4, Li 5, Li 6 und Li 7 war 54 °C. Bei dem Primer Li 3-5 wurde die Annealing-Temperatur von 59 °C experimentell ermittelt und für anschließende Amplifikationen verwendet.

4.1.7 Sanger-Sequenzierung

Die Analyse der Sequenzen erfolgte mithilfe der Sanger-Sequenzierung. Dabei wurden bestimmte Exon-Bereiche mittels PCR amplifiziert und mit ExoSAP-IT (Affymetrix) aufgereinigt. Es wurde nach Mutationen des Gens *BCORL1* in den Exons 3, 4, 5, 6 und 7 gesucht. Die Sequenzierung wurde mithilfe des M13 Primers (500 nM) mit dem ABI 3730 DNA Analyser im Sequenzier-Zentrum der LMU München durchgeführt. Zur Analyse der Sequenzen wurde die Software CHROMAS v1.45 verwendet.

4.1.8 Quantitative Echtzeit PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit PCR (qPCR) dient zur Quantifizierung der Genexpression von Kandidatengen. Hierbei wird durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR

Green) die DNA markiert, wobei die Fluoreszenz proportional mit dem anfallenden Genprodukt zunimmt und somit quantifiziert werden kann. Bei allen Proben wurde zusätzlich zur Genexpression des Kandidaten die Expression des Haushaltsgens TATA-Box Bindeprotein (TBP) gemessen, um eine Normierung der Expression erreichen zu können. Nach jeder Messung erfolgte eine Analyse der Schmelzkurven zur Testung der Spezifität der Primer. Als Software wurde realplex des Mastercycler ep gradient S verwendet. Da ein Vergleich der Kandidaten mit Normalgewebe durchgeführt werden sollte, wurde die relative Expression mittels $\Delta ct \text{ Probe} / \Delta ct \text{ Kontrolle}$ nach Pfaffl [89] berechnet. Jede Probe wurde in Dupletten gemessen, um danach den Mittelwert und die Standardabweichung der Paare berechnen zu können. Die Ansätze enthielten je 40 ng cDNA, 500 nM vorwärts und 500 nM rückwärts Primer und 2x Sso Universal SYBR Green Supermix. Das Durchlaufprogramm wird in Tabelle 4.2 gezeigt.

Tabelle 4.2: *qPCR-Durchlaufprogramm*

Erste Denaturierung		2 min	95°C
40 Zyklen	Denaturierung	15 s	95°C
	Annealing	15 s	55°C
	Elongation	20 s	68°C
	Schmelzkurve	15 s	60°C
		20 min	60 - 95 °C
		15 s	95 °C
Hold		bis Ende	4°C

4.1.9 Proteinisolierung

Zur Isolierung von Proteinen wurden die Zellen zuerst in eine 100mm-Platte gesäht. Anschließend wurden bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen mit Proteinlyse-Puffer von der Platte geschabt. Die Proben wurden ab diesem Zeitpunkt zu jeder Zeit auf Eis gehalten und alle Zentrifugationen bei 4 °C durchgeführt. Gelagert wurden die isolierten Lysate bei -80 °C. Um zyttoplasmatisches Zelllysate herzustellen erfolgten 4 Zyklen von jeweils 10 min Inkubation des Lysepuffers und 15 s vortexen. Danach wurden die Lysate bei 13.000 UpM für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt.

4.1.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test verwendet. Um eine Standardkurve zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe zur Kalibrierung verwendet. Nach Zugabe von 200 μl Bradford-Reagenz zu 10 μl der 1:10 verdünnten

Proteinlösung wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption und die Errechnung der Proteinkonzentration.

4.1.11 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Erstellung der SDS-PAGE wurden 10-30 μg Protein, aufgefüllt auf 20 μl mit D-PBS, mit 5 μl Laemmli Puffer vermengt und bei 99 °C für 10 min denaturiert. Danach wurden die Proben in einem 5 - 20 % Tris-Glycin Gel zusammen mit dem Page RulerTM Prestained Protein Ladder aufgetrennt. Es wurde für 70 min eine Spannung von 200 V angelegt. Der Blot erfolgte je nach Proteingröße bei unterschiedlichen Spannungen. Hierbei wurde das Gel der SDS-PAGE auf eine PVFD-Membran gelegt und alle Luftblasen ausgestrichen. Das Gel mit der Membran wurde von Whatmann-Papieren ummantelt. Nach dem Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf die Membran wurden diese mit PBS-T gewaschen. Nach Blocken der Membran mit 5 % Milch und anschließendem erneuten Waschen wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Mouse anti-EGFP und Rabbit anti-human β -actin je 1/1000 verdünnt) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-T Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit einem Sekundärantikörper (Rabbit Anti-Mouse Immunglobuline/HRP und Goat Anti-Rabbit Immunglobuline/HRP je 1/2000 verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte erneut eine dreimalige Waschung für je 10 min mithilfe des Waschpuffers. Die Detektion der Banden erfolgte mithilfe des ECL (enhanced chemiluminescent) plus Western Blot Detection Kits. Hierfür wurden je 1 ml der Solution A und 25 μl der Solution B vermischt und auf die Membran gegeben. Nach zwei minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnten die Banden auf den Membranen mittels dem Chemiluminescence Detection Module DIANA nachgewiesen werden.

4.1.12 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente in einem Gel. Dabei wurde ein 1 %iges Agarosegel (0,5 g Agarose in 50 ml 1xTBE-Puffer) mit 0,5 μl Ethidiumbromid (EtBr 10 mg/ml) verwendet. Darin wurden anschließend die Proben mit 6x Loading Dye aufgetragen und bei einer Spannung von 90 V über 40 min in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Mini[®]-Sub Cell GT Kammer laufen gelassen. Durch UV-Licht wurden die Banden mithilfe des UV-Transilluminator GelJet Imager visualisiert und die Bandenlänge anhand des Größenstandards Gene RulerTM abgelesen. Um im Agarose Gel aufgetrennte Banden weiter verarbeiten zu können, wurde das DNA-Stück der gesuchten Länge unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei wurde versucht, die Dauer der UV-Einwirkung möglichst kurz zu halten, um eine Schädigung der DNA zu verhindern. Das gewonnene Gelstück wurde gewogen und mit Hilfe des QIAquick[®] Gel

Extraction Kit aufgereinigt. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt und die extrahierte DNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

4.1.13 Design der guide-RNA für CRISPR/Cas9

Die sogenannte „Guide-RNA“ dient als Zielmechanismus des CRISPR/Cas9 Komplexes und kann eine spezifische Schnittstelle herbeiführen. Die dafür benötigten Oligonukleotide wurden mit dem Onlinetool ChopChop kreiert. Dabei wurde auf eine möglichst hohe Effizienz und möglichst wenige Nebenziele geachtet. Sowohl an den Vorwärts-, als auch an die Rückwärts-Oligonukleotide wurden sticky ends (siehe Tabelle 3.2) angehängt, um diese später besser mit dem Plasmid ligieren zu können. Um die Chance auf die erfolgreiche Generierung von Deletionsmutanten zu erhöhen, wurden zwei verschiedene Guide-RNAs gewählt. Beide lagen in Exon 4, dem ersten großen Exon von BCORL1. Durch die Größe des Exons gibt es ausreichende Wahlmöglichkeiten für das Design der Oligonukleotide und es befindet sich weit genug am Beginn von BCORL1, sodass ein nachfolgend verfrüht erzeugtes Stopcodon einen Großteil der Funktionsbereiche des Proteins betrifft.

4.1.14 CRISPR/Cas9 Plasmidklonierung

Die mittels ChopChop bestimmten Target-Oligonukleotide (siehe Tabelle 3.2) wurden in das Plasmid eSpCas9-(1.1)-2A-Puro kloniert. Dabei wurden zunächst die Oligonukleotide in einem $10\text{ }\mu\text{l}$ Ansatz (siehe Tabelle 4.3) aneinandergelagert und phosphoryliert [90]. Dies erfolgte in einem Thermocycler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min, dann bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min mit

Tabelle 4.3: Reaktionsansatz Annealing und Phosphorylierung der Target-Oligonukleotide

Materialien	Menge (μl)
sgRNA top ($100\text{ }\mu\text{M}$)	1
sgRNA bottom ($100\text{ }\mu\text{M}$)	1
T4 ligation buffer 10x	1
T4 PNK	1
Nuklease freies Wasser	6
Total	10

anschließender Abkühlung von $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf Raumtemperatur. Das Produkt wurde 1:200 mit Nuklease freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die nun doppelsträngigen Oligonukleotide in den Vektor eSPCas9-(1.1)-2a-Puro kloniert. Hierzu wurde dieser zunächst mittels BbsI-Verdau in einem $20\text{ }\mu\text{l}$ Ansatz (siehe Tabelle 4.4) bei 37°C für 4 h linearisiert und anschließend über Gelelektrophorese und QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die Ligation der doppelsträngigen Oligonukleotide in den linearisierten Vektor erfolgte bei Raumtemperatur über 10 min in dem in Tabelle 4.5 beschriebenen Ansatz.

Tabelle 4.4: *Plasmidverdau*

Materialien	Menge (μl)
eSpCas9-(1.1)-2A-Puro Plasmid	4 ($\equiv 2 \mu\text{g}$)
10x G-Puffer	2
BbSI	2
Nuklease freies Wasser	13
Total	20

Tabelle 4.5: *Ligation des Plasmids mit Target-Oligonukleotiden*

Materialien	Menge
10x T4 DNA Ligase Puffer	$2\mu\text{l}$
Vektor eSpCas9-(1.1)-2A-Puro	100ng
Insert DNA ($0,5\mu\text{M}$)	$2\mu\text{l}$
T4 DNA Ligase	$1\mu\text{l}$
Nuklease freies Wasser	auf $20\mu\text{l}$
Total	$20\mu\text{l}$

4.1.15 Transformation

Die Transformation erfolgte mit chemisch kompetenten DH5 α E. coli- Zellen nach der Hitzeschock-Methode nach Hanahan et. al. [91]. Die Bakterien wurden bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Der Ansatz erfolgte mit den in Tabelle 4.6 angegebenen Materialien. Zuerst wurden die DH5 α E. coli- Zellen auf Eis aufgetaut und mit $2\mu\text{l}$ des Ligationsansatzes vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde ein Hitzeschock bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ für 40 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurde die Probe 2 min auf Eis abgekühlt und danach mit $250\mu\text{l}$ auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmtes S.O.C. Medium vermischt. Die Probe wurde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ über eine Stunde bei 450 UpM geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurden je Probe einmal $100\mu\text{l}$ und einmal $200\mu\text{l}$ auf eine Agarplatte mit $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert. Durch das Selektionsmedium Ampicillin ist sichergestellt, dass nur positiv transformierte Bakterien auf der Agarplatte wachsen. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien mit einer sterilen $100\mu\text{l}$ Pipettenspitze gepickt und in ein 15 ml Falcon mit 5 ml LB-Medium überführt. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde das Flüssigmedium ebenfalls mit Ampicillin ($100\mu\text{g/ml}$) versetzt. Nach Animpfung des Flüssigmediums wurden die Monokulturen bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Inkubationsschüttler bei 200-250 UpM für 24h kultiviert.

Tabelle 4.6: *Transformationsansatz*

Materialien	Menge (μl)
DH5 α	$50\mu\text{l}$
Ligationsansatz	$2\mu\text{l}$
S.O.C. Medium	$250\mu\text{l}$

4.1.16 Isolation der Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid DNA erfolgte basierend auf der alkalischen Lyse (nach Birnboim und Doly [92]) mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits. Die Monokulturen wurden in 2 ml Tubes überführt und bei 12.000 UpM für 30 s pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem alkalischen Milieu mittels der P2 Lyse-Lösung lysiert. Um störende RNA zu eliminieren, wurde zusätzlich 0,5 μ g RNaseA hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lysereaktion mit dem P3 Neutralisierungspuffer (pH 5,2) neutralisiert. Gleichzeitig wurden Proteine und genomische DNA durch die Verwendung von SDS ausgefällt. Um die Plasmid-DNA vollständig aufzureinigen wurde im Anschluss eine Phenol-Chloroform Extraktion (siehe Abschnitt 4.1.1) durchgeführt. Dabei wurde diese Form der Extraktion im Gegensatz zu der im Kit beschriebenen Extraktion mithilfe von Säulen bevorzugt, da hierbei eine größere Menge an DNA gewonnen werden konnte. Nach erfolgter Extraktion und Lösung der DNA in 20 μ l nukleasefreiem Wasser bei 60 °C wurden 0,5 μ l RNase (1 mg/ml) hinzugegeben, um in der Probe eine möglichst hohe Reinheit zu erzielen.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Eukaryotische Zelllinien

Die humanen Hepatoblastomzelllinien HepT1, HepG2 und HUH6, sowie die humane Hepatokarzinomzelllinien HUH7 und Hep3B wurden in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) Medium (1x), flüssig mit GlutaMAXTMI mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penizillin/Streptomycin bei 37 °C in einem 5 % CO₂ Inkubator kultiviert.

4.2.2 Passagieren der Zellkulturen

Die Zellen wurden alle 2-3 Tage (bei ca. 70-90 % Konfluenz) mithilfe von Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %) gesplittet und mit frischem Medium versetzt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Kulturflasche mit D-PBS gewaschen. Anschließend wurden 500-1.000 μ l Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen hinzugegeben und für 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Falls sich die Zellen im Anschluss nicht gut abgelöst hatten, wurden sie mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst. Das Trypsin wurde durch FBS-haltiges Medium inaktiviert. Je nach Dichte wurden die Zellen gesplittet, mit frischem Medium versetzt und wieder ausgesät.

4.2.3 Auszählen eukaryotischer Zellen

Um die genaue Zellzahl bestimmen zu können, wurden die Zellen abtrypsiniert und in 5 ml Medium in ein 15 ml Falkonröhrchen überführt. 10 μ l dieser Zellsuspension wurden in

90 μl D-PBS verdünnt und 10 μl dieser Verdünnung in eine Zählkammer pipettiert. Es wurden 5 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Mit diesem Wert wurde die Zellzahl pro ml berechnet und daraus das für weitere Versuche nötige Volumen der Zellsuspension ermittelt und in das jeweilige Format überführt.

4.2.4 Transfektion

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in eine 24-Well Platte mit einer Anzahl von $1,3 \times 10^5$ Zellen in 1 ml pro Well ausgesät. Es wurde wie bei der Kultivierung der Zellen RPMI- Medium mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Nach 24 h Inkubation erreichten die Zellen die angestrebte Konfluenz von 70 - 80 %. 15 min vor der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt und 500 μl neues Medium vorsichtig an den Rand des Wells pipettiert. Die anschließende Transfektion diente der Einbringung eines Plasmids in die gewünschten Zelllinien mittels Lipofektion. Hierbei wurde FuGENE nach Angaben des Herstellers mit 0,16 - 0,8 μg Plasmid-DNA pro Well und 50 μl DMEM pro Well inkubiert um die Lipidkomplexe zu bilden. Anschließend wurden aus dieser Lösung (bei Verwendung einer 24-Well Platte) 50 μl pro Well zu den Zellen gegeben. Nach der Transfektion mit dem eSpCas9(1.1)-2A-Puro-Plasmid wurden die Zelllinien HUH6, HUH7 und HepG2 zur Selektion mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin für drei Tage inkubiert. Bei allen Zelllinien wurde am zweiten Tag das alte Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit neuem Medium und Antibiotikum versehen.

4.2.5 Einzelzell-Klonierung

Um Einzel-Klone der mit Plasmid eSpCas9(1.1)-2A-Puro transfizierten und mit Puromycin selektierten Zellen zu erhalten, wurden die Zellen aus dem 6-Well Format in eine 96-Well Platte ausgesät. Dabei wurden die Zellen zuerst gezählt und in einem Falconröhrchen auf 0,75 Zellen pro Well verdünnt. Anschließend wurden je 150 μl der Medium-Zelllösung in die einzelnen Wells gegeben und für eine Woche inkubiert. Danach wurden die Wells nach einzelnen, kreisförmigen Kolonien abgesucht und markiert. Sobald die Einzel-Klone eine ausreichende Zellzahl erreicht hatten, wurden sie in eine 12-Well Platte überführt und anschließend wieder bis zu einer Dichte von ca. 80 % aufgezogen. Der Nachweis der durch CRISPR/Cas9 modulierten DNA erfolgte mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung 4.1.7. Dabei konnte die Klonalität der Zellen sowie die Mutation bestimmt werden.

4.2.6 MTT - Test

Zur Messung der Proliferation verschiedener Zelllinien wurde der MTT (3-(4,5- Dimethylthiazol- 2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid) -Test verwendet. Hierbei wurden je 5.000

Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät und über Nacht angesiedelt. Dabei wurden aus der selben Zellverdünnung insgesamt 6 Platten ausgesät, um über eine Zeitspanne von 10 Tagen jeden zweiten Tag eine Messung durchführen zu können. Die Messung erfolgte jedes Mal zur selben Tageszeit. Acht Stunden vor jeder Messung wurde die MTT 1 Lösung mit einem Volumen von 10 % des Zellmediums zu den Zellen gegeben. Die Lösung integriert sich in jede lebende, proliferierende Zelle und wird dort umgesetzt. Vier Stunden vor der Messung wurde die MTT 2 Lösung zu den Zellen gegeben, um diese aufzulösen. Gemessen wurde die Absorption jedes Wells bei einer Wellenlänge von 630nm mithilfe des GENios Microplatereader.

4.2.7 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung der Zellen erfolgte in einem 12-Well Format. Vorbereitend wurden die Zellen auf 18 mm großen Deckgläser, liegend in einer 12-Well-Platte, ausgesät und abgewartet bis ca. 80 % Konfluenz erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und zur Fixierung über 15 min bei Raumtemperatur mit PFA-Lösung inkubiert. Nach Entfernung der PFA-Lösung erfolgte die Permeabilisierung mit PBS/Triton-Lösung je 3x für je 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurde mit PBS⁺-Lösung für 3x 10 min geblockt. Die Primärantikörper (Mouse anti-human β -Catenin und Rabbit anti-human E-Cadherin) wurden in PBS⁺-Lösung 1/2000 verdünnt und 80 μ l vorsichtig auf die 18 mm Deckgläser mit Zellbesiedelung gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und im Anschluss für 10 min mit PBS/Triton-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen für 5 min mit PBS wurden die Zellen mit PBS⁺-Lösung für 7 min blockiert. Anschließend wurden 80 μ l der Sekundärantikörperlösung (Goat anti rabbit/ mouse TRITC 1:400 verdünnt) wurde auf die Deckgläser gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden mit Hilfe einer Pinzette aus den Wells genommen und mit der Zellseite nach unten auf einen Vectashield-Tropfen gesetzt. Die Fixierung des Deckglases auf dem Objektträger erfolgte mit klarem Nagellack. Die Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Mutationsscreening auf *BCORL1*-Mutationen in Hepatoblastompatienten

In einem Whole-Exome-Sequencing Projekt an 15 Hepatoblastomen wurde in einem Tumor (T528) eine erste *BCORL1*-Mutation beschrieben (p.Lys1421Serfs*29) [39]. Ein anschließendes Mutationsscreening auf *BCORL1*-Mutationen erfolgte innerhalb eines Pilotprojekts an einem Kollektiv von insgesamt 29 weiteren Hepatoblastompatienten (durchgeführt von Dr. Alexander Beck). Hierbei wurden erneut 3 Mutationen gefunden, einer Mutationsrate von 9,9 % entsprechend. Alle Proben zeigten Mutationen nahe dem 3'-Ende von *BCORL1* (siehe Abbildung 5.1).

Am C-Terminus befinden sich bei BCoR-L1 vor allem Aminosäuresequenzen, die für die Kernlokalisierung und für die Funktion als Corepressor verantwortlich sind. Deshalb lässt sich bei Mutationen, die vor diesen Sequenzen liegen und ein Leserasterverschub erzeugen, ein Funktionsverlust von BCoR-L1 vermuten. Da diese Mutationsrate für das Hepatoblastom außergewöhnlich hoch ist, sollte zunächst das Kollektiv an Patientenproben erweitert werden. Dabei wurden weitere 25 Hepatoblastomproben analysiert. In jeder Probe wurden elf Bereiche, verteilt auf die Exons 3 - 7, mittels PCR amplifiziert und per Sanger-Sequenzierung auf Mutationen abgesucht. Hierbei bestätigten sich die im Pilotprojekt ermittelten 3 Mutationen (T6 c.3001_3001delC p.Gln1001Argfs*49; T4 c.3607G>A p.Gly1203Ser; HepT1 c.3765_3767delAGA p.Glu1257del; T528 c.4262_4262del p.Lys1421Serfs*29) (gezeigt in Abbildung 5.2). In dem neu untersuchten Kollektiv zeigten sich keine weiteren Mutationen von *BCORL1*. Insgesamt ergibt sich mit den drei gefundenen Mutationen aus den Patientenproben (T4, T6 und T528) und der Mutation der Hepatoblastom-Zelllinie HepT1 eine Mutationsrate von 5,8 %. Diese Mutationsrate macht *BCORL1* zur viert häufigsten bekannten Mutation im Hepatoblastom. Der Verschiebung des

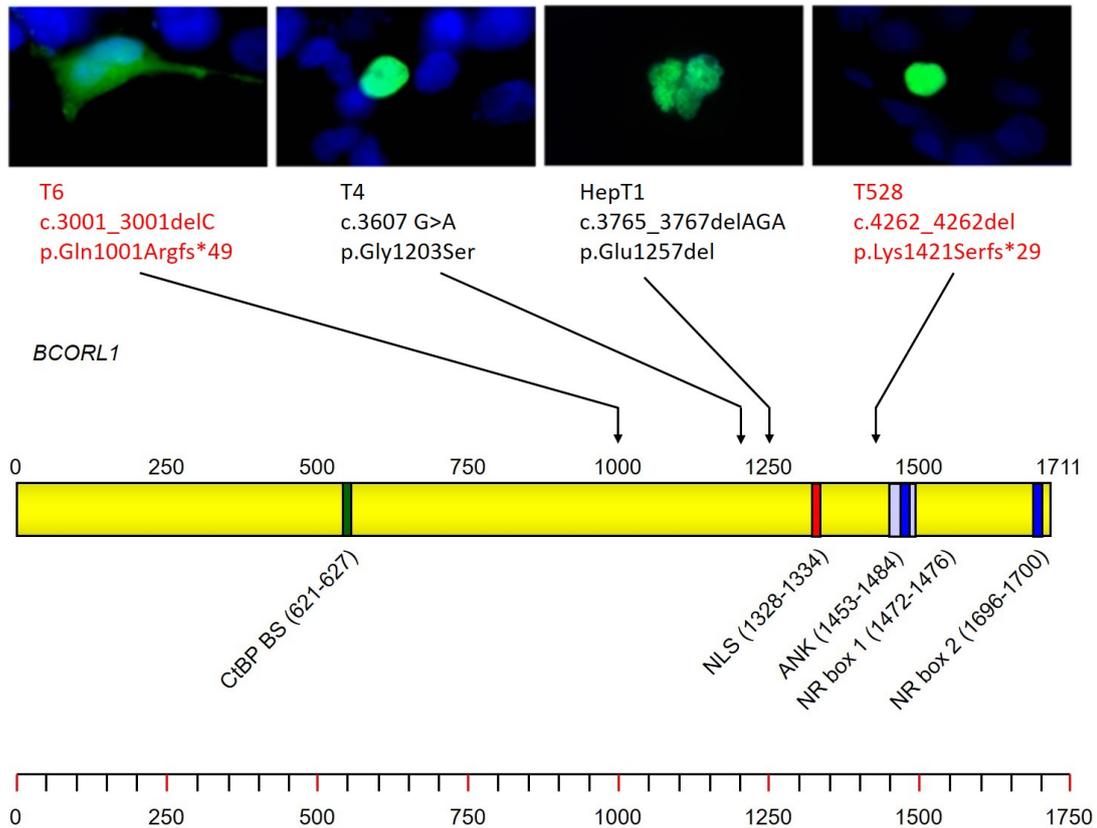


Abbildung 5.1: unten: BCoR-L1 Protein mit dessen funktionellen Bereichen und den vier gefundenen Mutationen (in rot Mutationen mit Leserasterverschub); oben: Klonierung der Mutationen und Expression in HEK293-Zellen. Die T6-Mutante zeigt hierbei eine fehlerhafte Lokalisierung von BCoR-L1 im Zytoplasma. Die Mutanten T4, HepT1 und T528 zeigen eine regelrechte intranukleäre Expression (Bilder zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Beck)

Leserasters der Mutation T6 c.3001_3001delC p.Gln1001Argfs*49 ergab einen frühzeitigen Abbruch der Translation nach 1.000 Aminosäuren und somit einer nicht mehr vorhandenen Kernlokalisierungssequenz. Dies führt zu einem Funktionsverlust von BCoR-L1, da es als Corepressor seine Funktion intranukleär ausübt. Um diese Fehllokalisierung des mutierten BCoR-L1-Proteins darzustellen, erfolgte die Klonierung der Mutationen in ein Plasmid und die Expression in HEK293-Zellen (durchgeführt von Dr. Alexander Beck). Abbildung 5.1 zeigt deutlich, dass die exprimierte T6-1001fs Mutante eine fehlerhafte Lokalisierung des BCoR-L1-Proteins im Zytoplasma besitzt. Da die T4-1203S und HepT1-1253del Mutanten keine Mutationen mit Leserasterverschub sind, bleibt die Kernlokalisierungssequenz intakt und BCoR-L1 wird weiterhin intranukleär exprimiert. Die T528-1421fs Mutation liegt näher am 5'-Ende als die Kernlokalisierungssequenz, sodass trotz eines Leserasterverschubs BCoR-L1 intranukleär nachgewiesen werden konnte. Ein Funktionsverlust lässt sich trotzdem vermuten, da viele funktionelle Domänen nahe dem C-Terminus liegen und durch den Leserasterverschub betroffen sind (siehe Abbildung 5.1).

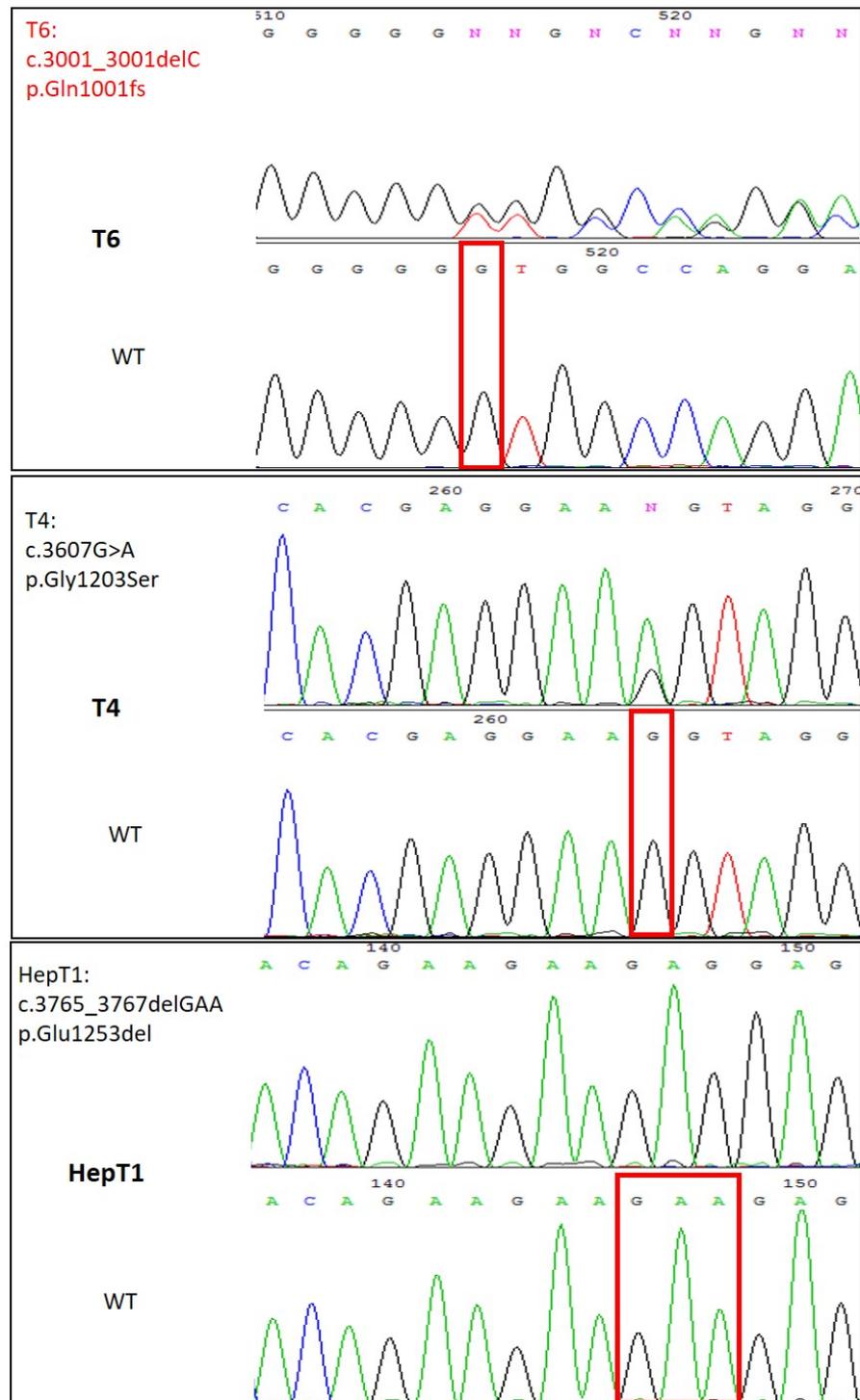


Abbildung 5.2: Sanger-Sequenz der T6-, T4- und HepT1-BCORL1 Mutationen (oben) im Vergleich zum Wildtyp (WT) (unten). Rot markiert ist die jeweilige Normalsequenz, die aufgrund der Mutation fehlt. Die Mutante T528 wurde mittels Whole-Exom-Sequencing ermittelt und ist hier nicht dargestellt [39]

5.2 Expression von *BCORL1* und *CDH1* in den Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B

Aufgrund der relevanten Mutationsrate bestimmten wir die *BCORL1*-Expression in verschiedenen Lebertumorzelllinien, die von uns zur weiteren Analyse von *BCORL1* geplant waren. Zusätzlich untersuchten wir die Expression von E-Cadherin (*CDH1*), da *CDH1* als Zielgen von BCoR-L1 identifiziert wurde [62]. Die Messung erfolgte mittels qPCR in den verwendeten Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B. Wie in Abbildung 5.3

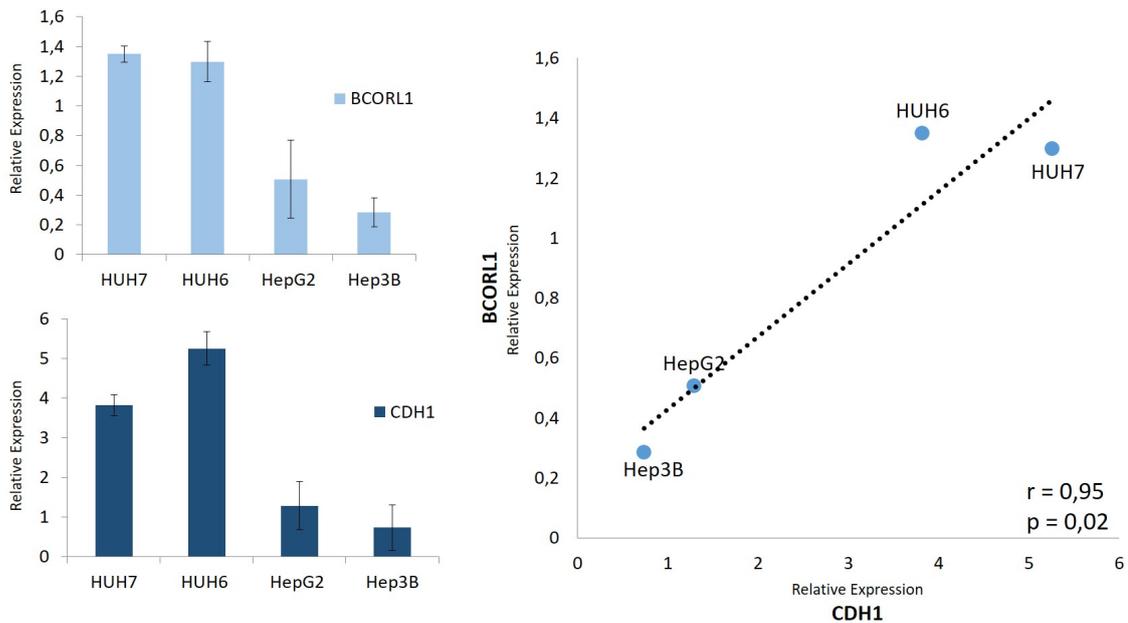


Abbildung 5.3: Relative Expression von *BCORL1* und *CDH1* in den Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B (normalisiert zum Haushaltsgen TBP)

dargestellt, zeigen alle 4 Zelllinien eine *BCORL1* Expression und eigneten sich dadurch für weitere Experimente. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *CDH1* und *BCORL1* mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,95 und einem p -Wert von 0,02.

5.3 *BCORL1* Überexpression

Es konnte in allen Zelllinien eine *BCORL1*-Expression nachgewiesen werden. Sie eigneten sich damit für die weiteren Experimente. Um den Einfluss von BCoR-L1 auf das Zellverhalten genauer verstehen zu können, erfolgt anschließend die Überexpression des Proteins in den zuvor getesteten Lebertumorzelllinien. Da E-Cadherin eine wichtige Rolle bei Zell-Zellkontakten spielt, untersuchten wir, ob eine Überexpression von *BCORL1* über dieses

Zielgen einen Einfluss auf die Zellstruktur und Zelladhäsion hat. Mithilfe eines eGFP-C1-BCORL1 Expressionsplasmids wurde *BCORL1* in den 4 Lebertumor-Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B überexprimiert. Die exogene *BCORL1* Expression wurde mittels quantitativer PCR und Westernblot verifiziert. Anschließend wurde das Wachstum der Wildtypzellen und der Überexpressionszellen beobachtet.

5.3.1 Ermittlung der Transfektionsrate

Die Erfolgskontrolle der Transfektion und die Ermittlung der Transfektionsrate erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurde der an das BCoR-L1-Protein fusionierte eGFP-Tag des Expressionsplasmids genutzt, um die Kernlokalisation und somit die Bestätigung der erfolgreichen Expression von *BCORL1* zusammen mit GFP nachzuweisen. Die Transfektionsrate (dargestellt in Abbildung 5.4) war in allen Zelllinien niedrig

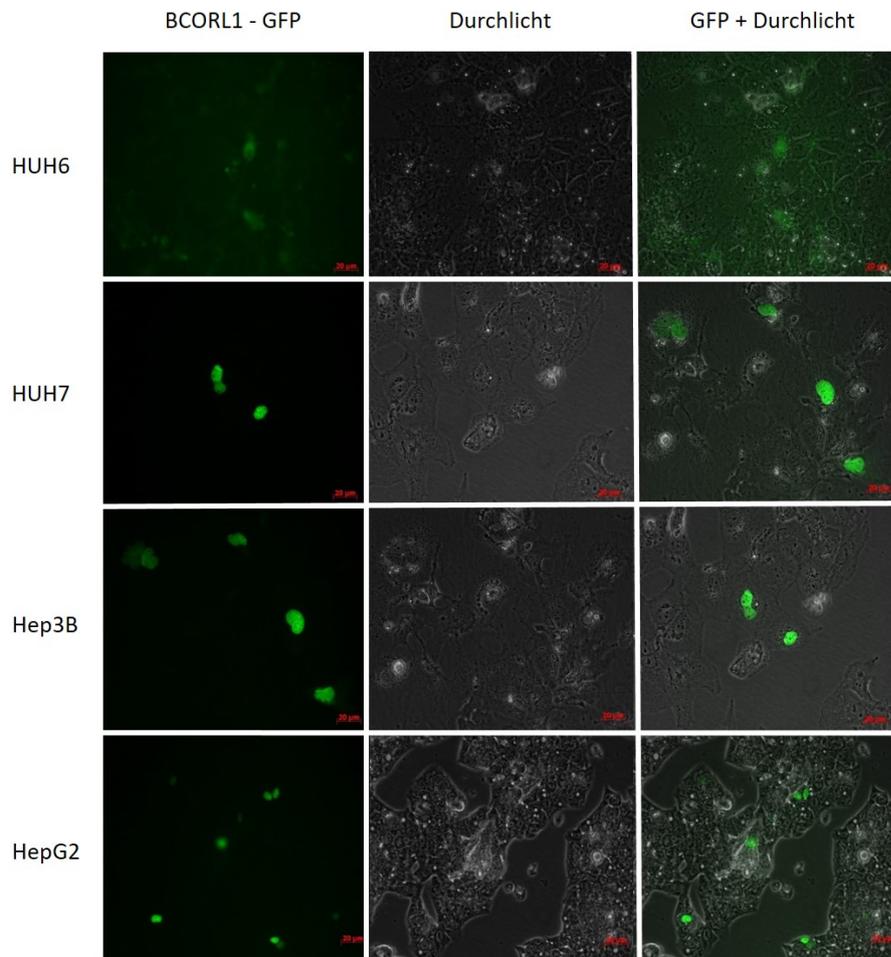


Abbildung 5.4: Fluoreszenzmikroskopie der *BCORL1*-GFP transfizierten Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B. Dargestellt sind die fluoreszierenden Zellkerne (grün) der erfolgreich transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen (keine Fluoreszenz).

bei ca. 5-10 %, was wahrscheinlich auf die Größe des *BCORL1*-GFP-Plasmids (9,8 kb) zurückzuführen ist. Dennoch zeigte sich in allen Zelllinien ein intranukleäres Signal, was auf ein intaktes BCoR-L1 Protein hinweist, weswegen wir weitere Analysen mittels qPCR und Westernblot durchführten.

5.3.2 Quantitative Bestimmung der exogenen Expression und Nachweis des Fusionsproteins im Western Blot

Um nach den qualitativen Analysen der Transfektionsrate mittels Fluoreszenzmikroskopie quantitative Aussagen treffen zu können, wurden die vier Zelllinien (HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B) mittels qPCR und Westernblot untersucht.

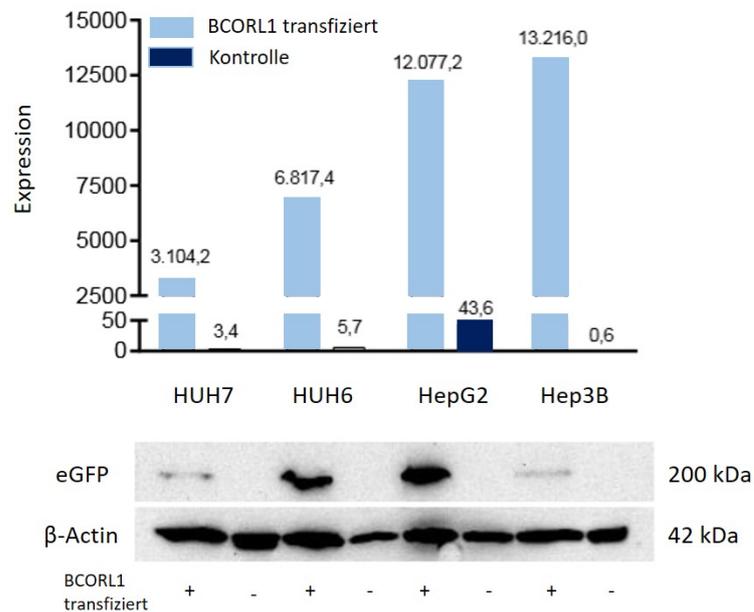


Abbildung 5.5: Messung der exogenen Expression von *BCORL1* mittels qPCR und Nachweis der Expression des eGFP - BCoR-L1 Fusionsproteins im Western Blot

Abbildung 5.5 zeigt die Expression von *BCORL1* der mit dem eGFP-*BCORL1* Expressionsplasmid transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Die Ergebnisse zeigten eine bis zu 10.000 - fache Überexpression von *BCORL1* im Vergleich zu der Kontrolle. Dies wurde durch einen Westernblot mit Nachweis des eGFP-BCoR-L1-Proteins in den transfizierten Zellen bestätigt.

5.3.3 Zellmorphologie der BCoR-L1 überexprimierten Zelllinie HUH7

In einem nächsten Schritt beobachtete wir die Zellmorphologie der BCoR-L1 Überexpressions-Zelllinien. Abbildung 5.6 zeigt keine morphologischen Veränderungen zwischen den

Zellen der Überexpression, den Kontrolltransfizierten- und den Wildtypzellen.

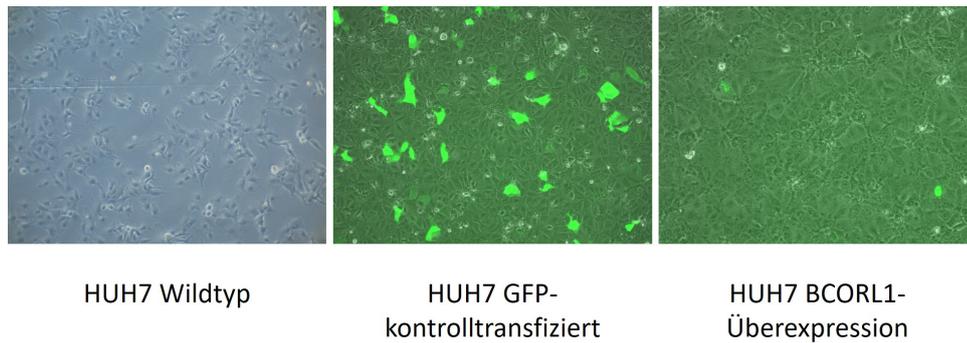


Abbildung 5.6: Zellmorphologie der HUH7 Wildtypzellen im Vergleich zu eGFP-kontrolltransfizierten Zellen und zur BCoR-L1-Überexpressions-Zelllinie

Das Wachstum auch der positiv transfizierten Zellen zeigte sich weiterhin adhärent und planar. In den HUH7 GFP-kontrolltransfizierten Zellen zeigt sich die Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma, in den HUH7 *BCORL1* transfizierten Zellen allerdings nur im Zellkern. Dies liegt daran, dass das GFP-BCoR-L1 Fusionsprotein durch die Kernlokalisierungssequenz von BCoR-L1 nach intranukleär transportiert wird. In allen Ergebnissen zur Überexpression von BCoR-L1 muss die transiente Transfektion und die geringe Transfektionsrate der Überexpressionszellen berücksichtigt werden.

5.4 Etablierung eines *BCORL1*-Knockouts mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems

Die Überexpression von *BCORL1* führte zu keiner Veränderung des Zellwachstums oder der Zellmorphologie. Im Gegensatz dazu und insbesondere zur in vitro Simulation einer *BCORL1*-Mutation erzeugten wir nachfolgend einen Funktionsverlust von BCoR-L1 in allen vier getesteten Lebertumorzelllinien (HUH7, HUH6, Hep3B und HepG2). Diese *BCORL1*-mutierten Lebertumorzellen sollten mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems neu generiert werden.

5.4.1 Beschreibung des Transfektionsplasmids

Für die Herstellung des Knockouts wurde das Plasmid eSpCas9(1.1)-2A-Puro (dargestellt in Abbildung 5.7) verwendet.

Das Plasmid enthält eine eSpCas9-Sequenz, die intrazellulär für die Translation der für den Doppelstrangbruch zuständigen Endonuklease sorgt. Über die Schnittstelle BbSI kann

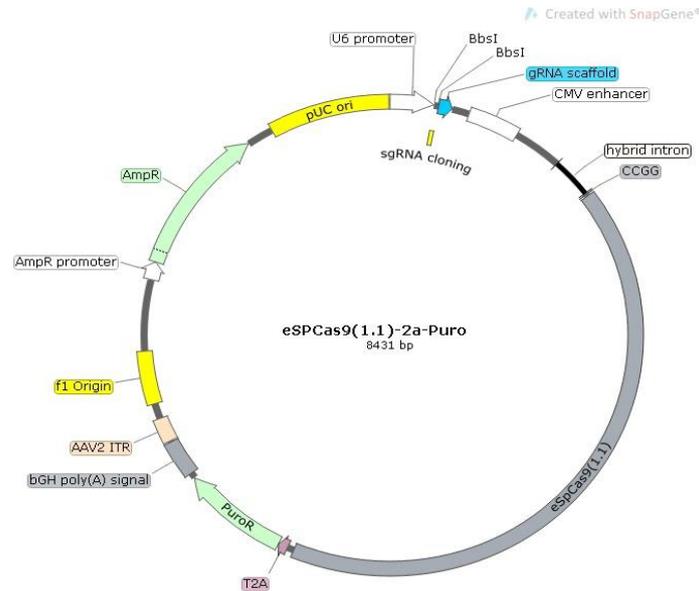


Abbildung 5.7: Darstellung der Struktur des Plasmids eSpCas9(1.1)-2a-Puro mit den wichtigsten Funktionseinheiten

die Ziel-RNA (gRNA) in das Plasmid kloniert werden. Diese dienen als Wegweiser für den Cas9-Komplex und sorgen für die Bindung an der richtigen Stelle der DNA.

Zusätzlich zeigt das Plasmid zwei Resistenzen. Die Ampicillin-Resistenz sorgt bei der Transformation für eine mögliche Selektion transformierter gegenüber nicht transformierter Bakterien. Die Puromycin-Resistenz hilft nach Transfektion bei der späteren Zellselektion. Komplementär zum U6 Promoter konnte ein Primer erstellt werden, mit dem eine erfolgreiche Klonierung überprüft wurde.

5.4.2 Ermittlung der Puromyckonzentration zur Selektion positiv transfizierter Zellen

Die Selektion positiv-transfizierter Zellen erfolgte mit Puromycin. Hierbei wurden zunächst die Wildtypzellen ausgesät und unter unterschiedlichen Konzentrationen von Puromycin inkubiert. Da die Selektion nach drei Tagen gestoppt werden sollte, wurde die geringst mögliche Konzentration ermittelt unter der keine Wildtypzelle überlebt. Bei allen Zelllinien wurde am zweiten Tag das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit neuem Medium und Puromycin versehen. Die Zellkulturen wurden täglich fotodokumentiert und am dritten Tag ausgewertet.

Das in Abbildung 5.8 dargestellte Ergebnis zeigt, dass nach einer Inkubation von drei

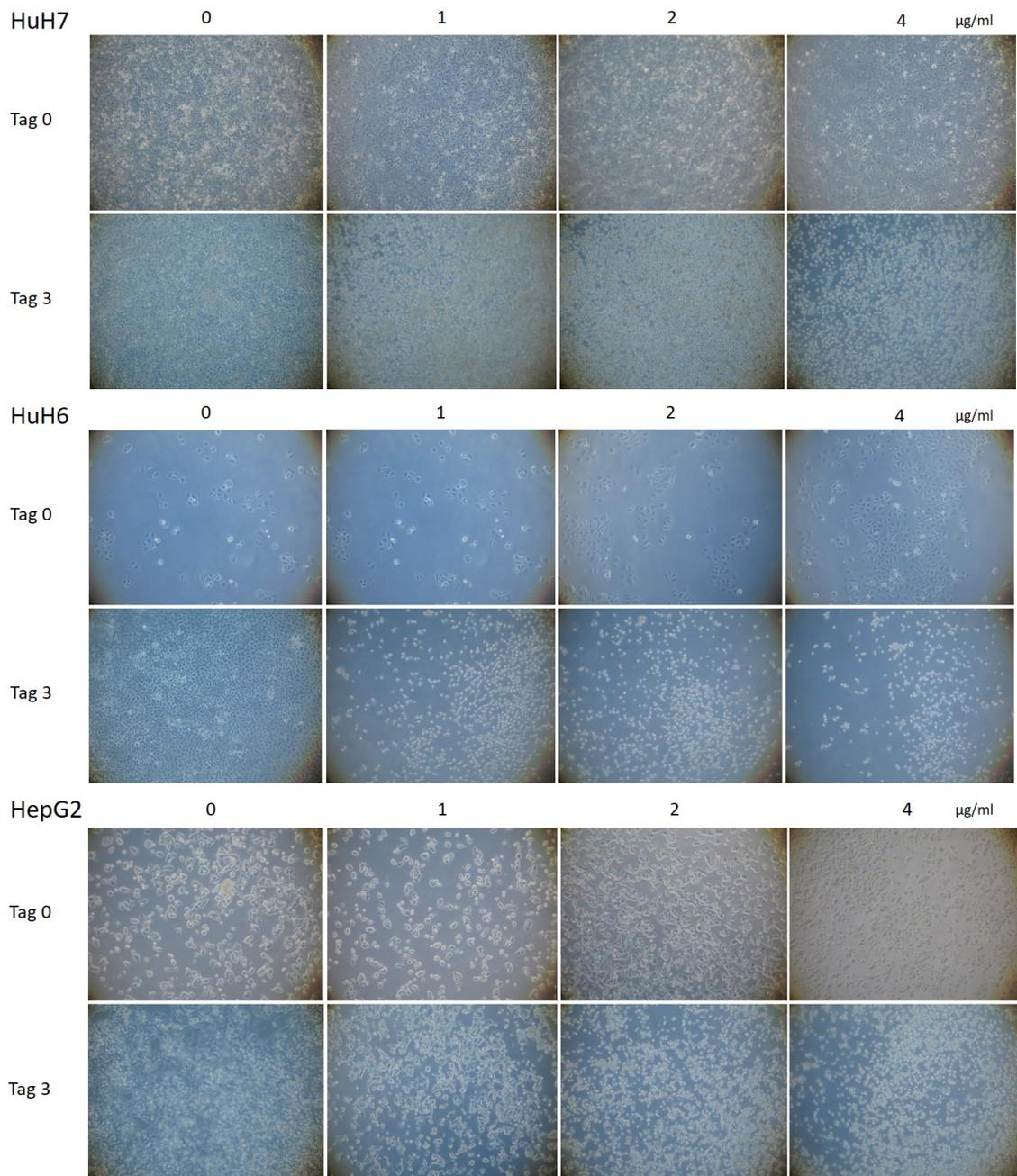


Abbildung 5.8: Ermittlung der Puromycinkonzentration zur Selektion positiv-transfizierter Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tag 0 und Tag 3 dargestellt.

Tagen bei einer Konzentration von 2 µg / ml Puromycin keine vitalen Zellen vorhanden sind. Somit konnten nur Zellen die mit dem Plasmid eSpCas9(1.1)-2A-Puro transfiziert wurden durch die vorhandene Puromycinresistenz überleben und untransfizierte Zellen abgetötet werden. Nach erfolgter Selektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Medium für einen weiteren Tag inkubiert, um ein Absterben durch eine zu frühe Vereinzlung zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und in eine

96-Well-Platte ausgesät. Dies erfolgte wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben durch Verdünnung. Die Platten wurde im Anschluss auf kreisförmige, einzelne Kolonien abgesucht. Um sicherzustellen, dass sich die Kolonien aus Einzelzellklonen bildeten, wurde die DNA mittels Sanger Sequenzierung analysiert.

5.4.3 Design der Schnittstellen der DNA und Effizienz des Knockouts

Abbildung 5.9 zeigt eine schematische Übersicht über das Design der Schnittstellen von *BCORL1*. Als Target des CRISPR/Cas9 Komplexes waren Sequenzen innerhalb des Exons 4 am vielversprechendsten, da es dort möglich war, die wenigsten Off-Targets zu erzeugen und gleichzeitig von einem sicheren Funktionsverlust (Abbruch der Transkription nahe dem N-Terminus) von BCoR-L1 ausgehen zu können.

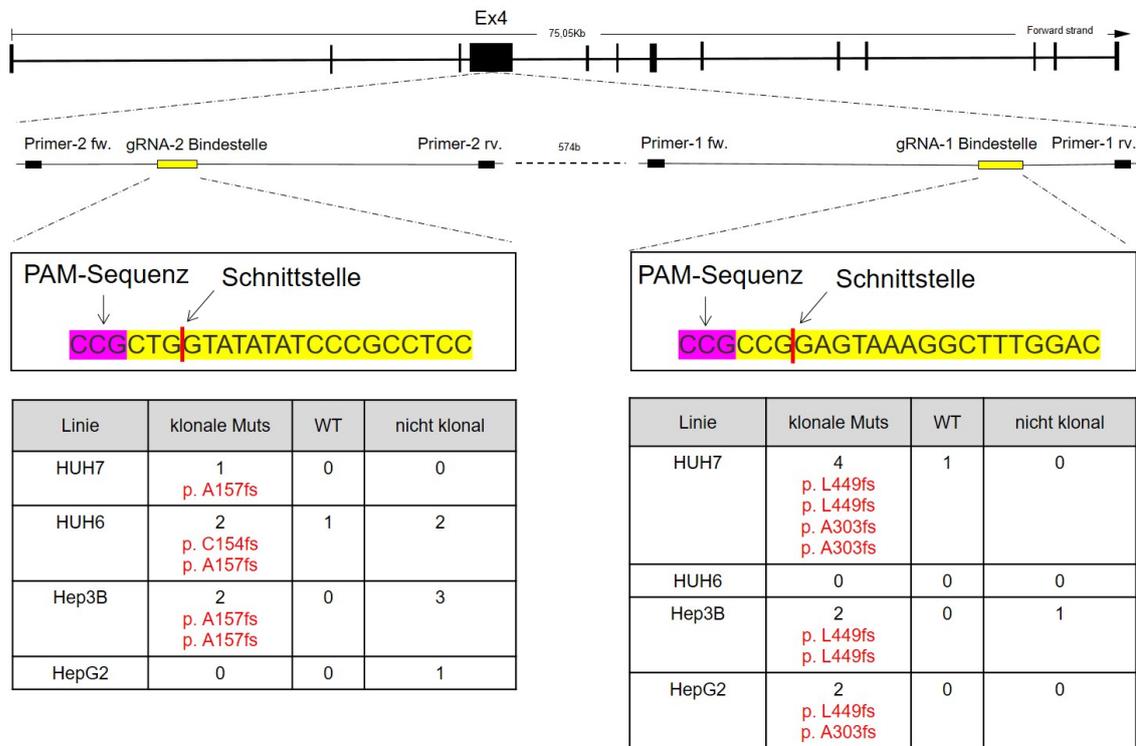


Abbildung 5.9: Im oberen Teil der Grafik wird die Lokalisation der Schnittstellen von beiden designierten CRISPR/Cas9-Komplexen (gRNA 1 und 2) in Exon 4 dargestellt. In den Tabellen darunter wird die Anzahl der herangezögten Einzelzellkolonien und deren jeweilige Sequenzveränderung gezeigt. („Linie“: Verwendete Zelllinie. „klonale Muts“: Anzahl und in rot Bezeichnung der klonalen Mutationen. „WT“: Anzahl der Einzelkolonien mit Wildtypsequenz, entsprechend für eine fehlerhafte Selektion. „nicht klonal“: Anzahl der nicht klonal aufgezögten Kolonien, entsprechend für fehlerhafte Vereinzlung)

Um einen Einfluss durch Nebenziele einer Zielsequenz auszuschließen, wurden zwei unterschiedliche Zielsequenzen gewählt. Die erste mit der Sequenz (5'-3') GTCCAAAGCCTT-

TACTCCGG (komplementär dazu gRNA-1 CCGGAGTAAAGGCTTTGGAC) mit keinen gefundenen Nebenzielen. Die zweite mit der Sequenz (5'-3') GGAGGCGGGATATATAC-CAG (komplementär dazu gRNA-2 CTGGTATATATCCCGCCTCC) mit einem gefundenen Nebenziel der Sequenz CTGGcATATtTCCCcCCTCC. Dabei zeigen sich bei drei Basen des Nebenziels keine Übereinstimmung mit der Zielsequenz und die Lage des Nebenziels an Stelle chr20:25164047 ohne bekannte Bedeutung. Beide gRNAs (Guide RNA) wurden jeweils in das Plasmid eSpCas9(1.1)-2A-Puro (siehe Abbildung 5.7) kloniert. Die Tabellen in Abbildung 5.9 zeigen die verwendeten Zelllinien, die Einzelklone mit erfolgreichen klonalen Mutationen, die fehlerhaft isolierten Zellen mit Wildtypsequenz und nicht klonal isolierte Kulturen. Unter den isolierten Einzelklonen zeigen sich unterschiedliche Mutationen, da der DNA-Reparaturmechanismus der Zellen zufällig die voneinander getrennten DNA-Fragmente ligiert. Dies geschieht unter Hinzufügen oder Herausschneiden weiterer Basenpaare. Allerdings erfolgt in allen klonalen Mutationen ein Verschiebung des Leserasters und somit ein früher eintretendes Stopcodon, wodurch BCoR-L1 seine funktionellen Domänen verliert.

Insgesamt konnte in allen vier verwendeten Zelllinien eine erfolgreiche Knockout-Mutation von *BCORL1* durch das CRISPR/Cas9-System kreiert werden und aus den 22 analysierten Zellkulturen 13 Kulturen mit klonaler Mutation etabliert werden. Dies entspricht einer Erfolgsrate von 59 %. In der HUH7-Zelllinie wurden insgesamt fünf klonale *BCORL1*-Knockout-Zelllinien isoliert und eine Einzelkolonie mit Wildtypsequenz. Die fünf Einzelkolonien der HUH6-Zelllinie zeigten zwei unterschiedliche klonale *BCORL1*-Mutationen, eine Wildtypsequenz und zwei nicht klonale Sequenzen. Die Hep3B Zelllinie zeigte nach Heranwachsen der Einzelkolonien vier Kolonien mit klonalen Mutationen und vier Kolonien mit nicht klonalen Mutationen. Die geringste Anzahl an Einzelzellkolonien konnten in der Zelllinie HepG2 herangezüchtet werden. Davon zeigten zwei Kolonien eine klonale Mutation und eine Kolonie eine nicht klonale Mutation.

5.4.4 Kontrolle der Einzellklone auf einen klonalen Knockout

Die Kontrolle eines erfolgreichen Knockouts und klonaler Selektion erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Hierbei wurde die DNA der Einzelklone isoliert und der Zielbereich mittels der hergestellten CRISPR-Sequenzierungsprimer amplifiziert. Nach erfolgter Sequenzierung wurde die Wildtypsequenz mit der isolierten Sequenz verglichen und Veränderungen dokumentiert (siehe Abbildung 5.10). Anschließend wurde der Verschiebung der Sequenz analysiert und nach einem verfrühten Stopcodon abgesucht. Ein dadurch früher eintretendes Ende der Translation fand bei allen 13 isolierten klonalen Mutationen statt.

Abbildung 5.10 zeigt ein Beispiel zweier unterschiedlichen Zelllinien (HUH7 und HUH6)

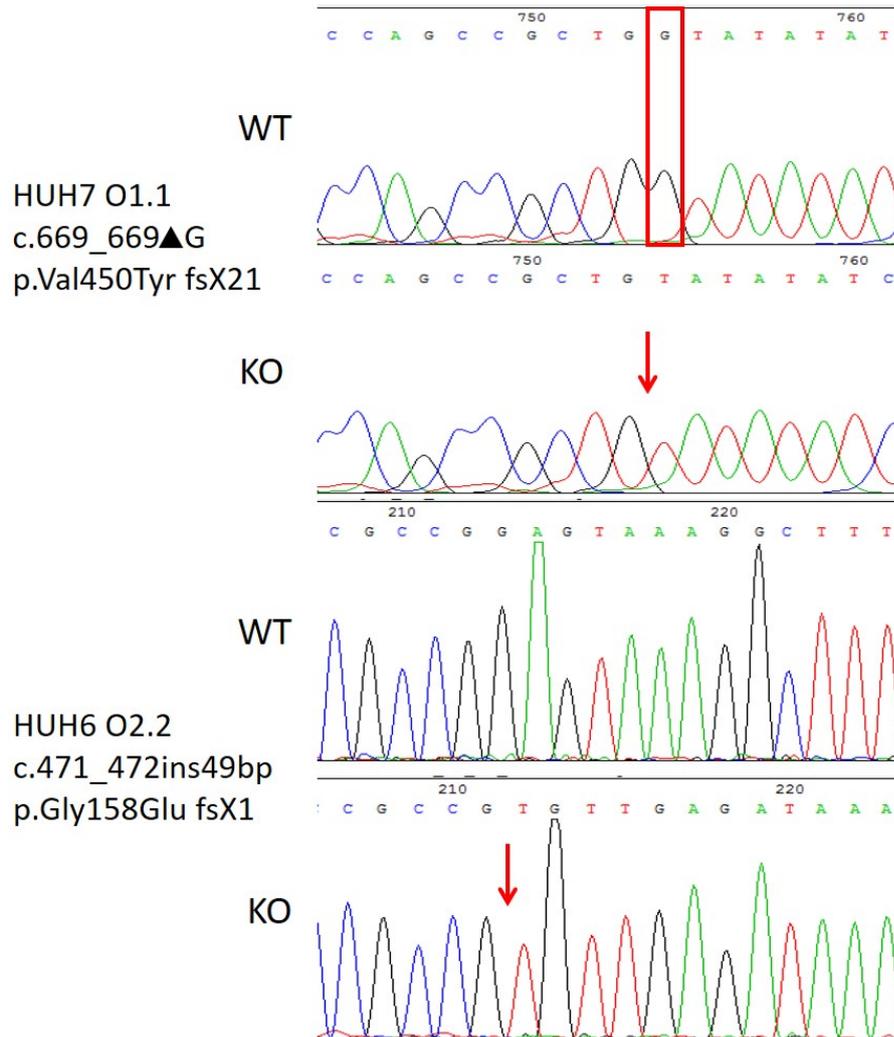


Abbildung 5.10: Darstellung zweier beispielhafter durch CRISPR/Cas9 erzeugter Mutationen mithilfe der Sanger-Sequenzierung. Oben eine Deletion eines einzelnen Guanins. Unten eine Insertion von 49 Basenpaaren. WT = Wildtyp, KO = Knockout

und der zwei unterschiedlichen Schnittstellen der Ziel-RNAs. Die oberen beiden Sequenzen zeigen die Deletion einer einzelnen Base (Guanin). Somit entsteht ein Vershub des Leserasters nach 669 Basenpaaren mit früherem Stopcodon nach weiteren 21 Aminosäuren. Die beiden unteren Ausschnitte zeigen eine größere Insertion, die zu einem Vershub des Leserasters nach 471 Basenpaaren führt, mit einer veränderten Translation nach insgesamt 158 Aminosäuren und einem Stopcodon nach einer weiteren Aminosäure. Somit wird in der HUH6 O2.2 Mutante nur 9 % des BCoR-L1 Gesamtproteins translatiert.

5.5 Analysen des *BCORL1*-Knockouts

5.5.1 Phänotyp der HUH7-Knockout-Zelllinie

Interessanterweise konnte in zwei der HUH7 Knockout-Zelllinien mit unterschiedlichen *BCORL1*-Mutationen (HUH7 O1.1 und HUH7 O2.33) ein veränderter Phänotyp in Form eines veränderten Wachstumsverhaltens beobachtet werden. Dieses Wachstum äußerte sich in einer kumulierten, dreidimensionalen, koloniebildenden Form, wie es in Abbildung 5.11 dargestellt ist. Das Wachstum der Wildtypzellen zeigt sich im Gegensatz dazu in

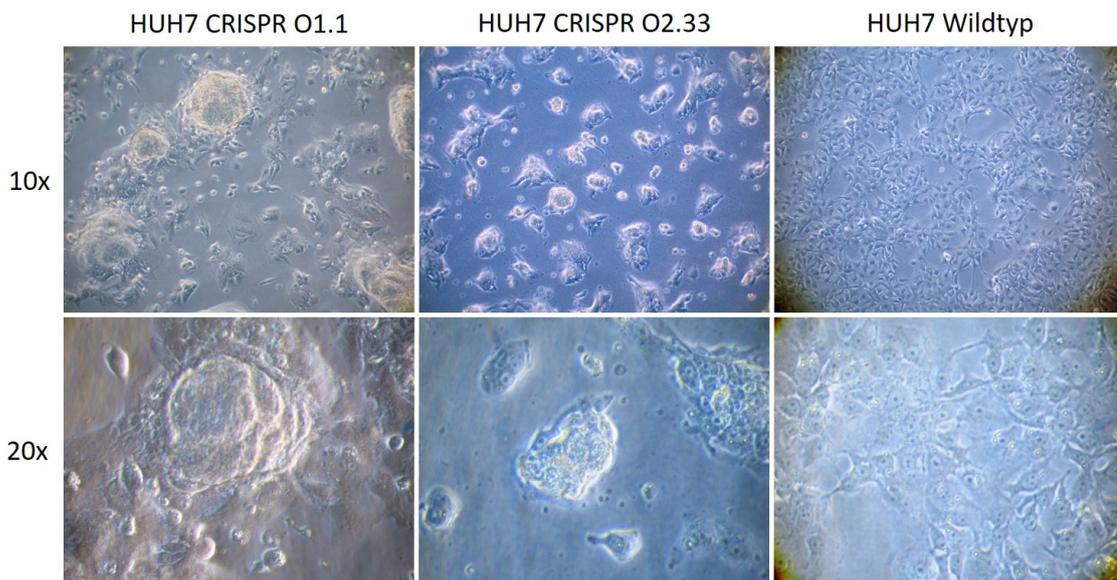


Abbildung 5.11: Darstellung des neuen Phänotyps der HUH7 Knockout-Zelllinie (HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33) in verschiedenen Vergrößerungen (10- und 20-fach) im Vergleich zu den HUH7 Wildtypzellen

einer adhären und planaren Form. Dieser Phänotyp konnte erstmals zwei Monate nach Vereinzelung der transfizierten und selektierten Zellen gefunden werden und zeigte sich anschließend über die gesamte Kultivierungszeit von einem Monat sowie nach mehreren Passagen stabil. Dieses veränderte Wachstumsverhalten konnte aktuell nur in Knockout-Zellen der Linie HUH7 beobachtet werden. Die restlichen Zelllinien HUH6, Hep3B und HepG2 zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein weiterhin ähnliches Wachstum, zumindest für den Kultivierungszeitraum von einem Monat.

5.5.2 Proliferationsanalysen mittels MTT-Tests

Da sich bereits makroskopisch ein verändertes Wachstumsverhalten der Knockoutzellen zeigte, schlossen wir weitere funktionelle Analysen mittels MTT-Test und immunhistochemischen Färbungen an. Abbildung 5.12 zeigt Proliferationsanalysen mittels MTT-Test,

die über 10 Tage mit allen vier Zelllinien durchgeführt wurden. Hierbei wurde stets der Wildtyp mit zwei unterschiedlichen Knockout Linien (HUH7: WT, O2.33, O1.1; Hep3B: WT, O2.5, O1.1; HUH6: WT, O2.2, O2.1; HepG2: WT, O1.2, O1.1) verglichen.

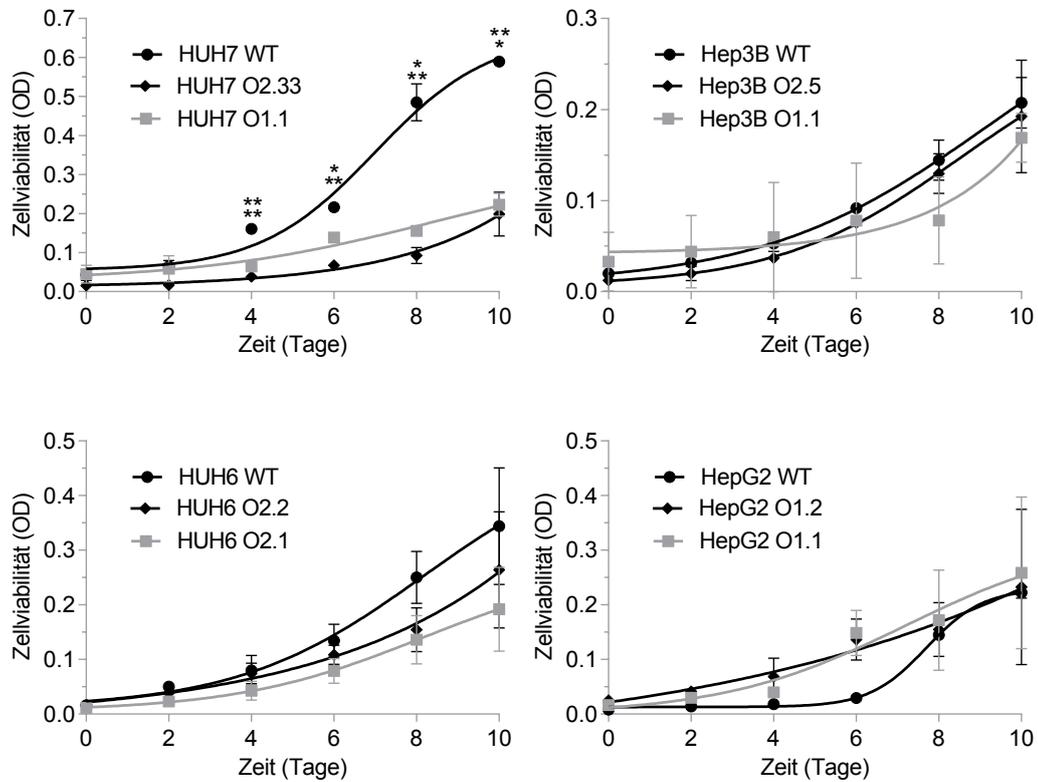


Abbildung 5.12: Wachstumsanalysen mittels MTT-Assays der Zelllinien HUH7, HUH6, HepG2 und Hep3B. (WT: Wildtypzellen. O1.X und O2.X: BCORL1-Knockoutzellen)

Das Ergebnis zeigt eine signifikant langsamere Proliferation der HUH7 Knockout-Zelllinien im Vergleich zum HUH7 Wildtyp. Dies stellt sich ab Tag 4 ein und bleibt konstant bis Tag 10. In den anderen Zelllinien HUH6, Hep3B und HepG2 konnte diese verlangsamte Proliferation der Knockout Linien nicht signifikant gezeigt werden.

5.5.3 Immunhistochemische Färbungen auf die Zelladhäsionsmarker β -Catenin und E-Cadherin

Aufgrund des vermuteten Einflusses von BCoR-L1 auf zelladhäsions-vermittelnde Proteine wurden immunhistochemische Färbungen der HUH7 Wildtyp- und Knockout-Zelllinien auf die Adäsionsmarker E-Cadherin und β -Catenin durchgeführt. In beiden Experimenten

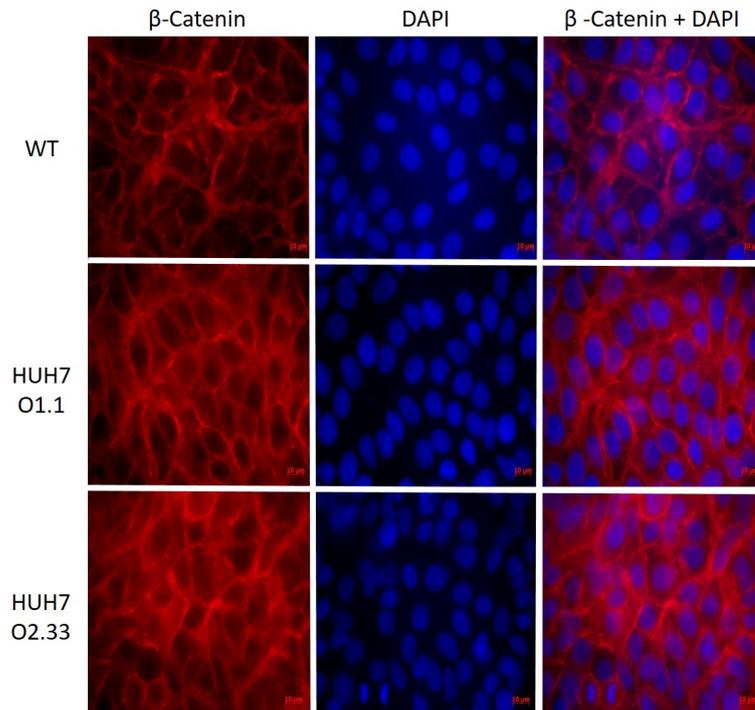


Abbildung 5.13: Immunhistochemische Färbungen der HUH7 Wildtypzellen und HUH7-*BCORL1*-Knockoutzellen O1.1 und O2.33 auf β -Catenin. Die linke Spalte zeigt die alleinige Färbung des Zelladhäsionsmarkers, die mittlere Spalte die alleinige Färbung der mittels DAPI angefärbten Zellkerne und die rechte Spalte beide Färbungen kombiniert.

erscheint die jeweilige Färbung von E-cadherin und β -Catenin in den Knockoutzelllinien gegenüber den Wildtypzellen intensiver (siehe Abbildung 5.13 und 5.14). Die Anfärbung mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zeigt dabei eine gleich starke Färbung der Zellkerne.

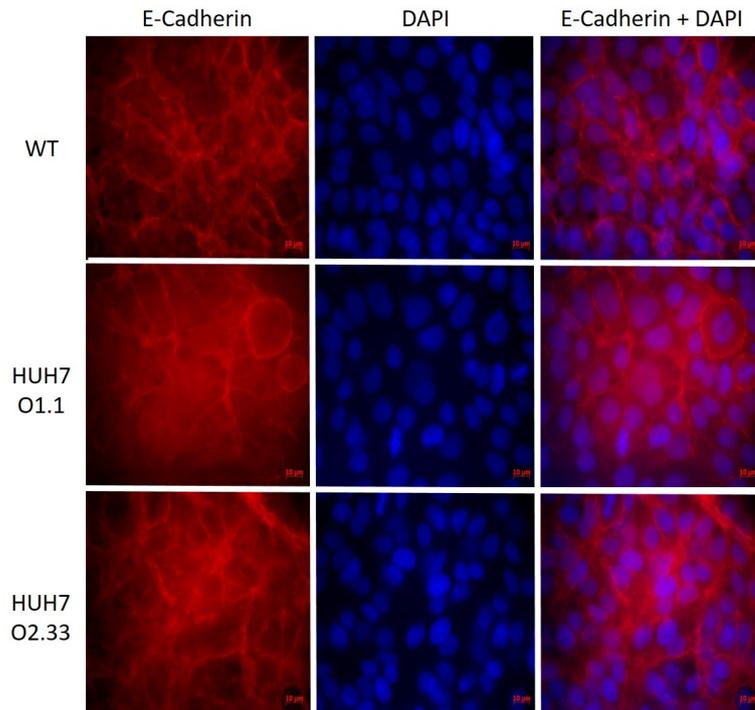


Abbildung 5.14: Immunhistochemische Färbungen der HUH7 Wildtypzellen und HUH7-*BCORL1*-Knockoutzellen O1.1 und O2.33 auf E-cadherin. Die linke Spalte zeigt die alleinige Färbung des Zelladhäsionsmarkers, die mittlere Spalte die alleinige Färbung der mittels DAPI angefärbten Zellkerne und die rechte Spalte beide Färbungen kombiniert.

5.6 RNA-Sequenzierungsdaten der *BCORL1* - Knockoutzellen

Aufgrund des deutlichen funktionellen Unterschiedes zwischen Knockout- und Wildtypzellen erhoben wir zum Vergleich der Transkription RNA-Sequenzierungsdaten, die uns auf mögliche Zielgene von *BCORL1* hinweisen sollten. Aus den Zelllinien HUH6, HUH7 und HepG2 wurde sowohl aus den Wildtypzellen, als auch aus den Knockout Zellen RNA isoliert. Diese wurde anschließend sequenziert, um potenzielle Zielgene von BCoR-L1 zu identifizieren. Da BCoR-L1 als Corepressor fungiert, wurden in den Knockout Zellen nur die hochregulierten Genaktivitäten im Vergleich zu den Wildtypzellen berücksichtigt. Dabei zeigte sich für HUH6 und HUH7 je 1.658 und für HepG2 1.527 Kandidatengene mit $P > 0.3$. Anschließend wurde ein Venn-Diagramm (Abb. 5.15) mit der Schnittmengen aller Gene zwischen den drei Zelllinien erstellt. Hierbei zeigte sich eine Schnittmenge aller Zelllinien von 26 Genen. Analysen der Gen-Ontologie dieser 26 Gene deuten auf eine veränderte Zell-Migration hin, welche vor allem durch die Gene ATPase Phospholipid Transporting 8A1 (*ATP8A1*) und Spermatogenesis Associated 13 (*SPATA13*) innerhalb dieser Schnittmenge zustande kommt. Insgesamt lässt sich bei dieser Schnittmenge jedoch keine große

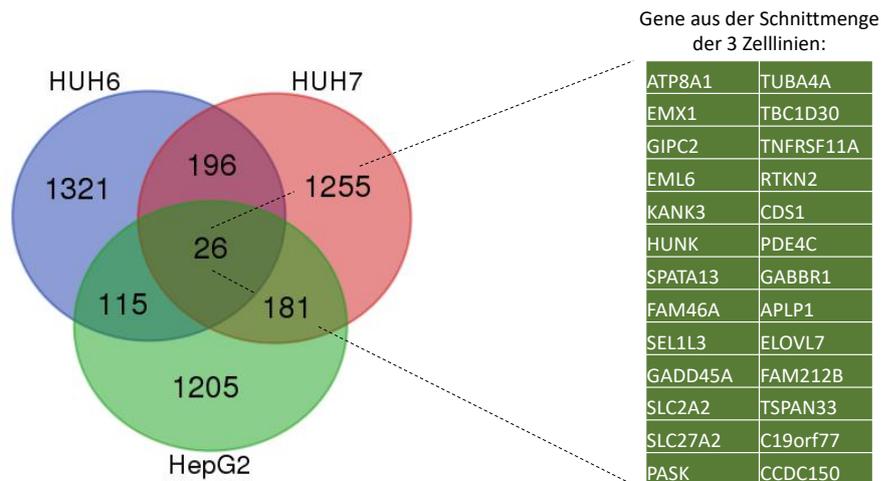


Abbildung 5.15: Venn-Diagramm der Schnittmenge aller hochregulierten Gene ($P > 0.3$) der Knockoutlinien aus HUH6, HUH7 und HepG2 im Vergleich zu deren Wildtyp. Darstellung der Anzahl der Gene in jeder Schnittmenge (links) und Auflistung aller 26 Gene der gemeinsamen Schnittmenge (rechts)

funktionelle Übereinstimmung feststellen. Am ehesten ist dies durch ein wildtyp-ähnliches Expressionsniveau der Knockout-Zellen der Linie HUH6 und HepG2 zu erklären. Diese Vermutung stützt sich auf einen zu kurzen Zeitraum zwischen *BCORL1*-Knockout und RNA-Extraktion nach einem Monat in diesen Zellen. Die Knockout-Zellen der Linie HUH6 und HepG2 zeigten zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion keine Veränderungen des Wachstumsverhaltens oder der Proliferation. Da sich dieses Verhalten der HUH7 *BCORL1*-Knockout-Zellen erst nach ca. 2 Monaten einstellte, ist von einer langsamen Umstellung des Expressionsniveaus der Knockout-Zellen auszugehen. Erst bei voll ausgeprägtem Phänotyp aller Knockout-Zellen kann ein valider Vergleich aller drei Zelllinien erfolgen.

RNA-Sequenzierungsdaten der Knockout-Linie HUH7

Anhand der Vermutung, dass das Expressionsniveau der Knockout-Zellen der Linie HUH6 und HepG2 noch nicht final angepasst ist, ist die singuläre Analyse der HUH7-RNA-Sequenzierungsdaten die wahrscheinlich aussagekräftigste. Deshalb wurden in der Gen-Analyse-Software „DAVID“ ein funktionelles Annotation Clustering aus allen 1.658 hochregulierten Kandidatengen der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien erstellt. Dies erzeugt einen besseren Überblick über die funktionellen Gruppen dieser Gene. Zusammengefasst zeigt sich die Funktion der hochregulierten Gene der *BCORL1*-Knockout Zelllinie HUH7 vor allem im Bereich der Zellmembran (siehe Abbildung 5.16). Die funktionellen Annotati-

Annotation Cluster	Enrichment Score	RT	Count	P_Value	Benjamini
Annotation Cluster 1					
	Enrichment Score: 8.48				
Pleckstrin homology-like domain	RT		70	1.2E-10	2.1E-7
Pleckstrin homology domain	RT		51	4.5E-10	4.1E-7
PH	RT		51	1.8E-8	7.2E-6
domain:PH	RT		42	1.3E-7	8.7E-5
Annotation Cluster 2					
	Enrichment Score: 7.09				
Membrane	RT		626	1.6E-10	1.9E-8
Glycoprotein	RT		405	1.4E-9	1.4E-7
glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)	RT		383	3.5E-9	7.0E-6
topological domain:Cytoplasmic	RT		318	2.7E-8	3.6E-5
Transmembrane	RT		476	5.9E-8	4.0E-6
Transmembrane helix	RT		474	7.8E-8	4.7E-6
transmembrane region	RT		432	3.1E-7	1.8E-4
topological domain:Extracellular	RT		248	1.7E-5	7.0E-3
integral component of membrane	RT		426	3.3E-4	3.7E-2
Annotation Cluster 6					
	Enrichment Score: 3.33				
Cell junction	RT		79	3.8E-6	1.2E-4
cell junction	RT		50	3.4E-3	1.8E-1
Synapse	RT		38	7.8E-3	7.5E-2
Annotation Cluster 33					
	Enrichment Score: 1.49				
Cadherin conserved site	RT		16	1.4E-2	4.9E-1
Cadherin	RT		16	2.1E-2	5.3E-1
domain:Cadherin 3	RT		15	2.3E-2	7.3E-1
domain:Cadherin 4	RT		15	2.3E-2	7.3E-1
Cadherin-like	RT		16	2.4E-2	5.5E-1
domain:Cadherin 6	RT		12	2.8E-2	7.7E-1
domain:Cadherin 1	RT		15	2.8E-2	7.7E-1
domain:Cadherin 2	RT		15	2.8E-2	7.7E-1
domain:Cadherin 5	RT		14	3.0E-2	7.8E-1
CA	RT		16	5.4E-2	5.9E-1
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	RT		18	6.0E-2	9.7E-1
Cadherin_N-terminal	RT		8	1.8E-1	9.6E-1

Abbildung 5.16: Clusteranalyse funktioneller Gen-Annotations der RNA-Sequenzierungsdaten der HUH7-BCORL1-Knockoutzellen mittels DAVID

on Cluster helfen zu verstehen, welche Bereiche des zellulären Mechanismus nach einem *BCORL1*-Knockout betroffen sind. Ein hoher Anreicherungswert an Genen innerhalb eines Clusters bedeutet, dass viele Gene innerhalb einer Signalkaskade oder funktionellen Domäne durch den *BCORL1*-Knockout betroffen sind. Damit lassen sich Schlüsse auf die Funktion potenzieller Kandidatengene von BCoR-L1 ziehen und beeinträchtigte Regelkreisläufe in Tumorzellen mit einer *BCORL1*-Mutation identifizieren. Die höchste Anreicherung zeigt sich in der Pleckstrin homology like domain. In dieser Kategorie finden sich 70 hochregulierte Gene, die als Rekrutierungswerkzeug der Zelle von Proteinen an unterschiedliche Membranen dienen. Die zweithöchste Anreicherung zeigte sich an Genen, die die Zellmembran beeinflussen. Hierbei fanden sich 626 Gene, zum Beispiel G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Transmembranproteine. Zusätzlich zeigen sich in dem Cluster 79 Gene die in der Zell-Zell-Verbindung eine Rolle spielen (siehe Abbildung 5.17) und 16 Gene, die der Cadherin-Domäne angehören. Aufgrund dieser Analyse ist zu vermuten, dass der veränderte Phänotyp der HUH7-Knockout Zelllinien durch eine veränderte Zell-Zell-Interaktion und eine Umgestaltung der Zellmembran entsteht.

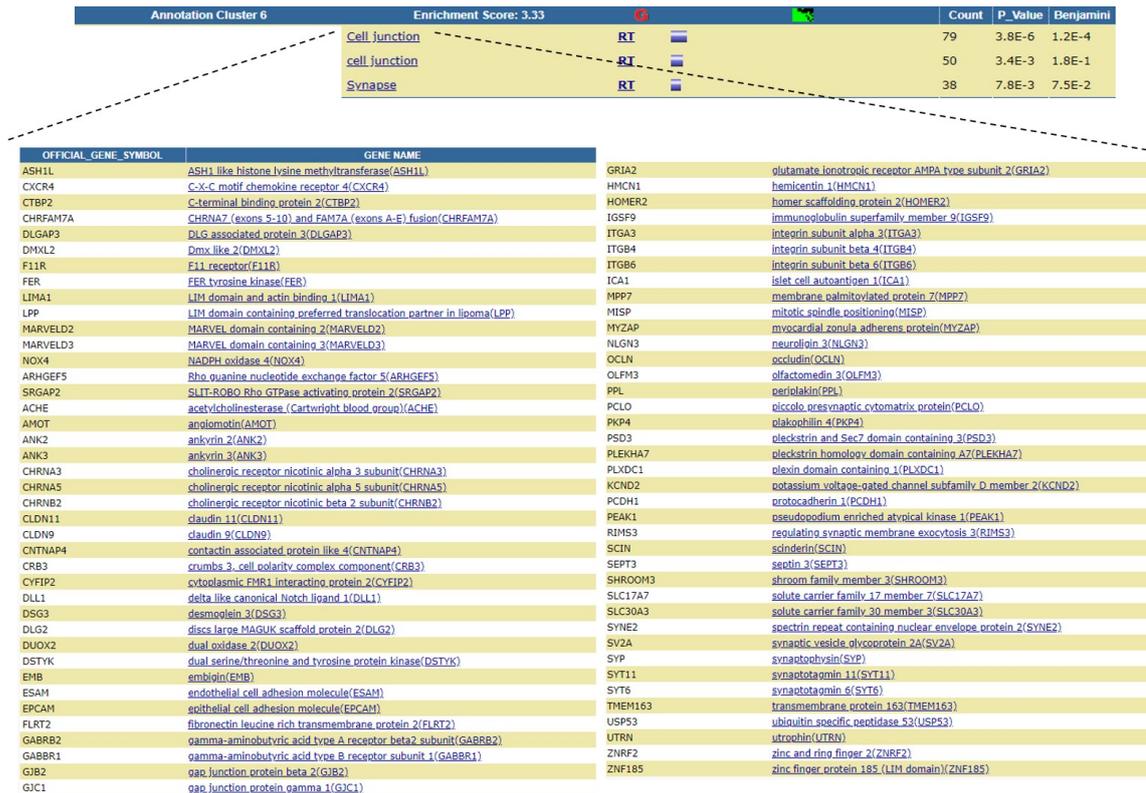


Abbildung 5.17: Liste transkriptionell veränderter Gene der Zell-Zell-Verbindung in der BCORL1-Knockoutzelllinie HUH7

Gencluster der Knockout-Linie HUH7

Zusätzlich wurde anhand der veränderten Genexpression ein sogenanntes Heatmap-Cluster der BCORL1-Knockoutzelllinie HUH7 mit den 100 jeweils am signifikantesten differenzier-ten Genen zwischen Wildtyp und Knockout erstellt (Abbildung 5.18). In der linken Spalte zeigt sich die Expression im Wildtyp, in der rechten Spalte die der Knockout-Zellen. Da-bei sind vor allen die im Vergleich zum Wildtyp induzierten Gene der Knockout-Zellen interessant, da diese durch die wegfallende Repression durch BCoR-L1 mögliche direkte Zielgene darstellen. Diese werden in Gruppe 1 und 3 der Heatmap gezeigt. Auffallend ist, dass sich in Gruppe 1 Zytokeratin 19 und Zytokeratin 15 (*KRT19* und *KRT15*) in einem fast gleichem Maße induziert zeigen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass BCoR-L1 als Korepressor eine Rolle in der Regulation der Expression beider Zytokeratine spielt. Insgesamt lässt sich durch diese Heatmap verdeutlichen, dass das Expressionspro- fil der BCORL1-Knockoutzelllinie HUH7 im Vergleich zu den HUH7-Wildtypzellen klare Veränderungen zeigt.

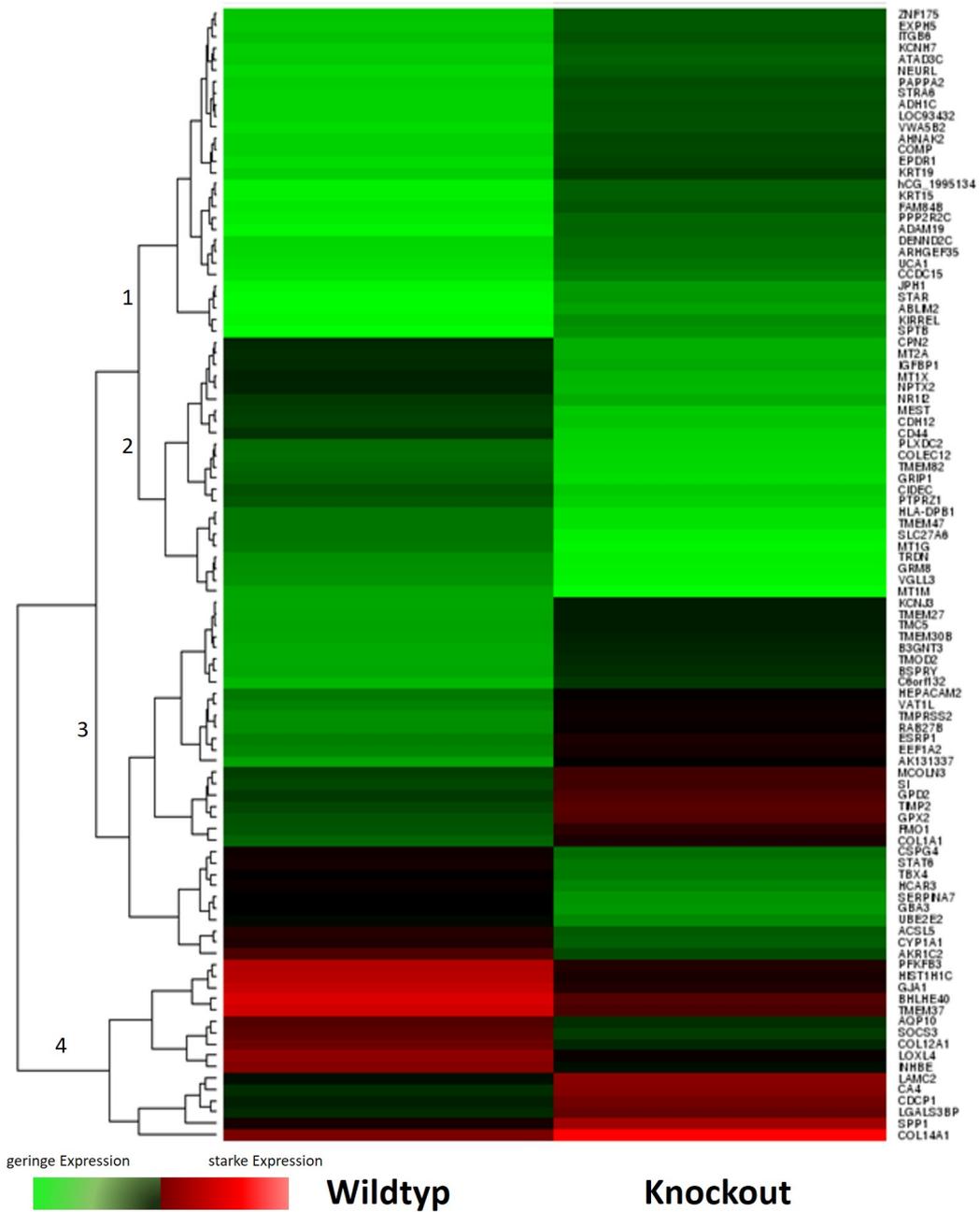


Abbildung 5.18: Heatmap der 100 Genen mit der größten Abweichung der Expression zwischen HUH7 Wildtyp- (linke Spalte) und Knockout-Zellen (rechte Spalte). Die Expression wird dabei mithilfe der Farbskala hellgrün (geringe Expression) bis hellrot (starke Expression) verdeutlicht. Rechts sind die Gennamen aufgeführt. Links zeigt sich ein Stammbaum der in Bezug zueinander stehenden Gene, aufgeteilt in 4 Hauptgruppen.

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Im Hepatoblastom treten gehäuft *BCORL1*-Mutationen auf

In dieser Arbeit sollte ein im Hepatoblastom noch unbekanntes Gen - *BCORL1* - genauer erforscht werden. Die Funktion des Proteins ist, katalytische Multiproteinkomplexe mit DNA-gebundenen Repressoren zu koppeln, um zusammen die Chromatinstruktur und dadurch die Transkription der Gene zu regulieren. Bislang konnte nur *CDH1* (E-Cadherin) als ein von BCoR-L1 reprimiertes Zielgen gezeigt werden, welches bei der Zelladhäsion eine zentrale Rolle spielt [62].

Wir fanden in einem Kollektiv aus 69 Hepatoblastomproben vier Fälle mit *BCORL1*-Mutationen, entsprechend einer Mutationsrate von 5,8 %. Diese Mutationsrate ist vergleichbar zu den bereits vorher beschriebenen Mutationsraten von *BCORL1* in anderen Malignitäten. Beispielsweise wird in einer Studie aus 62 Patientendaten mit intrakraniellen Keimzelltumoren beschrieben, dass in sechs Fällen eine *BCORL1*-Mutation zu finden war und in fünf davon eine Leserasterverschubmutation vorlag [69]. Hierbei ließ sich also eine im Vergleich zum Hepatoblastom etwas höhere Mutationsrate von 9,7 % darstellen. Weiterhin wurde in einer Studie mit 173 erwachsenen AML- (akut myeloische Leukämie) Patienten eine Mutationsrate von *BCORL1* von 5,8 % beschrieben. Darunter waren die meisten Mutationen nonsense-Mutationen, Mutationen mit Leserasterverschub oder Spleiß-Mutationen [67]. In einer Studie mit pädiatrischen AML-Patienten konnte allerdings nur eine Mutation aus 83 Fällen mit resultierendem Stopcodon identifiziert werden (Mutationsrate von 1,2 %) [10]. Somit zeigt sich die Mutationsrate von *BCORL1* variabel zwischen 1-10 %. Vor allem in pädiatrischen Tumoren zeigt sich, im Vergleich zur AML, im Hepatoblastom eine deutlich höhere Mutationsrate von *BCORL1*.

Aus den vier von uns gefundenen Mutationen resultierten zwei Mutationen in einem Leserasterverschub (Q1001fs und K1421fs), eine in einer Deletion eines Basentriplets (E1253del) und eine in einem Austausch einer Base (G1203S) (siehe Abbildung 5.1). Da aktuell die exakten Funktionsbereiche von BCoR-L1 noch nicht ausreichend beschrieben sind [62], lässt sich nicht sicher sagen ob alle Mutationen einen Funktionsverlust herbeiführen. Trotz fehlender Reprimierung der BCORL1-mRNA-Level von Tumorzellen mit *BCORL1*-Mutation wird vermutet, dass bei den fehlerhaft dekodierten Proteinen die C-terminal liegende NR- (nuclear receptor) Box fehlt und somit ein Funktionsverlust entsteht [67,69]. Dieses C-terminal liegende Motif LXXLL (NR-Box 1 und 2) (siehe Abbildung 1.5) ist für die hormonell bedingte Bindung zwischen Kernrezeptoren und Koaktivatoren, beziehungsweise Korepressoren, verantwortlich [93,94]. Beide der von uns gefundenen Mutationen mit Leserasterverschub liegen vor den NR-Boxen 1 und 2, was bei beiden für einen Funktionsverlust von BCoR-L1 spricht.

Da das Hepatoblastom mit nur drei Aberrationen pro Tumor die niedrigste Mutationsrate bislang systematisch sequenzierter Tumorentitäten aufweist, ist das Auftreten einer Mutation von *BCORL1* bei 5,8 % von 69 genotypisierten Hepatoblastomproben besonders interessant. Auch ist diese Mutationsrate nach *CTNNB1*, *NFEL2L* und *TERT* die viert häufigste der im Hepatoblastom gefundenen Mutationen.

6.2 Expression von BCoR-L1 in unterschiedlichen Zelllinien

Da das Mutationsscreening bei *BCORL1* eine für das Hepatoblastom hohe Mutationsrate zeigte, testeten wir anschließend die BCoR-L1-Expression in verschiedenen Leberzelllinien. Für diese Versuche wurden unter anderem die zwei Hepatoblastom-Zelllinien (HUH6 und HepG2), sowie zwei HCC-Zelllinien (HUH7 und Hep3B) verwendet. Die Hepatoblastomzelllinie HepT1 wurde aufgrund der gefundenen *BCORL1*-Mutation hierfür nicht verwendet. Zusätzlich untersuchten wir die Expression von E-Cadherin (*CDH1*), da BCoR-L1 als Corepressor dessen Expression reguliert [62].

Wie bereits durch Pagan et. al beschrieben, zeigte sich die Expression von BCoR-L1 vor allem in hormonsensiblen Geweben wie Hoden und Prostata höher exprimiert als in Gewebe des Gastrointestinaltrakts, beispielsweise Kolon [62]. Dies passt zu den von uns gefundenen niedrigen Expressionslevel der Leber-Zelllinien (siehe Abbildung 5.3). Auch E-Cadherin wird in allen von uns untersuchten Zelllinien exprimiert. Die von Pagan et al. [62] beschriebene mögliche inverse Korrelation zwischen der Expression von BCoR-L1 und E-Cadherin wurde in den Wildtypzellen nicht festgestellt, sondern vielmehr eine signifikant direkte Korrelation. CtBP interagiert mit dem *CDH1* Promoter und führt zu dessen

Repression. Umgekehrt kann bei einer Repression von CtBP die Transkription von *CDH1* gesteigert werden und selbst in Geweben, die normalerweise kein E-Cadherin exprimieren, kann danach eine Expression von E-Cadherin nachgewiesen werden [95–97]. Dies lässt vermuten, dass erst bei einer veränderten BCoR-L1-Expression und somit beeinflusster CtBP-Funktion eine Veränderung der E-Cadherin-Expression auftritt [62].

6.3 Funktionalität des CRISPR/Cas9-Systems zur Generierung eines Knockouts

6.3.1 Vorteile des CRISPR/Cas9-Systems

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.4) beschrieben, gibt es unterschiedliche Methoden der Genom-Veränderung. Dabei besitzt das CRISPR/Cas9 System klare Vorteile gegenüber den bisher üblichen Methoden wie Zinkfinger-Nukleasen und Transkriptions-Aktivator ähnliche Effektor-Nukleasen (TALEN). Zinkfinger-Nukleasen und TALEN wurden eingesetzt, da zuvor keine Möglichkeit bestand, spezifische DNA-Bereiche mit Nukleasen zu erreichen [79,98]. Allerdings zeigen sich bei der Verwendung beider Methoden einige Schwierigkeiten. Aufgrund einer nicht ausreichenden Bibliothek der Zinkfinger-Nukleasen sind die Zielbereiche der DNA nur begrenzt wählbar. TALEN sind teuer, aufwändig zu konstruieren und schwierig zu testen. Zusätzlich erschwert im Anschluss die Größe der TALEN den Transport nach intrazellulär. Diese Probleme konnten durch die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems eliminiert werden und größtenteils bestehende Methoden genutzt werden, um CRISPR/Cas9 zu etablieren [99]. In dieser Arbeit konnten zwei passende Zielregionen von *BCORL1* identifiziert und an diesen Stellen ein Knockout erzeugt werden (siehe Kapitel 5.4.3).

6.3.2 Hindernisse des CRISPR/Cas9-Systems

Das CRISPR/Cas9-System zeigt ein großes Potential zur Generierung funktioneller Knockoutmodelle. Allerdings sind einige wichtige Punkte der Genomveränderung wie Nebenmutationen und Nebeneffekte durch die Einbring-Methode des CRISPR/Cas9 Systems in die Zelle zu beachten.

Nebenmutationen

Nebenmutationen sind bei Methoden der Genomveränderung eine große Problematik. Vor allem ist bei der Nutzung des CRISPR/Cas9-Systems, verglichen mit der Verwendung anderen Methoden wie Zinkfinger oder TALEN, eine relativ hohe Auftretenswahrscheinlichkeit von Nebenmutationen zu beobachten [100]. Nebenmutationen entstehen durch

eine Gleichheit oder starke Ähnlichkeit anderer DNA-Abschnitte zum eigentlichen Zielabschnitt der DNA. Das CRISPR/Cas9-System schneidet hierbei, durch fälschliche Bindung der Ziel-RNA (gRNA), ebenfalls diese gleichen oder ähnlichen Abschnitte. Diese werden im Anschluss durch den DNA-Reparaturmechanismus fälschlich zusammengesetzt, wodurch in DNA-Bereichen fern des Zielabschnitts ebenfalls Mutationen entstehen. Um dieses Risiko zu minimieren, wurde in dieser Arbeit das Programm ChopChop verwendet, welches die Zielsequenzen direkt auf mögliche Nebenziele untersucht und die Zielsequenzen anhand dessen in einer Rangfolge sortiert [88]. Dabei wird auch beachtet, dass an Position 20 der gRNA ein Guanin steht, was für eine höhere Spezifität sorgt [101]. Bei Zielsequenzen mit dem gleichen Rang wird diejenige bevorzugt, die dem 5'-Ende näher ist, da bei der Veränderung eines Exons am 5'-Ende die Wahrscheinlichkeit eines Funktionsverlusts des translatierten Proteins höher ist [90]. In dieser Arbeit wurden zwei Zielsequenzen innerhalb des Exons 4 erstellt. Zielsequenz 1 mit gRNA-1 zeigte den von ChopChop ermittelten besten Rang, ohne Nebenziele und einer Effizienz von 61,52. Zielsequenz 2 mit gRNA-2 zeigte den zehnten Rang, mit einem Nebenziel (siehe Kapitel 5.4.3), allerdings der höchsten Effizienz mit einem Wert von 77,17. Beide Zielsequenzen befinden sich früh im Exon 4 von *BCROL1* und erfüllen somit das Kriterium der Lage Nahe dem 5'-Ende.

Da in der Zelllinie HUH7 nach *BCORL1*-Knockout der Effekt des veränderten Phänotyps und der verlangsamten Proliferation bei beiden verwendeten Zielsequenzen (Zielsequenz 1: HUH7 CRISPR O1.1 und Zielsequenz 2: HUH7 CRISPR O2.33) auftrat, ist ein Einfluss von Nebenmutationen unwahrscheinlich und die fehlerhafte Funktion von BCoR-L1 als Auslöser des veränderten Verhaltens anzunehmen (siehe Kapitel 5.5). Ein sicherer Ausschluss von Nebenmutationen ist allerdings nur über eine Genomsequenzierung möglich, die innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Wahl der Einbring-Methode des CRISPR/Cas9-Systems in die Zelle

Eine weitere Fehlerquelle bietet die gewählte Methode mit der man das CRISPR/Cas9-System nach intrazellulär transportiert. Hierbei stehen Verfahren wie die Transfektion eines Plasmids mit folgender intrazellulärer Expression von Cas9 und der gRNA [102] oder die Injektion einzelner CRISPR-Komponenten als RNA [103, 104] zur Verfügung. Die Effizienz der gewählten Methode ist abhängig von den gewählten Zellen und Gewebe, weshalb robustere Verfahren mit einer hohen Transfektionsrate gefordert werden [90]. In dieser Arbeit wurde ein Plasmid erzeugt (siehe Kapitel 5.4.1), welches in die Zielzellen transfiziert wurde und eine Puromycinresistenz zur anschließenden positiv-Selektion der transfizierten Zellen trägt. Durch die Selektion der Zellen wird eine mögliche niedrige Transfektionsrate kompensiert, da im Anschluss nur transfizierte Zellen überleben.

6.3.3 Effizienz der Etablierung eines Knockouts von *BCORL1* in Lebertumorzellen mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems

Anhand der Abbildung 5.9 lässt sich die Effizienz der gewählten Methodik des durch CRISPR/Cas9 modulierten Knockouts von *BCORL1* in den verschiedenen Zelllinien (HUH7, HUH6, Hep3B und HepG2) erkennen. Die transfizierten Zellen wurden nach der Selektion und Einzelzellklonierung mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei auftretenden Wildtypsequenzen teilweise untransfizierte Zellen durch die Selektion nicht abgetötet wurden oder es in transfizierten Zellen zu keinem CRISPR/Cas9 induzierten DNA-Strangbruch an der Zielsequenz kam. Da dies bei 22 analysierten Zellkulturen allerdings nur zweimal vorkam, ist von einer hohen Effektivität des CRISPR/Cas9-Systems und einer ausreichenden Selektionsstärke auszugehen.

Nicht klonale Sequenzen wurden bei Zellkulturen gefunden, die nach der Selektion nicht ausreichend vereinzelt wurden. Dies zeigte sich in sieben Fällen, was möglicherweise durch einen erhöhten Verdünnungsfaktor von 0,5 Zellen pro Well weiter verbessert werden könnte (siehe Kapitel 4.2.5). In diesem Fall lag durch die X-chromosomale Lage von *BCORL1* und die Verwendung männlicher Zelllinien ein begünstigender Faktor vor. Bei Verwendung eines Genlokus auf einem der homologen Chromosomenpaare wäre es möglich gewesen, dass die Anzahl der nicht-klonalen Sequenzen deutlich höher ausfällt.

Insgesamt wurden aus den 22 analysierten Zellkulturen 13 Kulturen mit klonaler Mutation identifiziert. Dies entspricht einer Erfolgsrate von 59 %. Zusätzlich funktionierte die Methode in allen verwendeten Zelllinien und führte bei mindestens einer der beiden verwendeten Zielsequenz-Loci zu einer Leserasterverschubs-Mutation. Bei den Zelllinien HUH7 und Hep3B konnten sogar bei beiden Zielsequenzen, 1 und 2, unterschiedliche Mutationen erzeugt werden. Insgesamt ist die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Etablierung eines *BCORL1*-Knockouts in den getesteten Leberzelllinien als Erfolg zu werten.

6.4 Veränderungen des tumorbiologischen Zellverhaltens nach einem *BCORL1*-Knockout

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zelluläre Veränderungen bei *BCORL1*-Überexpression und -Knockout in Leberzelllinien untersucht und auf tumorbiologisches Verhalten getestet. Lediglich der Knockout von *BCORL1* zeigte Veränderungen der Morphologie und des Wachstums der Tumorzellen. Dabei waren bei zwei der Knockout-Zelllinien (HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33) ein verändertes Wachstumsverhalten erkennbar.

Außerdem konnte eine signifikante, langsamere Proliferation dieser HUH7 Knockout-Linien im Vergleich zum HUH7 Wildtyp mittels MTT-Test nachgewiesen werden.

6.4.1 Einstellung eines makroskopisch veränderten Wachstumsverhaltens in HUH7-Zellen nach *BCORL1*-Knockout

Die Einstellung eines neuen Phänotyps einer Tumorzelllinie nach Veränderung der Genetik oder Behandlung mit Wirkstoffen ist nur selten beschrieben. Provoziert wurde dies in einer Studie zur epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) von Zellen des Oropharynxkarzinom durch die Therapie mit BMP-4 (bone morphogenic protein-4). Hierbei sollte ein Modell entwickelt werden, um Tumorstammzellen (CSCs) nach der Behandlung mit BMP-4 und der EMT zu identifizieren. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass sich das Wachstum der verwendeten Tca8113-Zellen von einem plattenförmigen zu einem spindelförmigen Aussehen veränderte. Dies ist typisch für eine epitheliale-mesenchymale Transition. Diese Veränderung stellte sich nach einer Kultivierungsdauer der Zellen von 2 Wochen ein. Zusätzlich wurden in den behandelten Zellen eine erhöhte Expression von CD44 nachgewiesen, was für Tumorstammzellen charakteristisch ist [105]. Es ist bereits bekannt, dass die Überexpression von EMT-Transkriptionsfaktoren nicht nur einen mesenchymalen Phänotyp erzeugt, sondern ebenfalls die tumorbildenden Fähigkeiten von Zelllinien und somit die Entwicklung in Richtung Tumorstammzellen fördern kann [106–108]. Tumorstammzellen zeigen sich in diesem Zusammenhang deshalb interessant, da deren Wachstum in Zellkulturen als sphärozytär beschrieben wird [109,110]. Dies könnte ähnlich zu dem Wachstum der in dieser Arbeit etablierten *BCORL1*-Knockout-Zelllinien - HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 - sein.

Ein verändertes Wachstumsverhalten von Tumorzellen nach einem Knockout an einem Tumorsupressorgen durch CRISPR/Cas9 konnte ebenfalls in einer Studie durch Hegge et al. in Glioblastomzellen gezeigt werden [111]. Hierbei wurde ein Knockout von *PAX6* erzeugt und nach 16 Tagen Kultivierungszeitraum eine veränderte, kopfsteinpflasterartige Zellmorphologie mit dem Wachstum in engeren Kolonien gesehen. Diese Knockout-Zellen waren im Anschluss resistenter gegenüber oxidativem Stress und medikamentöser Therapie. Auffällig ist, dass die *BCORL1*-Knockout-Zelllinien - HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 - ein ähnlich verändertes Wachstumsverhalten zeigen und beide Gene - *PAX6* und *BCORL1* - für die Gen-Repression verantwortlich sind. Deshalb sollten in den *BCORL1*-Knockout-Zelllinien weitere Studien bezüglich der Resistenz gegenüber oxidativem Stress und Chemotherapeutika durchgeführt werden.

Vergleich des Wachstumsverhaltens der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien - HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 - mit sich entwickelnden Tumorstammzellen

Das veränderte Wachstumsverhalten der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien - HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 - äußerte sich nach einem Kultivierungszeitraum von zwei Monaten in einer kumulierten, dreidimensionalen, koloniebildenden Form (siehe Kapitel 5.5). Das verzögerte Auftreten des Phänotyps zeigte sich auch in der zuvor beschriebenen Veränderung des Wachstumsverhaltens der Tca8113-Zellen nach BMP-4 Behandlung, beginnend nach zwei Wochen [105]. Der in dieser Arbeit gesehene etwas längere Zeitraum von zwei Monaten ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen zuvor aus Einzelzell-Kolonien wachsen mussten und deshalb mehr Zeit benötigen als bereits bestehende Zellkulturen, die ihr Wachstumsverhalten verändern. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit bis zur vollen Ausprägung des makroskopischen Phänotyps abgewartet, wohingegen in der Studie von Bin Qiao et al. nach zwei Wochen nur erste Anzeichen dieser Veränderung makroskopisch zu sehen waren [105].

In der Literatur sind nur wenige Studien zu Wachstumsformen von Tumorstammzell-Kolonien in zweidimensionalen Kulturen zu finden. Dies liegt an der erschwerten Kultivierungsmöglichkeit alleiniger Tumorstammzellen, weshalb spezielle Verfahren wie die Sphäroidzellkultur entwickelt wurden. Sphäroidzellkulturen werden zur Isolierung von Tumorstammzellen benutzt, indem serumfreies Medium und nonadhärente Platten verwendet werden [112]. Dieses Umfeld bietet Tumorzellen ein erschwertes Wachstum und führt meist zu deren Apoptose, wohingegen Tumorstammzellen überleben und wachsen können. Dadurch entstehen dreidimensionale Tumorstammzell-Sphären, die makroskopisch dem dreidimensionalen Wachstum der Zelllinien HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 in zweidimensional angelegten Kulturen ähneln. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Lungenkarzinomzellen nach einer Sortierung auf CD44+ und EPCAM+ in niedrig-adhärenenten Platten ein sphärozytäres, dreidimensionales Wachstum zu sehen ist. In der initialen Sortierung auf CD44+ und EPCAM+ sollten Zellen isoliert werden, die tumorstammzellähnliche Charakteristika besitzen [113]. In einer weiteren Studie wurde nach einer Sortierung von SW480 Zellen auf CD133+ und CD133- die Fähigkeit von Einzelzellen getestet, Kolonien zu bilden. Dies weist auf stammzellähnliche Eigenschaften einer Tumorzellen hin. Dabei konnte gezeigt werden, dass CD133 positive Zellen in zweidimensionalen und dreidimensionalen Kulturen signifikant mehr kugelförmige Kolonien bildeten als CD133 negative [114]. Hierbei zeigen, wie oben beschrieben, CD 133+ Zellen einen Zusammenhang mit Tumorstammzellen. Dies könnte eine Korrelation zwischen einem kolonieförmigen, rundlichen Wachstum in zweidimensionalen Zellkulturen, wie es in dieser

Arbeit bei HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 beobachtet wurde, und einem spärözytären Wachstum in dreidimensionalen Zellkulturen, wie es Tumorstammzellen zeigen, andeuten.

Unklar bleibt, ob es sich bei diesem sphären-ähnlichen Wachstum der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien - HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 - tatsächlich um eine Entwicklung in Richtung Tumorstammzellen handelt. Es fehlen weitere Studien wie die Messung der Expression von CD44 und CD133. Auch wäre das Wachstumsverhalten der Knockout-Zelllinien in einer Sphäroidzellkultur interessant. Aktuell kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass das veränderte Wachstum nicht durch den Knockout von *BCORL1* entstanden ist, sondern durch die Manipulation der Zellen während der CRISPR/Cas9-Methode. Hierbei könnte vor allem die Aussaat der selektierten Zellen in Einzelzell-Kolonien eine Ursache für das veränderte Wachstumsverhalten darstellen, da ein koloniebildendes Wachstum einen Überlebensvorteil bietet. Um dies zu überprüfen, müssen im Verlauf sogenannte Rescue-Versuche durchgeführt werden, indem das intakte *BCORL1* erneut in die Knockout-Zelllinien transfiziert wird. Falls sich im Anschluss das Wachstumsverhalten dieser Zellen dem der HUH7-Wildtypzellen angleicht, kann der Einfluss des *BCORL1*-Knockouts auf ein kolonieförmiges, sphärozytäres Wachstumsverhalten bewiesen werden. Dass der Funktionsverlust einzelner Transkriptionsfaktoren zu einer Transition von Tumorzellen zu einem tumorstammzellähnlichen Verhalten führen kann, ist beispielsweise in der akut lymphatischen Leukämie bereits beschrieben [115]. Weitere Studien zu *BCORL1* werden bestätigen müssen, ob auch eine Mutation von *BCORL1* eine solche Transition initiieren kann.

6.4.2 Langsamere Proliferation der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien im Vergleich zu HUH7-Wildtypzellen

Mittels MTT-Test wurde in dieser Arbeit eine signifikant langsamere Proliferation der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 gegenüber HUH7 Wildtypzellen gezeigt (siehe Kapitel 5.5). Es ist bereits bekannt, dass in der Regel nach einem Knockout eines Tumorsuppressorgens die Zellproliferation ansteigt [111, 116, 117]. Allerdings war dies nach Knockout des Korepressors *BCORL1* in dieser Arbeit nicht der Fall.

Tumorzellen mit einer langsameren Proliferation konnten als Subpopulationen bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen und untersucht werden [118–120]. In diesen Studien zeigt sich ein homogenes Bild, dass diese langsam proliferierenden Zellen für das persistierende Tumorstammzellwachstum verantwortlich [118], gegenüber Chemotherapie resistenter sind und vermehrt stammzellähnliche Eigenschaften besitzen [119, 120]. Ein Zusammen-

hang zwischen langsam proliferierenden Tumorzellen und Tumorstammzellen wird aktuell noch diskutiert [120]. Somit zeigt auch dieses Ergebnis, dass Lebertumorzellen nach einem Knockout von *BCORL1* Eigenschaften entwickeln könnten, die mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie und einer schlechteren Prognose korrelieren. Eine Transition von HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 in Richtung Tumorstammzellen lässt sich mit der langsameren Proliferation ebenfalls nicht beweisen; jedoch zeigt sich damit ein weiteres Indiz.

6.4.3 Möglicher Zusammenhang eines *BCORL1*-Knockouts mit der Redifferenzierung zu Tumorstammzellen

Insgesamt wäre die Transition der HUH7-Wildtypzellen durch einen *BCORL1*-Knockout zu einem tumorstammzell-ähnlichen Wachstumsverhalten denkbar. Auch wäre die Entwicklung von Tumorstammzellen aufgrund von bisher unbeschriebenen Mutationen im Hepatoblastom eine Erklärung für Hepatoblastomfälle mit schlechtem Verlauf, Rezidiven und schlechterem Ansprechen auf Chemotherapie. Weitere Forschung in diesem Feld an *BCORL1* und weiteren Genmutationen wird diese Theorie untersuchen müssen und kann möglicherweise für ein neues Verständnis für den schlechteren Verlauf mancher Hepatoblastomfälle sorgen.

6.5 Veränderungen der Genexpressionslevel in Lebertumorzellen nach einem *BCORL1*-Knockout

6.5.1 RNA-Sequenzierungsdaten der HUH7 Knockout-Zelllinie zeigen eine veränderte Expression von Genen der Zelladhäsion und der Zellverbindung

Die bisherigen Daten der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien HUH6 und HepG2 zeigen keinen veränderten Phänotyp und keine veränderte Proliferationsrate im Vergleich zu deren Wildtypzelllinien. Die Einstellung dieser Veränderung zu einem späteren Zeitpunkt ist jedoch denkbar. Deshalb ist zu vermuteten, dass auch die aktuell erhobenen Expressionsdaten der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien HUH6 und HepG2 wenig aussagekräftig sind und im Verlauf, nach verändertem Wachstum und Proliferation, die RNA-Sequenzierung nochmals durchgeführt werden sollte. Deswegen sind vor allem die isolierten Sequenzierungsdaten der Knockout-Zelllinie HUH7 interessant. Der sich nach dem Knockout von *BCORL1* eingestellte Phänotyp, zusammen mit der veränderten Zellviabilität weisen auf ein deutlich verändertes Expressionsprofil dieser Zelllinien hin und könnten Zielgene von BCoR-L1 andeuten. Die beschriebenen hochregulierten Gene der Zell-Zell-Verbindung nach einem *BCORL1*-Knockout, sind hierbei besonders interessant, da in neuen Studien gezeigt wer-

den konnte, dass eine Reihe an Zelladhäsionsmechanismen und eine intakte epitheliale Struktur die kollektive Invasion von Tumorzellen unterstützt [121]. Die kollektive Invasion von Tumorzellen wird im Gegensatz zu Einzelzell-Invasion als klinisch relevantere Art der Tumorzell-Migration angesehen und verdeutlicht die Bedeutung der intakten epithelialen Eigenschaften [122]. Die verstärkte Anreicherung der Zelladhäsionsproteine E-Cadherin und β -Catenin nach einem *BCORL1*-Knockout konnte in dieser Arbeit durch immunhistochemische Färbungen gezeigt werden. Zusammengefasst zeigt sich die Kombination aus veränderten Genfunktionen der Zelladhäsion (v.a. *CDH1*) und der Zell-Zell-Verbindungen interessant, da BCoR-L1 somit eine wichtige Rolle in der Regulation der kollektiven Zell-Invasion und -Migration darstellen könnte. Durch Mutationen von *BCORL1* könnten Tumorzellen die benötigten Verbindungen schaffen, um als Kollektiv in andere Gewebe migrieren zu können und somit Metastasen zu bilden.

Einfluss einer veränderten E-Cadherin-Funktion auf Metastasenbildung

Durch Pagan et al. beschrieben ist *CDH1* eines der Zielgene von BCoR-L1 und wird durch dessen Bindung reprimiert [62]. Deshalb ist es interessant, dass Cadherin-Catenin Komplexe eine große Rolle in Karzinomen vieler verschiedener Gewebe spielen [63]. Die Rolle von E-cadherin ist bei der Metastasenbildung jedoch umstritten. In der Vergangenheit ging man davon aus, dass eine verminderte Funktion von E-Cadherin förderlich für die Metastasenbildung eines Karzinoms sei [123–128]. Neuere Studien haben zunächst für das Pankreaskarzinom gezeigt, dass eine stabile E-Cadherin-Expression die Metastasenbildung in die Leber beschleunigt [129]. Zusätzlich konnte ebenfalls bei Brustkrebs gezeigt werden, dass E-Cadherin oxidativen Stress und die Apoptose metastasierender Zellen hemmt [130]. Somit stellt E-Cadherin einen Überlebensfaktor für Tumorzellen dar, die dadurch den mechanischen Stress der Migration in ein anderes Gewebe leichter überstehen. Durch einen Funktionsverlust von BCoR-L1 entsteht eine geringere Repression der *CDH1*-Expression. Eine vermehrte Anreicherung von E-Cadherin in der Zellmembran konnte in dieser Arbeit durch eine immunhistochemische Färbung der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien gezeigt werden. Diese erhöhte Expression von E-Cadherin könnte, wie oben beschrieben, ein Vorteil für Hepatoblastomzellen in Überleben und Metastasierung sein und gleichzeitig ein Indiz dafür sein, dass *BCORL1*-Mutationen mit einer erhöhten Metastasenbildung und somit einem schlechteren Verlauf korrelieren könnten.

6.5.2 Ein *BCORL1*-Funktionsverlust induziert die Expression von *KRT 19* und *KRT 15*

Das Hepatoblastom ist ein Tumor, der während der fetalen Leberdifferenzierung entsteht [13]. Um den Zeitpunkt der Entstehung des Hepatoblastoms weiter klassifizieren zu

können, erfolgte durch Cairo et al. eine Einteilung mittels einer 16-Gen Signatur, die das Hepatoblastom in zwei Subklassen, C1 und C2, gruppiert [131]. Diese Einteilung anhand der Genprofile zeigt, dass eine Entwicklung des Hepatoblastoms in einer frühen fetalen Phase (C2-Gruppe) mit einer höheren Proliferationsrate, einem fortgeschrittenem Tumorstadium und einem schlechterem Verlauf der Erkrankung korreliert. Die C1-Gruppe zeigt hingegen Genmarker eines späteren, fetalen oder postnatalen Leberentwicklungsstadiums und korreliert mit einem besseren Verlauf. Analysen der Genprofile der C2-Gruppe zeigt eine Expression von Genen, die hepatischen Stammzellen ähneln [131]. Dass Tumore im Kindesalter stammzellähnliche Genprofile besitzen, ist beispielsweise auch für das Nephroblastom [132] und für das Medulloblastom [133] bekannt.

In der Cluster-Analyse der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien fallen bei *KRT19* und *KRT15* eine ähnlich starke Induktion auf. Diese beiden Gene sind Stammzellmarker und könnten somit Hinweise für eine Redifferenzierung zu stammzellähnlichen Tumorzellen durch den *BCORL1*-Knockout sein, was eine schlechtere Prognose für das Hepatoblastom darstellen würde [134,135]. Vor allem *KRT19* zählt charakteristisch zu den fetalen und stammzellzugehörigen Genen in Hepatozyten [136]. Die schlechte Prognose durch eine erhöhte Aktivität von *KRT 19* konnte bereits im hepatozellulären Karzinom gezeigt werden, indem es die Progression des Tumors durch eine erhöhte Invasion und Angiogenese fördert [137]. Eine Überexpression von *KRT 19* stellt einen wichtigen Marker in der Unterscheidung zwischen der C1 - und C2 - Subklasse des Hepatoblastoms dar und spricht für einen früheren, schlechteren Verlauf der Hepatoblastomerkrankung [131]. Ein *BCORL1* Knockout könnte durch die Überexpression der beiden Gene *KRT 19* und *KRT 15* erklären, wieso manche Hepatoblastomfälle diesen schlechteren Verlauf der Tumorerkrankung zeigen und weist auf ein weiteres Indiz für eine Redifferenzierung in Richtung Tumorstammzellen hin. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Überexpression von *KRT 19* mit einer langsameren Proliferation von Tumorzellen einhergeht [135]. Dies ist ebenfalls stimmig zu der in den *BCORL1*-Knockout-Zelllinien gesehenen langsameren Proliferation von HUH7 CRISPR O1.1 und HUH7 CRISPR O2.33 im Vergleich zu HUH7-Wildtypzellen.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Obwohl das Hepatoblastom der häufigste Lebertumor im Kindesalter ist, ist trotz eines bereits vorhandenen Verständnisses für die Entstehung des Tumors der Grund von Metastasierung oder besonders schweren Verlaufsformen weitestgehend unerforscht. Deshalb wecken Genomanalysen der Hepatoblastompatienten Hoffnung, entscheidende Genmutationen zu identifizieren, die prognostisch und eventuell therapeutisch genutzt werden können.

Da das Hepatoblastom mit nur drei Aberrationen pro Tumor die niedrigste Mutationsrate bislang systematisch sequenzierter Tumorentitäten aufweist, ist das Auftreten einer Mutation von *BCORL1* bei 5,8 % von 69 genotypisierten Hepatoblastomproben besonders interessant. Diese Arbeit zeigt, wie mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems ein *BCORL1*-Knockout in verschiedenen Lebertumor-Zelllinien erzeugt und somit ein Modell entwickelt werden konnte, in welchem die Auswirkung eines Funktionsverlusts von *BCORL1* untersucht werden kann. In funktionellen Analysen der Knockout-Zelllinien zeigte sich die Einstellung eines makroskopisch veränderten Wachstumsverhaltens in HUH7-Zellen nach einem *BCORL1*-Knockout, eine langsamere Proliferation der *BCORL1*-Knockout-Zelllinien im Vergleich zu HUH7-Wildtypzellen und ein verändertes Expressionsprofil, insbesondere eine gesteigerte Expression von *KRT 19* und *KRT 15*. Damit ergeben sich einige Hinweise auf eine Redifferenzierung der Tumorzellen in Richtung Tumorstammzellen. Um diese Vermutung bestätigen zu können, werden weitere Versuche, wie die Analyse der Co-Expression von CD44 und CD133 oder das Wachstum in einer 3-dimensionalen Zellkultur, nötig sein. Die experimentellen Befunde unterstützen die Hypothese, dass *BCORL1* einen Marker für eine gering differenzierte Manifestation des Hepatoblastoms darstellt und eventuell für Therapieansätze genutzt werden könnte.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AFP	Alpha-Fetoprotein
AL	Amplikonlänge
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
AXIN 1/2	axis inhibition protein 1/2
ATP	Adenosintriphosphat
ATP8A1	ATPase Phospholipid Transporting 8A1
β -HCG	humane Choriongonadotropin
BCOR	BCL6 Corepressor
BCORL1	BCL6 Corepressor Like 1
BMP-4	bone morphogenic protein 4
BSA	Bovines Serumalbumin
BWS	Beckwith Wiedemann Syndrom
c	Konzentration
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
CDH1	Cadherin-1
cDNA	komplementäre DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHIC	Childhood Hepatic Tumors International Collaboration
CoA	Coaktivator
COG	Children Oncology Group
CoR	Corepressor
CSC	cancer stem cells

ct	cycle threshold
CT	Computertomografie
CtBP	C-terminal-binding protein
CTNNB1	Catenin Beta 1
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
d	Schichtdicke
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
Δ	Differenz
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	DNA Methyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTT	Dithiothreitol
E _A	Extinktion
ϵ_A	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
EGFP	Verstärkt (Enhanced) Grün Fluoreszierendes Protein
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
EtBr	Ethidiumbromid
Ex	Exon
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
fw	forward
fs	Frameshift
g	Gramm
G	Guanin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat

Gly	Glycin
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
gRNA	guide RNA
h	Stunde
HB	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HRP	Horseradish peroxidase
IGF2	Insulin-like growth factor 2
INI1	integrase interactor 1
IPSA	International Pediatric Transplant Association
IPSO	International Society of Pediatric Surgical Oncology
IVC	Vena cava inferior
JPLT	Japanese Pediatric Liver Tumours Group
kb	Kilobasen
KO	Knockout
KOAc	Kaliumacetat
KRT	Zytokeratin
KUZ	kleinzellig, undifferenzierter Tumor
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny broth - Medium
LK	Lymphknoten
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lok	Lokalisation
Lys	Lysin
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μg	Microgramm
μl	Microliter
μM	Micromolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Muts	Mutationen
N/C	Nukleusanzahl pro Zytoplasmaanteil
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NR	nuclear repeat
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
P	Wahrscheinlichkeit
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PAX6	Paired-box-Gene 6
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PHITT	Paediatric Hepatic International Tumour Trial
PLADO	Cisplatin/Doxorubicin
PNK	Polynukleotid Kinase
POSTTEXT	POST-Treatment EXTent of tumor
PRETEXT	PRE-Treatment EXTent of tumor
PVFD	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Gibco Roswell Park Memorial Institute
rv	reverse
s	Sekunden
Ser	Serin
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	Single Guide RNA

SIOPEL	International Childhood Liver Tumours Strategy Group
SPATA13	Spermatogenesis Associated 13
T	Thymin
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-binding protein
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TF	Transkriptionsfaktoren
TLCT	Transitioneller Leberzelltumor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine
Tyr	Tyrosin
U	Units
UPD	uniparentale Isodisomie
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
Vv.	Venae
WT	Wildtyp
ZFN	Zinkfingernukleasen

Literaturverzeichnis

- [1] M. Tulla, F. Berthold, N. Graf, S. Rutkowski, D. von Schweinitz, C. Spix, and P. Kaatsch. Incidence, trends, and survival of children with embryonal tumors. *Pediatrics*, 136:e623–632, 2015. doi:10.1542/peds.2015-0224.
- [2] J. M. Schnater, S. E. Kohler, W. H. Lamers, D. von Schweinitz, and D. C. Aronson. Where do we stand with hepatoblastoma? a review. *Cancer*, 98:668–678, 2003. doi:10.1002/cncr.11585.
- [3] P. Kaatsch and D. Grabow. The german cohort of long-term survivors of childhood cancer. a population-based cohort in the german childhood cancer registry. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55:843–851, 2012. doi:10.1007/s00103-012-1500-9.
- [4] D. von Schweinitz. Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg*, 15:17–24, 2006. doi:10.1053/j.sempedsurg.2005.11.004.
- [5] O. S. Misick. A case of teratoma hepatis. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 5:128–136, 1898. doi:https://doi.org/10.1002/path.1700050114.
- [6] M. R. DeBaun and M. A. Tucker. Risk of cancer during the first four years of life in children from the beckwith-wiedemann syndrome registry. *J Pediatr*, 132:398–400, 1998. doi:10.1016/s0022-3476(98)70008-3.
- [7] S. Aretz, A. Koch, S. Uhlhaas, W. Friedl, P. Propping, D. von Schweinitz, and T. Pietsch. Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for apc germline mutations? *Pediatr Blood Cancer*, 47:811–818, 2006. doi:10.1002/pbc.20698.
- [8] D. J. Lucas, J. Rubinstein, A. Gosain, G. Tiao, T. Head, J. N. Pratap, R. Williams, S. Helmig, J. Geller, M. Langham, and A. Trobaugh-Lotrario. Surgical and anesthetic management for hepatectomy in two pediatric patients with trisomy 18,

- pulmonary hypertension, and hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 66:e27678, 2019. doi:10.1002/pbc.27678.
- [9] D. López-Terrada, R. Alaggio, M. T. de Dávila, P. Czauderna, E. Hiyama, H. Katzenstein, I. Leuschner, M. Malogolowkin, R. Meyers, S. Ranganathan, Y. Tanaka, G. Tomlinson, M. Fabrè, A. Zimmermann, and M. J. Finegold. Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the los angeles cog liver tumors symposium. *Mod Pathol*, 27:472–491, 2014. doi:10.1038/modpathol.2013.80.
- [10] J. E. Haas, K. A. Muczynski, M. Krailo, A. Ablin, V. Land, T. J. Vietti, and G. D. Hammond. Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. *Cancer*, 64:1082–1095, 1989. doi:10.1002/1097-0142(19890901)64:5<1082::aid-cnrcr2820640520>3.0.co;2-g.
- [11] M. Kasai and I. Watanabe. Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. *Cancer*, 25:551–563, 1970. doi:10.1002/1097-0142(197003)25:3<551::aid-cnrcr2820250309>3.0.co;2-5.
- [12] D. von Schweinitz, S. Glüer, and H. Mildenerger. Liver tumors in neonates and very young infants: diagnostic pitfalls and therapeutic problems. *Eur J Pediatr Surg*, 5:72–76, 1995. doi:10.1055/s-2008-1066170.
- [13] A. Zimmermann. The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis. *Eur J Cancer*, 41:1503–1514, 2005. doi:10.1016/j.ejca.2005.02.035.
- [14] G. Perilongo and E. A. Shafford. Liver tumours. *Eur J Cancer*, 35:953–958; discussion 958–959, 1999. doi:10.1016/s0959-8049(99)00049-0.
- [15] J. Feusner and J. Plaschkes. Hepatoblastoma and low birth weight: a trend or chance observation? *Med Pediatr Oncol*, 39:508–509, 2002. doi:10.1002/mpo.10176.
- [16] P. Reynolds, K. Y. Urayama, J. Von Behren, and J. Feusner. Birth characteristics and hepatoblastoma risk in young children. *Cancer*, 100:1070–1076, 2004. doi:10.1002/cncr.20061.
- [17] D. von Schweinitz, D. Burger, U. Bode, P. Weinel, R. Erttmann, H. Hecker, and H. Mildenerger. Results of the hb-89 study in treatment of malignant epithelial liver tumors in childhood and concept of a new hb-94 protocol. *Klin Padiatr*, 206:282–288, 1994.

- [18] A. d. W. M. F. A.-S. K. Leitlinien. S1-leitlinie 025/011: Hepatoblastom aktueller stand: 06/2016.verfügbar: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-011l_s1_hepatoblastom_2016-06.pdf, zugriff am 20.08.2020. 2016.
- [19] A. Trobaugh-Lotrario, A. O'Neill, P. Li, A. Towbin, C. Weldon, D. Lopez-Terrada, and M. Malogolowkin. Advances in pediatric liver tumors. *Current Hepatology Reports*, 16:51–63, 2017.
- [20] D. J. Roebuck, D. Aronson, P. Clapuyt, P. Czauderna, J. de Ville de Goyet, F. Gauthier, G. Mackinlay, R. Maibach, K. McHugh, O. E. Olsen, J. B. Otte, D. Pariente, J. Plaschkes, M. Childs, and G. Perilongo. 2005 pretext: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the siopel group. *Pediatr Radiol*, 37:123–132; quiz 249–150, 2007. doi:10.1007/s00247-006-0361-5.
- [21] D. C. Aronson, J. M. Schnater, C. R. Staalman, G. J. Weverling, J. Plaschkes, G. Perilongo, J. Brown, A. Phillips, J. B. Otte, P. Czauderna, G. MacKinlay, and A. Vos. Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the international society of pediatric oncology liver tumor study group siopel-1 study. *J Clin Oncol*, 23:1245–1252, 2005. doi:10.1200/JCO.2005.07.145.
- [22] J. Brown, G. Perilongo, E. Shafford, J. Keeling, J. Pritchard, P. Brock, C. Dicks-Mireaux, A. Phillips, A. Vos, and J. Plaschkes. Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma– results from the international society of paediatric oncology (siop) study siopel 1. *Eur J Cancer*, 36:1418–1425, 2000. doi:10.1016/s0959-8049(00)00074-5.
- [23] G. Perilongo, E. Shafford, R. Maibach, D. Aronson, L. Brugieres, P. Brock, M. Childs, P. Czauderna, G. MacKinlay, J. B. Otte, J. Pritchard, R. Rondelli, M. Scopinaro, C. Staalman, J. Plaschkes, and S. International Society of Paediatric Oncology. Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the international society of paediatric oncology–siopel 2. *Eur J Cancer*, 40:411–421, 2004. doi:10.1016/j.ejca.2003.06.003.
- [24] R. L. Meyers, G. Tiao, J. de Ville de Goyet, R. Superina, and D. C. Aronson. Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation. *Curr Opin Pediatr*, 26:29–36, 2014. doi:10.1097/mop.000000000000042.
- [25] J. Fuchs, J. Rydzynski, H. Hecker, H. Mildemberger, D. Bürger, D. Harms, and V. S. D. The influence of preoperative chemotherapy and surgical technique in the treatment of hepatoblastoma—a report from the german cooperative liver tumour

- studies hb 89 and hb 94. *Eur J Pediatr Surg*, 12:255–261, 2002. doi:10.1055/s-2002-34484.
- [26] B. Haeberle and D. Schweinitz. Treatment of hepatoblastoma in the german cooperative pediatric liver tumor studies. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4:493–498, 2012. doi:10.2741/395.
- [27] J. M. Schnater, D. C. Aronson, J. Plaschkes, G. Perilongo, J. Brown, J. B. Otte, L. Brugieres, P. Czauderna, G. MacKinlay, and A. Vos. Surgical view of the treatment of patients with hepatoblastoma: results from the first prospective trial of the international society of pediatric oncology liver tumor study group. *Cancer*, 94:1111–1120, 2002.
- [28] K. Watanabe. Current chemotherapeutic approaches for hepatoblastoma. *Int J Clin Oncol*, 18:955–961, 2013. doi:10.1007/s10147-013-0616-8.
- [29] D. von Schweinitz, D. J. Byrd, H. Hecker, P. Weinel, U. Bode, D. Burger, R. Erttmann, D. Harms, and H. Mildenerger. Efficiency and toxicity of ifosfamide, cisplatin and doxorubicin in the treatment of childhood hepatoblastoma. study committee of the cooperative paediatric liver tumour study hb89 of the german society for paediatric oncology and haematology. *Eur J Cancer*, 33:1243–1249, 1997. doi:10.1016/s0959-8049(97)00095-6.
- [30] J. B. Otte, J. de Ville de Goyet, and R. Reding. Liver transplantation for hepatoblastoma: indications and contraindications in the modern era. *Pediatr Transplant*, 9:557–565, 2005. doi:10.1111/j.1399-3046.2005.00354.x.
- [31] R. L. Meyers, R. Maibach, E. Hiyama, B. Haberle, M. Krailo, A. Rangaswami, D. C. Aronson, M. H. Malogolowkin, G. Perilongo, D. von Schweinitz, M. Ansari, D. Lopez-Terrada, Y. Tanaka, R. Alaggio, I. Leuschner, T. Hishiki, I. Schmid, K. Watanabe, K. Yoshimura, Y. Feng, E. Rinaldi, D. Saraceno, M. Derosa, and P. Czauderna. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the children’s hepatic tumors international collaboration. *Lancet Oncol*, 18:122–131, 2017. doi:10.1016/S1470-2045(16)30598-8.
- [32] J. Pritchard, J. Brown, E. Shafford, G. Perilongo, P. Brock, C. Dicks-Mireaux, J. Keeling, A. Phillips, A. Vos, and J. Plaschkes. Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach—results of the first prospective study of the international society of pediatric oncology. *J Clin Oncol*, 18:3819–3828, 2000. doi:10.1200/JCO.2000.18.22.3819.

- [33] G. Perilongo, R. Maibach, E. Shafford, L. Brugieres, P. Brock, B. Morland, B. de Camargo, J. Zsiros, D. Roebuck, A. Zimmermann, D. Aronson, M. Childs, E. Widing, V. Laithier, J. Plaschkes, J. Pritchard, M. Scopinaro, G. MacKinlay, and P. Czauderna. Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *N Engl J Med*, 361:1662–1670, 2009. doi:10.1056/NEJMoa0810613.
- [34] J. Zsiros, R. Maibach, E. Shafford, L. Brugieres, P. Brock, P. Czauderna, D. Roebuck, M. Childs, A. Zimmermann, V. Laithier, J. B. Otte, B. de Camargo, G. MacKinlay, M. Scopinaro, D. Aronson, J. Plaschkes, and G. Perilongo. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the siopel-3hr study. *J Clin Oncol*, 28:2584–2590, 2010. doi:10.1200/JCO.2009.22.4857.
- [35] J. Zsiros, L. Brugieres, P. Brock, D. Roebuck, R. Maibach, A. Zimmermann, M. Childs, D. Pariente, V. Laithier, J. B. Otte, S. Branchereau, D. Aronson, A. Rangaswami, M. Ronghe, M. Casanova, M. Sullivan, B. Morland, P. Czauderna, G. Perilongo, and G. International Childhood Liver Tumours Strategy. Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (siopel-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol*, 14:834–842, 2013. doi:10.1016/S1470-2045(13)70272-9.
- [36] G. E. Tomlinson and R. Kappler. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. *Pediatric blood and cancer*, 59:785–792, 2012. doi:10.1002/pbc.24213.
- [37] L. J. Hughes and V. V. Michels. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet*, 43:1023–1025, 1992. doi:10.1002/ajmg.1320430621.
- [38] R. Fukuzawa, J. Hata, Y. Hayashi, H. Ikeda, and A. E. Reeve. Beckwith-wiedemann syndrome-associated hepatoblastoma: wnt signal activation occurs later in tumorigenesis in patients with 11p15.5 uniparental disomy. *Pediatr Dev Pathol*, 6:299–306, 2003. doi:10.1007/s10024-003-1009-1.
- [39] M. Eichenmüller, F. Trippel, M. Kreuder, A. Beck, T. Schwarzmayr, B. Häberle, S. Cairo, I. Leuschner, D. von Schweinitz, T. M. Strom, and R. Kappler. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with hcc-like features. *J Hepatol*, 61:1312–1320, 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.08.009.
- [40] S. Cairo, C. Armengol, and M. A. Buendia. Activation of wnt and myc signaling in hepatoblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4:480–486, 2012. doi:10.2741/393.
- [41] J. Tao, D. F. Calvisi, S. Ranganathan, A. Cigliano, L. Zhou, S. Singh, L. Jiang, B. Fan, L. Terracciano, S. Armeanu-Ebinger, S. Ribback, F. Dombrowski, M. Evert,

- X. Chen, and S. P. S. Monga. Activation of beta-catenin and yap1 in human hepatoblastoma and induction of hepatocarcinogenesis in mice. *Gastroenterology*, 147:690–701, 2014. doi:10.1053/j.gastro.2014.05.004.
- [42] K. M. Cadigan and R. Nusse. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 11:3286–3305, 1997. doi:10.1101/gad.11.24.3286.
- [43] H. Oda, Y. Imai, Y. Nakatsuru, J. Hata, and T. Ishikawa. Somatic mutations of the apc gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res*, 56:3320–3323, 1996.
- [44] K. Taniguchi, L. R. Roberts, I. N. Aderca, X. Dong, C. Qian, L. M. Murphy, D. M. Nagorney, L. J. Burgart, P. C. Roche, D. I. Smith, J. A. Ross, and W. Liu. Mutational spectrum of beta-catenin, axin1, and axin2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21:4863–4871, 2002. doi:10.1038/sj.onc.1205591.
- [45] A. Koch, N. Weber, A. Waha, W. Hartmann, D. Denkhaus, J. Behrens, W. Birchmeier, D. von Schweinitz, and T. Pietsch. Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (axin2) in hepatoblastomas. *J Pathol*, 204:546–554, 2004. doi:10.1002/path.1662.
- [46] A. de La Coste, B. Romagnolo, P. Billuart, C. A. Renard, M. A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn, and C. Perret. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:8847–8851, 1998. doi:10.1073/pnas.95.15.8847.
- [47] M. A. Buendia. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol*, 39:530–535, 2002. doi:10.1002/mpo.10180.
- [48] T. Nguyen, P. Nioi, and C. B. Pickett. The nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, 284:13291–13295, 2009. doi:10.1074/jbc.R900010200.
- [49] A. Lau, N. F. Villeneuve, Z. Sun, P. K. Wong, and D. D. Zhang. Dual roles of nrf2 in cancer. *Pharmacol Res*, 58:262–270, 2008. doi:10.1016/j.phrs.2008.09.003.
- [50] M. E. Abazeed, D. J. Adams, K. E. Hurov, P. Tamayo, C. J. Creighton, D. Sonkin, A. O. Giacomelli, C. Du, D. F. Fries, K. K. Wong, J. P. Mesirov, J. S. Loeffler, S. L. Schreiber, P. S. Hammerman, and M. Meyerson. Integrative radiogenomic profiling of squamous cell lung cancer. *Cancer Res*, 73:6289–6298, 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1616.

- [51] S. Vilarinho, E. Z. Erson-Omay, A. S. Harmanci, R. Morotti, G. Carrion-Grant, J. Baranoski, A. S. Knisely, U. Ekong, S. Emre, K. Yasuno, K. Bilguvar, and M. Günel. Paediatric hepatocellular carcinoma due to somatic *ctnnb1* and *nfe2l2* mutations in the setting of inherited bi-allelic *abcb11* mutations. *J Hepatol*, 61:1178–1183, 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.003.
- [52] J. C. Nault, M. Mallet, C. Pilati, J. Calderaro, P. Bioulac-Sage, C. Laurent, A. Laurent, D. Cherqui, C. Balabaud, and J. Zucman-Rossi. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*, 4:2218, 2013. doi:10.1038/ncomms3218.
- [53] M. Levine and R. Tjian. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424:147–151, 2003. doi:10.1038/nature01763.
- [54] K. A. Gelato and W. Fischle. Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. *Biol Chem*, 389:353–363, 2008. doi:10.1515/BC.2008.048.
- [55] J. L. Thorne, M. J. Campbell, and B. M. Turner. Transcription factors, chromatin and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 41:164–175, 2009. doi:10.1016/j.biocel.2008.08.029.
- [56] S. Battaglia, O. Maguire, and M. J. Campbell. Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *Int J Cancer*, 126:2511–2519, 2010. doi:10.1002/ijc.25181.
- [57] M. A. Blevins, M. Huang, and R. Zhao. The role of *ctbp1* in oncogenic processes and its potential as a therapeutic target. *Mol Cancer Ther*, 16:981–990, 2017. doi:10.1158/1535-7163.mct-16-0592.
- [58] K. Jepsen and M. G. Rosenfeld. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci*, 115:689–698, 2002.
- [59] K. Struhl. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*, 12:599–606, 1998. doi:10.1101/gad.12.5.599.
- [60] E. Bartova, J. Krejci, A. Harnicarova, G. Galiova, and S. Kozubek. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem*, 56:711–721, 2008. doi:10.1369/jhc.2008.951251.
- [61] R. Marmorstein and S. Y. Roth. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, 11:155–161, 2001. doi:10.1016/s0959-437x(00)00173-8.

- [62] J. K. Pagan, J. Arnold, K. J. Hanchard, R. Kumar, T. Bruno, M. J. Jones, D. J. Richard, A. Forrest, A. Spurdle, E. Verdin, M. Crossley, M. Fanciulli, G. Chenevix-Trench, D. B. Young, and K. K. Khanna. A novel corepressor, bcor-l1, represses transcription through an interaction with ctbp. *J Biol Chem*, 282:15248–15257, 2007. doi:10.1074/jbc.M700246200.
- [63] K. M. Hajra and E. R. Fearon. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 34:255–268, 2002. doi:10.1002/gcc.10083.
- [64] J. P. Thiery. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 15:740–746, 2003. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.006.
- [65] M. Takeichi. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 5:806–811, 1993. doi:10.1016/0955-0674(93)90029-p.
- [66] F. Damm, V. Chesnais, Y. Nagata, K. Yoshida, L. Scourzic, Y. Okuno, R. Itzykson, M. Sanada, Y. Shiraishi, V. Gelsi-Boyer, A. Renneville, S. Miyano, H. Mori, L. Y. Shih, S. Park, F. Dreyfus, A. Guerci-Bresler, E. Solary, C. Rose, S. Cheze, T. Prebet, N. Vey, M. Legentil, Y. Duffourd, S. de Botton, C. Preudhomme, D. Birnbaum, O. A. Bernard, S. Ogawa, M. Fontenay, and O. Kosmider. Bcor and bcorl1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood*, 122:3169–3177, 2013. doi:10.1182/blood-2012-11-469619.
- [67] M. Li, R. Collins, Y. Jiao, P. Ouillette, D. Bixby, H. Erba, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, and S. N. Malek. Somatic mutations in the transcriptional corepressor gene bcorl1 in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*, 118:5914–5917, 2011. doi:10.1182/blood-2011-05-356204.
- [68] F. Lose, J. Arnold, D. B. Young, C. J. Brown, G. J. Mann, G. M. Pupo, C. Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast, K. K. Khanna, G. Chenevix-Trench, and A. B. Spurdle. Bcor-l1 variation and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9:R54, 2007. doi:10.1186/bcr1759.
- [69] L. Wang, S. Yamaguchi, M. D. Burstein, K. Terashima, K. Chang, H. K. Ng, H. Nakamura, Z. He, H. Doddapaneni, L. Lewis, M. Wang, T. Suzuki, R. Nishikawa, A. Natsume, S. Terasaka, R. Dauser, W. Whitehead, A. Adekunle, J. Sun, Y. Qiao, G. Marth, D. M. Muzny, R. A. Gibbs, S. M. Leal, D. A. Wheeler, and C. C. Lau. Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature*, 511:241–245, 2014. doi:10.1038/nature13296.
- [70] J. A. Wamstad, C. M. Corcoran, A. M. Keating, and V. J. Bardwell. Role of the transcriptional corepressor bcor in embryonic stem cell differentiation and early embryonic development. *PLoS One*, 3:e2814, 2008. doi:10.1371/journal.pone.0002814.

- [71] Z. Fan, T. Yamaza, J. S. Lee, J. Yu, S. Wang, G. Fan, S. Shi, and C. Y. Wang. Bcor regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms. *Nat Cell Biol*, 11:1002–1009, 2009. doi:10.1038/ncb1913.
- [72] E. Tiacci, V. Grossmann, M. P. Martelli, A. Kohlmann, T. Haferlach, and B. Falini. The corepressors bcor and bcor11: two novel players in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 97:3–5, 2012. doi:10.3324/haematol.2011.057901.
- [73] M. R. Capecchi. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 6:507–512, 2005. doi:10.1038/nrg1619.
- [74] T. Cathomen and J. Keith Joung. Zinc-finger nucleases: The next generation emerges. *Mol Ther*, 16:1200–1207, 2008. doi:10.1038/mt.2008.114.
- [75] Y. G. Kim, J. Cha, and S. Chandrasegaran. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to fok i cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:1156–1160, 1996. doi:10.1073/pnas.93.3.1156.
- [76] J. Smith, M. Bibikova, F. G. Whitby, A. R. Reddy, S. Chandrasegaran, and D. Carroll. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger dna-recognition domains. *Nucleic Acids Res*, 28:3361–3369, 2000. doi:10.1093/nar/28.17.3361.
- [77] M. Bibikova, M. Golic, K. G. Golic, and D. Carroll. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161:1169–1175, 2002.
- [78] S. Alwin, M. B. Gere, E. Guhl, K. Effertz, 3rd Barbas, C. F., D. J. Segal, M. D. Weitzman, and T. Cathomen. Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther*, 12:610–617, 2005. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.094.
- [79] J. C. Miller, M. C. Holmes, J. Wang, D. Y. Guschin, Y. L. Lee, I. Rupniewski, C. M. Beausejour, A. J. Waite, N. S. Wang, K. A. Kim, P. D. Gregory, C. O. Pabo, and E. J. Rebar. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 25:778–785, 2007. doi:10.1038/nbt1319.
- [80] A. J. Bogdanove and D. F. Voytas. Tal effectors: customizable proteins for dna targeting. *Science*, 333:1843–1846, 2011. doi:10.1126/science.1204094.
- [81] A. Munoz Bodnar, A. Bernal, B. Szurek, and C. E. Lopez. Tell me a tale of tales. *Mol Biotechnol*, 53:228–235, 2013. doi:10.1007/s12033-012-9619-3.

- [82] Q. Ding, Y. K. Lee, E. A. Schaefer, D. T. Peters, A. Veres, K. Kim, N. Kuperwasser, D. L. Motola, T. B. Meissner, W. T. Hendriks, M. Trevisan, R. M. Gupta, A. Moisan, E. Banks, M. Friesen, R. T. Schinzel, F. Xia, A. Tang, Y. Xia, E. Figueroa, A. Wann, T. Ahfeldt, L. Daheron, F. Zhang, L. L. Rubin, L. F. Peng, R. T. Chung, K. Musunuru, and C. A. Cowan. A talen genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 12:238–251, 2013. doi:10.1016/j.stem.2012.11.011.
- [83] C. Mussolino, R. Morbitzer, F. Lutge, N. Dannemann, T. Lahaye, and T. Cathomen. A novel tale nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 39:9283–9293, 2011. doi:10.1093/nar/gkr597.
- [84] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169:5429–5433, 1987. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- [85] R. Jansen, J. D. Embden, W. Gaastra, and L. M. Schouls. Identification of genes that are associated with dna repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 43:1565–1575, 2002. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- [86] F. J. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, and E. Soria. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 60:174–182, 2005. doi:10.1007/s00239-004-0046-3.
- [87] T. Pietsch, C. Fonatsch, S. Albrecht, H. Maschek, H. K. Wolf, and D. von Schweinitz. Characterization of the continuous cell line hept1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest*, 74:809–818, 1996.
- [88] T. G. Montague, J. M. Cruz, J. A. Gagnon, G. M. Church, and E. Valen. Chopchop: a crispr/cas9 and talen web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*, 42:W401–407, 2014. doi:10.1093/nar/gku410.
- [89] M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res*, 29:e45, 2001. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- [90] F. Zhang, Y. Wen, and X. Guo. Crispr/cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 23:R40–46, 2014. doi:10.1093/hmg/ddu125.
- [91] D. Hanahan. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166:557–580, 1983. doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8.

- [92] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res*, 7:1513–1523, 1979. doi:10.1093/nar/7.6.1513.
- [93] D. M. Heery, E. Kalkhoven, S. Hoare, and M. G. Parker. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387:733–736, 1997. doi:10.1038/42750.
- [94] K. Loinder and M. Soderstrom. Functional analyses of an lxxll motif in nuclear receptor corepressor (n-cor). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 91:191–196, 2004. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.04.006.
- [95] Y. Shi, J. Sawada, G. Sui, B. Affar el, J. R. Whetstine, F. Lan, H. Ogawa, M. P. Luke, Y. Nakatani, and Y. Shi. Coordinated histone modifications mediated by a ctbp co-repressor complex. *Nature*, 422:735–738, 2003. doi:10.1038/nature01550.
- [96] M. L. Grootclaes and S. M. Frisch. Evidence for a function of ctbp in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 19:3823–3828, 2000. doi:10.1038/sj.onc.1203721.
- [97] Q. Zhang, D. W. Piston, and R. H. Goodman. Regulation of corepressor function by nuclear nadh. *Science*, 295:1895–1897, 2002. doi:10.1126/science.1069300.
- [98] J. H. Laity, B. M. Lee, and P. E. Wright. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 11:39–46, 2001. doi:10.1016/s0959-440x(00)00167-6.
- [99] P. D. Hsu, D. A. Scott, J. A. Weinstein, F. A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. J. Cradick, L. A. Marraffini, G. Bao, and F. Zhang. Dna targeting specificity of rna-guided cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 31:827–832, 2013. doi:10.1038/nbt.2647.
- [100] Y. Fu, J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung, and J. D. Sander. High-frequency off-target mutagenesis induced by crispr-cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 31:822–826, 2013. doi:10.1038/nbt.2623.
- [101] J. A. Gagnon, E. Valen, S. B. Thyme, P. Huang, L. Akhmetova, A. Pauli, T. G. Montague, S. Zimmerman, C. Richter, and A. F. Schier. Efficient mutagenesis by cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide rnas. *PLoS One*, 9:e98186, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0098186.
- [102] S. J. Gratz, A. M. Cummings, J. N. Nguyen, D. C. Hamm, L. K. Donohue, M. M. Harrison, J. Wildonger, and K. M. O’Connor-Giles. Genome engineering of dro-

- sophila with the crispr rna-guided cas9 nuclease. *Genetics*, 194:1029–1035, 2013. doi:10.1534/genetics.113.152710.
- [103] A. R. Bassett, C. Tibbit, C. P. Ponting, and J. L. Liu. Highly efficient targeted mutagenesis of drosophila with the crispr/cas9 system. *Cell Rep*, 4:220–228, 2013. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.020.
- [104] Z. Yu, M. Ren, Z. Wang, B. Zhang, Y. S. Rong, R. Jiao, and G. Gao. Highly efficient genome modifications mediated by crispr/cas9 in drosophila. *Genetics*, 195:289–291, 2013. doi:10.1534/genetics.113.153825.
- [105] B. Qiao, N. W. Johnson, X. Chen, R. Li, Q. Tao, and J. Gao. Disclosure of a stem cell phenotype in an oral squamous cell carcinoma cell line induced by bmp-4 via an epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep*, 26:455–461, 2011. doi:10.3892/or.2011.1299.
- [106] S. A. Mani, W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. A. Weinberg. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133:704–715, 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [107] A. P. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, and A. Puisieux. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 3:e2888, 2008. doi:10.1371/journal.pone.0002888.
- [108] A. Puisieux, T. Brabletz, and J. Caramel. Oncogenic roles of emt-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*, 16:488–494, 2014. doi:10.1038/ncb2976.
- [109] S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, and P. B. Dirks. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63:5821–5828, 2003.
- [110] X. Shu, H. Liu, Y. Pan, L. Sun, L. Yu, L. Sun, Z. Yang, and Y. Ran. Distinct biological characterization of the cd44 and cd90 phenotypes of cancer stem cells in gastric cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*, 459:35–47, 2019. doi:10.1007/s11010-019-03548-1.
- [111] B. Hegge, E. Sjøttem, and I. Mikkola. Generation of a pax6 knockout glioblastoma cell line with changes in cell cycle distribution and sensitivity to oxidative stress. *BMC Cancer*, 18:496, 2018. doi:10.1186/s12885-018-4394-6.

- [112] T. Ishiguro, H. Ohata, A. Sato, K. Yamawaki, T. Enomoto, and K. Okamoto. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*, 108:283–289, 2017. doi:10.1111/cas.13155.
- [113] V. Masciale, G. Grisendi, F. Banchelli, R. D’Amico, A. Maiorana, P. Sighinolfi, A. Stefani, U. Morandi, M. Dominici, and B. Aramini. Cd44+/epcam+ cells detect a subpopulation of aldh(high) cells in human non-small cell lung cancer: A chance for targeting cancer stem cells? *Oncotarget*, 11:1545–1555, 2020. doi:10.18632/oncotarget.27568.
- [114] T. M. Elsaba, L. Martinez-Pomares, A. R. Robins, S. Crook, R. Seth, D. Jackson, A. McCart, A. R. Silver, I. P. Tomlinson, and M. Ilyas. The stem cell marker cd133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer. *PLoS One*, 5:e10714, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0010714.
- [115] A. A. Wendorff, S. A. Quinn, M. Rashkovan, C. J. Madubata, A. Ambesi-Impiomato, M. R. Litzow, M. S. Tallman, E. Paietta, M. Paganin, G. Basso, J. M. Gastier-Foster, M. L. Loh, R. Rabadan, P. Van Vlierberghe, and A. A. Ferrando. Phf6 loss enhances hsc self-renewal driving tumor initiation and leukemia stem cell activity in t-all. *Cancer Discov*, 9:436–451, 2019. doi:10.1158/2159-8290.cd-18-1005.
- [116] O. Treeck, E. Diepolder, M. Skrzypczak, S. Schueler-Toprak, and O. Ortmann. Knockdown of estrogen receptor b increases proliferation and affects the transcriptome of endometrial adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*, 19:745, 2019. doi:10.1186/s12885-019-5928-2.
- [117] X. Deng, W. Wei, N. Huang, Y. Shi, M. Huang, Y. Yan, D. Li, J. Yi, and X. Wang. Tumor repressor gene chondroadherin oppose migration and proliferation in hepatocellular carcinoma and predicts a good survival. *Oncotarget*, 8:60270–60279, 2017. doi:10.18632/oncotarget.19811.
- [118] A. Roesch, M. Fukunaga-Kalabis, E. C. Schmidt, S. E. Zabierowski, P. A. Brafford, A. Vultur, D. Basu, P. Gimotty, T. Vogt, and M. Herlyn. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*, 141:583–594, 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.04.020.
- [119] A. El-Badawy, M. A. Ghoneim, M. M. Gabr, R. A. Salah, I. K. Mohamed, M. Amer, and N. El-Badri. Cancer cell-soluble factors reprogram mesenchymal stromal cells to slow cycling, chemoresistant cells with a more stem-like state. *Stem cell research and therapy*, 8:254, 2017. doi:10.1186/s13287-017-0709-9.

- [120] Jr. Davis, J. E., J. Kirk, Y. Ji, and D. G. Tang. Tumor dormancy and slow-cycling cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 1164:199–206, 2019. doi:10.1007/978-3-030-22254-3_15.
- [121] K. J. Cheung, E. Gabrielson, Z. Werb, and A. J. Ewald. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*, 155:1639–1651, 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.11.029.
- [122] K. J. Cheung and A. J. Ewald. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science*, 352:167–169, 2016. doi:10.1126/science.aaf6546.
- [123] U. H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner, and W. Birchmeier. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 113:173–185, 1991. doi:10.1083/jcb.113.1.173.
- [124] K. Vleminckx, Jr. Vakaet, L., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy. Genetic manipulation of e-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66:107–119, 1991. doi:10.1016/0092-8674(91)90143-m.
- [125] B. Mayer, J. P. Johnson, F. Leitl, K. W. Jauch, M. M. Heiss, F. W. Schildberg, W. Birchmeier, and I. Funke. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res*, 53:1690–1695, 1993.
- [126] H. Oka, H. Shiozaki, K. Kobayashi, M. Inoue, H. Tahara, T. Kobayashi, Y. Takatsuka, N. Matsuyoshi, S. Hirano, M. Takeichi, and et al. Expression of e-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res*, 53:1696–1701, 1993.
- [127] K. Sawada, A. K. Mitra, A. R. Radjabi, V. Bhaskar, E. O. Kistner, M. Tretiakova, S. Jagadeeswaran, A. Montag, A. Becker, H. A. Kenny, M. E. Peter, V. Ramakrishnan, S. D. Yamada, and E. Lengyel. Loss of e-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res*, 68:2329–2339, 2008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5167.
- [128] T. T. Onder, P. B. Gupta, S. A. Mani, J. Yang, E. S. Lander, and R. A. Weinberg. Loss of e-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 68:3645–3654, 2008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.
- [129] X. Liu, H. Huang, N. Remmers, and M. A. Hollingsworth. Loss of e-cadherin and epithelial to mesenchymal transition is not required for cell motility in tissues or

- for metastasis. *Tissue Barriers*, 2:e969112, 2014. doi:10.4161/21688362.2014.969112.
- [130] V. Padmanaban, I. Krol, Y. Suhail, B. M. Szczerba, N. Aceto, J. S. Bader, and A. J. Ewald. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, 573:439–444, 2019. doi:10.1038/s41586-019-1526-3.
- [131] S. Cairo, C. Armengol, A. De Reynies, Y. Wei, E. Thomas, C. A. Renard, A. Goga, A. Balakrishnan, M. Semeraro, L. Gresh, M. Pontoglio, H. Strick-Marchand, F. Levillayer, Y. Nouet, D. Rickman, F. Gauthier, S. Branchereau, L. Brugieres, V. Laitier, R. Bouvier, F. Boman, G. Basso, J. F. Michiels, P. Hofman, F. Arbez-Gindre, H. Jouan, M. C. Rousselet-Chapeau, D. Berrebi, L. Marcellin, F. Plenat, D. Zachar, M. Joubert, J. Selves, D. Pasquier, P. Bioulac-Sage, M. Grotzer, M. Childs, M. Fabre, and M. A. Buendia. Hepatic stem-like phenotype and interplay of wnt/beta-catenin and myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell*, 14:471–484, 2008. doi:10.1016/j.ccr.2008.11.002.
- [132] B. Dekel, S. Metsuyanin, K. M. Schmidt-Ott, E. Fridman, J. Jacob-Hirsch, A. Simon, J. Pinthus, Y. Mor, J. Barasch, N. Amariglio, Y. Reisner, N. Kaminski, and G. Rechavi. Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer Res*, 66:6040–6049, 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4528.
- [133] A. T. Kho, Q. Zhao, Z. Cai, A. J. Butte, J. Y. Kim, S. L. Pomeroy, D. H. Rowitch, and I. S. Kohane. Conserved mechanisms across development and tumorigenesis revealed by a mouse development perspective of human cancers. *Genes Dev*, 18:629–640, 2004. doi:10.1101/gad.1182504.
- [134] T. Kawai, K. Yasuchika, T. Ishii, H. Katayama, E. Y. Yoshitoshi, S. Ogiso, S. Kita, K. Yasuda, K. Fukumitsu, M. Mizumoto, E. Hatano, and S. Uemoto. Keratin 19, a cancer stem cell marker in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 21:3081–3091, 2015. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1936.
- [135] S. K. Saha, K. Kim, G. M. Yang, H. Y. Choi, and S. G. Cho. Cytokeratin 19 (krt19) has a role in the reprogramming of cancer stem cell-like cells to less aggressive and more drug-sensitive cells. *Int J Mol Sci*, 19, 2018. doi:10.3390/ijms19051423.
- [136] M. Zabulica, R. C. Srinivasan, M. Vosough, C. Hammarstedt, T. Wu, R. Gramignoli, E. Ellis, K. Kannisto, A. Collin de l’Hortet, K. Takeishi, A. Soto-Gutierrez, and S. C. Strom. Guide to the assessment of mature liver gene expression in stem cell-derived hepatocytes. *Stem Cells Dev*, 28:907–919, 2019. doi:10.1089/scd.2019.0064.

-
- [137] M. Takano, K. Shimada, T. Fujii, K. Morita, M. Takeda, Y. Nakajima, A. Nonomura, N. Konishi, and C. Obayashi. Keratin 19 as a key molecule in progression of human hepatocellular carcinomas through invasion and angiogenesis. *BMC Cancer*, 16:903, 2016. doi:10.1186/s12885-016-2949-y.

Danksagung

Abschließend sei an dieser Stelle mein herzlicher Dank an alle Personen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, gestellt.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Kappler bedanken. Dafür, dass er mir den Einstieg in die experimentelle Forschung durch die Aufnahme in sein Labor ermöglicht hat. Insbesondere seine große menschliche und fachliche Unterstützung, die vielen konstruktiven Diskussionen und allen voran das herzliche Arbeitsumfeld sind besonders hervorzuheben. Auch möchte ich mich bei allen Kolleg*innen, vor allem bei der technischen Assistentin Frau Shiva Promoli für den großen Spaß während der Arbeit und die stetige Hilfe bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. von Schweinitz, ehemaliger Direktor der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Bereitstellung der Forschungslaboratorien bedanken. Ganz besonders ist es mir ein Anliegen mich bei den Kindern, Eltern und den betreuenden chirurgischen Kollegen zu bedanken, die mit der Bereitstellung der Hepatoblastom-Patientenproben diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Spezieller Dank gilt auch der Abteilung für Klinische Pharmakologie, dem Direktor Prof. Dr. Stefan Endres und dem Projektleiter Dr. Lars König, für die Unterstützung bei der Etablierung des *BCORL1*-Knockouts mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner ganzen Familie; besonders bei meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder, die stets an mich geglaubt und mich fortlaufend motiviert haben.