

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
Im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Oliver Muensterer



Inhibition von BMI1 im Hepatoblastom als therapeutische Option

Dissertation

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

vorgelegt von

Marie Friederike Bentrop

aus

Karlsruhe

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: *Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler*

Zweiter Gutachter: PD Dr. Simon Hohenester

Dritter Gutachter: apl. Prof. Dr. Sibylle Koletzko

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung:	6
Abstract (English):	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Tumore im Kindesalter	10
1.2 Hepatoblastom	11
1.2.1 Klinik und Diagnostik	11
1.2.2 Histologie.....	12
1.2.3 Andere kindliche Lebertumoren	12
1.2.4 Staging	13
1.2.5 Therapie	14
1.2.6 Nebenwirkungen der Chemotherapie	15
1.3 Genetik des Hb.....	16
1.3.1 Wnt-Signalweg und β -Catenin	16
1.3.2 NFE2L2 Transkriptionsfaktor	19
1.3.3 16-Gen-Signatur.....	19
1.4 Epigenetik.....	20
1.4.1 DNA Methylierung	21
1.4.2 Posttranslationale Modifikation von Histonen	21
1.4.3 Micro RNA	22
1.4.4 Epigenetische Veränderungen als therapeutische Targets	23
1.5 Polycomb repressive Komplex.....	23
1.5.1 PcG und Kanzerogenese: BMI1	24
1.6 PDX als Modell für Hb in der Forschung.....	25
1.7 Ziel der Studie	25
2. Material	27
2.1 Zellkultur.....	27
2.1.1 Zelllinien	27
2.1.2 Zellkulturmaterialien	27
2.1.3 Transfektionsreagenzien	28
2.2 Inhibitoren.....	28
2.3 Prokaryotische Kulturen	28
2.3.1 Bakterien	28
2.3.2 Kulturmedien	28
2.3.3 Antibiotika	29
2.3.4 Plasmide.....	29
2.4 Enzyme	29
2.5 Proteinmarker	29
2.6 Antikörper	29

2.7	Kits.....	30
2.8	Primer.....	30
2.9	Puffer und Lösungen.....	30
2.10	Chemikalien.....	32
2.11	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.12	LaboraAusstattung.....	35
2.13	Software.....	36
3.	Methoden.....	37
3.1	Patienten.....	37
3.2	Prokaryotische Kulturen.....	37
3.2.1	Transformation.....	37
3.2.2	Plasmid Miniprep.....	37
3.3	Zellbiologische Techniken.....	38
3.3.1	Auftauen der Zellen.....	38
3.3.2	Kultivierung.....	38
3.3.3	Transfektion.....	38
3.3.4	MTT Assay.....	38
3.3.5	Klonogener Assay.....	39
3.3.6	TOPflash/FOPflash reporter assay.....	39
3.4	RNA Methoden.....	40
3.4.1	RNA-Isolierung.....	40
3.4.2	cDNA Synthese.....	40
3.4.3	qPCR.....	41
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.5.1	Proteinisolierung.....	41
3.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	42
3.5.3	Western Blot.....	42
3.6	Statistische Auswertung.....	42
4.	Ergebnisse.....	43
4.1	Die PRC1-Komponente BMI1 ist in Hepatoblastomen hochreguliert.....	43
4.2	Höhere Expressionslevel von BMI1 korrelieren mit negativen prognostischen Faktoren.....	44
4.3	Effekte der Pharmakologischen Inhibierung von BMI1 auf Hb Zelllinien.....	45
4.3.1	Pharmakologische Inhibierung von BMI1 verringert die Proliferation von Hb Zelllinien.....	45
4.3.2	Der BMI-Inhibitor PTC-209 führt zu einer verminderten Aktivität von PRC1.....	47
4.3.3	Pharmakologische Inhibierung von BMI1 schränkt die Fähigkeit zur Koloniebildung aus einzelnen Zellen stark ein.....	48
4.3.4	Pharmakologische Inhibierung von BMI1 induziert Apoptose.....	48
4.3.5	Pharmakologische Inhibierung von BMI1 verstärkt die Chemosensitivität von Hb Zelllinien.....	49
4.4	Effekt auf den Wnt-Signaltransduktionsweg.....	50
4.5	Verringerte Tumorgröße durch Behandlung mit PTC-209 in vivo.....	51
5.	Diskussion.....	53
5.1	Rolle von BMI1 im Hb.....	53
5.2	Einfluss von BMI1 auf den Wnt-Signalweg und die Zielgenexpression.....	57

5.3	BMI1 und Krebsstammzellen	60
5.4	Ausblick und klinische Implikationen	62
6.	Literaturverzeichnis	64
	Danksagung	70
	Affidavit	71

Zusammenfassung:

Das Hepatoblastom (Hb) ist ein Lebertumor, der in der Regel bei Kindern im Alter von unter drei Jahren auftritt. Obwohl es sehr selten ist, ist es trotzdem der häufigste pädiatrische Lebertumor. Die Prognose ist dank der Forschungserfolge der letzten Jahrzehnte sehr gut, in Kombination mit negativen prognostischen Faktoren wie multifokalem Wachstum und Metastasen bleibt sie jedoch schlecht. Es bleibt bis heute unklar, welche molekularen Mechanismen genau zu diesem Hochrisikoprofil führen.

Da das Hb eine sehr niedrige Mutationsrate zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass vermehrt auch andere Faktoren an der Tumorentstehung beteiligt sein können, wie zum Beispiel epigenetische Veränderungen. Vorarbeiten unserer Gruppe zeigten, dass eine Komponente des Polycomb repressive complex 1 (PRC1) in manchen Hb mutiert ist. Die Expressionsanalyse zeigte, dass die Komponenten von PRC1 im Hb exprimiert sind und dass das Polycomb Ring Finger Onkogen BMI1 überexprimiert ist. Erhöhte Level von BMI1 korrelierten außerdem mit metastasierendem und multifokalem Wachstum und einem schlechteren Outcome. BMI1 stellt also ein potentielles pharmakologisches Ziel bei der Behandlung des Hb dar. Die Behandlung von Lebertumorzelllinien mit dem BMI1 Inhibitor PTC-209 verringerte deren Proliferationsfähigkeit, inhibierte die Fähigkeit zur Koloniebildung aus einzelnen Zellen und induzierte Apoptose. Verringerte Mengen der Ubiquitylierung von Histon 2A nach Behandlung mit PTC-209 zeigen, dass seine Wirkung über eine Inhibierung des PRC1 Komplex vermittelt wird. Weiterhin zeigte sich, dass die kombinierte Behandlung der Tumorzellen mit PTC-209 und Cisplatin einen synergistischen Effekt hat. Die pharmakologische Inhibition von BMI1 hat außerdem einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg, da sich im TOP/FOP Luciferase Assay nach Behandlung mit PTC-209 eine verminderte Wnt-Aktivität in den Tumorzellen zeigte. Weiterhin zeigte sich in einem Hb-Mausmodell, dass die pharmakologische Inhibition von BMI1 auch *in vivo* erfolversprechend ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BMI1 ein neues vielversprechendes pharmakologisches Ziel bei der Behandlung des Hb darstellt.

Abstract (English):

Hepatoblastoma is a liver malignancy usually occurring in children under the age of three. Although being very rare it is the most common childhood liver cancer. Thanks to recent scientific advancements prognosis generally is very good, but in combination with certain negative prognostic factors such as multifocality and metastasis outcome is still poor. It is still unknown, which molecular mechanisms cause this high risk profile.

Since Hb generally shows very few mutations it has to be considered that other mechanisms such as epigenetic alterations contribute to tumorigenesis. Recent studies of our group showed that a component of the polycomb repressive complex 1 (PRC1) is mutated in some cases of Hb. Expression analysis showed that components of PRC1 are expressed in Hb and that the polycomb ring finger oncogene BMI1 is upregulated. Elevated levels of BMI1 were found to be correlated with metastasis, multifocality and generally a worse outcome. This led to the conclusion that pharmaceutical inhibition of BMI1 might be a therapeutic option. Treating liver cancer cell lines with the BMI1 inhibitor PTC-209 decreased proliferation, inhibited the ability to form colonies from single cells and induced apoptosis. Decreased levels of the ubiquitylation of histone H2A after treatment confirmed successful inhibition of BMI1 function. Combination treatment of liver tumor cells with cisplatin and PTC-209 showed synergistic effects. Pharmacological inhibition of BMI1 also influences Wnt-activity, as TOP/FOP luciferase reporter assays showed decreased Wnt activity in treated cell lines. By using a Hb mouse model, we showed that the inhibition of BMI1 also shows promising effects *in vivo*.

In summary, BMI1 is a promising new druggable target in Hb.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AFP	Alpha-Fetoprotein
APC	Adenomatöse poliposis coli
BMI1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CGI	CpG-Inseln
CpG	CpG-Dinukleotid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSC	Cancer stem cell
CTNNB1	β-Catenin
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
H2Aub	Ubiquitinyliertes Histon 2A
H3K27me	Methyliertes Lysin an Histon 3
Hb	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histon Deacetylase
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NL	Normalleber
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline mit Tween20
PCGF1-6	Polycomb Group Ring Finger 1-6
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDX	Patient derived xenograft
PLC	Pediatric Liver Cancer
PRC	Polycomb Repressive Complex
PRETEXT	Pre Treatment Extent of Disease
RNA	Ribonukleinsäure
RNF	Ring Finger Protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SCU	Kleinzellig undifferenziert
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIOPEL	International Childhood Liver Tumours Strategy Group
TBP	TATA-Box Binding Protein
TLCT	Transitionale Leberzelltumor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Tumore im Kindesalter

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen im Kindesalter, trotzdem sind Krebserkrankungen bei Kindern insgesamt selten [1]. Nur 1 % der jährlich diagnostizierten Krebserkrankungen treten bei Kindern auf [2]. Dank neuer Behandlungsmöglichkeiten hat sich das 10-Jahres-Überleben in den letzten 40 Jahren drastisch verbessert, es liegt mittlerweile bei über 80 % [3]. Maßgeblich hat zu dieser Veränderung das Verständnis beigetragen, dass sich Krebserkrankungen im Kindesalter in vielerlei Hinsicht von denen unterscheiden, die bei erwachsenen Patienten auftreten. Kinder erkranken am häufigsten an Leukämien, Lymphomen, Tumoren des zentralen Nervensystems und an Neuroblastomen [4]. Lungen-, Brust- sowie Darmkrebs, von dem Erwachsene am häufigsten betroffen sind [3], sind bei Kindern hingegen eine Seltenheit. Während bei Erwachsenen häufig eine Akkumulation somatischer Mutationen im Laufe des Lebens zum Entstehen von Krebs führt, sind in kindlichen Tumoren meist deutlich weniger Mutationen nachweisbar [5]. Es wird davon ausgegangen, dass bei ihnen andere Voraussetzungen wie beispielsweise Keimbahnmutationen [6], epigenetische Veränderungen und chromosomale Translokationen [7] bereits in frühen Entwicklungsstadien zur Tumorentstehung führen. Dies hat auch Konsequenzen für die Therapie kindlicher Tumore. Klassische Chemotherapeutika werden bei Kindern je nach Art des Tumors durchaus auch eingesetzt. Immer erfolgreicher werden heutzutage jedoch sogenannte „targeted therapies“, Therapien, die genau auf die biologischen Eigenschaften des Tumors abzielen [8]. Ein wichtiger Vorteil dieser zielgerichteten Therapien ist ihr oftmals geringeres Nebenwirkungsprofil. Bei den klassischen Chemotherapeutika sind neben den akuten Nebenwirkungen besonders die langfristigen Nebenwirkungen von Bedeutung wie beispielsweise Zweitmalignome, Herz- oder Lungenerkrankungen [9]. Die Entwicklung präziser Therapien, die genau auf die speziellen genetischen und epigenetischen Modifikationen kindlicher Tumoren abzielen, ist deshalb von großer Bedeutung und Ziel zahlreicher Studien [10].

1.2 Hepatoblastom

Das Hepatoblastom (Hb) ist der häufigste primäre Lebertumor des Kindesalters, es tritt normalerweise bei Kindern im Alter von unter drei Jahren auf [11]. Mit einer Inzidenz von 1:1,2-1,5 Millionen ist es eine seltene Erkrankung. Die genauen Ursachen, die zur Entstehung des Hb beitragen sind bis heute unbekannt, es sind jedoch einige Risikofaktoren bekannt, wie zum Beispiel ein niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit. Durch die stetig verbesserten Maßnahmen in der Versorgung von Frühgeborenen steigt die Zahl an Patienten mit diesen Risikofaktoren. Dies könnte eine Erklärung für die leicht steigende Inzidenz sein [12]. Die meisten Hepatoblastome entstehen sporadisch, es besteht allerdings eine Assoziation zu syndromalen Erkrankungen wie dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, dem Edwards-Syndrom (Trisomie 18) und der Familiären adenomatösen Polyposis [13]. Durch stetig verbesserte Behandlungsmöglichkeiten, betragen die Heilungsraten mittlerweile über 80 % [14]. Kommt es allerdings zu multifokalem Wachstum oder Metastasierung, ist das Outcome deutlich schlechter. Es ist bis heute weitestgehend unbekannt, welche molekularen Mechanismen zu einem solchen Hochrisikoprofil führen.

1.2.1 Klinik und Diagnostik

Hb sind meist zunächst asymptomatisch, da sie sich im Bauchraum relativ ungehindert ausdehnen können. Die Kinder fallen häufig erst mit einem stark vorgewölbten Abdomen auf, der Tumor kann dann bei der Palpation des Bauchs entdeckt werden. Weitere Symptome die durch das verdrängende Wachstum auftreten können, sind zum Beispiel Übelkeit und Erbrechen, Schmerzen und Gewichtsverlust. Wegweisend in der Diagnostik ist die Bestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) im Blutserum, eines Tumormarkers, der in über 90 % der Fälle erhöht ist [15]. Die apparative Diagnostik erfolgt mittels Ultraschall, MRT oder CT. Dadurch lässt sich die Ausbreitung und Tumorlokalisation in der Leber darstellen, und die Differentialdiagnosen Nephroblastom und Neuroblastom, die sich mit ähnlichen Symptomen präsentieren können, können weitestgehend ausgeschlossen werden. Ein CT der Lunge sollte ebenfalls erfolgen, da hier am häufigsten Metastasen zu finden sind [16, 17]. Als nächster diagnostischer Schritt erfolgt eine Biopsie, durch welche die Diagnose histologisch gesichert werden kann.

1.2.2 Histologie

Die histologische Untersuchung dient einerseits der Sicherung der Diagnose, andererseits ermöglichen manche histologische Subtypen auch eine Aussage über die Prognose. Histologisch finden sich in Hb die verschiedenen Entwicklungsstufen der Leber wieder. Es werden ein epithelialer Typ (67 %) und ein gemischt epithelial-mesenchymaler Typ (21 %) unterschieden [14]. Der epitheliale Typ lässt sich weiter unterteilen in fetal, embryonal, kleinzellig undifferenziert (SCU), makrotrabekulär und cholangioblastisch. Beim fetalen Typ unterscheidet man zusätzlich gut differenzierte, crowded, pleomorphe und anaplastische Subtypen. Das gut differenzierte, rein fetale Hb hat die beste Prognose und kann rein durch chirurgische Exzision vollständig geheilt werden. Unter fünf Prozent aller Hb sind rein SCU, häufiger finden sich jedoch SCU-Anteile in den Tumoren [18]. Der SCU Typ geht meist mit negativen prognostischen Faktoren wie niedrigem AFP-Wert und aggressiverem Wachstum einher und hat somit eine schlechtere Prognose [19, 20]. Beim gemischt epithelial-mesenchymalen Typ unterscheidet man Tumoren mit oder ohne teratoiden Anteil [21]. Es ist jedoch häufig nicht möglich, einen Tumor nur genau einem histologischen Subtyp zuzuordnen, da sie meist verschiedene Anteile enthalten.

1.2.3 Andere kindliche Lebertumoren

Seltener kommen bei Kindern hepatozelluläre Karzinome (HCC) und sogenannte transitionale Leberzelltumore (TLCT) vor, trotzdem sind sie eine mögliche Differentialdiagnose [22]. HCC finden sich häufiger bei älteren Kindern und können auf dem Boden einer Grunderkrankung der Leber entstehen. TLCT lassen sich histologisch weder als Hb noch als HCC klassifizieren. Sie gehen meist mit invasivem Wachstum einher, metastasieren häufiger und haben deshalb eine schlechtere Prognose [16]. Die histologische Differenzierung ist entscheidend, da ein HCC gewöhnlich nicht auf die Therapie des Hb anspricht [23].

1.2.4 Staging

Für die Therapieentscheidung nach der Diagnose eines Hb muss initial ein Staging erfolgen. Lange Zeit gab es unter anderem aufgrund der geringen Fallzahlen kein einheitliches Stagingssystem und es wurde regional unterschiedlich vorgegangen. Es gibt weltweit vier große Studiengruppen, die sich mit pädiatrischen Lebertumoren befassen: die International Childhood Liver Tumour Strategy Group (SIOPEL), die Children's Oncology Group (COG), die German Society for Pediatric Oncology and Haematology (GPOH) und die Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors (JPLT). Zwei verschiedene Stagingssysteme wurden dabei unterschieden: das von SIOPEL entwickelte PRETEXT- (pretreatment extension of disease) und das COG-Staging.

Das PRETEXT-System basiert auf radiologischer Bildgebung und unterscheidet die 4 Stadien PRETEXT I-IV. Die Leber wird bei diesem Verfahren in vier Sektoren unterteilt und es wird nach Grad der Infiltration aufgeteilt: drei benachbarte tumorfreie Sektoren (PRETEXT I), zwei benachbarte tumorfreie Sektoren (PRETEXT II), ein tumorfreier Sektor (PRETEXT III) und kein tumorfreier Sektor (PRETEXT IV) (siehe Abbildung 1A-D). Zusätzlich wird das Bestehen von Fernmetastasen (M) und der VPEFR-Status beschrieben: Hepatische Venen (V), Portalvenen (P), extrahepatisches Wachstum (E), Multifokalität (F) und Ruptur (R). Nach SIOPEL zählen zur Standardrisikogruppe (SR-HB) (70 %) alle Tumoren mit PRETEXT I-III und ohne nachweisbare Metastasen und Gefäßinfiltration. Die Hochrisikogruppe (HR-HB) (30 %) umfasst alle Tumoren mit PRETEXT IV, zusätzlicher extrahepatischer Manifestation, niedrigem AFP Wert (<100 ng/mL) und Tumorruptur [24].

Das COG-Staging teilt nach Resezierbarkeit und Metastasierung ein: Keine Metastasen und Tumor komplett resezierbar (Stadium 1), keine Metastasen, jedoch mikroskopisch nicht vollständig resezierter Tumor (Stadium 2), keine Fernmetastasen, Tumor jedoch nicht resezierbar oder großer Resttumor nach Resektion oder Lymphknotenmetastasen (Stadium 3), Fernmetastasen unabhängig von der Leberinfiltration [16].

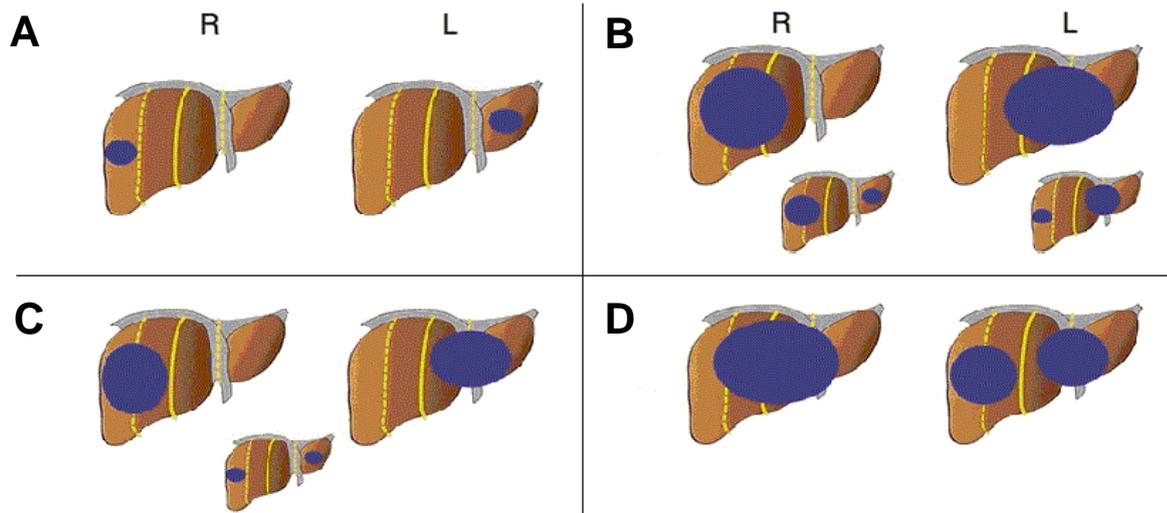


Abbildung 1: PRETEXT, Pre Treatment Extention als Stagingssystem (modifiziert nach[25]).

Das Hauptkriterium beim Staging nach PRETEXT ist der Grad der Infiltration der Leber. A PRETEXT I: drei benachbarte tumorfreie Abschnitte. B PRETEXT II: zwei benachbart tumorfreie Abschnitte C PRETEXT III: ein tumorfreier Abschnitt. D PRETEXT IV: kein tumorfreier Abschnitt.

Um der weltweit uneinheitlichen Einteilung und Behandlung von Hb entgegenzuwirken, wurde von den vier großen Studiengruppen SIOPEL, COG, GPOH und JPLT eine globale Vereinigung ins Leben gerufen. Die Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) propagiert nach Auswertung von Daten aller vier Studienzentren ein neues Stagingssystem, genannt CHIC-Hepatoblastoma Stratification (CHIC-HS). Dieses unterteilt ausgehend vom PRETEXT Stadium anhand verschiedener weiterer Risikofaktoren in vier Gruppen: Very Low Risk, Low Risk, Intermediate Risk und High Risk. Faktoren, die mit einem höheren Risikoeinhergehen sind zum Beispiel Fernmetastasierung, ein niedriger AFP-Wert, ein höheres Patientenalter bei Diagnose und ein positiver VPEFR-Status [26, 27].

1.2.5 Therapie

Eine vollständige chirurgische Resektion ist die einzige kurative Behandlungsmethode für Patienten mit einem Hb. Ergänzt wird die Therapie je nach Staging in den meisten Fällen durch eine Chemotherapie. Nur manche Tumoren können primär operativ entfernt werden. In den meisten Fällen muss jedoch zunächst neoadjuvant chemotherapeutisch behandelt werden, um eine präoperative Tumorverkleinerung zu erreichen [28].

Die Therapieregimes unterscheiden sich auch je nach Studiengruppe und Risikogruppe. Von der COG wird bei Niedrigrisikopatienten eine primäre Operation und adjuvante Chemotherapie und nur bei Hochrisikopatienten eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. Im Gegensatz dazu wird nach SIOPEL Schema bei allen Patienten eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Standardmäßig eingesetzte Chemotherapeutika sind Cisplatin und Doxorubicin, je nach Studiengruppe und Risikogruppe ergänzt durch Vincristin, Irinotecan und 5-Fluoruracil [14, 29]. In bis zu 90 % der Fälle kommt es dadurch zu einer Verkleinerung des Tumors, wodurch sich die Resektabilität verbessert [30]. Durch die Chemotherapie werden die Tumore aber nicht nur kleiner, sondern auch insgesamt dichter, sie neigen weniger zu Blutungen und sind intraoperativ besser vom gesunden Leberparenchym abzugrenzen [24].

Nach den aktuellen SIOPEL Leitlinien wird bei SR-HB mit 2-3 Zyklen Cisplatin + Doxorubin (PLADO) präoperativ und einem Zyklus postoperativ oder 4 Zyklen Cisplatin präoperativ und 2 postoperativ behandelt [31]. Die Monotherapie mit Cisplatin scheint zwar genau so effektiv zu sein wie PLADO, durch die Kombination mit Doxorubicin kann jedoch in manchen Fällen eine Dosisreduktion von Cisplatin erreicht werden [24, 30]. Patienten mit HR-HB werden präoperativ alternierend mit Cisplatin und PLADO in mehreren Zyklen behandelt, postoperativ erhalten sie zweimal Carboplatin/Doxorubicin und einmal Cisplatin [32].

Ist eine Operation aufgrund ausgedehnten Wachstums auch nach intensiver Chemotherapie nicht möglich, steht als letzte Option eine Lebertransplantation zur Verfügung. Entgegen früheren Annahmen sind auch Fernmetastasen kein Hindernisgrund für eine Transplantation, wenn sie vor der Transplantation entfernt werden können [29]. Bei Patienten mit einem gut differenzierten, rein fetalen Hb ist die alleinige chirurgische Exzision ohne anschließende Chemotherapie möglich [33]. Alle anderen Patienten erhalten postoperativ eine Chemotherapie, um möglicherweise verbliebene Tumorzellen oder unentdeckte Metastasen zu behandeln.

1.2.6 Nebenwirkungen der Chemotherapie

Durch den Einsatz von Chemotherapeutika hat sich die Prognose des Hb deutlich verbessert, man muss im Zuge der Therapie allerdings zahlreiche Nebenwirkungen in Kauf nehmen. Typische akute Symptomen sind beispielsweise Übelkeit, Müdigkeit,

Haarverlust, Fieber und Hämatoxizität, was zu Anämie, Blutungs- und Infektneigung führen kann. Neben den akuten Nebenwirkungen sind auch die Langzeitfolgen von Bedeutung: Cisplatin und Carboplatin sind nephro- und ototoxisch, während Doxorubicin vor allem kardiotoxische Nebenwirkungen hat [34]. Fast ein Drittel der Patienten, die Cisplatin erhalten leidet unter vermindertem Hörvermögen, das Ausmaß hängt von der kumulativen Gesamtdosis ab [35]. Zu den Haupttodesursachen von langzeitüberlebenden pädiatrischen Krebspatienten zählen neben kardialen Ursachen Zweitmalignome [9]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass 4,3 % der Hb-Patienten im Verlauf zum Beispiel an Leukämie, myelodysplastischem Syndrom oder einem Lymphom erkranken [36]. Eine möglichst geringe Dosis an Chemotherapeutika und eine engmaschige Kontrolle und Mitbetreuung durch HNO-Ärzte und Kardiologen ist deshalb unerlässlich.

1.3 Genetik des Hb

Das charakteristisch frühe Auftreten ließ vermuten, dass für die Entstehung des Hb nur vergleichsweise wenige Mutationen zur Ausbildung eines malignen Phänotyps nötig sind. Tatsächlich konnte in einem von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Exom-Sequencing festgestellt werden, dass das Hb mit durchschnittlich 3 Mutationen pro Tumor die niedrigste Mutationsrate bislang systematisch sequenzierter Tumorentitäten aufweist [5, 37]. Mit Abstand am häufigsten finden sich Mutationen im β -Catenin-Gen (*CTNNB1*). Andere wurden im *NFE2L2*-Gen gefunden oder wirken sich über epigenetische Mechanismen aus: Bei vier weiteren Hb-Patienten konnte eine Mutation des *BCORL1*-Gens festgestellt werden. *BCORL1* ist unter anderem Teil eines nicht kanonischen Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1.1), welcher bei der epigenetischen Modifikation von Histonen beteiligt ist [37].

1.3.1 Wnt-Signalweg und β -Catenin

Am häufigsten wird β -Catenin durch den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert. Es liegt im Zytoplasma gebunden an einen Proteinkomplex aus APC, AXIN, GSK1 und CK1 vor [38]. Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiv, wird es durch den Abbaukomplex zunächst phosphoryliert, dann ubiquitinyliert und anschließend am Proteasom abge-

baut. Aktiviert wird der Wnt-Signalweg, wenn der Ligand WNT an den Rezeptor Frizzled und Co-Rezeptor LRP5/6 bindet. Der Abbaukomplex wird dann durch das Protein Disheveled inaktiviert. Akkumuliert β -Catenin, kann es in den Zellkern gelangen und es fungiert hier als Co-Faktor des Transkriptionsfaktors TCF/LEF (siehe Abbildung 2). Dadurch wird die Expression einer ganzen Reihe von Zielgenen reguliert [39].

Der Wnt-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung, und er sorgt dafür, den Stammzellstatus in verschiedenen Gewebetypen aufrechtzuerhalten. Während der Entwicklung der Leber ist die Aktivierung und Deaktivierung des Wnt-Signalwegs zu verschiedenen Zeitpunkten für die Differenzierung des Gewebes besonders wichtig [40]. Auch in der erwachsenen Leber wird β -Catenin exprimiert [39]. Als Teil des Cadherinkomplexes ist es an der Zelladhäsion beteiligt. Rund um die hepatischen Zentralvenen ist β -Catenin auch im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert, und es wirkt auch dort als transkriptioneller Co-Faktor. Kommt es zu einer Leberschädigung, zum Beispiel durch eine Operation, eine Infektion oder durch Noxen, ändert sich die Lokalisation von β -Catenin. Dies ist von Bedeutung für die Regenerierung von Lebergewebe, kann jedoch auch zur Entartung führen. Die Aktivierung von β -Catenin als Teil des Wnt-Signalwegs ist also bei der Entstehung sowohl des Hb als auch von HCC von Bedeutung [39].

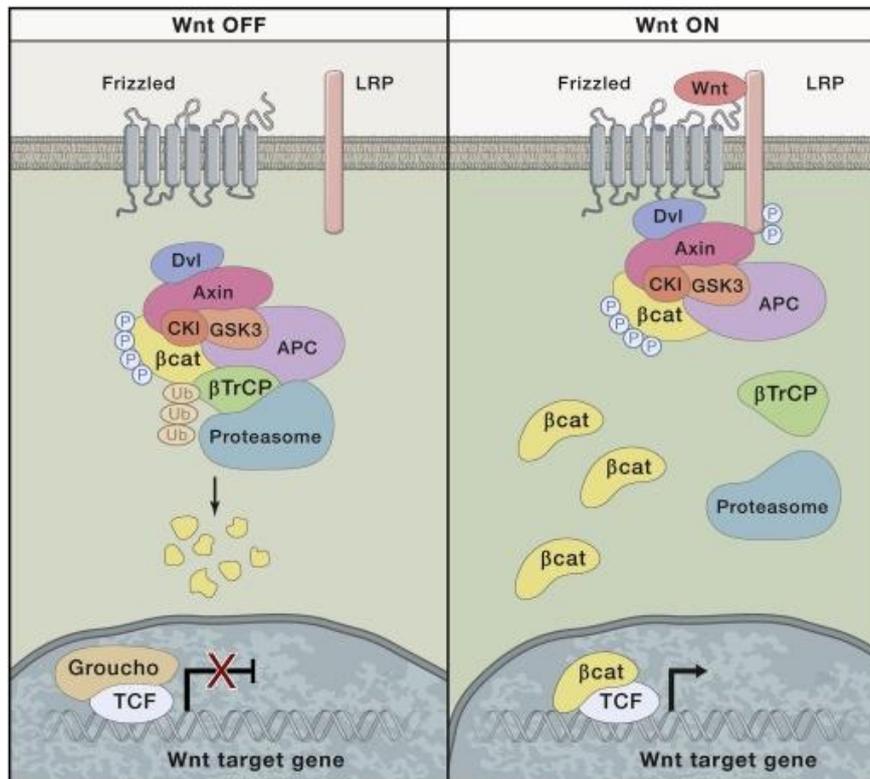


Abbildung 2: Aktivierung von β -Catenin durch den Wnt-Signalweg.“ (nach [41])

"Wnt OFF" stellt die Situation dar, in der der Frizzled Rezeptor nicht von Wnt aktiviert wird. β -Catenin liegt in einem Proteinkomplex gebunden vor, wird phosphoryliert, ubiquitinyliert und anschließend am Proteasom abgebaut. Die Zielgene des Wnt-Signalwegs werden nicht aktiviert.

"Wnt ON": Bindet der Ligand Wnt an den Rezeptor Frizzled, wird zusammen mit dem Co-Rezeptor LRP das Protein Dishevelled aktiviert. β -Catenin wird nicht phosphoryliert und dadurch vor dem Abbau durch das Proteasom geschützt. β -Catenin sammelt sich im Zellkern und aktiviert zusammen mit TCF die Zielgene des Wnt-Signalwegs.

Im Hb ist meist das Exon 3 des β -Catenin-Gens (*CTNNB1*) von einer Punktmutation oder Deletion betroffen und β -Catenin kann nicht mehr phosphoryliert werden. Dadurch wird β -Catenin nicht abgebaut, es wandert in den Zellkern und wirkt als transkriptioneller Co-Faktor für eine Reihe von Zielgenen. Seltener kommt es auch zu Mutationen von APC oder AXIN [42, 43]. Insgesamt findet sich in 80 % aller Hb eine Mutation in Genen die am Wnt-Signalweg beteiligt sind [44]. Eine fehlgesteuerte Aktivierung der Transkription von Genen, die durch den Wnt-Signalweg reguliert werden, ist demnach die häufigste Pathologie in der Genese kindlicher Lebertumore.

1.3.2 NFE2L2 Transkriptionsfaktor

Eine weitere Mutation, die in mehreren Hb nachgewiesen werden konnte, betrifft das *NFE2L2* Gen. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der Teil des antioxidativen Reaktionswegs ist [37]. Er kann sowohl tumorsuppressives als auch onkogenes Potential haben. Mutationen von *NFE2L2* in Hb scheinen zu Gefäßinfiltration und Metastasierung und damit zu einer schlechteren Prognose zu führen. Seine genaue Rolle bei der Karzinogenese ist noch nicht abschließend geklärt [45].

1.3.3 16-Gen-Signatur

Neben den bereits erwähnten klinischen Klassifikationssystemen wurde von Cairo et al. eine weitere Methode propagiert, Hb auf molekularbiologischer Ebene in zwei Kategorien einzuteilen [46]. Diese unterscheidet C1 und C2 Tumore, welche sich prognostisch deutlich unterscheiden. Mittels DNA-Mikroarray Analyse wurden die Genexpressionsmuster einer Reihe von Hb untersucht und die Tumore konnten in zwei Cluster unterteilt werden. Anhand der 16 am unterschiedlichsten exprimierten Gene in den zwei Clustern wurde dann die sog. 16-Gen-Signatur erstellt, die es ermöglicht einen Tumor anhand seines Expressionsmusters einem der beiden Cluster zuzuordnen. Obgleich beiden Subtypen die Überexpression von Zielgenen des Wnt-Signalweges gleich ist, exprimieren C2 Tumoren vor allem Marker hepatischer Stammzellen und ihrer Vorläufer, während C1 Tumoren durch eine vermehrte Expression von leberspezifischen Markern gekennzeichnet ist. Auch histologisch zeigen sich Unterschiede: Während C1 Tumoren eher den späten fetalen und postnatalen Stadien der Leberentwicklung entsprechen, zeigen C2 Tumoren typische Muster der früheren embryonalen Entwicklungsstufen. Von besonderer Bedeutung ist die unterschiedliche Überlebenswahrscheinlichkeit der beiden Kategorien, wobei C2 Tumoren eine viel schlechtere Prognose aufweisen. Eine groß angelegte Validierungsstudie an einem unabhängigen Patientenkollektiv konnte diese Ergebnisse kürzlich bestätigen [47]. Die 16-Gen Signatur ermöglicht also, Tumoren mit einem höheren Risikopotential zu identifizieren und erlaubt somit eine zuverlässige Prognose [44].

1.4 Epigenetik

Auch Mutationen, die epigenetische Veränderungen hervorrufen, können Ursachen von Hb sein. Als epigenetisch werden Mechanismen bezeichnet, bei denen die Expression von Genen nicht über die Sequenzinformationen auf der DNA direkt gesteuert wird. Stattdessen beeinflussen enzymatische Modifikationen der DNA oder Veränderungen der mit der DNA im Chromatin assoziierten Proteine die Genexpression. Durch epigenetische Modifikationen der DNA können bestimmte Gene stillgelegt werden, was z.B. ein wichtiger Regulationsmechanismus in der Ontogenese von pluripotenten Stammzellen in spezialisierte ausdifferenzierte Zellen ist, die nur einen Teil ihres Genoms exprimieren können. Epigenetische Mechanismen können auch vererbare Genexpressionsmuster induzieren, ohne dass dafür die Sequenz der DNA verändert wird [48].

Zu den wichtigsten Mechanismen, die die Genexpression auf epigenetischer Ebene regulieren, gehören Histonmodifikationen, DNA-Methylierung und die Unterdrückung der Genexpression durch nichtkodierende RNAs (siehe Abbildung 3). In den letzten Jahren konnte durch zahlreiche Studien gezeigt werden, dass Veränderungen am Epigenom maßgeblich an der Entstehung von Krebs beteiligt sind [49, 50].

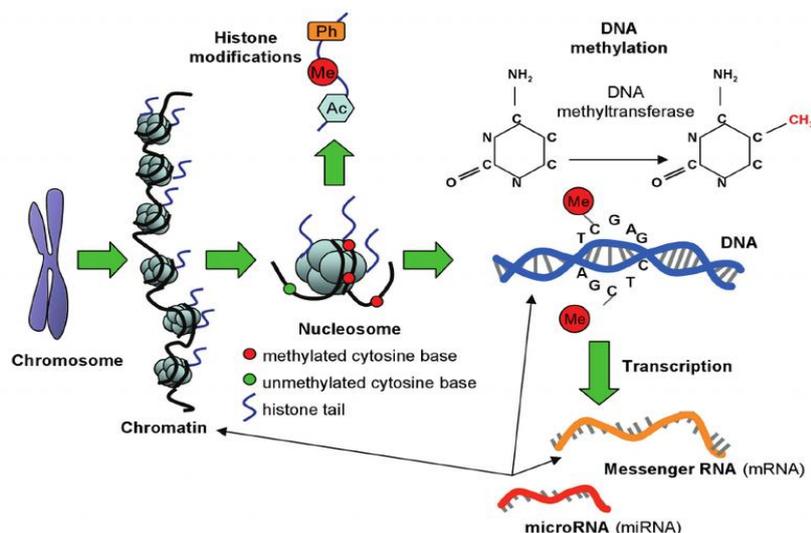


Abbildung 3: Epigenetische Modifikationen der DNA (nach [51])

Epigenetisch bedingte Veränderungen der Genexpression können auf verschiedene Weisen erfolgen: Durch Modifikationen an den Histonen kann die Struktur des Chromatins so verändert werden, dass die DNA leichter oder schwerer ablesbar ist. Hypermethylierung von Promotorregionen führt zum Silencing von Genen. microRNAs binden an mRNAs und verhindern die Transkription [52].

1.4.1 DNA Methylierung

Die Hyper- und Hypomethylierung von DNA-Abschnitten ist der am längsten bekannte epigenetische Pathomechanismus bei der Kanzerogenese [53]. Durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) findet die Methylierung an CpG-Dinukleotiden statt, also benachbarter Cytosine und Guanine in der DNA. Bereiche in denen sich vermehrt CpGs finden werden CpG Inseln (CGIs) genannt. CGIs sind Teil der Promoterregion vieler menschlicher Gene und sind normalerweise nicht methyliert. Die Hypermethylierung von CGIs in der Promoterregion tumorsuppressiver Gene führt zum Silencing dieser Gene. Diese Form der epigenetischen Stilllegung von Genen findet sich in vielen verschiedenen Krebszellen [54]. Auch in Hb zeigt sich ein verändertes Methylierungsmuster im Vergleich zu normalem Lebergewebe. Insbesondere Tumorsuppressorgene, Gene des Wnt- und des Hedgehog-Signalwegs und Gene, die an der Differenzierung von Leberzellen beteiligt sind, sind von aberranten Methylierungsmustern betroffen [55].

1.4.2 Posttranslationale Modifikation von Histonen

In der Zelle liegt die DNA nicht frei, sondern als Chromatin an Histone und weitere Proteine gebunden vor. Die strukturelle Grundeinheit des Chromatins sind die Nukleosomen. Sie bestehen aus einem Oktamer, das aus den vier Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 und einem 147 Basenpaare langem Abschnitt von DNA gebildet wird. Die stark basischen N-terminalen Enden der Histone ragen aus den Nukleosomen heraus und vermitteln die Verbindung zu benachbarten Nukleosomen. Die posttranslationale Modifizierung von Histonen an diesen N-terminalen Enden bestimmt die Struktur, in der die DNA im Zellkern vorliegt. Sie führt entweder zur Stabilisierung und zur Kompaktierung inaktiver DNA-Abschnitte, oder sie ermöglicht die Transkription und Reparatur der DNA durch Auflockerung der Chromatinstruktur. Zu den Mechanismen, wie Histone modifiziert werden, gehören zum Beispiel Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinylierung [56].

Die Acetylierung von Histonen geschieht durch ein Zusammenspiel von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs). Durch HATs werden Histone an Lysinen acetyliert, wodurch ihre positive Ladung neutralisiert wird. Dadurch wird die Bindung zwischen Histon und DNA geschwächt, die Chromatinstruktur aufgelockert und die Transkription ermöglicht. HDACs führen im Umkehrschluss zu

einer Verdichtung des Chromatins, sie zählen deshalb zu den Transkriptionsrepressoren [57]. Über die Funktion der Phosphorylierungen von Histonen ist bisher wenig bekannt. Sie fügen dem Histon negative Ladung hinzu und beeinflussen so die Chromatinstruktur. Methylierung können an Lysin- oder Argininresten erfolgen und verändern die Ladung eines Histons nicht. Im Gegensatz zu den relativ unspezifisch wirkenden HATs sind Lysin- und Argininmethyltransferasen (KMT, PRMT) spezifischer, und führen je nach Lokalisation zur Transkription oder Repression von Genen führen [56].

Die bisher genannten Arten der posttranslationalen Modifikation von Histonen resultieren nur in relativ kleinen molekularen Veränderungen. Größere Veränderungen erfolgen durch Ubiquitylierung. Ubiquitin ist ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren, das durch mehrere Enzyme (E1-E3) kovalent an Lysinreste der Histone gebunden wird. Es kann mono- oder polyubiquityliert werden. Am häufigsten kommt es zu einer Monoubiquitylierung von H2A oder H2B. Das Histonmark Histon2A-Lysin-119-Monoubiquitylierung (H2AK119ub1) hat eine repressive Wirkung auf die Expression der betroffenen Gene, während H2BK123ub1 wichtig für die Initiation der Translation und Elongation ist [58]. Aberrante posttranslationale Modifikationen von Histonen spielen auch bei der Entstehung von Krebs eine Rolle. Sie werden hauptsächlich durch Mutationen oder Überexpression der beteiligten Enzyme ausgelöst. So können Mutationen der Histonmethyltransferase EZH2 unter anderem in Brust-, Prostata-, und Darmkrebs gefunden werden [59, 60]. Eine Überexpression von BMI1 wurde beispielsweise in HCC, Brust- und Magenkrebs gefunden [61-63]. Es ist wie das in manchen Hb mutierte BCORL1 als Teil eines PRC1 Komplex an der Ubiquitylierung von Histonen beteiligt.

1.4.3 Micro RNA

Micro-RNAs (miR) sind kleine nicht kodierende RNAs, die an ihre Ziel-mRNAs binden. Dadurch können sie die Translation von Proteinen verhindern und somit zur Entstehung von Krebs beitragen oder als Tumorsuppressor wirken. Es konnte eine Reihe von miR gefunden werden, deren Expressionsmuster sich zwischen Hb und normalem Lebergewebe deutlich unterscheidet. Auch von ihnen kann angenommen werden, dass sie an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind [64].

1.4.4 Epigenetische Veränderungen als therapeutische Targets

Bereits seit Jahrzehnten werden epigenetische Veränderungen als Ziel der medikamentösen Therapie von Krankheiten erforscht [65]. Seitdem die vollständige Sequenzierung des Genoms von Tumorzellen möglich ist, konnten Mutationen in vielen Proteinen gefunden werden, die für die Struktur des Chromatins verantwortlich sind. Häufig spielen sie eine Schlüsselrolle bei Entstehung und Wachstum von Tumoren [66]. Bei den Therapieansätzen können sich vereinfacht zwei unterschiedliche Prinzipien zunutze gemacht werden, zum Einen können Tumorsuppressorgene aktiviert oder Protoonkogene gehemmt werden, deren Expression durch aberante epigenetische Veränderungen beeinflusst wird [67]. Zum Anderen kann die Chemoresistenz von Tumorzellen, zu der es im Verlauf der Therapie mit Chemotherapeutika häufig kommt, verhindert werden [68]. Es gibt bereits einige zugelassene Medikamente, die auf epigenetischer Ebene agieren. Dazu zählen zum Beispiel DNMT-Inhibitoren wie Azacitidin und Decitabin in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie und HDAC-Inhibitoren wie Romidepsin und Vorinostat zur Therapie von kutanen T-Zell-Lymphomen [69, 70]. KMT-Inhibitoren werden in Phase 2-Studien bei Patienten mit Non-Hodkin-Lymphomen getestet [66].

1.5 Polycomb repressive Komplex

An der Regulation der Histonaktivität sind unter anderem auch die Polycomb group Proteine (PcG) beteiligt. PcG wurden zuerst in *Drosophila* entdeckt und sind eine auch beim Menschen hoch konservierte Proteinfamilie [71]. Durch epigenetische Modifizierung von DNA spielen sie eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Repression und tragen dadurch insbesondere zur Beibehaltung des Stammzellstatus von Zellen bei [72]. PcG bilden die Komplexe Polycomb repressive complex 1 und 2 (PRC1/PRC2), die unterschiedliche Funktionen haben. Die Kernkomponenten von allen PRC1-Komplexen sind RING1A, welches als E3 Ubiquitinligase agiert und jeweils eins von sechs PCGF Proteinen (siehe Abb. 4). Die Kernkomponenten von PRC2 sind SUZ12, EED und EZH1/2; dieser Komplex hat eine Methyltransferase-

Aktivität [73, 74]. Mit den Kernkomponenten beider Komplexe sind dann weitere Proteine assoziiert, wodurch eine Vielzahl möglicher Komplexe entstehen kann.

PRC-Komplexe werden auf verschiedene Weisen an die DNA rekrutiert [75]. Ein Mechanismus ist, dass zunächst PRC2 an die DNA bindet und Histon 3 an Lysin 27 methyliert (H3K27me). PRC1 bindet daraufhin an H3K27me und ubiquitinyliert Histon 2A (H2AK119ub) [76]. PRC1 kann jedoch auch unabhängig von H3K27me an die DNA binden [77]. Die epigenetische Repression von Genen durch PcG spielt eine Schlüsselrolle für die Embryonalentwicklung und erhält die Pluripotenz embryonaler Stammzellen [78]. Ihre genaue Funktionsweise ist jedoch nicht geklärt, unter anderem aufgrund der großen Variabilität der Zusammensetzung der Komplexe und da weiterhin unbekannt ist, wie genau PRC an ihre Zielgene rekrutiert werden [79].

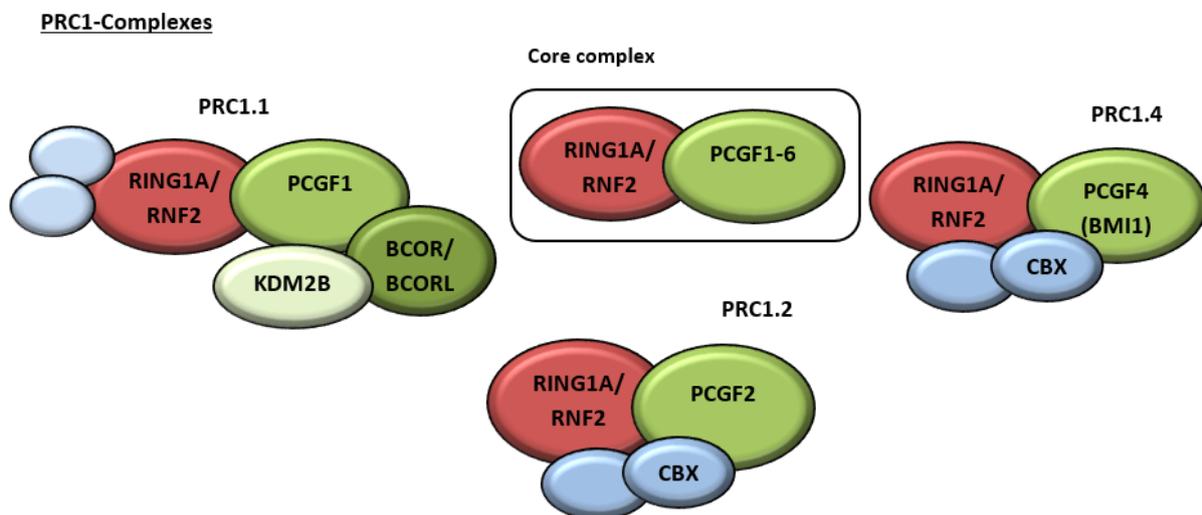


Abbildung 4: Zusammensetzung von PRC1 Komplexen

Der Kern des PRC1 Komplex besteht aus RING1A/RNF2 und einem PCGF Protein. Der Komplex wird je nach enthaltenem PCGF Protein benannt, (PRC1.1 enthält PCGF1, PRC1.2 enthält PCGF2 usw.). Mit dem Kernkomplex sind dann weitere Proteine assoziiert, wodurch eine große Zahl unterschiedlicher Komplexe entstehen kann, die auch unterschiedliche Funktionen haben [74].

1.5.1 PcG und Kanzerogenese: BMI1

Eine abberante Aktivierung von PcG konnte zuerst bei B- und T-Zelllymphomen gefunden werden. Es wird angenommen, dass PCGF4, besser bekannt als BMI1, durch Repression des *CDKN2A* Genlocus die MYC-induzierte Apoptose inhibiert. *CDKN2A* codiert die beiden Tumorsuppressoren INK4A und ARF [72]. BMI1 ist ein Protoonkogen, welches auch in anderen Tumoren hochreguliert ist, zum Beispiel bei Medullob-

lastomen, HCC, Brust-, Magen-, und Lungenkarzinomen [61, 62, 80-82]. Eine Überexpression von BMI1 steht im Zusammenhang mit Chemoresistenz, epithelial-mesenchymaler Transformation (EMT) und der Entstehung von sogenannten Krebsstammzellen [83]. Durch diese Erkenntnisse ist BMI1 als therapeutisches Target bei der Behandlung genannter Tumoren zum Gegenstand aktueller Studien geworden.

1.6 PDX als Modell für Hb in der Forschung

Aufgrund der Seltenheit gestaltet es sich nicht einfach, neue Therapien für Hb zu entwickeln und genug Patienten für Phase II Studien zu rekrutieren. Patient derived xenografts (PDX) werden immer häufiger als Modell für verschiedene Tumoren in präklinischen Studien verwendet. Dafür werden Tumorzellen direkt von einem Patienten in eine immundefiziente Maus übertragen, wo diese neue Tumoren formen. Dadurch, dass ihre Biologie, ihr Wachstum und ihr Ansprechen auf die Therapie *in vivo* beobachtet werden können, bieten PDX eine einzigartige Chance bei der Entwicklung und Erprobung neuer Therapieansätze [84].

Erst kürzlich etablierte die Arbeitsgruppe von Stefano Cairo auch für Hb verschiedene PDX-Modelle [85]. Die Tumoren zeigten sowohl histologisch als auch genetisch eine starke Ähnlichkeit zu den ursprünglichen Tumoren. Insbesondere Tumoren mit schlechteren prognostischen Faktoren zeigten ein stärkeres Tumorwachstum. PDX erscheinen daher besonders geeignet für die Identifizierung neuer Therapiemöglichkeiten für Hochrisiko-Patienten.

1.7 Ziel der Studie

Dank großer Fortschritte in der Bildgebung, Operationstechniken und Chemotherapie konnte die Überlebensrate von Patienten mit Hb auf 70-90 % gesteigert werden. Trotzdem haben weiterhin bis zu einem Drittel der Kinder, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium, mit Rezidiven oder Metastasen, ein stark erhöhtes Risiko, an der Erkrankung zu sterben. Deshalb ist die Identifizierung molekularer Veränderungen als mögliche Therapieziele von großer Bedeutung.

Im Rahmen einer großen Studie unserer Gruppe konnte in vier Hb-Patienten mittels Exomsequenzierung eine Mutation des *BCORL1*-Gens festgestellt werden. *BCORL1* ist unter anderem Teil des nicht kanonischen Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1.1). Da im Hb die aberrante Aktivierung nur weniger Gene zur Entstehung aggressiver Neoplasien führt, könnte nun der PRC1 Komplex als therapeutisches Ziel in Frage kommen.

Ziel dieser Arbeit war zunächst, eine Expressionsanalyse der Komponenten von PRC1 durchzuführen, um einen Überblick über die potentiell an der Entstehung von Hb beteiligten Gene zu bekommen. Um die klinische Relevanz zu definieren, sollten anschließend die Expressionslevel der Patienten mit den prognostischen Faktoren korreliert werden. Im Hinblick auf eine mögliche Therapie sollten die Auswirkungen einer medikamentösen Inhibition des PRC-Komplexes an verschiedenen etablierten und aus PDX abgeleiteten Hb Zelllinien untersucht werden. Dabei sollten Effekte auf die Proliferation der Zellen, Veränderungen der Genexpression und Veränderungen im Wnt-Signalweg, als auch das Tumorwachstum in PDX-Mausmodellen berücksichtigt werden.

2. Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

HUH6 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	JCRB, Osaka, Japan
HepT1 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	Pietsch et al., 1996 [86]
HepG2 <i>Homo sapiens</i> , Leber, TLCT	ATCC, Manassas, USA
HUH7 <i>Homo sapiens</i> , Leber, HCC	JCRB, Osaka, Japan
Hep3B <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	ATCC, Manassas, USA
Hb214 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	Xentech, Evry-Courcouronne, Frankreich
Hb243 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	Xentech, Evry-Courcouronne, Frankreich
Hb279 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	Xentech, Evry-Courcouronne, Frankreich
Hb282 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	Xentech, Evry-Courcouronne, Frankreich
Hb295 <i>Homo sapiens</i> , Leber, Hb	Xentech, Evry-Courcouronne, Frankreich
Hb303 <i>Homo sapiens</i> , Leber, TLCT	Xentech, Evry-Courcouronne, Frankreich

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Dimethyl sulfoxide (DMSO) steril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Advanced Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Fetales Kälberserum (FCS), steril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-Neutralisierungslösung, steril	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Transfektionsreagenzien

FuGene	Promega, Mannheim, Deutschland
--------	--------------------------------

2.2 Inhibitoren

PRT 4165	Tocris, Bristol, UK
PTC-209	Axon Medchem, Groningen, Niederlande
Rho-associated kinase inhibitor Y-27632	Selleckchem, Chesterbook, PA, USA
UNC 3866	CaymanChem, Ann Arbor, USA

2.3 Prokaryotische Kulturen

2.3.1 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
---	------------------------------------

Genotyp: F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZ*YA-argF)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rK-, mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*

2.3.2 Kulturmedien

Lysogeny Broth LB-Medium, 2,5% LB-Medium in dH ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar für Platten, 4% LB-Agar in dH ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Super Optimal Broth Medium with glucose (S.O.C.) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.3.3 Antibiotika

Ampicillin (100 µg /ml) Sigma, Steinheim, Deutschland

2.3.4 Plasmide

pTOPFlash Firefly luciferase reporter Prof. Dr. Frank Kolligs, LMU

pFOPFlash Firefly luciferase reporter Prof. Dr. Frank Kolligs, LMU

pRL-CMV Renilla luciferase plasmid Promega, Mannheim Deutschland

2.4 Enzyme

Super Script™ II Reverse Transcriptase Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

iTaq SYBR Green Supermix with ROX Bio-Rad, Munich, Deutschland

Hot-start Taq DNA Polymerase Sigma-Aldrich, St Louis, MD, USA

Proteinase K Sigma-Aldrich, St Louis, MD, USA

RNase A Sigma-Aldrich, St Louis, MD, USA

2.5 Proteinmarker

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Thermo Scientific, Wilmington, USA

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder Thermo Scientific, Wilmington, USA

2.6 Antikörper

Anti β-actin (# 4970), Kaninchen Cell signaling technology, Danvers, USA

Anti-PARP, Kaninchen Cell signaling technology, Danvers, USA

Anti-H2AK199ub, Maus	Merck Millipore Burlington, MA, USA
Anti-Histon H3, Kaninchen	Merck Millipore Burlington, MA, USA
Anti-Kaninchen HRP	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Anti-Maus HRP	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.7 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Dual-Luciferase Reporter Assay Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland

2.8 Primer

Name	Vorwärts	Rückwärts
RING1A	AGGTGGAGAAATTGAGCTCGT	TCTTCACATACCTCGTCTGGC
RNF2	CGGGGTTCCAGTGTAGAGG	AGCCTGAGACATTGGGTTTTAG
PCGF1	CAGCCTTTAAGATGGCGTCTC	AACCTCCTCCTCGTTCCGTA
PCGF2	AAAGAGAAAACAGGGGTGCG	TACTTGCTGGGCACATCCAT
PCGF4/BMI1	GCTGGTTGCCATTGACAG	AAAATCCCGGAAAGAGCAGC
BCOR	GCCCCAAAGCACGAATCAC	CGTCTAGTCTGGCTGGCG
BCORL1	AACGAGGAGAGAAGAGCACC	CATTGCTGCCACTTCCAAC
KDM2B	AAGACCGGGAAACAAAAGCG	CTCCTCACACTCACTCCTCC
TBP	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT

2.9 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden in dH₂O hergestellt, wenn nötig autoklaviert und der pH mit NaOH oder HCl eingestellt

- 5 x SDS Puffer
312,5 mM TrisHCl (pH 6,8)
50% Glycerol

5% SDS

5% β -Mercaptoethanol

0,05% Bromphenolblau

- 10 x Laufpuffer
250 mM TrisHCl (pH 8,3)
2500 mM Glycin
1 %SDS
- RIPA Lysepuffer
25 mM TrisHCl (pH 7,8)
150 mM NaCl
1% NP-40
1% Natriumdesoxychlorat
0,1% SDS
- Hypotoner Lysepuffer
10 mM Tris
10 mM NaCl
0,3% NP-40
10% Glycerol
- 10x TBS Puffer
24,2 g Tris
80 g NaCl
Ad 1000 ml dH₂O
- TBS-T
100 ml TBS (10x)
900 ml dH₂O
1 ml Tween 20
- MTT1 Lösung
200 mg MTT
In 40 ml PBS
- MTT2 Lösung
10 ml 10% SDS
10 μ l 37% HCl
- Einfriermedium

50 ml Fetales Kälberserum (FCS)
 40 ml Dulbeccos Modifies Eagle Medium (DMEM)

- Block-Lösung (Western Blot)
 2,5% Milchpulver in dH₂O
- Kristallviolett Färbelösung
 0,5% Kristallviolett
 In 20% Methanol und 80% dH₂O

2.10 Chemikalien

1st strand buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot Deutschland
Agarose	peQLab, Erlangen, Deutschland
Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) (100 X)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot Deutschland
Bromophenolblau	SERVA, Heidelberg, Deutschland
CaCl ₂	Calbiochem, San Diego, USA
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (PI)	Roche, Mannheim, Deutschland
ddH ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidium bromide (EtBr), 10 mg /ml	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
KCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MTT Formazan Pulver	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nonident P-40	Sigma Aldrich, St. Louis, MD, USA
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Random hexamer primer	Roche, Basel, Schweiz
Sodiumchloride	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdeoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Biomedicals, Eschwege, Deutschland
TRI Reagent® RNA Isolation Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ultra Pure TM DNase/RNase-Freies Distilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.11 Verbrauchsmaterialien

4-12% Tris-Glycin Gele	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
4-20% Tris-Glycin Gele	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

8-Well PCR-Streifen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
6-Well Platten, nicht pyrogen	NUNC, Langenselbold, Deutschland
12-Well-Platten, nicht pyrogen	NUNC, Langenselbold, Deutschland
24-Well-Platten, nicht pyrogen	NUNC, Langenselbold, Deutschland
96-Well-Platten, nicht pyrogen	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Biosphere Filterspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Costar Stripette serologische Pipetten 5 ml	Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Costar Stripette serologische Pipetten 10 ml	Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Costar Stripette serologische Pipetten 25 ml	Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Falcon Reaktionsgefäß 15 ml/50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Glasspritzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe, Nitril Extra Powder-Free	Halyard Health Inc. Alpharetta, USA
Handschuhe, Vasco Nitril soft blue	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Objektträger	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Parafilm	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR 96-Wellplatten	PeQLab, Erlangen, Deutschland
Petrischale 100mm, beschichtet	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Petrischale 100mm, unbeschichtet	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-lock Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-lock Eppendorf Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfermembran	Bio-Rad, München, Deutschland
Transwell Zellkultur-Einlagen	Corning Inc., Corning NY, USA
Zählkammern	KOVA International, Garden Grove, CA, USA
Zellkultur T-Flasks 25cm ²	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Zellkultur T-Flasks 75cm ²	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Zellkultur T-Flasks 175cm ²	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.12 Laborausstattung

Agarose Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Diana III Chemilumineszenz Imager	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Excella E24 Inkubator	New Brunswick Scientific, Enfield, USA
Feinwaage Te 1245	Sartorius, Göttingen, Deutschland
GelJet Imager Version 2004	Intas, Göttingen, Deutschland
GENios Mikroplattenleser	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Heizblock MR 3001	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Homogenisierer Micra	ART, Mühlheim, Deutschland
Mastercycler ep realplex2	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroliterzentrifuge MZ014	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus™ Pico	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge Heraeus™ Fresco	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA

Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000 Instrument	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Powershot G6 Kamera	Canon, Tokio, Japan
pH-Meter inoLab pH720	WTW, Weilheim, Deutschland
Schüttler Rock-N-Roller	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
Schüttler, Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
SimpliAmp Thermal Cycler	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Thermomixer Kompakt	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Transblot Turbo-Blot	Bio Rad, München, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries, NY, USA
Waage EMB 600-2	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	GFL, Wien, Österreich
Zentrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.13 Software

CHROMAS v1.45 software	Griffith University, Queensland, Australia
GraphPad Prism 8.2.1	GraphPad Software, La Jolla, USA
Realplex	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
CompuSyn Software	ComboSyn Inc., Paramus, USA
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/

3. Methoden

3.1 Patienten

Die Proben von Tumor- sowie normalem Lebergewebe wurden Patienten der Klinik für Kinderchirurgie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals entnommen. Das Studienprotokoll wurde zuvor von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Antragsnummer 431-11) und es wurde von jedem Patienten oder dessen Eltern eine Einverständniserklärung unterzeichnet.

3.2 Prokaryotische Kulturen

3.2.1 Transformation

Für die Transformation wurde pro Ansatz ein Aliquot (50 µl) kompetenter *E. coli* DH_{5α} (Lagerung bei bei -80 °C) auf Eis aufgetaut. Dann wurde jeweils 10 ng Plasmid (pFOP, pTOP, pRL-TK) zu den Bakterien gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock für 40 sek bei 42 °C, welcher die Aufnahme der DNA verbessert. Die Proben wurden dann für 2 min auf Eis gehalten, anschließend wurden 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium (37°C) hinzugegeben. Nach Schütteln der Proben für mindestens eine Stunde bei 37 °C und 450 rpm, wurden die Proben auf vorgewärmten LB-Platten (37 °C) mit dem passenden Antibiotika ausplattiert. Sie inkubierten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank

3.2.2 Plasmid Miniprep

Einzelne Kolonien wurden von den am Vortag ausplattierten Bakterien mit einer Pipettenspitze gepickt. Jeweils 5 ml LB-Medium mit dem adäquatem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) wurden angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Falcons für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 250 µl Puffer P1 mit RNase resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Miniprep wurde nach Anweisungen des Herstellers im Kit durchgeführt.

3.3 Zellbiologische Techniken

3.3.1 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden im Wasserbad für 1 min erwärmt und dann in ein 15 ml Falcon mit ca. 5 ml vorgelegtem Medium (37°C) überführt. Die Falcons wurden dann bei RT für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Dann wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25cm² Kulturflasche überführt. Die Zellen inkubierten für eine Nacht im Brutschrank und das Medium wurde am folgenden Tag erneuert.

3.3.2 Kultivierung

Die humanen Zelllinien HUH6 HepT1, HepG2, HUH7 und Hep3B wurde unter Standardbedingungen in Zellkulturflaschen kultiviert. Sie wurden in RPMI Medium das mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde bei 37 °C in einem 5 % CO₂ Inkubator aufbewahrt. Die PDX-Zelllinien Hb214, Hb243, Hb279, Hb282, Hb295 und Hb303 wurden in Advanced DMEM das mit 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin, 0.5 % GlutaMAX und 20 µM Rho-associated Kinase Inhibitor versetzt wurde bei 37 °C in einem 5 % CO₂ Inkubator aufbewahrt. Bei allen Zelllinien wurde das Medium ca. alles 3 d gewechselt. Wenn die Zellene eine Konfluenz von ca. 80-90 % aufwiesen wurden sie einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %) abgelöst und in neue Kulturflaschen gesplittet.

3.3.3 Transfektion

Die Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 – 85 % wachsen lassen. Dann wurde die Transfektion mit Fugene nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Pro Well wurden 155 µl serumfreies Medium, 9,9 µl Fugene und 3µg Plasmid gemischt. Dieser Ansatz inkubierte für 10 min bei RT. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen wurden und dann mit frischem serumfreien Medium und der angegebenen Menge des Ansatzes behandelt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 6 h wurde das Medium entfernt und durch Standardmedium ersetzt.

3.3.4 MTT Assay

Der Effekt der Inhibitoren des PRC1-Komplexes (PRT-4165, PTC-209 und UNC-3866) auf die Proliferation der Zelllinien wurde getestet. Zusätzlich wurden die Effekte einer kombinierten Behandlung mit PTC-209 und Cisplatin untersucht. Die Inhibitoren wurden in DMSO zu einer Konzentration von 100 mM gelöst und als Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden im 96-well Format ausgesät

und wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Inhibitoren in serumfreiem Medium verdünnt, daraufhin wurden die Zellen für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen (100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM) oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Für die Kombinationsbehandlung wurden die Zellen für 72 h mit Kombinationen verschiedener Konzentrationen (10 µM, 5 µM, 1 µM, 500 nM, 100 nM) von Cisplatin und PTC-209 behandelt. Das Medium wurde nach Ablauf der 72 h entfernt, dann wurden 90 µl frisches Medium und 10 µl MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS) in jedes Well gegeben. Da MTT lichtempfindlich ist, müssen alle Schritte so dunkel wie möglich durchgeführt werden. Vitale Zellen verstoffwechseln das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blauem Formazan. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurden 100 µl MTT2-Lösung zur Zellyse hinzugegeben. Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei RT wurde am folgenden Tag bei 595 nm die photometrische Absorption mit dem GENios Mikroplattenleser gemessen. Diese korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Die Berechnung der IC50 erfolgte in Graphpad Prism. Für die Kombinationsbehandlung wurden dann die Kombinationsindizes mit der CompySyn Software berechnet.

3.3.5 Klonogener Assay

Je nach Zelllinie wurden 10000 bis 15000 Zellen im 6-well Format ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator aufbewahrt und wurden am folgenden Tag entweder mit den Inhibitoren des PRC1-Komplexes oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden dann für 10 Tage bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium verworfen und alle Wells vorsichtig mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden sie 2 Mal für 5 min mit Methanol fixiert und dann mit Kristallviolett-Färbelösung gefärbt. Die Lösung wurde entfernt und die Wells wurden mehrmals vorsichtig mit dH₂O gewaschen. Die Quantifizierung der Kolonien wurde mit dem Plugin „ColonyArea“ für die Software ImageJ bestimmt.

3.3.6 TOPflash/FOPflash reporter assay

Die Zellen wurden nach der Transfektion mit pTOP+pRL-TK oder pFOP+RL-TK über Nacht in normalem Medium im Inkubator aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden sie entweder mit PTC-209 oder DMSO als Kontrolle über Nacht behandelt. Dann wurde der Dual-Luciferase Reporter Assay nach den Anweisungen im Kit durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit dem Passive Lysis Buffer gemischt. Sie wurden für 10 min bei RT auf einem Shaker lysiert. In eine 96 well-Patte wurden jeweils 100 µl LARII vorgelegt, dann wurden 20 µl Zelllysat hinzugegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei RT inku-

biert, dann wurde die Luciferaseaktivität mit dem GENios Mikroplattenleser gemessen. Dann wurden pro Well 100 µl Stop&Glo Puffer hinzugegeben, wodurch die Reaktion gestoppt und die Aktivität der Renilla-Luciferase angeregt wird. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 5 Minuten wurde die Renilla-Luciferaseaktivität erneut mit dem GENios Mikroplattenleser gemessen.

3.4 RNA Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde aus den Zelllinien HUH6, HepT1, HepG2, HUH7 und Hep3B jeweils unbehandelt und nach 24 stündiger Behandlung mit PTC-209, aus den PLC-PDX Zelllinien Hb214, Hb243, Hb279, Hb288, Hb295 und Hb303, und aus Tumor- und Normalgewebe der Patientenproben gewonnen. Tumor- und Normalgewebe wurden mit 1000 µl TRI-Reagenz mit dem Miccra Homogenisierer homogenisiert und für 5 min inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit TriReagent bedeckt. Diese Lösung wurde in ein Eppendorfgesäß gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurde zu den Proben 200 µl Chloroform hinzugefügt, dann wurden für 15 sec gevortext und dann für 15 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Dann wurde der Überstand in ein frisches Gefäß gegeben, mit 1 Vol. Isopropanol gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurden die Proben für 15 min bei 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und die RNA-Pellets mit kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und weitere 15 min bei 7500 rpm bei 4°C gewaschen. Nach Lufttrocknen der Pellets wurden diese für 15 min (55°C) je nach Größe in 20-50 µl DNase/RNase freiem Wasser resuspendiert. Im Bio Photometer wurde daraufhin die Konzentration gemessen.

3.4.2 cDNA Synthese

cDNA wurde mit dem SuperScript® II Erststrang-Synthesesystem durchgeführt. Dazu wurden 2 µg RNA mit DNase/RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 7 µl ergänzt. Dann wurden 5 µl Random Hexamere zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x first strand Buffer, 2 µl DTT (0.1 M) und 1 µl dNTPs (10mM), dann wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Temperatur für weitere 2 min auf 42 °C gesenkt. Als nächstes wurde 1 µl SuperScript II hinzugefügt und der Ansatz vorsichtig gemischt. Dann inkubierte er für 1 h bei 42°C und dann für weitere 10

min bei 70°C um die Reaktion zu beenden. Der Ansatz wurde mit DNase/RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

3.4.3 qPCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) wurde nach einem SYBRgreen-basierten Protokoll durchgeführt. Dafür wurden pro Well 2 µl cDNA (entsprechend 40 µg RNA), jeweils 500 nM Vorwärts Primer und Rückwärts Primer, 6 µl dH₂O und 12 µl SYBRgreen eingesetzt. Die Proben wurden immer in Dubletten pipettiert. Zur Messung der mRNA-Menge wurden der Mastercycler RealPlex2 sowie die Software „realplex“ verwendet.

Initiale Denaturierung: 2 min bei 95°C

Denaturierung:	15 sec bei 95°C	40 Zyklen
Primerhybridisierung:	15 sec bei 58°C	
Elongation:	20 sec bei 68°C	

Nach Analyse der Schmelzkurve, wurde die relative Expression errechnet und mit dem *TATA-Box binding protein* (TBP) normalisiert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Proteinisolierung

Die Zellen wurden im 6-well Format oder in Petrischalen (ø 5 cm) ausgesät und für 48 h mit PTC-209 oder DMSO als Kontrolle behandelt. Es wurde eine Konfluenz von 80 – 90 % abgewartet, dann wurde das Medium verworfen und die Zellen mit gekühltem PBS abgewaschen.

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden dann 100 -300 µl Lysepuffer zu den Zellen gegeben und sie wurden mit einem Zellschaber abgelöst. Das Lysat inkubierte für 30 min auf Eis und wurde dann für 30 min bei 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand in ein frisches Falcon gegeben.

Für die Gewinnung von nukleären Extrakten wurden 100 -300 µl hypotoner Lysepuffer zu den Zellen gegeben und sie wurden mit einem Zellschaber abgelöst. Das Lysat inkubierte für 15 min auf Eis und wurde dann für 10 min bei 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 0.2 M HCl gelöst. Die Proben wurden als nächstes über Nacht auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (enthält Histone) wurde in ein neues Falcon überführt.

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um eine Standardkurve für die Proteinkonzentration zu ermitteln, wurde zunächst BSA in Konzentrationen von 1200 µg/mL bis 0 µg/mL verdünnt. Die Standardlösungen wurden in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt, jeweils in Dubletten von 10 µl in eine 96 well-Platte pipettiert und es wurden 200 µl Bradfordreagent hinzugegeben. Nach Inkubation für 15 min (RT) wurde die Absorption im Bio Photometer gemessen. Die zu bestimmenden Proben wurden auf gleiche Weise behandelt und dann wurde anhand der BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration bestimmt.

3.5.3 Western Blot

Je nach Probe wurden 20- 50 µg Protein mit dH₂O auf die gewünschte Menge aufgefüllt, mit 5x SDS-Loading Dye vermischt und dann für 10 min bei 99 °C inkubiert um die Proteine zu denaturieren. Als nächstes wurden die Proben und 5 µl Längenmarker auf ein 4 – 12 % oder 4 – 20 % TRIS-Glycin-Minigel aufgetragen und für 40 – 60 min (200 V, 120 mA) aufgetrennt.

Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit dem Trans-Blot Turbo Transfer System auf eine PVDF Membran geblottet (25 V, 7 min). Die Membran wurde 3 Mal mit TBS-T gewaschen (jeweils 5 min) und dann für 3 h in TBS-T mit 5 % Milchpulver geblockt. Die Membran wurde dann mit dem primären Antikörper in der Verdünnung, die vom Hersteller angegeben ist (je nach AK 1:1000 oder 1:5000) in 2,5 % Milchpulver in TBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 Mal mit TBS-T gewaschen (jeweils 5 min) und dann für eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper (1:10000) in TBS-T mit 2,5% Milchpulver inkubiert. Dann wurde die Membran 3 Mal mit TBS-T gewaschen (jeweils 5 min). Für die Detektion wurde die Membran mit Plastikfolie bedeckt und mit Prime West Detection Lösung benetzt, dann wurden die Banden wurden mit Hilfe der Entwicklermaschine Diana III detektiert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit ImageJ.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GrapPad Prism 8.2.1.0 durchgeführt, unter Verwendung des ungepaarten Students t-Test oder des Mann Whitney-Tests. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte dann mit Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung in Punkt- oder Säulendiagrammen.

4. Ergebnisse

4.1 Die PRC1-Komponente BMI1 ist in Hepatoblastomen hochreguliert

Im Gegensatz zu den meisten adulten Neoplasien, die eine Vielzahl genetischer Veränderungen zeigen, finden sich im Hepatoblastom durchschnittlich nur 2,9 Mutationen [5]. Damit zählt das Hepatoblastom zu den genetisch einfachsten Tumoren. Neben genetischen können jedoch auch epigenetische Veränderungen zur Entstehung von Tumoren beitragen [48]. In Vorarbeiten unserer Gruppe konnte festgestellt werden, dass BCORL1, eine Komponente des Polycomb repressive complex 1 (PRC1) in manchen Hepatoblastomen mutiert ist. Um ein besseres Verständnis für die mögliche Rolle des PRC bei der Tumorentstehung zu bekommen, wurde in einem ersten Ansatz eine Expressionsanalyse verschiedener Komponenten des PRC1 und weiterer Mitglieder der PRC Familie an einem Kollektiv von 40 Hepatoblastomen und an Proben von Normalleber durchgeführt. In den Expressionslevels von RING1A, RNF2, KDM2B, BCORL1 und BCOR zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Normalleberproben. Interessanterweise sind jedoch die PRC1-Kernkomponenten BMI1 und PCGF2 signifikant hochreguliert. PCGF1 ist in den Tumoren hingegen herunterreguliert (Abb. 5).

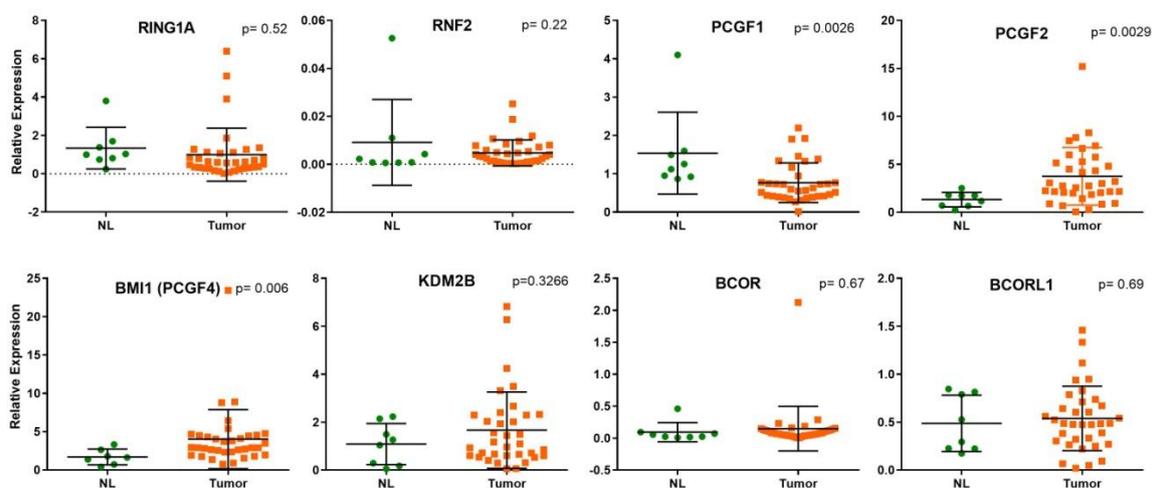


Abbildung 5: mRNA-Expression von PRC Komponenten in Hb

Die mRNA-Expressionslevel von verschiedenen Komponenten des Polycomb repressive complex 1 in normalem Lebergewebe (NL) und Tumorgewebe (Tumor) wurden verglichen.

Die Expressionslevel von PCGF2 und BMI1 waren in den Tumoren signifikant erhöht, PCGF1 signifikant erniedrigt. Die relative Expression der Kandidatengene wurde mit RT-qPCR bestimmt und mit dem Housekeeping-Gen TBP normalisiert.

4.2 Höhere Expressionslevel von BMI1 korrelieren mit negativen prognostischen Faktoren

Die Expressionslevel von BMI1 und PCGF2 wurden dann mit den klinischen Daten der Patienten korreliert. Es ist ersichtlich, dass höhere Expressionswerte von BMI1 signifikant häufig bei Tumoren mit Metastasierung und multifokalem Wachstum zu finden waren (Abb. 6). Weitere klinische Faktoren wie zum Beispiel Geschlecht, Patientenalter, Gesamtüberleben, Zuordnung zum C1 oder C2 Cluster und PRETEXT-Stadium zeigten hingegen keine Assoziation mit der Kandidatengen-Expression. Für das ebenfalls hochregulierte PCGF2 gibt es keinen solchen Zusammenhang. Die Expressionslevels des herunterregulierten Proteins PCGF1 zeigten ebenfalls keine Korrelation mit klinischen Parametern.

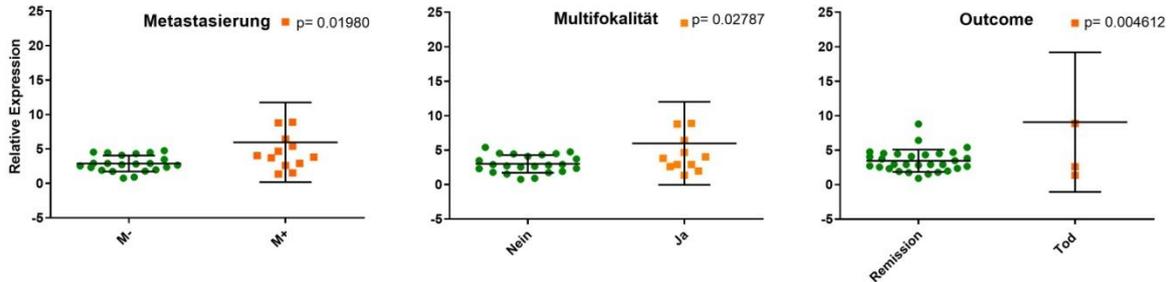


Abbildung 6: **Korrelation prognostischer Faktoren mit der Expression von BMI1.**

Die Expressionslevel von BMI1 in den Tumorproben wurden für jeden Patienten mit den prognostischen Faktoren korreliert. Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen höheren Expressionslevels von BMI1 mit multifokalem Wachstum, Metastasierung und Tod durch die Erkrankung.

4.3 Effekte der Pharmakologischen Inhibierung von BMI1 auf Hb Zelllinien

4.3.1 Pharmakologische Inhibierung von BMI1 verringert die Proliferation von Hb Zelllinien

Durch Literaturrecherche konnten drei Inhibitoren gefunden werden, die auf unterschiedliche Bestandteile von PRC1 zielen (Fig. 7A). PRT4165 [87], UNC3866 [88] und PRT-209 [89] sind sogenannte Small Molecule Inhibitors, synthetisch hergestellte Verbindungen, die aufgrund ihrer geringen Größe (<500Da) leicht in Zellen eindringen können. PRT4165 inhibiert die PRC1-Kernkomponenten RING1A und RNF, die die E3 Ubiquitinligaseaktivität der PRC1 vermitteln. Wird diese gestört, kann Histon 2A nicht mehr ubiquitinyliert werden. UNC3866 bindet die Chromodomänen von CBX4 und CBX8 und verhindert dadurch eine Bindung von PRC1 an die DNA. PTC-209 ist ein direkter Inhibitor von BMI1.

Um die Wirksamkeit der Inhibitoren initial zu beurteilen, wurden initial MTT-Assays mit den Hb Zelllinien HUH6, HepT1, HepG2, HUH7 und Hep3B für alle Inhibitoren durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle eine Fibroblastenzelllinie (Feja) mit den Inhibitoren behandelt. Zur Beurteilung der Wirkstärke wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) errechnet. Sie sagt aus, bei welcher Konzentration die Hälfte der maximal möglichen Hemmung erreicht ist. Je niedriger die IC₅₀ eines Wirkstoffes ist, desto stärker ist also seine Wirkung.

UNC 3866 zeigte keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien (Abb. 7C). PRT4165 zeigte zwar eine Wirkung, allerdings nur in sehr hohen Dosen. Die berechnete mittlere inhibitorische Konzentration liegt je nach Zelllinie zwischen 19,95 µM (HUH6) und 36,28 µM (HepT1). Diese Werte sind für eine mögliche spätere Anwendung an Patienten deutlich zu hoch (Abb. 7B). Außerdem zeigte sich, dass die Fibroblasten ähnlich sensitiv auf die Behandlung reagieren. Mit Abstand am wirksamsten ist PTC-209, mit IC₅₀ Werten zwischen 1,1 µM (HUH6) und 2,5 µM (HUH7). Deshalb wollten wir zusätzlich auch seine Wirkung auf die PDX-Zelllinien Hb214, Hb243, Hb279, Hb282, Hb295 und Hb303 überprüfen. Es zeigte sich, dass die PDX-Zelllinien noch sensitiver waren, mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich (Abb. 7D und 7E). In diesen geringen Dosen zeigt der Inhibitor keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Fibroblasten (Abb. 7D).

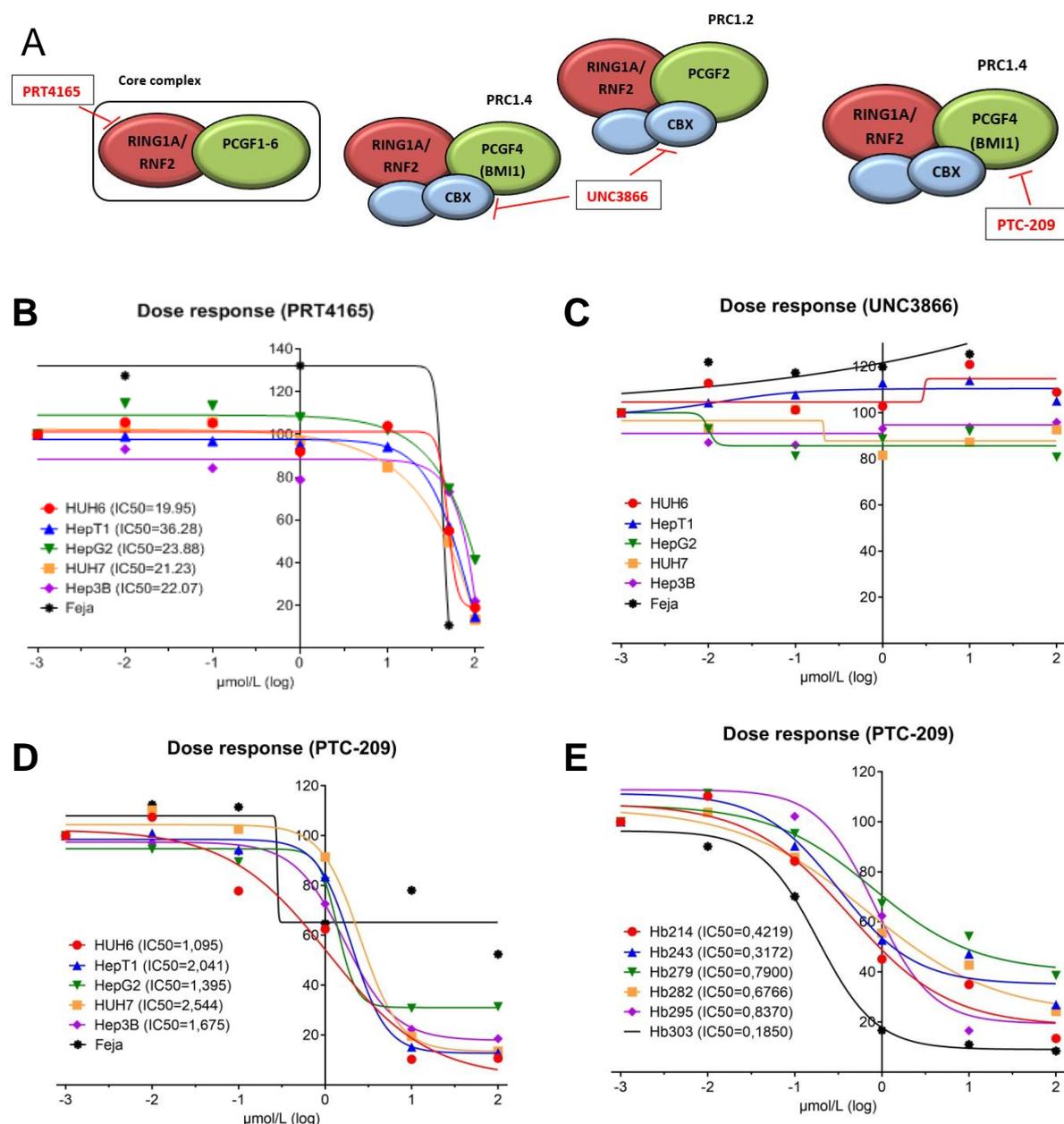


Abbildung 7: Effekt der Behandlung mit den Inhibitoren PRT4165, UNC3866 und PTC-209 auf das Wachstumsverhalten der Hb-Zelllinien

Der Effekt der Inhibitorbehandlung auf das Wachstumsverhalten der Zellen wurde durch Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) beurteilt. Die Inhibitoren haben verschiedene Angriffspunkte innerhalb der PRC Komplexe (A). Mittels MTT Assay wurde die Zellproliferation 72 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren ermittelt ($n=4$). Während PRT4165 (B) und UNC3866 (C) das Wachstum der Zellen nur in sehr hohen Dosen oder gar nicht beeinflussen, führt die Behandlung mit dem BMI1-Inhibitor PTC-209 (D, E) zu einem deutlich verlangsamten Zellwachstum. Bei UNC3866 und für Feja war die Berechnung einer IC_{50} nicht möglich, da die Zellen nicht auf die Behandlung ansprachen.

4.3.2 Der BMI-Inhibitor PTC-209 führt zu einer verminderten Aktivität von PRC1

Die Funktion von PRC1 ist die Bindung und Ubiquitylierung von Histon 2A. Durch eine PTC-209-verminderte Aktivität von BMI1 als Teil des PRC1-Komplexes sollte es daher auch zu einer Verringerung von ubiquitinyliertem Histon 2A (H2Aub) kommen. Durch den Nachweis dieses Histonmarks kann also eine Aussage darüber getroffen werden, ob der Effekt von PTC-209 tatsächlich über eine Inhibierung von PRC1 vermittelt wird. Dafür wurde im Western Blot H2Aub an nukleären Extrakten behandelter und unbehandelter Zellen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass in behandelten Zellen weniger H2Aub vorhanden ist als in unbehandelten Zellen (Abb. 8). Dies weist darauf hin, dass die Wirkung von PTC-209 durch direkte Inhibierung von BMI1 vermittelt wird und demzufolge zu einer verminderten Aktivität von PRC1 führt.

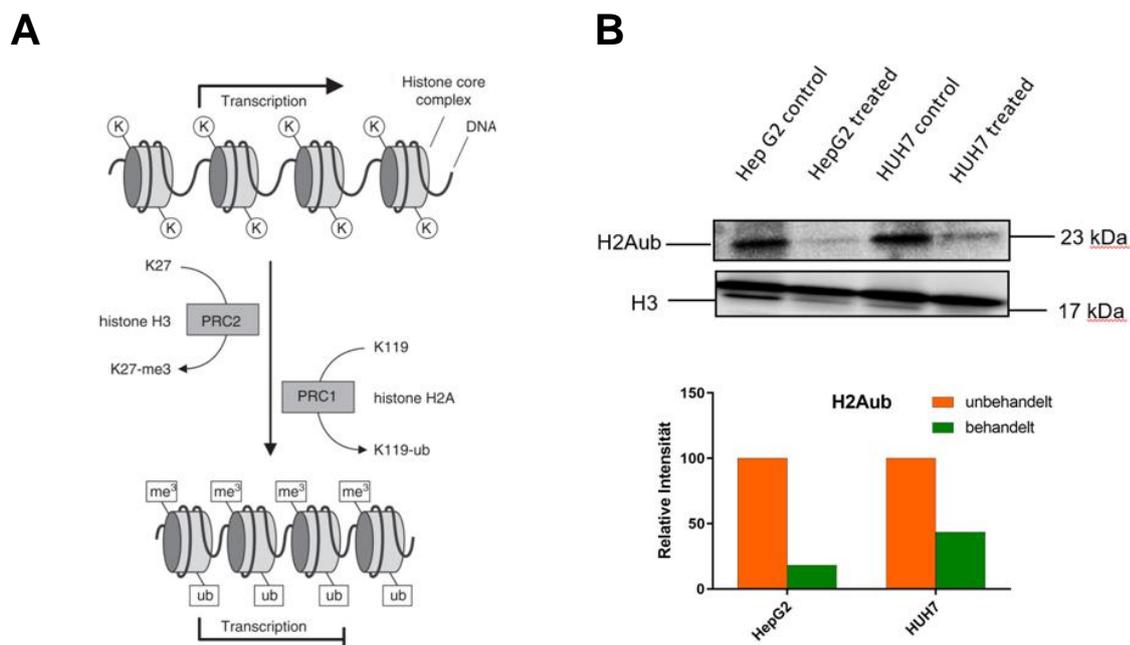


Abbildung 8: **Nachweis des repressiven Histonmarks H2Aub nach Behandlung mit PTC-209**

A: Schematische Darstellung des Mechanismus der Methylierung und Ubiquitylierung von Histonen durch PRC1 und PRC2: Zunächst bindet PRC2 und methyliert Histon 3 an Lysin (K) 27. Dieses Histonmark wird durch PRC 1 erkannt, das daraufhin Histon 2A ubiquitinyliert. B: Oben: Im Westernblot (jeweils 25 µg nukleäres Extrakt) konnte in den Zelllinien HepG2 und HUH7 nach Behandlung mit PTC-209 vermindertes H2Aub nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde Histon H3 detektiert. Unten: Quantifizierung der Signalintensität mit ImageJ.

4.3.3 Pharmakologische Inhibierung von BMI1 schränkt die Fähigkeit zur Koloniebildung aus einzelnen Zellen stark ein

Die Fähigkeit aus einzelnen Zellen neue Kolonien zu bilden, spielt eine wichtige Rolle für die Tumorprogression. Um den Effekt der Inhibitorbehandlung auf die Selbsterneuerungskapazität der Zelllinien zu beurteilen, wurde ein klonogener Assay durchgeführt (siehe Abbildung 9). Dafür wurden Zellen mit dem Inhibitor behandelt und anschließend für 10 Tage inkubiert. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit PTC-209 die Fähigkeit zur Koloniebildung stark einschränkt. Auch bei sehr geringen Konzentrationen im nanomolaren Bereich konnte bei keiner der Zelllinien ein Koloniewachstum detektiert werden.

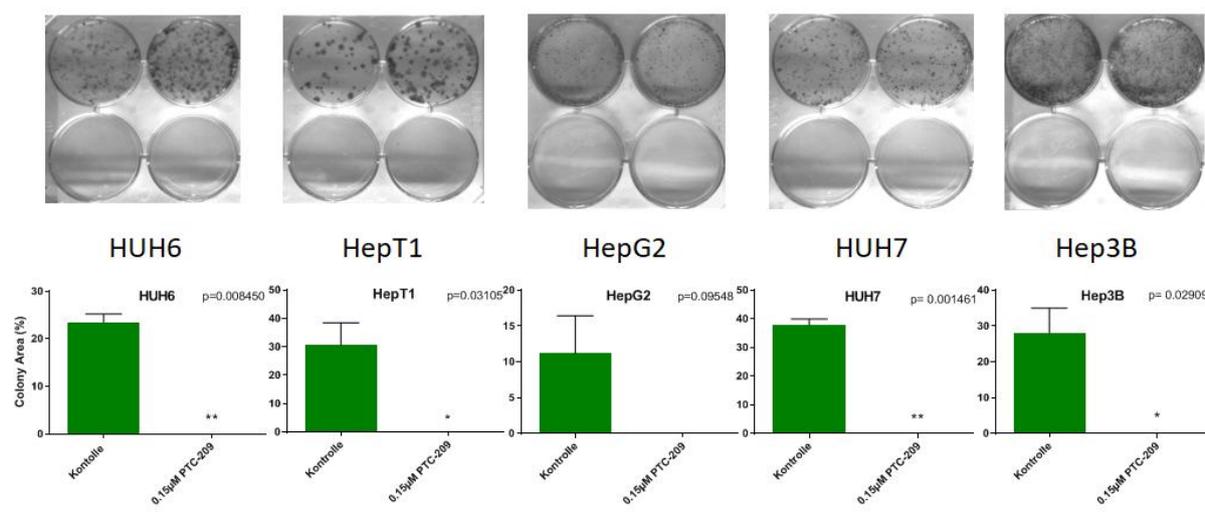


Abbildung 9: **Klonogener Assay nach Behandlung mit PTC-209.**

Oben: Platten mit gefärbten Kolonien der bezeichneten Zelllinien. Obere Reihe jeweils Kontrollen ohne Inhibitor, untere Reihe Platten mit Inhibitor-behandelten Zellen (0,15 µM PTC-209, 10 d). Unten: Quantifizierung der colony area (% der von Zellkolonien bedeckten Fläche der Platten) in ImageJ (n=4). Durch Behandlung mit PT-209 wird die Fähigkeit zur Koloniebildung stark eingeschränkt.

4.3.4 Pharmakologische Inhibierung von BMI1 induziert Apoptose

In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die kanzerogene Wirkung von BMI1 unter anderem durch Repression des *ink4a-ARF*-Locus vermittelt wird und ein Knockdown von BMI1 zu Apoptose führt [90]. Deshalb wollten wir untersuchen,

ob die Behandlung mit PTC-209 auch zur Induktion der Apoptose von Zellen führt. PARP ist ein Protein, das in apoptotischen Zellen von Caspasen gespalten wird. Natives PARP hat eine Größe von 130 kDa, gespaltenes PARP ist 89 kDa groß und dient als gängiger Marker zum Nachweis apoptotischer Zellen im Western Blot. Nach Inhibitorbehandlung über 72 Stunden zeigten sich in den Zelllinien bis zu 16-fach erhöhte Werte von gespaltenem PARP. Wie vermutet kann also auch die pharmakologische Inhibition von BMI1 zur Induktion von Apoptose führen.

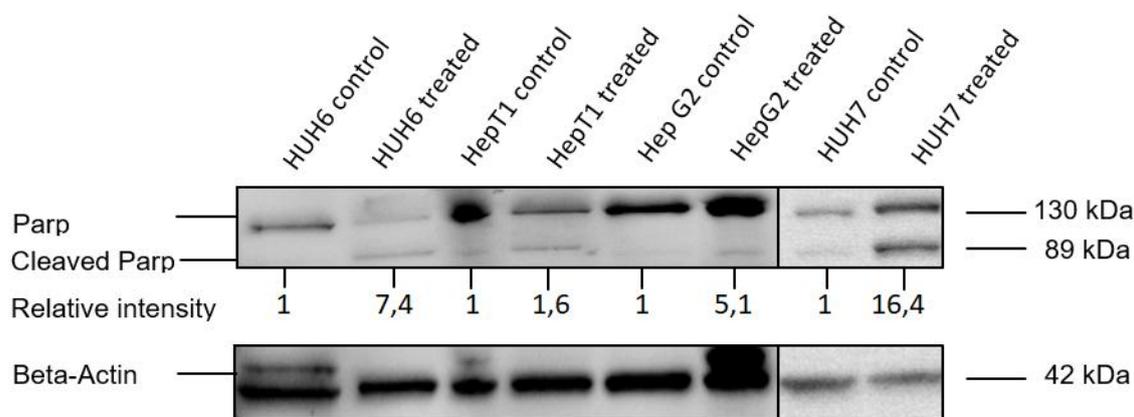


Abbildung 10: **Western blot für PARP/gespaltenes PARP nach Behandlung mit PTC-209**

Zellen der angezeigten Hb-Linien wurden 72 h mit 1,5 μ M PTC-209 behandelt. Gezeigt sind Western Blots von Zelllysaten, oben mit Antikörpern gegen PARP, unten gegen β -Actin als Ladekontrolle. Alle Proben wurden mit Hilfe der Ladekontrolle normiert. *Relative intensity* gibt die Intensität der 89 kDa-Bande (gespaltenes PARP) in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten an.

4.3.5 Pharmakologische Inhibierung von BMI1 verstärkt die Chemosensitivität von Hb Zelllinien

Weiterhin sollte getestet werden, ob PTC-209 einen synergistischen Effekt mit Cisplatin hat, das das Standardmedikament zur Behandlung von Hb ist. Dies ist vor allem im Hinblick auf die klinische Anwendung von Interesse, wenn in Kombination die nötige Dosis beider Substanzen reduziert werden und dadurch das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen verringert werden kann. Die Zellen wurden dafür mit

Kombinationen unterschiedlicher Konzentrationen von Cisplatin und PTC-209 behandelt. Es wurden MTT-Assays durchgeführt, aus deren Ergebnissen Kombinationsindizes mittels CompuSyn Software berechnet wurden. Ein Wert von 1 bedeutet einen additiven Effekt, Werte darüber einen antagonistischen und Werte darunter einen synergistischen Effekt. Es zeigte sich, dass besonders die Kombination geringerer Dosen Cisplatin und PTC-209 zu einem niedrigen Kombinationsindex führt (Abb. 11). Das bedeutet also, dass die Zellen chemosensitiver werden und kleinere Dosen Cisplatin bei zusätzlicher Gabe von PTC-209 stärker proliferationshemmend wirken als Cisplatin allein.

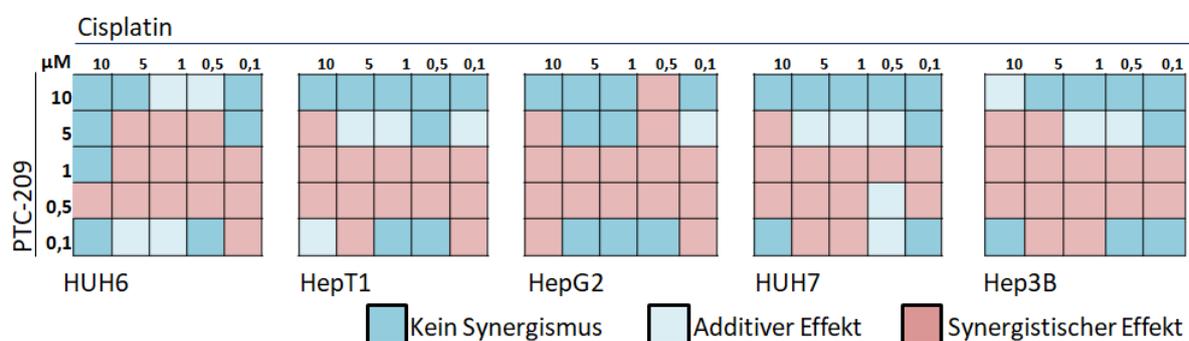


Abbildung 11: **Kombinationsindizes (CI) für Kombinationen verschiedener Konzentrationen von PTC-209 und Cisplatin**

Die Zelllinien wurden mit den genannten Konzentrationen von PTC-209 und Cisplatin sowie DMSO als Kontrolle für 48 h behandelt. Dann wurde ein MTT Assay durchgeführt um die Menge lebender Zellen zu quantifizieren. Farbkodierte Darstellung der Kombinationsindizes: dunkelblau indiziert keinen synergistischen Effekt, hellblau einen additiven und rot einen synergistischen Effekt. In allen Zelllinien konnten synergistische Effekte erzielt werden, insbesondere bei Kombination niedriger Dosen Cisplatin und PTC-209.

4.4 Effekt auf den Wnt-Signaltransduktionsweg

Es ist bereits bekannt, dass BMI1 auch einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg haben kann [91]. Daher wollten wir untersuchen, wie sich die Behandlung mit PTC-209 auf die Aktivität des Signalwegs im Hb auswirkt. Dazu wurde ein TOPflash/FOPflash Reporter Assay durchgeführt. Ist der Wnt-Signalweg aktiv, sammelt sich β -Catenin im Zellkern an und bildet einen Komplex mit TCF/LEF, welcher an TCF-Bindestellen des TOPflash Luciferase-Reporterplasmids binden und somit die Luciferaseaktivität erhöht. Das FOPflash-Plasmid dient mit seinen mutierten TCF-

Bindestellen dabei als Negativkontrolle. In den Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 ist das CTNNB1-Gen mutiert, wodurch der Wnt-Signalweg aktiviert wird. Tatsächlich zeigte sich, dass in Reporterplasmid-transfizierten Zellen nach Behandlung mit PTC-209 die Luciferaseaktivität signifikant verringert war (Abb.13). Die Wnt-Aktivität war in den drei untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit dem Inhibitor um 50 – 80 % niedriger als in unbehandelten Zellen.

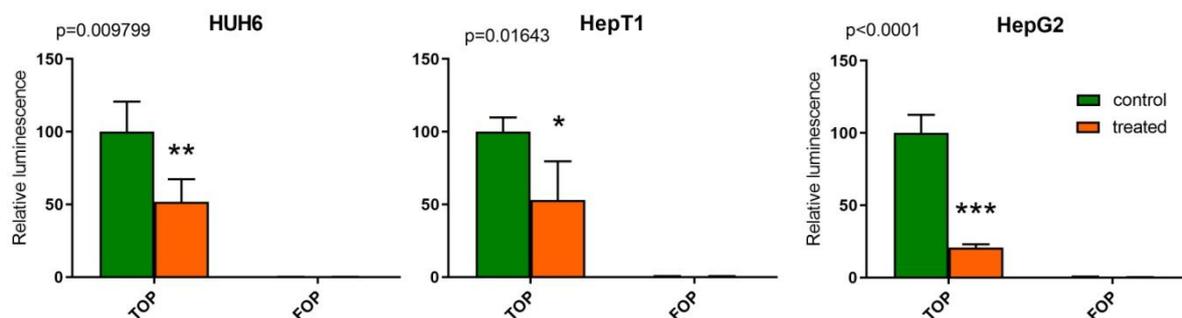


Abbildung 13: **TOP/FOP Assay zur Quantifizierung der Wnt-Aktivität nach Behandlung mit PTC-209**

Säulendiagramm der Luciferaseaktivität: Die Zellen wurden nach Transfektion mit TOPflash-Plasmid oder FOPflash-Plasmid als Kontrolle über Nacht mit PTC-209 oder DMSO behandelt. Am nächsten Tag wurde die Luciferaseaktivität bestimmt (n=3). Die Aktivität des Wnt-Signalwegs war nach pharmakologischer Inhibierung von BMI1 signifikant verringert.

4.5 Verringerte Tumorgroße durch Behandlung mit PTC-209 in vivo

Nach dem die pharmakologische Inhibierung von BMI1 durch PTC-209 *in vitro* erfolgversprechende Effekte zeigte, wurde die Wirkung auch *in vivo* überprüft werden. Diese Experimente wurden für uns freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Stefano Cairo (XenTech, Evry-Courcouronne, Frankreich) an einem von ihnen etablierten PDX Tumormodell in immunsupprimierten Mäusen durchgeführt. Tumortragende Mäuse wurden über einen Zeitraum von 18 Tagen täglich mit einer subkutanen Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Inhibitor oder Kontrollsubstanz behandelt, und die Tumorgroße wurde dreimal wöchentlich mit einem Messschieber gemessen. Es zeigte sich, dass das Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe ab Tag 14 der Behandlung signifikant verlangsamt war (Abb. 14). Besonders von Interesse war

dabei auch der Effekt der Behandlung auf die weitere Gesundheit der Mäuse. Die Mäuse wurden an den gleichen Zeitpunkten gewogen, und ihr Aussehen, Verhalten und klinische Veränderungen beurteilt. Im Verlauf der Behandlung zeigten sich keine relevanten Einflüsse auf den Gesundheitszustand der Tiere. Es zeichnet sich also ab, dass die Behandlung mit PTC-209 auch ein vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung von Hb im Patienten sein könnte.

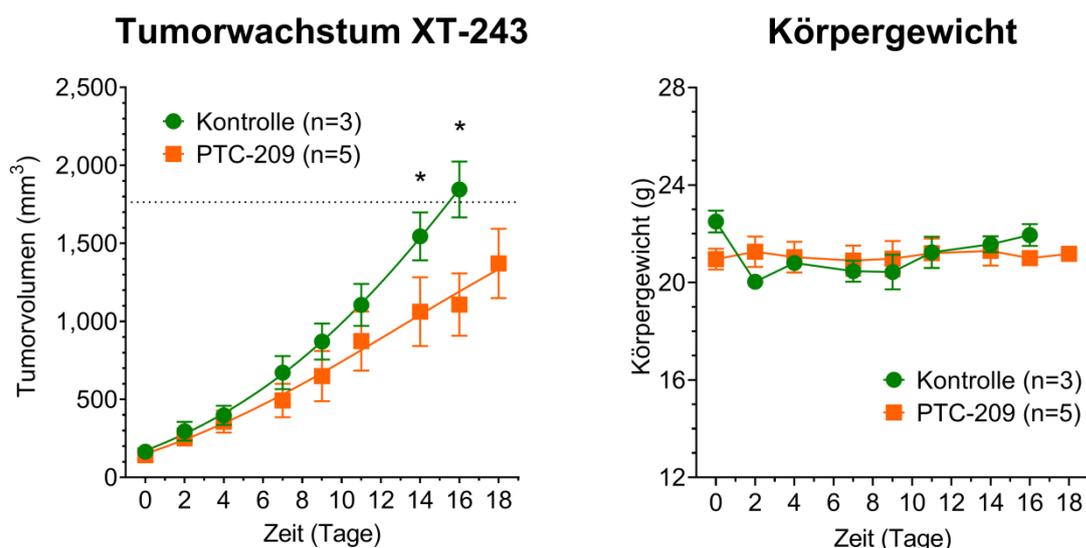


Abbildung 14: Einfluss der Behandlung mit PTC-209 auf das *in vivo* Wachstum des PDX-Modells XT-243

Graphische Darstellung des Tumorwachstums unter Behandlung mit PTC-209: Die Mäuse wurden mit PTC-209 oder Kontrollsubstanz (10% DMSO/90% PBS) subkutan täglich behandelt und die Tumorgöße gemessen. Bei der Beobachtung über einen Zeitraum von 18 Tagen zeigte sich bei den Mäusen, die mit dem Inhibitor behandelt wurden ein vermindertes Tumorwachstum. Nach zwei Wochen war die Tumorgöße der Mäuse, welche PTC-209 erhielten signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. Das Körpergewicht blieb in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar.

5. Diskussion

Das Hepatoblastom (Hb) ist der häufigste Lebertumor im Kindesalter [92]. Unter allen pädiatrischen Tumoren tritt er am frühesten auf und hat die höchste Mortalität, außerdem hat er die geringste Rate an Mutationen und bis jetzt konnte kein spezifischer Angriffspunkt für Chemotherapeutika gefunden werden [5]. Weiterhin wird die Erforschung neuer Therapieoptionen durch seine geringe Inzidenz (1:1,5 Mio) erschwert [14]. Bei Patienten mit Hb, die der Standardrisikogruppe angehören, ist die Prognose äußerst gut. Dank der Forschungserfolge der letzten Jahrzehnte ist ihre Überlebenschance auf über 90 % angestiegen [26]. Bei Patienten der Hochrisikogruppe beträgt sie hingegen nur um die 50 % [93]. Die Identifikation der molekularen Mechanismen, die zu einem Hochrisikoprofil führen ist daher von besonderer Bedeutung, um die Entwicklung neuer Therapien zu ermöglichen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden durch Exomsequenzierung in einigen Hb Mutationen des *BCORL1*-Gens gefunden. *BCORL1* gehört zu den Polycomb Group Proteins (PcG), die sogenannte *Polycomb repressive complexes* (PRC) bilden. Sie sind an der epigenetischen Modifikation von Histonen beteiligt, spielen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und tragen zur Beibehaltung des Stammzellstatus von Zellen bei. Es konnte bereits bei verschiedenen anderen Tumoren eine aberrante Aktivität von PcG nachgewiesen werden. Insbesondere das PCG-assoziierte Gen *BMI1* ist in verschiedenen Tumoren hochreguliert und kann zu metastatischem Wachstum und einer schlechteren Prognose führen [80, 89, 94].

5.1 Rolle von *BMI1* im Hb

Um ein besseres Verständnis für die Rolle der PRCs in der Entstehung von Hb zu bekommen, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Expressionsanalyse verschiedener Komponenten an einem Kollektiv von Hb durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *BMI1* in den Tumoren signifikant stärker exprimiert ist als in normalem Lebergewebe. Die Korrelation der Expressionslevel mit klinischen Aspekten der Patienten ergab außerdem, dass höhere Werte mit negativen prognostischen Faktoren wie Metastasierung und multifokalem Wachstum einhergehen. Dieser Zusammenhang konnte bereits für verschiedene andere Tumorentitäten gefunden werden [62, 80, 89, 95]. In diesen Studien zeigte sich, dass eine pharmakologische Inhibierung von *BMI1* mittels *small*

molecule Inhibitoren eine erfolgreiche Therapieoption darstellt, die das Tumorstadium *in vitro* und *in vivo* hemmen kann. Daher untersuchten wir den Einfluss des BMI1 Inhibitors PTC-209 und zweier weiterer PRC-Inhibitoren, die auf andere Komponenten des PRC zielen. Nur PTC-209 zeigte auf die verwendeten Zelllinien HUH6, HepT1, HepG2, HUH7 und Hep3B einen Effekt in Dosen, die auch bei Patienten anwendbar wären; die mittlere inhibitorische Konzentration IC₅₀ liegt zwischen 1,1 µM und 2,5 µM. Die sechs anschließend untersuchten Hb-PDX Zelllinien reagierten noch sensitiver auf die Behandlung mit dem Inhibitor. Hier liegt die IC₅₀ sogar im nanomolaren Bereich.

Da sich also zeigte, dass eine pharmakologische Inhibierung von BMI1 zu einem verminderten Wachstum von Hb Zelllinien führt, wollten wir genauer untersuchen, wie diese Wirkung vermittelt wird. Dafür überprüften wir zunächst, ob die Behandlung mit PTC-209 auch im Hb tatsächlich zu einer verringerten Aktivität von BMI1 führt. Seine repressive Funktion vermittelt BMI1 als Teil des PRC1 Komplex, welcher Histon 2A ubiquitinyliert. Western Blots haben dazu gezeigt, dass das repressive Histonmark H2Aub in zwei Zelllinien (HepG2 und HUH7) nach Behandlung mit PTC-209 signifikant verringert ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Behandlung mit PTC-209 zu einer verminderten Aktivität von BMI1 führt, wodurch es zu einer Verringerung der Proteinmenge von ubiquitinyliertem Histon 2A kommt. Einen ähnlichen Effekt konnten Ismail et al. mit dem PRC1-Inhibitor PRT4165 zeigen. Bereits die einstündige Behandlung mit einem BMI1-Inhibitor führte zu einem fast vollständigen Verlust von ubiquitinyliertem H2A in Zellkulturen [87]. An welcher Stelle der BMI1-Inhibitor genau seine Wirkung entfaltet, ist nicht abschließend geklärt. Allerdings zeigte sich in vorherigen Studien [96], dass nach Behandlung die mRNA-Level von BMI1 ansteigen. Dies lässt vermuten, dass durch PTC-209 nicht die Transkription verhindert wird, sondern dass der Angriffspunkt an einer anderen Stelle liegt. Möglicherweise kommt es sogar im Rahmen eines Rückkopplungseffekts durch niedrige Level von BMI1 zu einer verstärkten Transkription des BMI1-Gens, welches dann aber durch PTC-209 nicht translatiert werden kann oder nach der Translation abgebaut wird.

Studien anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Inhibition von BMI1 zu einer starken und anhaltenden Reduktion der Selbsterneuerungskapazität führt und Apoptose induziert [89, 96, 97]. Auch die klonogenen Assays in dieser Arbeit zeigten, dass die Behandlung mit PTC-209 die Fähigkeit der Zellen zur Selbsterneuerung stark

einschränkt. Schon nach einmaliger Behandlung mit einer geringen Konzentration (0,15 μM) des Inhibitors konnte auch nach zehn Tagen kein Koloniewachstum detektiert werden. Western Blot Analysen mit PARP weisen darauf hin, dass dieser Effekt unter anderem durch eine erhöhte Apoptoserate ausgelöst wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass BMI1 eine repressive Wirkung auf den Genlocus *INK4A-ARF* hat, der häufig selbst in Tumoren von Mutationen betroffen ist [98]. Er kodiert für zwei Tumorsuppressoren: p16^{Ink4a}, das die Progression des Zellzyklus in die S-Phase verhindert und so zu Seneszenz führt, und p19^{Arf}, das die Apoptose einleitet [99]. Durch BMI1-Inhibition wird also nicht nur Apoptose induziert, sie führt auch dazu, dass die Zellen in einen seneszenten Zustand übergehen. Der Nachweis vermehrter Seneszenz beispielsweise durch ein β -Galactosidase-Assay könnte also in Zukunft interessant sein, um diese Hypothese weiter zu untersuchen. Schließlich könnten Zellzyklusanalysen behandelter Zellen mithilfe einer Durchflusszytometrie, wie in anderen Studien durchgeführt, auch beim Hb noch weiter zum Verständnis beitragen, wie sich die Inhibition von BMI1 genau auf die Zellen auswirkt. Während in kolorektalen Karzinomen und bei Akuter Myeloischer Leukämie durch Inhibition von BMI1 die Apoptose eingeleitet wird, kommt es bei Gallengangskarzinomen eher zum Zellzyklusarrest und dadurch zu einer Hemmung des Tumorwachstums [89, 96, 100]. Die Repression von *INK4A-ARF* ist allerdings nicht alleiniger Mechanismus für die kanzerogene Wirkung von BMI1. So konnte gezeigt werden, dass *Ink4a/Arf*-defiziente hepatische Stammzellen keine Tumoren bilden und *Ink4a/Arf*^{-/-} Knockout-Mäuse kaum Lebertumore entwickeln [101, 102]. Wird in *Ink4a/Arf*-defizienten hepatischen Stammzellen jedoch zusätzlich BMI1 überexprimiert, kann dies zur malignen Transformation führen. Eine Überexpression von BMI1 muss also vermutlich durch die Repression weiterer Zielgene zur Entstehung von Tumoren beitragen.

Da eine Überexpression von BMI1 bei anderen Tumoren zu Chemoresistenz [62] führen kann, untersuchten wir außerdem, ob die Hemmung von BMI1 durch Behandlung mit PTC-209 die Chemosensitivität erhöhen kann. Werden Zellen mit verschiedenen Kombinationen von PTC-209 und Cisplatin behandelt und die Ergebnisse mit denen einer Monotherapie mit den jeweiligen Komponenten verglichen, zeigen die errechneten Kombinationsindizes, dass die Zellen tatsächlich durch Hinzufügen von PTC-209 sensitiver auf eine Behandlung mit Cisplatin reagieren. Durch die Kombination verschiedener Konzentrationen ergeben sich teilweise synergistische Effekte. Diese Tatsache ist besonders vielversprechend im Hinblick auf die klinische Anwen-

derung bei Patienten mit therapierefraktären Tumoren, die nicht ausreichend auf die Therapie mit Cisplatin und dem anderen Standardmedikament Doxorubicin ansprechen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass durch Kombination mit einem BMI1-Inhibitor eine Dosisreduktion der Standardmedikamente möglich ist, wodurch auch die Nebenwirkungen reduziert werden.

Da der BMI1 Inhibitor *in vitro* erfolgversprechende Ergebnisse zeigte, wollten wir seine Wirkung auch *in vivo* überprüfen. Es zeigte sich, dass die Behandlung von PLC-PDX Mäusen mit PTC-209 das Tumorwachstum signifikant reduzieren kann. Hierbei waren insbesondere die Auswirkungen auf den Gesamtorganismus von Interessen. Da BMI1 eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und für die Selbsterneuerungskapazität von Stammzellen hat, sind auch schwere Nebenwirkungen einer BMI1-Inhibition nicht auszuschließen. Interessanterweise zeigten sich bei den Mäusen über den Behandlungszeitraum hinweg keine Hinweise auf eine Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes. Trotzdem müssen die Auswirkungen einer BMI1-Inhibition auf einen sich in der Entwicklung befindenden Organismus noch eingehender erforscht werden. Bakhshinyan et al. konnten bereits zeigen, dass die pharmakologische BMI1-Inhibition die H2Aub Level in Medulloblastom-Zelllinien senkt, jedoch keinen Einfluss auf die Level in humanen neuronalen Stammzellen (hNSC) hat [80]. Dies gibt Hoffnung, dass andere Stammzellen weniger von einer Inhibition von BMI1 betroffen sind als Tumorzellen.

Bei einer Bewertung der Auswirkung einer BMI1-Inhibition ist außerdem zu beachten, dass die PDX Tumoren vornehmlich aus aggressiveren Tumoren generiert wurden [85]. Da generell der Einsatz eines BMI1-Inhibitors primär bei Patienten mit schlechterer Prognose in Frage kommt, bietet sich dieses Mausmodell zu seiner Erforschung besonders an.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine pharmakologische Inhibierung von BMI1 in Hb das Tumorwachstum verlangsamen kann. Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, über die diese Wirkung vermittelt wird. Einerseits wird durch eine Hemmung der Selbsterneuerungsfähigkeit die Fähigkeit zur Koloniebildung aus einzelnen Zellen stark eingeschränkt. Diese Fähigkeit ist insbesondere bei der Metastasierung von Tumoren von Bedeutung. Andererseits induziert die Behandlung mit PTC-209 Apoptose. Es kommt zu kurz- und langfristigen Effekten auf die Proliferationsfähigkeit und das Überleben der Tumorzellen. Die pharmakologi-

sche Inhibierung von BMI1 stellt also eine vielversprechende therapeutische Option bei der Behandlung von Hb dar.

5.2 Einfluss von BMI1 auf den Wnt-Signalweg und die Zielgenexpression

Der Wnt-Signalweg spielt während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, er ist entscheidend für die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus. Eine aberrante Aktivierung des Signalwegs ist auch bei der Entstehung verschiedener Krebsarten bekannt [103] und er ist in bis zu 80 % aller Hb von Mutationen betroffen [103, 104]. Es ist weiterhin bekannt, dass auch epigenetische Regulatoren seine Aktivität beeinflussen können [105]. Deshalb wollten wir den Einfluss einer BMI1 Inhibition auf den Wnt-Signalweg im Hb untersuchen. Im Luciferaseassay konnten wir zeigen, dass die Wnt-Aktivität in den Zelllinien nach Behandlung mit PTC-209 signifikant verringert ist. Bereits in anderen Publikationen konnte gezeigt werden, dass BMI1 Einfluss auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs haben kann [106-109]. Dabei finden sich widersprechende Aussagen darüber, wie genau sich BMI1 auf den Signalweg auswirkt. Je nach Studie finden sich Hinweise darauf, dass es durch BMI1 zu einer Hemmung oder Aktivierung kommen kann. Während es in spermatogenen und hämatopoetischen Stammzellen durch BMI1 zu einer Repression des Wnt-Signalwegs kommt [107, 108], wurde in Kolonkarzinom- und Brustkrebszelllinien eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs beobachtet [91, 109]. Möglicherweise unterscheidet sich also die Funktionsweise von BMI1 zwischen normalen Stammzellen und Krebszellen. Denkbar wäre zum Beispiel, dass es je nach Zelltyp durch BMI1 zu einer epigenetischen Repression von unterschiedlichen Genen kommt, die den Wnt-Signalweg entweder stimulieren oder unterdrücken [91].

In unserem Assay konnten wir zeigen, dass durch PTC-209 die TCF/LEF-Aktivierung vermindert ist. Daraus lässt sich folgern, dass sich die Behandlung mit PTC-209 im Hb hemmend auf den Wnt-Signalweg auswirkt, und im Umkehrschluss, dass BMI1 vermutlich den WNT-Signalweg stimuliert. An welcher Stelle genau dies passiert, bleibt jedoch unklar. BMI könnte einerseits einen direkten Einfluss auf die WNT-Aktivität haben, oder es könnte an anderer Stelle im Weg eingreifen.

Ein bereits beschriebenes Modell für die Beziehungen zwischen BMI1 und dem Wnt-Signalweg ist eine positive Feedbackschleife (Abb. 14) [109]. BMI1 wird durch das

Wnt-Zielgen MYC transkriptionell aktiviert, indem MYC an eine E-Box im Promotor von BMI1 bindet [110]. BMI1 wiederum wirkt unter anderem als Repressor von Proteinen der Dickkopf-Familie (DKKs) und von IDAX; beide sind als WNT-Repressoren bekannt [106, 111, 112]. Durch eine Aktivierung von BMI1 kommt es folglich zu einer Enthemmung des Wnt-Signalwegs. Normalerweise wird die Aktivität des Wnt-Signalwegs durch eine negative Feedbackschleife im Gleichgewicht gehalten: Durch Wnt-Aktivierung wird die Transkription von DKKs aktiviert, die ihrerseits die Wnt-Aktivität inhibiert [113] (siehe Abb. 14). Ist BMI1 überexprimiert, könnte es dazu kommen, dass dieser Mechanismus nicht mehr ausreichend funktioniert. BMI1 führt auch zur Transkription von weiteren Proteinen, die den Wnt-Signalweg aktivieren [109, 114].

Der Wnt-Signalweg ist in den untersuchten Zelllinien jedoch aufgrund von Mutationen im CTNN1B-Gen dauerhaft aktiv [115, 116]. Sie führen dazu, dass β -Catenin nicht abgebaut werden kann, wodurch es zu einer kontinuierlichen Wnt-Aktivierung kommt. Dass in unseren Experimenten jedoch trotzdem die Inhibition von BMI1 zu einer verminderten TCF/LEF-Aktivierung führt, weist darauf hin, dass BMI1 den Wnt-Signalweg noch auf andere Weise reguliert. Vereinfacht kann therapeutisch auf β -Catenin durch vier Mechanismen Einfluss genommen werden: durch Modulatoren (1) des Wnt-Rezeptorkomplexes, (2) des β -Catenin Abbaukomplexes, (3) der subzellulären Lokalisierung von β -Catenin und (4) des β -Catenin Transkriptionskomplexes mit TCF/LEF [117]). Liegt eine Mutation vor, die Phosphorylierung und Abbau von β -Catenin verhindert, können sich die beiden letzten Mechanismen zu Nutze gemacht werden. Um zu verstehen, an welcher Stelle sich eine BMI1 Inhibition in Wnt-aktiven Tumoren auf den Signalweg auswirkt, sind daher weitere Experimente notwendig.

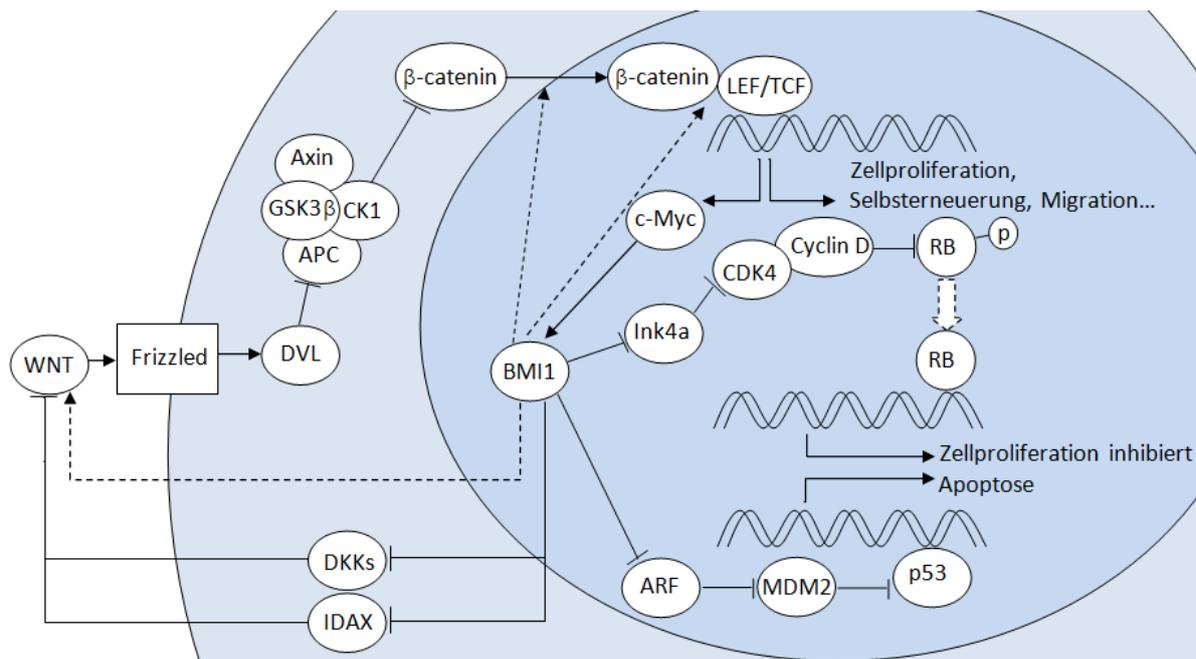


Abbildung 14: **Zusammenhänge zwischen BMI1 und WNT sowie dem Ink4a/ARF Locus** (modifiziert nach [109, 118]): Ist der Wnt-Signalweg aktiv, kommt es zur Transkription verschiedener Zielgene, unter anderem c-Myc, welches über eine E-Box im Promotor von BMI1 dessen Transkription aktivieren kann. BMI1 inhibiert seinerseits DKKs und IDAX [106], wodurch der Wnt-Signalweg enthemmt wird. Außerdem beeinflusst BMI1 die Expression verschiedener weiterer Proteine, die den Wnt-Signalweg aktivieren (gestrichelte Linien) [109]. BMI1 wirkt hinaus inhibierend auf den *INK4A/ARF* Genlocus, dessen beide Transkripte $p16^{\text{Ink4a}}$ und $p19^{\text{Arf}}$ als Tumorsuppressoren wirken indem sie indirekt RB und p53 aktivieren. Dadurch werden die Zellproliferation gehemmt und die Apoptose eingeleitet [118].

Die Beziehungen zwischen BMI1 und dem Wnt-Signalweg sind offensichtlich sehr komplex. Sowohl der Wnt-Signalweg als auch *INK4A-ARF* spielen entscheidende Rollen für die Selbsterneuerungskapazität von Stammzellen und eine aberrante Aktivität ist bei vielen Tumoren beschrieben und es ist bekannt, dass auch sie sich je nach Zelltyp aktivierend oder hemmend aufeinander auswirken können [119, 120]. Möglicherweise stellt BMI1 eine weitere Verbindung zwischen diesen beiden Elementen dar, die so oft an der Krebsentstehung beteiligt sind.

Um eine belastbare Aussage über den Einfluss von BMI1 auf den Wnt-Signalweg, *INK4A-ARF* und die Expression weiterer Zielgene im Hb zu treffen, wären Analysen mittels RNA-Sequenzierung sinnvoll. Der Vergleich ganzer Transkriptome behandelter und unbehandelter Hb-Zelllinien und von PDX Tumoren würde einen tieferen Einblick in die komplexen Einflüsse von BMI1 auf die intrazellulären Vorgänge ermöglichen. So zeigen verschiedene Studien unterschiedliche Auswirkung eines BMI1 Knockdowns auf die Expression hunderter Zielgene, welche je nach Tumorentität nur

teilweise übereinstimmen. Beispielsweise überschneiden sich die betroffenen Gene im Medulloblastom und Rhabdomyosarkom [121, 122], es findet sich hingegen keine Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil hepatischer Stammzellen [102]. Die Auswirkung einer BMI1 Inhibition auf Hb-Zellen lässt sich also nicht aus anderen Untersuchungen rückschließen, sondern muss individuell untersucht werden, da offensichtlich viele Faktoren, wie beispielsweise die Zusammensetzung des PRC-Komplex und der Zelltyp einen Einfluss auf die Wirkung von BMI1 haben und sie sich sogar je nach Genlocus unterscheiden kann [102, 123].

5.3 BMI1 und Krebsstammzellen

Die hier beschriebenen Effekte einer BMI1-Inhibition entsprechen dem, was in anderen Tumoren auch schon beschrieben wurde. Dabei ist zu beachten, dass diese Effekte insbesondere durch die Beeinträchtigung von Zellen mit Stammzellfähigkeiten vermittelt werden [89]. Immer mehr Studien legen nahe, dass es in den meisten Tumoren eine Subpopulation von Krebsstammzellen gibt, auf Englisch *Cancer Stem Cells* (CSCs) [124, 125]. Durch ihre speziellen Eigenschaften wie Selbsterneuerungskapazität und besonders effektive DNA-Reparaturmechanismen können sie häufig der klassischen Radio- und Chemotherapie standhalten. Sie spielen somit eine wichtige Rolle bei Tumorrezidiven und metastasierendem Wachstum. Obwohl Tumore meist aus einer einzelnen mutierten Zelle entstehen, setzen sie sich im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung häufig aus einer heterogenen Population von Zellen zusammen, welche unterschiedliche Marker exprimieren und sich im Grad der Differenzierung unterscheiden [126]. Diese Heterogenität innerhalb von Tumoren ist vermutlich ebenfalls auf das Vorhandensein von CSCs zurückzuführen und stellt eine weitere Hürde bei der Therapie dar.

Es konnte noch keine einheitliche und spezifische Gensignatur gefunden werden, anhand derer sich CSCs identifizieren lassen. Wie auch bei normalen Stammzellen werden sie vor allem anhand ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert. Je nach Tumor kann die Aktivität verschiedener Signaltransduktionswege und die Expression bestimmter Gene gemessen werden, um CSCs zu identifizieren. Häufig sind es dieselben, die auch normale Stammzellen des Ursprungsgewebes charakterisieren, zum Beispiel die klassischen Stammzellmarker CD133, EPCAM und LGR5 sowie der Wnt-Signalweg [127, 128]. In somatischen Stammzellen findet sich auch eine

starke Expression von BMI1, welche mit fortschreitender Differenzierung abnimmt [129]. BMI1 wird von manchen Autoren auch als Marker für CSCs beschrieben, wird allerdings ebenfalls in differenzierten Tumorzellen exprimiert [83, 89].

Am besten ist das Konzept der CSCs und die Rolle von BMI1 für die Beibehaltung der Stammzellfähigkeiten bei der akuten myeloischen Leukämie erforscht [130]. Hier zeigt sich, dass BMI1 essentiell für die Funktion normaler und leukämischer Stammzellen ist. Die Effekte einer BMI1-Inhibition speziell auf die CSCs werden bereits für andere Tumorentitäten erforscht und entsprechende Experimente wären auch in weiterführenden Studien am Hb interessant. Die erste Beschreibung einer pharmakologischen Inhibition von BMI1 als Therapie, die speziell auf die CSCs abzielt, erfolgte durch Kreso et al. bei Kolorektalen Karzinomen [89]. Sie konnte zeigen, dass der Inhibitor PTC-209 durch Beeinträchtigung der CSCs das Tumorwachstum langanhaltend und irreversibel aufhalten kann. Chen et al. [131] konnten zeigen, dass das Wachstum von Glioblastomen in Mausmodellen besonders effektiv aufgehalten werden kann, wenn sie mit einer Kombination von zwei Medikamenten behandelt wurden, von denen eines auf die sich schnell teilenden Tumorzellen und das andere auf die Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften abzielt. Die Kombination von einem BMI1-Inhibitor und einem klassischen Chemotherapeutikum zur Behandlung von Hb könnte also vielleicht nicht nur wie bereits erwähnt sinnvoll sein, um durch eine Dosisreduktion Nebenwirkungen zu verhindern, sondern auch, weil dadurch verschiedene Zelltypen innerhalb des Tumors angegriffen werden. Auch im Hb gibt es erste Hinweise auf eine Subpopulation von Zellen mit Stammzelleigenschaften [44, 132, 133]. Stammzellassays könnten eingesetzt werden, um die Wirkungsweise einer BMI1-Inhibition auf normale Tumorzellen und CSCs genauer zu beleuchten [134-136].

In diesem Zusammenhang ist noch einmal wichtig zu betonen, dass die Effekte einer Inhibition von BMI1 auf den Gesamtorganismus und insbesondere der normalen Stammzellen noch weiter erforscht werden müssen. BMI1 hat eine Schlüsselrolle für die Funktion von Stammzellen [137, 138]. Bei BMI1 Knockout-Mäusen kommt es zu Entwicklungsstörungen des Gehirns, zu Störungen der Hämatopoese und Skelettdéfekten [139]. Es muss also sichergestellt werden, dass durch eine medikamentöse BMI1-Inhibition nicht auch die normalen Stammzellen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

5.4 Ausblick und klinische Implikationen

Ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von BMI1 und negativen prognostischen Faktoren wie Metastasierung, einem höheren Rezidivrisiko und einer schlechteren Prognose wurden bereits für eine Vielzahl anderer Tumoren gezeigt [62, 80, 140]. Im Jahr 2014 wurde die pharmakologische Inhibition von BMI1 als therapeutische Option erstmals durch Kreso et al. bei Kolorektalen Karzinomen beschrieben [89]. Auch in anderen kindlichen Tumoren wie dem Medulloblastom wurde eine Überexpression von BMI1 nachgewiesen und eine pharmakologische Inhibition als therapeutische Option wird überprüft [80]. Daten aus der Forschung zur Rolle von BMI1 im Medulloblastom könnten auch für die Forschung am Hb orientierend interessant sein, da es sich hierbei ebenfalls um Tumoren mit wenigen genetischen Aberrationen handelt, die zum Teil auch eine Wnt-Aktivierung aufweisen. Dass BMI1 auch ein Target bei der Therapie anderer, deutlich häufiger auftretender Tumore ist, gibt Hoffnung darauf, dass entsprechende Medikamente in den nötigen klinischen Studien auf ihre Sicherheit und Effektivität überprüft werden. So könnte ihr Einsatz in der Therapie des Hb erleichtert werden, nachdem eine Zulassung für die Behandlung anderer Tumore erfolgt. Es ist jedoch weiterhin Vorsicht geboten, da sich die Nebenwirkungen eines BMI1-Inhibitors zwischen erwachsenen Patienten und Kindern natürlich unterscheiden könnte, weil sich deren Organismus noch in der Entwicklung befindet.

Nach Abschluss der hier vorgestellten Untersuchungen haben Verträglichkeitsstudien gezeigt, dass sich PTC-209 aufgrund schlechter pharmakokinetischer Eigenschaften nicht für den Einsatz beim Menschen eignet [100, 141]. Inzwischen wurden auch weitere, effektivere BMI1-Inhibitoren entwickelt, welche eine stärkere Wirkung und bessere Bioverfügbarkeit als PTC-209 haben. Hinsichtlich ihrer Funktionsweise wurde gezeigt, dass z.B. der Inhibitor PTC-596 durch eine Phosphorylierung von BMI1 wirkt. Diese induziert die Degradation von BMI und dadurch zu einer verminderten PRC1-Aktivität [142]. Da sich diese Inhibitoren in ihrer molekularen Struktur relativ ähnlich sind, ist davon auszugehen, dass sie an gleicher Stelle wirken. Es ist daher sinnvoll, folgende Studien an Hb nicht mit PTC-209, sondern mit den neuen, wirksameren Inhibitoren fortzuführen.

Wie viele kindliche Tumoren hat das Hb im Vergleich zu Tumoren Erwachsener deutlich weniger genetische Aberrationen. Aktuellen Daten zu Folge findet sich im Hb

sogar die niedrigste Mutationsrate aller untersuchter Tumorentitäten [5]. Dies legt nahe, dass hier verstärkt auch epigenetische Faktoren an der Tumorentstehung beteiligt sind. Im Hb sind zum Beispiel verschiedene Tumorsuppressorgene durch eine Hypermethylierung des Promotors epigenetisch unterdrückt [64]. Davon betroffen sind auch negative Regulatoren des Wnt-Signalwegs [143, 144]. Erst kürzlich wurde eine epigenetische Signatur etabliert, anhand derer eine Risikostratifizierung des Hb erfolgen kann [47]. Hierfür wurden unter anderem RNA-Sequenzierungs- und DNA-Methylierungsdaten von 113 Hb analysiert. Auch BMI1 wirkt als epigenetischer Regulator der Genexpression, der durch die Ubiquitylierung von Histonen die Transkription verhindert. In Zukunft könnte es interessant sein, die Expressionslevel von BMI1 mit der neuen epigenetischen Signatur zu korrelieren. Außerdem könnte die Identifikation differentiell exprimierter Gene nach der Behandlung mit einem BMI1-Inhibitor durch RNA-Sequenzierung darüber Aufschluss geben, ob Beziehungen zwischen BMI1 und der epigenetischen Signatur bestehen. BMI1 könnte ein weiterer Baustein der komplexen epigenetischen Veränderungen sein, die zur Entstehung des Hb beitragen.

Die Rolle von BMI1 bei der Entstehung des Hb und anderer Tumore wird weiterhin ein wichtiger und interessanter Gegenstand der Forschung sein. BMI1 wirkt als repressiverer epigenetischer Regulator der Genexpression, der Einfluss auf häufig an der Krebsentstehung beteiligte Mechanismen und Strukturen wie den Wnt-Signalweg oder den INK4A-ARF-Lokus hat und eine entscheidende Rolle für die Beibehaltung des Stammzellstatus spielt. Diese komplexen Zusammenhänge sind noch nicht vollständig verstanden und müssen weiterhin auf zellbiologischer Ebene intensiv erforscht werden. Gleichzeitig muss der Einsatz von BMI1-Inhibitoren in klinischen Studien getestet und auf seine Sicherheit überprüft werden. Da in der derzeit laufenden PHITT-Studie neuerdings vor der Tumoresektion eine Leberbiopsie durchgeführt wird, wäre in Zukunft zum Beispiel denkbar, dass bei Patienten initial der BMI1-Wert bestimmt werden könnte. Damit könnten Patienten mit einem höheren Risiko, im Verlauf ein Rezidiv oder Metastasen zu entwickeln, identifiziert werden. Bei Patienten, die der Hochrisikogruppe zugeordnet werden, könnte somit sogar präoperativ ein BMI1-Inhibitor zum Einsatz kommen, dessen Sicherheit ausreichend erforscht wurde.

6. Literaturverzeichnis

Uncategorized References

1. Ward, E., et al., *Childhood and adolescent cancer statistics, 2014*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014. **64**(2): p. 83-103.
2. Bhakta, N., et al., *Childhood cancer burden: a review of global estimates*. The Lancet Oncology, 2019. **20**(1): p. e42-e53.
3. Westhoff, M.-A., et al., *Cell death-based treatment of childhood cancer*. Cell death & disease, 2018. **9**(2): p. 116-116.
4. Steliarova-Foucher, E., et al., *Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991-2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study*. The Lancet. Oncology, 2018. **19**(9): p. 1159-1169.
5. Gröbner, S.N., et al., *The landscape of genomic alterations across childhood cancers*. Nature, 2018. **555**(7696): p. 321-327.
6. Zhang, J., et al., *Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer*. The New England journal of medicine, 2015. **373**(24): p. 2336-2346.
7. Filbin, M. and M. Monje, *Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer*. Nature medicine, 2019. **25**(3): p. 367-376.
8. Green, M.R., *Targeting targeted therapy*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2191-3.
9. Mertens, A.C., et al., *Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(19): p. 1368-79.
10. Forrest, S.J., B. Geoerger, and K.A. Janeway, *Precision medicine in pediatric oncology*. Current opinion in pediatrics, 2018. **30**(1): p. 17-24.
11. Sharma, D., G. Subbarao, and R. Saxena, *Hepatoblastoma*. Semin Diagn Pathol, 2017. **34**(2): p. 192-200.
12. Spector, L.G. and J. Birch, *The epidemiology of hepatoblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(5): p. 776-9.
13. Finegold, M.J., et al., *Protocol for the examination of specimens from pediatric patients with hepatoblastoma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(4): p. 520-9.
14. Czauderna, P., et al., *Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy*. Curr Opin Pediatr, 2014. **26**(1): p. 19-28.
15. Schnater, J.M., et al., *Where do we stand with hepatoblastoma? A review*. Cancer, 2003. **98**(4): p. 668-78.
16. Litten, J.B. and G.E. Tomlinson, *Liver Tumors in Children*. 2008. **13**(7): p. 812-820.
17. (GPOH), G.f.P.O.u.H. *S1-Leitlinie 025/011: Hepatoblastom*. 2016; Available from: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/025-011.html>.
18. López-Terrada, D., et al., *Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium*. Modern Pathology, 2014. **27**(3): p. 472-491.
19. Maibach, R., et al., *Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: The SIOPEL experience*. European Journal of Cancer, 2012. **48**(10): p. 1543-1549.
20. Haas, J.E., J.H. Feusner, and M.J. Finegold, *Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable*. Cancer, 2001. **92**(12): p. 3130-4.
21. Ranganathan, S., D. Lopez-Terrada, and R. Alaggio, *Hepatoblastoma and Pediatric Hepatocellular Carcinoma: An Update*. 2020. **23**(2): p. 79-95.
22. Prokurat, A., et al., *Transitional liver cell tumors (TLCT) in older children and adolescents: a novel group of aggressive hepatic tumors expressing beta-catenin*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 510-8.
23. Gupta, A.A., et al., *Critical review of controversial issues in the management of advanced pediatric liver tumors*. 2011. **56**(7): p. 1013-1018.

24. Aronson, D.C., et al., *The treatment of hepatoblastoma: Its evolution and the current status as per the SIOPEL trials*. Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons, 2014. **19**(4): p. 201-207.
25. Emre, S., V. Umman, and M. Rodriguez-Davalos, *Current concepts in pediatric liver tumors*. 2012. **16**(6): p. 549-563.
26. Czauderna, P., et al., *The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model*. European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 2016. **52**: p. 92-101.
27. Meyers, R.L., et al., *Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration*. The Lancet. Oncology, 2017. **18**(1): p. 122-131.
28. Czauderna, P., et al., *Surgical treatment of hepatoblastoma in children*. Pediatr Radiol, 2006. **36**(3): p. 187-91.
29. Hafberg, E., S.C. Borinstein, and S.P. Alexopoulos, *Contemporary management of hepatoblastoma*. Curr Opin Organ Transplant, 2019. **24**(2): p. 113-117.
30. Haeberle, B. and D. Schweinitz, *Treatment of hepatoblastoma in the German cooperative pediatric liver tumor studies*. Front Biosci (Elite Ed), 2012. **4**: p. 493-8.
31. Perilongo, G., et al., *Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1662-70.
32. Zsíros, J., et al., *Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2584-90.
33. Malogolowkin, M.H., et al., *Complete surgical resection is curative for children with hepatoblastoma with pure fetal histology: a report from the Children's Oncology Group*. J Clin Oncol, 2011. **29**(24): p. 3301-6.
34. Sivaprakasam, P., et al., *Survival and long-term outcomes in children with hepatoblastoma treated with continuous infusion of cisplatin and doxorubicin*. J Pediatr Hematol Oncol, 2011. **33**(6): p. e226-30.
35. Dembowska-Bagińska, B., et al., *Health Status in Long-Term Survivors of Hepatoblastoma*. Cancers, 2019. **11**(11): p. 1777.
36. Hiyama, E., et al., *Late toxicities, especially second malignancies, with GWAS analysis in hepatoblastoma cases treated in the Japanese study group for pediatric liver tumor protocol-2*. 2019. **37**(15_suppl): p. 10043-10043.
37. Eichenmüller, M., et al., *The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features*. Journal of Hepatology, 2014. **61**(6): p. 1312-1320.
38. Logan, C.Y. and R. Nusse, *THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2004. **20**(1): p. 781-810.
39. Monga, S.P., *β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis*. Gastroenterology, 2015. **148**(7): p. 1294-1310.
40. Ober, E.A., et al., *Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification*. Nature, 2006. **442**(7103): p. 688-691.
41. Nusse, R. and H. Clevers, *Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. Cell, 2017. **169**(6): p. 985-999.
42. Armengol, C., et al., *Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: The hepatoblastoma model*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2011. **43**(2): p. 265-270.
43. Buendia, M.A., *Unravelling the genetics of hepatoblastoma: Few mutations, what else?* Journal of Hepatology, 2014. **61**(6): p. 1202-1204.
44. Cairo, S., et al., *Hepatic Stem-like Phenotype and Interplay of Wnt/ β -Catenin and Myc Signaling in Aggressive Childhood Liver Cancer*. Cancer Cell, 2008. **14**(6): p. 471-484.
45. Sporn, M.B. and K.T. Liby, *NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context*. Nature reviews. Cancer, 2012. **12**(8): p. 564-571.
46. Cairo, S., et al., *Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/ β -catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **14**(6): p. 471-84.

47. Carrillo-Reixach, J., et al., *Epigenetic footprint enables molecular risk stratification of hepatoblastoma with clinical implications*. Journal of Hepatology, 2020. **73**(2): p. 328-341.
48. Taby, R. and J.-P.J. Issa, *Cancer Epigenetics*. 2010. **60**(6): p. 376-392.
49. Sandoval, J. and M. Esteller, *Cancer epigenomics: beyond genomics*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(1): p. 50-5.
50. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(6): p. 415-428.
51. Relton, C. and G. Davey Smith, *Epigenetic Epidemiology of Common Complex Disease: Prospects for Prediction, Prevention, and Treatment*. PLoS medicine, 2010. **7**: p. e1000356.
52. Dupont, C., D.R. Armant, and C.A. Brenner, *Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective*. Seminars in reproductive medicine, 2009. **27**(5): p. 351-357.
53. Robertson, K.D., *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3139-55.
54. Baylin, S.B. and J.E. Ohm, *Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(2): p. 107-116.
55. Maschietto, M., et al., *DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations*. Oncotarget, 2016. **8**(58): p. 97871-97889.
56. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Research, 2011. **21**(3): p. 381-395.
57. Kouzarides, T., *Chromatin Modifications and Their Function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
58. Meas, R. and P. Mao, *Histone ubiquitylation and its roles in transcription and DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2015. **36**: p. 36-42.
59. Audia, J.E. and R.M. Campbell, *Histone Modifications and Cancer*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2016. **8**(4): p. a019521-a019521.
60. You, J.S. and P.A. Jones, *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?* Cancer cell, 2012. **22**(1): p. 9-20.
61. Bartucci, M., et al., *Synthesis and Characterization of Novel BMI1 Inhibitors Targeting Cellular Self-Renewal in Hepatocellular Carcinoma*. Targeted oncology, 2017. **12**(4): p. 449-462.
62. M, J.R. and V. S, *BMI1 and PTEN are key determinants of breast cancer therapy: A plausible therapeutic target in breast cancer*. Gene, 2018. **678**: p. 302-311.
63. Yang, D.D., et al., *The co-expression of USP22 and BMI-1 may promote cancer progression and predict therapy failure in gastric carcinoma*. Cell Biochem Biophys, 2011. **61**(3): p. 703-10.
64. Tomlinson, G.E. and R. Kappler, *Genetics and epigenetics of hepatoblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(5): p. 785-92.
65. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
66. Bates, S.E., *Epigenetic Therapies for Cancer*. 2020. **383**(7): p. 650-663.
67. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The Epigenomics of Cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-692.
68. Crea, F., et al., *Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: an opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies*. Drug Resist Updat, 2011. **14**(6): p. 280-96.
69. Lopez, A.T., S. Bates, and L. Geskin, *Current Status of HDAC Inhibitors in Cutaneous T-cell Lymphoma*. Am J Clin Dermatol, 2018. **19**(6): p. 805-819.
70. Estey, E.H., *Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2013. **27**(9): p. 1803-1812.
71. Piunti, A. and A. Shilatifard, *The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021. **22**(5): p. 326-345.
72. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(11): p. 846-856.
73. Gao, Z., et al., *PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes*. Molecular Cell, 2012. **45**(3): p. 344-356.

74. Aranda, S., G. Mas, and L. Di Croce, *Regulation of gene transcription by Polycomb proteins*. Science advances, 2015. **1**(11): p. e1500737-e1500737.
75. Schuettengruber, B., et al., *Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting*. Cell, 2017. **171**(1): p. 34-57.
76. Wang, L., et al., *Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 637-46.
77. Schwartz, Y.B., et al., *Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 700-5.
78. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature, 2006. **441**(7091): p. 349-353.
79. Di Croce, L. and K. Helin, *Transcriptional regulation by Polycomb group proteins*. Nature Structural & Molecular Biology, 2013. **20**(10): p. 1147-1155.
80. Bakhshinyan, D., et al., *BMI1 is a therapeutic target in recurrent medulloblastoma*. Oncogene, 2019. **38**(10): p. 1702-1716.
81. Xu, C.-R., et al., *Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis*. Molecular cancer research : MCR, 2009. **7**(12): p. 1937-1945.
82. Codony-Servat, J., et al., *Cancer Stem Cell Biomarkers in EGFR-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. Clin Lung Cancer, 2019. **20**(3): p. 167-177.
83. Siddique, H.R. and M. Saleem, *Role of BMI1, a Stem Cell Factor, in Cancer Recurrence and Chemoresistance: Preclinical and Clinical Evidences*. STEM CELLS, 2012. **30**(3): p. 372-378.
84. Lai, Y., et al., *Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research*. Journal of hematology & oncology, 2017. **10**(1): p. 106-106.
85. Nicolle, D., et al., *Patient-derived mouse xenografts from pediatric liver cancer predict tumor recurrence and advise clinical management*. Hepatology, 2016. **64**(4): p. 1121-1135.
86. Pietsch, T., et al., *Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma*. Lab Invest, 1996. **74**(4): p. 809-18.
87. Ismail, I.H., et al., *A small molecule inhibitor of polycomb repressive complex 1 inhibits ubiquitin signaling at DNA double-strand breaks*. The Journal of biological chemistry, 2013. **288**(37): p. 26944-26954.
88. Stuckey, J.I., et al., *A cellular chemical probe targeting the chromodomains of Polycomb repressive complex 1*. Nature chemical biology, 2016. **12**(3): p. 180-187.
89. Kreso, A., et al., *Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer*. Nature Medicine, 2014. **20**(1): p. 29-36.
90. Jacobs, J.J., et al., *Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF*. Genes Dev, 1999. **13**(20): p. 2678-90.
91. Yu, H., et al., *Bmi1 Regulates Wnt Signaling in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. Stem Cell Reviews and Reports, 2021. **17**: p. 1-10.
92. Stiller, C.A., J. Pritchard, and E. Steliarova-Foucher, *Liver cancer in European children: incidence and survival, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project*. Eur J Cancer, 2006. **42**(13): p. 2115-23.
93. Fuchs, J., et al., *Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94*. Cancer, 2002. **95**(1): p. 172-82.
94. Kim, J.H., et al., *Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer*. Breast, 2004. **13**(5): p. 383-8.
95. Mayr, C., et al., *The role of polycomb repressive complexes in biliary tract cancer*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2015. **19**(3): p. 363-375.
96. Mayr, C., et al., *The BMI1 inhibitor PTC-209 is a potential compound to halt cellular growth in biliary tract cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(1): p. 745-758.
97. Li, J., Z. Vangundy, and M. Poi, *PTC209, a Specific Inhibitor of BMI1, Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines*. Anticancer Research, 2020. **40**(1): p. 133.
98. Ivanchuk, S.M., et al., *The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth*. J Neurooncol, 2001. **51**(3): p. 219-29.

99. Jacobs, J.J., et al., *The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 164-8.
100. Nishida, Y., et al., *The novel BMI-1 inhibitor PTC596 downregulates MCL-1 and induces p53-independent mitochondrial apoptosis in acute myeloid leukemia progenitor cells*. Blood Cancer Journal, 2017. **7**(2): p. e527-e527.
101. Serrano, M., et al., *Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality*. Cell, 1996. **85**(1): p. 27-37.
102. Chiba, T., et al., *Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in Mice*. 2010. **52**(3): p. 1111-1123.
103. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
104. Han, Z.-G., *Mutational landscape of hepatoblastoma goes beyond the Wnt- β -catenin pathway*. Hepatology, 2014. **60**(5): p. 1476-1478.
105. Li, J., et al., *KDM3 epigenetically controls tumorigenic potentials of human colorectal cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signalling*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15146.
106. Yu, F., et al., *BMI1 activates WNT signaling in colon cancer by negatively regulating the WNT antagonist IDAX*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. **496**(2): p. 468-474.
107. Yu, H., et al., *Bmi1 Regulates Wnt Signaling in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. Stem Cell Reviews and Reports, 2021. **17**(6): p. 2304-2313.
108. Yu, J., et al., *BMI1 promotes spermatogonial stem cell maintenance by epigenetically repressing Wnt10b/ β -catenin signaling*. International Journal of Biological Sciences, 2022. **18**(7): p. 2807-2820.
109. Cho, J.H., M. Dimri, and G.P. Dimri, *A positive feedback loop regulates the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 3406-18.
110. Guo, W.J., et al., *Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 536-46.
111. Moon, R.T., et al., *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(9): p. 691-701.
112. Bolonsky, A., et al., *Targeting of BMI-1 with PTC-209 shows potent anti-myeloma activity and impairs the tumour microenvironment*. Journal of Hematology & Oncology, 2016. **9**(1): p. 17.
113. González-Sancho, J.M., et al., *The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer*. Oncogene, 2005. **24**(6): p. 1098-103.
114. Cho, J.-H., M. Dimri, and G.P. Dimri, *A Positive Feedback Loop Regulates the Expression of Polycomb Group Protein BMI1 via WNT Signaling Pathway* ^{*} </sup>. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(5): p. 3406-3418.
115. Zhang, W., et al., *β -Catenin mutations as determinants of hepatoblastoma phenotypes in mice*. J Biol Chem, 2019. **294**(46): p. 17524-17542.
116. de La Coste, A., et al., *Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8847-51.
117. Shang, S., F. Hua, and Z.W. Hu, *The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities*. Oncotarget, 2017. **8**(20): p. 33972-33989.
118. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(12): p. 895-902.
119. Azazmeh, N., et al., *Chronic expression of p16INK4a in the epidermis induces Wnt-mediated hyperplasia and promotes tumor initiation*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 2711.
120. Adams, P.D. and G.H. Enders, *Wnt-signaling and senescence: A tug of war in early neoplasia?* Cancer Biol Ther, 2008. **7**(11): p. 1706-11.
121. Douglas, D., et al., *BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression*. Cancer research, 2008. **68**(16): p. 6507-6515.

122. Wiederschain, D., et al., *Contribution of polycomb homologues Bmi-1 and Mel-18 to medulloblastoma pathogenesis*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(13): p. 4968-79.
123. Orlando, V., *Polycomb, epigenomes, and control of cell identity*. Cell, 2003. **112**(5): p. 599-606.
124. Nassar, D. and C. Blanpain, *Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2016. **11**(1): p. 47-76.
125. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
126. Almendro, V., A. Marusyk, and K. Polyak, *Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 277-302.
127. Beck, B. and C. Blanpain, *Unravelling cancer stem cell potential*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**(10): p. 727-738.
128. Yamashita, T., et al., *Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10831-9.
129. Hosen, N., et al., *Bmi-1-green fluorescent protein-knock-in mice reveal the dynamic regulation of bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1635-44.
130. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 255-260.
131. Chen, J., et al., *A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy*. Nature, 2012. **488**(7412): p. 522-526.
132. Ruck, P. and J.C. Xiao, *Stem-like cells in hepatoblastoma*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 504-7.
133. Mavila, N. and J. Thundimadathil, *The Emerging Roles of Cancer Stem Cells and Wnt/Beta-Catenin Signaling in Hepatoblastoma*. Cancers, 2019. **11**(10): p. 1406.
134. Liu, S., et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6063-71.
135. Weiswald, L.B., D. Bellet, and V. Dangles-Marie, *Spherical cancer models in tumor biology*. Neoplasia, 2015. **17**(1): p. 1-15.
136. Srinivasan, M., et al., *Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation*. Oncotarget, 2017. **8**(24): p. 38731-38742.
137. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 302-5.
138. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
139. Leung, C., et al., *Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas*. Nature, 2004. **428**(6980): p. 337-41.
140. Fan, L., et al., *Bmi1 is required for hepatic progenitor cell expansion and liver tumor development*. PloS one, 2012. **7**(9): p. e46472-e46472.
141. Dey, A., et al., *Evaluating the Mechanism and Therapeutic Potential of PTC-028, a Novel Inhibitor of BMI-1 Function in Ovarian Cancer*. Mol Cancer Ther, 2018. **17**(1): p. 39-49.
142. Kim, M.J., et al., *Abstract 5517: PTC596-induced Bmi1 hyper-phosphorylation via Cdk1/2 activation resulting in tumor stem cell depletion*. Cancer Research, 2014. **74**(19_Supplement): p. 5517-5517.
143. Sakamoto, L.H., et al., *MT1G hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma*. Pediatr Res, 2010. **67**(4): p. 387-93.
144. Shih, Y.L., et al., *SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway*. Int J Cancer, 2007. **121**(5): p. 1028-35.

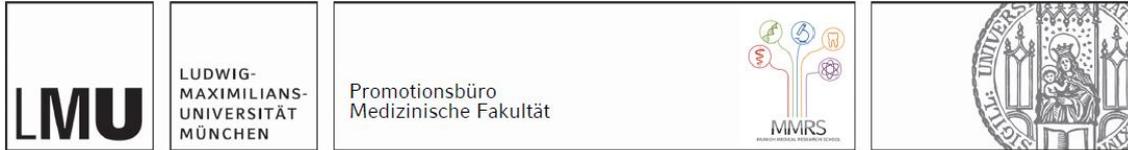
Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz und Herrn Prof. Dr. Oliver Muensterer für die Möglichkeit danken, in der Kinderchirurgischen Klinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals meine Dissertation durchzuführen. Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Kappler für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich bin dankbar dafür, dass er mir jederzeit geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand, komplexe Themen verständlich machte und mein Interesse an der Forschung wecken konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe herzlich bedanken, insbesondere Frau Fatemeh Promoli für die technische Assistenz. Mein Dank gilt Alexandra Wagner, Ting Jiang, Qian Li und Tamara Krause, für die Unterstützung auf fachlicher Ebene, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schönen Zeiten auch außerhalb des Labors.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und meinen Freunden und Yannik für die Unterstützung zu jeder Zeit. Besonderer Dank gilt meinem Vater für das Korrekturlesen und die inspirierenden inhaltlichen Diskussionen, meiner Mutter und meinem Bruder dafür, dass sie immer für mich da sind.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Bentrop, Marie Friederike

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Inhibition von BMI1 im Hepatoblastom als therapeutische Option

selbständig 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.

Karlsruhe, 22.03.2023

Ort, Datum

Marie Friederike Bentrop

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand