

Aus der kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz)

Die Rolle des DNMT-rekrutierenden Chromatinremodeler LSH in Hepatoblastomen

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

vorgelegt von
Diego Erich Kauffmann-Guerrero
aus
München
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Roland Kappler
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. David Anz
Priv. Doz. Dr. Sandra Hake
Prof. Dr. Markus Guba
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2016

Für meine Lieben

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
1 Einleitung	9
1.1 Das Hepatoblastom	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Risikofaktoren	9
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese	10
1.1.4 Klinische Aspekte	12
1.1.5 Therapie	15
1.1.6 Therapiebesonderheiten in Deutschland	16
1.2 DNA-Methylierung	16
1.2.1 DNA-Methyltransferasen	17
1.2.2 Funktion der DNA-Methylierung	18
1.2.3 DNA-Methylierung und Krankheit	20
1.3 Chromatin und Chromatinremodeler	22
1.3.1 Chromatin	22
1.3.2 Chromatinremodeler – Organisatoren des Chromatins	24
1.4 <i>LSH</i> (Lymphoid Specific Helicase)	26
1.4.1 Expression, genomische Struktur und chromosomale Lokalisation	26
1.4.2 <i>LSH</i> hat Einfluss auf Seneszenz und Proliferation	26
1.4.3 <i>LSH</i> – ein epigenetischer Regulator	27
1.4.4 Transkriptionelle Regulation von <i>LSH</i>	28
1.4.5 Klinische Aspekte von <i>LSH</i>	29
2 Zielsetzung der Arbeit	30
3 Material	31
3.1 Verwendete Zelllinien	31
3.2 Zellkulturmedien	31
3.3 Chemikalien und Reagenzien	32
3.4 Puffer	33
3.5 Nukleinsäuren	33
3.5.1 siRNAs	34
3.5.2 Primer	34

3.6	Enzyme	35
3.7	Antikörper	36
3.8	Verwendete Kits	36
3.9	Längenstandards	36
3.10	Verbrauchsmaterialien	36
3.11	Geräte	37
4	Methoden	38
4.1	Zellkultur	38
4.1.1	Zellen auftauen	38
4.1.2	Zellen passagieren	38
4.1.3	Zellen einfrieren	38
4.1.4	Transfektion mit siRNA	39
4.1.5	Bestimmung der Transfektionseffizienz und Zellvitalität nach Transfektion	39
4.2	RNA-Methoden	39
4.2.1	RNA-Isolierung	39
4.2.2	cDNA-Synthese	40
4.2.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	40
4.3	Protein-Methoden	41
4.3.1	Protein-Isolierung	41
4.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	41
4.3.3	Westernblot	41
4.3.4	Immunhistochemie	42
4.4	DNA-Methoden	43
4.4.1	DNA-Isolierung	43
4.4.2	Pyrosequencing	43
4.5	Zellbiologische Funktionsassays	45
4.5.1	MTT-Assay	45
4.5.2	BrdU-Assay	45
4.6	Bioinformatische und statistische Methoden	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Die Tumorsuppressorgene <i>HHIP</i> und <i>IGFBP3</i> sind in Zelllinien von Lebertumoren stillgelegt	47
5.2	<i>LSH</i> ist in Hepatoblastomen überexprimiert	48
5.3	Knockdownetablierung	51
5.4	Auswahl der besten siRNA	52
5.5	<i>LSH</i> -Knockdown	53
5.6	Reaktivierung der Tumorsuppressoren <i>HHIP</i> und <i>IGFBP3</i>	55
5.7	Einfluss von <i>LSH</i> auf weitere Zielgene	55
5.7.1	<i>DLK1</i> und <i>IGF2</i>	56

5.7.2	<i>NOTCH3</i> und <i>FOXA1</i>	57
5.7.3	<i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1C</i> und <i>CDKN2A</i>	58
5.8	Analyse der globalen und lokalen DNA-Methylierung	60
5.8.1	<i>LINE-1</i>	61
5.8.2	<i>HHIP</i>	62
5.8.3	<i>IGFBP3</i>	64
5.8.4	<i>DLK1</i>	65
5.8.5	IGF2/H19	66
5.8.6	<i>CDKN2A</i>	67
5.8.7	Methylierungsanalyse nach Langzeitknockdown	69
5.9	<i>LSH</i> -Knockdown hemmt die Proliferation	70
5.10	Regulation von <i>LSH</i> – Eine <i>in silico</i> Analyse	72
5.10.1	Der Transkriptionsfaktor <i>FOXM1</i>	72
5.10.2	Der Transkriptionsfaktor <i>GLI1</i>	74
5.10.3	Der Transkriptionsfaktor <i>LEF1</i>	75
5.10.4	Der Transkriptionsfaktor <i>p63</i>	75
5.10.5	Zusammenfassung	76
6	Diskussion	77
6.1	Spielt <i>LSH</i> eine relevante Rolle in Hepatoblastomen?	77
6.2	Wie wird die Expression von <i>LSH</i> reguliert?	78
6.3	<i>LSH</i> beeinflusst die Proliferationsfähigkeit	80
6.4	Einfluss von <i>LSH</i> auf verschiedene Zielgene	81
6.5	Einfluss von <i>LSH</i> auf etablierte DNA-Methylierung	83
6.6	Modellvorschlag für <i>LSH</i> in Hepatoblastomen	84
6.7	Weiterführende Forschungsansätze und Ausblick	86
	Zusammenfassung	88
	Abbildungsverzeichnis	89
	Tabellenverzeichnis	91
	Literaturverzeichnis	92
	Danksagung	109
	Eidesstattliche Versicherung	110

Abkürzungen

AFP	α -Fetoprotein
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked
BRCA	Breast Cancer
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKN	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
cDNA	complementary (komplementär) Desoxyribonukleinsäure
CTCF	CCCTC-Binding Factor
DAPK	Death-Associated Protein Kinase
Ddm	Decrease in DNA-Methylation
DLK	Delta Like homolog
DMR	Differentially Methylated Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMP	Epithelial Membrane Protein
EXT	Exostosin
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FOX	Forkhead box
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSTP	Glutathion S-Transferase π
HB	Hepatoblastom
HDAC	Histondeacetylase
HHIP	Hedgehog Interacting Protein
hMLH	MutL Homolog
ID	Inhibitor of DNA binding
IGF	Insulin-like Growth Factor

IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
ISWI	Imitation SWItch
KI	Konfidenzintervall
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LOI	Loss Of Imprinting
LSH	Lymphoid Specific Helicase
MEF	Murine Embryonal Fibroblast
mRNA	Messenger RNA
miRNA	Micro RNA
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
NIH	National Institutes of Health
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFH	Pure Fetal Histology
PGK	Phosphoglycerat Kinase
POL	Polymerase
PRETEXT	Preoperative Extent of Disease
RARB	Retinoic Acid Receptor β
RASSF	Ras Association domain Family
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SEER	Suveillance Epidemiology and End Results
SEM	Standard Error of the Mean
SFRP	Secreted Frizzled-Related Protein
SIOPEL	Strategy Group of the International Society of Paediatric Oncology
siRNA	Small Interfering RNA
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
SNF	Sucrose Non Fermentable
SWI	SWItch
TBP	TATA-Box Binding Protein
TF	Transkriptionsfaktor
THBS	Thrombospondin
VHL	Von Hippel Lindau
Wnt	Wingless Type
WRN	Werner Syndrom

1 Einleitung

1.1 Das Hepatoblastom

1.1.1 Epidemiologie

Neoplasien der Leber machen etwa 1,1 % aller malignen Erkrankungen des Kindesalters aus und sind somit äußerst selten. Mit einem Anteil von über zwei Dritteln stellt das Hepatoblastom den häufigsten Lebertumor bei Kindern unter 15 Jahren dar. Die Krebs-statistik *Surveillance Epidemiology and End Results (SEER)* der amerikanischen Gesundheitsbehörde (NIH) beziffert die Inzidenz von Hepatoblastomen während der letzten 21 Jahre mit 1,4 bis 1,6 pro Millionen Kinder unter 15 Jahren, wobei der Erkrankungsgipfel zwischen dem ersten und dritten Lebensjahr liegt [97]. Das Register beobachtete einen leichten Anstieg der Inzidenz in den Jahren 1975–1995, was wahrscheinlich auf die immer größer werdende Zahl von lebensfähigen Frühgeborenen zurückzuführen ist (s. **Kapitel 1.1.2**). Jungen sind mit einem Verhältnis von 2,3:1 etwas häufiger betroffen als Mädchen [68]. Zur Prognose des Hepatoblastoms siehe **Kapitel 1.1.4**.

1.1.2 Risikofaktoren

Vererbare Syndrome

Bis auf wenige vereinzelte Fallberichte [46, 116, 153, 135] scheint für Hepatoblastome keine familiäre Prädisposition vorzuliegen. Dennoch gehen einige vererbare Syndrome mit einer deutlich erhöhten Inzidenz für Hepatoblastome einher.

Eine inaktivierende Mutation des *APC*-Gens führt zur *Familiären Adenomatösen Polyposis Coli (FAP)*. Patienten mit solch einer Mutation entwickeln schon in jungen Lebensjahren hunderte Kolonpolypen, welche obligat in Karzinome transformieren. Bei Kindern mit nachgewiesener FAP liegt die Inzidenz für Hepatoblastome 750–847 mal höher als in der SEER Population [77, 55].

Kinder mit dem *Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS)* haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Hepatoblastomen. Durch einen Imprintingdefekt des *IGF2-H19* Locus kommt es zu einem Krankheitsbild, welches durch Gigantismus, Makroglossie, neonatale Hypoglykämien und mentale Retardierung gekennzeichnet ist. Das Risiko für Kinder

mit BWS an einem Hepatoblastom zu erkranken ist 2,28 mal höher als in der Vergleichspopulation gleichen Alters [28].

Zahlreiche andere Syndrome werden mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Hepatoblastoms in Verbindung gebracht. So zum Beispiel die *Trisomie 18 (Edwards Syndrom)*, das *Simpson-Golabi-Behmel Syndrom*, das *Prader-Willi Syndrom*, die *Neurofibromatose Typ I*, das *Faconi Syndrom* oder eine Mutation des *FGFR3*-Gens.

Da sowohl diese Syndrome als auch das Hepatoblastom sehr seltene Erkrankungen darstellen, liegen zu wenige Fallberichte vor, um eine fundierte Aussage über einen ätiologischen Zusammenhang tätigen zu können [148].

Weitere Risikofaktoren

Neben den vererbaren Syndromen gehen eine Reihe weiterer Faktoren mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Hepatoblastoms einher.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein sehr niedriges Geburtsgewicht (<1500 g) mit einer signifikanten Risikoerhöhung verbunden ist. In **Tabelle 1.1** sind diesbezüglich einige Studienergebnisse zusammengestellt:

Tabelle 1.1: Studien zur Erhöhung des Hepatoblastomrisikos bei einem Geburtsgewicht <1500 g

N Fälle	Odds ratio (95 % KI)	Referenz
543	15,6 (7,6-31,1)	[158]
273	17,18 (7,46-39,54)	[149]
155	9,5 (2,3-38,2)	[26]
18	69,0 (12,0-397,2)	[4]

Neben dem geringen Geburtsgewicht beobachteten einige Studien einen Zusammenhang von elterlichem Zigarettenrauchen mit der Entstehung von Hepatoblastomen [148]. Rauchen der Eltern während der Schwangerschaft war dabei mit einer erhöhten Odds ratio von 2,1–4,7 für Hepatoblastome assoziiert.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Zytogenetische Aberrationen

Bei der Untersuchung von Hepatoblastomen fielen immer wieder chromosomale Aberrationen auf. Durch Fehlen, übermäßiges Vorhandensein oder strukturelle Defekte von Chromosomen kommt es zu Fehlern bei der DNA-Replikation und der Mitose. Für zahlreiche Tumorerkrankungen sind diese zytogenetischen Aberrationen als tumorgen beschrieben.

Eine numerische Chromosomenaberration, welche sich in vielen Hepatoblastomen findet, ist die Trisomie der Chromosomen 2 und 20 [146, 167, 190, 3]. Auch das Chromosom 18 ist in Hepatoblastomen häufig von numerischen Aberrationen betroffen. So finden sich sowohl trisome (Edwards Syndrom - s. **Kapitel 1.1.2**), als auch monosome Zustände [166].

Neben den numerischen Chromosomenaberrationen finden sich auch einige strukturelle Chromosomendefekte, welche immer wieder in Hepatoblastomen beschrieben werden. So wurde beobachtet, dass die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 mit den oben beschriebenen Trisomien der Chromosomen 2 und 20 einhergeht [167].

Eine große Studie an 111 Hepatoblastomen identifizierte einige weitere häufige strukturelle Mutationen. Zum Beispiel durch unbalancierte Translokationen zustande gekommene Trisomien von 1q (18 % aller Fälle). Bei diesen Translokationen liegt ein Bruch in 1q12–21 vor. Mit der Translokation $t(1;4)$ wurde eine zweite wiederkehrende strukturelle Chromosomenaberration in Hepatoblastomen identifiziert [165].

Somatische Mutationen einzelner Gene

Anders als in adulten Neoplasien finden sich in Hepatoblastomen kaum somatische Mutationen von klassischen Onko- oder Tumorsuppressorgenen. Dies geht wahrscheinlich einher mit dem frühen Erkrankungsalter (Erkrankungsgipfel mit 3 Jahren). Diese Zeit ist mit dem klassischen Modell der mehrschrittigen Tumorgenese [66], welche sich über Jahrzehnte erstreckt, nicht vereinbar und impliziert andere Mechanismen der Tumorentstehung.

Die Mutation des β -*Catenin*-Gens und konsekutive Überaktivierung des *Wnt-Signalweges* ist die einzige klassische Mutation im Hepatoblastom, welche regelmäßig zu finden ist [172, 128]. Dabei zeigen 48 % der sporadischen Hepatoblastome eine Mutation im β -*Catenin*-Gen. Damit hat das Hepatoblastom eine der höchsten Mutationsfrequenzen für dieses Gen im Vergleich zu allen anderen Neoplasien [96].

Epigenetische Aberrationen in Hepatoblastomen

Da somatische Mutationen mit Ausnahme des β -*Catenin*-Gens äußerst seltene Ereignisse in Hepatoblastomen sind, mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass epigenetische Defekte für die Entstehung und Progression dieser Tumore verantwortlich sein könnten. Vor allem die aberrante DNA-Methylierung (s. **Kapitel 1.3**) steht im Fokus der Hepatoblastomforschung.

Überexpression geprägter Gene

Unter Prägung oder Imprinting versteht man die transkriptionelle Stilllegung eines Allels durch DNA-Methylierung und somit resultierende uniparentale Expression. In Hepatoblastomen sind einige dieser geprägten Gene durch ein Loss of Imprinting (LOI) überexprimiert.

Das *IGF2*-Gen ist dabei das am häufigsten hochregulierte Gen in Hepatoblastomen [61,

69, 74]. IGF2 vermittelt durch Aktivierung seines Rezeptors Wachstums- und Proliferationsprozesse.

Ein weiteres geprägtes Gen, welches häufig von LOI in Hepatoblastomen betroffen ist, ist *DLK1* [106]. *DLK1* ist ein Marker hepatischer Vorläuferzellen und auch als Tumormarker für Hepatoblastome Gegenstand aktueller Forschung [30, 39].

Epigenetische Stilllegung von Tumorsuppressorgenen

Ein weiterer epigenetischer Mechanismus, welcher in Hepatoblastomen eine wichtige Rolle zu spielen scheint, ist die transkriptionelle Stilllegung von Tumorsuppressorgenen. Durch Hypermethylierung ihrer Promotoren wird die Transkription dieser Gene verhindert und somit ihr tumorsuppressiver Einfluss aufgehoben.

So konnte gezeigt werden, dass die Tumorsuppressorgene *HHIP* [34], ein negativer Regulator des *Hedgehog-Signalweges*, *IGFBP3* [132], ein Suppressor des *IGF2-Weges* und *SFRP1* [144], ein Inhibitor der *Wnt-Signalkaskade*, durch Promotor-Hypermethylierung in Hepatoblastomen ausgeschaltet sind.

1.1.4 Klinische Aspekte

Klinisches Erscheinungsbild

Typischerweise präsentiert sich ein Hepatoblastom als indolente, abdominelle Raumforderung. Bei fortschreitender Erkrankung sind Gewichtsverlust, Inappetenz, Übelkeit und Erbrechen sowie Bauchschmerzen typische Symptome [123].

20 % aller Fälle weisen bei Diagnosestellung bereits hämatogene Metastasen in der Lunge, dem Hauptmetastasierungsort des Hepatoblastoms, auf [122]. Neben der Lunge finden sich gelegentlich auch Metastasen im zentralen Nervensystem sowie im Auge [9, 37].

Neben der Anämie und Thrombozytose, als unspezifische Laborbefunde bei Tumorerkrankungen, hat beim Hepatoblastom das α -*Fetoprotein* (*AFP*) eine zentrale Rolle als sensitiver Aktivitätsmarker. Über 90 % der Patienten weisen erhöhte AFP-Spiegel auf. Dennoch ist AFP nicht als diagnostischer Parameter, sondern als Aktivitätsmarker zu sehen. Sehr hohe und sehr niedrige AFP-Spiegel gehen mit einer schlechten Prognose einher [113].

Histologische Klassifikation

Hepatoblastome entstehen aus hepatischen Vorläuferzellen und können verschiedene histologische Morphologien zeigen:

- kleine undifferenzierte Zellen
- embryonale Zellen mit epitheloider Differenzierung
- voll differenzierte fetale Hepatozyten

Mischformen sind sehr häufig. Außerdem enthalten epithelial differenzierte Hepatoblastome häufig auch mesenchymale Anteile, wie Knochen, Knorpel oder glatte Muskulatur [175]. Die histologische Klassifizierung spielt klinisch insofern eine Rolle, da Hepatoblastome mit einer rein fetalen Differenzierung (PFH) eine bessere Prognose als andere histologische Typen haben [64].

Klinische Klassifikationen

Die am weitesten verbreitete klinische Klassifikation der Hepatoblastome ist die *Preoperative Extent of Disease (PRETEXT)*-Klassifikation der *Childhood Liver Tumour Strategy Group of the International Society of Paediatric Oncology (SIOPEL)* [136].

Sie teilt die Leber in 4 Sektionen ein und je nachdem, wie viele Sektionen zum Diagnosezeitpunkt von Tumor befallen sind, ergeben sich die *PRETEXT*-Stadien I–IV. **Abbildung 1.1** zeigt die Stadieneinteilung in Abhängigkeit der befallenen Sektionen.

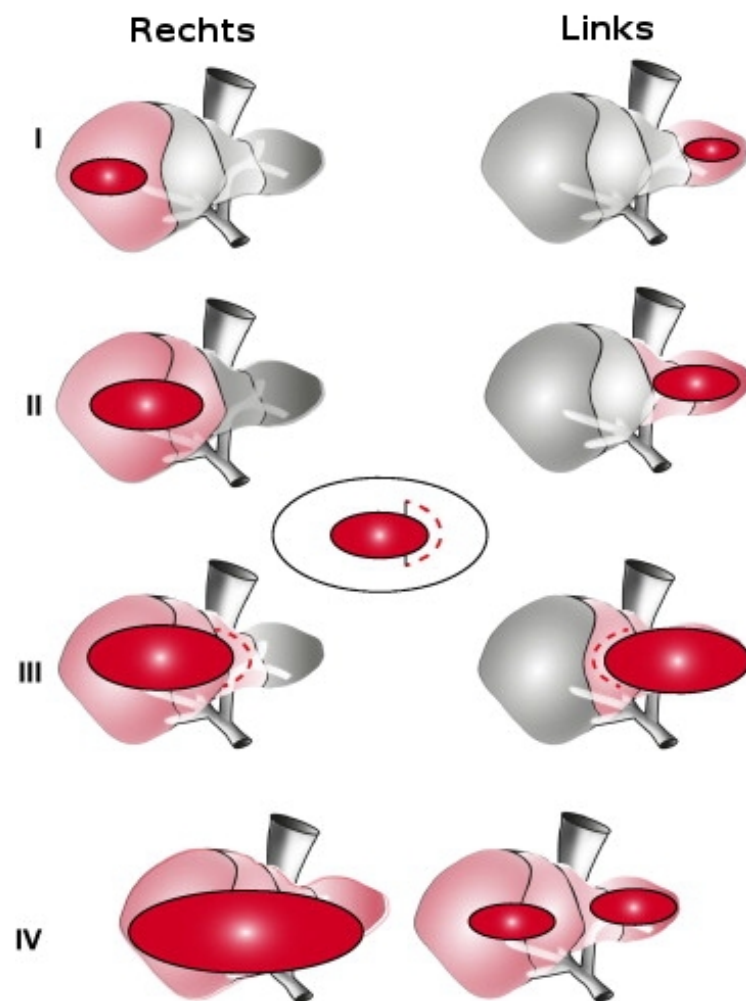


Abbildung 1.1: PRETEXT-Klassifikation. Modifiziert nach [138]

Erweitert wird diese Stadieneinteilung, welche vor allem für die chirurgische Therapie von Bedeutung ist, durch einige zusätzliche Subklassifikationen:

Tabelle 1.2: Subklassifikationen der PRETEXT-Klassifikation. Modifiziert nach [136]

PRETEXT Zusatz	Definition
C	Lobus caudatus betroffen
E	Extrahepatischer abdomineller Befall
F	Fokalität des Tumors
H	Tumorruptur oder intraperitoneale Hämorrhagie
M	Fernmetastasen
N	Lymphknotenmetastasen
P	Beteiligung der Portalvene
V	Beteiligung der Vena cava inferior und/oder der Lebervenen

Neben der PRETEXT-Klassifikation existieren noch eine TNM-Einteilung und postoperative Klassifikationen, welche im klinischen Alltag jedoch bei Weitem nicht den Stellenwert haben wie die SIOPEL-Einteilung.

Prognose

Die Prognose der Hepatoblastome ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. Signifikant prognoseverschlechternde Risikofaktoren sind PRETEXT-Stadium IV, AFP-Werte unter 100 ng/ml oder über $1,2 \times 10^6$ ng/ml, Metastasen und ein Erkrankungsalter über 5 Jahren. Die SIOPEL stratifiziert daher die Patienten aktuell in 3 Risikogruppen (s. **Abbildung 1.2**) [107].

Risikogruppen	Prognostische Faktoren							
	PRETEXT I, II, III	PRETEXT IV	Alter > 5 J	AFP > $1,2 \times 10^6$	multi-fokal	M+	AFP < 100	KUZ
1: gut	+	-	-	-	-	-	-	-
2: intermediär	+/-	mindestens eins				-	-	-
3: schlecht	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	mindestens eins		

Abbildung 1.2: SIOPEL-Risikostratifizierung. Modifiziert nach [107]

Das Ereignisfreie- (EFÜ) sowie das Gesamtüberleben (GÜ) der drei Risikogruppen nach drei Jahren ist in **Tabelle 1.3** dargestellt:

Tabelle 1.3: Prognose nach SIOPEL-Stratifizierung [107]

Risikogruppe	3-Jahres EFÜ [%]	3-Jahres GÜ [%]
1	90	94
2	71	80
3	49	54

1.1.5 Therapie

Die einzige kurative Therapie des Hepatoblastoms stellt die operative Tumorresektion dar. Da aber die meisten Hepatoblastome hoch sensibel auf Chemotherapie ansprechen, beinhalten die heutigen Therapieregime neben der Chirurgie auch adjuvante und neoadjuvante Chemotherapiekonzepte.

In Ländern, die in der SIOPEL vertreten sind, und die eine Biopsienahme vor eine Chemotherapie stellen, richtet sich die Wahl der Therapie nach dem Stadium der Erkrankung.

Rein fetale Histologie

Tumore mit einer rein fetalen Histologie (PFH), welche chirurgisch R0 reseziert werden können, benötigen keine weitere Chemotherapie, sondern allenfalls eine engmaschige Rezidivkontrolle [108].

PRETEXT-Stadium I und II

Zeigt die Tumorphistologie kleine undifferenzierte Zellen und entspricht damit nicht einer PFH, ist das Rezidivrisiko auch nach R0-Resektion deutlich erhöht und eine neoadjuvante Chemotherapie indiziert [63]. Dabei kommt typischerweise ein Cisplatin enthaltendes Kombinationsschema (entweder Cisplatin mit Vincristin und Flououralcil oder Cisplatin in Kombination mit Doxorubicin) zum Einsatz [31, 127]. Mit dieser Therapie liegt das 5-Jahres Gesamtüberleben der Patienten mit *PRETEXT*-Stadium I und II über 90 %. Ein Vergleich der beiden Chemotherapieregime ergab keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf das Überleben. Jedoch waren die toxischen Nebenwirkungen in der Gruppe mit Cisplatin, Vincristin und Flououralcil etwas geringer [119].

PRETEXT-Stadium III

Primär unresezierbare Hepatoblastome des Stadiums III werden durch eine neoadjuvante Chemotherapie behandelt. Dabei kommen die gleichen Kombinationen wie bei der Behandlung der Stadien I und II zum Einsatz. Dadurch kann in 75 % der Fälle eine operable Tumorgröße erzielt werden [134].

In den Fällen, in denen der Tumor nicht auf eine resezierbare Größe gebracht werden kann, sollte eine orthotrope Lebertransplantation in Erwägung gezogen werden [22, 17].

PRETEXT-Stadium IV und metastasierte Hepatoblastome

Bei metastasierten Erkrankungen oder *PRETEXT*-Stadium IV wird durch vier initiale Zyklen Chemotherapie (entweder Cisplatin mit Vincristin und Flououracil oder Cisplatin in Kombination mit Doxorubicin) versucht ein operables Stadium herbeizuführen. Gelingt dies, werden nach Tumorresektion nochmals zwei postoperative Chemotherapiezyklen durchgeführt. Sollten zum Zeitpunkt der operativen Tumorentfernung Lungenfiliae vorliegen, sollten diese, wenn möglich, ebenfalls reseziert werden.[122].

Eine orthotrope Lebertransplantation sollte nur bei metastasenfreien Stadien durchgeführt werden [22].

Patienten, bei denen durch die neoadjuvante Chemotherapie keine resektable Regression von extrahepatischen Herden erreicht werden kann, können mit alternativen Therapien behandelt werden. Einige Studien erzielten vielversprechende Ergebnisse mit dem Chemotherapeutikum Irinotecan bei der Behandlung von Hochrisiko-Hepatoblastomen [89, 120, 129]. Ein weitere Secondline-Therapie stellt die Chemoembolisation durch Injektionen in hepatische Arterien dar [150].

1.1.6 Therapiebesonderheiten in Deutschland

In Deutschland wird nach wie vor das Protokoll *HB99* der *Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)* verwendet. Dieses sieht fast in jedem Fall eine neoadjuvante Chemotherapie mit anschließender Tumorresektion vor. Die Heilungsraten liegen bei vergleichbaren Werten, wie beim SIOPEL-Prozedere, allerdings zeigte sich kein Überlebensvorteil. Eine Angleichung der Protokolle in den nächsten Jahren wird angestrebt [65].

1.2 DNA-Methylierung

Lange Zeit war das koordinierte Zusammenspiel von verschiedenen Transkriptionsfaktoren die einzige Erklärung für zellspezifische Proteinexpression und Differenzierung. In Zellen mit identischem genetischem Material entscheidet die Ausstattung an Transkriptionsfaktoren welche Differenzierung die Zellen erfahren [21]. Durch Transfer eines Zellkerns einer somatischen Zelle in kernlose Zellen eines anderen Zelltyps, findet eine Reprogrammierung des übertragenen Zellkerns statt [62]. Dennoch lassen sich durch Änderung der Transkriptionsfaktoren solche Reprogrammierungen nur begrenzt durchführen, denn epigenetische Modifikationen, welche bei der Zellteilung an die Tochterzellen vererbt werden können, regulieren ebenfalls die konstitutionelle Proteinexpression.

Epigenetik kann man als vererbare Veränderung der Funktion von Genen und Chromatin, ohne dabei die kodierende DNA-Sequenz selbst zu ändern, definieren [182]. Neben den Histonmodifikationen ist die Methylierung der DNA die wichtigste epigenetische Modifikation [43].

Unter DNA-Methylierung versteht man die kovalente Addition einer Methylgruppe an das 5'-Kohlenstoffatom von Cytosinbasen. Die Methylgruppe wird vom universellen Methylgruppendonor *S-Adenosyl-L-Methionin* (SAM) enzymatisch durch *DNA-Methyltransferasen* (DNMTs) übertragen (**Abbildung 1.3**) [79].

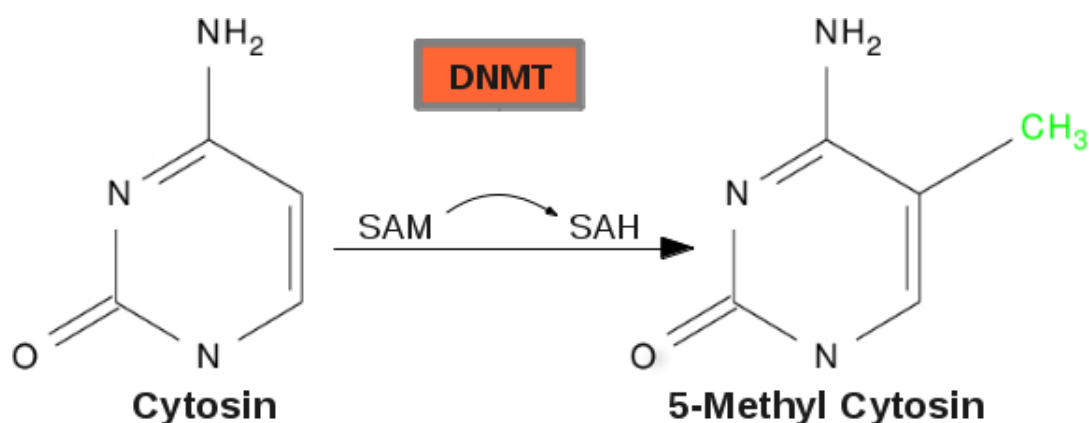


Abbildung 1.3: Mechanismus der DNA-Methylierung

DNA-Methylierungen kommen beim Menschen praktisch ausschließlich an Cytosinen, welche von einer Guaninbase gefolgt sind (CpG), vor. Kürzlich wurde aber auch von methylierten Cytosinen außerhalb von CpG-Dinukleotiden berichtet. Deren Funktion ist aber bis heute unklar [102]. Der durchschnittliche genomweite Methylierungsgrad aller CpGs liegt beim Menschen bei 70 %–80 % [32]. Die Verteilung der CpG-Dinukleotide innerhalb des Genoms ist dabei allerdings sehr heterogen. Während CpGs über das gesamte Genom gesehen statistisch unterrepräsentiert sind, akkumulieren sie in sogenannten CpG-Inseln. Diese sind etwa 1 kb große DNA-Abschnitte mit einer extrem hohen Dichte an CpGs. Solche Inseln, etwa 29 000 im gesamten Genom, befinden sich vornehmlich in der 5'-Promotorregion kodierender Gene. Dies impliziert, dass DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Expression zahlreicher Gene spielt [12, 86].

1.2.1 DNA-Methyltransferasen

Die kovalente Addition einer Methylgruppe an das 5'-Kohlenstoffatom von Cytosinen wird enzymatisch vermittelt von DNMTs. In Säugetieren existieren verschiedene DNMT-Isoformen mit unterschiedlichen Aufgaben:

DNMT1 methyliert vorzugsweise hemimethylierte DNA und spielt dabei eine essentielle Rolle bei der Replikation. DNMT1 überträgt die auf dem Mutterstrang etablierten Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Tochterstrang. Man spricht deshalb auch von Maintenance-Methylierung [58]. Neue experimentelle Daten deuten allerdings darauf hin, dass DNMT1 für die Erhaltungsmethylierung die Hilfe der DNMT3-Familie benötigt [87].

Die DNMT3-Familie besteht bei Säugetieren aus zwei Enzymen mit Methyltransferaseaktivität (DNMT3A und DNMT3B) sowie DNMT3L, welcher nur regulatorische Aufgaben zufallen. DNMT3A/B methylieren bevorzugt unmethylierte DNA und sind somit für die *de novo* Methylierung zuständig. DNMT3L wird ausschließlich in Keimzellen exprimiert und koordiniert dort die Etablierung spezifischer Methylierungsmuster, wie zum Beispiel maternales Imprinting [58].

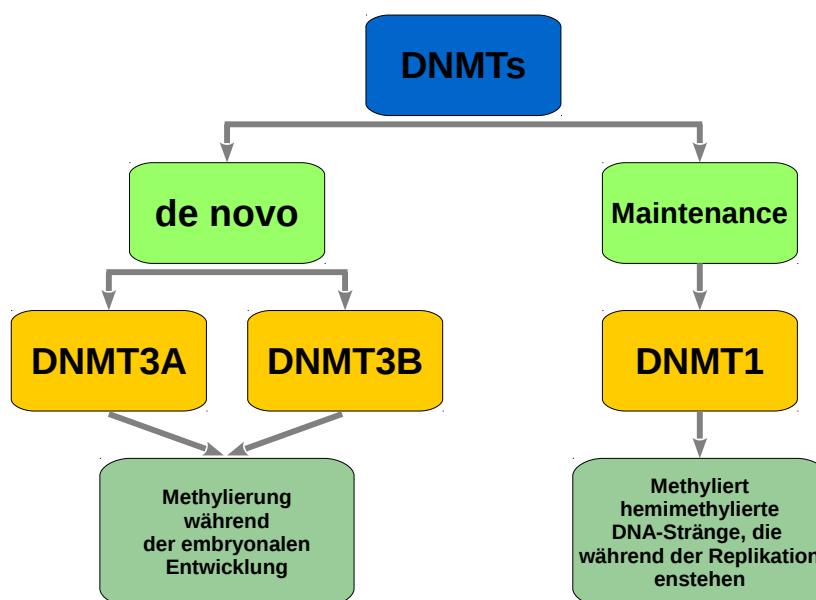


Abbildung 1.4: Einteilung und Aufgaben der DNMT-Isoformen. Modifiziert nach [130]

1.2.2 Funktion der DNA-Methylierung

DNA-Methylierung ist ein essentieller Prozess während der Embryonalentwicklung. Embryonale Stammzellen sind die einzigen Zellen, welche ohne DNA-Methylierung überleben und proliferieren können [169]. Für alle somatischen Zellen dagegen und auch für Krebszellen ist die Aktivität der DNMTs essentiell [81, 20].

Eine Hauptaufgabe von DNA-Methylierung stellt die Regulation der Transkription spezifischer Gene dar. Etwa 56 % aller Gene im menschlichen Genom enthalten in ihren Promotoren CpG-Inseln [5]. Sind diese CpGs stark methyliert, führt dies zum Transkriptionsstopp des betroffenen Gens.

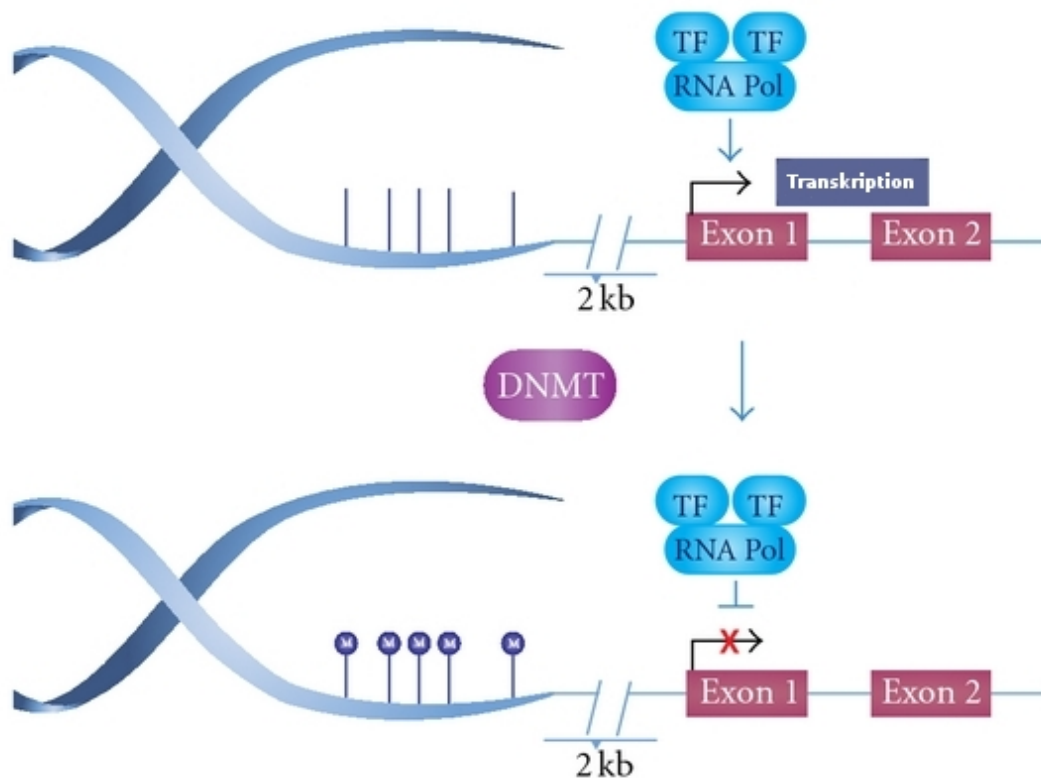


Abbildung 1.5: Transkriptionsregulation durch Promotormethylierung. TF = Transkriptionsfaktor, RNA-Pol = RNA-Polymerase. Modifiziert nach [130]

Dabei dient DNA-Methylierung als epigenetische Transkriptionsregulation eher der Stabilisierung einer Region, die auf lange Zeit reprimiert sein soll (X-Chromosom Inaktivierung, Imprinting, Unterdrückung von Retroposons), als dass sie eine flexible Funktion wie die Histonmodifikationen darstellt [86]. *Ooi et al.* zeigen in diesem Zusammenhang, dass *de novo* Methylierung nur an Loci stattfindet, an denen Nukleosome positioniert sind, deren Histone reprimierende Modifikationen tragen [118].

Imprinting

Alle Chromosome des Menschen sind in jeder Zelle paarig vorhanden. Eines stammt von der Mutter, das andere vom Vater. Somit existieren auch für alle Gene jeweils zwei Allele, die in den meisten Fällen gleichzeitig, dem Differenzierungsmuster einer Zelle entsprechend, exprimiert werden. Einige wenige Gene weisen jedoch unterschiedliche DNA-Methylierungsmuster auf, sodass die Expression eines Allels, das maternale oder paternale, unterdrückt wird und es somit zur monoallelischen Expression kommt. Diesen Vorgang nennt man Imprinting oder Prägung [125, 75].

Im menschlichen Genom gibt es etwa 100 geprägte Gene [8]. Diese liegen innerhalb eines Chromosoms oft gemeinsam in sogenannten Clustern mit einer zugehörigen CpG-Insel, welche als *Differentially Methylated Region (DMR)* bezeichnet wird [100]. Die für das Imprinting verantwortlichen Methylierungsmuster werden während der Oogenese bzw. Spermato-

genese etabliert und differieren deshalb zwischen maternalen und paternalen Allelen [75]. Viele der geprägten Gene spielen eine entscheidende Rolle bei der Embryonal- und Fetalentwicklung, sodass fehlerhaftes Imprinting zu schwerwiegenden Erkrankungen führt. Dabei können verschiedenste Mechanismen zugrunde liegen. So kann das exprimierte Allel mutiert sein und, obwohl es noch ein intaktes Allel gibt, kann die Mutation nicht kompensiert werden, da das intakte Allel durch DNA-Methylierung stillgelegt ist. Oder es kommt zum Verlust der DNA-Methylierung, einem sogenannten *Loss of Imprinting (LOI)*, und damit zur biallelischen Überexpression [8]. Durch Imprintingdefekte hervorgerufene Erkrankungen sind zum Beispiel das Beckwith-Wiedemann Syndrom, das Angelman Syndrom, das Silver-Russel Syndrom sowie das Prader-Willi Syndrom [8, 75, 7].

1.2.3 DNA-Methylierung und Krankheit

Korrekte Etablierung und Erhaltung von DNA-Methylierungsmustern ist unabdingbar für normale Embryonalentwicklung. Direkt nach der Befruchtung der Eizelle ereignen sich dramatische Änderungen im Methylierungsgrad. In den ersten 1–3 Stunden werden fast alle Methylierungsmuster auf der vom Vater stammenden DNA gelöscht, um dann in den Stunden 3–6 wieder neu etabliert zu werden. Auf der mütterlichen DNA hingegen kommt es durch *de novo* Methylierung, erst zu einer starken Zunahme an methylierten CpGs, anschließend werden auch diese Muster wieder entfernt. In einer zweiten Methylierungswelle wird nun auf beiden elterlichen Strängen ein einheitlicher Methylierungsgrad etabliert (**Abbildung 1.6**) [52].

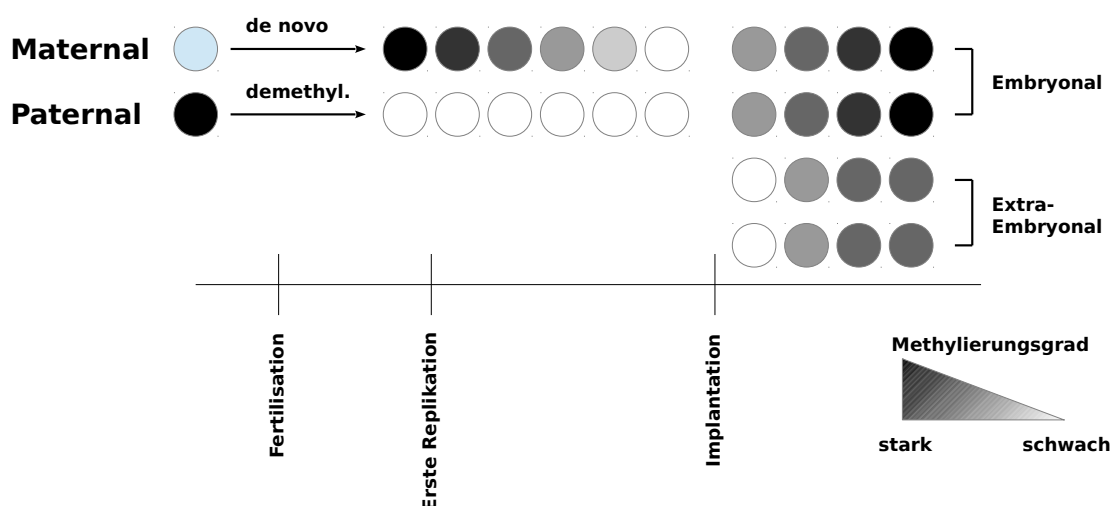


Abbildung 1.6: Methylierungs- und Demethylierungswellen in der Embryogenese. Modifiziert nach [52]

Diese hochkomplex choreographierten Ereignisse in der frühesten Entwicklungsphase legen nahe, dass Fehler im Methylierungsmuster oder in den zuständigen Proteinen zu schweren Krankheitsbildern führen können.

ICF Syndrom

Das ICF Syndrom ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, welche durch einen Funktionsverlust der DNMT3B entsteht [67]. Kinder mit dieser Erkrankung fallen durch mentale Retardierung, Immundefizienz, Centromerinstabilität und faziale Abnormalien (ICF) auf. Durch die Immunsuppression entstehen häufig starke Infektionen, welche meistens schon vor dem Erwachsenenalter zum Tode führen [33].

Rett Syndrom

Das Protein MECP2 bindet an methylierte DNA und vermittelt dadurch eine Reprimierung der Transkription. Mutationen in diesem Gen führen zum Rett Syndrom. Die Erkrankung wird X-chromosomal dominant vererbt und manifestiert sich vor dem zweiten Lebensjahr. Daher ist das RETT Syndrom bei Jungen wahrscheinlich pränatal letal und es sind ausschließlich Mädchen betroffen. Kinder mit Rett Syndrom zeigen typischerweise einen Verlust von schon gelernten Fähigkeiten, wie Sprache und Motorik [18, 145].

Mutationen im *ATRX*-Gen

Veränderungen der DNA-Methylierung an repetitiven Elementen, ribosomaler DNA und Y-Satelliten finden sich bei Mutationen von *ATRX*, einem SWI/SNF-Chromatinremodeler [56]. Patienten mit dieser Mutation präsentieren sich mit mentaler Retardierung, Dysmorphien des Gesichts, urogenitalen Abnormalien und α -Thalassämie [57, 56].

DNA-Methylierung und Krebserkrankungen

Aberrante DNA-Methylierung war die erste epigenetische Modifikation, welche mit der Entstehung von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wurde. Grundsätzlich unterscheidet man drei Veränderungsformen von Methylierungsmustern: Die Hypermethylierung, die Hypomethylierung und das Loss of Imprinting (LOI) [142].

Viele Tumore zeigen im Vergleich zu normalem Gewebe eine deutliche Reduzierung des globalen Methylierungsgrads. Diese Abnahme der DNA-Methylierung wird umso stärker, je weiter eine Krebszelle dedifferenziert. Diese Hypomethylierung verursacht chromosomale Instabilität und führt zu Fehlern bei der Replikation. Dadurch akkumulieren weitere mutagene Veränderungen. Der Verlust von methylierten CpGs kann auch zur biallelischen Expression (LOI) geprägter Gene, wie zum Beispiel des *IGF2*-Gens, führen [38].

Im Gegensatz zur Abnahme der globalen Methylierung ist die lokale Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotor von Tumorsuppressorgenen ein häufig beobachtetes Phänomen bei vielen Tumoren. Dabei stabilisiert die DNA-Methylierung die transkriptionelle

Reprimierung dieser Gene [142]. Von Promotor Hypermethylierung sind vor allem zellzyklusregulierende Gene betroffen, wie zum Beispiel das *Retinoblastom (RB)*-Gen [141], das *Von-Hippel-Lindau (VHL)*-Gen [71] oder der Zyklinkinaseinhibitor *p16* [72, 59].

Manel Esteller hat in seiner Übersichtsarbeit zur Epigenetik in Krebserkrankungen die wichtigsten epigenetischen Veränderungen zahlreicher Tumorentitäten zusammengestellt (**Tabelle 1.4**).

Tabelle 1.4: Aberrationen der DNA-Methylierung in verschiedenen Tumorentitäten.
Modifiziert nach [38]

Tumor	Aberrationen im Methylierungsstatus
Kolonkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>hMLH1</i> , <i>p16</i> , <i>p14</i> , <i>RARB2</i> , <i>SFRP1</i> und <i>WRN</i>), globale Hypomethylierung, LOI von <i>IGF2</i>
Mammakarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>BRCA1</i> , <i>E-Cadherin</i> , <i>TMS1</i> und <i>Östrogenrezeptor</i>), globale Hypomethylierung
Bronchialkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>p16</i> , <i>DAPK</i> und <i>RASSF1A</i>), globale Hypomethylierung
Gliome	Promotorhypermethylierung (<i>MGMT</i> , <i>EMP3</i> und <i>THBS1</i>)
Leukämien	Promotorhypermethylierung (<i>p15</i> , <i>EXT1</i> und <i>ID4</i>)
Lymphome	Promotorhypermethylierung (<i>p16</i> , <i>p73</i> und <i>MGMT</i>)
Blasenkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>p16</i> , <i>TPEF/HPPI</i>), globale Hypomethylierung
Nierenkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>VHL</i>) LOI von <i>IGF2</i> , globale Hypomethylierung
Prostatakarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>GSTP1</i>)
Ösophaguskarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>p16</i> , <i>p14</i>)
Magenkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>hMLH1</i> , <i>p14</i>)
Leberkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>SOCS1</i> und <i>GSTP1</i>), globale Hypomethylierung
Ovarialkarzinome	Promotorhypermethylierung (<i>BRCA1</i>)

1.3 Chromatin und Chromatinremodeler

1.3.1 Chromatin

Das menschliche Genom besteht aus etwa $3,2 \times 10^9$ Basenpaaren. Das entspricht DNA-Molekülen von etwa 2 Metern Länge. Diese große Menge muss in jeder Zelle in einen nur wenigen Mikrometer großen Zellkern verpackt werden. Um dies zu leisten, muss die DNA in geordneter Weise organisiert werden [36].

Der Begriff Chromatin bezeichnet dabei die Assoziation von DNA-Molekülen mit Verpackungsproteinen, den Histonen. Jeweils 2 Histone der Typen H2A, H2B, H3 und H4 fügen

sich zu einem Oktamer zusammen, um welches jeweils 147 Basenpaare in 1,65 Umdrehungen gewickelt sind. Diese ersten Organisationseinheiten des Chromatins, die *Nukleosome*, werden durch einen 20–50 Basenpaar langen, freien DNA-Abschnitt, die sogenannte *Linker-DNA*, verbunden. Somit entsteht ein Bild von Perlen auf einer Schnur (**Abbildung 1.7**). Diese Primärstruktur wird aufgrund ihres Durchmessers auch als 10 nm-Faser bezeichnet und ist nur *in vitro* bei niedrigen Salzkonzentrationen zu beobachten [105, 154, 25].

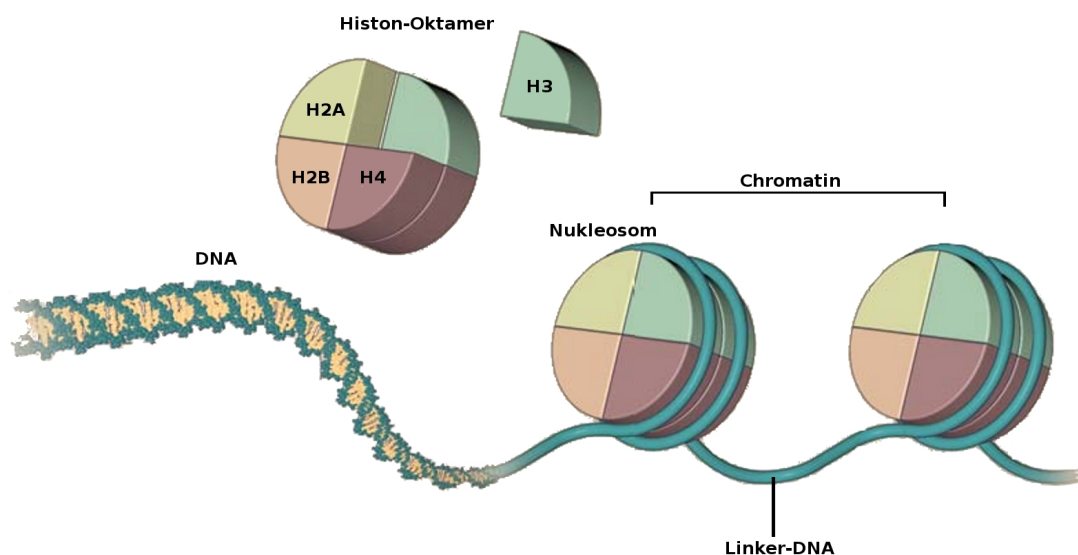


Abbildung 1.7: Aufbau des Chromatins: DNA-Moleküle mit assoziierten Proteinen (Histonen).
Modifiziert nach [25]

Posttranslationale Modifikationen von Histonen sowie multiple Histonvarianten führen zu einer nahezu unendlich großen Kombinationsvielfalt für einzelne Nukleosome. Die Zusammensetzung und Modifizierung der Nukleosome bestimmt ganz entscheidend über die Art der weiteren Konformation des Chromatins [104].

Ein weiterer Histontyp, das sogenannte Linker-Histon (H1 oder H5), assoziiert mit der Linker-DNA und führt dadurch zur Faltung der Chromatin-Primärstruktur. Die dadurch entstehenden Chromatinfasern werden als 30 nm-Fasern bezeichnet. Verschiedene Modelle für das Aussehen dieser Sekundärstruktur wurden postuliert, jedoch stammen die beobachteten Ergebnisse fast ausschließlich aus *in vitro* Experimenten mit kurzen Nukleinsäuren und sind nur bedingt auf *in vivo* Modelle übertragbar [164].

Das Solenoid-Modell beschreibt die 30 nm-Faser als eine Superhelix mit 6 bis 8 Nukleosomen pro Umdrehung (**Abbildung 1.8 A**) [176]. Die zweite postulierte Konformation der 30 nm-Faser ist das sogenannte Zig-Zag-Modell. Hierbei sind die Nukleosome durch starre Linker-DNA verbunden (**Abbildung 1.8 B**) [179, 180]. Welche Konformation das Chromatin annimmt, hängt *in vitro* stark von der Ionenkonzentration ab, bei welcher die Experimente durchgeführt werden [99].

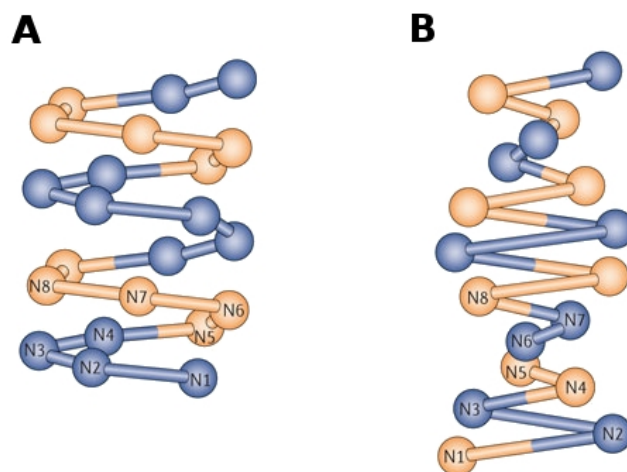


Abbildung 1.8: Das Solenoid (A) - und das Zig-Zag-Modell (B) sind die zwei prominentesten Konformationsmodelle der 30 nm-Chromatinfaser. Modifiziert nach [99]

Durch Zusammenlagerung mehrerer 30 nm-Fasern entstehen komplexe Tertiärstrukturen. Die Etablierung all dieser Strukturen muss ein genau koordinierter Prozess sein, da in der Metaphase des Zellzyklus immer wieder Chromosomen zu exakter Länge und Bandenmuster kondensieren [104]. Nichts desto weniger kommt in den letzten Jahren zunehmend Zweifel an der Existenz der 30 nm-Faser *in vivo* auf und viele Autoren gehen von einem weit weniger geordneten Zustand des Chromatins aus [49].

1.3.2 Chromatinremodeler – Organisatoren des Chromatins

Durch die Organisation des Chromatins in mehr oder weniger komplexe Bereiche entstehen Genomabschnitte, welche für Transkriptionsfaktoren und Polymerasen zugänglich sind (Euchromatin) und Abschnitte, die durch ihre komplexe Struktur nicht von der Transkriptionsmaschinerie erfasst werden können (Heterochromatin).

Da die Bereiche von Eu- bzw. Heterochromatin nicht starr definiert sind, sondern sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden und sich sogar während des Zellzyklus dynamisch verändern, gibt es spezialisierte Proteinkomplexe, welche für die Organisation und Strukturierung des Chromatins verantwortlich sind. Diese Komplexe werden als *Chromatinremodeler* bezeichnet. Chromatinremodelerkomplexe enthalten alle eine ATPase-Untereinheit, mit deren Hilfe durch Hydrolyse von ATP die nötige Energie für die Strukturierungsprozesse gewonnen wird [140]. Klassischer Weise werden vier Arten von Nucleosomremodeling unterschieden (**Abbildung 1.9**) [15]:

- Verschieben einzelner Nucleosome
- Herauslösen ganzer Histonoktamere aus dem Chromatinverband
- Entfernen einzelner Histone aus dem Nucleosom
- Austausch von Histonen durch spezielle Histonvarianten

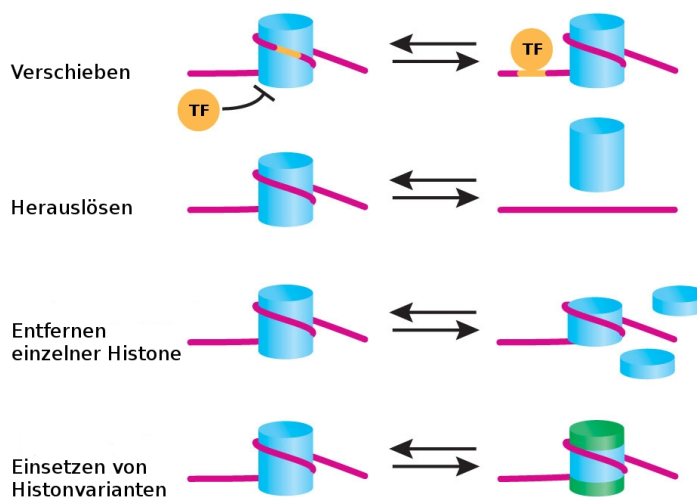


Abbildung 1.9: Die vier klassischen Typen des Chromatinremodelings: Verschieben, Herauslösen, Entfernen einzelner Histone und Einsetzen von Histonvarianten. TF = Transkriptionsfaktor. Modifiziert nach [15]

Alle eukaryoten Organismen besitzen vier Familien von Chromatinremodelerkomplexen, welche durch ihre ATPase-Untereinheit charakterisiert sind: *SWI/SNF*, *ISWI*, *NURD/Mi-2/CHD* und *INO80* [140]. Eine *DExx* und *HELICc* Domäne, getrennt von einer kurzen bzw. langen Insertion, ist in allen ATPasen konserviert. Die einzelnen Familien unterscheiden sich in ihren zusätzlichen Bindungsdomänen.

Die *HSA*-Domäne vermittelt Bindung an Aktinelemente, Histonlysinreste werden durch die *BROMO*-Domäne erkannt und die Domänen *SAINT* und *SLIDE* binden ebenso wie die *CHROMO*-Domäne an Histonstrukturen (**Abbildung 1.10**) [156].

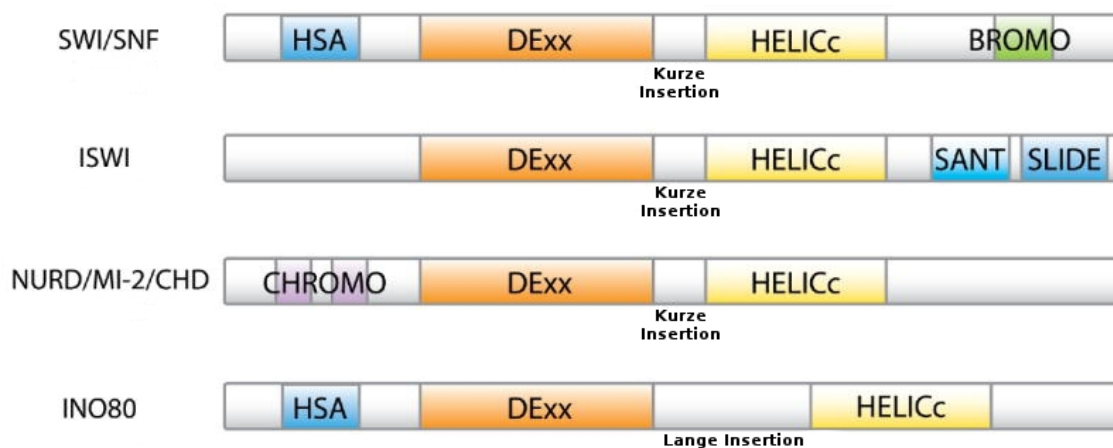


Abbildung 1.10: ATPase-Untereinheiten der eukaryoten Chromatinremodeler. Modifiziert nach [156]

Eine weitere Familie, *RAD54*, wird derzeit als Chromatinremodeler diskutiert, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass *RAD54* Nucleosomstrukturen verändern kann [2, 84].

Mit der jeweiligen ATPase bilden jeweils 4–15 weitere Untereinheiten mit verschiedensten Funktionen multiple Komplexe, die je nach Zusammensetzung unterschiedliche Aufgaben erfüllen [170].

1.4 *LSH* (Lymphoid Specific Helicase)

Auf der Suche nach Genen, welche bei der VDJ-Rekombination der frühen T-Zellen eine Rolle spielen, berichteten *Jarvis et al.* 1996 erstmals von einem neu gefundenen Protein mit konservierten Helikasedomänen. Diese Helikase wird in der Maus fast ausschließlich in fetalem Thymusgewebe exprimiert, weshalb sie den Namen *LSH* (Lymphoid Specific Helicase) erhielt.

LSH ist ein Mitglied der SWI/SNF2-Chromatinremodelerfamilie (s. **Kapitel 1.3.2**) [83]. In der Literatur werden die Bezeichnungen *HELLS* (*Helicase Lymphoid Specific*), *PASG* (*Proliferation-associated SNF2-like protein*) und *SMARCA6* (*SWI/SNF2-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin*) synonym verwendet. In der vorliegenden Arbeit wird der Einheitlichkeit halber der Name *LSH* verwendet.

LSH ist ein nicht redundanter Faktor der embryonalen Entwicklung, da *LSH*^{-/-}-Mäuse wenige Stunden nach ihrer Geburt sterben. Zusätzlich zeigen sie ein vermindertes Geburtsgewicht sowie schwere renale Läsionen. Heterozygote Tiere entwickeln sich völlig normal, zeigen keine Pathologien und sind fertil [53, 131].

1.4.1 Expression, genomische Struktur und chromosomale Lokalisation

LSH zeigt keine Expression in der Leber, der Lunge, dem Gehirn, der Niere, dem Herzen oder in Muskelgewebe. In humanem Gewebe konnte *LSH*-Expression, wie in der Maus, vor allem im Thymus nachgewiesen werden. Aber auch Hodengewebe, in welchem ebenfalls viele Rekombinationsprozesse ablaufen, exprimiert *LSH* [83, 131]. Andere Chromatinremodeler sind normalerweise ubiquitär exprimiert. Die spezifische Expression von *LSH* in nur wenigen Geweben lässt auf sehr spezifische Aufgaben schließen.

In allen bisher untersuchten Vertebraten konnte ein hochkonserviertes *LSH*-Homolog gefunden werden. Das *LSH*-Gen umfasst in der Maus 26.6 kb und der offene Leserahmen umfasst 18 Exons. *LSH* ist beim Menschen auf Chromosom 10 in der Region q23.3–q24.2 lokalisiert [50].

1.4.2 *LSH* hat Einfluss auf Seneszenz und Proliferation

LSH ist vor allem in frühen Lymphozyten exprimiert, wobei periphere T-Zellen kaum *LSH*-Expression zeigen. In aktivierten Lymphozyten allerdings wird die Expression von *LSH* wieder induziert. Auf der anderen Seite verlieren *LSH*^{-/-}-Lymphozyten nach Aktivierung die Fähigkeit zur Proliferation [51].

Auch murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus $LSH^{-/-}$ -Mäuseembryonen sowie Zellen verschiedener Tumorzelllinien nach Knockdown von LSH zeigen deutlich reduzierte Proliferationsraten verglichen mit Wildtypzellen sowie Zeichen von abnormen Mitosen [131, 42, 159]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LSH mit dem Transkriptionsfaktor E2F3, welcher eine wichtige Rolle in der Progression des Zellzyklus spielt, bei der Induktion dessen Zielgene kooperiert [171].

Passend zu der starken Expression von LSH in Keimzellen führt dessen Abwesenheit zu einem Meiosearrest der Spermatogenese sowie zu Meiosefehlern in Oozyten [27, 191].

Mäuse mit einer aktivitätsreduzierenden Mutation von LSH fallen durch Wachstumsverzögerung und frühes Altern auf. Kultivierte Fibroblasten dieser Tiere zeigen einen seneszenten Phänotyp sowie eine vermehrte Expression von seneszenzassoziierten Proteinen, wie p16, p19, p53, p21 und β -Galaktosidase [152, 151]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass LSH durch Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDACs) die Expression von p16 unterdrückt [192].

1.4.3 LSH – ein epigenetischer Regulator

Ddm1, ein weiteres Mitglied der SNF2-Familie in Pflanzen, weist eine starke Homologie zu LSH auf. Depletion von Ddm1 führt zu einem substantiellen Verlust von DNA-Methylierung [85]. Daher lag die Vermutung nahe, dass auch LSH einen Einfluss auf epigenetische Modifikationen haben könnte.

Es zeigte sich, dass genomische DNA von $LSH^{-/-}$ -Mäusen einen genomweiten Verlust von DNA-Methylierung an repetitiven Elementen (Minor Satelliten, Major Satelliten, Line1) auf etwa 20 % aufweist. Dies wird gestützt durch die Beobachtungen, dass LSH vor allem an perizentrischen Heterochromatin lokalisiert ist [185].

Auch einige single copy Gene, wie β -Globin oder *Pgk2* wiesen eine deutliche Hypomethylierung auf [29]. Der Methylierungsgrad geprägter Gene blieb mit Ausnahme von *Cdkn1c* in $LSH^{-/-}$ -Embryonen erhalten [40]. *Zhu et al.* konnten daraufhin zeigen, dass durch Depletion von LSH die *de novo* Methylierung nicht jedoch die Maintenance-Methylierung gestört wird [193]. Durch diesen Einfluss auf die *de novo* Methylierung kontrolliert LSH auch die epigenetische Stilllegung von Stammzellgenen (*Oct4*, *Nanog*) und Entwicklungsgenen (*HOX*) [184, 183, 160, 161].

Neben dem dramatischen Einfluss von LSH auf die DNA-Methylierung konnten auch einige Effekte im Bereich der Histonmodifizierungen gezeigt werden. So kam es in LSH-depletierten MEFs zur Akkumulation von H3-K4 Di- und Trimethylierungen, einem Marker für Euchromatin, wobei H3-K9 Methylierungen unverändert blieben [186]. An repetitiven Elementen führt das Fehlen von LSH in MEFs zur Akkumulation von Histonacetylierungen und dadurch zu vermehrter Transkription retroviraler Sequenzen [76].

Die Tatsache, dass LSH zu einem Verlust der DNA-Methylierung sowie zur Akkumulation von aktivierenden Histonmodifikationen an repetitiven Elementen führt, veranlasst zu der

These, dass LSH essentiell für die Etablierung von Heterochromatin ist [110, 112].

Eine Reihe von epigenetischen Faktoren scheinen einen die Transkription reprimierenden Komplex zu bilden, welcher durch LSH an spezifische Loci rekrutiert wird. So interagiert LSH direkt mit DNMT3A und DNMT3B, jedoch nur indirekt mit DNMT1 [193, 114]. Dies unterstützt die Ergebnisse, dass LSH für die *de novo* Methylierung essentiell ist, für die Maintenance-Methylierung aber nur ein Kofaktor zu sein scheint. Außerdem vermittelt der LSH-Komplex die Bindung von Histondeacetylasen (HDAC1/2) [114, 192]. **Abbildung 1.11** zeigt schematisch die Modellvorstellung des LSH-Komplexes.

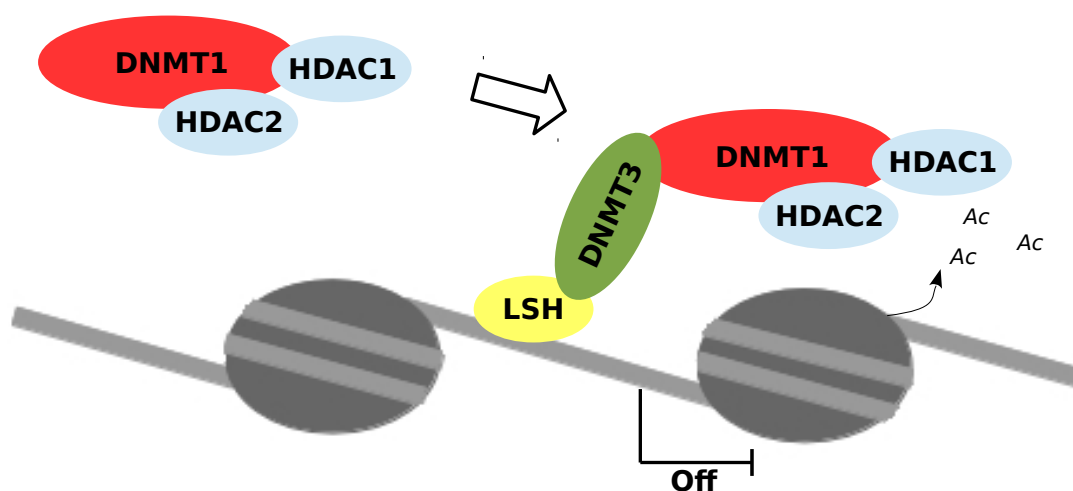


Abbildung 1.11: Modellvorstellung des LSH - Komplexes. Modifiziert nach [114]

1.4.4 Transkriptionelle Regulation von LSH

LSH ist in verschiedenen Tumorentitäten dysreguliert [54, 41, 93]. Außerdem zeigen proliferierende Zellen eine höhere Expression als im Zellzyklus arretrierte Zellen [51]. Daher stellt sich die Frage, wie die Transkription von LSH gesteuert und kontrolliert wird.

E2F1 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus. *Niu et al.* zeigten, dass der LSH-Promotor ein direktes Ziel von E2F1 ist und somit die erhöhte LSH Expression in proliferierenden Zellen erklären könnte [117]. Eine direkte Bindestelle für das Onkogen *p63* konnte ebenfalls im Promotor von LSH nachgewiesen werden [92]. Auch der Transkriptionsfaktor FOXM1 korreliert mit erhöhter LSH Expression [54, 174].

Ein noch sehr junges Forschungsfeld stellen die sogenannten *MicroRNAs* (*miRNAs*) dar. Diese sind nicht kodierende RNA-Moleküle, welche durch spezifische Bindung an mRNA zu deren Abbau und somit zur Verminderung der entsprechenden Proteinmenge führen. Auch LSH scheint unter der Kontrolle solcher miRNAs zu stehen. *miRNA-7* und *miRNA-468* haben eine Bindungsstelle in der 3'-UTR des LSH-Transkripts und führen zum Abbau von LSH-mRNA [80, 44].

1.4.5 Klinische Aspekte von LSH

Die genomische Lokalisation von LSH (Chr 10 q23.3-q24.2) ist eine Region, welche in vielen Leukämien chromosomale Veränderungen aufweist [50]. So konnte gezeigt werden, dass LSH in vielen akuten Leukämien durch eine Deletion mutiert ist [98]. Außerdem entwickeln Mäuse mit LSH-depletierten hämatopoetischen Progenitorzellen Erythroleukämien, welche ansonsten bei Mäusen nicht vorkommen [41]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LSH ein wichtiger Faktor für eine normale Hämatopoese ist.

In nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen finden sich häufig abnorme Splicevarianten von LSH, welche zu einem Funktionsverlust und damit zu epigenetischer Instabilität führen [188].

LSH wird außerdem als Biomarker für einige Tumorentitäten, wie zum Beispiel Melanommetastasen und oropharyngeale Karzinome, diskutiert [93, 54, 174].

2 Zielsetzung der Arbeit

Vorarbeiten zur Expression in Normallebergeweben und operativ entfernten Hepatoblastomen zeigten, dass der Chromatinremodeler LSH in Hepatoblastomen stark überexprimiert ist (s. **Kapitel 5.2**). Da LSH eine essentielle Rolle in der Etablierung von DNA-Methylierung spielt und auch andere epigenetische Modifikationen beeinflusst (s. **Kapitel 1.4.3**) liegt die Vermutung nahe, dass die in Hepatoblastomen gefundenen epigenetischen Aberrationen (s. **Kapitel 1.1.3**) in Zusammenhang mit der Überexpression von LSH stehen könnten. Somit stellt LSH ein interessantes Gen da, dessen Untersuchung neue Einblicke in die Tumorbilogie von Hepatoblastomen geben könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch transienten Knockdown den Einfluss von LSH auf die Expression aberrant exprimierter Gene sowie auf die Entstehung und Aufrechterhaltung epigenetischer Veränderungen in Hepatoblastomzelllinien zu untersuchen. Dazu soll der Methylierungsgrad ausgewählter Genloci mittels Pyrosequencing untersucht werden. Außerdem soll die Rolle von LSH im Zusammenhang von Überleben und Proliferation dieser Zelllinien analysiert werden.

Zuletzt steht die transkriptionelle Regulation von LSH im Mittelpunkt des Projekts, um erste Anhaltspunkte zu ermitteln, ob die Überexpression die Ursache oder eine Folge der epigenetischen Aberration in Hepatoblastomen ist. Dazu soll der Promotor von LSH durch bioinformatische Methoden auf potentielle Bindungsstellen aktivierender Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden.

3 Material

3.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3.1: Verwendete Zelllinien

Name	Charakterisierung	Bezugsquelle	Kulturbedingungen
HepT1	Humanes Hepatoblastom (embryonale Differenzierung)	Prof. Dr. Torsten Pietsch (Neuropathologie Bonn)	RPMI-Medium 37°C - 5 % CO ₂
HepG2	Humanes Hepatoblastom (eines 15 jährigen Jungen)	ATCC, Manassas, VA, USA	RPMI-Medium 37°C - 5 % CO ₂
HUH6 (j)	Humanes Hepatoblastom (Mischtyp)	Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan	DMEM-Medium 37°C - 5 % CO ₂
HUH6 (a)	Humanes Hepatoblastom (Mischtyp), Subklon	Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan	RPMI-Medium 37°C - 5 % CO ₂
HUH7	Humanes hepatozelluläres Karzinom	Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka, Japan	RPMI-Medium 37°C - 5 % CO ₂
HepT3	Humanes epitheliales Hepatoblastom	Prof. Dr. Torsten Pietsch (Neuropathologie Bonn)	RPMI-Medium 37°C - 5 % CO ₂

3.2 Zellkulturmedien

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

500 ml RPMI 1640 Medium (1x), liquid-with *GlutaMAX*TM I (Invitrogen, Karlsruhe) wurden für die Zellkultur mit 50 ml (10 %) fötalem Rinderserum (FBS, Invitrogen, Karlsruhe) und 5 ml (1 %) Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

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

500 ml DMEM-Medium (1x) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamine (Invitrogen, Karlsruhe) wurden für die Zellkultur mit 50 ml (10 %) fötalem Rinderserum (FBS, Invitrogen, Karlsruhe) und 5 ml (1 %) Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

Einfriermedium:

Das Einfriermedium wurde aus 50 ml FBS (Invitrogen, Karlsruhe), 40 ml DMEM (ohne Serum, mit Penicillin/Streptomycin) und 12,5 ml DMSO hergestellt.

3.3 Chemikalien und Reagenzien

5x strand buffer	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
Aceton	AppliChem, Darmstadt (DE)
Agarose	PeqLab, Erlangen (DE)
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe (DE)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Bradfordreagent	Bio-Rad, Hercules (USA)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt (DE)
BSA	Roth, Karlsruhe (DE)
Calcein, AM	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Chloroform (≥ 99 %)	Roth, Karlsruhe (DE)
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	DAKO, Hamburg (DE)
Distilled Water (DNase/RNase free)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
DPBS (1x) ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
DTT	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid (EtBr), 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Foetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Glycin	Roth, Karlsruhe (DE)
Hämalaun	Roth, Karlsruhe (DE)
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden (DE)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Loading Dye Solution (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (DE)
Magermilchpulver	Sliter, Obergünzburg (DE)
M-DTT	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Roth, Karlsruhe (DE)
Phenol	Roth, Karlsruhe (DE)

Random-Hexamer	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe (DE)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (DE)
Sodiumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
TriReagent	Molecular Research Center, Cincinnati (USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)

3.4 Puffer

Alle Puffer wurden mit sterilem, destilliertem Wasser angesetzt und falls notwendig autoklaviert.

Blockierungspuffer:

0,1 % Tween 20 in PBS; 5 % Magermilchpulver

Laufpuffer:

MOPS-Puffer (Roth, Karlsruhe)

Lysepuffer:

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

5xSDS-Probenpuffer:

2 % SDS; 5 % β -Mercaptoethanol; 10 % Glycin; 1 mM EDTA; 0,005 % Bromphenolblau; 62,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8)

STE-Puffer:

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

Strippingpuffer:

0,2 mM Glycin; 1 % SDS; HCl (pH 2,0)

Transferpuffer:

48 mM TRIS; 39 mM Glycin

TRIS-Puffer:

7,4 mM TRIS; 44 mM TRIS-Hydrochlorid; 0,15 mM Natriumchlorid

Westernblot Waschpuffer:

0,1 % Tween 20 in PBS

3.5 Nukleinsäuren

Randomhexamere	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
----------------	----------------------------------

3.5.1 siRNAs

FlexiTube siRNA (HS_HELLS_5)	Qiagen, Hilden (DE)
GeneSolution siRNA (HS_HELLS_5/6/7/8)	Qiagen, Hilden (DE)
siGENOME Non-Targeting siRNA #2	Thermo Scientific, Waltham (USA)

3.5.2 Primer

Quantitative RT-PCR

Die Primer für die quantitative RT-PCR wurden mit der Software *PrimerExpress*® designed.

Tabelle 3.3: Verwendete qPCR-Primer

Gen	Sequenz (5'-3')	Exons	Länge
BMI1	forward: ACCAGAGAGATGGACTGACAAATG reverse: GTGGAGGGAATACCTCCTGCT	6/7	91
CDKN1A	forward: AGGCTGAAGGGTCCCCAG reverse: CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA	2/3	91
CDKN1C	forward: GCGGCGATCAAGAAGCTG reverse: GGACATCGCCCGACGAC	1/2	91
CDKN2A	forward: AGGCAGTAACCATGCCCCG reverse: TTCCCGAGGTTTCTCAGAGC	2/3	91
DLK1	forward: GCAACCCCCAAAATGGATTC reverse: GAGGTCACGCACTGGTCACA	2/3	91
FOXA1	forward: CCCCCACTACTCCTTCAACCA reverse: GCAGTGCCTGTTTCGTATGCC	1/2	91
FOXM1	forward: CTCCCGCAGCATCAAGCAA reverse: GCCAGGACGCTGATGGTCTC		91
GLI1	forward: AGCTACATCAACTCCGGCCA reverse: GCTGCGGCGTTCAAGAGA	11/12	115
HHIP	forward: TGTACATCATTCTTGGTGATGGG reverse: AGCCGTAGCACTGAGCCTGT	6/7	91
IGF2	forward: CCTCCGACCGTGCTTCC reverse: GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	3/4	81
IGFBP3	forward: GTCCAAGCGGGAGACAGAATAT reverse: CCTGGGACTCAGCACATTGA	2/3	91
LSH	forward: TGTGAACCGTACAATTGCAAACA reverse: TCTAGTTCGTCGTTTTGGTCGAC	13/14	91
NOTCH3	forward: CAGCTGTCACAGCCGATGC reverse: GATCAGTGCCGTTGAGCCAT		91

Pyrosequencing

Die für die Methylierungsanalysen mittels Pyrosequencing verwendeten Primer wurden mit der Software *Pyromark Q24 Assaydesign* entworfen. Jeweils ein Primer wurde dabei am 5'-Ende mit einem Biotinmolekül gekoppelt.

Tabelle 3.4: Verwendete Pyrosequencing-Primer

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	CpGs
CDKN2A	forward	AATTTGGTAGTTAGGAAGGTTGTAT	7
	reverse	AAATCTCCCCCAAACACCAACC	
	sequencing	GGGAGGATTTTTTTTAAATAGAGTG	
DLK1	forward	TTTGTGAGATGAGGTGTGAAATTTTAT	7
	reverse	AAACCTCCCATCACTCTTATCC	
	sequencing	ATGTTTTTAAAATTTGTTATTAGT	
HHIP	forward	GGGAGGAGAGAGGAGTTT	10
	reverse	AACCAACCTCCAAAATACTAAACC	
	sequencing	TTAGGATTGAGTTTTTGTTTTAA	
IGF2/H19	forward	ATGGGTTTTTGGTTTGGTATTGG	10
	reverse	AAAAATTCATTTCCCCAAAAACACAA	
	sequencing	GGGGTGGAGGGTGTA	
IGFBP3	forward	TGGTTTTTTGAGATTTAAATGTAAGTTAGA	13
	reverse	ATCACCCCAATCACTCCTA	
	sequencing	GTTTGTTAAAGGAATTAATTTTAG	

3.6 Enzyme

CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (DE)
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
RNase H	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
<i>SuperScriptTM</i> Rev. Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Hot Start Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (DE)
iTaq SYBR Green Mix with ROX	Biorad, München (DE)
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories, Pasching (A)

3.7 Antikörper

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper

Antigen	Ursprung	Verdünnung	Firma
LSH	Maus	1:1000 (Westernblot) 1:500 (Immunhistochemie)	Santa Cruz Biotech, (USA)
IGFBP3	Kaninchen	1:400 (Westernblot)	Santa Cruz Biotech, (USA)
HHIP	Kaninchen	1:2000 (Westernblot)	Santa Cruz Biotech, (USA)
β-ACTIN	Kaninchen	1:200 (Westernblot)	Santa Cruz Biotech, (USA)

3.8 Verwendete Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics, Mannheim (DE)
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire (UK)
EpiTec® Bisulfit Kit	Qiagen, Hilden (DE)

3.9 Längenstandards

Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (DE)
Gene Ruler TM 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (DE)
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (DE)

3.10 Verbrauchsmaterialien

Biosphere Filtertips (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig (DE)
Hybond-C extra Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire (UK)
Hyperfilm TM MP	Amersham, Buckinghamshire (UK)
Kryoröhrchen, Nalgene	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig (DE)
PCR-5 strip tubes	Eppendorf, Hamburg (DE)
PCR-96 well Platten	PeqLab, Erlangen (DE)
Pipettenspitzen (10 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Pipettenspitzen (100 μ l)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim (DE)
Quarzküvette QS 10,00 mm	Hellma, Mühlheim (DE)

Reaktionsgefäße (Plastik) (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Reaktionsgefäße (Plastik) (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., Corning (USA)
Tris-Glycin Gele (12 %)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Zellkulturflaschen (12,5 cm ² , 25 cm ² , 75 cm ²)	NUNC, Langenselbold (DE)
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-well)	NUNC, Langenselbold (DE)
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)

3.11 Geräte

Abzugssystem EcoVac	Schütt, Labortechnik, Göttingen (DE)
AccuJet Pro Pipette	Brand, Wertheim (DE)
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Zeiss, Oberkochen (A)
Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen (DE)
Biofuge Fresco, Heraeus	Kendro, Hanau (DE)
Biofuge Pico, Heraeus	Kendro, Hanau (DE)
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg (DE)
Centrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg (DE)
C02-Incubator MCC-26AIC	Sanyo, Tokio (J)
Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Köln (DE)
GelJet Imager Version 2004	Intas, Göttingen (DE)
GENios Microplatereader	Tecan, Männedorf (CH)
HERAsafe Zellkulturabzug	Kendro, Hanau (DE)
Homogenisator Miccra	ART, Mühlheim (DE)
Kamera PowerShot G6	Canon, Krefeld (DE)
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg (DE)
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg (DE)
Micropipetten Research (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg (DE)
pH-Meter inoLab pH720	WTW, Weilheim (DE)
Schüttler Rock-N-Roller	G. Kisker, Steinfurt (DE)
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg (DE)
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg (DE)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waage Vic-5101	Acculab, Edgewood (USA)
Wasserbad GFL1083	GFL, Wien (A)
XCell IITM Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellen auftauen

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden möglichst schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 7 ml Kulturmedium gegeben. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert, in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen.

4.1.2 Zellen passagieren

Bei einer Konfluenz von etwa 80–90 % wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (2 ml für eine große (25 cm²) und 1 ml für eine kleine (12,5 cm²) Zellkulturflasche) abgelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Trypsinaktivität abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in adäquaten Verhältnissen (1:2, 1:3, 1:4 oder 1:5) in neue Kulturflaschen ausgesät.

4.1.3 Zellen einfrieren

Die Zellen wurden abtrypsinisiert (s. **Kapitel 4.1.2**) und für 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl Dubelcco's Medium resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde nun langsam 7 ml Einfriermedium zugegeben und die Zellen schnell auf Kryoröhrchen verteilt. Nach 1–3 Tagen bei -80 °C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

4.1.4 Transfektion mit siRNA

Zur Transfektion der Zellen mit siRNA wurden 5×10^5 Zellen in 2,3 ml Kulturmedium in einer 6-Well Platte ausgesät. Für den Transfektionsmix wurden 12 μ l siRNA (2 μ M) in 100 μ l serumfreiem Medium gelöst. Anschließend wurden 12 μ l HiPerFect Transfection Reagent hinzugefügt, der Ansatz kurz gevortext und 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Komplexbildung). Nun wurden 124 μ l des Transfektionsmix tropfenweise auf die noch schwimmenden Zellen gegeben (Fast-Forward Transfektion). Das vom Hersteller ebenfalls vorgeschlagene traditionelle Protokoll, bei welchem die Zellen erst am folgenden Tag, nachdem sie sich abgesetzt haben, transfiziert werden, wurde wegen schlechterer Transfektionseffizienz nicht angewendet. Für größere bzw. kleinere Ansätze wurden die einzelnen Mengenangaben entsprechend vervielfacht bzw. verringert.

4.1.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz und Zellvitalität nach Transfektion

Zur Überprüfung der Zellvitalität wurde eine Calceinfärbung vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert (s. **Kapitel 4.1.2**) und einmal mit DPBS gewaschen. In eine 6-Well Platte wurden 2,5 ml DPBS pro Well mit einer Calceinkonzentration von 1 μ M vorgelegt. Darin wurden je 5×10^5 Zellen ausgesät und eine Stunde bei normalen Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Calcein-positiven Zellen mit dem *2100 Bioanalyser* der Firma Agilent ausgezählt.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden mit einem Cy5-markierten Oligonukleotid transfizierte Zellen ebenfalls mit dem *2100 Bioanalyser* analysiert. Bei beiden Messungen wurde genau nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

4.2 RNA-Methoden

4.2.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Total-RNA wurden die Zellen mit Tri-Reagent lysiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform wurden die Ansätze 15 Sekunden gevortext und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Proben 15 Minuten mit 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurden, wurde die obere klare Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Tube überführt. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde die RNA 10 Minuten auf Eis ausgefällt. Anschließend wurden die Proben wiederum 15 Minuten bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das RNA-Pellet mit eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 12000 rpm bei 4 °C) wurde das RNA-Pellet, je nach Größe in 25–50 μ l sterilem Wasser aufgenommen und 10 Minuten bei 55 °C gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem *BioPhotometer* der Firma Eppendorf bestimmt. Isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

4.2.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 2 µg Total-RNA eingesetzt und mit sterilem Wasser auf 7 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 5 µl Randomhexamere (2 µg/µl) zugegeben und der Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Jeder Probe wurden nun 4 µl 5x FirstStrandBuffer, 2 µl M-DTT und 1 µl dNTPs beigefügt. Die Ansätze wurden nun erst 10 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Je 1 µl SuperScriptII (Reverse Transkriptase) wurde zu jeder Probe gegeben und die RNA 1 Stunde bei 42 °C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 70 °C abgestoppt. Durch die Zugabe von 1 µl RNase H und Inkubation bei 37 °C (20 Minuten) wurden RNA-Reste entfernt. Zuletzt wurde die cDNA mit einer adäquaten Menge (0–80 µl) sterilen Wasser verdünnt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die Expression einzelner Gene auf RNA-Ebene zu messen, wurde die Methode der qRT-PCR verwendet. Jeder Ansatz enthielt 2 µl cDNA, 10 µl iTaq SybrGreen with ROX Mastermix, je 1 µl Primer (10 µM) (reverse/forward) sowie 6 µl Wasser.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	40 Zyklen
Annealing	55 °C	15 sec	
Extention	68 °C	20 sec	
Schmelzkurve	60 °C	15 sec	
	60–95 °C	20 min	
	95 °C	15 sec	
Hold	4 °C		

Alle Proben wurden in Dupletten pipettiert und mittels der $\Delta\Delta$ -ct Methode nach Pfaffel [124] quantifiziert. Als Housekeeping-Gen wurde *TATA-Box Binding Protein (TBP)* verwendet.

4.3 Protein-Methoden

4.3.1 Protein-Isolierung

Zur Isolierung von Proteinen wurden die Zellen abtrypsiniert (s. **Kapitel 4.1.2**), 5 Minuten mit 1200 rpm abzentrifugiert und das Pellet je nach Größe in 80–200 µl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis lysiert. Nachdem die Proben 30 Minuten mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurden, wurde der klare Überstand in neue Tubes überführt. Die Zelllysate wurden bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration der Zelllysate zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford verwendet. Dazu wurde Bradfordreagent 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend steril filtriert. Je 10 µl einer mit BSA hergestellten Standardreihe (0,0/ 0,1/ 0,2/0,4/ 0,8/1,0/1,2 mg/ml) wurde in Dupletten in eine 96-Well Platte vorgelegt, ebenso wie die 1:2 verdünnten Lysatproben. In jedes Well wurden nun 200 µl verdünntes Bradfordreagent gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte OD_{595} für jedes Well mit dem Tecan *GENios Multiplatereader* gemessen.

Mit folgender Formel wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben berechnet:

$$\text{Proteinkonzentration}[\mu\text{g/ml}] = \frac{OD_{595} - t}{m \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

OD_{595} ist der Mittelwert der Dupletten einer Probe, t steht für den y-Achsenabschnitt und m für die Steigung der Standardreihe.

4.3.3 Westernblot

Für den Westernblot wurden 10–30 µg Protein eingesetzt. Alle Proben wurden mit DPBS auf 20 µl aufgefüllt und je 5 µl SDS-Probenpuffer zugegeben. Anschließend wurden die Proteine für 10 Minuten bei 99 °C denaturiert. Die TRIS-Glycin-Gele wurden in die Kammer eingespannt und die innere Kammer komplett, die Äußere etwa zu einem Drittel mit Laufpuffer befüllt. In die Taschen der Gele wurden nun je 25 µl der vorbereiteten Proben pipettiert. Als Längenmarker wurde immer eine Spur mit 5 µl *PageRulerTM* Prestained Protein Ladder beladen. Nun wurden die Proteine 60 Minuten bei folgenden Laufbedingungen aufgetrennt: 200 V konstant und 110 mA.

Kurz vor Ende der Laufzeit wurden die Nitrozellulosemembranen erst 10 Minuten in destilliertem Wasser und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Die für das Blotten benötigten Whatmanpapiere und Pads wurden ebenfalls mit Transferpuffer durchtränkt. Nach

Auftrennung der Proteine wurde die Blottingkammer mit Pads, Whatmanpapieren, Gel und den Membranen beladen. Die Kammer wurde nun etwa zur Hälfte mit Transferpuffer gefüllt. Bei folgenden Blottbedingungen wurden die Proteinbanden vom Gel auf die Membran übertragen: 25 V konstant und 100 mA für 90 Minuten.

Nach dem Blottvorgang wurden die Membranen in Blockierungspuffer für mindesten 2 Stunden inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blocken.

Für die Inkubation mit den Erstantikörpern wurden diese entsprechend verdünnt (s. Material) und die Membranen über Nacht bei 4 °C darin inkubiert. Am nächsten Tag folgte, nachdem die Membranen dreimal für 10 Minuten in Westernblot-Waschpuffer gewaschen wurden, die Inkubation mit den Zweitantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen wiederum dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen.

Zur Detektion der Banden wurde das ECL plus Western Blotting Detection Kit verwendet. Daraus wurden je 1 ml Solution A und 25 µl Solution B vermischt, auf die Membranen gegeben und darauf 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtropfen der Detektionslösung wurden die Membranen in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. Mit der Entwicklermaschine CP1000 wurden die Röntgenfilme entwickelt.

4.3.4 Immunhistochemie

Die Kryoschnitte der zu färbenden Gewebe wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde jeder Schnitt für 10 Minuten in Aceton fixiert. Für weitere 10 Minuten wurden die fixierten Gewebeschnitte unter 100 µl dualem endogenem Enzymblock inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TRIS-Puffer für jeweils 5 Minuten wurden unspezifische Proteinbindungen mit 5 %-igem Ziegen Serum geblockt (Inkubationszeit: 30 Minuten). Das Serum wurde mit TRIS-Puffer abgewaschen. Auf jeden der Schnitte wurden je 100 µl Antikörperverdünnung (s. Material) gegeben. Die so behandelten Gewebe wurden nun über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten mit TRIS-Puffer gewaschen und anschließend 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper (s. Material) inkubiert. Durch 15-minütige Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) im Dunklen wurden die gebundenen Antikörper detektiert. Zuletzt wurden die Schnitte 2 Minuten in Hämalan gegengefärbt.

4.4 DNA-Methoden

4.4.1 DNA-Isolierung

Die Zellen, aus denen DNA isoliert werden sollte, wurden abtrypsinisiert (s. **Kapitel 4.1.2**) und 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml DPBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Tubes überführt. Dieses wurde wiederum für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das verbleibende Pellet wurde in 500 µl STE-Puffer mit 30 µl Proteinase K über Nacht bei 56 °C verdaut.

Am nächsten Tag wurde zu jeder Probe ein Volumen Phenol gegeben und der Ansatz 5 Minuten invertiert. Nach einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt mit 8000 rpm bei 4 °C, wurde die obere Phase in ein neues Tube überführt, ein Volumen Chloroform zugegeben und der Ansatz durch Invertieren gemischt. Nach Wiederholung des letzten Zentrifugationsschrittes und Überführung des Überstandes in ein 14 ml Falcon, wurde durch Zugabe von Ethanol (absolut) und leichtes Schwenken der Probe die DNA für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefällt.

Für jede Probe wurden 500 µl Ethanol (70 %) in 1,5 ml-Tubes vorgelegt und das ausgefällte DNA-Knäuel vorsichtig in diese Tubes überführt. Nachdem die DNA abzentrifugiert wurde (10 Minuten mit 12000 rpm), wurde das DNA-Pellet nochmals mit Ethanol (70 %) gewaschen. Nach dem Lufttrocknen der Pellets wurden diese, je nach Größe, in 50–100 µl sterilen Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 60 °C gelöst. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit dem *BioPhotometer* bestimmt. Isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.4.2 Pyrosequencing

Bisulfitkonvertierung

Um den Gehalt an methylierten CpGs untersuchen zu können, wurden jeweils 20 µg DNA mit dem EpiTec Bisulfit Kit der Firma Qiagen behandelt. Es wurde nach der Herstelleranleitung vorgegangen.

Durch die Bisulfitkonvertierung werden alle CpGs zu Uracilen desaminiert. Nur Cytosine, welche durch eine Methylgruppe am 5'-C-Atom geschützt sind, werden nicht konvertiert (**Abbildung 4.1**). Somit kann während der Sequenzierung zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen unterschieden werden.

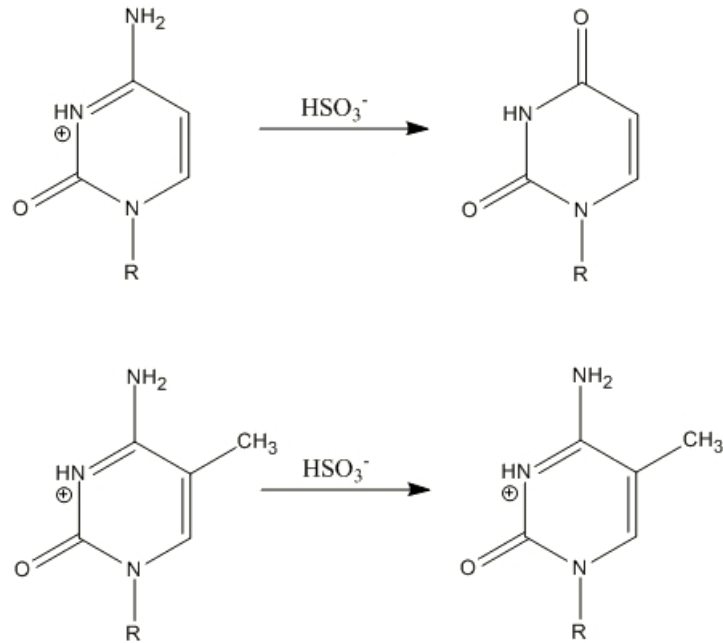


Abbildung 4.1: Cytosin wird durch die Bisulfitkonvertierung zu Uracil desaminiert. Methylierte CpGs sind vor der Konvertierung geschützt.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die für die Untersuchung der Methylierungsgrade bestimmten DNA-Loci wurden mittels PCR vervielfältigt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 1 μ l konvertierter DNA, 13,32 μ l sterilem Wasser, je 1 μ l Primer (forward/reverse), 2 μ l 10x Hot Start Taq Buffer und 1,2 μ l $MgCl_2$ zusammen.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	X °C	30 sec	40 Zyklen
Extention	72 °C	45 - 60 sec	
Schmelzkurve	60 °C	15 sec	
	60–95 °C	20 min	
	95 °C	15 sec	
Hold	4 °C		

Die optimale Anealingtemperatur wurde für jedes Primerpaar durch eine Gradienten-PCR bestimmt. Um die Amplifikation der Sequenz von Interesse zu überprüfen, wurden je Probe 2 μ l zusammen mit 2 μ l LoadingDye auf ein Agarosegel (8 %) mit 3 μ l Ethidiumbromid

aufgetragen. Als Längenmaß wurde jeweils eine Tasche mit dem *GeneRulerTM* beladen. Die Banden wurden mit dem GelJet Imager Version 2004 detektiert.

Sequenzierung

Der DNA-Methylierungsgrad verschiedener Gene wurde mittels Pyrosequencing bestimmt. Dabei wurde das Gerät *PyroMark24* der Firma Qiagen verwendet. Aufgrund der enzymatischen Umsetzung von Pyrophosphat, welches bei der DNA-Synthese entsteht, wird Licht emittiert. Durch Quantifizierung dieser Emission lässt sich auf die Menge der eingebauten Nukleotide schließen. Es wurden alle Reagenzien des PyroMark24 Kits verwendet und genau die Anweisungen des Herstellers befolgt.

4.5 Zellbiologische Funktionsassays

4.5.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay misst Zellvitalität mittels photometrischer Quantifizierung der Verstoffwechslung des gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in einen violetten Farbstoff. Es wurde das Cell Proliferation Kit I (MTT) der Firma Roche verwendet. Dabei wurden nach den Herstellerangaben vorgegangen. Je 2×10^3 Zellen wurden in 100 μ l Kulturmedium in Dupletten in einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden noch schwimmend (fastforward) transfiziert (s. **Kapitel 4.1.4**). Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten (nach ca. 4 Stunden), wurden 10 μ l MTT labeling reagent in jedes Well gegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen mit 100 μ l MTT Solubilization solution fixiert und die Reaktion gestoppt. Am nächsten Tag wurde die Absorption jedes einzelnen Wells bei 595 nm mit dem Tecan GENios Multiplaterereader gemessen. Für jeden Messzeitpunkt der Experimente wurde eine Hintergrundkontrolle nur mit Kulturmedium gemessen.

4.5.2 BrdU-Assay

Im Ansatz des BrdU-Assays befinden sich bromierte Uridine, welche mit der gleichen statistischen Wahrscheinlichkeit wie Thyminnukleotide bei der DNA-Synthese eingebaut werden. Aufgrund der Bromierung können diese Nukleotide mittels eines ELISAs gemessen werden. Die gemessene Menge an BrdU korreliert mit der DNA-Synthese und somit mit der Proliferation.

Es wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) der Firma Roche verwendet. Der Assays wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 2×10^3 Zellen in je 100 μ l Kulturmedium in Dupletten in einer 96-Well Platte ausgesät und noch

schwimmend (fastforward) transfiziert (s. **Kapitel 4.1.4**). Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten (nach ca. 4 Stunden) wurden 10 μ l BrdU labeling solution in jedes Well gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei normalen Zellkulturbedingungen wurde das Medium abgeschüttet und die Zellen jedes Wells mit 200 μ l FixDenat für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nachdem das Fixierungsreagent abgeschüttet wurde, folgte eine 90 minütige Inkubation mit dem BrdU-Antikörper. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit je 200 μ l Washing solution gewaschen, bevor durch Zugabe von je 100 μ l Substrate solution die Lumineszenzreaktion gestartet wurde. Die Lichtemission wurde mit dem Tecan GENios Multiplaterereader gemessen. Für jeden Messzeitpunkt der Experimente wurde eine Hintergrundkontrolle nur mit Kulturmedium gemessen.

4.6 Bioinformatische und statistische Methoden

Zur Suche und Analyse von Promotorbindungsstellen wurde das Programm *ACTG* von Herrn Prof. Ludwig Griehl von der Fakultät für Informatik der Hochschule Landshut verwendet.

Alle dargestellten Fehlerbalken entsprechen dem Standard Error Of Mean (SEM). Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen wurden mit dem t-Test untersucht. Statistische Signifikanz (*) wurde bei einem p-Wert < 0.05 angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Die Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3* sind in Zelllinien von Lebertumoren stillgelegt

Hepatoblastome als embryonale Tumore zeigen im Gegensatz zu adulten Neoplasien kaum Mutationen der kodierenden Erbsubstanz. Lediglich Mutationen des *β -Catenin*-Gens finden sich in vielen Hepatoblastomen [96]. Vielmehr scheinen epigenetische Alterationen, wie zum Beispiel ein Loss of Imprinting (LOI) des *IGF/H19*-Locus (IGF-Signalweg) für das Entstehen dieser Tumoren verantwortlich zu sein [74]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der embryonale Hedgehog-Signalweg und der IGF-Signalweg in Hepatoblastomen durch eine Hypermethylierung der Promotoren und konsekutive transkriptionelle Stilllegung der Gene *HHIP* und *IGFBP3*, negativen Regulatoren dieser Signalwege, stark aktiviert sind [34, 132].

Da diese Signalwege im Verdacht stehen, in der Entstehung des Hepatoblastoms eine entscheidende Rolle zu spielen, wurden in einem ersten Schritt die jeweiligen Regulatorgene bezüglich ihrer Expression in verschiedenen Zelllinien von Lebertumoren untersucht. Es zeigte sich, dass die Tumorsuppressorgene *HHIP* (Hedgehog-Signaling) und *IGFBP3* (IGF-Signaling) auf Proteinebene in den Hepatoblastomzelllinien HUH6 (a), HUH6 (j), HepT1, HepG2 und HepT3 sowie der hepatozellulären Karzinomzelllinie HUH7 im Vergleich zu Normallebergewebe (NL) stark reprimiert sind (**Abbildung 5.1 A**).

Auch die relative Quantifizierung der mRNA-Menge mittels qRT-PCR zeigte in den untersuchten Zelllinien eine deutliche Reduktion der Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3* (**Abbildung 5.1 B**).

Für das Expressionsniveau der normalen Leber (NL) wurden die Messergebnisse von drei unterschiedlichen Normallebergeweben (NL 146, NL 198 und NL 227) gemittelt. Für die Zelllinien wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und gemittelt.

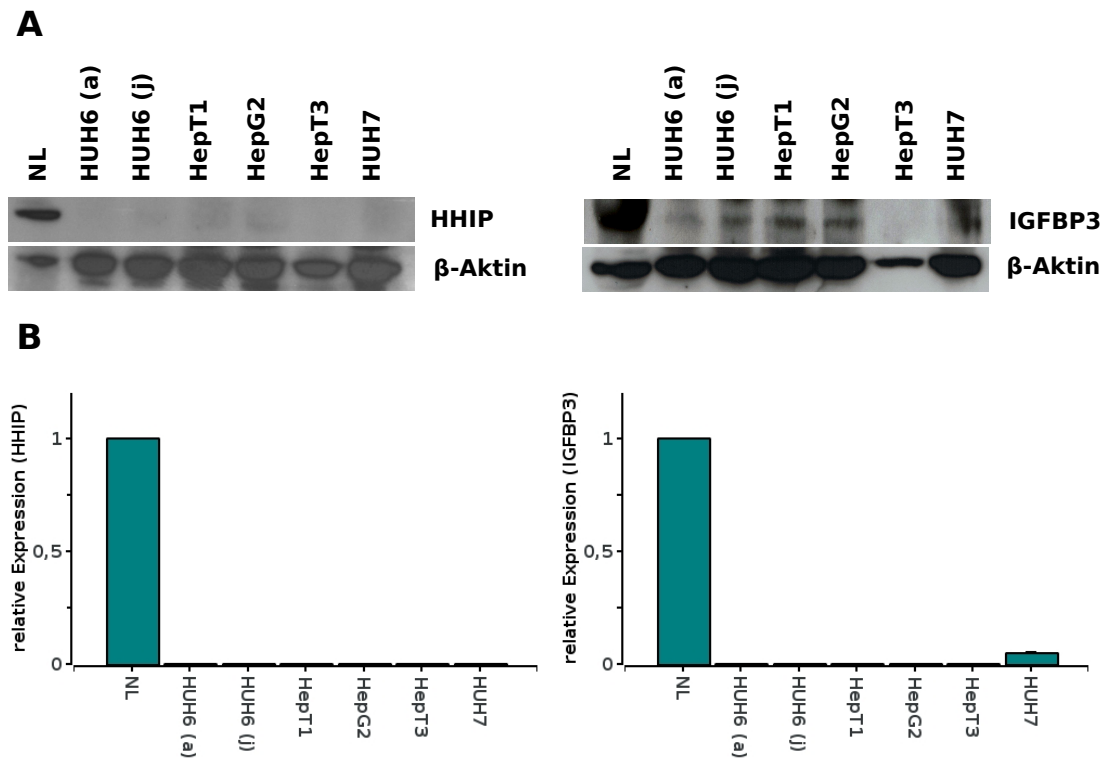


Abbildung 5.1: Die Tumorsuppressoren *HHIP* und *IGFBP3* sind in Lebertumorzelllinien stillgelegt
 (A) Westernblot mit Zellysaten einer Normalleber (NL) und der Leberkrebszelllinien
 (B) qRT-PCR: Quantifizierung der mRNA-Mengen in den Zelllinien im Vergleich zu Normallebergewebe (NL)

5.2 Der epigenetische Regulator *LSH* ist in Hepatoblastomen stark überexprimiert

Um herauszufinden, ob der Chromatinremodeler *LSH* (s. **Kapitel 1.4**) eine Rolle bei der Entstehung und Erhaltung epigenetischer Aberrationen in Hepatoblastomen spielt und einen Einfluss auf die Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3* hat, wurde die Expression von *LSH* in den Lebertumorzelllinien untersucht. Der Westernblot mit Proteinlysaten aller Zelllinien zeigte, mit Ausnahme von HepT3, eine deutliche Überexpression von *LSH* gegenüber normalem Lebergewebe (NL) (**Abbildung 5.2 A**).

Auch die Quantifizierung der *LSH*-mRNA mittels qRT-PCR ergab eine wesentlich stärkere Expression in den Zelllinien HUH (a), HUH6 (j), HepT1 und HepG2 und HUH7. (**Abbildung 5.2 B**).

Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert von jeweils drei unabhängigen Messungen bzw. drei unterschiedlichen Normallebern.

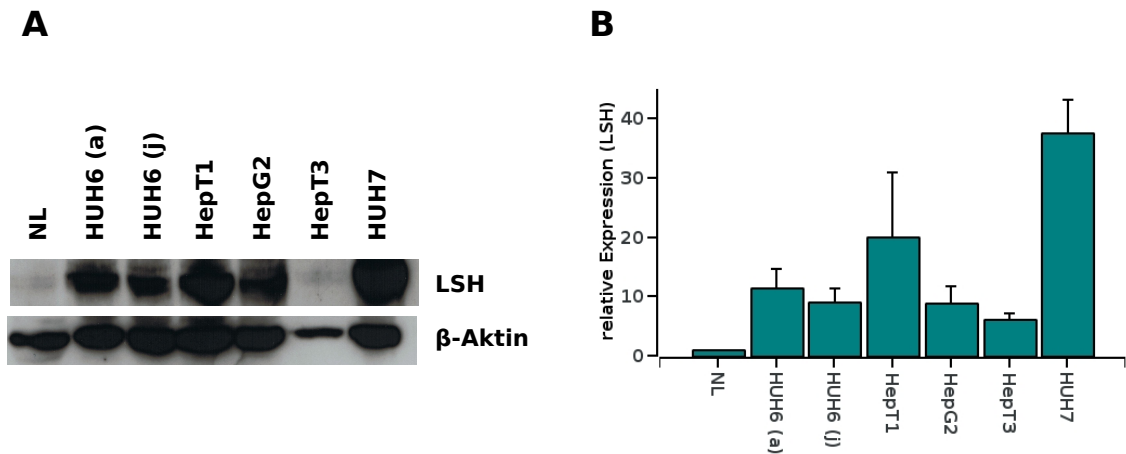


Abbildung 5.2: *LSH* ist in den Lebertumorzelllinien stark überexprimiert
 (A) Westernblot: Normallebergewebe (NL) im Vergleich zu allen Zelllinien
 (B) qRT-PCR: Quantifizierung der mRNA-Mengen in den Zelllinien im Vergleich zu Normallebergewebe (NL)

Abbildung 5.3 zeigt, dass *LSH* nicht nur in den Zelllinien, sondern auch in vielen operativ entfernten Hepatoblastomen deutlich überexprimiert ist. Die Daten wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Roland Kappler zur Verfügung gestellt.

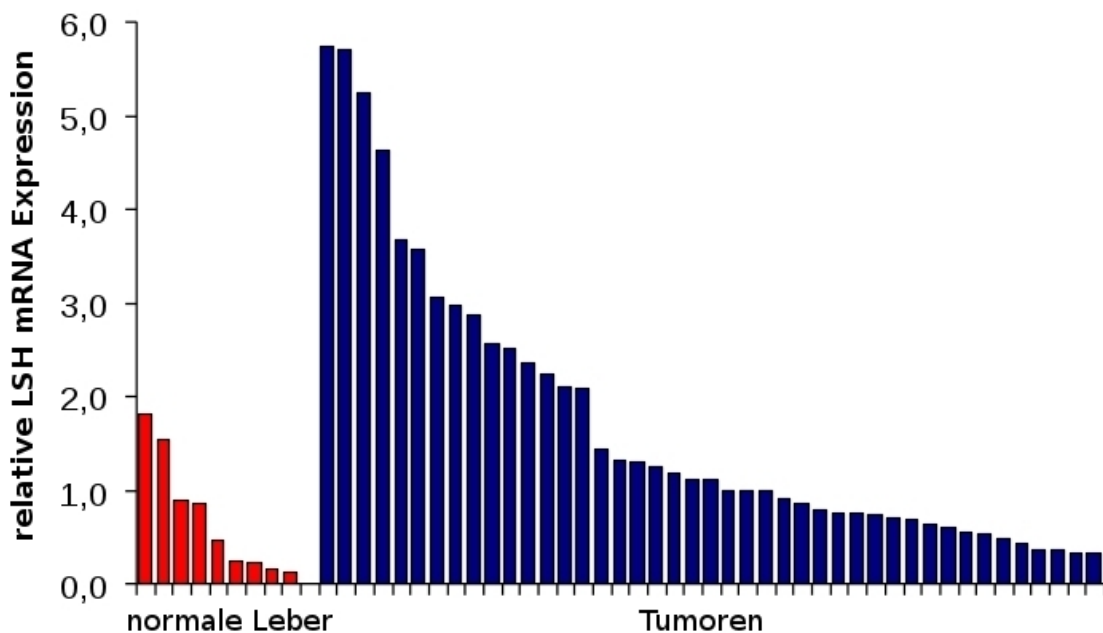


Abbildung 5.3: *LSH* ist in vielen Hepatoblastomgeweben überexprimiert.

Zusätzlich wurde *LSH* in Kryoschnitten von Normallebergewebe und Hepatoblastomgeweben immunhistochemisch angefärbt (braun). In der Normalleber zeigt sich stellenweise eine diskrete nukleäre und zytoplasmatische Färbung. Diese Anreicherung fand sich interessanterweise nahezu ausschließlich perivaskulär (Pfeile). Im Gegensatz dazu fallen die

Hepatoblastome durch eine starke Anreicherung der *LSH*-Färbung auf. Die Tumorzellen zeigen vor allem eine vermehrte zytoplasmatische Anfärbung. Zusätzlich fällt die intensive Färbung von Stromazellen auf. Wie auch schon im Normallebergewebe sind die perivaskulären Bereiche besonders deutlich gefärbt.

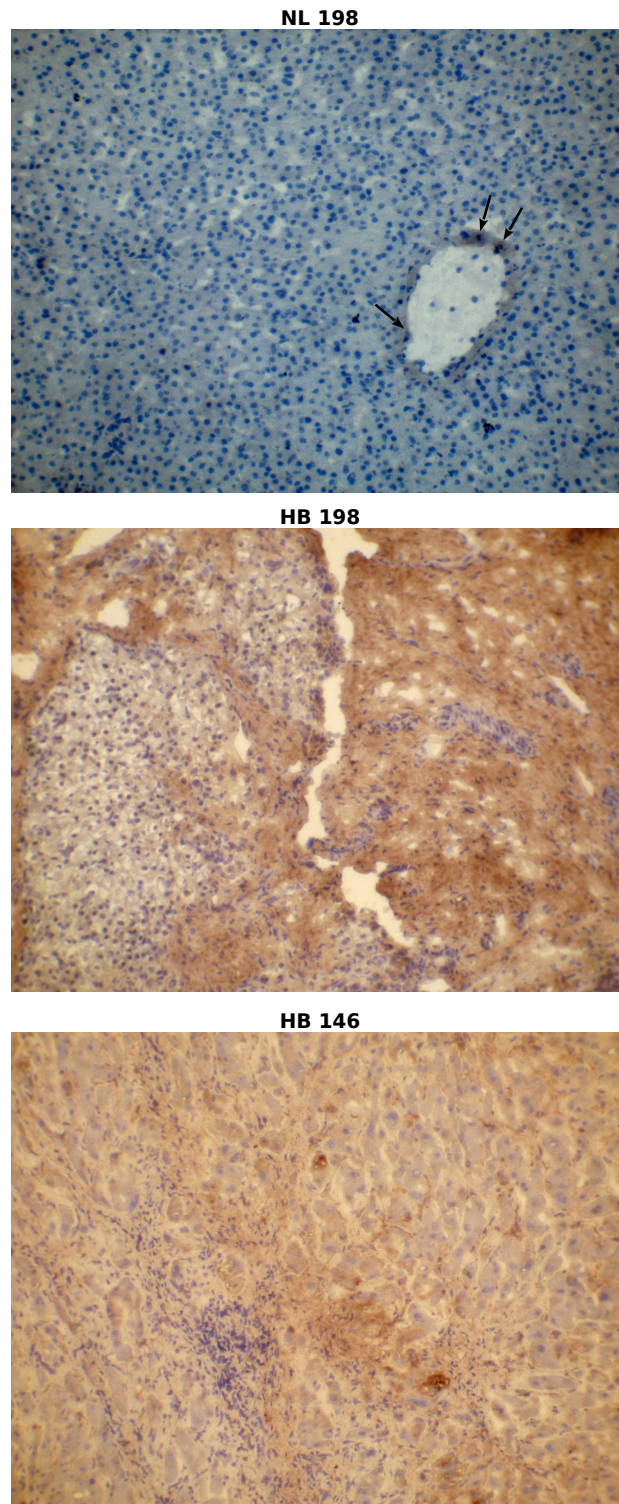


Abbildung 5.4: Hepatoblastomgewebe (HB) zeigen in der immunhistochemischen Färbung von *LSH* eine deutlich stärkere Anfärbung als Normallebergewebe (NL)

5.3 Etablierung der Genstilllegung mittels RNA-Interferenz

Alle folgenden Experimente des Projekts sind mit den Zelllinien HUH6 (j), HepT1 und HepG2 durchgeführt. Die Auswahl fiel auf diese Zelllinien, da HUH6 (j) im Gegensatz zu HUH (a) noch eine sehr ursprüngliche Zelllinie (sehr wenige Passagen) ist, HepT3 keine *LSH*-Überexpression zeigte und HUH7 eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie und kein Hepatoblastom ist. Um die biologische Funktion von *LSH* in Hepatoblastomen näher zu untersuchen, sollte das Protein mittels siRNA ausgeschaltet werden. Dabei wird ein kurzes RNA-Molekül durch Transfektion in die Zellen eingebracht. Dieses bindet an die komplementäre mRNA und führt zu deren Degradierung.

Als Transfektionsmethode wurde ein Lipofektionsverfahren mit dem *HiPerFect*-Transfektionsreagent der Firma Qiagen gewählt. Vom Hersteller werden zwei Methoden zur Transfektion vorgeschlagen:

- **Traditionell:** Die Zellen werden ausgesät und am nächsten Tag, nachdem sie sich abgesetzt haben, transfiziert
- **Fast-Forward:** Die Zellen werden direkt nach dem Aussäen d.h. schwimmend transfiziert

Um die effizienteste Transfektionsmethode zu ermitteln, wurden beide Protokolle parallel durchgeführt und hinsichtlich Transfektionseffizienz (Zahl der transfizierten Zellen) und Vitalität (Zahl der Zellen, welche die Transfektion überleben) verglichen.

Dazu wurden Zellen der Linie HepT1 zuerst mit einer *Cy5*-markierten *NontTarget*-siRNA transfiziert und anschließend mit Calcein gefärbt. Calcein komplexiert Kalziumionen in vitalen Zellen, was in einer grünen Fluoreszenz resultiert. Die Fluoreszenz der *Cy5*-Markierung und der Calceinfärbung wurde anschließend mit dem 2100 BioAnalyzer von Agilent gemessen und die doppelt positiven Zellen (*Cy5*⁺/transfiziert und *Calcein*⁺/lebend) quantifiziert.

Im Bezug auf die Vitalität der Zellen nach der Transfektion zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Methoden (**Abbildung 5.5 A**). Nach beiden Prozeduren wurden etwa 80 % aller Zellen als lebend gewertet.

Hinsichtlich der Transfektionseffizienz zeigte das Fast-Forward Protokoll eine etwas höhere Transfektionsrate als die traditionelle Methode (**Abbildung 5.5 B**). Deshalb sowie wegen der Zeitersparnis (1 Tag) die sich gegenüber der traditionellen Transfektion ergibt, wurde von nun an ausschließlich mit dem Fast-Forward Protokoll gearbeitet.

Die Graphiken in **Abbildung 5.5 C** zeigen alle erfassten Ereignisse der einzelnen Messungen. Gewertet wurden nur die doppelt positiven Zellen (roter Kasten).

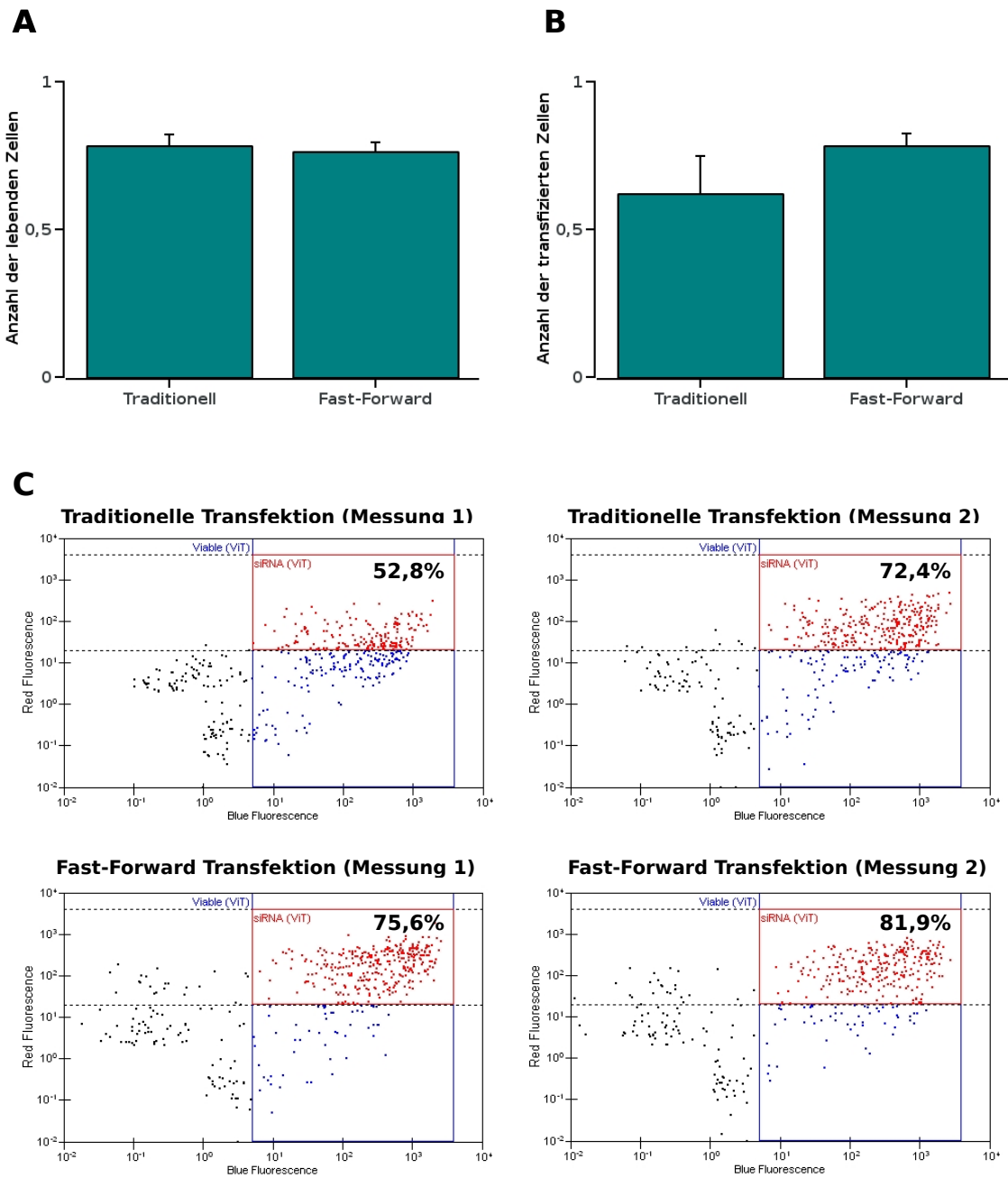


Abbildung 5.5: Etablierung der Knockdownmethode

- (A) Anteil der lebenden Zellen nach Transfektion
- (B) Anteil der transfizierten Zellen nach Transfektion
- (C) Zusammenfassung aller gemessenen Ereignisse

5.4 Auswahl der besten siRNA

Um möglichst gute Effizienzen beim Knockdown von *LSH* zu erzielen wurden 4 verschiedene siRNAs gegen *LSH*-mRNA miteinander verglichen. Die siRNAs stammten aus dem *FelxiTube*-Kit der Firma Qiagen. Mit Zellen der Linien HUH6 (j), HepT1 und HepG2 wurden jeweils 4 Transfektionen mit den unterschiedlichen siRNAs durchgeführt, die RNA

nach 2 Tagen geerntet und die Menge an *LSH*-mRNA, welche mittels qRT-PCR ermittelt wurde, mit der einer Kontrolltransfektion mit *NonTarget*-siRNA (siCtrl) verglichen. Von den unterschiedlichen siRNAs (HS_HELLS_5, HS_HELLS_6, HS_HELLS_7 und HS_HELLS_8) zeigte HS_HELLS_5 die beste Knockdowneffizienz in den drei Zelllinien (**Abbildung 5.6**), sodass diese siRNA für alle weiteren Experimente verwendet wurde.

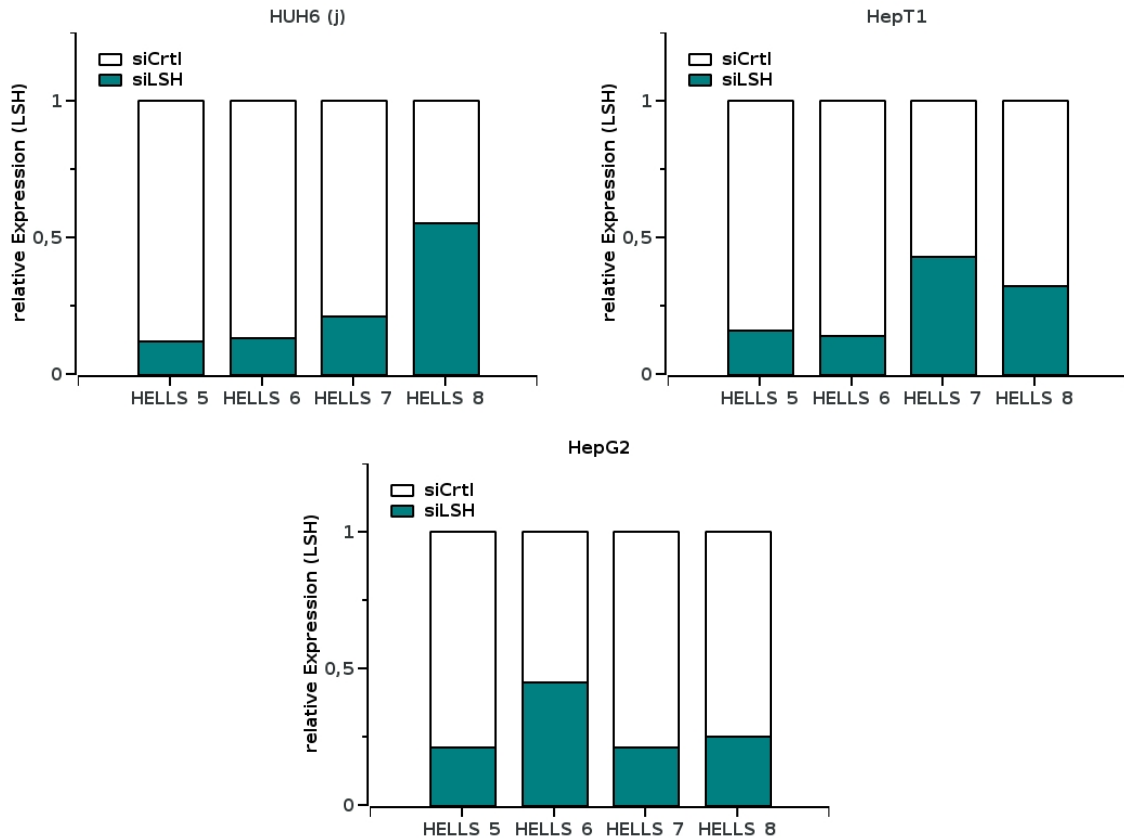


Abbildung 5.6: Vergleich der Transfektionseffizienzen der verschiedenen siRNAs gegen *LSH*-mRNA

5.5 *LSH*-Knockdown

Um den besten Zeitpunkt des Knockdowns zu ermitteln, wurden parallel für jede Zelllinie drei Experimente mit unterschiedlicher Versuchsdauer (2, 4 und 6 Tage) durchgeführt. Da sich zeigte, dass es bei nur einmaliger Transfektion zu einem Rückgang der Knockdowneffektivität kommt, wurden die Zellen jeden zweiten Tag nachtransfiziert. Das zeitliche Protokoll der Knockdownexperimente ist in **Abbildung 5.7 A** zu sehen.

Der *LSH*-Knockdown (siLSH) wurde mit Hilfe von qRT-PCR auf mRNA-Ebene immer im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion (siCtrl) nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die Effizienz des Knockdowns über die Zeit immer besser wurde. Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt (für die 4d-Werte: $n=3$), deren Mittelwerte und SEM in **Abbildung 5.7 B** dargestellt sind.

Im Anschluss wurde durch Westernblot nachgewiesen, dass die Verringerung der mRNA-Menge auch zu einer Abnahme der Proteinmenge führt. Wie in **Abbildung 5.7 C** zu sehen, ist in den Zelllinien HepT1 und HepG2 zu allen drei Zeitpunkten eine deutliche Reduktion der *LSH*-Proteinmenge nachzuweisen. Im Falle von HUH6 (j) ist *LSH* am zweiten und vierten Tag zwar relativ vermindert, eine echte Reduktion zeigt sich allerdings erst ab dem sechsten Tag. Dies kann daran liegen, dass die Zelllinie HUH6 (j) deutlich langsamer wächst als die beiden anderen Linien und somit eventuell einen längeren Protein-Turnover aufweist.

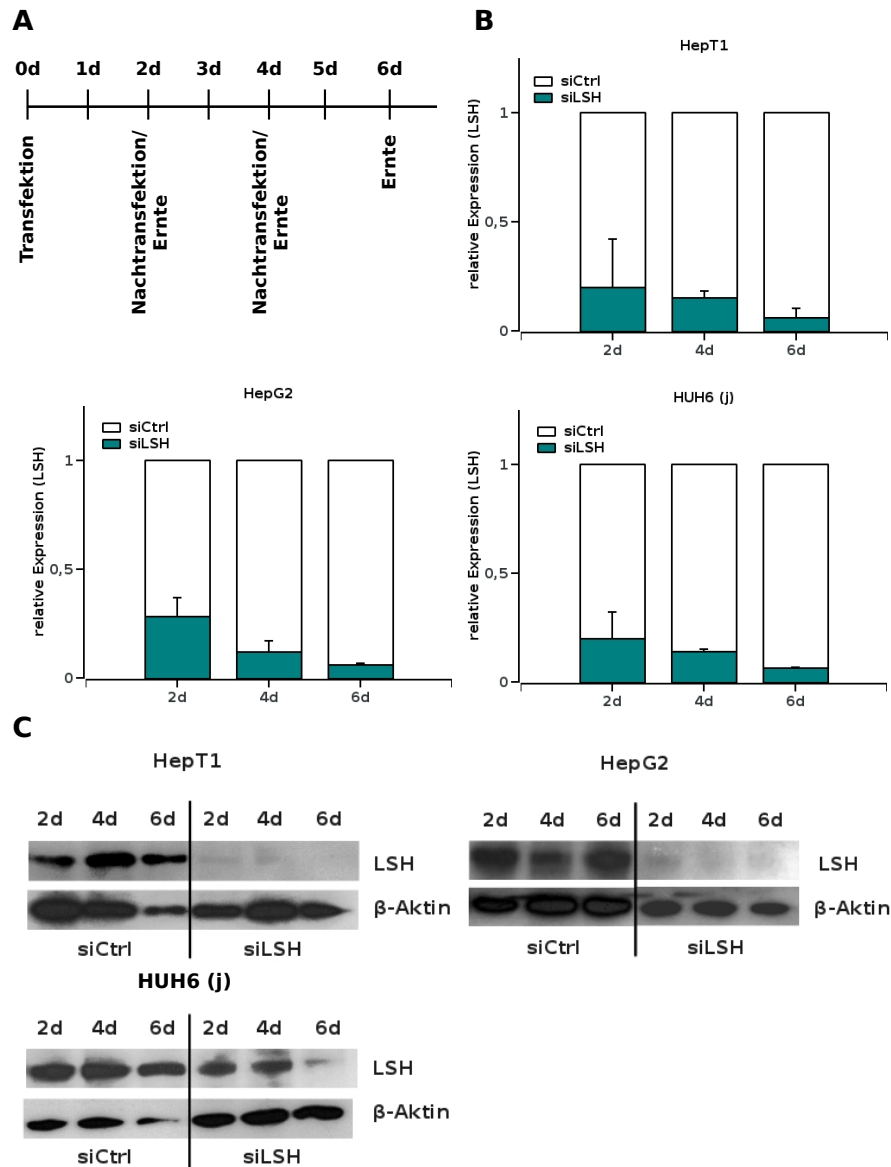


Abbildung 5.7: Knockdownetablierung

(A) Zeitliches Protokoll der Knockdownexperimente

(B) RT-PCR: relative Verringerung der mRNA-Menge nach 2, 4 und 6 Tagen

(C) Westernblot: Nachweis des Knockdowns auf Proteinebene.

LSH-Knockdown (siLSH) und Kontrolltransfektionen (siCtrl) nach 2, 4 und 6 Tagen

5.6 *LSH*-Knockdown führt zu einer Reaktivierung der Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3*

Als erster Schritt wurde untersucht, ob ein Knockdown von *LSH* zur Reexpression der durch DNA-Methylierung stillgelegten Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3* führt. Dazu wurde durch qRT-PCR die mRNA-Mengen der beiden Gene in Knockdownzellen (si*LSH*) der Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) zu den Zeitpunkten 2, 4 und 6 Tage nach Knockdown bestimmt und mit einer Kontrolltransfektion (siCtrl) verglichen.

Dabei zeigte sich, dass es nach Knockdown von *LSH* zu einer signifikanten Reaktivierung der Gene *HHIP* und *IGFBP3* an den Tagen 2 und 4 kam. Dabei war zu beobachten, dass die Reaktivierung nur transient war. Über die Zeit nahm das Ausmaß der Reexpression der Tumorsuppressoren ab, bis sie an Tag 6 praktisch wieder den unterdrückten Ausgangswert erreicht hatte (Abbildung 5.8).

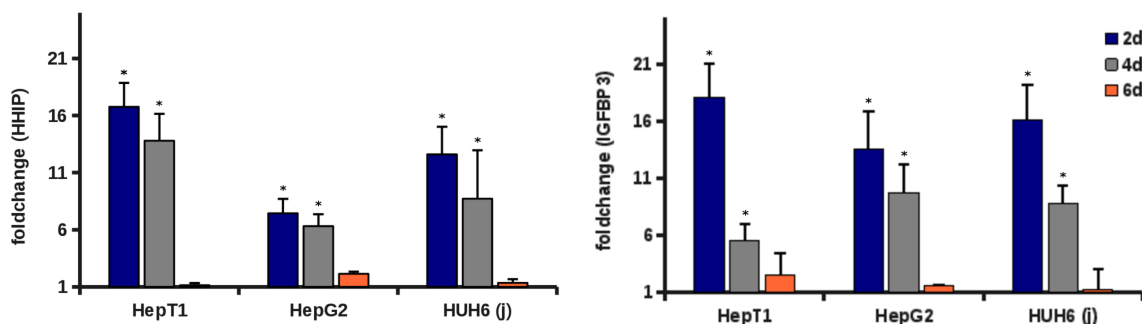


Abbildung 5.8: Reaktivierung der Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3* nach *LSH*-Knockdown

Die transiente Reaktivierung der Tumorsuppressorgene *HHIP* und *IGFBP3* nach Knockdown impliziert einen Einfluss von *LSH* auf die Stilllegung dieser Gene in den Hepatoblastomen. Allerdings scheint es alternative Mechanismen zu geben, die, obwohl der Knockdown von *LSH* immer besser wird (s. Kapitel 5.5), wieder zur Reprimierung der untersuchten Gene führt.

5.7 Einfluss von *LSH* auf weitere Zielgene

Neben den Tumorsuppressoren *HHIP* und *IGFBP3* wurde eine Reihe weiterer potentieller Zielgene von *LSH* auf ihr Verhalten nach Knockdown untersucht. Die einzelnen Gene wurden ausgewählt, da sie entweder in der Leberentwicklung eine Rolle spielen oder in der Literatur mit *LSH* in Verbindung gebracht wurden.

Für jedes Gen wurde mittels qRT-PCR zunächst die Expression in den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) durch Mittelung von jeweils drei unabhängigen Messungen bestimmt und mit dem Expressionsniveau in Normallebergewebe (NL), gemittelt aus drei verschiedenen Lebern, verglichen.

Anschließend wurde untersucht, ob sich an dieser Expression durch den Knockdown von *LSH* eine Änderung ergibt. Dabei wurde die Expression in Zellen, in denen *LSH* ausgeschaltet wurde (siLSH), mit der Expression in kontrolltransfizierten Zellen (siCtrl) verglichen. Die Zellen wurden jeweils nach 4 Tagen Transfektion geerntet, da die vorangegangenen Experimente gezeigt hatten, dass die Knockdowneffizienz besser ist als nach 2 Tagen und die transiente Reaktivierung von *HHIP* und *IGFBP3* noch nicht wie an Tag 6 nachgelassen hat (s. **Kapitel 5.6**).

5.7.1 *DLK1* und *IGF2*

Die erste Gruppe umfasst die beiden geprägten Gene *DLK1* und *IGF2*. Da genomisches Imprinting durch DNA-Methylierung vermittelt wird, lag die Vermutung nahe, dass *LSH* einen Einfluss auf die Regulierung dieser Gene haben könnte.

In **Abbildung 5.9** ist das Expressionsniveau von *DLK1* und *IGF2* in den Zelllinien im Vergleich zu Normallebergewebe (NL) gezeigt. Es zeigte sich, dass *DLK1* in den Zelllinien HepT1 und HUH6 (j) stark reprimiert ist, wohingegen es in der Zelllinie HepG2 sehr stark exprimiert wird. Auch *IGF2* zeigte sich in Bezug auf die Expression in den Zelllinien verglichen mit der Normalleber deutlich vermindert.

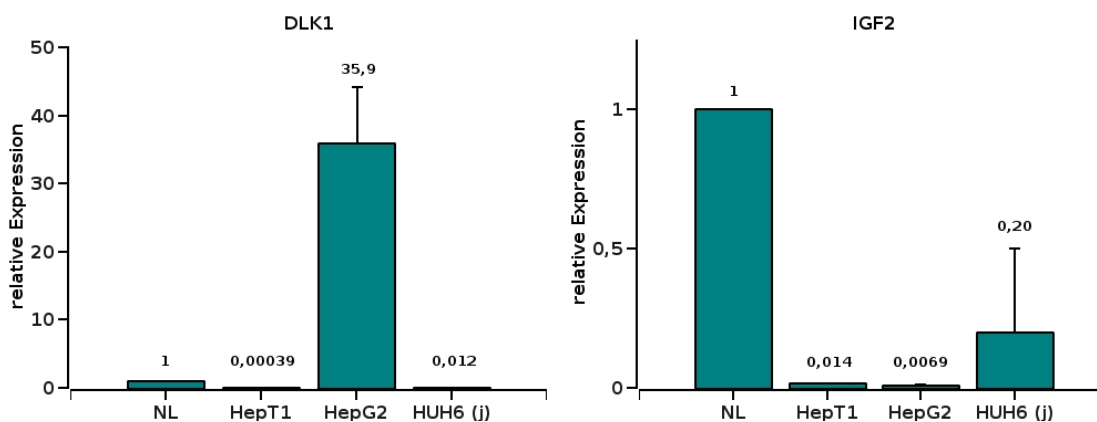


Abbildung 5.9: Expressionslevel von *DLK1* und *IGF2* in normalen Lebergewebe (NL) und den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j)

Durch den Knockdown von *LSH* (siLSH) kam es zu einer Zunahme der *DLK1*-mRNA in allen drei Zelllinien im Vergleich zur Kontrolltransfektion (siCtrl), wobei der Anstieg in den Zelllinien, welche *DLK1* sehr schwach exprimieren (HepT1 und HUH6 (j)) stärker war als in HepG2, die schon eine starke endogene *DLK1*-Expression zeigte (**Abbildung 5.10**). Im Falle von *IGF2* konnte keine nennenswerte Änderung der Expression in den Knockdownzellen (siLSH) gegenüber der Kontrolle (siCtrl) festgestellt werden.

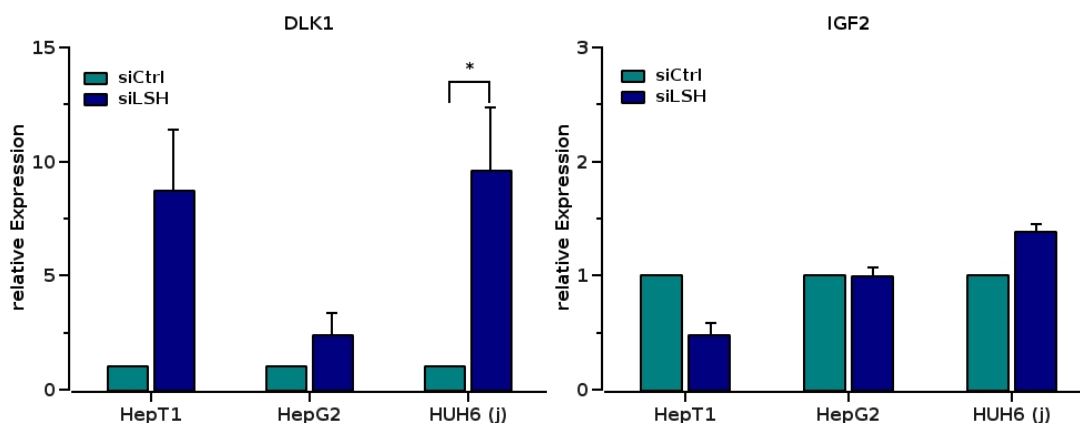


Abbildung 5.10: Expressionsänderung von *DLK1* und *IGF2* nach *LSH*-Knockdown.

5.7.2 *NOTCH3* und *FOXA1*

Die zweite Gruppe potentieller Zielgene von *LSH* beinhaltet *NOTCH3* und *FOXA1*. Diese Gene spielen eine Rolle in der Regulierung zelltypspezifischer Transkription und Differenzierung.

So konnte gezeigt werden, dass *NOTCH3* in hepatozellulären Karzinomen stark exprimiert wird, wohingegen es in normalen Lebergewebe und auch in Leberzirrhosen nicht exprimiert wird [60]. *Reister et al.* untersuchten eine Reihe von Stammzellmarkern, unter diesen auch *NOTCH3*, in Lebersternzellen und konnten zeigen, dass *NOTCH3* in diesen Zellen durch DNA-Methylierung reguliert wird, was es auch im Kontext von *LSH* interessant macht [133].

Das Forkhead Box A1 (*FOXA1*) Gen, auch *HNF-1* (hepatocyte nuclear factor 3 alpha) genannt, kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für entwicklungsspezifische Transkription in der Leber und auch vielen anderen Geweben verantwortlich ist [47] [147].

Auch für *NOTCH3* und *FOXA1* wurde zuerst das Expressionsniveau in den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) mittels qRT-PCR bestimmt und in Relation zur Expression in Normallebern (NL) gesetzt. Es zeigte sich, dass *NOTCH3* in den Zelllinien HepT1 und HUH6 (j) deutlich stärker exprimiert wird als in normalen Lebergeweben. Hingegen zeigten die Zellen der Linie HepG2 eine stark supprimierte Expression von *NOTCH3*.

Der Vergleich der mRNA-Mengen von *FOXA1* erbrachte, dass dieses Gen in den drei Zelllinien sowie in der Normalleber etwa gleich stark exprimiert wird. Allenfalls HepT1 zeigt leicht gesteigerte Werte (**Abbildung 5.11**).

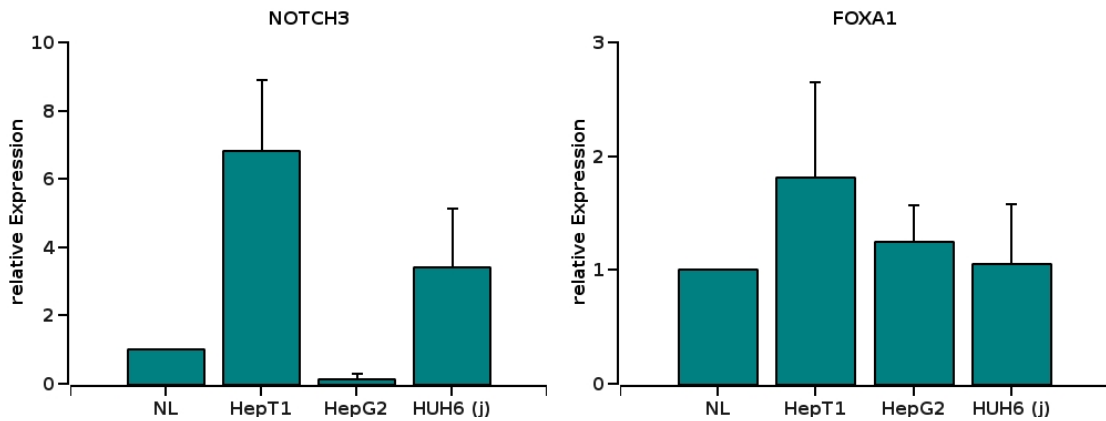


Abbildung 5.11: Expressionslevel von *NOTCH3* und *FOXA1* in normalen Lebergewebe (NL) und den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j)

Im nächsten Schritt wurde auch für diese beiden Gene der Einfluss von *LSH*-Knockdown auf deren Expression untersucht. Wie in **Abbildung 5.12** zu sehen, zeigten die Gene keine eindeutige Veränderung ihrer Expression infolge eines Knockdowns von *LSH* im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion. Lediglich im Falle von *FOXA1* konnte in den Zelllinien HepG2 und HUH6 (j) eine leichte Steigerung der mRNA-Menge festgestellt werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

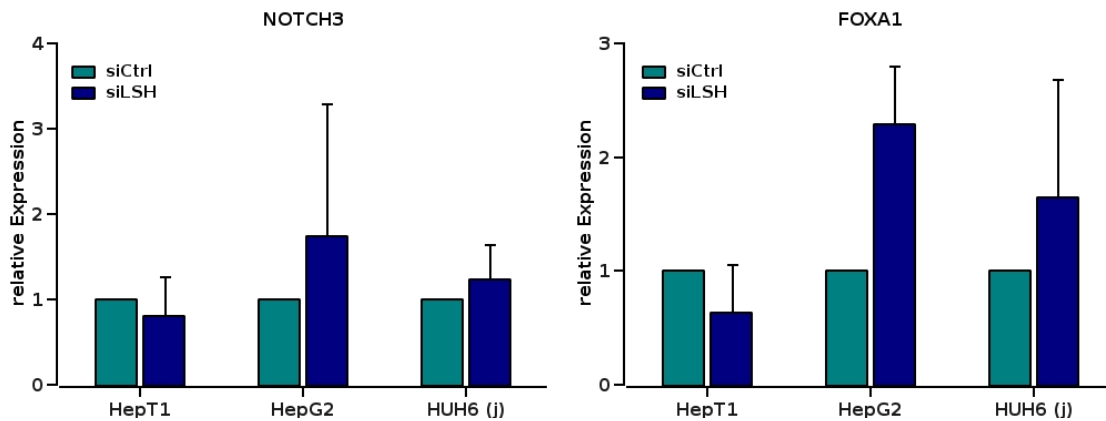


Abbildung 5.12: Expressionsänderung von *NOTCH3* und *FOXA1* nach *LSH*-Knockdown

5.7.3 *CDKN1A*, *CDKN1C* und *CDKN2A*

Die Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKNs) sind essentielle Faktoren in der Regulation des Zellzyklus. Sie inhibieren die Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) und hemmen somit die Progression des Zellzyklus.

Die Expression von *CDKN1A*, auch *p21* genannt, wird durch das prominente Tumorsuppressorgen *p53* reguliert und vermittelt somit den *p53* induzierten Arrest in der G1-Phase

des Zellzyklus [35]. Dazu inhibiert *CDKN1A* vor allem den CDK-Komplex 2 [14]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *CDKN1A* direkt mit dem *Proliferating cell nuclear antigen* (*PCNA*) interagiert und dadurch die DNA-Synthese blockiert [173].

CDKN1C (*p57*) ist ein geprägtes Gen, welches vom maternalen Allel exprimiert wird. Es kontrolliert vor allem in der G1-Phase zahlreiche CDK-Komplexe. Epigenetische Downregulation und Mutation in diesem Gen stehen mit vielen Tumorentitäten und dem Beckwith-Wiedemann Syndrom in Verbindung [121, 90]. Aus diesem Grund ist *CDKN1C* in Hepatoblastomen von spezieller Bedeutung, da Kinder mit BWS ein deutlich erhöhtes Hepatoblastomrisiko haben (s. **Kapitel 1.1.2**).

CDKN1A zeigte sich in den Zelllinien HepT1 und HUH6 (j) ähnlich stark exprimiert wie in den zum Vergleich herangezogenen normalen Lebergeweben (NL). Dagegen ergab sich bei der Untersuchung der Expression in der Zelllinie HepG2 eine deutliche Reduktion der relativen mRNA-Menge von *CDKN1A* (**Abbildung 5.13**).

Die Expression des Gens *CDKN1C* wurde ebenfalls mit Hilfe von qRT-PCR ermittelt. Hier zeigte sich, dass *CDKN1C* vor allem in der Zelllinie HepG2, aber auch in HUH6 (j) deutlich reprimiert ist. In HepT1 dagegen ist *CDKN1C* etwas stärker exprimiert als in der Normalleber.

Zuletzt wurde das Expressionsniveau von *CDKN2A* untersucht. Dies war in allen drei Zelllinien, vor allem aber in HepT1 deutlich erhöht, was mit der Theorie der paradox erhöhten p16-Level in aggressiven Tumoren übereinstimmt [137] (**Abbildung 5.13**).

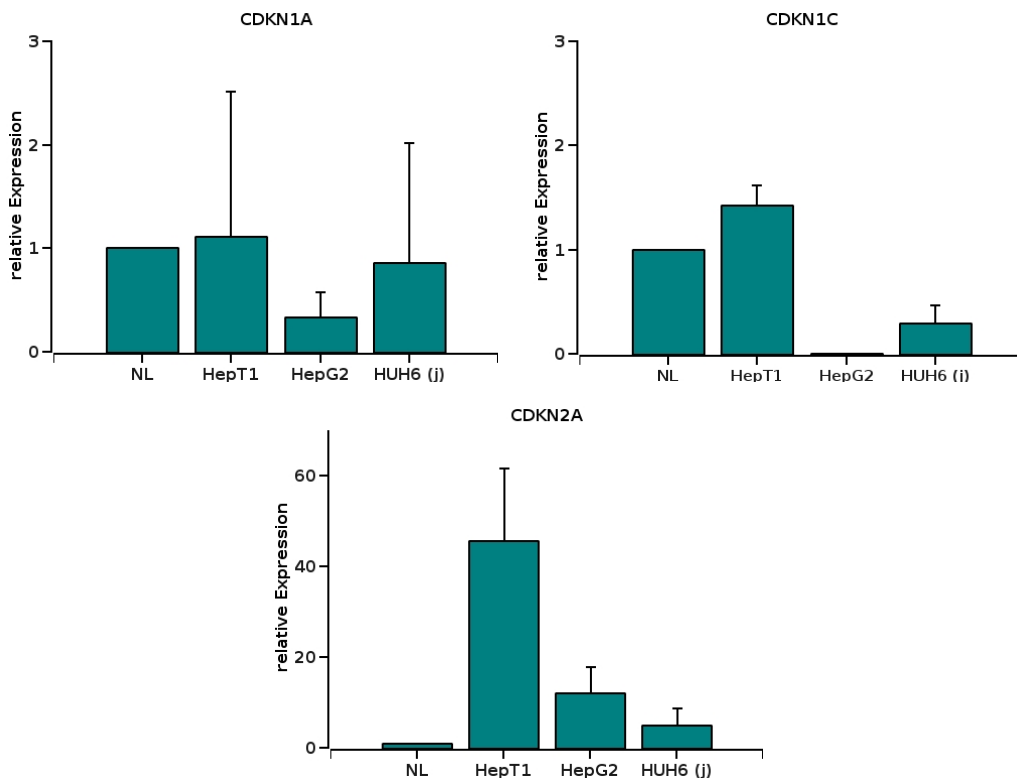


Abbildung 5.13: Expressionslevel von *CDKN1A*, *CDKN1C* und *CDKN2A* in normalem Lebergewebe und den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j)

Die durch den Knockdown von *LSH* herbeigeführten Änderungen der Expression der CDKNs waren nicht sehr deutlich. Im Fall von *CDKN1A* und *CDKN1C* zeigte sich eine leichte Erhöhung der mRNA-Level in den Zelllinien HepG2 und HUH6 (j), während bei HepT1 keine Veränderung zu beobachten war. Bemerkenswert ist der starke Anstieg der *CDKN2A*-Expression in der Zelllinie HepG2 nach *LSH*-Knockdown (**Abbildung 5.14**).

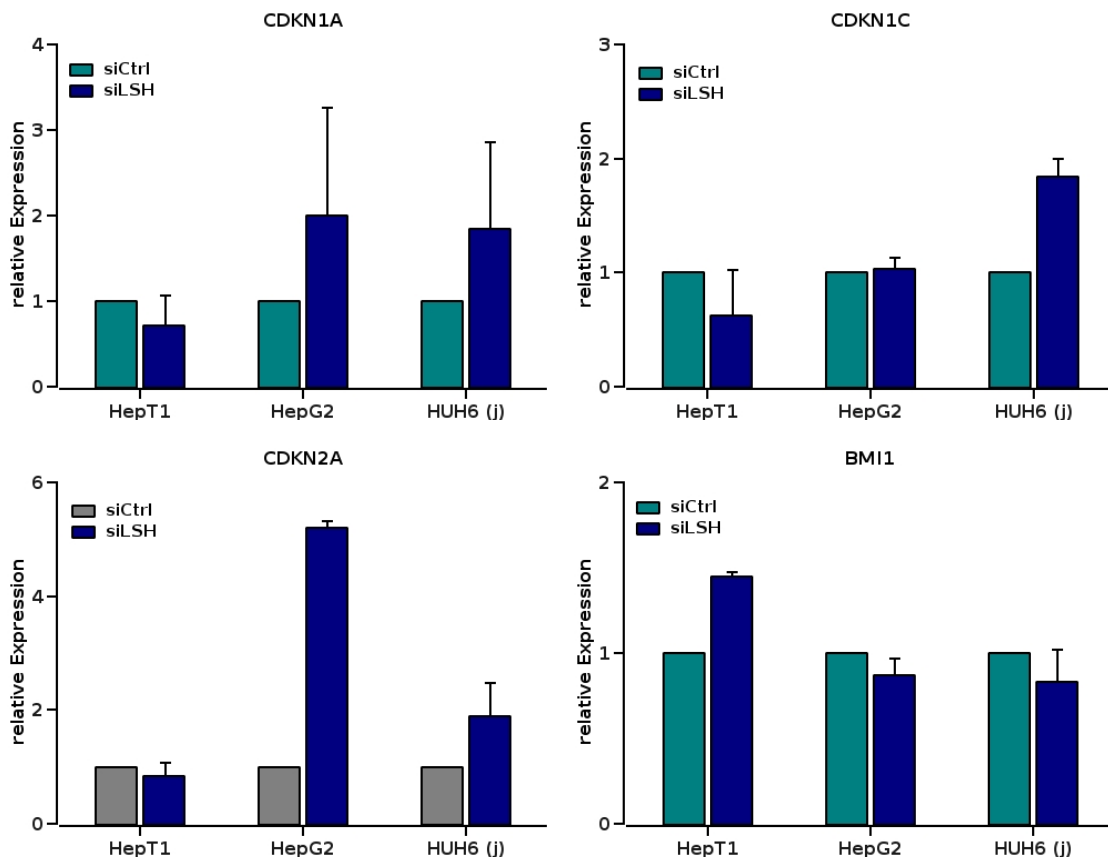


Abbildung 5.14: Expressionsänderung von *CDKN1A*, *CDKN1C* und *CDKN2A* nach *LSH*-Knockdown

Sun et al. beschreiben, dass die *LSH*-Knockdown abhängige Änderung der *CDKN2A*-Expression nicht durch Änderung der DNA-Methylierung, sondern durch Reprimierung des negativen *CDKN2A*-Regulators *BMI1* zustande kommt [152]. Aus diesem Grund wurde in den *LSH*-Knockdownzellen ebenfalls die Expression von *BMI1* bestimmt.

Abbildung 5.15 zeigt, dass die Expressionsänderung von *CDKN2A* nach *LSH*-Knockdown invers mit der Expressionsänderung von *BMI1* korreliert. Dies stützt die Hypothese, dass *LSH* über den Regulator *BMI1* Einfluss auf die Expression von *CDKN2A* nimmt.

5.8 Analyse der globalen und lokalen DNA-Methylierung

Da der *LSH*-Knockdown zu einer Reaktivierung der Gene *HHIP*, *IGFBP3*, *DLK1* und *CDKN2A* führte (s. **Kapitel 6.4**), wurde untersucht, ob der Einfluss von *LSH* auf diese Gene auf Veränderungen der DNA-Methylierung beruht.

Zusätzlich wurde der *IGF2/H19*-Lokus als Beispiel für eine weitere geprägte Region gewählt. Ergänzend sollte durch die Untersuchung des Methylierungsgrades von *LINE-1* ein Einblick in den Einfluss von *LSH* auf die globale Methylierung in Hepatoblastomen gewonnen werden. Die DNA-Methylierung wurde mittels Pyrosequencing ermittelt.

Dabei zeigte sich in allen Fällen, dass durch den *LSH*-Knockdown keine Änderung der Methylierungsgrades herbeigeführt wurde, was einen alternativen Einfluss von *LSH* auf diese Gene impliziert. Dennoch lieferte die Analyse der DNA-Methylierung einige Ergebnisse zum allgemeinen Verständnis der Biologie in Hepatoblastomen.

Zu Beginn wurden jeweils die Methylierungsgrade in DNA eines gesunden Probanden (genomische DNA) und der *in vitro* durch das Enzym *M.SssI* methylierten DNA (positiv Kontrolle) bestimmt. Diese beiden Kontrollen dienten dazu, die in Tumorzellen gemessenen Ergebnisse besser einordnen zu können.

Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen biologischen Replikaten und deren Standardabweichung.

5.8.1 *LINE-1*

LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element 1) ist mit 500.000 Kopien das häufigste Retrotransposon im menschlichen Genom. Insgesamt umfasst es damit etwa 17 % des gesamten Genoms [10]. Die meisten dieser Transposons sind durch zahlreiche Mutationen degradiert und damit nicht funktionstüchtig. Dennoch bleiben einige in voller Länge intakte Kopien bestehen [91]. Da die Expression von *LINE-1* zu chromosomaler Instabilität und Replikationsfehlern führt, sind die meisten Kopien transkriptionell stillgelegt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Suppression auf das Vorliegen von DNA-Methylierung zurückzuführen ist [70]. Wegen seines hohen Anteils am Gesamtgenom und der Tatsache, dass die *LINE-1* Loci einen hohen DNA-Methylierungsgrad aufweisen [181], eignen sie sich gut für die Abschätzung der genomweiten Methylierungsgrade.

Zur Analyse der DNA-Methylierung wurden die Primer des *LINE-1* Pyromark-Kit der Firma Qiagen verwendet.

Wie schon in der Literatur beschrieben, zeigte sich an unbehandelter DNA ein CpG-Methylierungsgrad von etwa 75 %. Durch die Behandlung mit *M.SssI* wurde die Methylierung auf 83 % gesteigert (**Abbildung 5.15**).

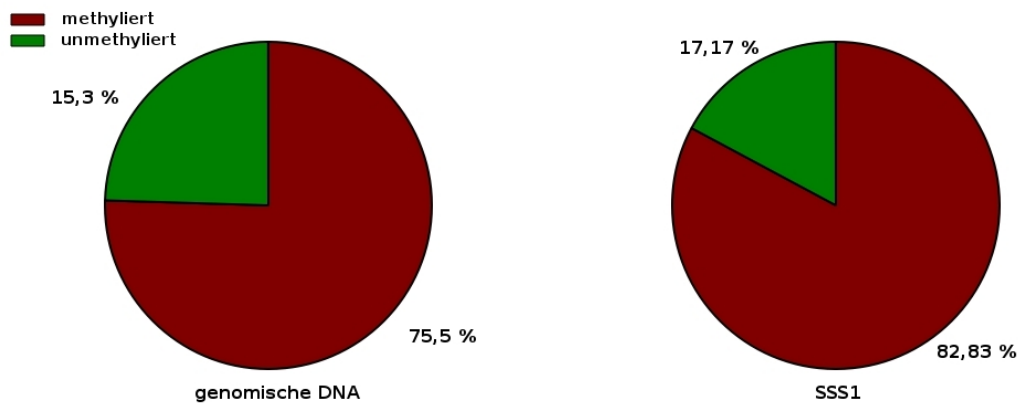


Abbildung 5.15: Methylierungsgrad von *LINE-1* in genomischer DNA und nach Behandlung mit *M.SssI*

Anschließend wurde die CpG-Methylierung von *LINE-1* in den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) analysiert. Es wurde jeweils die DNA von Zellen nach einem *LSH*-Knockdown (siLSH) und nach Kontrolltransfektion mit NonTarget siRNA (siCtrl) untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Knockdown von *LSH* keinen Einfluss auf die genomweite Methylierung von differenzierten Zellen hat (Abbildung 5.16). Eine schon etablierte DNA-Methylierung lässt sich also durch Ausschalten von *LSH* nicht löschen.

Dennoch konnten durch die Analyse eine generelle Eigenschaft von Krebszellen auch für die Hepatoblastome bestätigt werden, nämlich dass sie genomweit hypomethyliert sind. Die Zelllinie HepT1 zeigt mit einer Reduktion von etwa 30 % gegenüber der genomischen DNA den deutlichsten Abfall. Aber auch die Linien HepG2 und HUH6 (j) sind im Vergleich zur Kontrolle hypomethyliert.

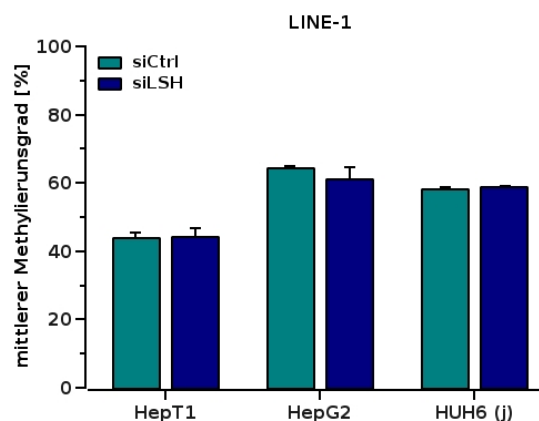


Abbildung 5.16: Einfluss von *LSH* auf den Methylierungsgrad von *LINE-1*

5.8.2 HHIP

Da sich nach Knockdown von *LSH* ein deutlicher Anstieg der Expression des Tumorsuppressorgens *HHIP* gezeigt hatte (s. Kapitel 5.6), wurde untersucht ob diese Expres-

sionssteigerung durch eine Änderung des Methylierungsgrades zustande kommt. In **Abbildung 5.17** ist die Lage der verwendeten PCR- und Sequenzierprimer und die somit erfassten CpGs schematisch dargestellt.

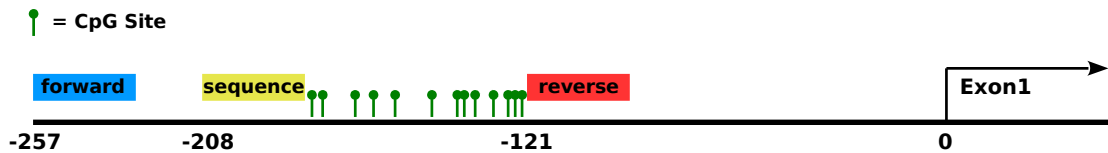


Abbildung 5.17: Primerlokalisierung und der untersuchte CpG-Sites im *HHIP*-Promotor

Zuerst wurde wiederum der Gehalt an DNA-Methylierung in genomischer DNA und an DNA, welche zuvor *in vitro* mit dem Enzym *M.SssI* methyliert wurde, gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Genom einer gesunden Zelle der Promotor von *HHIP* nur zu einem sehr geringen Anteil (etwa zu 8 %) methyliert ist. In der mit *M.SssI* behandelten DNA stieg der Grad an Methylierung auf 83 % (**Abbildung 5.18**).

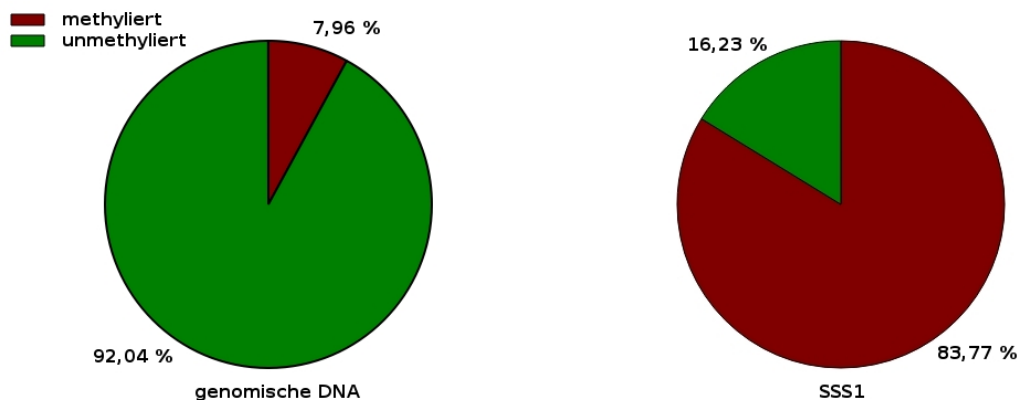


Abbildung 5.18: Methylierungsgrad von *HHIP* in genomischer DNA und nach Behandlung mit *M.SssI*

Im Anschluss wurde überprüft, ob sich durch den Knockdown von *LSH* ein Unterschied im Methylierungsgrad in den Hepatoblastozelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) feststellen lässt. Wie in **Abbildung 5.19** zu sehen, konnte kein Unterschied zwischen den Knockdownzellen (siLSH) und den Kontrolltransfektionen (siCtrl) detektiert werden. Dies lässt auf einen anderen Mechanismus schließen, durch den der Knockdown von *LSH* zu der oben beschriebenen Expressionssteigerung von *HHIP* führt.

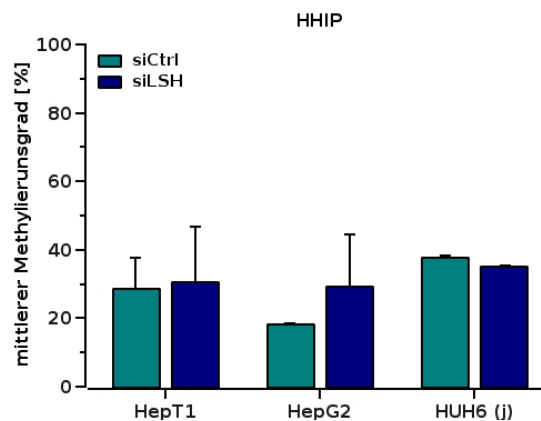


Abbildung 5.19: Einfluss von *LSH* auf den Methylierungsgrad von *HHIP*

Vergleicht man aber den Methylierungsgrad der Tumorzellen mit dem der genomischen DNA, stellt man fest, dass der Promotor von *HHIP* in den Zelllinien deutlich stärker methyliert ist (20 %–40 %). Dies untermauert die Annahme, dass *HHIP* in Hepatoblastomen durch aberrante DNA-Methylierung inaktiviert ist.

5.8.3 *IGFBP3*

Der Fall des Tumorsuppressors *IGFBP3* verhält sich ähnlich wie der von *HHIP*. Auch hier konnte durch *LSH*-Knockdown eine starke Reaktivierung der Expression in den Zelllinien erzielt werden (s. **Kapitel 5.6**). Die Lokalisation der zur Untersuchung der Promotormethylierung von *IGFBP3* verwendeten Primer und der untersuchten CpGs ist in **Abbildung 5.20** dargestellt.

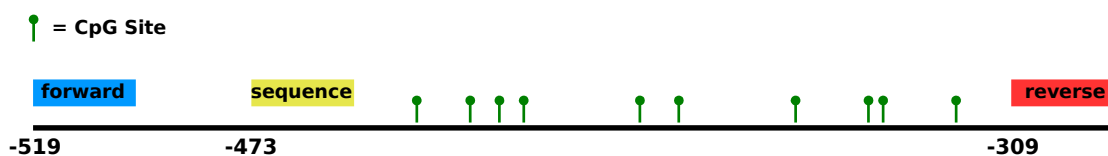


Abbildung 5.20: Primerlokalisierung und untersuchte CpG-Sites im *IGFBP3*-Promotor

Die DNA-Methylierung in genomischer DNA und mit *M.SssI* behandelter DNA zeigte folgende Ergebnisse: In unbehandelter DNA ist der Promotor von *IGFBP3* sehr schwach methyliert (15 %), was die starke Expression in Normalgewebe erklärt. Durch *in vitro* Methylierung mit *M.SssI* konnte eine mittlere Methylierung von 93 % erzielt werden (**Abbildung 5.21**).

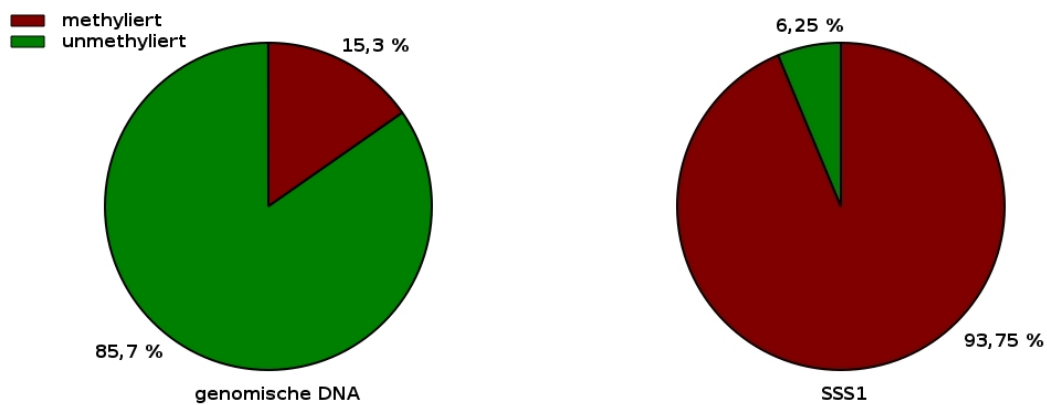


Abbildung 5.21: Methylierungsgrad von *IGFBP3* in genomischer DNA und nach Behandlung mit *M.SssI*

In **Abbildung 5.22** ist zu sehen, dass auch die Untersuchung des Methylierungsgrades der Promotorregion von *IGFBP3* zeigt, dass in den Tumorzelllinien eine deutlich höhere Methylierung (70 %–80 %) vorliegt als in der genomischen DNA, was die These stützt, dass der Suppressor des IGF-Signalweges in Hepatoblastomen durch CpG-Methylierung inaktiviert ist.

Die Analyse des Einflusses von *LSH* auf die Methylierung am *IGFBP3*-Promotor zeigte wiederum keinen Unterschied zwischen dem Methylierungsgrad in den Knockdownzellen und den Zellen der Kontrolltransfektion (**Abbildung 5.22**).

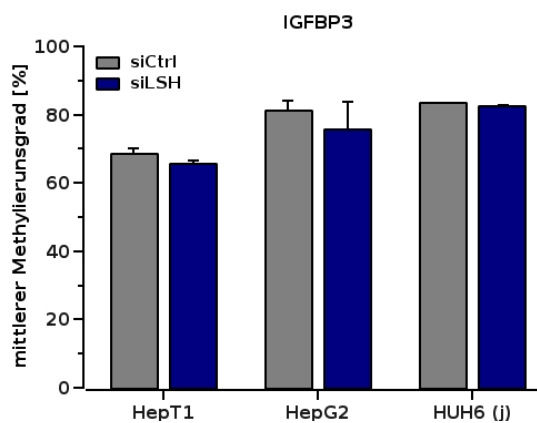


Abbildung 5.22: Einfluss von *LSH* auf den Methylierungsgrad von *IGFBP3*

5.8.4 *DLK1*

Auch der Promotor des *DLK1*-Gens wurde auf seine CpG-Methylierung hin untersucht, da vor allem in den Zelllinien HepT1 und HUH6 (j) eine deutliche Reexpression von *DLK1* nach *LSH*-Knockdown zu messen war (s. **Kapitel 6.4**).

Die Analyse der Methylierung von genomischer DNA zeigte, dass der Methylierungsgrad mit 62,4 % etwas höher lag als der für ein geprägtes Gen erwarteten von 50 %. In der

Positiv-Kontrolle (*M.SssI*) wurde eine mittlere Methylierung von 85 % erzielt (**Abbildung 5.23**).

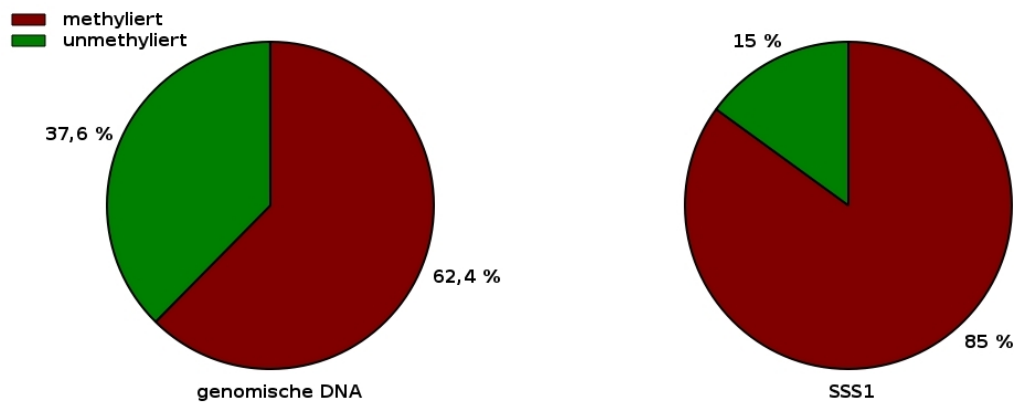


Abbildung 5.23: Methylierungsgrad von *DLK1* in genomischer DNA und nach Behandlung mit *M.SssI*

Wie auch bei den vorherigen Analysen konnte auch in der DMR von *DLK1* keine Änderung der DNA-Methylierung nach *LSH*-Knockdown festgestellt werden. Dennoch war zu beobachten, dass die Hepatoblastomzelllinien stark vom Methylierungsgrad der genomischen DNA abwichen. HepT1 zeigte eine starke Reduktion der CpG-Methylierung auf etwa 10 %, während HepG2 und HUH6 (j) stärker methyliert waren als in der genomischen Kontrolle (**Abbildung 5.24**). Dies identifiziert *DLK1* als ein Gen, welches in Hepatoblastomen von aberranter DNA-Methylierung betroffen ist.

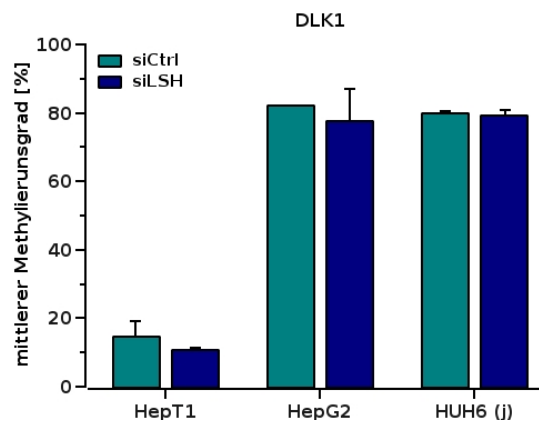


Abbildung 5.24: Einfluss von *LSH* auf den Methylierungsgrad von *DLK1*

5.8.5 IGF2/H19

Der *IGF2/H19*-Lokus enthält eine *CTCF*-Bindestelle und wird somit durch DNA-Methylierung reguliert. *IGF2* zeigte zwar nach *LSH*-Knockdown keine Expressionsänderung (s. **Kapitel 6.4**), dennoch sollte als Beispiel für ein weiteres geprägtes Gen, sowie für einen *CTCF*-Lokus, der Einfluss von *LSH* auf die Methylierung dieses Bereichs untersucht

werden. In **Abbildung 5.25** ist der Methylierungsgrad von *IGF2/H19* von genomischer DNA und mit *M.SssI* methylierter DNA zu sehen.

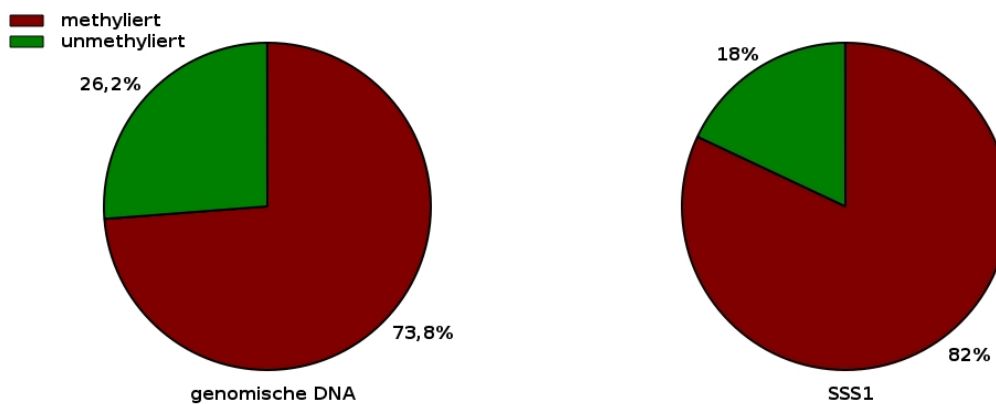


Abbildung 5.25: Methylierungsgrad von *IGF2* in genomischer DNA und nach Behandlung mit *M.SssI*

Die Zelllinien HepT1 und HUH6 (j) zeigten nach *LSH*-Knockdown keine Änderung des Methylierungsgrades. Gleichzeitig wiesen sie einen mit der genomischen DNA vergleichbaren DNA-Methylierungsgrad auf. Dahingegen fiel die Linie HepG2 durch einen deutlich niedrigeren Methylierungsgrad auf (**Abbildung 5.26**).

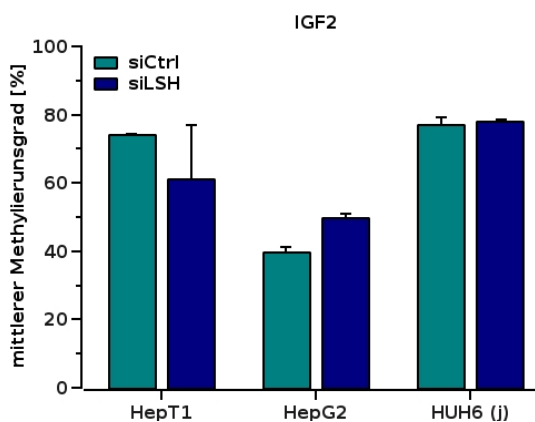


Abbildung 5.26: Einfluss von *LSH* auf den Methylierungsgrad von *IGF2*

5.8.6 *CDKN2A*

Der Zellzyklusinhibitor *CDKN2A* zeigte in den vorangegangenen Knockdownexperimenten in den Zelllinien HepG2 und HUH6 (j) eine Expressionssteigerung gegenüber der Kontrolltransfektion (s. **Kapitel 6.4**). Deshalb sollte untersucht werden, welche Rolle die Methylierung des zugehörigen Promotors in diesem Zusammenhang spielt. **Abbildung 5.27** zeigt die Lokalisation der verwendeten Primer und die dadurch analysierten CpG-Sites.

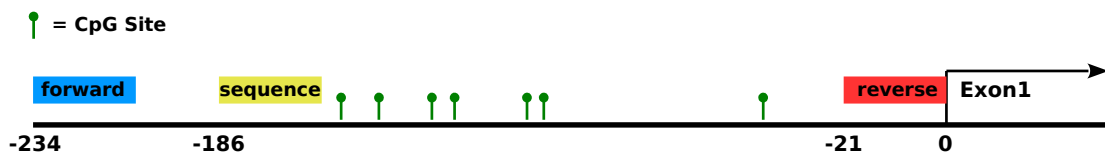


Abbildung 5.27: Primerlokalisierung und untersuchte CpG-Sites im *CDKN2A*-Promotor

Die ersten Messungen evaluierten den Methylierungsgrad in genomischer DNA eines gesunden Probanden und in DNA, welche durch *M.SssI* künstlich methyliert wurde (**Abbildung 5.28**). Wie zu erwarten, weist *CDKN2A* einen sehr niedrigen Methylierungsgrad (7 %) auf. Durch die Behandlung mit dem Enzym *M.SssI* wurde die mittlere Methylierung der Positivkontrolle auf 91 % gesteigert.

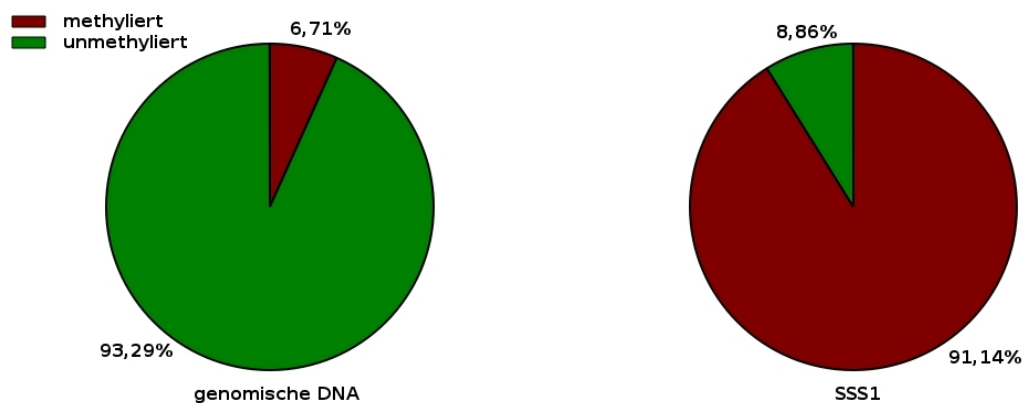


Abbildung 5.28: Methylierungsgrad von *CDKN2A* in genomischer DNA und nach Behandlung mit *M.SssI*

Die in **Abbildung 5.29** dargestellten Ergebnisse zeigen die Methylierungsdaten von *LSH*-Knockdownzellen und Kontrollzellen im Vergleich. Wie zu erwarten ist der Gehalt an methylierten CpGs sehr niedrig, was mit der hohen endogenen Expression von *CDK2A* in den Hepatoblastomzelllinien korreliert. Auch dass der Knockdown von *LSH* keine Änderung am Methylierungsgrad der *CDKN2A*-Promotors herbeiführt, fügt sich in das von *Sun et al.* gezeigte [152] und oben bestätigte Konzept, dass sich die Steigerung der *CDKN2A*-Expression nach *LSH*-Knockdown nicht durch Änderung der DNA-Methylierung, sondern durch Einfluss auf das Regulatorprotein *BMI1* ergibt (s. **Kapitel 6.4**).

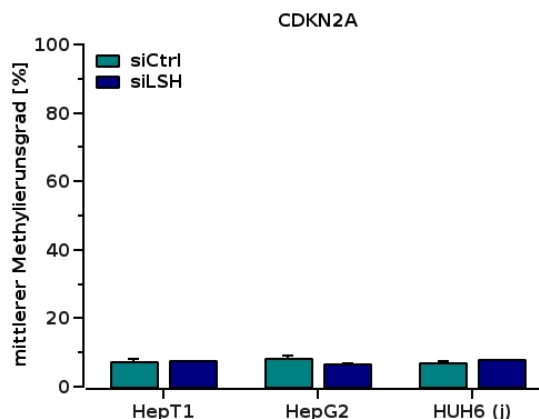


Abbildung 5.29: Einfluss von *LSH* auf den Methylierungsgrad von *CDKN2A*

5.8.7 Methylierungsanalyse nach Langzeitknockdown

Da der viertägige Knockdown von *LSH* keinen Einfluss auf den Methylierungsgrad der untersuchten Genloci zeigte, wurde in einem folgenden Experiment überprüft, ob die Methylierung über einen längeren Zeitraum der *LSH*-Abwesenheit verloren geht. Während der Replikation müssen auf dem neu synthetisierten DNA-Strang die Methylierungen entsprechend den Markierungen des alten Strangs neu etabliert werden (Maintenance-Methylierung). Ob *LSH* nicht nur für die *de novo* Methylierung essentiell ist, sondern auch eine Rolle in der Erhaltungsmethylierung spielt, sollte überprüft werden, indem der Knockdown über 7 Tage ausgeführt wurde.

Abbildung 5.30 zeigt alle Ergebnisse der Pyrosequencinganalysen der DNA-Methylierung nach 7 Tagen. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten aus den Experimenten nach 4 tägigem Knockdown. Der Knockdown von *LSH* (siLSH) zeigte im Vergleich zu den Kontrolltransfektionen (siCtrl) keine Verminderung der Methylierung an den untersuchten Genloci.

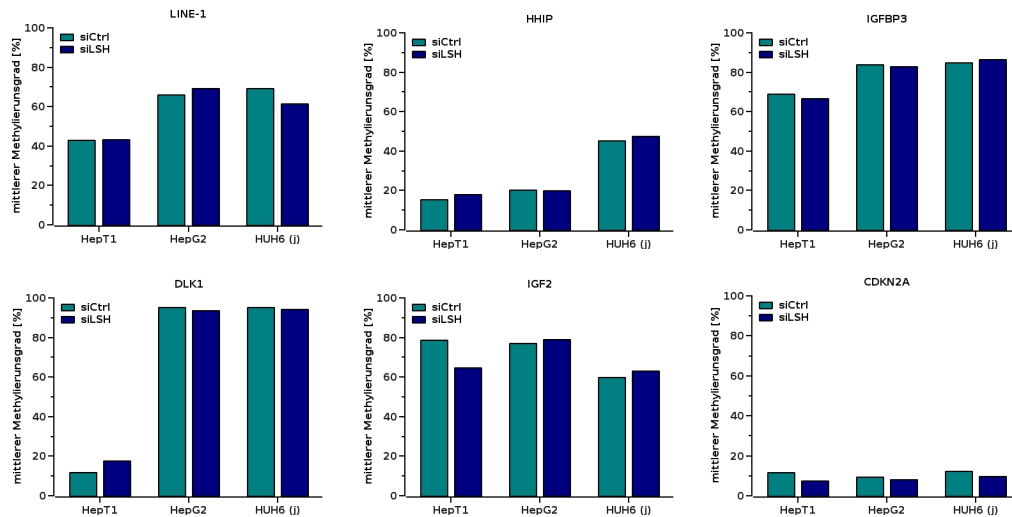


Abbildung 5.30: Zusammenfassung der Untersuchung des Methylierungsgrades nach 7 Tagen

5.9 Knockdown von *LSH* beeinträchtigt nicht die Vitalität der Zellen, hemmt aber deren Proliferation

Um nun zu untersuchen, ob *LSH* eine funktionelle Rolle in der Biologie von Hepatoblastomzellen spielt, wurde der Einfluss des *LSH*-Knockdowns auf das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen analysiert.

Zu Beginn wurde mit Hilfe des MTT-Assays gemessen, ob der Knockdown von *LSH* zu einer verminderten Zellvitalität führt.

Es wurde die MTT-Umsetzung am Tag der Transfektion (0d) sowie an den folgenden 3 Tagen bestimmt. Dabei zeigte der Knockdown keine Abnahme der Vitalität der mit *LSH*-siRNA transfizierten Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) (Abbildung 5.31). Das Ausschalten von *LSH* in Hepatoblastomzellen führt daher nicht zu vermehrter Induktion von Apoptose in diesen Zellen.

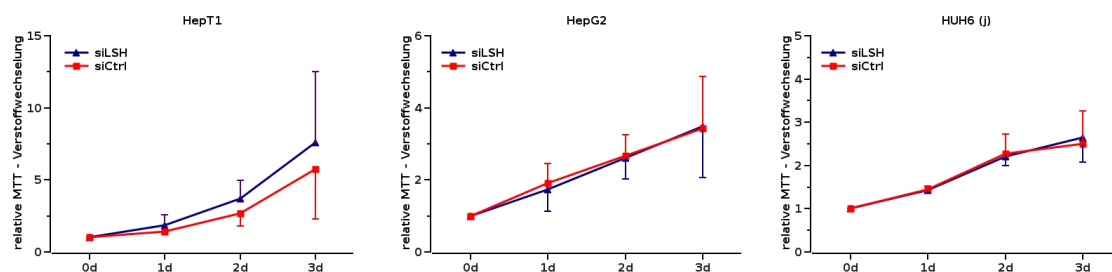


Abbildung 5.31: Einfluss von *LSH*-Knockdown (siLSH) auf das Überleben von Hepatoblastomzellen im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion (siCtrl)

Als zweite funktionelle Untersuchung wurde der BrdU-Assay, der die Zellproliferation misst, verwendet. Die Proliferation wurde jeweils am Tag der Transfektion (nach 6 Stunden)

und an den folgenden 4 Tagen gemessen. Die in **Abbildung 5.32** dargestellten Daten zeigen, dass der Knockdown von *LSH* die Proliferation in allen drei Zelllinien (HepT1, HepG2 und HUH6 (j)) hemmt. Dass in der Zelllinie HepT1 die Hemmung am stärksten (etwa 50 %) und in HUH6 (j) am schwächsten (etwa 20 %) ausfällt, kann daran liegen, dass HepT1 in Zellkultur deutlich schneller als die anderen Zelllinien wächst, wohingegen HUH6 (j) am langsamsten proliferiert. Spätestens am letzten Messungstag zeigte sich in allen Zelllinien eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate in *LSH*-Knockdownzellen (siLSH), verglichen mit Kontrolltransfektionen (siCtrl).

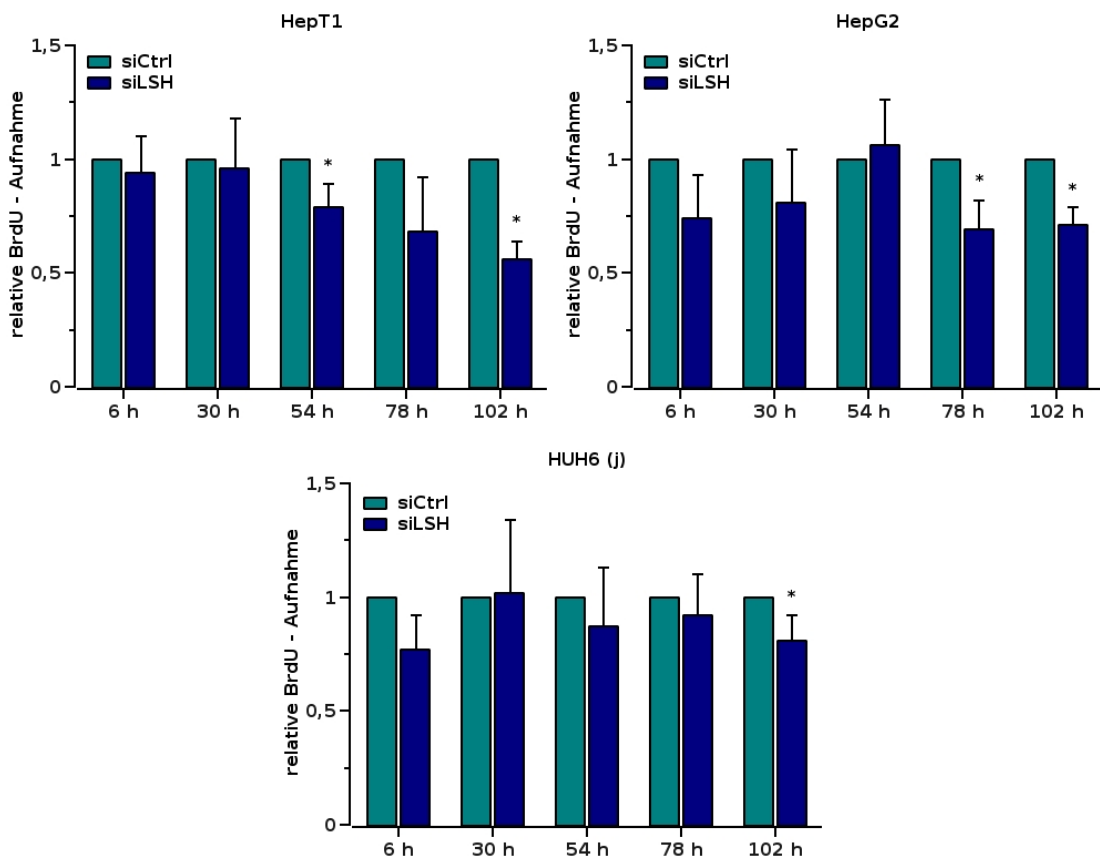


Abbildung 5.32: Einfluss von *LSH*-Knockdown (siLSH) auf die Proliferation von Hepatoblastomzellen im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion (siCtrl).

Als letzter Schritt wurde der Proliferationsversuch mit dem BrdU-Assay auf einen längeren Zeitraum ausgedehnt, um zu überprüfen, wie weit die Proliferation durch *LSH*-Knockdown reduziert werden kann. Die Messungen wurden nach 6 Stunden am Tag der Transfektion sowie an den Tagen 3, 7 und 10 nach Transfektion durchgeführt. Wie in **Abbildung 5.33** zu sehen, entspricht das Ausmaß der Proliferationshemmung zu den vergleichbaren Zeitpunkten etwa den Ergebnissen aus den Kurzzeitexperimenten. Jedoch konnte auf längere Knockdowndauer kein stärkerer Effekt erzielt werden. Der proliferationshemmende Effekt scheint nach einiger Zeit ein Plateau zu erreichen.

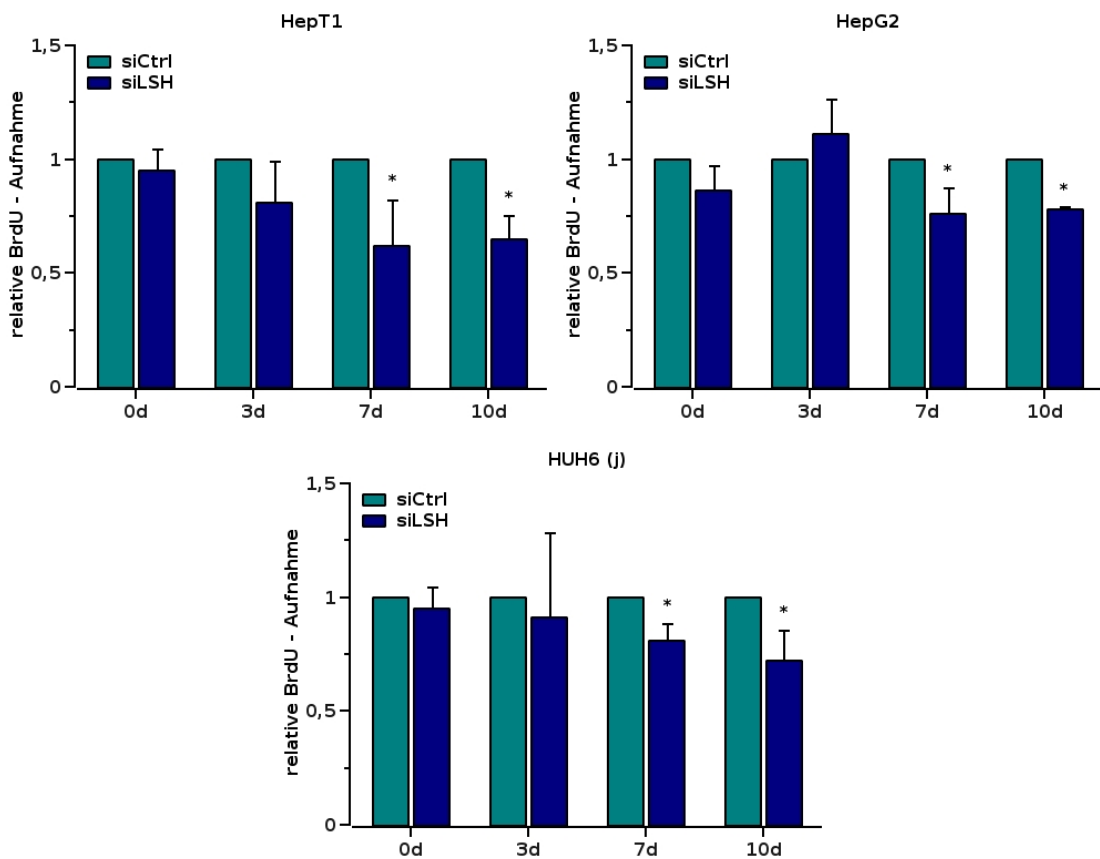


Abbildung 5.33: Langzeiteinfluss von *LSH*-Knockdown (siLSH) auf die Proliferation von Hepatoblastomzellen im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion (siCtrl).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Knockdown von *LSH* zwar kein Zelltod herbeigeführt wird, die Proliferationsrate der Hepatoblastomzellen jedoch bis zu einem gewissen Grad reduziert werden kann.

5.10 Regulation von *LSH* – Eine *in silico* Analyse

Um Einblicke in die Regulation von *LSH* und damit in die Überexpression von *LSH* in Hepatoblastomen zu erhalten, wurde in dessen Promotor nach Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren *FOXM1*, *GLI1*, *LEF1* und *p63* gesucht. Es wurde die Sequenz, welche 2,5 kb vor Exon 1 liegt, mit der Software *ACTG* untersucht.

5.10.1 Der Transkriptionsfaktor *FOXM1*

In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass *LSH* ein Zielgen des Transkriptionsfaktors *FOXM1* sein könnte, da die Expression von *LSH* positiv mit der Expression von *FOXM1* korreliert ist [174]. Um diese These zu überprüfen, wurden in den Zelllinien

HepT1, HepG2 und HUH6 (j) die Expression von *FOXM1* mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. In **Abbildung 5.34** ist zu sehen, dass *FOXM1* in allen Zelllinien deutlich stärker (bis zu 100-fach) exprimiert ist als in normalem Lebergewebe .

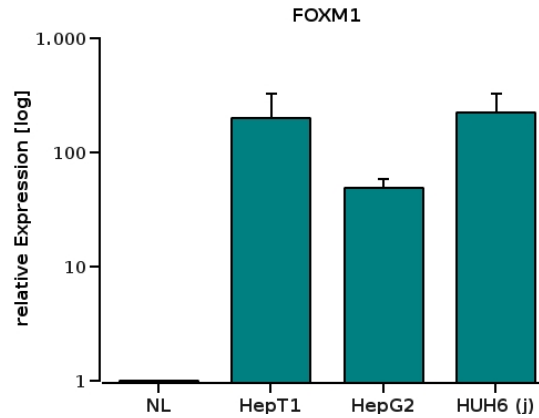


Abbildung 5.34: Expression des Transkriptionsfaktors *FOXM1* in den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) im Vergleich zu Normallebergewebe (NL)

Als nächster Schritt wurde der Promotor von *LSH* auf *FOXM1*-Bindungsstellen hin untersucht. In der Literatur finden sich einige verschiedene Charakterisierungen der *FOXM1*-Bindungssequenz. **Tabelle 5.1** zeigt die möglichen Sequenzen und die daraus für unsere Untersuchung hervorgehende Sequenz.

Tabelle 5.1: *FOXM1*-Bindungssequenzen (IUPAC-Code)

Bindungssequenz (5'-3')	Quelle
K T T A T T T G T T T K	[189]
T T T G T T T G T A T T	[111]
T T T G T T T G T T T G T T T T	[177]
T G T T T A	[103]
T T R T T T R T W T K	

Für *FOXM1* konnten folgende potentielle Bindestellen identifiziert werden.

Tabelle 5.2: Identifizierte Bindestellen für den Transkriptionsfaktor *FOXM1* im *LSH*-Promotor. Nicht übereinstimmende Nukleotide sind fett und rot dargestellt

Position (5' vor Exon 1)	Sequenz (5'-3')	Übereinstimmung
-1854	TTATTTA CT TG	91 %
-653	CT GT TTG GTTT	82 %

Die Lokalisation der Bindungsstelle von *FOXM1* sowie der anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren ist in **Abbildung 5.36** zu sehen.

5.10.2 Der Transkriptionsfaktor *GLI1*

Der Transkriptionsfaktor *GLI1* ist einer der Effektoren des aktivierten Hedgehog-Signalweges, welcher in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt und in zahlreichen Tumoren als übermäßig aktiviert beschrieben wurde [24, 194]. Die Untersuchung der Expression von *GLI1* ergab eine etwa gleich starke Expression in den Normallebern, sowie in den Tumorzelllinien HepT1 und HepG2. HUH6 (j) dagegen exprimierte deutlich weniger *GLI1* (**Abbildung 5.35**).

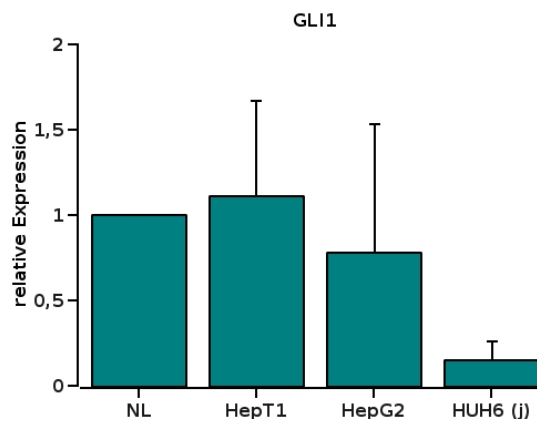


Abbildung 5.35: Expression des Transkriptionsfaktors *GLI1* in den Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 (j) im Vergleich zu Normallebergewebe (NL)

GLI1 zeigt ausschließlich nukleäre Lokalisation und bindet spezifisch an folgende Konsensus-Sequenz:

5'-GACCACCCA-3' [95]

Für diese Suchsequenz konnten 4 putative Bindestellen im *LSH*-Promotor identifiziert werden:

Tabelle 5.3: Identifizierte Bindestellen für den Transkriptionsfaktor *GLI1* im *LSH*-Promotor. Nicht übereinstimmende Nukleotide sind fett und rot dargestellt

Position (5' vor Exon 1)	Sequenz (5'-3')	Übereinstimmung
-2170	GACC GCCT	77,77 %
-1727	TAT CACCCA	77,77 %
-1677	GACCAC CTG	77,77 %
-519	TCC CACCCA	77,77 %

Die Lokalisation der *GLI1*-Bindestellen ist in **Abbildung 5.36** graphisch zusammengefasst.

5.10.3 Der Transkriptionsfaktor *LEF1*

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass aberrantes Wnt-Signaling eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Hepatoblastomen zu spielen scheint. Durch Mutation von *β -Catenin* und epigenetische Stilllegung des hemmenden Faktors *SFRP1* in Hepatoblastomen kommt es zu einer Überaktivierung des Wnt-Signalweges [172, 1, 144, 101]. Daher wurde untersucht, ob der aktivierende Transkriptionsfaktor des Wnt-Pathways *LEF*, einen Einfluss auf die Regulation von *LSH* haben könnte.

Dies ist die untersuchte Konsensus-Sequenz, an welche der *TCF/LEF1*-Komplex bindet:

5'-CCTTTGATCT-3' [78]

Im *LSH*-Promotor konnten zwei Sequenzen gefunden werden, die eine Übereinstimmung von 80 % zur gesuchten Zielsequenz aufwiesen. In **Tabelle 5.4** sind die identifizierten Bindestellen von *LEF1* aufgeführt.

Tabelle 5.4: Identifizierte Bindestellen für den Transkriptionsfaktor *LEF1* im *LSH*-Promotor. Nicht übereinstimmende Nukleotide sind fett und rot dargestellt

Position (5' vor Exon 1)	Sequenz (5'-3')	Übereinstimmung
-2381	CCTTTG AT	80 %
-2222	CCTTTG CTT	80 %

5.10.4 Der Transkriptionsfaktor *p63*

p63 gehört zur Transkriptionsfaktor-Familie des prominenten Tumorsuppressorgens *p53* und ist in vielen Progenitorzellen z.B. der Haut, der Brustdrüsen und der Prostata exprimiert [92]. In einigen Karzinomen ist *p63* überexprimiert [73, 168]. Dabei wird vermutet, dass *p63* zur Inhibition von *p53* führt [187]. *Keyes et al.* identifizierten eine *p63*-Bindestelle im murinen *LSH*-Promotor und konnten zeigen, dass *LSH* durch *p63* kontrolliert wird [92]. Die *p63*-Konsensussequenz nach der im *LSH*-Promotor gesucht wurde ist:

5'-WDDNDDGHHD- (1–27nt) -WDDCNDGHHD-3' [92]

Es konnte eine *p63*-Bindestelle im *LSH*-Promotor gefunden werden. Ihre Lokalisation ist in **Abbildung 5.36** zu sehen.

5.10.5 Zusammenfassung

In **Abbildung 5.36** ist die Lokalisation der Bindestellen der Transkriptionsfaktoren *FOXM1*, *GLI1*, *LEF1* und *p63* im *LSH*-Promotor zusammengefasst. Die genauen Sequenzen sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

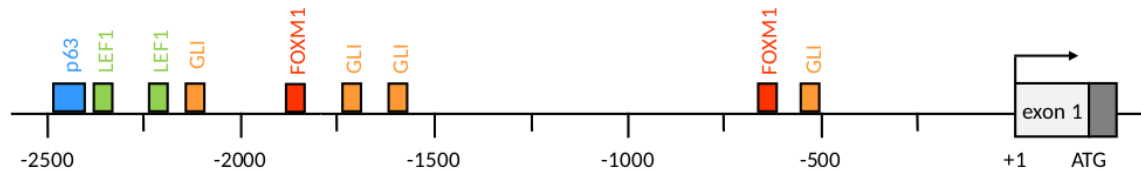


Abbildung 5.36: Identifizierte Bindestellen der Transkriptionsfaktoren *FOXM1*, *GLI1*, *LEF1* und *p63* im *LSH*-Promotor im Bereich bis 2500 Basen vor dem ersten Exon (weißes Kästchen) bzw. dem Start des Protein-kodierenden Bereichs (grau).

6 Diskussion

6.1 Spielt *LSH* eine relevante Rolle in Hepatoblastomen?

LSH gehört zur Familie der SNF2-Chromatinremodeler und ist ein essentieller Faktor in der Etablierung von DNA-Methylierung. Besonders während der Embryonalentwicklung scheint *LSH* eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung zu spielen (s. **Kapitel 1.4**). Hepatoblastome zeigen eine Reihe epigenetischer Veränderungen. Unter anderem durch DNA-Methylierung verursachte Stilllegung von Tumorsuppressorgenen und konsekutive Aktivierung von embryonalen Signalwegen, wie dem Hedgehog- oder dem IGF2-Pathway (s. **Kapitel 1.1**).

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts sollte untersucht werden, ob *LSH* eine relevante Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Aberrationen spielt.

Die Untersuchung der Expression von *LSH* ergab, dass in den Leberkrebszelllinien HUH6 (a), HUH6 (j), HepT1, HepG2, und HUH7 *LSH* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Vergleich zu normalem Lebergewebe stark überexprimiert ist. Auch in operativ entfernten Hepatoblastomgeweben zeigte sich immunhistochemisch eine Überexpression von *LSH* verglichen mit Normallebern. Die einzigen Zellen, welche in den Normalleberschnitten eine nukleäre Färbung zeigten fanden sich perivaskulär. Wieso gerade diese Zellen vermehrt *LSH* exprimieren wäre eine interessante Frage für weiterführende Forschung, um zu überprüfen, ob es sich hierbei vielleicht um für die Leberregeneration verantwortliche Leberstammzellen handelt.

Diese Stammzellen werden als *Ovalzellen* oder *Liver Progenitor Cells (LPCs)* bezeichnet und besitzen die Fähigkeit, ähnlich den Basalzellen der Haut oder den Kryptenzellen der Darmschleimhaut, zur Proliferation und Differenzierung zu reifen Hepatozyten und Cholangiozyten. Sie sind durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker wie *EpCAM*, *CD13* und *CD133* charakterisiert. Während der normale Zell-Turnover der Leber wahrscheinlich durch Proliferation der Hepatozyten selbst aufrecht erhalten wird, scheinen die *LPCs* vor allem bei der Leberregeneration nach Leberschädigung (z.B. durch Resektion oder Toxine) eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird vermutet, dass *LPCs* in der Nähe der Hering-Kanäle und Portalvenen lokalisiert sind und von dort durch Bildung neuer Gangstrukturen die Leberregeneration antreiben [155, 157].

Jedoch stehen diese Stammzellen, wie in anderen Geweben auch, im Verdacht an der Tumorgenese beteiligt zu sein. So wurden in Hepatoblastomen sogenannte *Small Epithelial Cells (SEC)* gefunden, welche die selben Oberflächeneigenschaften aufweisen wie *LPCs*

[139].

Da *LSH* physiologisch in proliferierenden Zellen hochreguliert wird und gleichzeitig in der Differenzierung von Stammzellen eine wichtige Rolle spielt (s. **Kapitel 1.4**), ließe sich eine gesteigerte Expression gerade in den LPCs gut erklären. Zur weiteren Klärung wäre eine Identifizierung der immunhistochemisch positiven, perivaskulären Zellen als *LPCs* notwendig. Dies könnte Einblicke sowohl in die Entstehung von Tumorstammzellen wie auch in die Regenerationsprozesse von gesundem Lebergewebe geben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in Hepatoblastomen sowohl die Transkription wie auch die Translation von *LSH* im Vergleich zu normalen Leberzellen stark gesteigert ist. Somit könnte der epigenetisch reprimierende Faktor *LSH* durchaus eine Rolle für die in Hepatoblastomen gefundenen epigenetischen Veränderungen spielen.

6.2 Wie wird die Expression von *LSH* reguliert?

Falls *LSH* für epigenetischen Aberrationen in Hepatoblastomen verantwortlich sein sollte, bleibt die Frage, wie es zu der starken Überexpression von *LSH* kommt. Dazu wurde der Promotor von *LSH* mittels einer *in silico* Analyse auf mögliche Bindestellen von verschiedenen Transkriptionsfaktoren hin untersucht. Dabei konnten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren *FOXM1*, *GLI1*, *LEF1* und *p63* identifiziert werden.

FOXM1 (Forkhead Box M1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher vor allem Einfluss auf die Progression des Zellzyklus hat. Seine endogene Expression ist während der S- und M-Phase am höchsten [178]. Des Weiteren wird die Überexpression von *FOXM1* mit der Entstehung und dem Fortschreiten zahlreicher Tumorentitäten in Verbindung gebracht [88, 94, 19].

In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass *LSH* ein Zielgen von *FOXM1* sein könnte, da die Expression von *LSH* positiv mit der Expression von *FOXM1* korreliert ist [54, 174, 162]. Weitere Ergebnisse zeigten, dass in oropharyngealen Karzinomen sowohl *FOXM1*, als auch *LSH* umso stärker exprimiert waren, je fortgeschrittener das Tumorstadium war [82]. Diese Ergebnisse sowie die Identifizierung einer möglichen *FOXM1*-Bindestelle im *LSH*-Promotor legen nahe, dass die Überexpression von *LSH* in Hepatoblastomen vielleicht auf den Einfluss des Transkriptionsfaktors *FOXM1* zurückzuführen ist. Außerdem zeigte sich, dass *FOXM1* in allen untersuchten Zelllinien mindestens 100-fach stärker exprimiert wurde als in normalen Leberzellen, was den Verdacht erhärtet, nach dem *FOXM1* für die Überexpression von *LSH* verantwortlich sein könnte. Weiterhin ist bekannt, dass *FOXM1* ein Zielgen von *GLI1*, dem Transkriptionsfaktor des in Hepatoblastomen überaktivierten Hedgehog-Signalweges ist [163].

Neben diesen Ergebnissen könnte durch die Identifizierung von mehreren potentiellen *GLI1*-Bindestellen innerhalb des *LSH*-Promotors *GLI1* nicht nur als möglicher indirekter, sondern auch als potentieller direkter Regulator von *LSH* in Frage kommen.

Neben dem Hedgehog-Signalweg scheint auch der Wnt-Pathway durch Mutation von β -*Catenin* und epigenetische Stilllegung des hemmenden Faktors *SFRP1* in Hepatoblastomen überaktiviert zu sein [172, 1, 144, 101]. Der Transkriptionsfaktor *LEF1* (*Lymphoid enhancer factor*) vermittelt dabei im Komplex mit *TCF* durch Promotorbindung die Effekte des Signalweges. Der Aktivator Komplex *TCF/LEF1* kann erst an seine Zielsequenz binden, wenn β -*Catenin* im Zellkern stabilisiert wird und die Bindung vermittelt [101, 109]. Eine Überaktivierung des Wnt-Signalweges durch Mutationen einzelner Komponenten oder epigenetische Alterationen ist in vielen Tumorentitäten beschrieben [1]. Im Promotor von *LSH* konnten 2 potentielle *LEF1*-Bindestellen identifiziert werden, sodass auch der überaktivierte Wnt-Signalweg einen möglichen Beitrag zur Überexpression von *LSH* leisten könnte.

Einige weitere Transkriptionsfaktoren neben denen der embryonalen Signalwege wurden in der Literatur mit *LSH* in Verbindung gebracht. *Keyes et al.* hatten schon 2011 von einer Zielsequenz für *p63* im *LSH*-Promotor berichtet und eine mögliche Regulation von *LSH* durch *p63* diskutiert [92]. *p63* gehört zur Familie des prominenten Tumorsuppressorgens *p53*. Vor allem die Splicevariante $\Delta Np63$ scheint eine onkogene Wirkung, die vor allem durch Hemmung von *p53* vermittelt zu sein scheint, zu haben [16, 187]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *p63* in einigen soliden pädiatrischen Tumoren überexprimiert ist und dort Proliferation und Tumorigenese fördert [11]. Die innerhalb dieses Projekts durchgeführte *in silico* Analyse konnte ebenfalls eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor *p63* im untersuchten Bereich identifizieren, so dass *p63* ebenfalls als möglicher Regulator der *LSH*-Expression betrachtet werden muss.

Neben den oben genannten Transkriptionsfaktoren wurde auch gezeigt, dass durch ektope Expression des Zellzyklusregulators *E2F1* die endogene *LSH*-Expression gesteigert werden konnte [117], sodass es nahe liegt, dass *LSH* auch während des normalen Zellzyklus hochreguliert wird und damit eine Rolle in der Proliferation zu spielen scheint.

Interessanterweise sind die identifizierten Transkriptionsfaktoren alle Teil von in Hepatoblastomen aberrant regulierten Signalwegen, sodass ein Zusammenspiel aus den verschiedenen pathogenetischen Komponenten der Hepatoblastomentstehung zur Überexpression von *LSH* und damit vielleicht zur Festigung von epigenetischen Aberrationen führt.

In **Abbildung 6.1** sind die Ergebnisse dieser Arbeit sowie Erkenntnisse aus der aktuellen Literatur zur transkriptionellen Regulation von *LSH* zusammengefasst. Anhand dieses Modells lässt sich sehr gut die starke Überexpression von *LSH* in Hepatoblastomen erklären. Durch zum Beispiel eine aktivierende Mutation im β -*Catenin*-Gen kommt es zur verstärkten Aktivität des Wnt-Signalweges. Der zugehörige Transkriptionsfaktor *LEF1* führt zu einer erhöhten Expression von *LSH* auch außerhalb von proliferativen Zellzyklusphasen. Diese erhöhte endogene *LSH*-Expression führt zu einer positiven Rückkopplung indem sie zur Etablierung von reprimierten Chromatin von Tumorsuppressorgenen wie *SFRP1* und *HHIP* beiträgt und damit die zugehörigen Signalwege triggert, welche ihrerseits wieder zu

erhöhter *LSH*-Expression beitragen. Somit bestünde eine denkbare Verbindung zwischen einer somatischen Mutation und epigenetischen Aberrationen.

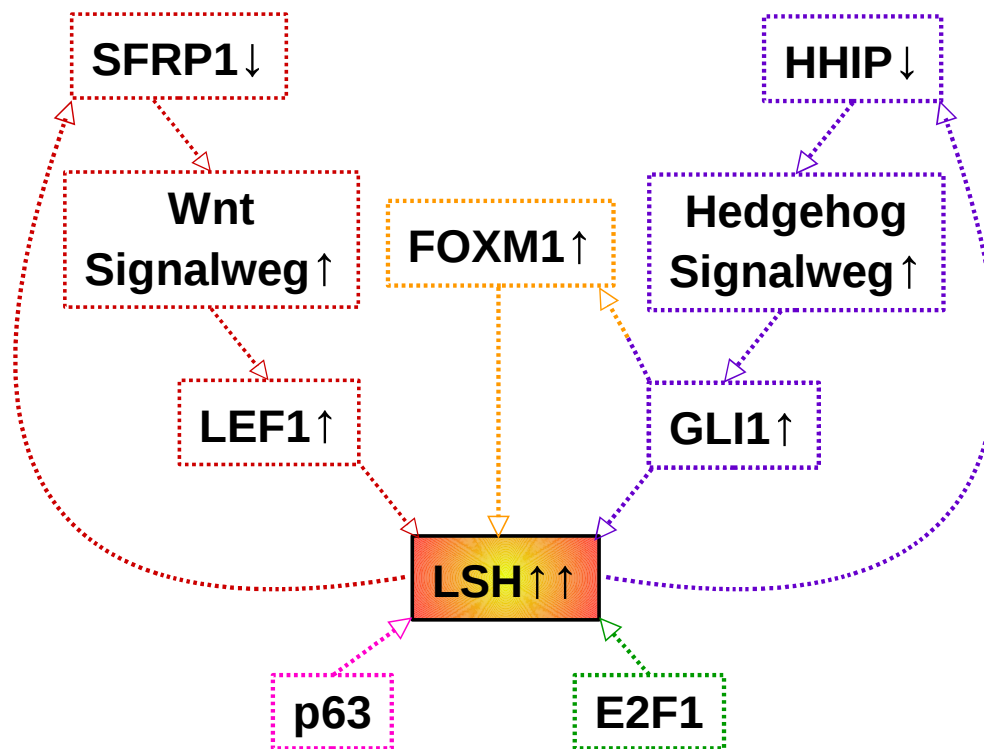


Abbildung 6.1: Modell zur transkriptionellen Regulation von *LSH*

6.3 *LSH* beeinflusst die Proliferationsfähigkeit von Hepatoblastomzellen

Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass *LSH* ein promotischer Faktor ist. Für T-Lymphozyten, murine embryonale Fibroblasten (MEFs), Spermatozoen und einige Tumorzelllinien ist beschrieben, dass die Anwesenheit von *LSH* für eine regelgerechte Proliferation notwendig ist (s. Kapitel 1.4.2). Dies und die Tatsache, dass *LSH* in Hepatoblastomen so stark überexprimiert ist, führte zu der Frage, ob *LSH* auch zu verstärktem Tumorzellwachstum beiträgt. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass durch den Knockdown von *LSH* zwar keine Apoptose induziert wird, die Tumorzellen aber signifikant in ihrer Proliferation gehemmt werden. Diese Beobachtung lässt sich wohl am besten durch ein Zusammenspiel mehrere Mechanismen erklären:

1. Hemmung von epigenetisch aktivierten, promotischen Signalwegen:

Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben sind in Hepatoblastomen einige promotische Signalwege (Hedgehog, IGF2, Wnt) durch Hypermethylierung der Promotoren regulatorischer Gene überaktiviert. Der Knockdown von *LSH* führt durch Destabilisierung von epigenetisch stillgelegten Chromatin zur zumindest transienten Reexpression solcher Tumorsuppressoren (*HHIP*, *IGFBP3*, s. Kapitel 5.6). Dadurch kommt es zur

Hemmung dieser Signalwege, zur Reduktion des promitotischen Stimulus und damit zur verminderten Proliferationsrate.

2. Beeinflussung der Zellzyklusprogression:

Neben der Hemmung von promitotischen Signalwegen beeinflusst der Knockdown von *LSH* auch die zweite Stufe der Proliferation, die Progression im Zellzyklus. Eine zentrale Rolle scheint dabei der Einfluss von *LSH* auf den Zyklin-abhängigen Kinaseninhibitor *CDKN2A* (*p16*) zu spielen. Die Experimente dieser Arbeit konnten zeigen, dass es durch den Knockdown von *LSH* zu einer Zunahme der *CDKN2A* Expression kommt. Diese Beobachtung wird durch weitere Ergebnisse der aktuellen Literatur bestätigt, die zeigen, dass es durch den Knockdown von *LSH* zur vermehrten *CDKN2A*-Expression bzw. durch Induktion von *LSH* zur Methylierung des *CDKN2A*-Promotors und damit zur Reprimierung von *CDKN2A* kommt [162, 192, 152]. Durch diese verminderte Expression kommt es zu einer Hemmung der Zellzyklusprogression. *von Eyss et al.* konnte außerdem zeigen, dass *LSH* mit *E2F3* interagiert und wichtig für die Aktivierung der Zielgene von *E2F3* ist [171]. Wie die anderen Mitglieder der E2F-Familie ist auch *E2F3* ein Antagonist des *RB* vermittelten Zellzyklusarrests, sodass der Knockdown von *LSH* zur verminderten Aktivität von *E2F3* führen könnte und damit der Eintritt in den Zellzyklus gehemmt wird.

3. Fehlerhafte Mitose führt zum Abbruch der Proliferation:

Mehrere Studien konnten zeigen, dass *LSH* nicht nur auf Ebene der Signaltransduktion in die Regulation der Proliferation eingreift, sondern auch Einfluss auf den "mechanischen" Teil der Mitose hat. Bei der Spermatogenese kommt es durch *LSH*-Depletierung zu einem Arrest im Stadium IV aufgrund von fehlerhaften Chromosomenverbindungen [191]. Dieselbe Beobachtung führt zu fehlerhaften Meiosen in *LSH*^{-/-} Oozyten [27]. *LSH*-depletierete MEFs fallen durch überzählige Centromere und multipolare Mitosespindeln, als Zeichen abnormaler Mitosen, auf [42]. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es durch den Knockdown von *LSH* zu Fehlern während der Mitose, die dann zu einem Zellzyklusarrest führen, kommt und dadurch die Proliferation gehemmt wird.

6.4 *LSH* hat Einfluss auf die Expression verschiedener Zielgene in Hepatoblastomen

Dass *LSH* in Hepatoblastomen nicht nur aberrant exprimiert ist, sondern auch direkten Einfluss auf die Biologie von Hepatoblastomen hat, zeigt die Hemmung der Proliferation von Hepatoblastomzellen durch den Knockdown von *LSH*. Dieser Effekt sollte auch mit Veränderungen verschiedener von *LSH* beeinflusster Gene einhergehen, sodass es auch ein Ziel dieser Arbeit war den Einfluss von *LSH* auf mehrere interessante Zielgene zu untersuchen.

HHIP und IGFBP3 hemmen die promitotischen Hedgehog- und IGF2-Signalwege durch Bindung an die jeweiligen Liganden [13, 126]. Die Untersuchung der Expression dieser beiden Faktoren zeigte, dass sie in Hepatoblastomen sowohl auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene im Vergleich zu Normalleber völlig ausgeschaltet sind. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass diese Suppression durch eine Hypermethylierung der Promotoren von *HHIP* und *IGFBP3* verursacht wird [34, 132].

Durch den Knockdown von *LSH* konnte eine signifikante Reexpression dieser Tumorsuppressoren in den Hepatoblastomzelllinien erzielt werden. Dies deutet auf einen zumindest indirekten Einfluss von *LSH* auf die Aufrechterhaltung der Suppression dieser Gene hin. Die Reexpression von *HHIP* und *IGFBP3* geben außerdem eine gute Erklärung für die beobachtete Hemmung der Proliferation nach *LSH*-Knockdown (s. **Kapitel 6.3**).

Neben *HHIP* und *IGFBP3* führte der Knockdown von *LSH* auch bei *DLK1* zu einer deutlichen Expressionsänderung, was einen regulierenden Einfluss von *LSH* auf dieses Gen impliziert, insbesondere, wenn man bedenkt, dass *DLK1* ein geprägtes Gen ist und durch DNA-Methylierung reguliert wird. Es ist Teil eines großen Genclusters, in welchem durch eine *Differential Methylated Regions (DMR)* die uniparentale Expression der beteiligten Gene reguliert wird. *DLK1* wird normalerweise vom paternalen Allel exprimiert [23].

DLK1 spielt in der fötalen Differenzierung einiger Zellarten, unter anderem von Leberzellen, eine entscheidende Rolle. So exprimieren fötale Leber-Progenitorzellen *DLK1*, wobei adulte Leberzellen keine *DLK1*-Expression zeigen [45]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *DLK1* einen möglichen Serummarker für das Hepatoblastom darstellt [39]. Eine immunhistochemische Untersuchung zeigte, dass *DLK1* in Hepatoblastomen, nicht jedoch in normalem Lebergewebe exprimiert wird [30].

In den Zelllinien HepT1 und HUH6 (j) zeigte sich eine deutlich verminderte Expression von *DLK1* im Vergleich zu normalem Lebergewebe. Dies könnte ein Effekt des vermehrten Einflusses von *LSH* in Hepatoblastomen sein, dadurch, dass es durch Etablierung von aberranter DNA-Methylierung auch an der paternalen DMR zu einem Loss of Imprinting (LOI) kommt und auch das normalerweise exprimierende Allel hierdurch ausgeschaltet wird. Im Gegensatz dazu zeigte sich *DLK1* in der Zelllinie HepG2 deutlich überexprimiert. Dies ist vielleicht vor dem Hintergrund zu sehen, dass HepG2 wohl kein reines Hepatoblastom zu sein scheint, sondern einen transitionalen Typ zwischen Hepatoblastom und hepatozellulärem Karzinom darstellt und somit andere Mechanismen für die Tumorentstehung verantwortlich sein könnten. Für hepatozelluläres Karzinome ist zudem beschrieben, dass es regelmäßig durch LOI zur Überexpression von *DLK1* kommt [6].

Durch den Knockdown von *LSH* konnte eine verstärkte Expression von *DLK1* in allen drei Zelllinien induziert werden, wobei der Effekt umso größer war, je geringer die Ausgangsexpression der einzelnen Zelllinien war. Dies lässt sich gut durch einen möglichen reprimierenden Einfluss von *LSH* auf *DMRs* erklären. Eine von Anfang an nicht methylierte DMR (HepG2) wird durch den Knockdown von *LSH* natürlich nicht stark tangiert, weshalb die folgende Expressionsänderung nur sehr gering ausfällt.

In den Zelllinien mit stark verminderter *DLK1*-Expression (HepT1 und HUH6 (j)) kann

man durch den verstärkten Einfluss von *LSH* von einem auf beiden Allelen stark reprimierten Chromatin ausgehen. Durch den Wegfall von *LSH* kommt es dann zu einer Lockerung des inaktiven Chromatins und damit zur Reexpression.

Ein weiteres durch den Knockdown von *LSH* in seiner Expression signifikant beeinflusstes Gen war *CDKN2A* (*p16*).

CDKN2A bindet an CDK4- und CDK6-Komplexe und hemmt somit die durch diese Komplexe vermittelte Phosphorylierung des Retinoblastom (*RB*) Gens. Dies hält den Transkriptionsfaktor *E2F1* gebunden und führt somit zu einem Arrest in der G1-Phase [143]. *CDKN2A* wird vermehrt bei oxidativem Stress und DNA-Schäden exprimiert und schützt somit vor maligner Entartung (Tumorsuppressorgen). Daher ist es nicht verwunderlich, dass *CDKN2A* in vielen Tumoren inaktiviert ist [143]. Einige Mechanismen, die zur Inaktivierung von *CDKN2A* führen wurden beschrieben, darunter auch epigenetische, wie zum Beispiel aberrante *de novo* DNA-Methylierung [72]. Trotz dieses einleuchtenden Mechanismus mehren sich auch Daten, die zeigen, dass *CDKN2A* in einigen Tumoren, vor allem auch in hoch malignen Neoplasien, überexprimiert ist [137].

So zeigte sich, dass *CDKN2A* vor allem in der Zelllinie HepT1 deutlich überexprimiert ist, aber auch in HepG2 und HUH6 (j) stärker exprimiert wird als in Normallebergewebe. Durch den Knockdown von *LSH* wurde eine Änderung der Expression von *CDKN2A* induziert. In den Zelllinien mit nur leichter Überexpression von *CDKN2A* (HUH6 (j) und HepG2) kam es zu einer vermehrten Expression, wobei in der Zelllinie HepT1, welche durch eine besonderes hohes Level an *CDKN2A* aufgefallen war, eine Abnahme der Expression beobachtet wurde. Diese gegensinnigen Ergebnisse legen nahe, dass *LSH* nicht direkt auf die Expression von *CDKN2A* Einfluss nimmt, sondern ein weitere Regulationsmechanismus zugrunde liegt. *Sun et al.* haben in einer früheren Arbeit beschrieben, dass die *LSH* Expression von *BMI1*, ein negativer *CDKN2A*-Regulator, reguliert wird. Die Untersuchung seiner Expression nach *LSH* Knockdown zeigte eine diskrete, aber invers korrelierte Expressionsänderung zur beobachteten Änderung der *CDKN2A* Expression. Dies lässt den Schluss zu, dass *LSH* Einfluss auf die Expression von *BMI1* nimmt und dadurch *CDKN2A* reguliert wird. Somit könnte auch die starke Überexpression von *CDKN2A* erklärt werden. Der reprimierende Faktor *LSH* hemmt die Expression von *BMI1* und dadurch kommt es zur verstärkten *CDKN2A* Expression.

Weitere untersuchte Gene waren *IGF2*, *NOTCH3*, *FOXA1*, *CDKN1A* und *CDKN1C*. Auf sie konnte kein signifikanter Einfluss nach *LSH*-Knockdown festgestellt werden.

6.5 Einfluss von *LSH* auf etablierte DNA-Methylierung

LSH ist ein essentieller Faktor in der Etablierung von *de novo* DNA-Methylierung (s. **Kapitel 1.4**). Daher war es naheliegend zu vermuten, dass die beobachtete Expressionsänderung der untersuchten Gene nach *LSH* Knockdown durch eine Verminderung der Promotormethylierung verursacht wird. In allen Fällen konnte jedoch keine Änderung des

Methylierungsgrades der einzelnen Gene festgestellt werden. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass trotz eines anhaltend guten Knockdowns von *LSH* der Effekt auf die untersuchten Zielgene nur transient, also die Expressionsänderungen 2 Tage nach Knockdown am größten waren und bis zum 6. Tag wieder vollständig regredient waren, legt nahe, dass *LSH* über einen alternativen Mechanismus Einfluss auf diese Gene nimmt (s. **Kapitel 6.6**).

Dennoch konnten durch die Untersuchung der Promotormethylierung mehrere Erkenntnisse über die Biologie der Hepatoblastomzelllinien gewonnen bzw. bestätigt werden. So konnte durch die Bestimmung des globalen Methylierungsgrades, repräsentiert durch das Retrotransposon *LINE-1*, die These der global hypomethylierten Tumoren bestätigt werden. Die Zelllinie HepT1 zeigte eine Reduktion der globalen Methylierung von ca. 30% gegenüber genomischer DNA. Auch HUH6 (j) und HepG2 zeigten sich deutlich weniger methyliert.

Neben dieser globalen Hypomethylierung konnte bestätigt werden, dass die Tumorsuppressoren *HHIP* und *IGFBP3* einen stark hypermethylierten Promotor aufweisen, was für deren Ausschaltung und damit Überaktivierung der zugehörigen Signalwege verantwortlich ist.

Auch die DMR, welche im *DLK1*-Cluster für die Regulation der uniparentalen Expression verantwortlich ist, zeigt sich bezüglich des Methylierungsgrades aberrant verglichen mit genomischer DNA.

Interessanterweise waren alle Gene, welche nach *LSH*-Knockdown eine Expressionsänderung zeigten mit einer aberranten Promotor- bzw. DMR-Methylierung assoziiert. *CDKN2A* wies keine aberrante Methylierung auf, was die These, dass es über *BMI1* reguliert wird, stützt (s. **Kapitel 6.4**). Auch der *IGF2/H19*-Lokus zeigte keine aberrante DNA-Methylierung und auch keine Expressionsänderung nach *LSH*-Knockdown. Diese Ergebnisse implizieren eine komplexe Rolle von *LSH* in der Etablierung und Aufrechterhaltung epigenetisch aberranten Chromatins.

6.6 Modellvorschlag für *LSH* in Hepatoblastomen

Ausgehend von dem von *Myant* und *Stancheva* postulierten Modell des *LSH*-Komplexes (**Abbildung 6.2**), lassen sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gut erklären.

Durch den Knockdown von *LSH* in den Hepatoblastomzelllinien kommt es zur Dissoziation des *LSH*-Komplexes. Dadurch geht die reprimierende Wirkung der Deacetylasen (HDAC1 und HDAC2) verloren, Acetylgruppen akkumulieren an den "freigewordenen" Histonen, das reprimierte Chromatin wird offener und es kommt zur Reexpression stillgelegter Gene. Dass diese Reexpression trotz anhaltendem *LSH*-Knockdown nur transient und nach kurzer Zeit wieder aufgehoben ist, legt einen alternativen, *LSH*-unabhängigen Mechanismus nahe, welcher wieder zur Stilllegung der Gene führt.

Ein naheliegender und gut etablierter Mechanismus könnte die Rekrutierung von HDACs

durch *Methyl-CpG-binding proteins (MeCP)* sein. Diese Proteine binden spezifisch an methylierte DNA, vermitteln direkt die Assoziation von HDACs und führen zur Deacetylierung der umliegenden Histone [115, 48]. Dadurch käme es wieder zur Reprimierung der kurzzeitig durch den Wegfall des *LSH*-Komplexes reexprimierten Genen.

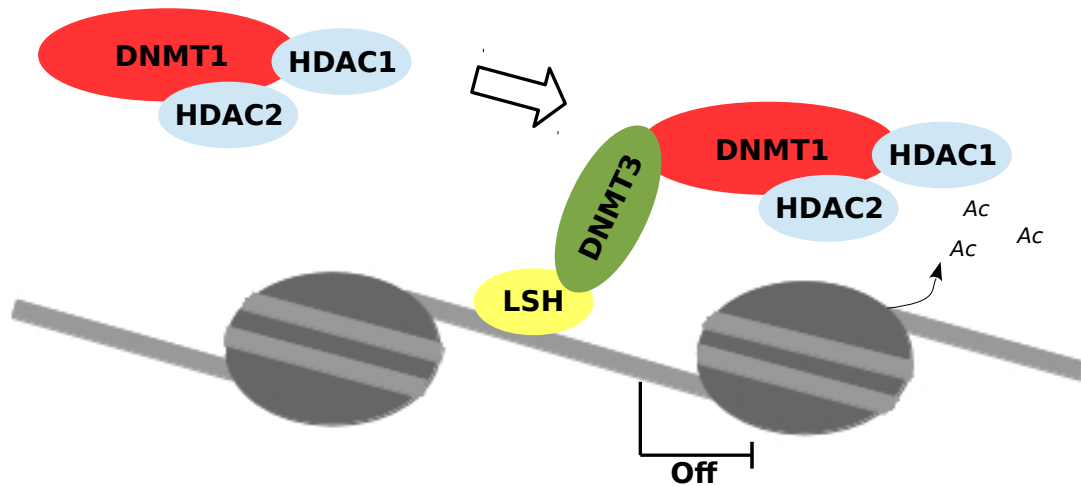


Abbildung 6.2: Postuliertes Modell des *LSH*-Komplexes. Modifiziert nach [114].

Dass die bereits etablierte DNA-Methylierung durch den Wegfall von *LSH* nicht gelöscht wurde, und somit nicht die Ursache für die Reexpression der untersuchten Gene sein kann, ist gut zu begründen. Denn *LSH* ist zwar ein essentieller Faktor in der *de novo* DNA-Methylierung, aber nicht obligat für die *Maintenance*-Methylierung (s. **Kapitel 1.4**), sodass die schon etablierte Methylierung auch durch wiederholte Replikation nicht geringer wird. Außerdem zeigte sich in den durchgeführten Experimenten, dass der Knockdown von *LSH* die Proliferationsrate senkt und damit diesen Effekt noch weiter abschwächt. Denn bei jeder Replikation halbiert sich der Methylierungsgrad der DNA durch die Synthese eines nichtmethylierten Strangs. Dieser muss erst durch *Maintenance*-Methylierung methyliert werden. Wird jedoch die Proliferation gehemmt, also weniger neue DNA synthetisiert, entsteht auch weniger unmethylierte DNA. Des Weiteren fehlen bis heute eindeutige Hinweise auf eine Demethylierungsmaschinerie in menschlichen Zellen, durch die methylierte DNA aktiv demethyliert wird.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit, führt wohl am ehesten die aberrante Aktivierung embryonaler Signalwege (Hedgehog, IGF, Wnt) zur Überexpression von *LSH*. Dadurch kommt es durch Etablierung von Promotorhypermethylierung der diese Wege regulierenden Gene zu einer Verstärkung der reprimierten Chromatinabschnitte durch die unflexible und dauerhafte DNA-Methylierung, was zur weiteren Aktivierung dieser Signalwege führt. Ein *circulus vitiosus* (**Abbildung 6.3**).

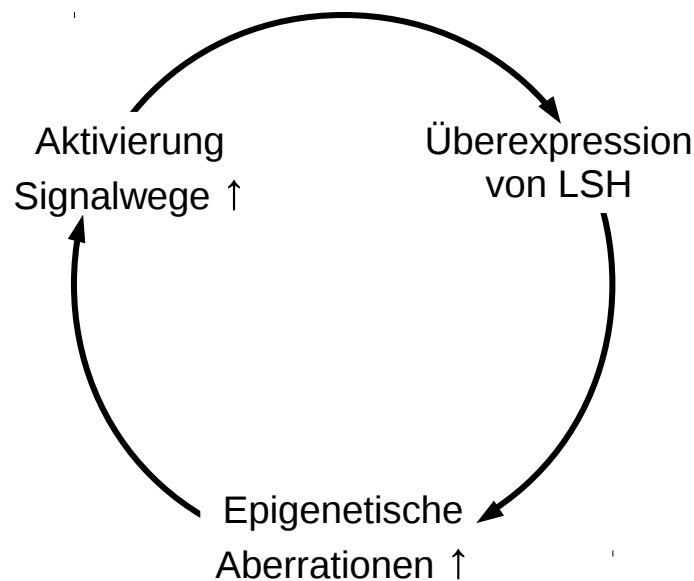


Abbildung 6.3: LSH-Teufelskreis in Hepatoblastomen

6.7 Weiterführende Forschungsansätze und Ausblick

Die Ergebnisse dieses Projekts legen nahe, dass *LSH* eine Rolle in der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung reprimierender epigenetischer Veränderungen in Hepatoblastomen spielt und Einfluss auf die Biologie von Hepatoblastomen haben könnte. Durch weiterführende Forschung könnte dieser erste Einblick in die Rolle von *LSH* weiter ausgebaut werden.

So wäre die Klonierung des Promotors von *LSH* ein nächster zielführender Schritt, um die funktionelle Relevanz der *in silico* identifizierten Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im *LSH*-Promotor zu klären. Dies könnte offenlegen, durch welchen aberrant regulierten Signalweg es zu einer Überexpression von *LSH* und damit vielleicht zu einer Hypermethylierung verschiedener Promotoren von Tumorsuppressorgenen in Hepatoblastomen kommt. Weitere interessante Einblicke über die Interaktionen von *LSH* könnten ChiP-Analysen liefern. Damit ließe sich klären, ob *LSH* an epigenetisch stillgelegten Genen dauerhaft bzw. im Vergleich zu normalen Gewebe vermehrt bindet. Weiterhin könnten diese Untersuchungen klären mit welchen weiteren epigenetischen Faktoren *LSH* interagiert.

Dies könnte wichtige Einblicke auch in die physiologische Funktion von *LSH* geben. So ist bis heute nicht geklärt, ob *LSH* tatsächlich auch als Chromatinremodeler wirkt, d.h., ob seine Helikase-Untereinheit zu mechanischen Veränderungen in der Chromatinstruktur führt.

Eine weitere wichtige Untersuchung wäre die Aufarbeitung einer größeren Anzahl von Hepatoblastomfällen, um zu überprüfen, ob der Grad der Überexpression von *LSH* mit verschiedenen klinischen Parametern, wie Tumorstadien, Überleben, AFP-Levels, Histologie oder Proliferationsgrad korreliert. So könnte untersucht werden, ob *LSH* als ein Biomarker für Hepatoblastome mit schlechter Prognose dienen könnte.

Da sich in anderen embryonalen Tumoren ebenfalls zahlreiche epigenetische Aberrationen finden, wäre es ein interessanter Ansatz zu untersuchen, ob sich in diesen Parallelen bezüglich *LSH* zu den Erkenntnissen in Hepatoblastomen finden lassen.

Durch die zunehmende Relevanz der Epigenetik in verschiedenen Bereichen der Medizin, könnte *LSH* nicht nur bei onkologischen Erkrankungen eine Rolle spielen. Als essentieller Faktor bei der *de novo* Methylierung können sowohl ein *Loss of function*, wie auch ein *Gain of function* von *LSH* zu epigenetischen Aberrationen und damit zu spezifischen Krankheitsbildern führen (s. **Kapitel 1.2.3**).

Diese Mechanismen zu klären, bietet ein weites Forschungsfeld, durch welches *LSH* weiterhin Gegenstand aktueller, epigenetischer Grundlagenforschung sein wird.

Zusammenfassung

Hepatoblastome zeigen im Gegensatz zu adulten Neoplasien kaum Mutationen der kodierenden Erbsubstanz. Lediglich Mutationen des β -Catenin Gens finden sich in vielen dieser Tumoren. Vielmehr scheinen epigenetische Aberrationen für das Entstehen von Hepatoblastomen verantwortlich zu sein. So sind z.B. die Tumorsuppressoren *HHIP* und *IGFBP3* in Hepatoblastomzelllinien durch Promotorhypermethylierung stillgelegt.

LSH ist ein essentieller Faktor bei der *de novo* Methylierung von unmethylierter DNA. Außerdem ist LSH vor allem in proliferierenden Zellen stark exprimiert. In dieser Arbeit sollte die Rolle von LSH in der Etablierung bzw. Erhaltung epigenetischer Aberrationen in Hepatoblastomen untersucht werden.

Es zeigte sich, dass LSH sowohl in Hepatoblastomzelllinien als auch in operativ entfernten Hepatoblastomen stark überexprimiert ist. Ferner ließ sich durch Knockdown von LSH ein Einfluss auf die Expression der Tumorsuppressoren *HHIP* und *IGFBP3*, sowie der Gene *DLK1* und *CDKN2A* beobachten, obwohl dieser nicht durch Änderung der Promotormethylierung vermittelt war, was einen anderen mechanistischen Einfluss von LSH auf diese Zielgene impliziert. Außerdem zeigten die Experimente, dass LSH-Knockdown zwar keine Apoptose verursacht, wohl aber die Proliferationsrate der Hepatoblastomzellen hemmt. In einem bioinformatischen Ansatz wurden Bindungstellen der Transkriptionsfaktoren FOXM1, GLI1, LEF1 und p63 im LSH-Promotor identifiziert, deren Untersuchung Anknüpfstelle weiterer Forschungen sein könnte.

Abbildungsverzeichnis

1.1	PRETEXT-Klassifikation	13
1.2	<i>SIOPEL</i> -Risikostratifizierung	14
1.3	Mechanismus der DNA-Methylierung	17
1.4	Einteilung und Aufgaben der DNMT-Isoformen	18
1.5	Transkriptionsregulation durch Promotormethylierung	19
1.6	Methylierungs- und Demethylierungswellen in der Embryogenese	20
1.7	Aufbau des Chromatins: DNA-Moleküle mit assoziierten Proteinen	23
1.8	Konformationsmodelle der 30 nm-Chromatinfaser	24
1.9	Die vier klassischen Typen des Chromatinremodelings	25
1.10	ATPase-Untereinheiten der eukaryoten Chromatinremodeler	25
1.11	Modellvorstellung des LSH - Komplexes	28
4.1	Prinzip der Bisulfitkonvertierung	44
5.1	<i>HHIP</i> und <i>IGFBP3</i> sind in Lebertumorzelllinien stillgelegt	48
5.2	<i>LSH</i> ist in den Lebertumorzelllinien stark überexprimiert	49
5.3	<i>LSH</i> ist in vielen Hepatoblastomgeweben überexprimiert.	49
5.4	<i>LSH</i> in der immunhistochemischen Färbung in Hepatoblastomen	50
5.5	Etablierung der Knockdownmethode	52
5.6	Vergleich der Transfektionseffizienzen der verschiedenen siRNAs	53
5.7	Knockdownetablierung	54
5.8	Reaktivierung der Tumorsuppressorgene <i>HHIP</i> und <i>IGFBP3</i>	55
5.9	Expressionslevel von <i>DLK1</i> und <i>IGF2</i>	56
5.10	Expressionsänderung von <i>DLK1</i> und <i>IGF2</i> nach <i>LSH</i> -Knockdown.	57
5.11	Expressionslevel von <i>NOTCH3</i> und <i>FOXA1</i>	58
5.12	Expressionsänderung von <i>NOTCH3</i> und <i>FOXA1</i> nach <i>LSH</i> -Knockdown	58
5.13	Expressionslevel von <i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1C</i> und <i>CDKN2A</i>	59
5.14	Expressionsänderung von <i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1C</i> und <i>CDKN2A</i>	60
5.15	Methylierungsgrad von <i>LINE-1</i>	62
5.16	Einfluss von <i>LSH</i> auf den Methylierungsgrad von <i>LINE-1</i>	62
5.17	Primerlokalisierung und der untersuchte CpG-Sites im <i>HHIP</i> -Promotor	63
5.18	Methylierungsgrad von <i>HHIP</i>	63
5.19	Einfluss von <i>LSH</i> auf den Methylierungsgrad von <i>HHIP</i>	64
5.20	Primerlokalisierung und untersuchte CpG-Sites im <i>IGFBP3</i> -Promotor	64
5.21	Methylierungsgrad von <i>IGFBP3</i>	65

5.22	Einfluss von <i>LSH</i> auf den Methylierungsgrad von <i>IGFBP3</i>	65
5.23	Methylierungsgrad von <i>DLK1</i>	66
5.24	Einfluss von <i>LSH</i> auf den Methylierungsgrad von <i>DLK1</i>	66
5.25	Methylierungsgrad von <i>IGF2</i>	67
5.26	Einfluss von <i>LSH</i> auf den Methylierungsgrad von <i>IGF2</i>	67
5.27	Primerlokalisierung und untersuchte CpG-Sites im <i>CDKN2A</i> -Promotor . . .	68
5.28	Methylierungsgrad von <i>CDKN2A</i>	68
5.29	Einfluss von <i>LSH</i> auf den Methylierungsgrad von <i>CDKN2A</i>	69
5.30	Zusammenfassung der Untersuchung des Methylierungsgrades nach 7 Tagen	70
5.31	Einfluss von <i>LSH</i> -Knockdown (siLSH) auf das Überleben von Hepatoblastomzellen	70
5.32	Einfluss von <i>LSH</i> -Knockdown (siLSH) auf die Proliferation von Hepatoblastomzellen	71
5.33	Langzeiteinfluss von <i>LSH</i> -Knockdown (siLSH) auf die Proliferation von Hepatoblastomzellen	72
5.34	Expression des Transkriptionsfaktors <i>FOXM1</i>	73
5.35	Expression des Transkriptionsfaktors <i>GLI1</i>	74
5.36	Identifizierte Bindestellen der Transkriptionsfaktoren <i>FOXM1</i> , <i>GLI1</i> , <i>LEF</i> und <i>p63</i> im <i>LSH</i> -Promotor	76
6.1	Modell zur transkriptionellen Regulation von <i>LSH</i>	80
6.2	Postuliertes Modell des <i>LSH</i> -Komplexes	85
6.3	<i>LSH</i> -Teufelskreis in Hepatoblastomen	86

Tabellenverzeichnis

1.1	Erhöhung des Hepatoblastomrisikos bei niedrigem Geburtsgewicht	10
1.2	Subklassifikationen der PRETEXT-Klassifikation	14
1.3	Prognose nach SIOPEL-Stratifizierung	15
1.4	Aberrationen der DNA-Methylierung in verschiedenen Tumorentitäten	22
3.1	Verwendete Zelllinien	31
3.3	Verwendete qPCR-Primer	34
3.4	Verwendete Pyrosequencing-Primer	35
3.5	Verwendete Antikörper	36
5.1	<i>FOXM1</i> -Bindungssequenzen	73
5.2	Identifizierte Bindestellen für <i>FOXM1</i> im <i>LSH</i> -Promotor	73
5.3	Identifizierte Bindestellen für <i>GLI1</i> im <i>LSH</i> -Promotor	74
5.4	Identifizierte Bindestellen für <i>LEF1</i> im <i>LSH</i> -Promotor	75

Literaturverzeichnis

- [1] O. Aguilera, A. Muñoz, M. Esteller, and M. F. Fraga. Epigenetic alterations of the wnt/beta-catenin pathway in human disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 7(1):13–21, Mar 2007.
- [2] A. Alexeev, A. Mazin, and S. C. Kowalczykowski. Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the rad51-ssdna nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol*, 10(3):182–186, Mar 2003.
- [3] W. Ali, S. Savasan, R. Rabah, and A. N. Mohamed. Cytogenetic findings in two new cases of hepatoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 133(2):179–182, Mar 2002.
- [4] P. Ansell, C. D. Mitchell, E. Roman, J. Simpson, J. M. Birch, and T. O. B. Eden. Relationships between perinatal and maternal characteristics and hepatoblastoma: a report from the ukccs. *Eur J Cancer*, 41(5):741–748, Mar 2005.
- [5] F. Antequera and A. Bird. Number of cpg islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):11995–11999, Dec 1993.
- [6] S. L. Anwar, T. Krech, B. Hasemeier, E. Schipper, N. Schweitzer, A. Vogel, H. Kreipe, and U. Lehmann. Loss of imprinting and allelic switching at the dlk1-meg3 locus in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 7(11):e49462, 2012.
- [7] S. Azzi, W. Abi Habib, and I. Netchine. Beckwith-wiedemann and russell-silver syndromes: from new molecular insights to the comprehension of imprinting regulation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(1):30–38, Feb 2014.
- [8] M. S. Bartolomei and A. C. Ferguson-Smith. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(7), Jul 2011.
- [9] M. Begemann, T. M. Trippett, E. Lis, and N. L. Antunes. Brain metastases in hepatoblastoma. *Pediatr Neurol*, 30(4):295–297, Apr 2004.
- [10] S. M. Belgnaoui, R. G. Gosden, O. J. Semmes, and A. Haoudi. Human line-1 retrotransposon induces dna damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell Int*, 6:13, 2006.
- [11] H. K. Bid, R. D. Roberts, M. Cam, A. Audino, R. T. Kurmasheva, J. Lin, P. J. Houghton, and H. Cam. deltanp63 promotes pediatric neuroblastoma and osteosarcoma by regulating tumor angiogenesis. *Cancer Res*, Oct 2013.

- [12] A. Bird. Dna methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1):6–21, Jan 2002.
- [13] J. Briscoe and P. P. Thérond. The mechanisms of hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(7):416–429, Jul 2013.
- [14] J. Brugarolas, K. Moberg, S. D. Boyd, Y. Taya, T. Jacks, and J. A. Lees. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated g1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(3):1002–1007, Feb 1999.
- [15] B. R. Cairns. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol*, 14(11):989–996, Nov 2007.
- [16] E. Candi, D. Dinsdale, A. Rufini, P. Salomoni, R. A. Knight, M. Mueller, P. H. Kramer, and G. Melino. Tap63 and deltanp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle*, 6(3):274–285, Feb 2007.
- [17] A. T. Casas-Melley, J. Malatack, D. Consolini, K. Mann, C. Raab, L. Flynn, P. Woolfrey, J. Menendez, and S. P. Dunn. Successful liver transplant for unresectable hepatoblastoma. *J Pediatr Surg*, 42(1):184–187, Jan 2007.
- [18] M. Chahrour and H. Y. Zoghbi. The story of rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*, 56(3):422–437, Nov 2007.
- [19] D. W. Chan, S. Y. M. Yu, P. M. Chiu, K. M. Yao, V. W. S. Liu, A. N. Y. Cheung, and H. Y. S. Ngan. Over-expression of foxm1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis. *J Pathol*, 215(3):245–252, Jul 2008.
- [20] T. Chen, S. Hevi, F. Gay, N. Tsujimoto, T. He, B. Zhang, Y. Ueda, and E. Li. Complete inactivation of dnmt1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet*, 39(3):391–396, Mar 2007.
- [21] M. P. Cosma, T. Tanaka, and K. Nasmyth. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*, 97(3):299–311, Apr 1999.
- [22] P. Czauderna, J. B. Otte, D. C. Aronson, F. Gauthier, G. Mackinlay, D. Roebuck, J. Plaschkes, G. Perilongo, and C. L. T. S. G. o. t. I. S. o. P. O. S. I. O. P. E. L. . Guidelines for surgical treatment of hepatoblastoma in the modern era—recommendations from the childhood liver tumour strategy group of the international society of paediatric oncology (siopel). *Eur J Cancer*, 41(7):1031–1036, May 2005.
- [23] S. T. da Rocha, C. A. Edwards, M. Ito, T. Ogata, and A. C. Ferguson-Smith. Genomic imprinting at the mammalian dlk1-dio3 domain. *Trends Genet*, 24(6):306–316, Jun 2008.

- [24] S. Das, L. G. Harris, B. J. Metge, S. Liu, A. I. Riker, R. S. Samant, and L. A. Shevde. The hedgehog pathway transcription factor *gli1* promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. *J Biol Chem*, 284(34):22888–22897, Aug 2009.
- [25] M. A. Dawson, T. Kouzarides, and B. J. P. Huntly. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med*, 367(7):647–657, Aug 2012.
- [26] S. de Fine Licht, L. S. Schmidt, N. H. Rod, K. Schmiegelow, P. M. Lähteenmäki, P. Kogner, C. Träger, T. Stokland, and J. Schüz. Hepatoblastoma in the nordic countries. *Int J Cancer*, 131(4):E555–E561, Aug 2012.
- [27] R. De La Fuente, C. Baumann, T. Fan, A. Schmidtman, I. Dobrinski, and K. Muegge. Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. *Nat Cell Biol*, 8(12):1448–1454, Dec 2006.
- [28] M. R. DeBaun and M. A. Tucker. Risk of cancer during the first four years of life in children from the beckwith-wiedemann syndrome registry. *J Pediatr*, 132(3 Pt 1):398–400, Mar 1998.
- [29] K. Dennis, T. Fan, T. Geiman, Q. Yan, and K. Muegge. Lsh, a member of the *snf2* family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev*, 15(22):2940–2944, Nov 2001.
- [30] K. Dezso, J. Halász, H. C. Bisgaard, S. Paku, E. Turányi, Z. Schaff, and P. Nagy. Delta-like protein (*dlk*) is a novel immunohistochemical marker for human hepatoblastomas. *Virchows Arch*, 452(4):443–448, Apr 2008.
- [31] E. C. Douglass, M. Reynolds, M. Finegold, A. B. Cantor, and A. Glicksman. Cisplatin, vincristine, and fluorouracil therapy for hepatoblastoma: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol*, 11(1):96–99, Jan 1993.
- [32] M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, and C. Gehrke. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human dna from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 10(8):2709–2721, Apr 1982.
- [33] M. Ehrlich, C. Sanchez, C. Shao, R. Nishiyama, J. Kehrl, R. Kuick, T. Kubota, and S. M. Hanash. Icf, an immunodeficiency syndrome: Dna methyltransferase 3b involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation. *Autoimmunity*, 41(4):253–271, May 2008.
- [34] M. Eichenmüller, I. Gruner, B. Hagl, B. Häberle, J. Müller-Höcker, D. von Schweinitz, and R. Kappler. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology*, 49(2):482–490, Feb 2009.

- [35] W. S. el Deiry, T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4):817–825, Nov 1993.
- [36] M. Emanuel, N. H. Radja, A. Henriksson, and H. Schiessel. The physics behind the larger scale organization of dna in eukaryotes. *Phys Biol*, 6(2):025008, 2009.
- [37] E. G. Endo, D. S. Walton, and D. M. Albert. Neonatal hepatoblastoma metastatic to the choroid and iris. *Arch Ophthalmol*, 114(6):757–761, Jun 1996.
- [38] M. Esteller. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358(11):1148–1159, Mar 2008.
- [39] F. A. Falix, D. C. Aronson, W. H. Lamers, J. K. Hiralall, and J. Seppen. Dlk1, a serum marker for hepatoblastoma in young infants. *Pediatr Blood Cancer*, Dec 2011.
- [40] T. Fan, J. P. Hagan, S. V. Kozlov, C. L. Stewart, and K. Muegge. Lsh controls silencing of the imprinted *cdkn1c* gene. *Development*, 132(4):635–644, Feb 2005.
- [41] T. Fan, A. Schmidtman, S. Xi, V. Briones, H. Zhu, H. C. Suh, J. Gooya, J. R. Keller, H. Xu, J. Roayaei, M. Anver, S. Ruscetti, and K. Muegge. Dna hypomethylation caused by lsh deletion promotes erythroleukemia development. *Epigenetics*, 3(3):134–142, 2008.
- [42] T. Fan, Q. Yan, J. Huang, S. Austin, E. Cho, D. Ferris, and K. Muegge. Lsh-deficient murine embryonal fibroblasts show reduced proliferation with signs of abnormal mitosis. *Cancer Res*, 63(15):4677–4683, Aug 2003.
- [43] A. P. Feinberg and B. Tycko. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2):143–153, Feb 2004.
- [44] J. N. Filkowski, Y. Ilnytsky, J. Tamminga, I. Koturbash, A. Golubov, T. Bagnyukova, I. P. Pogribny, and O. Kovalchuk. Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered mirna expression. *Carcinogenesis*, 31(6):1110–1115, Jun 2010.
- [45] C. Floridon, C. H. Jensen, P. Thorsen, O. Nielsen, L. Sunde, J. G. Westergaard, S. G. Thomsen, and B. Teisner. Does fetal antigen 1 (fa1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? a study of fa1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation*, 66(1):49–59, Aug 2000.
- [46] J. Fraumeni, Jr, P. J. Rosen, E. W. Hull, R. F. Barth, S. R. Shapiro, and J. F. O'Connor. Hepatoblastoma in infant sisters. *Cancer*, 24(5):1086–1090, Nov 1969.
- [47] J. R. Friedman and K. H. Kaestner. The foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 63(19-20):2317–2328, Oct 2006.

- [48] F. Fuks, P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, and T. Kouzarides. The methyl-cpg-binding protein mecp2 links dna methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, 278(6):4035–4040, Feb 2003.
- [49] E. Fussner, R. W. Ching, and D. P. Bazett-Jones. Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem Sci*, 36(1):1–6, Jan 2011.
- [50] T. M. Geiman, S. K. Durum, and K. Muegge. Characterization of gene expression, genomic structure, and chromosomal localization of hells (lsh). *Genomics*, 54(3):477–483, Dec 1998.
- [51] T. M. Geiman and K. Muegge. Lsh, an snf2/helicase family member, is required for proliferation of mature t lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9):4772–4777, Apr 2000.
- [52] T. M. Geiman and K. Muegge. Dna methylation in early development. *Mol Reprod Dev*, 77(2):105–113, Feb 2010.
- [53] T. M. Geiman, L. Tessarollo, M. R. Anver, J. B. Kopp, J. M. Ward, and K. Muegge. Lsh, a snf2 family member, is required for normal murine development. *Biochim Biophys Acta*, 1526(2):211–220, May 2001.
- [54] E. Gemenetzidis, A. Bose, A. M. Riaz, T. Chaplin, B. D. Young, M. Ali, D. Sugden, J. K. Thurlow, S.-C. Cheong, S.-H. Teo, H. Wan, A. Waseem, E. K. Parkinson, F. Fortune, and M.-T. Teh. Foxm1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. *PLoS One*, 4(3):e4849, 2009.
- [55] F. M. Giardiello, G. J. Offerhaus, A. J. Krush, S. V. Booker, A. C. Tersmette, J. W. Mulder, C. N. Kelley, and S. R. Hamilton. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *J Pediatr*, 119(5):766–768, Nov 1991.
- [56] R. J. Gibbons, T. L. McDowell, S. Raman, D. M. O’Rourke, D. Garrick, H. Ayyub, and D. R. Higgs. Mutations in atrx, encoding a swi/snf-like protein, cause diverse changes in the pattern of dna methylation. *Nat Genet*, 24(4):368–371, Apr 2000.
- [57] R. J. Gibbons, D. J. Picketts, and D. R. Higgs. Syndromal mental retardation due to mutations in a regulator of gene expression. *Hum Mol Genet*, 4 Spec No:1705–1709, 1995.
- [58] M. G. Goll and T. H. Bestor. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 74:481–514, 2005.
- [59] M. Gonzalez-Zulueta, C. M. Bender, A. S. Yang, T. Nguyen, R. W. Beart, J. M. Van Tornout, and P. A. Jones. Methylation of the 5’ cpg island of the p16/cdkn2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res*, 55(20):4531–4535, Oct 1995.

- [60] L. Gramantieri, C. Giovannini, A. Lanzi, P. Chieco, M. Ravaioli, A. Venturi, G. L. Grazi, and L. Bolondi. Aberrant notch3 and notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 27(7):997–1007, Sep 2007.
- [61] S. G. Gray, T. Eriksson, C. Ekström, S. Holm, D. von Schweinitz, P. Kogner, B. Sandstedt, T. Pietsch, and T. J. Ekström. Altered expression of members of the igf-axis in hepatoblastomas. *Br J Cancer*, 82(9):1561–1567, May 2000.
- [62] J. B. Gurdon. Genetic reprogramming following nuclear transplantation in amphibia. *Semin Cell Dev Biol*, 10(3):239–243, Jun 1999.
- [63] J. E. Haas, J. H. Feusner, and M. J. Finegold. Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable. *Cancer*, 92(12):3130–3134, Dec 2001.
- [64] J. E. Haas, K. A. Muczynski, M. Krailo, A. Ablin, V. Land, T. J. Vietti, and G. D. Hammond. Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. *Cancer*, 64(5):1082–1095, Sep 1989.
- [65] B. Haeberle and D. v. Schweinitz. Treatment of hepatoblastoma in the german cooperative pediatric liver tumor studies. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4:493–498, 2012.
- [66] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674, Mar 2011.
- [67] R. S. Hansen, C. Wijmenga, P. Luo, A. M. Stanek, T. K. Canfield, C. M. Weemaes, and S. M. Gartler. The dnmt3b dna methyltransferase gene is mutated in the icf immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25):14412–14417, Dec 1999.
- [68] A. L. Hartley, J. M. Birch, A. M. Kelsey, P. H. Jones, M. Harris, and V. Blair. Epidemiological and familial aspects of hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 18(2):103–109, 1990.
- [69] W. Hartmann, A. Waha, A. Koch, C. G. Goodyer, S. Albrecht, D. von Schweinitz, and T. Pietsch. p57(kip2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(kip2), igf2, and h19. *Am J Pathol*, 157(4):1393–1403, Oct 2000.
- [70] K. Hata and Y. Sakaki. Identification of critical cpG sites for repression of l1 transcription by dna methylation. *Gene*, 189(2):227–234, Apr 1997.
- [71] J. G. Herman, F. Latif, Y. Weng, M. I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D. S. Duan, J. R. Gnarr, and W. M. Linehan. Silencing of the vhl tumor-suppressor gene by dna methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21):9700–9704, Oct 1994.

- [72] J. G. Herman, A. Merlo, L. Mao, R. G. Lapidus, J. P. Issa, N. E. Davidson, D. Sidransky, and S. B. Baylin. Inactivation of the *cdkn2/p16/mts1* gene is frequently associated with aberrant dna methylation in all common human cancers. *Cancer Res*, 55(20):4525–4530, Oct 1995.
- [73] K. Hibi, B. Trink, M. Patturajan, W. H. Westra, O. L. Caballero, D. E. Hill, E. A. Ratovitski, J. Jen, and D. Sidransky. Ais is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10):5462–5467, May 2000.
- [74] S. Honda, Y. Arai, M. Haruta, F. Sasaki, M. Ohira, H. Yamaoka, H. Horie, A. Nakagawara, E. Hiyama, S. Todo, and Y. Kaneko. Loss of imprinting of *igf2* correlates with hypermethylation of the h19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer*, 99(11):1891–1899, Dec 2008.
- [75] B. Horsthemke. In brief: genomic imprinting and imprinting diseases. *J Pathol*, 232(5):485–487, Apr 2014.
- [76] J. Huang, T. Fan, Q. Yan, H. Zhu, S. Fox, H. J. Issaq, L. Best, L. Gangi, D. Munroe, and K. Muegge. Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res*, 32(17):5019–5028, 2004.
- [77] L. J. Hughes and V. V. Michels. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet*, 43(6):1023–1025, Aug 1992.
- [78] A. Hurlstone and H. Clevers. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J*, 21(10):2303–2311, May 2002.
- [79] C. A. Iacobuzio-Donahue. Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4:229–249, 2009.
- [80] Y. Ilnytskyy, F. J. Zemp, I. Koturbash, and O. Kovalchuk. Altered microrna expression patterns in irradiated hematopoietic tissues suggest a sex-specific protective mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(1):41–45, Dec 2008.
- [81] L. Jackson-Grusby, C. Beard, R. Possemato, M. Tudor, D. Fambrough, G. Csankovszki, J. Dausman, P. Lee, C. Wilson, E. Lander, and R. Jaenisch. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, 27(1):31–39, Jan 2001.
- [82] J. R. Janus, R. R. Laborde, A. J. Greenberg, V. W. Wang, W. Wei, A. Trier, S. M. Olsen, E. J. Moore, K. D. Olsen, and D. I. Smith. Linking expression of *foxm1*, *cep55* and *hells* to tumorigenesis in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 121(12):2598–2603, Dec 2011.
- [83] C. D. Jarvis, T. Geiman, M. P. Vila-Storm, O. Osipovich, U. Akella, S. Candeias, I. Nathan, S. K. Durum, and K. Muegge. A novel putative helicase produced in early murine lymphocytes. *Gene*, 169(2):203–207, Mar 1996.

- [84] M. Jaskelioff, S. Van Komen, J. E. Krebs, P. Sung, and C. L. Peterson. Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex dna joint formation with chromatin. *J Biol Chem*, 278(11):9212–9218, Mar 2003.
- [85] J. A. Jeddloh, T. L. Stokes, and E. J. Richards. Maintenance of genomic methylation requires a swi2/snf2-like protein. *Nat Genet*, 22(1):94–97, May 1999.
- [86] P. A. Jones. Functions of dna methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7):484–492, Jul 2012.
- [87] P. A. Jones and G. Liang. Rethinking how dna methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*, 10(11):805–811, Nov 2009.
- [88] V. V. Kalinichenko, M. L. Major, X. Wang, V. Petrovic, J. Kuechle, H. M. Yoder, M. B. Dennewitz, B. Shin, A. Datta, P. Raychaudhuri, and R. H. Costa. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19arf tumor suppressor. *Genes Dev*, 18(7):830–850, Apr 2004.
- [89] H. M. Katzenstein, C. Rigsby, P. H. Shaw, T. L. Mitchell, P. R. Haut, and M. Kletzel. Novel therapeutic approaches in the treatment of children with hepatoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24(9):751–755, Dec 2002.
- [90] E. Kavanagh and B. Joseph. The hallmarks of cdkn1c (p57, kip2) in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1816(1):50–56, Aug 2011.
- [91] H. Kazazian, Jr and J. V. Moran. The impact of l1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet*, 19(1):19–24, May 1998.
- [92] W. M. Keyes, M. Pecoraro, V. Aranda, E. Vernersson-Lindahl, W. Li, H. Vogel, X. Guo, E. L. Garcia, T. V. Michurina, G. Enikolopov, S. K. Muthuswamy, and A. A. Mills. Np63 is an oncogene that targets chromatin remodeler lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 8(2):164–176, Feb 2011.
- [93] H.-E. Kim, J. T. Symanowski, E. E. Samlowski, J. Gonzales, and B. Ryu. Quantitative measurement of circulating lymphoid-specific helicase (hells) gene transcript: a potential serum biomarker for melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23(6):845–848, Dec 2010.
- [94] I.-M. Kim, T. Ackerson, S. Ramakrishna, M. Tretiakova, I.-C. Wang, T. V. Kalin, M. L. Major, G. A. Gusarova, H. M. Yoder, R. H. Costa, and V. V. Kalinichenko. The forkhead box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Res*, 66(4):2153–2161, Feb 2006.
- [95] K. W. Kinzler and B. Vogelstein. The gli gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol*, 10(2):634–642, Feb 1990.

- [96] A. Koch, D. Denkhaus, S. Albrecht, I. Leuschner, D. von Schweinitz, and T. Pietsch. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*, 59(2):269–273, Jan 1999.
- [97] R. LAG., S. MA., G. JG., L. M., T. T., Y. JL., and B. G. (eds). Cancer incidence and survival among children and adolescents:.. *United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program*, 2012.
- [98] D. W. Lee, K. Zhang, Z. Q. Ning, E. H. Raabe, S. Tintner, R. Wieland, B. J. Wilkins, J. M. Kim, R. I. Blough, and R. J. Arceci. Proliferation-associated snf2-like gene (pasg): a snf2 family member altered in leukemia. *Cancer Res*, 60(13):3612–3622, Jul 2000.
- [99] G. Li and D. Reinberg. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 21(2):175–186, Apr 2011.
- [100] Y. Li and H. Sasaki. Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Cell Res*, 21(3):466–473, Mar 2011.
- [101] L. Ling, V. Nurcombe, and S. M. Cool. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*, 433(1-2):1–7, Mar 2009.
- [102] R. Lister, M. Pelizzola, R. H. Dowen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q.-M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren, and J. R. Ecker. Human dna methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271):315–322, Nov 2009.
- [103] D. R. Littler, M. Alvarez-Fernández, A. Stein, R. G. Hibbert, T. Heidebrecht, P. Aloy, R. H. Medema, and A. Perrakis. Structure of the foxm1 dna-recognition domain bound to a promoter sequence. *Nucleic Acids Res*, 38(13):4527–4538, Jul 2010.
- [104] K. Luger, M. L. Dechassa, and D. J. Tremethick. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(7):436–447, Jul 2012.
- [105] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 a resolution. *Nature*, 389(6648):251–260, Sep 1997.
- [106] J.-H. Luo, B. Ren, S. Keryanov, G. C. Tseng, U. N. M. Rao, S. P. Monga, S. Strom, A. J. Demetris, M. Nalesnik, Y. P. Yu, S. Ranganathan, and G. K. Michalopoulos. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology*, 44(4):1012–1024, Oct 2006.

- [107] R. Maibach, D. Roebuck, L. Brugieres, M. Capra, P. Brock, P. Dall'Igna, J.-B. Otte, B. De Camargo, J. Zsiros, A. Zimmermann, D. Aronson, M. Childs, M. Scopinaro, B. Morland, J. Plaschkes, P. Czauderna, and G. Perilongo. Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the siopel experience. *Eur J Cancer*, 48(10):1543–1549, Jul 2012.
- [108] M. H. Malogolowkin, H. M. Katzenstein, R. L. Meyers, M. D. Krailo, J. M. Rowland, J. Haas, and M. J. Finegold. Complete surgical resection is curative for children with hepatoblastoma with pure fetal histology: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 29(24):3301–3306, Aug 2011.
- [109] C. D. Mao and S. W. Byers. Cell-context dependent tcf/lef expression and function: alternative tales of repression, de-repression and activation potentials. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 21(3):207–236, 2011.
- [110] R. R. Meehan, S. Pennings, and I. Stancheva. Lashings of dna methylation, forkfuls of chromatin remodeling. *Genes Dev*, 15(24):3231–3236, Dec 2001.
- [111] M. K. Mirza, Y. Sun, Y. D. Zhao, H.-H. S. K. Potula, R. S. Frey, S. M. Vogel, A. B. Malik, and Y.-Y. Zhao. Foxm1 regulates re-annealing of endothelial adherens junctions through transcriptional control of beta-catenin expression. *J Exp Med*, 207(8):1675–1685, Aug 2010.
- [112] K. Muegge. Lsh, a guardian of heterochromatin at repeat elements. *Biochem Cell Biol*, 83(4):548–554, Aug 2005.
- [113] M. J. Murray and J. C. Nicholson. Alpha-fetoprotein. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 96(4):141–147, Aug 2011.
- [114] K. Myant and I. Stancheva. Lsh cooperates with dna methyltransferases to repress transcription. *Mol Cell Biol*, 28(1):215–226, Jan 2008.
- [115] X. Nan, H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, and A. Bird. Transcriptional repression by the methyl-cpg-binding protein mecp2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683):386–389, May 1998.
- [116] V. M. Napoli and W. Campbell, Jr. Hepatoblastoma in infant sister and brother. *Cancer*, 39(6):2647–2650, Jun 1977.
- [117] J. Niu, T. Chen, L. Han, P. Wang, N. Li, and T. Tong. Transcriptional activation of the senescence regulator lsh by e2f1. *Mech Ageing Dev*, 132(4):180–186, Apr 2011.
- [118] S. K. T. Ooi, C. Qiu, E. Bernstein, K. Li, D. Jia, Z. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S.-P. Lin, C. D. Allis, X. Cheng, and T. H. Bestor. Dnmt3l connects unmethylated lysine 4 of histone h3 to de novo methylation of dna. *Nature*, 448(7154):714–717, Aug 2007.

- [119] J. A. Ortega, E. C. Douglass, J. H. Feusner, M. Reynolds, J. J. Quinn, M. J. Finegold, J. E. Haas, D. R. King, W. Liu-Mares, M. G. Sensel, and M. D. Krailo. Randomized comparison of cisplatin/vincristine/fluorouracil and cisplatin/continuous infusion doxorubicin for treatment of pediatric hepatoblastoma: A report from the children's cancer group and the pediatric oncology group. *J Clin Oncol*, 18(14):2665–2675, Jul 2000.
- [120] R. D. Palmer and D. M. Williams. Dramatic response of multiply relapsed hepatoblastoma to irinotecan (cpt-11). *Med Pediatr Oncol*, 41(1):78–80, Jul 2003.
- [121] I. S. Pateras, K. Apostolopoulou, K. Niforou, A. Kotsinas, and V. G. Gorgoulis. p57kip2: "kipping the cell under control. *Mol Cancer Res*, 7(12):1902–1919, Dec 2009.
- [122] G. Perilongo, J. Brown, E. Shafford, P. Brock, B. De Camargo, J. W. Keeling, A. Vos, A. Philips, J. Pritchard, and J. Plaschkes. Hepatoblastoma presenting with lung metastases: treatment results of the first cooperative, prospective study of the international society of paediatric oncology on childhood liver tumors. *Cancer*, 89(8):1845–1853, Oct 2000.
- [123] G. Perilongo and E. A. Shafford. Liver tumours. *Eur J Cancer*, 35(6):953–8; discussion 958–9, Jun 1999.
- [124] M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45, May 2001.
- [125] R. N. Plasschaert and M. S. Bartolomei. Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Development*, 141(9):1805–1813, May 2014.
- [126] M. Pollak. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*, 12(3):159–169, Mar 2012.
- [127] J. Pritchard, J. Brown, E. Shafford, G. Perilongo, P. Brock, C. Dicks-Mireaux, J. Keeling, A. Phillips, A. Vos, and J. Plaschkes. Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach—results of the first prospective study of the international society of pediatric oncology. *J Clin Oncol*, 18(22):3819–3828, Nov 2000.
- [128] R. Purcell, M. Childs, R. Maibach, C. Miles, C. Turner, A. Zimmermann, and M. Sullivan. Hgf/c-met related activation of beta-catenin in hepatoblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 30:96, 2011.
- [129] M. Qayed, C. Powell, E. R. Morgan, M. Haugen, and H. M. Katzenstein. Irinotecan as maintenance therapy in high-risk hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 54(5):761–763, May 2010.
- [130] P. Quintero-Ronderos and G. Montoya-Ortiz. Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Dis*, 2012:593720, 2012.

- [131] E. H. Raabe, L. Abdurrahman, G. Behbehani, and R. J. Arceci. An snf2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation. *Dev Dyn*, 221(1):92–105, May 2001.
- [132] I. Regel, M. Eichenmüller, S. Joppien, J. Liebl, B. Häberle, J. Müller-Höcker, A. Vollmar, D. von Schweinitz, and R. Kappler. Igfbp3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. *Mol Cancer*, 11(1):9, 2012.
- [133] S. Reister, C. Kordes, I. Sawitzka, and D. Häussinger. The epigenetic regulation of stem cell factors in hepatic stellate cells. *Stem Cells Dev*, 20(10):1687–1699, Oct 2011.
- [134] M. Reynolds, E. C. Douglass, M. Finegold, A. Cantor, and A. Glicksman. Chemotherapy can convert unresectable hepatoblastoma. *J Pediatr Surg*, 27(8):1080–3; discussion 1083–4, Aug 1992.
- [135] P. Riikonen, L. Tuominen, A. Seppä, and M. Perkkiö. Simultaneous hepatoblastoma in identical male twins. *Cancer*, 66(11):2429–2431, Dec 1990.
- [136] D. J. Roebuck, D. Aronson, P. Clapuyt, P. Czauderna, J. de Ville de Goyet, F. Gauthier, G. Mackinlay, R. Maibach, K. McHugh, O. E. Olsen, J.-B. Otte, D. Pariente, J. Plaschkes, M. Childs, G. Perilongo, and I. C. L. T. S. G. . 2005 pretext: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the siopel group. *Pediatr Radiol*, 37(2):123–32; quiz 249–50, Feb 2007.
- [137] C. Romagosa, S. Simonetti, L. López-Vicente, A. Mazo, M. E. Lleonart, J. Castellvi, and S. Ramon y Cajal. p16(ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 30(18):2087–2097, May 2011.
- [138] A.-L. Rougemont, V. A. McLin, C. Toso, and B. E. Wildhaber. Adult hepatoblastoma: learning from children. *J Hepatol*, 56(6):1392–1403, Jun 2012.
- [139] P. Ruck, J. C. Xiao, T. Pietsch, D. Von Schweinitz, and E. Kaiserling. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by ov-1 and ov-6. *Histopathology*, 31(4):324–329, Oct 1997.
- [140] A. Saha, J. Wittmeyer, and B. R. Cairns. Chromatin remodelling: the industrial revolution of dna around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(6):437–447, Jun 2006.
- [141] T. Sakai, J. Toguchida, N. Ohtani, D. W. Yandell, J. M. Rapaport, and T. P. Dryja. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*, 48(5):880–888, May 1991.

- [142] J. Sandoval and M. Esteller. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev*, 22(1):50–55, Feb 2012.
- [143] M. Serrano. The tumor suppressor protein p16ink4a. *Exp Cell Res*, 237(1):7–13, Nov 1997.
- [144] Y.-L. Shih, C.-B. Hsieh, H.-C. Lai, M.-D. Yan, T.-Y. Hsieh, Y.-C. Chao, and Y.-W. Lin. Sfrp1 suppressed hepatoma cells growth through wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer*, 121(5):1028–1035, Sep 2007.
- [145] E. E. J. Smeets, K. Pelc, and B. Dan. Rett syndrome. *Mol Syndromol*, 2(3-5):113–127, Apr 2012.
- [146] S. W. Soukup and B. L. Lampkin. Trisomy 2 and 20 in two hepatoblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 3(3):231–234, May 1991.
- [147] B. T. Spear, L. Jin, S. Ramasamy, and A. Dobierzewska. Transcriptional control in the mammalian liver: liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation. *Cell Mol Life Sci*, 63(24):2922–2938, Dec 2006.
- [148] L. G. Spector and J. Birch. The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, Jun 2012.
- [149] L. G. Spector, S. E. Puumala, S. E. Carozza, E. J. Chow, E. E. Fox, S. Horel, K. J. Johnson, C. C. McLaughlin, P. Reynolds, J. V. Behren, and B. A. Mueller. Cancer risk among children with very low birth weights. *Pediatrics*, 124(1):96–104, Jul 2009.
- [150] K. Sue, K. Ikeda, A. Nakagawara, Y. Hironaga, Y. Hachitanda, K. Otubo, T. Mitsuihi, and T. Aoyama. Intrahepatic arterial injections of cisplatin-phosphatidylcholine-lipiodol suspension in two unresectable hepatoblastoma cases. *Med Pediatr Oncol*, 17(6):496–500, 1989.
- [151] L.-Q. Sun and R. J. Arceci. Altered epigenetic patterning leading to replicative senescence and reduced longevity. a role of a novel snf2 factor, pasg. *Cell Cycle*, 4(1):3–5, Jan 2005.
- [152] L.-Q. Sun, D. W. Lee, Q. Zhang, W. Xiao, E. H. Raabe, A. Meeker, D. Miao, D. L. Huso, and R. J. Arceci. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the snf2-like gene, pasg. *Genes Dev*, 18(9):1035–1046, May 2004.
- [153] N. Surendran, K. Radhakrishna, and V. G. Chellam. Hepatoblastoma in siblings. *J Pediatr Surg*, 24(11):1169–1171, Nov 1989.
- [154] H. J. Szerlong and J. C. Hansen. Nucleosome distribution and linker dna: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochem Cell Biol*, 89(1):24–34, Feb 2011.

- [155] M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, and A. Miyajima. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem*, 149(3):231–239, Mar 2011.
- [156] L. Tang, E. Nogales, and C. Ciferri. Structure and function of swi/snf chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol*, 102(2-3):122–128, 2010.
- [157] N. Tanimizu and T. Mitaka. Re-evaluation of liver stem/progenitor cells. *Organogenesis*, 10(2), Jan 2014.
- [158] M. Tanimura, I. Matsui, J. Abe, H. Ikeda, N. Kobayashi, M. Ohira, M. Yokoyama, and M. Kaneko. Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. *Cancer Res*, 58(14):3032–3035, Jul 1998.
- [159] Y. Tao, S. Liu, V. Briones, T. M. Geiman, and K. Muegge. Treatment of breast cancer cells with dna demethylating agents leads to a release of pol ii stalling at genes with dna-hypermethylated regions upstream of tss. *Nucleic Acids Res*, 39(22):9508–9520, Dec 2011.
- [160] Y. Tao, S. Xi, V. Briones, and K. Muegge. Lsh mediated rna polymerase ii stalling at hoxc6 and hoxc8 involves dna methylation. *PLoS One*, 5(2):e9163, 2010.
- [161] Y. Tao, S. Xi, J. Shan, A. Maunakea, A. Che, V. Briones, E. Y. Lee, T. Geiman, J. Huang, R. Stephens, R. M. Leighty, K. Zhao, and K. Muegge. Lsh, chromatin remodeling family member, modulates genome-wide cytosine methylation patterns at nonrepeat sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(14):5626–5631, Apr 2011.
- [162] M.-T. Teh, E. Gemenetzidis, D. Patel, R. Tariq, A. Nadir, A. W. Bahta, A. Waseem, and I. L. Hutchison. Foxm1 induces a global methylation signature that mimics the cancer epigenome in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 7(3):e34329, 2012.
- [163] M.-T. Teh, S.-T. Wong, G. W. Neill, L. R. Ghali, M. P. Philpott, and A. G. Quinn. Foxm1 is a downstream target of gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res*, 62(16):4773–4780, Aug 2002.
- [164] J. O. Thomas. The higher order structure of chromatin and histone h1. *J Cell Sci Suppl*, 1:1–20, 1984.
- [165] G. E. Tomlinson, E. C. Douglass, B. H. Pollock, M. J. Finegold, and N. R. Schneider. Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes Chromosomes Cancer*, 44(2):177–184, Oct 2005.
- [166] G. E. Tomlinson and R. Kappler. Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, Jul 2012.

- [167] V. S. Tonk, K. S. Wilson, C. F. Timmons, and N. R. Schneider. Trisomy 2, trisomy 20, and del(17p) as sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 11(3):199–202, Nov 1994.
- [168] G. Tonon, C. Brennan, A. Protopopov, G. Maulik, B. Feng, Y. Zhang, D. B. Khatry, M. J. You, A. J. Aguirre, E. S. Martin, Z. Yang, H. Ji, L. Chin, K.-K. Wong, and R. A. Depinho. Common and contrasting genomic profiles among the major human lung cancer subtypes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70:11–24, 2005.
- [169] A. Tsumura, T. Hayakawa, Y. Kumaki, S.-i. Takebayashi, M. Sakaue, C. Matsuoka, K. Shimotohno, F. Ishikawa, E. Li, H. R. Ueda, J.-i. Nakayama, and M. Okano. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of dna methyltransferases dnmt1, dnmt3a and dnmt3b. *Genes Cells*, 11(7):805–814, Jul 2006.
- [170] M. Vignali, A. H. Hassan, K. E. Neely, and J. L. Workman. Atp-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*, 20(6):1899–1910, Mar 2000.
- [171] B. von Eyss, J. Maaskola, S. Memczak, K. Möllmann, A. Schuetz, C. Loddenkemper, M.-D. Tanh, A. Otto, K. Muegge, U. Heinemann, N. Rajewsky, and U. Ziebold. The snf2-like helicase hells mediates e2f3-dependent transcription and cellular transformation. *EMBO J*, 31(4):972–985, Feb 2012.
- [172] D. von Schweinitz, J. A. Kraus, S. Albrecht, A. Koch, J. Fuchs, and T. Pietsch. Prognostic impact of molecular genetic alterations in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 38(2):104–108, Feb 2002.
- [173] S. Waga, G. J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls dna replication by interaction with pcna. *Nature*, 369(6481):574–578, Jun 1994.
- [174] A. Waseem, M. Ali, E. W. Odell, F. Fortune, and M.-T. Teh. Downstream targets of foxm1: Cep55 and hells are cancer progression markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 46(7):536–542, Jul 2010.
- [175] A. G. Weinberg and M. J. Finegold. Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol*, 14(6):512–537, Jun 1983.
- [176] J. Widom and A. Klug. Structure of the 300a chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, 43(1):207–213, Nov 1985.
- [177] I. Wierstra. The transcription factor foxm1c binds to and transactivates the promoter of the tumor suppressor gene e-cadherin. *Cell Cycle*, 10(5):760–766, Mar 2011.
- [178] I. Wierstra and J. Alves. Foxm1, a typical proliferation-associated transcription factor. *Biol Chem*, 388(12):1257–1274, Dec 2007.

- [179] S. P. Williams, B. D. Athey, L. J. Muglia, R. S. Schappe, A. H. Gough, and J. P. Langmore. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J*, 49(1):233–248, Jan 1986.
- [180] C. L. Woodcock and R. P. Ghosh. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5):a000596, May 2010.
- [181] D. M. Woodcock, C. B. Lawler, M. E. Linsenmeyer, J. P. Doherty, and W. D. Warren. Asymmetric methylation in the hypermethylated cpg promoter region of the human 11 retrotransposon. *J Biol Chem*, 272(12):7810–7816, Mar 1997.
- [182] Wu Ct and J. R. Morris. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293(5532):1103–1105, Aug 2001.
- [183] S. Xi, T. M. Geiman, V. Briones, Y. Guang Tao, H. Xu, and K. Muegge. Lsh participates in dna methylation and silencing of stem cell genes. *Stem Cells*, 27(11):2691–2702, Nov 2009.
- [184] S. Xi, H. Zhu, H. Xu, A. Schmidtman, T. M. Geiman, and K. Muegge. Lsh controls hox gene silencing during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(36):14366–14371, Sep 2007.
- [185] Q. Yan, E. Cho, S. Lockett, and K. Muegge. Association of lsh, a regulator of dna methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin. *Mol Cell Biol*, 23(23):8416–8428, Dec 2003.
- [186] Q. Yan, J. Huang, T. Fan, H. Zhu, and K. Muegge. Lsh, a modulator of cpg methylation, is crucial for normal histone methylation. *EMBO J*, 22(19):5154–5162, Oct 2003.
- [187] A. Yang, M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M. D. Fleming, V. Dötsch, N. C. Andrews, D. Caput, and F. McKeon. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 2(3):305–316, Sep 1998.
- [188] M. Yano, M. Ouchida, H. Shigematsu, N. Tanaka, K. Ichimura, K. Kobayashi, Y. Inaki, S. Toyooka, K. Tsukuda, N. Shimizu, and K. Shimizu. Tumor-specific exon creation of the hells/smarca6 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 112(1):8–13, Oct 2004.
- [189] H. Ye, T. F. Kelly, U. Samadani, L. Lim, S. Rubio, D. G. Overdier, K. A. Roebuck, and R. H. Costa. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol*, 17(3):1626–1641, Mar 1997.

- [190] Y. A. Yeh, P. H. Rao, C. T. Cigna, W. Middlesworth, J. H. Lefkowitz, and V. V. Murty. Trisomy 1q, 2, and 20 in a case of hepatoblastoma: possible significance of 2q35-q37 and 1q12-q21 rearrangements. *Cancer Genet Cytogenet*, 123(2):140–143, Dec 2000.
- [191] W. Zeng, C. Baumann, A. Schmidtman, A. Honaramooz, L. Tang, A. Bondareva, C. Dores, T. Fan, S. Xi, T. Geiman, R. Rathi, D. de Rooij, R. De La Fuente, K. Muegge, and I. Dobrinski. Lymphoid-specific helicase (hells) is essential for meiotic progression in mouse spermatocytes. *Biol Reprod*, 84(6):1235–1241, Jun 2011.
- [192] R. Zhou, L. Han, G. Li, and T. Tong. Senescence delay and repression of p16ink4a by lsh via recruitment of histone deacetylases in human diploid fibroblasts. *Nucleic Acids Res*, 37(15):5183–5196, Aug 2009.
- [193] H. Zhu, T. M. Geiman, S. Xi, Q. Jiang, A. Schmidtman, T. Chen, E. Li, and K. Muegge. Lsh is involved in de novo methylation of dna. *EMBO J*, 25(2):335–345, Jan 2006.
- [194] H. Zhu and H.-W. Lo. The human glioma-associated oncogene homolog 1 (gli1) family of transcription factors in gene regulation and diseases. *Curr Genomics*, 11(4):238–245, Jun 2010.

Danksagung

An diese Stelle sei mein herzlicher Dank an einige Personen, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gestellt.

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Roland Kappler meine große Dankbarkeit aussprechen. Dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Labor zu arbeiten. Durch sein großes Interesse an meiner Arbeit, die vielen konstruktiven Gespräche und seine große fachliche und menschliche Kompetenz, wurde für mich ein Arbeitsumfeld geschaffen, in dem man nicht nur gerne tätig war, sondern welches ebenso dazu motivierte tiefer in die Materie einzudringen und sich anzustrengen.

Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt Frau Shiva Promoli, die mir unermüdlich bei allen technischen Problemen zur Seite stand und ohne die der Kaffee nur halb so gut geschmeckt hätte. Auch bei meiner Kollegin Franziska Trippel, die mir nicht nur fachlich in vielen Belangen mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern mir auch eine gute Freundin geworden ist, möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Zuletzt bleibt mir noch, mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und bei Sabine zu bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich durch alle Phasen der Arbeit unterstützt und bestärkt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Kauffmann-Guerrero, Diego Erich

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

Die Rolle des DNMT-rekrutierenden Chromatinremodeler LSH in Hepatoblastomen

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

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

München, den

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand