

Identifikation und Charakterisierung eines Hepatoblastom-assoziierten onkogenen Clusters in der chromosomalen Region 2q24

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Martin Maximilian Rodemann

aus Soest

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Torsten Pietsch
2. Gutachterin: Prof. Dr. Marieta Toma

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2026

Aus dem Institut für Neuropathologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Einleitung	7
1.1.1 Fragestellung	10
1.2 Material und Methoden	12
1.3 Ergebnisse	19
1.4 Diskussion	30
1.5 Zusammenfassung	35
1.6 Abbildungsverzeichnis	36
1.7 Tabellenverzeichnis	37
1.8 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	38
2. Veröffentlichungen	44
3. Erklärung zum Eigenanteil	45
4. Danksagung	46

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	Adenomatous polyposis coli
AXIN1	Axin-1
AXIN2	Axin-2
BAZ2B	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CHIC	<i>Children's Hepatic tumors International Collaboration</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
CENTG1	Centaurin-gamma-1
CTNNB1	Catenin beta-1
DPP4	Dipeptidyl peptidase 4
FAP	Prolyl endopeptidase FAP
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FIGN	Fidgetin
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GCA	Grancalcin
GISTIC	<i>Genomic Identification of Significant Targets in Cancer</i>
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

H19	H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript
HB	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histone deacetylase
hsa-miR-26a	microRNA 26a-1
HTA2	<i>GeneChip Human Transcriptome Array 2.0</i>
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IHC	Immunhistochemie/immunhistochemisch
JPLT	<i>Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor</i>
lncRNA	<i>long-non-coding RNA</i>
LTR	Lebertumorregister
MARCH7	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH7
MAS5	<i>Microarray Suite (MAS) 5.0</i>
Mbp	Megabasenpaare
MIP	<i>Molecular Inversion Probes</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYC	Myc proto-oncogene
NFE2L2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NMYC	N-myc proto-oncogen
OR	<i>Odds ratio</i>
OS	<i>Overall survival</i>
PFS	<i>Progression-free survival</i>

PNN	Pinin
PRETEXT	PRE-Treatment EXTent of disease
RBMS1	RNA-binding motif, single-stranded-interacting 1
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC4A10	Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger
SOR	<i>Shortest Overlapping Region</i>
TANK	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator
TBR1	T-box brain 1
TCLT	Transitionaler Leberzelltumor
TERT	Telomerase reverse transcriptase
Wnt	Wingless

Anmerkung: Zur Abgrenzung zwischen Genen und ihren Genprodukten/Proteinen wurde für Erstere eine kursive Schreibweise gewählt.

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Pädiatrische Tumorerkrankungen sind selten und machen nur etwa 1 % aller jährlich neudiagnostizierten Krebserkrankungen aus. Trotz beeindruckender Behandlungserfolge in den letzten Jahrzehnten zählen sie weiterhin zu den häufigsten Todesursachen im Kindesalter (Ward et al., 2014). Aufgrund der Weiterentwicklung von Früherkennungs- und Behandlungsmaßnahmen konnte das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben mittlerweile jedoch auf etwa 80 % gesteigert werden (Bhakta et al., 2019). Zu den weltweit häufigsten Tumorerkrankungen zwischen 0 und 14 Jahren zählen Leukämien, Lymphome und Tumore des zentralen Nervensystems; Lebertumore machen hierbei etwa 1,5 % aller Fälle aus (Steliarova-Foucher et al., 2017).

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste primär maligne Lebertumor bei Kindern. Mit einer jährlichen Inzidenz von 2,2 Fällen pro Millionen Kinder macht das HB etwa 1 % aller kindlichen Krebserkrankungen aus (Feng et al., 2019). Damit ist es nach dem Neuro- und Nephroblastom der dritthäufigste abdominelle Tumor in dieser Altersgruppe (Kaatsch und Grabow, 2012). Weltweit, insbesondere aber in Industrieländern, ist eine Inzidenzzunahme zu beobachten, welche auf das vermehrte Auftreten von bekannten Risikofaktoren wie Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht zurückgeführt wird (Tulla et al., 2015). Das HB zeigt eine männliche Prädisposition im Verhältnis von 1,6:1 und einen Altersgipfel zwischen 6 Monaten und 3 Jahren (von Schweinitz, 2006). Auch wenn der Großteil der HB sporadisch entsteht, sind sie in einigen Fällen mit genetischen Syndromen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und der Trisomie 18 (Edwards-Syndrom) assoziiert (Nussbaumer und Benesch, 2022).

Das HB ist ein embryonaler Tumor, der vermutlich aus primitiven hepatozellulären Vorläuferzellen (Hepatoblasten) entsteht. Diese Tumore können die verschiedenen Stadien der Leberentwicklung abbilden und daher unterschiedlich differenziert sein. Histologisch lassen sich ein rein epithelialer Typ sowie ein gemischt epithelial-mesenchymaler Typ unterscheiden (Weinberg und Finegold, 1983). HB vom epithelialen Typ lassen sich wei-

ter in einen fetalen, embryonalen, makrotrabekulären, cholangioblastischen sowie kleinzellig-undifferenzierten Typ unterteilen; ein Mischbild der verschiedenen Typen ist ebenfalls häufig. Der gemischt epithelial-mesenchymaler Typ kann im Hinblick auf das Vorhandensein von teratoiden Anteilen weiter unterteilt werden (Cho et al., 2023).

Während die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate in den 1970er Jahren noch bei 30 % lag, konnte sie mittlerweile auf etwa 80 % gesteigert werden (Häberle et al., 2019). Dieser Erfolg beruht auf dem heutigen Einsatz (neo-)adjuvanter Chemotherapien, neuen chirurgischen Ansätzen sowie der multizentrischen Zusammenarbeit großer internationaler Studiengruppen (Czauderna et al., 2014). Die Stratifizierung in vier Risikogruppen nach dem CHIC-System (*Very-low-risk*, *Low-risk*, *Intermediate-risk* und *High-risk*) berücksichtigt neben dem PRETEXT-Stadium auch Risikofaktoren wie Fernmetastasen bzw. ergänzende anatomische Risikofaktoren; je nach Stadium werden zum Teil auch der AFP-Spiegel im Blut und das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose zur Einteilung herangezogen (Meyers et al., 2017). Die Hauptsäule der kurativen Therapie bleibt die chirurgische Resektion (Meyers et al., 2012; von Schweinitz, 2006). Grundsätzlich wird aber eine kombinierte Therapiestrategie, bestehend aus prä- und postoperativer Chemotherapie, entsprechend den aktuellen Empfehlungen der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) angestrebt (Yiallourous und Schmid, 2024). Lediglich in der *Very-low-risk*-Gruppe ist bei gut-differenzierter-fetaler Histologie eine primäre Resektion ohne weitere Therapie ausreichend (Yiallourous und Schmid, 2024). Als wirksamstes Chemotherapeutikum gilt Cisplatin, das je nach Risikogruppen-Protokoll entweder allein oder in Kombination mit u.a. Carboplatin, Doxorubicin, Vincristin und 5-Fluorouracil eingesetzt wird (Häberle und Schweinitz, 2012; Häberle et al., 2019; Yiallourous und Schmid, 2024; Zsiros et al., 2013). Bei Irresektabilität steht eine Lebertransplantation als *ultima ratio* zur Verfügung (Honda et al., 2023; Otte et al., 2004). Aktuelle Forschungsansätze konzentrieren sich auf die Entwicklung von zielgerichteten Therapien. Insbesondere Medikamente, die den Hedgehog- oder den Wnt-Signalweg blockieren, werden als Therapieoptionen betrachtet (Eichenmüller et al., 2009; Ilmer et al., 2015). Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die *HDAC*-Inhibition (Beck et al., 2016; Espinoza et al., 2024). Da die Behandlung des HB insbesondere in fortgeschrittenen Stadien eine Herausforderung darstellt, könnten diese zielgerichteten

Therapien zukünftig eine individuellere Patientenversorgung mit deutlich verbessertem Therapieansprechen bedeuten.

Die zentralen pathogenetischen Mechanismen des HB konnten identifiziert werden. Die pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs spielt hierbei eine Hauptrolle und kann in bis zu 90 % der Fälle beobachtet werden (Koch et al., 1999). Damit gehören HB zu den Krebserkrankungen mit den häufigsten Aberrationen des Wnt-Signalwegs (Cairo et al., 2008). Dieser Signalweg spielt bekanntermaßen eine wichtige Rolle in der physiologischen Entwicklung von hepatozellulären Vorläuferzellen. Seine Dysregulation beruht hauptsächlich auf aktivierenden Mutationen von *CTNNB1* (kodiert für Beta-Catenin) oder - seltener - auf Veränderungen anderer Gene wie *APC*, *AXIN1* und *AXIN2*, welche für Komponenten des Wnt-Signalwegs kodieren (Koch et al., 1999; Oda et al., 1996; Taniguchi et al., 2002). Auch wenn HB insgesamt eine niedrige Mutationsrate zeigen, konnten weitere Mutationen im *NFE2L2*-Gen und im *TERT*-Promotor bei einem kleineren Teil der HB identifiziert werden (Eichenmüller et al., 2014). Imprinting-Defekte in der kritischen BWS-Region 11p15 führen zu einer Überexpression von *IGF2* und einer Herunterregulation von *H19* (Albrecht et al., 1994; Suzuki et al., 2008).

Cairo et al. (2008) definierten anhand einer 16-Gen-Signatur zwei molekulare Subgruppen (C1/C2) mit prognostischer Relevanz. Die C1-Gruppe entspricht Stadien höherer Differenzierung und zeigt typischerweise eine fetale Histologie mit niedriger Proliferationsrate. Die C2-Gruppe bildet undifferenzierte Stadien der Leberentwicklung ab und ist durch die Expression hepatischer Stammzell-Marker charakterisiert. Dies zeigt sich durch eine hauptsächlich embryonale Histologie mit höherer Proliferationsrate. Typisch sind chromosomale Zugewinne von 2p und 8q sowie eine verstärkte c-Myc-Expression. Allerdings ist beiden Gruppen die Überexpression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs gemein. Im Vergleich hat die C2-Gruppe eine signifikant schlechtere Prognose (Cairo et al., 2008).

Zu den typischen zytogenetischen Veränderungen des HB gehören chromosomale Zugewinne der Chromosomen/Chromosomenarme 1q, 2, 8 und 20 sowie Verluste von 4q und 18 (Barros et al., 2021; Weber et al., 2000). Rekurrende fokale 2q24-Zugewinne/Amplifikationen deuten auf die Existenz eines bisher nicht identifizierten onkogenen Treibers in dieser chromosomalen Region hin (Arai et al., 2010; Barros et al.,

2021; Hu et al., 2000; Kumon et al., 2001; Nagae et al., 2021; Rodrigues et al., 2014; Weber et al., 2000). Bisher konnten onkogene Treiber im Bereich von 2q24 nicht identifiziert werden. Die Häufigkeit dieser 2q24-Kopienzahl-Zugewinne/Amplifikationen lassen jedoch vermuten, dass dieses Ereignis einen wichtigen pathogenetischen Mechanismus von HB darstellt.

1.1.1 Fragestellung

Bisher ist es nicht gelungen, onkogene Treiber im Bereich der 2q24-Region zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die Kopienzahlvariationen (CNV) einer Kohorte von 76 HB-Patient*innen untersucht. Die kleinste überlappende Region (SOR) des 2q24-Zugewinns sollte näher eingegrenzt und die dort lokalisierten Gene identifiziert werden. RNA- und Protein-Expressionsanalysen zielten darauf ab, überexprimierte Kandidaten unter diesen SOR-Genen herauszustellen und nachfolgend funktionell *in vitro* zu charakterisieren. Durch genspezifischen siRNA-Knockdown in drei etablierten humanen HB-Zelllinien sollte der Einfluss auf die Proliferations- und Apoptoserate sowie Interaktion mit dem Wnt-Signalweg untersucht werden (Abb. 1). Grundlage für die vorliegende Dissertation bildet die von Rodemann et al. (2025) publizierte Arbeit.

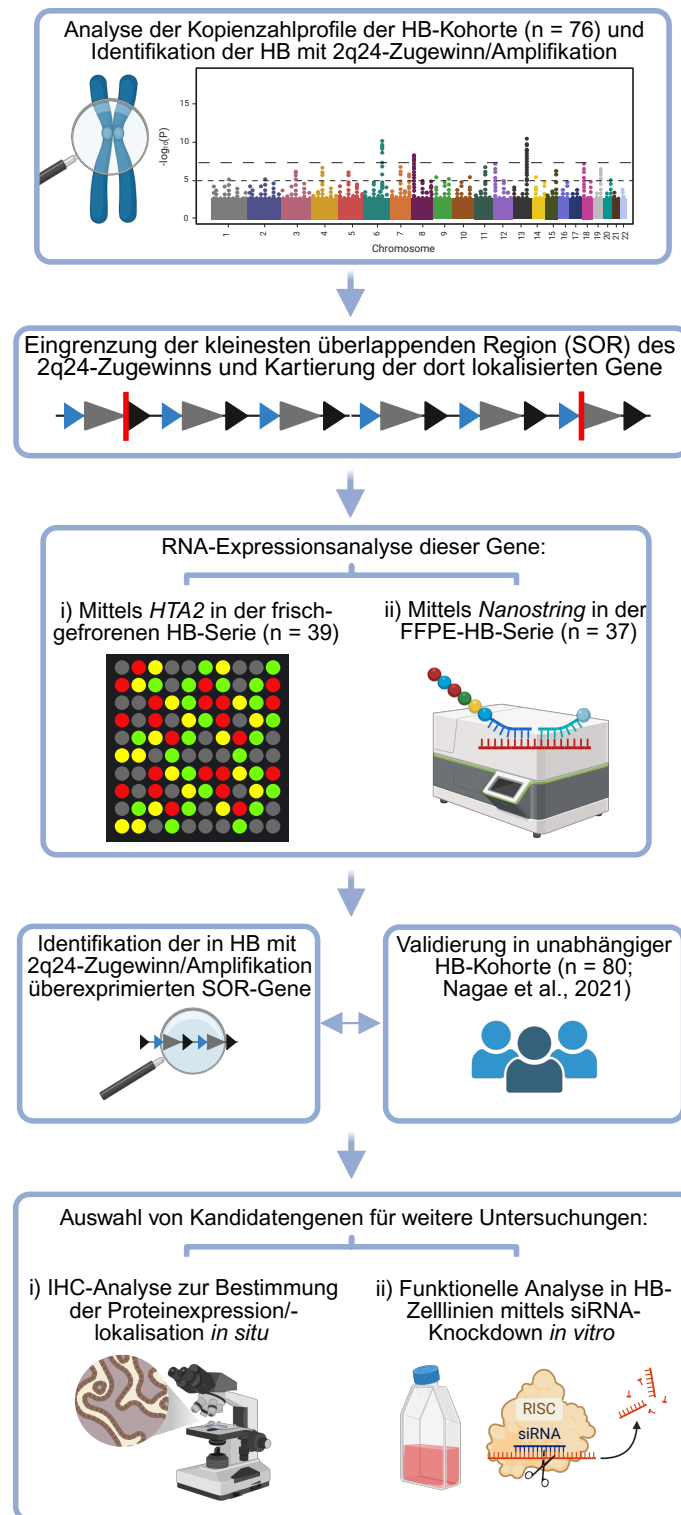


Abb. 1: Schematisch dargestellte experimentelle Strategie. HB: Hepatoblastom, SOR: *shortest overlapping region*, HTA2: *human transcriptome array 2.0*, Nanostring: *Nanostring-Technologie*, FFPE: Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet, IHC: immunhistochemisch, siRNA: *small interfering RNA*, RISC: *RNA-induced silencing complex*. Created in BioRender, Rodemann M. (2025), <https://BioRender.com/q0iqw5i>.

1.2 Material und Methoden

Insgesamt wurden Gewebeproben von 76 HB-Patient*innen aus den klinischen HB-Studien (HB89, HB94, HB99) und dem Lebertumorregister (LTR) der GPOH untersucht. Die aus Resektaten/Biopsien stammenden Proben lagen entweder als frisch-gefrorenes oder formalin-fixiertes, paraffineingebettetes (FFPE) Gewebe vor; im Folgenden als "frisch-gefrorene Serie" (n = 39) oder "FFPE-Serie" (n = 37) bezeichnet. Hinsichtlich der präoperativen Behandlung gab es Unterschiede: In der frisch-gefrorenen Serie (HB89-/HB94-/HB99-Studie, 1986 - 2006) erhielten 61,5 % der Patienten eine präoperative Chemotherapie, während in der FFPE-Serie (LTR, 2011 - 2020) 81,1 % der Patienten eine solche Therapie erhielten. Die Studienprotokolle der Studien HB89 und HB94 wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover und dem Vorstand der GPOH genehmigt. Die ethische Genehmigung für die HB99-Studie wurde von der Universitätskinderklinik Basel und der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn erteilt. Die ethische Genehmigung für das LTR wurde von der Ludwig-Maximilians-Universität in München erteilt.

Vor DNA- und RNA-Extraktionen erfolgte eine Mikrodissektion zur Identifikation des vitalen (Rest-)Tumors und Ausschluss von reaktivem, nekrotisiertem oder nicht-neoplastischem Gewebe. Die DNA aus den Proben der frischen-gefrorenen Serie wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gemäß einem bewährten Protokoll (Albrecht et al., 1994) aufgereinigt. Die DNA-Extraktion aus den Proben der FFPE-Serie erfolgte unter Verwendung des *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen Sciences, Germantown, MD). Die RNA-Extraktion aus frisch-gefrorenem Material erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen). Die RNA aus FFPE-Material wurde mit dem *AllPrep DNA/RNA FFPE Kit* (Qiagen) extrahiert.

Die Kopienzahldaten von 76 HB-Proben und drei HB-Zelllinien wurden mithilfe der *Molecular Inversion Probe* (MIP)-Technologie (Wang et al., 2012) unter Verwendung des *OncoScan CNV-Assays* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) erhoben. Die Auswertung erfolgte mittels der *Nexus Copy Number 10.0*-Software (Bionano Genomics, San Diego, CA). Die Schwellenwerte für das \log_2 -Kopienzahlverhältnis (Proben-Ploidie versus Diploidie) wurden zur Erkennung von Mosaizismus (gemäß Herstellerangaben) wie folgt festgelegt: - 0,15 für Verluste, 0,10 für Zugewinne und 0,70 für hohe Zugewin-

ne. Für Amplifikationen wurde ein Schwellenwert von 2,32 ($\triangleq 10$ Kopien) verwendet (Foster et al., 2015). Entsprechend ihres 2q-Kopienzahlstatus wurde die HB-Kohorte in drei Kategorien unterteilt: HB mit 2q-Stabilität bzw. diploider Kopienzahl (\log_2 -Kopienzahlverhältnis $< 0,10$), HB mit 2q-Zugewinn (\log_2 -Kopienzahlverhältnis $\geq 0,1$) und HB mit hohem (fokalem) 2q24-Zugewinn bzw. 2q24-Amplifikation (\log_2 -Kopienzahlverhältnis $\geq 0,7$ bzw. $\geq 2,32$). Letztere Gruppe wird im Folgenden zur Vereinfachung nur als HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation geführt und weicht damit aus Gründen der Leserlichkeit leicht von der englischsprachigen Bezeichnung *HB with 2q24 high-gain/amplification* aus der Veröffentlichung ab. Durch *Nexus GISTIC*-Algorithmus (Beroukhi et al., 2007) konnte die statistisch signifikante Region des 2q-Zugewinns der gesamten HB-Kohorte ($n = 76$) eingegrenzt und mit der kleinsten gemeinsamen überlappenden Region (SOR) des 2q-Zugewinns der HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation verglichen werden.

Die RNA-Expression von 22 SOR-Genen und zwei Genen der MYC-Familie (*MYCN*, *MYC*) ist mithilfe des *GeneChip Human Transcriptome Array 2.0* (HTA2, Thermo Fisher Scientific) in folgenden Gewebearten untersucht worden: pädiatrische reife Leber ($n = 6$), fetale Leber ($n = 7$), pädiatrisches HCC ($n = 9$), HB-Zelllinien (HepT1, HuH6, HepG2; $n = 3$) und HB der frisch-gefrorenen Serie ($n = 30$). Die Gene *TBR1*, *SLC4A10* und *GCA* wurden nicht auf dem HTA2-Array repräsentiert (22 von 25 SOR-Genen untersucht). Die Proben der reifen pädiatrischen Lebern und pädiatrischen HCC stammten aus Resektaten in klinischen Lebertumorstudien der GPOH. Die fetalen Leberproben ($n = 7$) wurden von Cynthia G. Goodyer (Abteilung für Endokrinologie, McGill Universität, Montreal, Kanada) bereitgestellt (Wirhiths et al., 2003). Die Datenanalyse wurde mit der *Transcriptome Analysis Console*-Software (Thermo Fisher Scientific) unter Anwendung des *MAS5*-Algorithmus durchgeführt. Die Expressionsniveaus wurden mit der *Spotfire 9.0*-Software (Cloud Software Group, Fort Lauderdale, FL) auf den mittleren Probenwert normalisiert.

Auf Grundlage der HTA2-Untersuchungsergebnisse wurden zehn SOR-Gene (*BAZ2B*, *CD302*, *COBLL1*, *DPP4*, *FAP*, *FIGN*, *GRB14*, *MARCH7*, *RBMS1*, *TANK*) für weiterführende RNA-Expressionsanalysen ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden weitere 35 HB-Proben, diesmal aus der FFPE-Serie, mittels *Nanostring*-Technologie (NanoString Technologies, Seattle, WA) mit einem individuellen *nCounter*-Panel analysiert. Die Da-

tenanalyse erfolgte mit der *nSolver 4.0*-Software (NanoString Technologies). Die Normalisierung erfolgte anhand des *PNN*-Haushaltsgens.

Zum Vergleich wurde die RNA-Expression von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* in einer unabhängigen HB-Kohorte der klinischen JPLT-2-Studie analysiert (Nagae et al., 2021). Insgesamt wurden normalisierte Expressionsdaten von 80 HB-Fällen und 28 nicht-tumorösen Lebern untersucht. Die RNA-Expression der genannten Gene wurde zwischen nicht-tumoröser Leber (n = 28), HB mit 2q-Stabilität (n = 65) und HB mit 2q-Zugewinn (n = 15) verglichen.

Die Proteinexpression und zelluläre Lokalisation von *RBMS1*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* wurden immunhistochemisch (IHC) an ausgewählten HB-Gewebeschnitten untersucht: pädiatrische reife Leber (nicht-tumoröser Teil von HB-76), HB mit 2q-Stabilität (HB-75), HB mit 2q-Zugewinn (HB-76) und HB mit 2q24-Zugewinn (HB-74). Eine IHC-Analyse der gesamten Kohorte war aufgrund einer begrenzten Gewebeverfügbarkeit nicht möglich. Für die Untersuchung wurden Antikörper gegen *RBMS1* (Maus, monoklonal, Klon OT12H1, #TA808580, OriGene Technologies, Rockville, MD), *MARCH7* (Kaninchen, polyklonal, #NBP1-90056, Novus Biologicals, Centennial, CO), *DPP4* (Ziege, polyklonal, #AF1180, R&D Systems, Minneapolis, MN), *FIGN* (Kaninchen, polyklonal, #LS-C498842, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA), *TANK* (Kaninchen, polyklonal, #ABIN957231, antibodies-online, Limerick, PA) und Beta-Catenin (Maus, monoklonal, Klon 14, #760-4242, Roche, Basel, Switzerland) verwendet. Trotz der IHC-Testungen von drei verschiedenen kommerziell erworbenen Antikörpern gegen *BAZ2B* konnte kein spezifisch-bindender Antikörper identifiziert werden.

Aufgrund ihres 2q-Zugewinns stellten die verwendeten etablierten humanen HB-Zelllinien HepT1 (Pietsch et al., 1996), HuH6 (Doi, 1976) und HepG2 (López-Terrada et al., 2009) ein geeignetes Modell für funktionelle Experimente dar. Die Zelllinien wurden Antibiotika-frei in *RPMI 1640*-Medium (Gibco, Waltham, MA) versetzt mit 10 % fetalem Rinderserum (Gibco) und 2 mmol/L L-Glutamin (Gibco) in sterilen 25/75 cm² Zellkulturflaschen (Corning Inc., Corning, NY) bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂) kultiviert. Alle zwei bis vier Tage wurde das Zellmedium gewechselt. Sobald die adhärenzte Zellkultur eine Konfluenz von 70 - 80 % erreicht hatte, wurden die Zellen passagiert und

anschließend weiterkultiviert. In regelmäßigen Abständen wurde mittels PCR auf Mykoplasmen-Kontamination getestet; eine Kontamination wurde stets ausgeschlossen.

Für *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* wurden jeweils drei spezifische 27mer siRNA-Duplexe (*RBMS1* - #SR304012; *BAZ2B* - #SR309334; *MARCH7* - #SR312148; *DPP4* - #SR301258; *FIGN* - #SR310516; *TANK* - #SR306737; OriGene Technologies) einzeln getestet. Die jeweiligen siRNA-Duplexe wurden mit einem RNAse-freiem siRNA-Duplex-Resuspensionspuffer (OriGene Technologies) auf eine Zielkonzentration von 10 µM verdünnt und anschließend zum *siTran 2.0*-Transfektionspuffer (OriGene Technologies) gegeben. Nach Zugabe der *siTran 2.0*-Transfektionsreagenz (OriGene Technologies) wurde der daraus entstandene Komplex für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei einer optimalen Konfluenz von 50 % tropfenweise zu den 24 Stunden zuvor ausgesäten Zellen dazugegeben. Ein gemischter Negativ-Kontroll-siRNA-Duplex (*Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control*, OriGene Technologies) diente als Kontrolle. Die Effizienz der Transfektion ist mittels fluoreszenzmarkiertem siRNA-Duplex (OriGene Technologies) überprüft worden.

Von den drei pro Gen getesteten spezifischen 27mer siRNA-Duplexen wurde die siRNA mit dem effektivsten mRNA-Knockdown mithilfe der *Nanostring*-Technologie überprüft. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die RNA-Extraktion aus den geernteten HB-Zellen mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde ein individuelles *nCounter Panel* (NanoString Technologies) entsprechend Herstellerprotokoll verwendet und die folgenden Duplexe für die nachfolgenden funktionellen Experimente ausgewählt: *RBMS1* - #SR304012C, *BAZ2B* - #SR309334B, *MARCH7* - #SR312148A, *DPP4* - #SR301258B, *FIGN* - #SR310516C, *TANK* - #SR306737A; OriGene Technologies.

Die Effektivität des Knockdowns von *RBMS1* wurde zusätzlich mittels Western Blot bestimmt. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Proteine mittels *CellLytic M*-Lysepuffer (Sigma) aus den geernteten Zellen extrahiert und anschließend für fünf Minuten bei 95 °C mit dem *4x Protein*-Ladepuffer (LI-COR Biosciences) denaturiert. Nach der Bestimmung der Proteinmenge mittels *Bradford Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories) wurden die Proben (20-25 µg) auf einem *NuPAGE 4 - 12 %*-Mini-Protein-Gel (Invitrogen) aufgetragen und anschließend durch die *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad Laborato-

ries) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach Aktivierung mit Methanol wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C in 5 %iger Milch mit einem Antikörper gegen RBMS1 (Maus, Monoklonal, Klon OTI2H1, #TA808580, OriGene Technologies) und am Folgetag mit einem passenden Sekundärantikörper (IRDye 800CW konjugierter Ziegen-anti-Maus-IgG, #926-32210, LI-COR Biosciences) inkubiert. Um den Effekt des RBMS1-Knockdowns auf die c-Myc-Expression zu untersuchen, wurde ein entsprechender Primärantikörper (Maus, monoklonal, Klon 9E10, Invitrogen) mit passendem Sekundärantikörper (IRDye 680RD konjugierte Ziegen-anti-Maus-IgG, #926-68070, LI-COR Biosciences) verwendet. Als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen Beta-Actin (Ziege, #ab8229, Abcam) mit passendem Sekundärantikörper (IRDye 680RD Esel-anti-Ziege-IgG, #926-68074, LI-COR Biosciences). Zum Schluss wurden die Membranen mit dem Odyssey-Scanner (LI-COR Biosciences) aufgezeichnet und mit Hilfe der Software *Image Studio Lite* (LI-COR Biosciences) ausgewertet.

Durch siRNA-vermittelte Knockdown-Experimente wurde die biologische Funktion von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* im Hinblick auf die Proliferationsrate, Apoptoseinduktion und Wnt-Signalwegs-Aktivität untersucht. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die drei HB-Zelllinien (HepT1: 7.000 Zellen/Well, HuH6: 6.000 Zellen/Well, HepG2: 8.000 Zellen/Well) 24 Stunden vor Transfektion in 96-Well-Platten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät. Unter Verwendung des *Cell Proliferation Kit I MTT* (Roche) wurde 72 Stunden nach der Transfektion das *MTT*-Reagenz hinzugegeben. Vier Stunden später wurde der Solubilisierungspuffer hinzugefügt und die Zellen anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Farbänderung photometrisch bestimmt (μ Quant; BioTek Instruments, Winooski, VT). Die Apoptoseinduktion wurde mittels *Caspase-Glo 3/7 Assay* (Promega, Fitchburg, WI) untersucht. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zelllinien (HepT1: 7.000 Zellen/Well, HuH6: 6.000 Zellen/Well) in Lumineszenz-kompatible 96-Well-Platten ausgesät (Greiner AG, Kremsmünster, AT). 72 Stunden nach der Transfektion wurde das *Caspase-Glo 3/7*-Reagenz hinzugefügt. Nach einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz anschließend mit dem *MicroBeta² Mikroplate-Counter* (PerkinElmer, Waltham, MA) gemessen. Mithilfe des *ONE-Glo Luciferase Assay-Systems* (Promega) wurde der Einfluss auf die Wnt-Signalwegs-Aktivität untersucht. Die Zelllinien (HepT1: 7.000 Zellen/Well, HuH6: 6.000 Zellen/Well, HepG2: 8.000 Zel-

len/Well) wurden 24 Stunden vor Transfektion in Lumineszenz-kompatiblen 96-Well-Platten (Greiner AG) ausgesät. Bei optimaler Konfluenz von 70 % erfolgte am Folgetag unter Verwendung des *siTran 2.0*-Transfektionsreagenz (OriGene Technologies) die gleichzeitige Transfektion von genspezifischer siRNA oder gemischter Negativ-Kontroll-siRNA mit dem *pGL4.49[luc2P/TCF-LEF RE/Hygro]*-Vektor (#9PIE461, Promega) gemäß den Herstellerangaben für die gleichzeitige siRNA- und Plasmid-DNA-Transfektion. Nach 72 Stunden wurde das *ONE-Glo*-Reagenz zu den Wells hinzugefügt. Die Lumineszenz wurde 15 Minuten später mit dem *MicroBeta² Mikroplate-Counter* (PerkinElmer) gemessen.

Die Bedeutung des 2q-Kopienzahlstatus für das Überleben von HB-Patient*innen wurde durch den Vergleich des progressionsfreien Überlebens (PFS) und des Gesamtüberlebens (OS) zwischen HB mit 2q-Stabilität (n = 23), HB mit 2q-Zugewinn (n = 35) und HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation (n = 11) untersucht. Dabei waren die Daten in sieben von 69 Fällen nicht verfügbar. Zusätzlich wurde die Bedeutung des Histologie-Typs auf das Überleben (PFS, OS) zwischen fetalen (n = 24), embryonalen (n = 13) und gemischt epithelial-mesenchymalen (n = 31) HB untersucht. Dabei waren die Daten in acht von 68 Fällen nicht verfügbar.

Die Assoziation unterschiedlicher Konstellationen des 2q-Kopienzahlstatus (2q24-Zugewinn/Amplifikation versus kein 2q24-Zugewinn/Amplifikation, 2q-Zugewinn versus kein 2q-Zugewinn, 2q24-Zugewinn/Amplifikation versus 2q-Stabilität) wurde in Bezug auf epidemiologische, klinische und histologische HB-Kategorien (Geschlecht, Alter bei der Diagnosestellung (< 1, < 2, ≥ 3, ≥ 8; in Jahren), AFP-Spiegel bei Diagnosestellung (< 100, < 1.000, ≥ 100.000, ≥ 1.000.000; in ng/ml), Histologie-Typ (epithelial, gemischt epithelial-mesenchymal, fetal, embryonal), PRETEXT-Gruppe (≥ 2, ≥ 3, = 4), PRETEXT-Annotationsfaktoren (Cava-Beteiligung (V), Pfortader-Beteiligung (P), extrahepatische Ausbreitung (E), Multifokalität (F), Fernmetastasen (M), Vorhandensein einer oder mehrerer VPEFM-Kategorien (VPEFM+))) untersucht. Nicht verfügbare Daten wurden von der Analyse ausgeschlossen ($n_{\text{PRETEXT}} = 10$, $n_{\text{AFP}} = 9$, $n_V = 11$, $n_P = 14$, $n_E = 11$, $n_F = 11$, $n_M = 11$).

Die statistische Auswertung erfolgte mit *GraphPad Prism 10.0* (GraphPad Software, San Diego, CA). Die Gruppenunterschiede der RNA-Expression wurden mithilfe des *Kruskal-*

Wallis-Tests mit *Dunn*-Korrektur für Mehrfachvergleiche berechnet. Die Gruppenunterschiede der RNA-Expression der untersuchten unabhängigen HB-Kohorte (Nagae et al., 2021) wurden mittels einseitiger ANOVA analysiert. In den funktionellen *in-vitro*-Studien wurde ein einseitiger, ungepaarter *t*-Test zur Bestimmung der statistisch signifikanten Gruppenunterschiede verwendet; bei ungleichen Varianzen wurde ein *t*-Test mit *Welch*-Korrektur verwendet. In der Überlebensanalyse wurde die statistische Signifikanz zwischen zwei Gruppen mit dem *Log-Rank*-Test und dem *Gehan-Breslow-Wilcoxon*-Test berechnet und mithilfe der *Bonferroni*-Korrektur bei einem geschätzten *p*-Wert von $< 0,016$ (bei Untersuchung von drei Gruppen) angepasst. Die Korrelation des 2q-Kopienzahlstatus mit unterschiedlichen HB-Kategorien wurde mittels zweiseitigen *Fishers-Exact*-Test durchgeführt. Die Odds Ratio (OR) wurde mit der *Baptista-Pike*-Methode berechnet (*Woolf*-Methode im Fall von Wert 0). Eine Signifikanz auf dem 95 %-Konfidenzniveau wurde für alle Berechnungen akzeptiert ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)).

1.3 Ergebnisse

In 65 der insgesamt 76 HB-Proben konnten Kopienzahlvariationen (CNV) detektiert werden. Von Zugewinnen waren insbesondere die Chromosomen 1q (44,7 %), 2p (26,3 %), 2q (63,2 %), 8q (25,0 %) und 20 (36,8 %) betroffen, wobei in elf Fällen (14,5 %) ein hoher 2q24-Zugewinn bzw. eine 2q24-Amplifikation bestand. Chromosomale Verluste hingegen zeigten sich hauptsächlich auf Chromosom 1p (14,5 %) und 4q (17,1 %). Die genannten prozentualen CNV-Verteilungen sind unter Berücksichtigung aller 76 HB-Proben angegeben (Abb. 2).

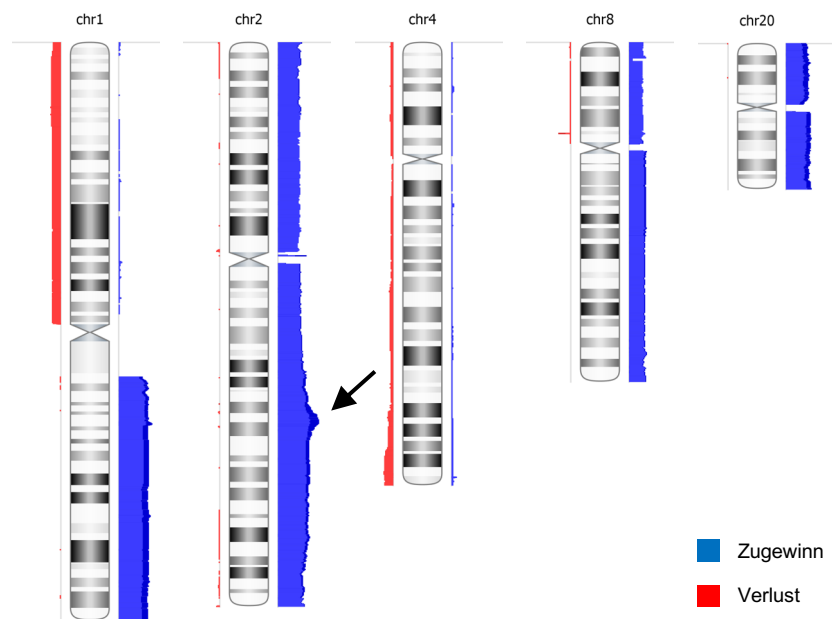


Abb. 2: *Summary plot* der am häufigsten von Kopienzahlvariationen (CNV) betroffenen Chromosomen in der analysierten Kohorte von 76 HB-Fällen. Die virtuellen Chromosomen (Chr) sind mit ihrem p-Arm nach oben ausgerichtet. (Kopienzahl-)Zugewinne sind rechts in Blau und (Kopienzahl-)Verluste links in Rot der jeweiligen Chromosomen dargestellt; die Breite der Balken gibt die Häufigkeit an. Der schwarze Pfeil markiert die Region 2q24. Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Abb. 1), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Detaillierte Informationen zu den CNV der Kohorte ($n = 76$) und der verwendeten HB-Zelllinien ($n = 3$) sind in der ergänzenden Tabelle 1 der Veröffentlichung zu finden. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die demografischen, histologischen, klinischen und molekularen Merkmale der untersuchten Kohorte. Klinische Informationen zu den HB-Fällen mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation ($n = 11$) finden sich in Tabelle 2.

Tab. 1: HB-Kohorte - demografische, histologische und molekulare Merkmale.

	HB-Kohorte (n = 76)	FF-Serie (n = 39)	FFPE-Serie (n = 37)
Geschlecht			
Männlich	47 (61,8 %)	25 (64,1 %)	22 (59,5 %)
Weiblich	29 (38,2 %)	14 (35,9 %)	15 (40,5 %)
Verhältnis (m:w)	1,6:1	1,8:1	1,5:1
Alter bei Diagnosestellung			
Median (Monate)	18,7	16,1	21,0
Spannweite (Monate)	1 - 114	1 - 114	3 - 95
Histologie			
Epithelial	42 (55,3 %)	29 (74,4 %)	13 (35,1 %)
Embryonal	15 (19,7 %)	13 (33,3 %)	2 (5,4 %)
Fetal	27 (35,5 %)	16 (41,0 %)	11 (29,7 %)
Makrotrabekulär	1 (1,3 %)	0 (0,0 %)	1 (2,7 %)
Gemischt epithelial/mesenchymal	33 (43,4 %)	10 (25,6 %)	23 (62,2 %)
Präoperative Chemotherapie			
Ja	54 (71,1 %)	24 (61,5 %)	30 (81,1 %)
Nein	16 (21,1 %)	12 (30,8 %)	4 (10,8 %)
KA	6 (7,9 %)	3 (7,7 %)	3 (8,1 %)
2q-Kopienzahlvariationen			
2q-Stabilität	28 (36,8 %)	15 (38,5 %)	13 (35,1 %)
2q-Zugewinn	48 (63,2 %)	24 (61,5 %)	24 (64,9 %)
2q24-Zugewinn/Amplifikation	11 (14,5 %)	7 (17,9 %)	4 (10,8 %)
2q24-Zugewinn	8 (10,5 %)	4 (10,3 %)	4 (10,8 %)
2q24-Amplifikation	3 (3,9 %)	3 (7,7 %)	0 (0,0 %)
Andere Kopienzahlvariationen			
1p-Verlust	11 (14,5 %)	6 (15,4 %)	5 (13,5 %)
1q-Zugewinn	34 (44,7 %)	17 (43,6 %)	17 (45,9 %)
2p-Zugewinn	20 (26,3 %)	9 (23,1 %)	11 (29,7 %)
4q-Verlust	13 (17,1 %)	8 (20,5 %)	5 (13,5 %)
8q-Zugewinn	19 (25,0 %)	7 (17,9 %)	12 (32,4 %)
20-Zugewinn	28 (36,8 %)	11 (28,2 %)	17 (45,9 %)

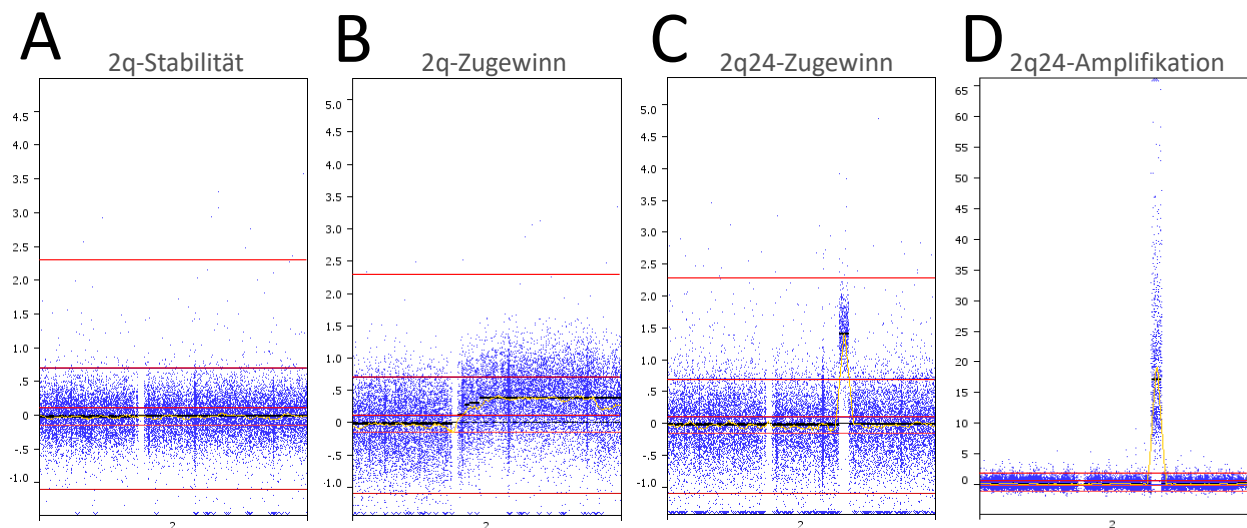
HB: Hepatoblastom, FF: frisch-gefroren, FFPE: Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet, m: männlich, w: weiblich, KA: keine Angaben. Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Tabelle 1), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Anhand ihres 2q-Kopienzahlstatus wurde die HB-Kohorte in drei Kategorien unterteilt: 2q-Stabilität, 2q-Zugewinn und 2q24-Zugewinn/Amplifikation (Abb. 3). Die statistisch signifikante Region des 2q-Zugewinns wurde mit dem *GISTIC*-Algorithmus im Bereich 2q24.2q24.3 (chr2: 160.282.911 - 165.523.017 bp) lokalisiert, was der kleinsten gemeinsamen Region (SOR) der HB-Fälle mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation entsprach (Abb. 4). Insgesamt befanden sich in dieser 5,2 Mbp großen Region 25 Gene (22 proteinkodierende Gene, zwei lncRNA-Gene und ein microRNA-Gen).

Tab. 2: Klinische Informationen zu den HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation (n = 11).

ID	Serie	2q24	M/F	Alter ^a (Monate)	AFP ^a (ng/ml)	PRETEXT	Histologie	PFS (Monate)	OS (Monate)	M+	Rezidiv	Status	Chemo
HB-3	FF	Zugew.	M	36,8	27150	III	Gemischt e/m	6,9	80,8	Ja	Ja	DOD	Ja
HB-8	FF	Zugew.	M	10,7	2682	II	Embryonal	62,7	62,7	Nein	Nein	NED	Ja
HB-28	FF	Ampl.	F	9,4	300000	KA	Gemischt e/m	207,8	207,8	Nein	Nein	NED	KA
HB-29	FF	Ampl.	F	7,9	433300	II	Gemischt e/m	60,2	60,2	Nein	Nein	NED	Nein
HB-31	FF	Zugew.	F	11,1	64870	II	Fetal	54,3	54,3	Nein	Nein	NED	Nein
HB-37	FF	Ampl.	M	51,2	243210	IV	Fetal	4,7	4,7	Ja	Nein	DOC	Ja
HB-39	FF	Zugew.	F	12,2	KA	KA	Gemischt e/m	5,7	5,7	KA	Nein	DOC	Ja
HB-49	FFPE	Zugew.	M	6,0	755500	III	Gemischt e/m	61,3	61,3	Nein	Nein	NED	Ja
HB-64	FFPE	Zugew.	M	18,7	29879	IV	Gemischt e/m	53,5	53,5	Nein	Nein	NED	Ja
HB-68	FFPE	Zugew.	M	17,9	430000	IV	Gemischt e/m	99,6	99,6	Nein	Nein	NED	Ja
HB-74	FFPE	Zugew.	M	26,4	154120	II	Gemischt e/m	26,7	26,7	Ja	Nein	NED	Ja

ID: Identifikationsnummer, ^a: bei Diagnose, FF: frisch-gefroren, FFPE: Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet, Zugew.: Zugewinn, Ampl.: Amplifikation, M: männlich, F: weiblich, AFP: Alpha-Fetoprotein-Spiegel, PRETEXT: Ausmaß der Erkrankung vor der Behandlung (Klassifikation), KA: keine Angaben, Gemischt e/m: gemischt epithelial-mesenchymal, PFS: progressionsfreies Überleben, OS: Gesamtüberleben, M+: Fernmetastasierung, DOD: an der Erkrankung verstorben, NED: keine Anzeichen der Erkrankung, DOC: an Komplikationen verstorben, Chemo: präoperative Chemotherapie. Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Tabelle 2), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

**Abb. 3:** Die HB-Kohorte wurde entsprechend ihres 2q-Kopienzahlstatus in (A) 2q-Stabilität (diploide Kopienzahl, z. B. HB-41), (B) (ganzer) 2q-Zugewinn (z. B. HB-51), (C) (fokaler) hoher 2q24-Zugewinn (z. B. HB-74) und (D) 2q24-Amplifikation (z. B. HB-29) eingeteilt. Die Gruppen C und D wurden zur Gruppe 2q24-Zugewinn/Amplifikation zu-

sammengefasst. Die x-Achse zeigt die Microarray-Sonden entsprechend ihrer genomischen Koordinaten auf Chromosom 2 (beginnend mit dem p-Arm). Die y-Achse stellt die \log_2 -Skala des Kopienzahlverhältnisses (Proben-Ploidie versus Diploidie) dar: Werte nahe 0 zeigen diploide Regionen, positive Werte zeigen (Kopienzahl-)Zugewinne und negative Werte zeigen (Kopienzahl-)Verluste an. Die horizontalen Linien (rot) repräsentieren die Schwellenwerte (von oben nach unten): Amplifikation ($y \geq 2,32$), hoher Zugewinn ($y \geq 0,7$), Zugewinn ($y \geq 0,1$), Verlust ($y \leq -0,15$) und großer Verlust ($y \leq -1,1$) an. Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Abb. 2), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

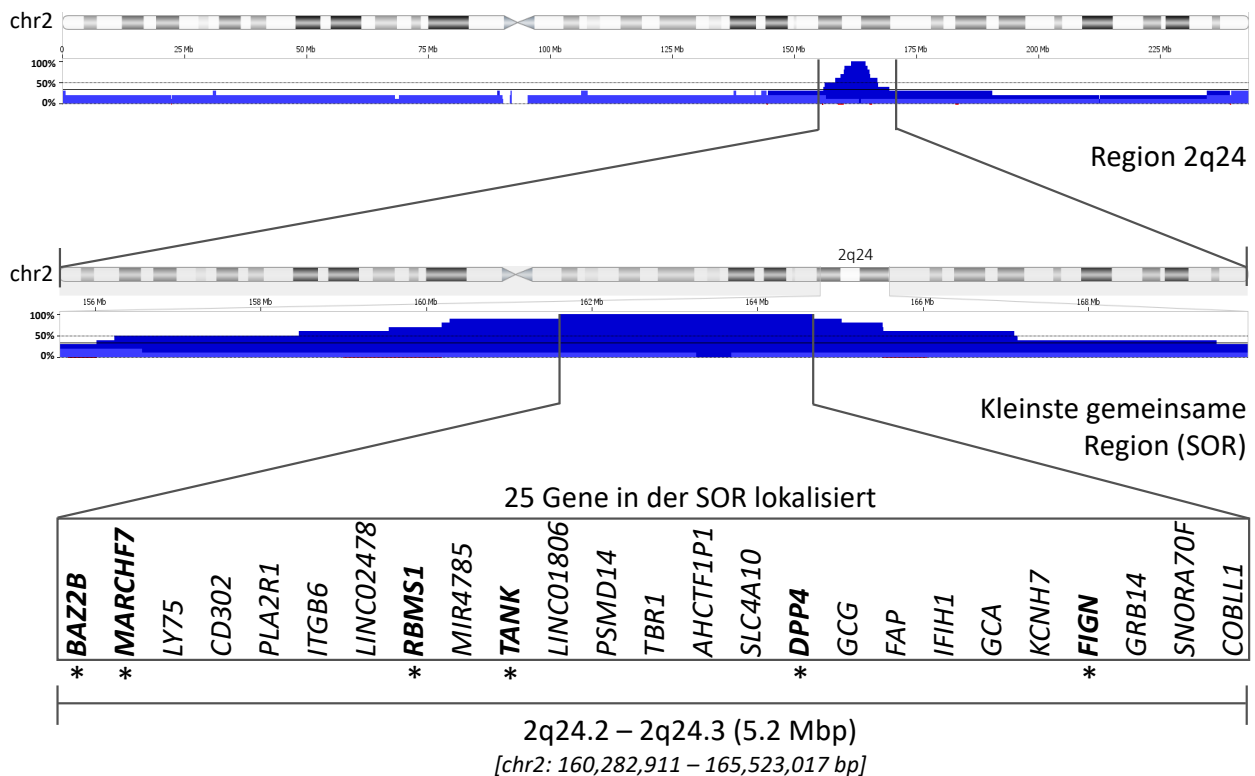


Abb. 4: Schematische Übersicht über die kleinste überlappende Region (SOR) des 2q-Zugewinns. Mit dem *GISTIC*-Algorithmus wurde der statistisch signifikante Bereich des 2q-Zugewinns auf die Region 2q24.2q24.3 eingegrenzt (chr2: 160.282.911 - 165.523.017 bp). Dies entsprach exakt der SOR des 2q-Zugewinns der HB-Gruppe mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation ($n = 11$). In dieser 5,2 Mbp großen SOR wurden insgesamt 25 Gene kartiert: 22 proteinkodierende Gene, 2 lncRNA-Gene und 1 microRNA-Gen. In nachfolgenden RNA-Analysen als überexprimiert identifizierte Gene sind mit (*) hervorgehoben. Die blauen Balken zeigen die von (Kopienzahl-)Zugewinn betroffenen Chromosomenregionen der elf HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation; ihre Häufigkeiten sind auf der y-Achse (in %) dargestellt. Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Abb. 3), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Nach Identifikation dieser SOR-Region wurde die RNA-Expression der dort lokalisierten Gene untersucht. In Abbildung 5 ist die Expression von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*,

DPP4, *FIGN* und *TANK* (Abb. 5A) sowie *MYCN* und *MYC* (Abb. 5B) mittels *HTA2*- (Abb. 5-1) oder *Nanostring*-Methode (Abb. 5-2) dargestellt. Die RNA-Expression der HB-Fälle wurde entsprechend ihres 2q-Kopienzahlstatus entweder untereinander (Abb. 5-2) oder zusätzlich zu pädiatrischer reifer Leber, fetaler Leber und pädiatrischem HCC (Abb. 5-1) verglichen. In HB-Fällen der frisch-gefrorenen Serie (Abb. 5A-1) zeigten *RBMS1*, *BAZ2B*, *DPP4* und *FIGN* ein auffälliges Expressionsprofil mit einer signifikanten RNA-Überexpression in HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation im Vergleich zu fetaler Leber (im Falle von *RBMS1* und *FIGN* zusätzlich im Vergleich zu pädiatrischer reifer Leber und pädiatrischem HCC). Die *TANK*- und *MARCH7*-Expression war in der *HTA2*-Analyse zwar unauffällig, zeigte allerdings in der nachfolgenden *Nanostring*-Analyse in der FFPE-Serie (Abb. 5A-2) eine signifikante Überexpression in HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation im Vergleich zu HB mit 2q-Zugewinn (im Falle von *TANK* zusätzlich im Vergleich zu HB mit 2q-Stabilität). Die *MYCN*-Expression war in der *HTA2*-Analyse in HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation im Vergleich zu fetaler Leber signifikant erhöht (Abb. 5B-1), was in der *Nanostring*-Analyse allerdings nicht bestätigt werden konnte. Die *MYC*-Expression zeigte weder in der *HTA2*- noch in der *Nanostring*-Analyse signifikante Unterschiede. Zum Vergleich wurde die RNA-Expression von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* zusätzlich in einer unabhängigen HB-Kohorte (n = 80) und in nicht-tumorösem Lebergewebe (n = 28) analysiert. Die Expressionswerte aller sechs Gene waren bei HB mit 2q-Zugewinn signifikant erhöht (siehe ergänzende Abb. 1 der Veröffentlichung). Insgesamt wurden *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* als mutmaßliche onkogene Treiber in Bezug auf ihr Expressionsmuster in HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation identifiziert und für weitere Analysen ausgewählt.

Zwischen den histologischen Subtypen (fetal, embryonal, gemischt epithelial-mesenchymal) zeigte sich keine signifikant unterschiedliche RNA-Expression von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* mit Ausnahme einer höheren *DPP4*-Expression bei gemischt epithelial-mesenchymaler Histologie im Vergleich zur embryonalen Histologie (ergänzende Abb. 2 der Veröffentlichung).

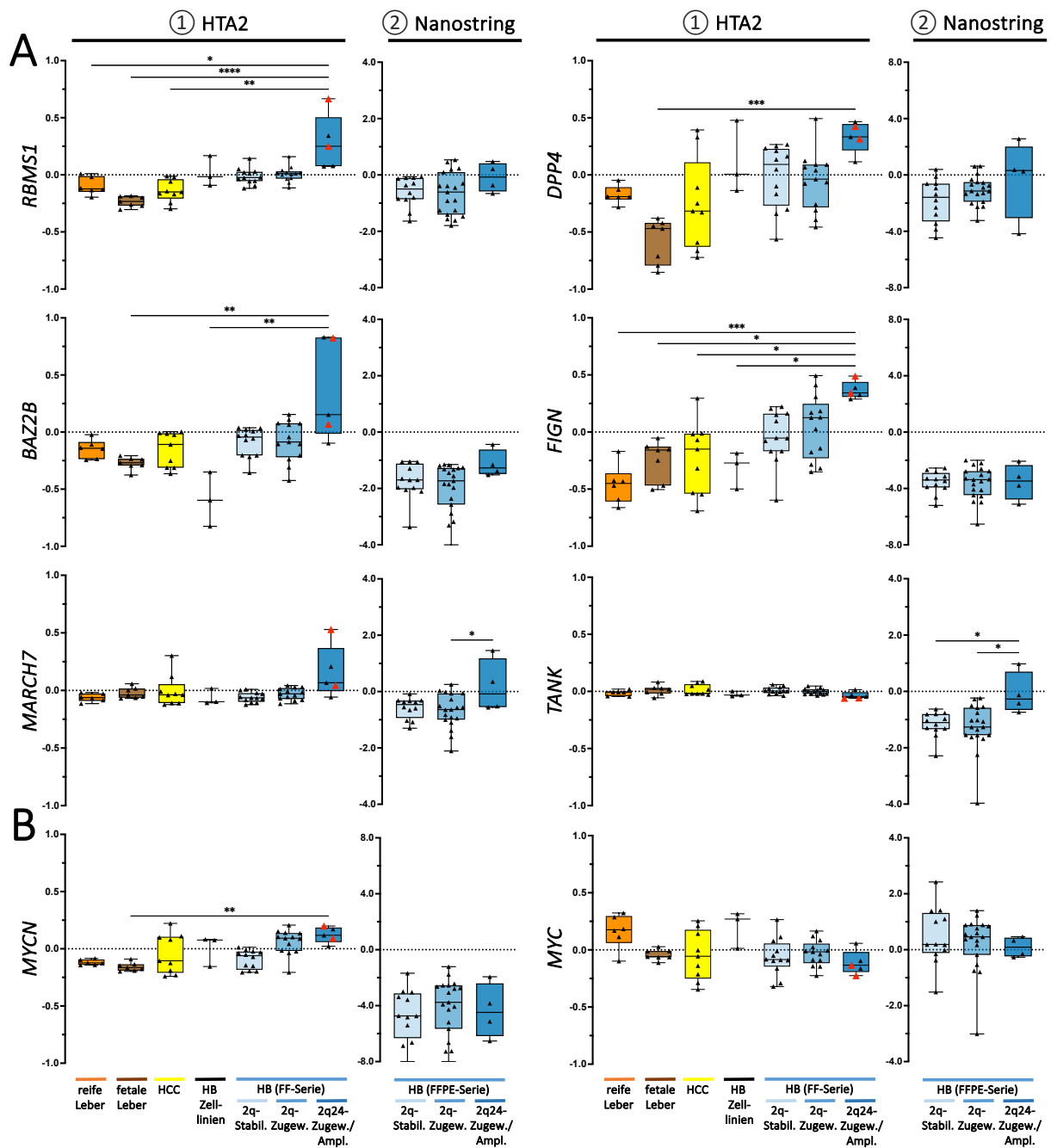


Abb. 5: RNA-Expression von **(A)** *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* sowie **(B)** *MYCN* und *MYC* analysiert mittels (-1) HTA2- oder (-2) Nanostring-Methode. **A/B-1:** Die x-Achse zeigt den Farbcode der jeweils untersuchten Gruppen: reife pädiatrische Leber (n = 6, orange), fetale Leber (n = 7, braun), pädiatrische HCC (n = 9, gelb), HepT1-, HuH6- und HepG2-Zelllinie (n = 3, schwarz) und HB (frisch-gefrorene Serie, n = 30, Blautöne gemäß 2q-Kopienzahlstatus). Die y-Achse stellt die log₁₀-Skala der Genexpression normalisiert auf das mittlere Proben-Signal dar. Die Expressionswerte von 2q24-amplifizierten HB-Fällen sind hervorgehoben (rote Dreiecke). **A/B-2:** Die x-Achse zeigt den Farbcode der jeweils untersuchten Gruppen: HB (FFPE-Serie, n = 35, Blautöne gemäß 2q-Kopienzahlstatus); die y-Achse stellt die

\log_2 -Skala der Genexpression normalisiert auf die Expression des Hausgen-Gens *PNN* dar. **A/B-1/2:** Die Ergebnisse sind als Boxplot-Diagramme unter Angabe der Einzelmesswerten dargestellt. Signifikante Gruppenunterschiede wurden bei einem Konfidenzniveau von 95 % angenommen ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)). Zur Übersichtlichkeit werden nur die Gruppenunterschiede zur HB-Gruppe mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation dargestellt. Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Abb. 4), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Die Proteinexpression und zelluläre Lokalisation von RBMS1, MARCH7, DPP4, FIGN und TANK wurde immunhistochemisch *in situ* analysiert (Abb. 6). Abgesehen von DPP4 wurden die Proteine RBMS1, MARCH7, FIGN und TANK nur schwach in der reifen pädiatrischen Leber und im HB mit 2q-Stabilität (HB-75) exprimiert. Im HB mit 2q-Zugewinn (HB-76) zeigte sich eine moderat gesteigerte Expression der jeweiligen Proteine. Die stärkste Expression von RBMS1, MARCH7, DPP4, FIGN und TANK konnte jedoch in HB mit 2q24-Zugewinn (HB-74) beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich hier eine deutliche zytosolische und nukleäre beta-Catenin Expression. In der pädiatrischen reifen Leber und im HB mit 2q-Stabilität (HB-75) wurden hingegen geringere und überwiegend membranöse beta-Catenin Expressionen festgestellt.

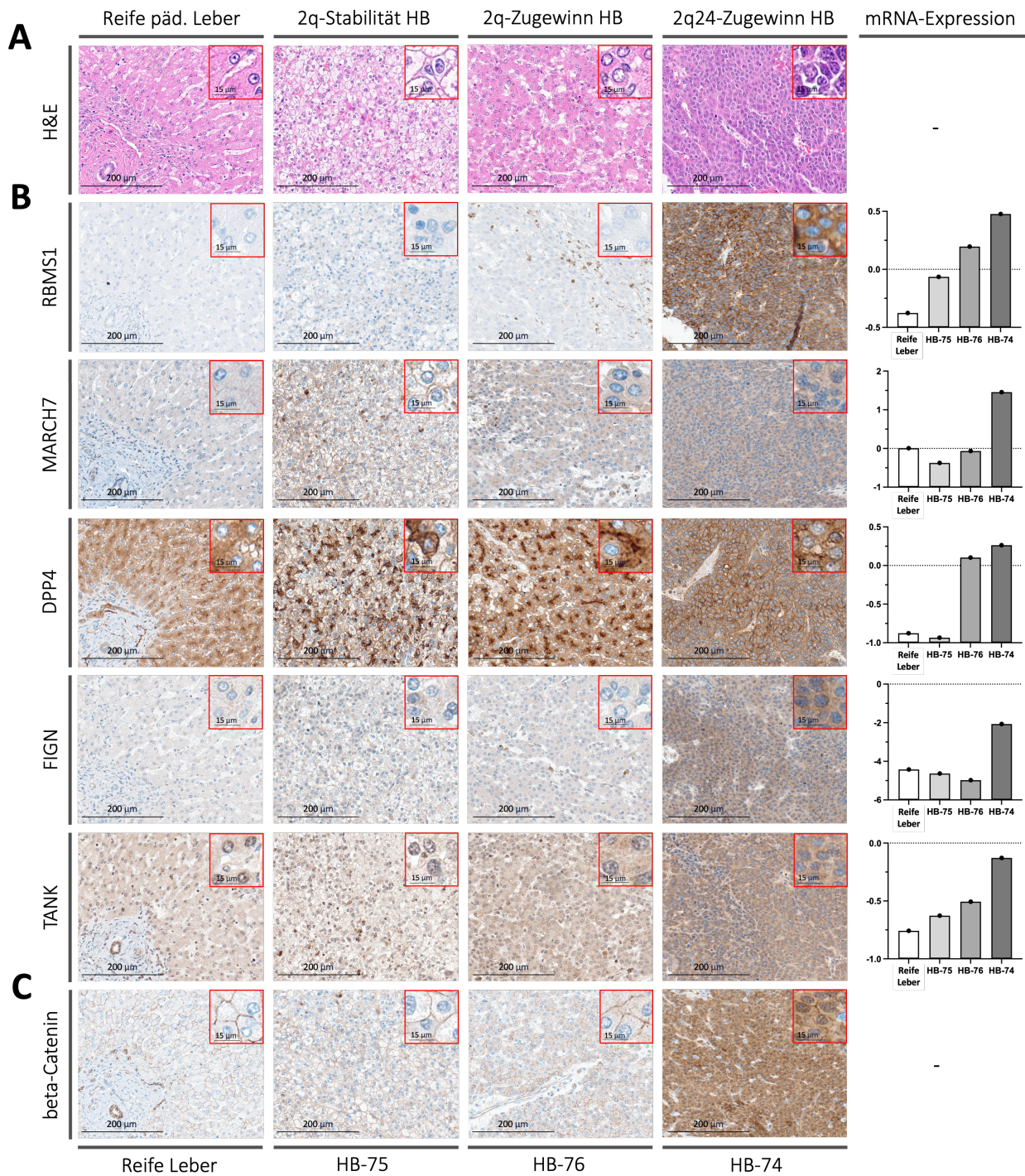


Abb. 6: Proteinexpression und -lokalisierung von RBMS1, MARCH7, DPP4, FIGN und TANK *in situ*. Histologische (**A**) und immunhistochemische (**B, C**) Färbung von Gewebeschnitten aus (pädiatrischer) reifer Leber, HB mit 2q-Stabilität (HB-75), HB mit 2q-Gewinn (HB-76) und HB mit 2q24-Zugewinn (HB-74). Zur Vergleichbarkeit sind die entsprechenden mRNA-Expressionsniveaus der jeweiligen Gene in diesen vier Fällen dargestellt (**B**). Die histologische Färbung (**A**) erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) zur Untersuchung des histologischen Subtyps (HB-75: fetal, HB-76 und HB-74: gemischt epithelial-mesenchymal). Die IHC-Färbung wurde mit spezifischen Antikörpern gegen

(B) ausgewählte Proteine (*RBMS1*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN*, *TANK*) und (C) beta-Catenin durchgeführt. Die dargestellten mRNA-Expressionsniveaus wurden mit der Nanostring-Methode analysiert; die y-Achse stellt die \log_2 -Skala der Genexpression normalisiert zur Expression des Haushaltsgens *PNN* dar. Die Bilder sind 20-fach vergrößert; der dargestellte Maßstab entspricht einer Länge von 200 μm . Ein Ausschnitt jedes Bildes ist in 80-facher Vergrößerung in der oberen rechten Ecke (roter Kasten) dargestellt; der dargestellte Maßstab entspricht einer Länge von 15 μm . Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Abb. 5), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Die biologische Funktion von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* wurde in Bezug auf Proliferation, Apoptose und Wnt-Signalwegsaktivität durch die jeweiligen genspezifischen siRNA-Knockdowns in drei HB-Zelllinien untersucht. Die MIP-Analyse zeigte einen 2q-Zugewinn in HepT1 und HuH6 sowie einen hohen (nicht-fokalen) 2q-Zugewinn in HepG2 (ergänzende Tabelle 1 der Veröffentlichung). Die effektivste der drei pro Gen getesteten genspezifischen siRNA wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Nanostring-Methode identifiziert und für nachfolgende Versuche verwendet. Die Wirkung des *RBMS1*-Knockdowns auf die c-Myc-Expression wurde mittels Western Blot untersucht (Abb. 7A). In HepT1- und HuH6-Zellen führte die Ausschaltung von *RBMS1* zu einer erhöhten c-Myc-Expression. In HepG2-Zellen wurde jedoch keine Wirkung auf die c-Myc-Expression beobachtet. Die Auswirkungen des jeweiligen genspezifischen Knockdowns auf die Proliferationsrate der HB-Zelllinien wurde mittels *MTT*-Assays analysiert (Abb. 7B). In HepT1- und HuH6-Zellen führte der jeweilige Gen-Knockdown zu einer signifikanten Wachstumsreduktion im Vergleich zu Kontrollzellen. In HepT1-Zellen war dieser antiproliferative Effekt am stärksten, insbesondere nach Knockdown von *RBMS1* und *BAZ2B*. Ähnliche Ergebnisse wurden in HuH6-Zellen erzielt, allerdings mit einer geringeren wachstumsreduzierenden Wirkung. In HepG2-Zellen wurde nur nach Knockdown von *BAZ2B* und *MARCH7* eine signifikant verringerte Proliferation beobachtet. Mittels eines Caspase-Assays wurden die Auswirkungen des jeweiligen Gen-Knockdowns auf die Apoptoseinduktion in den Zelllinien HepT1 und HuH6 untersucht (ergänzende Abb. 3 der Veröffentlichung). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen nach *RBMS1*-, *MARCH7*-, *DPPIV*-, *FIGN*- und *TANK*-Knockdown und Kontrollzellen festgestellt. Lediglich die Ausschaltung von *BAZ2B* in HepT1-Zellen führte zu einer signifikanten Verringerung der Apoptose.

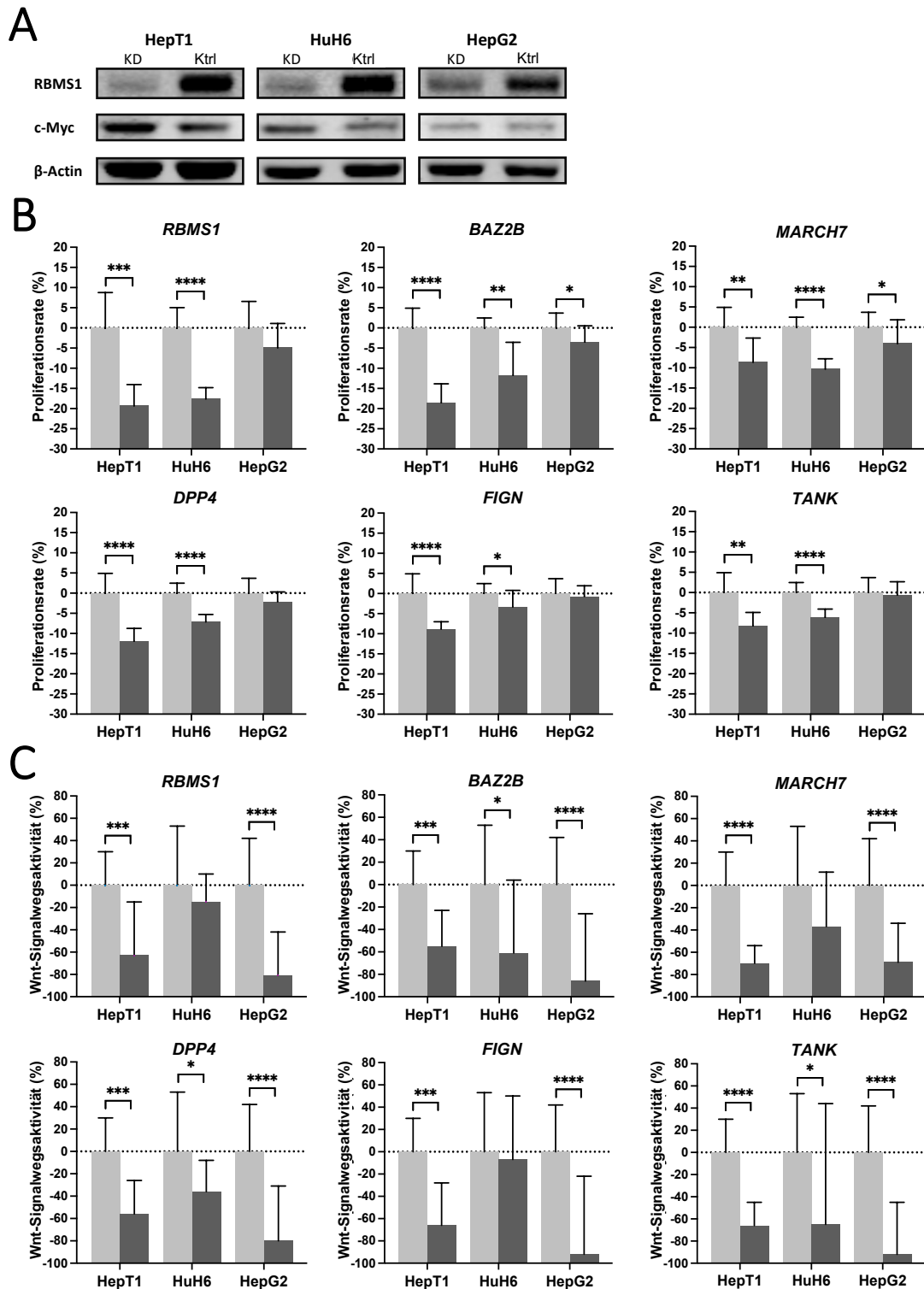


Abb. 7: Auswirkungen des Knockdowns von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* auf die Proliferationsrate und die Aktivität des Wnt-Signalwegs in den HB-Zelllinien HepT1, HuH6 und HepG2. **A:** Immunoblot von *RBMS1*, c-Myc und Beta-Actin nach *RBMS1*-Knockdown (KD: Zellen nach siRNA-Knockdown von *RBMS1*, Ktrl: Zellen, die mit einer gemischten Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert wurden). Beta-Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. **B:** MTT-Assay zur Untersuchung der Auswirkungen auf die

Zellproliferationsrate. Alle Balken zeigen den Mittelwert aus 6 Replikaten (hellgrau: mit scrambled Kontroll-siRNA transfizierte Zellen, dunkelgrau: Zellen nach siRNA-Knockdown der oben genannten Gene). Die Y-Achse zeigt die Proliferationsrate der Knockdown-Zellen im Verhältnis zu den scrambled Kontrollzellen (auf 0 gesetzt) in %. **C:** Luciferase-Reporter-Assay zur Untersuchung des Einflusses auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs. Alle Balken zeigen den Mittelwert aus 6 Replikaten (hellgrau: mit scrambled Kontroll-siRNA transfizierte Zellen, dunkelgrau: Zellen nach spezifischem siRNA-Knockdown ausgewählter Gene). Die Y-Achse zeigt die Wnt-Signalwegaktivität der Knockdown-Zellen im Verhältnis zu den scrambled Kontrollzellen (auf 0 gesetzt) in %. **B und C:** Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. Balken mit Sternchen kennzeichnen signifikante Gruppenunterschiede, die bei einem Konfidenzniveau von 95 % angenommen werden ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****)). Modifiziert nach Rodemann et al., 2025 (vgl. Abb. 6), <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Die Auswirkung des jeweiligen Gen-Knockdowns auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs wurde mithilfe eines Luciferase-Reporter-Assays untersucht. In HepT1- und HepG2-Zellen kam es nach jeweiligem Knockdown zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität des Wnt-Signalwegs (Abb. 7C). In HepG2-Zellen war dieser Wnt-Signalwegsaktivitäts-reduzierende Effekt am größten, insbesondere nach Knockdown von *FIGN*, *TANK*, *BAZ2B* und *RBMS1*. Ähnliche Ergebnisse wurden in HepT1-Zellen erzielt, allerdings mit einer geringeren Reduktion der Wnt-Signalwegsaktivität. In HuH6-Zellen führte die Ausschaltung von *BAZ2B*, *DPP4* und *TANK* zu einer signifikanten Verringerung der Wnt-Signalwegsaktivität.

Das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) von HB-Patient*innen mit 2q-Stabilität, mit 2q-Zugewinn oder mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation unterschied sich in 69 Fällen nicht signifikant (ergänzende Abb. 4A der Veröffentlichung). Ein signifikant kürzeres PFS und OS zeigte sich jedoch in 68 HB-Fällen in Bezug auf den Histologie-Typ (ergänzende Abb. 4B der Veröffentlichung). Embryonale HB zeigten ein signifikant kürzeres PFS und OS als fetale HB sowie ein signifikant kürzeres OS als gemischt epithelial-mesenchymale HB.

HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation waren signifikant mit einem gemischt epithelial-mesenchymalem Histologie-Typ (OR = 4,3) sowie einer Pfortaderbeteiligung (OR = 7,0) assoziiert (ergänzende Abb. 5 der Veröffentlichung). Im Vergleich zu HB ohne 2q-Zugewinn zeigten HB mit 2q-Zugewinn eine signifikante Assoziation mit Fernmetastasen (OR = 5,3). Weitere signifikante Korrelationen bestanden nicht.

1.4 Diskussion

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste primär maligne Lebertumor im Kindesalter. Auch wenn ein Großteil der Patient*innen mittlerweile eine gute Prognose hat, bleibt die Behandlung in fortgeschrittenen Stadien eine Herausforderung. Dabei ist die HB-Pathogenese zum Teil noch unverstanden. Durch die Identifikation noch unbekannter molekularer Ansatzpunkte kann die Entwicklung neuer Therapieansätze, wie z.B. zielgerichtete Therapien, ermöglicht werden. Hiervon erhofft man sich neben einem verbesserten Therapieansprechen, z.B. in der Hochrisikogruppe, auch eine grundsätzlich individuellere Patientenversorgung. Trotz zahlreicher präklinischer Ansätze hat es bisher noch keine zielgerichtete Therapie zur klinischen Anwendung geschafft.

Zentrale Mechanismen der HB-Pathogenese konnten bereits identifiziert werden. Als Haupttreiber gilt die Dysregulation des Wnt-Signalwegs, hauptsächlich verursacht durch *CTNNB1*- oder *APC*-Mutationen (Koch et al., 1999; Oda et al., 1996). Die alleinige Aktivierung dieses Signalweges im Mausmodell reicht jedoch nicht zur Induktion von HB *in vivo* aus, sodass ein Beitrag weiterer onkogener Treiber vermutet wird (Nejak-Bowen und Monga, 2011). Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten weisen HB eine sehr niedrige Mutationsrate auf, sodass neben den bekannten Mutationen vermutlich auch epi- und zytogenetische Alterationen eine zentrale Rolle spielen (Nagae et al., 2021).

Typische zytogenetische Veränderungen konnten in den letzten drei Jahrzehnten durch genomweite chromosomale Analysen (Karyotypisierung, FISH, konventionelle CGH und Array-CGH) aufgedeckt werden. Barros et al. (2021) analysierten in ihrem Review CNV-Daten von 480 HB-Fällen aus 45 Studien. Dabei zeigte sich in etwa 55 % der zytogenetisch veränderten Fälle ein Zugewinn von Chromosom 2, was somit die häufigste Chromosomenaberration in HB darstellt. Darüber hinaus wurden rekurrend 2q24-Amplifikationen beschrieben, deren Häufigkeit für HB typisch zu sein scheint (Arai et al., 2010; Barros et al., 2021; Hu et al., 2000; Kumon et al., 2001; Nagae et al., 2021; Rodrigues et al., 2014; Weber et al., 2000). Doch auch in Ovarial-, Ösophagus- und Plattenepithelkarzinomen sowie im Sotos- und Mafucci-Syndrom sind 2q24-Amplifikationen beschrieben worden, allerdings nicht in vergleichbarer Häufigkeit (Ambrosio et al., 2011; Amyere et al., 2014; Du Plessis et al., 1999; Kato et al., 2009; Tapper et al., 1998).

Die 2q24-Zugewinne/Amplifikationen in HB lassen auf das Vorhandensein eines oder mehrerer onkogener Treiber in dieser Region schließen. Aufgrund der niedrigen HB-Inzidenz erwies sich die Eingrenzung dieser 2q24-SOR bisher als schwierig. Dennoch gab es Versuche diese Region näher einzugrenzen und potenzielle Onkogene zu identifizieren, wofür bisher allerdings nur kleinere HB-Kohorten herangezogen wurden (Barros et al., 2021; Rodrigues et al., 2014). Eine funktionelle Charakterisierung der vermuteten Onkogene in HB-Zelllinien ist bisher nicht erfolgt. Daher blieb die pathogenetische Relevanz dieser Amplifikation bislang unklar und bildete die Grundlage für die von Rodemann et al. (2025) publizierte Arbeit.

In dieser Arbeit konnten hochauflösende Kopienzahlprofile einer größeren HB-Kohorte (n = 76) erstellt werden. In 14,5 % der Fälle zeigte sich ein 2q24-Zugewinn bzw. eine 2q24-Amplifikation, wodurch eine präzise Identifikation der SOR inklusive der dort lokalisierten Gene möglich war. Die RNA-Expressionsanalyse der SOR-Gene zeigte eine Überexpression von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* in HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation. Eine parallel erfolgte Literaturrecherche stütze diese Ergebnisse, da bereits potenzielle onkogene Funktionen dieser sechs Gene publiziert wurden. Auf diese Ergebnisse wird näher in der Diskussion der Veröffentlichung eingegangen. Die zu diesem Zeitpunkt gesammelten Informationen waren ausschlaggebend für die Auswahl von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* für weitere Experimente. Retrospektiv konnte die detektierte RNA-Überexpression dieser Gene zusätzlich anhand einer unabhängigen japanischen HB-Kohorte (n = 80) validiert werden (Nagae et al., 2021). Durch Nachweis einer entsprechenden Proteinüberexpression *in situ* in HB mit 2q24-Zugewinn fanden sich keine Hinweise auf gegenregulatorische posttranskriptionelle Mechanismen. Für die funktionelle Charakterisierung *in vitro* wurden die drei etablierten humanen HB-Zelllinien HepT1, HuH6 und HepG2 ausgewählt, da sie einen 2q-Zugewinn tragen und somit ein geeignetes Modell darstellen. Eine HB-Zelllinie mit 2q24-Amplifikation wäre zwar ein ideales Modell gewesen, jedoch ist es bisher - trotz intensiver Recherche und Austausch mit internationalen Kollegen - nicht gelungen eine solche Zelllinie zu etablieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach siRNA-Knockdown der jeweiligen Gene eine signifikant reduzierte Proliferationsrate und Wnt-Signalwegsaktivität in HB-Zelllinien vorlag. Dies lässt auf eine wachstumsfördernde Funktion der jeweiligen Gene durch deren Interaktion mit dem Wnt-Signalweg schließen.

Kim et al. (2010) entdeckten in einem bei Glioblastomen häufiger vorkommenden Amplicon auf Chromosom 12q13.3–14.1 ein funktionell-integriertes *Oncomir*/Onkogen-Cluster, bestehend aus dem microRNA-Gen *hsa-miR-26a* und den Genen *CDK4* und *CENTG1*. In Anlehnung an diese Entdeckung postulieren Rodemann et al. (2025), dass *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* ein lokal- und funktionell-integriertes Gencluster darstellen, welches durch gemeinsame Lokalisation in der rekurrend amplifizierten 2q24-Region das zelluläre Wachstum durch Interaktion mit dem Wnt-Signalweg antreibt. Da dieser Signalweg in etwa 90 % der Hepatoblastome pathologisch aktiviert ist (Koch et al., 1999; Nagae et al., 2021), könnte die Entdeckung dieses Genclusters zu einem besseren Verständnis der Tumorentstehung von HB führen. Eine zielgerichtete Modulation des durch Mutationen aktivierten Wnt-Signalwegs ist weiterhin eine bisher noch nicht bewältigte Herausforderung, weshalb die Entdeckung neuer Komponenten bzw. Regulatoren zur Identifikation neuer Angriffspunkte dieses Signalwegs führen kann. Diese Angriffspunkte könnten aufgrund der zentralen Bedeutung des Signalwegs auch Tumorentitäten-überschreitende Relevanz haben.

Ein kürzeres Überleben von HB-Patient*innen mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation zeigte sich im Rahmen der Analyse von 69 HB-Überlebensdatensätzen in dieser Arbeit nicht. Das PFS und das OS unterschieden sich nicht signifikant zwischen HB mit 2q-Stabilität, 2q-Zugewinn und 2q24-Zugewinn/Amplifikation, jedoch war ein Trend (nicht signifikant) zu einem kürzeren (progressionsfreien) Überleben in HB mit 2q-Zugewinn oder 2q24-Zugewinn/Amplifikation erkennbar. Da sich die vorliegende Studie jedoch auf eine retrospektive Kohorte von unterschiedlich behandelten HB-Patienten beschränkte, können keine endgültigen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Auswirkungen auf das Überleben gezogen werden. Zudem war die Gruppe der HB-Fälle mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation insgesamt klein ($n = 11$), was statistisch signifikante Unterschiede maskieren könnte. Somit konnten die Ergebnisse von Kumon et al. (2001) nicht bestätigt werden, die in der von ihnen untersuchten HB-Kohorte einen 2q-Zugewinn mit einer 2q24-SOR als unabhängigen Risikofaktor für ein kürzeres Überleben festgestellt hatten. Jedoch zeigten die verschiedenen histologischen Subtypen deutliche Unterschiede in Bezug auf das PFS und OS. Embryonale HB zeigten im Vergleich zu fetalen HB ein signifikant kürzeres Überleben. Ein längeres Überleben der gut-differenzierten fetalen HB ist bekannt, wäh-

rend Belege für ein signifikant schlechteres Ergebnis bei embryonalen HB bisher nicht berichtet wurden (Haas et al., 1989).

HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation waren statistisch signifikant mit einem gemischt epithelial-mesenchymalen Histologie-Typ assoziiert. Hingegen war die RNA-Überexpression von *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* nicht mit den verschiedenen histologischen Subtypen des HB assoziiert, sodass die detektierte RNA-Überexpression eindeutig auf die zugrundeliegende Kopienzahlvariation zurückzuführen war. Bei HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation mit einem invasiven Wachstum im Sinne einer Pfortaderbeteiligung. Darüber hinaus zeigt der *Forrest Plot* einen Trend (nicht signifikant) zur Assoziation mit einer höheren PRETEXT-Gruppe (IV) und positiven PRETEXT-Annotationsfaktoren (VPEFM+). Die fehlende statistische Signifikanz könnte, wie schon zuvor im Rahmen der Überlebensdaten erwähnt, auf die zahlenmäßig kleine Fallgruppe von HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation ($n = 11$) zurückzuführen sein und sollte mit höheren Fallzahlen zukünftig validiert werden.

Man kann davon ausgehen, dass die untersuchte HB-Kohorte für HB im Allgemeinen repräsentativ ist, da eine große Anzahl von unselektierten Fällen über einen Zeitraum von fast 40 Jahren gesammelt wurde. Das Fehlen von 2q24-amplifizierten HB-Fällen in der FFPE-Serie ist vermutlich durch den Einsatz fortgeschrittener, standardisierter präoperativer Chemotherapie-Protokolle zu erklären. Diese therapeutische Vorbehandlung könnte bestimmte proliferationsaktive HB-Zellpopulationen negativ selektionieren und damit chromosomale Aberrationen maskieren. Hinweise darauf konnten im Fall HB-37 der untersuchten Kohorte gefunden werden, dessen MIP-Analyse eine 2q24-Amplifikation in der Chemotherapie-naiven Biopsie und eine 2q-Stabilität des chemotherapeutisch-vorbehandelten Resektats zeigte, was die Wirkung der Chemotherapie auf die CNV der Tumorzellpopulation unterstreicht.

Auch wenn das gehäufte Vorkommen von 2q24-Amplifikationen in HB schon seit Jahrzehnten bekannt ist, konnten bisher keine onkogenen Treibergene in dieser Region identifiziert werden. In dieser Arbeit gelang durch die Analyse einer größeren HB-Kohorte eine genaue Eingrenzung der relevanten chromosomalen Region. Anschließend erfolgte erstmals eine funktionelle Charakterisierung der als überexprimiert identi-

fizierten Gene, was letztlich zur Erstbeschreibung dieses onkogenen Clusters führte. Weiterführende zellbiologische Untersuchungen sind zwingend notwendig, um die Rolle dieses Genclusters in der HB-Pathogenese besser zu verstehen.

1.5 Zusammenfassung

Das gehäufte Vorkommen von 2q24-Amplifikationen in Hepatoblastomen (HB) ist seit Jahrzehnten bekannt. Bisher konnten jedoch keine onkogenen Treiber in dieser Region identifiziert werden. In dieser Arbeit führte die Kopienzahlanalyse einer größeren HB-Kohorte zur Identifikation von mehreren Fällen mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation, wodurch sich die kleinste überlappende Region (SOR) des 2q-Zugewinns eingrenzen ließ. Nachfolgende RNA-Expressionsanalysen der dort lokalisierten Gene stellten *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* als potenzielle Kandidatengene heraus, deren Überexpression in einer unabhängigen japanischen HB-Kohorte validiert werden konnte. *In situ* konnte die erhöhte Proteinexpression dieser Gene (Ausnahme *BAZ2B*) in HB-Gewebeschnitten bestätigt werden. Nach siRNA-Knockdown der jeweiligen Gene in den drei etablierten humanen HB-Zelllinien (HepT1, HuH6 und HepG2) zeigte sich eine signifikant reduzierte Proliferationsrate und Wnt-Signalwegsaktivität, was auf eine jeweils wachstumsfördernde Genfunktion durch Interaktion mit dem Wnt-Signalweg schließen lässt. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Gencluster bestehend aus *RBMS1*, *BAZ2B*, *MARCH7*, *DPP4*, *FIGN* und *TANK* als onkogener Treiber in der Region 2q24 identifiziert werden. Der 2q24-Kopienzahlzugewinn ermöglicht es diesem dort lokalisierten Gencluster durch entsprechend erhöhte RNA- und Proteinexpression seine wachstumsfördernde Wirkung auszuüben. Weitere und detaillierte Untersuchungen dieses Clusters und seiner Wechselwirkungen mit anderen für die HB-Pathogenese relevanten Komponenten sind erforderlich, um den genauen Funktionsmechanismus dieser Gene und ihrer Genprodukte aufzudecken.

1.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch dargestellte experimentelle Strategie	11
Abbildung 2: <i>Summary plot</i> der Kopienzahlvariationen (CNV)	19
Abbildung 3: Gruppierung der HB-Kohorte gemäß 2q-Kopienzahlstatus	21
Abbildung 4: Eingrenzung der kleinsten gemeinsamen Region (SOR)	22
Abbildung 5: RNA-Expressionsanalysen der SOR-Gene	24
Abbildung 6: Immunhistochemische Analysen <i>in situ</i>	26
Abbildung 7: Funktionelle zellbiologische Analysen <i>in vitro</i>	28

1.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HB-Kohorte - demografische, histologische, molekulare Merkmale 20

Tabelle 2: Klinische Informationen zu den HB mit 2q24-Zugewinn/Amplifikation 21

1.8 Literaturverzeichnis

- Albrecht S, von Schweinitz D, Waha A, Kraus JA, von Deimling A, Pietsch T. Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res.* 1994; 54: 5041–5044
- Ambrosio EP, Drigo SA, Bérghamo NA, Rosa FE, Bertonha FB, de Abreu FB, Kowalski LP, Rogatto SR. Recurrent copy number gains of ACVR1 and corresponding transcript overexpression are associated with survival in head and neck squamous cell carcinomas. *Histopathology.* 2011; 59: 81–89
- Amyere M, Domp Martin A, Wouters V, Enjolras O, Kaitila I, Docquier P-L, Godfraind C, Mulliken JB, Boon LM, Vikkula M. Common somatic alterations identified in maffucci syndrome by molecular karyotyping. *Mol Syndromol.* 2014; 5: 259–267
- Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010; 49: 596–609
- Barros JS, Aguiar TFM, Costa SS, Rivas MP, Cypriano M, Toledo SRC, Novak EM, Odone V, Cristofani LM, Carraro DM, Werneck da Cunha I, Costa CML, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Krepschi ACV. Copy Number Alterations in Hepatoblastoma: Literature Review and a Brazilian Cohort Analysis Highlight New Biological Pathways. *Front Oncol.* 2021; 11: 741526
- Beck A, Eberherr C, Hagemann M, Cairo S, Häberle B, Vokuhl C, von Schweinitz D, Kappler R. Connectivity map identifies HDAC inhibition as a treatment option of high-risk hepatoblastoma. *Cancer Biol Ther.* 2016; 17: 1168–1176
- Beroukhim R, Getz G, Nghiemphu L, Barretina J, Hsueh T, Linhart D, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 20007–20012
- Bhakta N, Force LM, Allemani C, Atun R, Bray F, Coleman MP, Steliarova-Foucher E, Frazier AL, Robison LL, Rodriguez-Galindo C, Fitzmaurice C. Childhood cancer burden: a review of global estimates. *Lancet Oncol.* 2019; 20: e42–e53

- Cairo S, Armengol C, De Reyniès A, Wei Y, Thomas E, Renard C-A, et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell*. 2008; 14: 471–484
- Cho S-J, Ranganathan S, Alaggio R, Maibach R, Tanaka Y, Inoue T, et al. Consensus classification of pediatric hepatocellular tumors: A report from the Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC). *Pediatr Blood Cancer*. 2023; : e30505
- Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Häberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr*. 2014; 26: 19–28
- Doi I. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Gan*. 1976; 67: 1–10
- Du Plessis L, Dietzsch E, Van Gele M, Van Roy N, Van Helden P, Parker MI, Mugwanya DK, De Groot M, Marx MP, Kotze MJ, Speleman F. Mapping of novel regions of DNA gain and loss by comparative genomic hybridization in esophageal carcinoma in the Black and Colored populations of South Africa. *Cancer Res*. 1999; 59: 1877–1883
- Eichenmüller M, Gruner I, Hagl B, Häberle B, Müller-Höcker J, von Schweinitz D, Kappler R. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology*. 2009; 49: 482–490
- Eichenmüller M, Trippel F, Kreuder M, Beck A, Schwarzmayr T, Häberle B, Cairo S, Leuschner I, von Schweinitz D, Strom TM, Kappler R. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J Hepatol*. 2014; 61: 1312–1320
- Espinoza AF, Patel RH, Patel KR, Badachhape AA, Whitlock R, Srivastava RK, et al. A novel treatment strategy utilizing panobinostat for high-risk and treatment-refractory hepatoblastoma. *J Hepatol*. 2024; 80: 610–621
- Feng J, Polychronidis G, Heger U, Frongia G, Mehrabi A, Hoffmann K. Incidence trends and survival prediction of hepatoblastoma in children: a population-based study. *Cancer Commun (Lond)*. 2019; 39: 62

Foster JM, Oumie A, Togneri FS, Vasques FR, Hau D, Taylor M, Tinkler-Hundal E, Southward K, Medlow P, McGreeghan-Crosby K, Halfpenny I, McMullan DJ, Quirke P, Keating KE, Griffiths M, Spink KG, Brew F. Cross-laboratory validation of the OncoScan® FFPE Assay, a multiplex tool for whole genome tumour profiling. *BMC Med Genomics*. 2015; 8: 5

Haas JE, Muczynski KA, Krailo M, Ablin A, Land V, Vietti TJ, Hammond GD. Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. *Cancer*. 1989; 64: 1082–1095

Häberle B, Maxwell R, Schweinitz D von, Schmid I. High Dose Chemotherapy with Autologous Stem Cell Transplantation in Hepatoblastoma does not Improve Outcome. Results of the GPOH Study HB99. *Klin Padiatr*. 2019; 231: 283–290

Haeberle B, Schweinitz D von. Treatment of hepatoblastoma in the German cooperative pediatric liver tumor studies. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; 4: 493–498

Honda M, Uchida K, Irie T, Hirukawa K, Kadohisa M, Shimata K, Isono K, Shimojima N, Sugawara Y, Hibi T. Recent advances in surgical strategies and liver transplantation for hepatoblastoma. *Cancer Med*. 2023; 12: 3909–3918

Hu J, Wills M, Baker BA, Perlman EJ. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 27: 196–201

Ilmer M, Garnier A, Vykoukal J, Alt E, von Schweinitz D, Kappler R, Berger M. Targeting the Neurokinin-1 Receptor Compromises Canonical Wnt Signaling in Hepatoblastoma. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14: 2712–2721

Kaatsch P, Grabow D. [The German cohort of long-term survivors of childhood cancer. A population-based cohort in the German Childhood Cancer Registry]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2012; 55: 843–851

Kato M, Takita J, Takahashi K, Mimaki M, Chen Y, Koh K, Ida K, Oka A, Mizuguchi M, Ogawa S, Igarashi T. Hepatoblastoma in a patient with sotos syndrome. *J Pediatr*. 2009; 155: 937–939

- Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD. Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 2183–2188
- Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*. 1999; 59: 269–273
- Kumon K, Kobayashi H, Namiki T, Tsunematsu Y, Miyauchi J, Kikuta A, Horikoshi Y, Komada Y, Hatae Y, Eguchi H, Kaneko Y. Frequent increase of DNA copy number in the 2q24 chromosomal region and its association with a poor clinical outcome in hepatoblastoma: cytogenetic and comparative genomic hybridization analysis. *Jpn J Cancer Res*. 2001; 92: 854–862
- López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*. 2009; 40: 1512–1515
- Meyers RL, Czauderna P, Otte J-B. Surgical treatment of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59: 800–808
- Meyers RL, Maibach R, Hiyama E, Häberle B, Krailo M, Rangaswami A, et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration. *The Lancet Oncology*. 2017; 18: 122–131
- Nagae G, Yamamoto S, Fujita M, Fujita T, Nonaka A, Umeda T, et al. Genetic and epigenetic basis of hepatoblastoma diversity. *Nat Commun*. 2021; 12: 5423
- Nejak-Bowen KN, Monga SPS. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 44–58
- Nussbaumer G, Benesch M. Hepatoblastoma in molecularly defined, congenital diseases. *Am J Med Genet A*. 2022; 188: 2527–2535
- Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res*. 1996; 56: 3320–3323
- Otte JB, Pritchard J, Aronson DC, Brown J, Czauderna P, Maibach R, Perilongo G, Shafford E, Plaschkes J, International Society of Pediatric Oncology (SIOP). Liver trans-

plantation for hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL-1 and review of the world experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 42: 74–83

Pietsch T, Fonatsch C, Albrecht S, Maschek H, Wolf HK, von Schweinitz D. Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest*. 1996; 74: 809–818

Rodemann MM, Dreschmann V, Dörner E, Sommer A, Kraetzschmar J, Klein-Hitpass L, Nagae G, Hiyama E, von Schweinitz D, Kappler R, Vokuhl C, Pietsch T. Identification of a Growth-Promoting Gene Cluster in the Region 2q24 as a Driver of Tumorigenesis in Childhood Hepatoblastoma. *Am J Pathol*. 2025; 195: 1553–1569

Rodrigues TC, Fidalgo F, da Costa CML, Ferreira EN, da Cunha IW, Carraro DM, Krepischi ACV, Rosenberg C. Upregulated genes at 2q24 gains as candidate oncogenes in hepatoblastomas. *Future Oncol*. 2014; 10: 2449–2457

von Schweinitz D. Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg*. 2006; 15: 17–24

Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesselning P, Shin HY, Stiller CA, IICC-3 contributors. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017; 18: 719–731

Suzuki M, Kato M, Yuyan C, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci*. 2008; 99: 564–570

Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA, Liu W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*. 2002; 21: 4863–4871

Tapper J, Sarantaus L, Vahteristo P, Nevanlinna H, Hemmer S, Seppälä M, Knuutila S, Butzow R. Genetic changes in inherited and sporadic ovarian carcinomas by comparati-

ve genomic hybridization: extensive similarity except for a difference at chromosome 2q24-q32. *Cancer Res.* 1998; 58: 2715–2719

Tulla M, Berthold F, Graf N, Rutkowski S, von Schweinitz D, Spix C, Kaatsch P. Incidence, Trends, and Survival of Children With Embryonal Tumors. *Pediatrics.* 2015; 136: e623-632

Wang Y, Cottman M, Schiffman JD. Molecular inversion probes: a novel microarray technology and its application in cancer research. *Cancer Genet.* 2012; 205: 341–355

Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64: 83–103

Weber RG, Pietsch T, von Schweinitz D, Lichter P. Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *Am J Pathol.* 2000; 157: 571–578

Weinberg AG, Finegold MJ. Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol.* 1983; 14: 512–537

Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kühne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest.* 2003; 83: 429–434

Yiallourous M, Schmid I. Behandlung von Patienten mit Hepatoblastom gemäß Interims-Empfehlungen [Internet]. 2024 (Zugriffsdatum: 07.06.2025). Pfad: https://www.gpoh.de/kinderkrebsinfo/content/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/lebertumoren/behandlung_nach_interims_empfehlung/index_ger.html

Zsiros J, Brugieres L, Brock P, Roebuck D, Maibach R, Zimmermann A, et al. Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol.* 2013; 14: 834–842

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Rodemann MM, Dreschmann V, Dörner E, Sommer A, Kraetzschmar J, Klein-Hitpass L, Nagae G, Hiyama E, von Schweinitz D, Kappler R, Vokuhl C, Pietsch T. Identification of a Growth-Promoting Gene Cluster in the Region 2q24 as a Driver of Tumorigenesis in Childhood Hepatoblastoma. *Am J Pathol.* 2025; 195: 1553–1569

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2025.04.006>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Torsten Pietsch durchgeführt und beruht auf der gemeinsamen Publikation von Rodemann et al. (2025). An diesem Projekt haben folgende Personen mitgewirkt: Verena Dreschmann war an Untersuchungen und der Optimierung der Methodik beteiligt; Evelyn Dörner war an Untersuchungen beteiligt; Dr. Anette Sommer und Dr. Jörn Krätzschar waren an Untersuchungen beteiligt und haben das Manuskript überarbeitet; PD Dr. Ludger Klein-Hitpass war an Untersuchungen und der Datenerhebung beteiligt und hat das Manuskript überarbeitet; Prof. Dr. Genta Nagae, Prof. Dr. Eiso Hiyama und Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz waren an der Datenerhebung beteiligt; Prof. Dr. Roland Kappler war an der Datenerhebung beteiligt und hat das Manuskript überarbeitet; Prof. Dr. Christian Vokuhl war an Untersuchungen und der Datenerhebung beteiligt und Prof. Dr. Torsten Pietsch konzipierte das Projekt, beschaffte die Finanzmittel und Ressourcen, war an Untersuchungen und der Datenerhebung beteiligt, supervidierte das Projekt und überarbeitete das Manuskript. Ich selbst habe das Projekt mitkonzipiert, die Methodik optimiert, die Datenanalyse und die *in vitro* Funktionsanalyse selbständig durchgeführt, die Auswertung, Statistik und Visualisierung übernommen und die erste Version des Manuskripts verfasst und nachfolgende Versionen überarbeitet.

Zur Unterstützung bei der Übersetzung von Originaltexten aus fremdsprachlichen Quellen sowie zur Verbesserung der sprachlichen Qualität der Dissertationsschrift wurden die generativen Sprachmodelle DeepL SE, ChatGPT und Perplexity AI verwendet. Nach der Verwendung dieser Sprachmodelle habe ich die entsprechenden Passagen überprüft, bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Pietsch, für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas. Sein unermüdliches Engagement, seine motivierende Unterstützung sowie die intensive und stets konstruktive Betreuung haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Pietsch für die wertvolle Unterstützung in den vergangenen Jahren. Eure fachliche Expertise und technische Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieses Projekts beigetragen. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Verena Dreschmann, die sich nicht nur durch ihre herausragende Fachkompetenz, sondern auch durch ihre menschlichen Qualitäten als unverzichtbare Stütze erwiesen hat. Mein herzlicher Dank gilt außerdem Evelyn Dörner und Dorota Denkhaus für ihre tatkräftige Unterstützung.

Meiner Freundin Jil danke ich von Herzen für ihre beständige Unterstützung und Ermutigung auf diesem Weg. Ebenso danke ich unserem Freundeskreis, der in den vergangenen Jahren stets für den nötigen Ausgleich gesorgt hat – vielen Dank an Jakob, Marie, Johannes, Chrissy und Jonas.

Besonders danken möchte ich zuletzt meinem Bruder und meinen Eltern. Auf Eure Unterstützung und Euren Glauben an mich kann ich mich immer verlassen. Danke.