

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Jochen Herms

**Der Einfluss von 5-Hydroxymethylcytosin  
auf die Entstehung und das Wachstum  
des Glioblastoms**

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

vorgelegt von  
Gesa Kolck  
aus Bielefeld  
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Giese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Kösel  
Prof. Dr. Nathalie Albert  
PD Dr. Bogdana Suchorska

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Theo F. J. Kraus

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2020



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

**Kolck, Gesa**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Der Einfluss von 5-Hydroxymethylcytosin auf die Entstehung und das Wachstum des Glioblastoms**

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

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

**Mainz, 24.07.2020**

Ort, Datum

**Gesa Kolck**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	viii
Abbildungsverzeichnis .....	ix
Tabellenverzeichnis .....	x
Zusammenfassung .....	2
Abstract .....	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Gehirntumore.....	4
1.1.1 Die Rolle der Isocitratdehydrogenase in der Entwicklung von Gliomen.....	7
1.1.2 Glioblastoma multiforme .....	10
1.2 Epigenetik.....	12
1.2.1 Histonmodifikationen .....	13
1.2.2 Micro-RNAs.....	13
1.2.3 Methylierung.....	14
1.2.3.1 DNA-Methyltransferasen .....	16
1.2.3.2 5-Methylcytosin in der Tumorgenese .....	17
1.2.4 Hydroxymethylierung .....	18
1.2.4.1 Ten-Eleven-Translokase (TET).....	19
1.2.4.2 Passive und aktive Demethylierung.....	20
1.2.4.3 Proteine der DNA-Demethylierung.....	23
1.2.4.4 5-hmC als selbstständige epigenetische Modifikation .....	25
1.2.4.5 TET-Enzyme und 5-hmC in der Tumorgenese.....	25
1.3 Ziele der Arbeit .....	28
1.3.1 Versuche mit Retinsäure .....	28
1.3.2 Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium.....	29
1.3.3 TET3-Überexpression.....	30
2 Material und Methoden .....	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien .....	31

2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.3	Kits .....	33
2.1.4	Geräte .....	33
2.1.5	Puffer und Lösungen .....	35
2.1.6	Zellkulturmedien und Reagenzien.....	35
2.1.7	Antikörper .....	36
2.1.8	Primer.....	36
2.1.9	Zelllinien .....	37
2.1.10	Bakterien .....	37
2.2	Methoden .....	38
2.2.1	Färbungen.....	38
2.2.1.1	Immunhistochemie .....	38
2.2.1.2	Immunfluoreszenzfärbung .....	39
2.2.1.3	Quantifizierung der gefärbten Zellen.....	41
2.2.2	Zellkultur.....	41
2.2.2.1	Zellkultivierung.....	41
2.2.2.2	Gewinnung von Zellpellets.....	42
2.2.2.3	Behandlung mit Retinsäure.....	42
2.2.2.4	Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium.....	43
2.2.2.5	TET3-Überexpression.....	43
2.2.2.5.1	Transformation .....	43
2.2.2.5.2	Plasmid-Aufreinigung .....	44
2.2.3	Genexpressionsanalysen.....	45
2.2.3.1	RNA-Extraktion.....	45
2.2.3.2	DNA-Extraktion.....	45
2.2.3.3	Reverse Transkription.....	46
2.2.3.4	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von RNA und DNA ...	47
2.2.3.5	Bestimmung der RNA-Integrität .....	47
2.2.4	Gelelektrophorese .....	48
2.2.5	Quantitative PCR (qPCR) .....	49

2.2.5.1	Primer.....	50
2.2.5.2	Referenzgene.....	51
2.2.5.3	Relative Quantifizierung.....	51
2.2.5.4	Statistische Analysen.....	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Histologie.....	53
3.2	Zellkultur.....	57
3.2.1	Versuche mit Retinsäure (RA).....	57
3.2.1.1	Genexpressionsanalysen.....	57
3.2.1.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	64
3.2.2	Versuche mit Serum-freiem Medium.....	67
3.2.2.1	U87-Zelllinie.....	67
3.2.2.1.1	Genexpressionsanalysen.....	67
3.2.2.1.2	Qualitätsmessung der RNA.....	71
3.2.2.1.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	71
3.2.2.2	LN401-Zelllinie.....	77
3.2.2.2.1	Genexpressionsanalysen.....	77
3.2.2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	83
3.2.3	TET3-Überexpression mittels Vektor.....	87
3.2.3.1	Genexpressionsanalysen.....	87
3.2.3.2	RNA-Qualitätsmessung.....	89
3.2.3.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	89
3.3	Immunfluoreszenzfärbung von Mausekzellen.....	90
4	Diskussion.....	91
4.1	Histologie.....	91
4.2	Zellkulturversuche.....	94
4.2.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	94
4.2.2	Diskussion der qPCR-Methoden.....	95
4.2.2.1	Referenzgene für qPCR.....	95
4.2.2.2	RIN.....	96

4.2.3	Diskussion der Genexpressionsanalysen .....	96
4.2.3.1	Experimente mit Retinsäure-Behandlung.....	97
4.2.3.2	Experimente mit Serum-freiem Medium.....	100
4.2.3.3	Experimente mit Tet3-Vektor .....	103
4.3	Ausblick .....	105
5	Danksagung .....	107
6	Literaturverzeichnis.....	108

## Abkürzungsverzeichnis

5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-hmU	5-Hydroxymethyluracil
5-fC	5-Formylcytosin
5-caC	5-Carboxylcytosin
AICDA (AID)	Activation-induced-cytidine Deaminase
APOBEC	Apolipoprotein B
BSA	Bovines Serum Albumin
CCND1	Cyclin D1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBPS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
EdU	5-Ethynyl-2-Deoxyuridine
FBS	fetales bovines Serum
GFAP	Saures Gliafaserprotein
IDH	Isocitratdehydrogenase
IPO 8	Importin 8
LC	Light Cyler
MBD4	Methyl-CpG bindende Domäne Protein 4
5- mC	5- Methylcytosin
NGS	Normal Goat Serum
RA	Retinoic acid = Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SMUG1	strand-selective monofunctional uracil- DNA glykosylase
TBP	TATA Box bindendes Protein
TDG	Thymin DNA Glycosylase
TET1-3	Ten-eleven-Translokase 1-3

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Einteilung der diffusen Gliome nach der überarbeiteten WHO Klassifikation von 2016 (Louis, 2016).....	6
<b>Abbildung 2:</b> Zusammenfassung der Effekte des mutierten IDH1/2 auf den Stoffwechsel der Zelle (Ichimura, 2012).....	9
<b>Abbildung 3:</b> Mögliche Wege der DNA-Demethylierung (Branco, 2012).....	22
<b>Abbildung 4:</b> Immunhistochemische Färbungen einiger Glioblastome .....	53
<b>Abbildung 5:</b> Vergleich des 5-hmC-Gehalts zwischen gesundem Gehirngewebe (Kontrolle) und Glioblastomen (GBM) .....	55
<b>Abbildung 6:</b> Gesamtüberleben von Glioblastompatienten mit 5-hmC positiven Zellkernen.....	56
<b>Abbildung 7:</b> Genexpression der Zelllinie LN71, Übersichtsgraph.....	58
<b>Abbildung 8:</b> Genexpression der Zelllinie LN71, einzelne Enzyme.....	59
<b>Abbildung 9:</b> Genexpression der Zelllinie LN319, Übersichtsgraph.....	61
<b>Abbildung 10:</b> Genexpression der Zelllinie LN319, einzelne Enzyme.....	62
<b>Abbildung 11:</b> Fluoreszenzfärbung von LN319.....	64
<b>Abbildung 12:</b> Versuchsaufbau der Zellkulturversuche mit Serum-freiem Medium ....	67
<b>Abbildung 13:</b> Genexpression der Zelllinie U87, Übersichtsgraph.....	68
<b>Abbildung 14:</b> Genexpression der Zelllinie U87, einzelne Enzyme.....	70
<b>Abbildung 15:</b> RIN- Werte der U87.....	71
<b>Abbildung 16:</b> Phasenkontrastbilder der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium.....	74
<b>Abbildung 17:</b> Immunfluoreszenz der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium.....	76
<b>Abbildung 18:</b> Genexpression der Zelllinie LN401, Übersichtsgraph.....	77
<b>Abbildung 19:</b> Genexpression der Zelllinie LN401, einzelne Enzyme.....	80
<b>Abbildung 20:</b> Phasenkontrastbilder des Versuchsverlaufs der Zelllinie LN401.....	84
<b>Abbildung 21:</b> Serum-frei kultivierte Zellen nach 24h von Im et al (Im, 2015) .....	85
<b>Abbildung 22:</b> Immunfluoreszenzbilder der Zelllinie LN401 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium.....	86
<b>Abbildung 23:</b> Vektor transfizierte Zellen mit GFP-Signal.....	87
<b>Abbildung 24:</b> Genexpression der Zelllinie U87 nach Inkubation mit Tet3 Vektor.....	88
<b>Abbildung 25:</b> Ergebnisse der RIN-Messung für U87 nach Vektorbehandlung.....	89
<b>Abbildung 26:</b> Mausekornzellen mit 5-hmC positivem Signal im Zellkern.....	90

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Reagenzien und Chemikalien .....	31
<b>Tabelle 2:</b> Verbrauchsmaterialien .....	32
<b>Tabelle 3:</b> Kits .....	33
<b>Tabelle 4:</b> Geräte .....	33
<b>Tabelle 5:</b> Puffer und Lösungen .....	35
<b>Tabelle 6:</b> Zellkulturmedien und Reagenzien .....	35
<b>Tabelle 7:</b> Antikörper .....	36
<b>Tabelle 8:</b> Primer von Eurofins, Ebersberg, Deutschland .....	36
<b>Tabelle 9:</b> Genetische Charakterisierung der LN71, LN319, LN401 (Ishii et al., 1999)37	
<b>Tabelle 10:</b> Puffermengen für die Immunfluoreszenzfärbung .....	40
<b>Tabelle 11:</b> Reaktionsgemisch für die Immunfluoreszenzfärbung.....	40
<b>Tabelle 12:</b> Puffer und Antikörperlösungen .....	41
<b>Tabelle 13:</b> Anzahl der Zellen für Zellkulturflaschen .....	42
<b>Tabelle 14:</b> Reverse Transkription- Reaktionsgemisch.....	46
<b>Tabelle 15:</b> qPCR Ansatz.....	49
<b>Tabelle 16:</b> Beschreibung des Patientenkollektivs.....	54
<b>Tabelle 17:</b> Signifikanzen für die Zelllinie LN 71 nach RA-Behandlung .....	60
<b>Tabelle 18:</b> Signifikanzen für die Zelllinie LN 319 nach RA-Behandlung .....	62
<b>Tabelle 19:</b> Relative Differenzen der Enzymexpressionen, sowie GFAP-Expression, der Zelllinie LN71 und LN319 im Vergleich, nach RA-Behandlung.....	63
<b>Tabelle 20:</b> Quantifizierung der Immunfluoreszenz von LN71 nach RA Behandlung ..	65
<b>Tabelle 21:</b> Quantifizierung der Immunfluoreszenz von LN319 nach RA-Behandlung	65
<b>Tabelle 22:</b> Signifikanzniveaus der quantifizierten EdU und 5-hmC-Werte für LN71 und LN319.....	66
<b>Tabelle 23:</b> Signifikanzniveaus (p-Werte) der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium .....	70
<b>Tabelle 24:</b> Quantifizierung der Immunfluoreszenz der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium .....	72
<b>Tabelle 25:</b> Signifikanzniveaus (p-Werte) der Zelllinie LN401 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium .....	81
<b>Tabelle 26:</b> Relative Differenzen der Zelllinie LN401 und U87 nach Behandlung mit Serum-freiem Medium .....	82
<b>Tabelle 27:</b> Quantifizierung der LN401 Kultivierung in Serum-freiem Medium.....	83
<b>Tabelle 28:</b> Quantifizierung der Zelllinie U87 nach Vektorbehandlung.....	89

**Teilergebnisse der Arbeit haben zu folgender Veröffentlichung beigetragen:**

Kraus TF, Kolck G, Greiner A, Schierl K, Guibourt V, Kretschmar HA. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and intratumoral heterogeneity as an epigenomic hallmark of glioblastoma. *Tumour Biol.* 2015 Nov;36(11):8439-46. doi: 10.1007/s13277-015-3606-9. Epub 2015 May 29.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), einer epigenetischen Modifikation der Base Cytosin, auf die Entstehung und das Wachstum von Glioblastomen. Das Glioblastom ist ein hochmaligner Hirntumor, dessen Entstehung sehr wahrscheinlich durch epigenetische Vorgänge mit beeinflusst wird. Die Epigenetik beschreibt DNA-Veränderungen, die nicht durch die Basensequenz der DNA festgelegt sind. 5-hmC und die für seine Bildung zuständigen Ten-eleven-Translokase-Enzyme (TET) rücken seit 2010 in den Fokus der epigenetischen Forschung. Erste Untersuchungen lassen erkennen, dass 5-hmC bei der Reaktivierung von Genen und der Variabilität der Genexpression beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst in einer histologischen Studie an 94 humanen Glioblastompräparaten der 5-hmC-Gehalt mittels immunhistochemischer Färbung quantifiziert und die Ergebnisse mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert. Ferner wurden in verschiedenen Zellkulturversuchen der 5-hmC-Gehalt, die Proliferationsrate und die Expressionslevel von am 5-hmC-Stoffwechsel beteiligten Enzymen und die Veränderungen nach Exposition mit unterschiedlichen Stressoren an Glioblastomzelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen unter Zugabe von Retinsäure kultiviert, in Serum-freiem Medium geführt und mittels Vektor wurde TET3 überexprimiert. In der histologischen Studie zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem prozentualen 5-hmC-Gehalt und der Überlebenszeit der Patienten. Die Kultivierung mit Retinsäure zeigte keine eindeutigen Veränderungen. Die Inkubation in Serum-freiem Medium zeigte keinen signifikanten Effekt. Durch die Rekultivierung in Standardmedium konnte allerdings ein verstärkter Umsatz von 5-hmC beobachtet werden. Die Überexpression mittels TET3-Vektor konnte erfolgreich durchgeführt werden und neben einem Anstieg der TET3-Expression zeigte sich eine Zunahme eines der 5-hmC abbauenden Enzyme. Die Ergebnisse der histologischen Studie lassen Vermutungen zu, dass 5-hmC als histologischer Marker für die Infiltrationstiefe des Tumors genutzt oder als Prognosefaktor gewertet werden könnte. Welche Interpretation die wahrscheinlichere ist, sollte in größeren Stichproben weiter untersucht werden. Die Versuchsbedingungen zur Untersuchung des 5-hmC-Gehalts in der Zellkultur können noch optimiert werden, durch Verlängerung der Versuchsdauer oder durch Inkubation mit höheren Konzentrationen der verwendeten Substanzen. Das Experiment mit TET3-Überexpression ist vielversprechend. Die Überexpression konnte erfolgreich durchgeführt und Expressionsänderungen von TET3 und TDG beobachtet werden. In zukünftigen Versuchen könnten andere TET-Enzyme mittels Vektoren überexprimiert oder 5-hmC abbauende Enzyme durch den Einsatz von si-RNAs ausgeschaltet werden.

## **Abstract**

The doctoral thesis investigates the influence of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), an epigenetic modification of the DNA-base Cytosine, on the formation and growth of Glioblastoma. Glioblastoma (GBM) is the one of the most malignant brain neoplasm. The mechanisms leading to GBM are not yet completely understood, but there is evidence that genetic and epigenetic factors are involved. Epigenetic describes modifications of the DNA which are not determined by the Base Sequence. Since 2010 5-hydroxymethylcytosine and the different enzymes, which are responsible for forming and degrading 5-hmC, are getting into the focus of epigenetic research. Current investigations have shown, that 5-hmC is involved in reactivating genes. Its purpose is largely unexplained yet. In this work 94 Glioblastoma samples were examined via immunohistochemistry, the 5-hmC amount was quantified and correlated to the time of survival of the patients. In different cell culture experiments the 5-hmC amount, the proliferation, the expression of enzymes, which are involved in the 5-hmC metabolism and the changes after incubation with different stressors were investigated. Therefore the cells were cultured with retinoic acid (RA), under starvation and under overexpression of TET3. The analysis of the histological study didn't show any significance between the concentration of 5-hmC and the overall survival of the patients. The incubation with RA showed ambiguous results. The incubation under starvation didn't show any significant changes of the concentration of 5-hmC or the expression of any enzymes. After reincubating the cells in standard medium the turnover of 5-hmC increased. The overexpression of TET3 was successful and showed an increase of TET-expression and of one of the 5-hmC degrading enzymes. The meaning of the histological results is not clear yet. It is possible that 5-hmC staining could be used as infiltration marker or as a prognostic marker in the future. Which interpretation is more likely, should be investigated in larger studies. The experimental conditions of the 5-hmC content in cell culture should be further optimized. Therefore, the duration of the experiments could be extended or the substances for incubation could be used in higher concentration. The experiment with Tet3 vector is promising. Overexpression was performed successfully and expression changes of TET3 and TDG have been observed. In the future, other TET enzymes could be overexpressed by vector or 5-hmC degrading enzymes could be switched off by incubation with si-RNAs.

# 1 Einleitung

## 1.1 Gehirntumore

Gehirntumore werden entsprechend der Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) in vier Grade eingeteilt. Die WHO ist eine Sonderorganisation der Vereinten Nationen und koordiniert das öffentliche, internationale Gesundheitswesen. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems stellt eine weltweit anerkannte Klassifizierung dar, die eine internationale Vergleichbarkeit neuropathologischer Befunde ermöglicht. Für die Einteilung berücksichtigt werden histologische, immunhistologische und seit 2016 ebenso genetische Merkmale.

Die Tumore werden anhand von histologischen Kriterien in WHO Grad I-IV eingeteilt, wobei mit steigendem WHO Grad die Proliferationsrate und der Grad der Malignität zunehmend und die Prognose der Patienten abnehmend ist. WHO-Grad I Tumore beschreiben histologisch gutartige Tumore mit geringer Proliferationsrate und guter Prognose. WHO Grad II Tumore sind histologisch gutartige Tumoren, die infiltrativ wachsen. Teilweise neigen sie zur Weiterentwicklung zu höhergradigen, maligneren Tumoren. WHO Grad III Tumore sind maligne Tumore, die auch histologische Merkmale der Malignität aufweisen, wie Kernatypien und Kernteilungsfiguren. WHO Grad IV Tumore sind hoch maligne Gehirntumoren, die histologisch charakterisiert sind durch hohe Teilungsraten, Nekrosen und Gefäßproliferationen. (Louis et al., 2007).

Bisher wurden für die Einteilung der Gehirntumore in erster Linie histologische und immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Mit der überarbeiteten Klassifikation von 2016 werden zusätzlich genetische Profile untersucht, um die Tumorentitäten zu definieren. Durch die Verwendung von phänotypischen und genotypischen Merkmalen wird die Zuordnung der Gehirntumore objektiver (Louis et al., 2016).

In früheren Klassifikationen wurden die neuroepithelialen Tumore in astrozytische, oligodendrogliale und oligoastrozytische Tumore etc. eingeteilt. In der aktuellen Klassifikation von 2016 werden die diffusen Gliome, die die diffusen astrozytischen und oligodendroglialen Tumore umfassen, in einer Gruppe zusammengefasst (Louis et al., 2016).

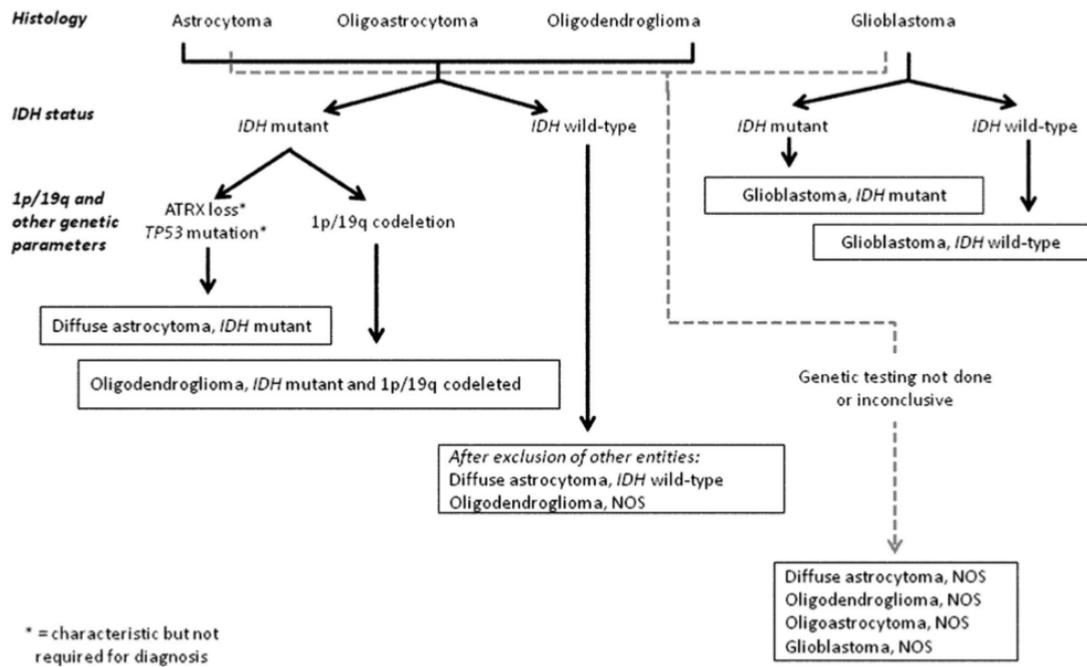
Die diffusen Gliome umfassen die WHO Grad II und III astrozytischen Tumore und die WHO Grad II und III Oligodendrogliome, sowie das WHO Grad IV Glioblastom. Die Astrozytome unterteilen sich in WHO Grad II diffuse Astrozytome und WHO Grad III anaplastische Astrozytome.

Um eine Zuteilung zu einer Entität vorzunehmen, werden nach der überarbeiteten Klassifikation zunächst histologische Differenzierungen in Astrozytom, Oligodendrogliom, Oligoastrozytom und Glioblastom vorgenommen. Die weitere Definierung folgt über das genetische Profil. Hier wird zunächst der Status der Isocitratdehydrogenase (IDH) untersucht und die Tumore unterteilt in IDH-Wildtyp oder IDH-Mutation. Die Einteilung zur IDH-Wildtyp-Gruppe erfolgt, wenn die Immunhistochemische Färbung auf die R132H IDH1 Mutation negativ ist und die Sequenzierung des IDH 1 Kodon 132 und IDH2 Kodon 172 ebenso negativ sind. Charakteristisch, aber nicht definierend, für die Astrozytome sind außerdem der Verlust des ATRX und eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53.

Oligodendrogliome werden nach Überprüfung des IDH-Status weiter untersucht auf den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p) und den Verlust des langen Arms von Chromosom 19 (19q) (LOH 1p/19q). Ein histologisch diffus infiltrierendes, langsam wachsendes Gliom mit einer IDH-Mutation und LOH 1p/19q definiert den Tumor als Oligodendrogliom (Louis et al., 2016).

Durch Hinzuziehen des genetischen Profils wird die Diagnostik genauer. Andererseits fallen durch die sehr genau definierten Tumorentitäten mehr Tumore auf, die nicht in eine der beschriebenen Gruppen passen, die so genannten NOS (not otherwise specified). Oft erfolgte die Zuteilung zur Gruppe der NOS durch unzureichende genetische Analysen. Einige Tumore können jedoch auch nach ausführlicher Untersuchung des genetischen Profils nicht einer Entität zugeordnet werden. Ein Beispiel hierfür ist das Oligoastrozytom, eine Tumorentität, die schon immer schwierig zu definieren war und eine hohe Uneinigkeit zwischen den verschiedenen Untersuchern zeigte (van den Bent et al., 2010). Werden genotypische und phänotypische Merkmale untersucht, passt fast jedes untersuchte „Oligoastrozytom“ entweder in die Gruppe der Astrozytome oder Oligodendrogliome (Sahm et al., 2014). Und so wurde die Diagnose des Oligoastrozytoms in der überarbeiteten WHO Klassifikation von 2016 zum NOS (Louis et al., 2016).

In uneindeutigen Fällen, in denen ein Tumorpräparat histologisch z.B. zu den Oligodendrogliomen zählt, genetisch allerdings das typische Mutationsmuster eines Astrozytoms aufweist, überwiegt die Genetik über der Histologie. Ersetzen kann die Genetik die histologischen Untersuchungen jedoch nicht. Zum einem wird durch die Histologie die Einteilung der WHO-Grade vorgenommen. Zum anderen gibt es Situationen in denen der vorliegende Tumor genetisch und histologisch nicht eindeutig in eine Kategorie passt (NOS) und hier eine histologische Bewertung erfolgen „muss“. (Louis et al., 2016).



**Abbildung 1:** Einteilung der diffusen Gliome nach der überarbeiteten WHO Klassifikation von 2016 (Louis et al., 2016)

### 1.1.1 Die Rolle der Isocitratdehydrogenase in der Entwicklung von Gliomen

In der Familie der IDH-Enzyme gibt es drei Isoformen: IDH1, IDH2 und IDH3. IDH1 ist im Zytoplasma und in den Peroxisomen lokalisiert und nimmt Teil am Lipidstoffwechsel. IDH2 und IDH3 befinden sich in den Mitochondrien und sind Mitglieder des Zitratzyklus. Von IDH3 wurden bisher noch keine Mutationen in Tumorzellen nachgewiesen (Ichimura et al., 2012).

Im Zitratzyklus ist IDH verantwortlich für die Oxidation von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ KG) unter Bildung von Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH). Neben ihren Stoffwechselfunktionen haben IDH1 und IDH2 auch Einfluss auf epigenetische Vorgänge. Das Produkt  $\alpha$ KG aktiviert Dioxygenasen, wie bspw. DNA-Methyltransferasen (DNMTs), Ten-Eleven-Translokasen (TET) und Histondemethylasen (Xu et al., 2011; Dang et al., 2017).

Mutationen von IDH-Enzymen wurden im Zusammenhang mit verschiedenen Tumoren beschrieben, unter anderem bei Grad II und -III Gliomen und sekundären Glioblastomen (Parsons et al., 2008; Yan et al., 2009). Bis zu 70% der WHO Grad II und -III Gliome verfügen über eine IDH-Mutation (Dang et al., 2017). Entsteht eine Mutation von IDH1 an der Aminosäure Arginin 132 (R132) oder bei der IDH2 am Arginin 172 (R172) wird das Arginin durch andere Aminosäuren ersetzt. (Yan et al., 2009; Dang et al., 2017). R132 bzw. R172 bilden das katalytische Zentrum der IDH-Enzyme. Wird Arginin durch Histidin an diesen Positionen ersetzt führt dies zur Konformationsänderung der Enzyme und zu einem erhöhten Risiko der Tumorentstehung (Dang et al., 2017). Das mutierte Enzym erhält eine neue Aktivität. Durch eine erhöhte Affinität für  $\alpha$ KG und NADPH, statt für Isocitrat, reduziert das Enzym  $\alpha$ KG weiter zu 2-Hydroxyglutarat (2HG) (Dang et al., 2009). Das mutierte IDH arbeitet jedoch nicht als Homodimer, sondern als Heterodimer bestehend aus einer mutierten Variante und einer Wildtyp-Variante. Diese beiden funktionieren unabhängig voneinander, wobei die mutierte Form die Wildtyp-Form partiell inhibiert. So entsteht insgesamt weniger  $\alpha$ KG und mehr 2HG (Pietrak et al., 2011).

Das Substrat der mutierten IDH1/2, 2HG, ist ein Onkometabolit, der unter anderem auch Einfluss auf die Onkogenese von Gliomen hat (Dang et al., 2009; Dang et al., 2017). Im Hinblick auf die Entstehung von Gliomen scheinen IDH-Mutationen die Rolle einer Driver-Mutation einzunehmen. Die Mutationen sind nicht nur sehr häufig nachweisbar, sie werden außerdem sehr früh in der Entstehung von Gliomen beobachtet und bestehen fort in der Entwicklung der Gliome (Dang et al., 2017). Dadurch, dass 2HG als Onkometabolit fungiert ist die IDH-Mutation am ehesten eine gain-of-function Mutation

(Dang et al., 2017).

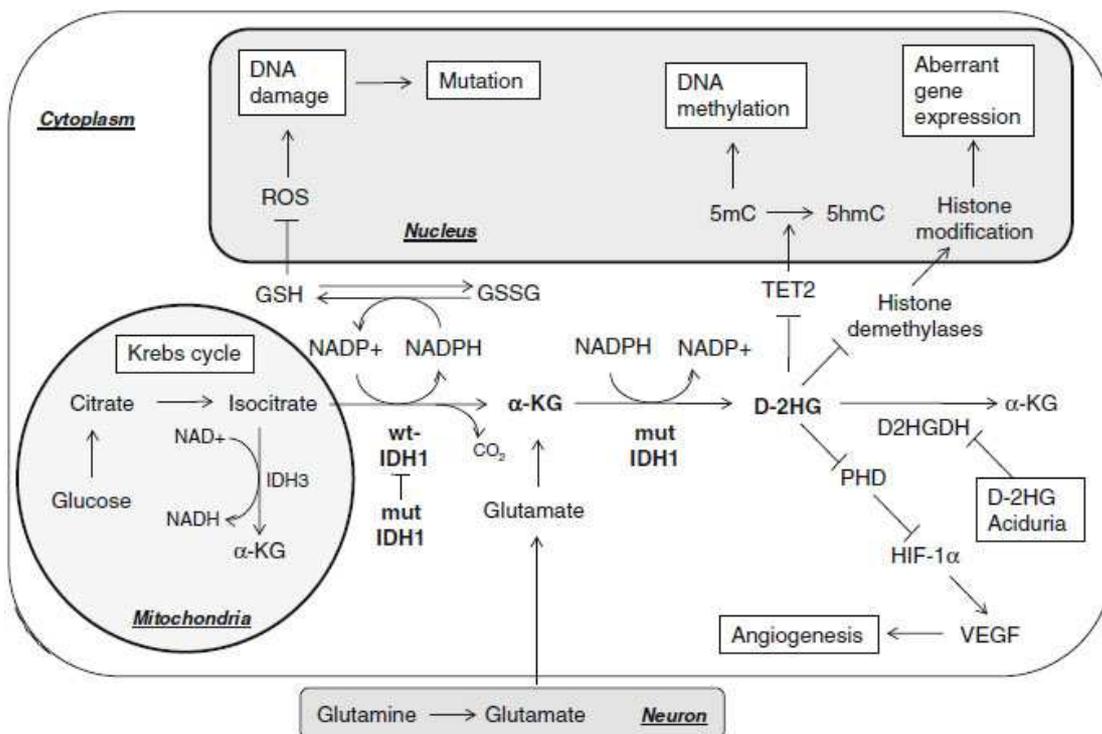
2HG ist ein kompetitiver Hemmer von Dioxygenasen und nimmt Einfluss auf die Angiogenese durch Hemmung der Prolylhydroxylase (PHD) und auch auf epigenetische Vorgänge.

PHD baut in der Zelle den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (Hypoxie induced factor 1 $\alpha$ ) ab. HIF-1 $\alpha$  reguliert die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel und aktiviert zudem den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF (Zhao et al., 2009). Wird PHD, physiologisch durch  $\alpha$ KG aktiviert, durch 2HG gehemmt, kommt es zu einer Anreicherung von HIF-1 $\alpha$ . VEGF und damit die Angiogenese werden aktiviert und das Tumorstadium wird gefördert (Ichimura et al., 2012). Williams et al. konnten allerdings zeigen, dass keine direkte Korrelation zwischen einer IDH-Mutation und erhöhter Expression von HIF1- $\alpha$  in Gliomen besteht (2011).

Auch im Kontext der epigenetischen Regulation besitzt 2HG eine hemmende Funktion. Die Epigenetik beschäftigt sich mit vererbaren Veränderungen der Genomfunktion, die nicht in der Basensequenz der DNA festgelegt sind. Wichtige Mechanismen der Epigenetik sind Histonmodifikationen und Methylierung der Base Cytosin zu 5-Methylcytosin. Ten-Eleven-Translokasen (TET), die die Oxidation von 5-Methylcytosin (5-mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) katalysieren zählen zu den Dioxygenasen und sind  $\alpha$ KG abhängig. Durch die Hemmung von TET durch 2HG wird die Hypermethylierung einiger Gene erreicht bzw. eine Demethylierung verhindert. Den Zusammenhang von IDH1/2-Mutationen in Gliomen und einer abnehmenden Demethylierung zeigten Xu et al. Sie beobachteten, dass bei IDH1/2 mutierten Gliomen eine signifikante Abnahme von 5-hmC, dem Produkt der TET- Enzyme, und ein erhöhtes Level an 5mC zu finden sind (2011). Diese Zusammenhänge konnten Kraus et al. 2012 in einer histologischen Studie bestätigen. Die Hemmung der TET-Enzyme verändert die Expression von Tumorkogenen und Tumorsuppressorgenen und hat somit Einfluss auf die Tumorentstehung. Die Hypermethylierung, die vor allem in Cytosin-Guanin Inseln (CpG-Inseln) auftritt, wurde von Nounmehr und Mitarbeitern bei verschiedenen Gliomen nachgewiesen und als ein Gliom-CpG-Insel Methylierungsphänotyp (G-CIMP) benannt. Die Arbeitsgruppe stellte außerdem fest, dass Gliome, die ein G-CIMP vorweisen mit IDH-Mutationen assoziiert sind und ein besseres klinisches Ergebnis vorweisen (Malta et al., 2017). Die Mutation der IDH und die zunehmende Bildung von 2HG führt zur Hemmung von TET2 und anschließend zur Entstehung der G-CIMP (Gusyatiner et al., 2017).

Durch eine IDH-Mutation ist allerdings nicht nur die Methylierung der CpGs betroffen, sondern auch Histonmodifikationen. Histondemethylasen sind ebenfalls  $\alpha$ KG abhängig, was zu einer erhöhten Histonmethylierung führt. Die Folge ist eine Inaktivierung von Genen (Xu et al., 2011). Lu et al zeigten, dass in Gliomen mit IDH-Mutation Histonmethylierungsmarker ansteigen (2012).

Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen Tumorgenese und DNA-Schädigung durch erhöhten oxidativen Stress, der durch IDH-Mutationen ausgelöst wird. Im oxidativen Stress der Zelle entstehen Sauerstoffradikale (Reaktive Sauerstoffspezies, ROS). Im physiologischen Zustand der Zelle werden diese Radikale durch Antioxidantien inaktiviert. Zu den Antioxidantien zählt das Glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH). Bei der Inaktivierung von ROS wird GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert. Für die Reduktion von GSSG zu GSH wird NADPH benötigt. Die Hauptproduzenten von NADPH in der Zelle sind IDH1 und IDH2. Ist IDH1/2 mutiert, kann die Oxidation von Isocitrat zu 2OG, bei der NADPH gebildet wird, nicht mehr katalysiert werden. Es wird weniger NADPH gebildet. Hinzu kommt, dass die mutierten IDH1/2 Enzyme für die Reduktion von 2OG zu 2HG NADPH verbrauchen (Ichimura et al., 2012). Eine IDH-Mutation hat also zur Folge, dass ROS nicht mehr abgebaut werden, der oxidative Stress der Zelle steigt und DNA-Schäden entstehen (Dang et al., 2017).



**Abbildung 2:** Zusammenfassung der Effekte des mutierten IDH1/2 auf den Stoffwechsel der Zelle (Ichimura et al., 2012)

### 1.1.2 Glioblastoma multiforme

Glioblastome sind die häufigsten malignen Gehirntumore mit einer Inzidenz von 3,19/100.000 Betroffenen pro Jahr und einer sehr schlechten Prognose mit einem 5-Jahresüberleben von 4-5% und einem 2-Jahresüberleben von 26-33% (Batash et al., 2017).

In den früheren WHO-Klassifikationen wurde unterschieden zwischen primären und sekundären Glioblastomen. In der überarbeiteten Klassifikation von 2016 werden die Glioblastome nach ihrem IDH-Status in IDH-Wildtyp und IDH-Mutation unterteilt (Louis et al., 2016). In 90% der Fälle handelt es sich um IDH-Wildtyp Glioblastome, die in der Regel mit dem klinisch definierten primären Glioblastom assoziiert sind und sich *de novo* entwickeln. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 62 Jahre und das mediane Überleben nach Diagnosestellung 9 Monate (Kleihues et al., 2013; Louis et al., 2016).

Glioblastome mit IDH-Mutation entwickeln sich aus dem diffusen- oder anaplastischen Astrozytom und werden somit auch als sekundäre Glioblastome bezeichnet. Sie werden gehäuft bei jüngeren Patienten beobachtet mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 44 Jahren und zeigen ein medianes Überleben von 24 Monaten nach Diagnosestellung (Ohgaki et al., 2007; Ohgaki et al., 2013; Louis et al., 2016).

Nicht nur in Bezug auf den IDH-Status unterscheiden sich die primären und sekundären Glioblastome. Primäre Glioblastome weisen in 35% der Fälle Überexpressionen des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (epidermal growth factor receptor, EGFR), in 24% der Fälle die Inaktivierung des Phosphatase-und-Tensin-Homolog-Gens (PTEN-Gen) und in 72% der Fälle eine Mutation des TERT-Promotors (Telomerase Reverse Transkriptase Promotor) auf. Der EGF-Rezeptor wird durch die Bindung von EGF aktiviert. Folge der Aktivierung ist die Zellproliferation und ein erhöhtes Zellüberleben durch Unterdrücken der Apoptose. Das PTEN-Gen reguliert die Zellmigration und kann auch als Tumorsuppressor aktiv sein. Diese beiden Mutationen werden in sekundären Glioblastomen nur in Ausnahmefällen detektiert (Kleihues et al., 2013; Louis et al., 2016; Batash et al., 2017).

Sekundäre Glioblastome tragen in 81% der Fälle eine Mutation des Tumorsuppressorgens P53 und in 71% der Fälle eine ATRX-Mutation (Alpha Thalassämie/ Retardierungssyndrom X-gebunden). Diese Mutationen sind ebenso charakteristisch für Astrozytome und finden sich in primären Glioblastomen nur sehr selten (Kleihues et al., 2013; Louis et al., 2016; Batash et al., 2017).

Die unterschiedlichen genetischen Profile, der IDH-Status, das unterschiedliche Erkrankungsalter und das durchschnittliche Überleben der primären und sekundären

Glioblastome lässt vermuten, dass es sich um unterschiedliche Tumorentitäten mit verschiedenen Ursprungszellen handelt (Kleihues et al., 2013).

Zusätzlich zu den genetischen Mutationen unterscheiden sich die primären und sekundären Glioblastome in der Methylierung von Promotern verschiedener Gene. Eine wichtige epigenetische Mutation ist die Hypermethylierung des O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA Methyltransferase(MGMT)-Promotors. MGMT erkennt die O<sup>6</sup>-Methylierung von Guanin. O<sup>6</sup>-Methylguanin wird wie Adenin gelesen, was zu G→A Mutationen führt. MGMT erkennt O<sup>6</sup>-Methylguanin und entfernt es. Bei einer Hypermethylierung des Promotors ist das MGMT codierende Gen inaktiv (Esteller et al., 2007). Therapeutische Bedeutung gewinnt diese Mutation bei der Behandlung von Glioblastomen mit chemotherapeutischen Medikamenten, wie Temozolomid. Temozolomid alkyliert die DNA. Die Folge ist eine Apoptose der Zelle. Ist das MGMT-Gen methyliert, ist die Expression reduziert, das Protein kann die Alkylgruppen nicht entfernen und die Zelle geht in die Apoptose. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen MGMT-Hypermethylierung und der Wirksamkeit von Chemotherapie wurde nachgewiesen von Hegi et al. (2005). Eine Metaanalyse verschiedener klinischer Studien von Binabaj et al. konnte zeigen, dass Patienten mit MGMT-Promoter-Methylierungen eine bessere Prognose mit längerem Überleben haben (Malta et al., 2017; Binabaj et al., 2018). Eine MGMT-Promoter-Methylierung findet sich bei ungefähr 40% der primären Glioblastome (Batash et al., 2017).

Glioblastome weisen eine hohe Heterogenität in ihrem genetischen und epigenetischen Profil auf, was eine wirksame Therapie erschwert. Diese Heterogenität entsteht zum einen durch Variierung der Kombination der verschiedenen genetischen und epigenetischen Aberrationen. Zum anderen ist unklar, welche Zellen den Ursprung der Tumorzellen darstellen (Jiang et al., Uhrbom et al., 2012). Vor der Entdeckung von adulten neuronalen Stammzellen (Neural Stem Cells, NSCs) im Gehirn, wurde angenommen, dass Astrozyten die Ursprungszellen der Tumoren sind, da sie zu dem Zeitpunkt die einzigen teilungsfähigen Zellen des Gehirns darstellten. Diese Hypothese wurde dadurch bekräftigt, dass Gliomzellen den astrozytären Marker GFAP exprimieren (Jones et al., 1981). Andere mögliche Ursprungszellen von Gliomen sind Gliazellen oder NSCs. Diese Hypothesen stützen sich auf den Befund, dass einige Gliomzellen gliale Marker exprimieren. Andere Gliomzellen weisen ähnliche Eigenschaften wie NSCs auf, wie z.B. die Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit oder die Expression von NSC-Markern. Aus den NSCs entwickeln sich Gliomstammzellen oder Gliom initiiierende Zellen (gliom initiating cells, GICs). Diese Zellen fördern das Tumorstadium und sind

resistent gegen Bestrahlung und gegen Chemotherapie (Jiang et al., Uhrbohm et al., 2012).

## **1.2 Epigenetik**

Epigenetik ist das Studium von mitotisch und / oder meiotisch vererbaren Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können (Felsenfeld, 2014).

Als Mitose wird die gewöhnliche Zellteilung eukaryotischer Zellen bezeichnet. Sie dient zum Wachstum und zur Erneuerung von Gewebe. Dabei teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, die beide genetisch identisch mit der Mutterzelle sind. Die Meiose, auch Reifeteilung, ist eine spezielle Form der Zellteilung. Sie findet nur bei der Bildung der Keimzellen statt und sorgt dafür, dass nach der Teilung jeder Tochterzelle nur ein homologer Partner des Chromosoms zugewiesen wird. So kann nach der Befruchtung wieder ein kompletter Chromosomensatz und kein doppelter entstehen.

Jeder vielzellige Organismus beginnt mit der befruchteten Eizelle, der Zygote. Zu Beginn der Embryogenese sind die Zellen pluripotent. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen werden, je nach Gewebetyp, Gene deaktiviert, die für die physiologische Funktion nicht gebraucht werden. So erhält jedes Gewebe sein eigenes Expressionsmuster. Die Inaktivierung von Genen beeinflusst nicht die DNA-Sequenz. Sie entsteht auf einer Ebene oberhalb der reinen Genetik und wird als Epigenetik bezeichnet (epi= altgr. für „dazu“ oder „außerdem“ und Genetik). Bereiche der Epigenetik sind bspw. DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und micro-RNAs. Ein neuer Mitspieler, der erst 2009 zum ersten Mal von Kriaucionis und Heintz im Gehirn nachgewiesen wurde, ist die Hydroxymethylierung (2009).

Die verschiedenen Mechanismen der Epigenetik sind miteinander verknüpft, können sich gegenseitig unterstützen und müssen über die Zellteilung gewahrt werden, um die zelluläre Identität zu bewahren. Sie beeinflussen wichtige zelluläre Prozesse, wie Genexpression, DNA-Protein-Interaktionen, Zelldifferenzierung, Embryogenese und X-Chromosom Inaktivierung. Die Histonmodifikation, DNA-Methylierung und DNA-Hydroxymethylierung als zentrale Mechanismen der Epigenetik werden im Folgenden detaillierter dargestellt (Felsenfeld, 2014).

### **1.2.1 Histonmodifikationen**

Die DNA liegt im Zellkern in Form des Chromatins vor. Chromatin ist die Struktur aus DNA und gebundenen Proteinen, unter anderem Histonproteine. Mikroskopisch lässt sich Hetero- von Euchromatin unterscheiden. Heterochromatin ist die inaktive Form der DNA. Es ist dichter gepackt und die Gene können nicht von Transkriptionsenzymen erkannt und abgelesen werden. Das Euchromatin stellt die aktive Form der DNA dar. Es ist lockerer angeordnet und dem Transkriptionsapparat zugänglich (Müller et al., 2015).

Für die Verpackung der DNA zum Chromatin wird sie mit Hilfe von Histonproteinen aufgerollt. Es gibt vier verschiedene Histonproteine (H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> und H<sub>4</sub>). Sie bilden zusammen ein Nukleosom, in dem jedes Protein in zweifacher Ausführung vorkommt (Müller et al., 2015). Um die Nukleosomen wickelt sich die DNA. Die Histone können durch Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung modifiziert werden. Die Modifikationen finden an der Aminosäure Lysin statt (Felsenfeld, 2014). Eine Methylierung führt zu einer dichteren Verpackung und Inaktivierung der Gene (Gusyatiner et al., 2017). Lysin kann einfach, zweifach oder dreifach methyliert sein (Müller et al., 2015). Die Histonmodifikationen sind allerdings nicht stabil über die Zellteilung und verschwinden nach einigen Zellteilungen wieder (Deichmann et al., 2016).

### **1.2.2 Micro-RNAs**

Das menschliche Genom besteht aus codierenden Bereichen, die ungefähr 2% ausmachen und dem größeren Bereich der nicht-codierenden Sequenzen (Esteller et al., 2011). Bei Transkription der nicht-codierenden Gene entstehen nicht-codierende RNA-Stränge. Zu diesen zählen unter anderem die kleinen nicht-codierenden RNAs (small non-coding RNA, nc-RNA), die so genannten micro-RNAs (Esteller et al., 2011). Micro-RNAs kontrollieren die Translation von mRNAs und nehmen so post-transkriptionell Einfluss auf die Inaktivierung von Genen. Sie binden an das 3'UTR (untranslatierte Region am 3'Ende der mRNA) der Ziel-mRNA und verhindern so die Translation (He et al., 2004). Micro-RNAs nehmen teil an der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose von Zellen (Esteller et al., 2011).

In Tumoren verändert sich das Expressionsprofil der micro-RNAs. Sie können als Tumorsuppressorgene oder als Onkogene fungieren und haben einen relevanten Anteil an der Tumorentwicklung (Esquela-Kerscher et al., 2006; Esteller et al., 2011). Die falsche Regulierung von micro-RNAs kommt wahrscheinlich durch epigenetische

Veränderungen, wie z.B. Hypermethylierung von Promotoren, zustande (Davalos et al., 2012).

Im Gehirn findet man das größte Spektrum an exprimierten micro-RNAs. Sie nehmen Teil an der neurologischen Entwicklung und eine Dysregulation wird bei fast allen neurologischen Erkrankungen beobachtet (Cao et al., 2006; Esteller et al., 2011). Außerdem wurde beschrieben, dass micro-RNAs mitverantwortlich sind für die Entwicklung und Metastasierung von Gliomen und für die Erhaltung von Gliom-Stammzellen (GSC) (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2014).

### **1.2.3 Methylierung**

Die physiologische Methylierung der DNA betrifft ausschließlich die Base Cytosin. Hierbei wird an dem fünften Kohlenstoff des Cytosins eine Methylgruppe (CH<sub>3</sub>) angehängt. Es entsteht 5-Methylcytosin (5-mC). Diese Reaktion wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert (Malta, 2017). In Säugern werden insbesondere dort Cytosine methyliert, wo sie in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CG-Dinukleotide) vorkommen. Annähernd 70-80% der CG-Dinukleotide sind methyliert (Kohli et al., 2013). Da bei der Basenpaarung der beiden DNA-Stränge ein Cytosin ausschließlich mit einem Guanin eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen kann, liegen sich stets CG- und GC-Dinukleotide gegenüber. In der Regel sind entweder beide Cytosine methyliert oder nicht. Die CG-Dinukleotide kommen im Genom selten vor. Es gibt allerdings bestimmte Regionen, wo eine erhöhte Dichte an CG-Dinukleotiden auftritt, die so genannten CpG-Inseln (Malta et al., 2017). CpG bedeutet Cytosin-phosphatidyl-Guanin.

CpG-Inseln finden sich vor allem am 5' Ende von Genen, an Promotorregionen von regulatorischen Genen, Housekeeper-Genen, gewebespezifischen Genen und Gene der Entwicklung (Malta et al., 2017). 60-70% aller Promotorregionen enthalten CpG-Inseln. Studien über die Genomweite Verteilung von 5-mC haben ergeben, dass CpG-Inseln oft keine Methylierung tragen (Li et al., 2010; Deichmann et al., 2016; Malta et al., 2017). In Tumoren sind CpG-Inseln im Vergleich zu normalen Zellen oft hypermethyliert, was zu einer Inaktivierung der betroffenen Gene führt (Egger et al., 2004).

Eine Isoform der DNMT-Enzyme, DNMT1, sorgt zusammen mit einem Cofaktor dafür, dass die 5-mC-Muster über die Zellteilung weitergegeben werden (Bostick et al., 2007). So führt die DNA-Methylierung zu einer langanhaltenden Veränderung in der Genexpression.

Die Methylierung selbst schaltet Gene nicht ab, da es kein aktiver Hemmer der Genexpression ist, allerdings erhält es eine permanente Inaktivierung von Genen

(Deichmann et al., 2016). Die Inaktivierung spezifischer DNA-Bereiche schützt und stabilisiert die DNA und ist nötig für die Differenzierung von Zellen. Sie entsteht durch eine Konformationsänderung der DNA nach der Methylierung von Cytosin. Die DNA besteht aus zwei komplementären Doppelsträngen, die sich um einander winden und durch Basenpaarung verbunden sind. Durch die Windungen verbleiben seitlich Lücken. Es entsteht eine große und eine kleine Furche in denen die Basen direkt an der Oberfläche liegen. In der großen Furche können Cytosine methyliert werden. In diesem Bereich befinden sich auch die Bindungsstellen anderer Proteine, die z.B. zum Transkriptionsapparat gehören. Durch die Methylgruppen werden dieser Bereich und die Bindungsstellen der anderen Proteine blockiert. Der betroffene DNA-Abschnitt kann nicht mehr transkribiert werden. Die Inaktivierung wird unterstützt durch Methylbindende-Proteine, wie z.B. das Methyl-CpG-bindende-Protein (MeCP2) (Bogdanovic et al., 2009). MeCP2 rekrutiert außerdem Histon-modifizierende Enzyme, wie z.B. Histonmethyltransferasen. Durch Methylierung der Histonproteine wird der DNA-Abschnitt dichter verpackt und die Repression der Genexpression noch verstärkt (Gusyatiner et al., 2017). Tachibana et al. beobachteten, dass auch Histon-modifizierende Enzyme die Cytosinmethylierung beeinflussen. Histon-Methyltransferasen (HMT) rekrutieren DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und unterstützen so eine *de novo* Methylierung (Tachibana et al., 2008). Außerdem wurde beobachtet, dass IDH-Mutationen zu einer vermehrter Methylierung von Histonen führt (Malta et al., 2017).

Die DNA-Methylierung dient dem Organismus zunächst als Schutzfunktion. Bei Bakterien wird fremde DNA von Restriktionsenzymen erkannt und entfernt. Die fremde DNA, wie z.B. Viren-DNA, trägt ein anderes Methylierungsmuster als die eigene DNA. Das abweichende Muster wird von den Restriktionsenzymen als fremd erkannt und ausgeschnitten. Auch beim Menschen gibt es die Methylierung als Schutzfunktion. 90 % der methylierten CG-Dinukleotide betreffen die sogenannten intragenischen Regionen (intragenic regions, Introns) (Goll et al., 2005). Introns sind nicht-kodierende Bereiche der DNA. Sie werden zwar transkribiert, jedoch aus der prä-mRNA herausgeschnitten, bevor die reife mRNA zur Translation aus dem Zellkern ausgeschleust wird. Die reife mRNA besteht nur noch aus Exons, kodierenden Bereichen. Die Methylierung von Introns dient zur Stabilisierung der DNA und der Abwehr gegen Fremd-DNA (Weber et al., 2007). Methylierung innerhalb des Genkörpers tritt oft in stark exprimierten Genen auf. Es wird angenommen, dass die Methylierung in diesen Bereichen Einfluss hat auf das RNA-Spleißen und die zeitliche Koordination der Replikation (Aran et al., 2010).

Neben der Inaktivierung von Parasiten-DNA und mobilen Segmenten im eigenen Genom, sorgt die Methylierung auch für die Differenzierung von Zellen. Jede Zelle des Körpers verfügt über die gleiche DNA-Sequenz. Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen entstehen durch verschiedene Methylierungsmuster, die der jeweils spezifischen Funktion der Zelle entsprechen. Jeder Zelltyp beansprucht zur Ausübung seiner Funktion nur einen bestimmten Pool an Genen. Die restlichen Gene, die nicht benötigt werden, sind ausgeschaltet. Die Methylgruppen verstärken die Inaktivierungen und erhalten sie über die Zellteilungen hinaus aufrecht. Der Grad der Methylierung ist daher bei den Genen, die eine Zelle nicht benötigt, besonders hoch. Die Methylierung stellt eine Informationsebene dar, die der DNA-Sequenz nachgeordnet ist. Sie enthält keine Informationen über den Bauplan von Proteinen, sondern kontrolliert, ob die codierten Proteine überhaupt synthetisiert werden (Kegel et al., 2009).

Es wird vermutet, dass die epigenetischen Modifikationen in der DNA-Sequenz vorgegeben sind. In einer Studie von Lienert et al. wurden DNA-Fragmente in die inerte genomische Sequenz von Maus-Stammzellen eingebaut. Die integrierte DNA nahm das gleiche Methylierungsmuster auf, wie die endogene Sequenz (2011).

### **1.2.3.1 DNA-Methyltransferasen**

Die DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysieren die Bindung zwischen einer Methylgruppe ( $\text{CH}_3$ ) und dem 5. Kohlenstoff einer Cytosin-Base. Es wird eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf Cytosin übertragen (Pang et al., 2016). Die Familie der DNMTs beinhaltet drei verschiedene Isoenzyme, DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Sie besitzen alle die gleiche katalytische Untereinheit, unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität. DNMT1 bewahrt die Methylierungsmuster bei der Zellteilung. Als Substrat dient ihr die hemimethylierte DNA (Gusyatiner et al., 2017). Hemimethyliert bedeutet, dass der Ursprungsstrang methyliert ist und der neu synthetisierte Strang noch nicht. Da die Stränge komplementär sind und die CG-Bereiche palindromisch angeordnet sind, ist es für DNMT1 möglich die methylierten Bereiche des alten Stranges zu erkennen und dieses Muster auf den neuen Strang zu übertragen. Hemimethylierte CG-Dinukleotide machen die DNA angreifbar für die katalytische Domäne des Enzyms. Unmethylierte Cytosine hingegen werden durch eine autoinhibitorische Konformationsänderung geschützt. DNMT1 interagiert in der S-Phase mit dem Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) (Auclair et al., 2012). Ein weiterer Kofaktor ist UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) (Bostick et al., 2007). Diese beiden Faktoren erkennen und binden an hemimethylierte DNA und rekrutieren DNMT1 (Wu et al., 2017).

DNMT3A und DNMT3B sind zuständig für die *de novo* Methylierung während der embryonalen Entwicklung (Gusyatiner et al., 2017). DNMT3B wirkt während der frühen Entwicklung des Embryos und sorgt für Methylierung der DNA während der Implantation. DNMT3A wird in späteren Entwicklungsstadien exprimiert und sorgt für das Methylierungsmuster der reifenden Gameten. Murine Knock-out-Modelle haben gezeigt, dass *Dnmt3b*<sup>-/-</sup> Mäuse in frühen embryonalen Entwicklungsstadien sterben und *Dnmt3a*<sup>-/-</sup> Mäuse während der ersten vier Wochen nach Geburt. Es wird angenommen, dass beide DNMT3 auch bei der Wartung der DNA-Methylierung während der Zellteilung eine Rolle spielen und solche Bereiche methylieren, die von DNMT1 versehentlich ausgelassen wurden. Ein anderes Protein, DNMT3L, ist verwandt mit DNMT3A und B, verfügt jedoch nicht über eine katalytische Domäne. Es dient DNMT3A und B als Kofaktor, stimuliert die *de novo* Methylierung und fördert die Bindung der DNMT3 an das Chromatin (Auclair et al., 2012).

### **1.2.3.2 5-Methylcytosin in der Tumorgenese**

Der DNA-Methylierung scheint auch bei der Tumorgenese eine Bedeutung zukommen, da viele Tumorzellen aberrante Methylierungsmuster vorweisen. Es treten globale Hypomethylierungen auf, die zu genomischer Instabilität führen und Hypermethylierung an CpG-Inseln im Promotorbereich, die zur Stilllegung von Genen führen (Malta et al., 2017).

Viele der inaktivierten Gene sind im normalen Gewebe und in embryonalen Stammzellen Zielgene der so genannten Polycomp-Protein-Gruppe. Der Polycomp-Komplex besitzt Histon-Methyltransferaseaktivität und legt die entsprechenden Gene nach Methylierung der Histone still (Widschwendter et al., 2007). Diese Gene werden auch im gesunden Gewebe nicht oder nur in geringem Maße exprimiert, da sie durch Histonmethylierung inaktiviert sind (Pfeifer et al., 2014). Eine Methylierung der Gene führt somit nicht zu einer grundlegenden Herabregulierung (Sproul et al., 2013). Ferner wird indes angenommen, dass durch die Methylierung eine permanentere und irreversible Inaktivierung erzeugt wird (Pfeifer et al., 2014). Zurzeit wird erwägt, dass die Inaktivierung von diesen Genen, die für Differenzierungsvorgänge verantwortlich sind, die Tumorzellen in einem undifferenzierten Status hält und DNA-Hypermethylierung so die zelluläre Plastizität senkt (Nejman et al., 2014; Pfeifer et al., 2014). Zu den inaktivierten Genen zählen vor allem auch Tumorsuppressorgene oder solche, die Proteine des Zellzyklus und der Apoptose kodieren (Jones et al., 2007; Malta et al., 2017).

Wie die Hypermethylierung zustande kommt ist bis jetzt nicht geklärt. Zwar wurde eine Überexpression von DNMT in Tumorzellen beobachtet. Dies kann jedoch daran liegen, dass die Zellteilungsrate in Tumoren generell steigt. Außerdem würde dieser Ansatz nicht erklären, warum einige CpG-Inseln hypermethyliert werden und andere nicht (Pfeifer et al., 2014).

Ungewöhnlich hohe Konzentrationen von DNA-Methylierung in CpG-Bereichen fanden Noushmehr et al. in einer Studie an 272 Glioblastompräparaten. Sie bezeichneten diese Entdeckung als Gliom-CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (G-CIMP) (2010; Malta et al., 2017). Sie stellten außerdem fest, dass Patienten mit G-CIMP Gliomen jünger waren, ein besseres klinisches Langzeitergebnis hatten und IDH-Mutationen trugen (Noushmehr et al., 2010; Malta et al., 2017). In Glioblastomen wurde der G-CIMP insbesondere bei sekundären Glioblastomen bzw. IDH-mutierten Glioblastomen festgestellt. Zudem wurde ein Zusammenhang gesehen zwischen MGMT-Promoter-Methylierungen, die mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sind, IDH-Mutation und G-CIMP (Malta et al., 2017). Malta et al. konnten weiter zeigen, dass Gliome mit G-CIMP in G-CIMP high und -low unterteilt werden können und Gliome mit prozentual mehr G-CIMP eine bessere Prognose aufweisen (2017).

#### **1.2.4 Hydroxymethylierung**

Hydroxymethyliertes Cytosin (5-hmC) wurde im menschlichen Gehirn zum ersten Mal von Kriaucionis et al. festgestellt (2009). Die Enzyme, Ten-Eleven-Translokasen (TET), die 5-hmC bilden, wurden erstmals von Tahiliani beschrieben (2009). Die Funktion von 5-hmC ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Es ist noch nicht sicher, ob 5-hmC lediglich ein Zwischenprodukt der passiven oder aktiven DNA-Demethylierung ist (Pang et al., 2016) oder eine eigene epigenetische Bedeutung besitzt. Bekannt ist lediglich, wie es gebildet wird und dass es im menschlichen Gewebe in unterschiedlichen Konzentrationen verteilt ist.

In adulten Gewebe liegt die Konzentration von 5-mC bei 4-5% aller Cytosine und ist damit relativ konstant. Im Gegensatz dazu variiert das 5-hmC-Level je nach Gewebetyp zwischen 0,1% und 0,7% der Cytosine. In jedem Gewebe ist 5-hmC vorhanden, mit der höchsten Konzentration im Nervensystem, gefolgt von Muskeln, Herz und Lungen. Die geringsten Konzentrationen an 5-hmC finden sich mit 0,03- 0,06% in Leber, Milz und den endokrinen Drüsen (Globisch et al., 2010). Selbst innerhalb des Gehirns variieren die 5-hmC-Konzentrationen. 5-hmC ist im Kortex höher konzentriert als in der weißen Substanz und ebenso im Kleinhirn und Hippocampus finden sich höhere

Konzentrationen (Kraus et al., 2012; Pang et al., 2016). In der Hypophyse liegen sehr geringe Mengen vor. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass ein hoher 5-hmC-Gehalt mit der neuronalen Funktion des Gewebes und nicht mit der Lokalisation im Gehirn korreliert (Globisch et al., 2010).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der 5-hmC-Gehalt bei Gliomen stark abnimmt und dass der 5-hmC-Gehalt mit steigender Malignität des Tumors sinkt (Kraus et al., 2012; Orr et al., 2012). Jin et al. stellten eine Abnahme der 5-hmC-Konzentration bei Gehirntumoren um das 30-fache fest. Sie konnten auch nachweisen, dass ein Zusammenhang zwischen 5-hmC-Reduktion und steigender Proliferationsrate besteht (2011). Stark proliferierende Tumore verlieren ihr 5-hmC demnach wahrscheinlich während der Zellteilung. Haffner et al. konnten auch in anderen Geweben zeigen, dass der 5-hmC-Gehalt des Tumorpräparats im Vergleich zum normalen Gewebe stark sinkt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der 5-hmC-Gehalt in hierarchisch aufgebauten Geweben, wie Haut und Kolon, in Richtung Oberfläche/Lumen mit dem Differenzierungsgrad der Zellen zunimmt. Auch hämatopoetische Stammzellen enthalten weniger 5-hmC als die ausdifferenzierten Zellen (2011). Der Umstand, dass Tumorzellen, genau wie Stammzellen, weniger 5-hmC enthalten, mag daran liegen, dass Tumorzellen Stammzell-ähnliche Funktionen, wie z.B. die Fähigkeit der Selbsterneuerung, annehmen. Neben der Abnahme von 5-hmC wird nur eine geringe Abnahme der 5-mC-Konzentration beobachtet.

#### **1.2.4.1 Ten-Eleven-Translokase (TET)**

Hydroxymethylierung des Cytosins entsteht bei der Oxidierung von 5-mC durch die Ten-Eleven-Translokation (TET) Enzymfamilie. Die Familie der TET-Enzyme wurde zuerst im Zusammenhang mit einer speziellen Form der akuten Leukämie, der MLL (myeloid/lymphoid oder mixed lineage Leukämie), beschrieben (Ono et al., 2002). Bei dieser Leukämie fusioniert das MLL-Gen, welches auf Chromosom 11 liegt durch Translokation mit verschiedenen Genen (Meyer et al., 2009). Unter diesen Fusionsgenen befindet sich auch das LCX (Leukämie-assoziiertes Protein mit CXXC-Domäne) auf Chromosom 10, oder auch TET (Ten-Eleven-Translokation) Enzym (Ono et al., 2002; Lorsbach et al., 2003). Von den TET-Enzymen gibt es drei Isoformen, TET1, 2 und 3. Sie sind alle zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung aktiv.

Die TET-Proteine gehören zu den  $\alpha$ KG-abhängigen Dioxingenasen. TET1 und TET3 verfügen über eine DNA-Bindedomäne, den CXXC-Zinkfinger (Koivunen et al., 2017). Auch andere Enzyme, die am 5-mC-Stoffwechsel beteiligt sind, besitzen diese

Bindedomäne. Die Domäne der TET-Enzyme unterscheidet sich allerdings ein wenig von der der anderen Proteine. Dieser kleine Unterschied ermöglicht es TET1 und TET3 unmethylierte und methylierte Bereiche der DNA zu erkennen und dort zu binden. An ihrem C-terminalen Ende besitzen sie eine katalytische Untereinheit mit 5'-Hydroxylase Aktivität. TET oxidieren nicht nur 5-mC zu 5-hmC, sondern können 5-hmC weiter oxidieren zu 5-Formylcytosin (5-fC) oder 5-Carboxylcytosin (5-caC) (Ito et al., 2011; Pang et al., 2016; Koivunen et al. 2017). 5-fC und 5-caC sind ebenfalls Intermediärprodukte der DNA-Demethylierung.

TET3 ist vor allem zuständig für die schnelle Demethylierung des paternalen Vorkerns vor der Verschmelzung der beiden Vorkerne. Es befindet sich in Oozyten und Zygoten (Gu et al., 2011). TET2 ist vor allem in hämatopoetischen Zellen vertreten. TET1 ist überwiegend in der frühen embryologischen Entwicklung aktiv, wenn sich der Embryo noch im pluripotenten Stadium befindet (Auclair et al., 2012).

Überexpression der TET-Enzyme im Mausmodell hat gezeigt, dass nicht nur 5-hmC angereichert wird, sondern auch eine DNA-Demethylierung passiert und damit eine Reaktivierung der Gene stattfindet (Zhang et al., 2010).

Da TET-Proteine  $\alpha$ -KG abhängig sind und  $\alpha$ -KG ein Intermediär des Zitratzyklusses ist, besteht die Möglichkeit, dass TET-Proteine metabolische Veränderungen wahrnehmen können und eine Rolle in der Adaption der Zelle an sich ändernde Bedingungen einnehmen (Wang et al., 2011).

#### **1.2.4.2 Passive und aktive Demethylierung**

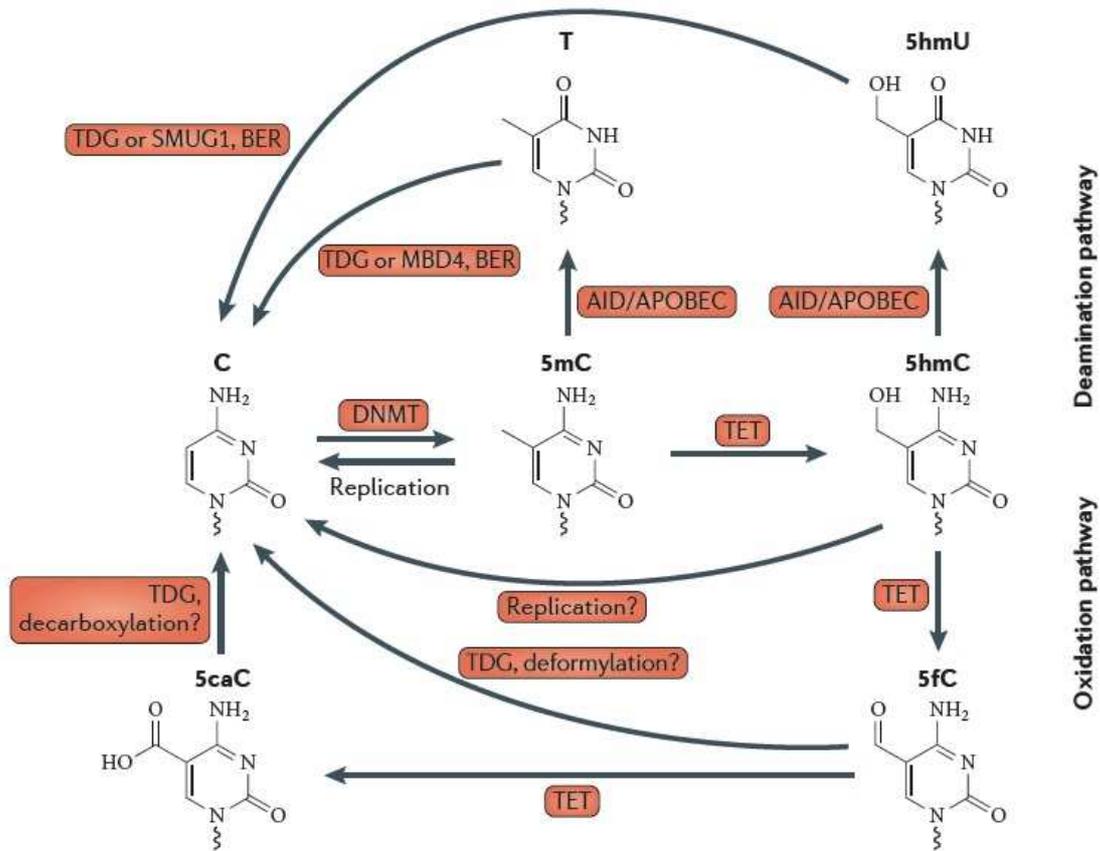
Passive Demethylierung geschieht während der Replikation, wenn 5-hmC in CG-Dinukleotiden die Bindung von DNMT1 verhindert und die Cytosine des neu synthetisierten Stranges nicht methyliert werden können. DNMT1 hat eine geringere Affinität zu 5-hmC und zu seinen Oxidationsprodukten 5-caC und 5-fC. Es erkennt diese nicht und kann das betroffene Cytosin des neu synthetisierten Stranges während der Zellteilung nicht methylieren (Pang et al., 2016).

Eine wichtige Rolle in der aktiven Demethylierung spielen die TET-Enzyme, die im ersten Schritt 5-mC zu 5-hmC hydroxylieren (Pang et al., 2016). 5-hmC kann nun auf zwei Wegen weiter abgebaut werden. Entweder entsteht unter Abspaltung der Aminogruppe am ersten C-Atom des Pyrimidinrings 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU). Die Desaminierung wird durch die Familie der Cytidin-Deaminasen AID (activation induced deaminase) und APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex)

durchgeführt. 5-hmU wird durch DNA-Reparaturenzyme erkannt und durch Cytosin ersetzt. Zu den Reparaturenzymen zählen die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) und die Strang-selektierende monofunktionale Uracil-DNA-Glykosylase 1 (strand-selective monofunctional uracil-DNA glykosylase, SMUG1), die beide eine hohe Affinität gegenüber 5-hmU:Guanin Fehlpaarung besitzen (Guo et al., 2011). Eine andere Abbaumöglichkeit von 5-hmC ist die Oxidation zu 5-Formylcytosin (5-fC) und weiter zu 5-Carboxylcytosin (5-caC). Diese beiden Oxidationsschritte werden durch die TET-Proteine katalysiert. Sowohl 5-fC als auch 5-caC sind Substrate für TDG und werden ersetzt durch Cytosin (Zhu et al., 2009; Wu et al., 2017).

Ein dritter Weg der aktiven Demethylierung führt über die direkte Desaminierung von 5-mC. Diese Reaktion wird ebenfalls durch die schon oben erwähnten Desaminasen katalysiert. Nach Abspaltung der Aminogruppe entsteht die Base Thymin. Diese Abspaltung kann auch spontan geschehen. Die T: G Fehlpaarung wird von TDG oder MBD4 (methyl-CpG-binding-domain-protein 4) erkannt und Thymin durch Cytosin ersetzt. Die funktionalen Zusammenhänge sind in Abbildung 3 noch einmal graphisch zusammengefasst (Branco et al., 2012).

Die Hypothese der aktiven Demethylierung wird durch den Befund unterstützt, dass im Vergleich zu anderen Geweben im Gehirn sehr große Mengen an 5-hmC vorhanden sind. Die neuronalen Zellen teilen sich jedoch nicht mehr, was eine passive Demethylierung bei der Replikation ausschließt und nur die Möglichkeit einer aktiven Demethylierung zulässt.



**Abbildung 3:** Mögliche Reaktionswege der DNA-Demethylierung (Branco et al., 2012)

Die aktive Demethylierung spielt eine Rolle bei der Erhaltung der Pluripotenz von ESC und bei der Demethylierung des paternalen Pronucleus.

Auch bei adulten Zellen ist die aktive Demethylierung wichtig. T-Zellen beispielsweise müssen durch Interleukin 2 (IL-2) aktiviert werden, um eine Immunantwort auslösen zu können. Der IL-2-Promotor wird im Fall einer Immunreaktion als Folge von Signaltransduktion demethyliert und IL-2 kann exprimiert werden (Bhutani et al., 2011). Auch in Muskelzellen wurde schon vor 20 Jahren eine aktive Demethylierung beobachtet (Weiss et al., 1996). Im Gehirn wird der Promotor des Wachstumsfaktors BDNF (brain-derived neurotrophic factor) aktiv demethyliert. BDNF wirkt auf Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems und sorgt für den Schutz von Synapsen und existierenden Neuronen. Außerdem fördert er die adulte Neurogenese. Martinowich et al. wiesen nach, dass eine gesteigerte Synthese von BDNF nach der Depolarisierung der Synapse mit Abnahme der CpG-Methylierung des BDNF-Gens korreliert (2003). Auch im hämatopoetischen System spielt Demethylierung bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu ausdifferenzierten Zellen eine Rolle (Auclair et al., 2012). Klug et al. beobachteten aktive Demethylierung bei postmitotischen

hämatopoetischen Zellen, wie beispielsweise Monozyten während ihrer Differenzierung zu dendritischen Zellen (2010).

#### **1.2.4.3 Proteine der DNA-Demethylierung**

Bei der aktiven Demethylierung folgt der Oxidation von 5-mC zu 5-hmC zunächst die Desaminierung. Sie wird katalysiert durch die AID/APOBEC-Enzyme. Sie desaminieren Cytosin, 5-mC und 5-hmC zu Uracil, Thymin und 5-hmU. Desaminierungen treten in jeder Zelle jeden Tag spontan bei 100-500 Cytosinen und dessen Modifikationen auf (Kemmerich et al., 2012). Die entstandenen Desaminierungsprodukte werden durch die zuständigen Glykosylasen weiter verstoffwechselt. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, wie AID an die DNA bindet und 5-mC erkennt, da es im Gegensatz zu den TET-Proteinen nicht über ein DNA-Bindemotiv verfügt. Eine Mausmodellstudie an Aid-knockout-PGCs (Primordial Germ Cells) zeigte einen drastischen Anstieg an Methylierungen (Popp et al., 2010). Das Fehlen von Aid führte jedoch nicht zum Tod oder zu einer Veränderung des Phänotyps. Dies impliziert, dass der Abbauweg über die Oxidation von 5-hmC über 5-fC und 5-caC als Alternative zur Desaminierung genauso wichtig ist. Andernfalls würden Aid-knockout-Mäuse sterben (Nabel et al., 2011). Bei ESC spielt AID eine Rolle in der Demethylierung von Pluripotenzgenen, wie z.B. NANOG und OCT4, was Bhutani et al. in einer knockout Studie zeigten (Bhutani et al., 2010).

Neben ihrer Funktion in der aktiven Demethylierung haben die Enzyme der Desaminierung auch andere Funktionen im Stoffwechsel. AID spielt eine Rolle im Immunsystem. Es ist verantwortlich für den Klassenwechsel der Immunglobuline (Fritz et al., 2010; Nabel et al., 2011). APOBEC-Enzyme, zu denen auch AID gehört, bekämpfen Retroviren, wie HIV, durch Desaminierung der viralen cDNA. APOBEC3G (A3G) wird in das Virus eingebaut und kann das Genom durch Desaminierung schädigen (Nabel et al., 2011).

MBD4, SMUG1 und TDG gehören zur Familie der DNA-Glykosylasen. Sie erkennen Fehlpaarungen in der DNA-Basenpaarung und spalten die N-glykosidische Bindung der falschen Base zu den beiden Nachbarbasen. Es entsteht eine Apyrimidin oder Apurin (AP) Stelle. Als nächstes wird das zurückgebliebene Nukleosid durch eine Endonuklease ausgeschnitten, die freie Stelle wird mit dem richtigen, komplementären Nukleotid durch eine DNA-Polymerase gefüllt und mit Hilfe einer DNA-Ligase mit dem Strang verknüpft. Dies alles gehört zum Mechanismus der Basenexzisionsreparatur (BER). Neben der Rolle als Teilnehmer in der DNA-Reparatur, haben alle DNA-

Glykosylasen eine Funktion in der aktiven Demethylierung von 5-mC und sind somit wichtig für die epigenetische Regulation der Zelle.

Die Gruppe der MBD-Proteine beinhaltet MeCP2 und MBD1-4. Die Proteine bestehen aus einer MBD Untereinheit, die methylierte CpG erkennt und bindet. So verstärken sie die Stilllegung von methylierten Genabschnitten (Gusyatiner et al., 2017). Außerdem besitzen die Enzyme eine DNA-Glykosylase-Untereinheit. Diese Untereinheit ermöglicht eine Teilnahme an der aktiven Demethylierung und der DNA-Reparatur. Die MBD-Proteine erkennen G:X-Falschpaarungen und schneiden die falsche Base aus der DNA heraus. Das X steht für ein Uracil, Thymin oder 5-hmU, welche die Desaminierungsprodukte von Cytosin, 5-mC und 5-hmC darstellen (Hashimoto et al., 2012). Hashimoto et al. zeigten, dass MBD4 nur die Fehlpaarungen G: U, G: T und G:5-hmU erkennt und nicht die korrekten Basenpaarungen, wie G:C, G:5-mC, G:5-hmC (2012).

Die Familie der MBD-Proteine ist nicht nur wichtig um die Schritte der aktiven Demethylierung zu beenden. Sie schützt die DNA auch vor Mutationen. 5-mC beispielsweise ist eine mutagene Substanz, die sich nicht nur durch Desaminierung, sondern auch spontan zu Thymin umwandeln kann. So kommt es zu einer Punktmutation, die entfernt werden muss. Den Zusammenhang zwischen erhöhter Umwandlung von 5-mC zu Thymin und steigendem Vorkommen von Koloncarcinomen in Mbd4-knockout-Mäusen zeigten Miller et al. (2002).

SMUG1 wurde ursprünglich nach seiner Fähigkeit Uracil (U) aus einzelsträngiger DNA zu entfernen benannt. Heute weiß man, dass SMUG1 aktiver an doppelsträngiger DNA ist. Es erkennt, wie die MBD-Proteine Uracil, Thymin und 5-hmU und entfernt sie. Kemmerich et al. zeigten an Smug1-knockout-Mäusen, dass das Fehlen von Smug1 in totalem Ausfall der 5-hmU Entfernung resultiert (2012). SMUG1 wäre in dem Fall hauptverantwortlich für die Erkennung und Entfernung von 5-hmU.

Die TDG-Enzyme erkennen G:T- und G:U-Fehlpaarungen und auch die Oxidationsprodukte von 5-hmC, 5-fC und 5-caC. Eine höhere Affinität hat TDG gegenüber 5-caC (Zhang et al., 2012; Wu et al., 2017). Cortellino et al. zeigten an Tdg-knockout-Mäusen, dass das Fehlen von Tdg zum Tod noch während der Embryogenese führt. Die Arbeitsgruppe beobachtete Defekte bei der Entwicklung des Herzens und bei der Angiogenese. TDG wirkt als positiver Regulator der Transkription von Retinsäure (retinoic acid, RA) -abhängigen Genen. Es ermöglicht die Interaktion zwischen der Histonacetyltransferase p300 und dem RA-Rezeptor. Acetylierung der Histonproteine führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur und macht die betroffenen Gene

zugänglich für Transkriptionsfaktoren. Tdg-knockout-Mäuse zeigten eine deutliche Abnahme der Expression von RA-abhängigen Genen. Die RA-abhängigen Gene zeigten außerdem eine Hypermethylierung der Promotoren. Die Tdg-knockout-Mäuse zeigten auch eine Abnahme der AID-Expression, was annehmen lässt, dass TDG die Stabilität oder das Expressionslevel von AID beeinflusst (Cortellino et al., 2011).

#### **1.2.4.4 5-hmC als selbstständige epigenetische Modifikation**

Die Tatsache, dass *de novo*-DNMTs in differenziertem Gewebe eher selten zu finden und gleichzeitig das 5-hmC-Level in einigen Geweben relativ hoch ist, lässt annehmen, dass 5-hmC in diesen Geweben Einfluss auf die Genexpression nimmt. 5-hmC kann zu Rekrutierung bestimmter Proteine führen oder zu Blockierung der DNA für andere Proteine. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung von Jin et al., dass 5-mC-bindende-Proteine 5-hmC nicht erkennen und von der DNA ab dissoziieren, sobald Methylcytosin hydroxyliert wird (2011). Dazu zählt zum Beispiel das 5-mC-bindende-Protein MeCP2 (Methyl-CpG-bindendes Protein 2), das zusammen mit 5-mC für eine Hemmung des betroffenen DNA-Abschnitts und Inaktivierung der Genexpression führt. Wird 5-mC jedoch oxidiert, kann MeCP2 nicht mehr binden und die Inaktivierung des Gens ist aufgehoben (Jin et al., 2011).

#### **1.2.4.5 TET-Enzyme und 5-hmC in der Tumorgenese**

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Tumorgewebe der 5-hmC-Gehalt stark abnimmt und ein niedrigerer 5-hmC-Gehalt mit einer hohen Proliferationsrate korreliert (Jin et al., 2011; Kraus et al., 2012). Wie der Verlust von 5-hmC zustande kommt, ist nicht eindeutig geklärt. Einerseits scheint er mit einer erhöhten Zellteilungsrate der Tumorzellen zusammenzuhängen, da stark proliferierende Zellen über weniger 5-hmC verfügen. Andererseits wurde auch beobachtet, dass die Expression von TET-Enzymen, die 5-hmC bilden, in Tumoren sinkt (Yang et al., 2012).

In einer Studie von Yang et al. wurde nachgewiesen, dass ein Zusammenhang besteht zwischen Tumorentstehung und der Abnahme von 5-hmC und der TET-Expression. In der Studie wurden die 5-hmC-Konzentrationen und die TET-Expressionslevel in Tumorpräparaten und normalem Gewebe von Lunge, Brust, Leber, Prostata und Pankreas verglichen. Expressionsanalysen der TET-Enzyme ergaben, dass die Expression aller drei TET-Enzyme stark sank, wobei jedoch der Grund für diese Inaktivierung nicht eindeutig geklärt werden konnte (2012). In einer Studie an Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass niedrige Expressionsraten von TET1

mit fortgeschrittenem Krebsstadium, Lymphknotenmetastasen und kürzerer Überlebenszeit korrelieren. Auf der anderen Seite konnte eine erhöhte Expression von TET1 die Zellinvasion der Tumorzellen senken (Hsu et al., 2012).

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für die abnehmende Expression von TET in Tumoren. Zum einen wird die Translation der TET-mRNA durch mehr als 30 verschiedene micro-RNAs moduliert (Huang et al., 2014). So konnte in Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden, dass die micro-RNA-22 (miR-22) das 3'UTR von TET-Enzymen angreift und eine Translation verhindert. Der Ausfall von TET resultierte in einer erhöhten Promotormethylierung und Herabregulierung von miR-200, einer antimetastatisch wirkenden micro-RNA. Dies führte zuletzt zu einer erhöhten Transkription von Schlüsselfaktoren der Metastasenentwicklung (Song et al., 2013; Huang et al., 2014). Auch bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) konnte eine Abnahme der TET2-Expression verursacht durch verschiedene micro-RNAs gezeigt werden (Cheng et al., 2013; Huang et al., 2014; Koivunen et al., 2017).

Eine andere Möglichkeit ist, dass TET-Enzyme durch Stoffwechselprodukte gehemmt werden. So hemmt 2HG, das Produkt der mutierten IDH,  $\alpha$ -KG abhängige Dioxygenasen, zu denen auch TET zählen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass durch die 2-HG assoziierte Hemmung von TET2 eine DNA-Hypermethylierung an G-CIMP erreicht wird (Gusyatiner et al., 2017). In einer histologischen Studie konnten Kraus et al. zeigen, dass bei Gliomen mit einer Mutation der IDH geringere 5-hmC-Level vorhanden sind (2012). Die Abnahme von 5-hmC könnte durch eine Hemmung von TET erklärt werden. Zwei andere Enzyme, die im Zitratzyklus beteiligt sind, Fumarathydratase (FH) und Succinatdehydrogenase (SDH), sind in verschiedenen Tumoren mutiert (Pfeifer et al., 2014; Koivunen et al., 2017). Fumarat und Succinat akkumulieren, falls FH und SDH mutiert sind (Yang et al., 2013) und sind zudem kompetitive Inhibitoren von  $\alpha$ KG-abhängigen Dioxygenasen (Xiao et al., 2012; Koivunen et al., 2017). Mason und Hornick konnten 2013 in einer Studie an Gastrointestinalen Stromatumoren zeigen, dass eine Mutation der SDH mit einer Abnahme des 5-hmC-Vorkommens korreliert (2013).

Außerdem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Vitamin C für die optimale Funktion von TET nötig ist. Vitamin C scheint den Cofaktor Fe(II) in seinem reduzierten Zustand zu erhalten (Blaschke et al., 2013; Chen et al., 2013; Pfeifer et al., 2014). Blaschke et al. beobachteten eine starke Zunahme der Tet-Expression und des globalen 5-hmC-Gehaltes in Maus-ESC nach der Zugabe von Vitamin C (2013). Es besteht die Möglichkeit, dass der Mangel an Vitamin C in Tumorzellen mitverantwortlich ist für eine reduzierte Aktivität von TET und reduziertem 5-hmC-Gehalt (Pfeifer et al., 2014).

Eine weitere Feststellung ist, dass TET2, zumindest in hämatologischen Erkrankungen, oft mutiert ist. Bei der Mutation handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine loss-of-function-Mutation, da zwei defekte Kopien von TET2 für eine Mutation nötig waren. Somit wäre TET2 ein Tumorsuppressorgen. (Kosmider et al., 2009; Pfeifer et al., 2014; Koivunen et al., 2017).

Insgesamt scheint eine verminderte TET-Expression und geringere Konzentrationen von 5-hmC bei verschiedenen Tumoren mit einer schlechteren Prognose und kürzerem Überleben assoziiert zu sein (Koivunen et al., 2017).

### 1.3 Ziele der Arbeit

In einer vorhergehenden Studie der Arbeitsgruppe konnte in immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass sich der 5-hmC-Gehalt von Gliomen umgekehrt proportional zum WHO-Grad verhält (Kraus et al., 2012). In der vorliegenden Studie sollte nun als weiterer Schritt untersucht werden, wie sich der 5-hmC-Gehalt der Glioblastome zur Überlebenszeit der Patienten verhält. Hierzu wurden von 94 Glioblastompräparaten immunhistochemische Färbungen angefertigt, der 5-hmC-Gehalt quantifiziert und mit Hilfe von GraphPad Prism mit der Überlebenszeit und der progressionsfreien Zeit der Patienten korreliert.

Als nächstes sollte in verschiedenen Zellkulturversuchen untersucht werden, ob sich der 5-hmC-Spiegel nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Medien und Reagenzien verändert und in wie weit ein veränderter 5-hmC-Gehalt das Wachstum und die Morphologie der Zellen beeinflusst.

#### 1.3.1 Versuche mit Retinsäure

Retinsäure (RA) ist ein Derivat von Vitamin A. Es entsteht durch die Oxidierung von Retinol zu Retinaldehyd und weiter zur All-trans-Retinsäure (RA). Vitamin A kann vom menschlichen Körper nicht selbst synthetisiert werden, sondern muss mit der Nahrung zugeführt werden. Im Darm wird es zu Retinol hydrolysiert und schließlich in der Leber gespeichert, die es je nach Bedarf wieder freigesetzt. Die intrazelluläre Konzentration an Retinoiden wird über die Aktivität verschiedener metabolischer Enzyme reguliert (Blaner et al., 1994). Diese Enzyme werden in verschiedenen Gewebetypen und Differenzierungsstadien der Zelle unterschiedlich stark exprimiert.

RA vermittelt seine biologische Wirkung über nukleäre Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren wirken. Die Rezeptoren der Retinoide werden in zwei Familien eingeteilt, die Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Die beiden Rezeptoren können als Homodimere vorliegen, üblicherweise treten sie jedoch als RAR-RXR Heterodimere auf. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor wirkt dieser als Transkriptionsfaktor durch Bindung an sogenannte *RA-response elements* (RAREs). In Abwesenheit des Liganden wirkt der Rezeptor in Verbindung mit einem Corepressorkomplex als Repressor. Der Corepressorkomplex enthält verschiedene Proteine, unter anderem Histondeacetylasen (Perissi et al., 2010). Nach Bindung eines Liganden interagiert der Rezeptor-Ligand-Komplex mit Koaktivatoren, unter denen ein Protein mit Histonacetyltransferase-Aktivität ist (O'Malley et al., 2009).

Der RAR $\beta$ 2 Rezeptor ist der vorherrschende Rezeptor für die Ausführung der hemmenden Effekte von RA auf die Zellproliferation (Altucci et al., 2007). Dieser Rezeptor stimuliert unter anderem die Expression von Zellzyklusinhibitoren wie P $_{21}$ .

Studien haben gezeigt, dass Retinoide wachstumshemmende und differenzierende Wirkung in Neuroblastomen und Gliomen haben. Zudem konnte in verschiedenen experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen werden, dass RA einen hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferationsrate hat und Apoptose einleitet. Der Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase wird erreicht durch Reduktion der Cyclin-D1-Expression und einer gesteigerter Proteolyse von Cyclin-D1 (Ma et al., 2005). Zusätzlich hat RA Einfluss auf das Wachstum der Zelle über den EGF-Rezeptor. Die Behandlung mit RA führt zur Hemmung der Autophosphorylierung des Rezeptors und eine Signaltransduktion kann nicht stattfinden (Yung et al., 1989).

Für die vorliegende Versuchsreihe wurde erwartet, dass eine Ausdifferenzierung der Zellen nach der Behandlung mit RA stattfindet und als Folge ein Anstieg der 5-hmC-Konzentration. Die Zellen wurden über mehrere Tage mit RA inkubiert und ein möglicher Effekt anhand von Immunfluoreszenzfärbungen und Genexpressionsanalyse mittels qPCR überprüft.

### **1.3.2 Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium**

Die Kultivierung von Zellen in Serum-armem oder Serum-freiem Medium hat zwei Gründe. Zum einen können die Zellen im Zellzyklus synchronisiert werden, zum anderen kann beobachtet werden, wie und in welchem Maß die Zelle auf die Stressreaktion reagiert. Tumorzellen, die in Stresssituationen geraten (z.B. Hypoxie, Temperaturänderungen, pH-Schwankungen) reagieren mit erhöhter Angiogenese, Umstellen des Metabolismus auf anaerobe Glykolyse, Regulierung der Proliferationsrate und der Apoptose. Die Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium stellt ebenfalls eine Stresssituation dar und die Zellen reagieren mit der Änderung des Expressionsmusters verschiedener Enzyme (Darzynkiewicz et al., 2011).

Werden Zellen unter Serum-freiem Medium kultiviert treten sie in die G1/G0-Phase des Zellzyklus ein und teilen sich nicht mehr. Sobald die Zellen wieder in Serum-haltigem Medium kultiviert werden, setzen sie den Zellzyklus alle in der gleichen Phase fort (Darzynkiewicz et al., 2011).

Für die vorliegende Studie wurde erwartet, dass die Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium einen Zellzyklusarrest in der G0-Phase bewirkt, die Tumorzellen

Eigenschaften von differenzierten Zellen annehmen und ihr Expressionsmuster ändern. Da ausdifferenzierte Zellen in gesundem menschlichem Gewebe höhere 5-hmC-Spiegel aufweisen als ihre Stammzellen (Haffner et al., 2011), wurde für die Zellkulturversuche ebenfalls ein Anstieg der 5-hmC-Konzentration erwartet.

Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen und Expressionsanalysen sollten mögliche Änderungen der Enzymexpression und des 5-hmC-Gehalts der Zellen detektiert werden.

### **1.3.3 TET3-Überexpression**

In einem letzten Versuch sollte durch eine transiente Transfektion der Zellen mit einem Tet3-Vektor eine Überexpression von TET3 bewirkt werden. Durch die Überexpression sollte ein Anstieg der 5-hmC-Konzentration erreicht werden und als Folge eine Ausdifferenzierung der Zellen oder morphologische Veränderungen beobachtet werden.

Auch hier sollte der Erfolg des Versuchs mittels Immunfluoreszenz- und Genexpressionsanalysen überprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 1:** Reagenzien und Chemikalien

Ware/Produkt	Hersteller
Agarose für DNA Elektrophorese	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rinderserumalbumin	G Bioscience, Baltimore, US
Triton-X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Ethanol	
Methanol	
Agar- Agar	
Hefeextrakt	
Milchpulver aus Casein	
Trypton/ pepton	
Gel Loading Buffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Paraformaldehyd	
DMSO, Dimethylsulfoxid	
Tris- Base	
Retinsäure (retinoic acid =RA)	
Xylol	Staub& Co, München, Deutschland
Gel Pilot 100BP Ladder	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-free-DNase Set	
Nuklease-free-water	
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Abcam plc, Cambridge, UK
NGS, Normal Goat Serum	
SYBR-Green, PCR Mastermix	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SYBR-Gold, nucleic acid gel staining	
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
NaCl	

Na-EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	
Hämalaun	Chroma
Harz Coverquick 2000	Labosphaera, Santiago de Compostela, Spanien

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

Ware/Produkt	Hersteller
Semperguard: Latex puderfreie Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Qiashredder	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Kim-Tech Präzisionstücher	Kimberly Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	
Zellschaber	SPL Life Science, Korea
Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup>	Thermo Scientific GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	
Multischalen 24 well-Format	
Multischalen 6 well-Format	
Kryoröhrchen 2ml	
PCR-Reaktionsstreifen	
Mikrotestplatten 96 well-Format	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
PCR-Platten 96 well Format	
Klebefolie BZO Seal Film	
Parafilm Laboratory Film	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	
1,5ml Eppendorf safe-lock-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2ml Eppendorf safe-lock Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,2ml Eppendorf PCR- Reaktionsgefäße	
Eppendorf Combitips Plus 2,5ml	
MultiGuard Barriere Tips: 10µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City,
MultiGuard Barrier Tips: 100µl	

MultiGuard Barrier Tips: 200µl	
MultiGuard Barrier Tips: 1000µl	
Serologische Pipetten 25ml	Greiner-Bio-One GmbH, Leipzig, Deutschland
Serologische Pipetten 10ml	
Serologische Pipetten 5ml	
Serologische Pipetten 2ml	
Deckgläser 24x40 mm	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Deckgläser 24x32 mm	

### 2.1.3 Kits

**Tabelle 3:** Kits

Kits	Hersteller
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAmp DNA Micro Kit	
SuperScript Vilo-cDNA Synthese Kit	Invitrogen by life technologies, Darmstadt, Deutschland
Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit	
Click-iT EdU Alexa 488 Imaging Kit	
Super-Sensitive Polymer- HRP IHC Detection System für Immunhistochemie	BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

### 2.1.4 Geräte

**Tabelle 4:** Geräte

Geräte	Hersteller
Light Cycler (LC-480-II)	Roche
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Brutschrank Hera Cell Invarz 240	
Kühlschrank -80°C Hera freeze	
DNA/ RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Gelkammer	
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5430	
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	

Eppendorf Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	
Thermocycler: Mastercycler gradient	
Eppendorf Zentrifuge 5804 R	
Eppendorf research Pipette 0,5-10 µl	
Eppendorf research Pipette 10-100 µl	
Eppendorf research Pipette 20-200 µl	
Eppendorf research Pipette 100-1000 µl	
Eppendorf Multipipette Plus	
Eppendorf easypet elektrische Pipetierhilfe	
Centrifuge/Vortex Combi-Spin	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
NanoDrop™ ND-1000 Spektrophotometer	
Vortex-Genie-2	Scientific Industries Inc., Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
Netzteil Power-Pac 1000	BioRad, München, Deutschland
Kühlschrank -20°C Liebherr Premium	Liebherr, Lindau, Deutschland
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
pH- Meter- MP120	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Autoklav	KSG Sterilisatoren GmbH, Olchin, Deutschland
Stickstofftank -196°C Cryo 300	Thermo Scientific GmbH, Karlsruhe, Deutschland
3 UV Transilluminator	UVP
Eismaschine ScotsmannAF10	Horst Zimmermann GmbH, Nürnberg, Deutschland
Milli-Q-Wasseraufbereitungssystem	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage CP-2201-OCE	
Fotodrucker Sony- Upp 110 HG	Sony, München, Deutschland
Inverses Mikroskop Olympus IX50	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Kamera IX SPT	
Olympus BX 50- Lichtmikroskop	
Mikroskopkamera- Color View-Soft imaging System	

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

**Tabelle 5:** Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Rezepte
TAE- Puffer (pH= 8)	121g Trisbase, 28,5ml Essigsäure, 9,31g Na EDTA
10x PBS (Stammlösung) (pH=7,4)	12,7g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 3,9g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 85,0g NaCl, 1000ml dH <sub>2</sub> O
1x PBS (Arbeitslösung)	10x PBS 1:10 mit dH <sub>2</sub> O verdünnt
NaBorat (pH=9)	
PBS Triton-X-100 (pH=7,4)	1x PBS, 0,5% Triton-X-100
PBS Triton X-100 (pH=7,4)	1x PBS, 0,3% Triton-X-100
Blockierungslösung	PBS, 10%NGS, 0,3% Triton-X-100
BSA in PBS	3% BSA in PBS
DAPI Lösung	PBS, DAPI (1:1000)
Alexa Fluor Lösung	PBS, 3%NGS, 0,3% Triton-X-100, Alexa (1:500)
2YT- Medium	Bacto Trypton: 16g Yeast Extract: 5g NaCl: 5g
LB (Luria Bertani)	Bacto Trypton: 10g Yeast Extract: 5g NaCl: 5g
LB- Agar:	Bacto Trypton: 10g Yeast Extract: 5g NaCl: 5g Agar: 15g

## 2.1.6 Zellkulturmedien und Reagenzien

**Tabelle 6:** Zellkulturmedien und Reagenzien

Ware	Hersteller
DPBS, steril filtriert	
Fetales Rinderserum	

Penicillin(10000U/ml), Streptomycin(10mg/ml)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypsin/EDTA, steril filtriert	
L-Glutamin	
DMEM	

### 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 7:** Antikörper

Antikörper	Art	Quelle	Verdünnung	Blockier- lösung	Hersteller
5-hmC	Primär- Antikörper	Kaninchen	1:1000	0,5%Triton-X- 100 in PBS 10%NGS	Active motif, La Hulpe, Belgien
Alexa Fluor 546	Sekundär- Antikörper	Ziege	1:500	0,5%Triton-X- 100 in PBS + 3% NGS	Invitrogen, Darmstadt, Deutsch- land
Alexa Fluor 546	Sekundär- Antikörper	Ziege	1:500		
Alexa Fluor 488	Sekundär- Antikörper	Ziege	1:500		

### 2.1.8 Primer

**Tabelle 8:** Primer von Eurofins, Ebersberg, Deutschland

Protein	Sequenz
TET1 3`forward	CCA ACC TTA GGG AGT AAC ACT G
TET1 3`revers	CTG AGT CTT CCC GAA GGC ATC
TET2 both forward	GCT TGG AAG CAG GAG ATG G
TET2 both revers	GGC TGC CCT CTA GTT GAA TTT
TET3 forward	CCA TTG CAA AGT GGG TGA
TET3 revers	CGC ACC AGG CAG AGT AGC
TDG 59 forward	GAA CCT TGT GGC TTC TCT TCA
TDG 59 revers	GTC ATC CAC TGC CCA TTA GG
AICDA forward	GAC TTT GGT TAT CTT CGC AAT AAG A
AICDA revers	AGG TCC CAG TCC GAG ATG TA
SMUG1 forward	CAG ACT GGG GTG CCC TTT G

SMUG1 revers	CAG GCT GTC CAC AGA GGT TC
MBD4 forward	GAA CAC AAC GAG AAG TAT GAG GAT AC
MBD4 revers	GTG GGA TGG TAT CTT GAA ATA TTT TC
CCND1 forward	CTG TGC CAC AGA TGT GAA GTT C
CCND1 revers	GCG TGT GAG GCG GTA G
GFAP forward	CTG GAC ACC AAG TCT GTG TC
GFAP revers	CTC CTT AAT GAC CTC TCC ATC C
TBP forward	GAA CAT GGA TCA GAA CAA CA
TBP revers	ATA GGG ATT CCG GGA GTC AT
IPO8 forward	GAT TTA GTG AGA GTC CAA TTA ACA ATG
IPO8 revers	GTC TTC ACC AGT TGA TAC AGG
ACTB forward	GAA GAT GAC CCA GAT CAT GTT TGA G
ACTB revers	CTC GGT GAG GAT CTT CAT GAG

### 2.1.9 Zelllinien

Die humane Gehirntumorzelllinie U87-MG wurde bei American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, USA gekauft. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die von einer 44-jährigen weiblichen Patientin aus einem *de novo* Glioblastom stammt. Morphologisch handelt es sich um epitheloide Zellen, die adhärent wachsen.

Die Linien LN71, LN319 und LN401 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. de Tribolet, Lausanne. Diese Linien wurden genetisch charakterisiert von Ishii et al.

**Tabelle 9:** Genetische Charakterisierung der LN71, LN319, LN401 (Ishii et al., 1999)

Linie	Tumor	Alter/ Geschlecht	P53 Status		PTEN-Status		P16 Status
			Kodon	DNA&Aminosäuren Austausch	Kodon	Mutation&Aminosäuren Austausch	
LN71	De novo GBM	67/M	146/146	TGG (Trp)→TGA(Stop)	173	CGC(Arg)→CAC(His)	del
LN319	De novo AA	67/M	175/175	CGC(Arg)→CAC (His)	15	AGA(Arg)→ATA(Ile)	WT
LN401	De novo GBM	63/M	215/215	AGT(Ser)→AGA (Arg)	27	TAT(Tyr)→TAG(Stop)	del

### 2.1.10 Bakterien

Die kompetenten Escheria coli (E. coli) Bakterien DH10B, die zur Transformation des Tet3-Vektors genutzt wurden, wurden von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Färbungen**

#### **2.2.1.1 Immunhistochemie**

In der Immunhistochemie werden Antigene (z.B. Proteine, DNA-Modifikationen) durch die Bindung von Antikörpern sichtbar gemacht.

In dieser Studie wurden histologische Schnitte von 94 verschiedenen Glioblastomen mit einem 5-hmC-Antikörper gefärbt. Die Gewebeproben wurden zunächst in Formalin fixiert. Die Formalinfixierung zählt zu den Immersionsfixierungen, bei denen das Gewebe in einer, dem lebenden Zustand gleichartigen Form, fixiert und Enzymsysteme inaktiviert werden, die autolytische Prozesse bewirken könnten. Als nächstes wurde das Präparat durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Das Einbettungsmaterial Paraffin ist mit dem Alkohol nicht verträglich und so wird das Gewebe zunächst in Xylol gelegt, das durch seine alkoholentziehenden und paraffinlösenden Eigenschaften als Intermedium zwischen Alkohol und Paraffin dient. Die Gewebeprobe wird anschließend in geschmolzenes Paraffin gegeben, das nach Abkühlen einen Paraffinblock bildet. Von diesem Paraffinblock können nun mit einem Mikrotom Schnitte angefertigt werden, die auf Objektträgern abgelegt werden. Vor Beginn der Färbung wird der Gewebeschnitt zunächst durch Xylol deparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und anschließend in 2M HCl-Puffer bei 35°C für 20 Minuten inkubiert. Durch die Formalinfixierung entstehen Proteinvernetzungen, die das Antigen verdecken. Durch die Vorbehandlung mit HCl werden diese Vernetzungen gelöst und das Antigen ist dem Antikörper wieder zugänglich. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur wurde mit PBS gewaschen. Als nächstes folgte ein 20-minütiger Inkubationsschritt in Wasserstoffperoxid, das in Methanol gelöst wurde. Das Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) blockt die gewebsendogene Peroxidase und verhindert so, dass nach Behandlung mit dem Chromogen Diaminobenzidin, das durch eine Peroxidase umgesetzt wird, eine Hintergrundfärbung entsteht. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurde das Gewebe mit einer Milchpulver enthaltenden Blockierungslösung (I-Block) inkubiert. Die Blockierungslösung dient zum Besetzen von unspezifischen Bindungsstellen des Antikörpers. So wird im optimalen Fall gewährleistet, dass der Antikörper nur an die vorgesehenen Stellen bindet. Der anschließend aufgetragene polyklonale 5-hmC anti-rabbit Antikörper wurde über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach Abwaschen des überstehenden Antikörpers mit PBS die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Super-Enhancer-Reagent (SE-Reagent)) für 20 Minuten und anschließend mit Meerrettichperoxidase-Polymer (Polymer-Horseredishperoxidase (HRP)) für 30 Minuten. Das „Super-Sensitive Polymer-HRP IHC Detection System“, das den

sekundären Antikörper und die Peroxidase für die Farbreaktion stellt, wurde von BioGenex genutzt. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) inkubiert. Der Farbstoff DAB dient als Substrat der Peroxidase, und bildet einen braunen Niederschlag. Bei dieser Methode bindet an den Primärantikörper, hier 5-hmC, ein Sekundärantikörper (SE-Reagent) an den wiederum ein oder mehrere Polymere binden. Die Polymere sind mit Enzymen, in diesem Fall Peroxidasen, markiert (Polymer HRP) Die Peroxidase oxidiert Wasserstoffperoxid. Durch die frei werdenden Protonen wird das Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt oxidiert. Ein Chromogen, hier DAB, ist die farblose Vorstufe des Farbstoffs, die erst nach Umwandlung die Farbe annimmt. Der braune Niederschlag zeigt die 5-hmC positiven Zellen. Da die Enzyme, die den Farbstoff herstellen, direkt an den Antikörper gebunden sind, wird eine Hintergrundfärbung reduziert und das Ergebnis ist besser verwertbar.

Nach Abwaschen des überschüssigen DAB mit destilliertem Wasser wurde der Gewebeschnitt für 2 Minuten in Hämalaun inkubiert. Bei Hämalaun handelt es sich um Farbstoffkomplexe aus Hämatein, der oxidierten Form des Hämatoxylin, und Alaunen. Diese Farbstoffkomplexe bilden wiederum Komplexe mit anionischen Strukturen, wie zum Beispiel der DNA in Zellkernen. Sie zeigen einen dunkelblau-violetten Farbton.

Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurde das Präparat erneut entwässert. Abschließend wurde der Gewebeschnitt mit einem Deckglas und Coverquick, einem flüssigen Harz von Labosphera abgedeckt und konnte nun unter dem Mikroskop analysiert werden.

### **2.2.1.2 Immunfluoreszenzfärbung**

Von allen Zellkulturversuchen wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Jeder Ansatz wurde mit EdU (5-Ethynyl-2-Deoxyuridin) und 5-hmC cogefärbt. EdU dient als Marker für die Zellteilungsrate. Es baut sich bei der Zellteilung in die DNA ein.

Für die Färbung mit EdU wurden die Zellen zunächst für eine Stunde mit je 5µl/well EdU behandelt, in 10µM Konzentration. EdU, als Nukleosid- Analog von Thymin, wird bei der Zellteilung statt Thymin in die DNA eingebaut. Die Detektion basiert auf einer so genannten Klick-Reaktion, einer Kupfer-katalysierten kovalenten Reaktion zwischen einer Säure und einem Alkin. EdU nimmt als Alkin und der sekundäre Antikörper, Alexa Fluor Farbstoff, als Säure an der Reaktion teil.

Nach der einstündigen Inkubationszeit mit EdU wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurde das PFA abgesaugt und durch PBS ersetzt. In PBS wurden die Zellen bis zur Färbung aufbewahrt. Die Färbung erfolgte mit dem EdU-Click-iT Kit von Invitrogen nach Herstellerprotokoll. Modifiziert wurden lediglich die verwendeten Mengen der einzelnen Reaktionsgemische und Puffer.

Nach zwei Waschschritten mit Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS und folgend Triton-X-100 in PBS wurde das Reaktionsgemisch mit dem sekundären Antikörper auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. BSA dient als Blockierungslösung und bindet an unspezifische Bindungsstellen. Triton-X-100 dient zur Reduzierung der Oberflächenspannung und Permeabilisierung der Zellen, sodass der Antikörper besser in die Zellen eindringen kann.

**Tabelle 10:** Puffermengen für die Immunfluoreszenzfärbung

Waschpuffer	Menge
0,5% Triton-X-100 in PBS	300µl/well
3% BSA in PBS	

Für das EdU-Reaktionsgemisch wurden folgende Mengen verwendet.

**Tabelle 11:** Reaktionsgemisch für die Immunfluoreszenzfärbung

Reagenz	Menge/ 200µl
Click-iT-Puffer	172
CuSO <sub>4</sub>	8
Alexa Fluor Azide	0,48 µl
EdU reaction-buffer-additive	10µl

Nach Anfärbung des EdU mit dem sekundären Antikörper wurde auf die Zellen der primäre 5-hmC-Antikörper in einer Blockier-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Belegen unspezifischer Bindungsstellen diente hier Normal-Goat-Serum (NGS).

Am folgenden Tag wurde zunächst durch 3 Waschschrritte der nicht aufgenommene Antikörper von den Zellen entfernt. Anschließend wurde mit dem sekundären Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Auch dieser wurde in einer Blockierungslösung mit NGS und PBS 1:500 verdünnt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Es folgten 2

Waschschritte und anschließend die Inkubation mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) für 5 Minuten zur Färbung der Zellkerne. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich besonders an Adenin und Thymin reichen Regionen an der DNA anlagert. Nach einem weiteren Waschschritt verblieben 300µl PBS in den Wells.

**Tabelle 12:** Puffer und Antikörperlösungen

Puffer/Lösung	Rezept	Menge/ well
Triton-X-100 in PBS	0,3%Triton-X-100 in PBS	300µl
Alexa Fluor in Blocking-Lösung	PBS, 3%NGS, 0,3% Triton-X-100, Alexa (1:500)	200µl
DAPI-Lösung	PBS, DAPI (1:1000)	300µl

### 2.2.1.3 Quantifizierung der gefärbten Zellen

Nach den Färbungen wurden die histologischen Präparate bzw. die gefärbten Zelllinien fotografiert. Es wurden stets Aufnahmen in 4x, 10x, 20x und 40x Vergrößerungen angefertigt. Aus den Fotos der 20x Vergrößerung wurde je ein repräsentativer Ausschnitt von 100x100µm gewählt und für die Quantifizierung verwendet. Die gezählten 5-hmC positiven bzw. EdU positiven Zellen wurden auf alle gezählten Zellkerne quantifiziert.

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Glioblastomzelllinien LN401, LN319, LN71 und U87 erfolgte im Wärmeinkubator in 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97%. Die Zellen wurden in T75 oder T25 Zellkulturflaschen gezüchtet. Die Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank mit autoklavierten bzw. sterilen Materialien durchgeführt. Das Medium (DMEM) wurde zusätzlich mit 10% FBS und 1% L-Glutamin versetzt. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin behandelt, um die Zelladhäsion am Flaschenboden zu lösen. Nach einigen Minuten Inkubationszeit im Wärmeinkubator wurde das Trypsin mit dreifacher Menge DMEM inaktiviert. Nach Zentrifugation wurde das überstehende Trypsin-DMEM-Gemisch abgesaugt und das Zellpellet mit DMEM resuspendiert. Falls die Zellen nicht für einen Versuch gebraucht wurden, wurden sie 1:2 oder 1:5 in geeigneter Menge an Medium subkultiviert.

**Tabelle 13:** Anzahl der Zellen für Zellkulturflaschen

Aufbewahrung	Zellzahl	Medium
T75 Kulturflasche	200µl /500µl	20ml
T25 Kulturflasche	125 µl	5ml
24-well Platte	25 µl	475µl
6-well Platte	100µl	2ml

### 2.2.2.2 Gewinnung von Zellpellets

Zum Einfrieren von Zellen für eventuelle DNA- oder RNA-Extraktion wurde das Zellpellet nach dem Zentrifugieren mit 10ml PBS resuspendiert und die Suspension in 1ml Portionen in Tubes pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das PBS abgenommen und die Tubes bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 2.2.2.3 Behandlung mit Retinsäure

Als Reagenz wurde Retinsäure von Sigma Aldrich, München, verwendet. Zur Behandlung der Zellen mit Retinsäure (RA) wurden von 80-90% konfluerten Zellen nach Trypsinierung und Zentrifugation 200 µl Zellen entnommen und in 20ml Medium in T75 Kulturflaschen kultiviert. Zum ersten Ansatz wurden 80 µl RA hinzugegeben. Da RA in DMSO gelöst wurde, wurde in einem zweiten Ansatz 80 µl DMSO zum Medium gegeben. So konnte ein möglicher Effekt von DMSO auf die Zellen beobachtet werden. Zusätzlich wurde eine Kulturflasche mit gleicher Zellzahl und Mediummenge mitgeführt ohne RA und ohne DMSO. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen 10 Tage kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen 1:5 passagiert und das Medium gewechselt. Der Versuch wurde mit der LN319 und der LN71 durchgeführt. Es wurden pro Zelllinie je 3 Ansätze der RA-behandelten Zellen, DMSO-behandelten Zellen und der Kontrollzellen mitgeführt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen der drei Versuchsgruppen auf 24-well-Platten an Tag 9 des Versuchs ausgesät und an Tag 10 mit EdU behandelt. Die restlichen Zellen wurden an Tag 10 abgenommen und nach der Zentrifugation eingefroren und für die RNA-Extraktion weiterverwendet.

#### **2.2.2.4 Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium**

Nach der Behandlung mit Retinsäure wurde beschlossen die Zellen durch Kultivierung in Serum-freiem Medium unter Stress zu setzen und so eventuell die 5-hmC-Bildung oder dessen Abbau zu beeinflussen.

Die Zellen wurden über 3 Tage in T25 Kulturflaschen kultiviert. Die in nährarmen Medium kultivierten Zellen wurden in 5ml Medium ohne FBS (DMEM + 0%FBS+ 1%Glutamin) gehalten. Als Kontrolle wurden Zellen in normalem Medium (DMEM + 10% FBS) mitgeführt. Nachdem die Zellen 3 Tage mit nährarmen Medium gefüttert wurden, wurden sie erneute 3 Tage mit dem gewohnten Medium (DMEM + 10%FBS+ 1%Glutamin) kultiviert. Sowohl nach den 3 Tagen im Hungerzustand, also auch nach erneutem Anfüttern, wurden die Zellen mit EdU behandelt und RNA extrahiert.

#### **2.2.2.5 TET3-Überexpression**

Im dritten Zellkulturversuch wurden die Zellen mit einem Tet3-Vektor transfiziert und mögliche Änderungen der Enzymexpression und der 5-hmC-Bildung beobachtet. Der Tet3-Vektor wurde freundlicherweise von Professor Leonhard, Professor für Humanbiologie und Bioimaging an der LMU München, zur Verfügung gestellt.

##### **2.2.2.5.1 Transformation**

Es wurde die Methode der chemischen Transformation gewählt, bei der die Zellen einem Hitzeschock unterzogen werden, der dafür sorgt, dass kleine Poren in der Zellmembran der Bakterien entstehen, durch die die Plasmid-DNA in die Zelle diffundieren kann. Die chemisch kompetenten E. coli Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Von den Zellen wurden 100µl in ein separates Reaktionsgefäß gegeben und 50pg des Vektors hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 42°C für 90 Sekunden dem Hitzeschock unterzogen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten auf Eis wurde zu den Zellen 900µl S.O.C-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Folgend wurde die Suspension 1:100 mit S.O.C.-Medium verdünnt und 100µl auf LB- Platten ausgesät. Die Plasmid-DNA enthielt ein Gen für Antibiotikaresistenz. Das LB- Medium der Platten war mit 100µg/ml Ampicillin, Antibiotikum, versetzt. So konnten nur die Bakterien auf den Platten wachsen, die das Plasmid aufgenommen hatten und resistent gegen das Ampicillin waren. Die Bakterien wurden für ein bis zwei Tage im Wärmeinkubator wachsen gelassen. Anschließend wurde eine Kolonie herausgepickt und in flüssiges LB- Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben.

#### **2.2.2.5.2 Plasmid-Aufreinigung**

Zur Plasmid-Aufreinigung wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Das Protokoll wurde nach Herstellangaben durchgeführt. Die vorher in flüssigem LB-Medium gezüchteten Bakterien wurden zunächst abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit einem alkalischen Puffer lysiert. Nach Trennung des Pellets von dem alkalischen Puffer durch Zentrifugation wurde die DNA durch Waschen mit einem salzarmen und pH-optimierten Puffer an eine Säule gebunden. Verunreinigungen wurden durch Waschen mit einem an Salz höher konzentrierten Puffer entfernt. Schließlich wurde die DNA mit einem hochkonzentrierten Salzpuffer gelöst und mit Hilfe einer Isopropanol-Fällung entsalzt.

Für die Behandlung der Zellen mit Plasmid-DNA wurden sie 24 Stunden vor der Transfektion auf einer 24-well Platte im gewohnten Medium (10% FBS, 1% Glutamin) ohne Zugabe von Antibiotika so ausgesät, dass sie nach 24 Stunden 90-95%ig konfluiert waren. Am folgenden Tag wurde vor der Transfektion das Medium gewechselt.

Plasmid-DNA und Lipofectamin 2000 wurden nach Herstellerangaben entsprechend mit Serum-freiem Medium (Opti-MEM I Reduced Serum Medium) verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide gemischt und weitere 20 Minuten bei RT zur Ausbildung von DNA-Transfektionskomplexen inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden kultiviert und anschließend für Immunfluoreszenzfärbung bzw. RNA- Extraktion weiterverwendet.

Lipofektion bedeutet das Einschleusen von DNA in Zellen mit Hilfe von Liposomen. Liposome sind vesikuläre Strukturen, die sich in wässriger Lösung spontan aus Lipidmolekülen formen. Meistens sind hier, auf Grund ihres amphiphilen Charakters, Phospholipide beteiligt. Durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen den negativen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA und der hydrophilen Kopfgruppe der kationischen Lipide entstehen Komplexe, die Lipoplexe genannt werden. Kationisch wirkt hier die Ammoniumverbindung, die über eine Phosphoesterbindung an das Glycerin des Lipids gebunden ist. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran, die auch aus Lipiden besteht und bringen so die DNA in die Zelle.

Der Vektor war mit einem GFP-Signal gekennzeichnet. GFP bedeutet Grün-fluoreszierendes-Protein. Seine Gensequenz wurde in dem Vektor mit dem Tet3-Gen fusioniert. Bei Expression des Vektors durch die Wirtszelle, wird auch das GFP

exprimiert. Dieses fluoresziert grün bei Anregung mit blauem Licht. So kann überprüft werden, ob die Transfektion erfolgreich war.

### **2.2.3 Genexpressionsanalysen**

#### **2.2.3.1 RNA-Extraktion**

Zur RNA-Extraktion aus Zellpellets wurde das RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt mit Ausnahme eines DNase- Verdau schritts.

Die Zellen wurden zunächst durch einen denaturierenden Puffer lysiert, die Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. So wurden Verunreinigungen der Proben verhindert. Anschließend wurde Ethanol zu dem Zelllysat hinzugegeben, wodurch die Bindungskapazität an die Säulenmembran erhöht wurde. Die Zellen wurden nun auf eine Säule aufgetragen. Dort banden die Zellen an eine Membran, die in folgenden drei Waschschr itten von möglichen Verunreinigungen gereinigt wurde. Anschließend wurde der DNase-Verdau eingeschoben, bei dem auf die Membran RDD-Puffer und DNase gegeben und anschließend für 15 Minuten inkubiert wurde. Der DNase-Verdau wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die erhaltene RNA nicht mit DNA kontaminiert ist und so das Ergebnis nicht verfälscht wird. Der RDD-Puffer (RNase free DNase Set, Qiagen) ist ein optimierter Puffer für DNase-Verdau auf Säulen. Es folgten weitere Waschschr itte und letztlich das Lösen der RNA von der Membran mit RNase freiem Wasser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die RNA wurde nach der Verdünnung mit destilliertem Wasser auf die Arbeitskonzentration von 50ng/µl bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### **2.2.3.2 DNA-Extraktion**

Zur DNA-Extraktion aus Zellpellets wurde das QIAmp-DNA-Micro-Kit von Qiagen verwendet. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben umgesetzt. Zunächst wurde das Pellet mit einem stark denaturierenden Puffer und in Anwesenheit von Proteinase K lysiert. Proteinase K ist eine Endo- und Exopeptidase, die Peptidbindungen spaltet und so Proteine abbaut und Nukleinsäuren freisetzt. Anschließend wurde das Lysat unter Zugabe von Ethanol auf eine Säule gegeben und an deren Membran adsorbiert. Es folgten verschiedene Waschschr itte mit Puffern mit bestimmten Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen, die sicherstellen, dass Proteine und andere mögliche Kontaminationen ausgewaschen werden. Die DNA wurde schließlich durch Zugeben

von destilliertem Wasser von der Membran gelöst, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.2.3.3 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription der extrahierten RNA wurde das SuperScript Vilo™ cDNA Synthesis Kit von Invitrogen genutzt. Die RNA wird bei dieser Reaktion in komplementäre DNA, complementary DNA (cDNA), umgewandelt. Die cDNA ist wesentlich stabiler als die RNA und eignet sich deshalb besser für weitere Versuche. Die Mengenangaben des Herstellerprotokolls wurden halbiert. Der SuperScript-Enzym-Mix liefert die Reverse Transkriptase und einen Ribonuklease-Inhibitor, der verhindert, dass die RNA des Gemisches abgebaut werden kann. Der 5x VILO™ Reaction Mix liefert die Primer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) für die Reaktion. MgCl<sub>2</sub> dient der Reaktion als Cofaktor.

**Tabelle 14:** Reverse Transkription- Reaktionsgemisch

Reagenz	Menge/ Ansatz in ul
10x SuperScript Enzym Mix	2µl
5x VILO™ Reaction Mix	1µl
RNA	5µl bis zu einer Konzentration von 250ng/µl
dH <sub>2</sub> O	5µl

Bei einer höheren RNA-Konzentration als 250ng/µl wurde die zugegebene RNA-Menge halbiert und mit dH<sub>2</sub>O auf 10µl aufgefüllt. Nach Vortexen der Proben wurden sie für ca. 2 Stunden im Thermocycler bei folgendem, optimiertem Programm inkubiert:

1. 25°C            10 Minuten
2. 42°C            90 Minuten
3. 85°C            5 Minuten

Anschließend wurde die Konzentration der cDNA mit dem NanoDrop™ gemessen. Nach Verdünnung auf eine Arbeitskonzentration von 50ng/µl wurde die Probe erneut gemessen und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### **2.2.3.4 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von RNA und DNA**

Nach der Extraktion wurde die RNA-/ DNA-Konzentration mittels NanoDrop™ ND-1000 Spektrophotometer von Peqlab gemessen. Als Einstellung für die RNA-Messung wurde RNA-40 genutzt und für die DNA Messung DNA-50.

Vor der Messung wurden die Messspalte zunächst mit Nuklease-freiem Wasser gereinigt. Da die RNA/ DNA in Nuklease-freiem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gelöst wurden, wurde das Gerät vor der eigentlichen Messung auf das Wasser geeicht. Es folgte das Messen der Extrakte. Hierzu wurden von der Probe jeweils 1,5µl auf den unteren Messarm pipettiert. Der Nanodrop misst bei verschiedenen Wellenlängen die Extinktion. Extinktion bedeutet die Abschwächung eines Lichtstrahls in einem Probemedium. Das Gerät misst zunächst das Spektrum der Eichlösung, in diesem Fall dH<sub>2</sub>O. Das Absorptionsspektrum der anschließend gemessenen Proben wird verrechnet mit dem Spektrum der Eichkurve und es wird das Spektrum der DNA oder RNA abgebildet. Die Konzentration des gemessenen Stoffes wird mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes berechnet und in ng/µl angegeben. Der NanoDrop™ kann auch die Reinheit der gemessenen RNA/ DNA berechnen. DNA bzw. RNA absorbieren das Licht bei einer Wellenlänge von 260nm ( $A_{260}$ ). Proteine hingegen absorbieren bei 280nm ( $A_{280}$ ). Durch den Quotienten  $A_{260}/A_{280}$ , der bei 1,9-2,3 liegen sollte konnten Proteinkontaminationen ausgeschlossen werden. Durch den Quotienten  $A_{260}/A_{230}$  konnten Kontaminationen durch EDTA und Kohlenhydrate ausgeschlossen werden.

#### **2.2.3.5 Bestimmung der RNA-Integrität**

Zur Bestimmung der Qualität der RNA wurde der Bioanalyzer 2100 von Agilent Technologies, USA verwendet. Bei der extrahierten RNA handelte es sich überwiegend um mRNA (messenger-RNA), die Aussage über die Proteinexpression in der Zelle gibt. Die mRNA ist ein relativ instabiles Molekül, da sie einem ständigen Auf- und Abbau unterlegen ist. Da die Genexpressionsanalysen mit dem Light Cycler auf der RNA/ mRNA aufbauen, ist es sinnvoll die RNA auf ihre Qualität zu überprüfen. Der Bioanalyzer arbeitet auf dem Prinzip der Kapillargelelektrophorese und berechnet die RNA-Integritätsnummer (RIN). Die übliche Gelelektrophorese wird hier verlagert auf einen Chip. Durch den Chip werden die Auftrennungszeit und das benötigte Material an Proben und anderen Reagenzien, wie z.B. Gel und Leiter, verringert. Der Chip enthält zum einen 16 wells, die für das Gel, die Leiter und die Proben genutzt werden und zum anderen Micro-Tunnel, die die wells untereinander verbinden. Die verschieden langen RNA-Moleküle werden durch einen Spannungsgradienten aufgetrennt. Die längeren Stücke laufen wie bei der Gelelektrophorese langsamer im Gel. Farbstoffmoleküle lagern sich

an den RNA-Strang an und werden durch eine Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert. Die erhaltenen Daten werden in Form eines Gel-ähnlichen Bildes (Gelbanden) und eines Elektropherogramms wiedergegeben. Das Elektropherogramm stellt die Fluoreszenzintensität gegen die Laufgeschwindigkeit/ Größe des Moleküls (Agilent 2100 Bioanalyzer, 2100 Expert User's Guide, S.66 ff.). Die RIN kann Werte zwischen 1-10 annehmen, wobei ein Wert von 1 eine völlig degradierte RNA und 10 eine intakte RNA bedeutet. Der RIN-Wert wird mit Hilfe des Verhältnisses der ribosomalen Untereinheiten 18S- und 28S-rRNA und deren möglichen Abbauprodukte berechnet.

Das Protokoll wurde exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Vor jeder Messung wurden die Elektroden des Geräts mit Hilfe eines Reinigungschips, der mit Nuklease-freiem Wasser geladen wurde, gereinigt. Daraufhin wurde ein neuer RNA 6000 Pico Chip mit den Proben und der Leiter beladen. Zur Gelmatrix wurde 1µl Farbstoffkonzentrat hinzugegeben und für 10 Minuten bei 13000g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Proben für 2 Minuten bei 70°C Hitze denaturiert. Nun wurden die Wells des Chips mit Gelmatrix, Leiter und Proben nach Vorgaben beladen, von der Gelmatrix 9µl, von den Proben und der Leiter jeweils 1µl. Jede Probe wurde in Duplikaten angelegt. Nach Vortexen des Chips für eine Minute wurde er im Bioanalyzer 2100 vermessen.

#### **2.2.4 Gelelektrophorese**

Für das Gel wurde Agarose von Sigma genutzt. Um ein 2%iges Gel zu erhalten wurden 1,0g Agarose mit 50ml 1x TAE Puffer (Trisbase, Essigsäure, NaEDTA) gemischt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt, bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Zu der flüssigen Gelmasse wurde 1µl SYBR-Gold Farbstoff von Invitrogen hinzugegeben. SYBR-Gold ist ein synthetischer Cyanin-Farbstoff, der an die cDNA bindet und unter UV-Licht fluoresziert und somit die Banden im Gel sichtbar macht. Nach Abkühlen des Gels wurden die Käbme entfernt und die Proben in die Taschen pipettiert. Für die Proben wurden jeweils 1µl der Probe und 4µl des Ladefarbstoffs von Sigma Aldrich vermengt. Der Ladepuffer enthält Bromphenol Blau und lagert sich an die cDNA-Fragmente an. So wird sichtbar gemacht, wie weit die Banden im Gel laufen. Als Leiter diente 100 Basenpaar Gel-Ladder von Qiagen, von der ebenfalls 1µl mit 4µl Ladefarbstoff verdünnt wurde.

Nach Anschließen der Elektroden wurde eine Spannung von 70 Volt eingestellt und das Gel für eine Stunde laufen gelassen.

Nach Durchlaufen des Gels wurden mit einem 3-UV Transilluminator von Uplande die Banden zunächst sichtbar gemacht und schließlich mit einer Canon Kamera fotografiert.

Die Banden wurden mit den Light-Cycler (LC) Ergebnissen verglichen. Hier entspricht ein niedriger C<sub>t</sub>-Wert (Cycle of threshold) im LC einer starken Bande im Gel.

### 2.2.5 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) beruht auf dem Mechanismus der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), bei der ein gewünschtes Gen der DNA mit Hilfe von den zugehörigen Primern und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) vervielfältigt wird. Mit der PCR können innerhalb kurzer Zeit kleinste Mengen von DNA-Abschnitten vervielfacht werden. Benötigt werden hierzu neben der cDNA die Primerpaare, Nukleotide, Puffer und eine thermostabile Polymerase. Die Primerpaare sind spezifisch für ein Gen, das während der PCR vervielfältigt werden soll. Die Vervielfältigung des spezifischen DNA-Abschnitts geschieht in drei Einzelschritten, die in mehreren Zyklen wiederholt werden. Nach einer Denaturierung, bei der sich der Doppelstrang der DNA trennt, folgt die Anlagerung (Annealing) der Nukleotide und schließlich die Elongation, Verlängerung des komplementären Stranges, durch die Polymerasen. Im optimalen Fall wird die cDNA nach jedem Zyklus verdoppelt. Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird durch den Fluoreszenzfarbstoff, SYBR-Green, zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA und emittiert nach der Bindung grünes Licht. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. So kann am Ende des Laufs mit Hilfe der Fluoreszenzsignale die Quantifizierung der DNA vorgenommen werden.

Für die qPCR wurde der empfohlene Ansatz von Invitrogen von 20µl auf 10 µl gesenkt. Als Mastermix, der sowohl Fluoreszenzfarbstoff als auch die Polymerasen enthält, wurde Power SYBR-Green PCR-Master-Mix von Invitrogen genutzt.

**Tabelle 15:** qPCR Ansatz

Reagenz	Menge pro Ansatz
Power SYBR- Green PCR Master Mix	5µl
Forward Primer	0,5µl
Revers Primer	1,5µl

Von dem Mastermix wurden 7µl pro well angesetzt. Von der zu testenden cDNA wurden pro well jeweils 3µl hinzugegeben.

Auf die 96-well-Platte wurde wie folgt pipettiert:

Die erste Reihe der 96-well-Platte wurde für die Kontrollen verwendet. Hier wurde für jedes Primerpaar von dem zuvor gemischten Mastermix 7µl in ein well der ersten Reihe pipettiert. Keine cDNA wurde hinzugegeben. Die Kontrollen dienten zum Ausschluss von Kontaminationen durch Fremd-DNA, die zu Verfälschungen des Ergebnisses führen würden.

In der zweiten Reihe wurde auf jeder Platte ein Triplet der Standardkurve pipettiert. Für die Standardkurve diente der Housekeeper Actin-beta (ACTB). Die Referenz-cDNA wurde aus gesundem Gehirngewebe gewonnen. Da zum Berechnen einer Standardkurve vier verschiedenen Punkte benötigt werden, wurden neben der Ursprungskonzentration der Referenz-cDNA auch vier Verdünnungsstufen hergestellt und von jeder Konzentration ein Triplet auf die Platte pipettiert.

Ab der dritten Reihe wurden dann die Test-cDNAs auf die Platte pipettiert. Auch hier wurde für jedes Primerpaar ein Triplet angelegt.

Als Gerät wurde der Light Cycler 480 von Roche genutzt.

Programm:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Messmodus</b>
1. Präinkubation	50°C	2 Minuten	
2. Ampilizierung	95°C	10 Minuten	
3. Quantifizierung	94°C	15 Sekunden	40x
	53°C	10 Sekunde	
	60°C	1 Minute	
4. Schmelzkurven	40°C	30 Sekunden	
	60°C	1 Sekunde	
	95°C	kontinuierlich	
5. Kühlung	40°C	10 Minuten	

### **2.2.5.1 Primer**

Die Primersequenzen wurden von Dr. Theo Kraus selbst designed und sind in Tabelle 8 zu finden.

### 2.2.5.2 Referenzgene

Als Referenzgene (housekeeper) bezeichnet man solche Gene, die konstant exprimiert werden. Es wird empfohlen den Mittelwert der Expression von mindestens zwei Referenzgene zu verwenden. Die hier verwendeten Referenzgene, TBP (TATA-Box-binding-Protein) und IPO8 (Importin 8) wurden von Kreth et al. als Gene mit konstantester Expression bei Glioblastomen beschrieben (2010).

### 2.2.5.3 Relative Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Genexpression wird der  $C_t$ -Wert (Cycle of threshold) verwendet. Der  $C_t$ -Wert beschreibt denjenigen Zyklus der qPCR, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Bei den vorigen Zyklen reichen die vervielfältigten DNA-Stränge noch nicht aus, um eine messbare Fluoreszenz zu erzeugen. Bei den folgenden Zyklen werden die dNTPs langsam verbraucht und die Polymerase erschöpft, was schließlich zu einer Plateauphase führt, in der sich der Fluoreszenzwert nicht mehr wesentlich ändert. Je niedriger der  $C_t$ -Wert ist, also je eher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto mehr Kopien des Zielgens sind schon vor der qPCR vorhanden.

Die Expressionsmuster der Enzyme bzw. die möglichen Änderungen der Expression nach der Behandlung der Zellen wurden mit Hilfe der vergleichenden  $C_t$ -Methode ( $\Delta\Delta CT$  Methode) berechnet. Da zum Vergleich der Expressionsmuster von behandelten Zellen und Kontrollzellen nicht die exakte Kopienzahl der cDNA der einzelnen Gene benötigt wird, sondern das Verhältnis der Expressionswerte der Versuchsgruppen zueinander, wurden die Werte relativ quantifiziert. Es wurde nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode gearbeitet. Hier wird nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Zielgruppe} - \Delta C_t \text{ Kontrollgruppe}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{(\Delta\Delta C_t)}$$

Da die Expressionsmuster aller Versuchsansätze, die teilweise auf verschiedenen Light Cycler-Platten vermessen wurden, im Bezug zu der gleichen Kontrollgruppe berechnet wurden, konnten alle Ansätze miteinander verglichen werden.

Als Referenzwert wurde in jedem Versuch der Mittelwert der beiden Referenzgene IPO8 und TBP verwendet. Als Zielgen der Kontrollgruppe wurde TET1 des ersten Ansatzes der Kontrollgruppe verwendet und als Referenzgen der Mittelwert von IPO8 und TBP desselben Ansatzes. Diese Anordnung wurde für jede Zelllinie und jeden Versuch gleich durchgeführt mit den jeweils zugehörigen Werten.

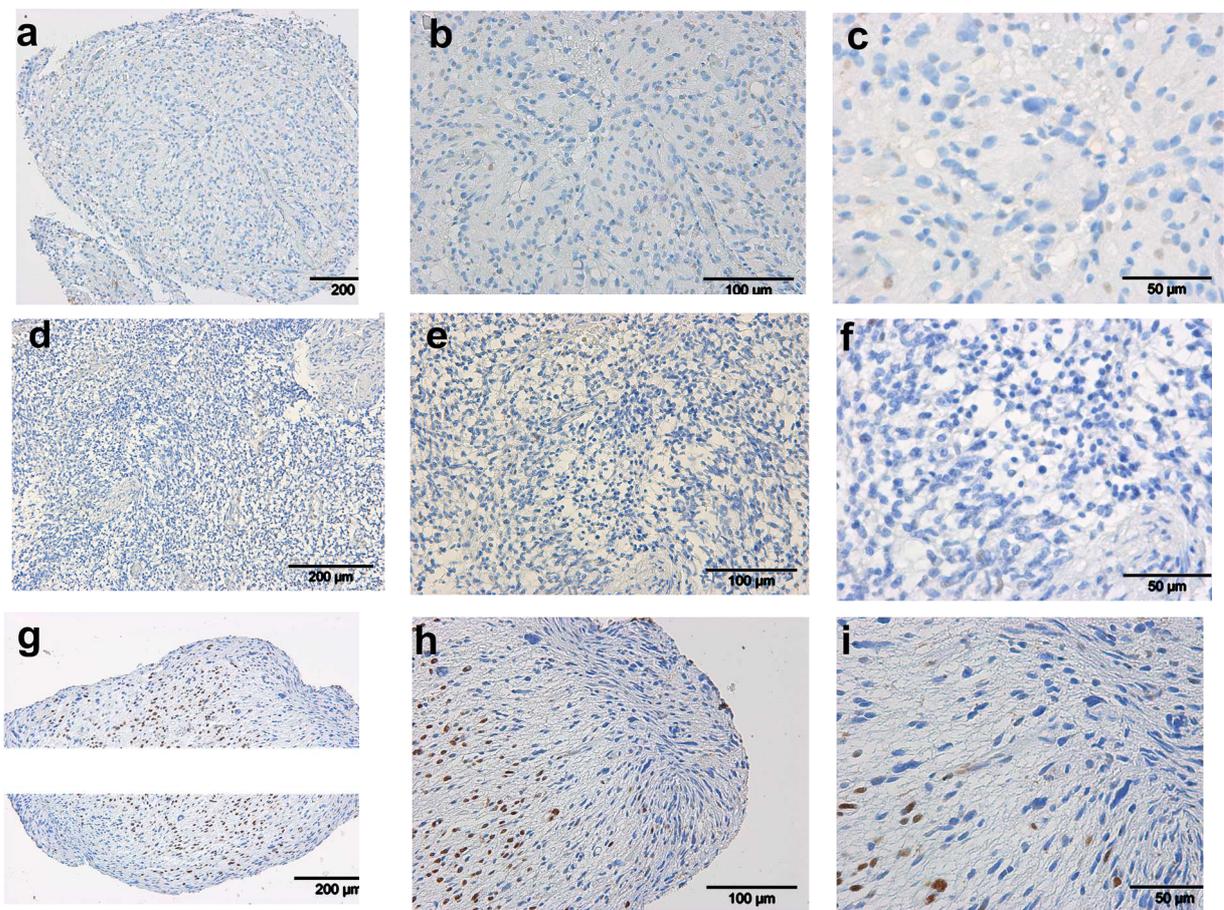
#### **2.2.5.4 Statistische Analysen**

Die berechneten Werte der relativen Expression wurden in GraphPad Prism ausgewertet. Erstellt wurde zunächst ein Übersichtsgraph, der die Expressionsmuster der Versuchsgruppen darstellte. Berechnet wurde hier mit dem ANOVA-Test. Zusätzlich wurden die Ratio-Werte der einzelnen Enzyme innerhalb der Versuchsgruppen im t-Test verglichen und in einzelnen Graphen dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden mit „\*“ als signifikant ( $p < 0,05$ ) und „\*\*“ als hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Histologie

In der histologischen Studie wurden Präparate von 94 verschiedenen Glioblastompatienten immunhistochemisch mit einem Antikörper auf 5-hmC gefärbt. Als Kontrolle dienten 5-hmC-Färbungen von Schnitten aus 10 verschiedenen gesunden Gehirngeweben.



**Abbildung 4:** Immunhistochemische Färbungen einiger Glioblastome mit Antikörper gegen 5-hmC. a-c Stereotaxie. d-f Biopsie. g-i Stereotaxie mit 5-hmC positiven Zellen. a,d,g) 10x Vergrößerung. b,e,f) 20x Vergrößerung. c,f,i) 40x Vergrößerung.

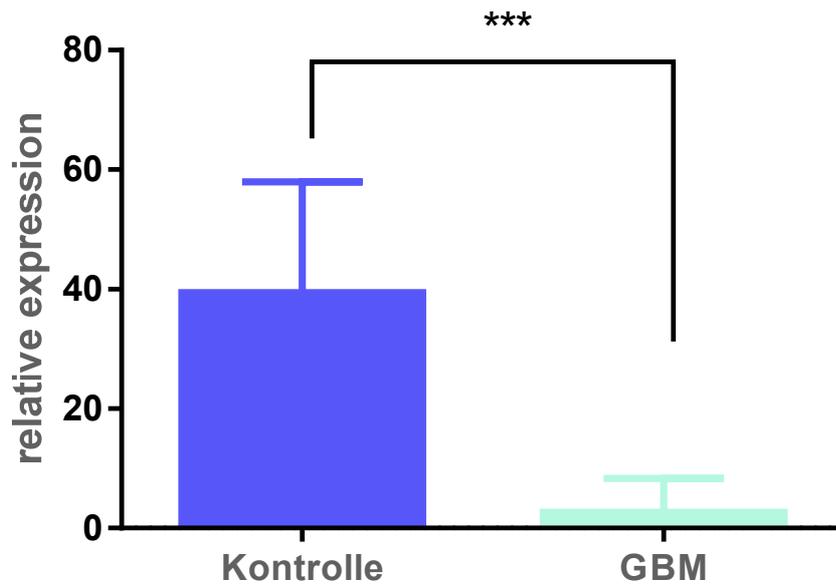
Nach Quantifizierung der 5-hmC positiven Zellen konnte das Patientenkollektiv nach dem medianen 5-hmC-Gehalt in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe mit weniger 5-hmC positiven Zellen (low-5-hmC-Gruppe; 5-hmC positive Zellen < 0,37%) und die Gruppe mit mehr 5-hmC positiven Zellen (high-5-hmC-Gruppe; 5-hmC positive

Zellen >0,37%). In der low-5-hmC-Gruppe fanden sich 70% männliche Patienten und 30% weibliche Patienten. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug 60 Jahre. Die genetische Analyse zeigte 17% MGMT-Promoter-Methylierungen und 2% IDH-Mutationen. Es zeigte sich ein medianes Überleben von 374 Tagen. Die high-5-hmC-Gruppe umfasste 58% männliche und 42% weibliche Patienten mit einem Durchschnittsalter bei Diagnosestellung von 61 Jahren und einer medianen Überlebenszeit von 443 Tagen. MGMT-Promoter-Methylierungen fanden sich in 33%, keine IDH-Mutationen. Die Kontrollgruppe umfasste 10 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren und 70% männlichen und 30% weiblichen Patienten.

**Tabelle 16:** Beschreibung des Patientenkollektivs

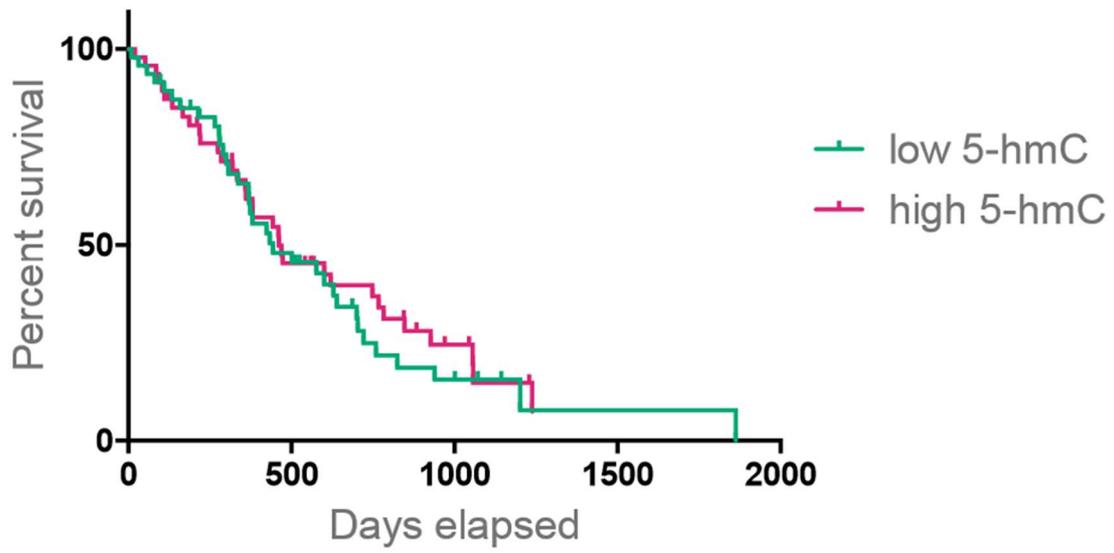
	Low-5-hmC-Gruppe		High-5-hmC-Gruppe		Kontrollgruppe
	Absolut	Relativ	Absolut	Relativ	
Anzahl Patienten	47		48		10
Durchschnittsalter	60		61		63
Männlich	33	70 %	28	58 %	70 %
Weiblich	14	30 %	20	42 %	30 %
MGMT methyliert	8	17 %	16	33 %	
MGMT nicht methyliert	22	47 %	11	23 %	
MGMT n.a.	17	36 %	21	44 %	
IDH-Mutation	1	2 %	0	0 %	
IDH nicht mutiert	42	89 %	42	88 %	
IDH-Status unklar	4	9 %	6	12 %	
LOH	2	4 %	1	2 %	
Kein LOH	16	34 %	16	33 %	
Isolierter Verlust 1p	2	4 %	2	4 %	
LOH-Status unklar	27	57 %	29	60 %	
Medianes Überleben nach Diagnosestellung(Tage)	374		443		

In GraphPad Prism wurden zunächst die 5-hmC positiven Zellen des Patientenkollektivs mit denen der Kontrollpräparate verglichen. Es konnte eine signifikant höhere Menge an 5-hmC positiven Zellen in der Kontrollgruppe festgestellt werden als in den Glioblastompräparaten.



**Abbildung 5:** Vergleich des 5-hmC-Gehalts zwischen gesundem Gehirngewebe (Kontrolle) und Glioblastomen (GBM). Die Kontrollpräparate wiesen durchschnittlich 39,4% 5-hmC positive Zellkerne auf. Die Glioblastompräparate hatten durchschnittlich 2,65% 5-hmC positive Zellkerne

Als nächstes wurde eine Kaplan-Mayer-Kurve erstellt und die Überlebenszeit nach Diagnosestellung der low-5hmC mit der high-5-hmC-Gruppe verglichen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit in den beiden Gruppen. Schaut man sich die Mutationsanalysen der beiden Gruppen an, fällt auf, dass in der high-5-hmC-Gruppe prozentual mehr MGMT-Promoter-Methylierungen vorliegen (33%) als in der low-5-hmC-Gruppe (17%). Die MGMT-Promoter-Methylierung ist mit einer besseren Prognose für die Patienten assoziiert, unter anderem durch ein besseres Therapieansprechen auf Chemotherapie (Hegi et al., 2005; Binabaj et al., 2018). Diese Auswirkung zeigt sich in der Überlebenskurve nicht.



**Abbildung 6:** Gesamtüberleben von Glioblastompatienten mit 5-hmC positiven Zellkernen von <0,37% (low-5-hmC-Gruppe) und >0,37% (high-5-hmC-Gruppe).

## **3.2 Zellkultur**

### **3.2.1 Versuche mit Retinsäure (RA)**

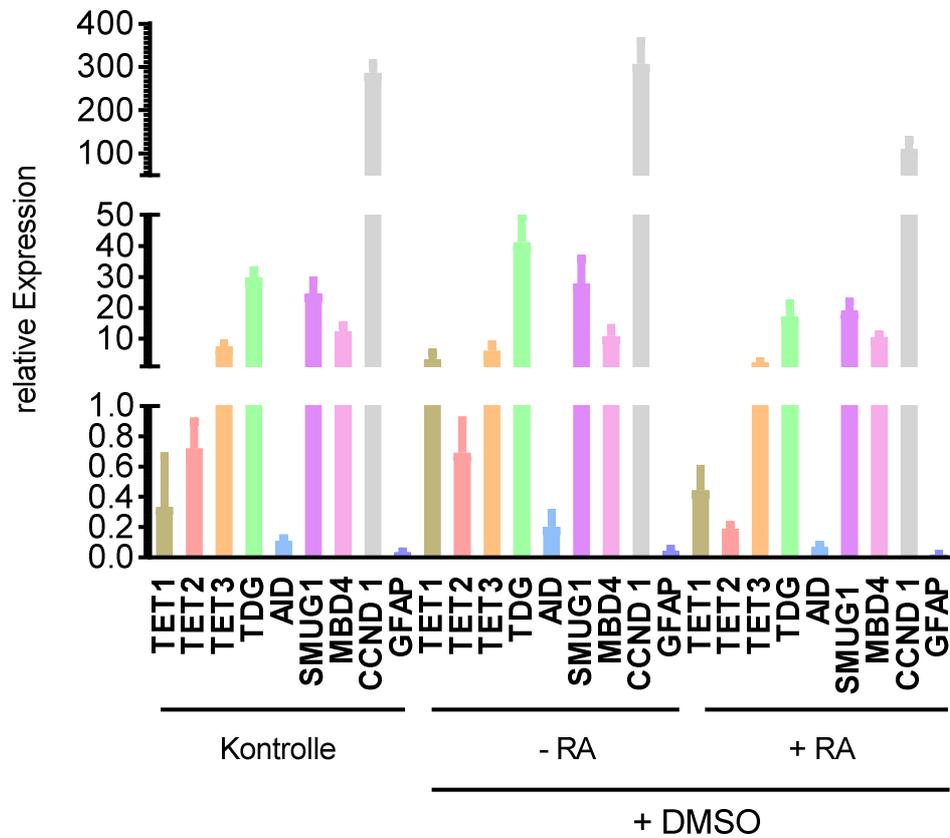
Retinsäure hat nachweislich Einfluss auf den Zellzyklusarrest und die Differenzierungsvorgänge in der Zelle. Die Ausgangsfrage für diesen Versuch war, ob sich die Tumorzellen nach Behandlung mit RA ausdifferenzieren, die Proliferation abnimmt und als Folge die Expression von TET-Enzymen zunimmt und damit die Bildung von 5-hmC ansteigt.

#### **3.2.1.1 Genexpressionsanalysen**

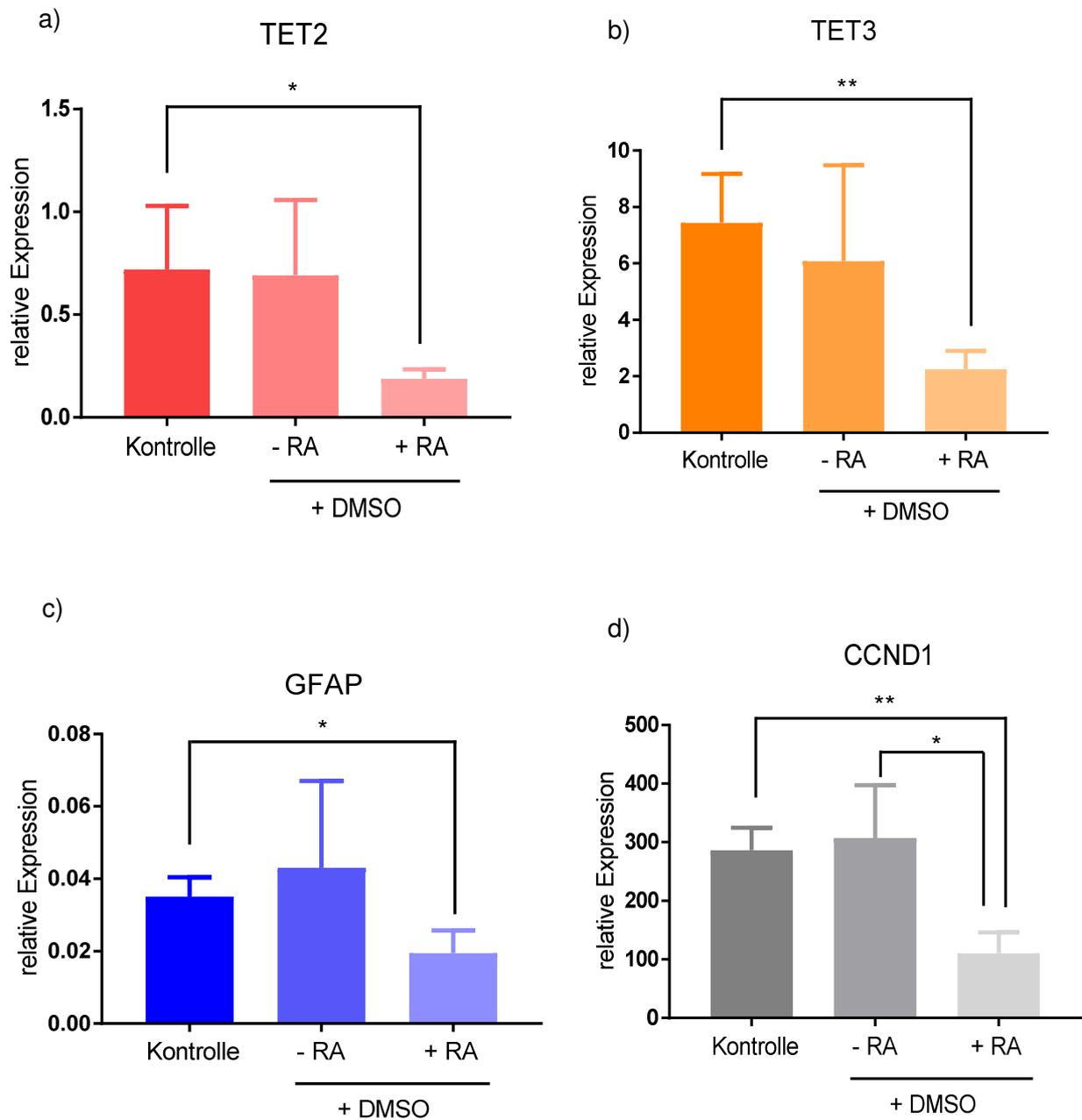
Mit Hilfe von qPCR wurden die Expressionsmuster der behandelten Zellen untersucht und mit den Ergebnissen der Kontrollzellen verglichen. Es wurden die Expression der 5-hmC bildenden Enzyme, TET1-3, der Abbauenzyme AICDA, TDG, MBD4 und SMUG1 und zwei Housekeepern, TBP und IPO8, untersucht. Zudem wurden die Proteine GFAP und CCND1 mituntersucht, um die Wirkung von RA zu bestätigen. Die Expression von CCND1 nimmt unter RA-Behandlung ab, die Expression von GFAP steigt (Ying et al., 2011).

Es wurden stets drei Versuchsansätze parallel geführt. Der Kontrollansatz wurde ohne jeglichen Zusatz geführt. Ein Ansatz wurde unter der Zugabe von DMSO (-RA+DMSO) kultiviert, da RA in DMSO gelöst wird und so ein Effekt von DMSO auf die Zellen ausgeschlossen werden sollte. Der dritte Ansatz wurde mit RA und DMSO behandelt (+RA+DMSO) behandelt. Es ergaben sich einige signifikante Unterschiede in der Enzymexpression zwischen den mit RA behandelten Zellen und den Kontrollzellen (-RA/-DMSO). Zwischen den Kontrollzellen und den mit DMSO kultivierten Zellen ergaben sich keine Signifikanzen, sodass ein möglicher Effekt von DMSO auf die Enzymexpression ausgeschlossen wurde.

Für die LN71-Zelllinie ergab sich eine signifikante Expressionsminderung von CCND1 bei den RA-behandelten Zellen. Außerdem zeigte sich eine Expressionsabnahme der TET2-, TET3-Enzyme und von GFAP bei den RA-behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen (-RA/-DMSO).



**Abbildung 7:** Übersichtgraph der Genexpressionen der Zelllinie LN71. Kultivierung von Glioblastomzellen für 10 Tage mit Retinsäure. Als Kontrollen: 1 Ansatz ohne Zusatz (Kontrolle), 1 Ansatz mit DMSO ohne RA (-RA +DMSO); 1 Ansatz inkubiert mit Retinsäure. Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgene der Kontrollgruppe: TET1 des ersten Ansatzes der Kontrollgruppe.



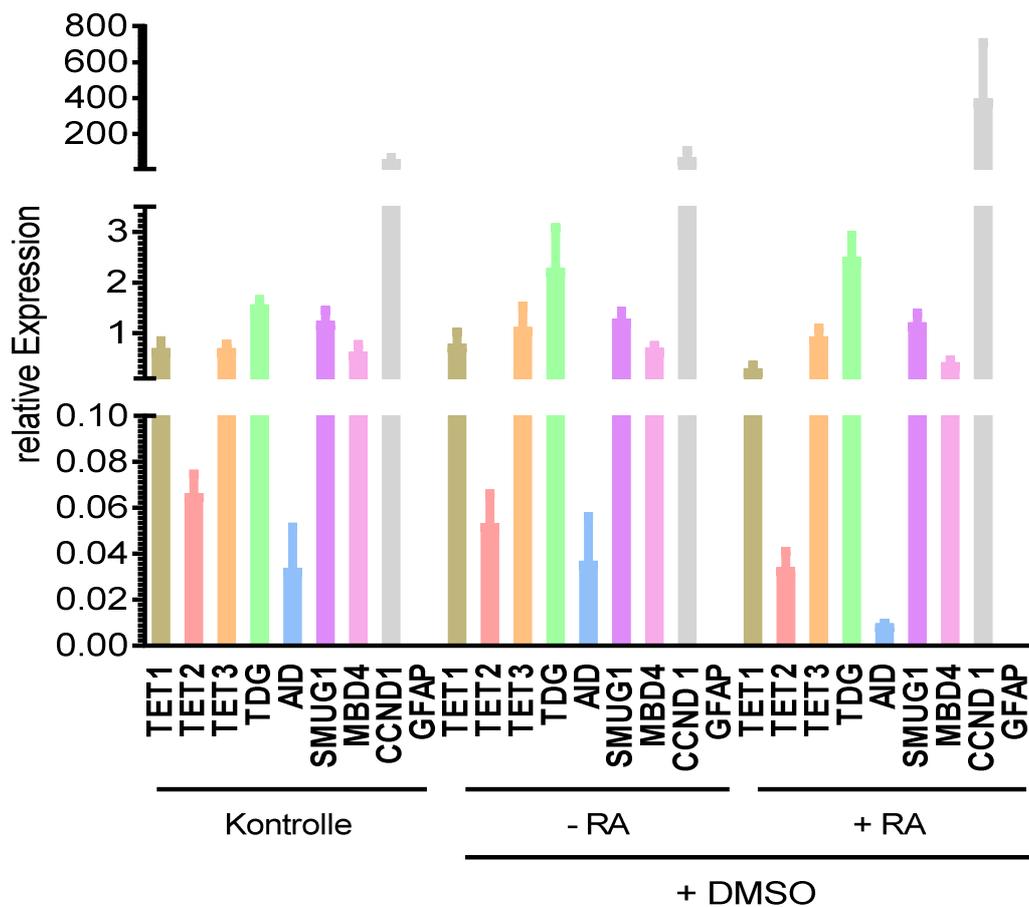
**Abbildung 8:** Einzelanalyse der Genexpressionen der Zelllinie LN71. Kultivierung von Glioblastomzellen für 10 Tage mit RA. Als Kontrollen: 1 Ansatz ohne Zusatz (Kontrolle), 1 Ansatz mit DMSO ohne RA (-RA +DMSO). 1 Ansatz inkubiert mit Retinsäure (+RA). Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratoren der Kontrollgruppe: TET1 des ersten Ansatzes der Kontrollgruppe . a) TET2-Expression; b) TET3- Expression; c) GFAP-Expression; d) CyclinD1-Expression; p-Werte s. Tab.17

Die Expressionswerte der einzelnen Enzyme wurden innerhalb der drei Versuchsgruppen mittels t-Test verglichen. Die Signifikanzen für die LN71 sind in folgender Tabelle abgebildet.

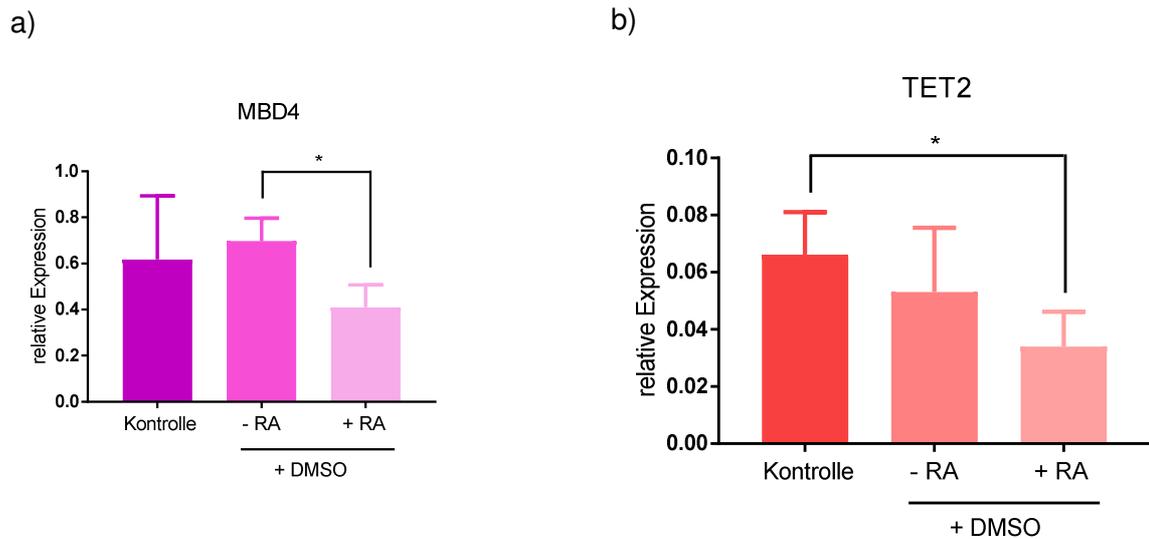
**Tabelle 17:** Signifikanzen für die Zelllinie LN 71 nach RA-Behandlung

Gen	p-Werte		
	Kontrolle ↔ +RA	-RA ↔ +RA	Kontrolle ↔ -RA
CCND1	<b>0,0042 (**)</b>	<b>0,024 (*)</b>	0,73
TET3	<b>0,0081 (**)</b>	0,1269	0,5713
TET2	<b>0,0423 (*)</b>	0,078	0,9252
GFAP	<b>0,0299 (*)</b>	0,1749	0,6062

Nach der Auswertung der LN319 konnte keine signifikante Expressionsabnahme von CCND1 beobachtet werden. Hier zeigten sich allerdings signifikante Änderungen der TET2- und MBD4-Expression, die bei den RA-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen abnahm.



**Abbildung 9:** Übersichtsgraph der Genexpressionen der Zelllinie LN319. Kultivierung von Glioblastomzellen für 10 Tage mit Retinsäure (RA). Als Kontrollen: 1 Ansatz ohne Zusatz (Kontrolle), 1 Ansatz mit DMSO ohne RA (-RA +DMSO). 1 Ansatz inkubiert mit Retinsäure (+RA). Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten Ansatzes der Kontrollgruppe.



**Abbildung 10:** Einzelanalysen der Genexpressionen der Zelllinie LN319. Kultivierung von Glioblastomzellen für 10 Tage mit Retinsäure (RA). Als Kontrollen: Ansatz ohne Zusatz (Kontrolle), Ansatz mit DMSO ohne RA (-RA +DMSO). 1 Ansatz inkubiert mit Retinsäure (RA). Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten Ansatzes der Kontrollgruppe a) MBD4-Expression; b) TET2- Expression. p-Werte s. Tab. 18

Die Signifikanzniveaus für die LN319 sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 18:** Signifikanzen für die Zelllinie LN 319 nach RA-Behandlung

Gen	p-Werte		
	K ↔ +RA	-RA ↔ +RA	K ↔ -RA
TET2	<b>0,0448 (*)</b>	0,2647	0,4508
MBD4	0,2835	<b>0,0233 (*)</b>	0,6649

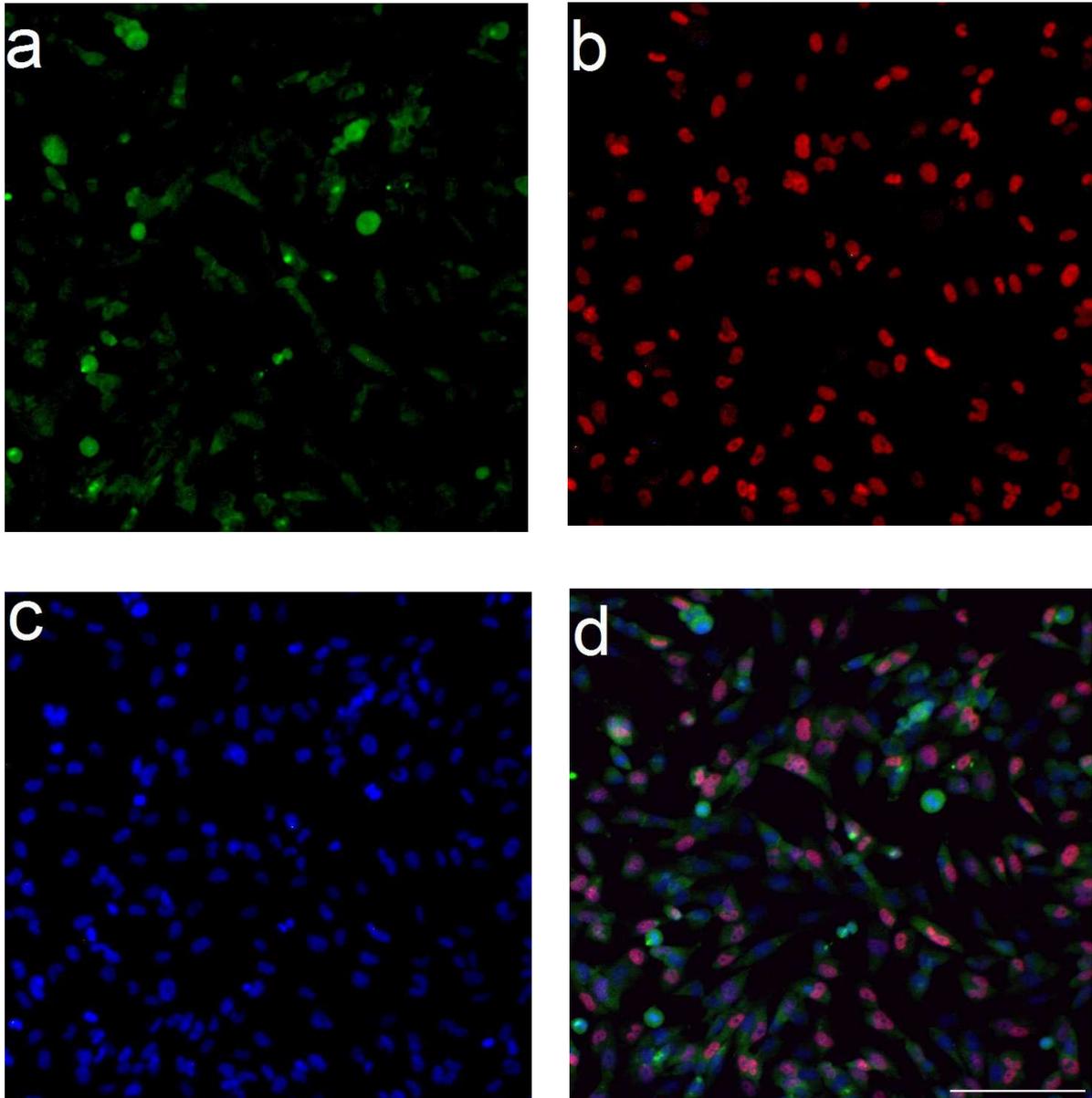
Zur besseren Übersicht der relativen Änderungen der Enzymexpression der zwei Zelllinien und den verschiedenen Ansätzen sind die relativen Differenzen in Tabelle 19 zusammengefasst.

**Tabelle 19:** Relative Differenzen der Enzymexpressionen, sowie GFAP-Expression, der Zelllinie LN71 und LN319 im Vergleich, nach RA-Behandlung

Enzym	Ansatz	LN71	LN319
TET1	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,9	0,11
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,24	0,58
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,87	0,62
TET2	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,04	0,2
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,74	0,49
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,73	0,36
TET3	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,18	0,37
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,7	0,25
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,63	0,16
TDG	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,28	0,32
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,42	0,38
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,58	0,08
AID	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,47	0,08
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,37	0,71
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,67	0,74
SMUG1	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,12	0,03
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,22	0,02
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,31	0,05
MBD4	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,13	0,11
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,15	0,34
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,03	0,41
CCND1	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,06	0,19
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,61	0,86
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,64	0,82
GFAP	Kontrolle vs (-RA+DMSO)	0,18	0,04
	Kontrolle vs (+RA+DMSO)	0,45	0,22
	(-RA +DMSO) vs (+ RA+DMSO)	0,55	0,18

### 3.2.1.2 Immunfluoreszenzfärbung

Neben den Expressionsanalysen wurden die Zellen in der Immunfluoreszenz mit EdU, als Proliferationsmarker, und 5-hmC kogefärbt. Nach Fotografieren der Zellen wurden die EdU positiven und 5-hmC positiven Zellen in Bezug auf den Zellkernmarker DAPI quantifiziert.



**Abbildung 11:** Fluoreszenzfärbung von LN319 (-RA/+DMSO) a) 5-hmC. b) EdU. c) DAPI. d) Fusionsbild. Maßstab beträgt 100µm

**Tabelle 20:** Quantifizierung der Immunfluoreszenz von LN71 nach RA Behandlung

<b>Ansatz</b>	<b>DAPI (abs.)</b>	<b>EdU (abs.)</b>	<b>5-hmC (abs.)</b>	<b>EdU/DAPI [%]</b>	<b>5-hmC/DAPI [%]</b>
LN71 +RA I	176	87	11	49,43	6,25
LN71 +RA II	93	44	5	47,31	5,38
LN71+RA III	145	55	4	37,93	2,76
<b>Mittelwert</b>	<b>138</b>	<b>62</b>	<b>6,67</b>	<b>44,93</b>	<b>4,83</b>
LN71 –RA I	167	86	8	51,49	4,79
LN71 –RA II	195	84	12	43,08	6,15
LN71–RA III	147	57	5	38,78	3,40
<b>Mittelwert</b>	<b>169,67</b>	<b>75,67</b>	<b>8,33</b>	<b>44,6</b>	<b>4,91</b>
LN71 K I	190	91	6	47,89	3,16
LN71 K II	258	120	7	46,51	2,71
LN71 K III	135	65	10	48,15	7,41
<b>Mittelwert</b>	<b>194,33</b>	<b>92</b>	<b>7,67</b>	<b>47,34</b>	<b>3,95</b>

**Tabelle 21:** Quantifizierung der Immunfluoreszenz von LN319 nach RA-Behandlung

<b>Ansatz</b>	<b>DAPI (abs.)</b>	<b>EdU (abs.)</b>	<b>5-hmC (abs.)</b>	<b>EdU/DAPI [%]</b>	<b>5-hmC/DAPI [%]</b>
LN319 +RA I	349	147	8	42,12	2,29
LN319 +RA II	246	130	9	52,85	3,66
LN319 +RA III	155	85	2	54,84	1,29
<b>Mittelwert</b>	<b>250</b>	<b>120,67</b>	<b>6,33</b>	<b>48,27</b>	<b>2,53</b>
LN319 –RA I	243	122	13	50,21	5,35
LN319 –RA II	328	158	8	48,17	2,44
LN319 –RA III	272	139	8	51,10	2,94
<b>Mittelwert</b>	<b>281</b>	<b>139,67</b>	<b>9,67</b>	<b>49,707</b>	<b>3,447</b>
LN319 K I	161	98	5	60,87	3,11

LN319 K II	186	94	4	50,54	2,15
LN319 K III	147	90	2	61,22	1,36
<b>Mittelwert</b>	<b>164,6666667</b>	<b>94</b>	<b>3,67</b>	<b>57,09</b>	<b>2,23</b>

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der EdU- oder 5-hmC-Quantität zwischen den einzelnen Ansätzen. Nach Vergleich der einzelnen Gruppen im t-Test ergaben sich folgende Signifikanzen (s.Tab.22).

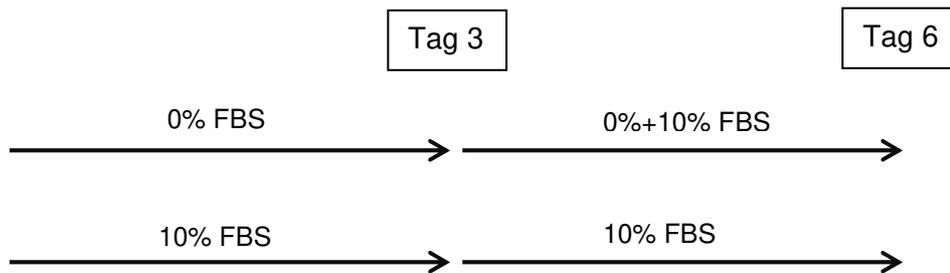
**Tabelle 22:** Signifikanzniveaus der quantifizierten EdU und 5-hmC-Werte für LN71 und LN319

Ansatz	p-Werte		
	K↔ +RA	+RA↔ -RA	K↔ -RA
LN71 EdU	0,5	0,936	0,46
LN71 5-hmC	0,85	0,99	0,84
LN319 EdU	0,22	0,98	0,099
LN319 5-hmC	0,82	0,362	0,25

In der qPCR wurde bei der LN319 die Abnahme der TET2- und TET3-Expression beobachtet, was zu einer Abnahme in der Bildung von 5-hmC führen sollte. Nach der Färbung ergaben sich jedoch für die 5-hmC-Quantität keine signifikanten Unterschiede.

### 3.2.2 Versuche mit Serum-freiem Medium

Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien angesetzt, LN401 und U87. Die Zellen wurden für drei Tage in fünf parallel geführten Ansätzen mit Serum-freiem Medium kultiviert. Nach drei Tagen wurden Zellen für RNA-Extraktion und Immunfluoreszenzfärbung abgenommen. Die restlichen Zellen wurden für weitere 3 Tage mit Standardmedium (10%FBS) weiter kultiviert. Über die ganze Zeit wurden 5 Kontrollansätze in Standardmedium parallel mitgeführt.



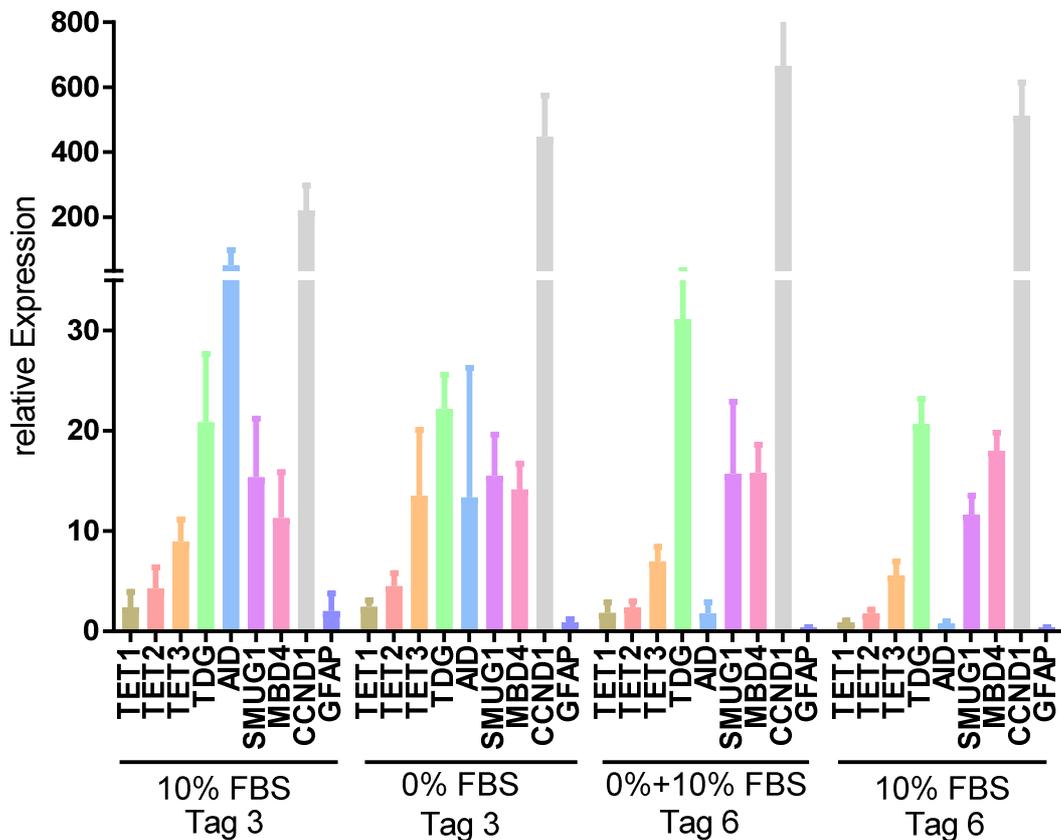
**Abbildung 12:** Versuchsaufbau der Zellkulturversuche mit Serum-freiem Medium. Die Zellen wurden bis Tag 3 in Serum-freiem Medium kultiviert (0% FBS). Nach Tag 3 wurde RNA gewonnen und Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die Zellen wurden nun mit 10% FBS rekultiviert (0%+10% FBS) und an Tag 6 gleich verfahren. Die Kontrolle (10%FBS) wurde einmal an Tag 3 und einmal an Tag 6 abgenommen.

#### 3.2.2.1 U87-Zelllinie

##### 3.2.2.1.1 Genexpressionsanalysen

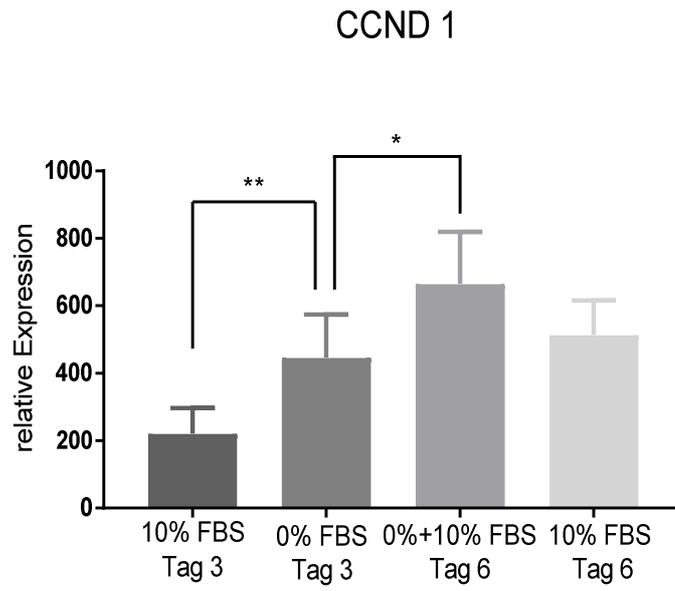
Die Ergebnisse der qPCR wurden auch hier mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet und in GraphPad Prism mit dem ANOVA-Test ausgewertet. In einem Übersichtsgraph wurden alle drei Versuchsgruppen dargestellt. Es gab die Kontrollgruppe (10%FBS), in Standardmedium kultiviert, Zellen, die in Serum-freiem Medium (0%FBS) kultiviert wurden und die Gruppe der Zellen, die nach Kultivierung in Serum-freiem Medium anschließend in Standardmedium (0%+10% FBS) weitergeführt wurden. Die Werte der einzelnen Enzyme wurden im t-Test miteinander verglichen und in separaten Graphen dargestellt.

Die Zellen, die in Serum-freiem Medium kultiviert wurden, zeigten eine Expressionszunahme von CCND1 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zwischen diesen beiden Ansätzen ergaben sich keine weiteren Signifikanzen. Allerdings zeigten sich weitere Signifikanzen zwischen den in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen und denen, die in 10% FBS rekultiviert wurden. Eine Expressionsabnahme bei den rekultivierten Zellen war zu beobachten für das Enzym TET2 und den Differenzierungsmarker GFAP. Eine Expressionszunahme ergab sich für die Enzyme TDG und CCND1. Im Folgenden werden zunächst in einem Übersichtsgraph die Expressionsmuster aller Ansätze und Enzyme dargestellt und in einzelnen Graphen, diese Enzyme im Detail, bei denen sich Expressionsänderungen zeigten.

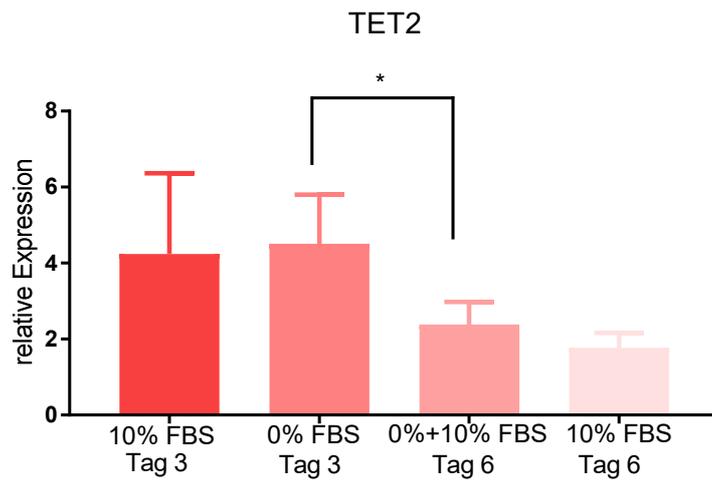


**Abbildung 13:** Übersichtsgraph der Genexpressionen der Zelllinie U87. Kultivierung von Glioblastomzellen in Serum-freiem Medium für 3 Tage (0%FBS), danach Rekultivierung mit 10% FBS für 3 Tage (0%+10%FBS). Kontrollgruppe (10%FBS) von Tag 3 und Tag 6. Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten von fünf Ansätzen der Kontrollgruppe (10%FBS).

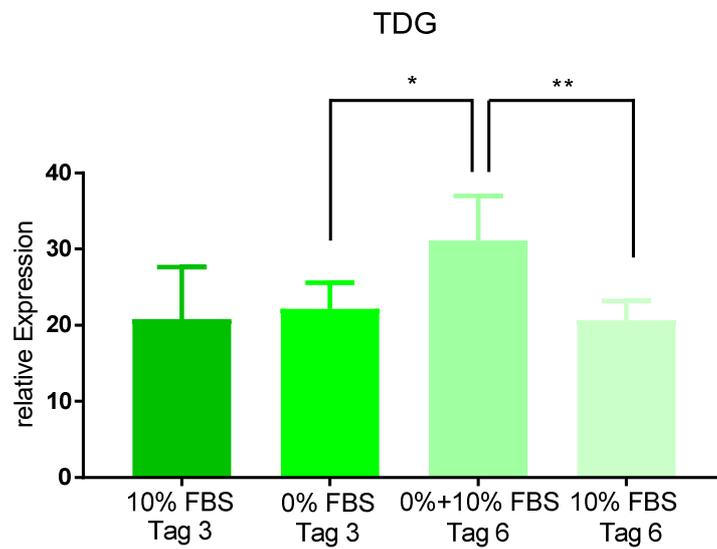
a)

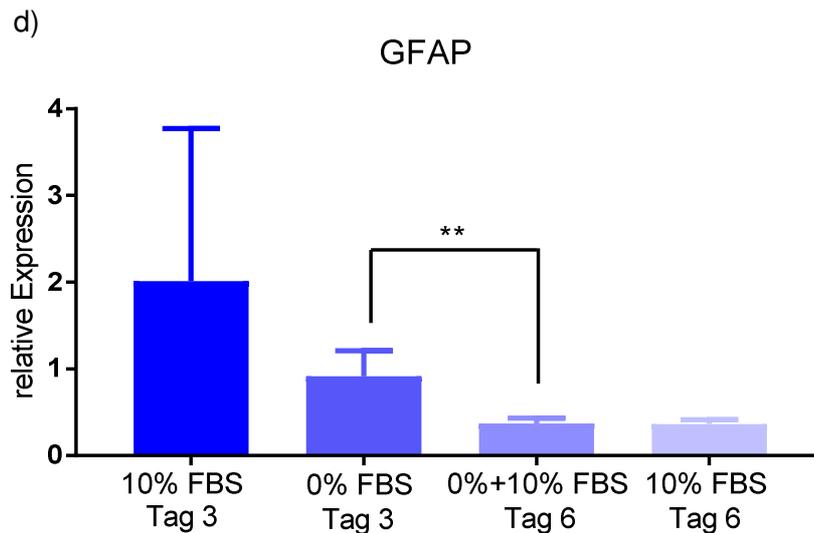


b)



c)





**Abbildung 14:** Einzelanalysen der Genexpressionen der Zelllinie U87. Kultivierung von Glioblastomzellen in Serum-freiem Medium für 3 Tage (0%FBS), danach Reaktivierung mit 10% FBS für 3 Tage (0%+10%FBS). Kontrollgruppe (10%FBS) von Tag 3 und Tag 6. Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten von fünf Ansätzen der Kontrollgruppe (10%FBS). a) CyclinD1-Expression; b) TET2-Expression; c) TDG-Expression; d) GFAP-Expression; Signifikanzniveaus s.Tab. 23

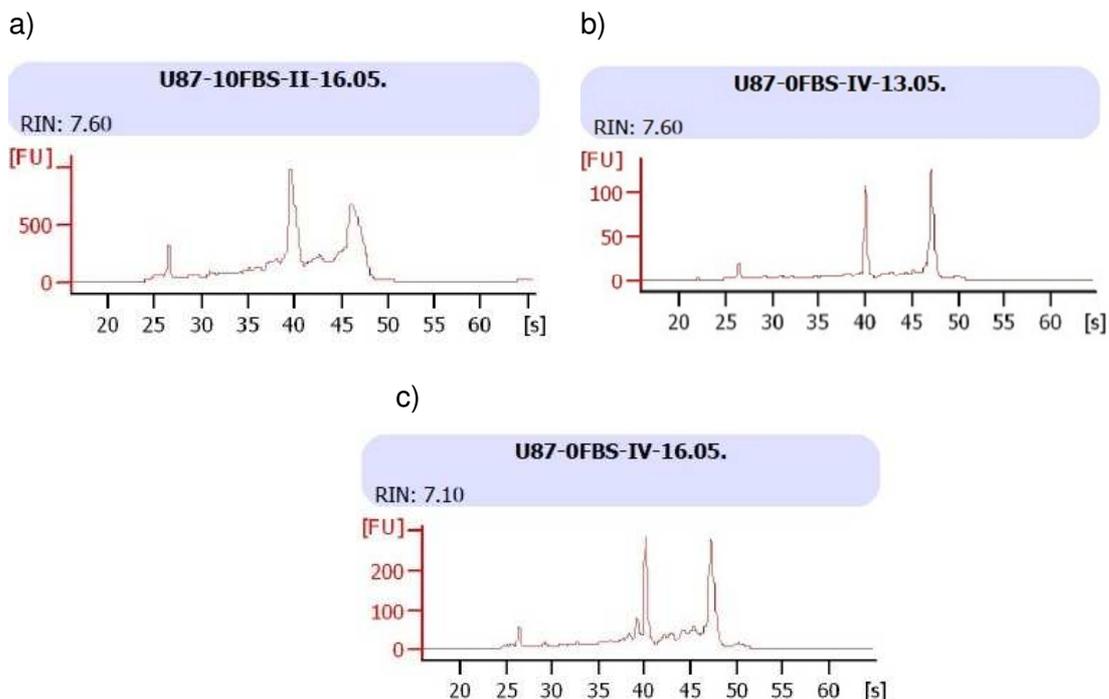
Die Signifikanzen der Enzymexpressionen sind in der untenstehenden Tabelle abgebildet.

**Tabelle 23:** Signifikanzniveaus (p-Werte) der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium

Enzym	p-Werte		
	10%FBS vs 0%FBS	0%FBS vs 0%+10%FBS	0%+10%FBS vs 10%FBS
CCND1	<b>0,0095 (**)</b>	<b>0,0402 (*)</b>	0,1025
TET 2	0,8152	<b>0,0104 (*)</b>	0,0916
TDG	0,7083	<b>0,0186 (*)</b>	<b>0,0064 (**)</b>
GFAP	0,2079	<b>0,0038 (**)</b>	0,8621

### 3.2.2.1.2 Qualitätsmessung der RNA

Die extrahierte RNA, die für die reverse Transkription zur Gewinnung der cDNA weiterverwendet wurde, wurde mit Hilfe des Bioanalyzers 2100 von Agilent Technologies auf ihre Qualität überprüft. Der Bioanalyzer bestimmt die RIN (Schröder et al., 2006). Diese kann Werte zwischen 0 und 10 annehmen und gibt Auskunft über die Stabilität der RNA. Bei Werten zwischen sechs und zehn kann man von einer guten Stabilität ausgehen und annehmen, dass die Ergebnisse der qPCR nicht durch Abbauprodukte der RNA verfälscht wurden. Dadurch, dass die RIN-Werte der verglichenen Versuchsgruppen nicht stark voneinander abweichen, sind auch die Ergebnisse vergleichbar. Für die Kontrolle und die in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen ergaben sich RIN-Werte von 7,6, für die in Standardmedium rekultivierten Zellen ein Wert von 7,1.



**Abbildung 15:** RIN-Werte der U87 nach Hungern. a) RIN der Kontrolle (10%). B RIN der Serum-frei kultivierten Zellen (0%). c) RIN der in Standardmedium rekultivierten Zellen (0%+10%).

### 3.2.2.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

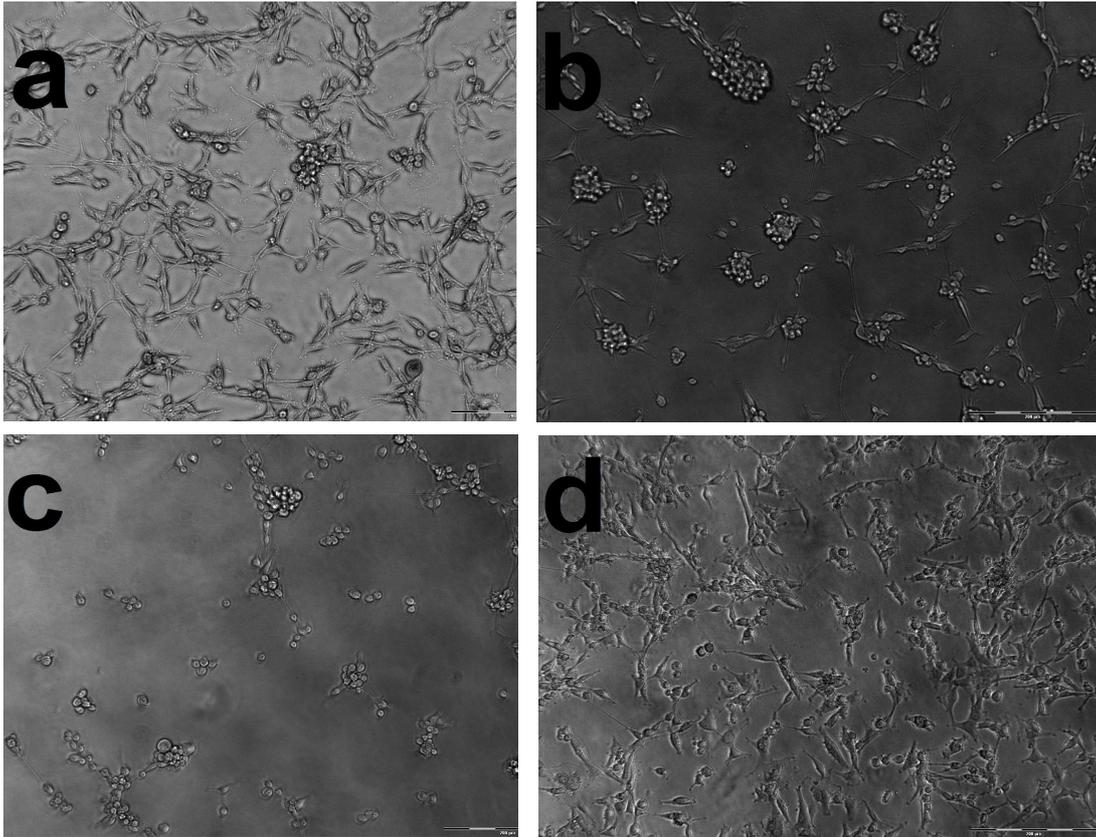
Von jedem Versuchsansatz wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt und die EdU bzw. 5-hmC positiven Zellen quantifiziert.

**Tabelle 24:** Quantifizierung der Immunfluoreszenz der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium

<b>Ansatz</b>	<b>DAPI</b> (abs.)	<b>EdU</b> (abs.)	<b>5-hmC</b> (abs.)	<b>EdU/DAPI</b> [%]	<b>5-hmC/DAPI</b> [%]
U87 10% I	119	26	0	21,85	0
U87 10% II	118	26	0	22,03	0
U87 10% III	55	20	0	36,36	0
U87 10% IV	60	16	0	26,67	0
U87 10% V	88	19	0	21,59	0
<b>Mittelwert</b>	<b>88</b>	<b>21,4</b>	<b>0</b>	<b>25,70</b>	<b>0</b>
U87 0% I	7	0	7	0	0
U87 0% II	11	1	5	9,09	0
U87 0% III	10	1	7	10	0
U87 0% IV	20	0	0	0	0
U87 0% V	15	15	0	0	0
<b>Mittelwert</b>	<b>12,6</b>	<b>6,8</b>	<b>0,4</b>	<b>3,82</b>	<b>0</b>
U87 0%+10% I	66	22	14	33,33	0
U87 0%+10% II	67	14	0	20,89	0
U87 0%+10% III	78	21	0	26,92	0
U87 0%+10% IV	52	11	0	21,15	0
U87 0%+10% V	29	17	0	58,62	0
<b>Mittelwert</b>	<b>58,4</b>	<b>17</b>	<b>2,8</b>	<b>32,19</b>	<b>0</b>

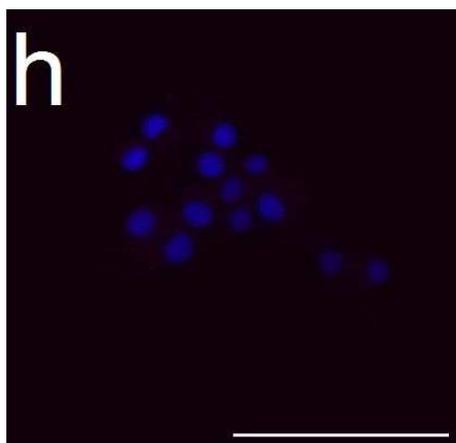
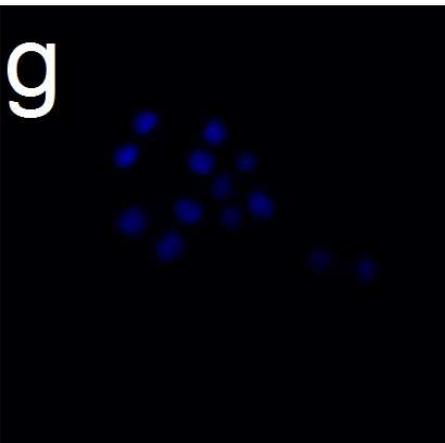
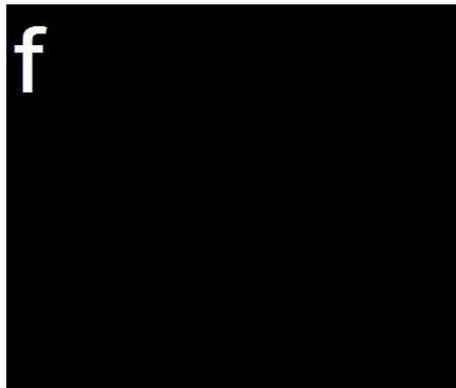
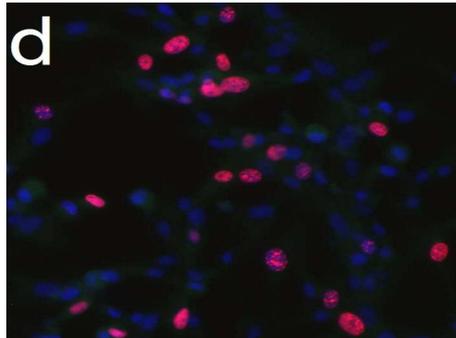
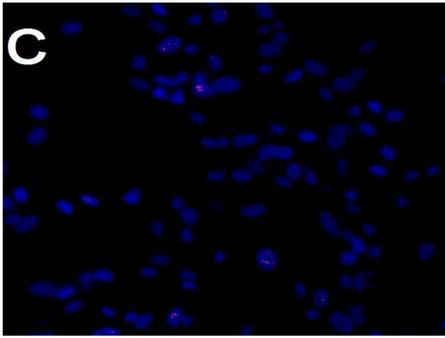
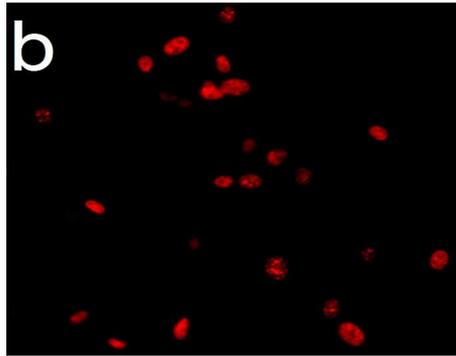
Die Auszählung der EdU positiven Zellen zeigt eine Abnahme der Proliferation bei Zellen, die Serum-frei kultiviert wurden. Wurden die Zellen in nährreichem Medium wieder rekultiviert stieg die Proliferationsrate an.

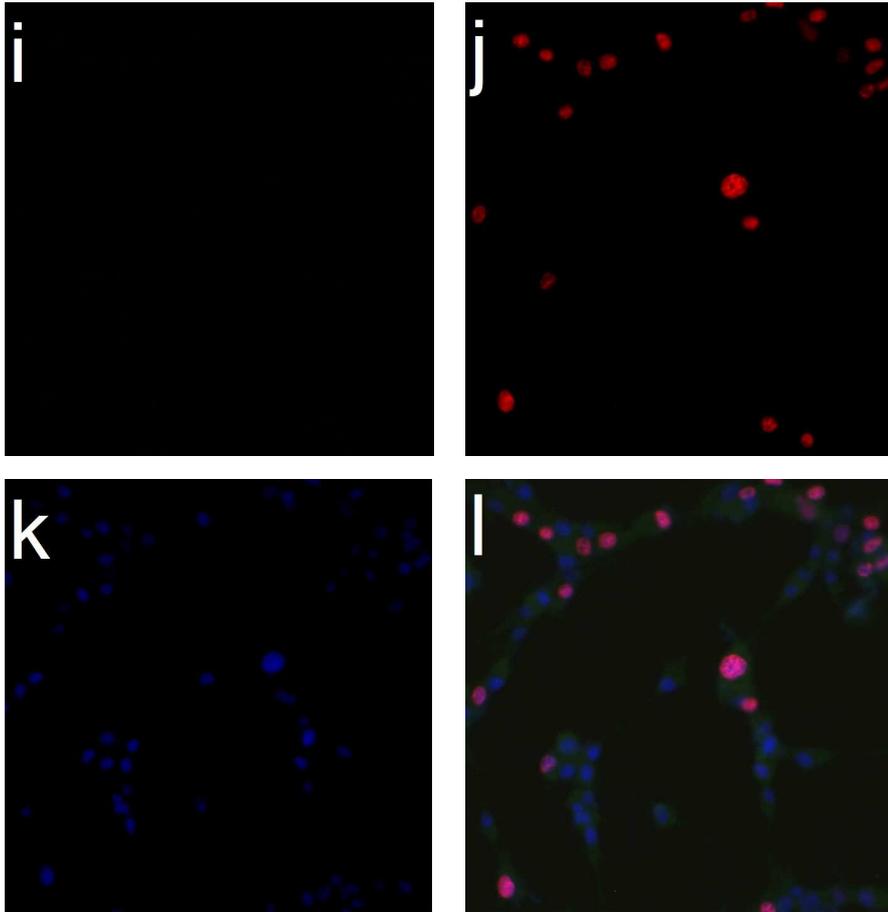
Es wurden Phasenkontrastbilder während des Verlaufs des Versuchs angefertigt. Schon nach dem ersten Tag in Serum-freien Medium zeigen die Zellen deutliche morphologische Veränderungen. Werden die Zellen dann jedoch wieder mit normalem Medium kultiviert, erholen sie sich relativ schnell und zeigen die gleiche Morphologie wie die Kontrollzellen.



**Abbildung 16:** Phasenkontrastbilder der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium. a) Kontrollzellen (10% FBS). b) Zellen nach einem Tag in Serum-freiem Medium (0%FBS). c) Zellen nach drei Tagen im Serum-freien Medium (0%FBS). d) in Standardmedium rekultivierte Zellen (0%+10%FBS). Maßstab: 200µm.

In Abbildung 17 ist der Unterschied in der Fluoreszenzfärbung zwischen Kontrollzellen, Serum-frei kultivierten Zellen und in Standardmedium rekultivierten Zellen sichtbar. Die Zellen, die Serum-frei gezüchtet wurden exprimierten signifikant weniger EdU als die Kontrollzellen. EdU positive Zellen sind wenige vorhanden und auch die Zelldichte sinkt. Sobald die Zellen jedoch unter normalen Bedingungen rekultiviert werden, erhöht sich die Proliferation, mehr EdU positive Zellen können detektiert werden und die Zelldichte steigt. 5-hmC positive Zellen konnten bei keinem Ansatz detektiert werden.



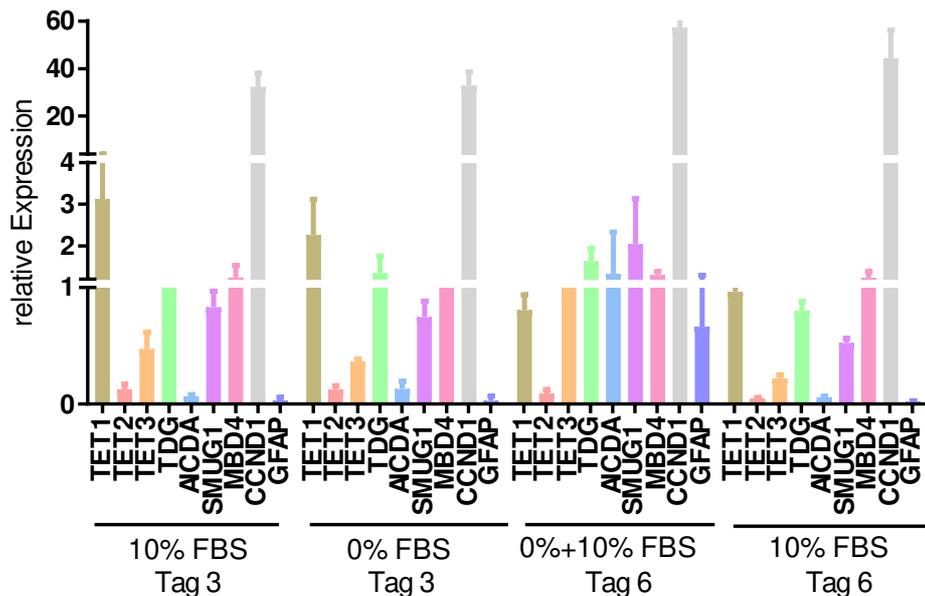


**Abbildung 17:** Immunfluoreszenz der Zelllinie U87 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium. a-d: Kontrolle (10%FBS). e-h: Serum-frei kultivierte Zellen (0%FBS). i-l: in Standardmedium rekultivierte Zellen (0%+10%). a,e,i) 5-hmC, b,f,j) EdU, c,g,k) DAPI, d,h,l) Fusionsbild, Maßstab: 100µm

### 3.2.2.2 LN401-Zelllinie

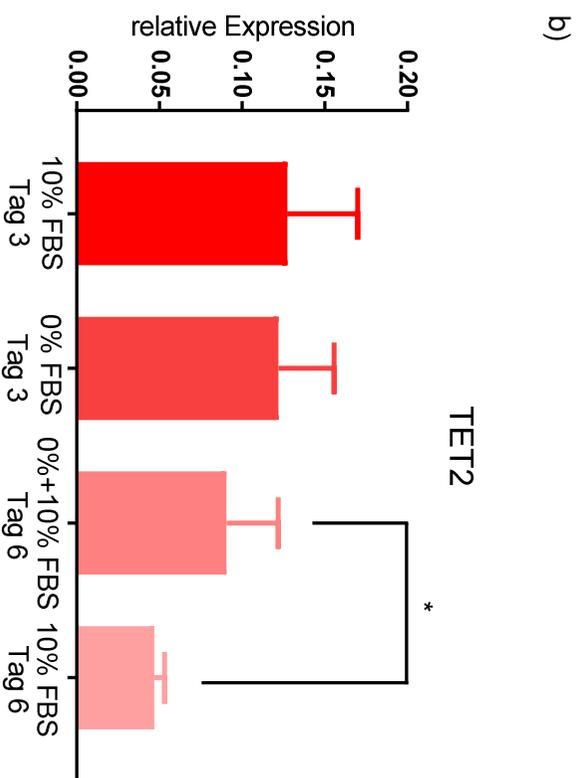
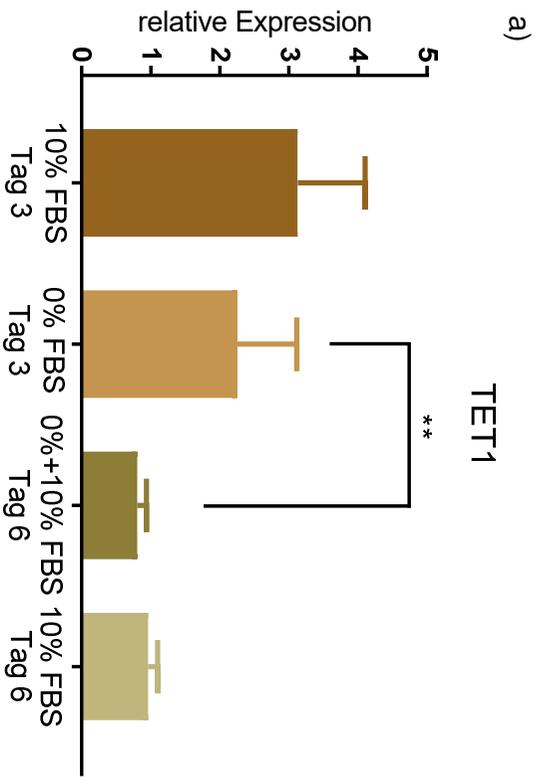
#### 3.2.2.2.1 Genexpressionsanalysen

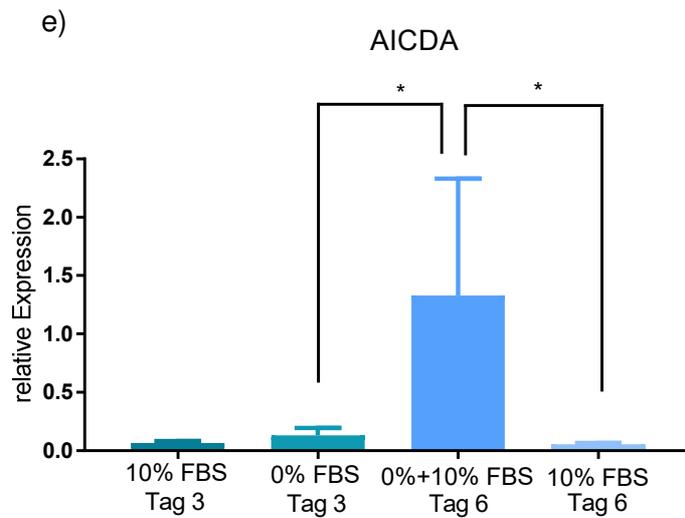
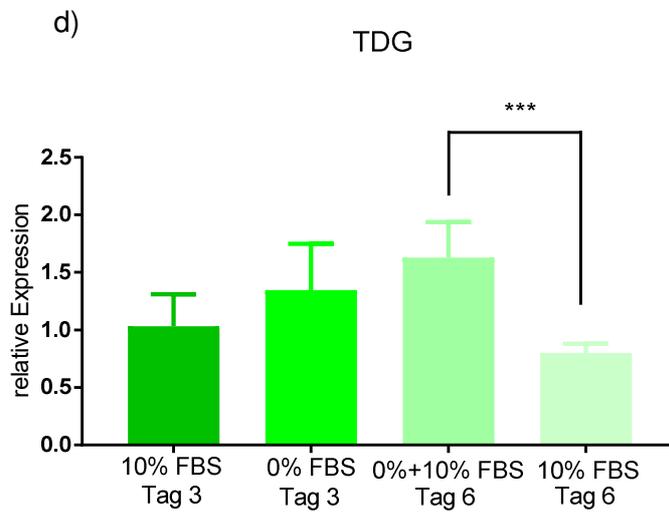
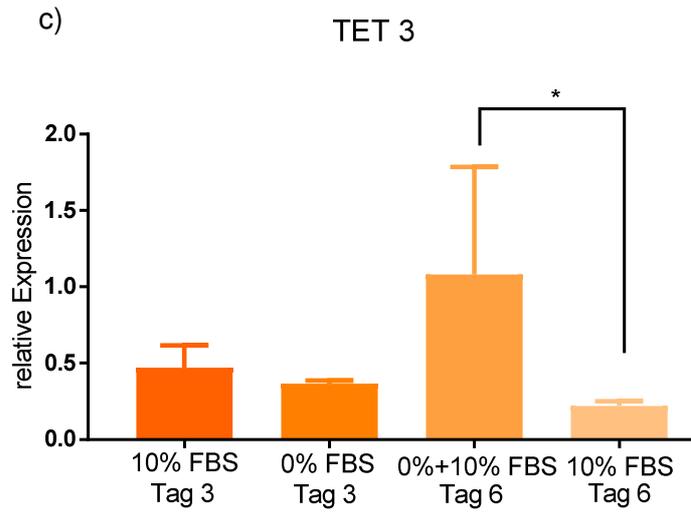
Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden auch für die LN401 mit GraphPad Prism ausgewertet und sowohl Übersichtsgraphen (s. Abb.18) als auch Graphen für die Enzyme, bei denen eine Veränderung beobachtet werden konnte (s. Abb.19), erstellt.

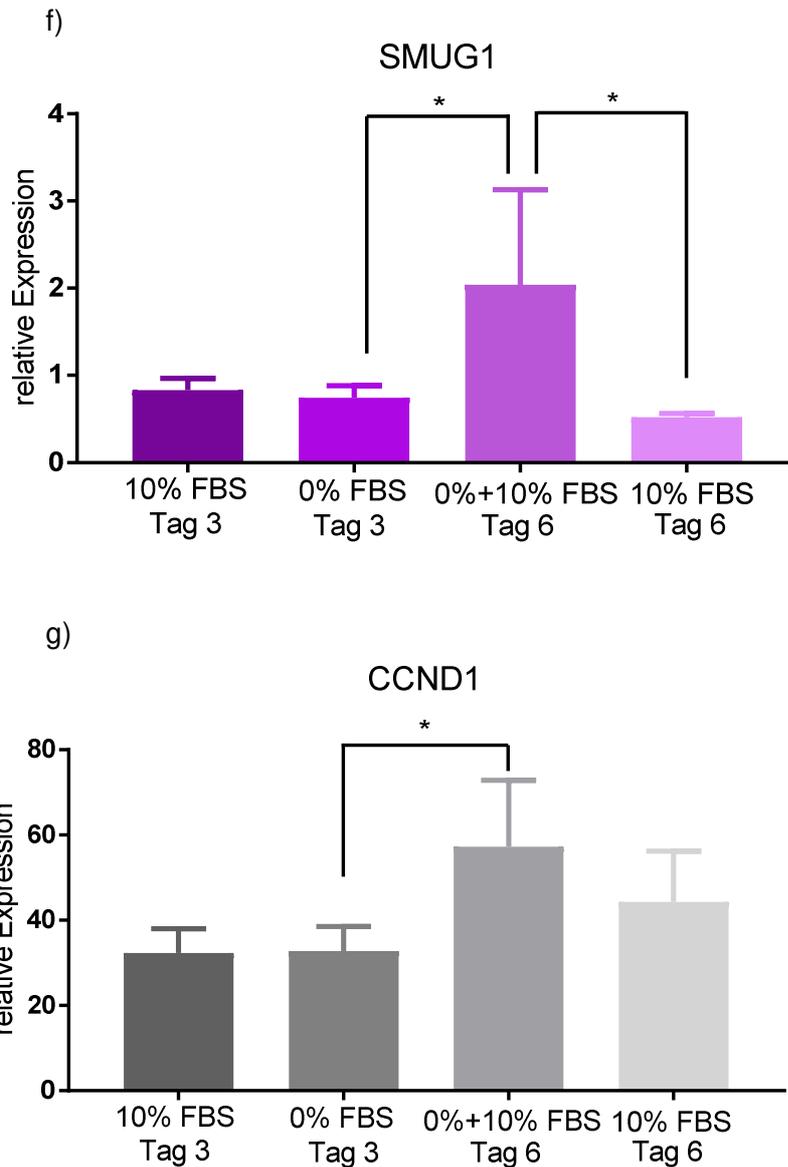


**Abbildung 18:** Übersichtsgraph der Genexpressionen der Zelllinie LN401. Kultivierung von Glioblastomzellen in Serum-freiem Medium für 3 Tage (0%FBS), danach Reaktivierung mit 10% FBS für 3 Tage (0%+10%FBS). Kontrollgruppe (10%FBS) von Tag 3 und Tag 6. Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten von fünf Ansätzen der Kontrollgruppe (10%FBS).

Es konnten keine signifikant unterschiedlichen Genexpressionen zwischen den in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen und den Kontrollzellen beobachtet werden. Signifikante Änderungen ergaben sich zwischen in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen und in Standardmedium reaktivierten Zellen (0%+10%FBS). Hier zeigte sich eine Expressionsabnahme von TET1 bei den in Standardmedium reaktivierten Zellen. Eine Expressionszunahme ergab sich für die Enzyme AICDA, SMUG1 und CCND1. Außerdem zeigte sich zwischen den reaktivierten Zellen (0%+10%FBS) und den Kontrollzellen von Tag 6, dass die Expression von TET2, TET3, TDG, AICDA und SMUG1 bei den Kontrollzellen abnahm.







**Abbildung 19:** Einzelanalysen der Genexpressionen der Zelllinie LN401. Kultivierung von Glioblastomzellen in Serum-freiem Medium für 3 Tage (0%FBS), danach Reaktivierung mit 10% FBS für 3 Tage (0%+10%FBS). Kontrollgruppe (10%FBS) von Tag 3 und Tag 6. Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratortgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten von fünf Ansätzen der Kontrollgruppe (10%FBS). a) TET1-Expression; b) TET2-Expression; c) TET3-Expression; d) TDG-Expression; e) AICDA-Expression; f) SMUG1-Expression; g) Cyclin-D1-Expression; Signifikanzniveaus s.Tab. 25

**Tabelle 25:** Signifikanzniveaus (p-Werte) der Zelllinie LN401 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium

Enzym	p-Werte		
	10%FBS vs 0%FBS	0%FBS vs 0%+10% FBS	0%+10%FBS vs 10%FBS
TET1	0,1743	<b>0,0058 (**)</b>	0,1037
TET2	0,8303	0,1646	<b>0,0160 (*)</b>
TET3	0,1456	0,0527	<b>0,0255 (*)</b>
SMUG1	0,3440	<b>0,0299 (*)</b>	<b>0,0145 (*)</b>
AICDA	0,0621	<b>0,0280 (*)</b>	<b>0,0215 (*)</b>
CCND1	0,8947	<b>0,0110 (*)</b>	0,1776

Zur besseren Übersicht und Vergleich der Enzymexpressionen der beiden Zelllinien und der verschiedenen Ansätze wurden die relativen Differenzen der Expression in einer separaten Tabelle dargestellt (s. Tab. 26).

**Tabelle 26:** Relative Differenzen der Zelllinie LN401 und U87 nach Behandlung mit Serum-freiem Medium

Enzym	Ansatz	relative Differenzen	
		LN401	U87
TET 1	0% FBS vs 10%FBS	0,28	0,02
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,64	0,25
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,16	0,51
TET 2	0% FBS vs 10%FBS	0,04	0,06
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,26	0,47
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,48	0,26
TET 3	0% FBS vs 10%FBS	0,22	0,34
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,66	0,49
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,8	0,2
TDG	0% FBS vs 10%FBS	0,23	0,06
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,17	0,29
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,51	0,34
AICDA	0% FBS vs 10%FBS	0,5	0,73
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,9	0,87
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,96	0,56
SMUG 1	0% FBS vs 10%FBS	0,1	0,01
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,63	0,01
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,74	0,24
MBD 4	0% FBS vs 10%FBS	0,08	0,2
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,13	0,1
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,05	0,12
CCND1	0% FBS vs 10%FBS	0,02	0,51
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,43	0,33
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,23	0,23
GFAP	0% FBS vs 10%FBS	0,07	0,54
	0%FBS vs 0%+10%FBS	0,96	0,6
	0%+10%FBS vs 10% FBS	0,97	0,02

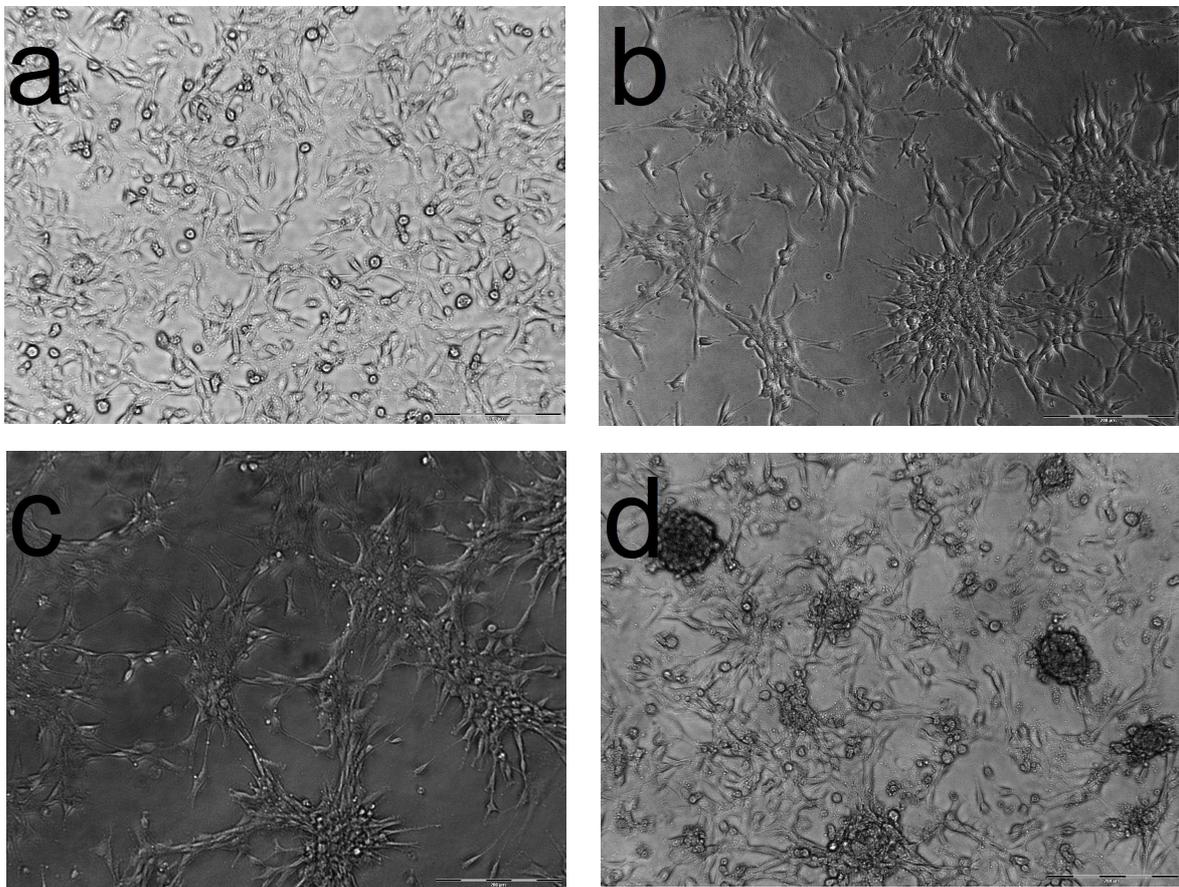
### 3.2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Von jedem der fünf Ansätze der drei Versuchsgruppen wurden Zellen mit Immunfluoreszenzfärbung gefärbt. Dabei konnte bei der LN401 beobachtet werden, dass sich die Zahl der EdU-positiven Zellen zwar verringert, sobald sie in Serum-reduzierten Medium kultiviert wurden. Es bleiben allerdings noch Zellen, die sich teilen. 5-hmC positive Zellen konnten weder bei der Kontrolle noch bei den in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen detektiert werden.

**Tabelle 27:** Quantifizierung der LN401 Kultivierung in Serum-freiem Medium

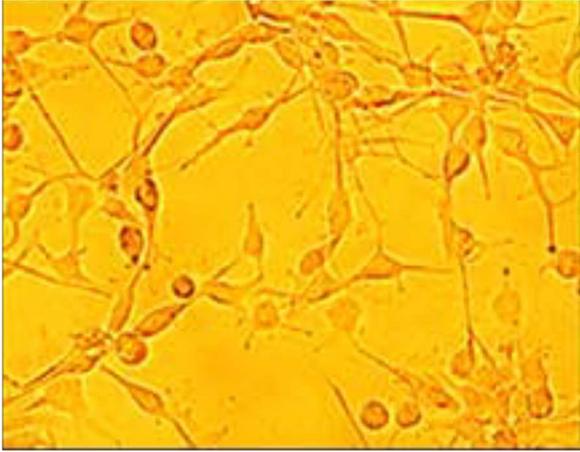
<b>Ansatz</b>	<b>DAPI (abs.)</b>	<b>EdU (abs.)</b>	<b>5-hmC (abs.)</b>	<b>EdU/DAPI [%]</b>	<b>5-hmC/DAPI [%]</b>
LN401 10% I	102	21	0	20,59	0
LN401 10% II	154	22	0	14,29	0
LN401 10%III	127	27	0	21,26	0
LN401 10% IV	123	32	0	26,02	0
LN401 10% V	131	46	0	35,11	0
<b>Mittelwert</b>	<b>127,4</b>	<b>29,6</b>	<b>0</b>	<b>23,45</b>	<b>0</b>
LN401 0% I	3	0	0	0	0
LN401 0% II	48	9	0	18,75	0
LN401 0% III	34	6	0	17,65	0
LN401 0% IV	20	1	0	5	0
LN401 0% V	23	6	0	26,09	0
<b>Mittelwert</b>	<b>25,6</b>	<b>4,4</b>	<b>0</b>	<b>13,49</b>	<b>0</b>
LN401 0%+10% I	37	18	0	48,65	0
LN401 0%+10% II	57	21	0	36,84	0
LN401 0%+10% III	51	23	0	45,1	0
LN401 0%+10% IV	83	38	0	45,78	0
LN401 0%+10% V	52	17	0	32,69	0
<b>Mittelwert</b>	<b>56</b>	<b>23,4</b>	<b>0</b>	<b>41,81</b>	<b>0</b>

Die Phasenkontrastbilder des Versuchsverlaufs zeigten, dass auch bei der LN401 morphologische Veränderungen der Zellen auftreten, sobald sie in nährarmem Medium kultiviert wurden.

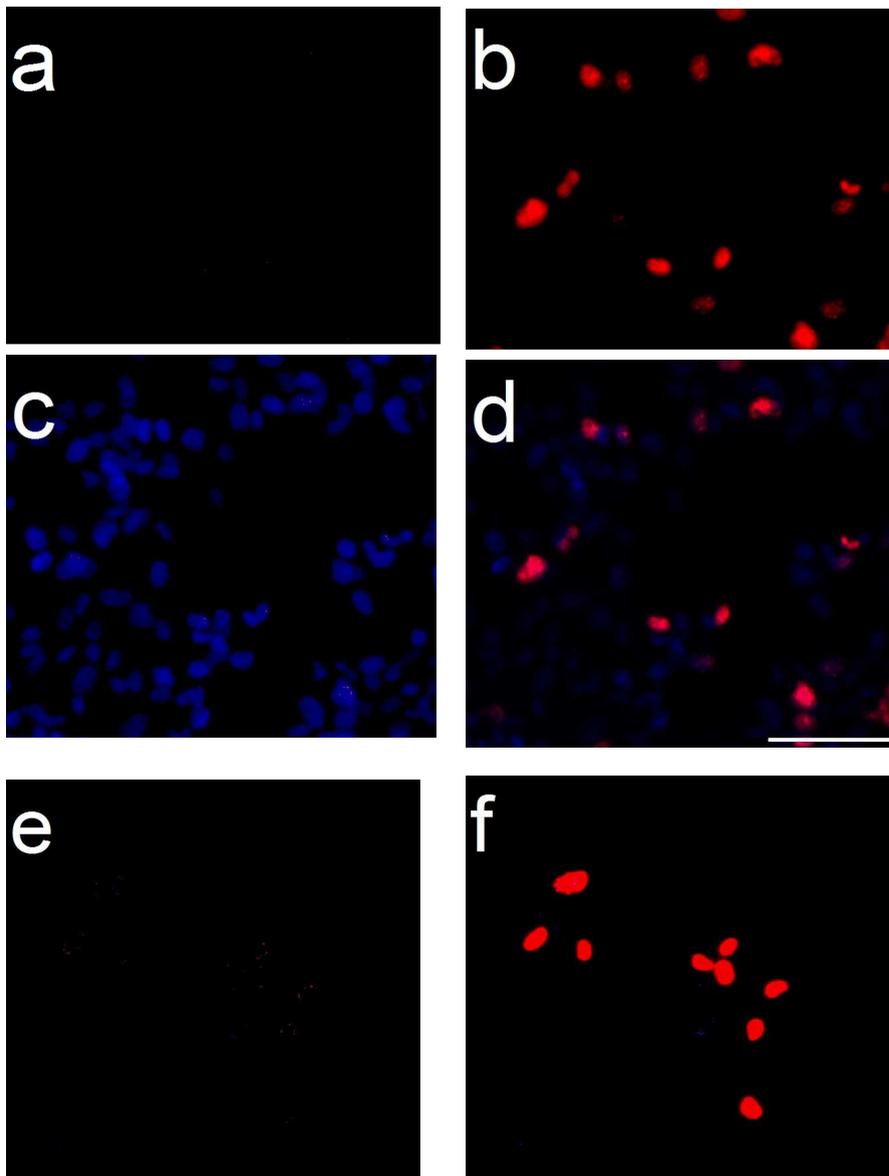


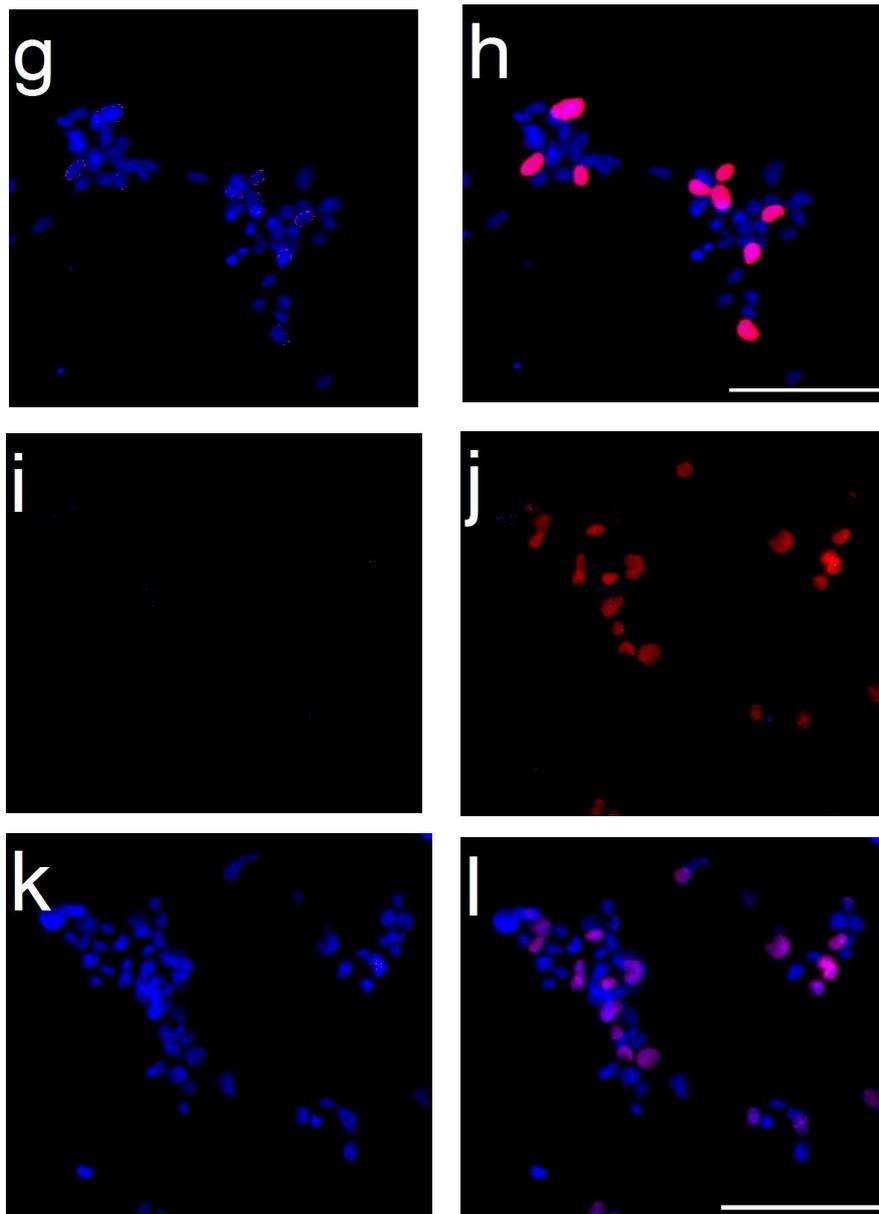
**Abbildung 20:** Phasenkontrastbilder des Versuchsverlaufs der Zelllinie LN401. a) Kontrolle (10%FBS). b) Zellen nach einem Tag Kultivierung in Serum-freiem Medium (0% FBS). c) Zellen nach drei Tagen Kultivierung in Serum-freiem Medium. d) Zellen drei Tage nach Rekultivierung in nährreichem Medium (0%+10% FBS)

Vergleicht man die morphologischen Veränderungen der Zellen nach Kultivierung in Serum-freiem Medium ähneln sich sehr den Zellen aus der Studie von Im et al., die ebenfalls Serum-frei kultiviert wurden (2015).



**Abbildung 21** : Serum-frei kultivierte Zellen nach 24h von Im et al. (2015). Zugabe von Wachstumsfaktoren im Medium

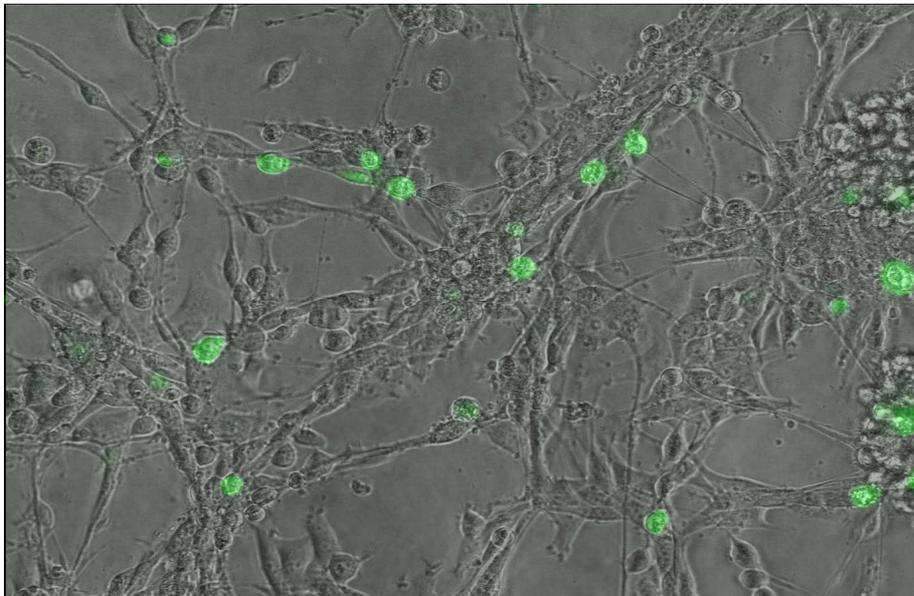




**Abbildung 22:** Immunfluoreszenzbilder der Zelllinie LN401 nach Kultivierung in Serum-freiem Medium. a-d: Kontrolle (10% FBS), e-h: Serum-frei kultivierte Zellen (0% FBS), i-l: in Standardmedium rekultivierte Zellen (0%+10% FBS). a,e,i) 5-hmC, b,f,j) EdU, c,g,k) DAPI, d,h,l) Fusionsbild. Maßstab:200µm

### 3.2.3 TET3-Überexpression mittels Vektor

In diesem Versuch wurde die Überexpression des TET3-Enzyms durch einen Vektor bewirkt. 8 Stunden nach der Transfektion wurde durch Detektion des GFP-Signals überprüft, ob die Transfektion erfolgreich war.

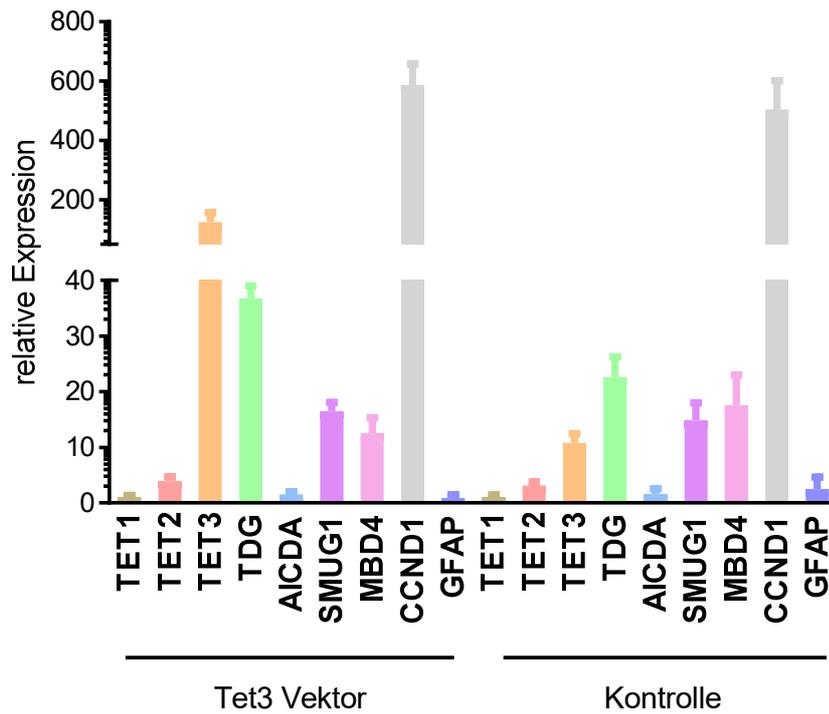


**Abbildung 23:** Vektor-transfizierte Zellen mit GFP-Signal. Überlagerung von Phasenkontrastaufnahme und Fluoreszenzbild.

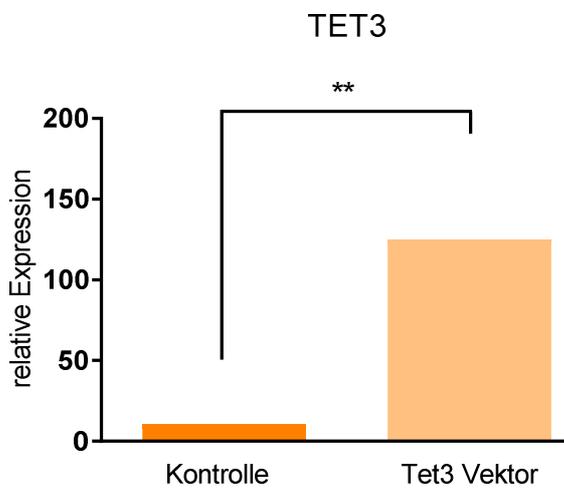
#### 3.2.3.1 Genexpressionsanalysen

Nach der Analyse in der qPCR ergab sich, dass die Transfektion erfolgreich war. Die TET3-Expression der behandelten Zellen stieg signifikant an mit  $p=0,0064$ . Außerdem konnte ein Anstieg der TDG-Expression mit  $p=0,01$  bei den behandelten Zellen beobachtet werden (s.Abb. 24).

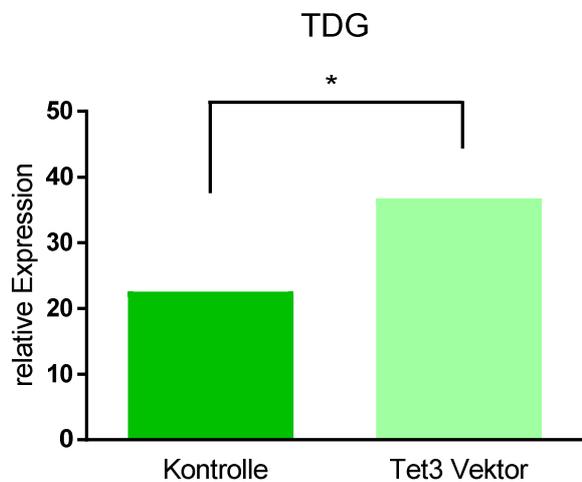
a)



b)



c)

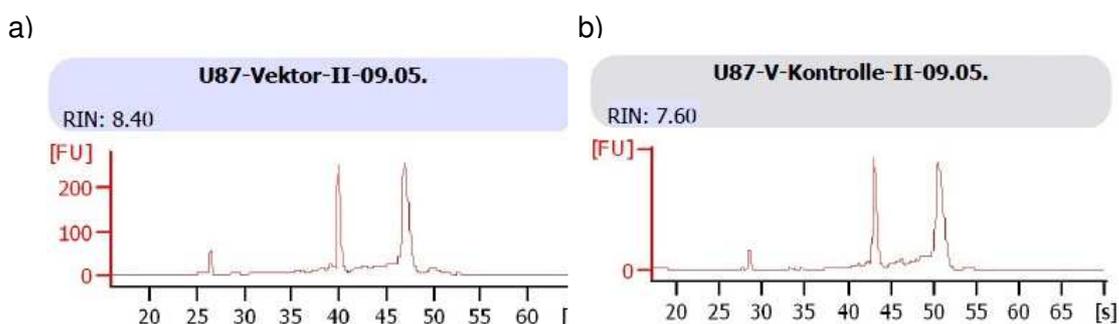


**Abbildung 24:** Genexpression der Zelllinie U87. Inkubation von Glioblastomzellen mit Tet3-Vektor. Auswertung der qPCR-Daten mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode; Referenzwert: Mittelwert der beiden Housekeepergene IPO8 und TBP. Kalibratorgen der Kontrollgruppe: TET1 des ersten von fünf Ansätzen der Kontrollgruppe (10%FBS). a) Übersichtgraph aller Enzym-Expressionen; b) TET3-Expression; c) TDG-Expression

Die Werte der qPCR wurden, wie auch schon bei den anderen Versuchen mit der  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet und in GraphPad-Prism mit ANOVA verglichen. Die Werte von TET3 und TDG der beiden Gruppen wurden separat im t-Test verglichen und in den zwei separaten Graphen abgebildet mit Angabe der Signifikanzniveaus.

### 3.2.3.2 RNA-Qualitätsmessung

Die RIN-Werte der extrahierten RNA im Vektor Versuch ergaben für die Vektor-behandelten Zellen einen Wert von 8,4 und für die Kontrolle einen Wert von 7,6.



**Abbildung 25:** Ergebnisse der RIN-Messung für U87 nach Vektorbehandlung. a) Vektorbehandlung. b) Kontrolle

### 3.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Auch bei diesem Versuch wurden neben der quantitativen Bestimmung der Enzymexpression die Zellen auf EdU und 5-hmC kogefärbt und quantifiziert. Nach Auswertung der quantifizierten Zellen im t-Test ergab sich ein Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$  der EdU positiven Zellen. Die mit Vektor behandelten Zellen teilten sich weniger als die Kontrollzellen. Es konnten weder bei den behandelten Zellen noch bei den Kontrollzellen 5-hmC positive Zellen detektiert werden.

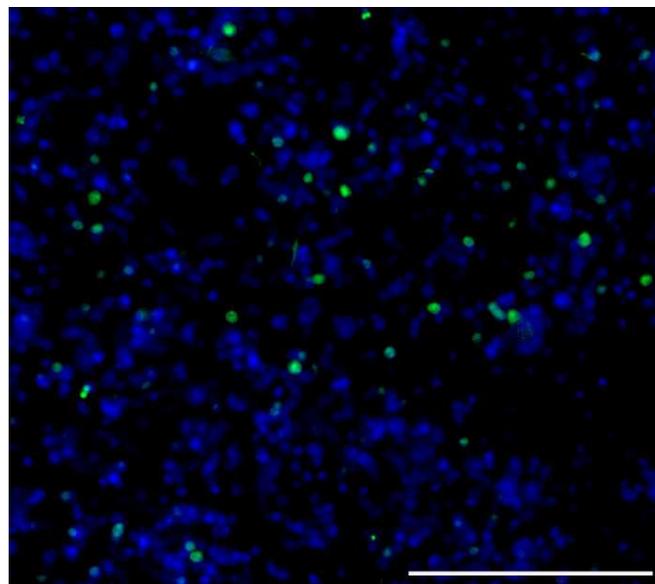
**Tabelle 28:** Quantifizierung der Zelllinie U87 nach Vektorbehandlung

Ansatz	DAPI (abs.)	EdU (abs.)	5-hmC (abs.)	EdU/DAPI [%]	5-hmC/DAPI [%]
U87 V I	187	37	0	26,81	0
U87 V II	107	18	0	16,82	0
U87 V III	61	11	0	18,03	0
U87 V IV	74	16	0	21,62	0

U87 V V	58	10	0	17,24	0
<b>Mittelwert</b>	<b>87,6</b>	<b>18,4</b>	<b>0</b>	<b>20,11</b>	<b>0</b>
U87 K I	63	21	0	33,33	0
U87 K II	106	37	0	34,91	0
U87 K III	70	17	0	24,29	0
U87 K IV	84	24	0	28,57	0
U87 K V	106	32	0	30,19	0
<b>Mittelwert</b>	<b>85,8</b>	<b>26,2</b>	<b>0</b>	<b>30,26</b>	<b>0</b>

### 3.3 Immunfluoreszenzfärbung von Mausekornzellen

Da in den Fluoreszenzfärbungen, die von den Versuchen angefertigt wurden, oft keine eindeutigen 5-hmC-Signale zu detektieren waren, wurde das Färbeprotokoll an Mausekornzellen überprüft. Es konnten eindeutig 5-hmC positive Zellkerne detektiert werden, sodass eine Fehlerquelle im Färbeprotokoll als Ursache für die geringen 5-hmC-Signale in den Zellkulturversuchen ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 26:** Mausekornzellen mit 5-hmC positivem Signal im Zellkern. Maßstab: 100µm

## 4 Diskussion

### 4.1 Histologie

In der Arbeitsgruppe wurde bereits eine histologische Studie durchgeführt, die den 5-hmC-Gehalt von gesundem Gehirngewebe und Gliomgewebe verglich. Die Färbungen des gesunden Gewebes ergaben, dass im Kortex mehr Prozent 5-hmC positive Zellkerne zu finden sind, als in der weißen Substanz. Die immunhistochemische Analyse von 117 Gehirntumoren, darunter Gliome (WHO I-IV), Ependymome und Meningeome, ergab, dass der 5-hmC-Gehalt mit steigendem Tumorgrad sinkt. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Kraus et al. zeigen, dass bei Grad II und III Tumoren ein Zusammenhang zwischen einer IDH-Mutation und niedrigem 5-hmC-Gehalt besteht (2012).

Mutierte IDH-Enzyme führen zur Bildung des Onkometabolits 2-Hydroxyglutarat (2HG). 2HG hemmt Dioxygenasen, zu denen auch die TET-Enzyme zählen (Dang et al., 2017). Der Zusammenhang zwischen mutierten IDH-Enzymen und geringerer 5-hmC-Konzentration konnte bei Glioblastomen nicht nachgewiesen werden. Kraus et al. untersuchten auch den Zusammenhang von Zellproliferation und 5-hmC-Konzentration. Der Vergleich von 5-hmC-positiv gefärbten Zellen und Ki67-positiv gefärbten Zellen ergab, dass stärker proliferierende Zellen weniger 5-hmC aufweisen. Glioblastome sind die am stärksten proliferierenden Gehirntumore und haben wahrscheinlich deswegen den geringsten Prozentsatz 5-hmC positiver Zellkerne (Kraus et al., 2012).

Die vorliegende Studie konnte zunächst die vorigen Erkenntnisse der Arbeitsgruppe, dass Glioblastome über signifikant weniger 5-hmC positive Zellen verfügen als gesundes Gehirngewebe, stützen. So zeigte das Kollektiv der Glioblastompatienten einen durchschnittlichen Prozentsatz 5-hmC positiver Zellkerne von 2,65%, die Kontrollgruppe hingegen einen durchschnittlichen Prozentsatz von 39,4%.

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, in wie weit der 5-hmC-Gehalt mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert.

Es wurden von 94 verschiedenen Glioblastompatienten Proben verwendet und immunhistologisch auf 5-hmC gefärbt. Nach dem medianen Prozentsatz an 5-hmC positiven Zellkernen konnte das Kollektiv in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe mit wenig 5-hmC positiven Zellkernen (<0,37%, low-5-hmC-Gruppe) und die andere Gruppe mit >0,37% 5-hmC positiven Zellkernen (high-5-hm-Gruppe).

In der low-5-hmC-Gruppe fanden sich 70% männliche Patienten und 30% weibliche Patienten. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung betrug 60 Jahre. Die

genetische Analyse zeigte 17% MGMT-Promoter-Methylierungen und 2% IDH-Mutationen. Das mediane Überleben nach Diagnosestellung betrug 374 Tage. Die high-5-hmC-Gruppe umfasste 58% männliche und 42% weibliche Patienten mit einem Durchschnittsalter bei Diagnosestellung von 61 Jahren. MGMT-Promoter-Methylierungen fanden sich in 33%, keine IDH-Mutationen. Das mediane Überleben betrug 443 Tage. Die Kontrollgruppe umfasste 10 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren und 70% männlichen und 30% weiblichen Patienten

Da die genetische Untersuchung nur in einem Fall eine IDH-Mutation nachweisen konnte und die 93 anderen Patienten über eine IDH-Wildtyp verfügen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich in den 93 Fällen gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation der Gliome um *de novo* entstanden, primäre Glioblastome handelt (Louis et al., 2016).

Der 5-hmC-Gehalt nimmt bei Gliomen stark ab und sinkt weiter mit steigender Malignität des Tumors (Kraus et al., 2012; Orr et al., 2012), sodass auch für diese Studie angenommen wurde, dass die Patienten mit höherem Prozentsatz an 5-hmC positiven Zellkernen länger überleben.

Die Korrelation der beiden Gruppen mit der Überlebenszeit zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied der Überlebenszeit zwischen den zwei Gruppen. In den Mutationsanalysen zeigte die high-5-hmC-Gruppe mit 33% etwas mehr MGMT-Promotor-Methylierungen, die generell mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Hegi et al., 2005; Binabaj et al., 2018). Dies hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf das Überleben in der vorliegenden Studie.

Auch Orr et al. untersuchten in ihrer histologischen Studie Präparate von 69 Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen auf den 5-hmC-Gehalt. Zunächst konnten sie bestätigen, dass mit steigendem Tumorgrad der Prozentsatz an 5-hmC positiven Zellkernen sinkt. Die Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten ergab, dass ein kürzeres Überleben mit einem niedrigeren 5-hmC-Gehalt einherging. Auch hier wurden das Kollektiv nach high-5-hmC und low-5-hmC unterteilt, wobei das mediane Überleben der low-5-hmC-Gruppe 6 Monate betrug und das der high-5-hmC-Gruppe 15,6 Monate. Orr et al. untersuchten außerdem die Expression verschiedener Gene, die im 5-hmC-Stoffwechsel beteiligt sind. Hierunter waren die Enzyme TET1-3, zwei Desaminasen (APOBEC, AICDA) und DNA-Reparaturenzyme (TDG, SMUG1, MBD4). Sie konnten zeigen, dass niedrige Expressionslevel von TET1 und TET3 und erhöhte APOBEC3G-Expression mit kürzerer Überlebenszeit der Patienten korrelierten (2012).

Genetische Analysen der TET-Enzyme, die 5-hmC bilden und der abbauenden Enzyme AICDA, APOBEC, TDG und MBD4 wurden in der vorliegenden Studie nicht

vorgenommen. Es wäre allerdings eine interessante Ergänzung zu den Ergebnissen der histologischen Untersuchung, ob eventuell hier eine Korrelation zwischen TET-Expressionsleveln, APOBEC-Expressionsleveln und der Überlebenszeit der Patienten gefunden werden könnte.

Zhang et al. untersuchten den 5-hmC-Gehalt von 287 Gliompräparaten, darunter Gliome vom WHO Grad I-IV und korrelierten den Prozentsatz 5-hmC positiver Zellkerne mit der Überlebenszeit der Patienten. Insgesamt ergab sich ein längeres Überleben für die Patienten mit mehr 5-hmC positiven Zellkernen. Wurde die Überlebenszeit in Bezug auf den 5-hmC-Gehalt der einzelnen Gliomgruppen, unterteilt nach WHO-Grad, betrachtet, ergab sich für WHO Grad II Astrozytome und WHO Grad II und III Oligodendrogliome ein längeres Überleben bei höheren Prozentzahlen 5-hmC positiver Zellkerne. Für WHO Grad III Astrozytome und WHO Grad IV Glioblastome (n=64) konnte diese Korrelation nicht signifikant nachgewiesen werden (2016). Das Ergebnis entspricht dem der vorliegenden Studie. In weiteren Färbungen und Studien könnte untersucht werden, ob bei niedriggradigen Gliomen eine signifikante Korrelation zwischen längerer Überlebenszeit und höherem Prozentsatz 5-hmC positiver Zellkerne festzustellen wäre.

Eine weitere histologische Studie von Kraus et al., zu der auch die histologischen Untersuchungen dieser Arbeit beitrugen, untersuchte die intratumorale Verteilung von 5-hmC im zentralen Tumorbereich und in den umliegenden, infiltrierten Bereichen. Dabei zeigte sich, dass infiltrierte Bereiche signifikant weniger 5-hmC-Konzentrationen aufwiesen als der Kortex und signifikant mehr 5-hmC positive Zellen zu finden waren, als im Zentrum des Tumors. Dies eröffnet die Möglichkeit 5-hmC als histologischen Marker für die Infiltrationszone von Glioblastomen zu verwenden (2015).

## 4.2 Zellkulturversuche

### 4.2.1 Immunfluoreszenzfärbung

Nach jedem Versuch wurden von den verschiedenen Versuchsgruppen Immunfluoreszenzfärbungen auf 5-hmC, EdU und DAPI durchgeführt. Bei den jeweiligen Kontrollgruppen wurden keine 5-hmC positiven Zellkerne erwartet, da in Tumoren der 5-hmC-Gehalt sinkt und Zelllinien sehr geringe bis keine Konzentrationen an 5-hmC aufweisen können (Nestor et al., 2011). Durch die verschiedenen Versuche wurde ein Anstieg der 5-hmC-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle erwartet. Die Immunfluoreszenzfärbungen sollten die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse unterstützen.

In allen drei Experimenten konnte, nach Inkubation mit dem jeweiligen Versuchsmedium, keine signifikante Änderung der 5-hmC Detektion beobachtet werden. Die Behandlung mit RA führte zu einer Expressionsabnahme einzelner TET-Enzyme. Die Expression der 5-hmC abbauenden Enzyme änderte sich nicht. Möglicherweise wurde 5-hmC zwar in den RA behandelten Zellen weniger gebildet, jedoch noch nicht abgebaut, sodass sich keine Änderung der 5-hmC positiven Zellen zeigte. Bei den mit Serum-freiem Medium behandelten Zellen zeigte sich bereits für die Kontrollzellen kein 5-hmC Signal. Da sich in den Expressionsanalysen keine Zunahme der TET-Expression zeigte, wurde keine signifikante Änderung der 5-hmC Detektion erwartet. Die Überexpression von TET3 konnte mittels Vektors erfolgreich durchgeführt werden. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression von TDG. Das vermehrt gebildete 5-hmC wurde möglicherweise, bevor es durch eine Färbung detektiert werden konnte, schon wieder abgebaut. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Abbauenzyme eine höhere Enzymeffektivität besitzen als die TET-Enzyme. Außerdem ist es möglich, dass der erhöhte 5-hmC-Spiegel noch nicht ausreicht, um ein detektierbares Signal auszulösen. Da der 5-hmC-Gehalt in Tumoren und in Zellkultur drastischer sinkt, hätte es möglicherweise einer stärkeren oder länger anhaltenden Stimulation der Zellen gebraucht, um nicht nur auf molekularer Ebene eine Veränderung feststellen zu können, sondern auch in der Immunfluoreszenz.

5-hmC ist eine DNA-Modifikation und so sollte sich das Signal stets nukleär zeigen. In den Färbungen der vorliegenden Studie war eine starke Hintergrundfärbung zu beobachten, die die längliche Zytoplasmaform der Zellen darstellte und kein eindeutige nukleäre Färbung. Zur Überprüfung des Färbeprotokolls wurde deshalb die gleiche Färbemethode bei Maus-Körnerzellen angewendet. Tatsächlich konnten einige 5-hmC positive Zellkerne detektiert werden und das Färbeprotokoll konnte als mögliche Fehlerquelle für die nicht eindeutige nukleäre 5-hmC-Färbung ausgeschlossen werden.

Die detektierte Hintergrundfärbung ist möglicherweise zurückzuführen auf RNA-Modifikationen oder Methylierung der Mitochondrien-DNA (mtDNA). Es gibt Hinweise, dass mtDNA von einer Isoform der DNMT1, der mtDNMT1, methyliert wird (Shock et al., 2011). Shock et al. berichteten von signifikantem 5-hmC-Gehalt der mtDNA. Isoformen der TET-Enzyme, die für die Hydroxymethylierung der mtDNA zuständig sind, sind noch nicht bekannt. Dzitoyeva et al. konnten via Western Blot TET1- und TET2-Expression in Mitochondrien der Maus nachweisen. Cofärbungen mit einem mitochondrialen Marker und einem TET2-Antikörper zeigten colokalisierte Signale im Zytoplasma (2012).

Das zunächst als Hintergrundfärbung eingeordnete Signal durch den 5-hmC-Antikörper, ist also möglicherweise auf ein 5-hmC-Vorkommen in den Mitochondrien der Zelle zurückzuführen.

In weiteren Versuchen könnte man die Zellen mit TET-Antikörpern färben, um eine bessere Korrelation zwischen der TET-Expression in der qPCR und der Quantifizierung über die Färbung zu erhalten. Außerdem könnte versucht werden durch andere Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel Dotblot oder Massenspektrometrie 5-hmC zu quantifizieren und so einen bessern Vergleich des 5-hmC-Gehaltes zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen zu erhalten.

Nach den Färbungen zur vorliegenden Studie wurden von den Kontrollzellen und den behandelten Zellen die EdU positive Zellkerne quantifiziert. Der Vergleich der EdU Quantifizierung sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die Proliferationsrate der Zellen nach der Behandlung ändert. Dieser Vergleich wurde auf molekularbiologischer Ebene mit der Expression von CCND1 verglichen. Bei einem Anstieg der 5-hmC-Konzentration in der Färbung, wurde eine Abnahme der EdU positiven Zellen erwartet, da sich Zellen mit höherem 5-hmC-Gehalt weniger teilen.

## **4.2.2 Diskussion der qPCR-Methoden**

### **4.2.2.1 Referenzgene für qPCR**

Für die Auswertung der Zellkulturversuche mit qPCR wurden geeignete Referenzgene benötigt, um die unterschiedlichen Versuchsgruppen untereinander vergleichen zu können. Die Referenzgene werden idealerweise in jeder Versuchsgruppe, unabhängig von der Behandlung, in gleichem Maße exprimiert. So können die Expressionswerte der untersuchten Gene normalisiert werden. Unterschiede, die durch verschiedene Quantität und Qualität der RNA oder unterschiedliche Effizienz von Extraktionen oder reverser Transkription auftreten, können ausgeschlossen werden. Kreth et al. testeten in einer

Studie verschiedene Referenzgene auf ihre Expressionsstabilität bei WHO Grad II-IV Tumoren, darunter auch Glioblastome. Die Referenzgene sollten gleichmäßig exprimiert werden, unabhängig von Gewebetyp, Entwicklungszustand, Krankheitszustand und medikamentöser oder experimenteller Behandlung (2010). In den qPCR Auswertungen der vorliegenden Studie wurden stets die Mittelwerte von den Referenzgenen IPO8 und TBP verwendet. IPO8 steht bei Kreth et al. für Glioblastome auf Platz 2 der stabil exprimierten Gene und TBP auf Platz 8 (2010).

#### **4.2.2.2 RIN**

Um die Vergleichbarkeit der Genexpressionsanalyse zu garantieren, wurde von den verwendeten RNAs die Integrität (RIN) bestimmt. Ein guter RIN-Wert, zwischen 7-10, zeugt von einer stabilen RNA und senkt die Wahrscheinlichkeit der Verfälschung von Genexpressionsanalyse durch RNA-Abbauprodukte. Über den Nachweis einer stabilen RNA mittels RIN konnten die Genexpressionsanalyse zuverlässig ausgewertet werden (Schröder et al., 2006).

#### **4.2.3 Diskussion der Genexpressionsanalysen**

Für die Experimente mit Retinsäure und Serum-freiem Medium wurde die gemeinsame Hypothese aufgestellt, dass beide Medien eine Stressreaktion der Zellen auslösen, zu einem Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase führen und somit eine Differenzierung von Zellen anstoßen (Ma et al., 2005). Differenzierte Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, weisen höhere 5-hmC-Level als ihre Vorläuferzellen bzw. Stammzellen auf (Haffner et al., 2011). So wurde angenommen, dass nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Medium eine Differenzierung stattfindet, der 5-hmC-Gehalt ansteigt und sich die Expression der am Stoffwechsel von 5-hmC beteiligten Enzyme ändert. Es sollte geprüft werden, ob eine mögliche Zunahme des 5-hmC-Levels durch die gesteigerte Bildung oder den verminderten Abbau hervorgerufen wird. Die Überexpression von TET3 mittels eines Vektors sollte zu einem erhöhten 5-hmC-Gehalt und schließlich zur Differenzierung der Tumorzellen führen. Für alle drei Versuchsansätze wurden in der qPCR die Expression der 5-hmC bildenden TET-Enzyme (TET1-3) und der Enzyme, die an einer möglichen aktiven Demethylierung teilhaben, namentlich AID, SMUG1, TDG und MBD4, untersucht. Zudem wurde stets die Expression des Differenzierungsmarkers GFAP und des Zellproliferationsmarkers Cyclin-D1 untersucht.

#### 4.2.3.1 Experimente mit Retinsäure-Behandlung

Studien haben gezeigt, dass Retinoide wachstumshemmende und differenzierende Wirkung in Neuroblastomen und Gliomen haben. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass RA einen hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferationsrate hat und einen programmierten Zelltod einleitet. Der Zellzyklusarrest wird erreicht durch Reduktion der Cyclin-D1 Expression und einer gesteigerten Proteolyse von Cyclin-D1 (Ma et al., 2005). Ying et al. konnten nachweisen, dass nach RA Behandlung die Expression von GFAP steigt und die CCND1-Expression sinkt (2011). Es gibt verschiedene Studien, die zu widersprüchlichen Ergebnissen über die Wirkung von RA gelangen.

Als Erste beschrieben Singh et al. die Existenz von Gehirntumorstammzellen (Brain tumor stem cells, BTSCs). Die Stammzellen zeigen Eigenschaften, wie Selbsterneuerung und kontinuierliche Proliferation und können nach Isolation und Kultivierung den Ursprungstumor exakt reproduzieren und nähren. BTSCs wurden in Gehirntumorgewebe, und kultivierten Gehirntumorzellen nachgewiesen (2004).

Lee et al. und Im et al. konnten zeigen, dass Gehirntumorzellen, die in Serum-freiem Medium kultiviert werden Eigenschaften von Stammzellen entwickeln und die Expression von Stammzellmarkern, wie SOX2 steigt (Lee et al., 2006; Im et al., 2015).

Studien an Gehirntumorzellen mit RA wurden oftmals an Gehirntumorstammzellen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in Serum-freiem Medium kultiviert, um Stammzellen zu generieren und anschließend wurden die Zellen mit RA inkubiert, um zu prüfen, ob RA eine differenzierende Wirkung auf die Gehirntumorstammzellen ausübt.

Niu et al. zeigten, dass die Kultivierung von Gehirntumorstammzellen mit RA keinen hemmenden Effekt auf die Stammzellen hat, sondern deren Proliferation noch fördert (2010). Choschick et al. untersuchten die Wirkung von RA an verschiedenen Glioblastomstammzellen und konnten ebenso zeigen, dass die Zelllinien überwiegend mit einer Steigerung der Proliferationsrate reagierten und diese Wirkung vor allem induziert wurde durch zwei Rezeptoruntergruppen, RAR $\alpha$  und RAR $\gamma$ . Außerdem zeigten sie, dass die Proliferationsrate umso mehr anstieg, je höher die RA-Konzentration war (2014).

Shi et al. inkubierten die Zellen zunächst in Serum-freiem Medium, um Glioblastomstammzellen zu generieren, die sie als nächstes mit 1-2 $\mu$ mol/l RA kultivierten. Dies führte zu einer Differenzierung der Zellen und Steigerung der GFAP-Expression. Höhere Konzentrationen allerdings führten zur Apoptose der Zellen. Eine

vollständige Differenzierung konnte nicht erzielt werden, da zu jedem Zeitpunkt der Stammzellmarker CD133 exprimiert wurde (2013). Friedmann et al. konnten ebenso zeigen, dass die Behandlung mit RA von Glioblastomstammzellen zum Verlust des Stammzellmarkers Nestin führte und eine Differenzierung der Zellen stattfand (2013).

Altucci et al. und Tang et al. konnten in weiteren Studien eine Resistenz der kultivierten Zellen gegenüber RA auf eine Hypermethylierung des  $RAR_{\beta 2}$ -Gens zurückführen.  $RAR_{\beta 2}$  ist der Hauptrezeptor für die hemmenden Effekte von RA auf die Zellproliferation (2007). In Tumoren ist das  $RAR_{\beta 2}$ -Gen oft durch Hypermethylierung an CpG-Inseln inaktiviert. Es kommt zur Expressionsabnahme des Rezeptors (Tang et al., 2011). Dies führt schließlich zu einer Resistenz gegenüber RA.

Choschzick et al. fanden in ihrer Studie verschiedene Erklärungsansätze, weshalb es so unterschiedliche Studienergebnisse über die Wirkung von RA gibt. Wird RA in zu hohen Konzentrationen zu den Zellen gegeben, erfolgt die Wirkung möglicherweise nicht nur über die verschiedenen RA-Rezeptoren, sondern zudem über andere Signalwege. Werden die Zellen in normalem, Serum-haltigen Medium kultiviert, hat dies schon einen differenzierenden Effekt und die Wirkung von RA ist möglicherweise nicht so durchschlagend. Zudem sind Zelllinien, die etabliert sind und schon einige Passagen durchlaufen haben, differenziert, an die Zellkultur adaptiert und reagieren nicht mehr adäquat auf Stimuli (2014).

Auch die Wirkung von RA auf die GFAP-Expression ist nicht ganz eindeutig. So untersuchten Yung et al. in einer Studie kultivierte Gliomzellen von verschiedenen Patienten. Drei der acht Zelllinien zeigten eine Resistenz gegenüber RA. Bei den anderen fünf Linien konnte ein Wachstums-hemmender Effekt nachgewiesen werden. Sie beobachteten weiter, dass der Effekt von RA durchschlagender ist bei Zellen, die nur wenige Passagen durchlaufen haben. Eine Steigerung der GFAP-Expression konnten die Arbeitsgruppe ebenfalls nicht detektieren, was sie damit erklärten, dass die Fähigkeit GFAP zu exprimieren während der Kultivierung verloren ging (1989). Ying et al. konnten allerdings in einer weiteren Studie einen Expressionsanstieg von GFAP nach Behandlung mit RA nachweisen (2011).

In der Studie der vorliegenden Arbeit ist der Effekt von RA nicht ganz eindeutig. Die Zellen wurden zunächst in normalem, serum-haltigen Medium kultiviert und RA hinzugegeben. Andere Studien (Shi et al., 2013; Friedmann et al., 2013) nutzten Gehirntumorstammzellen, die sie durch die vorige Kultivierung in Serum-freiem Medium generierten, und inkubierten diese mit RA, um einen differenzierenden Effekt zu erzeugen. Möglicherweise hätte man einen durchschlagenderen Effekt erzielt, wenn in der vorliegenden Studie ebenso Stammzellen der Säure ausgesetzt worden wären und

die Zellen nicht schon vor Inkubation mit RA allein durch das Serum-haltige Medium differenziert waren. Zudem sind die beiden untersuchten Zelllinien LN71 und LN319 etablierte Linien, die schon einige Passagen durchlaufen haben und an die Bedingungen der Zellkultur adaptiert sind. Laut Yung et al. und Choschzick et al. ist der differenzierende Effekt der Retinsäure auf die Zellen stärker, wenn diese noch nicht so viele Passagen durchlaufen haben und an die Zellkultur adaptiert sind (Yung et al., 1989; Choschzick et al., 2014). Des Weiteren sollte auf die Konzentration der Säure in der Zellkultur geachtet werden und in weiteren Versuchen besser angepasst werden. Shi et al. konnten eine Wirkung von RA detektieren, allerdings nur in einer Konzentration von 1-2µmol/l. Höhere Konzentrationen führten zur Apoptose der Zellen (Shi et al., 2013). Choschzick et al., die eine proliferations-fördernde Wirkung von RA beobachteten, entdeckten zusätzlich, dass höhere Konzentrationen von RA die Proliferation weiter steigerten (2014).

Die RA-Behandlung führte bei der LN319 nicht zu eindeutigen Expressionsänderungen. Die TET2-Expression nahm zwar signifikant ab, allerdings konnte die Wirkung von RA durch eine CCND1-Expressionsabnahme oder GFAP-Expressionszunahme nicht belegt werden. Möglicherweise ist die LN319 eine Zelllinie, die gegen die Wirkung von RA resistent ist. Eine Resistenz wurde von Altucci et al. und Tang et al. auf eine Hypermethylierung des RAR $\beta$ 2-Gens zurückgeführt (Altucci et al., 2007; Tang et al., 2011). Eine Expressionabnahme von MBD4 kann nicht auf die Wirkung von RA zurückgeführt werden, da sich die Änderung zwischen den mit RA behandelten Zellen und den mit DMSO behandelten Zellen zeigte und nicht zwischen RA behandelten Zellen und Kontrollzellen und so ein Effekt von DMSO nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann. Außerdem zeigte sich eine Expressionsabnahme von MBD4.

Die Ergebnisse der LN71-Zelllinie sind ebenso widersprüchlich. RA bewirkt zum einen eine Abnahme der CCND1-Expression, was auf eine verminderte Proliferation der Zellen hindeutet und den erwarteten Effekt von RA entspricht. Andererseits konnte keine erhöhte Differenzierung nachgewiesen werden, stattdessen nahm die GFAP-Expression ab. Auch die Abnahme der TET2- und TET3-Expression spricht, unter der Annahme, dass differenzierte Zellen über höhere Konzentrationen von 5-hmC verfügen (Haffner, 2011), eher gegen die differenzierende Wirkung von RA.

Takai et al zeigten, dass eine Zunahme der TET1-Expression und höhere 5-hmC-Konzentrationen zur Glioblastomgenese führen (2014). Falls diese Beobachtung stimmt, könnte im Umkehrschluss in dieser Studie eine abnehmende TET-Expression zu geringeren 5-hmC-Konzentrationen führen und eine Differenzierung bedeuten.

Allerdings konnte man die Expressionsabnahme nicht für die TET1-Expression feststellen und die Differenzierung ist auch durch eine erhöhte GFAP-Expression nicht zu stützen.

Für eine Verbesserung der Versuchsanordnung können verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.

Zunächst sollten weitere Zelllinien untersucht werden. Es sollten möglichst solche in Betracht gezogen werden, die noch nicht viele Passagen durchlaufen haben und somit noch nicht an die Zellkultur adaptiert sind (Yung et al., 1989; Choschzick et al., 2014). Des Weiteren sollten solche Zelllinien genutzt werden, die gegenüber RA nicht resistent sind. Hierzu könnte das Expressionslevel des RAR $\beta$ 2-Gens gemessen werden, um eine Hypermethylierung und somit Inaktivierung des Gens auszuschließen. Ein weiterer Ansatz wäre die Zellen zunächst in Serum-freiem Medium zu kultivieren, um Stammzellen zu generieren und diese als nächsten Schritt mit RA zu inkubieren, um einen differenzierenden Effekt (Friedmann et al., 2013; Shi et al., 2013) und als Konsequenz steigende TET-Expression und zunehmende 5-hmC-Konzentrationen zu erzielen, im Vergleich zu den Stammzellen (Haffner et al., 2011). Zudem sollte die Konzentration von RA überprüft und angepasst werden. Zu hohe Konzentrationen führen zur Apoptose der Zellen (Shi et al., 2013).

#### **4.2.3.2 Experimente mit Serum-freiem Medium**

Levin et al. untersuchten in ihrer Studie an verschiedenen Gliom- und Adenocarcinomzelllinien den Effekt von Serum-armem Medium auf die Enzymexpression. Sie kultivierten die Zellen in 0,5% FBS Medium für 24h und konnten schon nach dieser kurzen Zeit beobachten, dass Gliomzellen mit einer Steigerung der Expression verschiedener Enzyme reagierten. Adenocarcinomzellen zeigten eher eine Expressionsabnahme. Die Expressionssteigerung der Gliomzellen betraf vor allem Apoptosefaktoren (z.B. Bax, Bcl-2, Bcl-xL) und Zellzyklusregulatoren (z.B. CDK4, Cyclin B). Nach bereits 24 Stunden konnte eine Apoptoseresistenz festgestellt werden. Levin et al. erkannten, dass die Gliomzellen stärker resistent gegenüber Serumentzug sind, weil sie durch Expressionssteigerung bestimmter Enzyme ihr Überleben sichern (2010). Als Ursache für die Erhaltung der Proliferationsrate können Stammzellen verantwortlich sein. Singh et al. entdeckten, dass Gehirntumorstammzellen (Brain Tumor Stem Cells, BTSCs) in Gehirntumorgewebe und auch in dessen kultivierten Zelllinien vorhanden sind (2004). Die Arbeitsgruppe von Niu konnte einige Jahre später nachweisen, dass BTSCs sich selbst erneuern und kontinuierlich proliferieren, auch wenn sie in Serum-armem Medium kultiviert werden (2010).

Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Tumorzelllinien, die Serum-frei kultiviert werden ihre Morphologie ändern und Stammzellmarker wie SOX2 exprimieren (Im et al., 2015; Lee et al., 2006). Lee et al. konnten zeigen, dass Serum-frei kultivierte Glioblastomzellen ihre Morphologie ändern, Sphären bilden und zu 90% SOX2 exprimieren. Wurden diese Zellen wieder mit normalem Serum kultiviert nahm die SOX2-Expression ab und die Zellen zeigten ein exponentielles Wachstum (2006). Auch Im et al. zeigten an A172 Glioblastom Zellen, dass unter Serum-freier Kultivierung die SOX2-Expression zunahm und sich die Morphologie änderte (2015). Sowohl Lee et al. als auch Im et al. verwendeten in dem Serum-freiem Medium zusätzlich Wachstumsfaktoren (EGF), sodass nicht auszuschließen ist, dass auch die Wachstumsfaktoren die SOX2-Expression beeinflussten.

Zeitlich parallel zu den Versuchen der vorliegenden Studie, konnten Darzynkiewicz et al. zeigen, dass normale, nicht-Tumorzellen, durch Serum-freies Medium in der G1/G0-Phase synchronisiert werden können. Dieser Effekt tritt bei Tumorzellen, die Serum-frei kultiviert werden, allerdings nicht ein (2011).

Die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit zeigten kaum Änderungen durch die Kultivierung in Serum-freiem Medium, lediglich die U87 zeigte eine Zunahme der Zellteilung. Die Expressionsanalysen der LN401 zeigten keinerlei signifikante Änderungen zwischen den Kontrollzellen und den in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen. Dies zeigt, dass die Kultivierung in Serum-freiem Medium keinen hemmenden, differenzierenden Einfluss hat, sondern die Zellen sich auch ohne Serum erhalten. Eventuell hätte man die Zellen noch länger unter diesen Bedingungen kultivieren müssen um größere Veränderungen zu beobachten. Die Phasenkontrastbilder, die im Verlauf angefertigt wurden, zeigen jedoch, dass sich die Zellen ohne Zusatz von Serum morphologisch ändern. Vergleicht man die Phasenkontrastbilder der Studie von Im et al. mit denen der LN401 der vorliegenden Arbeit, lassen sich Ähnlichkeiten feststellen. Die Zellen der LN401 entwickeln nach bereits 24h Inkubation in Serum-freiem Medium Zellfortsätze und sammeln sich in Sphären, ähnlich wie die Zellen der Studie von Im et al. (2015). Im et al. konnten durch Expressionsanalysen zeigen, dass die Zellen SOX2 exprimieren und somit Stammzeleigenschaften aufweisen. In weiteren Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit sollten ebenso Stammzellmarker untersucht werden, um zu testen, ob bei den untersuchten Zelllinien unter Serum-freier Kultivierung ebenso Tumorstammzellen bleiben, die das Wachstum erhalten. Werden die Zellen rekultiviert bilden sich die Fortsätze zurück und die Morphologie ähnelt den Kontrollzellen.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass Serum-frei kultivierte Zellen, die in Standardmedium rekultiviert werden eine weitere Proliferationszunahme aufweisen. Auch Lee et al. beobachteten in ihrer Studie, dass rekultivierte Zellen eine Proliferationszunahme bis hin zu einem exponentiellen Wachstum zeigen und gleichzeitig die Expression des Stammzellmarkers SOX2 abnimmt (2006). Beide Zelllinien zeigten eine Zunahme der CCND1-Expression nach Rekultivierung der Zellen in normalem, Serum-haltigen Medium.

Des Weiteren hat es den Anschein, dass der 5-hmC-Umsatz durch Serum-freies Medium und anschließende Rekultivierung in normalem Medium steigt. So steigt bei der Zelllinie U87 die TDG-Expression nach Rekultivierung in normalem Medium an und bei der Linie LN401 die AICDA- und SMUG1-Expression. Außerdem zeigt sich zum Teil eine Abnahme der TET-Expression. Bei der LN401 sinkt die TET1-Expression nach Rekultivierung der Zellen signifikant und TET2 zeigt die Tendenz ebenfalls weniger exprimiert zu werden, allerdings nicht signifikant. Die U87 zeigt signifikante Expressionsabnahme von TET2 und GFAP nach Rekultivierung in normalem Medium und die Tendenz bei TET3. Durch Zugabe von Serum fangen die Zellen stärker an zu proliferieren, ändern ihre Morphologie und bilden weniger 5-hmC bzw. bauen 5-hmC stärker ab. Möglicherweise zeigt sich hier eine Tumorgenese, unter der Annahme, dass Tumore geringe 5-hmC-Konzentrationen aufweisen (Haffner et al., 2011).

In einer Studie von El Habr et al. an Glioblastomstammzellen konnte allerdings gezeigt werden, dass durch die Hemmung von TET2 und somit verminderter 5-hmC-Konzentration die Zellen zu weniger aggressiven Zellen differenzierten und die Proliferationsrate abnahm (2016). Auch Takai et al. konnten in einer Studie an Glioblastomzellen zeigen, dass hohe Konzentrationen von TET1 und 5-hmC zur Tumorgenese durch die gesteigerte Transkription von Tumor assoziierten Genen wie EGFR und CCND2 führt (2014). Falls diese Annahme zutrifft, würde dies für die vorliegende Studie bedeuten, dass die Rekultivierung der Zellen und der darunter beobachtete vermehrte Umsatz von 5-hmC die Tumorgenese hemmt. Hierzu passt allerdings nicht die steigende Proliferationsrate, die eher ein Tumorwachstum suggeriert.

D'Amico et al. konnten in ihrer Studie an einer Gliomzelllinie zeigen, dass die Kultivierung von Zellen in Serum-freiem Medium zur Abnahme der Cyclin D1-Expression und ebenso zur Abnahme der Expression des antiapoptotischen Faktors bcl-2 führt. Weiter konnten Sie eine Expressionszunahme des proapoptotischen p53 Proteins feststellen. Allerdings zeigte sich unter Kultivierung im Mangelmedium eine Abnahme der GFAP-Expression. Im weiteren Verlauf inkubierte die Arbeitsgruppe die in Serum-freiem Medium kultivierten Zellen zusätzlich mit den zwei Peptiden Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes-

Peptid (pituitary adenylat cyclase activating protein; PACAP) und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP). Diese zwei agieren im ZNS als Neurotransmitter und nehmen Einfluss auf die Zellteilung, neuronale Differenzierung und neuronales Überleben (Vaudry et al., 2000). D'Amico et al. entdeckten, dass sich nach Zugabe von VIP und PACAP die Effekte des Serum-freien Mediums noch verstärkten und zudem auch die Expression des Differenzierungsmarkers GFAP anstieg (2013).

In weiteren Versuchen sollte die Anordnung noch optimiert werden. Zum einen könnten die Zellen länger dem Serum-freiem Medium ausgesetzt werden, um einen stärkeren Effekt zu erzielen. Falls durch die Serum-freie Kultivierung auch in der vorliegenden Studie Stammzellen generiert wurden, was zumindest die Morphologie nahelegt, sollte die Expression von Stammzellmarkern, wie SOX2, mittels qPCR untersucht werden. So könnte nachvollzogen werden, ob Stammzellen entstehen und nach Rekultivierung die SOX2-Expression wieder zurückgeht und die Zellen exponentiell wachsen, wie Lee et al. es beobachteten (2006). Zudem könnte getestet werden, ob durch eine Zugabe von VIP und PACAP, wie es D'Amico et al. in ihrer Studie anwendeten (2013), die Expression von GFAP signifikant ansteigt und als Folge der Differenzierung eventuell die 5-hmC-Konzentration und die TET-Expression zunimmt. Des Weiteren könnte nach einer möglichen Generierung von Tumorstammzellen durch die Serum-freie Kultivierung eine anschließende Differenzierung durch die Inkubation mit RA erzeugt werden und gegeben falls eine erhöhte TET-Expression und 5-hmC-Konzentration detektiert werden.

#### **4.2.3.3 Experimente mit Tet3-Vektor**

Die transiente Transfektion der Zellen mit dem Tet3-Vektor sollte zu einer Überexpression von TET3 führen. Durch die Markierung des Vektors mit einem GFP Signal, das nach Expression der Vektor-DNA grün fluoresziert, konnte der Erfolg der Transfektion überprüft werden. Das Signal konnte jeweils ca. 12 Stunden nach Inkubation detektiert und die Wirksamkeit des Vektors somit nachgewiesen werden.

In der qPCR sollte die Wirkung der TET3-Überexpression auf die Expression verschiedener Enzyme überprüft werden. Die Expression von GFAP und CCND1 wurden als Marker für eine erfolgreiche Transfektion verwendet. Laut der aufgestellten Hypothese sollte durch einen Anstieg der 5-hmC-Konzentration eine Differenzierung der Zellen stattfinden und eine Abnahme der Proliferationsrate erkennbar sein. Die GFAP- und CCND1-Expression der transfizierten Zellen zeigte jedoch keine signifikanten Änderungen. Des Weiteren wurden die Expressionslevel der TET-Enzyme und der 5-hmC abbauende Enzyme überprüft. Ein Anstieg der TET3-Expression konnte signifikant

nachgewiesen und die erfolgreiche Transfektion bestätigt werden. Außerdem konnte ein Anstieg der TDG-Expression detektiert werden.

TDG zählt zu den DNA-Glykosylasen und nimmt Teil an der DNA-Reparatur. Es erkennt T:G Fehlpaarung, wobei Thymin als spontane Mutation von 5-mC entsteht. Zudem erkennt es die Abbauprodukte von 5-hmC, 5-hmU, 5-fC und 5-caC. 5-hmU entsteht durch Desaminierung von 5-hmC durch AID/APOBEC. Eine erhöhte Expression von AID konnte nicht detektiert werden, wodurch dieser Abbauweg ausscheidet. 5-fC und 5-caC entstehen durch Oxidation von 5-hmC durch die TET-Enzyme. Eine Zunahme der TET3-Expression scheint zunächst die Bildung von 5-hmC zu fördern und gleichzeitig den vermehrten Abbau von 5-hmC durch Oxidation zu 5-fC und 5-caC zu begünstigen. Diese Zwischenprodukte werden wiederum über TDG aus der DNA ausgeschnitten und durch Cytosin ersetzt. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob der Anstieg der TDG-Expression durch die ansteigende TET-Expression, die erhöhte Konzentration von 5-hmC oder durch die erhöhte Konzentration der Substrate 5-fC und 5-caC induziert wird. TET3 und TDG scheinen voneinander abhängig zu sein und direkt zusammenzuarbeiten, um eine schnelle Demethylierung zu erreichen.

Für den nicht eindeutig nachweisbaren Effekt von 5-hmC auf die Differenzierung der Zellen und Abnahme der Proliferation kann es verschiedene Erklärungen geben.

Falls tatsächlich die 5-hmC-Spiegel entscheidend sind für die Differenzierung der Zelle, wie durch die Arbeitsgruppen von Haffner und Jin (Haffner et al., 2011; Jin et al., 2011) gezeigt, bleibt eine Differenzierung der Zellen in der vorliegenden Studie möglicherweise aus, weil das gebildete 5-hmC direkt durch TDG abgebaut wird. Die Tumorzelle scheint der Differenzierung, ausgelöst durch die vermehrte Bildung von 5-hmC, entgegen zu wirken, indem sie 5-hmC wieder abbaut. Möglich ist jedoch auch, dass nicht der 5-hmC-Spiegel allein, sondern die Demethylierung von bestimmten Genen über eine Ausdifferenzierung der Zellen entscheidet. Die Demethylierung der DNA nimmt durch eine TET3- und TDG-Überexpression zu. Es sollten neben der GFAP-Expression noch weitere Differenzierungsmarker auf ihre Expressionslevel untersucht werden.

Die Tatsache, dass der 5-hmC-Gehalt von Zellen, die in Kultur genommen werden, auf ein Minimum absinkt (Nestor et al., 2011), spielt in der vorliegenden Versuchsreihe sehr wahrscheinlich auch eine Rolle. Die durch TET3-Überexpression erreichten 5-hmC-Konzentrationen bzw. die induzierte Demethylierung reicht möglicherweise noch nicht aus, um eine Differenzierung im detektierbaren Maß auszulösen. In weiteren Versuchen sollte die Überexpression verstärkt werden.

Für die Zukunft könnte das Ergebnis der qPCR, das einen deutlichen Anstieg der TET3-Expression zeigt, durch Färbungen mit einem TET3-Antikörper unterstützt werden.

In weiteren Versuchen sollten auch die anderen TET-Enzyme überexprimiert werden. Interessant wäre es zu beobachten, ob die gleichen Effekte eintreten oder andere Enzyme in ihrer Expression beeinflusst werden. TET1 ist vor allem aktiv in der frühen embryologischen Entwicklung, wenn sich der Embryo noch im pluripotenten Stadium befindet. TET1 sorgt hier für die Beibehaltung der Aktivität von Pluripotenzfaktoren (z.B. NANOG, OCT4). Huang et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die TET1-Expression bei MLL-Leukämie Patienten im Gegensatz zu Kontrollproben sehr viel höher ist und die 5-hmC-Konzentration ebenfalls steigt. Sie konnten nachweisen, dass TET1 als Onkogen fungiert (2013). Es erhält die Funktion der Selbsterneuerung von Stammzellen und wirkt einer Differenzierung eher entgegen. Es stellt sich die Frage, ob Tumorzellen mit TET1-Überexpression durch die erhöhte 5-hmC-Konzentration und gesteigerte Demethylierung Pluripotenzfaktoren reaktivieren und das Tumorwachstum steigt. In diesem Fall müsste eine Expressionsabnahme des Differenzierungsmarkers GFAP und eine Zunahme von CCND1 beobachtet werden. In der Färbung mit EdU sollte eine gesteigerte Proliferation detektiert werden können. Außerdem sollten als Unterstützung von Genexpressionsanalysen, die Zellen mit TET1-, 2- und 3-Antikörper gefärbt werden.

Lian et al. konnten wiederum zeigen, dass eine Überexpression von TET2 in Melanomzellen das Wachstum der Tumorzellen begrenzt (2012). In weiteren Studien an Glioblastomzellen sollte geprüft werden, ob dieser Effekt nachvollziehbar ist und eine TET2-Überexpression zu einer Abnahme des Tumorwachstums führt.

### **4.3 Ausblick**

Für die Zukunft könnten die Zellkulturversuche weiter variiert und optimiert werden, um einen Proliferationsstopp, eine Ausdifferenzierung der Zellen und als mögliche Folge den Anstieg der 5-hmC-Konzentration zu erreichen. Zunächst sollten die in dieser Studie untersuchten Versuchsreihen weiter optimiert werden, wie schon in den einzelnen Abschnitten besprochen.

Darüber hinaus könnten andere Versuchsansätze, die zu einem Proliferationsstopp und einer Differenzierung der Zellen führen, getestet werden.

Zunächst können durch die Verwendung von small interfering RNAs (siRNA) verschiedene Peptide ausgeschaltet werden. Eine Möglichkeit ist es die Expression von Pluripotenzfaktoren zu unterbinden. Glioblastomzellen exprimieren den

Pluripotenzfaktor SOX2, der die Selbsterneuerung der Zellen garantiert. 2009 konnte von Gangemi et al. bereits gezeigt werden, dass die Stilllegung von SOX2 in Tumor-initiiierenden Glioblastomzellen zum Proliferationsstopp und zum Verlust von Tumoreigenschaften führt (2009). In einer anderen Studie nutzten Guo et al. siRNA, um den Zellzyklusregulator SYF2, der am G1/S-Übergang mitwirkt, herab zu regulieren (2014). Die Arbeitsgruppe beobachtete, dass nach Kultivierung der Zellen in serum-freiem Medium der Expression von SYF2, und auch die Expression von Cyclin D1 anstiegen. Nachdem jedoch SYF2 durch siRNA ausgeschaltet war, nahm auch die Expression von Cyclin D1 ab (Guo et al., 2014).

Eine andere Option wäre es mit Hilfe von miRNAs den Zellzyklus zu beeinflussen. Hui et al. entdeckten in einer Studie, dass miR-195 in Gliomzelllinien und in Gliomgewebe stark herunter reguliert ist im Gegensatz zu gesundem Gewebe. Sie konnten nachweisen, dass eine Überexpression von miR-195 zur Abnahme der Zellproliferation führt, die Expression von Cyclin D1 und E1 sinkt, und die Zellen vermehrt in die G1/G0-Phase übergehen (2013). Für weitere Studien wäre es eine Möglichkeit zu testen, ob miR-195 auch in den Glioblastomzellen wenig exprimiert wird. Sollte dies der Fall sein, könnte durch eine Überexpression eventuell auch hier ein Proliferationsstopp und eine Ausdifferenzierung erreicht werden, um dann zu beobachten, ob sie die TET-Expression ändert und mit ihr der 5-hmC-Spiegel.

Wäre dieser Faktor ausgeschaltet und somit ein Proliferationsstopp erreicht, sollte eine gleichzeitig Überexpression von TET-Enzymen einen Differenzierungsvorgang einleiten können. GFAP würde in diesem Fall stärker exprimiert und 5-hmC sollte auch in der Immunfluoreszenz detektierbar sein.

Eine andere Möglichkeit wäre die Steigerung der TET-Enzymaktivität durch Inkubation der Zellen mit Vitamin C.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Vitamin C für die optimale Funktion von TET nötig ist. Vitamin C scheint den TET-Cofaktor Fe(II) in seinem reduzierten Zustand zu erhalten (Blaschke et al., 2013; Chen et al., 2013; Pfeifer et al., 2014). Blaschke et al. beobachteten eine starke Zunahme der Tet-Expression und des globalen 5-hmC-Gehaltes in Maus-ESC nach der Zugabe von Vitamin C (2013). Auch in der Zellkultur könnte eine Inkubation mit Vitamin C getestet werden, um bestenfalls die TET-Expression zu steigern, das 5-hmC-Level anzuheben und schließlich die Effekte auf das Zellwachstum beobachten zu können.

## 5 Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich zunächst meinem ehemaligen Doktorvater Professor Dr. med. Dr. h.c. Hans Kretzschmar aussprechen, ohne den es die Möglichkeit einer Dissertation nicht gegeben hätte. Er hat zum einen die Mittel zur Verfügung gestellt. Zum anderen konnte er durch seine Erfahrung und sein Wissen Denkfehler meinerseits aufklären und mir neue anregende Ideen für meine Versuche darlegen. Ein großer Dank gilt ebenso Prof. Dr. med. Armin Giese, der mich nach dem Tod von Professor Kretzschmar weiter betreute und die Fortführung der Doktorarbeit möglich machte.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Theo F.J. Kraus, der mir für Fragen und anregende Gespräche immer zur Verfügung stand. Zusammen haben wir Paper durchgearbeitet, neue Ideen entwickelt, Ergebnisse von Versuchen besprochen, kritisch betrachtet und Verbesserungen der Versuche erarbeitet. So konnte ich viele verschiedene Methoden kennenlernen und auch lernen Versuchsprotokolle selbst zu optimieren.

Einen weiteren Dank möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe aussprechen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein Dank gilt Andrea Greiner, die mir mit Geduld und Freude die Methoden der Molekularbiologie beibrachte und Virginie Guibourt, die mir bei histologischen Färbungen eine große Hilfe war. Außerdem danke ich Julia Geyer, die immer mit einem offenen Ohr für mich da war und stets gerne kleine Pausen mit mir einlegte. Mit der ganzen Arbeitsgruppe konnten stets neue Themen, Versuchsergebnisse und Versuchsabläufe diskutiert und optimiert werden.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Dr. Christa Kolck und Dr. Ulrich Müller-Kolck, ohne die das gesamte Studium und das Erarbeiten und Schreiben einer experimentellen Doktorarbeit mit 2 Freisemestern nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt hier meinem Vater, der mir zusätzlich eine große Hilfe beim Überarbeiten und Korrigieren der Doktorarbeit war.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund, Dr. Jonas Schiemer, und meiner Freundin und damaligen Mitbewohnerin, Silvia Gieles, die sich stets mit mir für positive Erlebnisse und Ergebnisse gefreut haben und auch immer ein offenes Ohr und aufbauende Worte in schwierigen Zeiten hatten.

## 6 Literaturverzeichnis

Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H, RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nature, Rev. Drug Discov* 2007, 6: 793-810

Aran D, Toperoff G, Rosenberg M, Hellmann A, Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes, *Human Molecular Genetics* 2010, 20: 670-680

Auclair G, Weber M, Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals, *Biochimie* 2012,

Baldewpersad Tewarie NM, Burgers IA, Dawood Y, den Boon HC, den Brok MG, Klunder JH, Koopmans KB, Rademaker E, van den Broek HB, van den Bersselaar SM, Witjes JJ, Van Noorden CJ, Atai NA, NADP<sup>+</sup>-dependent IDH1 R132 mutation and its relevance for glioma patient survival, *Med Hypotheses*. 2013 Jun;80(6):728-31.

Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M, Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review, *Curr Med Chem*. 2017;24(27):3002-3009.

Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM, Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation, *Nature* 2010, 463(7284):1042-7

Bhutani N, Burns DM, Blau HM, DNA Demethylation Dynamics, *Cell* 2011, 146(6):866-72

Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Joudi Mashhad M, Hassanian SM, Anvari K, Avan A, The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials, *J Cell Physiol*. 2018 Jan;233(1):378-386

Blaner WS, Olson JA, 1994, Retinol and retinoic acid metabolism. In *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, ed. MB Sporn, AB Roberts, DS Goodman, pp. 229-56. New York: Raven

Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird DJ, Hirst M, Rao A, Lorincz MC, Ramalho-Santos M, Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells, *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):222-6

Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, Tigchelaar W, Troost D, Vandertop WP, Bardelli A, Van Noorden CJ, The prognostic IDH1( R132 ) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma, *Acta Neuropathol.* 2010 Apr;119(4):487-94

Bogdanovic O, Veenstra GJ, DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function, *Chromosoma* 2009, 118: 549-565, 2009

Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE., UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells, *Science.* 2007 Sep 21;317(5845):1760-4

Branco MR, Ficiz G, Reik W, Uncovering the role of 5- hydroxymethylcytosine in the epigenome, *Nature Reviews Genetics* 2011

Cao X<sup>1</sup>, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH, Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system, *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:77-103

Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, Liu H, Wang X, Hu X, Gu T, Zhou Z, Liu J, Liu J, Wu H, Mao SQ, Mo K, Li Y, Lai K, Qi J, Yao H, Pan G, Xu GL, Pei D, Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming, *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1504-9

Cheng J, Guo S, Chen S, Mastriano SJ, Liu C, D'Alessio AC, Hysolli E, Guo Y, Yao H, Megyola CM, Li D, Liu J, Pan W, Roden CA, Zhou XL, Heydari K, Chen J, Park IH, Ding Y, Zhang Y, Lu J, An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis, *Cell Rep.* 2013 Oct 31;5(2):471-81

Choschzick I, Hirseland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V, Zechel C; Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ; *Neuroscience.* 2014 Oct 24;279:44-64

Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A, Thymine DNA Glykosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair, *Cell* 2011, 146: 67-69

D'Amico AG, Scuderi S, Saccone S, Castorina A, Drago F, D'Agata V.; Antiproliferative effects of PACAP and VIP in serum-starved glioma cells; *J Mol Neurosci.* 2013 Oct;51(2):503-13

Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM, Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature* 2009, 462: 739-744

Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H, Podhorecka M; Cell synchronization by inhibitors of DNA replication induces replication stress and DNA damage response: analysis by flow cytometry; *Methods Mol Biol.* 2011;761:85-96

Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M, Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis, *Oncogene.* 2012 Apr 19;31(16):2062-74

Deichmann U; Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic; *Dev Biol.* 2016 Aug 1;416(1):249-254

Dzitoyeva S, Chen H, Manev H, Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria, *Neurobiology of Aging*, 2012

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature* 2004, 429: 335-340

El-Habr EA, Dubois LG, Burel-Vandenbos F, Bogeas A, Lipecka J, Turchi L, Lejeune FX, Coehlo PL, Yamaki T, Wittmann BM, Fareh M, Mahfoudhi E, Janin M, Narayanan A, Morvan-Dubois G, Schmitt C, Verreault M, Oliver L, Sharif A, Pallud J, Devaux B, Puget S, Korkolopoulou P, Varlet P, Ottolenghi C, Plo I, Moura-Neto V, Virolle T, Chneiweiss H, Junier MP; A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma; *Acta Neuropathol.* 2017 Apr;133(4):645-660

Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer, *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr;6(4):259-69

Esteller M, epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome, *Human Molecular Genetics* 2007, R50-R59

Esteller M, Non-coding RNAs in human disease, *Nat Rev Genet.* 2011 Nov 18;12(12):861-74

Felsenfeld G, A Brief History of Epigenetics, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Jan

Friedman MD, Jeevan DS, Tobias M, Murali R, Jhanwar-Uniyal M; Targeting cancer stem cells in glioblastoma multiforme using mTOR inhibitors and the differentiating agent all-trans retinoic acid; *Oncol Rep.* 2013 Oct;30(4):1645-50

Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G, SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity, *Stem Cells* 2009, 27(1): 40-8

Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T., Tissue distribution of 5- hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates, *PLoS ONE* 2010, 5: e15367

Goll MG, Bestor TH, 2005: Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Ann.Rev. Biochem.* 74: 481-514

Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabó PE, Pfeifer GP, Li J, Xu GL, the role of Tet3 DNA dioxygenase in the epigenetic reprogramming by oocytes, *Nature* 2011, 477: 606-610

Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H, Hydroxylation of 5- methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain, *Cell* 2011, 145: 423-434

Gusyatiner O, Hegi ME; Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options; *Semin Cancer Biol.* 2017 Nov 21

Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, Toubaji A, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Nelson WG, Netto GJ, De Marzo AM, Yegnasubramanian S, Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers, *Oncotarget* 2011, 2(8):627-37

Hashimoto H, Zhang X, Cheng X, Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation, *Nucleic Acids Research* 2012, 1-9

Hassler MR, Egger G, Epigenomics of cancer- emergin new concepts, *Biochimie* 2012, doi:10.1016/j.biochi.2012.05.007

He L, Hannon GJ, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):522-31

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R, MGMT

Hsu CH, Peng KL, Kang ML, Chen YR, Yang YC, Tsai CH, Chu CS, Jeng YM, Chen YT, Lin FM, Huang HD, Lu YY, Teng YC, Lin ST, Lin RK, Tang FM, Lee SB, Hsu HM, Yu JC, Hsiao PW, Juan LJ, TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases, *Cell Rep.* 2012 Sep 27;2(3):568-79

Huang H, Jiang X, Li Z, Li Y, Song CX, He C, Sun M, Chen P, Gurbuxani S, Wang J, Hong GM, Elkahoulou AG, Arnovitz S, Wang J, Szulwach K, Lin L, Street C, Wunderlich M, Dawlaty M, Neilly MB, Jaenisch R, Yang FC, Mulloy JC, Jin P, Liu PP, Rowley JD, Xu M, He C, Chen J., TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 16;110(29):11994-9

Huang Y, Rao A, Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer, *Trends Genet.* 2014 Aug 14. pii: S0168-9525(14)00117-6

Hui W, Yuntao L, Lun L, WenSheng L, ChaoFeng L, HaiYong H, Yueyang B., MicroRNA-195 inhibits the proliferation of human glioma cells by directly targeting cyclin D1 and cyclin E1, *PLoS One.* 2013;8(1)

Ichimura K, Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas, *Japan Society of Brain Tumor Pathology*, 2012

Im CN, Yun HH, Yoo HJ, Park MJ, Lee JH; Enhancement of SOX-2 expression and ROS accumulation by culture of A172 glioblastoma cells under non-adherent culture conditions; *Oncol Rep.* 2015 Aug;34(2):920-8

Inoue A, Shen L, Dai Q, He C, Zhang Y, Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development, *Cell Research* 2011, 21: 1670-1676

Inoue A, Zhan Y, Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos, *Science* 2011, 334: 194

Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG, Frequent Co- Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14<sup>ARF</sup>, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines

Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y, Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell-self-renewal and inner cell mass specification, *Nature* 466:1129-1133

Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* 2011, 333(6047):1300-3

Jin G, Reitman ZJ, Duncan CG, Spasojevic I, Gooden DM, Rasheed BA, Yang R, Lopez GY, He Y, McLendon RE, Bigner DD, Yan H., Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas, *Cancer Res.* 2013 Jan 15;73(2):496-501

Jin SG, Jiang Y, Qui R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, Krex D, Lu Q, Pfeifer GP, 5-hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations, *Cancer Research* 2011, 71(24): 7360-5

Jin SG, Kadam S, Pfeifer GP, Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5- methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2, *Nature* 2010, 468:839-843

Jones PA, Baylin SB, The epigenome of cancer, *Cell* 2007, 128: 683-692

Jones TR, Bigner SH, Schold SC Jr, Eng LF, Bigner DD, Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expression, *American Journal of Pathology* 1981, 105: 316-327

Jurcic JG, Soignet SL, Maslak AP, Diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia, *Current Oncology Report* 2007,9: 337-344

Kegel B, Epigenetik- Wie Erfahrungen vererbt werden, Dumont Köln, 2009.

Kemmerich K, Dingler FA, Rada C, Neuberger MS, Germline ablation of SMUG1 DNA glykosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of Ung<sup>-/-</sup>MSH2<sup>-/-</sup> mice, *Nucleic Acid Research* 2012, 1-10

Kleihus P, Burger PC, Scheithauer BW, The new WHO classification of brain tumors, *Brain Pathology* 1993, 3: 225-268

Kleihus P, Cavenee WK, World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of the nervous system, IARC Press, Lyon, 2000

Klug M, Heinz S, Gebhard C, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Rehli M, Active DNA demethylation in human postmitotic cells correlates with activating histone modifications, but not transcription levels, *Genome Biology* 2010, 11(6):R63

Kohli RM, Zhang Y., TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation, *Nature*. 2013 Oct 24;502(7472):472-9

Koivunen P, Laukka T; The TET enzymes; *Cell Mol Life Sci*. 2017 Nov 28

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, Viguié F, Quesnel B, Beyne-Rauzy O, Solary E, Vey N, Hunault-Berger M, Fenaux P, Mansat-De Mas V, Delabesse E, Guardiola P, Lacombe C, Vainchenker W, Preudhomme C, Dreyfus F, Bernard OA, Birnbaum D, Fontenay M; Groupe Francophone des Myélodysplasies, TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs), *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3285-91

Kreth S, Heyn J, Grau S, Kretzschmar HA, Egensperger R, Kreth FW, Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma, *Neuro Oncology* 2010, 12(6): 570-9

Kriaucionis S, Heintz N., The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain, *Science*. 2009 May 15;324(5929):929-30

Kraus TF, Globisch D, Wagner M, Eigenbrod S, Widmann D, Münzel M, Müller M, Pfaffeneder T, Hackner B, Feiden W, Schüller U, Carell T, Kretzschmar HA, Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors, *Int J Cancer*. 2012 Oct 1;131(7):1577-90

Kraus TF, Kolck G, Greiner A, Schierl K, Guibourt V, Kretzschmar HA. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and intratumoral heterogeneity as an epigenomic hallmark of glioblastoma, *Tumour Biol*. 2015 Nov;36(11):8439-464

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA; Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines; *Cancer Cell*. 2006 May;9(5):391-403

Levin VA, Panchabhai SC, Shen L, Kornblau SM, Qiu Y, Baggerly KA, Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines, *Journal of Proteome Research* 2010, 9(1): 179-91

Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q, Lee CW, Hu D, Lian BQ, Kleffel S, Yang Y, Neiswender J, Khorasani AJ, Fang R, Lezcano C, Duncan LM, Scolyer RA, Thompson JF, Kakavand H, Houvras Y, Zon LI, Mihm MC Jr, Kaiser UB, Schatton T, Woda BA, Murphy GF, Shi YG., Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma, *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1135

Li Y et al, The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells, *PLoS Biol* 8:e1000533

Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schübeler D, Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states, *Nature Genetics* 2011, 43: 1091-1097

Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR, TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23), *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):637-41

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW, The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P, The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, *Acta Neuropathologica* 2007, 114:97-109

Lu C<sup>1</sup>, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB., IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation, *Nature*. 2012 Feb 15;483(7390):474-8

Ma Y, Feng Q, Sekula D, Diehl JA, Freemantle SJ, Dmitrovsky E, Retinoid targeting of different D-type cyclins through distinct chemopreventive mechanisms, *Cancer research* 2005, 65:6476-83

Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE, DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation, *Science* 2003, 302(5646):890-3

Mason EF, Hornick JL, Succinate dehydrogenase deficiency is associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine production in gastrointestinal stromal tumors: implications for mechanisms of tumorigenesis, *Mod Pathol.* 2013 Nov;26(11):1492-7

C Meyer, E Kowarz, J Hofmann, A Renneville, J Zuna, J Trka, R Ben Abdelali, E Macintyre, E De Braekeleer, M De Braekeleer, E Delabesse, M P de Oliveira, H Cavé, E Clappier, J J M van Dongen, B V Balgobind, M M van den Heuvel-Eibrink, H B Beverloo, R Panzer-Grümayer, A Teigler-Schlegel, J Harbott, E Kjeldsen, S Schnittger, U Koehl, B Gruhn, O Heidenreich, L C Chan, S F Yip, M Krzywinski, C Eckert, A Möricke, M Schrappe, C N Alonso, B W Schäfer, J Krauter, D A Lee, U zur Stadt, G Te Kronnie, R Sutton, S Izraeli, L Trakhtenbrot, L Lo Nigro, G Tsaur, L Fehina, T Szczepanski, S Strehl, D Ilencikova, M Molkentin, T Burmeister, T Dingermann, T Klingebiel and R Marschalek, *Oncogenes, Fusion Genes and Tumor Suppressor Genes- New insights to the MLL recombinome of acute leukemias, Leukemia (2009) 23, 1490–1499*

Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, Keightley PD, Bishop SM, Clarke AR, Bird A, Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice, *Science* 2002, 297: 403-405

Müller, M; Muir, TW; Histones: At the Crossroads of Peptide and Protein Chemistry; *Chem Rev.* 2015 Mar 25; 115(6): 2296–2349

Nabel CS, Manning SA, Kohli RM, The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation, and Oxidation as Modulators of Genomic Potential, *American Chemical Society Chemical Biology* 2011, 7: 20-30

Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, Katz E, Dixon JM, Harrison DJ, Meehan RR, Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes, *genome Research* 2012, 22(3):467-77

Nejman D, Straussman R, Steinfeld I, Ruvolo M, Roberts D, Yakhini Z, Cedar H, Molecular rules governing de novo methylation in cancer, *Cancer Res.* 2014 Mar 1;74(5):1475-83

Niles RM, Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer, *Mutation research* 2004, 555: 81-96

Niu CS, Li MW, Ni YF, Chen JM, Mei JM, Li J, Fu XM, effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010, 29: 113

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network, Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma, *Cancer Cell* 17: 510-522

O'Malley BW, Kumar R, Nuclear receptor coregulators in cancer biology, *Cancer Research* 2009, 69: 8217-22

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P., Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study, *Cancer Research* 2004, 64: 6892-6899

Ohgaki H, Kleihues P, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *The American Journal of Pathology* 5, 2007

Ohgaki H, Kleihues P, The definition of primary and secondary glioblastoma, *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):764-72

Ono, R., Taki, T., Taketani, T., Taniwaki, M., Kobayashi, H., Hayashi, Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23), *Cancer research* Volume 62, Issue 14, 15 July 2002, Pages 4075-4080

Orr BA, Haffner MC, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Eberhart CG. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma, *Plos one* 2012, 7(7) e41036

Pang AP, Sugai C, Maunakea AK; High-throughput sequencing offers new insights into 5-hydroxymethylcytosine; *Biomol Concepts.* 2016 Jun 1;7(3):169-78

Parsons DW, Jones S, Zhang X, JCH Lin, RJ Leary, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, LA Diaz Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW, An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme, *Science* 2008, 321: 1807-1812

Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG, Deconstructing repression: evolving models of corepressor action, *Nature Reviews Genetics* 2010, 11:109-23

Pietrak B, Zhao H, Qi H, Quinn C, Gao E, Boyer JG, Concha N, Brown K, Duraiswami C, Wooster R, Sweitzer S, Schwartz B., A tale of two subunits: how the neomorphic R132H IDH1 mutation enhances production of  $\alpha$ HG, *Biochemistry*. 2011 May 31;50(21):4804-12

Pfeifer GP, Xiong W, Hahn MA, Jin SG, The role of 5-hydroxymethylcytosine in human cancer, *Cell Tissue Res*. 2014 Jun;356(3):631-41

Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobson SE, Reik W, Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency, *Nature* 2010, 463: 1101-1105

Reitman ZJ, Yan H, Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism, *Journal of the National Cancer Institute* 102: 932-941

Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G, Molecular diagnostics of gliomas: state of the art, *Acta Neuropathologica* 2010, 120: 567-584

Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W, Mueller W, Hartmann C, Paulus W, von Deimling A. Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma, *Acta Neuropathol*. 2014 Oct;128(4):551-9

Satyanarayana A, Kaldis P, Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms, *Oncogene* 2009, 28: 2925-39

Schröder A, Müller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T, The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BioMed Central Molecular Biology* 2006, 7:3

Shi Z, Lou M, Zhao Y, Zhang Q, Cui D, Wang K, Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation of U87 glioma stem/progenitor cells, *Cell Mol Neurobiol*. 2013 Oct;33(7):943-51

Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM, DNA methyltransferase1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, 108:3630-3635

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB, Identification of human brain tumor initiating cells, *Nature* 2004, 432(7015): 396-401

Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, Beringer G, Brikbak NJ, Yuan X, Cantley LC, Richardson AL, Pandolfi PP, MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling, *Cell*. 2013 Jul 18;154(2):311-24

Soprano DR, Teets BW, Soprano KJ, role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells, *Vitamin & Hormons* 75: 69-95

Sproul D, Meehan RR, Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation, *Brief Funct Genomics*. 2013 May;12(3):174-90

Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Han JW, Kim SS, Namburi S, Hermetz K, Kim JJ, Rudd MK, Yoon YS, Ren B, He C, Jin P, Integrating 5- hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells, *Nature* 2011, 473: 394-397

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y, G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription, *Embo Journal* 2008, 27: 2681-2690

Tahiliani, M. et al., Conversion of 5- methylcytosine to 5- hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 2009, 324: 930-935

Tang XH, Gudas LJ, Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer, *Annual Review of Pathology* 2011.6:345-64

Takai H, Masuda K, Sato T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Katou Y, Ogawa H, Morishita Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T; 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex; *Cell Rep*. 2014 Oct 9;9(1):48-60

van den Bent MJ, Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective, *Acta Neuropathol*. 2010 Sep;120(3):297-304

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions, *Pharmacol Rev*. 2000 Jun;52(2)

Wang L, Chia NC, Lu X, Ruden DM, Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress, *Epigenetics* 2011, 6:853-856

Weber M, Schubeler D, Genomic patterns of DNA methylation targets and function of an epigenetic mark, *Current Opinion in Cell Biology* 2007, 19: 273-280

Weiss A, Keshet I, Razin A, Cedar H, DNA demethylation in vitro: involvement of RNA, *Cell* 1996, 86(5): 709-18

Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW, Epigenetic stem cell signature in cancer, *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):157-8

Williams SC, Karajannis MA, Chiriboga L, Golfinos JG, von Deimling A, Zagzag D., R132H-mutation of isocitrate dehydrogenase-1 is not sufficient for HIF-1 $\alpha$  upregulation in adult glioma, *Acta Neuropathol.* 2011 Feb;121(2):279-81

Wu X, Zhang Y; TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond; *Nat Rev Genet.* 2017 Sep;18(9):517-534

Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, Liu L, Liu Y, Yang C, Xu Y, Zhao S, Ye D, Xiong Y, Guan KL, Inhibition of  $\alpha$ -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors, *Genes Dev.* 2012 Jun 15;26(12):1326-38

Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y, Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases, *Cancer Cell* 2011, 19: 17-30

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD., IDH1 and IDH2 mutations in gliomas, *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73

Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang JY, Ma SH, Liu J, Xu ZD, Zhu HG, Ling ZQ, Ye D, Guan KL, Xiong Y, Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation, *Onkogene*, 2012

Yang M, Soga T, Pollard PJ, Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer, *J Clin Invest.* 2013 Sep 3;123(9):3652-8

Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin CR, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A, Laterra J, Xia S, Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition, *Oncogene* 2011, 30(31):3454-67

Yiwen Jiang, Lene Uhrbohm, On the origin of glioma, *Upsala Journal of Medical Sciences* 2012, 117: 113-121

Yu-Fei He, Bin-Zhong Li, Zheng Li, Peng Liu, Yang Wang, Qingyu Tang, Jianping Ding, Yingying Jia, Zhangcheng Chen, Lin Li, Yan Sun, Xiuxue Li, Qing Dai, Chun-Xiao Song, Kangling Zhang, Chuan He, Guo-Liang Xu, Tet mediated formation of 5- carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA, *Science* 2011, 333: 1303-1307

Yung WKA, Kyritsis AP, Gleason MJ, Levin VA, Treatment of recurrent malignant gliomas with high-dose 13-cis-retinoic Acid, *clinical Cancer Research* 1996, 2: 1931-1935

Yung WKA, Lotan R, Lee P, Lotan D, Steck PA, Modulation of growth and epidermal growth factor receptor activity by retinoic acid in human glioma cells, *Cancer Research* 1989, 49: 1014-1019

Zang C, Wächter M, Liu H, Posch MG, Fenner MH, Stadelmann C, von Deimling A, Possinger K, Black KL, Koeffler HP, Elstner E, Ligand for PPARgamma and RAR cause induction of growth inhibition and apoptosis in human glioblastomas, *Journal of Neurooncology* 2003, 65(2): 107-118

Zhan L, Lu X, Lu J, Liang H, Dai Q, Xu G, Luo C, Jiang H, He C, Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5- carboxylcytosine-modified DNA, *Nature Chemical Biology* 2012, 8(4):328-30

Zhang F<sup>1</sup>, Liu Y<sup>2</sup>, Zhang Z<sup>1</sup>, Li J<sup>1</sup>, Wan Y<sup>3</sup>, Zhang L<sup>1</sup>, Wang Y<sup>1</sup>, Li X<sup>1</sup>, Xu Y<sup>1</sup>, Fu X<sup>1</sup>, Zhang X<sup>1</sup>, Zhang M<sup>4</sup>, Zhang Z<sup>4</sup>, Zhang J<sup>1</sup>, Yan Q<sup>1</sup>, Ye J<sup>1</sup>, Wang Z<sup>1</sup>, Chen CD<sup>2</sup>, Lin W<sup>5</sup>, Li Q<sup>1</sup>, 5-hydroxymethylcytosine loss is associated with poor prognosis for patients with WHO grade II diffuse astrocytomas, *Sci Rep.* 2016 Feb 11;6:20882

Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG, TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine, *Cell Research* 2010, 20: 1390-1393

Zhang Y, Dutta A, Abounader R, The role of microRNAs in glioma initiation and progression, *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17:700-12

Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y, Glioma derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha, *Science* 2009, 324: 261-265

Zhao B, Bian EB, Li J, Li J, New advances of microRNAs in glioma stem cells, with special emphasis on aberrant methylation of microRNAs, *J Cell Physiol.* 2014 Sep;229(9):1141-7

Zhu JK, Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases, *Annu Rev Genet.* 2009;43:143-66

Zülch KJ, Histological typing of tumors of the central nervous system. World Health Organization, Geneva, 1979