Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

Molekulare und funktionelle Charakterisierung differentiell methylierter Kandidatengene in *IDH1*-mutierten Gliomen.

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Marc Maximilian Weber
2021

Als Inaugural-dissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Thomas Beez

Für meine Familie

Zusammenfassung

Bösartige Gliome sind die häufigsten primären Hirntumoren im Erwachsenenalter. Trotz eines multimodalen Therapieansatzes, ist es bisher nicht gelungen Patienten bösartigen Gliomen zu heilen. Fortschritte in der molekularen Diagnostik hirneigener Tumore erlauben es heutzutage, Gliome anhand molekularer Marker genauer zu differenzieren und Prognose sowie Therapieerfolg für jeden Patienten individuell besser abzuschätzen. Einer der wichtigsten molekularen Marker ist das Vorliegen von Mutationen im Gen für die Isocitratdeyhdrogenase 1 (*IDH1*). Die Funktionsänderung dieses Enzyms, führt zu einer intrazellulären Veränderung der DNA-Methylierung. Es kommt zu Hypermethylierung der DNA, welche wiederum Einfluss auf die Expression verschiedener Gene hat. Ziel dieser Arbeit ist es, in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationstatus in Gliomen differentiell methylierte Kandidatengene zu finden und deren funktionelle Auswirkungen *in vitro* zu evaluieren. Durch bioinformatische Auswertungen von Datensätzen aus der *The Cancer Genome Atlas* (*TCGA)*-Datenbank gelang es, zwölf Kandidatengene zu identifizieren, welche eine differentielle Promotormethylierung in Abhängigkeit vom *IDH1*-Status aufwiesen. RT-PCR-Analysen in einer Kohorte von Gliomen zeigten eine signifikant höhere Expression der Gene *SMOC1*, *BCAN* und *GNMT* in *IDH1*-mutierten Gliomen. Das bisher nur wenig erforschte Kandidatengen *SMOC1* wurde für weitere molekulare und funktionelle Untersuchungen ausgewählt. Dabei konnten Western Blot-Untersuchungen zeigen, dass eine *IDH1*-Mutation *in vitro* ausreichend ist, um eine erhöhte *SMOC1*-Sekretion zu induzieren. Mit Hilfe einer durch Klonierung neu etablierten *SMOC1*-überexprimierenden Glioblastomzelllinie wurde der Einfluss von *SMOC1* auf die Proliferation von Gliomzellen und deren Sensitivität gegenüber Chemotherapie mit Etoposid und Gemcitabin und eine mögliche Beeinflussung des BMP-2- sowie TGF-β 1-Signalweges analysiert. Hierbei zeigte sich weder ein Einfluss der SMOC1-Expression auf den BMP-2 und TGF-β 1 Signalweg, noch auf die Zellproliferation. Es ließ sich jedoch eine verminderte Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika Etoposid und Gemcitabin nachweisen. In dieser Dissertationsarbeit wurden neue interessante Kandidatengene identifiziert, die eine differentielle Expression in *IDH1*-mutierten Gliomen aufweisen. Die differentiell exprimierten Matrixproteine *SMOC1* und *BCAN* werfen die Frage nach Bedeutung der *IDH1*-Mutation für die Tumormikroumwelt auf, eine bisher kaum erforschte Fragestellung. Insbesondere die herabgesetzte Chemotherapeutikasensibilität durch *SMOC1*-Expression machen *SMOC1* zu einem interessanten Kandidaten für weitergehende Untersuchungen.

Abstract

The most common tumors of the central nervous system are gliomas. Despite multimodal therapy, including resection, radiation and chemotherapy, these tumors have an overall poor prognosis. Progress in the field of molecular diagnostics and the discovery of novel biomarkers led to a better understanding and classification of these tumors. Therefore, it is possible to predict life expectancy and effectiveness of certain therapies. In the majority of diffuse and anaplastic gliomas mutations in the isocitratdehydrogenases 1 (*IDH1*) gene are found. Thus, presenting one of the most important newly found molecular markers. A point mutation of codon 132 in *IDH1* leads to a change in the protein function. Instead of catalyzing the reaction of isocitrate to alpha-ketogluterate (*aKG*), *IDH1* turns *aKG* into 2-hydroxygluterate. This causes changes in DNA methylation of the tumors which can lead to a differential gene expression. Aim of this work is to find differentially methylated genes in *IDH1* mutant gliomas and to explore their functional impact on glioma cells. Through bioinformatic analysis using data from *The Cancer Genome Atlas* (*TCGA*) we found 12 differentially methylated genes for further research. Real-time PCR revealed a significant higher mRNA expression of the genes *SMOC1*, *BCAN* and *GNMT* in *IDH1*-mutant gliomas. Furthermore, genes *C11orf63*, *TGIF1*, *JAG1* und *NFKBIZ* showed significantly lower mRNA expression in *IDH1*-mutant glioma. Since there is little known about the extracellular protein *Sparc related modular calcium binding 1* (*SMOC1*), this protein was chosen for further investigations. *IDH1* mutation alone was sufficient to cause an *in vitro* overexpression of *SMOC1*. Glioma cells overexpressing *SMOC1* showed lower vulnerability towards the chemotherapeutics Etoposide and Gemcitabine. Expression of *SMOC1* did not alter cell proliferation, BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) or TGF-β 1 (Transforming growth factor 1) signaling significantly *in vitro*. Further investigations are needed to explore the regulation of *SMOC1* and how it alters sensitivity towards chemotherapeutic agents like Etoposide and Gemcitabine in glioma.

Abkürzungsverzeichnis

2-HG	2-Hydroxyglutarat
5mC	5-Methylcytosin
MGMT	6-O-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AML	Akute myeloische Leukämie
A	Ampere
BMP	Bone morphogenetic protein
BCAN	Brevican
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
C11orf63	Chromosome 11 open reading frame 63
CIMP	CpG island methylator phenotype
CDK	Cyclin dependent kinase
dNTP	Desoxinukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
Deptor	Domain containing mTor-interacting protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGFR	Epidermal growth factor receptor
C-Flip	FLICE-like inhibitory protein
GSZ	Gliomstammzellen
GSSD	Gluthationdisulfid
GNMT	Glycin N-Methyltransferase
°C	Grad Celsius
g	Gramm
HNRNPF	Heterogenous nuclear ribonucleiprotein F
HIF1α	Hypoxie-induzierender Faktor alpha
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
IDH2	Isocitratdehydrogenase 2
JAG1	Jagged 1
JAK	Januskinase
JmJC	Jumonji C
JHY	Junctional cadherin complex regulator
l	Liter
mTor	Mammalian target of rapamycin
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
miR	Micro-RNA
µ	Mikro
m	Milli
min	Minuten
MAPK	Mitogen-activierte Proteinkinase
M	Molar
n	Nano

NFκBIZ	NF-kappa-B-Inhibitor-Zeta
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4 group
NR2E1	Orphan nuclear receptor TLX
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSS	Reduziert reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
s	Sekunden
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SMOC1	Sparc related modular calcium binding 1
SMOC2	Sparc related modular calcium binding 2
h	Stunden
d	Tage
TMZ	Temozolomid
TET-2	Tet-methylcytosindioxygenase 2
TGFBR1	TGFβ1-Rezeptor Typ-1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGFIF1	Transforming growth factor ß induced factor 1
TCA	Tricarboxylsäure
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween 20
TGF-β	Tumor growth factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
V	Volt
Wt	Wildtyp
WHO	World Health Organization
αKG	α-Ketogluterat

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Klinische Bedeutung von Hirntumoren 1
1.2 Allgemeine Grundlagen der Tumorpathogenese 2
1.3 Klassifikation von Hirntumoren 3
1.4 Entitäts-definierende molekulare Marker 4
1.5 IDH-Mutationen in Gliomen 5
1.6 Chemotherapieresistenz in Gliomen 7
1.7 Die im Rahmen der Dissertation untersuchten Kandidatengene 8
1.17.1. BCAN 8
1.17.2. C11orf63 /Jhy 9
1.17.3. CFLAR 9
1.17.4. GNMT 9
1.17.5. HNRNPF 10
1.17.6. NFKI-Zeta 10
1.17.7. NR2E1 11
1.17.8. NR4A1 11
1.17.9. JAG1 11
1.17.10. SMOC1 12
1.17.11. SMOC2 12
1.17.12. TGIF1 13

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 13

3 Materialien und Methoden 14
3.1 Tumorgewebe 14
3.2 Bioinformatische Auswertung von Daten aus der *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)-Datenbank 15
3.3 DNA- und RNA-Extraktion 16
3.4 cDNA Synthese 16
3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 17
3.6 Real-Time PCR 18
3.7 Pyrosequenzierung 19
3.8 Natriumbisulfit-Behandlung von DNA 19
3.9 DNA Aufreinigung 20
3.10 Sanger-Sequenzierung 20
3.11 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren 20
3.12 Generierung kompetenter *E. coli* 24
3.13 Transformation kompetenter *E. coli* 24
3.14 Präparation von Plasmiden aus *E. coli* 25
3.15 Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen 26
3.16 Zellkulturtechniken 27
3.16.1. *In vitro* Kultivierung von Gliomzellen 27
3.16.2. Einfrieren der Zellen 27
3.16.3. Auftauen der Zellen 28
3.16.4. Transfektion von U87MG-Glioblastomzellen 28
3.16.5. Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 29
3.16.6. Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren 29
3.17 Zytostatikabehandlung und MTT-Assay 30
3.18 Proliferationsassay 33
3.19 Proteinextraktion und Aufreinigung 33
3.20 BSA-Assay 33
3.21 SDS-Gelelektrophorese 34
3.22 Western Blotting 34

3.23 Nachweis von SMOC1 im Sekretom von U87MG-Glioblastomzellen ... 36
3.23.1. Zellkultur ... 36
3.23.2. Proteinpräzipitation ... 36
3.23.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot ... 37
3.24 Puffer und Lösungen ... 37

4 Ergebnisse ... 40
4.1 Erhebung des *IDH1*- und *IDH2*-Mutationsstatus in der Tumorserie mittels Pyrosequenzierung ... 40
4.2 Analyse der mRNA-Expression von zwölf Kandidatengenen innerhalb der Tumorserie in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus ... 43
4.3 Analyse des Promotormethylierungsstatus von *SMOC1* mittels Bisulfit-Sequenzierung ... 49
4.4 Erstellung von stabil transfizierten SMOC1-exprimierenden U87MG-Glioblastomzellen ... 52
4.5 Sekretion des SMOC1-Proteins in das Nährmedium von kultivierten U87MG-Glioblastomzellen ... 53
4.6 Einfluss der SMOC1-Expression auf die Zellproliferation von U87MG-Glioblastomzellen ... 56
4.7 Zytostatikasensibilität *SMOC1*-exprimierender U87MG-Glioblastomzellen im Vergleich zu Leervektor-Kontrollen ... 57
4.8 Einfluss von SMOC1 auf den BMP-2- und den TGF-β1-Signalweg ... 59

5 Diskussion ... 63
5.1 Differentielle Expression von Kandidatengene in Gliomen in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus ... 63
5.2 Einfluss der IDH-Mutation auf die *SMOC1*-Expression in Gliomen ... 64
5.3 Auswirkungen der SMOC1-Überexpression in Glioblastomzellen ... 65
5.4 Auswirkungen von *SMOC1* auf die Zellproliferation in Glioblastomzellen ... 65
5.5 Interaktion von SMOC1 mit dem *TGF-β*-und dem *BMP*-Signalweg ... 66
5.6 Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika in Gliomen ... 68
5.7 Auswirkungen der SMOC1-Expression auf die Sensibilität von Glioblastomzellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika ... 69
5.8 Schlussfolgerungen ... 70

6 Literatur- und Quellenverzeichnis ... 71

7 Anhang ... 87
7.1. Verwendete Chemikalien ... 87
7.2. Verwendete Geräte ... 89
7.3. PCR-Protokolle ... 90
7.4. Verwendete Oligonukleotide ... 93
7.5. Verwendete Antikörper ... 95

8. Danksagung ... 96

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von Hirntumoren

Tumoren des zentralen Nervensystems umfassen mehr als 100 verschiedene Entitäten und Varianten [1]. Die häufigsten Tumorgruppen bilden die Meningiome (37,6 %), gefolgt von den Hypophysentumoren (16,8 %) und den Glioblastomen (14,6 %) [2]. Glioblastome sind die häufigsten bösartigen Tumoren des zentralen Nervensystems mit einer Inzidenz von ca. 3,2/100.000 Einwohnern in den USA [2]. Damit gehören die Glioblastome zwar insgesamt zu den selteneren Krebserkrankungen, weisen jedoch eine sehr schlechte Prognose auf. Trotz multimodaler Therapieansätze, bestehend aus operativer Tumorresektion, Bestrahlung und Chemotherapie, ist eine Heilung derzeit nicht möglich [3]. Auch unter der genannten multimodalen Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem Glioblastom lediglich ca. 16 Monate [4,5]. Auch in den Medien wurde die Gliomerkrankung in den letzten Jahren mehrfach thematisiert, zum Beispiel durch die Erkrankung des Schriftstellers Wolfgang Herrndorf und dessen Verarbeitung in seinem Buch „Arbeit und Struktur“ [6], oder durch den viel beachteten Film „Halt auf freier Strecke“ des Regisseurs Andreas Dresen [7]. Hirntumoren werden anhand der 2016 publizierten WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems eingeteilt [1]. Darin wird erstmals eine Klassifizierungssystematik beschrieben, die molekulargenetische Marker neben histologischen Befunden berücksichtigt und in einer integrierten Tumorklassifikation zusammenführt. Vor allem durch die Berücksichtigung der molekularen Marker lassen sich anhand der Klassifikation nun noch präzisere Aussagen hinsichtlich Prognose und Therapieoptionen stellen [1]. Einer der wichtigsten molekularen Marker ist die Mutation des Gens für die Isocitratdeyhdrogenase 1 (*IDH1*). *IDH1*-Mutationen wurden erstmals 2008 von Parsons und Mitarbeitern in Gliomen beschrieben wurde [8]. Punktmutationen im Kodon 132 des IDH1-Proteins verändern das aktive Zentrum dieses Enzyms und führen zur Synthese des „Onkometaboliten“ 2-Hydroxyglutarat (2-HG) anstelle des physiologischen Metaboliten alpha-Ketoglutarat (α-KG) [9]. 2-HG fungiert als kompetitiver Inhibitor von α-KG, wodurch α-KG-abhängige Enzyme, u.a. die Tet-Methylcytosindioxygenase 2, in ihrer Aktivität gehemmt werden, was dann wiederum zu einem hypermethylierten Phänotyp der DNA führt [10]. Die aberrante DNA-Methylierung

resultiert in Veränderung der Expression verschiedener Gene [10,11]. Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus differentiell methylierte Gene in Gliomen zu identifizieren und deren möglichen Einfluss auf die Tumorpathogenese zu untersuchen.

1.2 Allgemeine Grundlagen der Tumorpathogenese

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Krebs oder auch Tumoren als ein unkontrolliertes Wachstum abnormaler Zellen, die dabei ihre Grenzen überschreiten und die Fähigkeit besitzen, in umliegende und ferner liegende Organe und Gewebe hineinzuwachsen [12]. Prinzipiell können bösartige Tumoren aus fast jeder Zelle des menschlichen Körpers entstehen, was zu einer Vielzahl unterschiedlicher Neoplasien führt. Dennoch gibt es einige grundlegende Eigenschaften von Tumoren, die sie für ihr unkontrolliertes Wachstum benötigen und die sich in den meisten Neoplasien wiederfinden. Hanahan und Weinberg definierten diese Eigenschaften als sogenannte „Hallmarks of Cancer“ über die sie 2000 und 2011 berichteten [13,14]. Dazu gehören zum einen Faktoren, die ein unbegrenztes Wachstum der Tumorzellen garantieren, wie dauerhaft aktive Stimulation des Zellwachstums, verminderte Sensibilität gegenüber wachstumshemmenden Signalen und das Verhindern des programmierten Zelltods. Zum anderen interagiert der Tumor auch mit seiner Umwelt und den ihn umgebenden Zellen. Gesunde Zellen zeigen dabei geordnete Zell-Zell-Kontakte, sowie eine Polarisierung und Ausrichtung innerhalb des jeweiligen Gewebes. Im Rahmen der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) verlieren Tumorzellen diese Eigenschaften, wodurch sie die Möglichkeit haben, invasiv in umliegendes Gewebe hineinzuwachsen und über Blut- und Lymphwege Fernmetastasen auszubilden [15]. Das Erzeugen eines chronischen Entzündungszustands im umliegenden Gewebe, sowie das vermehrte Einsprossen von Blutgefäßen erleichtert das invasive Wachstum und die Fernmetastasierung zusätzlich. Eine weitere Triebfeder der Tumorentstehung und -progression ist die Entwicklung einer genetischen Instabilität mit Anhäufung von DNA-Mutation [13,14]. Letztendlich lässt sich hierbei eine Evolution im Kleinen beobachten: Mutationen, die zu einem Überlebensvorteil der Tumorzelle führen, werden beibehalten, sodass Tumorzellen mit diesen Mutationen die umgebenden Zellen überwuchern können und damit das gesunde Gewebe zerstören [13,14].

1.3 Klassifikation von Hirntumoren

Baily und Cushing legten 1926 eine erste systematische Klassifikation der hirneigenen Tumoren vor [16]. Namensgebend war hierbei die Ähnlichkeit der jeweiligen Tumorgruppen zu gesunden Gliazellen. Die dabei definierten Namen von Astrozytomen, Glioblastomen und Oligodendrogliomen sind noch heute gebräuchlich [1,16]. Grundsätzlich werden Tumoren des Nervensystems auch heute noch anhand ihres histologischen Bildes in der Lichtmikroskopie typisiert und in verschiedene Tumorentitäten, wie z.B. diffuse Astrozytome, Oligodendrogliome oder Glioblastome eingeteilt. Zusätzlich zur histologischen Typisierung der Tumoren erfolgt eine Gradierung der Tumoren in die WHO-Grade I bis IV, welche die Malignität und den zu erwartenden klinischen Verlauf des jeweiligen Tumors indizieren [1]. WHO-Grad I Tumoren sind in der Regel langsam wachsende Tumoren mit guter Prognose, die durch eine Tumorresektion geheilt werden können. WHO-Grad II Tumoren wachsen langsam, aber infiltrativ in das umgebende Hirngewebe ein, sodass eine komplette Resektion meist nicht möglich ist und es oft zu Rezidiven kommt. WHO-Grad III Tumoren wachsen schnell und weisen Anzeichen einer malignen Entartung wie Zellkernatypien und eine erhöhte Mitoseaktivität auf. WHO-Grad IV Tumoren zeichnen sich schließlich durch ein sehr aggressives Wachstum und histologische Zeichen der Malignität in Form einer hohen mitotischen Aktvität, pathologischen Gefäßproliferaten oder Tumornekrosen aus [1]. Einige Tumorentitäten, wie z.B. die diffuse Astrozytome WHO-Grad II, weisen im Falle eines Rezidivs oftmals einen Progress zu einem anaplastischen Astrozytom WHO-Grad III oder einem Glioblastom WHO-Grad IV auf [17]. Zwar ist auch heute noch die histologische Einordnung eines Tumors anhand des Mikroskopiebefundes die Basis für die Klassifikation von Hirntumoren, jedoch zeigten Studien, dass es hierbei mitunter zu einer Varibilität zwischen unterschiedlichen Pathologen kommen kann [18]. Des Weiteren ergaben mehrere Studien, dass molekulare Marker die Prognose des Patienten zum Teil besser widerspiegeln, als die histologische Klassifikation [19,20]. Deswegen nehmen seit der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 molekularpathologische Merkmale eine zunehmend wichtigere Rolle in der Tumorklassifikation ein [1]. Des Weiteren zeigte sich, dass bei manchen Tumorentitäten, wie z.B. den Medulloblastomen, durch Einsatz molekularer Marker eine Differenzierung in biologisch und klinisch relevante Subtypen möglich ist [21,22]. Wieder andere Tumorentitäten, wie z.B. oligoastrozytäre Gliome, haben keinen Bestand mehr, da sie mittels molekulargenetischer Untersuchungen anderen

Tumorentitäten, d.h. entweder astrozytären oder oligodendroglialen Gliomen zugeordnet werden können [23]. Letztendlich unterscheidet man nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 bei der Einteilung der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliome zwischen diffusen IDH-mutierten Astrozytomen, IDH-mutierten anaplastischen Astrozytomen, IDH-Wildtyp Glioblastomen, IDH-mutierten Glioblastomen, H3-K27M-mutierten diffusen Mittelliniengliomen, IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen, sowie IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten anaplastischen Oligodendrogliomen [1]. Auf weitere astrozytäre Tumore, wie beispielsweise pilozytische Astrozytome oder pleomorphe Xanthoastrozytome, werde ich in der Folge nicht weiter eingehen, da diese nicht Gegenstand der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung sind.

1.4 Entitäts-definierende molekulare Marker

Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 enthält mit der IDH-Mutation, der 1p/19q-Kodeletion und der H3-K27M-Mutation drei Entitäts-definierende molekulare Marker, deren Bestimmung notwendig ist, um astrozytäre und oligodendrogliale Hirntumoren klassifizieren zu können. Ich werde in der Folge zunächst nur auf die 1p/19q-Kodeletion und die H3-K27M-Mutation eingehen. Die IDH-Mutation wird im Anschluss in Abschnitt 1.4. ausführlich behandelt.

Mit Inkrafttreten der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 ist die 1p/19q-Kodeletion Entitäts-definierend für oligodendrogliale Gliome. So spricht man von Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert, und von anaplastischen Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert. In klinischen Studien definiert die 1p/19q-Kodeletion zusammen mit der IDH-Mutation eine Gruppe von diffusen Gliomen, die gut auf eine adjuvante Radio-Chemotherapie ansprechen und mit einer besseren Prognose assoziiert sind, als diffuse Gliome ohne diese Veränderungen [24,25]. Wichtig ist hierbei, dass es sich um eine kombinierte Deletion von 1p und 19q handelt. Eine kleine Gruppe von IDH-Wildtyp Gliomen und Glioblastomen weist eine unvollständige 1p/19q-Deletion auf, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [26]. Gegenstand von aktuellen Diskussionen ist derzeit noch, ob die 1p/19q-Kodeletion allein von prädiktiver Bedeutung für das Ansprechen auf Radiochemotherapie oder auch einen Therapie-unabhängigen prognostischen Wert besitzt [27,28].

Mutationen der Histon H3 Gene *H3F3A* und *HIST1H3B/C* grenzen die zuvor als diffuse intrinsische Ponsgliome bezeichnete Gruppe an hirnstammnahen Gliomen genauer ab. Diese werden nun als diffuse Mittellinengliome, H3-K27M-mutiert bezeichnet. Zumeist sind Kinder und junge Erwachsene betroffen und die Tumoren sind mit einer relativ schlechten Prognose verbunden, wobei dies wahrscheinlich mit der Lokalisation dieser Tumoren in Mittellinien-nahen Strukturen zusammenhängt .

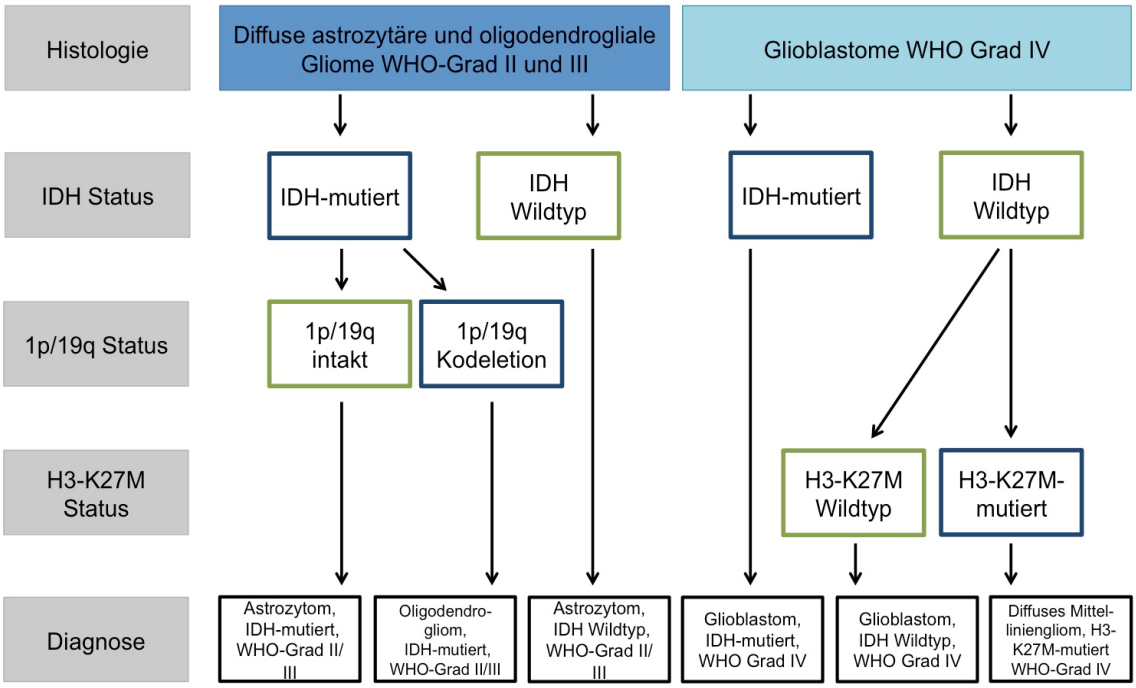


Abb. 1 Entitäts-definierende molekulare Marker für diffuse Gliome. Schematischer, vereinfachter Algorithmus zur Klassifikation von diffusen Gliomen gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 (modifiziert nach .Reifenberger et al. 2017 [29]). Nicht aufgeführt sind die nichtanderweitig klassifizierbaren Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Glioblastome. Bei diesen Diagnosen handelt es sich um Fälle, bei denen molekulargenetische Untersuchungen nicht durchgeführt werden konnten, nicht eindeutig waren, oder mit dem histologischen Bild nicht zu einer integrierten Diagnose vereinbar waren.

1.5 IDH-Mutationen in Gliomen

Einer der wichtigsten molekularen Marker in der Klassifikation diffuser astrozytärer und oligodendroglialer Hirntumoren sind Mutationen in den Genen *IDH1* oder dem Homolog *IDH2*, die für die Isocitratdehydrogenasen 1 bzw. 2 kodieren. 2008 entdeckten Parsons und Mitarbeiter, dass in ca. 12 % aller Glioblastome eine *IDH1*-Mutation vorliegt [8]. In der Folge zeigte sich, dass in 70-80 % der astrozytären und oligodendroglialen Tumoren vom

WHO-Grad II und III, sowie ca. 5-10% der Glioblastome eine Mutation in einem der beiden IDH-Gene nachweisbar ist [30]. Bei der *IDH1*-Mutation handelt es sich in ca. 90 % der Fälle um eine Punktmutation von Guanin zu Adenin an Position 395, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin nach Histidin im Kodon 132 führt (IDH1-R132H) [31]. Des Weiteren konnten auch IDH1-R132C, -R132S, -R132G und -R132L Mutationen nachgewiesen werden [30,32]. Neben Mutationen in *IDH1* wurden deutlich seltener auch Mutationen in *IDH2* festgestellt [30]. Hierbei handelt es sich in der Regel um eine Punktmutation an Position 515 die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin im Kodon 172 führt. Insgesamt stellen die *IDH2*-Mutationen jedoch nur weniger als 1 % aller IDH-Mutationen in Gliomen dar [30].

Weitere Studien wiesen die klinische Bedeutung der IDH-Mutation nach. So zeigte sich, dass die IDH-Mutation auf eine bessere Prognose hinweist und ein besserer Prädiktor für das Gesamtüberleben (*overall survival*) als das WHO-Grading ist [33]. Des Weiteren sind Patienten mit IDH-mutierten Gliomen in der Regel jünger und die Tumoren zeigen eine geringe Kontrastmittelaufnahme, was auf eine intakte Blut-Hirn-Schranke hinweist [34,35]. IDH-Mutationen konnten neben Gliomen unter anderem auch bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), in Cholangiokarzinomen und in Chondrosarkomen nachgewiesen werden [36–38].

IDH1 katalysiert die Umwandlung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat (αKG) unter Reduktion von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat ($NADP^+$) zu NADPH. Bei den *IDH1*-Mutationen handelt es sich um *gain-of-function* Mutationen, sodass anstatt der oben beschriebenen Reaktion die Reaktion von α-Ketoglutarat zu D-2-Hydroxyglutarat (2HG) katalysiert wird. Hierbei wird ausserdem NADPH zu $NADP^+$ oxidiert [39]. Dies hat verschiedene Auswirkungen auf die IDH-mutierte Zelle. Über 60 verschiedene Dioxygenasen benötigen αKG als Kofaktor. Durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu αKG inhibiert 2HG die Aktivität dieser Dioxygenasen [40]. Zwei sehr wichtige Gruppen von durch 2HG inhibierten Dioxygenasen sind die Tet-Methylcytosindioxygenasen, vor allem TET2, und die JumonjiC (JmJC)-Domänen enthaltenden Histondemethylasen. TET2 spielt durch Umwandlung von 5-Methylcytosin (5mC) in 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) eine wichtige Rolle in der Regulation der DNA-Methylierung [40]. DNA-Methylierung findet zu einem großen Teil an CpG-Dinukleotiden statt und so zeigte sich, dass IDH-mutierte Gliome einen hypermethylierten DNA-Phänotyp aufweisen, d.h. insbesondere im Bereich sogenannter CpG-Inseln findet sich eine verstärkte DNA-Methylierung [11]. Eine IDH-Mutation allein reicht aus, um den beschriebenen hypermethylierten CpG-Insel Phänotyp

in Gliomen (*G-CIMP*) zu induzieren [10]. Die durch mutantes IDH induzierte DNA-Methylierung tritt gehäuft an Stellen auf, an welchen CCCTC-bindende Faktoren (CTCF) binden. CTCF-Proteine fungieren zumeist als Abgrenzung zwischen verschiedenen Genabschnitten. Durch Methylierung der CTCF-bindenden DNA-Sequenzen können CTCF-Proteine nicht mehr binden, wodurch Transkriptionsverstärker in Interaktion mit Onkogenen treten und deren Expression verstärken können [41]. Weiterhin zeigte sich, dass IDH-Mutationen in Gliomen zu einer verminderten Demethylierung von Histonen führen und darüber die Genexpression beeinflussen können [42]. IDH-Mutationen, die ein frühes Ereignis in der Gliomgenese sind [43], führen zu epigenetischen Veränderungen und beeinflussen darüber die Entstehung von Gliomen. Des Weiteren lassen sich neben den beschriebenen epigenetischen Veränderungen in IDH-mutierten Gliomen auch Veränderungen des Zellmetabolismus nachweisen. Zytosolische IDH1 bildet einen Großteil des NADPH in der Zelle, welches wiederum ein essentieller Kofaktor bei der Reduktion von Gluthationdisulfid (GSSD) zu Gluthation ist. Gluthation ist ein entscheidendes Antioxidans und reduziert reaktive Sauerstoffspezies (RSS) [44]. RSS führen zu DNA-Doppelstrangbrüchen und induzieren unbalancierte chromosomale Translokationen [45,46]. Die erhöhte Sensibilität von IDH1-mutierten Gliomzellen gegenüber RSS führt zu einem stärkeren Ansprechen auf das Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) [47]. Zusammengefasst können die durch IDH-Mutationen verursachten erhöhten Level an RSS sowohl zu erhöhter Sensibilität gegenüber Chemotherpeutika, als auch zu genetischer Instabilität von Hirntumoren beitragen.

1.6 Chemotherapieresistenz in Gliomen

Trotz des multimodalen Therapiekonzepts sind diffuse Gliome und insbesondere Glioblastome derzeit nicht heilbar. Aufgrund des diffusen Wachstums kann eine alleinige Resektion der Tumoren nicht zur Heilung führen. Deswegen erfolgt, abhängig vom WHO-Grad und von klinischen Faktoren, die adjuvante Bestrahlung und Chemotherapie [48]. Hierbei kommt insbesondere die alkylierende Substanz Temozolomid zum Einsatz sowie unter Umständen die ebenfalls alkylierenden Substanzen Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea (CCNU) und Procarbazin, sowie der Mitosehemmer Vincristin [48]. Letztlich führt jedoch auch der Einsatz dieser Chemotherapeutika nicht zur Heilung, da es den Tumorzellen gelingt, durch verschiedene Mechanismen Resistenzen gegen

Chemotherapeutika zu entwickeln [49]. Zusätzlich stellt die Chemotherapie von Hirntumoren generell eine Herausforderung dar, da aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nur geringe Konzentrationen von Chemotherapeutika im Tumorgewebe erreicht werden können [50]. Des Weiteren kann durch die Expression von ABC-Transportern (ATP-binding-casette), die Chemotherapeutika aus der Tumorzelle transportieren, die Wirksamkeit von Chemotherapeutika vermindert werden [51]. Insbesondere sogenannte Gliomstammzellen (GSZ), d.h. Tumorzellen mit Stammzellen-ähnlichen Eigenschaften, scheinen eine wichtige Rolle in der Chemotherapieresistenz von Gliomen zu spielen. GSZ stellen eine Subpopulation von undifferenzierten Tumorzellen dar, die in der Lage sind, verschiedene Klone von Tumorzellen zu generieren [52]. Man nimmt an, dass bereits wenige GSZ, die eine Chemotherapie und Bestrahlung überleben, ausreichen, um zu einem Rezidiv zu führen [53]. Wichtige Mechanismen zur Resistenz gegenüber Chemotherapie sind DNA-Reparaturmechanismen und die Zellzyklusregulation. Beide sind in GSZ vermehrt ausgeprägt [53]. In dieser Arbeit wurden die Chemotherapeutika Etoposid, Gemcitabin, Hydroxyurea und CCNU verwendet. Etoposid ist ein Topoisomerase-II-Inhibitor, Gemcitabin ein Nukleosidanalogon, Hydroxyurea ein Ribonukleotidreduktaseinhibitor und CCNU ein DNA-Alkylanz.

1.7 Die im Rahmen der Dissertation untersuchten Kandidatengene

Ausgehend von einer bereits vorliegenden Kandidatengenliste von differentiell methylierten Genen in diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III ohne oder mit IDH-Mutation wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt zwölf Kandidatengene näher untersucht. Die der Kandidatengenliste zu Grunde liegenden Methylierungs- und mRNA-Expressiondaten für die ursprüngliche Kandidatengenliste waren bereits aus der TCGA-Datenbank heruntergeladen und bioinformatisch analysiert worden. Die im folgenden analysierten Gene wurden auf Grund ihrer Korrelation von DNA-Methylierung und mRNA-Expressionsanalyse sowie der z.T. interessanten Literaturlage für weitere Untersuchungen ausgewählt.

1.17.1. BCAN

BCAN kodiert für das 1994 von Jarworski und Mitarbeitern entdeckte Proteoglycan Brevican [54]. Brevican ist ein häufiges Proteoglycan der extrazellulären Matrix (ECM) im Gehirn und das kleinste Proteoglycan der Lectican-Familie [55,56]. Brevican wird entweder

sezerniert und in die ECM eingebunden oder an der Zelloberfläche gebunden [57,58]. Astrozytäre Gliome zeigen eine erhöhte Expression von Brevican [59]. Eine Überexpression von Brevican fördert die Invasivität von Gliomzellen [60,61], ein *Knock-down* von Brevican im Tiermodell führte zu verminderter Aggressivität von Gliomzellen [62]. Um die beschriebene Invasivität zu fördern muss Brevican jedoch durch Mitglieder der ADAMTS Familie (Kurzform für *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), einer Gruppe von extrazellulären Proteasen, prozessiert werden [63,64]. Ein möglicher Regulator von Brevican scheint TGF-ß1 zu sein: Bei Behandlung von Astrozyten *in vitro* mit TGF-ß1 zeigt sich eine verminderte Aktivität von ADAMTS4 und eine Verminderung von prozessiertem Brevican [65].

1.17.2. C11orf63 /Jhy

Über den *Chromosom 11 open reading frame 63* (*C11orf63)* ist bisher kaum etwas bekannt, lediglich zum Maushomolog Jhy (*junctional cadherin complex regulator*) wurden bisher Veröffentlichungen publiziert. Hier zeigte sich, dass Jhy Einfluss auf die Zilienentwicklung in ependymalen Zellen hat und ein *Knock-Out* zu einem juvenilen Hydrocephalus in Mäusen führt [66–68].

1.17.3. CFLAR

Das *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator* (*CFLAR*)-Gen kodiert für das gleichnamige Protein, das auch unter dem Namen C-FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) bekannt ist. Von den 13 verschiedenen Splicevarianten des Gens werden lediglich die Varianten c-FLIP$_L$, c-FLIP$_S$ und c-FLIP$_R$ translatiert. Diese sind negative Regulatoren verschiedener Apoptose-Signalwege [69,70]. Ein Überexpression von CFLAR ist in mehreren Tumoren und Tumorzelllinien nachgewiesen worden, unter anderem in chronischer lymphatischer Leukämie, Urothelzellkarzinomen, Adenokarzinomen der Lunge, malignen Melanomen und Gliomen [71–76]. In Astrozytomen hemmt der Proteasomeninhibitor Bortezumib c-FLIP und unterstützt dadurch die Induktion der Apoptose [77]. Histondeacetylaseinhibitoren induzieren ebenso wie NF-Kappa-B Aktivierung Apoptose durch negative c-FLIP Regulation [78,79].

1.17.4. GNMT

Das *GNMT*-Gen kodiert für das Protein Glycin N-Methyltransferase (GNMT), welches die Reaktion von Glycin in N-Methylglycin, auch Sarcosin genannt, unter Umwandlung von S-Adenosylmethionin (SAM) in S-Adenosylhomocystein (SAH) katalysiert. Dadurch hat

es entscheidenden Einfluss auf die Regulation von SAM, dem Methylgruppendonor für die meisten Methylierungsprozesse innerhalb der Zelle [80]. GNMT wird vor allem in der Leber, aber auch im Gehirn exprimiert [81]. Ein *Knock-down* von GNMT führte in Mäusen zur Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) [82,83] und das *GNMT* Genprodukt Sarcosin scheint Einfluss auf die Invasivität von Prostatakarzinomen zu haben [84]. Sarcosin kann des Weiteren auch direkt mit anderen Proteinen interagieren, so wurde nachgewiesen, dass Srcosin das *DEP domain containing mTor-interacting protein* (DEPTOR) bindet und dadurch *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) hochreguliert. Das mTOR-Protein fördert in verschiedenen Tumorarten, unter anderem auch in Glioblastomen, die Zellproliferation [85,86].

1.17.5. HNRNPF

Das *Heterogenous nuclear ribonucleoprotein F* (*HNRNPF*)-Gen kodiert für das gleichnamige Protein, das zu den RNA-bindenden Proteinen gehört. Durch Interaktion mit pre-mRNA hat HNRNPF Einfluss auf das alternative Splicen von mRNA und kann dies sowohl fördern als auch inhibieren [87]. So reguliert HNRNPF über alternatives Splicen z.B. die Differenzierung von Oligodendrozyten. Ein *Knock-down* von HNRNPF führt hier zu einer Hochregulation von Zelldifferenzierung induzierenden Faktoren [88]. In Magen- und Kolonkarzinomen zeigt sich eine erhöhte, in HCCs eine vermindert Expression von HNRNPF [89,90].

1.17.6. NFKI-Zeta

NF-kappa-B-Inhibitor-Zeta (NF κ BIZ) ist ein Protein, welches als Teil der NF-kappa-B-Inhibitoren-Familie durch binden an NF-kappa-B (NF- κ B) Proteine selbige reguliert, indem es deren Translokation in den Zellkern verhindert [91]. NF- κ B-Proteine sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf Inflammation, Proliferation, Apoptose, sowie Immunantwort haben [92]. NF κ BIZ kann den NF- κ B-Signalweg sowohl positiv als auch negativ regulieren und darüber Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose haben [93]. NF κ BIZ selbst wird über *Toll-like*-Rezeptoren sowie Lipopolysaccharide reguliert [94]. In Glioblastomen scheint darüberhinaus die *microRNA-223* einen regulatorischen Effekt auf NF κ BIZ zu haben [95]. Des Weiteren wird in Glioblastomzelllinien NF κ BIZ durch γ-Strahlung induziert [96].

1.17.7. NR2E1

Das Gen *NR2E1* kodiert den *orphan nuclear receptor* TLX, der ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor ist. TLX ist vor allem in der subventrikulären Zone des Seitenventrikels und der subgranularen Zone des Hippocampus stark exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation neuronaler Stammzellen im erwachsenen Gehirn [97]. So ist TLX beispielsweise notwendig für die physiologische Ausbildung des Cortex während der Embryogenese [98]. Reguliert wird TLX unter anderem durch die microRNA *let-7d*, welche die mRNA von TLX bindet [99]. Mehrere Studien zeigten, dass eine Dysregulation von TLX Hirntumorbildung initiieren kann [100,101]. So führt eine erhöhte Expression von TLX zu einer Suppression von p21,sowie zu einer verstärkten Expression von Sox2,was wiederum die Gliomagenese fördert [102,103].

1.17.8. NR4A1

Nuclear receptor subfamily 4 group A (NR4A) ist eine Gruppe von drei homologen *orphan nuclear receptors* zu denen NR4A1 *(Nuclear receptor subfamily 4 group A 1*) gehört [104]. NR4A1 spielt in verschiedenen intrazellulären Prozessen eine Rolle und interagiert mit vielen für die Kanzerogenese wichtigen Signalwegen. In einigen Tumorentitäten korrelierte verstärkte Expression von NR4A1 mit verstärkter Proliferation und Tumorzellüberleben, so z.B. in Prostatakarzinomen via Hochregulation von Cyclin D2 [105], oder via reaktiven Sauerstoffspezies (RSS) in Pankreaskarzinomen [106]. In akuten myeloischen Leukämien (*AML*), bei denen ebenfalls *IDH1*-Mutationen festgestellt werden konnten, zeigt sich NR4A1 als Tumorsuppressor: *Knock-down* von NR4A1 induziert AML in Mäusen und eine Reexpression von NR4A1 senkt die Proliferationsrate bei AML [107,108]

1.17.9. JAG1

Das vom *JAG1*-Gen exprimierte Protein Jagged1 (JAG1) ist einer von vier Liganden des Notch-Signalwegs [109]. Der Notch-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation sowie der Neurogenese [110]. Über diesen Signalweg moduliert JAG1 die Entwicklung verschiedener Organe wie Herz, Gehirn, sowie von Blutgefäßen [111]. Ein Funktionsverlust von JAG1 durch Mutationen führt zum Allagille-Syndrom, einer seltenen Erbkrankheit mit schweren Herzfehlern [112]. Eine Überexpression hingegen führt zur Proliferation von Endothel und Aussprossung von Blutgefäßen und kann damit auch die Tumorangiogenese fördern [113]. So ist eine Überexpression von JAG1 auch in verschiedenen Tumorentitäten nachweisbar: in Glioblastomen und Kolonkarzinomen fördert es das Überleben von Tumorstammzellen [114,115], bei Brustkrebs korreliert die

Expression mit einer schlechten Prognose [116]. Die Expression von JAG1 wird maßgeblich von anderen mit der Tumorentstehung assoziierten Signalwegen induziert, so z.B. durch den TGF-ß1-, oder den Wnt-Signalweg [117,118].

1.17.10. SMOC1

Das *Sparc related modular calcium binding 1* (SMOC1) Protein wurde erstmals 2002 von Vannahme und Kollegen beschrieben [119]. Damals wurde es als Glykoprotein mit Kalzium-abhängiger Konformation beschrieben, das vor allem in der extrazellulären Matrix zu finden ist [119]. Es wirkt als Regulator in der Differenzierung von Knochenmarksstammzellen hin zu Osteoblasten [120]. Darüberhinaus ist die Expression von SMOC1 essentiell für die Entwicklung von Augen und Gliedmaßen in Mäusen und Menschen [121]. Missense oder Nonsense Mutationen von *SMOC1* führen zum Waardenburg-Anophthalmie-Syndrom, bei dem es durch Fehlentwicklung der Neuralleiste zu Anophthalmie, kognitiver Beeinträchtigung und Fehlentwicklung der Gliedmaßen kommt [122,123]. SMOC1 beeinflusst den TGF- β 1-Signalweg durch Inhibierung der Phosphorylierung von SMAD2/3 durch den TGF- β 1-Rezeptor-Typ-1 (*TGFBR1*). Dadurch führt eine erhöhte Expression von SMOC1 zu vermehrter Proliferation von Endothelzellen und zu Angiogenese [124]. Auch in Gliomen zeigte sich eine erhöhte Expression von SMOC1 [125,126], wohingegen die Expression in Kolorektalenkarzinomen via Promotormethylierung herunterreguliert ist [127]. Weitere intra- und extrazelluläre Funktionen von SMOC1 sind wahrscheinlich. So konnte gezeigt werden, dass SMOC1 mit dem ECM-Protein Tenascin-C interagiert und die Tenascin-C-vermittelte Migration von Glioblastomzellen inhibiert [126]. Letztlich bedarf die genaue Funktion von SMOC1 noch weiterer Erforschung. Auch die Regulation der SMOC1-Expression ist noch nicht abschließend geklärt. Neben epigenetischen Mechanismen beeinflusst auch die *micro-RNA-223* (*miR-223*) die SMOC1-Expression negativ [124]. Die Expression von *miR-223* scheint sowohl durch Hypoxie als auch durch IDH1-R132H-Mutationen negativ beeinflusst zu werden, was wiederum zu einer vermehrten Expression von SMOC1 führen könnte [124,128]. Eine aktuelle Publikation berichtet, dass eine verstärkte Expression von SMOC1 in Gliomen eine prognostisch günstige Veränderung ist [129].

1.17.11. SMOC2

Sparc related modular calcium binding 2 (SMOC2) ist ein Homolog zum bereits beschriebenen Protein SMOC1 [130]. Eine differentielle Expression von SMOC2 ist vor

allem in gastrointestinalen Tumoren zu beobachten [131,132]. Bei Kolonkarzinomen wird die SMOC2-Expression über den NF- κ B-Signalweg stimuliert. Hier ist die SMOC2-Expression erhöht und fördert die epitheliale-mesenchymale Transition [131]. In papillären Schilddrüsenkarzinomen und Pankreaskarzinomen zeigt sich hingegen eine Unterexpression von SMOC2 [133,134]. Überexpression von SMOC2 führte in hepatozellulären Karzinomen (HCC) zu verminderter Proliferation und Migration *in vitro* und in einem HCC-Mausmodell [135].

1.17.12. TGIF1

Transforming growth factor ß induced factor 1 (TGIF1) ist Teil der *three-amino-acid loop extension* (TALE)-Familie von Homöobox Proteinen, die eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren mit Wirkungen auf Proliferation und Differenzierung regulieren [136]. TGIF1 ist insbesondere bei der Entwicklung des Prosencephalons wichtig [137]. Mutationen im *TGIF1*-Gen führen zum Krankheitsbild der Holoprosencephalie, einer pränatal entstehenden Fehlbildung von Gesicht und Vorderhirn [137]. Des Weiteren korreliert die TGIF1-Expression mit einer schlechten Prognose in akuten myeloischen Leukämien [138]. In Lungen- und Mammakarzinomen zeigten sich ebenfalls erhöhte Expressionslevel von TGIF1 [139,140].

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Da IDH Mutationen in den meisten diffusen und anaplastischen Gliomen, sowie einem Teil der Glioblastomen auftreten, kann eine funktionelle Charakterisierung der zellulären Effekte dieser Mutation zu einem besseren Verständnis von Gliomen führen. Anhand dieser lassen sich möglicherweise neue therapeutische Konzepte zur Heilung dieser bisher unheilbaren Erkrankungen entwickeln. Es ist bekannt, dass IDH Mutationen bereits früh in der Entwicklung von Tumoren auftreten, jedoch nicht ausreichend für die Entstehung von Gliomen sind, was auf eine multifaktorielle Tumorentstehung hinweist [10,141]. Einhergehend mit der IDH Mutation ist ein hypermethylierter Phänotyp der zu einer differentiellen Genexpression in Gliomen führen kann [10]. Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die in Abhängigkeit von IDH1-Mutationen in diffusen Gliomen eine differentielle Promotormethylierung aufweisen. Hierfür wurden zunächst anhand von öffentlich zugänglichen Daten des *The Cancer Genome Atlas* (*TCGA*) eine Konsensus

Liste differentiell methylierter Kandidatengene in Abhängigkeit einer *IDH1/2*-Mutation erstellt. Darauf aufbauend soll die Frage beantwortet werden, ob die differentielle Promotormethylierung auch zu einer veränderten Genexpression führt? Hierfür wurde in einer Serie diffuser Gliome unterschiedlicher WHO-Grade und Histologien aus der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie mittels Pyrosequenzierung der *IDH1/2*-Mutationstatus erhoben und das mRNA-Expressionsniveau der identifizierten Kandidatengene anhand von semiquantitativer Real-Time-PCR Analysen ermittelt. Um die zellulären und funktionellen Auswirkungen eines in Abhängigkeit vom IDH Mutationstatus differentiell überexprimierten Kandidatengens zu untersuchen, sollte anschließende eine stabile Überexpression in einer Gliomzelllinie *in vitro* erzeugt werden. Anhand dieser Zelllinie erfolgten dann Untersuchungen hinsichtlich Chemotherapiesenisitivität, Proliferationsverhalten und Einfluss auf für die Tumorentstehung relevante Signalwege.

3 Materialien und Methoden

3.1 Tumorgewebe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten pseudonymisierten Tumorgewebeproben stammten aus dem Gewebearchiv des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Insgesamt wurden Tumorgewebeproben von 95 Patienten mit Gliomen untersucht, die zwischen 1988 und 2004 in der Klinik für Neurochirurgie operativ behandelt und deren Tumoren am Institut für Neuropathologie diagnostiziert wurden. Bei 16 Tumorgewebeproben war keine ausreichende Menge mehr an genomischer DNA vorhanden, um die Tumoren entsprechend der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems von 2016 zu klassifizieren (s.u.). Die ursprüngliche Klassifikation der Tumoren erfolgte nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2007 (Louis et al. 2007). Alle Tumoren wurden nachträglich auf IDH-Mutationen hin untersucht und gemäß der WHO-Klassifikation 2016 (Louis et al. 2016) reklassifiziert. Die Verwendung von Tumorproben aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie für wissenschaftliche Zwecke wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (Studiennummern 3005, 3005-Ergänzung und 3562). Das vorliegende Dissertationsprojekt wurde im Rahmen

des von der Deutschen Krebshilfe geförderten Max-Eder-Forschungsprojektes von Frau Dr. med. Christiane Knobbe-Thomsen zum Thema "Die Rolle von IDH1-Mutationen in der Pathogenese und Therapie von malignen Gliomen" durchgeführt, für das ebenfalls ein positives Votum der Ethikkommission vorliegt (Studiennummer: 3970). Zusätzlich wurde ein weiteres Votum für die vorliegende Arbeit eingeholt (Studiennummer: 6217R). Insgesamt umfasste die untersuchte Tumorserie gemäß der WHO-Klassifikation von 2007 Proben von acht diffusen Astrozytomen (WHO-Grad II), 14 anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III), sechs Oligodendrogliomen (WHO-Grad II), acht anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO-Grad III), vier Oligoastrozytomen, 15 anaplastischen Oligoastrozytomen und 24 Glioblastomen (WHO-Grad IV). Nach Reklassifizierung gemäß der WHO-Klassifikation 2016 war die untersuchte Tumorserie folgendermaßen unterteilt: 9 diffuse Astrozytome, IDH-mutiert (WHO-Grad II), 8 anaplastische Astrozytome, IDH-mutiert (WHO-Grad III), 2 Glioblastome, IDH-mutiert (WHO-Grad IV), 21 Glioblastome, IDH-Wildtyp (WHO-Grad IV), 2 diffuse Astrozytome IDH-Wildtyp (WHO-Grad II), 12 diffuse Astrozytome IDH-Wildtyp (WHO-Grad III), 5 Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (WHO-Grad II) und 11 anaplastische Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (WHO-Grad III). Neun der ursprünglich 79 Tumoren konnten aufgrund von fehlendem Material nicht mehr gemäß der WHO-Klassifikation von 2016 reklassifiziert werden. Diese wurden im weiteren Verlauf nicht weiter untersucht oder in den Auswertungen berücksichtigt.

3.2 Bioinformatische Auswertung von Daten aus der *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)-Datenbank

DNA-Methylierungsdaten sowie Daten zu somatischen Mutationen für diffuse Gliome der WHO-Grade II und III wurden im März 2013 aus der TCGA-Datenbank heruntergeladen (https://cancergenome.nih.gov/; TCGA-LGG). Die DNA-Methylierungs- und Mutationsdaten wurden statistisch ausgewertet (Dr. Wolfgang Kaisers, Institut für Mathematik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Die DNA-Methylierungsdaten basierten auf Untersuchungen mittels 450K-Arrays (Infinium Human Methylation 450 Bead Chip, Illumina, San Diego, CA). Für weiterführende Analysen wurden diejenigen Kandidatengene ausgewählt, die in den statistischen Auswertungen vier oder mehr CpG-Dinukleotide aufwiesen, die zwischen den Tumoren mit IDH-Mutation und den Tumoren

ohne IDH-Mutation differentiell methyliert waren, wobei hier entscheidend war, dass sich die differentiell methylierten CpG-Dinukleotide im Promotorbereich und nicht im Genkörper des jeweiligen Genes befanden.

3.3 DNA- und RNA-Extraktion

Die DNA und RNA aus Zellen wurde mit Hilfe einer Isolierung mit Trizol gewonnen. Dazu wurden die Zellpellets in 1.5 mL Eppendorftubes in 1.0 mL Trizol gelöst und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Chloroform zur Extraktion hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln für ca. 15 s wurden die Proben erneut 2-3 min Bei RT inkubiert. Zur Separation der Phasen wurden die Proben 15 min bei 4 °C und 12.000x G zentrifugiert. Nach beendeter Zentrifugation wurden die Phasen separiert, wobei die Proben-RNA aus der oberen, wässrigen Phase isoliert werden konnte. Die RNA der Proben wurden mit 500 µL Isopropanol versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Aus der unteren, organischen Phase der extrahierten Proben konnte die DNA gewonnen werden. Zur Isolation der DNA wurde die organische Phase mit 300 µL EtOH (100 %) versetzt. Die Proben wurde mehrfach invertiert und erneut 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 12.000x G durchgeführt. Nach beendeter Zentrifugation wurden die Pellets der einzelnen Proben mit je 1 mL Natriumcitrat-Lösung (0.1 M, 10 % EtOH, pH 8.5) gewaschen und die Proben erneut 30 min bei RT intubiert. Der Waschvorgang mit je 1 mL Natriumcitrat-Lösung wurde ein zweites Mal wiederholt. Die Pellets wurden im Anschluss mit je 1.5 mL EtOH (75 %) versetzt und wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4 cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Scientific™ genutzt. Je Probe wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde im Verhältnis 1:20 mit H_2O verdünnt und bei 4 °C gelagert.

3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist die Methode der Wahl zur *in vitro* Amplifizierung spezifischer Genabschnitte. Hierbei binden spezifische Oligonukleotide an beiden DNA-Strängen des entsprechenden Fragments und geben damit einer DNA-Polymerase die Start- und Endpunkte für die Vervielfältigung des DNA-Fragments vor. Neben diesen spezifischen Oligonukleotiden und der DNA oder cDNA benötigt man für die PCR-Reaktion noch eine Taq-Polymerase, Nukleotide zur Elongation, sowie $MgCl_2$. Des Weiteren kann man z.B. 5 % DMSO zusetzen, um die Amplifikation GC-reicher DNA-Abschnitte zu erleichtern. Die Reaktionen wurden in einem für die jeweilige PCR-Reaktion entsprechend programmierten PCR-Cycler durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung von fünf Minuten bei 94 °C bzw. von 15 Minuten bei 95 °C (bei HotStar-Taq-Polymerasen) werden abhängig von der jeweiligen PCR-Reaktion die folgenden drei Schritte 30 bis 45-mal durchlaufen:

1. Ein Denaturierungsschritt bei 90 bis 95°C;
2. Ein Annealing-Schritt bei 56 bis 60°C, abhängig vom GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide;
3. Ein Elongationsschritt bei 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase.

Im Anschluss an die oben genannte mehrfache Wiederholung der drei erläuterten Schritte findet noch ein abschließender Elongationsschritt für fünf bis 10 Minuten bei 72 °C statt. Produkte der PCR wurden vielfältig weiter genutzt, z.B. für eine anschließende Sanger-Sequenzierung, Pyrosequenzierung oder Klonierung.

Der Ansatz für eine PCR in einem Volumen von 20 µl wurde wie folgt pipettiert:

10x Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Forward und *Reverse*-Oligonukleotid (jeweils 10 µM)	jeweils 0,5 µl
Hot-Start Taq® Polymerase (5 Unit/µl)	0,1 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0,5 µl
DMSO	1 µl
Aqua dest.	13,9 µl
DNA- / cDNA- Template (25 ng/µl)	2 µl

Der 25 µl Ansatz zur PCR für anschließende Pyrosequenzierungen wurde wie folgt pipettiert:

10x Puffer	2,5 µl
dNTPs mit Uracil (2 mM)	2,5 µl
Forward und *Reverse*-Oligonukleotid (jeweils 10 µM)	jeweils 1 µl
Hot-Start Taq® Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Uracil-DNA-Glycosylase (1 U/µl)	0,25 µl
DMSO	1 µl
Aqua dest.	14,55 µl
DNA- / cDNA- Template (20 ng/µl)	2 µl

3.6 Real-Time PCR

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression eines Genes wurden Real-Time PCR-Analysen mit dem StepOnePlus™ System (Applied Biosystems) durchgeführt, wobei die RNA zuvor in cDNA umgeschrieben wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® green interkaliert mit der amplifizierten DNA, wodurch der Anstieg in der Fluoreszenz proportional zu der Menge des amplifizierten Genabschnitts ist. Die Fluoreszenzintensität wird entsprechend kontinuierlich gemessen und reflektiert die Menge des PCR-Produktes.
Pro Probe wurden pro Lauf drei technische Replikate durchgeführt. Als Referenzprobe wurde eine cDNA der Universal Human Reference RNA (Stratagene, San Diego, CA) genutzt. Als endogenes Kontrolltranskript fungierte ADP-ribosylation-factor 1 (*ARF1*). Die relative mRNA Expression, normalisiert zur Universal Human Reference, wurde mit Hilfe der $-2^{\Delta\Delta Ct}$-Methode berechnet. Als Software wurden dabei StepOnePlus™ 2.0 sowie Excel 2010 verwendet.
Ansatz für 20 µl:

SYBR® green Master Mix (Invitrogen)	10 µl
Forward-/Reverse-Oligonukleotid (10 µM)	je 1 µl
Aqua dest.	5 µl
cDNA-Template	3 µl

3.7 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde zur Detektion von *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in der beschriebenen Hirntumorserie genutzt. Die DNA wurde dabei nach dem in 2.3. beschriebenen Protokoll isoliert. Vor der eigentlichen Sequenzierung wurde bereits eine PCR zur Amplifikation des Sequenzabschnittes um Kodon 132 des *IDH1*-Gens bzw. Kodon 172 des *IDH2*-Gens durchgeführt. Die Vorschriften für die PCR zur anschließenden Pyrosequenzierung sind dem Abschnitt 2.4 zu entnehmen. Für die Pyrosequenzieurng wurde pro Probe 60 µl Bead-Mix angesetzt, der sich wie folgt zusammensetzt:

Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Health Care)	2 µl
Aqua dest.	18 µl
PyroMark™ Binding-Buffer (QUIAGEN)	40 µl

Anschließend wurden 10 µl PCR-Produkt und 60 µl des Bead-Mixes für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Währenddessen wurde der Sequenzierungsprimer (IDH1-Cd132psS_v1 bzw. IDH2_Cd172_ps_S) in einer Konzentration von 0,3 µM angesetzt und je 25 µl pro Ansatz auf die Sequenzierungsplatte aufgetragen. Anschließend wurden die zuvor auf dem Schüttler inkubierten Proben mittels einer PyroMark™ Workstation angesaugt, denaturiert, gewaschen und auf die Sequenzierungsplatte übertragen. Dort wurden sie für zwei Minuten bei 80°C inkubiert. Nach 10-15 min Abkühlen wurde die Sequenzierungsplatte in den PyroMark™ Q24 Sequenzierer der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) gegeben. Alle experimentellen Schritte wurden gemäß der Angaben zur Pyrosequenzierung im PyroMark™ Q24 MDX Handbuch durchgeführt.

3.8 Natriumbisulfit-Behandlung von DNA

Die Natriumbisulfit-Behandlung genomischer Tumor-DNA wurde gemäß dem Protokoll des EZ DNA Methylation-Gold™ Kits von Zymo Research (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Es wurden jeweils 500 ng DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt.

Zusätzlich wurden die Proben vor dem Eluieren in 15 µl Aqua dest. für 30 s bei >10.000x G pelletiert.

3.9 DNA Aufreinigung

Zur DNA-Aufreinigung und zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das JetQuick® DNA Purification Kit (Genomed, Löhne, Deutschland) genutzt. Die Aufreinigung wurde gemäß des dem Kit beigefügten Protokolls durchgeführt.

3.10 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung bedient sich der Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei vier PCR-Ansätze parallel durchgeführt werden. Im Unterschied zu einer herkömmlichen PCR werden jedoch jedem der vier zunächst identischen PCR-Ansätze mit den vier dNTPs (2'-Desoxynukleotide) jeweils eines der vier 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) in geringer Konzentration hinzugefügt. Die ddNTPs besitzen im Vergleich zu den dNTPs kein 3'-OH, wodurch beim Einbau der ddNTPs keine Kettenverlängerung stattfinden kann. Die Kettenverlängerung durch die Polymerase findet zwischen der 3'-Hydroxygruppe und der Phosphatgruppe des nächsten Nudekleotids statt, da jedoch bei den ddNTPs kein 3'-OH vorhanden ist, kommt es zu einem Kettenabbruch. Die ddNTPs konkurrieren mit den dNTPs in der Polymerasekettenreaktion, wodurch es zu einer Vielzahl von Syntheseprodukten mit unterschiedlicher Länge kommt. Pro Ansatz Enden die Syntheseprodukte mit dem jeweils gleichen im Unterschuss zugegebenen ddNTP. Trennt man in der Folge das Sequenzierprodukt mittels Kappilargelelektrophorese in einem Seqeunzierer auf, so erhält man ein spezifisches Bandenmuster, anhand dessen man die Sequenz bestimmen kann. Nach Bisulfit-Behandlung und Aufreinigung wurde die DNA für die Sangersequenzierung genutzt, um den *SMOC1*-Promotorbereich in den Tumorproben auf eine aberrante Methylierung hin zu untersuchen. Die Sanger-Sequenzierung erfolgte durch die Firma StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland).

3.11 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

Um SMOC1-überexprimierende Gliomzellen mittels Transfektion zu generieren, musste zunächst ein entsprechender Vektor hergestellt werden. Die Herstellung dieses Vektors erfolgte in drei Arbeitsschritten:

1. Erstellung eines *Inserts,* das die kodierende mRNA-Sequenz von *SMOC1* trägt, damit diese am Ende von den transfizierten Zellen abgelesen und exprimiert werden kann.
2. Linearisierung des pIRES2-EGFP-Vektors.
3. Klonierung des in Schritt 1 generierten *Inserts* in den linearisierten pIRES2-EGFP Vektor

1. Erstellung des *Inserts*:

Zur Erstellung des *Inserts* wurde eine *nested*-PCR unter Verwendung des *AccuPrime*™ Taq DNA Polymerase Kits durchgeführt. Dafür wurde folgender Ansatz pro Probe gewählt:

10X *AccuPrime*™ Buffer	5 µl
SMOC1-Hs-Inf-F1 Oligonukleotid	1 µl
SMOC1-Hs-Inf-R1 Oligonukleotid	1 µl
AccuPrime™ *High-Fidelity* Taq Polymerase	0,2 µl
Aqua dest.	41,8 µl
Human Reference cDNA	1 µl

Die Reaktionen wurden anschließenden im *Biometra*® T3000 Thermocycler mit folgender Programmierung durchgeführt:

1. 94 °C: 2 min
2. 94 °C: 4 min
3. 60 °C: 30 sek
4. 68 °C: 1 min Die Schritte 2. Bis 4. Wurden 39 mal wiederholt
5. 68 °C: 5 min
6. 4 °C: ∞

Das gewonnene PCR-Produkt wurde mittels JetQuick® DNA Purification Kit (Thermo-Fisher) aufgereinigt und in 25 µl Aqua dest. eluiert. Anschließend wurde die Qualität des PCR-Produktes mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Dieses *SMOC1*-FL-Hs PCR Produkt wurde in eine weiteren PCR-Reaktion eingesetzt, um das für die Klonierung gewünschte *Insert* zu erhalten. Für diese zweite PCR-Reaktion wurde der folgende Ansatz verwendet:

10X *AccuPrime*™ Buffer	5 µl
SMOC1-Hs-Inf-F1 Oligonukleotid	1 µl
SMOC1-Hs-Inf-R1 Oligonukleotid	1 µl
AccuPrime™ *High-Fidelity* Taq Polymerase	0,2 µl
Aqua dest.	41,8 µl
SMOC1-FL PCR Produkt	1 µl

Für den Thermocycler wurde das gleiche Protokoll wie zur Amplifikation des *SMOC1*-FL-Hs PCR Produktes verwandt. Das PCR-Produkts wurde anschließend auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Die hierbei im Agarosegel sichtbaren Banden auf Höhe des 1,5 kb Markers wurden ausgeschnitten und mittels JETQUICK Gel Purification Kit in 25 µl Aqua dest. eluiert. Die spektrophotometrische Quantifzierung mittels NanoDrop (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) ergab eine DNA-Konzentration von 132,2 ng/µl.

2. Für die Klonierung wurde der pIRES2-EGFP Vektor der Firma *Clonetech*™/Takara (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Der Vektor ist 5,3 kb lang und verfügt über eine für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) kodierende Region an Position 1254-1973 sowie ein Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen an Position 3204-3998 und einen *plasmid replication origin* (pUC) an Position 4583-5226. Die *multiple cloning site* (MCS) befindet sich an Position 591-665 und enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NHEI, ECOR47III, BGlII, XhoI, SacI, ECl136II, HindIII, EcoRI, PstI, SalI, AccI, KpnI, Asp718I, ApaI, Bsp120I, XmaI, SmaI und BamHI. Darüber hinaus befindet sich zwischen der MSC und dem für EGFP kodierenden Abschnitt eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), die es erlaubt, dass sowohl das in die MSC klonierte Zielgen, als auch EGFP von einer mRNA ausgehend, jedoch unabhängig voneinander translatiert werden können.

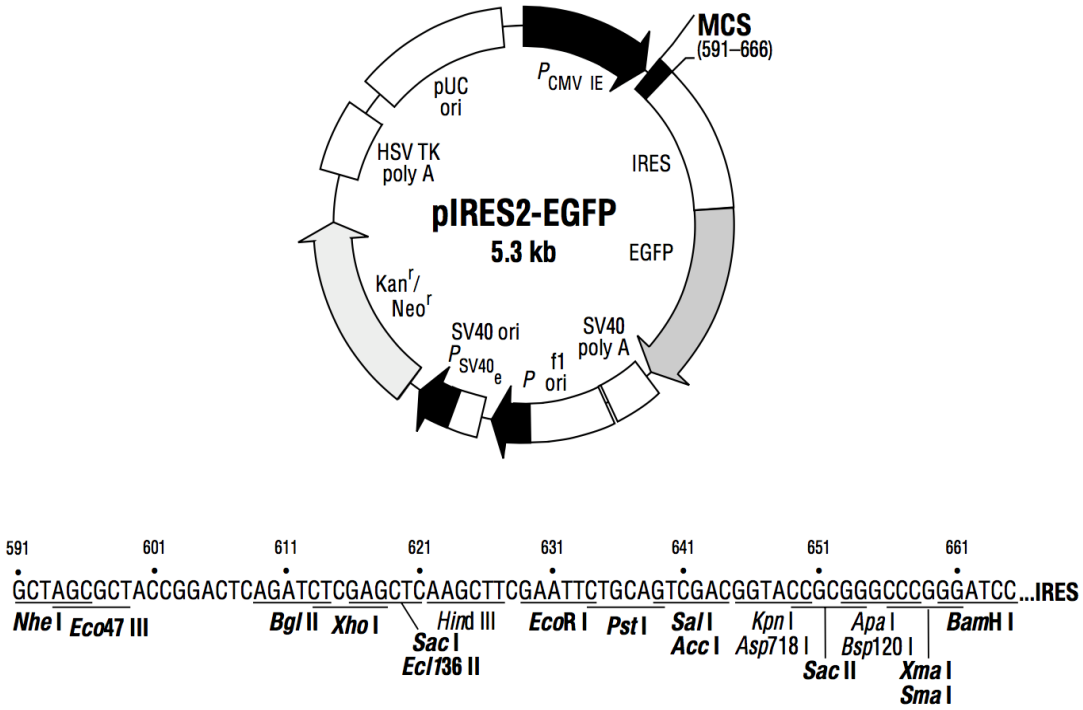


Abb. 2 Darstellung des pIRES2-EGFP Vektors (aus: *Clontech pIRES2-EGFP Vector Information).*

Vor Verwendung des Vektors wurde dieser zunächst durch folgenden Ansatz bei 37 °C über vier Stunden linearisiert:

- 4 µl pIRES2-EGFP Vektor in einer Konzentration von 500 ng/µl
- 1 µl EcoRI-HF®
- 5 µl CutSmart® Buffer
- 40 µl Aqua dest.

Anschließend wurde der Verdau mittels JetQuick® DNA Purification Kit aufgereinigt, in 25 µl Aqua dest. eluiert und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop quantifiziert.

3. Im letzten Schritt erfolgte die Klonierung mittels des In-Fusion HD® Cloning Kits der Firma Clontech. Bei dem In-Fusion HD® Cloning Verfahren handelt es sich um ein Rekombinase-basiertes Klonierungsverfahren. Dafür sind Oligonukleotide nötig, die am 5'-Ende einen Überhang von 15 Basenpaaren haben, der homolog zu den Enden des vorher linearisierten aufnehmenden Vektors ist. Im Anschluss wird dann durch homologe Rekombination das zu insertierende PCR-Fragment mit dem Vektor verbunden. Gemäß dem In-Fusion HD® Cloning Protokoll wurde folgender Reaktionsansatz genutzt:

- 2 µl 5x In-Fusion HD Enzyme Premix
- 1 µl linearisierter Vektor
- 3 µl aufgereinigtes PCR-Fragment
- 4 µl Aqua dest.

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 50 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.12 Generierung kompetenter *E. coli*

5 µl einer *E.coli DH5 α* Stammlösung wurden in 3 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der über Nacht kultivierten *E.coli* in 100 ml LB-Medium überführt und erneut bei 37 °C inkubiert. Nach 1,5 h erfolgte die erste Messung der optischen Dichte im Photometer bei 660 nm. Die *E.coli*-Kultur wurde solange inkubiert und gemessen bis sich eine Dichte von 0,4-0,55 einstellte.

Nachfolgend wurde die *E.coli*-Kultur auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und durchgängig auf Eis gekühlt. Nach 10 min Abkühlen auf Eis wurden die Falcon-Röhrchen für 10 min bei 4 °C und 3400 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend abgegossen und das entstandene Pellet in 15 ml kaltem TFB-1 Puffer suspendiert, gefolgt von erneutem Inkubieren auf Eis für 15 min und Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 3400 rpm.

Der Überstand wurde wieder abgegossen und die *E.coli* in 2 ml kaltem TFB-2 Puffer suspendiert. Die nun kompetenten E.coli wurden zu je 100 µl Aliquots auf Eppis aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

3.13 Transformation kompetenter *E. coli*

Transformation bezeichnet die Überführung eines DNA-Vektors in kompetente Bakterien, Hefen, Pilze oder Pflanzen. Ziel der Transformation ist es, z.B. vor einer später durchzuführenden Transfektion von Glioblastomzellen mit einem Vektor die Funktionsfähigkeit, z.B. des *SMOC1*-pIRES2-EGFP Vektors zu überprüfen und größere Mengen dieses Vektors zu generieren. Dazu wurden 40 µl kompetente *E. coli DH5alpha* Zellen mit 2 µl des *SMOC1*-pIRES2-EGFP-Vektors für 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurde der leere pIRES2-EGFP Vektor genutzt, für den der gleiche Ansatz

gewählt wurde. Auch die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden genauso bei dem pIRES2-EGFP Vektor durchgeführt. Nach der Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für zwei Minuten bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen um die Bakterienmembran für den Vektor durchlässig zu machen. Anschließend wurden dem Ansatz 100 µl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 60 min auf dem Schüttler (250 Umdrehungen pro Minute) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf einer Kanamycin-LB-Medium-Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Folgend wurden von der Kanamycin-LB-Medium-Platte sieben Kolonien der mit dem *SMOC1*-pIRES2-EGFP transformierten E. coli und drei Kolonien der alleine mit dem pIRES2-EGFP Vektor transformierten Zellen gepickt und in Falcon-Röhrchen mit je 5 ml Selektions-LB-Medium (Kanamycin) überführt. Die Falcon-Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank auf dem Schüttler (250 Umdrehungen pro Minute) inkubiert.

3.14 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Zur Isolierung von bis ca. 25 µg Plasmidvektoren aus zuvor transformierten *E. coli* wurde eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab, die sogenannte Minipräp (*MiniPrep*) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde sie genutzt, um den klonierten *SMOC1*-pIRES2-EGFP-Vektor anschließend mittels Sangersequenzierung validieren zu können. Die Aufreinigung des Vektors aus dem mit den transfomierten Kolonien angeimpften LB-Medium erfolgte mittels des peqGOLD Plasmid Mini Prep Kits (PeqLab, Ort. Land) gemäß Protokoll des Herstellers. Zur Aufreinigung von Plasmiden aus *E.coli* im größeren Maßstab wurde eine sogenannte Maxipräp (MaxiPrep) durchgeführt. Hierdurch können größere Mengen des Plasmidvektors, bis ca. 0,5 mg, isoliert werden. Der *MaxiPrep* vorangehend erfolgte das Animpfen einer größeren Menge an Kanamycin-LB-Medium, um den gewünschten Vektor in größerer Menge zu produzieren. Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

- 50 µl LB-Medium mit transformierten kompetenten *E. coli* Zellen
- 100 ml LB-Medium
- 100 µl Kanamycin (50 ug/ml)

Der Ansatz wurde dann für 24 h bei 37 °C im Schüttler (250 Umdrehungen pro Minute) in einem sterilen Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend erfolgte die MaxiPrep mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit gemäß des dem Kit beiliegenden Protokolls. Der isolierte

Plasmidvektor wurde anschließend zur Transfektion von U87MG-Glioblastomzellen verwendet.

3.15 Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen

Der Verdau von Vektoren mittels Restriktionsenzymen erfolgte zur Linearisierung des Vektors und um Vektorfragmente einer spezifischen Größe zu erhalten. Anhand dieser spezifischen Fragmente lässt sich dann auf den korrekten Einbau des *Inserts* in den Vektor schließen. Als Restriktionsenzyme wurden verschiedene Enzyme der Firma New England Biolabs® GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland) gewählt, die in Tabelle 1 einzeln aufgeführt sind.

Es wurde folgender Ansatz gewählt:

DNA (versch. Konzentrationen) 1 µg

CutSmart® Buffer 5 µl

Restriktions-Enzym 1 µl

je nach Volumen der eingesetzten DNA-Verdünnung wurde der Ansatz entsprechend bis auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt

Anwendung	**Restriktions-enzym**	**Schnittsequenz**	**Inkubationszeit/ -temperatur**	**Inaktivierung**
Linearisierung des pIRES2-EGFP Vektors	EcoRI-HF	G/AATTC	4 h;37 °C	20 min bei 65 °C
Kontrolle der Klonierung anhand charakteristischer Fragmentgrößen nach Verdau	HindIII-HF	A/AGCTT	15-20 min;37 °C	20 min bei 80 °C
Linearisierung des SMOC1 Vektors zur anschließenden Zelltransfektion	AlwNI	CAGNNN/CTG	15-20 min;37 °C	20 min bei 80 °C

Tab. 1. Aufstellung der verwendeten Restriktionsenzyme samt Anwendung, Schnittsequenz, Inkubationszeit und –temperatur, sowie der Methode der Inaktivierung.

3.16 Zellkulturtechniken

3.16.1. *In vitro* Kultivierung von Gliomzellen

Als Modell für die Arbeiten in der Zellkultur wurde die Gliobastomzelllinie U87MG (bezogen von der Firma ATCC®, Manassas, Virginia, HTB-14™) verwendet. Diese ist seit langem gut etabliert und wurde bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium wurde dafür *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glukose und L-Glutamin, welches zuvor mit 10 % FCS (Fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin (DMEM/FCS/PS) versetzt wurde, verwendet. In der Regel wurde das Medium alle drei Tage abgesaugt, die Zellen mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und anschließend neues Medium aufgetragen. Sobald die Zellen zu ca. 70 % konfluent waren wurden sie je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 aufgeteilt. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 10 cm Zellkulturplatten bzw. 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 15 cm Zellkulturplatten für 3 bis 4 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von der Platte zu lösen. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mit DMEM neutralisiert, die Zellen möglichst als Einzelzellsuspension resuspendiert und dann in dem jeweils vorgesehen Verhältnis aufgeteilt. Zu Selektionszwecken wurde den transfizierten Zellen jeweils 1 % Geneticin (500 µg/ml) zum Medium hinzugesetzt.

3.16.2. Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein Einfriermedium bestehend aus 10 % DMSO und 90 % FCS verwendet. Die in DMEM/FCS/PS suspendierten Zellen wurden für 5 min bei 10.000 G zentrifugiert, sodass sie sich in einem Pellet sammelten. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet im Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Proben im Kryoröhrchen wurde anschließend für kurze Zeit bei -80 °C asserviert. Die langfristige Asservierung der tiefgefrorenen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.16.3. Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der tiefgefrorenen Zellen wurde 1 ml vorgewärmtes DMEM/FCS/PS dazu gegeben und langsam auf und ab pipettiert, bis alle Zellen aufgetaut waren. Anschließend wurden die Zellen auf eine Zellkulturplatte überführt und weitere 8 ml DMEM/FCS/PS hinzugefügt. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und 7.5 ml DMEM/FCS/PS neu hinzugegeben. Bei transfizierten Zellen wurde zu diesem Zeitpunkt 75 µl Geneticin entsprechend einer Endkonzentration von 500 µg/ml zum Medium hinzugefügt.

3.16.4. Transfektion von U87MG-Glioblastomzellen

Die Transfektion von U87MG-Glioblastomzellen erfolgte zur Erzeugung stabiler *SMOC1*-überexprimierender Glioblastomzellen, mit denen die molekulare Wirkungsweise von SMOC1 in Gliomzellen weiter erforscht werden sollte. Zur Transfektion wurde eine 6-Well-Zellkulturplatte mit einem Well-Durchmesser von je 2 cm gewählt. Die vorher mittels *Vi-Cell*^{TM} XR (Beckmann Coulter Life Science) bestimmte Zellviabilität betrug 99,2 %. Pro Well wurden jeweils 400.000 U87MG-Glioblastomzellen ausplattiert und für 24 h in 2 ml DMEM/FCS/PS bei 37 °C kultiviert. Es wurden drei mal zwei Transfektionsansätze hergestellt, bestehend aus Transfektionsansatz A und Transfektionsansatz B. Transfektionsansatz A bestand pro Well aus 250 µl Opti-MEM und 2 µg *SMOC1*-pIRES2-EGFP Vektor bzw. 2 µg pIRES2-EGFP Vektor für Kontrolle 1 und 2. Transfektionsansatz B bestand aus 250 µl Opti-MEM und 5 µl Lipofectamin 2000 (1 mg/ml). Beide Transfektionsansätze wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend vereint und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde aus den Wells abgesaugt und die Wells mit je 1 ml DPBS gewaschen. Im Anschluss wurde jedes Well mit 1,5 ml Opti-MEM befüllt und 0,5 ml Transfektionsansatz tropfenweise hinzugegeben. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank wurden 200 µl FCS pro Well hinzugefügt. Nach 24 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und durch DMEM/FCS/PS ersetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank wurde 1 % Geneticin (50 mg/ml; gibco® by life technologies^{TM}) als Selektionsantibiotikum hinzugefügt. Die Weitere dauerhafte Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte analog zu dem in 2.14.1. beschriebenem Vorgehen mit Zusatz von 1% Geneticin als

Selektionsantibiotikum. Die stabile Transduktion wurde durch den Nachweis von SMOC1 mittels Western Blot im Medium der transduzierten Zellen gesichert.

3.16.5. Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Zur Trennung von vitalen, stabil transduzierten Zellen von apoptotischen bzw. avitalen Zellen wurde eine Durchflusszytometrie-basierte Sortierung der Zellen nach 4 Wochen Kultivierung unter Selektion mit 1% Geneticin (500 ug/ml) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen an Hand ihrer Fluoreszenzintensität in dem grünen Kanal bei 488 nm getrennt. Zellen, die eine deutliche Fluoreszenz aufwiesen wurden anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen und wieder in Kultur genommen. Dieses Cell Sorting fand vor dem Hintergrund der Expression des *enhanced green fluorescent proteins* (EGFP) von den stabil transduzierten Plasmiden statt.

3.16.6. Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren

Zunächst wurden vier 15 cm Platten mit U87MG-*SMOC1*, U87MG-*LV1*, U87MG-*LV2*, U87MG-*parental* Zellen ausplattiert und für 72 h bei 37 °C wachsen gelassen. Das Medium wurde mit 200 µl Geneticin pro Platte versehen entsprechend einer Konzentration von 500 ug/ml. Anschließend wurde die Zellkonzentration mittels *ViCell*^{TM} bestimmt und je Zellentität fünf 10 cm Platten mit jeweils 750.000 Zellen ausplattiert. Jeder Platte wurden 75 µl Geneticin hinzugefügt. Die Zellen wurden 48 h im Brutschrank wachsen gelassen bis sie zu ca. 70 % konfluent waren. Danach wurde bei vier von fünf Platten je Zellentität das Medium abgesaugt, zwei Mal mit PBS$^{+/+}$ gespült und anschließend mit 5 ml FCS freiem Medium versehen. Nach 24 h im Brutschrank wurden die Zellen ohne FCS-Medium mit einem der beiden Wachstumsfaktoren für 1 Stunde, 30 min, 15 min oder gar nicht behandelt. Die Zellen mit FCS-Medium wurden als positive Kontrollen genutzt.

	Lösungsmittel	Konzentration im Eppi	Zielkonzentration	Auf Platte hinzugefügtes Volumen
TGF-ß1	20 mM Citrat+1 % BSA	10 µg/ ml	10 ng/ml	5 µl
BMP2	10mM HCL+ 1 % BSA	50 µg/ml	50 ng/ml	5 µl

Tab.2. Übersicht über in der Zellkultur verwendete Wachstumsfaktoren.

3.17 Zytostatikabehandlung und MTT-Assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)-Assays wurden durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Zytostatika auf die Zellvitalität zu untersuchen. Dafür wurden auf einer 96-Well-Platte 5000 Zellen (U87MG-*SMOC1*, U87MG-*LV1*, U87MG-*LV2* oder U87MG-*parental*) in 50 µl DMEM/FCS/PS pro Well ausgesäht (in der Abbildung 3 blau gekennzeichnet), wobei jeweils die äußersten Reihen und Spalten mit 50 µl Medium ohne Zellen gefüllt wurden:

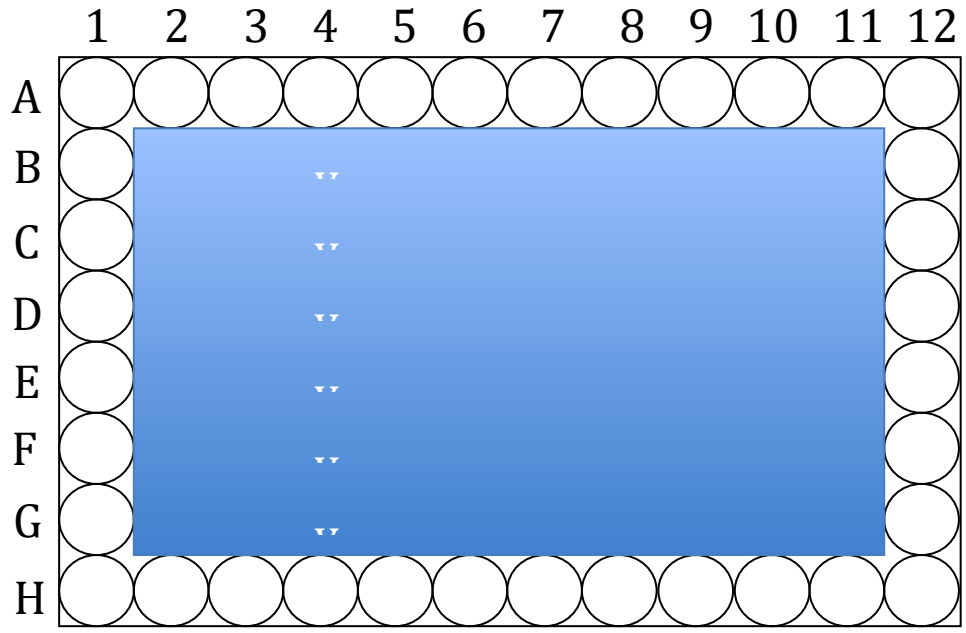


Abb. 3 Schema einer 96- Well Platte für Zytostatika-Assays. In die blau unterlegten Wells wurden pro Well 5000 Glioblastomzellen einer Zellinie in 50 µl DMEM/FCS/PS ausplattiert. Die weiß hinterlegten Wells wurden mit 50 µl zellfreiem DMEM/FCS/PS gefüllt.

Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen alternativ mit vier verschiedenen Chemotherapeutika - Etoposid, Gemcitabin, Hydroxyurea und CCNU - behandelt: Zu den

zuvor mit 50 µl Medium gefüllten Wells wurden weitere, mit Chemotherapeutikum versetzte 50 µl Medium geben, sodass sich folgende Konzentrationen ergaben: Wells B6-D6 25 µM Etoposid, Wells B5, C5, D5 5 µ Etoposid, Wells B4, C4, D4 1 µl Etoposid und Wells B3, C3, D3 0,2 µl Etoposid. Da Etoposid in DMSO gelöst wird, wurde in die Wells B2, C2 und D2 mit DMSO versetztes Medium hinzugefügt, sodass sich eine DMSO-Konzentration von 0,05 % einstellte. Diese Konzentration an DMSO entspricht der DMSO-Konzentration der Wells B6, C6, D6, sodass die Wells B2, C2 und D2 als Negativkontrolle verwandt wurden. Gemcitabin wurde in den Konzentrationen 4 µM (Wells B7, C7, D7), 0,8 µM (Wells B8, C8, D8), 60 nM (Wells B9, C9, D9) und 2 nM (Wells B10, C10, D10) eingesetzt. Für Gemcitabin wurden die Wells B11, C11, D11 als Negativkontrollen genutzt. Da Gemcitabin, wie auch Hydroxyurea und CCNU, in PBS gelöst wird, wurden die Wells, die als Negativkontrolle fungierten, ausschließlich mit DMEM/FCS/PS gefüllt. Hydroxyurea wurde in den Konzentrationen 2 µM (Wells E6, F6, G6), 400 nM (Wells E5, F5, G5), 80 nM (Wells E4, F4, G4) und 16 nM (Wells E3, F3, G3) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden die Wells E2, F2 und G2 genutzt. CCNU (Lomustin) wurde in den Konzentrationen 125 µM (Wells E7, F7, G7), 25 µM (Wells E8, F8, G8), 5 µM (Wells E9, F9, G9) und 1 µM (Wells E10, F10, G10) eingesetzt. Die Negativkontrolle stellten hier die Wells E11, F11 und G11 dar. Nach Auftragen der Chemotherapeutika wurden die 96-Well Platten für 72 h im Brutschrank inkubiert.

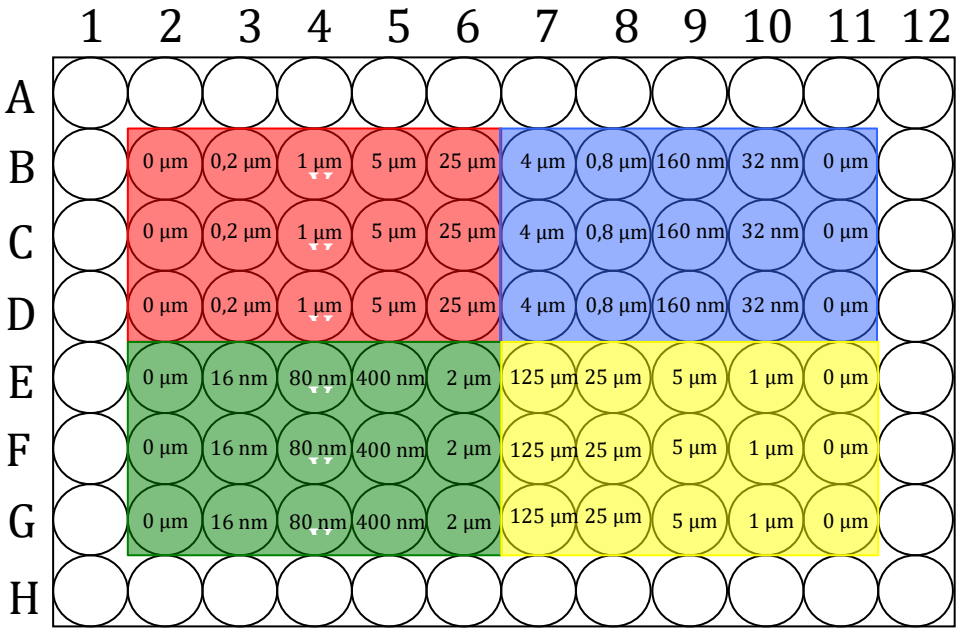


Abb. 4 Schema einer 96- Well Platte für Zytostatika-Assays. Die weiß hinterlegten Wells wurden nur mit 50 µl DMEM/FCS/PS gefüllt. Die eingefärbten Wells sind mit jeweils 5000 Glioblastomzellen in 100 µl

DMEM/FCS/PS gefüllt, sowie die mit einer der Grafik zu entnehmenden Konzentration an Chemotherapeutikum versetzt. Als Negativkontrolle dienten jeweils die mit 0 µM beschrifteten Wells. Diese wurden jeweils nur mit 100 µl DMEM/FCS/PS gefüllt, mit Ausnahme von Etoposid. Die Glioblastomzellen der Etoposid-Negativkontrolle wurden zusätzlich einer Konzentration von 0,05 % DMSO ausgesetzt. Farbkodierung: Etoposid (rot), *Gemcitabin* (blau), Hydroxyurea (grün) und CCNU (gelb)

Anschließend wurde ein MTT-Assay durchgeführt, um die Zellviabilität zu untersuchen. Dabei wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT NAD(P)H-abhängig zum violetten Formazan reduziert. Da diese Reaktion nur in lebenden Zellen möglich ist, korreliert die Umsetzung von MTT zu Formazan mit der Vitalität der Zellen. Dazu wurde jedes Well mit 10 µl MTT-Lösung versetzt und die Platte anschließend für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je Well 100 µl Solubilisationslösung hinzugegeben um die Formazan-Kristalle zu lösen und die 96-Well Platte abgedunkelt bei RT über Nacht inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 560 nm und 650 nm durch die Paradigm™ Detection Platform (Beckman Coulter®) gemessen und die Absorption pro Well bestimmt, wobei die Absorption bei 560 nm die Absorption von Formazan widerspiegelt und die Absorption bei 650 nm die Hintergrundabsorption. Je Zelllinie wurden drei biologische Replikate angefertigt. Die Konzentrationen an Gemcitabin mussten nach dem ersten Replikat angepasst werden, da die ursprünglichen Konzentrationen von 100, 20, 4 und 0,8 µM sich als zu hoch gewählt darstellten, sodass keine Dosis-Wirkungs-Beziehung mehr hergestellt werden konnte. Demzufolge waren für Gemcitabin nur zwei biologische Replikate verfügbar bzw. auswertbar. Die Daten wurden jeweils auf die Negativkontrolle normalisiert.

Die MTT-Lösung wurde wie folgt angesetzt:

- Ansatz einer MTT Lösung in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) mit einer Konzentration von 5 mg/ml.
- Filtrierung der Lösung durch einen 0,2 µm Filter in ein steriles Falcon-Röhrchen

Ansatz der Solubilisationslösung:

- Ansatz einer 40 % (vol/vol) Lösung von Dimethylformamid (DMF) in einer 2 % (vol/vol) Essigsäure
- Zusatz und Lösung von 16 % Natriumdodecylsulfat (SDS) zur DMF-Lösung
- Einstellen des pHs auf 4,7

3.18 Proliferationsassay

Für die Proliferationsassays wurden je 250.000 U87MG-*SMOC1*, U87MG-*LV1* und U87MG-*LV2* Zellen auf 6 cm Zellkulturplatten unter den bereits beschrieben Bedingungen kultiviert. Alle 72 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und zur Lösung von der Zellkulturplatte mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt, sowie für 2-3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zur Neutralisierung pro Zellkulturplatte 3,5 ml DMEM/FCS/PS hinzugefügt. Von den 4 ml gelöster Zellen in DMEM/FCS/PS wurde 1 ml im *Vi-Cell*^{TM} XR (Beckmann Coulter Life Science) zur Bestimmung von lebenden und toten Zellen, sowie zur Konzentrationsbestimmung dieser Zellen pro Milliliter verwendet. Anhand der dabei ermittelten Werte wurde die Gesamtzahl an Zellen und das Wachstum berechnet. Anschließend wurden erneut 250.000 Zellen jeder der drei Zellentitäten neu ausplattiert. Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt.

3.19 Proteinextraktion und Aufreinigung

Für die Western Blot-Analysen wurden Proteine aus U87MG-Zellen extrahiert. Zunächst wurde der RIPA-Puffer mit einem Protease Inhibitor (Roche mini, EDTA-free, Roche, Basel, Schweiz) und Phosphatase Inhibitor (Roche; jeweils 1 Tablette auf 10 ml), sowie 250 I.U. Benzoase® Nuclease (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro ml komplettiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl RIPA-Puffer pro 10 cm Platte für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zelllysat mittels Cell Scraper gesammelt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei maximaler Amplitude für 30 s im Ultraschall-Bad aufgeschlossen. Abschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30 min auf dem Rotator im Kühlraum bei 4 °C gedreht, 10 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand bei -20 °C weggefroren.

3.20 BSA-Assay

Zur Quantifizierung der Proteinextraktion wurde das Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific^{TM} (Waltham, MA, USA) gemäß dem beiliegendem Protokoll verwendet. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0;

0,5; 1; 1,5 und 2 mg/ml in RIPA-Puffer gelöst genutzt. Die Proben und die BSA-Standard-Lösungen wurden auf eine 96-Well Platte aufgetragen und zusammen mit je 200 µl des Mastermix, bestehend aus BSA-Lösung A und B des Protein Assay Kits, für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Vermessung der Proben bei 570 nm mittels der Paradigm™ Detection Plattform der Firma Beckman Coulter®.

3.21 SDS-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen nach ihrer Masse und als Vorbereitung auf den Western Blot wurde die SDS-Gelelektrophorese genutzt. Zunächst wurden 15 µg der Proteinproben mit 5 µl Laemmli-Puffer versetzt. Diese Proben wurden anschließend in die Taschen der SDS-Gele (NuPage™ 4-12 % Bis-Tris Gel, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gegeben. Als Laufpuffer wurde 1x 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer) verwendet, mit dem die Gelkammer von innen komplett gefüllt war. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstant 160 V für 65 Minuten. Als Marker wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder 10 – 180 kDa der Firma Thermo Fischer verwendet.

3.22 Western Blotting

Die Methode des Western Blotting wurde genutzt, um Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran zu übertragen und diese sodann mittels Antikörpern spezifisch nachzuweisen. Das Verfahren lässt sich in vier Schritte unterteilen:

1. Transfer/Blotten, zum Übertragen der Proteine auf die Membran.
2. Blocken, zum Besetzen unspezifischer Bindungsstellen.
3. Primärantikörperfärbung, zur Detektion des Zielproteins.
4. Sekundärantikörperfärbung, zur Visualisierung des ersten Antikörpers, Scannen des Blots.

Transfer/Blotten:

Die Blotkammer wurde mit Transfergerät und Eiskammer bestückt und die Kammer mit 1x konzentriertem Blotpuffer befüllt. Folgender Aufbau wurde für den Transfersandwichaufbau gewählt:

Von der Kathodenseite ausgehenden wurde der Sandwichrahmen mit der schwarzen Seite vorgelegt → Schwamm → zwei Whatman-Papiere → ausgepacktes, bereits gelaufenes SDS-Gel → Nitrocellulosemembran → Zwei Whatman-Papiere → Schwamm → roter Sandwichrahmen auf der Anodenseite. Der Zusammenbau erfolgte nass, d.h., dass sämtliche Komponenten in einer mit 1xBlotpuffer gefüllten Wanne zusammen gesetzt wurden. Danach wurde der Transfersandwichaufbau in die Blotkammer gestellt und bei 250 mA für mindestens 2,5 h im Kühlraum geblottet. Anschließend wurde die Membran entnommen und geblockt.

Blocken:
Dazu wurde die Membran in 10 ml 5 % Milchpulver in TBS (Tris-buffered saline) bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln für eine Stunde inkubiert. Folgend wurde die Membran mit TBS-T (Tris-buffered saline und 0,1% Tween 20) abgewaschen.
Primärantikörper/Detektion: Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in mindestens 6 ml Primärantikörperlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Es wurden Anti-Phospho-SMAD1/5/9-, Anti-Phospho-SMAD2-, Anti-SMAD1- und Anti-SMAD2/3- (Cell signaling technology®, Danvers, USA), sowie Anti-β-Aktin-Antikörper verwendet (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Antikörper wurden 1:1000 in einer Lösung von 5 % Albumin Fraktion V (BSA) in TBS-T verdünnt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran zweimal 10 min in TBS-T bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen.

Sekundärantikörper:
Als Sekundärantiköper wurde ein Anti-Rabbit-Antiköper (IRDye® 800CW anti rabbit) (Li-COR® , Lincoln, USA) mit maximaler Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 800 nm gewählt und 1:10.000 in 10 ml TBS-T mit 5 % BSA verdünnnt. Die Membran wurde 1 h im Dunkeln bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwei mal fünf Minuten im Dunkeln mit TBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran auf dem Odyssey® CLx Scanner der Firma LI-COR® (Lincoln, Nebraska USA) eingescannt. Zur Analyse der Bilder wurde die Software Image Studio™ der Firma LI-COR® genutzt.

3.23 Nachweis von SMOC1 im Sekretom von U87MG-Glioblastomzellen

3.23.1. Zellkultur

Da SMOC1 ein extrazelluläres Matrixprotein ist, wird es fast vollständig sekretiert. Um die Bildung und Sekretion von SMOC1 durch kultivierte Zellen nachweisen zu können, muss das extrazelluläre Zellmedium untersucht werden. Zunächst wurden *SMOC1*-, *LV1* (Leervektor) und *LV2* Zellen, zwei *IDH1*-mutierte U87MG-Zelllinien (im weiteren Verlauf mit *IDH1mut1* und *IDH1mut2* bezeichnet), *IDH1*-Wildtyp U87MG-Zellen (*IDH1wt*) und U87MG parentale Zellen auf 10 cm Platten in DMEM/FCS/PS kultiviert bis eine Konfluenz der Zellen von ca. 70 % erreicht war. Die *IDH1*-mutierten Zelllinien unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihres *HA-tags*. *IDH1mut1* besitzen ein C-terminales, *IDH1mut2* ein N-terminales *HA-tag*). Anschließend wurde die jeweilige Zellkonzentration mittels *Vi-Cell*^{TM} XR bestimmt und zwei Millionen Zellen jeder Zelllinie auf einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte ausplattiert. Die übrigen Zellen wurden auf der jeweils ursprünglichen Zellkulturplatte erneut ausplattiert und wieder kultiviert bis eine Zellkonfluenz von ca. 70 % erreicht war. Die zwei Millionen ausplattierten Zellen wurden über Nacht in DMEM/FCS/PS kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturplatten zwei Mal mit eiskaltem PBS-Puffer gespült. Anschließend wurden 7 ml FCS-freies DMEM (mit 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt) auf jede Zellkulturplatte aufgetragen und die Zellen darin für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium von den Zellkulturplatten in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und anschließend bei 1000xG für fünf Minuten bei vier Grad Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Folge in 10 ml Luer-Lock Spritzen gegeben und durch einen 0,2 µm Steril Syringe Filter in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Danach wurden die Sekretom-Proben bei -80 °C gelagert oder im Rahmen der Proteinpräzipitation direkt weiterverarbeitet.

3.23.2. Proteinpräzipitation

Ziel der Proteinpräzipitation ist es Proteine, in der Probe auszufällen und diese Proteine anschließend mittels Western Blot genauer zu charakterisieren. Zunächst wurden die Sekretomproben auf Eis gelagert und aufgetaut. Sämtliche weitere Schritte fanden auf Eis bzw. in der vorgekühlten Zentrifuge statt. Sobald das Sekretom aufgetaut war, wurde ein

Viertel des Ausgangsvolums in Form von eiskalter 50 %iger Trichloressigsäure (TCA) hinzugefügt und die Probe anschließend für zehn Minuten auf Eis präzipitiert. Danach wurden 2 ml der Probe in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und für 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 20.000xG) in der auf 4 °C heruntergekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß abgesaugt. Der Vorgang des Zentrifugierens und Überstandabsaugens wurde solange wiederholt, bis die ursprüngliche Probe aufgebraucht war. Dabei wurde für jede Probe das jeweilige 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wiederholt eingesetzt. Zu dem nun entstanden Pellet wurde 1 ml Aceton (EMSURE®) hinzugesetzt und die Probe erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 20 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Aceton bei geöffnetem Deckel verdampft. Das Pellet wurde danach in 50 µl Ripa-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.23.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Der abschließende Western Blot wurde entsprechend des oben beschriebenen Protokolls durchgeführt. Es wurden 25 µl der Probe mit 5 µl Laemmli Puffer versetzt. Als Antikörper wurden ein in 5 % BSA in TBS-T 1 zu 500 verdünnter Anti-*SMOC1*-AK verwendet. Als Zweitantiköper wurde ein Anti-Rabbit-Antiköper mit maximaler Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 800 nm gewählt und 1:10.000 in 10 ml TBS-T mit 5 % BSA verdünnt. Da es bisher kein zur Ladungskontrolle geeignetes, gleichmäßig sekretiertes Protein gibt wurde die gleichmäßige Beladung des SDS-Gels durch Färbung der auf die Nitrocellulose übertragenen Proteinbanden durch Ponceau-S Lösung nachgewiesen.

3.24 Puffer und Lösungen

Nachstehend sind die Ansätze der in den Experimenten verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt:

Ansatz MES-Puffer (einfach konzentriert):

- 9,76 g 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)
- 6,06 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
- 1 g Natriumdodecylsulfat (SDS)

- 0,3 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
- Lösung in einem Liter Aqua dest.

Ansatz Blotpuffer (einfach konzentriert)

- 3,03 g TRIS
- 15,01 g Glycin
- 200 ml Methanol
- Lösung in 800 ml Aqua dest.

Ansatz LB-Medium

- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- 10 g Trypton
- Lösung in 950 ml Aqua dest.
- pH Einstellung auf 7,0
- Auffüllen auf einen Liter mit Aqua dest.

Um Agar-Platten mit Kanamycin zu gießen, werden dem Medium noch 15 g Agar und 10 mg Kanamycin pro Liter hinzugefügt. Anschließend Gießen in 10 cm Platten und abkühlen lassen.

Laemmli Puffer (4x Konzentration):

- 0,6 g TRIS
- 15 ml einer 20 % SDS Lösung
- 20 ml Glycerol
- 2 ml 2-Mercaptoethanol
- eine Spatelspitze Bromphenolblau

EDTA-Lösung (100 mM):

- 1,86 g EDTA
- 40 mL H2O
- Hinzufügen von NaOH zum Lösen und Einstellen des pH-Wertes auf 7,4
- Abschließend wird das Volumen auf 50 mL mit H2O aufgefüllt
- Lagerung bei 4 °C

TBS Puffer, zehnfach konzentriert (10xTBS):

- 15,76 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
- 40 g NaCl
- aufgelöst in 500 ml Aqua dest.

TBS-T Puffer, einfach konzentriert (1xTBS-T):

- 200 ml 10x TBS
- 2 ml Tween 20
- aufgelöst in 2 l Aqua dest.

Ponceau-S-Lösung:

- 2 g Ponceau S
- 30 g Trichloressigsäure
- 30 g Sulfosalicylsäure
- aufgelöst in 100 ml Aqua dest.

TFB-1 Puffer (50 ml):

- 500 µl 3 M Kaliumacetat
- 5 ml 0,5 M $MnCl_2$
- 10 ml 0,5 M RbCl
- 500 µl 1 M $Cacl_2$
- 7,5 ml 100% Glycerin
- pH auf 5,8 stellen und bis zu einem Volumen von 50 ml mit Aqua dest. auffüllen

TFB-2 Puffer (10 ml):

- 1 ml 100 mM MOPS ;ph6,8
- 750 µl 1 M $CaCl_2$
- 200 µl 0,5 M RbCl
- 1,5 ml → 100% Glycerin
- bis 10 ml mit Aqua dest. auffüllen

4 Ergebnisse

4.1 Erhebung des *IDH1*- und *IDH2*-Mutationsstatus in der Tumorserie mittels Pyrosequenzierung

Insgesamt wurden 70 Tumoren mittels DNA-Pyrosequenzierung auf Mutationen im Codon 132 des *IDH1*-Gens sowie auf Mutationen im Codon 172 des *IDH2*-Gens hin untersucht. Diese 70 Tumoren setzten sich aus 47 diffusen (WHO-Grad II) oder anaplastischen (WHO-Grad III) Gliomen, sowie 23 Glioblastomen (WHO-Grad IV) zusammen. Insgesamt zeigten 35 Tumoren eine Mutation des *IDH1*-Gens, wovon 33 auf die WHO-Grad II/III Gliome und zwei auf die Glioblastome entfielen. Insgesamt 35 Tumoren, bestehend aus 14 WHO-Grad II/III Gliomen und 21 Glioblastomen, zeigten keine *IDH1*-Mutation. Bei den Mutationen handelte es sich in 32 Fällen um eine Punktmutation von Guanin zu Adenin an Position 395, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin führt (c.G395A, p.R132H). In drei Fällen handelte es sich um eine Cytidin zu Guanin Punktmutation an Position 396 im *IDH1*-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Serin führt (c.C396G, p.R132S). Insgesamt 70 Tumoren wurden auf *IDH2*-Mutationen mittels Pyrosequenzierung untersucht. Es konnte eine Mutation von *IDH2* nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um eine Punktmutation an Position 515, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin führt (c.G515A, p.R172K). Dieser Tumor wies neben der *IDH2* Mutation auch eine *IDH1* Mutation auf. In Abbildung 5 sind exemplarisch fünf Pyrogramme verschiedener Tumoren mit und ohne *IDH1*- bzw. *IDH2*-Mutation dargestellt. Auf der Ordinatenachse des Pyrogramms wurde die relative Intensität der Biolumineszenz und auf der Abszissenachse die sequenzierte Nukleotidabfolge abgebildet. Mutationen zeigen eine verringerte Intensität der Biolumineszens des Wildtyp-Nukleotids, sowie eine erhöhte Intensität der Biolumineszens des mutanten Nukleotids. Da es sich bei den *IDH-1* und *IDH-2*-Mutationen um hemizygot mutante Allele handelt, kann die Intensität der Biolumineszens des mutanten Nukleotids maximal 50 % erreichen. Ab einer Intensität von 10 % wurde von dem Vorliegen einer Mutation ausgegangen.
Basierend auf diesen molekulargenetischen Untersuchungen sowie den durch Frau Britta Blaschke, Frau Heike Seul und Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen durchgeführten 1p/19-Allelverlustuntersuchungen ergaben sich in der Zusammenschau die histologisch-molekularpathologisch kombinierten Diagnosen von 9 diffusen Astrozytomen, IDH-mutiert (WHO-Grad II), 2 diffusen Astrozytomen IDH-Wildtyp (WHO-Grad II), 8

anaplastischen Astrozytomen, IDH-mutiert (WHO-Grad III), 2 Glioblastomen, IDH-mutiert (WHO-Grad IV), 21 Glioblastomen, IDH-Wildtyp (WHO-Grad IV), 2 diffusen Astrozytomen IDH-Wildtyp (WHO-Grad II), 12 diffusen Astrozytomen IDH-Wildtyp (WHO-Grad III), 5 Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (WHO-Grad II) und 11 anaplastischen Oligodendrogliomen, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (WHO-Grad III).

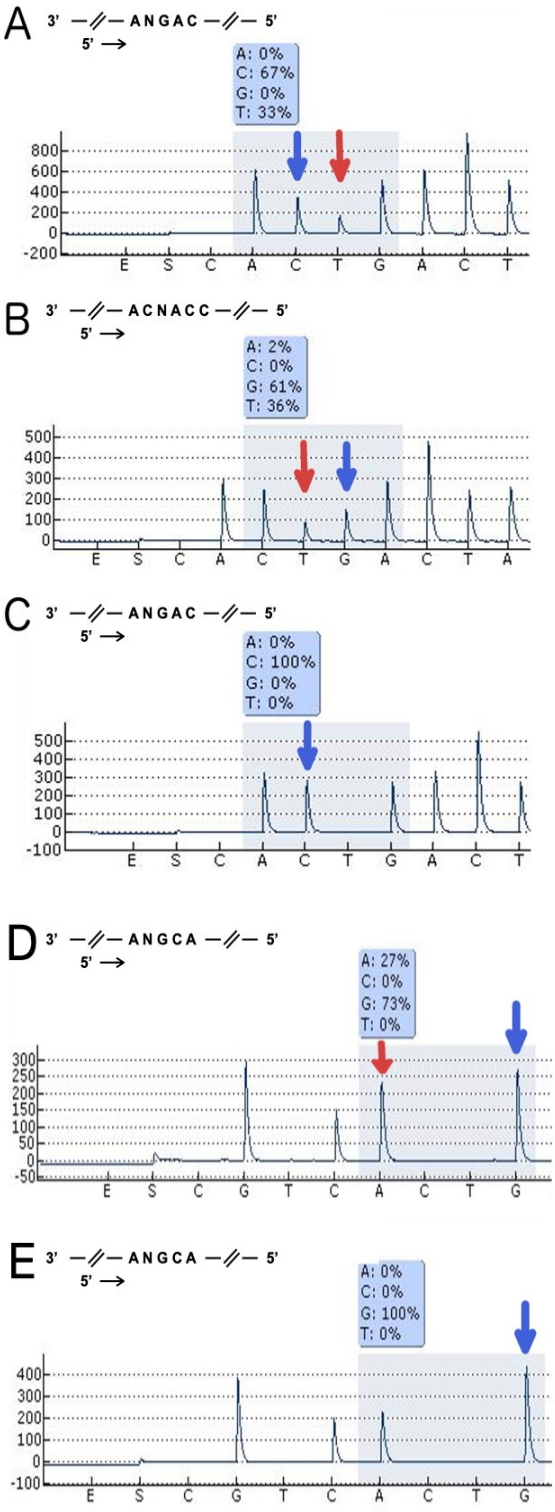


Abb. 5 Beispiele des Nachweises von *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen in Gliomen mittels DNA-Pyrosequenzierung. Dargestellt sind fünf Pyrogramme unterschiedlicher Proben. Oberhalb des Pyrogramms ist die erwartete inverse Sequenz aufgetragen, wobei „N“ das zu untersuchende Nukleotid darstellt. Auf der Abszissenachse ist die sequenzierte Nukleotidabfolge abgebildet. Die blaue Box oberhalb des Pyrogramms gibt die an Position „N“ detektierten Nukleotide in Prozent an. Bei Werten von > 10 % wird von einer Mutation ausgegangen. Blauer Pfeil: Wildtyp-Nukleotid; roter Pfeil: Punktmutation. Es wurden jeweils die reversen Sequenzen untersucht. **A** G-zu-A-Punktmutation an Position 395 der Probe Nr. 102 im Codon 132 des *IDH1*-Gens, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin nach Serin führt (c.G395A, p.R132H).
B C-zu-G-Punktmutation an Position 396 der Probe 24 im Codon 132 des *IDH1*-Gens, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Serin führt (c.C396G; p.R132S).
C *IDH1*-Wildtyp bei Probe Nr. 58 mit der Sequenz CGT im Codon 132.
D G-zu-A-Punktmutation an Position 515 der Probe Nr. 44 im Codon 172 des *IDH2*-Gens, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin führt (c.G515A; p.R172K).
E *IDH2*-Wildtyp bei Probe Nr. 58 mit der Sequenz AGG im Codon 172.

4.2 Analyse der mRNA-Expression von zwölf Kandidatengenen innerhalb der Tumorserie in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus

DNA-Methylierungsdaten sowie Daten zu somatischen Mutationen für diffuse Gliome der WHO-Grade II und III wurden im März 2013 aus der TCGA-Datenbank heruntergeladen ((110,111); TCGA-LGG). Die DNA-Methylierungsdaten der Tumoren, für die sowohl DNA-Methylierungsdaten als auch Mutationsdaten vorhanden waren, wurden statistisch ausgewertet (Dr. Wolfgang Kaisers, Institut für Mathematik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Bei den DNA-Methylierungsdaten handelte es sich um Daten, die mittels 450K Arrays generiert worden waren (Infinium HumanMethylation450 BeadChip, Illumina). Für die weiterführende Analysen wurden Gene ausgewählt, die in den statistischen Auswertungen vier oder mehr differentiell methylierte CpG-Dinukleotide in Tumoren mit IDH-Mutation versus Tumoren ohne IDH-Mutation aufwiesen, wobei hier entscheidend war, dass sich die differentiell methylierten CpG-Dinukleotide im Promotorbereich des jeweiligen Gens befanden, und nicht im Genkörper). Auszüge der Konsensusliste sind in Tabelle 3 dargestellt.

Gen-Name	Genlocus	Promotormethylierungsstatus in *IDH1* mutierten Gliomen
C11orf63	Chromosom 11, NC_000011.10 (122881639..122959722)	hypermethyliert
CFLAR	Chromosom 2, NC_000002.12 (201116154..201172688)	hypermethyliert
GNMT	Chromosom 6, NC_000006.12 (42939415..42963880)	hypermethyliert
HNRNPF	Chromosom 10. NC_000010.11 (43385617..43409248, Komplement)	hypermethyliert
JAG1	Chromosom 20. NC_000020.11 (10637684..10674046, Komplement)	hypermethyliert
NFKBIZ	Chromosom 3, NC_000003.12 (101827990..101861025)	hypermethyliert
NR2E1	Chromosom 10. NC_000076.6 (42561963..42583588, Komplement)	hypermethyliert
NR4A1	Chromosom 12, NC_000012.12 (52022832..52059507)	hypermethyliert
TGIF1	Chromosom 18, NC_000018.10 (3411927..3458411)	hypermethyliert
BCAN	Chromosom 3, NC_000069.6 (87987531..88000893, Komplement)	hypomethyliert
SMOC1	Chromosom 14, NC_000014.9 (69879388..70032366)	hypomethyliert
SMOC2	Chromosom 6, NC_000006.12 (168441151..168667994)	nicht differentiell methyliert

Tab. 3 Übersicht über die in der Tumorserie auf ihre mRNA-Expression hin untersuchten Kandidatengene. Dargestellt sind Name, Genlocus, sowie die auf der Analyse des Methylierungsstatus der Promotorregion basierenden biostatistischen Auswertungen von Daten des *The Cancer Genome Atlas* (*TCGA*) Projektes mit der daraus folgenden Einteilung in hypermethyliert oder hypomethyliert.

Es wurden neun Gene mit einem hypermethyliertem Promotorbereich (*C11orf63, CFLAR, GNMT, HNRNPF, JAG1, NFKBIZ, NR2E1, NR4A1*, *TGIF1*) sowie zwei Gene (*SMOC1* und *BCAN*) mit einem hypomethylierten Promotorbereich in IDH-mutierten Gliomen ausgewählt. *SMOC2* war in IDH-mutierten Gliomen weder hyper- noch hypomethyliert. Es wurde nach ersten vielversprechenden Ergebnissen für *SMOC1* als homologes Gen der Liste hinzugefügt. Mittels semiquantitativer Real-Time-PCR wurde die relative mRNA-Expression der Kandidatengene innerhalb der Düsseldorfer Tumorserie untersucht. Dabei wurden *ADP-ribosylierungs-Faktor 1* (*ARF1*) als Haushaltsgen zur Normierung und *Universal Human reference*® RNA (HU) als Kontrolle zur Normalisierung der verschiedenen Real-Time PCR Experimente genutzt. Innerhalb der Tumorserie wurde zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp Gliomen unterschieden und die Mittelwerte der relativen mRNA-Expression des jeweiligen Kandidatengens zwischen diesen beiden Gruppen verglichen. *Welchs* ungepaarter t-Test wurde durchgeführt, um die Mittelwerte der IDH-mutierten *versus* der IDH-Wildtyp-Tumoren zu vergleichen. Unterschiede in der Anzahl an untersuchten Tumoren ergaben sich dadurch, dass die in der Tumorbank vorrätige RNA bei einigen Proben nicht mehr ausreichte, um daraus cDNA für weitere Real-Time PCR Experimente zu synthetisieren. Von den zwölf Kandidatengenen zeigten drei eine signifikant höhere mRNA-Expression in IDH-mutierten Gliomen (*BCAN, GNMT* und *SMOC1*), vier zeigten eine signifikant geringere mRNA-Expression in IDH-mutierten Gliomen (*C11orf63, JAG1, NFKBIZ* und *TGF1*) und fünf zeigten keine signifikanten Unterschiede (*CFLAR, HNRNPF, NR2E1, NR4A1* und *SMOC2*) zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp-Tumoren in der mRNA Expression. In Abbildung 6 sind die drei Kandidatengene *BCAN*, *GNMT* und *SMOC1* dargestellt, die jeweils eine erhöhte relative mRNA-Expression in IDH-mutierten Gliomen aufwiesen. Die 30 auf *BCAN* mRNA-Expression hin untersuchten IDH-mutierten Gliome wiesen dabei einen Mittelwert von 1037 mit einer Standartabweichung (SD) von ± 190,5 auf, wohingegen die relative mRNA-Expression der IDH-Wildtyp-Gliome (n=31) für *BCAN* im Mittelwert nur 185,3 ± 29,13 (SD) zeigte. Die relative mRNA-Expression von *GNMT* in IDH- mutierten Gliomen (n=31) lag im Mittelwert bei 4,346 ± 0,58 (SD), die der IDH-Wildtyp-Tumoren (n=27) bei 2,262 ± 0,32 (SD). Die relative mRNA-Expression von *SMOC1* wies einen Mittelwert von 36,47 ± 5,53 (SD) in IDH-mutierten Gliomen (n=30) auf. Die relative mRNA-Expression von *SMOC1* in den IDH-Wildtyp-Gliomen (n=31) lag bei einem Mittelwert von 4,561 ± 1,25 (SD).

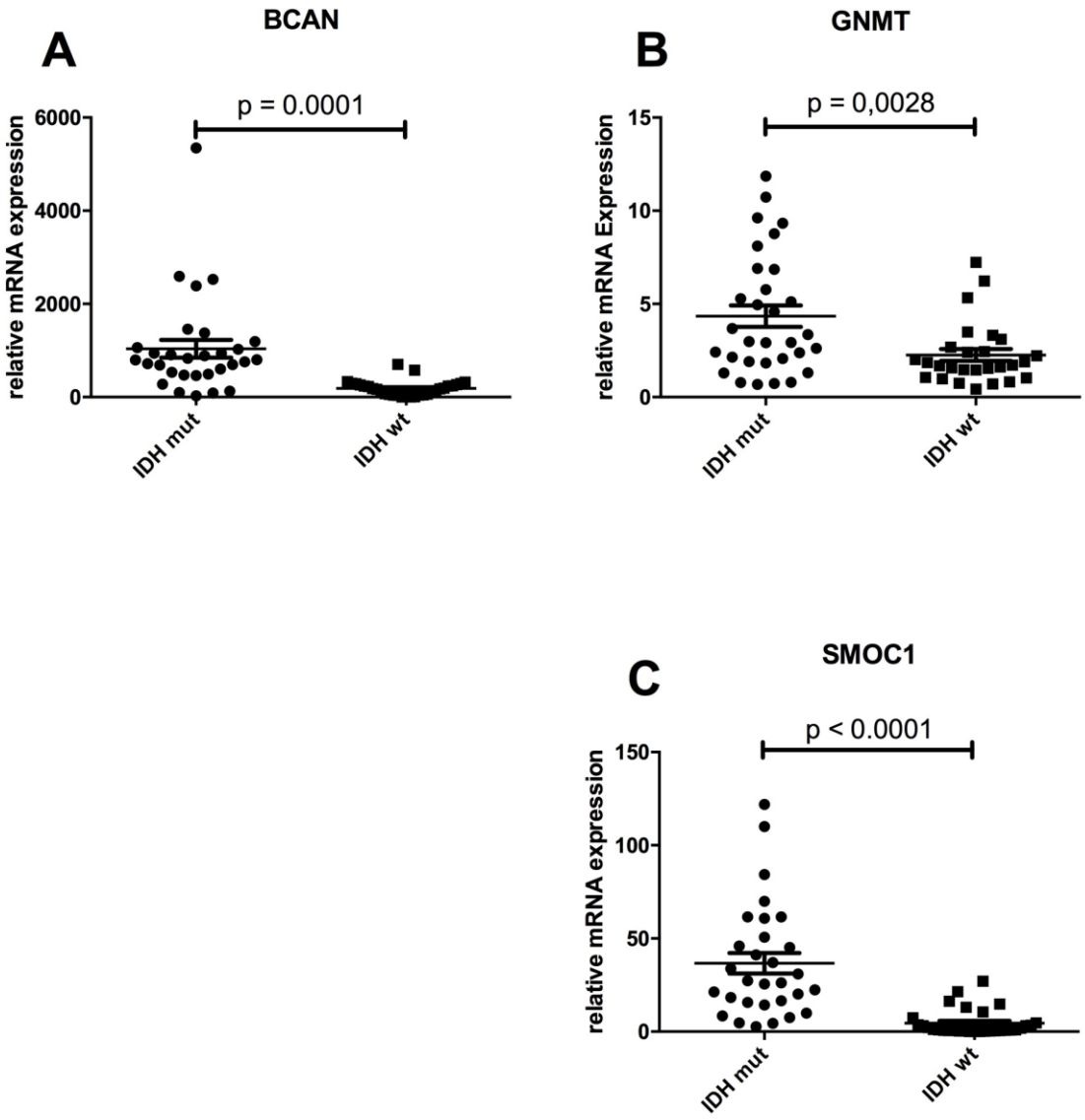


Abb. 6 Differentiell methylierte Kandidatengene mit erhöhter mRNA-Expression in den untersuchten IDH-mutierten (IDH mut) Gliomen im Vergleich zu Gliomen mit IDH-Wildtyp-Status (IDH wt). Die drei dargestellten Gene weisen alle eine im t-Test mit *Welchs* Korrektur signifikant ($p < 0.05$) erhöhte mRNA-Expression in der Gruppe der IDH-mutierten Gliome auf. Die Angaben der entsprechenden Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) der mRNA Expression in den jeweiligen Gruppen finden sich im Text (s.o.).

Die Gene *C11orf63*, *JAG1*, *NFKBIZ* und *TGIF1* sind in IDH-mutierten Gliomen hypermethyliert und zeigten, wie in Abbildung 7 dargestellt, im Vergleich zu IDH-Wildtyp-Gliomen eine verringerte mRNA-Expression in IDH-mutierten Gliomen. Der Mittelwert der relativen mRNA Expression von *C11orf63* in IDH-mutierten Gliomen (n=28) lag bei 1,687 ± 0,81 SD. Der Mittelwert in den IDH-Wildtyp-Gliomen (n=34) lag für *C11orf63* bei 4,783 ± 1,01 SD. Die relative mRNA Expression von *JAG1* wies in den

IDH-mutierten Gliomen (n=24) einen Mittelwert von 2,237 ± 0.9441 SD auf, während der Mittelwert für die IDH-Wildtyp-Gliomen bei 6,308 ± 1,19 SD lag (n=31). In IDH-mutierten Gliomen (n=20) zeigte sich für die relative mRNA Expression von *NFKBIZ* ein Mittelwert von 0.3302 ± 0.07 SD. Der Mittelwert der IDH-Wildtyp-Gliomen (n=29) lag bei 1.059 ± 0.2 SD. Die relative mRNA Expression von *TGIF1* zeigte in IDH-mutierten Gliomen (n=25) einen Mittelwert von 0,4994 ± 0,09 SD und in IDH-Wildtyp-Gliomen (n=29) einen Mittelwert von 1,153 ± 0,28 SD.

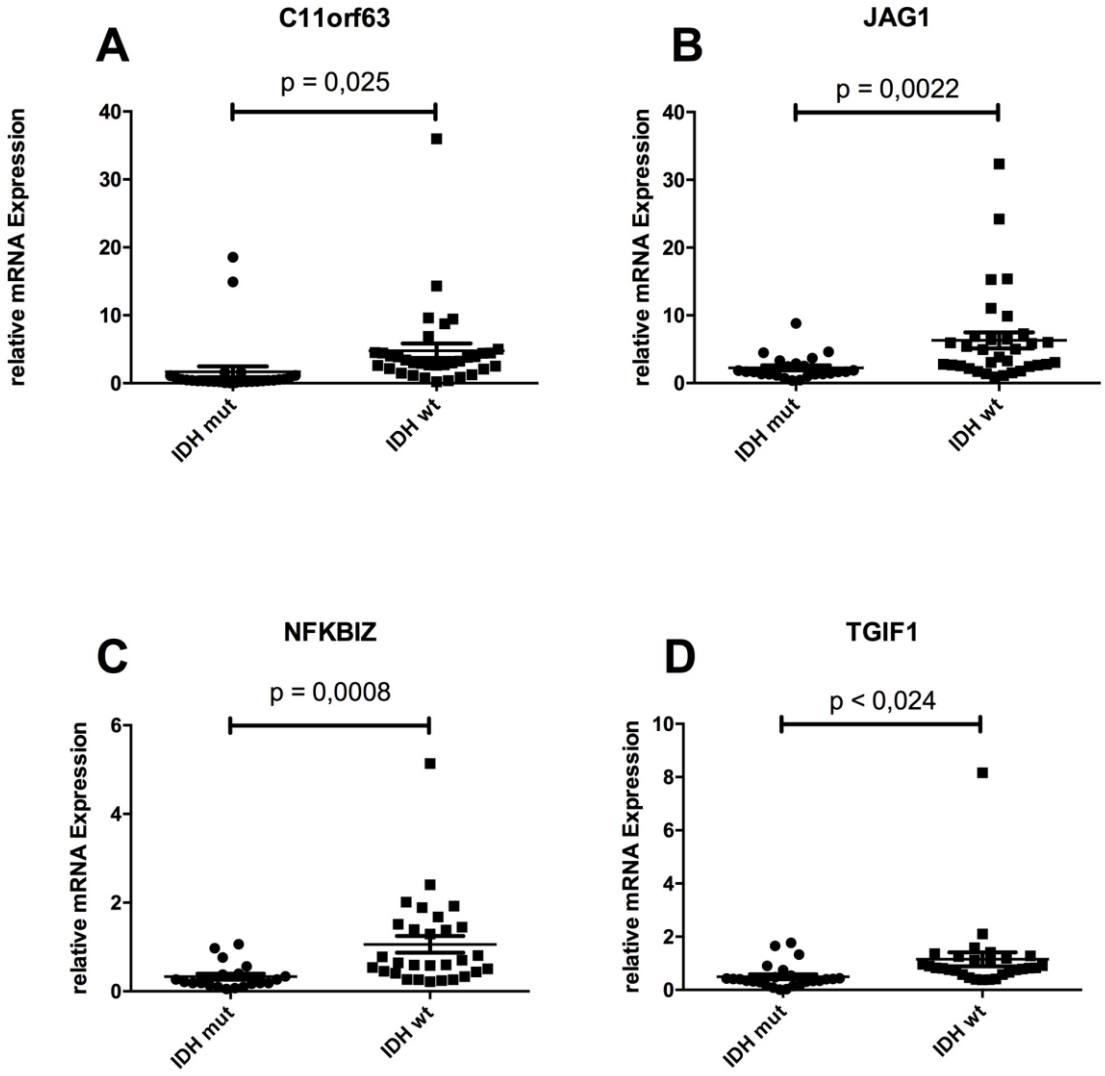


Abb. 7 Differentiell methylierte Kandidatengene mit verringerter mRNA-Expression in den untersuchten IDH-mutierten (IDH mut) Gliomen im Vergleich zu Gliomen mit IDH-Wildtyp-Status (IDH wt). Die vier dargestellten Gene weisen alle eine im t-Test mit *Welchs* Korrektur signifikant ($p < 0.05$) verminderte mRNA-Expression der jeweiligen Gene in IDH-mutierten Gliomen auf. Die Angaben der entsprechenden Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) der mRNA Expression in den jeweiligen Gruppen finden sich im Text (s.o.).

In Abbildung 8 ist die relativen mRNA-Expression der Gene *CFLAR*, *HNRNPF*, *NR2E1, NR4A1* und *SMOC2* in den untersuchten Gliomen dargestellt. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression in IDH-mutierten versus IDH-Wildtyp-Tumoren festgestellt werden.

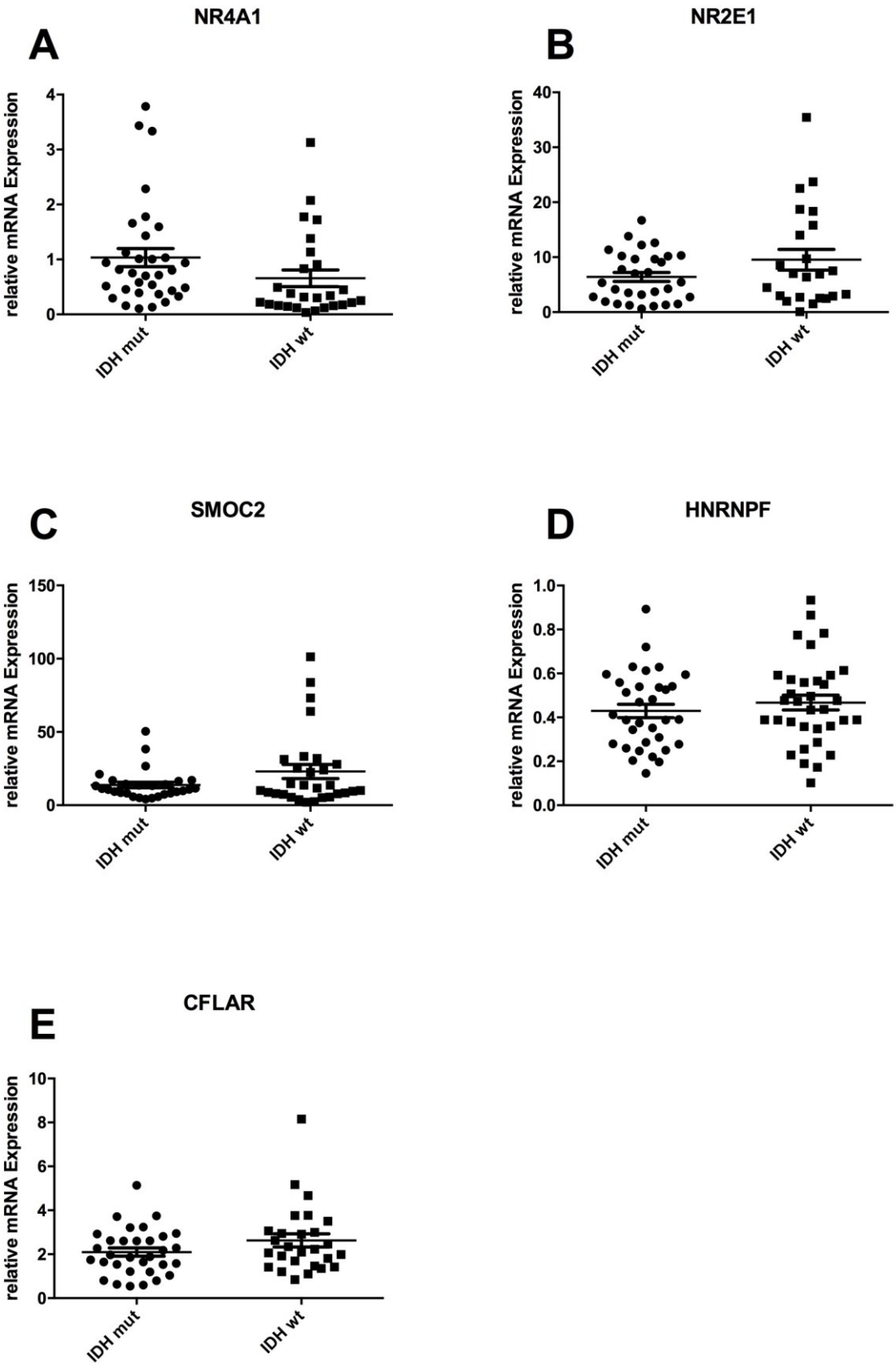

A
NR4A1
relative mRNA Expression
4
3
2
1
0
IDH mut
IDH wt
B
NR2E1
relative mRNA Expression
40
30
20
10
0
IDH mut
IDH wt
C
SMOC2
relative mRNA Expression
150
100
50
0
IDH mut
IDH wt
D
HNRNPF
relative mRNA Expression
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IDH mut
IDH wt
E
CFLAR
relative mRNA Expression
10
8
6
4
2
0
IDH mut
IDH wt

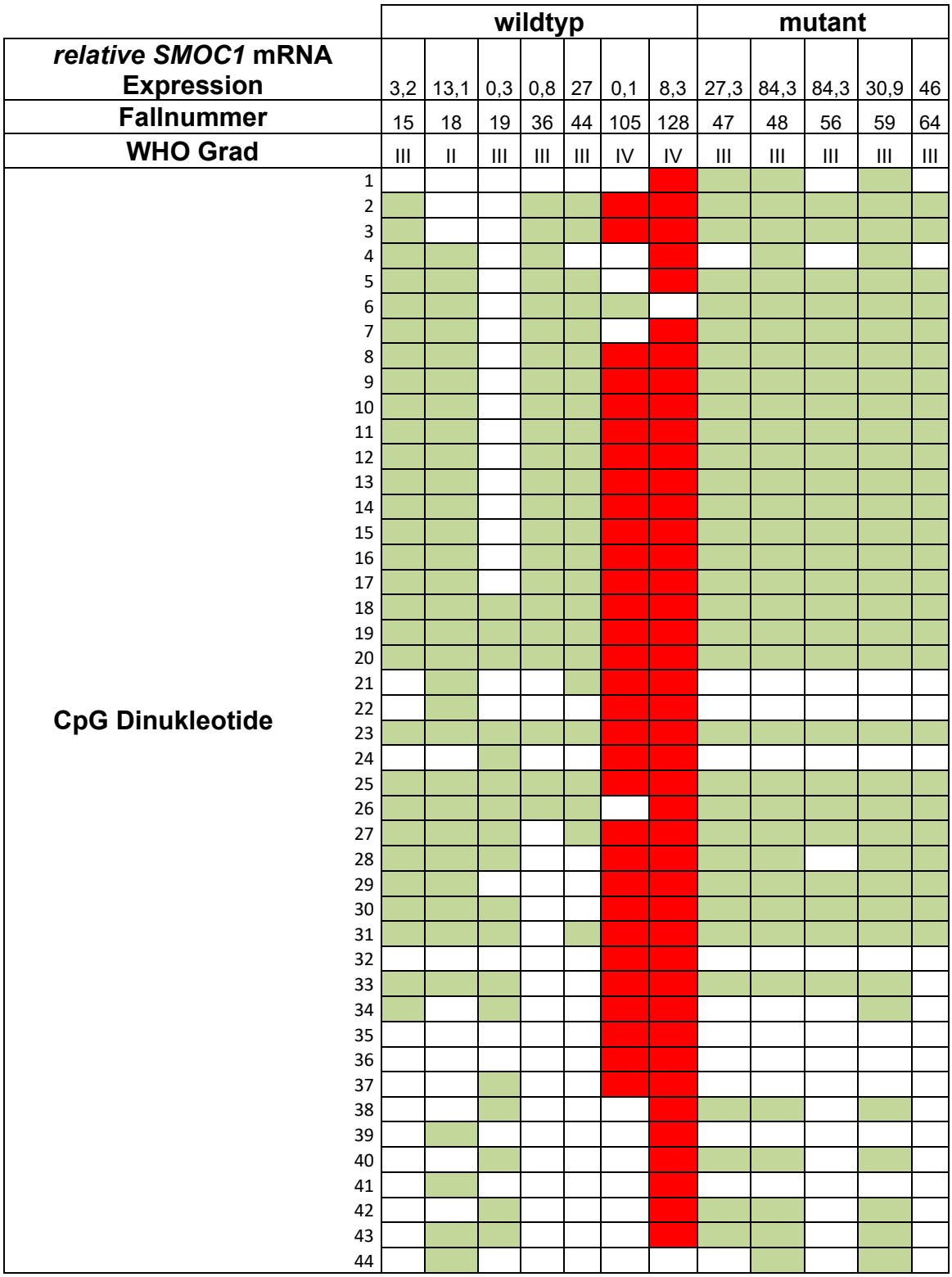
Abb. 8 Differentiell methylierte Kandidatengene, die keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression in IDH-mutierten *versus* IDH-Wildtyp-Gliomen zeigten. Die vier dargestellten Gene weisen im t-Test mit *Welchs* Korrektur keine signifikanten Unterschiede ihrer mRNA Expression zwischen den beiden Gruppen auf. Nachstehend werden die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) der mRNA Expression in IDH-mutierten Gliomen (IDH1 mut) und IDH-Wildtyp-Gliomen (IDH1 wt) aufgeführt: **A** *NR4A1 IDH1* mut MW: 1,035 ± 0,1650 n=33; *NR4A1 IDH1* wt MW: 0,6571 ± 0,1515 n=26. **B** *NR2E1 IDH1* mut MW: 6,407 ± 0,8170 n=30; *NR2E1 IDH1* wt MW: 9,548 ± 1,885, n=23 **C** *SMOC2 IDH1* mut MW: 13,81 ± 1,920 n=28; *SMOC2 IDH1* wt MW: 23,00 ± 4,771 n=29. **D** *HNRNPF IDH1* mut MW: 0,4293 ± 0,03027, n=33; *HNRNPF IDH1* wt MW: 0,4674 ± 0,03393, n=34 **E** *CFLAR IDH1* mut MW: 2,097 ± 0,1868, n=32; *CFLAR IDH1* wt MW: 2,629 ± 0,2967 n=27.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den zwölf untersuchten Kandidatengenen sieben in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus Unterschiede in der jeweiligen mRNA-Expression aufwiesen. Außerdem zeigte sich, dass diese Unterschiede in der mRNA-Expression unabhängig von der durch die *TCGA*-Daten erhobenen Promotormethylierungsdaten auftraten. So zeigten *SMOC1* und *BCAN* bei hypomethyliertem Phänotyp signifikant höhere mRNA Expressionswerte in den IDH-mutierten Tumoren. Allerdings zeigten auch *GNMT,* dessen Promotoren in IDH-mutierten Gliomen hypermethyliert ist, erhöhte mRNA Expressionswerte in dieser Tumorgruppe. Des Weiteren wiesen *C11orf63*, *JAG1*, *NFKBIZ* und *TGIF1* passend zu einer Hypermethylierung ihrer Promotorbereiche eine verminderte mRNA-Expression in den IDH-mutierten Gliomen auf. Die Gene *CFLAR*, *HNRNPF, NR4A1* und *NR2E1* zeigten dagegen trotz differentiell methyliertem Promotor keine Unterschiede in der mRNA-Expression im Vergleich zwischen IDH-mutierten und IDH-Wildtyp-Gliomen.

4.3 Analyse des Promotormethylierungsstatus von *SMOC1* mittels Bisulfit-Sequenzierung

Um die biostatistischen Ergebnisse aus dem TCGA DNA-Methylierungsdatensatz zu validieren, wurden Bisulfitbehandlungen mit anschließenden Sanger-Sequenzierungen von zwölf der in Abschnitt 3.1. und 3.2. untersuchten Gliome durchgeführt. Dabei wurden die CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von *SMOC1* von 1 bis 44 durchnummeriert. Der untersuchte Bereich beginnt an Position 70346059 von Chromosom 14 mit dem CpG-Dinukleotid 1 und endet an Position 70346374 mit dem CpG-Dinukleotid 44 (Assembly Februar 2009, GRCh37/hg19 (GCF_000001405.25), genome.ucsc.edu) und überspannt

den Transkriptionsstart. Methylierte Cytosine werden von der Bisulfitbehandlung nicht verändert, sodass methylierte CpG-Dinukleotide in der Sequenzierung die Nukleotidfolge Cytidin-Guanin beibehalten. Nichtmethylierte Cytosine werden durch Bisulfitbehandlung in Uracil umgewandelt, sodass nicht methylierte CpG-Dinukleotide in der reversen Sequenzierung die Nukleotidsequenz Adenin-Cytidin aufweisen. In Tabelle 4 sind die 44 untersuchten CpG-Dinukleotide im *SMOC1*-Promotor der zwölf untersuchten Gliome, sowie die relative mRNA-Expression von *SMOC1* der jeweiligen Tumorprobe und deren WHO-Grad aufgeführt. Nichtmethylierte CpG-Dinukleotide wurden grün und methylierte CpG-Dinukleotide rot indiziert. Die weiß indizierten CpG-Dinukleotide konnten nicht eindeutig bestimmt werden. Zwischen den Tumoren vom WHO-Grad II und III konnte kein differentielles Methylierungsmuster in Abhängigkeit von IDH-Mutationen nachgewiesen werden. Weder bei IDH-Wildtyp noch bei IDH-mutierten Tumoren der WHO-Grade II und III konnte ein methyliertes CpG-Dinukleotid nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen die IDH-Wildtyp-Glioblastome vom WHO-Grad IV fast vollständig methylierte CpG-Dinukleotide auf. Des Weiteren wurde die relative mRNA Expression von *SMOC1* in den Tumoren mit deren Methylierungsmuster verglichen: Hier ließ sich keine Korrelation zwischen CpG-Methylierung und *SMOC1* mRNA Expression nachweisen.



Tab. 4 *SMOC1*-Promotormethylierung und -expression in 12 ausgewählten Gliomen der eigenen Tumorserie. Dargestellt sind 44 CpG-Dinukleotide aus der CpG-Insel im *SMOC1*-Promotorbereich von zwölf Gliomen der WHO-Grade II (ein Tumor), III (neun Tumoren) und IV (zwei Tumoren). Grün gefärbte Kästen repräsentieren nicht methylierte, rot eingefärbte Kästen methylierte CpG-Dinukleotide. Weiß eingefärbte Kästen repräsentieren CpG-Dinukleotide, deren Methylieung nicht genau bestimmbar war. Während die beiden IDH-Wildtyp-Glioblastome eine durchgehende Methylierung der untersuchten CpG-Dinukleotide aufwiesen, ließ sich bei in Gliomen vom WHO-Grad II und III unabhängig vom IDH-Status keine CpG-

Methylierung feststellen. Eine Korrelation zwischen CpG-Methylierung und *SMOC1* mRNA-Expression ließ sich in den untersuchten 12 Tumoren nicht nachweisen.

4.4 Erstellung von stabil transfizierten SMOC1-exprimierenden U87MG-Glioblastomzellen

Um den Einfluss der Expression von SMOC1 in Glioblastomen untersuchen zu können, wurde zunächst ein für die *SMOC1*-Sequenz kodierender Vektor (*SMOC1 pIRES2-EGFP* Vektor =*SMOC1*-Vektor) sowie ein Leervektor (*pIRES2-EGFP* Vektor = Leervektor) als Kontrolle erstellt. Der *SMOC1*-Vektor besteht aus dem kommerziell erhältlichen *pIRES2-EGFP*-Vektor, in den die Variante 1 des *SMOC1*-Transkriptes kloniert wurde, und ist insgesamt 6635 Basenpaare groß. Der als Kontrolle fungierende Leervektor besteht lediglich aus dem *pIRES2-EGFP*-Vektor und ist 5308 Basenpaare groß. Mittels Sanger-Sequenzierung wurde die korrekte Insertion der gesamten kodierenden Sequenz der Transkriptvariante 1 (*NCBI Reference Sequence: NM_001034852.21308*; 1308 Basenpaare) von *SMOC1* in den *pIRES2-EGFP*-Vektor überprüft. Die Insertion erfolgte an Position 635 des *pIRES2-EGFP*-Vektors hinter der von der Restriktionsendonuklease *EcoRI* erkannten Sequenz 5'...GAATTC...3' und endete an Position 1961. Die kodierende Sequenz der Transkriptvariante 1 von *SMOC1* erstreckte sich von Position 640 bis 1948.
Die Restriktionsendonuklease *AlwNI* erkennt die DNA-Basensequenz 5'...CAGNNNCTG...3' und trennt dort die drei Nukleotide zwischen Guanin und Cytosin heraus. Da diese Erkennungssequenz im *pIRES2-EGFP*-Vektor, der auch das Grundgerüst für den *SMOC1*-Vektor darstellt, an Position 4433/4430 und 4841/4838 vorkommt, wird dieser in zwei Fragmente in Größe von 4900 und 408 Basenpaaren geteilt. Da der *SMOC1 pIRES2-EGFP*-Vektor um die Transkriptvariante 1 von *SMOC1* größer ist, wird er von *AlwNI* in ein 6227 und ein 408 Basenpaar großes Fragment geteilt. Diese unterschiedlich großen Fragmente der beiden Vektoren konnten in der nach dem Enzymverdau durchgeführten Gelelektrophorese gezeigt werden:

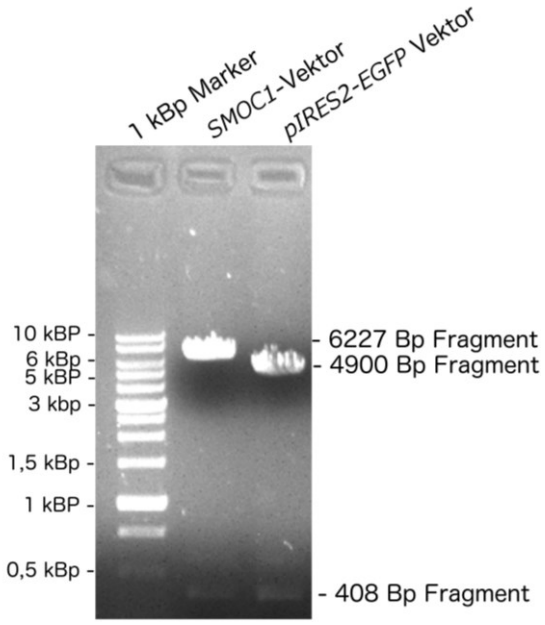


Abb. 9 Agarosegelelektrophorese des die kodierende Sequenz von *SMOC1* enthaltenden *pIRES2-EGFP*-Vektors (*SMOC1*–Vektor) und des *pIRES2-EGFP*-Vektors (Leervektor) nach dem Enzymverdau mit AlwNI. AlwNI erkennt in beiden Vektoren die DNA-Basensequenz 5'...CAGNNNCTG...3' und trennt dort die drei Nukleotide zwischen Guanin und Cytosin heraus. Da beide Vektoren über zwei dieser Basensequenzen verfügen, werden sie in zwei Fragmente aufgeteilt. Dabei entsteht beim Leervektor ein 408 Bp und ein 4900 Bp großes Fragment. Da der *SMOC1*-Vektor um die *SMOC1*-Transskriptvariante 1 größer ist als der Leervektor, entstehen hier ein 408 Bp und ein 6227 Bp großes Fragment.

Nachdem die korrekte Insertion der Transskriptvariante 1 von *SMOC1* in den *SMOC1*-Vektor überprüft wurde, wurden die in der Arbeitsgruppe etablierten U87MG-Gliobastomzellen mit dem linearisierten *SMOC1*-Vektor oder mit dem Leervektor transfiziert. Da zwei unabhängige Transfektionen der U87MG-Glioblastomzellen mit dem Leervektor durchgeführt wurden, resultierten daraus zwei unabhängige mit dem Leervektor transfizierte Zelllinien (Leervektor 1= *LV1*; Leervektor 2= *LV2*) als Kontrollen. Zur Selektion wurden das Zellmedium sowohl der mit dem *SMOC1*-Vektor transfizierten Zellen (*SMOC1*-Zellen), als auch das Zellmedium der *LV1* und *LV2 Zellen* mit 1 % des Antibiotikums Geneticin (G-418) versetzt. Des Weiteren wurden die Zellen nach vier Wochen mittels *fluoresence-activated-cell-sorting* (*FACS)* sortiert und damit ebenfalls selektioniert.

4.5 Sekretion des SMOC1-Proteins in das Nährmedium von kultivierten U87MG-Glioblastomzellen

Um zu ermitteln, ob das Vorhandensein einer *IDH1*-Mutation in Gliomen ausreichend ist, um eine erhöhte Sekretion von SMOC1 zu verursachen, wurden die Sekretome von *IDH1*-mutierten und *IDH1*-Wildtyp U87MG-Glioblastomzelllinien mittels Western Blot Analyse untersucht. Die in Abb. 10 gezeigten Western Blot Experimente verfügen jeweils über neun Spuren, in welchen das Sekretom von insgesamt sieben verschiedenen Zelllinien

aufgetrennt wurde. In Spur 1 befindet sich die Sekretomprobe der mit *SMOC1* transfizierten U87MG-Glioblastomzellen (*SMOC1*-Zellen), in den Spuren 2 und 3 die Sekretomproben der mit einem Leervektor transfizierten U87MG-Glioblastomzellen (LV1 und LV2) und in de Spuren 4 und 9 die Sekretomprobe von parentalen U87MG-Glioblastomzellen. Die Spur 5 ist zur besseren Abgrenzung der ersten und der zweiten vier Spuren leer (Leerkontrolle). In den Spuren 6 und 7 befinden sich die Sekretomproben der beiden IDH1-mutierten U87MG-Glioblastomzelllinien (*IDH1*-mut1 und *IDH1*-mut2), die sich anhand ihres *HA-Tags* (*IDH1*-mut1 mit C-terminalen, *IDH1*-mut2 mit N-terminalem *HA-Tag*) und ihrer Expression an 2-Hydroxygluterat (2HG) unterscheiden. Die in Abb. 10 dargestellten Western Blots wurden jeweils mit einem Anti-*SMOC1*-Antikörper inkubiert und lassen sich in zwei Teilbereich untergliedern. Der erste Bereich umfasst die Spuren 1 bis 4. Hier zeigt sich anhand der kräftigen Banden in Spur 1, dass im Sekretom der *SMOC1*-Zellen das SMOC1-Protein vorhanden ist. In den Spuren 2 - 4 lassen sich in allen Experimenten keine entsprechenden Banden ausmachen, was zeigt, dass das SMOC1-Protein im Sekretom der LV1-Zellen, LV2-Zellen und der parentalen U87MG-Zellen nicht oder nur in minimaler Menge vorhanden ist. Diese Ergebnisse stellen sich in allen vier unabhängigen Experimenten gleich dar und zeigen, dass die *SMOC1*-Zellen das SMOC1-Protein translatieren und sekretieren, während die parentalen U87MG-Zellen sowie die LV1- und LV2-Zellen dies nicht oder zumindest nicht in einem mittels Western Blot klar nachweisbaren Ausmaß tun. Der zweite Bereich der Abb. 10 umfasst die Spuren 6 bis 9. Hier zeigt sich eine deutliche Bande in allen vier unabhängigen Experimenten der *IDH1*-mutierten Zellen 2 und in Experiment vier der *IDH1*-mutierten Zellen 1. Des Weiteren zeigen sich schwache Banden in den Experimenten eins und zwei für die *IDH1*-mutierten Zellen 1, sowie in allen vier Experimenten für die *IDH1*-Wildtyp-Zellen. Die parentalen U87MG-Zellen zeigten generell keine SMOC1-Banden auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die *IDH1*-Wildtyp transfizierten U87MG-Zellen im geringen Maße SMOC1 sekretieren, die *IDH1*-mutierten U87MG Zellen 2 jedoch eine im Vergleich stärkere SMOC1-Sekretion aufweisen. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Transfektion der U87MG-Zellen mit *SMOC1* gelungen ist und das SMOC1-Protein in diesen transfizierten Zellen stark sekretiert wird. Darüberhinaus zeigt sich, dass auch die Transfektion von U87MG-Zellen mit mutiertem *IDH1* zu einer höheren Sekretion von SMOC1 führen kann.

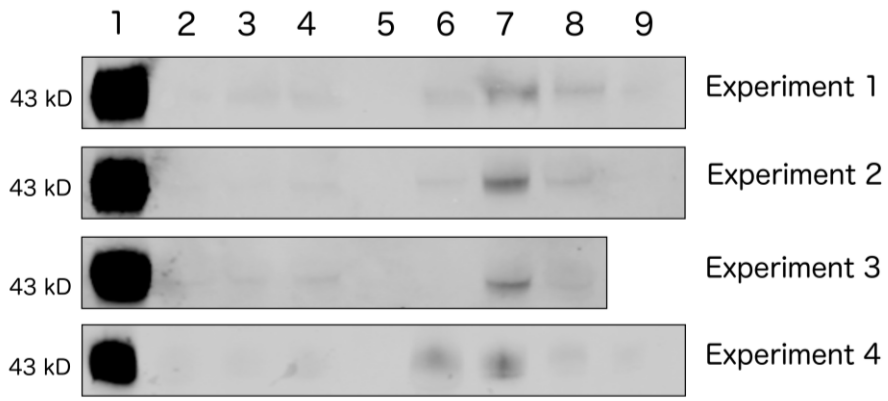


Abb. 10 Detektion von sekretiertem SMOC1 in U87MG-Glioblastomzellen nach Transfektion von *SMOC1* bzw. mutiertem *IDH1*. Dargestellt sind vier unabhängige Experimente mit Anti-SMOC1 Western Blots von sieben transfizierten und Kontroll-U87MG-Zellen: (1) *SMOC1*-transfizierte U87MG-Zellen (*SMOC1* Zellen), (2) Leervektor 1-transfizierte U87MG-Zellen (LV1-Zellen), (3) Leervektor 2-transfizierte U87MG-Zellen (LV2-Zellen), (4) parentale U87MG-Zellen, (5) Leerkontrolle, (6) *IDH1-R132H*-transfizierte U87MG-Zellen 1, (7) *IDH1-R132H*-transfizierte U87MG-*Zellen* 2, (8) *IDH1*-Wildtyp-transfizierte U87MG-Zellen, (9) parentale U87MG-Zellen. *SMOC1*-Zellen weisen die stärkste Sekretion von SMOC1 auf, *IDH1*-mutierte Zellen 2 zeigen eine höhere SMOC1 Sekretion als *IDH1*-Wildtyp-Zellen und parentale U87M-Zellen.

Da es kein sekretiertes Protein gibt, das als Referenz zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung der Western Blots dienen kann, ist in Abb. 11 exemplarisch die Ponceau-S Färbung der Western Blot-Membran von Experiment vier abgebildet. Man erkennt, dass sich in allen Spuren, mit Ausnahme der Leerkontrolle in Spur 5, eine gleichmäßige Proteinbeladung zeigt.

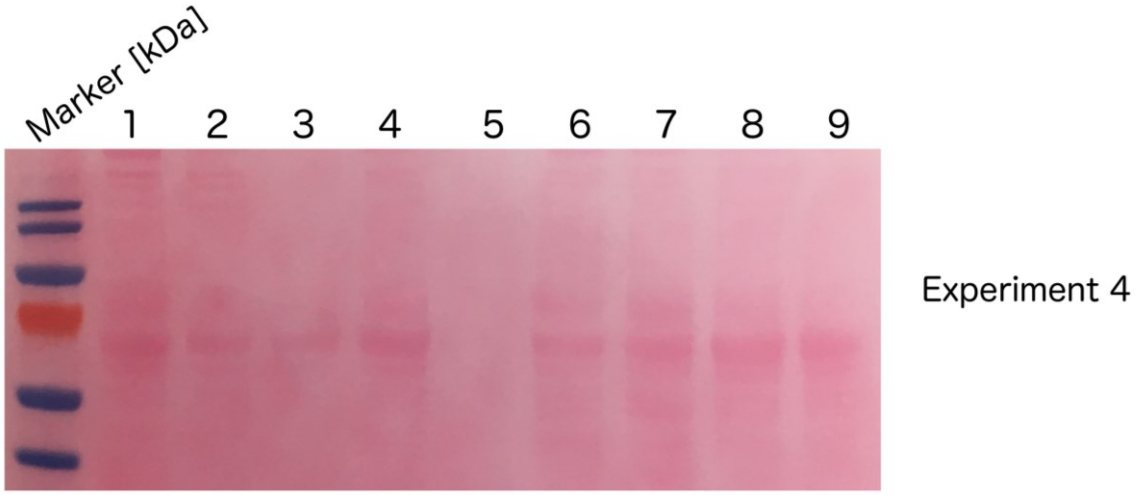


Abb. 11 Gleichmäßige Anfärbung der Sekretome der in Abb. 10 per Western Blot analysierten Zellen durch Ponceau-S-Färbung. Dargestellt ist die Membran, die für das Anti-SMOC1 Western Blot Experiment 4 verwendet wurde: (1) *SMOC1*-transfizierte U87MG-Zellen (*SMOC1* Zellen), (2) Leervektor 1-transfizierte U87MG-Zellen (LV1-Zellen), (3) Leervektor 2-transfizierte U87MG-Zellen (LV2-Zellen), (4) parentale U87MG-

Zellen, (5) Leerkontrolle, (6) *IDH1-R132H*-transfizierte U87MG-Zellen 1, (7) *IDH1-R132H*-transfizierte U87MG-*Zellen* 2, (8) *IDH1*-Wildtyp-transfizierte U87MG-Zellen, (9) parentale U87MG-Zellen. Anhand gleichmäßiger Färbung durch Ponceau-S-Lösung aller Positionen lässt sich von einer gleichmäßigen Proteinbeladung in allen Positionen ausgehen.

4.6 Einfluss der SMOC1-Expression auf die Zellproliferation von U87MG-Glioblastomzellen

Um den Einfluss der *SMOC1*-Expression in SMOC1-transfizierten versus Leervektor-transfizierten U87MG-Glioblastomzellen zu untersuchen, wurden Proliferationsassays über einen Zeitraum von 26 Tagen durchgeführt. Hierzu wurden die Ergebnisse für die *SMOC1*-Zellen mit denen der *LV1*- und *LV2*-Zellen (Leervektoren) verglichen. Sechsmal wurden die verwendeten Zellen jeweils nach 72 Stunden, zweimal nach 96 Stunden Inkubationszeit mittels *Vi-Cell*^{TM} *XR* gezählt und auf ihre Viabilität hin geprüft, sodass achtmal die Anzahl an viablen Zellen ermittelt wurde. Ausgehend von der absoluten Zellzahl pro Platte nach 72 bzw. 96 Stunden Wachstum und der immer gleichbleibenden Ausgangszahl von 250.000 pro Platte ausplattierten Zellen wurde das prozentuale Wachstum errechnet: ($Zellzahl_{neu}$ / 250.000) * 100 % = Wachstumsraten in Prozent. Für weitere Berechnungen wurden nur die Wachstumsraten nach 72 Stunden verwendet. Für jeden der sechs Messzeitpunkte wurde aus den jeweiligen drei biologischen Replikaten pro Zelltyp ein Mittelwert errechnet. Das durchschnittliche prozentuale Wachstum wurde aus den Mittelwerten der sechs Messzeitpunkte bestimmt und in Abb. 12 dargestellt. Die durchschnittliche Wachstumsrate von *SMOC1*-Zellen lag bei 400.9 % (Standardabweichung (SD): ± 42.72%; n=6). Die Wachstumsraten der LV1-Zellen lag bei 329.8 % (SD ± 24.99%; n=6), die der LV2-Zellen bei 343.1 % (SD ± 33.13%; n=6). Es wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt, um herauszufinden ob es signifikante Unterschiede zwischen dem durchschnittlichen Wachstum von *SMOC1*-Zellen, LV1-Zellen und LV2-Zellen gibt. Zwischen den drei Zelltypen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zellproliferation nachgewiesen werden. Die Verdopplungszeit lag bei durchschnittlich 39,5 h für die *SMOC1*-Zellen und bei 43,9 h bzw. 40,9 h für die LV1- bzw. LV2-Zellen. Auch hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede zeigen.

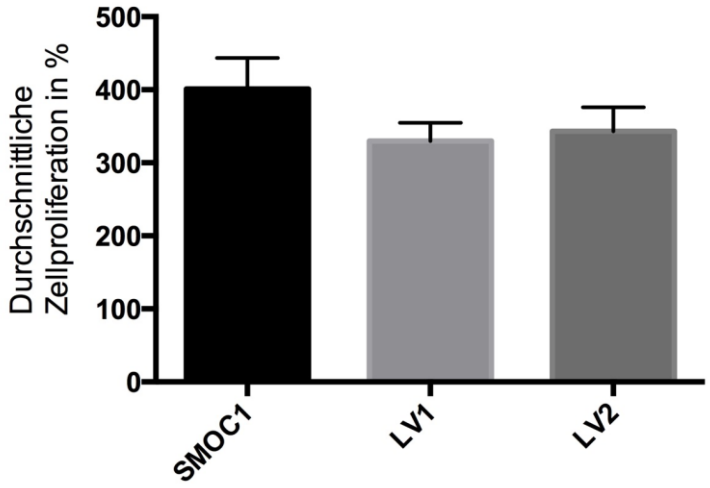


Abb. 12 Durchschnittliche Zellproliferation in Prozent von *SMOC1*-Zellen, LV1-Zellen und LV2-Zellen. Jeweils 250.000 *SMOC1*-exprimierende U87MG-Glioblastomzellen (*SMOC1*-Zellen) und Leervektor 1-transfizierte U87MG-Glioblastomzellen (LV1-Zellen) bzw Leervektor 2-transfizierte U87MG-Glioblastomzellen (LV2-Zellen) wurden ausplattiert und nach 72 oder 96 h gezählt. Die durchschnittliche Zellproliferation wurde aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten (n=3) an sechs Messpunkten bestimmt (n=6). Ungepaarte t-Tests wurden durchgeführt und ergaben keinen signifikanten Unterschied ($p<0.05$) zwischen *SMOC1*-Zellen und den Kontrollen LV1 und LV2. Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) der verschiedenen Zelllinien: *SMOC1*-Zellen: 400.9 % ± 42.72%; LV1-Zellen 329.8 % ± 24.99%; LV2-Zellen 343.1 % ± 33.13%.

4.7 Zytostatikasensibilität *SMOC1*-exprimierender U87MG-Glioblastomzellen im Vergleich zu Leervektor-Kontrollen

Es wurden Zytostatikabehandlungen und anschließend MTT-Assays durchgeführt, um die Auswirkungen der *SMOC1*-Expression auf die Zytostatikasensibilität von U87MG-Glioblastomzellen zu untersuchen. Die im MTT-Assay gemessene relative Absorption korreliert mit der Vitalität der Zellen, sodass die relative Absorption ein Indikator für die Sensibilität von Zellen auf Chemotherapeutika ist.

Es wurden vier verschiedene Chemotherapeutika mit jeweils unterschiedlichen Wirkmechanismen eingesetzt: Etoposid (ein Topoisomerase-II-Hemmer), *Hydroxyurea* (führt zur Hemmung der Ribonukleotidreduktase), Gemcitabin (Nukleosidanalogon), Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea (kurz CCNU, wird auch als Lomustin bezeichnet und wirkt als DNA-Alkylanz*).* Die *SMOC1-Zellen* sowie die LV1- und LV2-Zellen wurden für 72 Stunden mit jeweils vier verschiedenen Konzentrationen von Etoposid, Hydroxyurea,

Gemcitabin oder CCNU im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle inkubiert. Bei Etoposid handelte es sich um Konzentrationen von 0,2 µM, 1 µM, 5 µM und 25 µM. Bei Hydroxyurea wurden Konzentrationen von 16 µM, 80 µM, 400 µM oder 2 mM verwendet. Gemcitabin wurde in Konzentrationen von 0,8 µM, 4 µM, 20 µM oder 100 µM und in den Konzentrationen 32 nM, 160 nM, 0,8 µM oder 4 µM angewendet. Da nach dem ersten Versuchsdurchgang, in dem Konzentrationen von 0,8 µM, 4 µM, 20 µM bzw. 100 µM eingesetzt wurden, sowohl die *SMOC1*-Zellen als auch die Kontrollen, d.h. LV1-Zellen und LV2-Zellen, sich sehr sensibel gegenüber diesen Konzentrationen zeigten, wurden im zweiten und dritten Versuchsdurchgang die oben genannten geringeren Konzentrationen verwendet. Des Weiteren wurden die Zellen CCNU in Konzentrationen von 0,1 µM, 5 µM, 25 µM oder 125 µM ausgesetzt. Bei jedem Experiment wurden für jede Konzentration fünf technische Replikate erstellt, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Aus den jeweiligen Mittelwerten der drei unabhängigen Experimente wurde für jede Konzentration ein Mittelwert gebildet. Um die Mittelwerte zwischen den *SMOC1*-Zellen und den LV1- und LV2-Zellen zu vergleichen, wurden multiple *Welchs* t-Tests durchgeführt. Als signifikant wurden Unterschiede in den Mittelwerten mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ angenommen. Signifikante Unterschiede zwischen *SMOC1*- und LV1- sowie LV2-Zellen zeigten sich bei Zellen, die mit einer Konzentration von 25 µM Etoposid und bei Zellen, die mit einer Konzentration von 0.2 µM Gemcitabin behandelt wurden. Bei der Behandlung mit CCNU und Hydroxyurea zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellvitalität zwischen den *SMOC1*-transfizierten U87MG-Zellen und den Kontrollen.

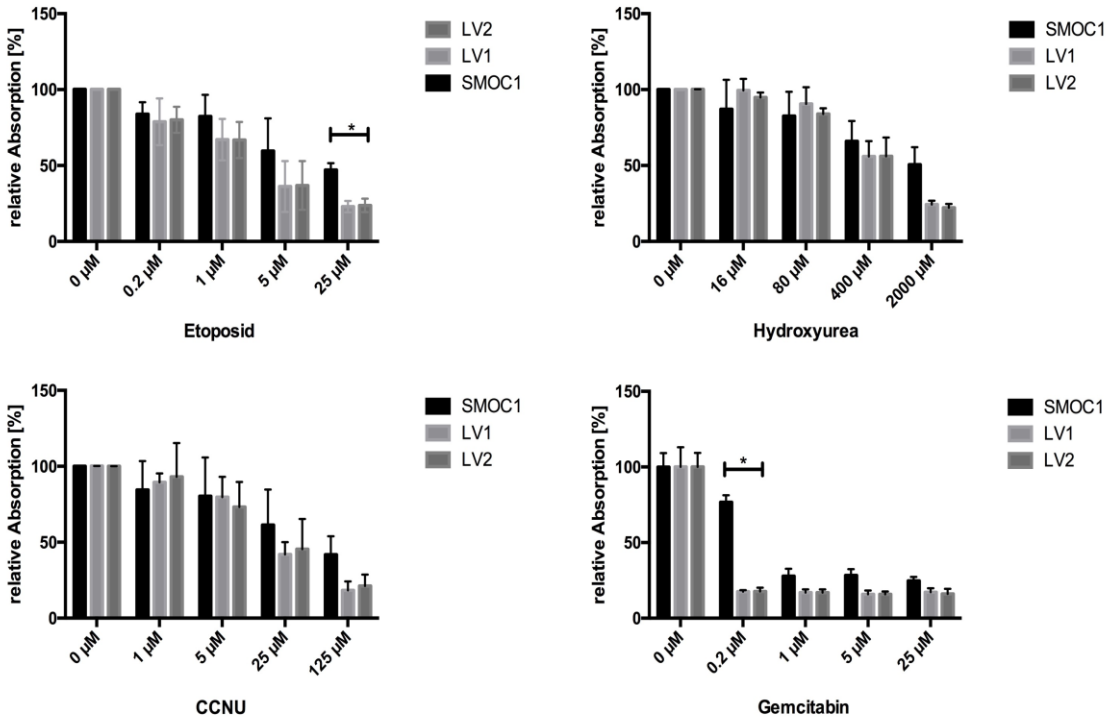


Abb. 13 SMOC1-Überexpression vermindert die Sensibilität von U87MG-Zellen gegenüber Gemcitabin und Etoposid. Dargestellt sind die Ergebnisse von MTT-Assays für *SMOC1*-transfizierte U87MG-Zellen (SMOC1*)* sowie zwei mit Leervektor-transfizierten U87MG-Zellmodellen (LV1 und LV2), die jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen der Chemotherapeutika Etoposid, Hydroxyurea, CCNU und Gemcitabin behandelt wurden. Für alle vier Chemotherapeutika zeigten die *SMOC1*-Zellen im Vergleich zu den LV1. und LV2-Zellen ein erhöhtes Zellüberleben nach der Behandlung. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$; indiziert durch *) in multiplen t-Tests konnten für die Konzentrationen von 25 µM Etoposid und 0.2 µM Gemcitabin gezeigt werden.

4.8 Einfluss von SMOC1 auf den BMP-2- und den TGF-β 1-Signalweg

Um den Einfluss der SMOC1-Expression in U87MG-Glioblastomzellen auf den BMP-2- und den TGF-β1-Signalweg zu untersuchen, wurden die vier verschiedenen Zelllinien (*SMOC1*-U87MG, LV1-U87MG, LV2-U87MG und U87MG parental) für 0, 15, 30 oder 60 min mit 10 ng/ml BMP-2 beziehungsweise 50 ng/ml TGF-β1 behandelt. Während BMP-2 vor allem via Phosphorylierung von SMAD1/5/9 wirkt, agiert TGF-β1 via Phosphorylierung von SMAD2. Nach der Behandlung der jeweiligen Zelllinien mit BMP-2 bzw. TGF-β1 wurden Western Blots durchgeführt, um die Phosphorylierung der SMAD-Proteine in Abhängigkeit von der Behandlungszeit in den verschiedenen Zelllinien zu analysieren. Dafür wurden die Antikörper Anti-Phospho-SMAD1/5/9 (pSMAD1/5/9) und Anti-Phospho-SMAD2 (pSMAD2) verwendet. Die Antikörper Anti-SMAD1 (SMAD1)

und Anti-SMAD2/3 (SMAD2/3) wurden genutzt, um die Gesamtheit der jeweiligen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten SMAD-Proteine als Referenz zu den jeweiligen phosphorylierten SMAD-Proteinen darzustellen. Der Anti-Aktin-Antikörper diente dem Nachweis von β-Aktin, welches als Referenz für eine gleichmäßige Proteinbeladung der verschiedenen Spuren im Western Blot genutzt wurde. In Abbildung 14 ist beispielhaft das Experiment Nummer 2 der mit BMP-2 behandelten Zelllinien abgebildet. Abbildung 15 zeigt die mit TGF-β1 behandelten Zelllinien. Der Aufbau beider Abbildungen ist identisch: Die Western Blot-Membranen, die nacheinander mit jeweils einem der fünf verschiedenen Antikörper inkubiert wurden, sind in der Reihenfolge pSMAD1/5/9, SMAD1, pSMAD2, SMAD2/3 und β-Aktin von oben nach unten angeordnet, darunter steht jeweils die behandelte Zelllinie. Auf der jeweiligen Membran werden fünf verschiedene Spuren von links nach rechts unterschieden: In Spur 1 wurden die 60 min lang behandelten Proben aufgetragen, in den Spuren 2-4 die 30 min, 15 min oder 0 min lang behandelten Proben. Als Positivkontrolle (+CTRL) fungierten nicht behandelte, nicht FCS-deprivierte Zellen, deren Lysat in Spur 5 aufgetragen wurde. In Abbildung 14 zeigen sich für die Positivkontrollen in allen Zelllinien kräftige Banden, mit Ausnahme von pSMAD2. Die Bandenintensität für pSMAD1/5/9 stieg von 0 min Behandlung bis 60 min Behandlung in allen Zelllinien kontinuierlich an, bis sie bei 60 min eine ähnlich starke Intensität wie in der Positivkontrolle aufwies. Die Banden für SMAD1 zeigten keine Abhängigkeit von der Behandlungszeit. Hier zeigten sich für alle Zelllinien mäßig starke Banden in jeder der fünf Spuren auf der Membran. Banden für pSMAD2 waren in keiner der vier Zelllinien abzugrenzen. Die Banden für SMAD2/3 zeigten sich als deutliche Doppelbanden in allen vier Zelllinien. Bei den *SMOC1*-Zellen stellten sich die SMAD2/3-Banden etwas kräftiger, bei den LV1-Zellen etwas schwächer dar. Die ß-Aktin-Banden waren in allen Spuren gleichmäßig kräftig erkennbar, sodass von einer gleichmäßigen Proteinbeladung der SDS-Gele und damit entsprechend der Membranen ausgegangen werden kann. Deutliche Unterschiede der Phosphorylierung der SMAD-Proteine zwischen den einzelnen Zelllinien waren nicht nachweisbar.

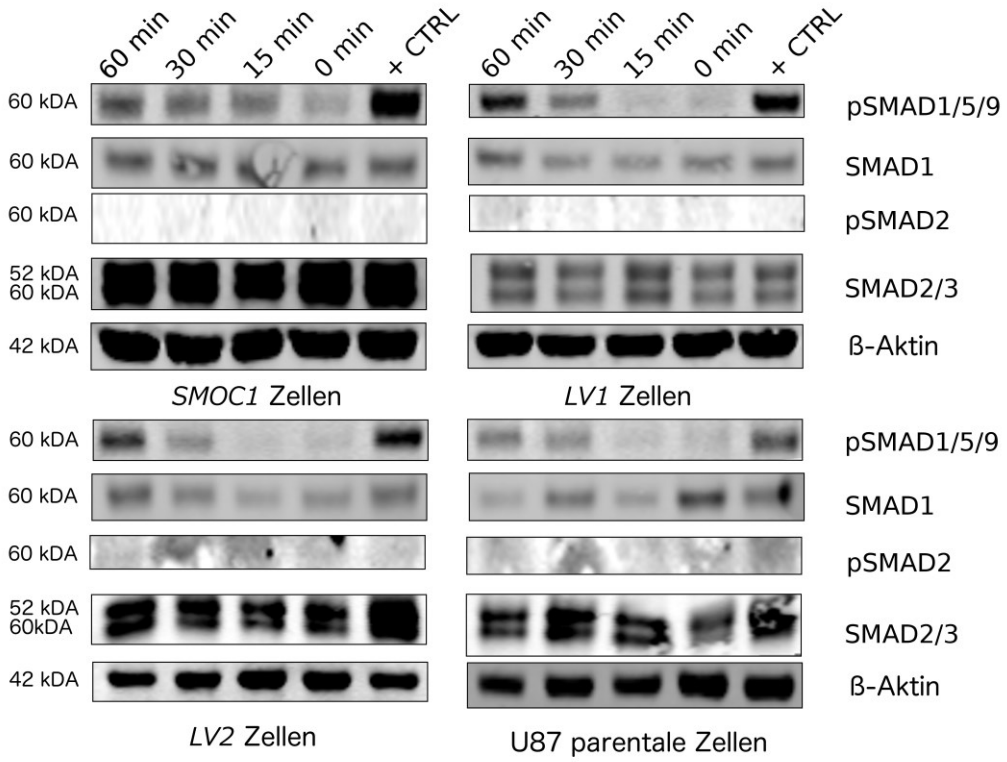


Abb. 14 Expression von *SMOC1* in U87MG-Glioblastomzellen hat keinen Einfluss auf den BMP-2 Signalweg. Dargestellt sind exemplarische Western Blots der vier Zelllinien *SMOC1*-U87MG, LV1-U87MG, LV2-U87MG, U87MG parental und der jeweiligen Positivkontrollen (+CTRL), die mit Antikörpern pSMAD1/5/9, SMAD1, pSMAD2, SMAD2/3 und ß-Actin nach verschiedenen Intervallen (0 bis 60 min) der Behandlung mit BMP-2 inkubiert wurden. Als Positivkontrolle (+CTRL) fungierten jeweils nicht behandelte und in FCS kultivierte Kontrollzellen. Die Bandenintensität für pSMAD1/5/9 steigt mit zunehmender Behandlungsdauer in allen vier Zelllinien an. Für pSMAD2 sind keine klaren Banden erkennbar. Insgesamt waren keine Unterschiede in der Phosphorylierung der SMAD-Proteine zwischen den einzelnen Zelllinien nachweisbar.

In Abbildung 15 stellen sich kräftige Antikörperbanden für die Positivkontrolle (+CTRL) auf fast allen Membranen der vier Zelllinien dar. Ausnahme bildet pSMAD2, für das in keiner der vier Zelllinien spezifische Banden erkennbar waren. Für die *SMOC1*-Zellen konnte für die Behandlungsdauer von 0 min nicht genügend Probenmaterial aufgetragen werden, sodass keine Proteine von einem der fünf Antikörper in Spur 4 detektiert werden konnten. Für pSMAD1/5/9 zeigte sich für die parentalen U87MG-Zellen und die *SMOC1*-U87MG-Zellen eine zunehmende Intensität mit steigender Behandlungsdauer. LV1- und LV2-Zellen zeigten zwar ebenfalls kräftige Banden für pSMAD1/5/9, allerdings waren diese nicht klar abgrenzbar. Die Banden für SMAD1 wiesen keine Abhängigkeit vom Behandlungsintervall auf. Es zeigten sich in allen Spuren in jeder der vier Zelllinien deutliche Banden. Die Bandenintensität für pSMAD2 war in den *SMOC1*-Zellen für 15 min, 30 min und 60 min Behandlungszeit gleichbleibend, während die Bandenintensität bei

den LV2-Zellen und den parentalen U87MG-Zellen zunahm. Die LV1-Zellen zeigten die kräftigste pSMAD2 Bande für einen Behandlungszeitraum von 15 min. Für die Behandlungszeit von 30 min und 60 min sank die Intensität der pSMAD2 Bande. Die Banden für SMAD2/3 zeigten sich wiederum als deutliche Doppelbanden in allen vier Zelllinien. In Spur 2 und 3 der LV2-Zellen sowie in Spur 4 der parentalen U87MG-Zellen waren Luftblasen beim Blotten eingeschlossen worden, die sich als runde, scharf begrenzte Aufhellungen abzeichnen. Mit Ausnahme der oben bereits erwähnten Spur 4 der *SMOC1 Zellen* sind gleichmäßig kräftige ß-Aktinbanden in allen Spuren der vier Zelllinien abgrenzbar, sodass von einer gleichmäßigen Proteinbeladung ausgegangen werden kann. Gravierende Unterschiede in der Phosphorylierung von SMAD-Proteinen nach Behandlung mit TGF-β1 konnten nicht gezeigt werde, allerdings zeigten sowohl LV2-Zellen als auch parentale U87MG-Zellen eine stärkere Zunahme der Bandenintensität für eine Behandlungsdauer von 30 und 60 min als die *SMOC1*-Zellen.

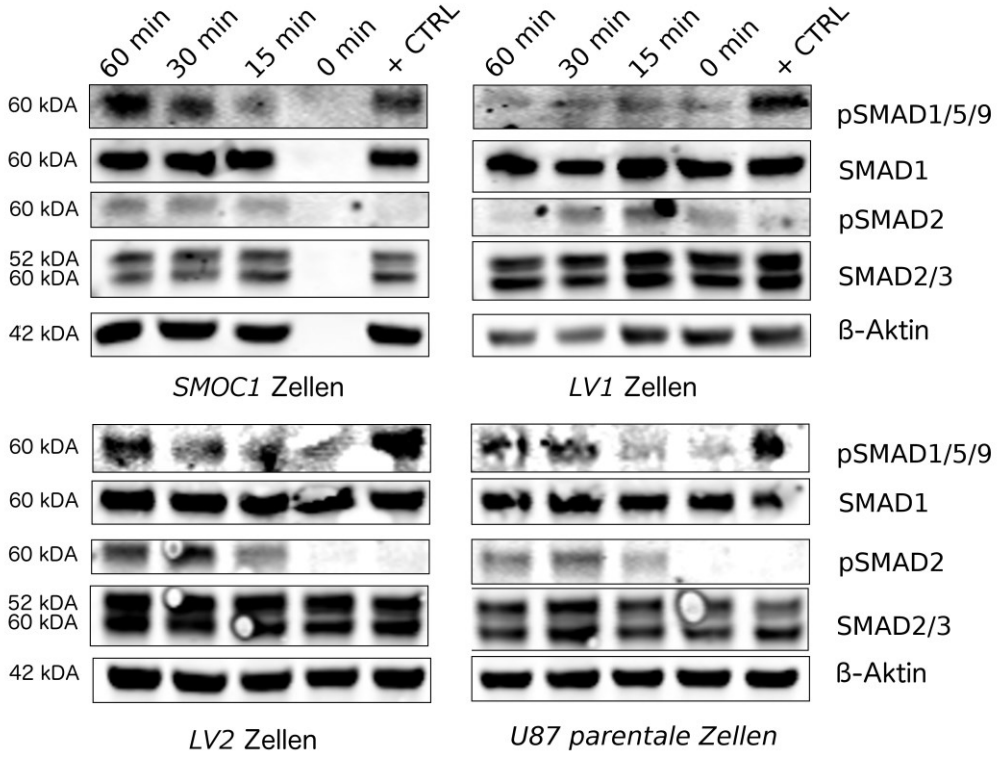


Abb. 15 Expression von *SMOC1* hat keinen Einfluss auf den *TGF-ß1* Signalweg. Dargestellt sind exemplarische Western Blots der vier Zelllinien *SMOC1*-U87MG, LV1-U87MG, LV2-U87MG, U87MG parental mit den Antikörpern pSMAD1/5/9, SMAD1, pSMAD2, SMAD2/3 und ß-Aktin nach verschiedenen Intervallen (0 bis 60 min) der Behandlung mit *TGF-ß1*. Als Positivkontrolle (+CTRL) fungierten jeweils nicht behandelte und in FCS kultivierte Zellen. Die Bandenintensität des pSMAD2 Antikörpers steigt mit zunehmender Behandlungsdauer in allen vier Zelllinien an. Insgesamt können keine Unterschiede in der Phosphorylierung der SMAD-Proteine zwischen den einzelnen Zelllinien gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine Phosphorylierung von SMAD2 in einer der Positivkontrollen nachzuweisen war, wohingegen die Phosphorylierung von SMAD1/5/9 in sämtlichen Positivkontrollen gezeigt werden konnte. Des Weiteren nahm die Phosphorylierung von SMAD1/5/9 sowohl mit zunehmender Behandlungsdauer mit BMP-2 als auch mit zunehmender Behandlungsdauer mit TGF-β1 zu. Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien konnten dabei nicht festgestellt werden. Die Phosphorylierung von SMAD2 nahm in den LV1-Zellen und den parentalen U87MG-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer zu, während sie bei den *SMOC1*-Zellen gleich blieb und bei den LV1-Zellen abnahm.

5 Diskussion

5.1 Differentielle Expression von Kandidatengene in Gliomen in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus

Turcan und Kollegen zeigten, dass die *IDH1* Mutation ausreichend ist, um einen sohgenannten hypermethylierten CpG-Insel-Phänotyp in Gliomen (*glioma CpG island-methylated phenotype, G-CIMP*) hervorzurufen [10]. Methylierungen von CpG-Dinukleotiden in CpG-Inseln von Genpromotoren führen zumeist zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität des Promotors und konsekutiv erniedrigten Expression des entsprechenden Genproduktes auf mRNA- und Proteinebene [143]. Die Methylierung von CpG-Inseln wird entsprechend als ein Mechanismus verstanden, über den die Genexpression reguliert werden kann. In Neuronen zeigte sich, dass mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zellen die DNA-Methylierung zunimmt [144]. Ziel der eigenen Arbeit war es, in IDH-mutierten und IDH-Wildtyp-Gliomen differentiell exprimierte Gene zu identifizieren und deren Auswirkung auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen. Insgesamt wurden zwölf in Datenbankanalysen identifizierte potentielle Kandidatengenen in einer eigenen Gliomkohorte validiert. Hierbei zeigten drei Gene, *SMOC1*, *BCAN*, und *GNMT*, in IDH-mutierten Gliomen eine erhöhte mRNA-Expression verglichen zu *IDH*-Wildtyp-Gliomen. In der bioinformatischen Auswertung von *TCGA*-Daten zeigten *BCAN* und *SMOC1* eine differentielle Hypomethylierung ihrer Promotorregionen in IDH-mutierten Gliomen. Umgekehrt konnte eine verminderte mRNA-Expression der Gene *C11orf63*, *TGIF1*, *JAG1* und *NFKBIZ* in IDH-mutierten Gliomen nachgewiesen werden.

C11orf63, *TGIF1*, *JAG1* und *NFKBIZ* zeigten alle in der Auswertung der *TCGA*-Daten eine Hypermethylierung in ihren Promotorregionen. Im Kontrast dazu steht jedoch die Beobachtung, dass das laut *TCGA*-Daten differentiell hypermethylierte Gen *GNMT* gleichzeitig eine erhöhte mRNA-Expression in IDH-mutierten Gliomen aufwies. Des Weiteren konnte in der eigenen Tumorkohorte keine differentielle mRNA-Expression der Kandidatengene *NR2E1*, *CFLAR, NR4A1* und *HNRNPF* nachgewiesen werden, trotz Nachweis einer differentiellen Hypermethylierung ihrer Promotoren in den *TCGA*-Daten. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die in IDH-mutierten Gliomen hypomethylierten Gene *BCAN* und *SMOC1* eine erhöhte mRNA-Expression aufweisen, ein hypermethylierter Promotorphänotyp jedoch nicht unbedingt zu einer vermindert mRNA-Expression führen muss. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass der *G-CIMP* nicht ausschließlich durch *Gene-silencing* via Promotormethylierung wirkt. Bereits Flavahan und Kollegen zeigten einen Weg auf, über den *G-CIMP* zu einer vermehrten Expression von Onkogenen führen kann [41]. Des Weiteren ist auch eine genauere Differenzierung innerhalb des *G-CIMP* denkbar, wie es Souza und Kollegen postulieren [145]. Hier wird zwischen einem hochgradigem und einem niedriggradigem *G-CIMP* (*G-CIMP*+ bzw. *G-CIMP*-) unterschieden. Bei einigen Gliomrezidiven zeigt sich eine verringerte DNA-Methylierungen verglichen mit dem Primärtumor. Solche Gliome mit einem niedriggradigen *G-CIMP* korrelieren mit einer schlechten Prognose. Gliome, die im Rezidiv ihren G-CIMP+ Status beibehalten haben, zeigen dagegen eine vergleichsweise bessere Prognose [145]. Insgesamt ist weitere Forschung notwendig, um die Auswirkungen des *G-CIMP* in IDH-mutierten Gliomen genauer zu untersuchen. Anhand der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse könnte hier auch ein Fokus auf in IDH-mutierten Gliomen differentiell in ihrem Promotorbereich hypomethylierte Gene, wie *SMOC1* und *BCAN,* gelegt werden.

5.2 Einfluss der IDH-Mutation auf die *SMOC1*-Expression in Gliomen

In der mittels Sangersequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA analysierten Promotorregion von *SMOC1* ließ sich in der untersuchten Gliomserie keine eindeutige Korrelation zwischen Promotormethylierung und mRNA-Expression von *SMOC1* nachweisen. Letztendlich konnte auch die in der TCGA-Datenbank gefundene Abhängigkeit der CpG-Inselmethylierung im *SMOC1*-Promotors vom IDH-Mutationstatus

nicht bestätigt werden. Grund dafür könnte jedoch eine mit n=12 zu geringe Stichprobenauswahl gewesen sein. Anhand der Proteinanalyse aus dem Überstand von Glioblastomzellen, die entweder mutiertes IDH1 oder Wildtyp-IDH1 überexprimierten, lies sich dagegen bestätigen, dass die Überexpression von mutiertem IDH1 ausreichend ist, um zu einer erhöhten Expression von *SMOC1* zu führen. Somit ist die verstärke Expression von *SMOC1* mehr oder weniger direkt auf den IDH-Mutationstatus zurückzuführen. Offen bleibt, über welchen Weg eine IDH-Mutation zu einer erhöhten *SMOC1*-Expression führt. Wie bereits erwähnt, konnte die Regulation von *SMOC1* via Promotormethylierung nicht zweifelsfrei belegt werden. Alternativ wurde von Awwad und Kollegen beschrieben, dass die Expresion von *SMOC1* auf posttranslationaler Ebene negativ von der *microRNA 223* (*miR-223*) reguliert wird [124]. *IDH1*-Mutation führte in Prostatakarzinomzellen wiederum zu einer verminderten Expression von *miR-223* [128]. Somit könnte eine IDH-Mutation möglicherweise auch durch Regulation von *miR-223* die Expression von *SMOC1* modulieren. Natürlich muss diese Hypothese noch experimentell bestätigt werden, jedoch bietet sie einen Ansatz, um möglicherweise die Frage zu beantworten, über welche Wege mutiertes IDH1 die Expression von SMOC1 beeinflusst.

5.3 Auswirkungen der SMOC1-Überexpression in Glioblastomzellen

Um die funktionellen Veränderungen, die mit einer Überexpression von SMOC1 in Glioblastomzellen einhergehen, zu untersuchen, wurden *SMOC1* stabil überexprimierende *U87MG*-Glioblastomzellen (*SMOC1*-Zellen) hergestellt. Der Focus der Untersuchungen wurde dabei auf das Proliferationsverhalten, eine Interaktion mit dem *Bone morphogenetic protein*-Signalweg (*BMP*-Signalweg) bzw. dem *Transforming growth factor beta*-Signalweg (*TGF-β*-Signalweg) und die Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika gelegt.

5.4 Auswirkungen von *SMOC1* auf die Zellproliferation in Glioblastomzellen

Über die Funktion von *SMOC1* auf zellulärer Ebene liegen bisher nur wenige Daten vor. Choi und Kollegen zeigten, dass *SMOC1* in mesenchymalen Knochenmarksstammzellen die Differenzierung hin zu Osteoblasten fördert, dabei jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation nimmt [120]. In Endothelzellen hingegen führt eine Überexpression von *SMOC1* zu vermehrter Proliferation [124]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsassays

zeigten keinen Unterschied zwischen *SMOC1*-exprimierenden und *SMOC1*-negativen Glioblastomzellen auf.

5.5 Interaktion von SMOC1 mit dem *TGF-β*-und dem *BMP*-Signalweg

Der *Transforming growth factor ß* (TGF-ß)-Signalweg beinhaltet eine Familie von Proteinen mit Einfluss auf die Embryogenese, Differenzierung, Organhomöostase und -entwicklung [146]. Damit spielt der TGF-ß-Signalweg auch eine komplexe Rolle in verschiedenen Krebsentitäten [147]. Bei diesem Signalweg handelt es sich um eine ligandengetriggerte Signalkaskade, die nach Ligandenbindung eine intrazelluläre Signalweiterleitung in Gang setzt. Im kanonischen Signalweg bindet einer der Liganden (*TGF-β 1-3, Bone morphogenetic proteins* (*BMPs*), *Growth differentiation factor 1* und *3* (*GDF1*/*3*) *Nodal, Activin A*) einen Typ 2-Rezeptor, der wiederum einen Typ 1-Rezeptor phosphoryliert und damit rekrutiert. Beide Rezeptortypen sind homodimere Rezeptoren, sodass ein heterotetramerer Komplex entsteht, der nun in der Lage ist, als Serin-/Threonin-Kinase zu fungieren und Proteine der *SMAD*-Familie zu rekrutieren und zu phosphorylieren. Die für den TGF- ß-Signalweg relevanten SMAD-Proteine sind SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5 und SMAD8. Man kann hier nun zwischen zwei Armen des TGF-β bzw. des BMP-Signalwegs unterscheiden: Während die Liganden TGF-β 1-3, GDF1/3, Nodal und Activin A zur Phosphorylierung von SMAD2/3 führen, aktivieren BMPs SMAD1/5/8. In beiden Armen des Signalwegs binden die nun phosphorylierten SMAD-Proteine SMAD4, um damit einen Proteinkomplex zu binden, der in den Zellkern übertritt und dort an Promotorregionen bzw. an Transkriptionsfaktoren bindet und darüber die mRNA-Transkription moduliert. Neben dem kanonischen Signalweg mit Aktivierung der SMAD-Proteine können die nach Ligandenbindung phosphorylierten intrazellulären Domänen der Typ-1/2-Rezeptoren weitere Proteine binden und über Aktivierung von GTP in Ras auch eine MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase)-Kaskade in Gang setzen [148]. Vereinfacht wird der Signalweg in der Abbildung 16 dargestellt. Je nach Gewebe, Pathologie und Entwicklungsstadium beeinflussen der TGF-β- und *BMP*-Signalweg unterschiedliche zelluläre Prozesse [149,150]. TGF-β 1-3, GDF1/3, Nodal und Activin A fördern Immunsuppression, Apoptose und Angiogenese. [147,151] BMPs induzieren unter anderem die Osteoblastendifferenzierung und Neurogenese [147,151].

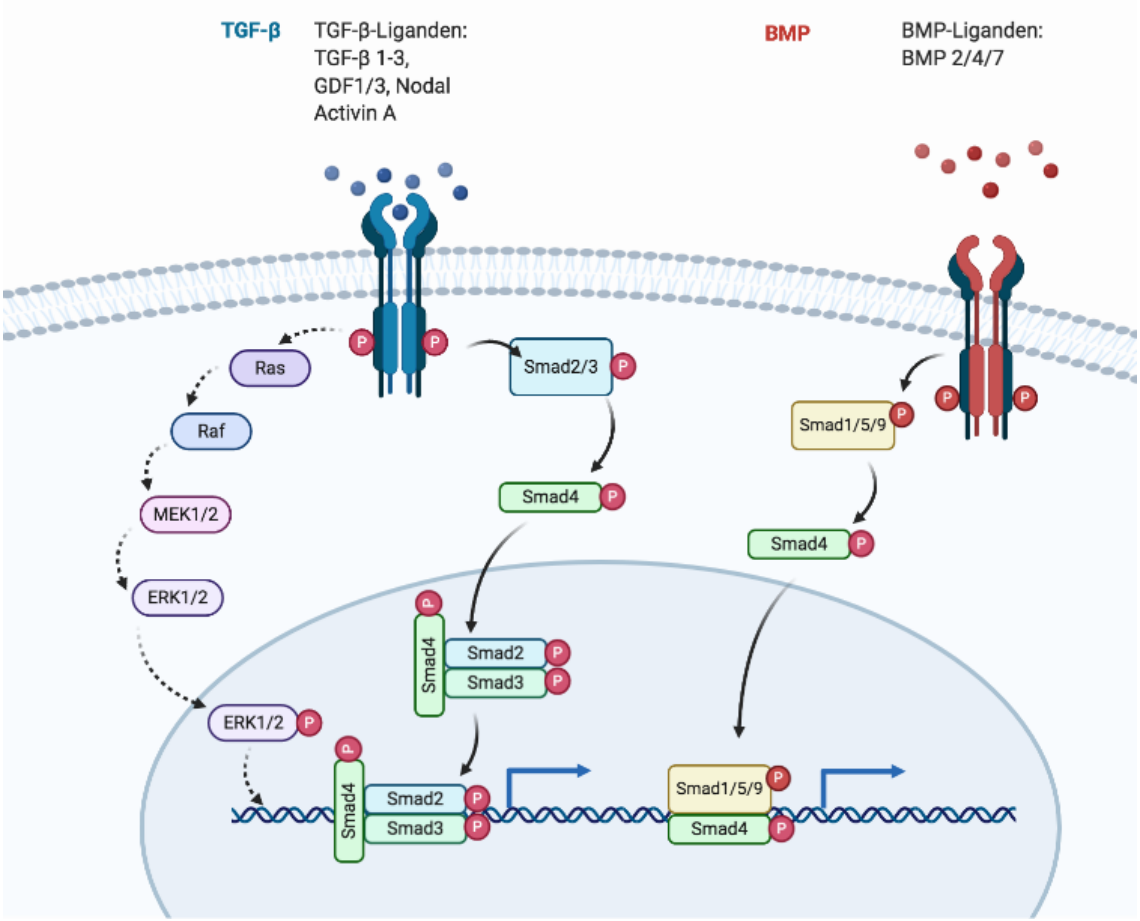


Abb. 16 Vereinfachtes Schema des TGF-β- und BMP-Signalwegs (modifiziert nach Biorender.com [152]) Darstellung der beiden Arme des TGF-β- und BMP-Signalwegs sowie des MAPK/ERK-Signalwegs. Während TGF-β 1-3, GDF1/3, Nodal und Activin A via SMAD2/3 Apoptose, Angiogenese und Immunsuppression fördern, verstärken BMPs via SMAD1/5/8 die Differenzierung von Osteoblasten und die Neurogenese.

In Glioblastomen wurde im Vergleich zu gesundem Hirngewebe eine erhöhte Expression von TGF-β1 und 2 nachgewiesen [153]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Glioblastomzellen TGF-β2 sezernieren und damit eine autokrine Stimulation durchführen [153]. Prinzipiell bewirken TGF-β1-3 durch Induktion des Checkpointinhibitoren *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B* (CDKN2B) einen G1-Arrest und hemmen dadurch die Zellproliferation. In Glioblastomen jedoch wird durch homozygote Deletion oder Mutationen in *CDKN2B* die homöostatische Wirkung von TGF-β1-3 umgangen [154]. Dadurch bekommt die onkogene Wirkung von TGF-β ein Übergewicht: Unter anderem werden Sox2 und Sox4 hochreguliert, und damit das Entstehen von Glioblastomstammzellen, welche als Schlüsselfaktor für die Therapieresistenz von Glioblastomen angesehen werden, gefördert [155]. Des Weiteren wird durch TGF-β via *Platelet-derived growth factor* (PDGF) die Angiogenese und die Tumorzellproliferation verstärkt [156]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die onkogene Wirkung des TGF-β-Signalwegs ist die Immunsuppression. Dies geschieht

z.B. durch Hemmung von natürlichen Killerzellen oder die negative Regulation von HLA-DR-Antigenen [157,158]. Über den TGF-β-Signalweg kommunizieren Glioblastomstammzellen mit der umgebenden Microglia und schaffen so eine Tumorumgebung, welche die Invasivität und die Proliferation der Tumoren erhöht [159,160]. BMPs hingegen können als Tumorsuppressoren in Gliomen wirken. So induziert BMP7 die Differenzierung von Glioblastomstammzellen [161]. BMP2 kann Glioblastomstammzellen für die Behandlung mit Temozolomid sensibilisieren [162]. Zusammengefasst ist der TGF-β-Signalweg damit ein Schlüsselfaktor für die Modulation der Tumormikroumgebung und der Glioblastomstammzellen.

Da SMOC1 allen Erkenntnissen nach als Modulator des TGF-β-Signalwegs agieren kann, war es nur folgerichtig, die Aktivierung von TGF-ß und BMPs in Abhängigkeit von der SMOC1-Expression zu untersuchen. Hierbei fanden sich jedoch in der Westernblot-basierten Analyse der Phosphorylierung der SMAD-Proteine keine Unterschiede zwischen SMOC1-überexprimierenden und entsprechenden Kontroll-U87MG-Glioblastomzellen. Dennoch sollte ein Einfluss von SMOC1 auf den TGF-β- und BMP-Signalweg und eine Bedeutung für die Gliomentstehung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Untersucht wurden lediglich die Auswirkungen der SMOC1-Expession in der Zellkultur, welche die Heterogenität und das Mikromilieu eines Glioms *in situ* nicht abbilden kann. Insbesondere der belegte Einfluss von SMOC1 auf Endothelzellen und Vaskularisierung via des TGF-β- und BMP-Signalwegs [124] könnte ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein.

5.6 Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika in Gliomen

Die derzeitige Standardtherapie für Glioblastome ist ein multimodales Therapiekonzept bestehend aus den drei Säulen Chirurgie, Radio(chemo)therapie gefolgt von Chemotherapie entsprechend des sogenannten Stupp-Protokolls oder einer Abwandlung dieses Protokolls [5,163]. Trotz dieses multimodalen Therapiekonzeptes ist eine Heilung dieser bösartigen Tumoren nach wie vor nicht möglich. Ein Grund dafür sind verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber Radio- und Chemotherapie [49,164].

Verschiedene Mechanismen führen zum Beispiel zu einer unzureichenden Wirkung von Chemotherapeutika. Zunächst bildet die physiologische Blut-Hirn-Schranke eine natürliche Barriere, die das Erreichen einer wirksamen Medikamentenkonzentration im

Gehirn deutlich erschwert. So zeigten sich beispielsweise, verglichen mit der Plasmakonzentration, deutlich geringere Konzentrationen an Temozolomid im Liquor [165]. Des Weiteren sind Glioblastomzellen in der Lage über verschiedene ABC-Transporter (*ATP binding cassette*-Transporter) Chemotherapeutika aus den Tumorzellen heraus zu pumpen [51]. Glioblastomzellen verfügen zudem oftmals über eine erhöhte Expression von DNA-Reparaturenzymen, die durch Chemotherapeutika entstandene Schäden der DNA beseitigen. Das bekannteste dieser Reparaturenzyme ist die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*), welche die Wirkung alkylierender Chemotherapeutika durch die Reparatur eben der DNA-Addukte vermindert, die durch die alkylierenden Chemotherapeutika verursacht werden, so die Konversion von O6-Methylguanin zurück zu Guanin [166]. Insgesamt zeichnen sich Glioblastome jedoch vor allem durch ihre hohe intratumorale zelluläre Heterogenität und Plastizität aus, sodass durch Chemotherapeutika zumeist nur eine Subpopulation des Tumors geschädigt wird [167].

5.7 Auswirkungen der SMOC1-Expression auf die Sensibilität von Glioblastomzellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika

Vor dem Hintergrund der häufigen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der SMOC1-Expression in Hinsicht auf die Sensibilität von *MGMT* Promotor-hypermethylierten U87MG-Zellen [168] gegenüber den Chemotherapeutika Gemcitabin, Etoposid, CCNU und Hydroxyurea untersucht. Gegenüber Gemcitabin und Etopsid wiesen die SMOC1-exprimierenden U87MG-Glioblastomzellen eine signifikant geringere Sensibilität als die Kontrollen auf. Bezüglich CCNU und Hydroxyurea zeigte sich dagegen allenfalls eine (nicht-signifikante) Tendenz in Richtung einer geringeren Sensibilität nach SMOC1-Überexpression.

Gemcitabin ist ein Analogon von Cytidin, welches nach Einbau in die DNA die DNA-Synthese unterbricht. Verschiedene Resistenzmechanismen führen zu einer abgeschwächten Wirkung von Gemcitabin. Die Aufnahme von Gemcitabin durch Nucleosidtransporter kann durch Hemmung der Nucleosidtransporter verringert werden [169]. Die Desoxycytidin-Kinase (dCK) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des *dNTP-salvage*-Signalwegs, der dNTPs für die DNA-Synthese zur Verfügung stellt. Verminderte Expression der dCK führt zu einer Gemcitabinresistenz, Hochregulation führt zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber Gemcitabin [170]. Etoposid wirkt als Inhibitor der

Topoisomerase II und dadurch als Zytostatikum. In gegen Etoposid resistenten Brustkrebs- und Neuroblastomzelllinien wurde eine differentielle Expression von Apoptose-regulierenden microRNAs sowie von verschiedenen *ABC*-Transportern nachgewiesen [171,172]. Da über die intrazelluläre Wirkung von *SMOC1* nur wenig bekannt ist, kann bisher keine direkte Verbindung zwischen den oben genannten Resistenzmechanismen und *SMOC*1 hergestellt werden.

5.8 Schlussfolgerungen

Trotz multimodaler Therapiekonzepte ist eine Heilung diffuser Gliome, insbesondere der häufigsten und bösartigsten Gruppe der Glioblastome, bisher nicht möglich. Zur Optimierung bestehender und Erforschung neuer Therapieansätze ist deswegen ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der Entstehung und Progression dieser Tumoren essentiell. Die komplexen Auswirkungen von IDH-Mutationen in Gliomen sind weiterhin noch nicht vollständig verstanden und es bedarf diesbezüglich weiterer Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurden in Abhängigkeit vom IDH-Mutationsstatus in Gliomen differentiell exprimierte Kandidatengene validiert. *SMOC1*, *BCAN*, *NR4A1* und *GNMT* wiesen eine erhöhte, *C11orf63*, *TGIF1*, *JAG1* und *NFKBIZ* eine verminderte Expression in IDH-mutierten Gliomen im Vergleich zu IDH-Wildtyp-Gliomen auf. Die beiden Kandidatengene *SMOC1* und *BCAN,* die für extrazelluläre Matrixproteine kodieren, werfen die Frage nach dem Zusammenhang zwischen IDH-Mutation und Veränderungen der extrazellulärer Matrix in Gliomen auf. Hierzu wurden bisher erst ansatzweise Forschungsergebnisse publiziert, die z.B. über eine Abhängigkeit der Expression von Matrixmetalloproteasen in Gliomen vom IDH-Mutationsstatus berichteten [173]. Andere Autoren fanden eine verstärkte Expression von Hyaloronsäuresynthase 2 (HAS2) in IDH-Wildtyp- im Vergleich zu IDH-mutierten Gliomen [174]. Über welche Mechanismen die IDH-Mutation die jeweiligen Kandidatengene reguliert, ist noch nicht bekannt und bedarf weiterer Forschung. Ebenso bieten die weitere Charakterisierung der molekularen Auswirkungen der verstärkten SMOC1-Expression in IDH-mutierten Gliomen Potential für weitere interessante Fragestellungen.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

(1) Louis, D. N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Deimling, A. von; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W. K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Kleihues, P.; Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2016**, *131* (6), 803–820. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1.

(2) Ostrom, Q. T.; Cioffi, G.; Gittleman, H.; Patil, N.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncol.* **2019**, *21* (Supplement_5), v1–v100. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150.

(3) Weller, M.; van den Bent, M.; Tonn, J. C.; Stupp, R.; Preusser, M.; Cohen-Jonathan-Moyal, E.; Henriksson, R.; Rhun, E. L.; Balana, C.; Chinot, O.; Bendszus, M.; Reijneveld, J. C.; Dhermain, F.; French, P.; Marosi, C.; Watts, C.; Oberg, I.; Pilkington, G.; Baumert, B. G.; Taphoorn, M. J. B.; Hegi, M.; Westphal, M.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; Wick, W.; European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Gliomas. European Association for Neuro-Oncology (EANO) Guideline on the Diagnosis and Treatment of Adult Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Lancet Oncol.* **2017**, *18* (6), e315–e329. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8.

(4) Gilbert, M. R.; Dignam, J. J.; Armstrong, T. S.; Wefel, J. S.; Blumenthal, D. T.; Vogelbaum, M. A.; Colman, H.; Chakravarti, A.; Pugh, S.; Won, M.; Jeraj, R.; Brown, P. D.; Jaeckle, K. A.; Schiff, D.; Stieber, V. W.; Brachman, D. G.; Werner-Wasik, M.; Tremont-Lukats, I. W.; Sulman, E. P.; Aldape, K. D.; Curran, W. J. Jr.; Mehta, M. P. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370* (8), 699–708. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308573.

(5) Baumert, B. G.; Hegi, M. E.; van den Bent, M. J.; von Deimling, A.; Gorlia, T.; Hoang-Xuan, K.; Brandes, A. A.; Kantor, G.; Taphoorn, M. J. B.; Hassel, M. B.; Hartmann, C.; Ryan, G.; Capper, D.; Kros, J. M.; Kurscheid, S.; Wick, W.; Enting, R.; Reni, M.; Thiessen, B.; Dhermain, F.; Bromberg, J. E.; Feuvret, L.; Reijneveld, J. C.; Chinot, O.; Gijtenbeek, J. M. M.; Rossiter, J. P.; Dif, N.; Balana, C.; Bravo-Marques, J.; Clement, P. M.; Marosi, C.; Tzuk-Shina, T.; Nordal, R. A.; Rees, J.; Lacombe, D.; Mason, W. P.; Stupp, R. Temozolomide Chemotherapy versus Radiotherapy in High-Risk Low-Grade Glioma. *Lancet Oncol.* **2016**, *17* (11), 1521–1532. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30313-8.

(6) Herrndorf, W. *Arbeit und Struktur*, 3rd ed.; Rowohlt Taschenbuch Verlag: Reinbek bei Hamburg, 2015.

(7) Andreas, D. Halt auf freier Strecke-Trailer https://www.youtube.com/watch?v=Vkp1DkrbndE (accessed Jan 16, 2018).

(8) Parsons, D. W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J. C.-H.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.-M.; Gallia, G. L.; Olivi, A.; McLendon, R.; Rasheed, B. A.; Keir, S.; Nikolskaya, T.; Nikolsky, Y.; Busam, D. A.; Tekleab, H.; Diaz, L. A.; Hartigan, J.; Smith, D. R.; Strausberg, R. L.; Marie, S. K. N.; Shinjo, S. M. O.; Yan, H.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Karchin, R.; Papadopoulos, N.; Parmigiani, G.; Vogelstein, B.; Velculescu, V. E.; Kinzler, K. W. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **2008**, *321* (5897), 1807. https://doi.org/10.1126/science.1164382.

(9) Ward, P. S.; Patel, J.; Wise, D. R.; Abdel-Wahab, O.; Bennett, B. D.; Coller, H. A.;

Cross, J. R.; Fantin, V. R.; Hedvat, C. V.; Perl, A. E.; Rabinowitz, J. D.; Carroll, M.; Su, S. M.; Sharp, K. A.; Levine, R. L.; Thompson, C. B. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting Alpha-Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **2010**, *17* (3), 225–234. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.020.

(10) Turcan, S.; Rohle, D.; Goenka, A.; Walsh, L. A.; Fang, F.; Yilmaz, E.; Campos, C.; Fabius, A. W. M.; Lu, C.; Ward, P. S.; Thompson, C. B.; Kaufman, A.; Guryanova, O.; Levine, R.; Heguy, A.; Viale, A.; Morris, L. G. T.; Huse, J. T.; Mellinghoff, I. K.; Chan, T. A. IDH1 Mutation Is Sufficient to Establish the Glioma Hypermethylator Phenotype. *Nature* **2012**, *483* (7390), 479–483. https://doi.org/10.1038/nature10866.

(11) Noushmehr, H.; Weisenberger, D. J.; Diefes, K.; Phillips, H. S.; Pujara, K.; Berman, B. P.; Pan, F.; Pelloski, C. E.; Sulman, E. P.; Bhat, K. P.; Verhaak, R. G. W.; Hoadley, K. A.; Hayes, D. N.; Perou, C. M.; Schmidt, H. K.; Ding, L.; Wilson, R. K.; Van Den Berg, D.; Shen, H.; Bengtsson, H.; Neuvial, P.; Cope, L. M.; Buckley, J.; Herman, J. G.; Baylin, S. B.; Laird, P. W.; Aldape, K. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype That Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* **2010**, *17* (5), 510–522. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017.

(12) Cancer http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer (accessed Jul 8, 2018).

(13) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

(14) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

(15) Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (3), 178–196. https://doi.org/10.1038/nrm3758.

(16) A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis, with a Correlated Study of Prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 Illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal: J. B. Lippincott Company. 21s. Net. *BJS Br. J. Surg.* **1927**, *14* (55), 554–555. https://doi.org/10.1002/bjs.1800145540.

(17) Weltgesundheitsorganisation. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Revised 4th edition.; Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Eds.; World Health Organization classification of tumours; International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2016.

(18) van den Bent, M. J. Interobserver Variation of the Histopathological Diagnosis in Clinical Trials on Glioma: A Clinician's Perspective. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2010**, *120* (3), 297–304. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0725-7.

(19) Network, T. C. G. A. R. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372* (26), 2481–2498. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121.

(20) Suzuki, H.; Aoki, K.; Chiba, K.; Sato, Y.; Shiozawa, Y.; Shiraishi, Y.; Shimamura, T.; Niida, A.; Motomura, K.; Ohka, F.; Yamamoto, T.; Tanahashi, K.; Ranjit, M.; Wakabayashi, T.; Yoshizato, T.; Kataoka, K.; Yoshida, K.; Nagata, Y.; Sato-Otsubo, A.; Tanaka, H.; Sanada, M.; Kondo, Y.; Nakamura, H.; Mizoguchi, M.; Abe, T.; Muragaki, Y.;

Watanabe, R.; Ito, I.; Miyano, S.; Natsume, A.; Ogawa, S. Mutational Landscape and Clonal Architecture in Grade II and III Gliomas. *Nat. Genet.* **2015**, *47* (5), 458. https://doi.org/10.1038/ng.3273.

(21) Ceccarelli, M.; Barthel, F. P.; Malta, T. M.; Sabedot, T. S.; Salama, S. R.; Murray, B. A.; Morozova, O.; Newton, Y.; Radenbaugh, A.; Pagnotta, S. M.; Anjum, S.; Wang, J.; Manyam, G.; Zoppoli, P.; Ling, S.; Rao, A. A.; Grifford, M.; Cherniack, A. D.; Zhang, H.; Poisson, L.; Carlotti, C. G.; Pretti da Cunha Tirapelli, D.; Rao, A.; Mikkelsen, T.; Lau, C. C.; Yung, W. K. A.; Rabadan, R.; Huse, J.; Brat, D. J.; Lehman, N. L.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Zheng, S.; Hess, K.; Rao, G.; Meyerson, M.; Beroukhim, R.; Cooper, L.; Akbani, R.; Wrensch, M.; Haussler, D.; Aldape, K. D.; Laird, P. W.; Gutmann, D. H.; Noushmehr, H.; Iavarone, A.; Verhaak, R. G. W. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **2016**, *164* (3), 550–563. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.028.

(22) Sturm, D.; Witt, H.; Hovestadt, V.; Khuong-Quang, D.-A.; Jones, D. T. W.; Konermann, C.; Pfaff, E.; Tönjes, M.; Sill, M.; Bender, S.; Kool, M.; Zapatka, M.; Becker, N.; Zucknick, M.; Hielscher, T.; Liu, X.-Y.; Fontebasso, A. M.; Ryzhova, M.; Albrecht, S.; Jacob, K.; Wolter, M.; Ebinger, M.; Schuhmann, M. U.; van Meter, T.; Frühwald, M. C.; Hauch, H.; Pekrun, A.; Radlwimmer, B.; Niehues, T.; von Komorowski, G.; Dürken, M.; Kulozik, A. E.; Madden, J.; Donson, A.; Foreman, N. K.; Drissi, R.; Fouladi, M.; Scheurlen, W.; von Deimling, A.; Monoranu, C.; Roggendorf, W.; Herold-Mende, C.; Unterberg, A.; Kramm, C. M.; Felsberg, J.; Hartmann, C.; Wiestler, B.; Wick, W.; Milde, T.; Witt, O.; Lindroth, A. M.; Schwartzentruber, J.; Faury, D.; Fleming, A.; Zakrzewska, M.; Liberski, P. P.; Zakrzewski, K.; Hauser, P.; Garami, M.; Klekner, A.; Bognar, L.; Morrissy, S.; Cavalli, F.; Taylor, M. D.; van Sluis, P.; Koster, J.; Versteeg, R.; Volckmann, R.; Mikkelsen, T.; Aldape, K.; Reifenberger, G.; Collins, V. P.; Majewski, J.; Korshunov, A.; Lichter, P.; Plass, C.; Jabado, N.; Pfister, S. M. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* **2012**, *22* (4), 425–437. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.024.

(23) Sahm, F.; Reuss, D.; Koelsche, C.; Capper, D.; Schittenhelm, J.; Heim, S.; Jones, D. T. W.; Pfister, S. M.; 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. (Berl.)* **2014**, *128* (4), 551–559. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1326-7.

(24) van den Bent, M. J.; Brandes, A. A.; Taphoorn, M. J. B.; Kros, J. M.; Kouwenhoven, M. C. M.; Delattre, J.-Y.; Bernsen, H. J. J. A.; Frenay, M.; Tijssen, C. C.; Grisold, W.; Sipos, L.; Enting, R. H.; French, P. J.; Dinjens, W. N. M.; Vecht, C. J.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Gorlia, T.; Hoang-Xuan, K. Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Follow-up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2013**, *31* (3), 344–350. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2229.

(25) Cairncross, G.; Wang, M.; Shaw, E.; Jenkins, R.; Brachman, D.; Buckner, J.; Fink, K.; Souhami, L.; Laperriere, N.; Curran, W.; Mehta, M. Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2013**, *31* (3), 337–343. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2674.

(26) Cahill, D. P.; Louis, D. N.; Cairncross, J. G. Molecular Background of Oligodendroglioma: 1p/19q, IDH, TERT, CIC and FUBP1. *CNS Oncol.* **2015**, *4* (5), 287–294. https://doi.org/10.2217/cns.15.32.

(27) Felsberg, J.; Erkwoh, A.; Sabel, M. C.; Kirsch, L.; Fimmers, R.; Blaschke, B.; Schlegel, U.; Schramm, J.; Wiestler, O. D.; Reifenberger, G. Oligodendroglial Tumors: Refinement of Candidate Regions on Chromosome Arm 1p and Correlation of 1p/19q Status with Survival. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **2004**, *14* (2), 121–130.

(28) Hartmann, C.; Hentschel, B.; Tatagiba, M.; Schramm, J.; Schnell, O.; Seidel, C.; Stein, R.; Reifenberger, G.; Pietsch, T.; von Deimling, A.; Loeffler, M.; Weller, M.; German Glioma Network. Molecular Markers in Low-Grade Gliomas: Predictive or Prognostic? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *17* (13), 4588–4599. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3194.

(29) Reifenberger, G.; Wirsching, H.-G.; Knobbe-Thomsen, C. B.; Weller, M. Advances in the Molecular Genetics of Gliomas - Implications for Classification and Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14* (7), 434–452. https://doi.org/info:doi/10.1038/nrclinonc.2016.204.

(30) Hartmann, C.; Meyer, J.; Balss, J.; Capper, D.; Mueller, W.; Christians, A.; Felsberg, J.; Wolter, M.; Mawrin, C.; Wick, W.; Weller, M.; Herold-Mende, C.; Unterberg, A.; Jeuken, J. W. M.; Wesseling, P.; Reifenberger, G.; Deimling, A. von. Type and Frequency of IDH1 and IDH2 Mutations Are Related to Astrocytic and Oligodendroglial Differentiation and Age: A Study of 1,010 Diffuse Gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2009**, *118* (4), 469–474. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0561-9.

(31) Pusch, S.; Sahm, F.; Meyer, J.; Mittelbronn, M.; Hartmann, C.; von Deimling, A. Glioma IDH1 Mutation Patterns off the Beaten Track. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2011**, *37* (4), 428–430. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01127.x.

(32) Yan, H.; Parsons, D. W.; Jin, G.; McLendon, R.; Rasheed, B. A.; Yuan, W.; Kos, I.; Batinic-Haberle, I.; Jones, S.; Riggins, G. J.; Friedman, H.; Friedman, A.; Reardon, D.; Herndon, J.; Kinzler, K. W.; Velculescu, V. E.; Vogelstein, B.; Bigner, D. D. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360* (8), 765–773. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710.

(33) Hartmann, C.; Hentschel, B.; Wick, W.; Capper, D.; Felsberg, J.; Simon, M.; Westphal, M.; Schackert, G.; Meyermann, R.; Pietsch, T.; Reifenberger, G.; Weller, M.; Loeffler, M.; Deimling, A. von. Patients with IDH1 Wild Type Anaplastic Astrocytomas Exhibit Worse Prognosis than IDH1-mutated Glioblastomas, and IDH1 Mutation Status Accounts for the Unfavorable Prognostic Effect of Higher Age: Implications for Classification of Gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2010**, *120* (6), 707–718. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0781-z.

(34) Ostrom, Q. T.; Gittleman, H.; Liao, P.; Vecchione-Koval, T.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19* (suppl_5), v1–v88. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158.

(35) QI, S.; YU, L.; LI, H.; OU, Y.; QIU, X.; DING, Y.; HAN, H.; ZHANG, X. Isocitrate Dehydrogenase Mutation Is Associated with Tumor Location and Magnetic Resonance Imaging Characteristics in Astrocytic Neoplasms. *Oncol. Lett.* **2014**, *7* (6), 1895–1902. https://doi.org/10.3892/ol.2014.2013.

(36) Mardis, E. R.; Ding, L.; Dooling, D. J.; Larson, D. E.; McLellan, M. D.; Chen, K.; Koboldt, D. C.; Fulton, R. S.; Delehaunty, K. D.; McGrath, S. D.; Fulton, L. A.; Locke, D. P.; Magrini, V. J.; Abbott, R. M.; Vickery, T. L.; Reed, J. S.; Robinson, J. S.; Wylie, T.; Smith, S. M.; Carmichael, L.; Eldred, J. M.; Harris, C. C.; Walker, J.; Peck, J. B.; Du, F.;

Dukes, A. F.; Sanderson, G. E.; Brummett, A. M.; Clark, E.; McMichael, J. F.; Meyer, R. J.; Schindler, J. K.; Pohl, C. S.; Wallis, J. W.; Shi, X.; Lin, L.; Schmidt, H.; Tang, Y.; Haipek, C.; Wiechert, M. E.; Ivy, J. V.; Kalicki, J.; Elliott, G.; Ries, R. E.; Payton, J. E.; Westervelt, P.; Tomasson, M. H.; Watson, M. A.; Baty, J.; Heath, S.; Shannon, W. D.; Nagarajan, R.; Link, D. C.; Walter, M. J.; Graubert, T. A.; DiPersio, J. F.; Wilson, R. K.; Ley, T. J. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (11), 1058–1066. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903840.

(37) Borger, D. R.; Tanabe, K. K.; Fan, K. C.; Lopez, H. U.; Fantin, V. R.; Straley, K. S.; Schenkein, D. P.; Hezel, A. F.; Ancukiewicz, M.; Liebman, H. M.; Kwak, E. L.; Clark, J. W.; Ryan, D. P.; Deshpande, V.; Dias-Santagata, D.; Ellisen, L. W.; Zhu, A. X.; Iafrate, A. J. Frequent Mutation of Isocitrate Dehydrogenase IDH1 and IDH2 in Cholangiocarcinoma Identified through Broad-Based Tumor Genotyping. *The Oncologist* **2012**, *17* (1), 72–79. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0386.

(38) Amary, M. F.; Bacsi, K.; Maggiani, F.; Damato, S.; Halai, D.; Berisha, F.; Pollock, R.; O'Donnell, P.; Grigoriadis, A.; Diss, T.; Eskandarpour, M.; Presneau, N.; Hogendoorn, P. C.; Futreal, A.; Tirabosco, R.; Flanagan, A. M. IDH1 and IDH2 Mutations Are Frequent Events in Central Chondrosarcoma and Central and Periosteal Chondromas but Not in Other Mesenchymal Tumours. *J. Pathol.* **2011**, *224* (3), 334–343. https://doi.org/10.1002/path.2913.

(39) Ichimura, K. Molecular Pathogenesis of IDH Mutations in Gliomas. *Brain Tumor Pathol.* **2012**, *29* (3), 131–139. https://doi.org/10.1007/s10014-012-0090-4.

(40) Xu, W.; Yang, H.; Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Kim, S.-H.; Ito, S.; Yang, C.; Wang, P.; Xiao, M.-T.; Liu, L.; Jiang, W.; Liu, J.; Zhang, J.; Wang, B.; Frye, S.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Lei, Q.; Guan, K.-L.; Zhao, S.; Xiong, Y. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* **2011**, *19* (1), 17–30. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.014.

(41) Flavahan, W. A.; Drier, Y.; Liau, B. B.; Gillespie, S. M.; Venteicher, A. S.; Stemmer-Rachamimov, A. O.; Suvà, M. L.; Bernstein, B. E. Insulator Dysfunction and Oncogene Activation in IDH Mutant Gliomas. *Nature* **2016**, *529* (7584), 110–114. https://doi.org/10.1038/nature16490.

(42) Lu, C.; Ward, P. S.; Kapoor, G. S.; Rohle, D.; Turcan, S.; Abdel-Wahab, O.; Edwards, C. R.; Khanin, R.; Figueroa, M. E.; Melnick, A.; Wellen, K. E.; O'Rourke, D. M.; Berger, S. L.; Chan, T. A.; Levine, R. L.; Mellinghoff, I. K.; Thompson, C. B. IDH Mutation Impairs Histone Demethylation and Results in a Block to Cell Differentiation. *Nature* **2012**, *483* (7390), 474–478. https://doi.org/10.1038/nature10860.

(43) Johnson, B. E.; Mazor, T.; Hong, C.; Barnes, M.; Aihara, K.; McLean, C. Y.; Fouse, S. D.; Yamamoto, S.; Ueda, H.; Tatsuno, K.; Asthana, S.; Jalbert, L. E.; Nelson, S. J.; Bollen, A. W.; Gustafson, W. C.; Charron, E.; Weiss, W. A.; Smirnov, I. V.; Song, J. S.; Olshen, A. B.; Cha, S.; Zhao, Y.; Moore, R. A.; Mungall, A. J.; Jones, S. J. M.; Hirst, M.; Marra, M. A.; Saito, N.; Aburatani, H.; Mukasa, A.; Berger, M. S.; Chang, S. M.; Taylor, B. S.; Costello, J. F. Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma. *Science* **2014**, *343* (6167), 189–193. https://doi.org/10.1126/science.1239947.

(44) Lee, S. M.; Koh, H.-J.; Park, D.-C.; Song, B. J.; Huh, T.-L.; Park, J.-W. Cytosolic NADP(+)-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Status Modulates Oxidative Damage to Cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32* (11), 1185–1196.

(45) Lieber, M. R. The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (1), 1–5. https://doi.org/10.1074/jbc.R700039200.

(46) Koptyra, M.; Cramer, K.; Slupianek, A.; Richardson, C.; Skorski, T. BCR/ABL Promotes Accumulation of Chromosomal Aberrations Induced by Oxidative and Genotoxic Stress. *Leukemia* **2008**, *22* (10). https://doi.org/10.1038/leu.2008.78.

(47) Shi, J.; Sun, B.; Shi, W.; Zuo, H.; Cui, D.; Ni, L.; Chen, J. Decreasing GSH and Increasing ROS in Chemosensitivity Gliomas with IDH1 Mutation. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2015**, *36* (2), 655–662. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2644-z.

(48) Weller, M.; van den Bent, M.; Hopkins, K.; Tonn, J. C.; Stupp, R.; Falini, A.; Cohen-Jonathan-Moyal, E.; Frappaz, D.; Henriksson, R.; Balana, C.; Chinot, O.; Ram, Z.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; Wick, W. EANO Guideline for the Diagnosis and Treatment of Anaplastic Gliomas and Glioblastoma. *Lancet Oncol.* **2014**, *15* (9), e395–e403. https://doi.org/info:doi/10.1016/S1470-2045(14)70011-7.

(49) Chen, J.; Li, Y.; Yu, T.-S.; McKay, R. M.; Burns, D. K.; Kernie, S. G.; Parada, L. F. A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth after Chemotherapy. *Nature* **2012**, *488* (7412), 522–526. https://doi.org/10.1038/nature11287.

(50) Pardridge, W. M. Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32* (11), 1959–1972. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126.

(51) Bleau, A.-M.; Hambardzumyan, D.; Ozawa, T.; Fomchenko, E. I.; Huse, J. T.; Brennan, C. W.; Holland, E. C. PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* **2009**, *4* (3), 226–235. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007.

(52) Ahmed, A. U.; Auffinger, B.; Lesniak, M. S. Understanding Glioma Stem Cells: Rationale, Clinical Relevance and Therapeutic Strategies. *Expert Rev. Neurother.* **2013**, *13* (5), 545–555. https://doi.org/10.1586/ern.13.42.

(53) Auffinger, B.; Spencer, D.; Pytel, P.; Ahmed, A. U.; Lesniak, M. S. The Role of Glioma Stem Cells in Chemotherapy Resistance and Glioblastoma Multiforme Recurrence. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, *15* (7), 741–752. https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1051968.

(54) BEHAB, a New Member of the Proteoglycan Tandem Repeat Family of Hyaluronan-Binding Proteins That Is Restricted to the Brain [Published Erratum Appears in J Cell Biol 1997 Apr 21;137(2):521]. *J. Cell Biol.* **1994**, *125* (2), 495–509.

(55) Ruoslahti, E. Brain Extracellular Matrix. *Glycobiology* **1996**, *6* (5), 489–492.

(56) Yamaguchi, Y. Lecticans: Organizers of the Brain Extracellular Matrix. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2000**, *57* (2), 276–289. https://doi.org/10.1007/PL00000690.

(57) Carulli, D.; Rhodes, K. E.; Brown, D. J.; Bonnert, T. P.; Pollack, S. J.; Oliver, K.; Strata, P.; Fawcett, J. W. Composition of Perineuronal Nets in the Adult Rat Cerebellum and the Cellular Origin of Their Components. *J. Comp. Neurol.* **2006**, *494* (4), 559–577. https://doi.org/10.1002/cne.20822.

(58) Frischknecht, R.; Heine, M.; Perrais, D.; Seidenbecher, C. I.; Choquet, D.; Gundelfinger, E. D. Brain Extracellular Matrix Affects AMPA Receptor Lateral Mobility and Short-Term Synaptic Plasticity. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12* (7), 897–904. https://doi.org/10.1038/nn.2338.

(59) Jaworski, D. M.; Kelly, G. M.; Piepmeier, J. M.; Hockfield, S. BEHAB (Brain Enriched Hyaluronan Binding) Is Expressed in Surgical Samples of Glioma and in Intracranial Grafts of Invasive Glioma Cell Lines. *Cancer Res.* **1996**, *56* (10), 2293–2298.

(60) Zhang, H.; Kelly, G.; Zerillo, C.; Jaworski, D. M.; Hockfield, S. Expression of a Cleaved Brain-Specific Extracellular Matrix Protein Mediates Glioma Cell Invasion In Vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **1998**, *18* (7), 2370–2376.

(61) Nutt, C. L.; Zerillo, C. A.; Kelly, G. M.; Hockfield, S. Brain Enriched Hyaluronan Binding (BEHAB)/Brevican Increases Aggressiveness of CNS-1 Gliomas in Lewis Rats. *Cancer Res.* **2001**, *61* (19), 7056–7059.

(62) Dwyer, C. A.; Bi, W. L.; Viapiano, M. S.; Matthews, R. T. Brevican Knockdown Reduces Late-Stage Glioma Tumor Aggressiveness. *J. Neurooncol.* **2014**, *120* (1), 63–72. https://doi.org/10.1007/s11060-014-1541-z.

(63) Viapiano, M. S.; Hockfield, S.; Matthews, R. T. BEHAB/Brevican Requires ADAMTS-Mediated Proteolytic Cleavage to Promote Glioma Invasion. *J. Neurooncol.* **2008**, *88* (3), 261–272. https://doi.org/10.1007/s11060-008-9575-8.

(64) Nakada, M.; Miyamori, H.; Kita, D.; Takahashi, T.; Yamashita, J.; Sato, H.; Miura, R.; Yamaguchi, Y.; Okada, Y. Human Glioblastomas Overexpress ADAMTS-5 That Degrades Brevican. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2005**, *110* (3), 239–246. https://doi.org/10.1007/s00401-005-1032-6.

(65) Hamel, M. G.; Mayer, J.; Gottschall, P. E. Altered Production and Proteolytic Processing of Brevican by Transforming Growth Factor β in Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.* **2005**, *93* (6), 1533–1541. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03144.x.

(66) Appelbe, O. K.; Bollman, B.; Attarwala, A.; Triebes, L. A.; Muniz-Talavera, H.; Curry, D. J.; Schmidt, J. V. Disruption of the Mouse Jhy Gene Causes Abnormal Ciliary Microtubule Patterning and Juvenile Hydrocephalus. *Dev. Biol.* **2013**, *382* (1), 172–185. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.07.003.

(67) Muniz-Talavera, H.; Schmidt, J. V. The Mouse Jhy Gene Regulates Ependymal Cell Differentiation and Ciliogenesis. *PLoS ONE* **2017**, *12* (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184957.

(68) Ivliev, A. E.; Hoen, P. A. C. 't; Roon-Mom, W. M. C. van; Peters, D. J. M.; Sergeeva, M. G. Exploring the Transcriptome of Ciliated Cells Using In Silico Dissection of Human Tissues. *PLOS ONE* **2012**, *7* (4), e35618. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035618.

(69) Micheau, O.; Thome, M.; Schneider, P.; Holler, N.; Tschopp, J.; Nicholson, D. W.; Briand, C.; Grütter, M. G. The Long Form of FLIP Is an Activator of Caspase-8 at the Fas Death-Inducing Signaling Complex. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (47), 45162–45171. https://doi.org/10.1074/jbc.M206882200.

(70) Micheau, O. Cellular FLICE-Inhibitory Protein: An Attractive Therapeutic Target? *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, *7* (4), 559–573. https://doi.org/10.1517/14728222.7.4.559.

(71) MacFarlane, M.; Harper, N.; Snowden, R. T.; Dyer, M. J. S.; Barnett, G. A.; Pringle, J. H.; Cohen, G. M. Mechanisms of Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis in Primary B Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Oncogene* **2002**, *21* (44), 6809–6818. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205853.

(72) Korkolopoulou, P.; Goudopoulou, A.; Voutsinas, G.; Thomas-Tsagli, E.; Kapralos,

P.; Patsouris, E.; Saetta, A. A. C-FLIP Expression in Bladder Urothelial Carcinomas: Its Role in Resistance to Fas-Mediated Apoptosis and Clinicopathologic Correlations. *Urology* **2004**, *63* (6), 1198–1204. https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.01.007.

(73) Salon, C.; Eymin, B.; Micheau, O.; Chaperot, L.; Plumas, J.; Brambilla, C.; Brambilla, E.; Gazzeri, S. E2F1 Induces Apoptosis and Sensitizes Human Lung Adenocarcinoma Cells to Death-Receptor-Mediated Apoptosis through Specific Downregulation of c-FLIP(Short). *Cell Death Differ.* **2006**, *13* (2), 260–272. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401739.

(74) Bullani, R. R.; Huard, B.; Viard-Leveugle, I.; Byers, H. R.; Irmler, M.; Saurat, J. H.; Tschopp, J.; French, L. E. Selective Expression of FLIP in Malignant Melanocytic Skin Lesions. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117* (2), 360–364. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01418.x.

(75) Hao, C.; Beguinot, F.; Condorelli, G.; Trencia, A.; Van Meir, E. G.; Yong, V. W.; Parney, I. F.; Roa, W. H.; Petruk, K. C. Induction and Intracellular Regulation of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Mediated Apotosis in Human Malignant Glioma Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61* (3), 1162–1170.

(76) Grotzer, M. A.; Eggert, A.; Zuzak, T. J.; Janss, A. J.; Marwaha, S.; Wiewrodt, B. R.; Ikegaki, N.; Brodeur, G. M.; Phillips, P. C. Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis in Primitive Neuroectodermal Brain Tumor Cells Correlates with a Loss of Caspase-8 Expression. *Oncogene* **2000**, *19* (40), 4604–4610. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203816.

(77) Koschny, R.; Holland, H.; Sykora, J.; Haas, T. L.; Sprick, M. R.; Ganten, T. M.; Krupp, W.; Bauer, M.; Ahnert, P.; Meixensberger, J.; Walczak, H. Bortezomib Sensitizes Primary Human Astrocytoma Cells of WHO Grades I to IV for Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2007**, *13* (11), 3403–3412. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0251.

(78) Koul, D.; Takada, Y.; Shen, R.; Aggarwal, B. B.; Yung, W. K. A. PTEN Enhances TNF-Induced Apoptosis through Modulation of Nuclear Factor-KappaB Signaling Pathway in Human Glioma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *350* (2), 463–471. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.077.

(79) Bangert, A.; Cristofanon, S.; Eckhardt, I.; Abhari, B. A.; Kolodziej, S.; Häcker, S.; Vellanki, S. H. K.; Lausen, J.; Debatin, K.-M.; Fulda, S. Histone Deacetylase Inhibitors Sensitize Glioblastoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by c-Myc-Mediated Downregulation of CFLIP. *Oncogene* **2012**, *31* (44), 4677–4688. https://doi.org/10.1038/onc.2011.614.

(80) Luka, Z.; Mudd, S. H.; Wagner, C. Glycine N-Methyltransferase and Regulation of S-Adenosylmethionine Levels. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (34), 22507–22511. https://doi.org/10.1074/jbc.R109.019273.

(81) Yang, C.-P.; Wang, H.-A.; Tsai, T.-H.; Fan, A.; Hsu, C.-L.; Chen, C.-J.; Hong, C.-J.; Chen, Y.-M. A. Characterization of the Neuropsychological Phenotype of Glycine N-Methyltransferase-/- Mice and Evaluation of Its Responses to Clozapine and Sarcosine Treatments. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2012**, *22* (8), 596–606. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.12.007.

(82) Martínez-Chantar, M. L.; Vázquez-Chantada, M.; Ariz, U.; Martínez, N.; Varela, M.; Luka, Z.; Capdevila, A.; Rodríguez, J.; Aransay, A. M.; Matthiesen, R.; Yang, H.; Calvisi, D. F.; Esteller, M.; Fraga, M.; Lu, S. C.; Wagner, C.; Mato, J. M. Loss of the

Glycine N-Methyltransferase Gene Leads to Steatosis and Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Hepatol. Baltim. Md* **2008**, *47* (4), 1191–1199. https://doi.org/10.1002/hep.22159.

(83) Liao, Y.-J.; Liu, S.-P.; Lee, C.-M.; Yen, C.-H.; Chuang, P.-C.; Chen, C.-Y.; Tsai, T.-F.; Huang, S.-F.; Lee, Y.-H. W.; Chen, Y.-M. A. Characterization of a Glycine N-Methyltransferase Gene Knockout Mouse Model for Hepatocellular Carcinoma: Implications of the Gender Disparity in Liver Cancer Susceptibility. *Int. J. Cancer* **2009**, *124* (4), 816–826. https://doi.org/10.1002/ijc.23979.

(84) Sreekumar, A.; Poisson, L. M.; Rajendiran, T. M.; Khan, A. P.; Cao, Q.; Yu, J.; Laxman, B.; Mehra, R.; Lonigro, R. J.; Li, Y.; Nyati, M. K.; Ahsan, A.; Kalyana-Sundaram, S.; Han, B.; Cao, X.; Byun, J.; Omenn, G. S.; Ghosh, D.; Pennathur, S.; Alexander, D. C.; Berger, A.; Shuster, J. R.; Wei, J. T.; Varambally, S.; Beecher, C.; Chinnaiyan, A. M. Metabolomic Profiles Delineate Potential Role for Sarcosine in Prostate Cancer Progression. *Nature* **2009**, *457* (7231), 910–914. https://doi.org/10.1038/nature07762.

(85) Gini, B.; Zanca, C.; Guo, D.; Matsutani, T.; Masui, K.; Ikegami, S.; Yang, H.; Nathanson, D.; Villa, G. R.; Shackelford, D.; Zhu, S.; Tanaka, K.; Babic, I.; Akhavan, D.; Lin, K.; Assuncao, A.; Gu, Y.; Bonetti, B.; Mortensen, D. S.; Xu, S.; Raymon, H. K.; Cavenee, W. K.; Furnari, F. B.; James, C. D.; Kroemer, G.; Heath, J. R.; Hege, K.; Chopra, R.; Cloughesy, T. F.; Mischel, P. S. The MTOR Kinase Inhibitors, CC214-1 and CC214-2, Preferentially Block the Growth of EGFRvIII-Activated Glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (20), 5722–5732. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0527.

(86) Duzgun, Z.; Eroglu, Z.; Biray Avci, C. Role of MTOR in Glioblastoma. *Gene* **2016**, *575* (2, Part 1), 187–190. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.060.

(87) Caputi, M.; Zahler, A. M. Determination of the RNA Binding Specificity of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (HnRNP) H/H'/F/2H9 Family. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (47), 43850–43859. https://doi.org/10.1074/jbc.M102861200.

(88) Wang, E.; Aslanzadeh, V.; Papa, F.; Zhu, H.; de la Grange, P.; Cambi, F. Global Profiling of Alternative Splicing Events and Gene Expression Regulated by HnRNPH/F. *PLoS ONE* **2012**, *7* (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051266.

(89) Balasubramani, M.; Day, B. W.; Schoen, R. E.; Getzenberg, R. H. Altered Expression and Localization of Creatine Kinase B, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein F, and High Mobility Group Box 1 Protein in the Nuclear Matrix Associated with Colon Cancer. *Cancer Res.* **2006**, *66* (2), 763–769. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3771.

(90) Honoré, B.; Baandrup, U.; Vorum, H. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins F and H/H′ Show Differential Expression in Normal and Selected Cancer Tissues. *Exp. Cell Res.* **2004**, *294* (1), 199–209. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.011.

(91) Karin, M.; Ben-Neriah, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-[Kappa]B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 621–663. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621.

(92) Gilmore, T. D. Introduction to NF-*κ*B: Players, Pathways, Perspectives. *Oncogene* **2006**, *25* (51), 6680–6684. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954.

(93) Motoyama, M.; Yamazaki, S.; Eto-Kimura, A.; Takeshige, K.; Muta, T. Positive and Negative Regulation of Nuclear Factor-KappaB-Mediated Transcription by IkappaB-Zeta, an Inducible Nuclear Protein. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (9), 7444–7451.

https://doi.org/10.1074/jbc.M412738200.

(94) Yamamoto, M.; Yamazaki, S.; Uematsu, S.; Sato, S.; Hemmi, H.; Hoshino, K.; Kaisho, T.; Kuwata, H.; Takeuchi, O.; Takeshige, K.; Saitoh, T.; Yamaoka, S.; Yamamoto, N.; Yamamoto, S.; Muta, T.; Takeda, K.; Akira, S. Regulation of Toll/IL-1-Receptor-Mediated Gene Expression by the Inducible Nuclear Protein IkappaBzeta. *Nature* **2004**, *430* (6996), 218–222. https://doi.org/10.1038/nature02738.

(95) Huang, Y.-T.; Hsu, T.; Kelsey, K. T.; Lin, C.-L. Integrative Analysis of MicroRNA, Gene Expression and Survival of Glioblastoma Multiforme. *Genet. Epidemiol.* **2015**, *39* (2), 134–143. https://doi.org/10.1002/gepi.21875.

(96) Brennenstuhl, H.; Armento, A.; Braczysnki, A. K.; Mittelbronn, M.; Naumann, U. IκBζ, an Atypical Member of the Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Family, Is Induced by γ-Irradiation in Glioma Cells, Regulating Cytokine Secretion and Associated with Poor Prognosis. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47* (5), 1971–1980.

(97) Shi, Y.; Chichung Lie, D.; Taupin, P.; Nakashima, K.; Ray, J.; Yu, R. T.; Gage, F. H.; Evans, R. M. Expression and Function of Orphan Nuclear Receptor TLX in Adult Neural Stem Cells. *Nature* **2004**, *427* (6969), 78–83. https://doi.org/10.1038/nature02211.

(98) Land, P. W.; Monaghan, A. P. Abnormal Development of Zinc-Containing Cortical Circuits in the Absence of the Transcription Factor Tailless. *Dev. Brain Res.* **2005**, *158* (1), 97–101. https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.04.006.

(99) Zhao, C.; Sun, G.; Ye, P.; Li, S.; Shi, Y. MicroRNA Let-7d Regulates the TLX/MicroRNA-9 Cascade to Control Neural Cell Fate and Neurogenesis. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1329. https://doi.org/10.1038/srep01329.

(100) Liu, H.-K.; Wang, Y.; Belz, T.; Bock, D.; Takacs, A.; Radlwimmer, B.; Barbus, S.; Reifenberger, G.; Lichter, P.; Schütz, G. The Nuclear Receptor Tailless Induces Long-Term Neural Stem Cell Expansion and Brain Tumor Initiation. *Genes Dev.* **2010**, *24* (7), 683–695. https://doi.org/10.1101/gad.560310.

(101) Zhu, Z.; Khan, M. A.; Weiler, M.; Blaes, J.; Jestaedt, L.; Geibert, M.; Zou, P.; Gronych, J.; Bernhardt, O.; Korshunov, A.; Bugner, V.; Lichter, P.; Radlwimmer, B.; Heiland, S.; Bendszus, M.; Wick, W.; Liu, H.-K. Targeting Self-Renewal in High-Grade Brain Tumors Leads to Loss of Brain Tumor Stem Cells and Prolonged Survival. *Cell Stem Cell* **2014**, *15* (2), 185–198. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.04.007.

(102) Shimozaki, K.; Zhang, C.-L.; Suh, H.; Denli, A. M.; Evans, R. M.; Gage, F. H. SRY-Box-Containing Gene 2 Regulation of Nuclear Receptor Tailless (Tlx) Transcription in Adult Neural Stem Cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (8), 5969–5978. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290403.

(103) Niu, W.; Zou, Y.; Shen, C.; Zhang, C.-L. Activation of Postnatal Neural Stem Cells Requires Nuclear Receptor TLX. *J. Neurosci.* **2011**, *31* (39), 13816–13828. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1038-11.2011.

(104) Maxwell, M. A.; Muscat, G. E. O. The NR4A Subgroup: Immediate Early Response Genes with Pleiotropic Physiological Roles. *Nucl. Recept. Signal.* **2006**, *4*. https://doi.org/10.1621/nrs.04002.

(105) Chen, H.-Z.; Li, L.; Wang, W.-J.; Du, X.-D.; Wen, Q.; He, J.-P.; Zhao, B.-X.; Li, G.-D.; Zhou, W.; Xia, Y.; Yang, Q.-Y.; Hew, C.-L.; Liou, Y.-C.; Wu, Q. Prolyl Isomerase Pin1 Stabilizes and Activates Orphan Nuclear Receptor TR3 to Promote Mitogenesis. *Oncogene* **2012**, *31* (23), 2876–2887. https://doi.org/10.1038/onc.2011.463.

(106) Lee, S.-O.; Jin, U.-H.; Kang, J. H.; Kim, S. B.; Guthrie, A. S.; Sreevalsan, S.; Lee, J.-S.; Safe, S. The Orphan Nuclear Receptor NR4A1 (Nur77) Regulates Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **2014**, *12* (4), 527–538. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0567.

(107) Mullican, S. E.; Zhang, S.; Konopleva, M.; Ruvolo, V.; Andreeff, M.; Milbrandt, J.; Conneely, O. M. Abrogation of Nuclear Receptors Nr4a3 and Nr4a1 Leads to Development of Acute Myeloid Leukemia. *Nat. Med.* **2007**, *13* (6), 730–735. https://doi.org/10.1038/nm1579.

(108) Boudreaux, S. P.; Ramirez-Herrick, A. M.; Duren, R. P.; Conneely, O. M. Genome-Wide Profiling Reveals Transcriptional Repression of MYC as a Core Component of NR4A Tumor Suppression in Acute Myeloid Leukemia. *Oncogenesis* **2012**, *1*, e19. https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.19.

(109) Bray, S. J. Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7* (9), 678–689. https://doi.org/10.1038/nrm2009.

(110) Gaiano, N.; Fishell, G. The Role of Notch in Promoting Glial and Neural Stem Cell Fates. *Annu. Rev. Neurosci.* **2002**, *25* (1), 471–490. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.030702.130823.

(111) High, F. A.; Lu, M. M.; Pear, W. S.; Loomes, K. M.; Kaestner, K. H.; Epstein, J. A. Endothelial Expression of the Notch Ligand Jagged1 Is Required for Vascular Smooth Muscle Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (6), 1955–1959. https://doi.org/10.1073/pnas.0709663105.

(112) Krantz, I. D.; Colliton, R. P.; Genin, A.; Rand, E. B.; Li, L.; Piccoli, D. A.; Spinner, N. B. Spectrum and Frequency of Jagged1 (JAG1) Mutations in Alagille Syndrome Patients and Their Families. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *62* (6), 1361–1369. https://doi.org/10.1086/301875.

(113) Benedito, R.; Roca, C.; Sörensen, I.; Adams, S.; Gossler, A.; Fruttiger, M.; Adams, R. H. The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell* **2009**, *137* (6), 1124–1135. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.025.

(114) Lu, J.; Ye, X.; Fan, F.; Xia, L.; Bhattacharya, R.; Bellister, S.; Tozzi, F.; Sceusi, E.; Zhou, Y.; Tachibana, I.; Maru, D. M.; Hawke, D. H.; Rak, J.; Mani, S. A.; Zweidler-McKay, P.; Ellis, L. M. Endothelial Cells Promote the Colorectal Cancer Stem Cell Phenotype through a Soluble Form of Jagged-1. *Cancer Cell* **2013**, *23* (2), 171–185. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.021.

(115) Jeon, H.-M.; Kim, S.-H.; Jin, X.; Park, J. B.; Kim, S. H.; Joshi, K.; Nakano, I.; Kim, H. Crosstalk between Glioma-Initiating Cells and Endothelial Cells Drives Tumor Progression. *Cancer Res.* **2014**, *74* (16), 4482–4492. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1597.

(116) Reedijk, M.; Odorcic, S.; Chang, L.; Zhang, H.; Miller, N.; McCready, D. R.; Lockwood, G.; Egan, S. E. High-Level Coexpression of JAG1 and NOTCH1 Is Observed in Human Breast Cancer and Is Associated with Poor Overall Survival. *Cancer Res.* **2005**, *65* (18), 8530–8537. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1069.

(117) Zavadil, J.; Cermak, L.; Soto-Nieves, N.; Böttinger, E. P. Integration of TGF-Beta/Smad and Jagged1/Notch Signalling in Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *EMBO J.* **2004**, *23* (5), 1155–1165. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600069.

(118) Rodilla, V.; Villanueva, A.; Obrador-Hevia, A.; Robert-Moreno, A.; Fernández-

Majada, V.; Grilli, A.; López-Bigas, N.; Bellora, N.; Albà, M. M.; Torres, F.; Duñach, M.; Sanjuan, X.; Gonzalez, S.; Gridley, T.; Capella, G.; Bigas, A.; Espinosa, L. Jagged1 Is the Pathological Link between Wnt and Notch Pathways in Colorectal Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (15), 6315–6320. https://doi.org/10.1073/pnas.0813221106.

(119) Vannahme, C.; Smyth, N.; Miosge, N.; Gösling, S.; Frie, C.; Paulsson, M.; Maurer, P.; Hartmann, U. Characterization of SMOC-1, a Novel Modular Calcium-Binding Protein in Basement Membranes. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (41), 37977–37986. https://doi.org/10.1074/jbc.M203830200.

(120) Choi, Y.-A.; Lim, J.; Kim, K. M.; Acharya, B.; Cho, J.-Y.; Bae, Y.-C.; Shin, H.-I.; Kim, S.-Y.; Park, E. K. Secretome Analysis of Human BMSCs and Identification of SMOC1 as an Important ECM Protein in Osteoblast Differentiation. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (6), 2946–2956. https://doi.org/10.1021/pr901110q.

(121) Okada, I.; Hamanoue, H.; Terada, K.; Tohma, T.; Megarbane, A.; Chouery, E.; Abou-Ghoch, J.; Jalkh, N.; Cogulu, O.; Ozkinay, F.; Horie, K.; Takeda, J.; Furuichi, T.; Ikegawa, S.; Nishiyama, K.; Miyatake, S.; Nishimura, A.; Mizuguchi, T.; Niikawa, N.; Hirahara, F.; Kaname, T.; Yoshiura, K.; Tsurusaki, Y.; Doi, H.; Miyake, N.; Furukawa, T.; Matsumoto, N.; Saitsu, H. SMOC1 Is Essential for Ocular and Limb Development in Humans and Mice. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88* (1), 30–41. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.012.

(122) Abouzeid, H.; Boisset, G.; Favez, T.; Youssef, M.; Marzouk, I.; Shakankiry, N.; Bayoumi, N.; Descombes, P.; Agosti, C.; Munier, F. L.; Schorderet, D. F. Mutations in the SPARC-Related Modular Calcium-Binding Protein 1 Gene, SMOC1, Cause Waardenburg Anophthalmia Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88* (1), 92–98. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.12.002.

(123) Rainger, J.; van Beusekom, E.; Ramsay, J. K.; McKie, L.; Al-Gazali, L.; Pallotta, R.; Saponari, A.; Branney, P.; Fisher, M.; Morrison, H.; Bicknell, L.; Gautier, P.; Perry, P.; Sokhi, K.; Sexton, D.; Bardakjian, T. M.; Schneider, A. S.; Elcioglu, N.; Ozkinay, F.; Koenig, R.; Mégarbané, A.; Semerci, C. N.; Khan, A.; Zafar, S.; Hennekam, R.; Sousa, S. B.; Ramos, L.; Garavelli, L.; Furga, A. S.; Wischmeijer, A.; Jackson, I. J.; Gillessen-Kaesbach, G.; Brunner, H. G.; Wieczorek, D.; van Bokhoven, H.; FitzPatrick, D. R. Loss of the BMP Antagonist, SMOC-1, Causes Ophthalmo-Acromelic (Waardenburg Anophthalmia) Syndrome in Humans and Mice. *PLoS Genet.* **2011**, *7* (7). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002114.

(124) Awwad, K.; Hu, J.; Shi, L.; Mangels, N.; Abdel Malik, R.; Zippel, N.; Fisslthaler, B.; Eble, J. A.; Pfeilschifter, J.; Popp, R.; Fleming, I. Role of Secreted Modular Calcium-Binding Protein 1 (SMOC1) in Transforming Growth Factor β Signalling and Angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *106* (2), 284–294. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv098.

(125) Boon, K.; Edwards, J. B.; Eberhart, C. G.; Riggins, G. J. Identification of Astrocytoma Associated Genes Including Cell Surface Markers. *BMC Cancer* **2004**, *4*, 39. https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-39.

(126) Brellier, F.; Ruggiero, S.; Zwolanek, D.; Martina, E.; Hess, D.; Brown-Luedi, M.; Hartmann, U.; Koch, M.; Merlo, A.; Lino, M.; Chiquet-Ehrismann, R. SMOC1 Is a Tenascin-C Interacting Protein over-Expressed in Brain Tumors. *Matrix Biol.* **2011**, *30* (3), 225–233. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.02.001.

(127) Aoki, H.; Yamamoto, E.; Takasawa, A.; Niinuma, T.; Yamano, H.-O.; Harada, T.;

Matsushita, H.-O.; Yoshikawa, K.; Takagi, R.; Harada, E.; Tanaka, Y.; Yoshida, Y.; Aoyama, T.; Eizuka, M.; Yorozu, A.; Kitajima, H.; Kai, M.; Sawada, N.; Sugai, T.; Nakase, H.; Suzuki, H. Epigenetic Silencing of SMOC1 in Traditional Serrated Adenoma and Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2017**, *9* (4), 4707–4721. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23523.

(128) Zhang, L.; Qi, M.; Feng, T.; Hu, J.; Wang, L.; Li, X.; Gao, W.; Liu, H.; Jiao, M.; Wu, Z.; Bai, X.; Bie, Y.; Liu, L.; Han, B. IDH1R132H Promotes Malignant Transformation of Benign Prostatic Epithelium by Dysregulating MicroRNAs: Involvement of IGF1R-AKT/STAT3 Signaling Pathway. *Neoplasia N. Y. N* **2018**, *20* (2), 207–217. https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.12.001.

(129) Zhang, G.-H.; Zhong, Q.-Y.; Gou, X.-X.; Fan, E.-X.; Shuai, Y.; Wu, M.-N.; Yue, G.-J. Seven Genes for the Prognostic Prediction in Patients with Glioma. *Clin. Transl. Oncol.* **2019**. https://doi.org/10.1007/s12094-019-02057-3.

(130) Vannahme, C.; Gösling, S.; Paulsson, M.; Maurer, P.; Hartmann, U. Characterization of SMOC-2, a Modular Extracellular Calcium-Binding Protein. *Biochem. J.* **2003**, *373* (Pt 3), 805–814. https://doi.org/10.1042/BJ20030532.

(131) Shvab, A.; Haase, G.; Ben-Shmuel, A.; Gavert, N.; Brabletz, T.; Dedhar, S.; Ben-Ze'ev, A. Induction of the Intestinal Stem Cell Signature Gene SMOC-2 Is Required for L1-Mediated Colon Cancer Progression. *Oncogene* **2016**, *35* (5), 549–557. https://doi.org/10.1038/onc.2015.127.

(132) Su, J.-R.; Kuai, J.-H.; Li, Y.-Q. Smoc2 Potentiates Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells via Promotion of Cell Cycle Progression. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22* (45), 10053–10063. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i45.10053.

(133) Kim, H. S.; Choi, J. H.; Lee, J. Y.; Kang, J.; Myung, J. K.; Kim, W. H.; Jang, B. G. Downregulation of SMOC2 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma and Its Prognostic Significance. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61828-z.

(134) Vincent, A.; Omura, N.; Hong, S.-M.; Jaffe, A.; Eshleman, J.; Goggins, M. Genome-Wide Analysis of Promoter Methylation Associated with Gene Expression Profile in Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *17* (13), 4341–4354. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3431.

(135) Huang, X.-Q.; Zhou, Z.-Q.; Zhang, X.-F.; Chen, C.-L.; Tang, Y.; Zhu, Q.; Zhang, J.-H.; Xia, J.-C. Overexpression of SMOC2 Attenuates the Tumorigenicity of Hepatocellular Carcinoma Cells and Is Associated With a Positive Postoperative Prognosis in Human Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* **2017**, *8* (18), 3812–3827. https://doi.org/10.7150/jca.20775.

(136) Bartholin, L.; Melhuish, T. A.; Powers, S. E.; Goddard-Léon, S.; Treilleux, I.; Sutherland, A. E.; Wotton, D. Maternal Tgif Is Required for Vascularization of the Embryonic Placenta. *Dev. Biol.* **2008**, *319* (2), 285–297. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.027.

(137) El-Jaick, K. B.; Powers, S. E.; Bartholin, L.; Myers, K. R.; Hahn, J.; Orioli, I. M.; Ouspenskaia, M.; Lacbawan, F.; Roessler, E.; Wotton, D.; Muenke, M. Functional Analysis of Mutations in TGIF Associated with Holoprosencephaly. *Mol. Genet. Metab.* **2007**, *90* (1), 97–111. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.07.011.

(138) Hamid, R.; Patterson, J.; Brandt, S. J. Genomic Structure, Alternative Splicing and Expression of TG-Interacting Factor, in Human Myeloid Leukemia Blasts and Cell Lines.

Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech. **2008**, *1779* (5), 347–355. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2008.04.003.

(139) King, T. D.; Suto, M. J.; Li, Y. The Wnt/β-Catenin Signaling Pathway: A Potential Therapeutic Target in the Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2012**, *113* (1), 13–18. https://doi.org/10.1002/jcb.23350.

(140) Wang, Y.; Wang, H.; Gao, H.; Xu, B.; Zhai, W.; Li, J.; Zhang, C. Elevated Expression of TGIF Is Involved in Lung Carcinogenesis. *Tumor Biol.* **2015**, *36* (12), 9223–9231. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3615-8.

(141) Watanabe, T.; Nobusawa, S.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174* (4), 1149–1153. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080958.

(142) Staurosporine from <I>Streptomyces</I> sp. S4400 https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s4400 (accessed Sep 24, 2018).

(143) Bird, A. DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes Dev.* **2002**, *16* (1), 6–21. https://doi.org/10.1101/gad.947102.

(144) Mohn, F.; Weber, M.; Rebhan, M.; Roloff, T. C.; Richter, J.; Stadler, M. B.; Bibel, M.; Schübeler, D. Lineage-Specific Polycomb Targets and de Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. *Mol. Cell* **2008**, *30* (6), 755–766. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007.

(145) Souza, C. F. de; Sabedot, T. S.; Malta, T. M.; Stetson, L.; Morozova, O.; Sokolov, A.; Laird, P. W.; Wiznerowicz, M.; Iavarone, A.; Snyder, J.; deCarvalho, A.; Sanborn, Z.; McDonald, K. L.; Friedman, W. A.; Tirapelli, D.; Poisson, L.; Mikkelsen, T.; Carlotti, C. G.; Kalkanis, S.; Zenklusen, J.; Salama, S. R.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Noushmehr, H. A Distinct DNA Methylation Shift in a Subset of Glioma CpG Island Methylator Phenotypes during Tumor Recurrence. *Cell Rep.* **2018**, *23* (2), 637–651. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.107.

(146) Schmierer, B.; Hill, C. S. TGFβ–SMAD Signal Transduction: Molecular Specificity and Functional Flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (12), 970–982. https://doi.org/10.1038/nrm2297.

(147) Wakefield, L. M.; Hill, C. S. Beyond TGFβ: Roles of Other TGFβ Superfamily Members in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (5), 328–341. https://doi.org/10.1038/nrc3500.

(148) Zhang, Y. E. Non-Smad Pathways in TGF-β Signaling. *Cell Res.* **2009**, *19* (1), 128–139. https://doi.org/10.1038/cr.2008.328.

(149) Moustakas, A.; Heldin, C.-H. The Regulation of TGFβ Signal Transduction. *Development* **2009**, *136* (22), 3699–3714. https://doi.org/10.1242/dev.030338.

(150) Pickup, M.; Novitskiy, S.; Moses, H. L. The Roles of TGFβ in the Tumour Microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (11), 788–799. https://doi.org/10.1038/nrc3603.

(151) Akhurst, R. J.; Hata, A. Targeting the TGFβ Signalling Pathway in Disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (10), 790–811. https://doi.org/10.1038/nrd3810.

(152) BioRender https://app.biorender.com/, https://app.biorender.com/ (accessed Jan 13, 2020).

(153) Rodón, L.; Gonzàlez-Juncà, A.; Inda, M. del M.; Sala-Hojman, A.; Martínez-Sáez,

E.; Seoane, J. Active CREB1 Promotes a Malignant TGFβ2 Autocrine Loop in Glioblastoma. *Cancer Discov.* **2014**, *4* (10), 1230–1241. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0275.

(154) Rich, J. N.; Zhang, M.; Datto, M. B.; Bigner, D. D.; Wang, X.-F. Transforming Growth Factor-β-Mediated P15INK4BInduction and Growth Inhibition in Astrocytes Is SMAD3-Dependent and a Pathway Prominently Altered in Human Glioma Cell Lines. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (49), 35053–35058. https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.35053.

(155) Ikushima, H.; Todo, T.; Ino, Y.; Takahashi, M.; Miyazawa, K.; Miyazono, K. Autocrine TGF-β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. *Cell Stem Cell* **2009**, *5* (5), 504–514. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.08.018.

(156) Bruna, A.; Darken, R. S.; Rojo, F.; Ocaña, A.; Peñuelas, S.; Arias, A.; Paris, R.; Tortosa, A.; Mora, J.; Baselga, J.; Seoane, J. High TGFbeta-Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene. *Cancer Cell* **2007**, *11* (2), 147–160. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.023.

(157) Zuber, P.; Kuppner, M. C.; De Tribolet, N. Transforming Growth Factor-Beta 2 down-Regulates HLA-DR Antigen Expression on Human Malignant Glioma Cells. *Eur. J. Immunol.* **1988**, *18* (10), 1623–1626. https://doi.org/10.1002/eji.1830181023.

(158) Eisele, G.; Wischhusen, J.; Mittelbronn, M.; Meyermann, R.; Waldhauer, I.; Steinle, A.; Weller, M.; Friese, M. A. TGF-Beta and Metalloproteinases Differentially Suppress NKG2D Ligand Surface Expression on Malignant Glioma Cells. *Brain J. Neurol.* **2006**, *129* (Pt 9), 2416–2425. https://doi.org/10.1093/brain/awl205.

(159) Wurdinger, T.; Deumelandt, K.; van der Vliet, H. J.; Wesseling, P.; de Gruijl, T. D. Mechanisms of Intimate and Long-Distance Cross-Talk between Glioma and Myeloid Cells: How to Break a Vicious Cycle. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2014**, *1846* (2), 560–575. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.10.003.

(160) Wick, W.; Platten, M.; Weller, M. Glioma Cell Invasion: Regulation of Metalloproteinase Activity by TGF-β. *J. Neurooncol.* **2001**, *53* (2), 177–185. https://doi.org/10.1023/A:1012209518843.

(161) Chirasani, S. R.; Sternjak, A.; Wend, P.; Momma, S.; Campos, B.; Herrmann, I. M.; Graf, D.; Mitsiadis, T.; Herold-Mende, C.; Besser, D.; Synowitz, M.; Kettenmann, H.; Glass, R. Bone Morphogenetic Protein-7 Release from Endogenous Neural Precursor Cells Suppresses the Tumourigenicity of Stem-like Glioblastoma Cells. *Brain* **2010**, *133* (7), 1961–1972. https://doi.org/10.1093/brain/awq128.

(162) BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1α stability and MGMT expression | Cell Death & Disease https://www.nature.com/articles/cddis2012153 (accessed May 5, 2019).

(163) Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J. B.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352* (10), 987–996. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330.

(164) Bao, S.; Wu, Q.; McLendon, R. E.; Hao, Y.; Shi, Q.; Hjelmeland, A. B.; Dewhirst, M. W.; Bigner, D. D.; Rich, J. N. Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature* **2006**, *444* (7120), 756–760. https://doi.org/10.1038/nature05236.

(165) Ostermann, S.; Csajka, C.; Buclin, T.; Leyvraz, S.; Lejeune, F.; Decosterd, L. A.; Stupp, R. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10* (11), 3728–3736. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0807.

(166) Wick, W.; Weller, M.; van den Bent, M.; Sanson, M.; Weiler, M.; von Deimling, A.; Plass, C.; Hegi, M.; Platten, M.; Reifenberger, G. MGMT Testing--the Challenges for Biomarker-Based Glioma Treatment. *Nat. Rev. Neurol.* **2014**, *10* (7), 372–385. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100.

(167) Patel, A. P.; Tirosh, I.; Trombetta, J. J.; Shalek, A. K.; Gillespie, S. M.; Wakimoto, H.; Cahill, D. P.; Nahed, B. V.; Curry, W. T.; Martuza, R. L.; Louis, D. N.; Rozenblatt-Rosen, O.; Suvà, M. L.; Regev, A.; Bernstein, B. E. Single-Cell RNA-Seq Highlights Intratumoral Heterogeneity in Primary Glioblastoma. *Science* **2014**, *344* (6190), 1396–1401. https://doi.org/10.1126/science.1254257.

(168) Alonso, M. M.; Gomez-Manzano, C.; Bekele, B. N.; Yung, W. K. A.; Fueyo, J. Adenovirus-Based Strategies Overcome Temozolomide Resistance by Silencing the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter. *Cancer Res.* **2007**, *67* (24), 11499–11504. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5312.

(169) Mini, E.; Nobili, S.; Caciagli, B.; Landini, I.; Mazzei, T. Cellular Pharmacology of Gemcitabine. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2006**, *17 Suppl 5*, v7-12. https://doi.org/10.1093/annonc/mdj941.

(170) Horii, A.; Saiki, Y.; Nakano, T.; Kudo, C.; Sunamura, M. Abstract 5473: Human Cancer Cells Acquire Chemoresistance to Gemcitabine Mainly through Loss-of-Function Mutations in the DCK Gene. *Cancer Res.* **2015**, *75* (15 Supplement), 5473–5473. https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-5473.

(171) Marengo, B.; Monti, P.; Miele, M.; Menichini, P.; Ottaggio, L.; Foggetti, G.; Pulliero, A.; Izzotti, A.; Speciale, A.; Garbarino, O.; Traverso, N.; Fronza, G.; Domenicotti, C. Etoposide-Resistance in a Neuroblastoma Model Cell Line Is Associated with 13q14.3 Mono-Allelic Deletion and MiRNA-15a/16-1 down-Regulation. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 13762. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32195-7.

(172) Moitra, K.; Im, K.; Limpert, K.; Borsa, A.; Sawitzke, J.; Robey, R.; Yuhki, N.; Savan, R.; Huang, D. W.; Lempicki, R. A.; Bates, S.; Dean, M. Differential Gene and MicroRNA Expression between Etoposide Resistant and Etoposide Sensitive MCF7 Breast Cancer Cell Lines. *PloS One* **2012**, *7* (9), e45268. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045268.

(173) Fu, Y.; Zheng, Y.; Li, K.; Huang, R.; Zheng, S.; An, N.; Liang, A. Mutations in Isocitrate Dehydrogenase 2 Accelerate Glioma Cell Migration via Matrix Metalloproteinase-2 and 9. *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34* (3), 441–446. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0800-8.

(174) Valkonen, M.; Haapasalo, H.; Rilla, K.; Tyynelä-Korhonen, K.; Soini, Y.; Pasonen-Seppänen, S. Elevated Expression of Hyaluronan Synthase 2 Associates with Decreased Survival in Diffusely Infiltrating Astrocytomas. *BMC Cancer* **2018**, *18* (1), 664. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4569-1.

7 Anhang

7.1. Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller	Bestellnummer
XhoI	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland	R3146S
0,2 µm Steril Syring Filter	VWR Interantional, Radnor, USA	28146-477
2-Propanol z.Synthese.	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	CP41.3
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M5655
5-Aza-2´-Deoxycytidin (AZA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A3656-5MG
70% Ethanol	VWR Interantional, Radnor, USA	1070172511
AccuPrime TaqDNA Polymerase System	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	12339016
Aceton (EMSURE®)	VWR Interantional, Radnor, USA	1.00014.1000
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	5210.2
Agarose Standard	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	3810.3
Albumin, Bovine, Fraction V	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	8076.5
AlwNI	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland	R0514S
Anti-Rabbit-Antiköper	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB100-56402SS
BamHI-HF	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland	R3136S
Benzoase® Nuclease	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E1014-25KU
BMP-2 Recombinant Human	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	PHC7141
CCNU/Lomustin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L0745000
Chromatography paper 3 mm CHR 20 x 20 cm Whatman	VWR Interantional, Radnor, USA	588-3145
Complete,Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche, Basel, Schweiz	11 836 170 001
CutSmart® Buffer	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland	B7204S
D-PBS (Dulbecco´s Phosphate buffered Saline)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	14190169
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D5879
DMEM	gibco® by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	41965-039
dNTP-Set	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland	80-85011000
DPBS	gibco® by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	14190-094
EcoRI-HF	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland	R3101S
Etoposid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E2600000
EZ DNA Methylation-Gold™ Kits	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	D5006
Fetal Bovine/Calf Serum (FBS/FCS)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	10270106
Gemcitabin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Y0000675
Geneticin (50 mg/ml)	gibco® by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	10131-027
Glycin p.A.	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	3790.5

Guanidinthiocyanat = Guanidinisothiocyanat	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	0017.2
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	2363.1
HindIII-HF	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland	R3104S
Hot Star HighFidelity Polymerase Kit (100)	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	202602
Hot Star Taq DNA Polymerase	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland	80-66010100
Hydroxyurea	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H8627
In-Fusion HD Cloning Kits	Clonetech, Kusatsu, Japan	638920
Jetquick Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne, Deutschland	420050
Jetquick PCR Purification Kit	Genomed, Löhne, Deutschland	410250
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	K1377
Lipofectamin 2000 (1mg/ml)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	11668-019
Lipofectamine 2000	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	11668019
Methanol	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	CP43.4
$MgCl_{2\ (25mM)}$	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	10005482
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	T145.3
my-Budget 1 kb DNA-Leiter	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland	85-1000-250
my-Budget 100 bp DNA-Leiter	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland	85-2000-250
N-2 Supplement	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	17502048
N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D4551-250ML
Natriumdodecylsulfat-Lösung (10 % SDS Lösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	71736-100ml
NuPage™ 4-12% Bis-Tris Gel (1,0 mm 15 Well)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	NP0323BOX
NuPage™ 4-12% Bis-Tris Gel (1,0 mm 15 Well)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	NP0323BOX
Opti-MEM I (1x) Reduced Serum Medium	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	31985047
PageRuler Prestained Protein Ladder 10 - 180 kDa	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	26616X4
PCR 10xPuffer	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	1005479
Pen/Strep (10.000 U/ml)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	15140-122
peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	12-6942-02
Phospho-Smad1 (Ser463/465)/ Smad5 (Ser463/465)/ Smad9 (Ser465/467) (D5B10) Rabbit	Cell signaling technology®, Danvers, USA	13820S
Phospho-Smad2 (Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425) (D27F4) Rabbit Antikörper	Cell signaling technology®, Danvers, USA	8828S
PhospStop Phosphatase Inhibitor Cocktail tablets	Roche, Basel, Schweiz	04 906 845 001
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	23225
pIRES2-EGFP Vector	Clonetech, Kusatsu, Japan	6029-1
PROTRAN BA 83 Nitrocellulose Transfer Membrane, 0.2 µm pore size von Schleicher & Schuell	VWR Interantional, Radnor, USA	732-4016
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	979009
PyroMark Binding Buffer	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	979006
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	979007
PyroMark Gold Q24 Reagents 5x24	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	970802

PyroMark Q24 Cartridge	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	979202
PyroMark Q24 CpG Line-1 4x24	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	970042
PyroMark Q24 Vaccum Prep Tool Filter Probes	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	56404
PyroMark Wash Buffer	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	979008
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen N.V., Hilde, Deutschland	12163
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	K1621
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	CN30.2
SMAD1 (D59D7) XP Rabbit Antikörper	Cell signaling technology®, Danvers, USA	6944S
Smad2/3 (D7G7) XP® Rabbit	Cell signaling technology®, Danvers, USA	8685S
SMOC1-Antikörper	Novus Biologicals, Littleton, USA	NBP1-86146
Streptavidin Sepharose™ High Performance	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland	71500470-EF
SYBR Green qPCR-Kit	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	11733-046
TGFB1 Recombinant Human Protein	gibco® by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	PHG9211
TOPO TA Cloning Kit with pCR2.1 TOPO	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	K4500-01
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	VWR Interantional, Radnor, USA	1.08387.2500
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	25300054
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	8952.1
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	9127.1
Universal human Reference RNA	Stratagene, San Diego, USA	740000
Uracil-DNA-Glycosylase (1 U/µl)	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA	18054-015
α-Actin Antikörper; Rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A2066

7.2. Verwendete Geräte

Verwendung	**Name**	**Hersteller**
PCR Block	T3000 Thermocycler	Biometra
RT PCR	StepOnePlus™ System	Applied Biosystems (Thermo Fischer)
Pyrosequezierer	PyroMark™ Q24	Quiagen
Photometrische Auswertung von MTT-Assays	Paradigm™ Detection Platform	Beckman Coulter®
Westernblot scannen	Odyssey® CLx	LI-COR®
DNA und RNA Quantifizierung	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	peqLab Biotechnologie GmbH
Durchflusszyto-metrie (FACS)	BD FACS Canto™ II	BD Pharmigen™, San Jose, USA

7.3. PCR-Protokolle

Gen	Oligonukleotid-Kombination	Amplicon-länge	PCR Bedingungen				Verwendung
GNMT	GNMT-F2		Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Primertest
			Hot-Start-Taq	95 °C	15 min	1	
			Denaturierung	90 °C	20 s	40	
	GNMT-R2		Annealing	56 °C	20 s	40	
			Elongation	72 °C	20 s	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
IDH1	IDH1-gen-F4bio		Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Pyro-sequenzierung
			Hot-Start-Taq-Start I	37 °C	15 min	1	
			Hot-Start-Taq-Start II	95 °C	15 min	1	
	IDH1-gen-R3		Denaturierung	95 °C	30 s	40	
			Annealing	58 °C	30 s	40	
			Elongation	72 °C	30 s	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
IDH2	IDH2-gen-Rbio		Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Pyro-sequenzierung
			Hot-Start-Taq-Start I	37 °C	15 min	1	
			Hot-Start-Taq-Start II	95 °C	15 min	1	
	IDH2-gen-F2		Denaturierung	95 °C	30 s	40	
			Annealing	58 °C	30 s	40	
			Elongation	72 °C	30 s	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Hs-F1		Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Primertest
			Hot-Start-Taq	95 °C	15 min	1	
			Denaturierung	90 °C	20 s	40	
	SMOC1-Hs-R1		Annealing	56 °C	20 s	40	
			Elongation	72 °C	20 s	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Cpg-F2-Bst	444 BP	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Sanger-sequenzierung
			Hot-Start-Taq	95 °C	15 min	1	
			Denaturierung	90 °C	1 min	40	
	SMOC1-Cpg-R3-NotI		Annealing	60 °C	30 s	40	
			Elongation	72 °C	1 min	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Cpg-F2-NotI	563 BP	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Sanger-sequenzierung
			Hot-Start-Taq	95 °C	15 min	1	
			Denaturierung	90 °C	1 min	40	
	SMOC1-Cpg-		Annealing	60 °C	30 s	40	

	R4-Bst		Elongation	72 °C	1 min	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Cpg-F3-Bst		Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Sangersequenzierung
			Hot-Start-Taq	95 °C	15 min	1	
			Denaturierung	90 °C	1 min	40	
	SMOC1-Cpg-R4-NotI		Annealing	60 °C	30 s	40	
			Elongation	72 °C	1 min	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Cpg-F2-Bst		Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Sangersequenzierung
			Hot-Start-Taq	95 °C	15 min	1	
			Denaturierung	90 °C	1 min	40	
	SMOC1-Cpg-R4-NotI		Annealing	60 °C	30 s	40	
			Elongation	72 °C	1 min	40	
			Finaler Elongationsschritt	72 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Hs-FL-F1		Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Nested PCR
			High-fidelity Hot Start Taq	94 °C	2 min	1	
			Denaturierung	94 °C	30 s	40	
	SMOC1-Hs-FL-R1		Annealing	60 °C	30 s	40	
			Elongation	68 °C	1 min	40	
			Finaler Elongationsschritt	68 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Hs-Inf-F1		Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	PCR zur anschließenden Klonierung
			High-fidelity Hot Start Taq	94 °C	2 min	1	
			Denaturierung	94 °C	30 s	40	
	SMOC1-Hs-Inf-R1		Annealing	60 °C	30 s	40	
			Elongation	68 °C	1 min	40	
			Finaler Elongationsschritt	68 °C	10 min	1	
SMOC 1	SMOC1-Hs-F1	110 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	SMOC1-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
BCAN	BCAN-Hs-F1	117 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	BCAN-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
HNRNPF	HNRNPF-Hs-F1	135 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	

	HNRNPF-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
TGIF1	TGIF1-Hs-F1	108 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	TGIF1-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
GNMT	GNMT-F2	112 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	GNMT-R2		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
NR2E1	NR2E1-F1	113 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	NR2E1-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
NR4A1	NR4A1-Hs-F2	130 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	NR4A1-Hs-R2		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
SMOC2	SMOC2-Hs-F1	125 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	SMOC2-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
NFKBIZ	Nfkbiz-Hs-F1	138 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	Nfkbiz-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
CFLAR	Cflar-Hs-F1	134 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	Cflar-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
C11orf63	C11orf63-Hs-F1	130 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR
			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	C11orf63-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	
JAG1	Jag1-Hs-F1	137 bp	Schritt	Temperatur	Dauer	Wieder-holungen	Real Time PCR

			Start	95 °C	10 min	1	
			Denaturierung	95 °C	15 s	40	
	Jag1-Hs-R1		Annealing	60 °C	1 min	40	
			Elongation	95 °C	15 s	40	

7.4. Verwendete Oligonukleotide

Gen	Oligonukleotid	Oligonukleotidsequenz	Annealing-Temperatur	Verwendung	Accession-number	Hersteller
ARF	ARF1-F1	GACCACGATCCTCTACAAGC	59,2	qPCR		Sigma Aldrich
ARF	ARF1-R3	TCCCACACAGTGAAGCTGATG	61,3			Sigma Aldrich
Cflar	Cflar-Hs-F1	GAGTGCTGATGGCAGAGATTG	60,2		NM_003879	Sigma Aldrich
Cflar	Cflar-Hs-R1	CAACTCAACCACAAGGTCCAAGAA	62,8			Sigma Aldrich
C11orf63	C11orf63-Hs-F1	GAGATGGAAGAGGAAGCAAGTG	60,1		NM_024806	Sigma Aldrich
C11orf64	C11orf63-Hs-R1	GGTCATAGCGGAGGTCTGAA	60,6			Sigma Aldrich
Nfkbiz	Nfkbiz-Hs-F1	CTGCATGTGTGTGCTGAGAAG	61,1		NM_031419	Sigma Aldrich
Nfkbiz	Nfkbiz-Hs-R1	GGCTATGACTGCACAGTGAAG	60,3			Sigma Aldrich
Hnrnpf	Hnrnpf-Hs-F1	CTGAAGGCATCCGTGGTTGT	62,3		NM_001098208	Sigma Aldrich
Hnrnpf	Hnrnpf-Hs-R1	GGCAGGCCACGGAGCTTGA	67,1			Sigma Aldrich
Jag-1	Jag1-Hs-F1	CCTGCCAGGACCTGGTTAAC	62,1		NM_000214	Sigma Aldrich
Jag-1	Jag1-Hs-R1	GCTGGCAATGAGATTCTTACAGGATT	62,9			Sigma Aldrich
BCAN	BCAN-Hs-F1	CACAGCCGCTTCAACGTCTAC	63		NM_021948	Sigma Aldrich
BCAN	BCAN-Hs-R1	CACTGTGACGATAGCCTCTAG	58,7			Sigma Aldrich
NR4A1	NR4A1-Hs-F1	GCACTGCCAAACTGGACTACTC	62,8		NM_001202234	Eurofins MWG Operon
	NR4A1-Hs-R1	CGGAGAGCAGGTCGTAGAAC	61,2			Eurofins MWG Operon
	NR4A1-Hs-F2	CTGACCAGGACCTGTTGCTG	62,2		NM_001202234	Eurofins MWG Operon
	NR4A1-Hs-R2	GCACACTGCAGCCGGTGTAG	65,7			Eurofins MWG Operon
GNMT	GNMT-F1	GAGTGTGGATGCCAGTGACA	61,7		NM_018960	Eurofins MWG Operon
	GNMT-R1	CTACGACCACATCCTCAGTAC	58,6			Eurofins MWG Operon
	GNMT-F2	GAGTCATCCAGTTGGCTTCTT	59,05		NM_018960	Eurofins MWG Operon
	GNMT-R2	GGCCTTGTTGTTCACTATCAG	58,2			Eurofins MWG Operon
NR2E1	NR2E1-F1	GCTGAAGAAGTGTTTGGAAGTC	59		NM_001286102	Eurofins MWG Operon
	NR2E1-R1	CCTTGTGTCCACGGAAGTAG	59,4			Eurofins MWG Operon
	NR2E1-F2	CTGCCAGACTTCTCTTCATGA	58,9		NM_001286102	Eurofins MWG Operon
	NR2E1-R2	CAGTTCTCTCCAAGCATCTTC	57,7			Eurofins MWG Operon
TGIF1	TGIF1-Hs-F1	GCTGTATGAGCACCGTTACAATG	61,3		NM_170695	Eurofins MWG Operon
	TGIF1-Hs-R1	GCGTTGATGAACCAGTTACAG	58,7			Eurofins MWG Operon
	TGIF2-Hs-F1	CTGTACTTGCACCGCTACAAC	60,7		NM_001199514	Eurofins MWG Operon

	TGIF2-Hs-R1	GGCATTGATGAACCAGTTACATA	58,3			Eurofins MWG Operon
SMOC1	SMOC1-Hs-F1	CTGACATGGTTCAGGCCATTAAC	61,2		NM_001034852	Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-R1	GCTGAAATACCAGTGCACTAC	58,2			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-F1	GTATTATTATTAGTTAGGTGAG	47,9	Sanger-sequenzierung		Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-R1	AACCAAAAAACCTATTAAAAC	49,9			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-F2	GGTTTTTATTTGTTAGAGGGT	53,1			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-R2	ATCAAAAAACACAATCATAAAC	51			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-F3	GTTTATGATTGTGTTTTTTGAT	51			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-R3	CAACTACACCAACACCAACAAC	59,4			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-F4	GTTTAGTTTGGTTGGTATTATG	42,3			Sigma Aldrich
	SMOC1-CpG-R4	CCCCTCCTCCTTCCCTCAAA	62,8			Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-FL-F1	GGCACCATGCTGCCCGCGCGCTG	87	Klonierung		Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-FL-R1	CTGCTCCTTAGACGAGGCGTCC	70,3			Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-Inf-F1	CTCAAGCTTCGAATTCGGCACCATGCTGCCCGCGCGCTG	92,7			Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-Inf-R1	GTCGACTGCAGAATTCCTGCTCCTTAGACGAGGCGTCC	83,8			Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-F2	CAGCCGGTGTTCGATGGAGATG	72,9			Sigma Aldrich
	SMOC1-Hs-R2	CATCTCCATCGAACACCGGCTG	72,9			Sigma Aldrich
	SMOC1-GA-F	CGAGCTCAAGCTTCGGGCACCATGCTGCCCGCGCG	93,4			Sigma Aldrich
	SMOC1-GA-R	TACCGTCGACTGCAGCTGCTCCTTAGACGAGGCGTC	84,3			Sigma Aldrich
	SMOC1-Mm-F1	GGTCCTACGAGTCCATGTGT	61,5			Sigma Aldrich
	SMOC1-Mm-R1	CTGAGGCTTCTTGGCCTGTT	65,6			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-F2-Bst	CCTGCAGGGGTTTTTATTTGTTAGAGGGT	71,7	Sanger-sequenzierung		Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-R2-Bst	CCTGCAGGATCAAAAACACAATCATAAAC	70,6			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-F3-Bst	CCTGCAGGGTTTATGATTGTGTTTTTTGAT	71,6			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-R3-Bst	CCTGCAGGCAACTACACCAACACCAACAAC	77,4			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-R4-NotI	GCGGCCGCCCCCTCCTCCTTCCCTCAAA	86,3			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-R4-Bst	CCTGCAGGCCCCTCCTCCTTCCCTCAAA	81,7			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-F2-NotI	CGGGCCGCGGTTGTTTTTATTTGTTAGAGGGT	77,6			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-F3-NotI	GCGGCCGCGTTTATGATTGTGTTTTTTGAT	77,6			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-R2-NotI	GCGGCCGCATCAAAAAACACAATCATAAAC	76,7			Sigma Aldrich
	SMOC1-Cpg-R3-NotI	GCGGCCGCCAACTACACCAACACCAACAAC	82,4			Sigma Aldrich
IDH1	IDH1-gen-F4bio	GGCTTGTGAGTGGATGGGTA	61,2	Pyro-sequenzierung		Sigma Aldrich
	IDH1-gen-R3	GCCAACATGACTTACTTGATCC	58,6			Sigma Aldrich
IDH1	IDH1-Cd132psS_v1	GATCCCCATAAGCAT	47,1			Sigma Aldrich

IDH 2	IDH2_Cd172_ps _S	AAGCCCATCACCATT	50,7			Sigma Aldrich
	IDH2-gen-Rbio	TGTGGCCTTGTACTG CAGAG	61,7			Sigma Aldrich
	IDH2-gen-F2	GTTCAAGCTGAAGAA GATGTGG	58,8			Sigma Aldrich

7.5. Verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Rabbit-Antiköper	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB100-56402SS
Phospho-Smad1/Smad5/Smad9 Rabbit-Antikörper	Cell signaling technology®, Danvers, USA	13820S
Phospho-Smad2/Smad3 Rabbit-Antikörper	Cell signaling technology®, Danvers, USA	8828S
Smoc1 Rabbit-Antikörper	Novus Biologicals, Littleton, USA	NBP1-86146
Smad1 Rabbit-Antikörper	Cell signaling technology®, Danvers, USA	6944S
Smad2/3 Rabbit-Antikörper	Cell signaling technology®, Danvers, USA	8685S
α-Actin Rabbit-Antikörper	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A2066

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Chance an seinem Institut meine Dissertation durchführen zu dürfen. Seine unzähligen Ratschläge, Hinweise und Nachfragen haben diese Dissertation am Ende erst möglich gemacht. Ganz besonders möchte ich mich für Seine Unterstützung bei der Bewerbung um das Mildred-Scheel-Stipendium der Deutschen Krebshilfe bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen für die Betreuung der Arbeit und Überlassen des spannenden Dissertationsprojekts. Christiane hat mir im Labor und beim Analysieren und Diskutieren der Ergebnisse immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich habe mich immer besonders darüber gefreut, dass du dir nebenbei auch immer Zeit für ein persönliches Gespräch, oder fürs Fachsimpeln übers Rennradfahren genommen hast.

Ein großer Dank geht natürlich auch an alle Mitglieder der KnoTho-Arbeitsgruppe: An Sascha, Miriam, Anna, Vanessa, Rabia, Jana und Nina. Zusammen haben wir die guten und schlechten Tage im Labor verbracht, die Doktoranden-Retreats durchlebt und anschließend in der Kneipe analysiert ;) Vielen Dank für alles.

Auch beim restlichen Team des Instituts für Neuropathologie möchte ich mich bedanken: Bei Marietta, Bastian, Kerstin, Jörg und Angela. Ihr wart immer da wenn ich mal nicht mehr weiter wusste und habt mich und meine Arbeit ernst genommen, auch wenn ich „nur“ eine medizinische Doktorarbeit durchgeführt habe. Insbesondere bei Bastian und Marietta möchte ich mich bedanken, durch die ich viel über das Forschen an sich, das Planen eines Experiments und dessen korrekte Durchführung gelernt habe.

Ein ganz herzlicher Dank geht an die Deutsche Krebshilfe, die mich und meine Dissertation mit dem Mildred-Scheel-Stipendium nicht nur finanziell, sondern auch ideell unterstütz hat. Das gab mir die Freiheit mehr Zeit in meine Dissertation zu investieren, ohne mir dabei Sorgen um meinen Lebensunterhalt machen zu müssen.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, meinen Brüdern. Ihr habt mich immer unterstützt und mich zu dem Menschen gemacht der ich bin. Ihr wart immer für mich da

und habt mich als vorlautes, altkluges Kind und großen Bruder immer akzeptiert wie ich bin. Ohne euch wäre ich niemals dort wo ich jetzt bin. Auch wenn sie dies nicht mehr lesen können möchte ich auch meinen Großeltern für alles danken, was sie für mich getan haben. Ich weiß ihr wärt stolz auf mich.

Zuletzt möchte ich Anja danken. Unzählige Male hast du diese Arbeit Korrektur gelesen, mir vieles beigebracht und mich motiviert immer weiter zu machen. Du hast in deiner Doktorarbeit geschrieben, dass wir „den Weg gemeinsam“ gehen. Wir gehen ihn seit acht Jahren, nicht immer im Gleichschritt, aber Seite an Seite. Ich kann und will mir diesen Weg nicht mehr ohne dich vorstellen. Du ergänzt mich, du glaubst an mich und du stehst immer zu mir.