

Untersuchung der molekularen Valproinsäure-Effekte auf Gliom-Zellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Hoja
aus
Nürnberg

im Jahr
2016

Untersuchung der molekularen Valproinsäure-Effekte auf Gliom-Zellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Hoja
aus
Nürnberg

im Jahr
2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider

Tag der mündlichen Prüfung: 11.Januar 2017

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Glioblastoma multiforme (GBM).....	5
1.1.1	Definition und Epidemiologie	5
1.1.2	WHO-Klassifikation und molekulare Diagnostik	6
1.1.3	Therapie-Strategien.....	7
1.1.4	Molekulare Pathogenese.....	8
1.1.5	Molekulare Klassifikation	10
1.2	Valproinsäure als Histon-Deacetylase-Inhibitor	12
1.2.1	Epigenetische Grundlagen	12
1.2.2	Histon-Deacetylase-Inhibitoren im klinischen Einsatz.....	14
1.2.3	Effekte der Valproinsäure	15
1.3	Fragestellungen und Zielsetzung der Doktorarbeit	17
2	MATERIAL.....	19
2.1	Patienten-Material.....	19
2.2	Zelllinien.....	20
2.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.4	Gele und Puffer	23
2.5	Kommerzielle Reagenzien-Sätze (Kits)	24
2.6	Proteine (Enzyme und Antikörper)	24
2.7	Oligonukleotide (PCR-Primer und siRNAs)	25
2.8	Geräte und Laborausstattung	27
2.9	Software	28
3	METHODEN.....	29
3.1	Zellbiologische Methoden.....	29
3.1.1	Kultivierung von Zelllinien	29
3.1.2	Behandlung von Zelllinien mit Valproinsäure	29
3.1.3	Temozolomid-Chemosensitivitäts-Assay	30
3.1.4	siRNA-Transfektion (SLC-Transporter)	30
3.2	Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1	Extraktion von Nukleinsäuren.....	31
3.2.2	MGMT-Methylierungsquantifizierung	31
3.2.3	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	31
3.2.4	Quantitative real-time Reverse-Transkriptase-PCR (real-time qRT-PCR)	32
3.2.5	Agarose-Gel-Elektrophorese	33
3.2.6	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	33
3.2.7	Next-Generation Sequencing (NGS)	35

INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Proteinbiochemische Methoden	38
3.3.1	Immunhistochemie	38
3.4	Bioinformatische Methoden.....	39
3.4.1	Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	39
3.4.2	GO term Analyse.....	39
3.4.3	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	40
3.5	Andere statistische Methoden.....	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Funktionelle Effekte der Valproinsäure-Behandlung	42
4.1.1	Re-Expression des Zellzyklus-Kontroll-Gens CDKN1A	42
4.1.2	Sensitivierung für Temozolomid.....	43
4.1.3	Reduktion der Proliferationsrate	44
4.2	Next-Generation Sequencing (NGS)-Auswertungen	45
4.2.1	Hauptkomponentenanalyse.....	45
4.2.2	Auswertungen mit der Genomatix-Software.....	47
4.2.3	Anreicherungs-Analysen	51
4.3	Einzelgen-Analysen bestimmter Gen-Gruppen.....	53
4.3.1	MGMT	53
4.3.2	DNA-Reparatur-Gene	54
4.3.3	Tumorsuppressor-Gene.....	55
4.3.4	Stammzellmarker	57
4.4	Glioblastom-Subtypen-Analyse	57
4.4.1	Einteilung der Zelllinien in die molekularen Subtypen	57
4.4.2	Analysen der Auswirkungen von VPA auf die Gen-Signaturen.....	58
4.5	Validierungen und funktionelle Untersuchungen zu den SLC-Transportern.....	60
4.5.1	Validierung der Re-Expression nach VPA-Behandlung auf mRNA-Ebene	60
4.5.2	Validierung der Hochregulation nach VPA-Behandlung auf Protein-Ebene in humanem Gewebe	61
4.5.3	siRNA-Knockdown-Versuche	63
5	DISKUSSION.....	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	91

1 EINLEITUNG

1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Der Begriff *Glioblastoma multiforme* wurde geprägt von Percival Bailey und Harvey Cushing in ihrem Werk „*A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis*“ aus dem Jahr 1926 (Bailey and Cushing 1926). Darin beschreiben Bailey, der als Histologe tätig war, und der Neurochirurg Cushing, der die Überlebensdaten beisteuerte, um die Prognosen einschätzen zu können, dass sich Glioblastome aus Gliazellen entwickeln und ein sehr variables, also multiformes, Erscheinungsbild mit Nekrosen, Einblutungen und Zysten aufweisen. Auch heute noch gilt der Nachweis von mikrovaskulären Gefäßproliferationen und/oder Nekrose-Zonen als wichtiges Abgrenzungsmerkmal des Glioblastoms gegenüber anderen Hirntumoren (Louis, Perry et al. 2016).

Das Glioblastom ist beim Erwachsenen der häufigste maligne hirneigene Tumor (Jukich, McCarthy et al. 2001). Die Inzidenz des Glioblastoms ist bei Menschen mit weißer Hautfarbe (in hochentwickelten industrialisierten Ländern) höher als in der afrikanischen oder asiatischen Bevölkerung und liegt in Europa und Nordamerika bei 2-3 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner. Männer sind dabei etwas häufiger betroffen als Frauen, der Altersgipfel liegt zwischen 50 und 70 Jahren (Ohgaki 2009). Die mittlere Gesamt-Überlebenszeit beim Glioblastom beträgt 14,9 Monate. Bei Behandlung in kompetenten neuroonkologischen Zentren werden jedoch oft auch bessere Werte erreicht.

Der derzeit einzige erwiesene ätiologische Umweltfaktor für die Entstehung maligner Gliome ist die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (Ohgaki and Kleihues 2005). Die meisten Gliome entwickeln sich spontan, nur ein geringer Anteil der Patienten (etwa 5 %) weist eine Verbindung zu durch seltene vererbbarer Mutationen hervorgerufenen genetischen Syndromen, wie beispielsweise der Neurofibromatose 1 und 2, dem familiären Retinoblastom oder dem Li-Fraumeni-Syndrom, auf (Schwartzbaum, Fisher et al. 2006, Farrell and Plotkin 2007).

1.1.2 WHO-Klassifikation und molekulare Diagnostik

Bis vor Kurzem wurden Gliome nach der allgemein anerkannten WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralen Nervensystems aus dem Jahr 2007 anhand histomorphologischer Ähnlichkeiten zu (möglichen) Ursprungs-Zellen (astrozytär, oligodendroglial oder ependymal) eingeteilt sowie bezüglich ihres Malignitäts-Grades eingestuft (WHO-Grad I-IV) (Louis, Ohgaki et al. 2007). In der jetzt gebräuchlichen WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2016 (revidierte 4. Auflage) werden ergänzend zu Histologie und Immunhistochemie zunehmend auch molekulare Biomarker in die Klassifikation der Hirntumoren einbezogen (Louis, Perry et al. 2016).

Die diffus infiltrativ ins Hirngewebe einwachsenden astrozytären und oligodendroglialen Gliome der WHO-Grade II-IV werden in Zukunft – basierend auf ihren molekularen Veränderungen – in drei große Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1).

molekularer Biomarker bzw. Histologie/Prognose	diffuse Gliome mit IDH-Mutation und 1p/19q-Ko-Deletion	diffuse Gliome mit IDH-Mutation ohne 1p/19q-Ko-Deletion	diffuse Gliome ohne IDH-Mutation
IDH1/2	mutiert	mutiert	Wildtyp
1p/19q	ko-deletiert	intakt	intakt
TERT-Promoter	mutiert	Wildtyp	mutiert
ATRX	erhaltene nukleäre Expression	Verlust der nukleären Expression	erhaltene nukleäre Expression
Histologie	oligodendroglial	astrozytär	astrozytär
WHO-Grad	II oder III	II oder III (selten IV)	IV (selten II oder III)
medianes Überleben	> 15 Jahre	8-12 Jahre	< 2-3 Jahre

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten Charakteristika der drei großen (molekularen) Gruppen von diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliomen im Erwachsenenalter. Tabelle nach (Weller, Reifenberger et al. 2016).

Zunächst müssen Gliome mit und ohne *IDH* (*Isocitrate Dehydrogenase*)-Mutation unterschieden werden. Außerdem wird bestimmt, ob ein Tumor die sog. 1p/19q-Ko-Deletion (entspricht dem Verlust von genetischem Material auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und dem langen Arm von Chromosom 19) besitzt. Diese Ko-Deletion ist nun definierend für oligodendrogliale Tumoren und wird mit einem guten Ansprechen auf Strahlen- und/oder Chemotherapie in

Verbindung gebracht. Auch führen aktivierende Mutationen im *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*)-Promoter sowie inaktivierende Mutationen im Gen *ATRX* (*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked*) zur Telomer-Stabilisierung und erhöhen so die Immortalität der Tumorzellen. Patienten, deren Gliom sowohl eine *IDH*-Mutation als auch die 1p/19q-Ko-Deletion aufweist, haben in der Regel eine relativ gute Prognose, wohingegen *IDH*-Wildtyp-Tumoren ohne 1p/19q-Ko-Deletion mit einem nur sehr kurzen Überleben der entsprechenden Patienten assoziiert sind.

1.1.3 Therapie-Strategien

Bei vielen Gliomen ist die Basis der Therapie, wenn möglich, die chirurgische Resektion, doch auch das mittels einer Biopsie (ohne Resektion) gewonnene Gewebe ist wertvoll, da sich daran histologische und molekulare Untersuchungen zur Diagnose-Sicherung durchführen lassen (Gulden Sala and Stupp 2016). Um eine möglichst vollständige Resektion zu erreichen, dient heutzutage bei neurochirurgischen Eingriffen u.a. die Markierung des Tumorgewebes mit Fluoreszenz-Farbstoffen, wie beispielsweise 5-ALA (5-Aminolävulinsäure) (Stummer, Pichlmeier et al. 2006) oder Natrium-Fluorescein (Schebesch, Proescholdt et al. 2013).

Die Standard-Therapie beim Glioblastom besteht aus lokaler, möglichst vollständiger chirurgischer Resektion gefolgt von einer kombinierten Radiochemotherapie (Stupp, Mason et al. 2005). Das Therapie-Schema setzt sich aus einer fraktionierten fokalen Bestrahlung des entsprechenden Hirnareals in Kombination mit der Verabreichung des Chemotherapeutikums Temozolomid (Temodal®) zusammen. Im Anschluss an die konkomitante Phase folgt eine adjuvante Temozolomid-Erhaltungs-Therapie. Dabei profitieren besonders Patienten mit einer *MGMT* (*O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*)-Promoter-Methylierung von dieser kombinierten Radiochemotherapie, da die durch Bestrahlung und das alkylierende Zytostatikum hervorgerufenen DNA-Schäden dann nur eingeschränkt von dem Reparatur-Enzym repariert werden (Hegi, Diserens et al. 2005). Neben dem *MGMT*-Promoter-Methylierungs-Status gehen weitere molekulare Marker, die vorab schon erklärt wurden (siehe 1.1.2 WHO-Klassifikation und molekulare Diagnostik), bei der Entwicklung einer Behandlungs-Strategie für den einzelnen Patienten in die Entscheidung ein (siehe Abbildung 1).

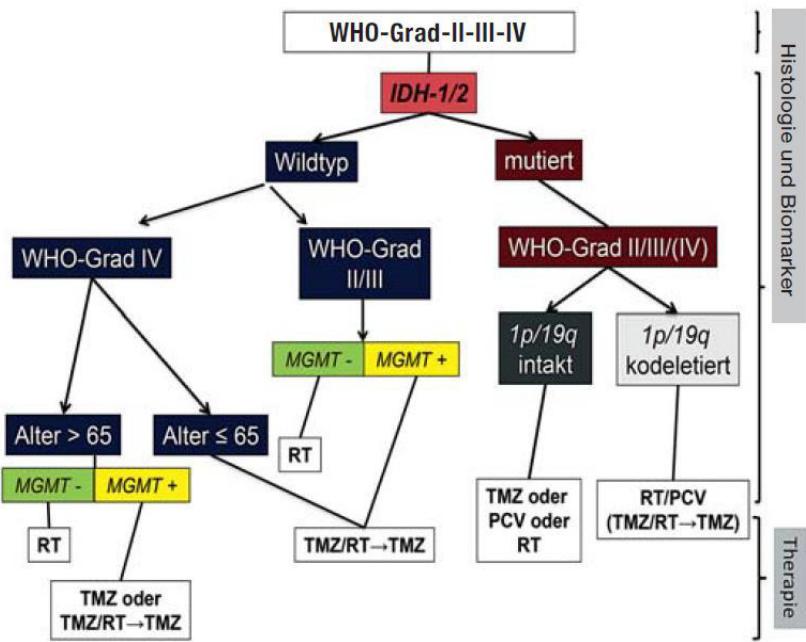


Abbildung 1: Übersicht über die auf (molekularen) Biomarkern basierenden Behandlungs-Strategien bei diffusen Gliomen. Der IDH-Mutations-Status, das Vorhandensein der 1p/19q-Ko-Deletion sowie der MGMT-Promoter-Methylierungs-Status und das Alter der Patienten gehen in die Entscheidung ein. TMZ = Temozolomid, RT = Radiotherapie, PCV = Chemotherapie bestehend aus Procarbazine, CCNU (Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea = Lomustin) und Vincristin. Abbildung aus (Weller, Reifenberger et al. 2016).

1.1.4 Molekulare Pathogenese

Glioblastome werden aufgrund ihrer Biologie und ihrer genetischen und epigenetischen Alterationen in zwei Gruppen eingeteilt: Primäre Glioblastome, die innerhalb relativ kurzer Zeit *de novo* aus gesundem Hirngewebe entstehen, werden von sekundären Glioblastomen, die sich im Laufe von einigen Jahren aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen entwickeln, unterschieden. Während primäre Glioblastome, die etwa 90 % der Glioblastome ausmachen, eher bei älteren Patienten (Durchschnitts-Alter: 62 Jahre) auftreten, sind die deutlich selteneren sekundären Glioblastome häufig bei jüngeren Patienten (Durchschnitts-Alter: 45 Jahre) zu finden (Ohgaki, Dessen et al. 2004). Bereits im Jahr 1996 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) in primären Glioblastomen vorherrschte, wohingegen sekundäre Glioblastome sehr häufig *TP53* (*Tumor Suppressor P53*)-Mutationen aufwiesen. Diese beiden genetischen Veränderungen schlossen sich praktisch gegenseitig aus und so konnten zwei unterschiedliche Wege zur Entstehung eines Glioblastoms

definiert werden (Watanabe, Tachibana et al. 1996). Wie in Abbildung 2 veranschaulicht, sind für jede der beiden Untergruppen eine ganze Reihe von charakteristischen genetischen und epigenetischen Veränderungen bekannt (Ohgaki and Kleihues 2007, Riemenschneider and Reifenberger 2009, Ohgaki and Kleihues 2013), wobei heutzutage der *IDH*-Mutations-Status als eines der wichtigsten Merkmale angesehen wird: Primäre Glioblastome zeigen nur selten *IDH*-Mutationen (5-10 %), wohingegen sie bei sekundären Glioblastomen häufig zu finden sind (70-80 %) und somit als molekularer Marker für diese Untergruppe von Tumoren, die üblicherweise mit einer besseren Prognose einhergehen, gelten (Malzkorn, Felsberg et al. 2015).

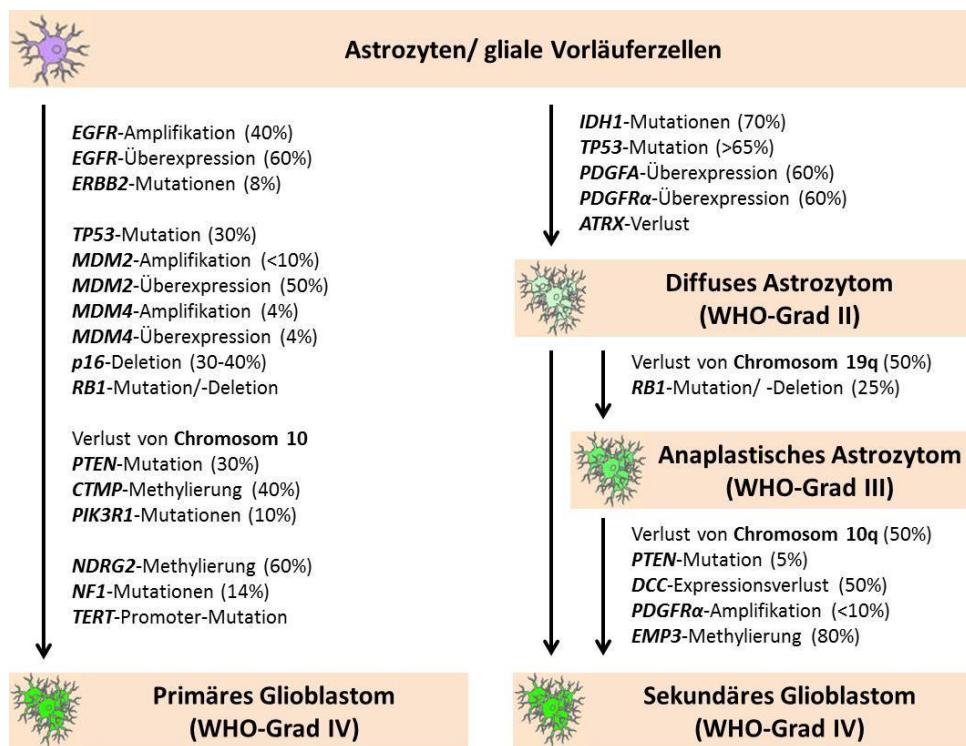


Abbildung 2: Schematische Darstellung der molekularen Pathogenese der beiden Glioblastom-Untergruppen. Unterschieden werden primäre Glioblastome, die *de novo* entstehen, und sekundäre Glioblastome, die sich aus niedrigmaligneren astrozytären Tumoren entwickeln. Für jede der beiden Gruppen sind bestimmte genetische und epigenetische Veränderungen jeweils charakteristisch. Abbildung nach (Ohgaki and Kleihues 2007, Riemenschneider and Reifenberger 2009).

Bei den primären Glioblastomen treten dagegen in vielen Fällen Mutationen und Amplifikationen des EGF-Rezeptors auf. Dabei exprimieren 25-33 % der *EGFR*-amplifizierten Tumore die am häufigsten vorkommende Variante EGFRvIII, eine konstitutiv aktiven Form des Rezeptors. Die

Aktivierung dieses Wachstumsfaktor-Signalwegs führt zur Stimulation des Zellwachstums sowie zur Apoptose-Inhibition und ist folglich mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert (Pelloski, Ballman et al. 2007). Außerdem sind *PTEN* (*Phosphatase And Tensin Homolog*)-Mutationen sowie der vollständige Verlust von Chromosom 10 charakteristisch für diese Glioblastom-Untergruppe. Eine wiederholt auftretende epigenetische Veränderung ist beispielsweise die Methylierung des *NDRG2* (*N-Myc Downstream-Regulated Gene Family Member 2*)-Gens (Tepel, Roerig et al. 2008). In sekundären Glioblastomen sind neben den *IDH1*-Mutationen auch Mutationen im *TP53*-Gen sowie der Verlust des Chromosomen-Arms 19q die häufigsten genetischen Veränderungen.

Unter anderem aufgrund der Tatsache, dass der Unterschied im *IDH*-Mutations-Status eine sehr frühe Veränderung ist, wird heutzutage nicht mehr davon ausgegangen, dass sich die beiden Glioblastom-Untergruppen aus denselben Vorläufer-Zellen entwickeln und ein individuelles biologisches und klinisches Verhalten an den Tag legen. Vielmehr besteht die Annahme, dass sich die Tumoren aus Zellen unterschiedlichen Ursprungs entwickeln. Für diese Hypothese sprechen außerdem die Beobachtungen, dass die beiden Glioblastom-Untergruppen in Patienten unterschiedlichen Alters auftreten und einen divergierenden klinischen Ausgang haben. Auch das Vorhandensein potentieller Tumorstammzellen scheint sich zwischen den Gruppen zu unterscheiden: So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der relative Anteil an CD133⁺-positiven Zellen in primären Glioblastomen signifikant höher war als in sekundären, und dass die CD133⁺-Expression nur in primären Glioblastomen mit der Bildung von Sphären-artigem, nicht adhärenten Wachstum assoziiert war (Beier, Hau et al. 2007).

1.1.5 Molekulare Klassifikation

Das Forschungsnetzwerk TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) katalogisierte im Jahre 2009 wiederholt auftretende genomische Alterationen in Glioblastomen. Dabei entstand mittels Microarray-Analysen eine auf genetischen Expressions-Mustern basierende molekulare Klassifikation des Glioblastoms. Unterschieden werden die vier molekularen Subtypen klassisch, mesenchymal, neural und proneural (Verhaak, Hoadley et al. 2010) (siehe Abbildung 3).

Tumoren des **mesenchymalen** Subtyps, die sich durch den Verlust von *NFI* (*Neurofibromin 1*) und *PTEN* sowie der Expression mesenchymaler Marker auszeichnen (Phillips, Kharbanda et al.

EINLEITUNG

2006), haben grundsätzlich eine eher schlechte Prognose. **Proneural** klassifizierte Glioblastome hingegen, die häufig *IDH1*-Mutationen und *PDGFRA* (*Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*)-Amplifikationen aufweisen, zeigen oft eine bessere Prognose. Außerdem besitzen die Tumoren dieses Subtyps häufig den sog. *glioma-CpG Island Methylator Phenotype* (G-CIMP). Patienten mit proneuralen, G-CIMP-positiven Tumoren, die eine gezielte Hypermethylierung einer großen Anzahl an Loci aufweisen, überleben signifikant länger als solche mit proneuralen, G-CIMP-negativen oder nicht-proneuralen Tumoren (Noushmehr, Weisenberger et al. 2010). Der **klassische** Subtyp weist als eindeutigstes Charakteristikum *EGFR*-Amplifikationen auf, die in den anderen Subtypen so gut wie nicht auftauchen. Häufig tritt zusammen mit der Hochregulation des EGF-Rezeptors (sei es durch Mutation, Amplifikation oder Überexpression) der Verlust des Gens *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) auf. Der am wenigsten definierte **neurale** Subtyp ist durch die Expression neuronaler Marker gekennzeichnet. Diese molekulare Subklassifikation ist aufgrund der Tatsache, dass sie im Wesentlichen auf Expressions-Veränderungen basiert, jedoch nicht immer stabil und hat deshalb noch keinen Eingang in die Tumorklassifikation nach WHO-Kriterien gefunden.

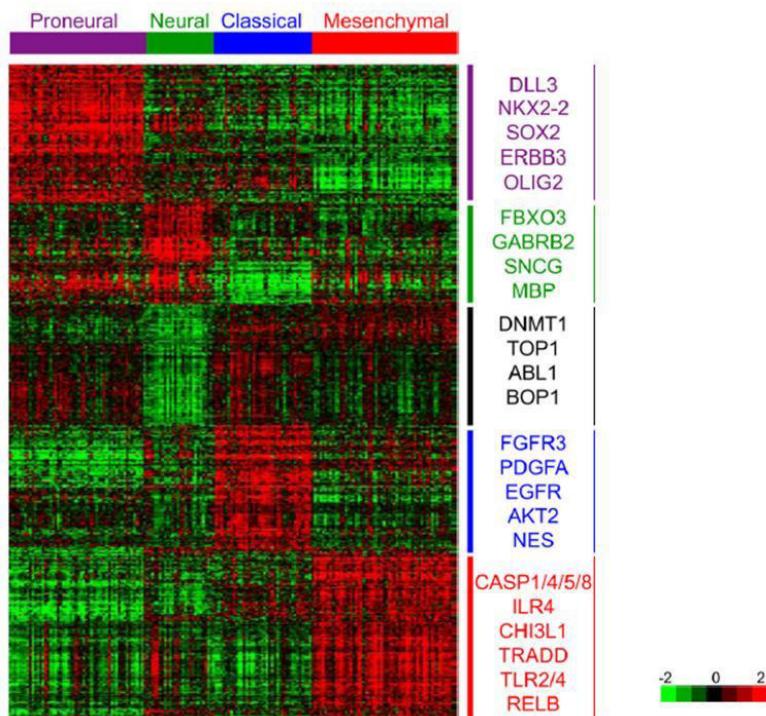


Abbildung 3: Übersicht über die jeweils charakteristischen Genexpressions-Muster der vier molekularen Subtypen proneural, neural, klassisch und mesenchymal. Abbildung aus (Verhaak, Hoadley et al. 2010).

1.2 Valproinsäure als Histon-Deacetylase-Inhibitor

1.2.1 Epigenetische Grundlagen

Unter dem Begriff Epigenetik werden heutzutage alle vererb baren Chromosomen-Modifikationen zusammengefasst, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen (Berger, Kouzarides et al. 2009). Diese Modifikationen in der Chromatin-Struktur können direkt positiven oder negativen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Transkription, DNA-Replikation, DNA-Reparatur und die genomische Stabilität nehmen (Shahbazian and Grunstein 2007). Die Gesamtheit aller epigenetischen Regulationsmechanismen bezeichnet man als Epigenom (siehe Abbildung 4).

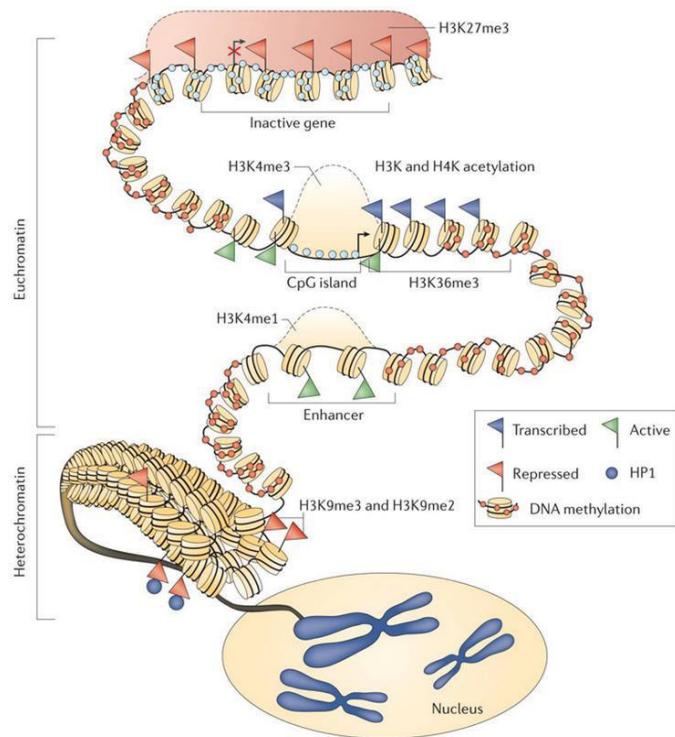


Abbildung 4: Die Gesamtheit aller epigenetischen Regulationsmechanismen (u.a. DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen) in einer Zelle charakterisiert das Epigenom. Aktive, transkriptionell gut zugängliche Bereiche (Euchromatin) werden von transkriptionell-inaktiven, unzugänglichen Bereichen (Heterochromatin) unterschieden. Abbildung aus (Baylin and Jones 2011).

Zu den wichtigsten epigenetischen Veränderungen, die zu einer dynamischen Regulation der Chromatin-Struktur führen, zählen neben DNA-Methylierung (Bird 2002) und RNAi-vermittelten Mechanismen (*non-coding RNA*) (Volpe, Kidner et al. 2002) die Histon-Modifikationen

EINLEITUNG

(Kouzarides 2007). Diese post-translationalen Veränderungen treten meist an den N-terminalen Enden eines Histon-Proteins auf (Turner 2005). Dabei zählen die von Histon-Methyltransferasen (HMT) katalysierte Methylierung sowie die ausschließlich an Lysin-Resten stattfindende Acetylierung zu den am häufigsten auftretenden Veränderungen. Durch die Acetylierung, die im Allgemeinen zu einer Aktivierung der Transkription führt, wird die positive Ladung des Lysins neutralisiert, wodurch es zu einer verminderten elektrostatischen Anziehung zwischen Histon und negativ geladenem DNA-Rückgrat kommt. Die auf diese Weise aufgelockerte Chromatin-Struktur ist dann besser zugänglich für Transkriptionsfaktoren, die nach ihrer Bindung an die DNA die Transkription vorantreiben können. Acetylierungen der Histone H3 und H4 (H3ac/H4ac), zwei der vier Kern-Histone, aus denen ein Nukleosom aufgebaut ist, sind mit der lockerer verpackten, transkriptionell gut zugänglichen Form des Chromatins, dem sog. Euchromatin, assoziiert (siehe Abbildung 4). H3K9me3 (die Dreifach-Methylierung des Lysin-Restes an Position 9 des Histons 3) und H3K27me3 hingegen gelten als Marker für Heterochromatin, der dichter verpackten und damit schwerer zugänglichen Form des Chromatins (Schones and Zhao 2008). Vermittelt werden Protein-Acetylierung und -Deacetylierung von Histon-Acetyltransferasen (HATs) bzw. -Deacetylasen (HDACs) (Wang, Zang et al. 2009). Inzwischen sind 18 Histon-Deacetylasen bekannt, die, basierend auf ihrer Sequenz-Homologie zu den Hefe-Proteinen (Ceccacci and Minucci 2016), in fünf Klassen (Klassen I, IIa, IIb, III und IV) mit unterschiedlicher Funktion, Lokalisation und Substraten eingeteilt werden (Thiagalingam, Cheng et al. 2003, Bolden, Peart et al. 2006, Dokmanovic, Clarke et al. 2007).

Auch in der Gliom-Pathogenese spielen epigenetische Regulationsmechanismen zusätzlich zu genetischen Alterationen, die Einfluss auf die DNA-Reparatur, Zell-Adhäsion, -Migration und -Invasion, Apoptose sowie den Zellzyklus haben können, eine große Rolle (Kim 2014). Es wurde beobachtet, dass epigenetische Veränderungen vor allem in den frühen Stadien der Tumorgenese auftreten, wobei sie prinzipiell zu jedem Zeitpunkt erscheinen können (Feinberg and Tycko 2004). Besonders HDAC-Proteine können neben anderen, für Histon-Modifikationen verantwortlichen Komponenten in Gliomen durch Mutationen oder veränderte Expressions-Level in ihrer Funktion beeinflusst werden (Lucio-Eterovic, Cortez et al. 2008). Doch auch Mutationen oder Deletionen in den Histon-Acetyltransferasen können zu einem Ungleichgewicht bei der Histon-Acetylierung führen (Moore, Herrick et al. 2004).

1.2.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren im klinischen Einsatz

Die Überexpression von Histon-Deacetylasen konnte in Verbindung gebracht werden mit der epigenetischen Repression von Loci, die für Tumorsuppressoren und DNA-Reparatur-Gene kodieren (Eot-Houllier, Fulcrand et al. 2009). Generell ergab sich aus der in Tumorzellen beobachteten erhöhten HDAC-Expression und der damit verbundenen Histon-Hypoacetylierung der potentielle Einsatz von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) für die Behandlung diverser Krebsarten (Nakagawa, Oda et al. 2007). Tatsächlich betrifft die Inhibition der Histon-Deacetylasen hauptsächlich die Krebszellen, in denen Schlüssel-Gene für das Überleben und das Wachstum des Tumors nötig sind, und ruft Zellzyklus-Arrest, Differenzierung, Induktion des Zelltods, verminderte Angiogenese sowie Anpassungen des Immunsystems hervor (Ceccacci and Minucci 2016). In normalen Zellen hingegen liegt eine verminderte „Verwundbarkeit“ der Zellen gegenüber epigenetischen Regulationsstörungen vor (Dawson and Kouzarides 2012), wobei der genaue Mechanismus bisher nicht (auf)geklärt werden konnte.

Bislang sind vier Histon-Deacetylase-Inhibitoren von der FDA (*Food and Drug Administration*) für den klinischen Einsatz in der Krebs-Therapie zugelassen worden: **Vorinostat** (Zolinza®), eine aromatische Verbindung aus der Gruppe der Hydroxamsäuren, auch bekannt unter dem Namen SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*), wurde im Jahr 2006 als erster HDAC-Inhibitor für die Behandlung des refraktären kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen (Marks and Breslow 2007). Vorinostat inhibiert die Histon-Deacetylase-Klassen I, II und IV und wirkt *in vitro* im µM-Bereich (Lane and Chabner 2009). Das Medikament zeigt auch in Patienten mit rezidivierendem Glioblastom in Phase-II-Studien eine Anti-Krebs-Wirkung (Galanis, Jaeckle et al. 2009) und wird von Patienten mit hochgradigen Gliomen in Kombination mit Temozolomid gut vertragen (Phase-I-Studie) (Lee, Puduvali et al. 2012). Jedoch ist die Wirksamkeit bei der Behandlung solider Tumoren insgesamt deutlich weniger überzeugend als bei der Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen, so dass bislang keine Phase-III-Studien bezüglich der Wirkung in Gliomen durchgeführt wurden (Weseler 2014).

Auch die beiden HDAC-Inhibitoren **Romidepsin** (Istodax®, zugelassen im Jahr 2009) und **Belinostat** (Beleodaq®, zugelassen im Jahr 2014) werden heutzutage für die medikamentöse Therapie bei T-Zell-Lymphomen eingesetzt. Bei Patienten mit rezidivierendem Glioblastom konnte in einer Phase-I/II-Studie jedoch kein nennenswerter Effekt von Romidepsin beobachtet werden (Iwamoto, Lamborn et al. 2011). Belinostat hingegen zeigt starke pro-apoptotische

Effekte in der Glioblastom-Zelllinie LN229 und kann somit als potentielles Agens in der Glioblastom-Therapie in Betracht gezogen werden (Kusaczuk, Kretowski et al. 2016).

Panobinostat (Farydak®, LBH589), ein im Jahr 2015 für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassener HDAC-Inhibitor, besitzt neben nachgewiesenen radiosensitivierenden Effekten in Glioblastom-Modellen (Pont, Naipal et al. 2015) möglicherweise auch anti-neoplastische und anti-angiogene Effekte bei Gliomen. Jedoch zeigt sich in einer Phase-II-Studie mit Patienten mit rezidivierenden Gliomen, in der Panobinostat in Kombination mit Bevacizumab (Avastin®), dem monoklonalen Antikörper gegen *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), getestet wurde, kein signifikant verbessertes 6-Monats-progressionsfreies Überleben im Vergleich zur Monotherapie mit dem Angiogenese-Hemmer (Lee, Reardon et al. 2015).

Ein weiterer, sehr häufig *in vitro* verwendeter Histon-Deacetylase-Inhibitor ist **Trichostatin A** (TSA). Dieses gegen Pilze wirksame Antibiotikum zeigt p53-abhängige anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte bei der Behandlung von Glioblastom-Zellen mit dieser Substanz (Bajbouj, Mawrin et al. 2012). In klinischen Studien wurde Trichostatin A jedoch bislang nicht weiter verfolgt.

1.2.3 Effekte der Valproinsäure

Die Valproinsäure (VPA), die besonders in Form ihrer Salze unter anderem unter den Handelsnamen Valproat® und Convulex® vertrieben wird, ist ein Medikament aus der Gruppe der Antiepileptika und wird primär zur Behandlung von Epilepsien und bipolaren Störungen eingesetzt. Sie fungiert aber auch als HDAC-Inhibitor. VPA (*valproic acid*), eine kurzkettige Carbonsäure, inhibiert spezifisch die Histon-Deacetylase-Klassen I und IIa und wirkt *in vitro* im mM-Bereich (Lane and Chabner 2009, Bezecny 2014). Aufgrund der Tatsache, dass Glioblastom-Patienten häufig zusätzlich an (epileptischen) Anfällen leiden (Prakash, Lukiw et al. 2012), werden vermehrt antiepileptische Medikamente zusätzlich zur Chemotherapie verabreicht und beeinflussen die Wirkung der Chemotherapeutika. Dabei wird die Valproinsäure dank ihrer Effektivität und ihrer relativ geringen Toxizität oft bei Hirntumor-assoziierten epileptischen Anfällen eingesetzt (Chateauvieux, Morceau et al. 2010, Vecht, Kerkhof et al. 2014). Sie besitzt die Fähigkeit, die Effekte des wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitters des Zentralen Nervensystems, GABA (Gamma-Aminobuttersäure), zu verstärken, sei es durch Hemmung des

EINLEITUNG

Abbaus und/oder Stimulation der Synthese. Außerdem können Spannungs-abhängige Natrium-Kanäle und T-Typ-Calcium-Kanäle blockiert werden (Berendsen, Broekman et al. 2012).

Im Jahr 1999 wurde die erste klinische Studie zur Wirksamkeit der Valproinsäure als Anti-Krebs-Medikament durchgeführt (Michaelis, Doerr et al. 2007). In der 2011 veröffentlichten EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups*)/NCIC (*National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*)-Studie über die Wirkung von Antiepileptika auf die Temozolomid-Radiochemotherapie bei Glioblastom-Patienten konnte gezeigt werden, dass Valproinsäure die Wirkung von Temozolomid verstärkt, was zu einem längeren Überleben der Patienten führt (Weller, Gorlia et al. 2011). Auch zahlreiche weitere retrospektive Studien zeigen, dass die Behandlung mit Valproinsäure den Verlauf der Erkrankung bei Gliom-Patienten (positiv) beeinflussen kann (Oberndorfer, Piribauer et al. 2005, Felix, Trompieri et al. 2011, Barker, Bishop et al. 2013, Kerkhof, Dielemans et al. 2013, Krauze, Myrehaug et al. 2015, Redjal, Reinshagen et al. 2016). In zellbiologischen *in vitro*-Untersuchungen bezüglich der VPA-Effekte auf Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass Valproinsäure durch Hervorrufen eines Zellzyklus-Arrest in der G1- und/oder der G2-Phase die Zellproliferation inhibiert (Gottlicher, Minucci et al. 2001). Außerdem werden Differenzierung und/oder Apoptose induziert (Marks, Rifkind et al. 2001), möglicherweise über Regulation des Redox-Systems (Chen, Chang et al. 2011). Nicht nur in adhärenten Zelllinien, sondern auch in Stammzellen, die aus Glioblastomen erzeugt wurden, führt die Behandlung mit Valproinsäure zu einer verminderten Proliferation der Zellen (Alvarez, Field et al. 2015). In primären humanen Glioblastom-Zellen nimmt nach VPA-Behandlung die Viabilität der Zellen ab (Hosein, Lim et al. 2015). Außerdem konnte beobachtet werden, dass Valproinsäure die Expression von *MGMT* herunterreguliert und humane Gliom-Zellen für die Behandlung mit Temozolomid sowie für Bestrahlung sensitiviert (Chinnaiyan, Cerna et al. 2008, Ryu, Yoon et al. 2012, Van Nifterik, Van den Berg et al. 2012).

Es gibt jedoch bislang noch keine genomweite, systematische Untersuchung, die die Valproinsäure-Effekte auf Gliom-Zellen in ihrer Gesamtheit (in Form von Veränderungen auf Histon- sowie auf Expressions-Ebene) analysiert.

1.3 Fragestellungen und Zielsetzung der Doktorarbeit

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz des Antiepileptikums Valproinsäure in Kombination mit Temozolomid bei Glioblastom-Patienten zu einer verstärkten Wirkung des Chemotherapeutikums sowie zu einem verlängerten Überleben der Patienten führt. Jedoch zeigen neuere Studien nun teilweise widersprüchliche Ergebnisse: So konnte in einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse prospektiver klinischer Studien belegt werden, dass VPA in Kombination mit der klassischen Radiochemotherapie nicht mit einem verbesserten progressionsfreien oder Gesamt-Überleben der Patienten (im Gegensatz zu denen, die keine antiepileptischen Medikamente bekamen), assoziiert ist (Happold, Gorlia et al. 2016). Unter anderem aus dieser Diskrepanz der Daten ergibt sich schon seit einiger Zeit die Frage, ob die mutmaßlichen positiven therapeutischen Effekte der Valproinsäure-Behandlung bei Glioblastom-Patienten in einer prospektiven, randomisierten, kontrollierten Studie untersucht werden könnten bzw. sollten (Weller 2013).

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es deshalb, die molekularen Aspekte der Valproinsäure-Wirkung auf Hirntumor-Zellen näher zu untersuchen und zu charakterisieren, um so für die Klinik eine Entscheidungs-Hilfe zu leisten und möglicherweise neue molekulare Marker zu identifizieren, die einen Hinweis auf das Ansprechen auf Valproinsäure bei der Behandlung von Glioblastom-Patienten geben könnten.

Dazu wurden in einem ersten Schritt zahlreiche adhärente Gliom-Zelllinien sowie primäre Glioblastom-Stammzelllinien mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure behandelt. Anschließend wurden zunächst die funktionellen Auswirkungen dieser Behandlung auf die Zelllinien in Form von Chemosensitivitäts- und Proliferations-Versuchen analysiert. Außerdem wurden globale Sequenzierungs-Analysen mittels *Next-Generation Sequencing* durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass Valproinsäure als Histon-Deacetylase-Inhibitor fungiert, wurden Sequenzierungen im Anschluss an Chromatin-Immunpräzipitationen (sog. ChIP-Seq) realisiert. Außerdem wurde die RNA der Zelllinien sequenziert (RNA-Seq), um einen Eindruck über die Auswirkungen der VPA-Behandlung auf Expressions-Ebene zu erhalten. Aus der Liste der unter Valproinsäure hochregulierten und euchromatinisierten Gene wurde die Gruppe der SLC-Transporter genauer hinsichtlich ihrer funktionellen Wirkungsweise untersucht. Auch wurden weitere interessante Gen-Gruppen bezüglich der Gliom-Pathogenese (u.a. DNA-Reparatur-Gene,

EINLEITUNG

Tumorsuppressor-Gene) einer vertieften Analyse unterzogen. Abschließend wurden die unbehandelten und VPA-behandelten Zelllinien angesichts ihrer Einteilung in die molekularen Subtypen analysiert.

Es sollte ein möglichst vollständiges Gesamtbild der molekularen Auswirkungen der Valproinsäure-Behandlung auf Gliom-Zellen gewonnen werden. Denn neben der Annahme, dass VPA zu einer Sensitivierung der Zellen für das Chemotherapeutikum Temozolomid führt, muss auch die Möglichkeit, dass es unter Valproinsäure zu einer generellen Verbesserung der biologischen Eigenschaften des Tumors (zu einer „Benignisierung“) kommt, in Betracht gezogen werden.

2 MATERIAL

2.1 Patienten-Material

Die für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe-Proben von Hirntumor-Patienten stammten aus dem Archiv der Abteilung für Neuropathologie. Die Untersuchung dieser Proben war durch den Antrag #13-101-0005 bei der Ethikkommission der Universität Regensburg abgedeckt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über Geschlecht und Alter (bei Erst-Diagnose) der Patienten, über deren Tumoren jeweils vor und unter (bzw. nach) Valproinsäure-Behandlung sowie über die Valproinsäure (VPA)-Tagesdosis.

Patient	Geschlecht, Alter	Diagnose vor und unter (bzw. nach) VPA-Behandlung; VPA-Tagesdosis
1	weiblich, 26 Jahre	<ul style="list-style-type: none"> vor VPA: anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III) VPA-Dosis: 1.500 mg unter VPA: anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III)
2	weiblich, 67 Jahre	<ul style="list-style-type: none"> vor VPA: Glioblastom (WHO-Grad IV) VPA-Dosis: 300-1.200 mg unter VPA: Glioblastom (WHO-Grad IV)
3	weiblich, 27 Jahre	<ul style="list-style-type: none"> vor VPA: Astrozytom (WHO-Grad II) VPA-Dosis: 2.000 mg unter VPA: anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III)
4	weiblich, 39 Jahre	<ul style="list-style-type: none"> vor VPA: anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III) VPA-Dosis: 300-1.300 mg nach VPA: anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III)
5	männlich, 65 Jahre	<ul style="list-style-type: none"> vor VPA: Glioblastom (WHO-Grad IV) VPA-Dosis: 900-1.300 mg unter VPA: Glioblastom (WHO-Grad IV)
6	männlich, 31 Jahre	<ul style="list-style-type: none"> vor VPA: Oligoastrozytom (WHO-Grad II) VPA-Dosis: 600 mg unter VPA: anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III)
Negativ-Kontrolle	männlich, 64 Jahre	nicht-neoplastisches Hirngewebe

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Gewebe-Proben mit Angaben über Geschlecht und Alter (bei Erst-Diagnose) der Patienten sowie die Diagnosen der Hirntumoren jeweils vor und unter (bzw. nach) Valproinsäure-Behandlung und die erhaltenen Valproinsäure-Dosen.

2.2 Zelllinien

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten humanen adhärenten Gliom-Zelllinien (siehe Tabelle 3) wurden von der Firma ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) bezogen.

Zelllinie	Ursprungs-Tumor	Alter	Geschlecht
HS683	anaplastisches Oligodendrogiom (WHO-Grad III)	76 Jahre	männlich
T98G	Glioblastom (WHO-Grad IV)	61 Jahre	männlich
TP365MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	n.a.	weiblich
U87MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	44 Jahre	weiblich
U118MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	50 Jahre	männlich
U251MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	n.a.	männlich
U373MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	n.a.	n.a.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Zelllinien mit Angaben über den Ursprungs-Tumor sowie Alter und Geschlecht der Patienten, aus deren Tumoren die entsprechenden Zelllinien etabliert worden waren.
n.a. = nicht angegeben

Außerdem wurden die folgenden sieben humanen Glioblastom-Stammzelllinien verwendet: NCH421k, NCH465, NCH601, NCH636, NCH644, NCH660h, NCH1425 (Campos, Gal et al. 2014). Diese Stammzelllinien wurden freundlicherweise von Professor Christel Herold-Mende (Neurochirurgische Universitätsklinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Eine Authentifizierung der Zelllinien wurde durchgeführt mittels STR (*Short Tandem Repeat*)-Analyse in Regensburg für die adhärenten Zelllinien im Vergleich zu bekannten Profilen oder Markern bzw. in Heidelberg für die Stammzelllinien im Vergleich zum ursprünglichen Patienten-Material.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2x SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Mix	Bioline, London, UK
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
5x Resuspension Buffer	GE Healthcare, Freiburg
10x Tango Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
100 bp-DNA-Leiter	Fermentas, Waltham, MA, USA
Agarose (certified low range ultra)	Biorad, Hercules, CA, USA
Agarose (universal)	Bio&Sell, Feucht
AGENCOURT® AMPure XP	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
beta-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
bFGF2	ReliaTech, Wolfenbüttel
BIT-Admixture Supplement	Pelo Biotech, Planegg
Chloroform (Trichlormethan)	Roth, Karlsruhe
cOmplete ULTRA Tablets	Roche, Basel, Schweiz
DEPC-Wasser (DNase/RNase-frei)	Bioline, London, UK
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
DMEM	Gibco, Carlsbad, CA, USA
DMEM/Ham's F-12	Biochrom, Berlin
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, Waltham, MA, USA
DTT	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGF	ReliaTech, Wolfenbüttel
Entellan	Merck Millipore, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (70%, vergällt)	Otto Fischar, Saarbrücken
Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8%)	Roth, Karlsruhe
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Ficoll® 400	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Merck Millipore, Darmstadt
Hämatoxylin	Dako, Santa Clara, CA, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe

MATERIAL

Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Carlsbad, CA, USA
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (C₂H₃NaO₂)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
(Mono-)Natriumcitrat (C₆H₇NaO₇)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Roth, Karlsruhe
(Di-)Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NP-40	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Orange G (C.I.16230)	Roth, Karlsruhe
PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Carlsbad, CA, USA
(Roti®-)Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Random Hexamer Primer	GeneLink, Hawthorne, NY, USA
RedSafe™ nucleic acid staining solution	iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea
Resazurin	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
RNase-freies Wasser	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
SYBR Gold nucleic acid gel stain	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Temozolomid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trisbase	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween® 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Valproic acid sodium salt	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylol	Roth, Karlsruhe

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers.

2.4 Gele und Puffer

Gel/Puffer	Zusammensetzung/Herstellung
Agarose-Gel (2%) [ChIP]	- 2 g Agarose (low range) lösen in 100 ml 1x TAE-Puffer - 10 µl SYBR Gold
Agarose-Gel (2%) [PCR-Kontrolle]	- 2 g Agarose (universal) lösen in 100 ml 1x TAE-Puffer - 5 µl RedSafe
Aufquell-Puffer [ChIP]	- 25 mM HEPES - pH-Wert einstellen auf 7,8 - 1,5 mM MgCl ₂ - 10 mM KCl - 0,1 % NP-40 - 1 mM DTT - 0,5 mM PMSF
Elutions-Puffer [ChIP]	- 0,1 M NaHCO ₃ - 1 % SDS
Gel-Lade-Puffer (6x) [Agarose-Gel-Elektrophorese]	- 0,14 g Ficoll® 400 lösen in 10 ml H ₂ O - Spatelspitze Orange G
PBS (10x) [Immunhistochemie]	- 80 g NaCl - 2 g KCl - 14,4 g Na ₂ HPO ₄ - 2,4 g KH ₂ PO ₄ - pH-Wert einstellen auf 7,4 - ad 1 l H ₂ O
PBS-T (1x) [Immunhistochemie]	- 100 ml 10x PBS lösen in 900 ml H ₂ O - 500 µl Tween® 20
TAE-Puffer (50x) [Agarose-Gel-Elektrophorese]	- 242 g Trisbase - 57,1 ml Essigsäure - 100 ml 0,5 M EDTA - pH-Wert einstellen auf 8,0 - ad 1 l H ₂ O
Zitronensäure-Puffer [Immunhistochemie]	- 2,94 g C ₆ H ₇ NaO ₇ lösen in 1 l H ₂ O - pH-Wert einstellen auf 6,0

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Gele und Puffer mit Angaben zur Zusammensetzung sowie zur Herstellung.

2.5 Kommerzielle Reagenzien-Sätze (Kits)

Reagenzien-Satz (Kit)	Hersteller
Acetyl-Histone H3 Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit	Merck Millipore, Darmstadt
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
EnVisionTM+ Dual Link System-HRP Kit	Dako, Santa Clara, CA, USA
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TruSeq® ChIP Sample Preparation Kit	Illumina, San Diego, CA, USA
TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2	Illumina, San Diego, CA, USA

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Kits mit Angabe des Herstellers.

2.6 Proteine (Enzyme und Antikörper)

Enzym	Konzentration	Hersteller
DraI	10 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hin6I	10 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proteinase K	20 µg/µl	Roth, Karlsruhe
RNasin® Plus	40 U/µl	Promega, Madison, WI, USA
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	200 U/µl	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
XbaI	10 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Enzyme mit Angabe der Konzentration und des Herstellers.

Antikörper	Konzentration	Hersteller
anti-SLC17A7 rabbit polyclonal antibody	5,14 mg/ml	Origene, Rockville, MD, USA
anti-SLC25A27 rabbit polyclonal antibody	0,5 mg/ml	Origene, Rockville, MD, USA
normal rabbit IgG polyclonal antibody	1 mg/ml	Merck Millipore, Darmstadt

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper mit Angabe der Konzentration und des Herstellers.

2.7 Oligonukleotide (PCR-Primer und siRNAs)

Alle verwendeten Primer (siehe Tabelle 9) wurden selbst designt und von der Firma Eurofins (Ebersberg) bezogen. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden in RNase-freiem Wasser so gelöst, dass die Stamm-Lösung eine Konzentration von 100 µM besaß. Vor Benutzung wurden die Primer 1:10 verdünnt.

Gen	Accession Number	Primer-Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße
CDKN1A	NM_000389	• forward: GCAGACCAGCATGACAGATT • reverse: AAGATGTAGAGCGGGCCTT	130 bp
GAPDH	NM_002046	• forward: CATGACAACTTGGTATCGTG • reverse: GTCCACCACTGACACGTTG	240 bp
SLC2A13	NM_052885	• forward: GTCAGGTCAGAACGCCACTT • reverse: CTTGTAGCAGAAACCGCAGTC	82 bp
SLC6A12	NM_003044	• forward: CTTGCCTGGGCTCTCTTCTA • reverse: TTCAGAAAGTCCGTGCAATG	104 bp
SLC17A7	NM_020309	• forward: TGGGGCTACATTGTCACTCA • reverse: CTGAGGGGATCAGCATGTTT	118 bp
SLC25A27	NM_004277	• forward: TGAATACACCACTTGAGGGACAA • reverse: TTTGATGACATCGGCTGGT	101 bp
SLC30A3	NM_003459	• forward: CTGCAGAGCTTGGGTACT • reverse: AAGGGCACAGATGGAGAAGA	105 bp
SLC44A3	NM_001114106	• forward: CGGCATGGTTATTCTGTTC • reverse: ACATGTTGCCAAAGCTGTCA	120 bp

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten PCR-Primer mit Angabe der Accession Number, der Sequenz und der Fragmentgröße des entsprechenden PCR-Produktes.

Die verwendeten siGENOME siRNAs (siehe Tabelle 10) wurden von der Firma GE Healthcare Dharmacon bezogen. Laut Hersteller-Angaben besitzen alle siRNAs eine Knockdown-Effizienz von mindestens 75 % auf mRNA-Ebene. Die siRNAs wurden als Pools, d.h. jeweils vier verschiedene siRNAs pro Gen in einem Mix, eingesetzt.

MATERIAL

Gen	Accession Number	siRNA-Sequenzen (5' → 3')
SLC12A6	NM_005135	GGUAAUAGCUGGUAGAUC, GAAGUGAUCACCAUUUAUU, CCUAAUGGCUGGCGUAAA, AGGGAGAGAUCAUCGAAAA
SLC17A7	NM_020309	ACAGCGAAAUGGAGGAUGA, CAGUACGUGUUCCUAAUUG, CCACCAACGUGCGCAAGUU, CAACAUCACUCUAAACAU
SLC23A2	NM_005116	UCUCACAAUCUGCUAUGUUU, CAAGUUACCUCAGACAGAA, GCAUGGAGUCGUACAAUUU, UAAAUUUCCUCUCCCGAUU
SLC25A27	NM_004277	GAGGUCGAAUGGUACAUUA, AAAGUGAAGAUGAGCAUUA, GAGUGACACCCGCCAUUA, UAUCAUGACUCACGGUUUA
SLC2A13	NM_052885	GGAAGUAACUAUCUUCUUU, GAAGGGAGAUAAUUGAAU, GGAAAUUGAAUCACUCUUU, CAAUUUAAGAGGCCGAUUA
SLC30A3	NM_003459	GAGCAGUAUCAGCCGGAGA, CCCUGCAGGUUCAGCAGUA, ACUCAAGCCUAAUACAA, GGGCAACCCAUGAGCUGCA
SLC36A1	NM_078483	GAAAUGUGCUCACCACUUC, CCAAUGGGACCACCAAUAA, CAACAUGGUUCCAGACCUU, GCUCCCCAUUCAUCAAAU
SLC40A1	NM_014585	GCAAAUACAUCUGUUGUUU, GGAGGGAACUCAUCUAAUG, CAAGAUACCUGAAAUUACA, CAAGAAUGCUAGACUUA
SLC43A2	NM_152346	AGGACGAGAUGCUCAAUUU, GUACCGAGCCAGAGAAUGU, UCACAGGGAAAGCAGUUCUA, GGCGGGAGGACAUGGACUA
SLC44A3	NM_152369	CGAGAAUCAUUGUCAUGUA, GGUCCUUCCUGUGUUUA, GGAAUCAUGUCGGGAAGAG, GUACGCAGCUAACCGCAU
SLC46A3	NM_181785	GGACAUAAUGUGGAUUAUU, GCUAUGAACUUCUUUAACA, GGACGAAAAAUUCCCUAUGA, GAGUGGUUCGUUUCUAAUUA
SLC4A5	NM_021196	CCACUUACCUAAAGAAA, GGAGGGAGAUUUCCGGAUCA, CAAACACAGACCAGCGGAA, GGACCCAAUAUCCGGAUU
SLC4A8	NM_004858	GAUCGGGAUGGAUUAUU, GCAUUUGCCUCCCUAAUUU, GCAAAUAGCAUAGAAGAAA, GGCCAGAACUUCAGCGCAC
SLC6A12	NM_003044	GAAGGAGACCAUUUGUAG, GGGCGGACCGUUUCUAUGA, GCACGGACUUUCUGAACCA, AUUGCAACACCUCGAGUUA
SLC7A8	NM_182728	GGACAGAGGAGGCUCUAAUGA, UCAACUACCUCUUCUAUGG, CCACGAAGGACAAGGACGU, UGGCCAUGAUCCACGUGAA
SLC8B1	NM_024959	GACCGGGUAUCUUCUAAUA, UGACUACGGUGAUGAGUAC, UACAUGAAGUGGAGAAGGA, GGACAUUCGUUUUCUACAU
Negativ-Kontrolle	(non-targeting control)	UAGCGACUAAACACAUCAA, UAAGGCUAUGAAGAGAUAC, AUGUAUUGGCCUGUAUUAG, AUGAACGUGAAUUGCUCAA

Tabelle 10: Übersicht über die (jeweils als Pool) verwendeten siRNAs mit Angabe der Sequenzen der vier verschiedenen siRNAs pro Gen.

2.8 Geräte und Laborausstattung

Gerät/Ausstattung	Modell/Größe(n)	Hersteller
CO₂-Inkubator	HERAcell 240 i	Heraeus, Hanau
CryoPure-Gefäße	1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophorese-Apparatur	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektrophorese-PowerSupply	POWER PAC 3000	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Eppis, SafeSeal	1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppis, silikonisiert	1,7 ml (Costar)	Corning, Corning, NY, USA
Geldokumentationssystem	LAS 4000 mini	Intas, Göttingen
Gewebekultur-Flaschen	T75	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Gewebekultur-Platten	24-Well; 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekultur-Platten, schwarz	96-Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Gewebekultur-Schalen	35/10	Sarstedt, Nümbrecht
Magnetständer	Magnetic Stand-96	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Mehrkanalpipette	5-100 µl	Sartorius, Göttingen
Mikroplatten-Reader	FLUOStar Omega	BMG Labtech, Ortenberg
Mikroskop	Leitz DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Multipet	plus	Eppendorf, Hamburg
Multipetten-Aufsatz	Combitips plus, 1 ml	Eppendorf, Hamburg
Multiply 8er-Kette	0,2 ml (mit Deckeln)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-System (real-time)	StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR-Platten	96-Well	4titude, Dorking, UK
PCR-Platten-Klebefolien	qPCR seal sheets	4titude, Dorking, UK
pH-Meter	FiveEasy™	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Pipetten, Research plus	0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, serologisch	2 ml; 5 ml; 10 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	0,5-20 µl; 2-20 µl; 2-200 µl; 100-1.000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, silikonisiert	1-200 µl	VWR, Ismaning
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand, Ismaning
Reagenzglasschüttler	100-2500 1/min	VWR, Ismaning

MATERIAL

Rotationsgerät	H5600	VWR, Ismaning
Schraubröhre	15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sequenziergerät (NGS)	HiSeq 1000	Illumina, San Diego, CA, USA
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS/KSP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen
Thermo-Mixer	compact	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	S220	Covaris, Woburn, MA, USA
Ultraschall-Tubes	6x16mm	Covaris, Woburn, MA, USA
Waage, Labor	PBS/PBJ	Kern, Balingen
Waage, Präzision	Pioneer™	Ohaus, Parsippany, NJ, USA
Wasserbad	AL 25	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge, groß	Rotina 420R	HettichLab, Tuttlingen
Zentrifuge, mini	Mini Star	VWR, Ismaning
Zentrifuge, Tisch	Mikro 200R	HettichLab, Tuttlingen

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Geräte und der Laborausstattung mit Angabe des Modells bzw. der Größe(n) und des Herstellers.

2.9 Software

Software	Hersteller
EndNote (Version X7.5)	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
Genomatix Mining Station (Sesame 2.4.1)	Genomatix Software GmbH, München
Genomatix Genome Analyzer (Version 3.51106)	Genomatix Software GmbH, München
GraphPad Prism (Version 6.1)	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
MARS Data Analysis Software (Version 2.41)	BMG Labtech, Ortenberg
Microsoft Office (Version 2007)	Microsoft, Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000-Software (Version 1.4.2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Omega Steuerungs-Software (Version 3.00)	BMG Labtech, Ortenberg
R (Version 3.1.2)	https://www.r-project.org/
StepOne™ Software (Version 2.1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 12: Übersicht über die verwendete Software mit Angabe des Herstellers.

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten etablierten adhärenten Gliom-Zelllinien sowie die Glioblastom-Stammzelllinien wurden bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Dem Zellkultur-Medium DMEM wurde 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertes FCS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Das Stammzell-Medium wurde hergestellt aus DMEM/Ham's F-12 Flüssigmedium (Mischung 1:1) mit stabilem Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie 2 mM L-Glutamin. Direkt vor Gebrauch wurde diesem Medium zusätzlich noch 20 % (v/v) BIT-Admixture Supplement sowie jeweils 20 ng/ml der Wachstumsfaktoren bFGF2 und EGF hinzugefügt.

Die dauerhafte Lagerung der Zelllinien erfolgte in FCS mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff.

3.1.2 Behandlung von Zelllinien mit Valproinsäure

Für die Behandlung der Zelllinien mit Valproinsäure wurde die als Pulver vorliegende Valproinsäure in steril-filtriertem destillierten Wasser gelöst und anschließend in DMEM-Medium verdünnt. Die Zellen wurden mit 7,5 mM VPA (Selokar, St John et al. 2013) für 36 h (Schmidt, Windmann et al. 2012) behandelt, wobei nach 18-20 h ein Mediumwechsel erfolgte. Zur Kontrolle einer erfolgreichen VPA-Behandlung wurde nach dem Ernten aus den Zellen RNA isoliert (siehe 3.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren) und mittels real-time qRT-PCR (siehe 3.2.4 Quantitative real-time Reverse-Transkriptase-PCR) die Expression des Zellzyklus-Kontroll-Gens *CDKN1A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) bestimmt, dessen Expressions-Steigerung in Glioblastom-Zelllinien nach der Behandlung mit einem Histon-Deacetylase-Inhibitor in der Literatur beschrieben ist (Das, Aguilera et al. 2007, Yin, Ong et al. 2007). Als Negativ-Kontrolle diente *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*), welches bereits in unbehandelten Zellen vollständig euchromatinisiert vorliegt und somit durch die Valproinsäure-Behandlung nicht verändert wird.

3.1.3 Temozolomid-Chemosensitivitäts-Assay

Für die Temozolomid-Chemosensitivitäts-Versuche (IC_{50} -Bestimmungen) wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät (500 Zellen/Well in 100 µl Medium). 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel ohne bzw. mit Valproinsäure (7,5 mM). Weitere 24 h später wurden den unbehandelten sowie den VPA-behandelten Zellen aufsteigende Konzentrationen Temozolomid zugegeben (1 µM, 16 µM, 63 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 2.000 µM, 4.000 µM, 8.000 µM). 72 h nach Temozolomid-Zugabe (Hasina, Surati et al. 2013, Ugur, Taspinar et al. 2014, Wu, Yang et al. 2014) konnte mittels Resazurin die metabolische Aktivität und damit die Vitalität der Zellen am Mikroplatten-Reader gemessen werden. Resazurin ist ein Redox-Farbstoff, der von metabolisch aktiven Zellen zu dem rot-fluoreszierenden Resofurin reduziert wird. Nach dreistündiger Inkubation erfolgte die Messung der Fluoreszenz (Anregung bei 544 nm/Emission bei 590 nm) am Mikroplatten-Reader. Zur Auswertung wurden die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten mittels der Software GraphPad Prism (Version 6.1) zunächst log-transformiert und normalisiert. Anschließend konnten mit Hilfe der Methode der linearen Regression die Dosis-Wirkungs-Kurven berechnet werden. Die Konzentration, die zu einer 50%igen Wachstums-Reduktion der Zellen (im Vergleich zu den Zellen, denen kein Temozolomid zugegeben worden war) führte, war der sog. IC_{50} -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration); bei dieser Konzentration wurde die halbmaximale inhibitorische Wirkung von Temozolomid beobachtet.

3.1.4 siRNA-Transfektion (SLC-Transporter)

Für die siRNA-Transfektionen wurde das DharmaFECTTM Transfektions-Reagens der Firma GE Healthcare Dharmacron entsprechend den Hersteller-Angaben verwendet. Dazu wurden U373MG-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät (3.000 Zellen/Well in 100 µl Medium), 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel ohne bzw. mit Valproinsäure (7,5 mM). Anschließend wurden die Zellen mit der entsprechenden siRNA (SLC-Transporter bzw. Negativ-Kontrolle) in einer Konzentration von 25 nM in Medium ohne bzw. mit VPA transfiziert. Am nächsten Tag wurde den unbehandelten sowie den VPA-behandelten Zellen Temozolomid in einer Konzentration von 1.500 µM zugegeben (was in etwa dem IC_{50} -Wert dieser Zelllinie entspricht), 72 h wurde die Aktivität der Zellen mittels Resazurin gemessen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Die Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen gemäß den Hersteller-Angaben. Für die Isolierung von DNA aus kultivierten Zellen wurde der AllPrep DNA/RNA Mini Kit der Firma Qiagen gemäß den Hersteller-Angaben verwendet.

Die Messungen der RNA- bzw. DNA-Konzentrationen sowie die Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren erfolgten am Spektrophotometer NanoDrop 2000.

3.2.2 MGMT-Methylierungsquantifizierung

Die Methylierungsquantifizierung des *MGMT*-Promoters erfolgte mittels der MethyQESD-Methodik (Bettstetter, Dechant et al. 2008). Die Methode basiert auf einer quantitativen PCR, bei der Endonuklease-resistente DNA untersucht wird. Der Methylierungs-Gehalt der DNA vor und nach Valproinsäure-Behandlung wurde jeweils in Prozent ermittelt. Als Positiv-Kontrolle (100 % Promoter-Methylierung) diente genomische DNA aus der Kolonkarzinom-Zelllinie SW48, als Negativ-Kontrolle (0 % Promoter-Methylierung) aus Blut isolierte DNA.

3.2.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus 1 µg RNA erfolgte mit Hilfe der SuperScriptTM II Reversen Transkriptase der Firma Invitrogen. Ein Ansatz (Gesamt-Volumen: 50 µl) bestand dabei aus folgenden Komponenten: 1 µg *template* RNA, DEPC-behandeltes H₂O ad 32,1 µl (→ Inkubation 5 min bei 70 °C), 10 µl 5x First Strand Buffer, 3 µl Random Hexamer Primer, 2,5 µl dNTPs (25 mM), 1 µl RNasin Plus, 0,4 µl DTT (→ Inkubation 3 min bei 42 °C) sowie 1 µl Reverse Transkriptase (→ Inkubation zunächst 50 min bei 42 °C, dann 10 min bei 80 °C). Die 42 °C im 50-minütigen Inkubations-Schritt entsprechen dem Temperatur-Optimum der Reversen Transkriptase; durch die zehnminütige Inkubation bei 80 °C wird das Enzym inaktiviert und die Reaktion abgestoppt.

3.2.4 Quantitative real-time Reverse-Transkriptase-PCR (real-time qRT-PCR)

Die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) ist eine Methode, mittels derer DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert werden können. Die PCR erfolgt klassischerweise in drei Schritten: Nach der Denaturierung (Erhitzen der doppelsträngigen DNA um die beiden Stränge voneinander zu trennen) erfolgen das *Annealing* (Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA) sowie die *Elongation* (Verlängerung/Auffüllen der fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden).

Die auf dem Prinzip der PCR basierende quantitative real-time Reverse-Transkriptase-PCR (real-time qRT-PCR) wird häufig dazu verwendet, die Expressions-Stärke eines Gens zu bestimmen. Sie wird in Gegenwart eines fluoreszierenden Farbstoffes, der doppelsträngige DNA bindet, durchgeführt. Der entstehende DNA-Farbstoff-Komplex (die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus korreliert mit der DNA-Zunahme) kann vom Thermocycler detektiert werden, wodurch eine Messung der Amplifikation in Echtzeit möglich ist. Die Anzahl der Zyklen, die notwendig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenz-Niveau zu erhalten wird als C_t - oder auch CP-Wert (*crossing point*) bezeichnet. Dieser Wert wird als Maß für die vorhandene DNA-Menge herangezogen: Je höher der C_t -Wert, desto mehr Zyklen werden benötigt, um ein adäquates Fluoreszenz-Niveau zu erreichen, d.h. desto weniger DNA war zu Beginn der PCR im Ansatz enthalten. Die qPCR wurde im StepOnePlus™ Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Bei dem PCR-Lauf handelte es sich um eine Two-Step-PCR mit 40 Zyklen (Denaturierung 5 sec bei 95 °C, *Annealing* und *Elongation* 15 sec bei 60 °C). Die Ansätze wurden in Triplets pipettiert, wobei ein Ansatz (Gesamt-Volumen: 25 µl) aus folgenden Komponenten bestand: 12,5 µl 2x SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Mix, 6 µl RNase-freies H₂O, jeweils 0,75 µl Primer (entspricht 300 nM; forward und reverse), 5 µl cDNA (1:5 verdünnt).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der StepOne™ Software (Version 2.1). Es wurde die Methode der relativen Quantifizierung gewählt. Hierbei bedient man sich direkt der C_t -Werte und berechnet mit Hilfe der 2(-ΔΔ C_t)-Methode (Delta-Delta- C_t -Methode) (Livak and Schmittgen 2001) die Expression des entsprechenden Zielgens. Zunächst musste die Genexpression an einem ubiquitär und homogen exprimierten Housekeeping-Gen (HKG), in diesem Fall *GAPDH*, normalisiert werden. Dazu wurde vom C_t -Wert des Zielgens der C_t -Wert des Housekeeping-Gens abgezogen, woraus sich der ΔC_t -Wert ergab: $\Delta C_t = C_t\text{-Wert (Zielgen)} - C_t\text{-Wert (HKG)}$. Anschließend wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert berechnet, indem vom ΔC_t -Wert der VPA-behandelten

Probe der ΔC_t -Wert der jeweiligen unbehandelten Kontroll-Probe abgezogen wurde: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (*Probe*) – ΔC_t (*Kontrolle*). Damit konnte dann der relative Expressions-Unterschied (= Ratio; entspricht der Über- bzw. verminderten Expression des Zielgens in den VPA-behandelten Zellen) mit folgender Formel errechnet werden: $Ratio = 2(-\Delta\Delta C_t)$.

3.2.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

PCR-Produkte konnten mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (2%iges Agarose-Gel) nach ihrer Größe aufgetrennt werden, um so die jeweiligen Größen der in der PCR entstandenen Fragmente zu kontrollieren. Der im Agarose-Gel enthaltene Nukleinsäure-Farbstoff RedSafe lagert sich in die doppelsträngige DNA ein, wodurch diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann; als Orientierung diente ein ebenfalls im Gel mitgelaufener DNA-Größen-Standard.

3.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) (siehe Abbildung 5) können Protein-DNA-Interaktionen untersucht werden. Dazu wurden zunächst jeweils 1 Mio. Zellen (unbehandelt bzw. VPA-behandelt) zehn Minuten in 1%iger Formaldehyd-Lösung inkubiert, was zu einer Quervernetzung der Proteine mit der DNA führte (sog. *crosslink*). Für das weitere Vorgehen wurde der Acetyl-Histone H3 Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit der Firma Merck Millipore gemäß den Hersteller-Angaben verwendet. Nach dem Zell-Aufschluss in 500 µl selbst hergestelltem Aufquell-Puffer (30 min auf Eis) und der Isolierung des Chromatins in 320 µl SDS-Lyse-Puffer konnte die DNA mittels Ultraschall-Behandlung fragmentiert werden. Dazu wurden die einzelnen Proben achtmal für jeweils 60 Sekunden unter folgenden Bedingungen mit Ultraschall behandelt: *duty cycle* 2, Intensität 5, *cpb* 100. Anschließend erfolgte ein Zentrifugations-Schritt (20 min bei 10 °C), der Überstand enthielt die fragmentierte DNA, wobei die entstandenen Fragmente idealerweise eine Größe im Zielbereich von 200-800 bp besaßen. Anschließend sorgte das sog. *preclearing* mit neun Volumenanteilen ChIP-Verdünnungs-Puffer und 60 µl Agarose-Beads pro 2 ml Probe für die Reduzierung unspezifischer Bindungen (30 min bei 4 °C). Danach erfolgte über Nacht bei 4 °C die eigentliche Immunpräzipitation mit 5 µl

spezifischem Antikörpern gegen das (als Marker für Euchromatin geltende) acetylierte Histon H3 (H3ac), ein (unspezifischer) IgG-Antikörper diente als Negativ-Kontrolle. Die DNA-Histon-Antikörper-Komplexe wurden am nächsten Tag mit Hilfe der Agarose-Beads (60 µl pro 2 ml Probe) isoliert (1 h bei 4 °C) und anschließend jeweils 5 min mit verschiedenen Waschpuffern gewaschen. Danach konnten die DNA-Histon-Antikörper-Komplexe mittels frisch hergestelltem Elutions-Puffer eluiert werden (15 min). Zum Rückgängigmachen der Quervernetzungen und zum Verdau der Proteine wurden die Proben zunächst für 5 h bei 65 °C mit NaCl (4 µl pro 100 µl Probe) und anschließend über Nacht bei 55 °C mit EDTA (2 µl pro 100 µl), Tris-HCl (4 µl pro 100 µl) sowie Proteinase K (1 µl pro 100 µl) inkubiert. Abschließend wurde die zuvor an die Histone gebundene DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (im Verhältnis Probe:Phenol:Chloroform-Isoamylalkohol (25:1) = 2:1:1) aufgereinigt (zweimal 10 min). Danach konnte die DNA mittels 30-minütiger Ethanol-Präzipitation bei -80 °C mit 1/10 Volumenanteil NaAc, 2,5 Volumenanteile 100 % EtOH sowie 1/20 Volumenanteil Glykogen extrahiert und in 110 µl TE-Puffer aufgenommen werden.

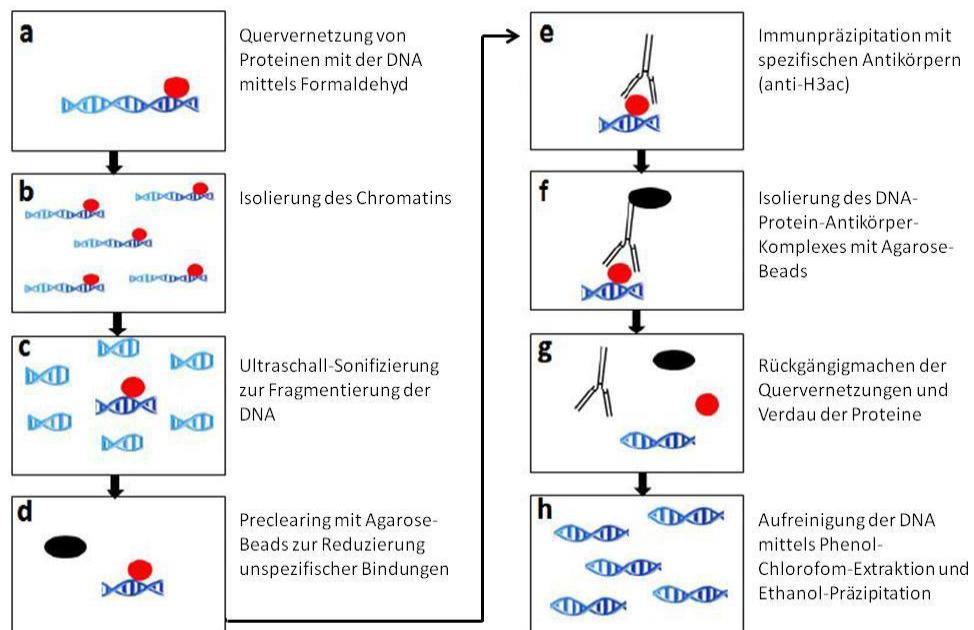


Abbildung 5: Übersicht über die ChIP-Methodik: Zunächst werden Proteine (rot) und DNA (blau) mittels Formaldehyd quervernetzt (a). Nach Isolierung des Chromatins (b) und Ultraschall-Fragmentierung der DNA (c) erfolgt ein Preclearing-Schritt mit Agarose-Beads (schwarz) (d), bevor anschließend die Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern stattfindet (e). Dann kann der DNA-Protein-Antikörper-Komplex mit Hilfe der Agarose-Beads isoliert werden (f) und die DNA wird nach Rückgängigmachen der Quervernetzungen (g) aufgereinigt und eluiert (h). Abbildung nach (Schmidt 2011).

Mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (2%iges Agarose-Gel) konnte die Ultraschall-Sonifizierung kontrolliert werden. Erfolgreich fragmentierte DNA lieferte im Gel einen Schmier mit dem hellsten Bereich zwischen 200 und 800 bp. Im Gegensatz dazu waren die Kontroll-Proben von vor der Ultraschall-Behandlung als jeweils eine einzelne etwas dickere Bande im Agarose-Gel sichtbar.

3.2.7 Next-Generation Sequencing (NGS)

Die an eine Chromatin-Immunpräzipitation anschließende Sequenzierung (sog. **ChIP-Seq**) ist eine Methode, die es ermöglicht, mittels *high-throughput*-Sequenzierung von zuvor immunpräzipitierter DNA Histon-gebundene Gen-Promotoren zu identifizieren. Indem unbehandelte mit Valproinsäure-behandelten Proben verglichen werden, lassen sich Gene ermitteln, deren Promotoren durch die Behandlung der Zellen mit Valproinsäure angereichert wurden.

Auch RNA von unbehandelten sowie VPA-behandelten Zellen kann im Hochdurchsatz-Verfahren sequenziert werden (sog. **RNA-Seq**), um Aussagen über die Auswirkungen der Valproinsäure-Behandlung auf Genexpressions-Ebene treffen zu können.

3.2.7.1 Herstellung der Libraries

Zur Herstellung der für die Sequenzierung notwendigen Libraries aus immunpräzipitierter DNA wurde der TruSeq ® ChIP Sample Preparation Kit der Firma Illumina entsprechend den Hersteller-Angaben verwendet. In einem ersten Schritt wurden dabei die DNA-Überhänge, die im Zuge der Chromatin-Immunpräzipitation bei der Fragmentierung der DNA entstanden waren, zu glatten Enden umgewandelt. Mittels der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Enzym-Mixes wurden die 3'-Überhänge entfernt, während die 5'-Überhänge mittels einer Polymerase aufgefüllt wurden. Anschließend wurden einzelne „A“-Nukleotide an die nun geraden 3'-Enden der DNA-Fragmente angehängt. Im nächsten Schritt wurden Adaptoren, die ein entsprechendes „T“-Nukleotid an ihrem 3'-Ende tragen, an die DNA-Stücke ligiert, um diese für die Hybridisierung auf die *flow cell* vorzubereiten. Dabei erhielt jede zu untersuchende Probe ihren eigenen Adapter-Index, um zu gewährleisten, dass die einzelnen Sequenzen nach der Sequenzierung voneinander unterschieden werden können. Anschließend wurden die Produkte

der Ligations-Reaktion auf einem Agarosegel aufgetrennt und ein wenige Millimeter großes Gel-Stück, das die DNA-Fragmente der gewünschten Größe enthielt, wurde ausgeschnitten. Adaptoren, die nicht gebunden hatten, sowie Adapter-Dimere wurden somit beseitigt. Im Anschluss daran wurden noch gezielt nur diejenigen ausgeschnittenen DNA-Fragmente, die Adapter-Moleküle an beiden Enden trugen, mittels PCR amplifiziert.

Aus der aus unbehandelten sowie Valproinsäure-behandelten Zellen isolierten RNA wurden mittels des TruSeq ® RNA Sample Preparation Kit v2 der Firma Illumina gemäß den Hersteller-Angaben die Libraries für die RNA-Seq hergestellt. Dabei wurde die mRNA zunächst aufgereinigt, fragmentiert und für die nachfolgende cDNA-Synthese vorbereitet. Anschließend erfolgte das Umschreiben der RNA-Fragmente mittels Reverser Transkriptase in einzelsträngige cDNA. Danach wurde das RNA *template* entfernt und es wurde ein entsprechender „Ersatz“-Strang synthetisiert, um doppelsträngige cDNA zu generieren. Die „Reparatur“ der DNA-Enden, das Anhängen von „A“-Nukleotiden und die Adapter-Ligation an die Enden der cDNA für die Hybridisierung der Proben auf der *flow cell* erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie bei der Erstellung der ChIP-Seq Libraries. Auch hier folgte mittels PCR eine spezifische Amplifikation der DNA-Fragmente mit Adapter-Molekülen an beiden Seiten.

3.2.7.2 Sequenzierungs-Vorgang

Die Sequenzierung erfolgte in einer Core Facility am Regensburger Campus im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) auf dem Sequenzergerät HiSeq 1000 der Firma Illumina. Alle Libraries wurden zunächst mit Hilfe des KAPA SYBR FAST ABI Prism Library Quantification Kit der Firma Kapa Biosystems (Wilmington, MA, USA) quantifiziert. Äquimolare Mengen einer jeden Library wurden anschließend entsprechend ihrer Adapter-Sequenzen gepoolt, auf die *flow cell* geladen und sequenziert (*single read*, 50 bp Sequenzertiefe). Die erhaltenen .bcl-Dateien wurden mittels der Software CASAVA 1.8.2 in .fastq-Dateien umgewandelt.

3.2.7.3 Daten-Analyse

Die Auswertung der NGS-Daten erfolgte mit Hilfe der Genomatix-Software. Zunächst wurden die vom KFB zur Verfügung gestellten fastq.-Dateien in die Genomatix Mining Station (GMS, Sesame 2.4.1) importiert und dort aufs menschliche Genom (hg19) gemappt, wobei die

METHODEN

Annotation auf ElDorado 12-2012 basierte. ElDorado ist die Genom-Annotation von Genomatix, die auf öffentlich zugänglichen Referenz-Genomen von 33 verschiedenen Organismen beruht.

Anschließend wurden alle *unique hits* in der Analyse-Software Genomatix Genome Analyzer (GGA, Version 3.51106) weiter verarbeitet. Zur Analyse der Chip-Seq-Daten wurden die Programme „*ChIP-Seq Workflow*“ und „*GenomeInspector*“ (Quandt, Grote et al. 1996) verwendet. Dabei wurden die Zelllinien zunächst mittels des Audic-Claverie-Algorithmus einem paarweisen Vergleich (unbehandelt vs. VPA-behandelt für jede Zelllinie separat) unterzogen, um Regionen zu detektieren, die durch die Valproinsäure-Behandlung eine signifikante Zunahme ($p<0.01$) an acetyliertem Histon H3 erfahren hatten. Dieser Algorithmus bestimmt zunächst anhand der Kontroll-Probe (unbehandelt) für jede genomische Region die Wahrscheinlichkeit für die Anzahl der minimal bzw. maximal zu erwartenden *reads*. Anschließend wird die in der Input-Probe (VPA-behandelt) gemessene Anzahl an *reads* mit diesen Werten verglichen (Audic and Claverie 1997). Der dabei ermittelte Wert entscheidet dann, ob der für den p-Wert angegebene Schwellenwert ($p<0.01$) erreicht bzw. unterschritten wird. Zusätzlich wurde als Grenzwert festgelegt, dass die VPA-behandelten Proben im Vergleich zu den Kontroll-Proben mindestens doppelt so viele *reads* enthalten mussten (entspricht dem Festlegen des Fold Change-Schwellenwertes ≥ 2). Die so identifizierten angereicherten Regionen wurden dann mit bekannten definierten Promotoren abgeglichen, um euchromatinisierte Regionen mit Promoter-Korrelation (jeweils von -1.000 bis 0 Basenpaare relativ zum Transkriptionsstart des entsprechenden Gens) zu identifizieren.

Die RNA-Seq-Daten wurden mittels des Programms „*Expression Analysis for RNA-Seq*“ analysiert, um Listen von Genen zu generieren, die nach der VPA-Behandlung signifikant hochreguliert worden waren ($p<0.01$). Dazu wurden die Zelllinien ebenfalls mit Hilfe des Audic-Claverie-Algorithmus einem paarweisen Vergleich unterzogen, um differziell exprimierte Gene (Fold Change ≥ 2) zu identifizieren.

In einem abschließenden Analyse-Schritt konnten über das Programm „*List comparison*“ diejenigen Gene detektiert werden, die beides – sowohl eine signifikante Anreicherung der an acetylierte Histone H3 gebundenen Promoter-DNA, als auch eine signifikant erhöhte Expression auf mRNA-Ebene – aufwiesen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Färbungen können Proteine in Zellen oder Geweben sichtbar gemacht werden, indem sie mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Hirntumor-Schnitte von Patienten, die Valproinsäure erhalten hatten, gefärbt. Es wurde die Expression zweier SLC-Transporter (SLC17A7 und SLC25A27) jeweils vor und unter (bzw. nach) Valproinsäure-Behandlung untersucht.

Zunächst wurden die in Paraffin fixierten Schnitte mittels einer absteigenden Alkohol-Reihe entparaffiniert (2x 10 min Xylol, 2x 2 min 100 % EtOH, 2x 2 min 96 % EtOH, 1x 2 min 70 % EtOH), um die Antigene für die Immunfärbung zugänglich zu machen. Anschließend sorgte das 20-minütige Kochen der Schnitte in Zitronensäure-Puffer dafür, dass die Quervernetzungen der Proteine gelöst und somit die Antigene aufgeschlossen wurden.

Nach dem Abkühlen (in PBS-Tween) wurden die Schnitte in eine Färbe-Kammer gelegt und es wurde mit einem Fett-Stift ein Kreis um das zu färbende Gewebe gezogen. Anschließend erfolgte die Immunfärbung der vorbehandelten Schnitte mit Hilfe des EnVisionTM+ Dual Link System-HRP Kits der Firma Dako gemäß den Hersteller-Angaben. Nach zehnminütigem Blocken mit der „*Dual Endogenous Enzyme Block*“-Lösung (1-2 Tropfen), wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl der beiden 1:100 verdünnten Primär-Antikörper (anti-SLC17A7 und anti-SLC25A27) für 45 min inkubiert. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation mit der „*Labelled Polymer HRP*“-Lösung (1-2 Tropfen) sowie eine (exakt) zweiminütige Inkubation mit etwa 100 µl der DAB+-Lösung, die zuvor frisch hergestellt worden war aus 1 ml DAB+-Substrat-Puffer sowie einem Tropfen des DAB+-Chromogens.

Im Anschluss an die Färbungen mit den anti-SLC-Transporter-Antikörpern wurden die Schnitte für fünf Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt, um die Zellkerne besser sichtbar zu machen, und mittels einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (2x 2 min 96 % EtOH, 2x 2 min 100 % EtOH, 2x 10 min Xylol) fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Schnitte mit Hilfe des Eindeckmittels Entellan eingedeckelt.

3.4 Bioinformatische Methoden

3.4.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis* = PCA) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik und dient der strukturierten Darstellung und Veranschaulichung komplexer Datensätze (Jolliffe and Cadima 2016). Als Grundlage für diese Analyse, mit der überprüft wurde, ob sich die unbehandelten von den Valproinsäure-behandelten Zelllinien anhand ihres Genexpressions-Musters unterscheiden, dienten die 1.800 meist-variabelsten Genen, die von der Genomatix-Software erkannt wurden. Für die Erstellung eines PCA-Plots wurden die RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*)-Werte benötigt, die für jedes Gen als arithmetischer Mittelwert über alle RPKM-Werte der Transkripte, die einem Gen zugeordnet wurden, ausgerechnet wurden. Die RPKM-Werte der einzelnen untersuchten Proben wurden in einer Liste zusammengestellt und anschließend dazu genutzt, mit Hilfe des R-basierten Pakets *ggbiplot* eine graphische Darstellung (sog. *biplot*) zu erstellen.

3.4.2 GO term Analyse

Die Identifizierung angereicherter biologischer Begriffe (sog. *GO terms*) wurde mit Hilfe der DAVID-Datenbank (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) wie von Huang da et al. beschrieben durchgeführt (Huang da, Sherman et al. 2009). Dabei wurde zunächst die Liste mit 497 signifikant hochregulierten Genen nach Valproinsäure-Behandlung für die Analyse importiert. Anschließend wurde die passende Hintergrund-Spezies (*Homo sapiens*) gewählt; auch wurde angegeben, nach der Anreicherung welcher *GO terms* (*biological process*, *cellular component* und/oder *molecular function*) in der importierten Liste gesucht werden soll. Nach Auswahl der *functional annotation chart* wurden diejenigen *GO terms* angezeigt, die in der zuvor importierten Liste angereichert vorlagen, sortiert nach ihrem global korrigierten p-Wert, der für die Anreicherung eines jeden *GO terms* berechnet wurde. Außerdem konnten genau die Gene, die in den angereicherten *GO terms* enthalten waren, angezeigt werden.

3.4.3 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Mittels einer *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern>) konnte ermittelt werden, ob ein *a priori* definiertes Set an Genen in einer Untergruppe (unbehandelte vs. Valproinsäure-behandelte Zelllinien) über- oder unterrepräsentiert vorlag (Subramanian, Tamayo et al. 2005). Dabei wurden sowohl die signifikant regulierten SLC-Transporter als auch verschiedene Gruppen von DNA-Reparatur-Genen analysiert (Yoshimoto, Mizoguchi et al. 2012). Tabelle 13 zeigt die in den analysierten Gen-Sets enthaltenen Gene.

Im Gegensatz dazu können mittels einer *single sample Gene Set Enrichment Analysis* (ssGSEA) Zelllinien (unbehandelt oder Valproinsäure-behandelt) einzeln bezüglich bestimmter Gen-Gruppen, beispielweise den Signatur-Genen der molekularen Glioblastom-Subtypen, analysiert werden. Dabei wurde ermittelt, welche der importierten, von Verhaak et al. definierten Gen-Signaturen (Verhaak, Hoadley et al. 2010) in einer (unbehandelten) Zelllinie vorherrscht und ob sich diese Einteilung in eine Glioblastom-Untergruppe möglicherweise durch die Valproinsäure-Behandlung verändert.

Name des Gen-Sets	enthaltene Gene
SLC-Transporter	SLC17A7, SLC25A27, SLC30A3, SLC6A12, SLC44A3, SLC4A5, SLC8B1, SLC46A3, SLC12A6, SLC23A2, SLC2A13, SLC36A1, SLC40A1, SLC43A2, SLC4A8, SLC7A8
Doppelstrangbruch-Reparatur	BLM, BRCA1, BRCA2, CHEK1, DMC1, FEN1, H2AFX, HUS1, LIG1, LIG4, MDC1, MLH1, MRE11A, NBN, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54L, RPA1, TP53BP1, XRCC2, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6
Mismatch-Reparatur	ABL1, EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PCNA, PMS1, PMS2, POLD3, TP73, TREX1
Basenexzisions-Reparatur	ADPR1, APEX1, APEX2, CCNO, FEN1, LIG1, LIG3, MBD4, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, PCNA, PNKP, POLB, RPA1, SIRT1, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1
Nukleotidexzisions-Reparatur	ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, NTHL1, OGG1, PCNA, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SIRT1, SLK, TP53, XAB2, XPA, XPC, XPD

Tabelle 13: Übersicht über die in den analysierten Gen-Sets enthaltenen Gene für die Gene Set Enrichment-Analyse. Es wurden SLC-Transporter sowie verschiedene Gruppen von DNA-Reparatur-Genen analysiert.

3.5 Andere statistische Methoden

Weitere statistische Analysen und Auswertungen im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgten mit Hilfe der Programme Microsoft Office Excel (Version 2007) oder GraphPad Prism (Version 6.1).

P-Werte von $p<0.05$ (*) bzw. $p<0.01$ (**) wurden jeweils als statistisch signifikant angesehen.

Für die Berechnungen der IC_{50} -Werte wurde der zweiseitige studentsche T-Test angewandt, bei den Berechnungen bezüglich der Signifikanz der siRNA-Knockdown-Experimente der einseitige studentsche T-Test. Bei der Ermittlung signifikant angereicherter *GO terms* kam der Exakte Test nach Fisher zum Einsatz. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde bei den Auswertungen bezüglich der molekularen Klassifikation der Zelllinien angewandt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Funktionelle Effekte der Valproinsäure-Behandlung

4.1.1 Re-Expression des Zellzyklus-Kontroll-Gens CDKN1A

Zur Kontrolle der 36-stündigen Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure wurde zunächst die Expression des Zellzyklus-Kontroll-Gens *CDKN1A* bestimmt. Die in Abbildung 6 dargestellten Werte ergeben sich aus der Normalisierung der erhaltenen *CDKN1A*-Expressions-Werte auf das Housekeeping-Gen *GAPDH*. Abgesehen von zwei Ausnahmen (U87MG und NCH660h), in denen es nur zu einer schwachen Re-Expression kommt, zeigen alle Zelllinien mindestens eine Verdopplung der *CDKN1A*-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen (CTRL). Einige Zelllinien zeigen einen mehr als zehnfachen Expressions-Anstieg, in der Zelllinie NCH421k kommt es sogar zu einem über 100-fachen Anstieg der Genexpression nach VPA-Behandlung.

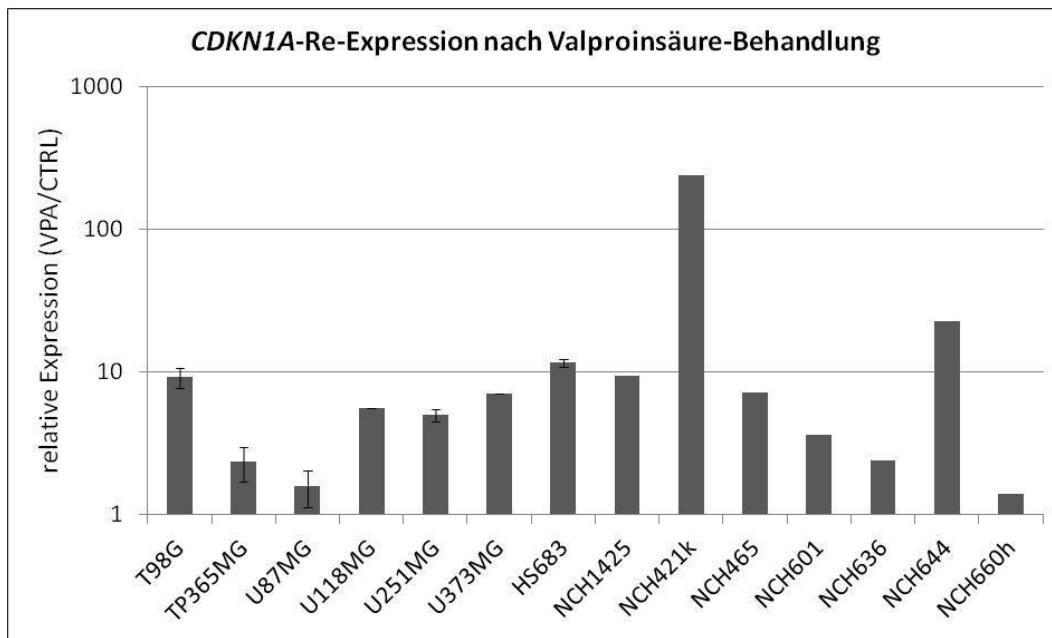


Abbildung 6: Expressions-Level des Zellzyklus-Kontroll-Gens *CDKN1A* nach Behandlung der adhärenten Zelllinien sowie der Stammzelllinien mit Valproinsäure. Die auf einer logarithmischen Skala dargestellten Fold Change-Werte ergeben sich aus der Normalisierung auf *GAPDH* und im Vergleich mit den jeweils unbehandelten Kontroll-Zellen (CTRL), deren *CDKN1A*-Expressions-Werte jeweils gleich 1 gesetzt wurden.

4.1.2 Sensitivierung für Temozolomid

Um einen Eindruck über die Auswirkungen der Valproinsäure-Behandlung auf die Zelllinien in funktioneller Hinsicht zu gewinnen, wurden Temozolomid-Chemosensitivitäts-Versuche durchgeführt. Dazu wurden in den sieben klassischen adhärenten Zelllinien sowie in vier der sieben Stammzelllinien die IC₅₀-Werte vor und nach VPA-Behandlung bestimmt (siehe Abbildung 7). Drei Stammzelllinien (NCH1425, NCH601 und NCH636) waren sehr empfindlich gegenüber der für den Versuchs-Aufbau unerlässlichen Vereinzelung. Aufgrund ihrer schwierigen Handhabung waren sie deshalb nicht für diese funktionellen Versuche geeignet und wurden von den Analysen ausgeschlossen.

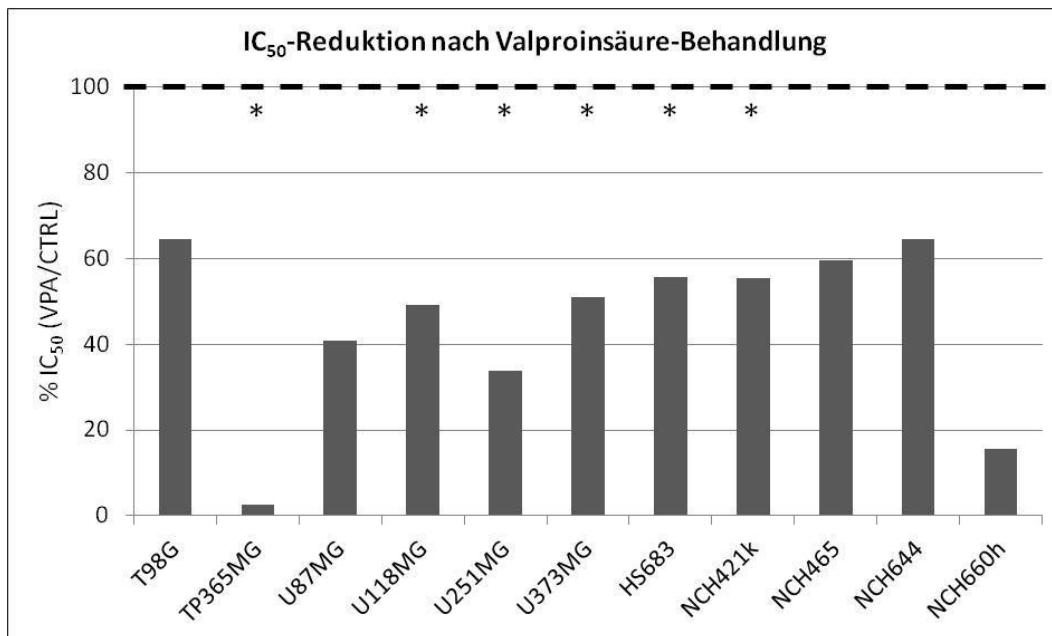


Abbildung 7: Reduktion der IC₅₀-Werte nach Behandlung der Zelllinien mit Valproinsäure. Alle sieben adhärenten Zelllinien sowie die vier untersuchten Stammzelllinien zeigen eine Sensitivierung für Temozolomid. *p<0.05 (zweiseitiger t-Test) in mindestens einem Experiment; die Ergebnisse wurden in einem zweiten unabhängigen Experiment reproduziert.

Alle untersuchten Zelllinien zeigen eine deutliche Reduktion ihrer IC₅₀-Werte nach VPA-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen (CTRL), die Zellen werden also für Temozolomid sensitiviert. In sechs der elf Zelllinien (TP365MG, U118MG, U251MG, U373MG, HS683 und NCH421k) kommt es zu einer statistisch signifikanten Sensitivierung der

Zellen in mindestens einem der beiden unabhängig durchgeführten Experimente. Graphisch betrachtet lässt sich diese Sensitivierung durch die Linksverschiebung der IC_{50} -Kurven beobachten, exemplarisch dargestellt für die adhärente Zelllinie U118MG (siehe Abbildung 8a) sowie für die Stammzelllinie NCH421k (siehe Abbildung 8b).

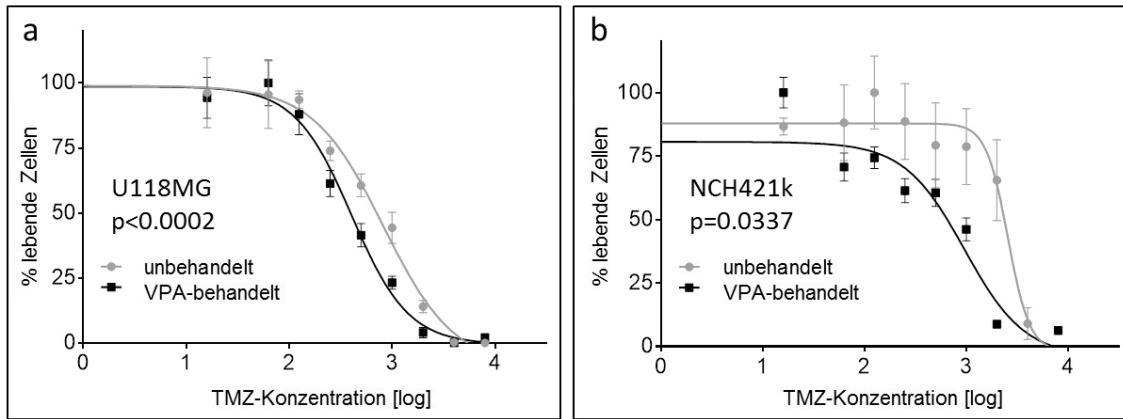


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Temozolomid (TMZ)-Sensitivierung durch Valproinsäure für die Zelllinien U118MG (a) und NCH421k (b). Durch die Valproinsäure-Behandlung kommt es zu einer Linksverschiebung der IC_{50} -Kurven, die Zellen werden für Temozolomid sensitiviert.

4.1.3 Reduktion der Proliferationsrate

Neben der Chemosensitivität wurde ausgehend von den Proliferations-Werten der Zellen, die kein Temozolomid erhalten hatten, auch die Proliferation der einzelnen Zelllinien nach Valproinsäure-Behandlung berechnet (siehe Abbildung 9). Hierbei zeigt sich, dass es im Großteil der Zelllinien zu einer deutlichen Herunterregulation der Proliferationsrate nach VPA-Behandlung kommt. Alle klassischen adhärenten Glioblastom-Zelllinien (T98G, TP365MG, U87MG, U118MG, U251MG, U373MG) weisen eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation um mindestens 20 % auf. In den vier untersuchten Stammzelllinien hingegen ist der Effekt nicht so deutlich zu beobachten, in einer Zelllinie (NCH66h) kommt es durch die VPA-Behandlung sogar zu einer gesteigerten Proliferation. Insgesamt betrachtet kann man jedoch sagen, dass die Valproinsäure-Behandlung neben einer Reduktion der IC_{50} -Werte – was einer Sensitivierung der Zellen für Temozolomid entspricht – insgesamt auch zu einer Reduktion der Proliferation führt.

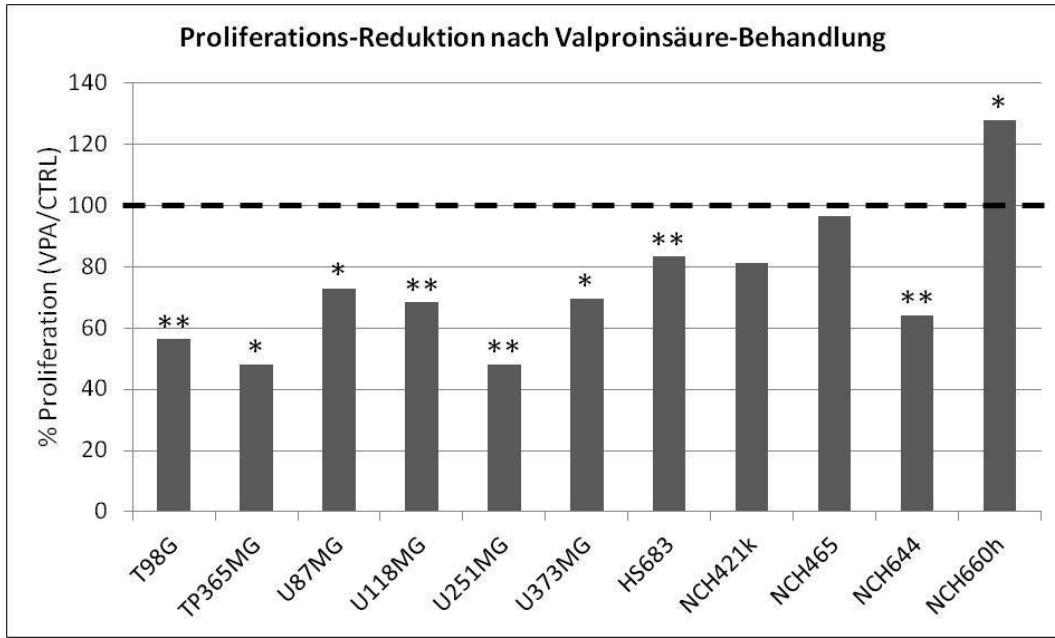


Abbildung 9: Reduktion der Proliferation nach Behandlung der Zellen mit Valproinsäure. Nahezu alle Zelllinien zeigen eine statistisch signifikante Herunterregulation der Proliferation nach VPA-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen (CTRL); einzige Ausnahme bildet die Zelllinie NCH660h, in der es zu einer gesteigerten Proliferation nach VPA-Behandlung kommt. ** $p<0.01$, * $p<0.05$ (zweiseitiger t-Test); die Ergebnisse konnten in einem zweiten unabhängigen Experiment reproduziert werden.

4.2 Next-Generation Sequencing (NGS)-Auswertungen

4.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Um einen ersten globalen Eindruck über die Auswirkungen der Valproinsäure-Behandlung auf die Zelllinien zu erhalten, wurde – basierend auf den RNA-Seq-Daten aller unbehandelten und Valproinsäure-behandelten Zelllinien – eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (siehe Abbildung 10). Basis dieser Darstellung sind die Top 1.800 variabelsten Gene, berechnet auf Grundlage der mittleren RPKM-Werte. Entlang PC1 trennen sich die Zelllinien nach ihrer Art auf, d.h. die adhärenten Zelllinien befinden sich links (einer imaginären Linie), die Stammzelllinien rechts (davon). Die Stammzelllinie NCH1425 ordnet sich relativ nahe an die adhärenten Zelllinien, was die Tatsache widerspiegelt, dass diese Zellen eher adhärent und nicht in den für Stammzellen typischen Sphären wachsen. Entlang PC2 trennen sich alle Zelllinien ausnahmslos so auf, dass die unbehandelten stets unterhalb der Valproinsäure-behandelten Proben zu finden sind. Die Beobachtung, dass dieser „Shift“ (nach oben) in allen Zelllinien

ERGEBNISSE

gleichermaßen zu beobachten ist (siehe Pfeile in Abbildung 10), lässt darauf schließen, dass die Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor in allen Zelllinien den gleichen bzw. einen vergleichbaren Effekt auf die Genexpression zu haben scheint. Außerdem stellt dieser Befund eine weitere gute Qualitätskontrolle für die erfolgreiche Valproinsäure-Behandlung in den Zelllinien dar.

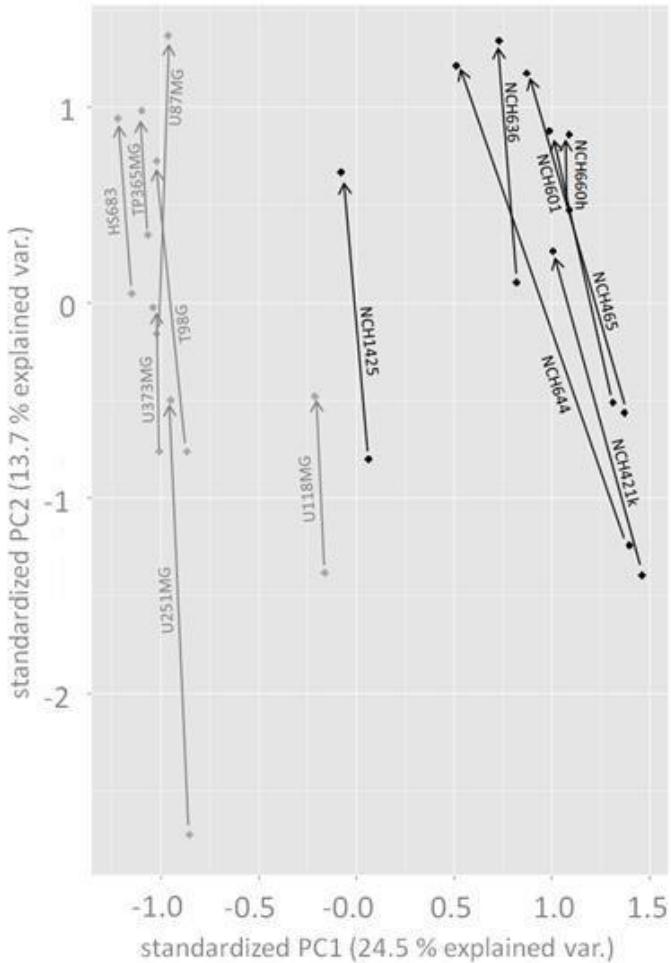


Abbildung 10: Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis = PCA). Der Plot bildet die Objekte (14 Zelllinien, jeweils unbehandelt und VPA-behandelt) in einem Raum der Linearkorrelationen der Gene ab. Entlang PC1 ordnen sich die Zelllinien entsprechend ihres „Ursprungs“, die adhärenten Zelllinien (hellgrau) links, die Stammzelllinien (dunkelgrau) rechts. Entlang PC2 erfolgt die Auf trennung für jede einzelne Zelllinie in unbehandelt (weiter unten) und VPA-behandelt (weiter oben). Die Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor scheint in allen Zelllinien einen sehr ähnlichen Effekt auf die Genexpression zu haben.

4.2.2 Auswertungen mit der Genomatix-Software

Im Anschluss an die Hauptkomponentenanalyse wurden die RNA-Seq-Daten sowie die ChIP-Seq-Daten mit Hilfe verschiedener Analyse-Programme des Genomatix Genome Analyzers ausgewertet.

4.2.2.1 RNA-Seq

Bei der Auswertung der RNA-Seq-Daten wurden die Zelllinien einem paarweisen Vergleich unterzogen, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren. Es ergeben sich für jede Zelllinie einige tausende Gene, die durch die VPA-Behandlung signifikant hochreguliert werden (siehe Tabelle 14). Dabei nimmt bei gleichbleibendem p-Wert ($p<0.01$) die Anzahl der hochregulierten Gene mit steigendem Fold Change (FC)-Schwellenwert ab. Bei einem Fold Change ≥ 2 ergeben sich im Mittel etwa 3.700 hochregulierte Gene, während bei einem Fold Change ≥ 5 nur noch durchschnittlich 1.700 Gene eine signifikante Expressions-Steigerung aufweisen. Da sich die nachfolgenden Analysen nicht nur auf Gene beschränken sollten, die ausnahmslos in allen 14 Zelllinien reguliert werden (siehe Zeile „in allen 14 ZL“), sind unter dem Begriff „in Mehrheit“ diejenigen Gene dargestellt, die durch die Valproinsäure-Behandlung in der Mehrheit der Zelllinien, d.h. in mindestens vier der sieben adhärenten Zelllinien und zugleich in mindestens vier der sieben Stammzelllinien, hochreguliert werden. Tabelle 17 zeigt die 497 Gene, die in der Mehrzahl der Zellen mit einem Fold Change ≥ 5 signifikant hochreguliert werden.

4.2.2.2 ChIP-Seq

Bei der Auswertung der ChIP-Seq-Daten sollten Gene identifiziert werden, deren Promotor-Regionen durch die Valproinsäure-Behandlung signifikant angereichert wurden. Der ebenfalls paarweise Vergleich liefert für jede Zelllinie zunächst einige hunderttausend Regionen, die durch die VPA-Behandlung eine signifikante Zunahme ($p<0.01$) an acetyliertem Histon H3 erfahren haben (siehe Tabelle 15). Beim Abgleich dieser angereicherten Regionen mit bekannten definierten Promotoren ergeben sich für jede Zelllinie immer noch einige zehntausend euchromatinisierte Regionen mit Promoter-Korrelation (jeweils von -1.000 bis 0 Basenpaare relativ zum Transkriptionsstart des entsprechenden Gens).

ERGEBNISSE

Zelllinie	Anzahl der hochregulierten Gene			
	p<0.01, FC ≥ 2	p<0.01, FC ≥ 3	p<0.01, FC ≥ 4	p<0.01, FC ≥ 5
T98G	3.234	2.183	1.753	1.508
TP365MG	3.284	2.202	1.795	1.572
U87MG	3.780	2.631	2.127	1.813
U118MG	4.149	2.855	2.281	1.952
U251MG	5.532	3.752	2.871	2.362
U373MG	3.095	2.159	1.769	1.524
HS683	2.719	1.800	1.461	1.271
NCH1425	3.658	2.461	1.965	1.677
NCH421k	4.196	3.000	2.516	2.234
NCH465	3.375	1.990	1.449	1.176
NCH601	4.147	2.889	2.325	2.032
NCH636	2.653	1.686	1.288	1.076
NCH644	4.863	3.356	2.771	2.441
NCH660h	3.278	2.111	1.678	1.434
in allen 14 ZL	172	66	47	36
in Mehrheit	1.607	863	623	497

Tabelle 14: Die Auswertung der RNA-Seq-Daten liefert für jede Zelllinie eine bestimmte Anzahl an signifikant hochregulierten Genen (p<0.01) nach Valproinsäure-Behandlung. Mit steigendem Fold Change (FC)-Schwellenwert nimmt die Anzahl der signifikant regulierten Gene ab.

Zelllinie	Anzahl der angereicherten Regionen (p<0.01)	Promoter-Korrelationen
		(-1000 bis 0 bp)
T98G	78.539	7.578
TP365MG	586.695	39.909
U87MG	759.187	53.630
U118MG	533.322	33.245
U251MG	130.235	9.973
U373MG	1.008.547	60.082
HS683	630.964	42.730
NCH1425	103.423	5.064
NCH421k	577.244	25.497
NCH465	201.424	14.905
NCH601	555.889	35.143
NCH636	441.038	31.005
NCH644	453.295	27.450
NCH660h	725.521	48.981

Tabelle 15: Die Auswertung der ChIP-Seq-Daten liefert für jede Zelllinie eine bestimmte Anzahl an signifikant angereicherten Regionen (p<0.01) nach Valproinsäure-Behandlung, sowie die mit diesen Regionen korrelierenden Gen-Promotoren.

4.2.2.3 Kombinierte Analyse

In einem abschließenden Analyse-Schritt wurden die Listen an signifikant hochregulierten Genen (mRNA-Ebene) mit der Liste an signifikant angereicherten Promoter-Regionen (ChIP-DNA-Ebene) miteinander verglichen, um so Gene zu identifizieren, die beides – nämlich sowohl eine erhöhte Expression als auch eine Anreicherung der an acetylierte Histone H3 gebundener Promoter-DNA – aufweisen. Dabei nimmt, analog zur RNA-Seq-Analyse, die Anzahl der signifikant regulierten Gene ($p<0.01$) mit steigendem Fold Change-Schwellenwert ab (siehe Tabelle 16). Auch hier sind in der Zeile „in Mehrheit“ diejenigen Gene dargestellt, die in der Mehrheit der Zelllinien (d.h. in mindestens vier der sieben adhärenten Zelllinien und zugleich in mindestens vier der sieben Stammzelllinien) reguliert werden. In Tabelle 17 sind innerhalb der 497 auf mRNA-Ebene hochregulierten Gene ($p<0.01$, $FC \geq 5$) diejenigen 87 Gene grau unterlegt, die darüber hinaus auch eine signifikante Promoter-DNA-Anreicherung zeigen.

Zelllinie	Anzahl der hochregulierten Gene mit Promoter-DNA-Anreicherung			
	$p<0.01, FC \geq 2$	$p<0.01, FC \geq 3$	$p<0.01, FC \geq 4$	$p<0.01, FC \geq 5$
T98G	802	499	380	310
TP365MG	2.038	1.324	1.067	929
U87MG	2.570	1.723	1.375	1.178
U118MG	2.356	1.588	1.269	1.085
U251MG	1.953	1.289	954	769
U373MG	2.240	1.536	1.253	1.086
HS683	1.811	1.161	920	793
NCH1425	530	352	262	212
NCH421k	1.833	1.246	1.030	915
NCH465	1.294	731	517	413
NCH601	2.501	1.724	1.359	1.181
NCH636	1.512	921	687	566
NCH644	2.647	1.762	1.421	1.245
NCH660h	2.217	1.395	1.105	940
in Mehrheit	379	178	114	87

Tabelle 16: Die kombinierte Analyse der RNA-Seq- und der ChIP-Seq-Daten liefert Gene, die eine Expressions-Steigerung und zugleich eine Anreicherung an Promoter-DNA aufweisen. Mit steigendem Fold Change (FC) nimmt die Anzahl der signifikant regulierten Gene ($p<0.01$) ab.

ERGEBNISSE

ABCA7	CALB2	CYP2S1	FCHO1	KCNC3	MAT1A	PITX3	SERPINA5	SYT2
ABCB1	CALCRL	CYP46A1	FGFR4	KCNH3	MB	PKD1L2	SERPING1	SYT5
ABCD2	CALN1	CYP4F11	FHAD1	KCNH7	MFAP3L	PLAC2	SERPIN1I	SYT7
ABCGL	CAMSAP3	CYP4F12	FILIP1	KCNJ9	MICB	PLCL1	SH2D3A	TCEAL2
ABCG4	CAPN6	CYP4F22	FLJ25758	KCNK13	MLXIPL	PLCXD2	SH2D3C	TEX19
ABLIM1	CASC1	D4S234E	FLJ34208	KCNK15	MMP17	PLD1	SH3GL2	TJP3
ABLIM2	CASZ1	DBC1	FLJ41200	KCNK9	MMP28	PLIN4	SHH	TLL2
ACAP1	CCDC108	DCDC1	FLJ43390	KCNN1	MMP9	PMEL	SHISA7	TMCC2
ACHE	CCDC110	DCT	FSTL5	KCNN3	MORN5	PPL	SLC12A8	TMEM108
ACSL6	CCDC148	DEC1	FXYD7	KDMSB-AS1	MPP7	PPM1J	SLC16A12	TMEM130
ACSM3	CCDC153	DENND2C	GABRA2	KIAA0319	MRVII-AS1	PPP1R16B	SLC17A7	TMEM132B
ACVR1C	CCDC63	DENND3	GABRB2	KIAA1324	MTUS1	PPP2R2C	SLC25A27	TMEM151A
ADRB2	CCDC64	DEPTOR	GABRQ	KIAA1683	MTUS2	PPP4R4	SLC2A4	TMEM232
AGTR1	CCDC69	DES	GAL3ST1	KIAA1755	MUC3A	PRAP1	SLC30A3	TMEM59L
AIM1L	CCK	DGKB	GALNTL1	KIF21B	MUC3B	PRKCG	SLC44A3	TMEM63C
ALOXE3	CCNA1	DGKG	GCK	KIRREL2	MYCT1	PRSS3	SLC45A1	TMEM74
ALPL	CCNB3	DHH	GOLGA7B	KIT	MYO18B	PRSS35	SLC4A10	TMEM86A
ALS2CL	CD24	DHRS2	GPC5	KLK4	MYOZ2	PSD	SLC4A5	TMEM92
ANKRD1	CD40	DISP2	GPR143	KRT17	MYZAP	PTCHD2	SLC4A8	TMPRSS9
ANKRD24	CDA	DLGAP3	GPR4	LAMC3	NAPI1L2	PTPRH	SLC6A1	TNFRSF9
ANO4	CDC20B	DLX3	GPRC5A	LAT2	NAPI1L3	PTPRN	SLC6A12	TNNI3
AQP3	CDH15	DLX4	GRB14	LDHD	NCCRP1	PTPRU	SLC6A17	TRNP1
ARHGAP26	CDH23	DMKN	GRIA2	LGI3	NCKAP1L	RAB37	SLC7A3	TSPAN33
ARHGAP30	CDK18	DNAAF1	GRIN1	LGSN	NDNF	RAB3C	SLC8A2	TTBK1
ARHGAP4	CDK5R2	DNAAF3	GRIN3B	LHX6	NELL2	RANBP3L	SMPD3	TTLL6
ARHGEF26-AS1	CDS1	DNAH2	GRM1	LINC00052	NEUROD1	RASA4	SMPDL3B	UGT3A2
ATP1A3	CEACAM22P	DNAH3	GSDMB	LINC00087	NFASC	RASGRP2	SNAP25	UNC13A
ATP2A3	CELF3	DNAH6	HAPLN4	LIPA	NGFR	RBM20	SNCB	UNC5A
ATP2C2	CELF5	DNAH7	HBE1	LIPH	NLRP1	RDH12	SORBS1	UNC5B
ATP6V1C2	CES4A	DNAI1	HES2	LLGL2	NME5	REEP6	SP8	UNC5D
ATP8A1	CFD	DNAJC6	HLA-DMB	LOC100128028	NMNAT2	REM1	SPEF2	UNC80
ATP8A2	CHD5	DYDC2	HLA-DOA	LOC100131825	NOXA1	REPS2	SPINK2	USH1G
ATP8B3	CHGB	EDA	HLF	LOC100133857	NPNT	RERG	SPINT1	VAT1L
BAIAP3	CHRD	EGFLAM	HOXB9	LOC100134216	NR3C2	RET	SPP1	VGLL2
BCAS1	CHRM4	ELMOD1	HPCAL4	LOC100287225	NRXN1	RFPL4A	SPTBN4	VWA5B2
BCO2	CHST1	ELOVL2	HPGD	LOC10028866	NRXN2	RGS9	SRRM3	WBSCR28
BEX1	CLDN1	ELOVL3	HYDIN	LOC100289211	NTRK1	RNASE1	SSPO	WDR16
BEX5	CLMN	ELOVL7	IFLTD1	LOC100505505	OASL	RND1	SSTR2	WDR17
BIK	CNFN	EML2	IGF2	LOC100506098	OSTBETA	ROPN1L	ST6GALNAC3	WDR65
BRS3	CNN1	EML6	IGSF1	LOC100506299	OTOA	RORB	ST8SIA4	WDR96
BTBD11	CNTN1	EPHB6	IGSF22	LOC100507305	OTOG	RPL3L	STAC2	WNT16
C10ORF107	COL4A3	ERBB4	IGSF9	LOC100508736	OTUD7A	RSPH4A	STAT4	WNT4
C10ORF54	COL4A4	ERC2	IL10RA	LOC257358	PACSIN1	RTBDN	STIM2	WNT6
C11ORF96	COL5A3	ESR1	IL1R2	LOC283888	PAIP2B	RUND3A	STK32A	WNT8B
C12ORF55	CORO6	ESRRG	IL21R	LOC338758	PARM1	RYR1	STMN2	YBX2
C12ORF68	COX6B2	ESYT3	INSRR	LOC400706	PCDH19	SIPR1	STMN4	ZBTB7C
C17ORF28	CPLX1	F11R	IQCD	LOC402160	PCDHAC1	SAMD12	SUSD4	ZCCHC12
C19ORF59	CREB3L3	FABP4	IQCH	LOC731789	PCLO	SCARA5	SVOP	ZNF280A
C19ORF77	CREG2	FAM105A	IQUB	LOC79015	PCP4L1	SCG2	SYBU	ZNF843
C19ORF81	CRISPLD2	FAM131C	IRF6	LPPR4	PCSK5	SCIN	SYN1	
C20ORF160	CRLF1	FAM19A2	ITGAX	LRP2	PDE2A	SCN4B	SYNPO2	
C30RF15	CRYM	FAM70B	ITIH5	LRRC6	PDE4C	SCN5A	SYP	
C70RF57	CTNNA2	FAM71F1	JAKMIP1	LRRIQ1	PDZD7	SCN9A	SYPL2	
CACNA1G	CYP19A1	FANK1	JUP	LUM	PGBD5	SCUBE1	SYT1	
CADM3	CYP19A1	FAT2	KCNA1	LYPD3	PHOSPHO1	SEC14L5	SYT13	
CALB1	CYP24A1	FBXO2	KCNB1	MAPK8IP2	PIP5KL1	SEMA3F	SYT14	

Tabelle 17: Alphabetische Auflistung der 497 Gene, die auf mRNA-Ebene in der Mehrheit der Zelllinien (d.h. in mindestens vier der sieben adhärenten Zelllinien und zugleich in mindestens vier der sieben Stammzelllinien) signifikant reguliert werden ($p<0.01$, $FC \geq 5$). Grau unterlegt sind dabei die 87 Gene, die neben der transkriptionellen Hochregulation auch eine signifikante Promoter-Euchromatinisierung aufweisen.

4.2.3 Anreicherungs-Analysen

4.2.3.1 GO term Enrichment Analysis

Für die im Anschluss stattfindende *GO term Enrichment Analysis*, eine Analyse, die Anreicherungen an mittels Gen-Ontologie definierten Begriffen (sog. *GO terms*) untersucht, wurde die in Tabelle 17 abgebildete Liste an 497 hochregulierten Genen auf mRNA-Ebene ($p<0,01$, $FC \geq 5$) ausgewählt. Innerhalb dieser Liste, die die Gene enthält, die in der Mehrheit der Zelllinien signifikant hochreguliert werden, wurde nach *GO terms* gesucht, die deutlich überrepräsentiert vorliegen. Fünf verschiedene *GO terms*, die alle jeweils das Wort „*transport*“ beinhalten, sind in dieser Gen-Liste signifikant angereichert ($p<0,05$), ein weiterer ähnlicher *GO term* („*potassium ion transport*“) besitzt einen knapp nicht mehr signifikanten p-Wert von 0,06 (siehe Tabelle 18). Somit scheinen Gene, die mit diesem *GO term* assoziiert sind, eine wichtige Rolle zu spielen, was die Auswirkungen der Valproinsäure-Behandlung auf die Zellen betrifft.

GO term	Accession Number	p-Wert
“metal ion transport”	GO:0030001	0,0039
“ion transport”	GO:0006811	0,0052
“neurotransmitter transport”	GO:0006836	0,0074
“monovalent inorganic cation transport”	GO:0015672	0,0078
“cation transport”	GO:0006812	0,011
“potassium ion transport”	GO:0006813	0,060

Tabelle 18: Übersicht über die mittels der GO term Enrichment-Analyse (durchgeführt mit der Liste an 497 hochregulierten Genen) signifikant angereicherte GO terms ($p<0,05$), die allesamt das Wort „*transport*“ enthalten.

Innerhalb der Gene/Gen-Gruppen, die diesen *GO terms* zugrunde liegen, fiel besonders die Gruppe der SLC-Transporter auf, die in nahezu jedem der signifikant angereicherten *GO terms* vorkommt. Bei genauerer Betrachtung der 497-Gen-Liste lassen sich 16 hochregulierte SLC-Transporter ausmachen, was einer signifikanten Anreicherung dieser Gen-Gruppe im Vergleich zum Vorkommen der Transporter im Gesamt-Genom (insgesamt gibt es 397 SLC-Transporter innerhalb der 46.111 sequenzierten Gene) entspricht ($p=1,18 \cdot 10^{-5}$, Exakter Test nach Fisher). Von diesen 16 SLC-Transportern weisen vier (SLC17A7, SLC25A27, SLC30A3 und SLC6A12) neben der Expressions-Steigerung auf mRNA-Ebene auch eine signifikante Anreicherung

ERGEBNISSE

($p<0.01$) an H3ac-gebundener Promoter-DNA auf. Die Anzahl der hochregulierten und zugleich epigenetisch veränderten (euchromatinisierten) SLC-Transporter nimmt mit abnehmendem Fold-Change-Schwellenwert zu (siehe Tabelle 19). So kommen bei einem $FC \geq 4$ zwei Transporter, bei $FC \geq 3$ weitere zwei und bei $FC \geq 2$ weitere acht Transporter dazu.

FC	signifikant hochregulierte, euchromatinisierte SLC-Transporter ($p<0.01$)	
	Anzahl	Transporter
FC ≥ 5	4	SLC17A7, SLC25A27, SLC30A3, SLC6A12
FC ≥ 4	6	+ SLC44A3, SLC4A5
FC ≥ 3	8	+ SLC8B1, SLC46A3
FC ≥ 2	16	+ SLC12A6, SLC23A2, SLC2A13, SLC36A1, SLC40A1, SLC43A2, SLC4A8, SLC7A8

Tabelle 19: Übersicht über die hochregulierten und zugleich euchromatinisierten SLC-Transporter. Mit abnehmendem Fold Change (FC) nimmt die Anzahl der signifikant regulierten Gene zu.

4.2.3.2 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Die Anreicherung signifikant hochregulierter und euchromatinisierter SLC-Transporter nach Valproinsäure-Behandlung konnte anschließend mittels einer *Gene Set Enrichment*-Analyse bestätigt werden. Dabei wurden alle unbehandelten Zellen mit den VPA-behandelten Zellen hinsichtlich der 16 SLC-Transporter aus Tabelle 19 verglichen. Die GSEA liefert für die Gruppe dieser SLC-Transporter einen normalisierten *Enrichment Score* (NES) von -1,9421 (siehe Tabelle 21), was einer Hochregulation dieser Gene in den Valproinsäure-behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen entspricht.

Aufgrund der Ergebnisse all dieser auf den *Next Generation Sequencing*-Daten basierenden Analysen wurde die Gruppe der SLC-Transporter für weitere funktionelle Untersuchungen bezüglich des Effekts der Valproinsäure-Behandlung auf die Zelllinien ausgewählt. Zuvor jedoch wurden die NGS-Daten weiteren Analysen im Hinblick auf beim Glioblastom relevante Gene/Gen-Gruppen unterzogen.

4.3 Einzelgen-Analysen bestimmter Gen-Gruppen

Nach Identifikation der SLC-Transporter in der vollkommen ergebnisoffenen NGS-Analyse, wurden also zunächst einige weitere Gene/Gen-Gruppen (nämlich MGMT, DNA-Reparatur-Gene, Tumorsuppressor-Gene und Stammzellmarker) genauer hinsichtlich ihrer Transkription und ihres H3ac-Promoter-DNA-Levels nach Valproinsäure-Behandlung untersucht. Es sollte herausgefunden werden, inwiefern diese Gene an der VPA-induzierten Chemo-Sensitivierung für Temozolomid beteiligt sind oder welche anderen Mechanismen möglicherweise zu einer Verbesserung der Tumor-Eigenschaften und damit zu einem längeren Überleben der Patienten führen könnten. Dazu wurden die RNA-Seq- sowie die ChIP-Seq-Daten jeder Zelllinie ausführlich auf Einzelgen-Ebene ausgewertet und in Listen zusammengestellt.

4.3.1 MGMT

Aufgrund der Tatsache, dass in der Literatur Valproinsäure-Effekte auf das *MGMT*-Gen beschrieben sind, wurde dieses Gen hinsichtlich transkriptioneller Hochregulation sowie Promoter-Euchromatinisierung und Promoter-Methylierung untersucht (siehe Tabelle 20). Auf Expressions-Ebene kommt es in nur einer der 14 untersuchten Zelllinien (NCH660h) zu einer signifikanten Expressions-Steigerung ($p<0.01$) nach VPA-Behandlung. Auch weist lediglich eine Zelllinie (TP365MG) eine erkennbare Zunahme der Promoter-Methylierung nach VPA-Behandlung auf, wohingegen sechs der untersuchten Zelllinien eine Euchromatinisierung des *MGMT*-Promoters zeigen. Insgesamt betrachtet hat die Behandlung mit Valproinsäure in einigen Zelllinien also eher einen aktivierenden Effekt auf das *MGMT*-Gen, der eine Chemo-Sensitivierung nicht erklären kann.

Gen\Zelllinie	T98G	TP365MG	U87MG	U118MG	U251MG	U373MG	HS683	NCH1425	NCH421k	NCH465	NCH601	NCH636	NCH644	NCH660h	#
MGMT															
Expression															1
Methyl.															1
Euchrom.															6

Tabelle 20: Übersicht über die Untersuchungen bezüglich MGMT. Es wurde untersucht, ob es durch die Behandlung mit Valproinsäure in den Zellen zu einer signifikanten Expressions-Steigerung ($p<0.01$, Fold Change ≥ 2 ; rote Einfärbung), einer Zunahme der Promoter-Methylierung (horizontale Streifen) und/oder einer signifikanten Promoter-Euchromatinisierung ($p<0.01$; vertikale Streifen) kommt. Insgesamt betrachtet wird MGMT durch die VPA-Behandlung in einigen Zelllinien aktiviert.

4.3.2 DNA-Reparatur-Gene

Die primär zur Validierung der SLC-Transporter-Hochregulation durchgeführte *Gene Set Enrichment*-Analyse lieferte zusätzlich eine signifikante Herunterregulation diverser DNA-Reparatur-Gen-Gruppen nach Valproinsäure-Behandlung. So zeigen die Gen-Gruppen Doppelstrangbruch-Reparatur, Mismatch-Reparatur, Basenexzisions-Reparatur und Nukleotidexzisions-Reparatur allesamt einen positiven normalisierten *Enrichment Score* (NES), was einer Herunterregulation dieser Gen-Gruppen in den VPA-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen entspricht (siehe Tabelle 21).

Gen-Set	NES	p-Wert	FDR
gene_sets.gmt#SLC-Transporter	-1,9421	0	0
gene_sets.gmt#Doppelstrangbruch-Reparatur	2,1478	0	0
gene_sets.gmt#Mismatch-Reparatur	2,0440	0	0,0010
gene_sets.gmt#Basenexzisions-Reparatur	1,8699	0	0,0045
gene_sets.gmt#Nukleotidexzisions-Reparatur	1,5069	0,0131	0,1072

Tabelle 21: Die Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) liefert (neben einer Hochregulation der SLC-Transporter) eine Herunterregulation verschiedener DNA-Reparatur-Gen-Gruppen nach Valproinsäure-Behandlung. NES = normalisierter Enrichment Score, FDR = false discovery rate.

In Folge wurden die wichtigsten Gene innerhalb der drei Gruppen Mismatch-Reparatur (MMR), Basenexzisions-Reparatur (BER) und Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur genauer hinsichtlich transkriptioneller Herunterregulation untersucht (siehe Tabelle 22). Innerhalb der BER-Gene scheinen besonders die beiden Gene *PARP2* (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2*) und *PARP3* (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 3*) von der Valproinsäure-Behandlung beeinflusst zu werden, da diese beiden Gene eine signifikante Herunterregulation ($p<0.01$) in zehn bzw. elf der 14 untersuchten Zelllinien aufweisen. Innerhalb der DSB-Reparatur-Gene zeigen *NBN* (*Nibrin*) und *RAD51* (*RAD51 Recombinase*) eine signifikante Herunterregulation in der Mehrzahl (neun bzw. elf) der Zelllinien. Im Gegensatz dazu scheint die Expression der Mismatch-Reparatur-Gene deutlich weniger stark von der Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor betroffen zu sein; die Gene innerhalb dieser Gen-Gruppe weisen, mit Ausnahme von *MLH1* (*MutL Homolog 1*), lediglich eine Herunterregulation in einzelnen Zelllinien auf.

ERGEBNISSE

Gen\Zelllinie	T98G	TP365MG	U87MG	U118MG	U251MG	U373MG	HS683	NCH1425	NCH421k	NCH465	NCH601	NCH636	NCH644	NCH660h	#
MMR	MLH1														6
	MSH2														1
	MSH6														2
	PMS1														1
	PMS2														2
BER	APEX1														3
	LIG3														8
	MPG														-
	PARP1														2
	PARP2														10
	PARP3														11
	POLB														-
DSB-Reparatur	XRCC1														-
	ATM														4
	LIG4														-
	MDC1														7
	NBN														9
	PRKDC														3
	RAD51														11
RAD52	RAD52														2
	XRCC4														1
	XRCC5														5
	XRCC6														3

Tabelle 22: Übersicht über die drei Gruppen von DNA-Reparatur-Genen: Mismatch-Reparatur (MMR), Basenexzisions-Reparatur (BER), Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur. Es wurde untersucht, ob es durch die Behandlung mit Valproinsäure in den Zellen zu einer signifikanten Herunterregulation der Gene ($p<0.01$; blaue Einfärbung) kommt. Einige Gene innerhalb der Gen-Gruppen BER und DSB-Reparatur weisen in der Mehrzahl der Zelllinien eine Herunterregulation nach VPA-Behandlung auf, wohingegen die MMR-Gene nicht so stark von der VPA-Behandlung betroffen zu sein scheinen.

4.3.3 Tumorsuppressor-Gene

Neben direkten Auswirkungen auf die Chemo-Sensitivität, scheint die Behandlung mit Valproinsäure auch Chemotherapie-unabhängige Folgen auf die Zellen zu haben, so beispielsweise die oben beschriebene Reduktion der Proliferation (siehe 4.1.3). Um herauszufinden, welche Gene auf molekularer Ebene zu einer „Benignisierung“ des Tumors führen könnten, wurden nun in einem nächsten Schritt bekannte Tumorsuppressor (TS)-Gene hinsichtlich transkriptioneller Hochregulation sowie Promoter-Euchromatinisierung nach VPA-Behandlung analysiert (siehe Tabelle 23). Dabei zeigt sich, dass nahezu alle Zelllinien (mit der Ausnahme von NCH465) eine signifikante Expression-Steigerung ($p<0.01$) mindestens eines Tumorsuppressors aufweisen, in der Zelllinie U251 kommt es sogar zur Re-Expression von zehn TS-Genen. Die beiden Gene *CDKN1A* sowie *SFRP1* (*Secreted Frizzled-Related Protein 1*) scheinen besonders betroffen von der Valproinsäure-Behandlung zu sein, sie weisen in jeweils acht der 14 untersuchten Zelllinien eine signifikante Hochregulation auf. Die Re-Expression des Zellzyklus-Kontroll-Gens *CDKN1A* konnte bereits erfolgreich validiert werden (siehe 4.1.1), was als zusätzliche Qualitäts-Kontrolle der RNA-Seq-Daten angesehen werden kann. Eine Promoter-

ERGEBNISSE

Euchromatinisierung der untersuchten Gene findet insgesamt betrachtet sogar häufiger im Vergleich zur transkriptionellen Re-Expression statt und kann nahezu für alle untersuchten Tumorsuppressoren in der Mehrzahl der Zellen festgestellt werden.

Gen\Zelllinie	T98G	TP365MG	U87MG	U118MG	U251MG	U373MG	HS683	NCH1425	NCH421k	NCH465	NCH601	NCH636	NCH644	NCH660h	#
APC															3
ATRX															-
CDKN1A															10
CDKN2A															9
CDKN2B															5
CDKN2C															-
CHEK2															10
H3F3A															-
NDRG2															7
NF1															11
NF2															12
NOTCH1															-
NOTCH2															9
PTCH1															1
PTCH2															12
PTEN															3
RB1															13
SFRP1															2
SMAD2															10
SMAD4															-
SOCS3															-
TP53															3
TSC1															-
TSC2															10
VHL															1
WT1															4

Tabelle 23: Übersicht über die analysierten Tumorsuppressor-Gene. Es wurde untersucht, ob es durch die Behandlung mit Valproinsäure in den Zellen zu einer signifikanten Expressions-Steigerung ($p<0.01$, Fold Change ≥ 2 ; dunkelrote Einfärbung) und/oder einer signifikanten Promoter-Euchromatinisierung ($p<0.01$; vertikale Streifen) kommt. Die hellrote Einfärbung indiziert Gene, deren Hochregulation (Fold Change ≥ 2) nicht signifikant ist. In nahezu jeder Zelllinie wird mindestens ein Tumorsuppressor durch die VPA-Behandlung hochreguliert bzw. euchromatinisiert.

4.3.4 Stammzellmarker

Abschließend wurden die klassischen Stammzellmarker CD44, CD133, Nestin, OCT3/4 sowie SOX2 genauer hinsichtlich transkriptioneller Herunterregulation untersucht (siehe Tabelle 24). Dabei zeigt sich, dass besonders CD44 und CD133 eine signifikante Herunterregulation ($p<0.01$) in einigen (jeweils fünf) Zelllinien aufweisen. Wenig überraschend zeigen sich die Veränderungen in den Stammzellmarkern hauptsächlich in den Stammzelllinien, was für eine differenzierende Wirkung der Valproinsäure-Behandlung besonders in diesen Zelllinien spricht.

Gen\Zelllinie	T98G	TP365MG	U87MG	U118MG	U251MG	U373MG	HS683	NCH1425	NCH421k	NCH465	NCH601	NCH636	NCH644	NCH660h	#
CD44															5
CD133															5
Nestin															-
OCT3/4															4
SOX2															1

Tabelle 24: Übersicht über die analysierten Stammzellmarker. Es wurde untersucht, ob es durch die Behandlung mit Valproinsäure in den Zellen zu einer signifikanten Herunterregulation der Gene ($p<0.01$; blaue Einfärbung) kommt. Dabei zeigen CD44 und CD133 eine signifikante Herunterregulation in jeweils fünf Zelllinien. Insgesamt betrachtet fällt auf, dass hinsichtlich der Stammzellmarker hauptsächlich die Stammzelllinien von der VPA-Behandlung betroffen zu sein scheinen.

4.4 Glioblastom-Subtypen-Analyse

4.4.1 Einteilung der Zelllinien in die molekularen Subtypen

Im Anschluss an die Einzelgen-Analysen wurde untersucht, inwieweit die Behandlung mit Valproinsäure einen Einfluss auf den molekularen Subtyp einer jeden Zelllinie hat bzw. ob es möglicherweise durch VPA zu einem Wechsel des Subtyps kommen könnte. Dafür wurde zunächst mittels einer *single sample Gene Set Enrichment*-Analyse (ssGSEA) bestimmt, welchem der vier molekularen Subtypen (klassisch, mesenchymal, neural, proneural) (Verhaak, Hoadley et al. 2010) die einzelnen Zelllinien im unbehandelten Zustand zuzuordnen sind (siehe Tabelle 25). Dabei wird deutlich, dass – wenn man sich bei der Einteilung auf die beiden prognostisch relevanteren Subtypen mesenchymal und proneural beschränkt und die beiden Subtypen klassisch und neural außer Acht lässt – die adhärenten Zelllinien ausnahmslos den mesenchymalen Subtyp aufweisen (pink), wohingegen die Stammzelllinien (mit Ausnahme der Zelllinie NCH1425, die jedoch kein sphäroides, sondern ein adhärentes Wachstum zeigt) den proneuralen Subtyp besitzen (grün).

Zelllinie	klassisch	molekularer Subtyp		
		mesenchymal	neural	proneural
T98G	13.578	14.501	9.238	5.973
TP365MG	14.347	15.879	10.247	7.127
U87MG	13.025	16.219	11.636	8.683
U118MG	13.994	13.156	12.604	12.146
U251MG	14.009	13.658	11.611	8.031
U373MG	15.307	15.164	12.184	8.732
HS683	14.379	16.100	9.640	7.902
NCH1425	14.662	14.477	10.838	12.505
NCH421k	13.376	6.404	10.987	16.104
NCH465	17.425	9.094	9.125	14.395
NCH601	16.384	9.046	9.916	14.205
NCH636	16.724	9.289	10.194	16.464
NCH644	13.427	9.572	10.636	15.183
NCH660h	16.764	9.072	9.422	15.387

Tabelle 25: Zuordnung der einzelnen Zelllinien (im unbehandelten Zustand) in die molekularen Subtypen mittels ssGSEA. Bei außer Acht Lassen des klassischen sowie des neuralen Subtyps weisen die adhärenten Zelllinien ausnahmslos den mesenchymalen (pink), die Stammzelllinien den proneuralen Subtyp (grün) auf. Die Zelllinie NCH1425 besitzt den mesenchymalen Subtyp, was die Tatsache widerspiegelt, dass diese Zellen adhärent und nicht in den für Stammzellen typischen Sphären wachsen.

4.4.2 Analysen der Auswirkungen von VPA auf die Gen-Signaturen

Durch die Valproinsäure-Behandlung der Zellen kommt es – aufgrund der Tatsache, dass VPA als Histon-Deacetylase-Inhibitor für eine Auflockerung der Chromatin-Struktur sorgt – in jeder Zelllinie zu einer generellen Anreicherung der Signatur-Gene aller vier Subtypen. In den adhärenten Zelllinien äußert sich dies hauptsächlich in einer signifikanten Anreicherung ($p<0.05$) der proneuralen Signatur-Gene (siehe Tabelle 26 (grün) und Abbildung 11a), wohingegen in den Stammzelllinien eine signifikante Anreicherung ($p<0.05$) der Gene, die mit dem mesenchymalen Subtyp assoziiert sind, stattfindet (siehe Tabelle 26 (pink) und Abbildung 11b). Dennoch kommt ob es durch die Valproinsäure-Behandlung nicht zu einem Wechsel der Subtypen, die adhärenten Zelllinien behalten ihren mesenchymalen Subtyp bei, während die Stammzelllinien ihren proneuralen Subtyp beibehalten. Zusammengefasst betrachtet sorgt die Behandlung mit VPA also zu einer Anreicherung der (eher schwächer ausgeprägten) Signatur-Gene, führt jedoch nicht zu einem Subtypen-Wechsel in der molekularen Klassifikation.

ERGEBNISSE

Zelllinie	molekularer Subtyp			
	unbehandelt		VPA-behandelt	
	mesenchymal	proneural	mesenchymal	proneural
T98G	14.501	5.973	15.605	10.805
TP365MG	15.879	7.127	15.914	11.232
U87MG	16.219	8.683	16.385	10.670
U118MG	13.156	12.146	14.458	13.682
U251MG	13.658	8.031	14.643	11.023
U373MG	15.164	8.732	15.116	11.581
HS683	16.100	7.902	16.356	10.905
NCH1425	14.477	12.505	15.714	14.146
NCH421k	6.404	16.104	11.059	16.377
NCH465	9.094	14.395	11.312	14.418
NCH601	9.046	14.205	12.830	14.802
NCH636	9.289	16.464	10.351	16.467
NCH644	9.572	15.183	13.567	15.775
NCH660h	9.072	15.387	11.172	15.520

Tabelle 26: Durch die Valproinsäure-Behandlung kommt es in den adhärenten Zelllinien zu einer vorrangigen Anreicherung der proneuralen Signatur-Gene (grün), während in den Stammzelllinien hauptsächlich die mesenchymalen Signatur-Gene angereichert werden (pink). Die ursprüngliche Signatur bleibt jedoch auch nach der VPA-Behandlung führend.

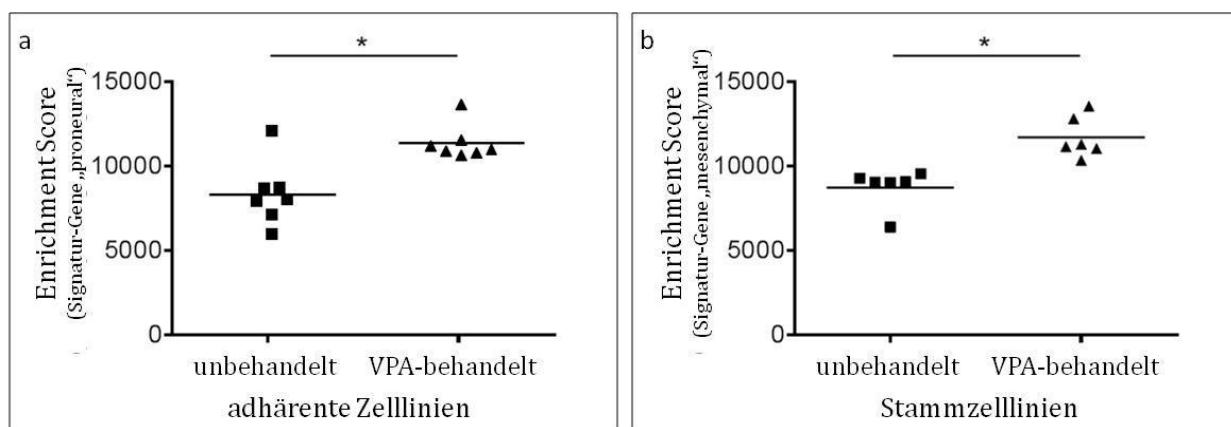


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Anreicherungen der proneuralen bzw. mesenchymalen Signatur-Gene. Für die adhärenten Zelllinien ergibt sich eine signifikante Anreicherung ($p=0.02$) der Gene, die mit dem proneuralen Subtyp assoziiert sind (a), für die Stammzelllinien hingegen eine signifikante Anreicherung ($p=0.03$) der mesenchymalen Signatur-Gene (b). * $p<0.05$

4.5 Validierungen und funktionelle Untersuchungen zu den SLC-Transportern

4.5.1 Validierung der Re-Expression nach VPA-Behandlung auf mRNA-Ebene

Bevor funktionelle Experimente stattfinden konnten, sollte zunächst die SLC-Transporter-Hochregulation validiert werden. Um die Re-Expression der SLC-Transporter auf mRNA-Ebene in den adhärenten Zelllinien sowie in den Gliom-Stammzelllinien nach Valproinsäure-Behandlung zu validieren, wurden real-time qRT-PCRs durchgeführt. Exemplarisch wurden die vier SLC-Transporter (SLC17A7, SLC25A27, SLC30A3 und SLC6A12) untersucht, die nach der VPA-Behandlung auf mRNA-Ebene die größte Expressions-Steigerung (Fold Change ≥ 5) und zugleich auf ChIP-Ebene eine Promoter-Euchromatinisierung aufwiesen. Abbildung 12 zeigt die relativen Expressions-Werte für diese vier Transporter in den 14 untersuchten Zelllinien. Alle vier Transporter zeigen eine deutliche Expressions-Steigerung in der großen Mehrzahl der Zelllinien, teilweise kommt es sogar zu einem über 100-fachen Expressions-Anstieg nach Valproinsäure-Behandlung.

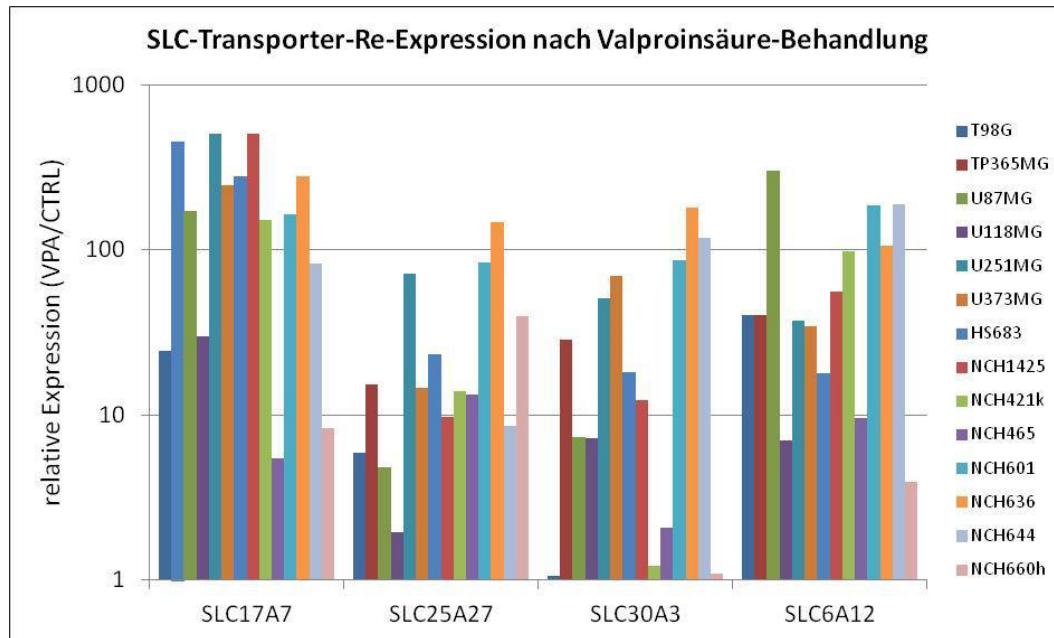


Abbildung 12: Expressions-Level der SLC-Transporter SCL17A7, SLC25A27, SLC30A3 und SLC6A12 nach Behandlung der adhärenten Zelllinien sowie der Stammzelllinien mit Valproinsäure. Die auf einer logarithmischen Skala dargestellten relativen Expressions-Werte ergeben sich aus der Normalisierung auf GAPDH und im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontroll-Zellen (CTRL), deren Expressions-Werte der entsprechenden Transporter jeweils gleich 1 gesetzt wurden.

4.5.2 Validierung der Hochregulation nach VPA-Behandlung auf Protein-Ebene in humanem Gewebe

Zusätzlich zur Validierung auf mRNA-Ebene wurde die Hochregulation der SLC-Transporter nach Valproinsäure-Behandlung auch in humanem Gewebe validiert. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen SLC17A7 und SLC25A27 von Hirntumor-Schnitten angefertigt. Es wurde die Expression dieser beiden SLC-Transporter vor und unter (bzw. nach) Valproinsäure-Behandlung der jeweiligen Patienten untersucht und miteinander verglichen. Zunächst wurden die beiden Antikörper in nicht-neoplastischem Hirngewebe etabliert (siehe Abbildung 13), wobei sich für den Transporter SLC17A7 ein etwas höheres basales Expressions-Level ergibt als für SLC25A27.

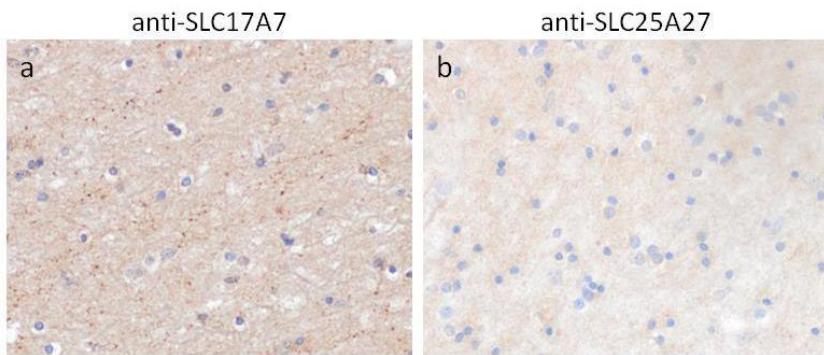


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbungen von nicht-neoplastischem Hirngewebe zur Etablierung der Antikörper gegen SLC17A7 (a) und SLC25A27 (b). Der Transporter SLC17A7 weist ein leicht höheres basales Expressions-Level auf als SLC25A27.

Anschließend wurden die Schnitte der Hirntumor-Patienten jeweils vor und unter (bzw. nach) Valproinsäure-Behandlung immunhistochemisch gefärbt (siehe Abbildung 14). Dabei wurde die Intensität der Färbung mittels eines Score-Systems (0-3) beurteilt und verglichen (siehe Tabelle 27). Bezuglich des Transporters SLC17A7 ist bei drei der sechs Patienten eine (teilweise deutliche) Zunahme der Farbe-Intensität, d.h. eine Zunahme der Transporter-Expression, zu beobachten. Für SLC25A27 kann sogar bei vier der sechs gefärbten Schnitte-Paare eine Expressions-Zunahme des Transporters unter Valproinsäure festgestellt werden (siehe jeweils Kreise in Tabelle 27).

ERGEBNISSE

Patient	Färbe-Intensität			
	SLC17A7		SLC25A27	
	vor VPA	unter VPA	vor VPA	unter VPA
1	3	3	1	3
2	1	1-2	0	3
3	2	1	1	2
4	2	0-3	2	0-2
5	0-1	3	0-2	3
6	3	2	3	2

Tabelle 27: Übersicht über die Färbe-Intensitäten der Hirntumor-Schnitte vor und unter Valproinsäure-Behandlung. Der Score gibt die Intensität der Färbung an: 0 = keine/minimale, 1 = schwache, 2 = moderate/mittelstarke, 3 = starke Färbung. Beim Transporter SLC17A7 kommt es bei drei, bei SLC25A27 sogar bei vier der sechs untersuchten Schnitte-Paare zu einer Expressions-Steigerung.

Die Tatsache, dass der Transporter SLC25A27 in einer höheren Anzahl der untersuchten Schnitte-Paare einen Expressions-Anstieg unter VPA zeigt, ist möglicherweise mit seinem etwas niedrigeren basalen Expressions-Level zu begründen. Aufgrund der insgesamt sehr geringen Anzahl an Proben wurden hier keine weiteren statistischen Auswertungen vorgenommen. Dennoch stellt dieses klinisch sehr wertvolle Patientenkollektiv eine gute Möglichkeit dar, die Hochregulation von SLC-Transportern durch Valproinsäure auch *in vivo* nachzuvollziehen.

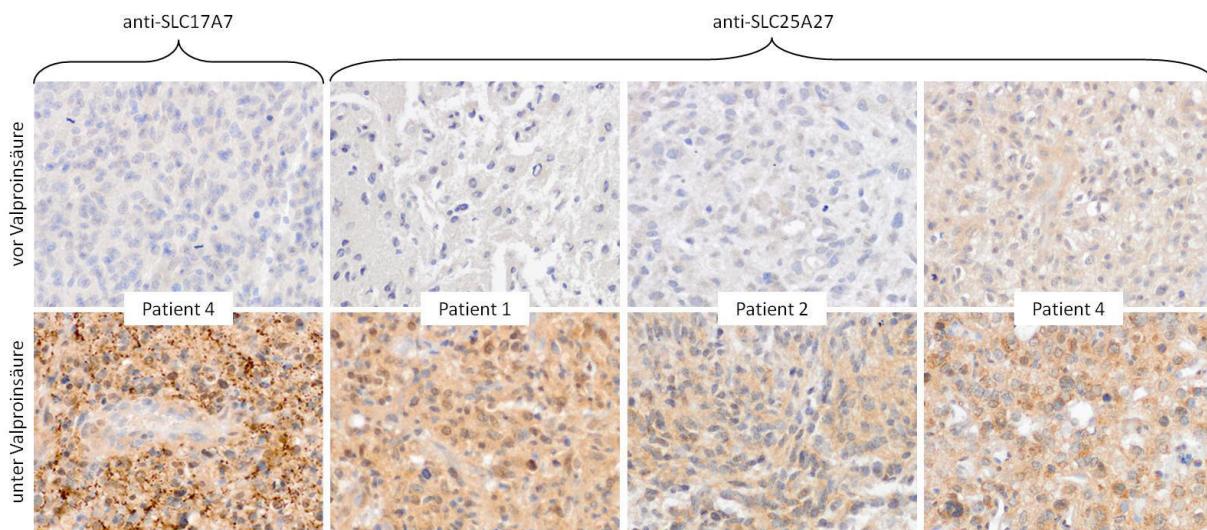


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbungen von Hirntumor-Schnitte-Paaren jeweils vor und unter Valproinsäure. Unter Valproinsäure zeigt sich sowohl für den Transporter SLC17A7 als auch für SLC25A27 eine deutliche Zunahme der Expression.

4.5.3 siRNA-Knockdown-Versuche

Um weiter zu untersuchen, ob die (sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene validierte) Hochregulation von SLC-Transportern mit der (nachgewiesenen) Temozolomid-Sensitivierung in direktem Zusammenhang stehen könnte, wurden siRNA-Knockdown-Experimente durchgeführt. Für den Fall, dass die SLC-Transporter für die VPA-induzierte Chemo-Sensitivierung verantwortlich wären, müsste ein Knockdown dieser Transporter die Sensitivierung in gewisser Weise „rückgängig“ machen (Rescue der Valproat-induzierten Temozolomid-Sensitivierung). Im weiteren Verlauf wird in diesem Zusammenhang von einer angestrebten sog. Temozolomid-Desensitivierung gesprochen.

Zunächst wurden unbehandelte sowie VPA-behandelte Zellen (U373MG) mit den entsprechenden siRNAs gegen 16 SLC-Transporter (siehe Tabelle 19) sowie einer Negativ-Kontrolle (siCTRL) transfiziert. Danach wurde Temozolomid in einer Konzentration von 1.500 µM zugegeben, was in etwa dem IC₅₀-Wert dieser Zelllinie (im unbehandelten Zustand) entspricht. Für die Auswertung wurde zunächst für die mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Kontroll-Zellen) die VPA-induzierte Sensitivierung der Zellen für Temozolomid, d.h. die relative Reduktion der Proliferation durch Temozolomid in den VPA-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, berechnet und der Wert gleich 1 gesetzt. Anschließend wurden die gleichen Berechnungen für die mit den SLC-siRNAs transfizierten Zellen durchgeführt und entsprechend auf die Kontroll-Zellen normalisiert. Wenn nach der Transfektion mit einer SLC-siRNA die VPA-induzierte Temozolomid-Sensitivierung der Zellen größer ist als in den Kontroll-Zellen, ergeben sich relative Proliferations-Werte < 1, was einer zusätzlichen, durch den Knockdown induzierten Sensitivierung entspricht. Wenn jedoch nach der Transfektion mit einer SLC-siRNA die VPA-induzierte Temozolomid-Sensitivierung der Zellen geringer ist als in den Kontroll-Zellen, ergeben sich relative Proliferations-Werte > 1, was einer Desensitivierung der Zellen entspricht und somit den vermuteten Rescue-Effekt bestätigen würde. Von den 16 untersuchten SLC-Transportern kommt es bei fünf Transportern (SLC12A6, SLC2A13, SLC30A3, SLC44A3 und SLC8B1) nach dem siRNA-induzierten Knockdown zu einer schwachen Temozolomid-Desensitivierung (siehe Abbildung 15). Jedoch sind diese beobachteten Effekte nicht stark und einheitlich genug, um von einem erfolgreichen Rescue-Experiment sprechen zu können.

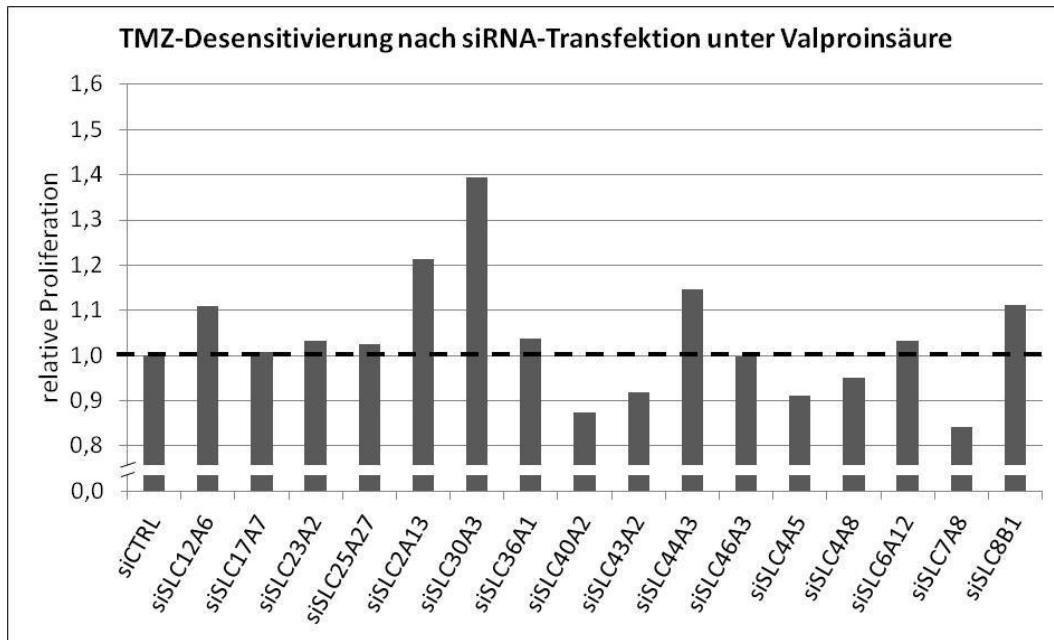


Abbildung 15: Temozolomid-Desensitivierung nach siRNA-Transfektion unter Valproinsäure in U373MG-Zellen. Für die Transporter SLC12A6, SLC2A13, SLC30A3, SLC44A3 und SLC8B1 ergeben sich relative Proliferations-Werte > 1 (im Vergleich zu den Kontroll-Zellen), was einer Temozolomid-Desensitivierung der Zellen nach siRNA-Transfektion unter Valproinsäure entspricht.

Aus diesem Grund wurde nun ein vereinfachter Versuchs-Aufbau angestrebt, wobei untersucht werden sollte, ob der SLC-Transporter-Knockdown in einer VPA-unabhängigen Situation zu einer Temozolomid-Desensitivierung führen würde. Dafür wurden unbehandelte U373MG-Zellen mit siRNAs (gegen 16 SLC-Transporter sowie einer Negativ-Kontrolle) transfiziert und erhielten Temozolomid, es fand jedoch keine Vorbehandlung mit Valproinsäure statt. Hier zeigt sich bei einer größeren Anzahl von SLC-Transportern nach deren Knockdown eine erhöhte relative Proliferation im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (siehe Abbildung 16). Somit scheinen zumindest einige SLC-Transporter tatsächlich im Temozolomid-Antwort-Verhalten der Zellen eine Rolle zu spielen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der siRNA-Knockdown der SLC-Transporter keinen größeren direkten Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen (Zelllinie U373MG) zu haben scheint (siehe Abbildung 17), lediglich bei einigen wenigen Transportern kommt es nach deren Knockdown zu einer leicht erhöhten Proliferation im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, deren Proliferation nach siRNA-Transfektion mit der Negativ-Kontroll-siRNA gleich 1 gesetzt wurde.

ERGEBNISSE

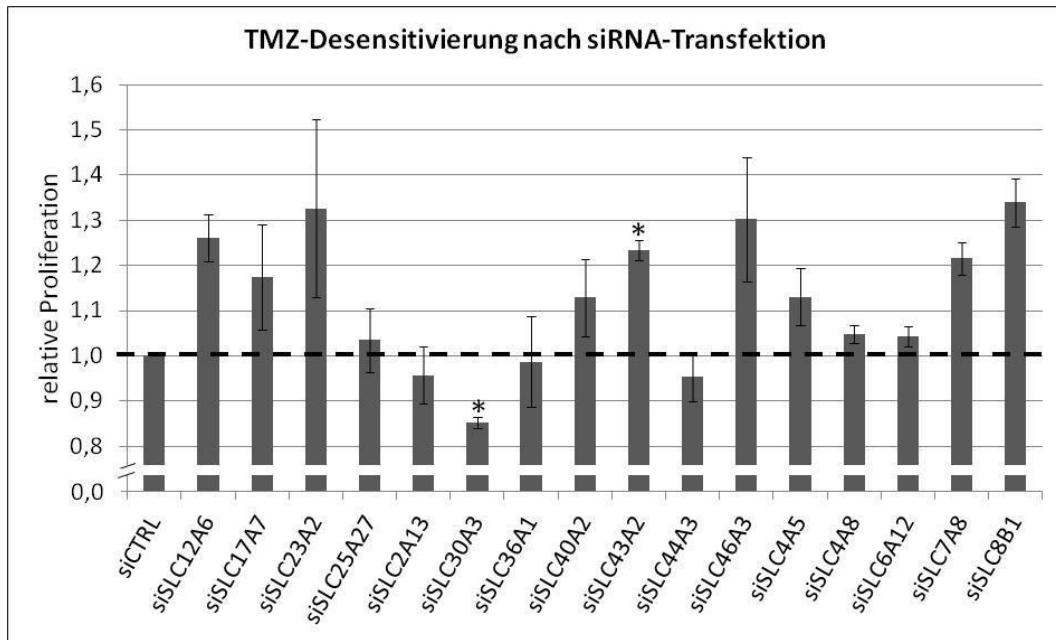


Abbildung 16: Temozolomid-Desensitivierung nach siRNA-Transfektion in U373MG-Zellen. Für einige Transporter ergeben sich (teilweise signifikante) relative Proliferations-Werte > 1 (im Vergleich zu den Kontroll-Zellen), was einer Temozolomid-Desensitivierung der Zellen nach siRNA-Transfektion (in einer VPA-unabhängigen Situation) entspricht. *p<0,05.

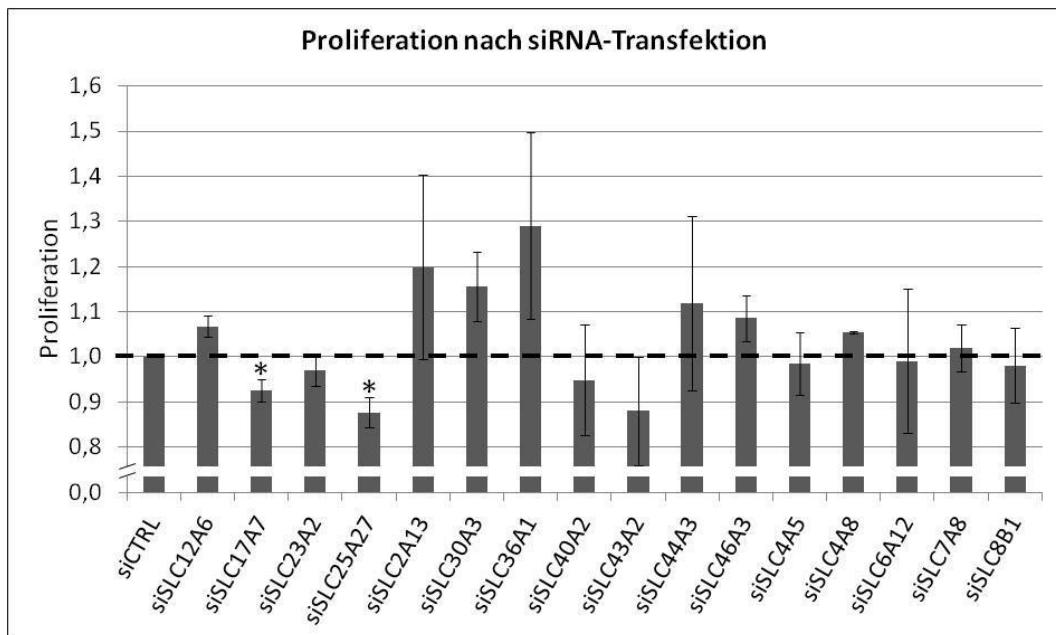


Abbildung 17: Proliferation nach siRNA-Transfektion in U373MG-Zellen. Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen ergibt sich nur für einige Transporter eine leicht erhöhte Proliferation. Somit scheint die siRNA-Transfektion der Transporter keinen wesentlichen Effekt auf die Zell-Proliferation zu haben. *p<0,05.

ERGEBNISSE

In einem abschließenden Versuch wurde die Knockdown-Effizienz der SLC-siRNAs exemplarisch für die siRNAs gegen die beiden Transporter SLC2A13 sowie SLC44A3 bestimmt (siehe Abbildung 18). Für beide Transporter ergibt sich eine Knockdown-Effizienz von etwa 60 % in den unbehandelten Zellen. In den Valproinsäure-behandelten Zellen beträgt die Knockdown-Effizienz sogar etwa 80 %.

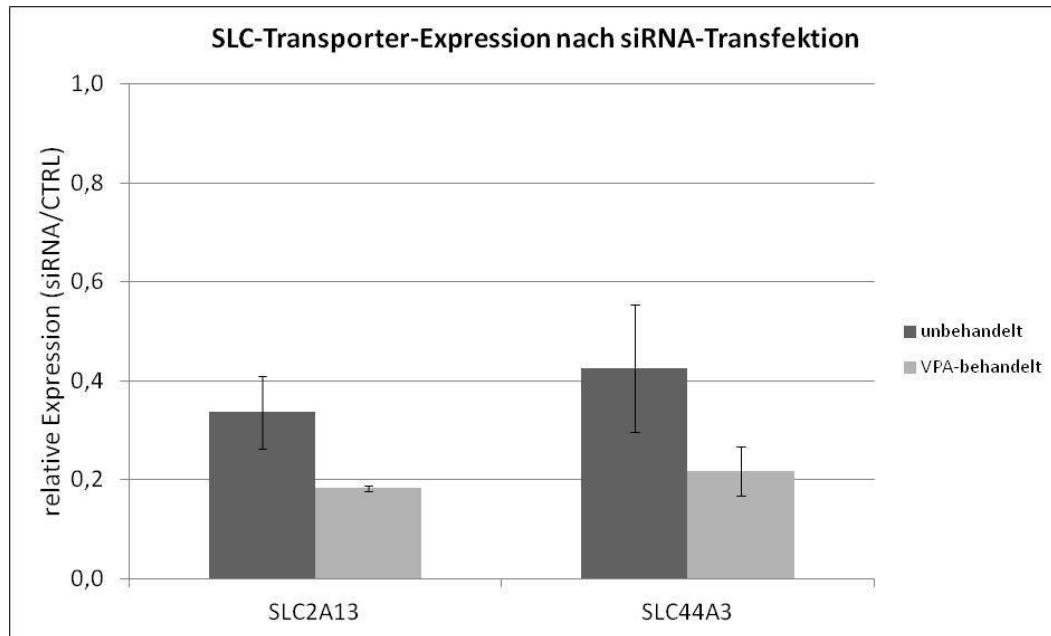


Abbildung 18: Expressions-Level der SLC-Transporter SCL2A13 und SLC44A3 in unbehandelten bzw. VPA-behandelten Zellen (U373MG) nach siRNA-Transfektion. Die dargestellte Knockdown-Effizienz ergibt sich aus der Normalisierung auf GAPDH und im Vergleich mit den jeweiligen Kontroll-Zellen (CTRL; mit Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert), deren Expressions-Werte jeweils gleich 1 gesetzt wurden.

Anschließend wurde zudem untersucht, ob die Transfektion mit siRNAs gegen einzelne SLC-Transporter ausreicht, um der durch die Valproinsäure-Behandlung induzierten Expressionssteigerung in ausreichendem Maß entgegen zu wirken. Hierfür wurde exemplarisch die relative Expression zweier Transporter (SLC2A13 und SLC44A3) jeweils in unbehandelten untransfizierten (= Wild-Typ, WT) Zellen, in VPA-behandelten untransfizierten Zellen sowie in VPA-behandelten mit siRNA-transfizierten Zellen ermittelt und miteinander verglichen (siehe Abbildung 19).

ERGEBNISSE

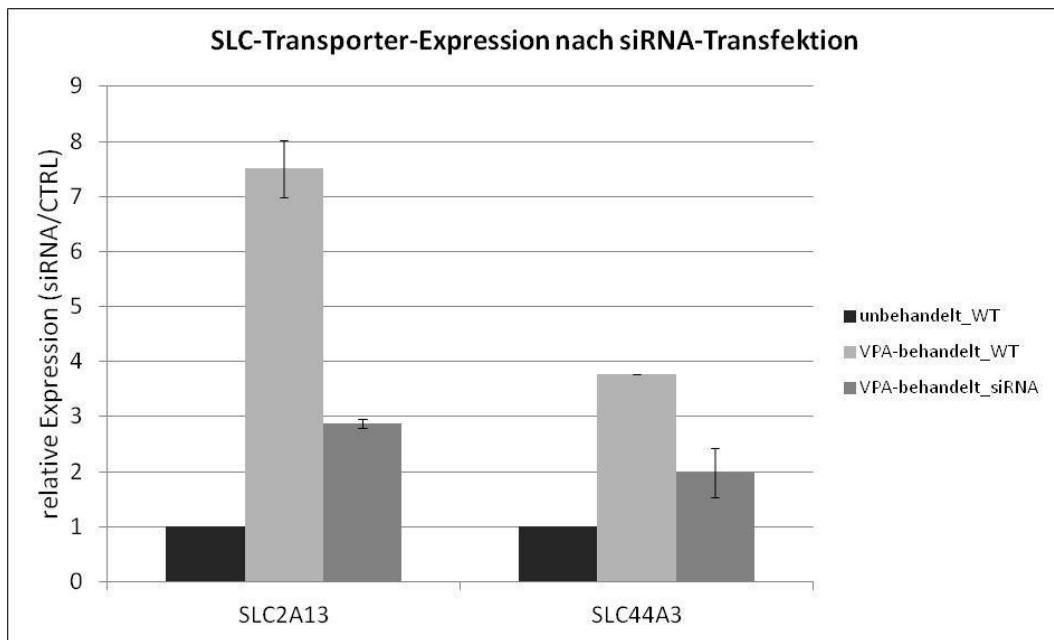


Abbildung 19: Expressions-Level der SLC-Transporter SCL2A13 und SLC44A3 in unbehandelten bzw. VPA-behandelten Zellen (U373MG) ohne bzw. nach siRNA-Transfektion. Die dargestellten Fold Change-Werte (relative Expression) ergeben sich aus der Normalisierung auf GAPDH und im Vergleich mit den jeweils unbehandelten Kontroll-Zellen (CTRL; Wildtyp (WT), d.h. untransfiziert), deren Expressions-Werte jeweils gleich 1 gesetzt wurden (schwarze Balken).

Nach der Behandlung der Zellen (U373MG) mit Valproinsäure kommt es (wie erwartet) zu einem deutlichen Expressions-Anstieg der beiden Transporter (etwa 7,5fach für SLC2A13, knapp 4fach für SLC44A3) im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (deren Expression jeweils gleich 1 gesetzt wurde). Außerdem weisen die VPA-vorbehandelten Zellen, die mit siRNAs gegen die SLC-Transporter transfiziert wurden, eine geringere Expression der Transporter auf als die VPA-vorbehandelten untransfizierten Zellen. Jedoch kann das ursprüngliche Expressions-Level der beiden Transporter nicht wieder hergestellt werden, d.h. trotz siRNA-Transfektion weisen die VPA-behandelten Zellen eine höhere SLC-Transporter-Expression auf als im unbehandelten untransfizierten Zustand. Die siRNA-Transfektion unter Valproinsäure reicht also nicht aus, um dem VPA-induzierten SLC-Transporter-Anstieg entgegen zu wirken und das SLC-Transporter-Expressions-Level wieder auf den Ausgangswert zurückzusetzen, was eine mögliche Erklärung für die beschränkte Aussagekraft der Rescue-Experimente darstellen könnte (siehe Diskussion).

5 DISKUSSION

Das Glioblastom ist beim Erwachsenen der häufigste bösartige hirneigene Tumor. Trotz aggressiver Therapie, die aus chirurgischer Resektion und anschließender kombinierter Radiochemotherapie besteht, ist die Prognose nach wie vor sehr schlecht. 20-80 % aller Hirntumor-Patienten leiden zusätzlich an epileptischen Anfällen (van Breemen, Wilms et al. 2007), woraus sich der Einsatz von Antiepileptika zusätzlich zur Chemotherapie ergibt. Zur Behandlung Hirntumor-assozierter epileptischer Anfälle wird neben Levetiracetam (Keppra®) die Valproinsäure (VPA) eingesetzt. Jedoch kann es bei gleichzeitiger Verabreichung zweier Medikament-Gruppen u.a. zu pharmakokinetischen Wechselwirkungen zwischen den chemotherapeutischen Agenzien und den Antiepileptika kommen (Yap, Chui et al. 2008). In Bezug auf die Valproinsäure wurde diesbezüglich die Hemmung des Metabolismus und folglich die Verlängerung der Halbwertszeit und der Toxizität der gleichzeitig eingenommenen Substanz beobachtet (Weller, Stupp et al. 2012).

Heutzutage wird in mehrerlei Hinsicht diskutiert, ob Valproinsäure im Einsatz gegen Krebs als wirkungsvolles Medikament verabreicht werden könnte. Aufgrund der Tatsache, dass VPA relativ kostengünstig ist, ein recht vorteilhaftes Nebenwirkungs-Spektrum besitzt und leicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Brodie and Brandes 2014), ergeben sich verschiedene denkbare Anwendungsmöglichkeiten des Histon-Deacetylase-Inhibitors als Anti-Krebs-Mittel. Einerseits wäre theoretisch der Einsatz von Valproinsäure als Monotherapie denkbar. Jedoch ist die Erfahrung auf diesem Gebiet sehr beschränkt und bislang nur in metastasierenden neuroendokrinen Karzinomen und myeloischen Erkrankungen untersucht (Pilatrino, Cilloni et al. 2005, Mohammed, Holen et al. 2011). Doch andererseits kann VPA natürlich auch in Kombination mit anderen Medikamenten wie epigenetischen Regulatoren, zytotoxischen Chemotherapeutika oder Immun-Modulatoren verabreicht werden. Von den epigenetischen Regulatoren rückten besonders demethylierende Agenzien in den Fokus der Untersuchungen, nachdem gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitor Azacitidin (Vidaza®) zu einem deutlich besseren Gesamt-Überleben von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom führte (Fenaux, Mufti et al. 2009). Die Kombination von HDAC-Inhibitoren mit DNMT-Inhibitoren ist gegenwärtig im Fokus zahlreicher klinischer Studien, beispielsweise für die Behandlung von Leukämie, nicht-

DISKUSSION

kleinzelligem Bronchialkarzinom oder Multiplem Myelom (Golabek, Strzelczyk et al. 2015). Doch können HDAC-Inhibitoren auch in Kombination mit DNA-schädigenden Medikamenten verabreicht werden. Ein Beispiel hierfür wäre Karenitecin® (BNP1350), ein zytotoxisches Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Topoisomerase-I-Inhibitoren. So konnte in Phase-I- und Phase-II-Studien gezeigt werden, dass die Valproinsäure bei Patienten mit malignem Melanom die von Karenitecin hervorgerufenen Effekte (DNA-Strangbrüche und Zytotoxizität) verstärkt (Daud, Dawson et al. 2009). Auch wurde Valproinsäure bereits in Kombination mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Epirubicin (Farmorubicin®) getestet. Dabei konnte beispielsweise eine Anti-Tumor-Aktivität bei Anthracyclin-resistenten Tumoren beobachtet werden (Munster, Marchion et al. 2007).

Bezüglich der Behandlung von Glioblastom-Patienten konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Valproinsäure in Kombination mit Temozolomid eine Anti-Krebs-Wirkung besitzt und das Überleben der Patienten verlängert. Für die offensichtlich verbesserte Wirksamkeit des Chemotherapeutikums werden in der Literatur zwei unterschiedliche Mechanismen in Betracht gezogen werden: Zum einen wird (laut der TEMODAR®-Packungsbeilage mit Verschreibungs-Informationen) die orale *clearance* von Temozolomid um bis zu 5 % verringert durch die gleichzeitige Gabe von Valproinsäure (Weller, Stupp et al. 2012). Teilweise könnte auch die erhöhte hämatologische Toxizität, die während der adjuvanten Phase der Temozolomid-Chemotherapie in Kombination mit Valproinsäure beobachtet wird, mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Temozolomid assoziiert sein. Zum anderen sensitiviert die Valproinsäure möglicherweise mittels ihrer Funktion als Histon-Deacetylase-Inhibitor Gliom-Zellen für Temozolomid. So zeigten beispielsweise Glioblastom-Patienten, die nach Valproinsäure-Einnahme erneut operiert worden waren, Anzeichen einer Hemmung der Histon-Deacetylasen (Tsai, Wei et al. 2012). Auch konnte in Patienten, deren Glioblastom adjuvant mit dem Alkylans Lomustin (Cecenu®) behandelt wurde, bei gleichzeitiger Einnahme eines nicht-Enzym-induzierenden Antiepileptikums (hauptsächlich Valproinsäure) ein längeres Überleben gegenüber Patienten, die (zusätzlich zu Lomustin) ein Enzym-induzierendes Antiepileptikum (vornehmlich Carbamazepin) erhalten hatten, beobachtet werden (Oberndorfer, Piribauer et al. 2005). In einem vor Kurzem veröffentlichten Review wird außerdem beschrieben, dass die Anti-Tumor-Therapie bei der Behandlung von Anfällen vorteilhaft sein kann, während gleichzeitig auch Antiepileptika positive Effekte auf den Tumor haben können (Huberfeld and Vecht 2016).

DISKUSSION

Auf Grundlage all dieser positiven therapeutischen Eigenschaften der Valproinsäure ergab bzw. ergibt sich die Überlegung, ob VPA möglicherweise sogar regelhaft bei der Behandlung von Glioblastomen in Kombination mit Temozolomid eingesetzt werden könnte/sollte. Jedoch müssten dazu der molekulare Wirkmechanismus sowie die molekularen Auswirkungen dieses Antiepileptikums noch besser erforscht bzw. verstanden werden, weshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit nun mittels einer umfassenden, unvoreingenommenen, genomweiten Analyse die (molekularen) Valproinsäure-Effekte auf Gliom-Zellen untersucht wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Valproinsäure von ihrer Wirkungsweise her betrachtet als Histon-Deacetylase-Inhibitor fungiert (Lane and Chabner 2009), wurden nicht nur mRNA-Sequenzierungen, sondern auch sog. ChIP-Seq-Analysen (DNA-Sequenzierungen im Anschluss an Chromatin-Immunpräzipitationen) durchgeführt. Nach der Behandlung von insgesamt 14 Zelllinien (sechs adhärente Glioblastom-Zelllinien, eine adhärente Zelllinie oligodendroglialen Ursprungs sowie sieben Glioblastom-Stammzelllinien) wurden dann zunächst – noch völlig unabhängig von den nachfolgenden *Next-Generation Sequencing*-Auswertungen – die funktionellen Auswirkungen der Valproinsäure-Behandlung auf die Zellen untersucht. Dabei konnte die bereits in *in vitro*-Studien in Gliom-Zelllinien (Ryu, Yoon et al. 2012, Van Nifterik, Van den Berg et al. 2012) gezeigte Sensitivierung für Temozolomid bestätigt werden. Außerdem konnte diese Sensitivierung, wenn auch in etwas schwächerem Ausmaß, ebenfalls in den untersuchten Glioblastom-Stammzelllinien, in denen solche Effekte bislang nicht publiziert wurden, gezeigt werden.

Beim Vergleich der molekularen Profile vor und nach Valproinsäure-Behandlung konnten *GO terms*, die das Wort „*transport*“ enthielten, als angereichert in den VPA-behandelten Zelllinien identifiziert werden. Innerhalb der angereicherten Gen-Gruppen fielen dabei besonders die SLC-Transporter auf. Transporter sind Membran-gebundene Proteine, die für den Transport von größeren und hydrophilen Molekülen, die biologische Membranen nicht selbstständig passieren können, zuständig sind (Lin, Yee et al. 2015). Neben den ABC (*ATP-binding cassette*)-Transportern, die ihre Energie aus der Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) beziehen und hauptsächlich den Efflux (d.h. den Ausstrom aus der Zelle) von Substraten vermitteln, sind die SLC (*solute carrier*)-Transporter die wichtigste Transporter-Superfamilie. Die Gruppe der SLC-Transporter, die sekundär- oder tertiär-aktiv Substrate vorrangig in Zellen hinein transportieren (und deshalb als Influx-Transporter bezeichnet werden), umfasst zum heutigen Stand 395

DISKUSSION

Mitglieder, die sich in 52 Untergruppen gliedern und sich sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran von Zellorganellen wie den Mitochondrien befinden (Hediger, Clemenccon et al. 2013). Transportiert werden eine Vielzahl von organischen und anorganischen Kationen und Anionen sowie ungeladene Moleküle (He, Vasiliou et al. 2009). Doch neben endogenen Substraten können die SLC-Transporter auch exogene Substrate wie Toxine und Medikamente in die Zellen transportieren und so die intrazelluläre Arzneimittel-Konzentration erhöhen (Joyce, McCann et al. 2015). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sie u.a. beim Transport von Anti-Krebs-Medikamenten über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Laquintana, Trapani et al. 2009). Ob SLC-Transporter auch beim Transport von Temozolomid von Bedeutung sind, ist jedoch bislang nicht untersucht.

Die Untersuchung der Transporter hinsichtlich ihrer Anti-Tumor-Eigenschaften gewinnt immer mehr an Bedeutung (Bhutia, Babu et al. 2016). Die beiden Transporter SLC5A8 und SLC26A3 beispielsweise konnten als Tumorsuppressoren im Kolon bestimmt werden (Chapman, Knoepp et al. 2002, Li, Myeroff et al. 2003). Die Tumor-unterdrückende Funktion des Transporter SLC39A1 hingegen ist auf die Prostata beschränkt (Costello, Franklin et al. 2005). Doch auch bei der Entstehung von Gliomen scheinen SLC-Transporter eine Rolle zu spielen. Der Transporter SLC17A7 wurde als bivalenter Tumorsuppressor identifiziert, der sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene in Glioblastom-Gewebe im Vergleich zu Normalhirn-Gewebe herunterreguliert war. Zusätzlich inhibiert die Überexpression dieses Transporters die Zell-Proliferation, -Migration und -Invasion von Glioblastom-Zellen (Lin, Lee et al. 2015). Außerdem wurde der Transporter SLC22A18 als Tumorsuppressor bei Gliomen evaluiert (Chu, Ma et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation dieses Transporters in der humanen Glioblastom-Zelllinie U251 zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber BCNU (Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea = Carmustin) (Chu, Ma et al. 2011) sowie gegenüber Bestrahlung führt (Chu, Zhou et al. 2014). Auf der anderen Seite scheint es so, als ob SLC-Transporter auch onkogene Eigenschaften besitzen können. So ist beispielsweise die Überexpression des Transporters SLC7A7 in Glioblastom-Patienten sowohl mit einem schlechteren Progressions-freien Überleben als auch mit einem schlechteren Gesamt-Überleben assoziiert (Fan, Meng et al. 2013).

Bei genauerer Betrachtung der *Next-Generation Sequencing*-Daten konnten zahlreiche SLC-Transporter in der Liste der hochregulierten und euchromatinisierten Gene bestätigt werden.

DISKUSSION

Diese Hochregulation nach VPA-Behandlung wurde anschließend zunächst auf mRNA-Ebene exemplarisch für vier SLC-Transporter (SLC17A7, SLC25A27, SLC30A3 und SLC6A12) in allen 14 Zelllinien erfolgreich validiert. Auch konnte mittels immunhistochemischer Färbungen an gepaarten (d.h. vor und nach Valproinsäure-Einnahme) Gewebe-Proben von Hirntumor-Patienten die Überexpression zweier SLC-Transporter (SLC17A7 und SLC25A27) nach bzw. unter VPA-Behandlung auf Protein-Ebene bestätigt werden.

Nachdem nun sowohl die VPA-induzierte Sensitivierung für Temozolomid, als auch die Hochregulation von SLC-Transportern nach VPA-Behandlung in den Zelllinien nachgewiesen worden war, sollte eine mögliche funktionelle Beziehung dieser beiden Beobachtungen weiterverfolgt werden. Dazu wurde zunächst untersucht, ob es möglich wäre, die VPA-induzierte Chemo-Sensitivierung durch einen siRNA-vermittelte Gen-Knockdown der SLC-Transporter rückgängig zu machen. Leider konnten die Effekte dieses Rescue-Experiments trotz der Tatsache, dass die Herunterregulation einiger weniger Transporter zu einer mittelstarken Temozolomid-Desensitivierung führte, nicht als überzeugend stark und beständig angesehen werden. Jedoch sorgte der Knockdown im VPA-unabhängigen Kontext bei einer wesentlich größeren Anzahl an SLC-Transportern für eine Desensitivierung. Auf die Proliferation direkt hingegen hatte die Herunterregulation der SLC-Transporter keinen Einfluss. Insgesamt betrachtet könnten die SLC-Transporter also durchaus eine Rolle in der durch Valproinsäure beeinflussten Temozolomid-Antwort der Zellen spielen. Verschiedene Gründe sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass in Bezug auf die siRNA-Transfektionen der SLC-Transporter nicht noch eindeutigere Effekte erzielt werden konnten: Zum einen gibt es insgesamt beinahe 400 SLC-Transporter mit überlappenden Funktionen, so dass der Knockdown eines einzelnen Transporters wahrscheinlich nicht ausreicht, um die gewünschten funktionellen Effekte zu erzielen. Zweitens konnte die siRNA-vermittelte Herunterregulation der SLC-Transporter der VPA-induzierten SLC-Überexpression nicht in ausreichendem Maß entgegenwirken, so dass die Expressions-Level der Transporter in den VPA-behandelten Zellen nicht auf ihre Ausgangswerte (im unbehandelten, untransfizierten Zustand) zurück gebracht werden konnten. Drittens kann Temozolomid aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften und seiner relativ kleinen Größe (Agarwala and Kirkwood 2000) die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden und ist daher bei der intrazellulären Aufnahme nicht unbedingt auf den Transport über SLC-Transporter angewiesen.

DISKUSSION

Im Anschluss an die funktionellen Analysen der SLC-Transporter wurden (bezüglich der Gliom-Pathogenese) wichtige und interessante Gen-Gruppen genauer untersucht, die möglicherweise mit dem verbesserten Temozolomid-Ansprechen der Zellen nach Valproinsäure-Behandlung in Verbindung stehen könnten. Dazu wurden die RNA-Seq-Daten der unbehandelten und VPA-behandelten Zelllinien hinsichtlich der Hoch- bzw. Herunterregulation einzelner Gene überprüft. Außerdem wurde in den ChIP-Seq-Daten die Euchromatinisierung der entsprechenden Gen-Promotoren betrachtet. Zunächst wurde das DNA-Reparatur-Gen *MGMT*, dessen Promoter-Methylierungs-Status von prädiktiver prognostischer Bedeutung bei Hirntumoren ist, einer gründlichen Analyse unterzogen. In der Literatur ist beschrieben, dass die Behandlung mit Valproinsäure zu einer Herunterregulation der *MGMT*-Expression führt und (dadurch) Zellen für Chemotherapeutika sensitiviert werden (Ryu, Yoon et al. 2012). Durch die verminderte Expression dieses DNA-Reparatur-Enzyms (sei es durch transkriptionelle Herunterregulation oder durch Promoter-Hypermethylierung) werden Schäden in der DNA weniger effektiv repariert, womit sich die Wirkungs-Verstärkung des Alkylans Temozolomid erklären lässt. Jedoch scheinen in den 14 untersuchten Zelllinien sowohl die Expression als auch die Promoter-Methylierung von *MGMT* kaum von der VPA-Behandlung betroffen zu sein. Die in sechs Zelllinien beobachtete Promoter-Euchromatinisierung kann den Sensitivierungs-Effekt der Valproinsäure nicht erklären, weshalb zusammengenommen diese Beobachtungen nicht für eine relevante Rolle des *MGMT*-Gens in der Vermittlung der VPA-induzierten Chemo-Sensitivierung sprechen.

Beim Glioblastom können jedoch auch andere DNA-Reparatur-Mechanismen an einer Veränderung des Ansprechens der Zellen auf Temozolomid beteiligt sein (Yoshimoto, Mizoguchi et al. 2012). So konnte zum einen die Herunterregulation zahlreicher Basenexzisions-Reparatur (BER)-Gene in den Zellen nach der Behandlung mit Valproinsäure beobachtet werden. Störungen im BER-Apparat, und insbesondere die Herunterregulation des Gens *APEX1* (*Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1*), sind in der Literatur ebenfalls mit einer Verstärkung der zytotoxischen Effekte dieses Chemotherapeutikums beschrieben (Zhang, Stevens et al. 2012, Montaldi, Godoy et al. 2015). Ebenso fiel auch die Herunterregulation der Gene *PARP2* und *PARP3* in zehn bzw. elf der untersuchten Zelllinien nach Valproinsäure-Behandlung auf. Diese Beobachtung kann als therapeutisch wertvoll interpretiert werden, da PARP-Inhibitoren (die ebenfalls zu einer Herunterregulation der PARP-Proteine führen) in der

DISKUSSION

Literatur für die Behandlung von Glioblastom-Patienten diskutiert werden (Chalmers 2010). Die Hemmung dieser DNA-Reparatur-Enzyme führt dazu, dass Einzelstrangbrüche weniger effektiv behoben werden können und somit die Anti-Tumor-Wirkung von Einzelstrangbrüchen-induzierenden Therapie-Ansätzen, wie beispielsweise die Verabreichung des alkylierenden Zytostatikums Temozolomid oder der Einsatz ionisierender Strahlung, verstärkt wird (Leonetti, Biroccio et al. 2012).

Neben Basenexzisions-Reparatur-Genen waren zum anderen auch zahlreiche Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur-Gene in den Zelllinien nach der Behandlung der Zellen mit Valproinsäure herunterreguliert, wobei besonders die beiden Gene *NBN* und *RAD51*, die in neun bzw. elf der 14 Zelllinien signifikant herunterreguliert waren, ins Auge fielen. Die Inaktivierung des *NBN*-Gens ist in der Literatur mit der Sensitivierung von Melanom-Zellen für Temozolomid beschrieben (Eich, Roos et al. 2010), während die Herunterregulation von *RAD51* in Gliom-Zellen nachgewiesenermaßen bereits einen Temozolomid-sensitivierenden Effekt erzielen konnte (Xipell, Aragon et al. 2016).

Die Herunterregulation von Mismatch-Reparatur (MMR)-Genen, die in den analysierten Zelllinien im Vergleich zu den BER- und den DSB-Reparatur-Genen nur in sehr geringem Ausmaß beobachtet werden konnte, wird in der Literatur häufig eher mit gegensätzlichen Effekten in Zusammenhang gebracht. So entwickelt sich beispielweise die Herunterregulation der Gene *MSH2* (*MutS Homolog 2*) und *MSH6* (*MutS Homolog 6*) während der Therapie mit alkylierenden Agenzien und würde eher zu einer Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Temozolomid führen (Yip, Miao et al. 2009, McFaline-Figueroa, Braun et al. 2015). Mit Ausnahme von *MLH1* waren die untersuchten MMR-Gene jedoch, wie bereits erwähnt, nur in vereinzelten Zelllinien von der Valproinsäure-Behandlung betroffen, so dass das Risiko einer Resistenz-Entwicklung als relativ gering angesehen werden kann.

Neben all diesen oben beschriebenen Effekten der Valproinsäure in Bezug auf ein verbessertes Temozolomid-Ansprechen der Zellen konnten auch „direkte“, Temozolomid-unabhängige Effekte auf die Zellen beobachtet werden. Einerseits zeigten nahezu alle Zelllinien nach der Valproinsäure-Behandlung eine verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Als molekulares Korrelat, das diesen Befund möglicherweise erklärt, kann die Euchromatinisierung und Hochregulation zahlreicher gut-establierter Tumorsuppressor-Gene angesehen werden. In jeder der 14 Zelllinien war mindestens ein

DISKUSSION

wichtiger Tumorsuppressor nach der Behandlung der Zellen mit VPA signifikant hochreguliert. Von den beiden Gene *CDKN1A* und *SFRP1*, die dabei auf mRNA-Ebene am häufigsten reguliert waren, weiß man, dass sie in Gliomen über epigenetische Regulationsmechanismen kontrolliert werden. Die durch den HDAC-Inhibitor Valproinsäure induzierte Hochregulation des Zellzyklus-Kontroll-Gens *CDKN1A* ist bereits in der Literatur beschrieben (Das, Aguilera et al. 2007). Dieser CDK-Inhibitor 1 (auch p21 genannt) inhibiert Cyclin-abhängige Kinasen und ist am p53-abhängigen Zellzyklus-Arrest nach DNA-Schädigung beteiligt. Die Expression des für einen Wnt-Antagonisten kodierenden Gens *SFRP1* ist bei Gliomen von positiver prognostischer Relevanz (Delic, Lottmann et al. 2014). *SFRP1*, das als Negativ-Regulator im Wnt-Signalweg, einem hoch-konservierten Signalweg der Zelle, der sowohl während der Embryonal- und Zellentwicklung als auch beim normalen Zellwachstum, bei der Zelldifferenzierung und bei der Proliferation eine wichtige Rolle spielt, sorgt *in vitro* in humanen malignen Gliom-Zellen für eine verminderte Zell-Motilität und -Invasivität (Roth, Wild-Bode et al. 2000). Durch die Hochregulation der Tumorsuppressoren sorgt die Valproinsäure also für eine Verbesserung der biologischen Eigenschaften des Tumors, es kommt zu einer „Benignisierung“ der Gliom-Zellen. Auch werden unter VPA, besonders in den Stammzelllinien, klassische Stammzellmarker herunterreguliert, wie beispielsweise CD44 und CD133, was zu einem differenzierteren Phänotyp führt, wie von Alvarez et al. bereits beschrieben (Alvarez, Field et al. 2015).

In Bezug auf die molekularen Glioblastom-Expressions-Subtypen (Verhaak, Hoadley et al. 2010) kam es durch die Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure zu unspezifischen euchromatinisierenden Gen-Effekten, aus denen jedoch keine konkrete Wirkungsrichtung ablesbar war, es kam nicht zu einem Wechsel der Subtypen. Die adhärenten Zelllinien behielten unter VPA – trotz der Tatsache, dass die proneuralen Signatur-Gene signifikant angereichert wurden – ihren mesenchymalen Subtyp bei. Die Stammzelllinien hingegen behielten trotz einer signifikanten Anreicherung der mit dem mesenchymalen Subtyp assoziierten Gene ihren proneuralen, mit einem besseren Überleben assoziierten Subtyp bei.

Zusammengefasst liefert diese Doktorarbeit eine umfassende *Next-Generation Sequencing*-Studie zur Aufklärung der globalen molekularen Valproinsäure-Effekte, sowohl auf epigenetischer (Histon-), als auch auf transkriptioneller Ebene präsentiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass die VPA-Effekte sehr mannigfaltig sind und sich einerseits direkt auf die Temozolomid-Antwort der Zellen auswirken, andererseits jedoch auch Temozolomid-unabhängige, begünstigende

DISKUSSION

Auswirkungen auf die Gliom-Biologie zu haben scheinen (siehe Abbildung 20). Die Gliom-Zellen werden durch die VPA-Behandlung für Temozolomid sensitiviert, es kommt zu einer Reduktion der IC₅₀-Werte in den VPA-behandelten Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen. Außerdem werden zahlreiche DNA-Reparatur-Gene herunterreguliert, womit eine verstärkte Wirkung des Chemotherapeutikums erklärt werden kann. Zusätzlich werden die (Influx-) SLC-Transporter hochreguliert, was möglicherweise zu einer verbesserten Temozolomid-Aufnahme in die Zellen führen könnte. Die durchgeführten Rescue-Experimente konnten jedoch leider (bislang) keinen direkten Zusammenhang zwischen der Hochregulation der SLC-Transporter und dem verbesserten Temozolomid-Ansprechen der Zellen herstellen. Auf der anderen Seite sorgt die Behandlung mit Valproinsäure für eine verminderte Proliferation der Zellen. Daneben kommt es zur Euchromatinisierung und Re-Expression zahlreicher Tumorsuppressor-Gene sowie zur Herunterregulation typischer Stammzell-Marker. Insgesamt betrachtet werden also die biologischen Eigenschaften verbessert, so dass man von einer „Benignisierung“ der Tumor-Zellen sprechen kann.

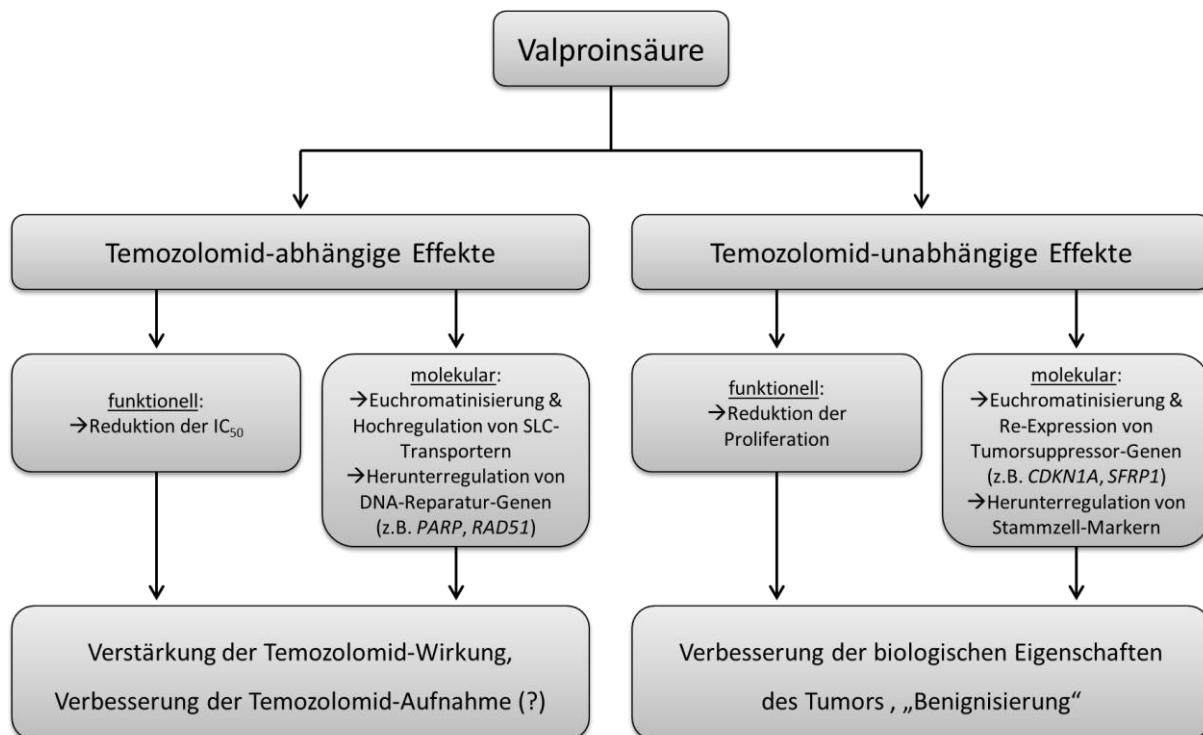


Abbildung 20: Übersicht über die in dieser Doktorarbeit beobachteten Valproinsäure-Effekte auf Gliom-Zellen. Es spielen sowohl Temozolomid-abhängige, als auch Temozolomid-unabhängige Effekte eine Rolle bei der VPA-Wirkungsentfaltung.

DISKUSSION

Die Daten liefern, vom molekularen Standpunkt aus betrachtet, eine potentielle anti-tumorigene Wirkung der Valproinsäure (in Kombination mit Temozolomid), was durchaus für einen „Mehrwert“ der Valproinsäure bei der Behandlung von Glioblastom-Patienten spricht. In einer kürzlich veröffentlichten retrospektiven Metaanalyse klinischer Studien wurde jedoch gezeigt, dass weder die Valproinsäure noch Levetiracetam, das ebenfalls als Antiepileptikum bei Hirntumor-Patienten eingesetzt wird, in Kombination mit der klassischen Radiochemotherapie bei Glioblastom-Patienten zu einem verbesserten progressionsfreien oder Gesamt-Überleben führt (gegenüber Patienten, die kein antiepileptisches Medikament einnahmen) (Happold, Gorlia et al. 2016). Ein möglicher Grund dafür, dass die gefundenen molekularen Effekte nicht einfach 1:1 in die Klinik übertragen werden können, ist die unglaublich große Anzahl der durch Valproinsäure erzeugten Veränderungen. Beispielsweise wurden in jeder einzelnen Zelllinie einige zehntausend euchromatinisierte Promoter-Regionen sowie einige tausend transkriptionell hochregulierten Gene detektiert, so dass es nahezu unmöglich war, all diese Veränderungen in ihrer Gesamtheit zu untersuchen. Deshalb wurde der Fokus auf die Untersuchung derjenigen Gene, die (überlappend) in der Mehrzahl der Zelllinien reguliert waren, gelegt. Es kann somit natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass in einzelnen Zelllinien bzw. in einzelnen Patienten gewisse molekulare Veränderungen den erläuterten, im Allgemeinen positiven Valproinsäure-Effekten entgegenwirken (siehe beispielsweise Herunterregulation der Mismatch-Reparatur-Gene).

Um die Auswirkungen der Valproinsäure abschließend klinisch zu klären, sollte eine prospektive, randomisierte, kontrollierte Studie zur Valproinsäure-Behandlung bei Glioblastom-Patienten in Erwägung gezogen werden. Dabei muss – basierend auf den vorliegenden Forschungs-Ergebnissen – berücksichtigt werden, dass es (noch) keinen einfachen molekularen Parameter zur Identifikation von Patienten, die von einer kombinierten Temozolomid-VPA-Therapie profitieren, gibt. Außerdem muss bedacht werden, dass jeder Patient aufgrund seiner eigenen molekularen Eigenschaften individuell auf die vielschichtigen molekularen Effekte reagieren wird. Beim Entwerfen einer solchen Studie wäre es also wichtig, das grundlegende molekulare Setup des einzelnen Tumors zu beachten und die Patienten-Gruppen so homogen wie möglich zu halten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Viele Glioblastom-Patienten leiden an epileptischen Anfällen, weshalb sie mit Antiepileptika, die dann zusätzlich zu chemotherapeutischen Medikamenten verabreicht werden, behandelt werden. Die Valproinsäure (VPA) ist ein Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi), der neben seinen antikonvulsiven Effekten auch eine Anti-Krebs-Wirkung besitzt: In einigen retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von VPA (in Kombination mit Temozolomid) zu einem verbesserten Überleben der Hirntumor-Patienten führt. Die genauen molekularen Effekte der Valproinsäure-Behandlung wurden bislang jedoch noch nicht hinreichend aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden nun sowohl adhärente Gliom-Zelllinien, als auch sphäroide Glioblastom-Stammzelllinien mit Valproinsäure behandelt. Anschließend wurden zunächst die funktionellen Effekte dieser Behandlung untersucht; ebenso fand eine umfassende, unvoreingenommene, genomweite *Next-Generation Sequencing*-Analyse auf Chromatin (ChIP)- und RNA-Ebene statt.

Die Behandlung mit Valproinsäure führte auf der einen Seite zu einer Sensitivierung der Zellen für Temozolomid. Ein wichtiger molekularer Aspekt in diesem Kontext war die VPA-induzierte transkriptionelle Hochregulation/Re-Expression zahlreicher SLC-Transporter. Diese Hochregulation konnte sowohl auf Histon-Ebene (in Form einer Promoter-Euchromatinisierung der entsprechenden Gene) als auch mittels immunhistochemischer Färbungen von humanem Biopsie-Gewebe nach VPA-Behandlung bestätigt werden. DNA-Reparatur-Gene hingegen wurden durch die Behandlung der Zellen mit Valproinsäure herunterreguliert.

Auf der anderen Seite kam es durch die Valproinsäure-Behandlung zu einer (Temozolomid-unabhängigen) verminderten Proliferation der Zellen. Auf molekularer Ebene konnte in diesem Kontext die transkriptionelle Hochregulation/Re-Expression und Euchromatinisierung zahlreicher, beim Glioblastom relevanter Tumorsuppressor-Gene beobachtet werden. Außerdem führte die Behandlung mit VPA zu einer Herunterregulation klassischer Stammzellmarker, während die Genexpressions-basierte Subklassifikation der Zelllinien (mesenchymal, proneural) erhalten blieb.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse also darauf hin, dass sowohl Temozolomid-abhängige, als auch Temozolomid-unabhängige Effekte bei der Wirkungsentfaltung der Valproinsäure eine Rolle spielen: Einerseits könnte VPA die Temozolomid-Aufnahme der Gliom-Zellen erhöhen und damit die Effizienz des Chemotherapeutikums verbessern. Gleichzeitig führt die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor zu einer (Chemotherapie-unabhängigen) „Benignisierung“ des Tumors, die biologischen Eigenschaften der Zellen werden verbessert.

Aus einer molekularen Perspektive sprechen die vorliegenden Daten somit durchaus für einen „Mehrwert“ der Valproinsäure bei der Behandlung von Glioblastom-Patienten, was künftig Einfluss auf klinische Therapie-Entscheidungen nehmen könnte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agarwala, S. S. and J. M. Kirkwood (2000). "Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma." Oncologist **5**(2): 144-151.
- Alvarez, A. A., M. Field, S. Bushnev, M. S. Longo and K. Sugaya (2015). "The effects of histone deacetylase inhibitors on glioblastoma-derived stem cells." J Mol Neurosci **55**(1): 7-20.
- Audic, S. and J. M. Claverie (1997). "The significance of digital gene expression profiles." Genome Res **7**(10): 986-995.
- Bailey, P. and H. Cushing (1926). "A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis." J.B.Lippincott Company.
- Bajbouj, K., C. Mawrin, R. Hartig, J. Schulze-Luehrmann, A. Wilisch-Neumann, A. Roessner and R. Schneider-Stock (2012). "P53-dependent antiproliferative and pro-apoptotic effects of trichostatin A (TSA) in glioblastoma cells." J Neurooncol **107**(3): 503-516.
- Barker, C. A., A. J. Bishop, M. Chang, K. Beal and T. A. Chan (2013). "Valproic acid use during radiation therapy for glioblastoma associated with improved survival." Int J Radiat Oncol Biol Phys **86**(3): 504-509.
- Baylin, S. B. and P. A. Jones (2011). "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications." Nat Rev Cancer **11**(10): 726-734.
- Beier, D., P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P. J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn and C. P. Beier (2007). "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles." Cancer Res **67**(9): 4010-4015.
- Berendsen, S., M. Broekman, T. Seute, T. Snijders, C. van Es, F. de Vos, L. Regli and P. Robe (2012). "Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: review of the preclinical rationale and published clinical results." Expert Opin Investig Drugs **21**(9): 1391-1415.
- Berger, S. L., T. Kouzarides, R. Shiekhattar and A. Shilatifard (2009). "An operational definition of epigenetics." Genes Dev **23**(7): 781-783.
- Bettstetter, M., S. Dechant, P. Ruemmele, C. Vogel, K. Kurz, M. Morak, G. Keller, E. Holinski-Feder, F. Hofstaedter and W. Dietmaier (2008). "MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples." Lab Invest **88**(12): 1367-1375.
- Bezecny, P. (2014). "Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience." Med Oncol **31**(6): 985.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bhutia, Y. D., E. Babu, S. Ramachandran, S. Yang, M. Thangaraju and V. Ganapathy (2016). "SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms." Biochem J **473**(9): 1113-1124.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Bolden, J. E., M. J. Peart and R. W. Johnstone (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 769-784.
- Brodie, S. A. and J. C. Brandes (2014). "Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far." Expert Rev Anticancer Ther **14**(10): 1097-1100.
- Campos, B., Z. Gal, A. Baader, T. Schneider, C. Sliwinski, K. Gassel, J. Bageritz, N. Grabe, A. von Deimling, P. Beckhove, C. Mogler, V. Goidts, A. Unterberg, V. Eckstein and C. Herold-Mende (2014). "Aberrant self-renewal and quiescence contribute to the aggressiveness of glioblastoma." J Pathol **234**(1): 23-33.
- Ceccacci, E. and S. Minucci (2016). "Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia." Br J Cancer.
- Chalmers, A. J. (2010). "Overcoming resistance of glioblastoma to conventional cytotoxic therapies by the addition of PARP inhibitors." Anticancer Agents Med Chem **10**(7): 520-533.
- Chapman, J. M., S. M. Knoepp, M. K. Byeon, K. W. Henderson and C. W. Schweinfest (2002). "The colon anion transporter, down-regulated in adenoma, induces growth suppression that is abrogated by E1A." Cancer Res **62**(17): 5083-5088.
- Chateauvieux, S., F. Morceau, M. Dicato and M. Diederich (2010). "Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid." J Biomed Biotechnol **2010**.
- Chen, C. H., Y. J. Chang, M. S. Ku, K. T. Chung and J. T. Yang (2011). "Enhancement of temozolomide-induced apoptosis by valproic acid in human glioma cell lines through redox regulation." J Mol Med (Berl) **89**(3): 303-315.
- Chinnaiyan, P., D. Cerna, W. E. Burgan, K. Beam, E. S. Williams, K. Camphausen and P. J. Tofilon (2008). "Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid." Clin Cancer Res **14**(17): 5410-5415.
- Chu, S. H., Y. B. Ma, D. F. Feng, H. Zhang, J. H. Qiu and Z. A. Zhu (2011). "Elevated expression of solute carrier family 22 member 18 increases the sensitivity of U251 glioma cells to BCNU." Oncol Lett **2**(6): 1139-1142.
- Chu, S. H., Y. B. Ma, D. F. Feng, H. Zhang, Z. A. Zhu, Z. Q. Li and P. C. Jiang (2012). "Correlation of low SLC22A18 expression with poor prognosis in patients with glioma." J Clin Neurosci **19**(1): 95-98.

LITERATURVERZEICHNIS

- Chu, S. H., Z. M. Zhou, S. Karri, Z. Q. Li and J. M. Zhao (2014). "In vitro and in vivo radiosensitization of human glioma U251 cells induced by upregulated expression of SLC22A18." *Cancer Gene Ther* **21**(3): 103-109.
- Costello, L. C., R. B. Franklin and P. Feng (2005). "Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer." *Mitochondrion* **5**(3): 143-153.
- Das, C. M., D. Aguilera, H. Vasquez, P. Prasad, M. Zhang, J. E. Wolff and V. Gopalakrishnan (2007). "Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines." *J Neurooncol* **85**(2): 159-170.
- Daud, A. I., J. Dawson, R. C. DeConti, E. Bicaku, D. Marchion, S. Bastien, F. A. Hausheer, 3rd, R. Lush, A. Neuger, D. M. Sullivan and P. N. Munster (2009). "Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial." *Clin Cancer Res* **15**(7): 2479-2487.
- Dawson, M. A. and T. Kouzarides (2012). "Cancer epigenetics: from mechanism to therapy." *Cell* **150**(1): 12-27.
- Delic, S., N. Lottmann, A. Stelzl, F. Liesenberg, M. Wolter, S. Gotze, M. Zapatka, Y. Shiio, M. C. Sabel, J. Felsberg, G. Reifenberger and M. J. Riemenschneider (2014). "MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation." *Neuro Oncol* **16**(2): 179-190.
- Dokmanovic, M., C. Clarke and P. A. Marks (2007). "Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives." *Mol Cancer Res* **5**(10): 981-989.
- Eich, M., W. P. Roos, G. L. Dianov, M. Digweed and B. Kaina (2010). "Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) causes resistance to methylating anticancer drugs such as temozolomide." *Mol Pharmacol* **78**(5): 943-951.
- Eot-Houllier, G., G. Fulcrand, L. Magnaghi-Jaulin and C. Jaulin (2009). "Histone deacetylase inhibitors and genomic instability." *Cancer Lett* **274**(2): 169-176.
- Fan, S., D. Meng, T. Xu, Y. Chen, J. Wang, X. Li, H. Chen, D. Lu, J. Chen and Q. Lan (2013). "Overexpression of SLC7A7 predicts poor progression-free and overall survival in patients with glioblastoma." *Med Oncol* **30**(1): 384.
- Farrell, C. J. and S. R. Plotkin (2007). "Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes." *Neurol Clin* **25**(4): 925-946, viii.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-153.

LITERATURVERZEICHNIS

- Felix, F. H., N. M. Trompieri, O. L. de Araujo, K. M. da Trindade and J. B. Fontenele (2011). "Potential role for valproate in the treatment of high-risk brain tumors of childhood-results from a retrospective observational cohort study." Pediatr Hematol Oncol **28**(7): 556-570.
- Fenaux, P., G. J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, C. Finelli, A. Giagounidis, R. Schoch, N. Gattermann, G. Sanz, A. List, S. D. Gore, J. F. Seymour, J. M. Bennett, J. Byrd, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. Beach, L. R. Silverman and M. D. S. S. G. International Vidaza High-Risk (2009). "Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study." Lancet Oncol **10**(3): 223-232.
- Galanis, E., K. A. Jaeckle, M. J. Maurer, J. M. Reid, M. M. Ames, J. S. Hardwick, J. F. Reilly, A. Loboda, M. Nebozhyn, V. R. Fantin, V. M. Richon, B. Scheithauer, C. Giannini, P. J. Flynn, D. F. Moore, Jr., J. Zwiebel and J. C. Buckner (2009). "Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study." J Clin Oncol **27**(12): 2052-2058.
- Golabek, K., J. K. Strzelczyk, A. Wiczkowski and M. Michalski (2015). "Potential use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." Contemp Oncol (Pozn) **19**(6): 436-440.
- Gottlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O. H. Kramer, A. Schimpf, S. Giavara, J. P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P. G. Pelicci and T. Heinzel (2001). "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells." EMBO J **20**(24): 6969-6978.
- Gulden Sala, W. and R. Stupp (2016). "Neue Perspektiven in der Diagnostik und Therapie der Gliome: Moderne Therapiemodalitäten und Molekularpathologie." Aerzteverlag medinfo AG: 22-27.
- Happold, C., T. Gorlia, O. Chinot, M. R. Gilbert, L. B. Nabors, W. Wick, S. L. Pugh, M. Hegi, T. Cloughesy, P. Roth, D. A. Reardon, J. R. Perry, M. P. Mehta, R. Stupp and M. Weller (2016). "Does Valproic Acid or Levetiracetam Improve Survival in Glioblastoma? A Pooled Analysis of Prospective Clinical Trials in Newly Diagnosed Glioblastoma." J Clin Oncol.
- Hasina, R., M. Surati, I. Kawada, Q. Arif, G. B. Carey, R. Kanteti, A. N. Husain, M. K. Ferguson, E. E. Vokes, V. M. Villaflor and R. Salgia (2013). "O-6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase methylation enhances response to temozolomide treatment in esophageal cancer." J Carcinog **12**: 20.
- He, L., K. Vasiliou and D. W. Nebert (2009). "Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily." Hum Genomics **3**(2): 195-206.
- Hediger, M. A., B. Clemenccon, R. E. Burrier and E. A. Bruford (2013). "The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction." Mol Aspects Med **34**(2-3): 95-107.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G.

LITERATURVERZEICHNIS

- Cairncross, R. C. Janzer and R. Stupp (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
- Hosein, A. N., Y. C. Lim, B. Day, B. Stringer, S. Rose, R. Head, L. Cosgrove, P. Sminia, M. Fay and J. H. Martin (2015). "The effect of valproic acid in combination with irradiation and temozolomide on primary human glioblastoma cells." J Neurooncol **122**(2): 263-271.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nat Protoc **4**(1): 44-57.
- Huberfeld, G. and C. J. Vecht (2016). "Seizures and gliomas--towards a single therapeutic approach." Nat Rev Neurol **12**(4): 204-216.
- Iwamoto, F. M., K. R. Lamborn, J. G. Kuhn, P. Y. Wen, W. K. Yung, M. R. Gilbert, S. M. Chang, F. S. Lieberman, M. D. Prados and H. A. Fine (2011). "A phase I/II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin for adults with recurrent malignant glioma: North American Brain Tumor Consortium Study 03-03." Neuro Oncol **13**(5): 509-516.
- Jolliffe, I. T. and J. Cadima (2016). "Principal component analysis: a review and recent developments." Philos Trans A Math Phys Eng Sci **374**(2065): 20150202.
- Joyce, H., A. McCann, M. Clynes and A. Larkin (2015). "Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism." Expert Opin Drug Metab Toxicol **11**(5): 795-809.
- Jukich, P. J., B. J. McCarthy, T. S. Surawicz, S. Freels and F. G. Davis (2001). "Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994." Neuro Oncol **3**(3): 141-151.
- Kerkhof, M., J. C. Dielemans, M. S. van Breemen, H. Zwinkels, R. Walchenbach, M. J. Taphoorn and C. J. Vecht (2013). "Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme." Neuro Oncol **15**(7): 961-967.
- Kim, Y. Z. (2014). "Altered histone modifications in gliomas." Brain Tumor Res Treat **2**(1): 7-21.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Krauze, A. V., S. D. Myrehaug, M. G. Chang, D. J. Holdford, S. Smith, J. Shih, P. J. Tofilon, H. A. Fine and K. Camphausen (2015). "A Phase 2 Study of Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients With Glioblastoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **92**(5): 986-992.
- Kusaczuk, M., R. Kretowski, A. Stypulkowska and M. Cechowska-Pasko (2016). "Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor - belinostat - in glioblastoma cell lines: a preliminary report." Invest New Drugs **34**(5): 552-564.
- Lane, A. A. and B. A. Chabner (2009). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." J Clin Oncol **27**(32): 5459-5468.

LITERATURVERZEICHNIS

- Laquintana, V., A. Trapani, N. Denora, F. Wang, J. M. Gallo and G. Trapani (2009). "New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors." Expert Opin Drug Deliv **6**(10): 1017-1032.
- Lee, E. Q., V. K. Puduvalli, J. M. Reid, J. G. Kuhn, K. R. Lamborn, T. F. Cloughesy, S. M. Chang, J. Drappatz, W. K. Yung, M. R. Gilbert, H. I. Robins, F. S. Lieberman, A. B. Lassman, R. M. McGovern, J. Xu, S. Desideri, X. Ye, M. M. Ames, I. Espinoza-Delgado, M. D. Prados and P. Y. Wen (2012). "Phase I study of vorinostat in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 04-03." Clin Cancer Res **18**(21): 6032-6039.
- Lee, E. Q., D. A. Reardon, D. Schiff, J. Drappatz, A. Muzikansky, S. A. Grimm, A. D. Norden, L. Nayak, R. Beroukhim, M. L. Rinne, A. S. Chi, T. T. Batchelor, K. Hempfling, C. McCluskey, K. H. Smith, S. C. Gaffey, B. Wrigley, K. L. Ligon, J. J. Raizer and P. Y. Wen (2015). "Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma." Neuro Oncol **17**(6): 862-867.
- Leonetti, C., A. Biroccio, G. Graziani and L. Tentori (2012). "Targeted therapy for brain tumours: role of PARP inhibitors." Curr Cancer Drug Targets **12**(3): 218-236.
- Li, H., L. Myeroff, D. Smiraglia, M. F. Romero, T. P. Pretlow, L. Kasturi, J. Lutterbaugh, R. M. Rerko, G. Casey, J. P. Issa, J. Willis, J. K. Willson, C. Plass and S. D. Markowitz (2003). "SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8412-8417.
- Lin, B., H. Lee, J. G. Yoon, A. Madan, E. Wayner, S. Tonning, P. Hothi, B. Schroeder, I. Ulasov, G. Foltz, L. Hood and C. Cobbs (2015). "Global analysis of H3K4me3 and H3K27me3 profiles in glioblastoma stem cells and identification of SLC17A7 as a bivalent tumor suppressor gene." Oncotarget **6**(7): 5369-5381.
- Lin, L., S. W. Yee, R. B. Kim and K. M. Giacomini (2015). "SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities." Nat Rev Drug Discov **14**(8): 543-560.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol.
- Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016). "The 2016 World Health

LITERATURVERZEICHNIS

- Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.
- Lucio-Eterovic, A. K., M. A. Cortez, E. T. Valera, F. J. Motta, R. G. Queiroz, H. R. Machado, C. G. Carlotti, Jr., L. Neder, C. A. Scrideli and L. G. Tone (2008). "Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas." BMC Cancer **8**: 243.
- Malzkorn, B., J. Felsberg and G. Reifenberger (2015). "Integrierte histologische und molekulare Diagnostik von Gliomen." Trillium Krebsmedizin **24**(5): 288-292.
- Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller and W. K. Kelly (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." Nat Rev Cancer **1**(3): 194-202.
- Marks, P. A. and R. Breslow (2007). "Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug." Nat Biotechnol **25**(1): 84-90.
- McFaline-Figueroa, J. L., C. J. Braun, M. Stanciu, Z. D. Nagel, P. Mazzucato, D. Sangaraju, E. Cerniauskas, K. Barford, A. Vargas, Y. Chen, N. Tretyakova, J. A. Lees, M. T. Hemann, F. M. White and L. D. Samson (2015). "Minor Changes in Expression of the Mismatch Repair Protein MSH2 Exert a Major Impact on Glioblastoma Response to Temozolomide." Cancer Res **75**(15): 3127-3138.
- Michaelis, M., H. W. Doerr and J. Cinatl, Jr. (2007). "Valproic acid as anti-cancer drug." Curr Pharm Des **13**(33): 3378-3393.
- Mohammed, T. A., K. D. Holen, R. Jaskula-Sztul, D. Mulkerin, S. J. Lubner, W. R. Schelman, J. Eickhoff, H. Chen and N. K. Loconte (2011). "A pilot phase II study of valproic acid for treatment of low-grade neuroendocrine carcinoma." Oncologist **16**(6): 835-843.
- Montaldi, A. P., P. R. Godoy and E. T. Sakamoto-Hojo (2015). "APE1/REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line." Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen **793**: 19-29.
- Moore, S. D., S. R. Herrick, T. A. Ince, M. S. Kleinman, P. Dal Cin, C. C. Morton and B. J. Quade (2004). "Uterine leiomyomata with t(10;17) disrupt the histone acetyltransferase MORF." Cancer Res **64**(16): 5570-5577.
- Munster, P., D. Marchion, E. Bicaku, M. Schmitt, J. H. Lee, R. DeConti, G. Simon, M. Fishman, S. Minton, C. Garrett, A. Chiappori, R. Lush, D. Sullivan and A. Daud (2007). "Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study." J Clin Oncol **25**(15): 1979-1985.
- Nakagawa, M., Y. Oda, T. Eguchi, S. Aishima, T. Yao, F. Hosoi, Y. Basaki, M. Ono, M. Kuwano, M. Tanaka and M. Tsuneyoshi (2007). "Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues." Oncol Rep **18**(4): 769-774.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nooshmehr, H., D. J. Weisenberger, K. Diefes, H. S. Phillips, K. Pujara, B. P. Berman, F. Pan, C. E. Pelloski, E. P. Sulman, K. P. Bhat, R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, D. N. Hayes, C. M. Perou, H. K. Schmidt, L. Ding, R. K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L. M. Cope, J. Buckley, J. G. Herman, S. B. Baylin, P. W. Laird, K. Aldape and N. Cancer Genome Atlas Research (2010). "Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma." *Cancer Cell* **17**(5): 510-522.
- Oberndorfer, S., M. Piribauer, C. Marosi, H. Lahrmann, P. Hitzenberger and W. Grisold (2005). "P450 enzyme inducing and non-enzyme inducing antiepileptics in glioblastoma patients treated with standard chemotherapy." *J Neurooncol* **72**(3): 255-260.
- Ohgaki, H. (2009). "Epidemiology of brain tumors." *Methods Mol Biol* **472**: 323-342.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lutolf and P. Kleihues (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." *Cancer Res* **64**(19): 6892-6899.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(6): 479-489.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." *Am J Pathol* **170**(5): 1445-1453.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." *Clin Cancer Res* **19**(4): 764-772.
- Pelloski, C. E., K. V. Ballman, A. F. Furth, L. Zhang, E. Lin, E. P. Sulman, K. Bhat, J. M. McDonald, W. K. Yung, H. Colman, S. Y. Woo, A. B. Heimberger, D. Suki, M. D. Prados, S. M. Chang, F. G. Barker, 2nd, J. C. Buckner, C. D. James and K. Aldape (2007). "Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma." *J Clin Oncol* **25**(16): 2288-2294.
- Phillips, H. S., S. Kharbanda, R. Chen, W. F. Forrest, R. H. Soriano, T. D. Wu, A. Misra, J. M. Nigro, H. Colman, L. Soroceanu, P. M. Williams, Z. Modrusan, B. G. Feuerstein and K. Aldape (2006). "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." *Cancer Cell* **9**(3): 157-173.
- Pilatrino, C., D. Cilloni, E. Messa, A. Morotti, E. Giugliano, M. Pautasso, U. Familiari, S. Cappia, P. G. Pelicci, F. Lo Coco, G. Saglio and A. Guerrasio (2005). "Increase in platelet count in older, poor-risk patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome treated with valproic acid and all-trans retinoic acid." *Cancer* **104**(1): 101-109.
- Pont, L. M., K. Naipal, J. J. Kloezeman, S. Venkatesan, M. van den Bent, D. C. van Gent, C. M. Dirven, R. Kanaar, M. L. Lamfers and S. Leenstra (2015). "DNA damage response and anti-

LITERATURVERZEICHNIS

- apoptotic proteins predict radiosensitization efficacy of HDAC inhibitors SAHA and LBH589 in patient-derived glioblastoma cells." Cancer Lett **356**(2 Pt B): 525-535.
- Prakash, O., W. J. Lukiw, F. Peruzzi, K. Reiss and A. E. Musto (2012). "Gliomas and seizures." Med Hypotheses **79**(5): 622-626.
- Quandt, K., K. Grote and T. Werner (1996). "GenomeInspector: basic software tools for analysis of spatial correlations between genomic structures within megabase sequences." Genomics **33**(2): 301-304.
- Redjal, N., C. Reinshagen, A. Le, B. P. Walcott, E. McDonnell, J. Dietrich and B. V. Nahed (2016). "Valproic acid, compared to other antiepileptic drugs, is associated with improved overall and progression-free survival in glioblastoma but worse outcome in grade II/III gliomas treated with temozolomide." J Neurooncol **127**(3): 505-514.
- Riemenschneider, M. J. and G. Reifenberger (2009). "Molecular neuropathology of gliomas." Int J Mol Sci **10**(1): 184-212.
- Roth, W., C. Wild-Bode, M. Platten, C. Grimmel, H. S. Melkonyan, J. Dichgans and M. Weller (2000). "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells." Oncogene **19**(37): 4210-4220.
- Ryu, C. H., W. S. Yoon, K. Y. Park, S. M. Kim, J. Y. Lim, J. S. Woo, C. H. Jeong, Y. Hou and S. S. Jeun (2012). "Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells." J Biomed Biotechnol **2012**: 987495.
- Schebesch, K. M., M. Proescholdt, J. Hohne, C. Hohenberger, E. Hansen, M. J. Riemenschneider, W. Ullrich, C. Doenitz, J. Schlaier, M. Lange and A. Brawanski (2013). "Sodium fluorescein-guided resection under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery--a feasibility study." Acta Neurochir (Wien) **155**(4): 693-699.
- Schmidt, N. (2011). "Molecular analysis of small Ras-related GTPase genes with potential tumor suppressor function in human gliomas.", Monographie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schmidt, N., S. Windmann, G. Reifenberger and M. J. Riemenschneider (2012). "DNA hypermethylation and histone modifications downregulate the candidate tumor suppressor gene RRP22 on 22q12 in human gliomas." Brain Pathol **22**(1): 17-25.
- Schones, D. E. and K. Zhao (2008). "Genome-wide approaches to studying chromatin modifications." Nat Rev Genet **9**(3): 179-191.
- Schwartzbaum, J. A., J. L. Fisher, K. D. Aldape and M. Wrensch (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma." Nat Clin Pract Neurol **2**(9): 494-503; quiz 491 p following 516.
- Selokar, N. L., L. St John, T. Revay, W. A. King, S. K. Singla and P. Madan (2013). "Effect of histone deacetylase inhibitor valproic acid treatment on donor cell growth characteristics, cell

LITERATURVERZEICHNIS

- cycle arrest, apoptosis, and handmade cloned bovine embryo production efficiency." Cell Reprogram **15**(6): 531-542.
- Shahbazian, M. D. and M. Grunstein (2007). "Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation." Annu Rev Biochem **76**: 75-100.
- Stummer, W., U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, H. J. Reulen and A. L.-G. S. Group (2006). "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial." Lancet Oncol **7**(5): 392-401.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiotherapy and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(43): 15545-15550.
- Tepel, M., P. Roerig, M. Wolter, D. H. Gutmann, A. Perry, G. Reifenberger and M. J. Riemenschneider (2008). "Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma." Int J Cancer **123**(9): 2080-2086.
- Thiagalingam, S., K. H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam and J. F. Ponte (2003). "Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code." Ann N Y Acad Sci **983**: 84-100.
- Tsai, H. C., K. C. Wei, C. N. Tsai, Y. C. Huang, P. Y. Chen, S. M. Chen, Y. J. Lu and S. T. Lee (2012). "Effect of valproic acid on the outcome of glioblastoma multiforme." Br J Neurosurg **26**(3): 347-354.
- Turner, B. M. (2005). "Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones." Nat Struct Mol Biol **12**(2): 110-112.
- Ugur, H. C., M. Taspinar, S. Ilgaz, F. Sert, H. Canpinar, J. A. Rey, J. S. Castresana and A. Sunguroglu (2014). "Chemotherapeutic resistance in anaplastic astrocytoma cell lines treated with a temozolomide-lomeguatrib combination." Mol Biol Rep **41**(2): 697-703.
- van Breemen, M. S., E. B. Wilms and C. J. Vecht (2007). "Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management." Lancet Neurol **6**(5): 421-430.

LITERATURVERZEICHNIS

- Van Nifterik, K. A., J. Van den Berg, B. J. Slotman, M. V. Lafleur, P. Sminia and L. J. Stalpers (2012). "Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and gamma-radiation." J Neurooncol **107**(1): 61-67.
- Vecht, C. J., M. Kerkhof and A. Duran-Pena (2014). "Seizure prognosis in brain tumors: new insights and evidence-based management." Oncologist **19**(7): 751-759.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes and N. Cancer Genome Atlas Research (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal and R. A. Martienssen (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." Science **297**(5588): 1833-1837.
- Wang, Z., C. Zang, K. Cui, D. E. Schones, A. Barski, W. Peng and K. Zhao (2009). "Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes." Cell **138**(5): 1019-1031.
- Watanabe, K., O. Tachibana, K. Sata, Y. Yonekawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (1996). "Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas." Brain Pathol **6**(3): 217-223; discussion 223-214.
- Weller, M. (2013). "Are we ready for a randomized trial of valproic acid in newly diagnosed glioblastoma?" Neuro Oncol **15**(7): 809-810.
- Weller, M., T. Gorlia, J. G. Cairncross, M. J. van den Bent, W. Mason, K. Belanger, A. A. Brandes, U. Bogdahn, D. R. Macdonald, P. Forsyth, A. O. Rossetti, D. Lacombe, R. O. Mirimanoff, C. J. Vecht and R. Stupp (2011). "Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma." Neurology **77**(12): 1156-1164.
- Weller, M., G. Reifenberger, J. C. Tonn and W. Wick (2016). "Gliome: Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie." Dtsch Arztebl International **113**(6): -18-.
- Weller, M., R. Stupp and W. Wick (2012). "Epilepsy meets cancer: when, why, and what to do about it?" Lancet Oncol **13**(9): e375-382.
- Weseler, A. (2014). "Über den Genen: Epi-genetik - Teil 2." Pharmazeutische Wissenschaft: 6-13.
- Wu, L., L. Yang, Y. Xiong, H. Guo, X. Shen, Z. Cheng, Y. Zhang, Z. Gao and X. Zhu (2014). "Annexin A5 promotes invasion and chemoresistance to temozolomide in glioblastoma multiforme cells." Tumour Biol **35**(12): 12327-12337.

LITERATURVERZEICHNIS

- Xipell, E., T. Aragon, N. Martinez-Velez, B. Vera, M. A. Idoate, J. J. Martinez-Irujo, A. G. Garzon, M. Gonzalez-Huarriz, A. M. Acanda, C. Jones, F. F. Lang, J. Fueyo, C. Gomez-Manzano and M. M. Alonso (2016). "Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51." Neuro Oncol.
- Yap, K. Y., W. K. Chui and A. Chan (2008). "Drug interactions between chemotherapeutic regimens and antiepileptics." Clin Ther **30**(8): 1385-1407.
- Yin, D., J. M. Ong, J. Hu, J. C. Desmond, N. Kawamata, B. M. Konda, K. L. Black and H. P. Koefller (2007). "Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor: effects on gene expression and growth of glioma cells in vitro and in vivo." Clin Cancer Res **13**(3): 1045-1052.
- Yip, S., J. Miao, D. P. Cahill, A. J. Iafrate, K. Aldape, C. L. Nutt and D. N. Louis (2009). "MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance." Clin Cancer Res **15**(14): 4622-4629.
- Yoshimoto, K., M. Mizoguchi, N. Hata, H. Murata, R. Hatae, T. Amano, A. Nakamizo and T. Sasaki (2012). "Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma." Front Oncol **2**: 186.
- Zhang, J., M. F. Stevens and T. D. Bradshaw (2012). "Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance." Curr Mol Pharmacol **5**(1): 102-114.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µ	mikro
bFGF2	<i>basic fibroblast growth factor2</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
h	hours, Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
l	Liter
m	Meter
m	milli
M	Molar
min	Minuten
n	nano
NP-40	Nonidet P-40
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
(m)RNA	(<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume in volume</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich an allererster Stelle bei Herrn Prof. Markus J. Riemenschneider für die Überlassung dieses hochinteressanten wissenschaftlichen Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Labor der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg anzufertigen. Ich danke ihm für die äußerst kompetente und engagierte Betreuung meiner Arbeit, für die fachliche Unterstützung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und für die Korrektur des Manuskripts.

Herrn Prof. Martin Proescholdt danke ich für seine motivierende Mentoren-Tätigkeit, für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Unterstützung bei der Beschaffung klinischer Patienten-Daten.

Herrn Prof. Michael Rehli danke ich ebenfalls für seine Mentoren-Tätigkeit und für die Möglichkeit, in seinem Labor die für die Chromatin-Immunpräzipitationen notwendigen Ultraschall-Behandlungen der Proben durchzuführen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen der Abteilung für Neuropathologie ganz herzlich bedanken für die fruchtbare Zusammenarbeit und für ein hervorragendes Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank geht dabei an Tanja Rothhammer-Hampl, Julia Lorenz und Markus Schulze, die mir im Labor auf jede erdenkliche Weise mit Rat und Tat zur Seite standen. Maria Hirblinger, Susanne Brüggemann und Anja Sabo danke ich für ihre exzellente technische Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Natalia Velez Char, Saida Zoubaa, Gabi Sommer, Gerlinde Hiltl, Lydia Pawelko, Maria Hutterer, Florian Hessenauer, Stefan Swoboda und Christine Zander für ihre stets freundliche und kollegiale Unterstützung.

Mein Dank gilt ferner auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Sabit Delic und Anja Stelzl, mit denen ich in den ersten zwei Jahren meiner Doktorarbeit erfolgreich zusammenarbeiten durfte.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitgliedern der AG Rehli, Claudia Gebhard, Dagmar Glatz und Julia Wimmer, bedanken für die Einführung in die Herstellung von NGS-Libraries und für die Hilfe bei den RNA-Seq-Auswertungen sowie beim Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) für die Durchführung aller Sequenzierungen.

Zu guter Letzt gebührt mein allergrößter Dank meinen Freunden und meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich Zeit meines Lebens unterstützt und an mich geglaubt haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Sabine Hoja, geboren am 11.03.1987 in Nürnberg, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 12. Januar 2017

Sabine Hoja