Medizinische Fakultät

der

Universität Duisburg-Essen

Klinik für Kinderheilkunde III

Die Bedeutung der Lysin-spezifischen Histon-Demethylase 1 (LSD1/KDM1A) im Medulloblastom und in seinen Vorläuferzellen

Inaugural–Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Christina Brockmeyer

aus Bochum

2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/76640
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20220919-094330-0

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. A. Schramm

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. G. Fleischhack

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2022

Publikation:

The KDM1A histone demethylase is a promising new target for the epigenetic therapy of medulloblastoma

Kristian W Pajtler, Christina Weingarten, Theresa Thor, Annette Künkele, Lukas C Heukamp, Reinhard Büttner, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Michael Grotzer, Anja Rieb, Annika Sprüssel, Angelika Eggert, Alexander Schramm, Johannes H Schulte

Acta Neuropathol Commun. 2013; 1: 19. Published online 2013 May 29. doi: 10.1186/2051-5960-1-19PMCID: PMC3893444

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 7
1.1 Das Medulloblastom 7
1.1.1 Definition 7
1.1.2 Epidemiologie 8
1.1.3 Ätiologie 8
1.1.4 Histopathologie 9
1.1.5 Molekulare Subgruppen des Medullobastoms 11
1.1.7 Klinische Symptome 16
1.1.8 Diagnose 16
1.1.9 Stadieneinteilung, Risikostratifizierung und Therapiestrategien 17
1.2 Kleinhirnentwicklung 19
1.3 Epigenetik 22
1.4 LSD1 23
1.5 Zielsetzung 25
2 Material und Methoden 27
2.1 Material 27
2.1.1 Zellkulturlösungen und Antibiotika 27
2.1.2 Chemikalien und Lösungen 27
2.1.3 Puffer (sofern nicht in Kits enthalten) 29
2.1.4 Verbrauchsmaterialien 29
2.1.5 Kits 30
2.1.6 Antikörper 30
2.1.7 Primer für quantitative Real-Time PCR 31
2.1.8 Enzyme 31
2.1.9 Geräte 31
2.1.10 Zelllinien 32
2.1.11 Mausmodelle 33
2.1.12 Murines Tumorgewebe 33
2.2 Methoden 34
2.2.1 Kultivierung der Zellen 34
2.2.2 Passagieren von Zellen 34
2.2.3 Zellzahlbestimmung 34
2.2.4 Kryokonservierung und Lagerung einer Zellkulturcharge 35
2.2.5 Isolierung der GCPs zur Herstellung einer Primärkultur 35

2.2.6 Herstellung von Proteinlysaten 36
2.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford....37
2.2.8 Western Blot 37
2.2.9 Boyden-Chamber-Assay....38
2.2.10 siLSD1 Transfektion....38
2.2.11 RNA-Isolierung....39
2.2.12 cDNA Synthese....39
2.2.13 Real-Time PCR....40
2.2.14 MTT 41
2.2.15 BrdU-Proliferations-Assay....41
2.2.16 Cell Death ELISA....42
2.2.17 Tranylcypromin-Behandlung 42
2.2.18 Immunfluoreszenzfärbung der GCPs....43
2.2.19 Microarray-Analyse....43
2.2.20 Immunhistochemie und Tissue Microarrays....46
3 Ergebnisse....48
3.1 Reanalyse von Microarray Daten humaner Medulloblastome 48
3.2 Analyse von Tissue Microarrays....50
3.3 Analyse der LSD1 Expressionen in murinen Medulloblastommodellen...51
3.4 Überprüfung der LSD1 Expression im Zellkulturmodell....53
3.5 Reduktion der LSD1 Expression mittels siRNA Technologie 54
3.6 Untersuchung der Viabilität, Proliferation und Apoptose von Medulloblastomzellen nach Einsatz von siRNA gegen *LSD1*....55
3.7 Analyse der Migrationskapazität von Medulloblastomzellen nach Einsatz von siRNA gegen *LSD1*....57
3.8 Identifikation von BMP2 als potentielles Zielgen von LSD1 im Medulloblastom 58
3.9 Wirkung von *small molecule* Inhibitoren gegen LSD1 auf Medulloblastomzellen....61
3.10 *LSD1* Expression in den granulären neuronalen Vorläuferzellen (GNCPs)....62
4 Diskussion....65
4.1 LSD1-Expression in humanen Medulloblastomen und murinen Medulloblastommodellen....66
4.2 Untersuchung des LSD1-knockdown Phänotyps von Medulloblastomzellen....69
4.2.1 Viabilität und Proliferation 69

4.2.2 Apoptose 71
4.2.3 Migration 72
4.3 *BMP2* als mögliches Zielgen von LSD1 73
4.4 Therapeutischer Einsatz vom *small molecule* Inhibitoren gegen LSD1 ... 74
5 Zusammenfassung 76
6 Literaturverzeichnis 77
7 Anhang 100
7.1 Verzeichnis Abkürzungen 100
7.2 Verzeichnis Abbildungen 102
8 Danksagung 104
9 Lebenslauf 105

1 Einleitung

1.1 Das Medulloblastom

1.1.1 Definition

Das Medulloblastom gehört zur Gruppe der embryonalen, neuroepithelialen Tumoren und stellt neben den glialen Tumoren die häufigste intrakranielle Tumorentität des Kindesalters dar (Ellison et al., 2002; Ostrom et al., 2014). Historisch wurden alle pädiatrischen embryonalen Hirntumoren unabhängig von ihrer intrakraniellen Lokalisation zur Gruppe der peripheren neuroektodermalen Tumoren (PNET) gezählt (Rorke et al., 1983), wobei das im Kleinhirn auftretende Medulloblastom auch als infratentorieller PNET bezeichnet wurde. Erstmals wurde das Medulloblastom 1910 von Dr. James Wright beschrieben, der dem Tumor aufgrund gewisser Ähnlichkeiten zum Neuroblastom den Namen Neurozytom gab (Wright, 1910). Die Bezeichnung Medulloblastom wurde im Jahr 1925 von Bailey und Cushing geprägt, die einen hoch malignen und schnell metastasierenden Tumor des vierten Ventrikels beschrieben, den sie zunächst als Gliom klassifizierten (Bailey und Cushing, 1925). Zunächst wurden alle Tumoren des Kleinhirns, die durch das Auftreten kleiner, blauer Zellen charakterisiert waren, als Medulloblastom bezeichnet. Aufgrund der Entwicklung und ständigen Verbesserung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden konnten histopathologisch ähnlich erscheinende Entitäten jedoch zunehmend besser voneinander unterschieden werden. So lässt sich seit Entdeckung einer spezifischen Mutation in einigen der Tumoren - hSNF5/INI1 – sowie Entwicklung spezifischer Antikörper zur immunhistochemischen Detektion dieser Veränderung die Gruppe der atypischen teratoiden/ rhabdoiden Tumoren (ATRT) von den Medulloblastomen abgrenzen (Biegel et al., 1989; Judkins et al., 2004). Eine weitere Gruppe, die ebenfalls nicht mehr zu den Medulloblastomen gezählt wird, wird als *Embryonal tumors with multilayered rosettes* (ETMR) bezeichnet (Korshunov et al., 2012). ETMRs umfassen Ependymoblastome, Medulloepitheliome und *Embryonal tumors with abundant neuropil and true rosettes* (ETANTR). Molekulargenetisch unterscheiden sich diese vom Medulloblastom insbesondere durch eine Fusion zwischen dem embryonalen Gen *TTHY1* und einem microRNA Cluster auf Chromosom 19 (Kleinman et al.,

2014; Korshunov et al., 2014). Aber auch die eigentlichen Medulloblastome konnten vor allem mit Hilfe von Genexpressionanalysen in weitere molekulare Subgruppen unterteilt werden (s. Abschnitt 1.1.5). Der Begriff des infratentoriellen PNETs findet heute keine Anwendung mehr und auch die histopathologische Diagnose PNET wurde zwischenzeitlich durch genauere molekulare Diagnosen abgelöst (Sturm et al., 2016). Insbesondere durch die auf DNA-Methylierung basierende Klassifikation von Hirntumoren können molekulare Entitäten heute deutlich besser unterschieden werden (Capper et al., 2018). Das Medulloblastom wird nach der WHO Klassifikation 2016 als Grad IV Tumor klassifiziert. Die Metastasierung erfolgt frühzeitig in umgebendes Hirngewebe und über Abtropfmetastasen in den gesamten Liquorraum. Eine extrakranielle Metastasierung ist dagegen selten und tritt bei unter 5% aller Fälle auf (Kleinman et al., 1981).

1.1.2 Epidemiologie

Das Medulloblastom ist nach den glialen Tumoren der häufigste Hirntumor des Kindesalters. Insgesamt beträgt der Anteil des Medulloblastoms an allen Tumoren des kindlichen zentralen Nervensystems 20% und an allen Tumoren der hinteren Schädelgrube 40% (Ostrom et al., 2014; Gurney et al., 1999). Die Inzidenz beträgt 4,8 pro 1.000.000 Kinder und Jungen sind 2-mal häufiger betroffen als Mädchen (Deutsches Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2019. Am häufigsten tritt das Medulloblastom bei Kindern zwischen dem 5. und 7. Lebensjahr auf, während 30% der Tumoren erst nach dem 10. Lebensjahr manifest werden. Im Erwachsenenalter sind Medulloblastome selten und haben einen Anteil unter 1% an allen Hirntumoren (Chan et al., 2000).

1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie des Medulloblastoms ist weitestgehend unklar. Als eine eindeutige Ursache für die spätere Entstehung von Hirntumoren konnten bisher ionisierende Strahlen identifiziert werden. Besonders nach erfolgter Strahlentherapie eines Retinoblastoms oder einer akuten Leukämie kann zu einem späteren Zeitpunkt

als ein sogenanntes Zweitmalignom ein Medulloblastom auftreten (Neglia et al., 2006; Little et al., 1998; Friedman et al., 2010). Eine Prädisposition für die Entwicklung eines Medulloblastoms stellen das Turcot- mit Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* und in den für DNA-Mismatch-Reparaturproteine codierdenden Genen *hMLH1* und *hPMS2* sowie das Gorlin-Goltz-Syndrom mit Mutationenim *PTCH1*-Gen dar (Hamilton et al., 1995; Garrè et al., 2009). Auch das autosomal dominant vererbte Li-Fraumeni-Syndrom, das aufgrund von Keimbahnmutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* zur Entwicklung zahlreicher Tumoren führt, prädisponiert für die Entstehung des Medulloblastoms der sonic hedgehog Gruppe (Kleihues et al., 1997, Waszak et al., 2018). Insbesondere in den letzten Jahren wurden zudem weitere prädisponierende genetische Veränderungen identifiziert, die u.a. den *ELP1*-Genlocus mit nachfolgendem Funktionsverlust des *ELP1*-Gens betreffen (Waszak et al., 2018; Waszak et al., 2020; Begemann et al., 2020). Eine Vielzahl von Umwelteinflüssen, einschließlich elektromagnetischer Strahlungen von Stromleitungen und Mobiltelefonen, wurde bisher in verschiedenen Studien untersucht. Einen kausalen Zusammenhang mit dem Auftreten von Medulloblastomen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Johansen et al., 2001; Gutjahr, 2004). Allerdings ist die Aussagekraft vieler Studien, die den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Pathogenese kindlicher Tumoren untersuchen, durch zu kleine Beobachtungseinheiten, inadäquate Kontrollgruppen oder inkomplette Erhebung der Expositionsdaten limitiert, so dass ein möglicher Einfluss dieser Faktoren weiterhin nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann (Cheung und Cohn, 2005).

1.1.4 Histopathologie

Die WHO-Klassifikation von 2007 definiert 5 histologische Unterformen des Medulloblastoms: das klassische, das desmoplastisch/noduläre, das anaplastische, das großzellige, sowie das Medulloblastom mit extensiver Nodularität (Louis et al., 2007). Die großzelligen und anaplastischen Varianten, jeweils mit einem Anteil von 10-22% bzw. von 2-4% an allen Medulloblastomen, bilden ein Kontinuum, da alle großzelligen Tumoren Inseln mit anaplastischen

Zellen aufweisen (Ellison, 2002; Giangaspero et al., 1992). Die desmoplastischen/nodulären Tumoren, die am häufigsten bei Erwachsenen und Adoleszenten auftreten, sowie die Unterformen mit extensiver Nodularität, die eher Patienten unter 3 Lebensjahren betreffen, haben Anteile von 7% bzw. 3% an allen Medulloblastomen (Ellison, 2002; McManamy et al., 2007). Den mit bis zu 80% größten Anteil bildet die klassische Unterform, die vornehmlich den für embryonale Tumoren typischen Aufbau aus kleinen, runden und blauen Zellen aufweist. In weniger als 40% der klassischen Tumore findet man Pseudorosetten (Homer-Wright Rosetten), die aus kreisförmig angeordneten Zellen mit peripher liegenden Zellkernen bestehen. Die desmoplastisch/nodulären Tumoren weisen die für sie typischen Zonen reduzierter Zellularität auf. Diese Retikulin-freien „nodulären“ Areale werden auch als *pale islands* bezeichnet, da die hier vor allem neuronal differenzierten Zellen von Kollagenablagerungen umgeben sind (Gilbertson und Ellison, 2008). Die extensive Nodularität zeichnet sich im Vergleich zur nodulären Form durch noch größere Areale ohne Retikulin aus, die lobuläre Strukturen bilden, welche mit Neuropil-ähnlichem Gewebe ausgefüllt sind. Die großzelligen und anaplastischen Tumoren hingegen weisen eine hohe mitotische Aktivität sowie zahlreiche Bereiche mit apoptotischen Zellen auf. Die morphologische Differenzierung von Zellen des Medulloblastoms erfolgt primär entlang der neuroepithelialen Linie in Neurozyten oder seltener in Gliazellen (Rorke, 1983; Rubinstein, 1985). Das Auftreten ependymaler Zellen ist sehr selten und muss an eine Fehldiagnose denken lassen (Gilbertson und Ellison, 2008). Die überarbeitete WHO Klassifikation 2016 teilt die Medulloblastome anhand molekularer (s. 1.1.5) und histopathologischer Merkmale ein (Louis et al., 2016). Die molekulare Klassifikation beinhaltet die Unterteilung in die 4 hauptsächlichen molekularen Gruppen: WNT aktiviert (10%), Shh aktiviert (30%), Gruppe 3 (20%) und 4 (40%) (s. Abb. 1), die auf Transkriptions- und Methylierungsprofilen beruhen und zunehmend klinische Bedeutung gewinnen (Northcott et al., 2012). Die histopathologische Einteilung wurde beibehalten, da diese insbesondere eine Rolle spielt, wenn molekulare Analysen nicht durchführbar sind. Hierbei wurden jedoch die großzelligen und anaplastischen Tumoren in einer Kategorie zusammenfasst, da wie oben beschrieben

weitestgehend alle großzelligen Tumoren auch anaplastische Areale aufweisen und beide mit einer ungünstigen Prognose einhergehen (Rutkowski et al., 2010; von Hoff et al., 2010). Teils sind die histologischen Einteilungen eng mit einer molekularen Subgruppe assoziiert (s. Abb. 2). Alle desmosplastisch/nodulären und Medulloblastome mit extensiver Nodularität lassen sich der Shh-Gruppe zuordnen, während WNT aktivierte Tumore fast immer eine klassische Histologie aufweisen. Großzellig/anaplastische Tumoren gehören entweder zur Shh-aktivierten Gruppe oder zur Gruppe 3 (vgl. 1.1.5). Der mitotische Index der Medulloblastome liegt zumeist im Bereich von 0,5-2% und die durch Ki-67 markierte Wachstumsfraktion bei über 20% (McManamy et al., 2003; Gilbertson et al., 1997). Um eine möglichst genaue prognostische und prädiktive Einschätzung zu erreichen, sollte wann immer möglich eine integrierte Klassifikation aus histopatholgischen und molekularen Informationen erfolgen (Louis et al., 2014).

1.1.5 Molekulare Subgruppen des Medullobastoms

Früher fand die Einteilung der Medullobalstome nur anhand ihrer Morphologie sowie Histopathologie statt. Mit Etablierung molekulargenetischer Analysen ist es jedoch möglich geworden, die Biologie des Medulloblastoms genauer zu beschreiben. Nach einem im Jahr 2012 getroffenen Konsensus der führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der Medulloblastomforschung kann diese Entität in 4 molekulare Subgruppen unterteilt werden (s. Abb. 1). Dieses sind die Wnt- und Shh-Gruppe sowie die Gruppe 3 und 4 (Taylor et al., 2012).

In der Folge wurden Medulloblastome mittels Sequenziertechniken der nächsten Generation (*next generation sequencing*, NGS) extensiv untersucht (Northcott et al., 2012; Rausch et al., 2012; Pugh et al., 2012; Jones et al., 2012). Durch Generierung einer Vielzahl von epigenetischen und genetischen Daten sowie von Informationen über das Transkriptom und Proteom von Medulloblastomen wurden die Konsensusgruppen weiter verfeinert und zahlreiche Subgruppen sind mittlerweile definiert (Hovestadt et al., 2020). Nachfolgend werden die Charakteristika der einzelnen Gruppen näher beschrieben.

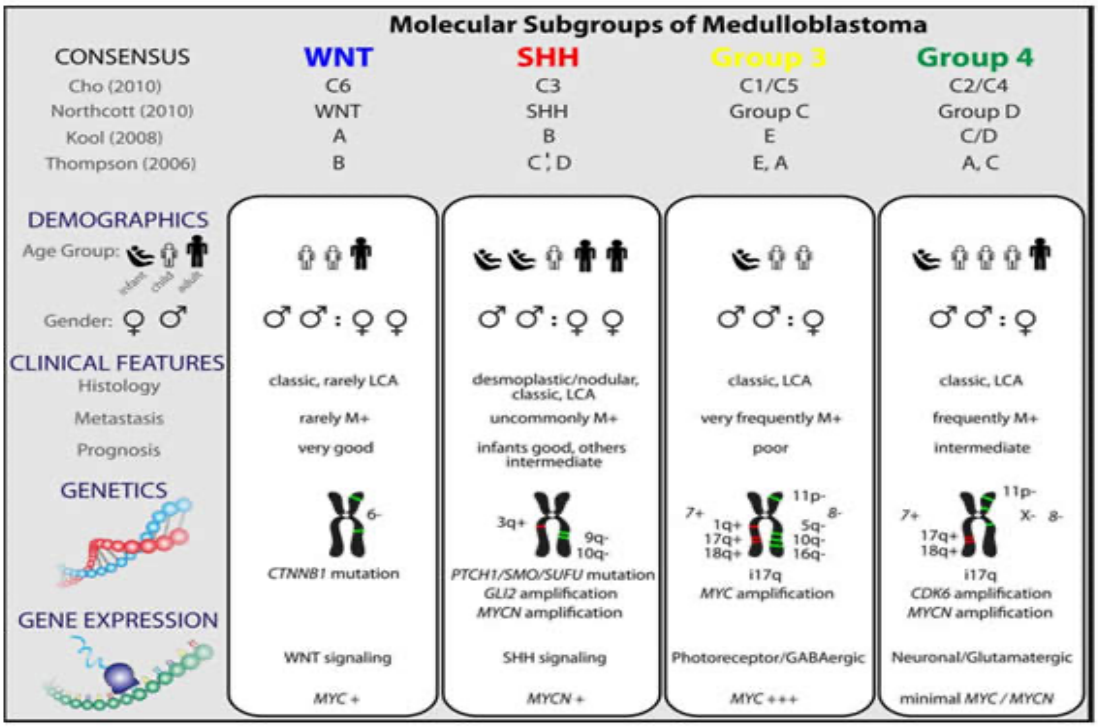

Abb. 1: Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms (Taylor et al., 2012)

Wnt-Gruppe

In der Histopathologie findet man in dieser Subgruppe meistens die klassische Form. Gemeinsam ist den Tumoren dieser Subgruppe eine Mutation innerhalb des Wnt-Signalweges. Der Wnt-Signalweg ist essentiell für die Embryogenese und Aufrechterhaltung der Integrität verschiedener bereits differenzierter adulter Gewebe. Eine Deregulation innerhalb des Signalweges ist an der Entwicklung verschiedener Malignome beteiligt (Logan und Nusse, 2004). Die Mutationen betreffen in bis zu 85% das für β-Catenin kodierende Gen *CTNNB1* (Northcott et al.,2012; Hovestadt el al., 2020) Die übrigen Fälle werden zumeist durch eine Mutation im *APC* Gen ausgelöst (Waszak et al., 2018). *CTNNB1* stellt ein Onkogen dar und eine durch Mutation hervorgerufene Überaktivität führt zu einer verstärkten Zellproliferation sowie gleichzeitig zu einer verringerten Differenzierung (Marino et al., 2005). Typisch ist eine stark positive Immunhistochemie bei Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen β–Catenin (Taylor et al., 2012). Ebenfalls kennzeichnend für diese Subgruppe ist die Deletion einer Kopie von Chromosom 6 (= Monosomie 6), die sich in circa 80% der Fälle findet (Northcott et al., 2012). Oft besteht eine hohe *MYC*-Expression,

die sich allerdings auch in Tumoren der Gruppe 3 findet (Taylor et al., 2012). Wnt-Medulloblastome treten eher bei älteren Kindern und Jugendlichen auf und haben im Gegensatz zu den anderen Subgruppen ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. Die Tumoren metastasieren selten, was zu einer exzellenten Prognose mit 10-Jahres Überlebensraten von über 95% beiträgt (Gajjar et al., 2006). In der aktuellen PNET5-Studie wird bei Diagnose eines Medulloblastoms aus der Wnt-Gruppe daher eine Deeskalation der Therapie durchgeführt. Ergebnisse von Arbeiten mit einem für diese Gruppe existierenden Mausmodell haben gezeigt, dass diese Tumoren sehr wahrscheinlich von Zellen der unteren rhombischen Lippe ausgehen und somit ihren Ursprung außerhalb des Kleinhirns haben (Gibson et al., 2010).

Shh-Gruppe

Innerhalb dieser Subgruppe können alle histopathologischen Varianten des Medulloblastoms auftreten, wobei die klassische sowie die noduläre/desmoplastische Histologie je circa 40% ausmacht. Die übrigen Fälle weisen zumeist die großzellig anaplastische Variante auf. Charakteristisch für diese Subgruppe sind Veränderungen im Sonic Hedgehoc Signalweg (Shh) (Taylor et al., 2012). Keimbahnmutationen des Shh-Rezeptorgens *PTCH1* beim Gorlin-Goltz-Syndrom führen unter anderem zur Entstehung von Medulloblastomen. Aber auch andere Gene des Signalweges können von Keimbahnmutationen betroffen sein und zu einer Prädisposition für Medulloblastome führen, wie zum Beispiel der Shh-Inhibitor *SUFU* (Taylor et al., 2002). Interessanterweise kann es auch durch Keimbahnmutationen im TP53 mit nachfolgender Umlagerung einer Vielzahl von Chromosomenabschnitten (Chromotrypsis) zu Shh-Medulloblastomen kommen. Sporadische Tumoren dieser Gruppe weisen ebenfalls Mutationen in Genen des Shh-Signalweges auf, wie zum Beispiel Mutationen in *PTCH1*, *SMO* und *SUFU* (Brugieres et al., 2010). Des Weiteren scheinen Amplifikationen von *GLI1* und *GLI2* eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung zu spielen (Northcott et al., 2009). Bei einer Vielzahl der Tumoren besteht eine Amplifikation mit nachfolgender Überexpression von *MYCN*. Das Erkrankungsalter weist zwei Häufigkeitsgipfel auf, die zwischen 0-3 Jahren sowie nach dem 16. Lebensjahr liegen. Kürzlich

wurden 4 molekulare Subtypen der Shh-Gruppe beschrieben, die eng mit dem Alter der Patienten korrelieren (Cavalli et al., 2017). Shh-β und Shh-γ treten primär im Säuglingsalter auf und Shh-α und Shh-δ bei Kindern/Adoleszenten bzw. Erwachsenen. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (2:1). Die Prognose ist intermediär im Vergleich zu den anderen Gruppen, wobei insbesondere Jugendliche einen sehr ungünstigen Verlauf aufweisen können (Gajjar et al., 2014). Insbesondere die Verfügbarkeit von Inhibitoren des Smoothened Proteins, welches einen wichtigen Liganden im Shh-Signalweg darstellt, ermöglichte bereits Ansätze einer zielgerichteten Therapie dieser Tumoren (Gajjar et al., 2013). Da es mit aktuell verfügbaren Substanzen jedoch zum vorzeitigen Verschluss von Wachstumsfugen kommt, sind diese Therapien für in der Entwicklung befindliche Kinder noch nicht zugänglich. Als Ursprungszelle werden die granulären neuronalen Vorläuferzellen des Kleinhirns angesehen, deren Entwicklung stark Shh-Signalweg abhängig ist (s. Abschnitt 1.2). Die meisten Mausmodelle zur Medulloblastomentwicklung, wie auch die in dieser Arbeit verwendeten (s. Abschnitt 2.1.11), repräsentieren Modelle eines veränderten Shh-Signalweges (Hatten und Roussel, 2011). Molekular entsprechen die meisten Modelle dabei eher dem adulten Subtyp (Pöschl et al., 2014).

Gruppe 3/4

Gruppe 3 Medulloblastome treten primär im Säuglings- und Kindesalter auf, während Gruppe 4 Medulloblastome in allen Altersklassen vorkommen. Beide Gruppen kommen bei Männern häufiger vor als bei Frauen (2:1 oder mehr). Die Histologie in Gruppe 3 wird insbesondere vom großzelligen anaplastischen Typ bestimmt. Klinisch haben beide Gruppen eine eher ungünstige Prognose und mehr als 30% der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnose eine Metastasierung auf. Während MYC-Amplifikationen typisch für Gruppe 3 sind und mit einem besonders ungünstigen Verlauf assoziiert sind, sind MYCN und CDK6 Amplifikationen typisch für Gruppe 4 (Cho et al., 2011; Northcott et al., 2011; Northcott et al., 2012; Northcott et al., 2017). Ein sogenanntes Isochromosom 17q (i17q) findet sich bei mehr als 50% der Patienten beider Gruppen. Auch wenn die Unterscheidung der Gruppen klinische Relevanz hat

und sich auch in der Klassifikation der WHO (Louis et al., 2016) widerspiegelt, werden sie seit ihrer Entdeckung kontrovers diskutiert und die weitere Einteilung in Subtypen ist mittlerweile auch für die Gruppen 3 und 4 erfolgt (siehe Abb. 2) (Hovestadt et al., 2020; Sharma et al., 2019).

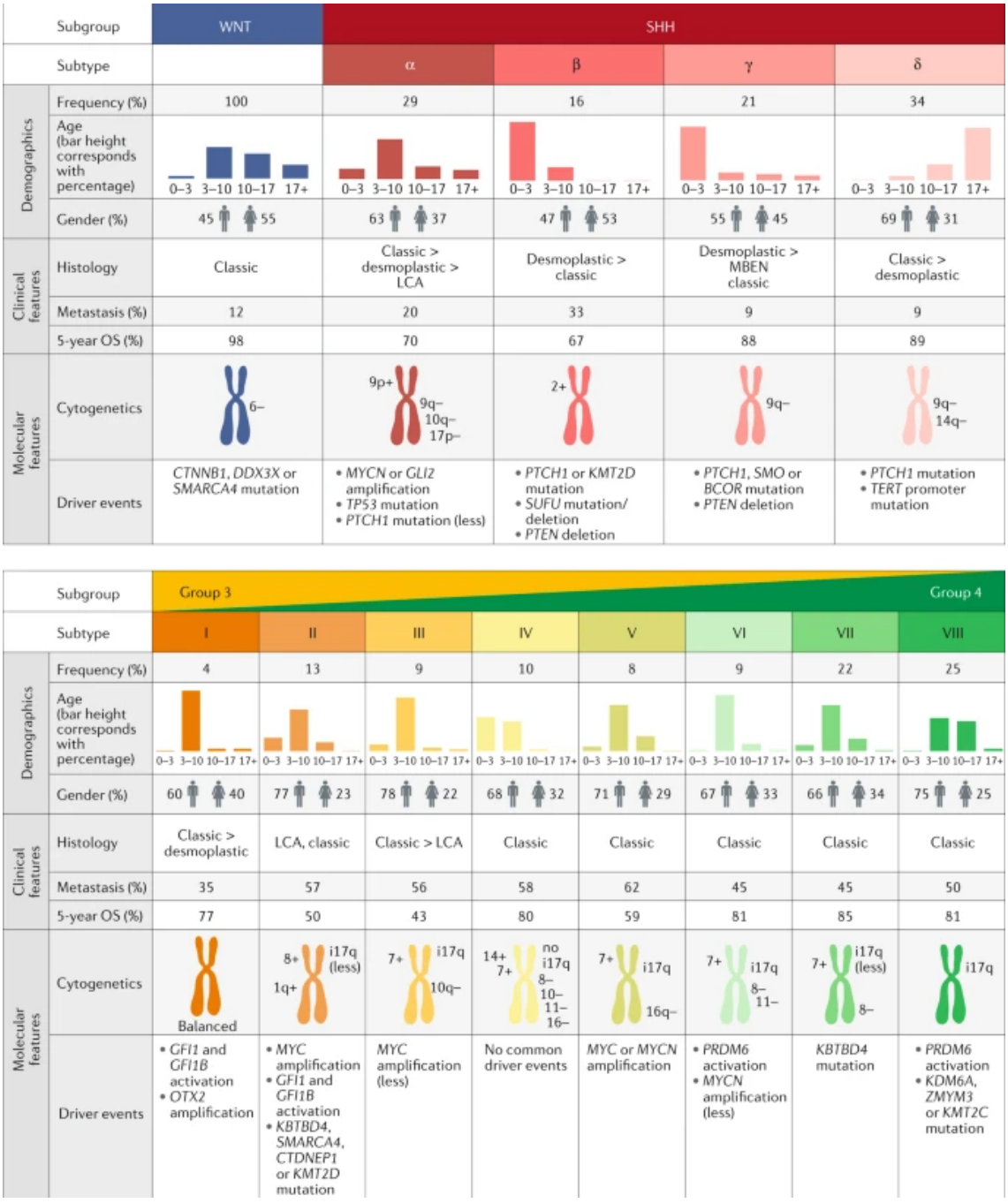

Abb. 2: Demographische, klinische und molekulare Merkmale des Medulloblastoms (Hovestadt et al., 2020)

1.1.7 Klinische Symptome

Die klinischen Auffälligkeiten variieren stark mit dem Alter des betroffenen Kindes sowie dem Ausmaß der Erkrankung (lokal begrenzt oder metastasiert). Die meisten Symptome des Medulloblastom hängen mit einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks zusammen, der aufgrund eines obstruktiven Hydrozephalus entsteht. Zu diesen gehören schwallartiges Erbrechen, das häufig bereits im nüchternen Zustand auftritt, erhöhte Irritabilität, das sogenannte „Sonnenuntergangsphänomen“ mit Verdrehen der Bulbi nach kaudal, Nystagmus, das Auftreten von Doppelbildern, sowie Ataxie und Stauungspapillen. Während es bei kleinen Kindern aufgrund noch nicht vollständig geschlossener Schädelnähte noch zu einer kompensierenden Zunahme des Kopfumfanges kommen kann, treten bei älteren Kindern häufig Kopfschmerzen als Kardinalsymptom auf, die sich in horizontaler Lage noch verschlimmern können. Besonders bei Tumoren in der Mittellinie, die in 75% der Fälle und vor allem bei kleinen Kindern auftreten, kann es durch gesteigerten Hirndruck zum Auftreten eines Parinaud-Syndroms kommen. Dies bezeichnet eine vertikale Blicklähmung mit fehlender Konvergenzreaktion der Augen, sowie einen Nystagmus und eine Mydriasis bei gleichzeitig fehlendem Pupillenreflex. Ursache ist eine Schädigung der Hirnnervenkerne im dorsalen Bereich des Mittelhirns. Die Hemisphären des Kleinhirns sind häufiger bei älteren Kindern betroffen. Hier findet man häufiger ataktische Bewegungsstörungen der Extremitäten sowie dysmetrische Fehlfunktionen. Metastasierte Erkrankungen führen je nach Lokalisation der Tumormanifestationen zu einer Kompression des Rückenmarks mit nachfolgenden Lähmungen oder zu Krampfanfällen aufgrund von Hirnmetastasen (Pizzo und Poplack, 2011).

1.1.8 Diagnose

Wird ein Patient mit den oben beschriebenen Symptomen vorgestellt, erfolgt zumeist notfallmäßig zunächst die Durchführung einer Computertomografie (CT), da diese Methode einfach, schnell und in den meisten Kliniken verfügbar ist. Zudem ist für diese Untersuchung in den meisten Fällen keine längere Sedierung des Kinders erforderlich. Die Bildgebung zeigt zumeist eine hyperdense Struktur,

die vom Vermis ausgeht (80%), in den vierten Ventrikel vorwächst und in manchen Fällen kalzifiziert ist (<20%) (Bourdeaut et al., 2011). Bei sehr heterogenen Tumoren kann auch eine Zystenbildung beobachtet werden. Für eine genaue präoperative Planung und als Referenz für Diagnose und Stadieneinteilung erfolgt im Anschluss die geplante Durchführung einer Magnetresonanztomografie (MRT). Die Vorteile liegen vor allem in der höheren Auflösung und der damit verbundenen genaueren Abgrenzung von anatomischen Strukturen. In der T1-Wichtung erscheinen die Tumoren häufig hypointens, während in der T2-Wichtung zumeist eine milde Hyperintensität besteht. Die Kontrastmittelgabe führt in den meisten Fällen zu einer heterogenen aber insgesamt starken Signalintensität. Ein niedriger apparenter Diffusionskoeffizient ermöglicht die Unterscheidung von möglichen anderen Tumoren der hinteren Schädelgrube (Jaremko et al., 2010). Eine leptomeningeale Aussaat des Tumors kann durch eine Kontrastmittelanreicherung entlang der Hirnhäute, auch „Zuckerguss“ genannt, diagnostiziert werden (Dhall, 2009). In den ersten 48 (bis 72) Stunden postoperativ sollte eine erneute Bildgebung erfolgen, um das Ausmaß der Resektion zu bestimmen. Ergänzt wird die Bildgebung durch eine Lumbalpunktion, die im Falle von sogenannten Abtropfmetastasen den Nachweis von Tumorzellen im Liquor erbringen kann. Eine entsprechende Punktion sollte nicht durchgeführt werden, wenn ein Zustand mit akutem Hirndruck besteht, da es durch einen plötzlichen Druckabfall im Spinalkanal zu einer unteren Einklemmung des Gehirns kommen kann. Des Weiteren sollte eine diagnostische Lumbalpunktion frühestens 10 bis 14 Tage nach erfolgter Operation des Tumors erfolgen, da es sonst ebenfalls zu falsch positiven Befunden mit Auswirkung auf die spätere Therapie kommen kann.

1.1.9 Stadieneinteilung, Risikostratifizierung und Therapiestrategien

Eine Einteilung nach der TNM-Klassifikation wird für das Medulloblastom nicht durchgeführt. Größte prognostische Bedeutsamkeit haben der Nachweis eines Resttumors nach der initialen Operation sowie von Metastasen, die beide mit einem ungünstigen Verlauf einhergehen. Zunehmend werden die o.g.

molekularen Merkmale in die prognostische Abschätzung und Therapieplanung einbezogen. Der Grad der Metastasierung wird nach Chang eingeteilt in M1 (Tumorzellen im Liquor), M2 (supratentorielle Metastasierung), M3 (spinale Metastasierung) sowie M4 (Metastasen außerhalb des ZNS) (Chang et al., 1969). Des Weiteren ist der histologische Subtyp von prognostischer Relevanz, hat allerdings wie in Abschnitt 1.1.5 dargelegt mit Entwicklung der molekularen Subgruppen an Bedeutung verloren. Desmoplastische/ noduläre Medulloblastome als auch jene mit extensiver Nodularität weisen eine bessere Prognose auf als klassische Subtypen, während großzellige/ anaplastische Varianten einen deutlich aggressiveren Krankheitsverlauf zeigen (Ellison, 2010). Die Behandlung des Medulloblastoms bei Kindern erfolgt in Deutschland nach einheitlichen Therapieempfehlungen der Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH) auf der Grundlage der multizentrischen Therapieoptimierungsstudie SIOP PNET5 MB. Die Basistherapie besteht dabei in der primären neurochirurgischen Resektion des Tumors. Diese operative Intervention stellt bei initial häufig erhöhtem Hirndruck eine lebensrettende Maßnahme dar. Das Ziel ist die operationsmikroskopische Totalresektion des Tumors, da so eine Senkung des Rezidivrisikos erreicht werden kann (Zeltzer et al., 1999). Ist eine Totalresektion zu Beginn nicht möglich, erfolgt gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt eine zweite Intervention (*Second look).* Aufgrund des infiltrierenden Wachstums des Medulloblastoms ist eine Heilung ohne den Einsatz adjuvanter Therapiemaßnahmen sehr unwahrscheinlich. Die Risikostratifizierung basiert auf histologischen, molekularen und klinischen (Metastasierungsstatus, Resttumor) Parametern. Das Risiko bezieht sich dabei auf die Wahrscheinlichkeit eines späteren Rückfalls. Patienten der WNT Gruppe werden im Rahmen der Studie einem Niedrig-Risiko Arm zugeordnet, während Patienten mit einem Gruppe 3/4 oder Shh Medulloblastom ohne besondere klinische oder molekulare Risikofaktoren (wie z.B. Metastasierung >M0, TP53 Mutation, CMYC Amplifikation) in einem Standard-Risiko Arm behandelt werden. Erstmals gibt es in dieser Studie auch einen Behandlungsarm für Patienten, deren Shh Medulloblastom im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms aufgetreten ist. Um bei diesen Patienten die Gefahr von strahleninduzierten Zweittumoren zu

reduzieren, wurde die Bestrahlungsintensität reduziert. Alle Patienten außer jenen mit somatischer oder Keimbahn-TP53 Mutation werden zunächst innerhalb der ersten vierzig Tage nach Diagnose einer Bestrahlung zugeführt. Diese erfolgt ausnahmslos kraniospinal, da häufig zum Zeitpunkt der Diagnose bereits okkulte Metastasen vorliegen können. Im Anschluss erfolgen 6-8 Zyklen einer Erhaltungschemotherapie, bei der die Substanzen Cyclophosphamid, Vincristin, Cisplatin und CCNU zum Einsatz kommen. Patienten mit einer TP53 Mutation erhalten zunächst eine Induktionschemotherapie, an die sich eine adaptierte Radiotherapie sowie eine Erhaltungschemotherapie mit Vinblastin anschließt. Liegt zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Metastasierung vor, so wird dieses multimodale Therapiekonzept intensiviert. Bei Kindern, die jünger als 3 Jahre sind, soll aufgrund der erhöhten Vulnerabilität der sich in Entwicklung befindlichen Hirnstrukturen eine postoperative Bestrahlung möglichst verhindert werden (Duffner et al., 1993). In diesen Fällen erfolgt zunächst eine postoperative Chemotherapie im Rahmen eines internationalen Registerprotokolls. Bei Auftreten eines Rezidivs kann eine erneute Chemotherapie bestehend aus Etoposid und Carboplatin erfolgen. In Einzelfällen kann sogar eine erneute Bestrahlung einen kurativen Ansatz darstellen (Milker-Zabel et al., 2002). Aktuell liegt das Siebenjahres-Ereignisfreie-Überleben von Patienten ohne Metastasen, die älter als 4 Jahre sind bei 79,5% (Dietzsch et al., 2020). Die Prognose im Falle einer unvollständigen Resektion oder Metastasierung ist mit Fünfjahres-Überlebensraten von 56% respektive 38% weiterhin sehr ungünstig (Rutkowski et al., 2005).

1.2 Kleinhirnentwicklung

Über 100 Jahre nach der ersten Beschreibung des Medulloblastoms scheint zunehmend sicher, dass die Entstehung dieses Tumors sehr eng mit der physiologischen Entwicklung des Kleinhirns verknüpft ist. Das Kleinhirn stellt ein einzigartiges Organ unter den Strukturen des zentralen Nervensystems dar, da es mit seinen Kernen und Kortexarealen sowohl subkortikale als auch typische kortikale Elemente aufweist. Aus dieser Beobachtung resultiert die Vermutung, dass onkogene Veränderungen in Zellen dieser sehr unterschiedlichen Strukturen zur Entwicklung der molekulargenetisch distinkten Subgruppen des

Medulloblastoms führen. Studiert wurden die Kleinhirnentwicklung und pathologischen Abweichungen vor allem in Mausmodellen. Die Kleinhirnanlage der Maus entwickelt sich auf dem Dach des Metencephalons am embryonalen Tag 10 (E10) aus Zellen zweier unterschiedlicher germinaler Zonen, der Rautenlippe und dem Dach des 4. Ventrikels (Miale et al., 1961; Morales et al., 2006; Zhang et al., 1996). Während sich aus der germinalen Zone am Dach des 4. Ventrikels Purkinje-Zellen und Interneurone entwickeln, entstehen im Bereich der Rautenlippe zunächst die tiefen Kleinhirnkerne. Etwas verzögert bewirken Proteine aus der Klasse der *bone morphogenetic proteins* (BMPs), dass sich unspezifische Vorläuferzellen innerhalb der Rautenlippe zu einer weiteren Zellpopulation entwickeln, den granulären neuronalen Vorläuferzellen (GNCPs) (Alder et al., 1999). Von den beschriebenen Zellpopulationen, die maßgeblich zur Entwicklung des Kleinhirns beitragen, sind diese GNCPs bisher am besten verstanden (Gilbertson und Ellison, 2008). GNCPs wandern über die Oberfläche der Kleinhirnanlage und bilden die externe Granularzellschicht (EGL). In dieser Schicht kommt es an Tag E16 vermittelt durch das von Purkinje Zellen ausgeschüttete Mitogen *sonic hedgehog* (Shh) zunächst zu einer klonalen Expansion der Zellen (Dahmane et al., 1999; Lewis et al., 2004). Shh bindet dabei an seinen Rezeptor PTCH1 auf der Oberfläche der GNCPs. Dies führt zu einer Abkopplung des Rezeptors von dem transmembranalen Protein smoothened (Smo), welches zuvor durch PTCH1 inhibiert wurde. Smo vermittelt dann über die Gli-Transkriptionsfaktoren die Expression von cyclinD1 sowie N-myc, wodurch es zur Proliferation der Zellen kommt (Ruiz i Altaba et al., 2002; Kenney et al., 2003). Im Anschluss an die Geburt der Maus erfolgt postnatal (P) ein Austritt der GNCPs aus dem Zellzyklus. Dieser Schritt wird maßgeblich durch das Protein BMP2 beeinflusst, das über die Aktivierung des Proteins Smad5 der N-myc vermittelten Proliferation entgegenwirkt (Alvarez-Rodriguez et al., 2007; Rios et al., 2004). Nach anschließender Differenzierung der GNCPs zu reifen granulären Zellen mit Ausbildung von Axonen wandern diese an Tag P14 in tiefere Bereiche des Kleinhirns. Es entsteht die interne Granularzellschicht (IGL). Zusätzlich zum beschriebenen Shh-Signalweg werden sowohl Proliferation als auch Differenzierung der GNCPs von anderen Regulatoren beeinflusst. Einen

der Bedeutendsten stellt dabei der Notch-Signalweg dar (Yoon et al., 2005). Im Gegensatz zu den GNCPs sind die Mechanismen, die zur Entwicklung der übrigen Vorläuferzellen des Kleinhirns beitragen, weitestgehend unklar. Es wird vermutet, dass sich die Zellen am Dach des 4. Ventrikels unter dem Einfluss des Wnt-Signalweges entwickeln (McMahon et al., 1990). Eine dritte Zellpopulation bildet die Vorläuferzellen der weißen Substanz des Kleinhirns. Diese weisen bezüglich ihres Differenzierungsprozesses deutliche Unterschiede zu den beiden übrigen Zellpopulationen auf, so dass man hier von anderen noch zu identifizierenden Mechanismen ausgeht (Lee et al., 2005). Die Kleinhirnentwicklung der Maus endet an Tag P28 mit Abschluss der Dendritenausreifung und Synaptogenese (Hatten et al., 1997). Der postnatal vergleichbare Prozess der Kleinhirnentwicklung des Menschen benötigt ungefähr ein Jahr. Zurzeit ist es weitestgehend wissenschaftlicher Konsens, dass Mutationen innerhalb der Signalkaskaden, die die physiologische Entwicklung der Vorläuferzellen des Kleinhirns bewirken, zu einem fehlgeleiteten Verhalten der entsprechenden Zellen führen und somit die Grundlage für die Entstehung der einzelnen Unterformen des Medulloblastoms bilden (s. Abschnitt 1.1.5). Während das desmoplastische Medulloblastom eher auf Grundlage entarteter GNCPs mit Mutationen im Shh- respektive Notch-Signalweg zu entstehen scheint, tritt die klassische Unterform unter anderem nach Mutationen in der Wnt-Signalkaskade auf (Gilbertson und Ellison, 2008). Interessanterweise werden Tumoren mit Shh-Mutationen zumeist in den Kleinhirnhemisphären, die aus der Rautenlippe hervorgehen, diagnostiziert, während man Tumoren mit Wnt assoziierten Mutationen eher im Bereich des 4. Ventrikels findet (Gibson et al., 2010; Baryawno et al., 2010; Behesti et al., 2009). Neue technische Methoden ermöglichen mittlerweile genauere Einblicke in den zellulären Ursprung von Medolloblastomen. Mit Hilfe der Sequenzierung von einzelnen Zellen konnten für Shh-Medulloblastome GNCPs grundsätzlich als Ursprungszellen bestätigt werden (Hovestadt et al., 2019). Während jedoch adulte Shh Tumoren am ehesten aus unreiferen Vorläuferzellen mit hoher ATOH1 Expression hervorgehen, entstehen die infantilen Shh Tumoren aus intermediären und reifen granulären Neuronen mit hoher NEUROD1 Expression. Gruppe 3 und 4 Tumoren

zeigen ein Spektrum von primitiven Vorläuferzellen bis hin zu stärker differenzierten neuronalen Zellen, wodurch sich Herausforderungen bei der genauen molekularen Klassifikation ergeben. Insbesondere Gruppe 4 Tumoren scheinen aus unipolaren Bürstenzellen und glutaminergen Kernen zu entstehen (Hovestadt et al., 2019). Eine Zuordnung der Wnt Tumoren zu Vorläuferzellen des Kleinhirns ist auch mit Techniken der Einzelzellsequenzierung nicht gelungen, wodurch ein Ursprung dieser Malignome aus nicht zerebellären Arealen wahrscheinlicher wird (Gibson et al., 2010).

1.3 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt Veränderungen der Chromosomen und damit der Chromosomenaktivität, die nicht auf einer Veränderung der DNA-Sequenz basieren. Dies bedeutet, dass es zu einer Änderung im Phänotyp nicht aber im Genotyp kommt. Dies betrifft sowohl die Methylierung bestimmter DNA-Abschnitte (CpG Inseln), welche in Promotorregionen zur Repression der Transkription führen, als auch posttranslationale Chromatin-Modifikationen an bestimmten Aminosäuren. Diese Chromatin-Modifikationen können den Kondensationsstatus des Chromatins von für Transkriptionsfaktoren besser zugänglichem Euchromatin zu schwer zugänglichem Heterochromatin verändern und somit die Gen-Expression beeinflussen (Dawson und Kouzarides, 2012). Andere Veränderungen an terminalen Aminosäureresten, die den Zustand des Chromatingerüstes verändern, sind Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitylierung (Strahl und Allis, 2000; Tan et al., 2011). Länger bekannt und bereits besser verstanden ist der dynamische Prozess der Acetylierung (Kouzarides, 2000). Die wichtigsten Enzyme hierbei sind die Histonacetyltransferasen (HATs), die eine Acetylierung bewirken, sowie die Deacetylasen (HDACs), die Acetylgruppen abspalten. Die Acetylierung bewirkt primär eine Aktivierung der Transkription (Roth et al., 2001; Oberdoerffer und Sinclair, 2007). Die epigenetische Histon-Modifikation durch Methylierung erfolgt durch Methyltransferasen unter Verwendung von S-Adenosyl-L-Methionin als Methylgruppendonor (Rea et al., 2000). Bevorzugte Stellen der Histonmethylierung sind die Lysine 4, 9 und 36 von Histon H3 und Lysin 20 von Histon H4 (Tong et al., 1998). Diese führen abhängig von ihrer Lokalisation und

Anzahl zu Veränderungen des Chromatinkondensationsstatus oder zur Beeinflussung von Bindungsstellen. Die Methylierung kann im Gegensatz zur Acetylierung sowohl zur Transkriptionsaktivierung als auch zur Repression führen (Zhang und Reinberg, 2001). So führt die Dimethylierung der Aminosäure Lysin 4 an Histon 3 zu verminderter Transkription, während die Dimethylierung der Aminosäure Lysin 9 die Transkription erhöht (Metzger et al, 2005; Lakowski et al., 2006). Lange Zeit hielt man den Methylierungsstatus für irreversibel, da die Amino-Methyl-Verbindungen eine hohe Thermostabilität aufweisen. Allerdings konnten Shi und Kollegen die Lysin-spezifische Histon Demethylase 1 (LSD1/KDM1A) als Bestandteil des CoRest-Corepressorkomplexes identifizieren, die in der Lage ist, Methylierungen an Histonen wieder rückgängig zu machen (Shi et al., 2004; s. Abschnitt 1.4). Da der CoRest-Corepressor-Komplexes unter anderem auch die Histondeacetylasen 1 und 2 enthält, ist er gleichzeitig sowohl für die Acetylierung als auch Methylierung zuständig, was eine gleichzeitige und koordinierte Organisation dieser Prozesse ermöglicht (Lee et al., 2005).

1.4 LSD1

Die Lysin-spezifische Histon Demethylase 1 (LSD1/KDM1A) ist ein Enzym aus der Gruppe der Monoaminoxidasen und ist aus evolutionsbiologischer Sicht hochkonserviert. LSD1 katalysiert die Abspaltung von Di- und Monomethylgruppen der Lysinreste K4 und K9 des Histons H3 und nimmt Einfluss auf die Genexpression (Shi et al, 2004). LSD1 besteht aus 3 Hauptkomponenten. Am N-terminalen Ende befindet sich eine sogenannte SWIRM Domäne, am C-terminalen Ende eine AOL Domäne (amine oxidase like) und im Zentrum eine *Tower* Domäne (Yang et al., 2006). An der AOL Domäne befinden sich die Bindungsstellen zum einen für Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und zum anderen die Substratbindungsstelle. Die genaue Funktion der SWIRM Domäne bei LSD1 ist nicht bekannt. Ein sogenannter *silencing factor* des CoREST-Corepressorkomplexes (s. Abschnitt 1.3) bindet die *Tower* Domäne von LSD1 und beeinflusst so dessen Aktivität (Lee et al., 2005). Seinen Wirkungsort erreicht LSD1 durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren oder mit Hilfe des Androgen-Rezeptors (Metzger et al, 2005). Neben LSD1 wurden

mittlerweile weitere Histon-Demethylasen identifiziert, die als kennzeichnendes Strukturmotiv eine Jumonji Domäne (JMJD) aufweisen (Cloos et al., 2006; Chen et al., 2006). Aufgrund der zumeist komplexen Methylierungsmuster der Histone kann man auf ein Zusammenspiel verschiedener Histon-Demethylasen schließen (Wissmann et al., 2007). Häufig liegen verschiedene Demethylasen in sogenannten Multiprotein-Komplexen wie dem CoRest-Corepressorkomplex vor (Lee et al., 2005; Shi et al., 2005). LSD1 kooperiert beispielsweise am Lysinrest 9 des Histons H3 mit der Tri-Demethylase JMJD2C (Wissmann et al., 2007). In einigen Medulloblastomen wurde ein Überexpression von JMJD2C gefunden (Northcott et al., 2009). Die Tatsache, dass eine Inhibition von JMJD2C zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation von Medulloblastomzellen führt, unterstreicht die Bedeutung der Demethylasen für die Biologie dieses Tumors (Northcott et al., 2009). In einer Vielzahl von primären Medulloblastomen findet sich ein reduzierter Dimethylierungsstatus im Bereich des Wirkungsortes von LSD1 am Lysinrest 9 des Histons H3. Dies legt eine besondere Bedeutung dieser Demethylase in dieser Tumorentität nahe. Es konnte mittlerweile auch gezeigt werden, dass die Aktivität des Proteins GFI1, das zur Entstehung von Medulloblastomen beitragen kann, von der direkten Interaktion mit LSD1 abhängig ist (Lee, C. et al., 2019). Durch frühere Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass LSD1 grundlegend an der Regulation der Hämatopoese sowie anderen Differenzierungsprozessen beteiligt ist (Sprüssel et al., 2012; Schulte et al., 2009). LSD1 spielt innerhalb dieser Prozesse eine essenzielle Rolle und ist von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung von Geweben, was auch durch die embryonale Letalität eines LSD1 knock-outs in der Maus nachgewiesen werden konnte (Wang et al., 2007). Des Weiteren wird vermutet, dass LSD1 neben der Modifikation von Histonen an der Regulation anderer Proteine, insbesondere p53, beteiligt ist (Huang et al., 2007). Nicht zuletzt aufgrund seiner Bedeutung in der Regulation von physiologischen Prozessen spielt eine Deregulation von LSD1 auch eine wichtige Rolle bei Entstehung und Progression verschiedener anderer Krebserkrankungen, so zum Beispiel im Prostata- und Mammakarzinom sowie im kindlichen Neuroblastom (Metzger et al., 2005; Schulte et al., 2009).

1.5 Zielsetzung

In vorangegangenen Projekten unseres Labors konnte bereits gezeigt werden, dass LSD1 eine grundlegende funktionelle Bedeutung bei einer weiteren embryonalen Tumorentität, dem Neuroblastom, hat (Schulte et al., 2009). Da zum einen Hochdurchsatzanalysen gezeigt haben, dass im Medulloblastom in größerem Umfang Gene wiederholt von Mutationen betroffen sind, die direkt oder indirekt die Histonmethylierung beeinflussen (Northcott et al., 2009), und zum anderen insbesondere LSD1 an der Regulation embryonaler Prozesse beteiligt ist, vermuteten wir eine funktionelle Rolle dieser Demethylase für den embryonalen Hirntumor Medulloblastom. Im Rahmen dieser Promotion sollten die Grundlagen für ein genaueres Verständnis der Bedeutung von LSD1 für
1.) die phänotypischen Eigenschaften des Medulloblastoms und
2.) für die Entwicklung der granulären neuronalen Vorläuferzellen (GNCPs) als ein Ursprungszelltyp des Medulloblastoms geschaffen werden.

Hierzu sollten in einem ersten Schritt zunächst Daten zur Expression auf RNA und Proteineben aus *in vitro* und *in vivo* Modellen des Medulloblastoms gewonnen werden. Anschließend sollte eine nähere Untersuchung der funktionellen Bedeutung von LSD1 im Medulloblastom mittels verschiedener Inhibitionsmechanismen im Zellkulturmodell erfolgen. Insbesondere sollten Veränderungen von entscheidenden Charakteristika der Tumorbiologie wie Zellviabilität, Proliferation, Apoptose und Migration untersucht werden. Im Anschluss sollten vielversprechende LSD1 regulierte Gene mit Einfluss auf diese grundlegenden Mechanismen identifiziert und validiert werden. Um zudem die Rolle von LSD1 für die GNCPs genauer zu analysieren, sollte zunächst die Etablierung einer erfolgreichen Isolation und zuverlässigen Kultivierung dieser Zellen aus dem Kleinhirn von Mäusen in unserem Labor erfolgen. Anschließend sollte die Expression von LSD1 in verschiedenen Stadien der murinen Kleinhirnreifung bis zu deren Abschluss am postnatalen Tag 28 mittels GNCP-Isolation aus dem Kleinhirn zum jeweiligen Zeitpunkt untersucht werden. Aus den Erkenntnissen über physiologische Abläufe in den GNCPs sollten erste Rückschlüsse auf die Funktion der LSD1-Demethylase im Rahmen der

Tumorigenese und Tumorprogression gezogen werden. Ziel der Arbeit sollte insgesamt ein verbessertes Verständnis der Rolle von LSD1 im Medulloblastom und mittel- bis langfristig das Aufzeigen neuer Therapieansätze für epigenetisches Tumortargeting beim Medulloblastom sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkulturlösungen und Antibiotika

Amphothericin B	Invitrogen (Karlsruhe)
FCS (fetales Kälberserum)	PAA (Pasching)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Non Essential Amino Acids	PAA (Pasching)
Penicillin /Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin/ EDTA	PAA (Pasching)
Neurobasalmedium A	Invitrogen (Karlsruhe)
B27 Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
BSA	Sigma-Aldrich (USA)
Coomassie	Sigma-Aldrich (USA)
DMSO	Merck (Darmstadt)
EBSS	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure (100%)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Sigma-Aldrich (USA)
HBSS; -Mg^{2+}; -Ca^{2+}; -Phenolrot	Invitrogen (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)

Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Lithiumdodecylsulfat (LDS)	Boehringer (Mannheim)
MES	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
NaCl	Roth (Karlsruhe)
NCL-1	Entwickelt von Naoki Miyata und Takayoshi Suzuki (Ueda et al., 2009)
Noggin; recombinant mouse	R&D Systems (USA)
NP 40%	Sigma-Aldrich (USA)
Paraformaldehyd 4,5%	Morphisto (Frankfurt am Main)
Percoll (pH 8,5-9,5)	Sigma-Aldrich (USA)
PBS pH7,4; 1x; - CaC_{l2}; - $MgCl_2$	Invitrogen (Karlsruhe)
Phenolrot	Sigma-Aldrich (USA)
Poly-D-Lysin	BD (Heidelberg)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Proteingrössenmarker Page Ruler; Unstained	Thermo Scientific (Litauen)
Proteinase Inhibitor	Sigma-Aldrich (USA)
Roti-Quant 5x	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (37%; rauchend)	Roth (Karlsruhe)
SDS 4x	Gerbu (Heidelberg)
siLSD1 HP Custom siRNA	Qiagen (Hilden)
Thiazolblau	Roth (Karlsruhe)
Transfektionsreagenz Hiperfect	Qiagen (Hilden)
Tranylcypromin	Biomol (Hamburg)
Tris-Base	Roth (Karlsruhe)

Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Triton-X 100	Sigma-Aldrich (USA)

2.1.3 Puffer (sofern nicht in Kits enthalten)

SDS-Eletrophorese/Western-Blot:

MES-Laufpuffer (1X): MES 50mM, Tris Base 50mM, SDS 0,1%, EDTA 1mM

Ladepuffer (1X): Tris-HCl 106mM, Tris Base 141mM, LDS 2%, EDTA 0,51mM, Glycerin 10%, Coomassie 1% 0,22mM, Phenolrot 1% 0,175mM

Transferpuffer (1X): Tris Base, Glycin

RIPA-Lysepuffer: HEPES 50mM, NaCl 150mM, NP40 1%, SDS 0,1%, Triton 1%

MTT-Assay:

MTT Solubilisierungslösung: DMSO 100ml; SDS 10%; Eisessig 0,6ml

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Combitips (0,5; 2,5; 5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Cryoröhrchen	Simport (Kanada)
Einwegpipetten (2ml; 5 ml; 5 ml; 10 ml)	Greiner bio- one (Frickenhausen)
Eppendorfgefäße (0,2; 1,5; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
HTS Fluoro Block Inserts(8µm Porengröße; 24 well Format)	Falcon (USA)
Injekt-F 1 ml Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
Multiwell 24well für Membraneinsätze	Falcon (USA)
Nitrocellulose Transfermembran	GE Healthcare (Freiburg)
Parafilm	Pechinery (USA)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
PCR- Tubes	Axygen (USA)
Pinzetten	Finescience Tools (Heidelberg)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
PMMA- Einmalküvetten	Roth (Karlsruhe)
Polyacrylamid Fertiggele(NuPage 4-12% Bis-Tris-Gel,12well)	Invitrogen (Karlsruhe)
PP- Röhrchen (15 ml: 50 ml)	Greiner bio- one (Frickenhausen)

Scheren	Finescience Tools (Heidelberg)
Skalpelle	Servopax (Wesel)
Whatman Papier	GE Healthcare (Freiburg)
Zellkulturflaschen (25cm^2; 75cm^2)	Corning (Kaiserslautern)
Zellkulturschalen (96-Loch;12-Loch;6- Loch)	Corning (Kaiserslautern)
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld)

2.1.5 Kits

Cell Death Detection ELISA	Roche (Mannheim)
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche (Mannheim)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Assay on Demand GAPDH	Applied Biosystems (USA)
ECL Detection Kit	Amersham (Großbritanien)
SYBR-Green®	Applied Biosystems (USA)
TaqMAN®	Applied Biosystems (USA)
Complete GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents	Affymetrix (USA)
MEGAscript T7 Kit	Ambion (Darmstadt)
Bio-Array HighYield RNA-Transcription Labeling Kit	Enzo (USA)

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Firma	Verdünnung
anti-ß-Actin (A5441)	Sigma-Aldrich (USA)	1:2000
anti-GAPDH (MAB 374)	Millipore (Schwalbach)	1:2000

anti-LSD1	Cell Signaling (Frankfurt am Main)	1:1000
anti-pSmad 1/5/8 (#9511)	Cell Signaling (Frankfurt am Main)	1:2000
anti-ß-Tubulin (T5293)	Sigma-Aldrich (USA)	1:2000
anti-LSD1	Novus Biological (USA)	1:250
Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung
anti- mouse IgG HRP (NA9340V)	GE Healthcare (Freiburg)	1:2000
anti- rabbit IgG HRP (NA9340V)	GE Healthcare (Freiburg)	1:2000
Fluor® 594 (A11005)	Invitrogen (Karlsruhe)	1:2000

2.1.7 Primer für quantitative Real-Time PCR

	Cat.-Nummer	Firma
LSD1	HS00323448	Life Technologies
BMP2	QT00012544	Qiagen
GAPDH	HS03929097	Life Technologies

2.1.8 Enzyme

Papain	Worthington (USA)
DNase Vial	Worthington (USA)

2.1.9 Geräte

Allegra X-22R Zentrifuge	Beckmann Coulter (Krefeld)
Auflichtmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
EL-800 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments(BadFriedrichshall)
Elektrophoresekammern	Invitrogen (Karlsruhe)
Enduro 250V Power Supply	Labnet (Ried im Innkreis)
GFL 3005 Schüttler	Heidolph (Schwabach)
Laborwaage EW420-3NM	Kern & Sohn (Balingen- Frommen)
Mikro22R Kühlzentrifuge	Hettich (Kirchlengern)
Mini- PROTEAN 2 Westernblotzubehör	Biorad (München)
Modulus Microplate Reader	Turner Biosystems/ Promega (Mannheim)

Multipette Stream	Eppendorf (Hamburg)
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab (Erlangen)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
RM5- Assistant Rollschüttler	Braun (Melsungen)
Rotixa 50 RS Zentrifuge	Hettich (Mülheim a. d. Ruhr)
Rührer	IKA Labortechnik (Staufen)
Schüttelwasserbad	GFL (Burgwedel)
StepOne Plus Real- Time- PCR	Applied Biosystems (USA)
Sterilbank HERA-Safe HS12	Heraeus (Hanaua)
Thermal Cycler C1000	Biorad (München)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415D + Rotor	Eppendorf (Hamburg)
Uvichemi	Biometra (Göttingen)
Vortex	Heidolph (Schwabach)

2.1.10 Zelllinien

Die hier durchgeführten *in vitro* Versuche wurden an den humanen Medulloblastomzelllinien DAOY, ONS-76, HD-MB3, UW-228 und D458 durchgeführt. Die Zelllinie DAOY wurde 1985 aus einem desmoplastischen Medulloblastom eines 4 Jahre alten Jungen isoliert (Jacobsen et al., 1985). Diese Zelllinie lässt sich am ehesten der Shh-Gruppe zuordnen. Der histologische Ursprung und damit die Zuordnung zu einer Tumorsubgruppe lässt sich für die UW-228-Zellen leider nicht ausmachen. In beiden Zelllinien, DAOY und UW-228, konnte eine Mutation des Tumorsuppressors p53 identifiziert werden, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führt (Künkele et al., 2012).

Die HD-MB3-Zelllinie wurde aus Tumormaterial eines Patienten mit einem metastasiertem Gruppe 3 Tumor isoliert. Diese Zellen spiegeln sowohl histologisch als auch molekulargenetisch die Merkmale dieser Tumorsubgruppe, wie zum Beispiel eine Amplifikation von *MYC* oder der Nachweis eines Isochromosoms 17q, wider (Milde et al., 2012).

Die ONS-76 Zellen wurden 1987 aus einem metastasierten Tumor eines 2jährigen japanischen Mädchens isoliert und kultiviert (Tamura et al., 1989). In diesen Zellen lassen sich die Neuronspezifische Enolsae (NSE) sowie Neurofilamenet (NFP) im Zytoplasma nachweisen (Sun et al., 2013). Den Zelllinien HD-MB3 und ONS-76 ist ein

Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) im Tumorsuppressor TP53 gemeinsam, der jedoch weder einen Einfluss auf die Expression noch die Funktion von p53 hat (Künkele et al., 2012).
Die humane Medulloblastom Zelllinie D-458 exprimiert neuronale Marker wie Vimentin und Neurofilamente (He et al., 1991). Sie ist daher am ehesten Tumoren der Guppe 4 zu zuordnen.

2.1.11 Mausmodelle

In dieser Arbeit wurden sowohl die Ptch +/- sowie SmoA1-Mäuse als bereits etablierte Medulloblastommodelle genutzt.
Durch eine Inaktivierung des Tumorsuppressors Ptch oder einer Expression des Proto-Onkogens Smo entstehen *in vivo* spontan Medulloblastome (Goodrich et al., 1997; Hatton et al., 2008). Eine homozygote Inaktivierung von Ptch ist auf Grund von Entwicklungsstörungen wie zum Beispiel Herzfehlern oder Neuralrohrdefekten zwischen dem 9. und 10. Tag der Embryonalentwicklung letal (Goodrich et al., 1997). Heterozygote Mäuse entwickeln mit einer Inzidenz von 30% in der 12.-25. Lebenswoche spontan Medulloblastome. Diese Mäuse entwickeln neben Medulloblastomen auch noch andere maligne Tumor wie Rhabdomyosarkome und Basalzellkarzinome (Wetmore et al., 2000).
Beim SmoA1-Mausmodell kommt es zu einer erhöhten Expression von Smo und damit zur Aktivierung des Shh-Signalweges (Hallahan et al., 2004). Bei homozygoten transgenen Mäusen im Alter von 1 Monat ist die subklinische Tumorinzidenz 85% und im Alter von 2 Monaten 94% (Hatton et al., 2008). Die Mäuse entwickeln durchschnittlich im Alter von 4 Monaten die ersten klinischen Symptome.
Als klinische Symptome können die Mäuse eine Ataxie oder Kopfschiefhaltung sowie Gewichtsverlust zeigen.

2.1.12 Murines Tumorgewebe

Die zuvor beschriebenen Mäuse wurden nach Entwicklung neurologischer Symptome geopfert und der Tumor entnommen. Der Tumor wurde mechanisch zerkleinert und die RNA sowie die cDNA wie unter 2.2.11 und 2.2.12 beschrieben isoliert. Zur Analyse der Tumoren auf Proteinebene mittels Western Blot wurden die Tumoren mittels RIPA-Puffer lysiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Tumorzellen wurden im Inkubator bei 37°C, 80% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Partaildruck kultiviert. Die Zellkulturflaschen hatten eine Bodenfläche von 25 oder 75cm². Das Kulturmedium enthielt: 500ml RPMI-1640 (Gibco), 10% fetales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Amphotericin. Für die Kultivierung der Zelllinie ONS-76 wurde noch 1% L-Glutamin und für die HD-MB3 Zellen 1% nicht-essenzielle Aminosäuren zugefügt. Die gesamte Arbeit mit den Zellen wurde an sterilen Werkbänken mit vertikalem Flow durchgeführt.

2.2.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden passagiert und in neue Kulturflaschen ausplattiert, wenn die Bodenfläche zu 80-90% konfluent war. Hierzu wurde nach dem Entfernen des Mediums 1ml bzw. 2ml 0,2% Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Nach ca. 5 Minuten wurden die gelösten Zellen mit 5ml Medium aufgenommen und in ein 15ml Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde bei 300x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5ml Medium resuspendiert. Hiervon wurden 0,5-1 ml in neuen Kulturflaschen ausgesät.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Bürker-Zählkammer. Diese besteht aus einer Glasplatte mit einem Liniennetz, das die Zählfläche bildet. Ein Deckglas wird nach Anhauchen mit etwas Druck auf die Kammer geschoben. Hierbei zeigt das Auftreten von Interferenzfarben (Newtonsche Ringe) eine optimale Lage des Deckglases an, so dass der Raum zwischen Glasplättchen und Trägerstäben der Zählkammer vernachlässigbar wird und das Deckglas nicht verrutscht. Zum Zählen der Zellen wurden 50µl der abtrypsinierten Zellsuspension mit 50µl Trypanblau gemischt und vor das Glasplättchen pipettiert. Durch Kapillarkräfte saugt sich die Suspension in den Zwischenraum. Das Trypanblau färbt tote Zellen blau an. während vitale Zellen aufgrund ihrer intakten Zellmembran farblos erscheinen. Es wurden jeweils die vitalen Zellen in den 9 großen Quadraten der Bürker-Kammer gezählt und darüber die Zellzahl pro Milliliter nach folgender Formel ermittelt: Gezählte Zellen/ 9 x 2 x 10^4. Ausgehend davon wurde die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

2.2.4 Kryokonservierung und Lagerung einer Zellkulturcharge

Die Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Einfriermedium wurde aus fetalem Kälberserum und 10% DMSO hergestellt. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurden dann umgehend im -80°C Kühlschrank gelagert. Längerfristig wurden die Chargen im Stickstofftank bei -196°C aufbewahrt.

2.2.5 Isolierung der GCPs zur Herstellung einer Primärkultur

Vorbereitungen

Herstellung der Percolllösungen:

Die industrielle hergestellte Percollösung wird zunächst mit einer 1molaren HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht. Für einen Liter Percoll benötigt man ungefähr 6,5ml HCl. Der pH-Wert wird mittels pH-Elektrode gemessen.

Für die 35% Lösungen werden 17,5ml Percoll, 12,5ml 4fach PBS und 20ml H_2O in einem 50ml Falcon gemischt. Die 60% Lösung enthält 30ml Percoll, 12,5ml 4fach PBS und 7,5ml H_2O. Zusätzlich werden in die 60% Lösung noch einige Tropfen Trypanblau hinzugegeben, damit man die beiden Schichten voneinander unterscheiden kann.

Für die Isolierung der GCPs wird für die Gradientenzentrifugation jedes Mal frisch 10ml von der 35% Percolllösung in ein 50ml Falcon gefüllt und 10 ml 60% mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle vorsichtig unter die 35% Percolllösung gespritzt.

Herstellung des Mediums:

Das Kulturmedium der GCPs besteht aus 48ml Neurobasalmedium A, 500µl PenStrep, 500µl L-Glutamin, 6,25µl 2molarer KCl-Lösung und 980µl B27. Anschließend wird das Medium steril filtriert. Kühl gelagert ist es für 2 Wochen haltbar.

Beschichten der 6 Lochplatten:

Die 6 Lochplatten werden für 2Stunden mit Poly-D-Lysin im Inkubator beschichtet und zweimal mit Wasser gewaschen. Bis zum Gebrauch sollten die Vertiefungen mit Wasser bedeckt sein, um ein Austrocknen der Poly-D-Lysin-Schicht zu verhindern.

Herstellung der HBSS-Glukose:

Das HBSS wurde mit 6g Glukose pro Liter versetzt und anschließend steril filtriert. Bei 4°C ist es 1 Monat haltbar.

Durchführung

Die 7 Tage alten Mäuse wurden durch Dekapitation getötet und die Schädelkalotten entfernt. Die Kleinhirne wurden entnommen und in eine Petrischale mit HBSS-Glukose gelegt. Unter mikroskopischer Sicht wurden die Kleinhirne von den Hirnhäuten befreit und dann in ein mit kalter HBSS-Glukose gefülltes 15ml Falcon überführt. Die Kleinhirne der Mäuse wurden nach dem Genotyp der Mäuse sortiert.

Die HBSS-Glukose wurde abgesaugt und durch 2,5ml Papain ersetzt. Die Falcon-Röhrchen wurden dann 15-20min im 37°C warmen Wasserbad geschwenkt. Das Gewebe wurde danach mit einer 1000er Pipette durch Auf- und Abpipettieren zerkleinert. Nach 15 Sekunden, in denen die Zellsuspension sedimentierte, wurde der Überstand in ein neues 15ml Falcon überführt. Dieser wurde nun bei 200x g und Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml HBSS-Glukose und 50µl DNase resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde vorsichtig auf einen Percoll-Gardienten pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1800x g und Raumtemperatur für 10 Minuten. Um den Percollgradienten nicht zu durchmengen, wurde die Zentrifugation ohne Abbremsen durchgeführt. Die GCPs befinden sich nach der Zentrifugation in der Zwischenschicht zwischen dem 35% und dem 60% Percoll. Durch vorsichtiges Abpipettieren zwischen den Schichten wurden die GCPs in ein neues 15ml Falcon-Röhrchen überführt und mit HBSS-Glukose aufgefüllt. Diese Zellsuspension wurde bei 1100x g und Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in dem Kulturmedium aufgenommen und auf den beschichteten 6 Lochplatten mit einer Zellzahl von $6x10^6$ pro ml ausplattiert.

Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.6 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen trypsiniert und in PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde anschließend bei 300x g zentrifugiert und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen, um das im Kulturmedium enthaltene fetale Kälberserum zu entfernen. Abhängig von der Größe des Zellpellets wurden zwischen 50 & 500µl RIPA-Puffer hinzugegeben, resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 10 Minuten bei 10.000x g und 4°C zentrifugiert, um nichtlysierte Zellbestandteile und die DNA zu entfernen. Der Überstand wurde in neue

Eppendorf-Gefäße überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (2.2.7) gemessen. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

2.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bildet mit Proteinen Komplexe und sein Absorptionsspektrum verschiebt sich von 470nm auf 595nm. Bei dieser Wellenlänge wird der Proteingehalt der Lysate photometrisch gemessen. Hierzu wird 2µl des Lysates mit 998µl Bradfordreagenz (1:5 mit Wasser verdünnt) gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurden Kontrollen mit 0,2,4,6,8 und 10µg Rinderserumalbumin (1mg pro ml) mit dem Bradfordreagenz versetzt und inkubiert. Die Kontrollen wurden im Photometer gemessen und anhand der Werte eine Eichgrade erstellt. Anschließend wurden die Proben gemessen.

2.2.8 Western Blot

Western Blot bezeichnet die die Übertragung von Proteinen auf eine Membran und der anschließend immunologische Nachweis mittels spezifischer Antikörper. Vor dem eigentlichen Western Blot müssen die Proteine zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Die benötigte Proteinmenge wurde mit RIPA-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt und mit 6,6µl Lämmli-Ladepuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Das SDS und ß-Mercaptoethanol im Lämmli-Puffer bewirkt, dass die Wasserstoff- und Disulfidbrücken innerhalb der Proteinen aufbrechen und so die Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört werden.

Die so vorbereiteten Proben wurden in die Taschen eines Polyacrylamid Fertiggel (Invitrogen) pipettiert. Ein Längenmarker wurde in einer separaten Tasche aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit MES Puffer gefüllt und eine Spannung von 120V für 1,5h angelegt. Der eigentliche Western Blot wurde mittels Tank-Blot-System durchgeführt. Hierzu wurde das Gel in folgender Anordnung (von unten nach oben) in die Tank-Blot-Kammer eingebracht: Schwamm, Whatman Paper, Gel, Nitrozellulose Membran, Whatman Paper, Schwamm. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 40V für 1h. Danach wurde die Membran in Ponceau S für 5min gefärbt, die Banden des Längenmarkers mit Bleistift markiert und der Proteintransfer kontrolliert. Die Membran wurde zwischen der erwarteten Bande des Zielproteins und der

bekannten Lage der ß-Aktin Ladekontrolle geschnitten, sodass eine separate Inkubation mit ß-Aktin-Antikörper und Primärantiköper erfolgen konnte. Es folgt ein kurzer Waschschritt in PBST (PBS, 0,05% Tween) und die anschließende Blockierung für 30min in 5%iger Milch (Milchpulver + PBS). Die Antiköper wurden in der benötigten Verdünnung in 2ml 5%iger Milch angesetzt und die Membran damit bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgt dreimal ein Waschschritt mit PBST. Der mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper wurde in 2ml 5%iger Milch verdünnt und die Membran 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen waschen mit PBST wurde die Membran 5min mit ECL plus Reagenz inkubiert. Das überschüssige ECL wurde abgetupft und die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt. Die Dokumentation erfolgte mittels des Chemilumineszenzdetektors „Uvichemi“ von Biometra.

2.2.9 Boyden-Chamber-Assay

Bei dem Boyden-Chamber-Assay handelt es sich um einen Migrationstest. Die Boyden-Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine Membran mit Mikroporen getrennt werden. Die Zellen werden in dem oberen Kompartiment ausplattiert und migrieren durch die Poren in das Untere. Im unteren Kompartiment befindet sich Medium, dass Substanzen enthält, die einen Wachstumsanreiz für die Zellen darstellen.

In dieser Arbeit sollte der hemmende Effekt von LSD1 auf die Migration von Medulloblastomzellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen 12 Lochplatten transfiziert, jeweils ein Ansatz mit siLSD1 und Transfektionsreagenz. Nach 72h wurden das 10%FCS Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5%FCS Medium kultiviert. Nach 4h wurden die Zellen mit Accutase gelöst und 25.000Zellen/250µl 0,5% FCS Medium in dem oberen Kompartiment ausplattiert. Zuvor wurde 800µl 10%FCS Medium in das untere Kompartiment gefüllt. Die Auswertung des Versuches erfolgte 24h nach Einbringen in die Kammer, das heißt ca. 96h nach der Transfektion. Hierfür wurde das obere Kompartiment in DAPI fixiert und gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.10 siLSD1 Transfektion

Die Transfektion von Zellen mittels small interfering RNA (siRNA) ist eine Methode, um auf mRNA Ebene Gene auszuschalten. Diese kleinen doppelsträngigen RNA-Fragmente werden in die Zelle eingeschleust und bewirken, dass die zur siRNA

komplementäre mRNA durch Endonukleasen zerschnitten wird. Zur Einschleusung der siRNA in die Zellen wurde Hiperfect (QIAGEN) als Transfektionsreagenz benutzt.
Die Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl 24h vorher ausplattiert. Das Transfektionsgemisch wurde in Kryoröhrchen zusammen pipettiert, wobei die Reihenfolge zu beachten ist. Zuerst wird RPMI ohne Zusätze, dann die siLSD1 und zuletzt das Transfektionsreagenz pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Dieser Ansatz muss 30min bei Raumtemperatur inkubieren, damit eine Komplexbildung zwischen der siLSD1 und dem Transfektionsreagenz stattfinden kann. Nun wurde die benötigte Menge des Transfektionsansatzes in die Vertiefungen zu den Zellen gegeben. Nach 6h wurde nochmals Medium hinzugefügt, um die gewünschte Konzentration der siLSD1 (10nM) zu erreichen. 24h nach der Transfekion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.
Der Transfektionserfolg wurde sowohl auf RNA-Ebene mittels Real-Time PCR (2.2.13) als auch auf Proteinebene mittels Western Blot (2.2.8) überprüft.

2.2.11 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kits von Qiagen. Das Medium wurde aus den Vertiefungen abgesaugt und die Zellen mittels RLT Buffer lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 250µl 100%Ethanol gemischt. Dann wurden die Proben auf die beiliegenden Säulen überführt und 15 Sekunden bei 10.000x g zentrifugiert. Die Säulen wurden in neue Sammelgefäße gesteckt und 500µl RPE Buffer auf die Säulen gegeben. Es folgt erneut eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000x g. Der Durchfluss wurde verworfen und 500µl 80% Ethanol auf die Säulen pipettiert, die dann zwei Minuten bei 10.000x g zentrifugiert wurden. Die Säulen wurden erneut in neue Sammelgefäße gesteckt und 5 Minuten bei 10.000x g zentrifugiert, um die Membran der Säule vollständig zu trocknen und letzte Reste des Ethanols zu entfernen. Danach wurden die Säulen in 1,5ml Eppendorfgefäße gesteckt. Die RNA wurde mit 14µl RNase-freiem Wasser 1 Minute bei 10.000x g eluiert.

2.2.12 cDNA Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das SuperScript II Reverse Transcriptase Kit verwendet. Es wurden 6µl RNA verwendet. Pro Probenansatz wurden 1µl 10mM dNTP und 3µl Random-Primer gemischt und zu der RNA pipettiert. Es folgte eine Denaturierung bei

65°C für 5 Minuten. Danach wurde zu jedem Probenansatz ein RT-Reaktionsgemisch bestehend aus 5µl 5xPuffer, 5µl 25mM $MgCl_2$, 2,5µl 0,1 M DTT, 1,25µl RNase-Inhibitor RNase-Out sowie 1,25µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die RT-Reaktion lief bei folgenden Temperaturen ab: Abkühlung für 10Minuten auf 25°C, Annealing/Elongationsphase bei 42°C für 50 Minuten und die anschließende Inaktivierung der RT-Reaktion bei 70°C für 15 Minuten. Um die restliche komplementäre RNA aus dem cDNA Gemisch zu entfernen, wurde anschließend noch ein RNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden zu jeder Probe 1µl RNase-H hinzugefügt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung der DNA und beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich eine quantitative Auswertung der entstandenen DNA, da während der exponentiellen Phase der Reaktion in Echtzeit die Menge an Produkten über Fluoreszenz bestimmt werden kann. Hierbei können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden zum Einsatz kommen: SYBR Green ist ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Bei den sog. TaqMan-Sonden handelt es sich hingegen um für die Ziel-DNA sequenz-spezifische Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Je mehr Amplifikate entstehen, umso stärker wird das Signal. Die Fluoreszenz ist daher proportional zur Menge des PCR Produktes. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels einer Detektionseinheit im ABI Taqman 5700 gemessen. Der CT-Wert beschreibt die Anzahl der Zyklen, bei der die gemessene Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Zunächst werden anhand von Kalibratorproben Standardkurven für eine endogene Referenz und das zu untersuchende Gen erstellt. Die Geräte-Software errechnet dann anhand der linearen Standardkurven die CT-Werte für die endogene Referenz und das zu untersuchende Gen jeder Probe in eine relative Mengenangabe bezogen auf die Kalibratorprobe um. Der Quotient aus der relativen Mengenangabe von endogener Referenz und dem zu untersuchenden Gen ergibt die relative Expression des Gens in Bezug auf die endogene Kontrolle.

In dieser Arbeit wurde mittels real-time PCR die mRNA Expression von LSD1 in den Zelllinien DAOY, ONS76, HD-MB3, UW228 sowie D458 gemessen. Als endogene Referenz diente GAPDH. Es wurden die „Assays On Demand“ der Fa. Applied

Biosystems verwendet, welche Primer und markierte Sonden enthalten. Es wurden 20µl Reaktionsansatz aus 10µl 2x Universal PCR Master Mix, 1µl Primer Mix aus dem „Assay on Demand“ und 9µl cDNA hergestellt.

2.2.14 MTT

Hierbei handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest für Zellen *in vitro* unter dem Einfluss von Außenfaktoren. Das Prinzip beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu lila, wasserunlöslichen Formazankristallen. Die Reduktion ist abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH, sowie teilweise von der Succinat-Dehydrogenase. Somit entspricht die Menge des entstandenen Formazan der mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Zellen. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.
In dieser Arbeit wurde die Zellviabilität nach der Transfektion mit siLSD1 untersucht. Hierzu wurden 4.000 Zellen/100µl in 96 Lochplatten pipettiert und nach 24h transfiziert. Zu den Zeitpunkten 24-120h nach der Transfektion wurden die MTT-Assays durchgeführt. Hierzu wurden 20µl MTT-Lösung zu dem Medium in jede Vertiefung gegeben und für 2-4h im Inkubator inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die entstandenen Formazankristalle in 100µl Solubilisierungslösung gelöst.

2.2.15 BrdU-Proliferations-Assay

Mittels BrdU-Assay misst man die DNA-Synthese als direktes Korrelat der Zellproliferation. Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Analog der DNA-Base Thymidin und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU lässt sich die DNA-Synthese z.B. immunhistochemisch oder photometrisch nachweisen. Hierfür ist eine Denaturierung der DNA mittels Hitze oder Säure notwendig. Der entstandene Farbstoff bzw. die Absorption ist proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen.
Der BrdU-Assay wurde mit dem Kit von Roche nach der Anleitung durchgeführt:
Die Zellen wurden in 96 Lochplatten wie vorher beschrieben kultiviert und behandelt. Im ersten Schritt wurde pro Vertiefung 10µl brommarkiertes Desoxyuridin zugegeben. Die Endkonzentration vom BrdU lag bei 10µM. Während der 120 Minuten Inkubation bei 37°C wurde BrdU anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Anschließend

wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe eines Schnellfixans denaturiert. Danach wurden die Zellen mit 100µl des BrdU-Antikörpers 90 Minuten inkubiert. Nach 3 Waschgängen wurde durch Zugabe der Substratlösung eine Reaktion der entstandenen Immunkomplexe ausgelöst. Diese Reaktion wurde abhängig von der Farbentwicklung nach ca. 5-15 Minuten durch Zugabe von 1M Schwefelsäure gestoppt. Anschließend wurde die Absorption in einem Multiwell-Spektrophotometer bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Der BrdU-Assay wurde zum einen mit den DAOY und ONS-76 Zellen 96 Stunden nach einer Transfektion mit siLSD1 und zum anderen mit den ONS-76 Zellen nach Behandlung mit Noggin, mit siLSD1 oder der Kombination, Noggin + siLSD1, durchgeführt.

2.2.16 Cell Death ELISA

Am Ende der Signalkaskade der Apoptose steht die Spaltung von chromosomaler DNA in Oligonukleotide. Hierfür sind spezifische Endonukleasen verantwortlich. Diese spalten die genomische DNA an internukleosomalen Regionen und produzieren histongebundene DNA-Fragmente mit einer Länge von 180-185bp. Mittels Anti-Histon und Anti-DNA Antikörper können diese Fragmente detektiert werden, bevor die Plasmamembran zerstört wird.

Zur Detektion der Apoptose wurde in dieser Arbeit der Cell Death ELISA von Roche verwendet. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA und ermöglicht eine semiquantitative Auswertung.

Die Zellen wurden wie vorher beschrieben in 96 Lochplatten ausplattiert und eine siLSD1-Transfektion durchgeführt. 24 Stunden nach Transfektion wurde der Cell Death ELISA durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen zunächst durch Zugabe eines Lysepuffers lysiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und mit den Anti-Histon/Biotin-Antikörpern sowie mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-DNA-Antikörper inkubiert. Nach Zugabe eines chromogenen Substrates wurde die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen.

2.2.17 Tranylcypromin-Behandlung

Bei Tranylcypromin handelt es sich um einen unselektiven und irreversiblen

Monoaminoxidase-Inhibitor, der als Reservemedikament bei Depressionen eingesetzt wird. Die Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne von LSD1 hat eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu Monoaminoxidasen (MAO), die den gleichen Demethylierungsmechanismus nutzen. Lee und Kollegen konnten bereits zeigen, dass Monoaminoxidase-Inhibitoren (MAOI), wie zum Beispiel Tranylcypromin, auch die Aktivität von LSD1 hemmen (Lee et al., 2006).
Zunächst wurde hier das Tranylcypromin-abhängige Wachstum der Medulloblastom-Zelllinien DAOY und ONS-76 mittels MTT-Test untersucht. Dazu wurden die Zellen in der entsprechenden Zellzahl 24h vorher ausplattiert und für 72h mit unterschiedlichen Tranylcypromindosen von 5mM bis 0,001µM inkubiert. Im Anschluss wurde ein MTT-Test wie in 2.2.14 beschrieben durchgeführt und die jeweilige mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) bestimmt.

2.2.18 Immunfluoreszenzfärbung der GCPs

Die GCPs wurden wie zuvor beschrieben isoliert (2.2.5) und für 14 Tage im 12well Format kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 400µl 4% Paraformaldehyd fixiert. Mit 400µl 0,5% Triton X100 wurden die Zellen 20 Minuten permeabilisiert und anschließend mit 3% BSA für 1 Stunde blockiert. Der Erstantikörper ß-Tubulin wurde in 1% BSA 1:2000 verdünnt. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 1 Stunde. Es folgten 6 Waschschritte mit PBS. Der gegen Maus-IgG gerichtete Sekundärantikörper war direkt mit dem Floureszenzfarbstoff Alexa Fluor 594 gekoppelt. Dieser wurde ebenfalls in 1% BSA 1:2000 verdünnt und für 1 Stunde auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 6 Waschschritten mit PBS wurde noch eine Färbung der Zellkerne mittels DAPI-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die DAPI-Lösung (1mg/ml) für 1 Minute auf die Zellen gegeben, sodass diese bedeckt waren.

2.2.19 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse erfolgte an ONS-76 Zellen, die entweder für 72 Stunden mit siRNA gegen LSD1 oder nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden. Die RNA wurde aus drei unabhängigen Versuchen isoliert. Die Proben wurden auf dem Affymetrix Genechip Human Genome U133 Plus 2.0 Array im BioChip-Labor des Institutes für Zellbiologie des Universitätklinikums Essen bei PD Dr. Klein-Hitpass

untersucht. Es wurden je 3 Microarrays nach Behandlung mit siLSD oder Kontrollen analysiert.

Methode

Die Microarray-Analyse ermöglicht es Genexpressionsprofile verschiedener Zellen mit Hilfe sogenannter Gen-Chips zu vergleichen. Bei diesen Gen-Chips handelt es sich um Trägermembranen aus Glas oder Silikon, auf deren Oberfläche sich Tausende von Gen-Sonden befinden. Diese Sonden können z.B. aus cDNA-Fragmenten bestehen. Aus den zu analysierenden Proben wird mRNA isoliert. Unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers, der die Sequenz eines T7-RNA-Polymerasepromotors trägt, erfolgt eine Transkription in cDNA. Daraufhin folgt eine *in vitro* Transkription mit T7-Polymerase, hier wird die cDNA in cRNA umgeschrieben. Bei diesem Schritt wird biotinyliertes UTP in die cRNA eingebaut. Die so markierte cRNA wird fragmentiert und auf Microarray-Chips gegeben. Die cRNA-Fragmente binden mittels Hybridisierung an ihre komplementären Sonden. Dann wird ein an Streptavidin gebundener Fluoreszenzfarbstoff auf den Chip gegeben. Der gefärbte Chip wird unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge von 488nm gescannt und das Fluoreszenzsignal detektiert.

Versuchsaufbau

Der Ablauf der Chip-Hybridisierung erfolgte nach Affymetrix-Protokoll unter Verwendung des Complete GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents (Affymetrix), des MEGAscript T7 Kit (Ambion) und des Bio-Array HighYield RNA-Transcription Labeling Kit (Enzo). Die verwendeten Materialien wurden gemäß Herstellerangaben benutzt. Als erster Schritt wurden ONS-76 Zellen mit siLSD1 für 72 Stunden wie in 2.2.10 beschrieben transfiziert und die RNA isoliert. Als Kontrolle wurde RNA aus nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten ONS-76 Zellen verwendet. Es folgt eine Einzelstrang-cDNA-Synthese. Dazu wurde RNA mit 1µl eines Gemisches aus 3'-polyadenylierten Kontroll-RNAs und 1µl 75µM T7-Oligonucleotid(dT)-Primer für 6 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde 3µl des „First Cycle, First-Strand Master-Mix" hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1h bei 42°C. Die Inaktivierung der Superscript II RT-Transcriptase erfolgte für 10 min bei 72°C. Im nächsten Schritt wurde aus der Einzelstrang-cDNA Doppelstrang-cDNA synthetisiert. Zu der Probe wurde hierzu 32,5µl des „First Cycle, Second-Strand Master-Mix" gegeben. Es folgte sich eine Inkubation bei 16°C für 2 Stunden. Anschließend wurden 1µl T_4-DNA-Polymerase

I (5U/µl) hinzugegeben und die Probe wurde für weitere 10 min bei 16°C inkubiert. Durch Zugabe von 10µl 0,5µM EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Die Doppelstrang cDNA wurde mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch ausgefällt, in 12µl RNAse freiem Wasser gelöst und anschließend getrocknet.

Die Doppelstrang-cDNA wurde mit Hilfe des MEGAscript T7 Kits durch eine *in vitro* Transkription in cRNA umgeschrieben.

Hierzu wurde zu den getrockneten Doppelstrang-cDNA Pellets 10µl des „First Cycle, IVT Master-Mix“ gegeben. Die Probe wurde dann für 6h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die cRNA mit Hilfe von RNeasy-Säulen aufgereinigt und konzentriert. Danach folgte die Amplifikation und das Markieren der Proben. Die cRNA wurde zunächst wieder in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 4µl der cRNA mit 1µl „Random“- Primern (0,2µg/µl) versetzt und bei 70°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Probe 5µl „Second Cycle, First-Strand Master-Mix“ zugegeben und 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Um die RNA-Reste zu entfernen, wurde die Probe mit 1 µl RNase H für 20 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der RNase erfolgte durch eine 5minütige Inkubation der Probe bei 95°C. Die Einzelstrang-cDNA wurde dann wieder in Doppelstrang-cDNA umgeschrieben. Zu der Probe wurde ersten Schritt 2µl 5µM T7-Oligo(dT)-Promoter-Primer gegeben und für 6 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 62µl des „Second Cycle, Second-Strand Master-Mix“ zu der Probe pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl 0,5µM EDTA gestoppt. Die Doppelstrang cDNA wurde auch zuvor mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch ausgefällt, in 12µl RNAse freiem Wasser gelöst und anschließend getrocknet. Unter Verwendung des BioArray HighYield RNA Transcription Labeling Kit der Firma Enzo wurde in einer *in vitro* Reaktion die Doppelstrang-cDNA in cRNA umgeschrieben und im selben Schritt mit Biotin markiert. Dazu wurden 40µl des Labeling-Mixes zu jeder Probe hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 5 Stunden. Die markierte cRNA wurde mittels RNeasy Säulen aufgereinigt und konzentriert.

Bei 95°C erfolgte mittels thermischer Hydrolyse ein Verdau der cDNA zu Fragmenten zwischen 100-200 Basenpaaren. Dieses Produkt wurde dann auf den Affymetrix-Chip gegeben. Die Hybridisierung erfolgte auf dem Schüttler bei 45°C über Nacht. Anschließend wurde der GenChip in der Waschstation gewaschen. Zur Detektion wurde Streptavidin-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend mit Hilfe eines Scanners detektiert.

Auswertung der Microarray-Ergebnisse

Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurde der MAS5.0 Algorithmus des GCOS Programm (Affymetrix Inc.) verwendet. Die p- Werte wurden für jede Probe mittels des MAS5.0 Algorithmus bestimmt. Die Qualität der Microarrays wurde durch die Analyse des ß-Aktin und GAPDH 5'-3' -Verhältnisses sichergestellt. Daten wurden unter Verwendung des Statistik- und Rechenprogramms R2 (http://R2.amc.nl) oder TMEV - Software analysiert. Die Genexpressionsdaten wurden in der GEO-Datenbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) hinterlegt und sind unter der Nummer GSE43552 zugänglich.

2.2.20 Immunhistochemie und Tissue Microarrays

Die Tissue Microarrays (TMA) wurden aus in Paraffin eingebetteten Gewebeproben von 70 primären Medulloblastomen und 9 Kleinhirn-Proben hergestellt. Drei verschiedene Gewebezylinder aus jeder Probe wurden mittels eines manuellen Stanzgerätes (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) entnommen. Aus dem Tissue Microarray wurden 2µm dicke Paraffinschnitte mit einem Schlittenmikrotom hergestellt und auf SuperFrost Objektträger aufgebracht. Es folgte eine Trocknung über Nacht bei 37 Grad Celsius in einem Brutschrank. Danach wurden die Schnittpräparate für 5 min in einem Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) mit Mikrowellen behandelt, um die Eiweißvernetzungen der Formalinfixierung aufzubrechen. Anschließend erfolgte eine zwanzigminütige Inkubation der TMA Schnitte mit 200 ml Demaskierungslösung, pH 6,0 (Envision Plus-Detection Kit, Dako, Glostrup, Dänemark) bei 100 ° C. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger mit 3% H_2O_2 für 5 min inkubiert. Der primäre Antikörper gegen LSD1 wurde 1:250 verdünnt (Kat. # NB100-1762 Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Die Auswertung der nukleären Immunfärbung gegen LSD1 erfolgte mit Hilfe eines semiquantitativen Punktesystems. In einem ersten Schritt wurde die Anzahl der positiven Zellen gezählt (0 = keine positiven Kerne, 1 = <10% der Zellkerne gefärbt, 2 = 10-50% der Zellkerne gefärbt, 3 = 51-80% der Zellkerne gefärbt und 4 => 80% der Zellkerne gefärbt). In einem zweiten Schritt wurde die Färbungsintensität der positiven Zellen beurteilt (0 = keine positiven Kerne, 1 = sehr schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung und 3 = starke Färbung). Die Gesamtpunktzahl für das LSD1-Proteinexpressionsniveau wurde durch Multiplikation der beiden Werte berechnet (0-3 = negativ, 3-6 = schwach, 6-9 = mittel und 9-12 = stark). Eine Information zur Einteilung in Subgruppen stand für die beim TMA-Array

analysierten Tumoren leider nicht zur Verfügung. So konnte eine Korrelation zwischen Tumorsubgruppe und LSD1-Expression nicht beurteilt werden.

3 Ergebnisse

Medulloblastome der Gruppe 3 und 4 sind biologisch deutlich heterogener als Medulloblastome der molekularen Subgruppen Shh und Wnt und stellen klinisch weiterhin eine große Herausforderung dar. Die Suche nach geeigneten Strukturen, die einer zielgerichteten Therapie zugänglich sind, ist daher von hoher Relevanz. Hier spielt zunehmend auch die Beeinflussung epigenetischer Regulatoren eine Rolle. Für Histonacetylasen und -methylasen konnte bereits gezeigt werden, dass sie zentrale Gene in Medullobalstomen regulieren (Milde et al., 2010; Northcott et al., 2009; Parsons et al., 2011). Durch intensive Sequenzanalysen ist bekannt, dass Mutationen in epigenetisch wirksamen Enzymen wie z.B. den Histondemethylasen am häufigsten in Tumoren der Gruppe 3 und 4 auftreten (Jones et al., 2012; Northcott et al., 2017). Die biologische Bedeutung dieser Mutationen in Medulloblastomen sind bisher nicht vollumfänglich geklärt und ein potentieller klinischer Nutzen unklar. In der Vergangenheit konnte unser Labor den Einfluss von LSD1 und der damit einhergehenden H3K4-Demethylierung im Neuroblastom zeigen. Da die embryonalen kindlichen Tumore Neuroblastom und Medulloblastom viele morphologische und molekulare Eigenschaften gemein haben (Schulte et al., 2009), lag die Vermutung nahe, dass LSD1 möglicherweise auch in Medulloblastomen eine wichtige Rolle spielen könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression von LSD1 in primären humanen Medulloblastomen und verfügbaren murinen Medulloblastommodellen analysiert. Des Weiteren wurde in Medulloblastom-Zelllinien der Einfluss von LSD1 auf die Proliferation, den Zelltod und die zelluläre Viabilität untersucht. Zum Schluss wurde die Wirksamkeit eines gegen LSD1 gerichteten *„small-molecule inhibitors“* in Medullobalstom-Zelllinien analysiert.

3.1 Reanalyse von Microarray Daten humaner Medulloblastome

Um einen ersten Anhalt bezüglich der Bedeutung von LSD1 im Medulloblastom zu erlangen, wurde zunächst die Expression in humanen Tumoren auf mRNA Ebene untersucht. Hierzu wurden bereits publizierte Daten aus Microarrayexperimenten reanalysiert (Kool et al., 2008). Diese Reanalysen wurde wie unter 2.2.19 beschrieben unter Nutzung der R2 Plattform durchgeführt (http://r2.amc.nl). Insgesamt umfasste die verwendete Microarraystudie 62 primäre Medulloblastome, davon 60 Erstdiagnosen und 2 Rezidive, wobei zu einem Tumor histologischen Angaben fehlten.

Bei einem medianen Alter der Patienten von 6 Jahren und einem Anteil von 46 klassischen, 13 desmoplastischen und einem großzellig/anaplastischen Tumor entspricht die Zusammensetzung den unter 1.1.4 für die Bevölkerung genannten epidemiologischen Daten und kann somit als repräsentatives Kollektiv angesehen werden. Verglichen wurde die Höhe der *LSD1* Expression in einem ersten Schritt mit jener in gesundem Kleinhirngewebe. Entsprechende Expressionswerte lagen in der R2 Datenbank aus vorhergehenden Genexpressionsanalysen von 9 Kleinhirnproben vor (Roth et al., 2006). Es zeigte sich eine hoch signifikant erhöhte Expression von *LSD1* in primären Medullobastomen verglichen mit normalem Kleinhirngewebe (Abb. 3, p=<0,0001).

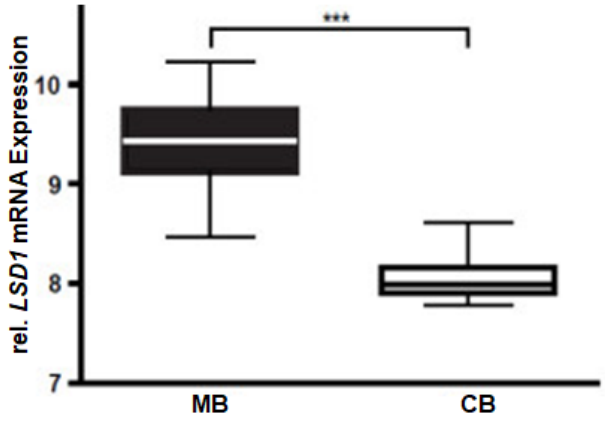

Abb. 3: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in primären Medulloblastomen und Kleinhirngewebe, p=<0,0001

Da das Medulloblastom nach aktuellem internationalen Konsens in 4 unterschiedliche Subgruppen eingeteilt wird (s. Abschnitt 1.1.4, dazu gibt es mittlerweile weitere Subtypen innerhalb der jeweiligen Subgruppen s. Abb. 2), die sich vor allem in ihren molekularbiologischen Eigenschaften unterscheiden und prognostische Bedeutung haben, wurde in einem nächsten Schritt die *LSD1* Expression innerhalb dieser Gruppen untersucht. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einer erhöhten Expression innerhalb der Gruppe 4, so dass insgesamt keine eindeutige Präferenz der *LSD1* Expression für eine bestimmte Subgruppe festgestellt werden konnte (Abb. 4). Es ergaben sich somit hier erste Hinweise, dass LSD1 in allen Medulloblastomen stark exprimiert ist und dies unabhängig davon, welcher onkogene Signalweg innerhalb des Tumors vorherrschend aktiv ist.

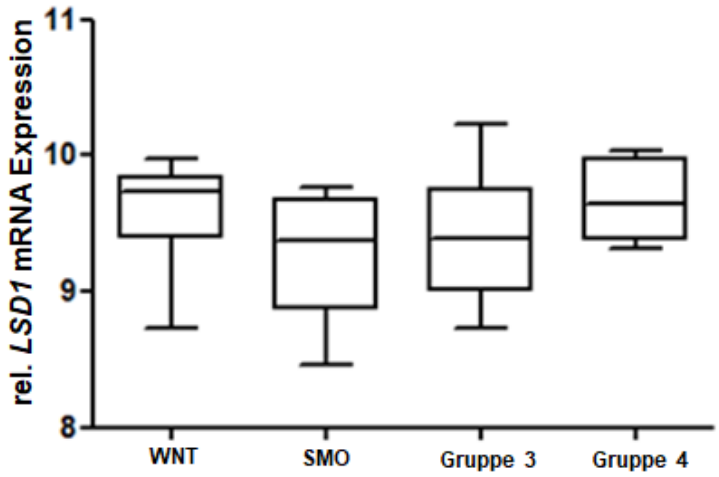

Abb. 4: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Medulloblastom Subgruppen

3.2 Analyse von Tissue Microarrays

Im Anschluss wurden die reanalysierten Genexpressionsdaten auf Proteinebene validiert. Um gut vergleichbare und effiziente immunhistochemische Färbungen durchführen zu können, waren daher im Labor zunächst Tissue Microarrays (TMAs) von 70 primären Medulloblastomen und 9 gesunden Kleinhirnpräparaten erstellt worden. Diese TMAs standen nun im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung und wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Uniklinik Köln gefärbt. Unter Verwendung eines gegen LSD1 gerichteten Antikörpers konnte in allen untersuchten Medulloblastomen eine deutliche Expression des Proteins in den Zellkernen nachgewiesen werden, während die gesunden Kleinhirne keine Anfärbung zeigten (Abb. 5). Die semiquantitative Auswertung und anschließende statistische Analyse der immunhistochemischen Färbungen ergaben auch für die Expression von LSD1 auf Proteinebene der primären Tumoren eine hohe Signifikanz (Abb. 6, $p<0,0001$).

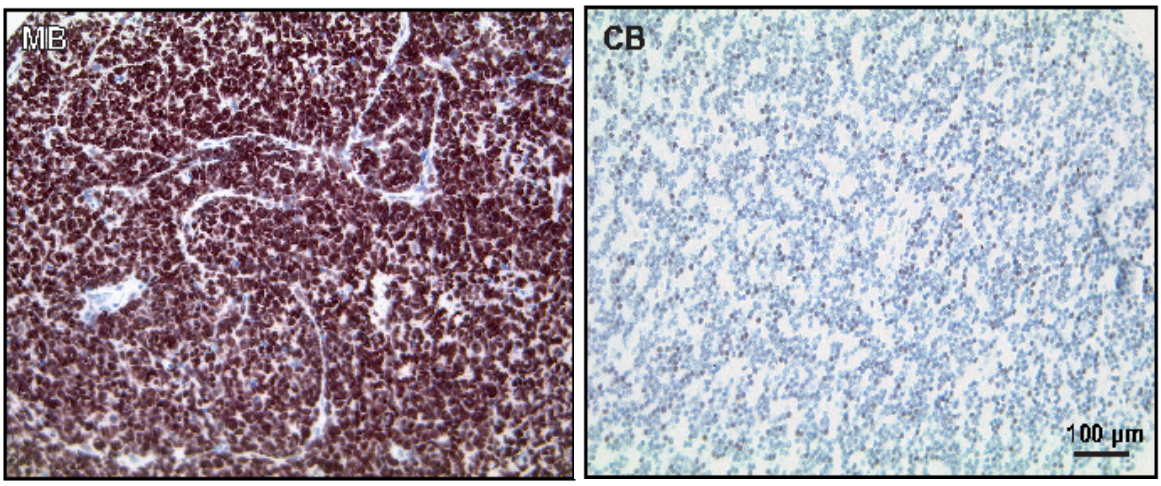

Abb. 5: Repräsentative immunhistochemische Färbung von Tissue Microarrays, MB=Medulloblastom; CB=Kleinhirn

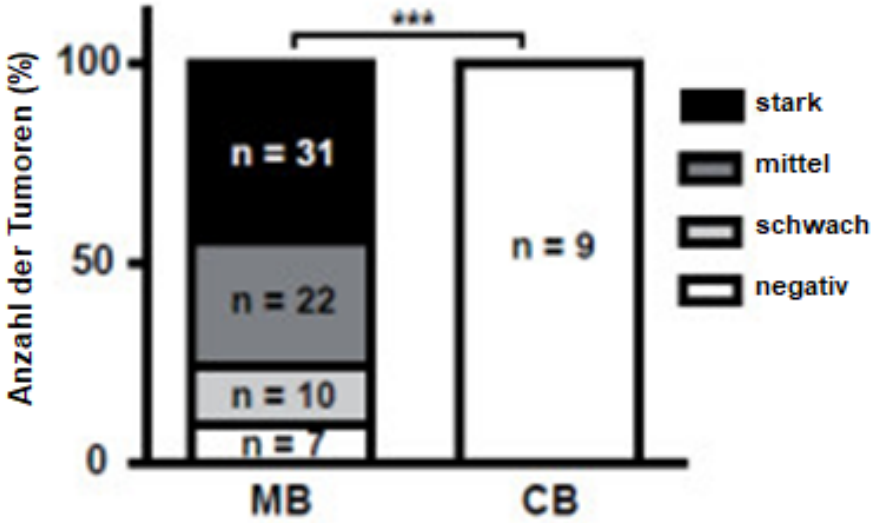

Abb. 6: Semiquantitative Auswertung der relativen LSD1-Expression der immunhistochemischen Färbungen der Medulloblastome (MB) und Kleinhirne (CB). In einem ersten Schritt wurde die Anzahl der positiven Zellen gezählt (0 = keine positiven Kerne, 1 = <10% der Zellkerne gefärbt, 2 = 10-50% der Zellkerne gefärbt, 3 = 51-80% der Zellkerne gefärbt und 4 => 80% der Zellkerne gefärbt). In einem zweiten Schritt wurde die Färbungsintensität der positiven Zellen beurteilt (0 = keine positiven Kerne, 1 = sehr schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung und 3 = starke Färbung). Die Gesamtpunktzahl für das LSD1-Proteinexpressionsniveau wurde durch Multiplikation der beiden Werte berechnet (0-3 = negativ, 3-6 = schwach, 6-9 = mittel und 9-12 = stark), $p<0,0001$.

3.3 Analyse der LSD1 Expressionen in murinen Medulloblastommodellen

Die Bedeutung einzelner Moleküle oder Signalwege für die Entwicklung und Progression von Tumoren sowie neue therapeutische Strategien werden häufig in

Mausmodellen untersucht. Für die Entität des Medulloblastoms sind insbesondere die transgenen Mausmodelle SmoA1 und Ptch$^{+/-}$ mit aktivierenden Mutationen im *sonic hedgehog* Signalweg von Bedeutung (s. Abschnitt 2.1.11). In dieser Arbeit sollte die *LSD1* Expression in den genannten Mausmodellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht werden. Diese Analysen sollten zum einen als Grundlage für mögliche weitergehende Untersuchungen bezüglich der Bedeutung von LSD1 für die Tumorentstehung respektive Progression sowie für spätere Therapiesimulationen *in vivo* dienen. Zum anderen könnten artübergreifende hohe Expressionswerte von LSD1 in murinen Medulloblastommodellen die Bedeutung des Moleküls innerhalb dieser Entität weiter erhärten. Die Mäuse entwickelten im Durchschnitt nach 3-6 Monaten Tumoren in der hinteren Schädelgrube und fielen zumeist durch ein ataktisches Gangbild oder Krampfanfälle auf. Die auf diese Weise diagnostizierten Mäuse wurden geopfert und die entnommenen Tumoren anschließend analysiert (3 Ptch$^{+/-}$- und 5 SmoA1-Mäuse). Interessanterweise zeigten alle entnommenen Tumoren eine signifikant erhöhte Expression von *LSD1* mRNA im Vergleich zu Kleinhirngewebe von Mäusen desselben genetischen Hintergrundes, die keine aktivierende Mutation im *sonic hedgehog* Signalweg aufwiesen (Abb. 7, p=0,014/ p=0,037). Die Validierung der LSD1 Expression erfolgte auf Proteinebene mittels Western Blot und konnte die deutlich erhöhte LSD1 Expression in den murinen Medulloblastommodellen bestätigen (Abb. 8).

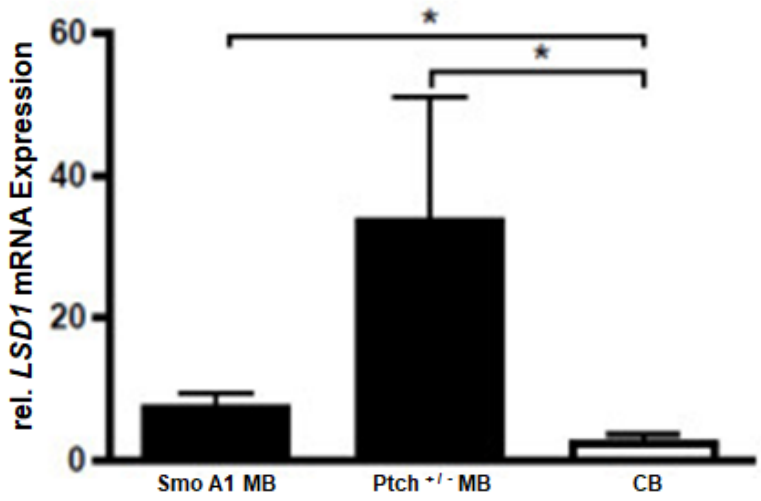

Abb. 7: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in murinen medulloblastischen Tumoren und murinem Kleinhirngewebe

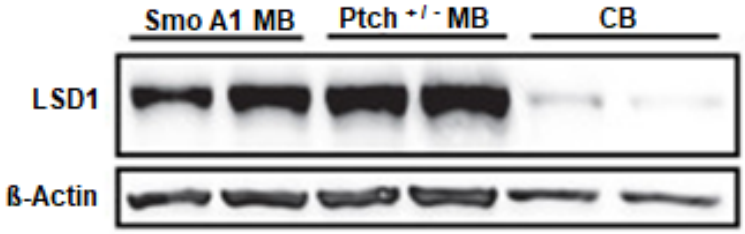

Abb. 8: LSD1-Expression auf Proteinebene in murinen Medulloblastommodellen und murinem Kleinhirngewebe

3.4 Überprüfung der LSD1 Expression im Zellkulturmodell

Um die Bedeutung von LSD1 im Medulloblastom durch *in vitro* Versuche näher zu untersuchen, musste als Voraussetzung zunächst der Expressionsstatus von LSD1 in den zur Verfügung stehenden Zelllinien geklärt werden. Mittels real-time RT-PCR wurde dazu die Expression von *LSD1* auf mRNA Ebene in verschiedenen Zelllinien des Medulloblastoms überprüft. Verwendet wurden etablierte und gut charakterisierte Zelllinien, die sich zumindest zum Teil histologischen oder molekularen Subgruppen des Medulloblastoms zuordnen lassen (siehe Abschnitt 2.1.10).

Interessanterweise fand sich eine hohe Expression von *LSD1* auf mRNA Ebene in allen untersuchten Zelllinien, unabhängig von deren Zuordnung zu einem histologischen oder molekularen Subtyp (Abb. 9). Als Positivkontrolle diente die Neuroblastomzelllinie SK-N-BE, die eine starke *LSD1* Expression aufweist (Schulte et al., 2009).

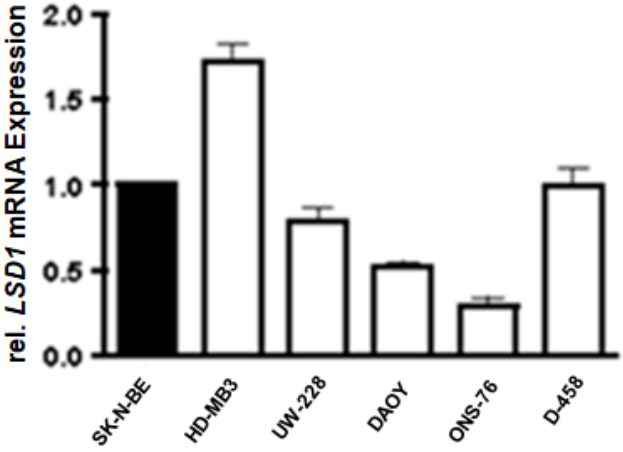

Abb. 9: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in etablierten Medulloblastomzelllinien und der Neuroblastomzellienie SK-N-BE als Positivkontrolle

3.5 Reduktion der LSD1 Expression mittels siRNA Technologie

Nachdem eine erhöhte LSD1 Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in den beschriebenen Zelllinien festgestellt worden war, sollte diese Expression mit Hilfe der siRNA Technologie reduziert werden. Durch dieses Vorgehen sollte eine Grundlage für die folgenden Untersuchungen des durch LSD1 bedingten Phänotyps der Zellen geschaffen werden. Nach transienter Transfektion der Zelllinien DAOY und ONS-76 mit einer gegen LSD1 gerichteten siRNA wurde zunächst die Expression der *LSD1* mRNA durch eine real-time RT-PCR bestimmt. Hier zeigte sich für beide Zelllinien eine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich zu nur mit dem Transfektionsmedium behandelten Kontrollzellen (Abb. 10, p jeweils <0,0001). Die weitere Validierung der Expression auf Proteinebene mittels Western Blot ergab auch hier eine deutliche Reduktion von LSD1 (Abb. 11).

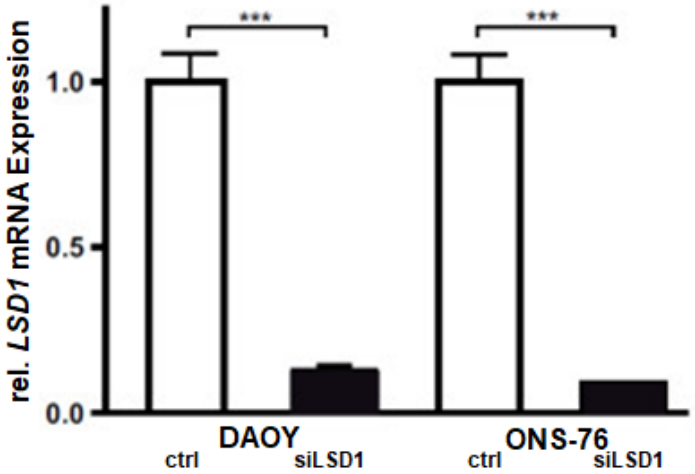

Abb. 10: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene 72h nach siLSD1-Transfektion, p<0,0001

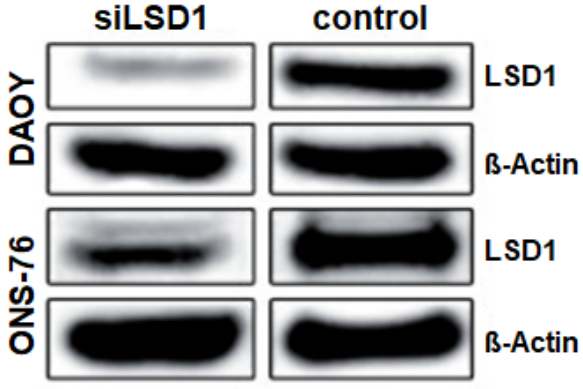

Abb. 11: LSD1-Expression auf Proteinebene 72h nach siLSD1-Transfektion

3.6 Untersuchung der Viabilität, Proliferation und Apoptose von Medulloblastomzellen nach Einsatz von siRNA gegen *LSD1*

Nachdem mittels Einsatz von siRNA eine effektive Reduktion der erhöhten *LSD1* Expression in den Medulloblastomzelllinien erreicht werden konnte, sollte in nachfolgenden funktionellen *in vitro* Analysen der durch LSD1 bedingte Phänotyp der Tumorzellen untersucht werden. Eine erste Orientierung zu den Auswirkungen der verringerten Menge an LSD1 ergab die Durchführung eines MTT-Tests. Die Viabilität, d.h. die Lebensfähigkeit der Zellen, wurde 72h nach Durchführung der Transfektion mit gegen *LSD1* gerichteter siRNA anhand der Extinktion gemessen. Sowohl die transfizierten DAOY als auch ONS-76 Zellen wiesen eine hochsignifikant niedrigere Viabilität im Vergleich zu den nur mit dem Transfektionsmedium behandelten Kontrollzellen auf (Abb. 12, p jeweils <0,0001).

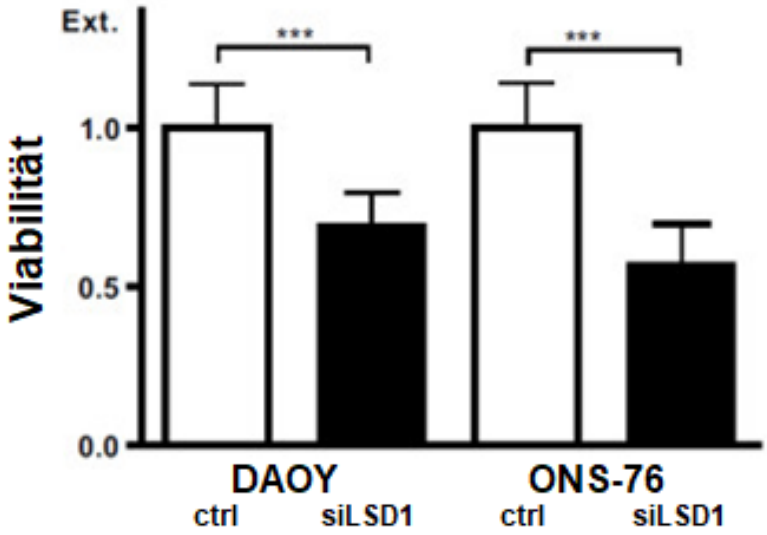

Abb. 12: Vergleich der Viabilität von DAOY und ONS-76 Zellen gemessen mittels MTT-Assay 72h nach siLSD1-Transfektion im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen, p<0,0001.

Um den phänotypischen Unterschied genauer zu charakterisieren, wurde in einem nächsten Schritt ein BrdU-Test durchgeführt. BrdU kann von Zellen aufgenommen werden und in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper gegen BrdU kann dann eine erfolgte DNA-Synthese immunhistochemisch

nachgewiesen werden, die dann eine Zellproliferation anzeigt. Hier zeigte sich, dass die Abnahme der Zellviabilität nach Einsatz der siRNA gegen *LSD1* mit einer deutlichen Verminderung der Proliferation von DAOY und ONS-76 Zellen, gemessen anhand der BrdU-Inkorporation, einhergeht (Abb. 13, p<0,0001).

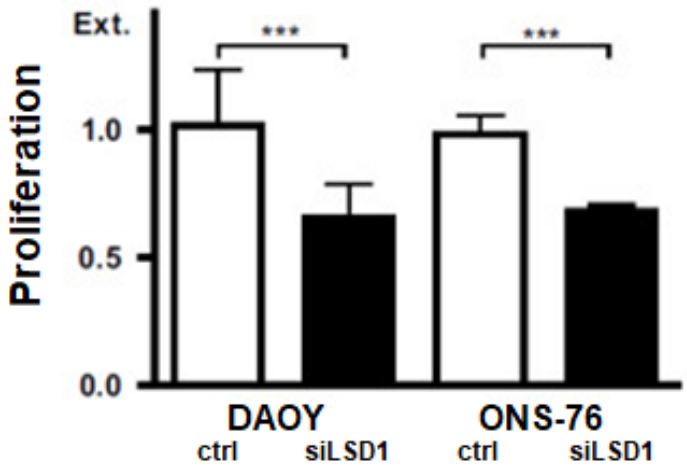

Abb. 13: Vergleich der Proliferation von DAOY und ONS-76 Zellen gemessen mittels BrdU-Test von DAOY und ONS-76 Zellen 72h nach siLSD1-Transfektion im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen, p<0,0001.

Da es für die Behandlung eines Tumors von großer Bedeutung ist, ob die Zellen in die Apoptose gehen oder sich nur in einer Ruhephase (G0) befinden, wurde zur weiteren funktionellen Analyse ein *Cell Death Detection* ELISA® durchgeführt. Dieser ergab, dass die durch die *LSD1* Inhibition bedingten Veränderungen des Phänotyps von DAOY und ONS-76 Zellen mit einer signifikanten Zunahme der Apoptose einhergingen (Abb. 14, p<0,0001 DAOY Zellen für 72h transfiziert mit siLSD1 im Vergleich zu DAOY Zellen nur mit Transfektionsmedium behandelt/ p=0,022 ONS-76 Zellen für 72h transfiziert mit siLSD1 im Vergleich zu ONS-76 Zellen nur mit Transfektionsmedium behandelt).

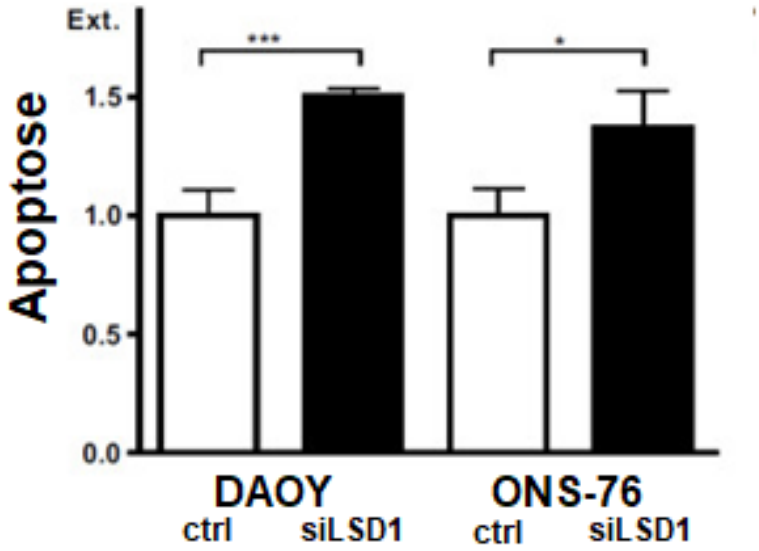

Abb. 14: Vergleich der Apoptose von DAOY und ONS-76 Zellen gemessen mittels Cell Death ELISA® 72h nach siLSD1-Transfektion im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen, ***p<0,0001, *p=0,022

3.7 Analyse der Migrationskapazität von Medulloblastomzellen nach Einsatz von siRNA gegen *LSD1*

Da wir sowohl eine Überexpression von LSD1 in der Mehrzahl der humanen Medulloblastome als auch eine Dysregulation in murinen Medulloblastommodellen feststellen konnten, sollte die potentielle Bedeutung von LSD1 für Migration untersucht werden, welche ein wichtiges Kennzeichen für das aggressive Verhalten von Medulloblastomzellen darstellt. Dazu wurden erneut DAOY und ONS-76 Zellen mit siRNA gegen *LSD1* transfiziert und nach 72h in einem „Boyden Chamber"-Versuch eingesetzt. Die Analyse 24h nach Beginn der Migrationsanalyse zeigte bereits optisch einen deutlichen Unterschied im Migrationsverhalten der Zellen. Es fanden sich deutlich weniger Zellen an der Unterseite der Membran im Falle der mit siLSD1 transfizierten DAOY und ONS-76 Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen (Abb. 15). Dies wurde durch die statistische Auswertung bestätigt, die eine signifikante Reduktion der migratorischen Kapazität der Medulloblastomzellen nach *LSD1* Inhibition ergab (Abb. 16, p=0,0047 DAOY Zellen für 72h transfiziert mit siLSD1 im Vergleich zu DAOY Zellen nur mit Transfektionsmedium behandelt/ p=0,015 ONS-76 Zellen für 72h transfiziert mit siLSD1 im Vergleich zu ONS-76 Zellen nur mit Transfektionsmedium behandelt).

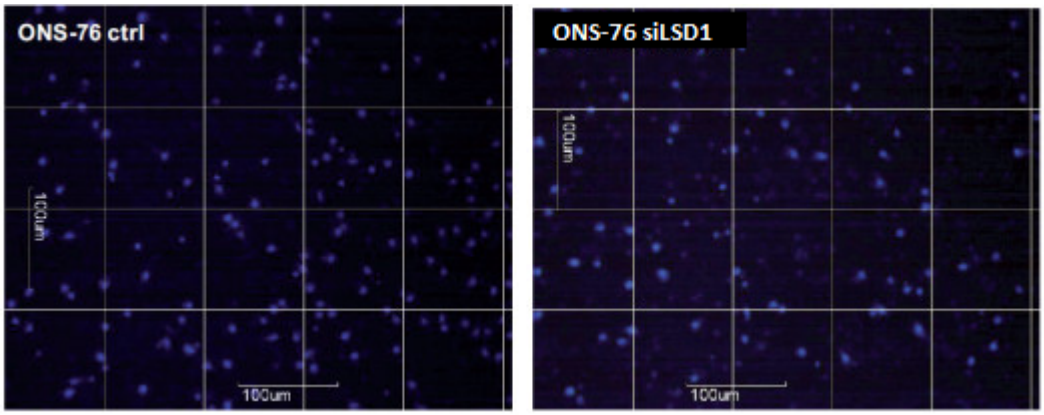

Abb. 15: Auflichtmikroskopie der Unterseite der Boyden-Kammern nach DAPI-Färbung, ONS-76 96h nach Tranfektion mit siLSD1

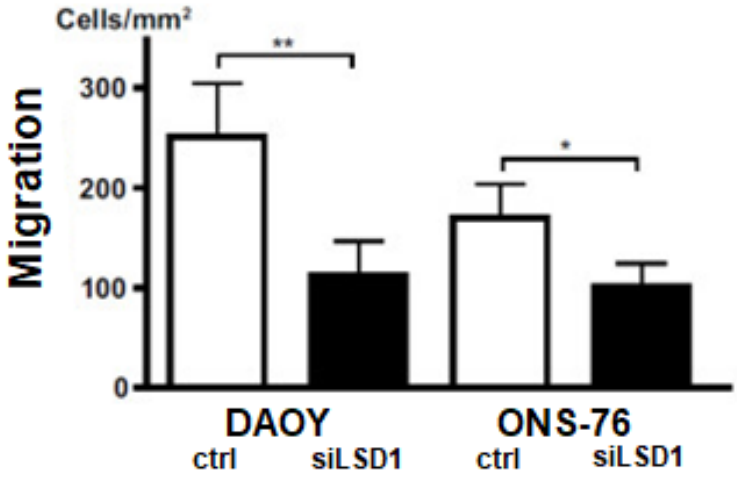

Abb. 16: Anzahl der Zellen auf der Unterseite der Boyden-Kammer pro mm² 24h nach Ausplattieren von DAOY und ONS-76 Zellen nach vorheriger siLSD1-Transfektion für 72h im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen, **p=0,0047/ *p=0,015.

3.8 Identifikation von BMP2 als potentielles Zielgen von LSD1 im Medulloblastom

Die vorherigen Daten haben gezeigt, dass LSD1 eine wichtige Rolle in der Tumorbiologie des Medulloblastoms spielt. Daher war das nächste Ziel die Identifizierung sogenannter „Targetgene“ von LSD1. Hierzu wurde ein Affymetrix Microarray mit RNA durchgeführt, die aus ONS-76 Zellen 72h nach siLSD1 Transfektion sowie aus Kontrollzellen isoliert wurde, die nur mit Transfektionsreagenz behandelt wurden. Diese Analyse zeigte, dass eine Inhibition von *LSD1* in 4 Genen

eine 3fache Repression und in 30 Genen eine 3fache Induktion zur Folge hatte (Abb. 17). Das am stärksten herunterregulierte Gen ist LSD1, was eine Positivkontrolle für eine erfolgreiche siLSD1-Transfektion darstellt. Die deutlichste Zunahme mit der höchsten Signifikanz ($p=6,4x10^{-6}$) zeigte BMP2 in beiden Sonden auf dem Chip mit einer 4fach erhöhten Expression. In der Literatur ist die Hemmung der Malignität bei Vorläuferzellen von Hirntumoren durch BMP bereits beschrieben (Piccirillo et al., 2006). Es wurde zudem gezeigt, dass BMP2 einen Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung der granulären neuronalen Vorläuferzellen (GNCPs), den potenziellen Vorläuferzellen der Shh-Medulloblastome, hat (Rios et al., 2004; Alvarez-Rodriguez et al., 2007).

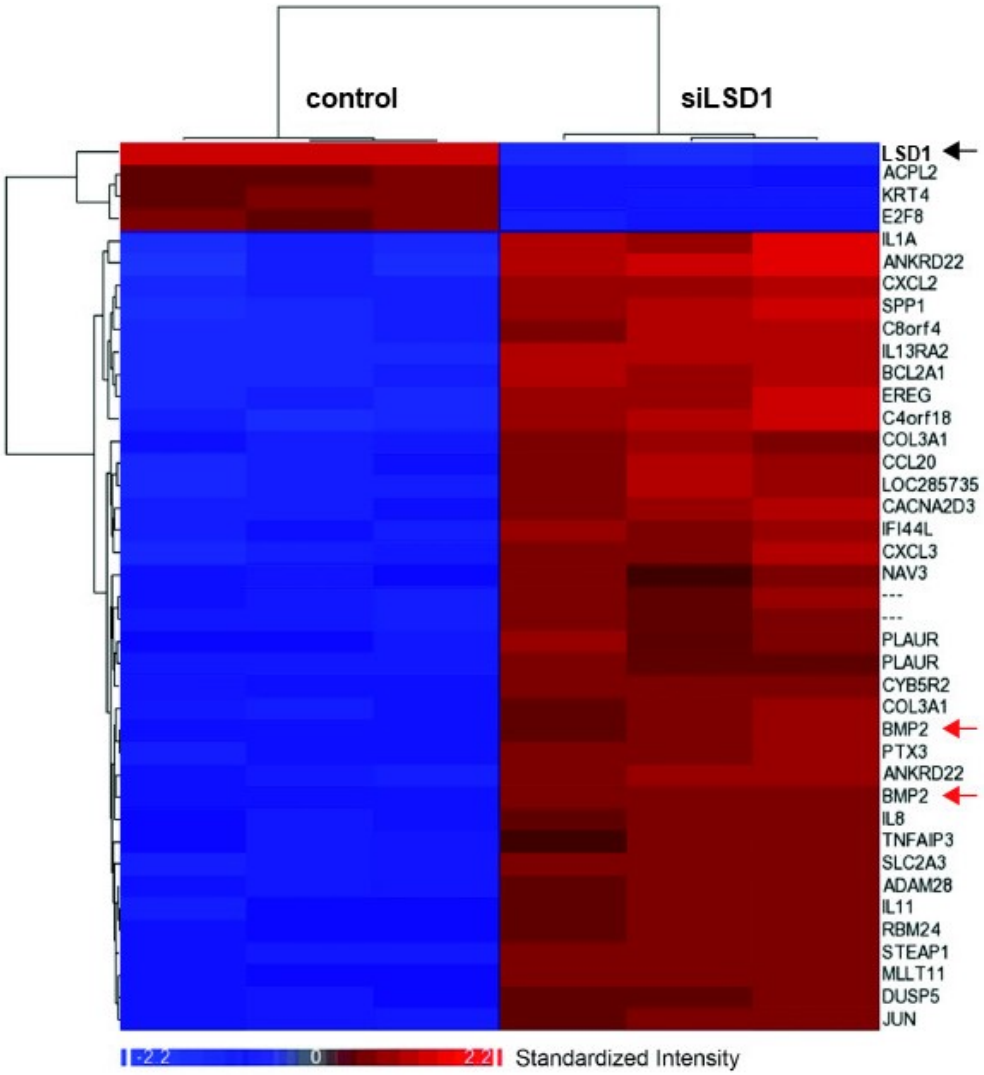

Abb. 17: Übersicht von regulierten Genen (Heatmap) 72h nach siLSD1-Transfektion (rechts) bzw. Behandlung mit Transfektionsreagenz (links) von ONS-76 Zellen. Analyse mittels Affymetrix U133 Plus 2.0 Microarray. Hochregulierte Gene sind in rot und herunterregulierte Gene in blau dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert LSD1 und die beiden rote Pfeile die 2 Sonden für BMP2

Zunächst wurde die erhöhte *BMP2*-Expression als Antwort auf eine *LSD1*-Inhibition bei den ONS-76 Zellen 72h nach siLSD1-Transfektion auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 18, $p<0,05$). Um beurteilen zu können, dass nicht nur die Transkription sondern auch die Funktion von BMP2 durch LSD1 beeinflusst wird, wurde die Phosphorylierung von SMAD5, einem nachgeschaltetem Element des BMP2-Signalweges, untersucht. Eine Transfektion von ONS-76 mit siLSD1 für 72h führte auf Proteinebene zu einer Zunahme der SMAD5-Phosphorylierung um 220% im Vergleich zu nur mit dem Transfektionsmedium behandelten Kontrollzellen (Abb. 19). Insgesamt zeigen diese Daten, dass BMP2 in den ONS-76-Zellen herunterreguliert und die Regulation nachgeschalteter Faktoren kompromittiert ist. Durch eine Inhibition von LSD1 kommt es nicht nur zu einer erhöhten Transkription von BMP2 sondern auch zu einer Zunahme der Aktivität des BMP2-Signalweges.

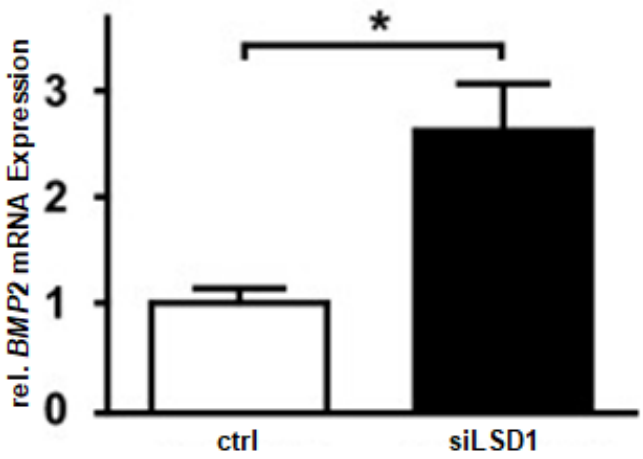

Abb. 18: Relative *BMP2*-Expression auf mRNA-Ebene in ONS-76 72h nach Transfektion mit siLSD1, $p= <0,05$

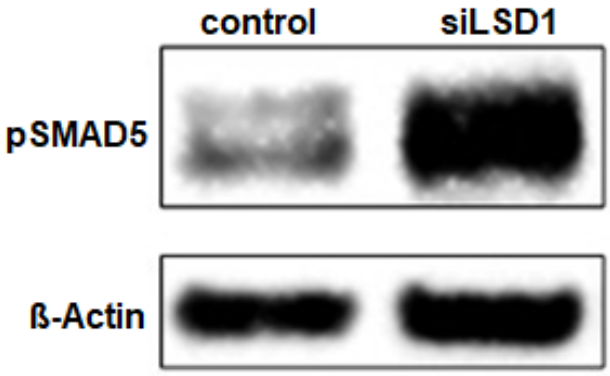

Abb. 19: Messung der Phosphorylierung von SMAD5 auf Proteinebene in ONS-76 72h nach Transfektion mit siLSD1

3.9 Wirkung von *small molecule* Inhibitoren gegen LSD1 auf Medulloblastomzellen

Die Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne von LSD1 hat eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu Monoaminoxidasen (MAO), die den gleichen Demethylierungsmechanismus nutzen. Monoaminoxidasen sind Enzyme, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und den Abbau von Monoaminen katalysieren. Es gibt zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B. Für Monoaminoxidase-Inhibtoren (MAOI), wie zum Beispiel Tranylcypromin, wurde bereits gezeigt, dass sie auch die Aktivität von LSD1 hemmen. MAOI wurden daher als erste verfügbare *small molecule* Inhibitoren gegen LSD1 bezeichnet (Lee et al., 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass eine Behandlung mit MAOI einen signifikanten Effekt auf die Proliferation von Neuroblastomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hat (Schulte et al., 2009). Zunächst wurde hier das Tranylcypromin-abhängige Wachstum der Medulloblastom-Zelllinien DAOY und ONS-76 mittels MTT-Test untersucht. Hierzu wurden die Zellen 72h mit unterschiedlichen Tranylcypromindosen inkubiert. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) lag bei den DAOY-Zellen bei 0,38mM und bei den ONS-76 bei 1,76mM (Abb. 20).

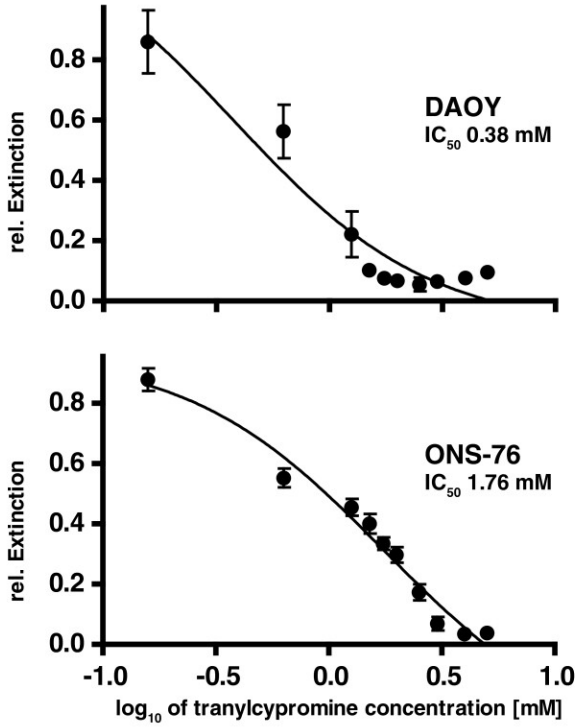

Abb. 20: Messung der Zellviabiltät mittels MTT Assay 72h nach Tranylcypromin-Behandlung von DAOY und ONS-76 mit angegebenen Konzentrationen.

In Mausversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die hohen erforderlichen MAOI-Dosen zur effektiven LSD1-Inhibition schwerwiegende Nebenwirkungen haben (Schulte et al., 2009). Daher ist ein spezifischer Inhibitor von LSD1 erforderlich. Die Arbeitsgruppe um Ueda hat NCL-1 als *small molecule* Inhibitor gegen LSD1 entdeckt. NCL-1 ist nicht gegen MAO-A und MAO-B gerichtet und es kann insgesamt von geringeren Nebenwirkungsraten ausgegangen werden (Ogasawara et al., 2011; Ueda et al., 2009). Um die Wirkung dieses spezifischen *small molecule* Inhibitors auf Medulloblastomzellen näher zu untersuchen, wurden DAOY und ONS-76 mit 10µM NCL-1 behandelt. Für diese Konzentration konnte bereits gezeigt werden, dass die Proliferation von LSD1 exprimierenden Glioblastomzellen beeinflusst wird (Sareddy et al., 2013). Nach 72h wurde die Zellviabilität mittels MTT-Test gemessen. Es zeigte sich in den behandelten DAOY-Zellen eine zu 63% und in den ONS-76 eine zu 54% reduzierte Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 21, ***p<0,0001). Diese Daten zeigen, dass eine spezifische Hemmung von LSD1 mittels *small molecule* Inhibitoren in Medulloblastomzellen, die eine hohe LSD1-Expression haben, einen signifikanten Einfluss auf die Tumorzellviabilität hat.

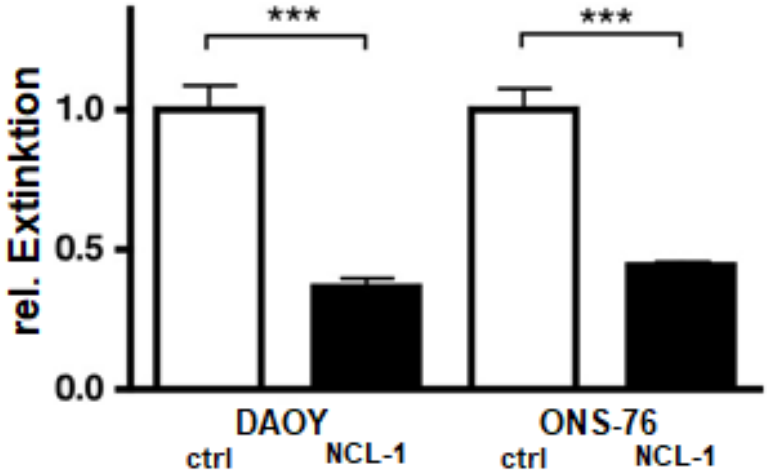

Abb. 21: Messung der Zellviabiltät mittels MTT Assay nach Behandlung für 72h mit dem LSD1-spezifischen Inhibitor NCL-1von DAOY und ONS-76 Zellen, ***p<0,0001

3.10 *LSD1* Expression in den granulären neuronalen Vorläuferzellen (GNCPs)

Um die Bedeutung von LSD1 in den potenziellen Ursprungszellen der Medulloblastome, insbesondere der Shh-Medulloblastome, näher zu beschreiben, wurde zunächst ein Protokoll zur Isolierung dieser Zellen wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben etabliert. Eine exemplarische Kultur der isolierten GNCP-Zellen ist in Abb.

22a dargestellt. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Primärkultur mit ßIII-Tubulin und DAPI, um den neuronalen Ursprung der Zellen zu belegen (Abb. 22 b). Um die isolierten Zellen weiter zu validieren, wurde die Expression von *ATOH1* auf mRNA-Ebene in der Primärkultur bei 7 Tage alten Mäusen untersucht. *ATOH1* wird in den Vorläuferzellen des sich entwickelnden Cerebellums exprimiert (Butts et al., 2014). Hier zeigte sich eine hohe Expression im Vergleich zur Gliazellkultur, als weiterer Beleg für die Isolation der gewünschten granulären neuronalen Vorläuferzellen (Abb. 23).

a) b)

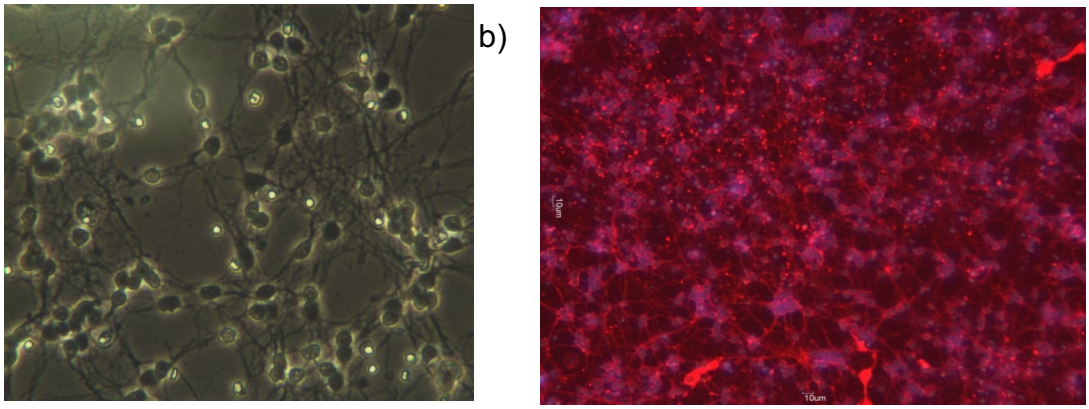

Abb. 22: a) GNCP's in Kultur b) Immunfluorezenzfärbung der GNCP`s mit ßIII-Tubulin und DAPI

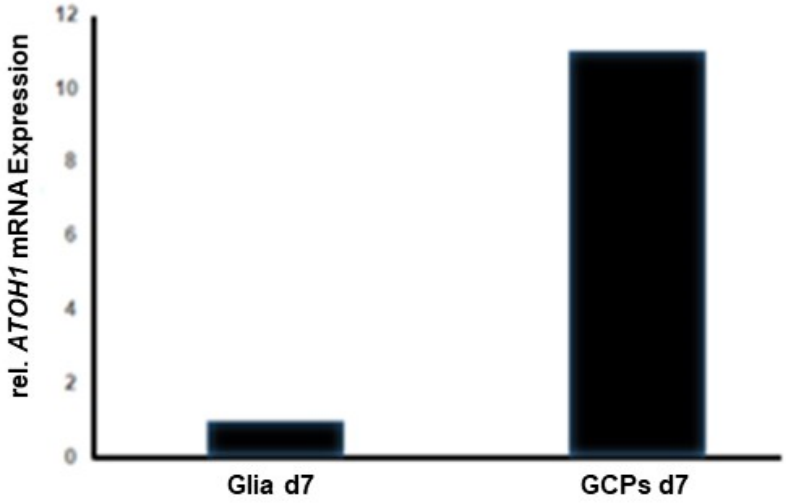

Abb. 23: Expression von *ATOH1* auf mRNA-Ebene in GNCP's im Vergleich zu Gliazellen bei 7 Tagen alten Mäusen

Man weiß, dass es in der Entwicklung dieser Progenitorzellen durch Histondemethylierung zu einer Aktivierung bestimmter Gene kommt, die mit dem Vorläuferzellphänotyp korreliert sind. Diese Demethylierung erfolgt v.a. im Bereich H3K9, der auch durch LSD1 demethyliert wird. Als nächster Schritt erfolgte daher die

Analyse der LSD1-Expression im Verlauf der Kleinhirnentwicklung bei transgenen SmoA1-, SmoM2 und Ptch+/- Mäusen sowie in Kontrollen (B6N-Mäusen). Die *LSD1*-Expression wurde auf mRNA-Ebene an den Tagen 7, 14 und 28 gemessen. Hier zeigte sich, dass die Expression bis zum 14. Tag zunimmt und erst dann wieder absinkt (Abb. 24). Zum Zeitpunkt des Peaks zeigen die murinen GNCPs die stärkste Migration aus der Granularzellschicht (Hatten et al., 1997).

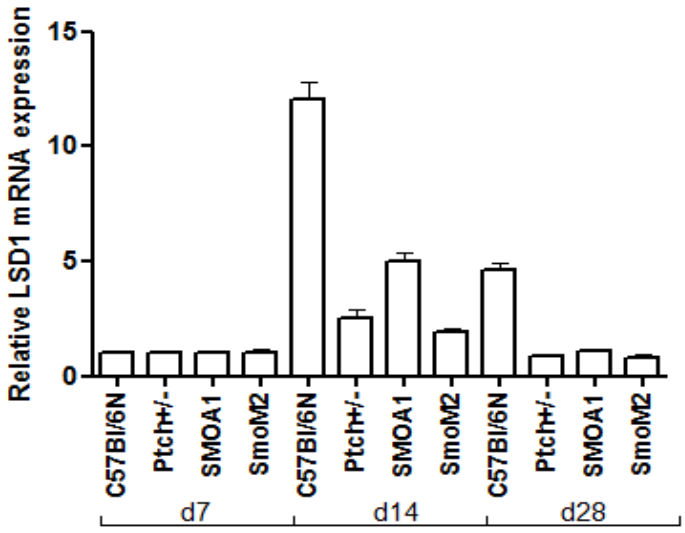

Abb. 24: Relative *LSD1*-Expression der GNCP's transgener SmoA1-, SmoM2 und Ptch+/- Mäusen sowie Black6N-Mäusen an postnatalen Tagen 7, 14 und 28

4 Diskussion

Chromatinmodifikatoren können die Expression von Genen durch Acetylierung und Methylierung bestimmter Histonreste regulieren und werden daher zunehmend als potentielle neue Zielstrukturen in der Therapie verschiedener Krebserkrankungen untersucht. Im Rahmen von Sequenzierungsprojekten mit Hilfe von sogenannten *next-generation* Techniken konnten in verschiedenen Tumorentitäten, darunter auch das Medulloblastom, zahlreiche Mutationen insbesondere in solchen Genen entdeckt werden, die für Chromatin modifizierende Enzyme kodieren (Gui et al., 2011; Morin et al., 2011; Northcott et al., 2009; Northcott et al., 2017). Es wird daher davon ausgegangen, dass Chromatinmodifikatoren durch Beeinflussung der Expression von bestimmten Genen zur Ausbildung maligner Eigenschaften von Tumoren beitragen können. Vorhergehende Arbeiten aus unserem Labor und Ergebnisse anderer Gruppen weisen darauf hin, dass eine hohe Expression von LSD1 in einer Vielzahl von Entitäten, wie z.B. dem Bronchial-, Prostata-, Mamma-, Colon- und Blasenkarzinom sowie dem Neuroblastom und der akuten myeloischen Leukämie mit einer Zunahme der Aggressivität und Abnahme der Differenzierung von Krebszellen einhergeht (Wang et al., 2007; Schulte et al., 2009; Kahl et al., 2006; Sareddy et al., 2013; Harris et al., 2012). Da in diesen Arbeiten gezeigt wurde, dass LSD1 durch die Regulation epigenetischer Merkmale übergeordnete Bedeutung für eine Vielzahl von wichtigen biologischen Prozessen der Tumorprogression hat, stellt dieses Molekül einen potenziellen Kandidaten einer zielgerichteten Therapie dar. Gleichzeitig kann LSD1 aufgrund seiner Assoziation mit einer ungünstigen Prognose der betroffenen Patienten als prädiktiver Biomarker genutzt werden (Lim et al., 2010; Schulte et al., 2009; Suikki et al., 2010).

Um die Rolle von LSD1 im Medulloblastom genauer zu verstehen, wurde in dieser Arbeit:

1.) die Expression von LSD1 in Zellkultur- und Maus-Modellen sowie in Primärtumoren und potentiellen Vorläuferzellen des Medulloblastoms untersucht und

2.) die funktionelle Bedeutung von LSD1 mit Hilfe von *knockdown*- und Inhibitionsexperimenten *in vitro* analysiert.

Die erhobenen Ergebnisse legen nahe, dass die Expression von LSD1 im

Medulloblastom maßgeblich zwei entscheidende Charakteristika maligner Zellen beeinflusst: die Proliferation sowie das Migrationsverhalten. In den noch nicht entarteten potenziellen Vorläuferzellen scheint die Überexpression von LSD1 jedoch auf bestimmte Zeiten beschränkt zu sein, in denen die Demethylase den Vorgang der physiologischen Migration dieser Zellen regulieren könnte. Da hier zudem gezeigt werden konnte, dass die LSD1-Inhibition mittels in prä-klinischer Erprobung befindlicher niedermolekularer Verbindungen (*small molecules*) effektiv ist, haben die Resultate dieser Arbeit potentiell auch translationale Relevanz.

4.1 LSD1-Expression in humanen Medulloblastomen und murinen Medulloblastommodellen

Um erste Anhaltspunkte über die Bedeutung von LSD1 im Medulloblastom zu erhalten, wurden Genexpressionsdaten von 62 primären Medulloblastomen unter Verwendung der R2-Datenbank re-analysiert und mit der *LSD1*-Expression in physiologischem Kleinhirngewebe verglichen (Kool et al., 2008; http://r2.amc.nl/]. Die nachfolgende Validierung der LSD1-Expression auf Proteinebene erfolgte an Paraffinschnitten eines Tissue Microarrays bestehend aus 70 primären Medulloblastomen sowie 10 Schnitten physiologischer Kleinhirne. In der Mehrzahl der Medulloblastome (ca. 90%) zeigte sich eine deutliche Überexpression von LSD1 im Vergleich zu physiologischem Kleinhirngewebe. Dieses Resultat stimmt auch mit der von unserer und anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Beobachtung überein, dass die LSD1-Expression invers mit der Zelldifferenzierung korreliert, da Medulloblastome vorwiegend aus undifferenzierten Zellen bestehen (Schulte et al., 2009; Kahl et al., 2006). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konnten bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Arbeiten von Wang und Kollegen zur Entwicklung der Hypophyse lassen jedoch darauf schließen, dass die Aktivierung oder Hemmung von Zielgenen primär davon abhängt, ob ein LSD1 enthaltender Komplex zusätzlich mit bestimmten Komponenten, sogenannten Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, ausgestattet ist (Wang et al., 2007). Während LSD1 so zu einem späten Zeitpunkt in der physiologischen Entwicklung einer Stammzelle die Gewebespezifität beeinflussen kann, wird zu einem frühen Zeitpunkt, zu dem ähnlich der Situation in aggressiven Tumoren sehr unreife Zellen vorliegen, durch Aktivierung dezidierter genregulatorischer Programme die Differenzierung unterdrückt (Wang et al., 2007). Ein subgruppenspezifischer Vergleich der *LSD1*-Genexpression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den 4 molekularen Gruppen des

Medulloblastoms. Leider standen für die Paraffinschnitte keine entsprechenden Daten zur Verfügung, so dass für primäre Medulloblastome keine differenziertere Aussage zur möglichen Korrelation zwischen LSD1-Proteinmenge und Zugehörigkeit zu molekularen Subgruppen ist. Somit konnte auch nicht geklärt werden, ob die 7 Präparate ohne messbare LSD1-Expression zu einer bestimmten Subgruppe gehören. Des Weiteren waren keine klinischen Patientendaten zu den Tumoren der Genexpressionsanalysen und jenen des Tissue Micrarrays verfügbar, so dass eine Korrelation der LSD1-Expression mit dem Überleben der Patienten oder anderen Parametern nicht möglich war. In dieser Arbeit konnte daher nicht weiter analysiert werden, inwieweit LSD1-Expression im Medulloblastom prognostisch relevant ist.

Das zur Kontrolle sowohl für die Expressionsanalysen auf mRNA- als auch auf Proteinebene verwendete Gewebe stammte von adulten Kleinhirnen. Da die vier beschriebenen molekularen Subtypen des Medulloblastoms von verschiedenen Ursprungszellen ausgehen, müssten die Expressionsdaten jeweils auf die LSD1-Expression in diesen nicht entarteten Ursprungszellen bezogen werden. Bisher können allerdings nur die Vorläuferzellen der Shh-Subgruppe, die GNCPs, aus dem Kleinhirn 7 Tage alter Mäuse isoliert werden. Der mehrschrittige Isolationsvorgang der GNCPs konnte im Rahmen dieser Arbeit in unserem Labor erfolgreich etabliert werden. Für die übrigen potenziellen Vorläuferzellen, wie zum Beispiel die GABAergen Zellen der Germinalzone, aus denen mutmaßlich der WNT-Subtyp hervorgeht, konnte bisher keine routinemäßig anwendbare Isolationstechnik entwickelt werden. Da 1) die aus dem Kleinhirn der Maus isolierten Zellen nur zur Kontrolle von Effekten in murinen Zellen genutzt werden können, 2) die entsprechenden Vorläuferzellen bisher noch nicht für alle Subtypen des Medulloblastoms sicher identifiziert werden konnten und 3) bekannte Vorläuferzellen wie die GNCPs weder aus physiologischem menschlichen Kleinhirngewebe noch aus Tumormaterial isoliert werden können, erschien Kleinhirngewebe bestehend aus einem Kollektiv verschiedener Zellen des Kleinhirns als bestmögliche Kontrolle für die in dieser Arbeit durchgeführten Gen- und Proteinexpressionsanalysen.

Um die Bedeutung der LSD1-Expression für das Medulloblastom näher zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt die Expression der LSD1-Demethylase in verschiedenen Zelllinien des Medulloblastoms analysiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien stammen, wie die meisten Tumorzelllinien, von aggressiven Tumoren und übereinstimmend mit von Neuroblastommodellen stammenden Daten

zeigte sich auch in diesen unreifen und undifferenzierten Medulloblastomzellen eine hohe Expression von LSD1 (Schulte et al., 2009). Im Laufe intensiver molekularer Charakterisierung von Primärtumoren und von diesen abgeleiteten Zelllinien in Hinblick auf Kopienzahl chromosomaler Regionen, Mutationen und mRNA-Expression wird zunehmend deutlich, dass sich insbesondere viele seit langer Zeit etablierte Zelllinien weit vom ursprünglichen Primarius entfernt haben (Domcke et al., 2013). Das zeigen auch neuere auf DNA Methylierung-basierende Ergebnisse (Brabetz et al., 2018). Während die in dieser Arbeit eingesetzte Zelllinie HD-MB3, die vergleichsweise neu etabliert wurde, mit einem Isochromosom 17 sowie einer *MYC*-Amplifikation molekular den Tumoren der Gruppe 3 sehr ähnlich ist, werden die Zelllinien DAOY, ONS-76, UW-228 und D-458 teilweise seit Jahrzehnten und in hohen Passagen verwendet (Milde et al., 2012). Im Rahmen von vergleichenden Genexpressionsanalysen unter Verwendung von molekular gut charakterisierten Medulloblastomproben konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zelllinien DAOY, ONS-76 und UW-228 ein ähnliches Expressionsprofil aufweisen wie Tumoren der Shh-Gruppe (Triscott et al., 2013). Im DAOY-Modell scheint zudem der Shh-Signalweg weiterhin zumindest responsiv zu sein, da die Inkubation der Zellen mit Agonisten von Shh oder Smoothened zu einer Überexpression des GLI1 Proteins führt (Götschel et al., 2013). Aufgrund ihres zuverlässigen Wachstumsverhaltens *in vitro* und einer zumindest näherungsweise bestehenden Surrogatfunktion für Shh-Tumoren wurden daher zunächst DAOY und ONS-76 Zellen für weitere *in vitro* Analysen ausgewählt. Diese Zelllinien unterscheiden sich zudem bezüglich des Mutationsstatus des *TP53* Gens, so dass bei Verwendung beider Zelllinien angenommen werden konnte, mögliche Hinweise auf *TP53*-abhängige Effekte von LSD1 zu erhalten (s. Abschnitt 2.1.10).

In Vorbereitung auf spätere *in vivo*-Experimente, die nicht mehr Teil dieser Arbeit waren, wurde in einem weiteren Schritt die LSD1-Expression in murinen Medulloblastomen untersucht, die spontan in genetisch modifizierten Mausmodellen, den $Ptch^{+/-}$- und SMO-Mäusen, auftreten. In allen untersuchten Tumoren aus beiden transgenen Mausvarianten der Shh-Subgruppe zeigt sich eine deutliche Überexpression von LSD1 in Vergleich zu murinem Kleinhirn. Diese Subtyp-übergreifende LSD1-Überexpression in medulloblastischen Tumoren legt nahe, dass die LSD1 tatsächlich grundlegende Bedeutung für die Entstehung und/oder Progression von Medulloblastomen hat (Johnson et al., 2010). Zwar reflektieren

transgene Mausmodelle mit aktivierenden Mutationen des Shh-Signalweges nur annähernd 25% der humanen Medulloblastome (Uziel et al., 2005; Northcott et al., 2017), doch zeigte die Reanalyse der humanen Genexpressionsdaten ähnlich erhöhte LSD1-mRNA Level in allen Subgruppen des Medulloblastoms. Daraus ließe sich eine funktionelle Rolle von LSD1 in allen Subtypen vermuten, so dass Shh-getriebene Mausmodelle generell für zukünftige präklinische *in vivo*-Analysen der LSD1-Inhibition im Medulloblastom geeignet scheinen.

4.2 Untersuchung des LSD1-knockdown Phänotyps von Medulloblastomzellen

Die im Vergleich zum Normalgewebe deutlich erhöhte LSD1-Expression in allen Subgruppen des Medulloblastoms, Beobachtungen in anderen Entitäten sowie Erkenntnisse aus der Entwicklung pluripotenter Stammzellen führte zu der Hypothese, dass die LSD1-Demethylase grundlegenden Einfluss auf den Phänotyp der Medulloblastomzellen nimmt.

4.2.1 Viabilität und Proliferation

Die funktionelle Bedeutung von LSD1 sollte daher im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von *in vitro* Experimenten näher untersucht werden. Zunächst wurde hierzu mittels der siRNA-Technologie die *LSD1*-Expression in DAOY und ONS-76 Zellen reduziert. Nachdem unter Variierung der experimentellen Bedingungen zuverlässig eine transiente Reduktion der *LSD1*-Expression auf circa 20 Prozent erreicht worden war, wurden zunächst deren Auswirkungen auf die allgemeine zelluläre Integrität und Viabilität analysiert. Nach Feststellung einer signifikanten Reduktion der Viabilität bei niedriger *LSD1*-Expression wurde als nächstes das Wachstumsverhalten der Medulloblastomzellen in Abhängigkeit von LSD1 untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation von Zellen mit herunterregulierter *LSD1*-Expression im Vergleich zu Zellen mit erhöhten *LSD1*-Expressionsleveln. Ähnliche Ergebnisse zeigen eine Arbeit von Lee und Kollegen, die Medulloblastome der Gruppe 3 näher untersucht haben. Sie identifizierten in dieser Subgruppe eine Überexpression von *Gfi1* als wichtigen Faktor für die Tumorentstehung. Gfi1 interagiert unter anderem mit LSD1. Eine Inhibition von *LSD1 in vivo* und *in vitro* führte ebenfalls zu einer Abnahme der Proliferation (Lee et al., 2019). Arbeiten zum Pankreaskarzinom legen nahe, dass ein synergistischer Effekt von LSD1 mit dem Hypoxia inducible factor-1α (HIF1α) zur Verstärkung metabolischer Prozesse insbesondere der Glykolyse führt

und auf diese Weise zu einer unkontrollierten Proliferation beiträgt (Qin et al., 2014). Im Prostatagewebe binden sowohl die SWIRM als auch die c-terminale Aminoxidase-Domäne von LSD1 an die Liganden-Bindungsstelle des Androgen-Rezeptors (Metzger et al., 2005). Mittels dieses Mechanismus übernimmt LSD1 sowohl die Kontrolle über die Androgen-abhängige Genexpression als auch über den Prozess der Zellproliferation und kann so bei Überexpression das Zellwachstum von Prostatakarzinomzellen beeinflussen (Willmann et al., 2012). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass LSD1 auch in einem anderen Hormon abhängigen Malignom, dem Mammakarzinom, die Östrogen-regulierte Genexpression über Interaktion mit dem Östrogenrezeptor (ER) zu regulieren scheint (Pollock et al., 2012). Deutlicher wird in dieser Entität jedoch eine übergeordnete Rolle von LSD1 für die Proliferation, da nach Inhibition mittels siRNA sowie unter Einsatz von LSD1-Inhibitoren eine Abnahme des Zellwachstums beobachtet werden konnte, die unabhängig vom Östrogenrezeptor-Status der untersuchten Zellen war. Hinweise zur LSD1-gesteuerten Proliferation finden sich auch in zahlreichen anderen Malignomen, die, wie das Medulloblastom, ebenfalls nicht in Abhängigkeit von Hormonrezeptorinteraktionen proliferieren. Hayami und Kollegen konnten in zahlreichen Zelllinien von Lungen- und Blasenkarzinomen zeigen, dass einer Reduktion der LSD1-Expression eine Abnahme der Proliferationsrate dieser Zellen folgt (Hayami et al., 2011). Ergänzend wurden Versuche mit Fibroblasten durchgeführt, bei denen es im umgekehrten Experiment durch exogene LSD1-Expression zu einer Progression des Zellzyklus kam. Massenspektrometrische Analysen zur Proteininteraktion mit LSD1 identifizierten MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) als Substrat der Demethylase LSD1 (Cho et al., 2011). MYPT1 reguliert die Phosphorylierung des als Tumorsuppressor wirkenden Retinoblastomproteins (RB1), die durch Demethylierung von MYPT1 zunimmt. In der der genannten Studie führte die LSD1-Hemmung über Zunahme der *MYPT1*-Expression sowie des Methylierungsstatus des Proteins zu einer Abnahme der RB1-Phosphorylierung und in der Folge zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors E2F. Dieser wiederum ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und beeinflusst die G1/S-Transition (Chen et al., 2009). Da Mutationen im Tumorsuppressorgen *RB1* selbst nur selten in Medulloblastomen auftreten, könnte die LSD1 vermittelte RB1-Phosphorylierung einen alternativen Mechanismus zur Störung der Zellzyklusregulation in dieser Entität darstellen (Uziel et al., 2006). Diese Hypothese bleibt jedoch in weitergehenden

Untersuchungen zu klären.

4.2.2 Apoptose

Zur Überprüfung der Wirkung von LSD1 auf das Proliferationsverhalten der Zellen wurde ein BrdU-Test eingesetzt. Das chemische Analogon des Nukleosids Thymidin, BrdU, wird von vitalen Zellen aufgenommen und während der S-Phase des Zellzyklus in phosphorylierter Form in die neu synthetisierte DNA als Markierung eingebaut. Hieraus folgt, dass mit Hilfe dieser Technik nur der Anteil im Wachstum befindlicher Zellen detektiert werden und keine Aussage über die übrige Zellpopulation getroffen werden kann. In einem weiteren Schritt sollte daher geklärt werden, ob die beobachtete Abnahme der Proliferation alleinig durch eine Wachstumshemmung erklärt werden kann oder ob auch apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen. Mittels eines *Cell Death Detection* ELISA wurden mit siRNA gegen *LSD1* transfizierte ONS-76 sowie DAOY Zellen im Vergleich zu nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen untersucht. In Medulloblastomzellen mit einem *knockdown* von LSD1 zeigte sich eine signifikante Zunahme der Apoptoserate. Jin und Kollegen beschreiben unter Verwendung der Kolonkarzinomzelllinie HCT116, in denen ein homozygoter LSD1-knockout (LSD1-/-) durchgeführt wurde, ebenfalls eine Abnahme der Proliferation (Jin et al., 2013), was in Abschnitt 3.6 auch für die transient transfizierten Medulloblastomzellen gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten sie jedoch im Vergleich zur Kontrolle (LSD1+/+) keine Zunahme der Apoptoserate feststellen. Eine kompensatorische Erhöhung der p21-Expression wird in ihrer Studie daher als partielle Wiederherstellung der Zellzykluskontrolle und als Ursache der abnehmenden Proliferation postuliert (Jin et al., 2013). Daten aus einer Studie zur Rolle von LSD1 in Gliomen zeigen ebenfalls eine Abnahme der Proliferation nach siRNA-vermittelter Herunterregulation der LSD1-Demethylase sowie nach pharmakologischer Hemmung mit den Substanzen Pargyline oder NCL-1 (Sareddy et al., 2013). Durch Sareddy und Kollegen wurden Zellen der Glioblastomzelllinie U87, die eine Überexpression von LSD1 aufweisen, in die Flanke von NOD/SCID-Mäusen injiziert und eine pharmakologische LSD1-Inhibition mit Pargyline durchgeführt. Die histologische Aufarbeitung ergab wie erwartet eine Abnahme des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie klare Hinweise auf apoptotische Vorgänge als primäre Ursache der Proliferationsreduktion. Interessanterweise belegen die ebenfalls im Rahmen der genannten Studie durchgeführten *in vitro*-Versuche im

Anschluss an die LSD1-Hemmung eine Re-Expression der *TP53* Zielgene *CDKN1A* (welches für *p21* kodiert) sowie *BBC3*, welches für das pro-apoptotische Protein PUMA kodiert. Im Neuroblastom konnten Althoff und Kollegen unter Verwendung eines Reportersystems eine direkte Interaktion zwischen der im Neuroblastom supprimierten microRNA-137 und dem 3‘-UTR des für LSD1 kodierenden Gens nachweisen (Althoff et al., 2013). Durch gezielte Re-Expression der microRNA-137 konnte in ihren Experimenten eine Abnahme der LSD1-Expression erreicht werden, die wiederum als zellbiologischen Effekt ebenfalls das Einsetzen der Apoptose zur Folge hatte. Um nähere Erkenntnisse über Moleküle zu erhalten, die bedingt durch eine erhöhte LSD1-Expression zur Umgehung der Apoptose im Medulloblastom führen, wurden in weiteren Untersuchungen dieser Arbeit LSD1-Zielgene identifiziert. Ein interessantes und vielversprechendes Kandidatengen, *BMP2*, wird nachfolgend in 4.3 diskutiert.

4.2.3 Migration

Neben rasantem Zellwachstum zeigen Medulloblastome auch eine starke Tendenz zur Metastasierung. Das Auftreten von Metastasen stellt einen entscheidenden Faktor in der Risikostratifizierung dar und geht mit einer ungünstigen Prognose einher (Kleihues et al., 2002; Zeltzer et al., 1999). Die grundlegende Voraussetzung, um den Primärtumor zu verlassen und in andere Bereiche innerhalb des zentralen Nervensystems oder – in seltenen Fällen - darüber hinaus vorzudringen, ist die Entwicklung von migratorischen Fähigkeiten der Tumorzellen. Das Ausmaß, mit dem Zellen ihre ursprüngliche Lokalisation verlassen, um in andere Kompartimente zu wandern, kann mit Hilfe der Boyden-Kammer untersucht werden. In dieser Arbeit sollte die Fähigkeit von ONS-76 und DAOY Medulloblastomzellen mit siRNA-vermittelter Reduktion der LSD1-Mengen im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen analysiert werden, eine Membran mit 8µM messenden Poren durch Zellmigration zu überwinden. Eine signifikante Abnahme der Migrationsfähigkeit konnte als weitere Eigenschaft eines LSD1-*knockdowns* in den siLSD1-transfizierten Zellen detektiert werden. Diese Erkenntnisse werden durch eine von Serce und Kollegen veröffentlichte Arbeit unterstützt, die eine graduelle Zunahme der LSD1-Expression im Rahmen der Entwicklung vom präinvasiven zum migratorisch aktiven, invasiven Mammakarzinom beschreibt (Serce et al., 2012). Neben statistischen Expressionsanalysen wurden allerdings in der genannten Studie keine weiteren funktionellen Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Invasion von gesundem Gewebe durch die malignen Zellen

und dem LSD1-Expressionsstatus durchgeführt.

4.3 *BMP2* als mögliches Zielgen von LSD1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach einem *LSD1-knockdown* in Medulloblastom-Zelllinien zu einer Hochregulation von *BMP2* kommt. Übereinstimmend damit berichten Adamo und Kollegen über eine starke Korrelation zwischen dem Abbau von LSD1 und der Induktion der BMP2-Expression in undifferenzierten embryonalen Zellen (Adamo et al., 2011). In Myelomzellen konnte gezeigt werden, dass BMP2 Apoptose induziert (Kawamura et al., 2000). Hallahan und Kollegen konnten in Medullobalstomzellen eine Induktion der Apoptose nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 und im Anschluss einer Retinoidbehandlung mit einhergehender erhöhter BMP2-Expression zeigen. Diese BMP2-vermittelte Apoptose war jedoch nur in Medulloblastomzellen nachweisbar, die auf Retinoide ansprechen, sodass dieser Wirkungsmechanismus in einer Vielzahl von Medulloblastomzelllinien, einschließlich DAOY, unwahrscheinlich ist (Hallahan et al., 2003).

Basierend auf den Daten aus dieser Arbeit, die zeigen, dass Apoptose auch in DAOY-Zellen nach LSD1 knockdown induziert wird, postulieren wir, dass die potentiell pro-apoptotische Funktion von BMP2 unabhängig vom Ansprechen auf Retinoide ist und durch Inhibition von LSD1 induziert werden kann. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen molekularen Mechanismus zu klären, der die LSD1-abhängige BMP2-Regulation bewirkt und um zu zeigen, dass die pro-apoptotische Wirkung des BMP2 kausal für die Effekte der reduzierten LSD1-Expression verantwortlich sind. Die hier gezeigten Daten implizieren jedoch, dass einige Effekte einer hohen LSD1-Expression durch das Herunterregulieren des BMP2-Signalweges vermittelt werden können.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung von BMP2 zu einem Zellzyklus-Arrest, Apoptose oder Differenzierung von GNPCs führt, welche die wahrscheinlichen Ursprungszellen der Medulloblastome der Shh-Gruppe darstellen (Rios et al., 2004; Gilbertson und Ellison 2008). Der BMP2-Signalweg wird durch Phosphorylierung von SMAD5 eingeleitet und aktiviert KLF10. Dies führt zur Inhibierung von MYCN durch eine Induktion von ID1/2 und nachfolgender Herunterregulierung von ATOH-1 (Alvarez-Rodrigues et al., 2007; Zhao et al., 2008). Eine Reanalyse der Daten von Northcott und Kollegen (Northcott et al., 2011) mittels

der R2-Datenbank zeigten, dass BMP2 in allen Untergruppen des Medulloblastoms schwach exprimiert wird. In Medulloblastomen der Shh-Gruppe ließ sich jedoch die niedrigste Expression nachweisen. Tumore dieser Gruppe könnten daher durch die niedrige BMP2-Expression apoptotischen Signalen entkommen oder einen undifferenzierten Phänotyp behalten. Die jedoch am häufigsten genutzten Medulloblastomzelllinien, wie auch in dieser Arbeit, sind zum einen unabhängig von der Aktivierung des Shh-Signalweges (siehe 2.1.10) und zum anderen führt ein knockdown von *LSD1* zu keiner signifikanten Änderung der Expression von Genen des Shh-Signalweges. Daher gehen wir davon aus, dass die Hochregulation von BMP2 durch einen knockdown von *LSD1* eine Induktion der Apoptose unabhängig vom Shh-Signalweg bewirkt.

4.4 Therapeutischer Einsatz vom *small molecule* Inhibitoren gegen LSD1

Obwohl MAOI wie Tranylcypromin *in vitro* sehr wirksam sind und das Wachstum von Neuroblastom Xenotransplantat-Tumoren bei Mäusen signifikant reduzieren, ist aufgrund der fehlenden Spezifität für LSD1 eine Behandlung mit hohen Dosen notwendig, die bereits in Tierversuchen zu massiven Nebenwirkungen führt (Schulte et al., 2009). Daher erscheint es unwahrscheinlich das MAOI als therapeutische Substanzklasse für die LSD1-Inhibition in den klinischen Einsatz kommen. Die präklinischen *in-vitro* Untersuchungen des hochspezifischen niedermolekularen Inhibitors NCL-1 zeigten bei aggressiven Gliomen vielversprechende Ergebnisse (Sareddy et al., 2013). Unsere Daten zeigen in Übereinstimmung, dass eine Hemmung von LSD1 mit einem MAOI oder aber auch mittels des spezifischen Inhibitors NCL-1 zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität in Medulloblastomzelllinien führt. In Bezug auf mögliche Nebenwirkungen einer spezifischen systemischen pharmakologischen Hemmung von LSD1, konnte in unserem Labor in einem LSD1 knockout Mausmodell eine transiente, aber signifikante Unterdrückung von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zeigen (Sprüssel et al., 2012).

Es ist bekannt, dass es bei Krebstherapien durch Hemmung der Angiogenese, Blockierung antiapoptotischer Proteine oder Hemmung tumorspezifischer Rezeptortyrosinkinasen häufig zur Entwicklung von Resistenzmechanismen im Laufe der Tumorprogression kommt. Diesem Problem der Resistenzentwicklung gegenüber gezielten Therapien muss mit Entwicklung multimodaler Kombination aus gezielten

Therapieansätzen begegnet werden (Huang et al., 2011; Shimizu et al., 2010). Bei Medulloblastomen könnte eine Kombination von Histondemethylase- und Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC) nützlich sein, um die Entwicklung einer Resistenz zu verhindern und eine maximale Wirkung zu erzielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von LSD1 und der Einsatz von HDAC synergistische Effekte hat, insbesondere bei Glioblastomen (Singh et al., 2011; Lee et al., 2006).

Die wichtige Rolle vom LSD1 bei Prostata- und Brustkrebs spricht für die oben genannte Durchführung klinischer Phase-I- und Phase-II-Studien mit LSD1-Inhibitoren in Kombination mit weiteren epigenetischen Therapien bei Erwachsenen. Dies könnte auch neue Therapieoptionen für die Behandlung pädiatrischer embryonaler Tumore, einschließlich Medulloblastomen, eröffnen.

5 Zusammenfassung

Das Medulloblastom gehört zur den häufigsten intrakranielle Tumorentität des Kindesalters. Diese Arbeit liefert den ersten Nachweis, dass die Lysin-spezifischen Histon-Demethylase 1 (LSD1) funktionell an der Regulation des malignen Phänotyps von Medulloblastomzellen beteiligt ist, indem sie drei Hauptmerkmale von Krebszellen beeinflusst:

Hohe *LSD1*-Expressionlevel tragen erstens zu einer unkontrollierten Zellproliferation bei. Mittels small interfering Ribonukleinsäure (siRNA) -Technologie konnte eine transiente Reduktion der *LSD1*-Expression in DAOY und ONS-76 Zellen auf ca. 20% erzielt werden. Im Anschluss wurde das Wachstumsverhalten der Medulloblastomzellen in Abhängigkeit von LSD1 untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation von Zellen mit herunterregulierter *LSD1*-Expression im Vergleich zu Zellen mit erhöhten *LSD1*-Expressionsleveln. Ebenso führte die Behandlung von Medulloblastomzellen mit einem spezifischen niedermolekularen LSD1-Inhibitor, NCL-1, in vitro zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Somit konnte in zwei komplementären Ansätzen die Bedeutung von LSD1 für Proliferation und Überleben von Medulloblastomzellen nachgewiesen werden. Um zu klären, ob die beobachtete Abnahme der Proliferation alleinig durch eine Wachstumshemmung erklärt werden kann oder ob auch apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen, wurde die Apoptose von siLSD1 transfizierten ONS-76 sowie DAOY Zellen im Vergleich zu nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen gemessen. In Medulloblastomzellen mit einem *knockdown* von LSD1 zeigte sich eine signifikante Zunahme der Apoptoserate. Hohe LSD1-Expressionslevel haben somit zweitens eine verminderte Apoptoserate zufolge. Drittens führt eine hohe *LSD1*-Expression zu einer stärkeren Migration. Für die Prognose des Medulloblastoms ist das Auftreten von Metastasen von entscheidender Bedeutung. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Migrationsfähigkeit, einer wesentlichen Voraussetzung für Metastasierung, in mit siLSD1 transfizierten Zellen. Ribonukleinsäure-Profile von Zellen mit herunterregulierter *LSD1*-Expression zeigten eine gegenläufige Expression von Bone morphogentic protein 2 (BMP2), welches in cerebellären Vorläuferzellen Differenzierung fördert und Proliferation hemmt. Zusammenfassend legen die aus dieser Arbeit resultierenden Daten eine erste präklinische Grundlage für die zukünftige Bewertung von LSD1-inhibierenden Therapieansätzen gegen Medulloblastome.

6 Literaturverzeichnis

1. Adamo, A., Barrero, M.J., Izpisua Belmonte, J.C. (2011): „LSD1 and pluripotency: a new player in the network.“ Cell Cycle 10(19):3215-6
2. Alder, J., Lee, K.J., Jessell, T.M., Hatten, M.E. (1999): „Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells.“ Nat Neurosci. 2(6):535-40
3. Althoff, K., Beckers, A., Odersky, A., Mestdagh, P., Köster, J., Bray, I.M., Bryan, K., Vandesompele, J., Speleman, F., Stallings, R.L., Schramm, A., Eggert, A., Sprüssel, A., Schulte, J.H. (2013): „MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A.“ Int J Cancer 133(5):1064-73
4. Alvarez-Rodríguez, R., Barzi. M., Berenguer, J., Pons, S. (2007): „Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc.“ J Biol Chem. 282(51):37170-80
5. Bailey, P., Cushing, H. (1925): „Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors.“ Proc Natl Acad Sci U S A. 11(1):82-4
6. Baryawno, N., Sveinbjörnsson, B., Kogner, P., Johnsen, J.I. (2010): „Medulloblastoma: a disease with disorganized developmental signaling cascades.“ Cell Cycle. 9(13):2548-54
7. Begemann, M., Waszak, S.M.,, Robinson, G.W., Jäger, N., Sharma, T., Knopp, C., Kraft, F., Moser, O., Mynarek, M., Guerrini-Rousseau, L., Brugieres, L., Varlet, P., Pietsch, T., Bowers, D.C., Chintagumpala, M., Sahm, F., Korbel, J.O., Rutkowski, S., Eggermann, T., Gajjar, A., Northcott, P., Elbracht, M., Pfister, S.M., Kontny, U., Kurth, I. (2020): „Germline *GPR161* Mutations Predispose to Pediatric Medulloblastoma.” J Clin Oncol 38(1):43-50
8. Behesti, H., Marino, S. (2009): „Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis.“ Int J Biochem Cell Biol. 41(3):435-45
9. Biegel, J.A., Rorke, L.B., Emanuel, B.S. (1989). „Monosomy 22 in rhabdoid or atypical teratoid tumors of the brain.“ N Engl J Med. 321(13):906
10. Bourdeaut, F., Miquel, C., Alapetite, C., Roujeau, T., Doz, F. (2011): „Medulloblastomas: update on a heterogeneous disease.“ Curr Opin Oncol. 23(6):630-7

11. Brabetz, S., Leary, S.E.S., Gröbner, S.N., Nakamoto, M.W., Şeker-Cin, H., Girard, E.J., Cole, B., Strand, A.D., Bloom, K.L., Hovestadt, V., Mack, N.L., Pakiam, F., Schwalm, B., Korshunov, A., Balasubramanian, G.P., Northcott, P.A., Pedro, K.D., Dey, J., Hansen, S., Ditzler, S., Lichter, P., Chavez, L., Jones, D.T.W., Koster, J., Pfister, S.M., Kool, M., Olson, J.M. (2018): "A biobank of patient-derived pediatric brain tumor models." Nat Med 24(11):1752-1761
12. Brugières, L., Pierron, G., Chompret, A., Paillerets, B.B., Di Rocco, F., Varlet, P., Pierre-Kahn, A., Caron, O., Grill, J., Delattre, O. (2010): „Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations." J Med Genet. 47(2):142-4
13. Butts, T., Green, M.J., Wingate, R.J. (2014): „Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'." Development. 141(21):4031-41
14. Capper, D., Jones, D.T.W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D.E., Kratz, A., Wefers, A.K., Huang, K., Pajtler, K.W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N.W., Lindenberg, K., Harter, P.N., Braczynski, A.K., Plate, K.H., Dohmen, H., Garvalov, B.K., Coras, R., Hölsken, A., Hewer, E., Bewerunge-Hudler, M., Schick, M., Fischer, R., Beschorner, R., Schittenhelm, J., Staszewski, O., Wani, K., Varlet, P., Pages, M., Temming, P., Lohmann, D., Selt, F., Witt, H., Milde, T., Witt, O., Aronica, E., Giangaspero, F., Rushing, E., Scheurlen, W., Geisenberger, C., Rodriguez, F.J., Becker, A., Preusser, M., Haberler, C., Bjerkvig, R., Cryan, J., Farrell, M., Deckert, M., Hench, J., Frank, S., Serrano, J., Kannan, K., Tsirigos, A., Brück, W., Hofer, S., Brehmer, S., Seiz-Rosenhagen, M., Hänggi, D., Hans, V., Rozsnoki, S., Hansford, J.R., Kohlhof, P., Kristensen, B.W., Lechner, M., Lopes, B., Mawrin, C., Ketter, R., Kulozik, A., Khatib, Z., Heppner, F., Koch, A., Jouvet, A., Keohane, C., Mühleisen, H., Mueller, W., Pohl, U., Prinz, M., Benner, A., Zapatka, M., Gottardo, .NG., Driever, P.H., Kramm, C.M., Müller, H.L., Rutkowski, S., von Hoff, K., Frühwald, M.C., Gnekow, A., Fleischhack, G., Tippelt, S., Calaminus, G., Monoranu, C.M., Perry, A., Jones, C., Jacques, T.S., Radlwimmer, B., Gessi, M., Pietsch, T., Schramm, J., Schackert, G., Westphal, M., Reifenberger, G., Wesseling, P., Weller, M., Collins, V.P., Blümcke, I., Bendszus, M., Debus, J., Huang, A., Jabado, N., Northcott, P.A., Paulus, W., Gajjar, A., Robinson, G.W., Taylor, M.D., Jaunmuktane, Z., Ryzhova, M., Platten, M., Unterberg, A., Wick, W.,

Karajannis, M.A., Mittelbronn, M., Acker, T., Hartmann, C., Aldape, K., Schüller, U., Buslei, R., Lichter, P., Kool, M., Herold-Mende, C., Ellison, D.W., Hasselblatt, M., Snuder, I.M., Brandner, S., Korshunov, A., von Deimling, A., Pfister, S.M. (2018): “DNA methylation-based classification of central nervous system tumours.” Nature 555(7697): 469–474

15. Cavalli, F.M.G., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D.J.H., Luu, B., Garzia, L., Torchia, J., Nor, C., Morrissy, A.S., Agnihotri, S., Thompson, Y.Y., Kuzan-Fischer, C.M., Farooq, H., Isaev, K., Daniels, C., Cho, B.K., Kim, S.K., Wang, K.C., Lee, J.Y., Grajkowska, W.A., Perek-Polnik, M., Vasiljevic, A., Faure-Conter, C., Jouvet, A., Giannini, C., Nageswara Rao, A.A., Li, K.K.W., Ng, H.K., Eberhart, C.G., Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Gillespie, G.Y., Olson, J.M., Leary, S., Weiss, W.A., Lach, B., Chambless, L.B., Thompson, R.C., Cooper, M.K., Vibhakar, R., Hauser, P., van Veelen, M.C., Kros, J.M., French, P.J., Ra, Y.S., Kumabe, T., López-Aguilar, E., Zitterbart, K., Sterba, J., Finocchiaro, G., Massimino, M., Van Meir, E.G., Osuka, S., Shofuda, T., Klekner, A., Zollo, M., Leonard, J.R., Rubin, J.B., Jabado, N., Albrecht, S., Mora, J., Van Meter, T.E., Jung, S., Moore, A.S., Hallahan, A.R., Chan, J.A., Tirapelli, D.P.C., Carlotti, C.G., Fouladi, M., Pimentel, J., Faria, C.C., Saad, A.G., Massimi, L., Liau, L.M., Wheeler, H., Nakamura, H., Elbabaa, S.K., Perezpeña-Diazconti, M., Chico Ponce de León, F., Robinson, S., Zapotocky, M., Lassaletta, A., Huang, A., Hawkins, C.E., Tabori, U., Bouffet, E., Bartels, U., Dirks, P.B., Rutka, J.T., Bader, G.D., Reimand, J., Goldenberg, A., Ramaswamy, V., Taylor, M.D. (2017): “Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups.” Cancer Cell 31(6):737-754
16. Chan, A.W., Tarbell, N.J., Black, P.M., Louis, D.N., Frosch, M.P., Ancukiewicz, M., Chapman, P., Loeffler, J,S. (2000): „Adult medulloblastoma: prognostic factors and patterns of relapse.“ Neurosurgery 47(3):623-31
17. Chang, C.H., Housepian, E.M., Herbert, C. Jr. (1969): „An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas.“ Radiology. 93(6):1351-9
18. Chen, H.Z., Tsai, S.Y., Leone, G.B. (2009): „Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control.“ Nat Rev Cancer 9(11):785-97
19. Chen, Q.R., Bilke, S., Wei, J.S., Greer, B.T., Steinberg, S.M., Westermann, F., Schwab, M., Khan, J. (2006): „Increased WSB1 copy number correlates with its

over-expression which associates with increased survival in neuroblastoma.“ Genes Chromosomes Cancer 45(9):856-62

20. Cheung N.-K.V., Cohn, S.L. (2005): „Neuroblastoma“, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, S.4
21. Cho, H.S., Suzuki, T., Dohmae, N., Hayami, S., Unoki, M., Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Takawa, M., Chen, T., Kurash, J.K., Field, H.I., Ponder, B.A., Nakamura, Y., Hamamoto, R. (2011): „Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells.“ Cancer Res. 71(3):655-60
22. Cho, Y.J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C.G., Lau, C.C., Olson, J.M., Gilbertson, R.J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J.P., Pomeroy, S.L. (2011): „Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome.“ J Clin Oncol. 29(11):1424-30
23. Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., Helin, K. (2006): „The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3.“ Nature. 442(7100):307-11
24. Dahmane, N., Ruiz i Altaba, A. (1999): „Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum.“ Development. 126(14):3089-100
25. Dawson, M.A., Kouzarides, T. (2012): „Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy.“ Cell 150:12-27
26. Dhall, G. (2009): „Medulloblastoma.“ J Child Neurol. 24(11):1418-30
27. Dietzsch, S., Placzek, F., Pietschmann, K., von Bueren, A.O., Matuschek, C., Glück, A., Guckenberger, M., Budach, V., Welzel, J., Pöttgen, C., Schmidberger, H., Heinzelmann, F., Paulsen, F., Escudero, M.P., Schwarz, R., Hornung, D., Martini, C., Grosu, A.L., Stueben, G., Jablonska, K., Dunst, J., Stranzl-Lawatsch, H., Dieckmann, K., Timmermann, B., Pietsch, T., Warmuth-Metz, M., Bison, B., Kwiecien, R., Benesch, M., Gerber, N.U., Grotzer, M.A., Pfister, S.M., Clifford, S.C., von Hoff, K., Klagges, S., Rutkowski, S., Kortmann, R.D., Mynarek, M. (2020): „Evaluation of Prognostic Factors and Role of Participation in a Randomized Trial or a Prospective Registry in Pediatric and Adolescent Nonmetastatic Medulloblastoma - A Report From the HIT 2000 Trial.” Adv Radiat Oncol 5(6):1158-1169

28. Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C., Schultz, N. (2013): „Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles.“ Nat Commun. 4:2126
29. Duffner, P.K., Horowitz, M.E., Krischer, J.P., Friedman, H.S., Burger, P.C., Cohen, M.E., Sanford, R.A., Mulhern, R.K., James, H.E., Freeman, C.R. (1993): „Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors.“ N Engl J Med. 328(24):1725-31
30. Ellison, D. (2002): „Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics.“ Neuropathol Appl Neurobiol. 28(4):257-82
31. Ellison, D.W. (2010): „Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease.“ Acta Neuropathol. 120(3):305-16
32. Friedman, D.L., Whitton, J., Leisenring, W., Mertens, A.C., Hammond, S., Stovall, M., Donaldson, S.S., Meadows, A.T., Robison, L.L., Neglia, J.P. (2010): „Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study.“ J Natl Cancer Inst. 102(14):1083-95
33. Gajjar, A., Chintagumpala, M., Ashley, D., Kellie, S., Kun, L.E., Merchant, T.E., Woo, S., Wheeler, G., Ahern, V., Krasin, M.J., Fouladi, M., Broniscer, A., Krance, R., Hale, G.A., Stewart, C.F., Dauser, R., Sanford, R.A., Fuller, C., Lau, C., Boyett, J.M., Wallace, D., Gilbertson, R.J. (2006): „Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial.“ Lancet Oncol. 7(10):813-20
34. Gajjar, A., Pfister, S.M., Taylor, M.D., Gilbertson, R.J. (2014): „Molecular insights into pediatric brain tumors have the potential to transform therapy.“ Clin Cancer Res. 20(22):5630-40
35. Gajjar, A., Stewart, C.F., Ellison, D.W., Kaste, S., Kun, L.E., Packer, R.J., Goldman, S., Chintagumpala, M., Wallace, D., Takebe, N., Boyett, J.M., Gilbertson, R.J., Curran, T. (2013): „Phase I study of vismodegib in children with recurrent or refractory medulloblastoma: a pediatric brain tumor consortium study.“ Clin Cancer Res. 19(22):6305-12
36. Garrè, M.L., Cama, A., Bagnasco, F., Morana, G., Giangaspero, F., Brisigotti, M., Gambini, C., Forni, M., Rossi, A., Haupt, R., Nozza, P., Barra, S., Piatelli, G., Viglizzo, G., Capra, V., Bruno, W., Pastorino, L., Massimino, M., Tumolo, M.,

Fidani, P., Dallorso, S., Schumacher, R.F., Milanaccio, C., Pietsch, T. (2009): „Medulloblastoma variants: age-dependent occurrence and relation to Gorlin syndrome - a new clinical perspective.“ Clin Cancer Res. 15(7):2463-71

37. Giangaspero, F., Rigobello, Badiali, M., Loda, M., Andreini, L., Basso, G., Zorzi, F., Montaldi, A. (1992): „Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior.“ Am J Surg Pathol. 16(7):687-93
38. Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M.C., Currle, D.S., Eden, C., Kranenburg, T.A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., Finkelstein, D., Pounds, S., Weiss, A., Patay, Z., Scoggins, M., Ogg, R., Pei, Y., Yang, Z.J., Brun, S., Lee, Y., Zindy, F., Lindsey, J.C., Taketo, M.M., Boop, F.A., Sanford, R.A., Gajjar, A., Clifford, S.C., Roussel, M.F., McKinnon, P.J., Gutmann, D.H., Ellison, D.W., Wechsler-Reya, R., Gilbertson, R.J. (2010): „Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins.“ Nature 468(7327):1095-9
39. Gilbertson, R.J., Ellison, D.W. (2008): „The origins of medulloblastoma subtypes.“ Annu Rev Pathol. 3:341-65
40. Gilbertson, R.J., Jaros, E., Perry, R.H., Kelly, P.J., Lunec, J., Pearson, A.D. (1997): „Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma.“ Eur J Cancer. 33(4):609-15
41. Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., Scott, M.P. (1997): „Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants.“ Science 277:1109-1113.
42. Götschel, F., Berg, D., Gruber, W., Bender, C., Eberl, M., Friedel, M., Sonntag, J., Rüngeler, E., Hache, H., Wierling, C., Nietfeld, W., Lehrach, H., Frischauf, A., Schwartz-Albiez, R., Aberger, F., Korf, U. (2013): „Synergism between Hedgehog-GLI and EGFR signaling in Hedgehog-responsive human medulloblastoma cells induces downregulation of canonical Hedgehog-target genes and stabilized expression of GLI1.“ PLoS One. 8(6):e65403
43. Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., Wu, R., Chen, C., Li, X., Zhou, L., He, M., Li, Z., Sun, X., Jia, W., Chen, J., Yang, S., Zhou, F., Zhao, X., Wan, S., Ye, R., Liang, C., Liu, Z., Huang, P., Liu, C., Jiang, H., Wang, Y., Zheng, H., Sun, L,, Liu, X., Jiang, Z., Feng, D., Chen, J., Wu, S., Zou, J., Zhang, Z., Yang, R., Zhao, J., Xu, C., Yin, W., Guan, Z., Ye, J., Zhang, H., Li, J., Kristiansen, K., Nickerson, M.L., Theodorescu, D., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Wang, J., Yang, H., Wang, J., Cai, Z. (2011): „Frequent mutations of chromatin remodeling

genes in transitional cell carcinoma of the bladder.“ Nat Genet. 43(9):875-8

44. Gurney, J.G., van Wijngaarden, E. (1999): „Extremely low frequency electromagnetic fields (EMF) and brain cancer in adults and children: review and comment.“ Neuro Oncol. 1(3):212-20
45. Gutjahr, P. (2004): „Krebs bei Kindern und Jugendlichen“, 5. Auflage, Köln, Deutscher Ärzte-Verlag; Kapitel Chemische Umwelttoxikologie, S 64
46. Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., et al. (2003): „BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect.“ Nat Med. 9(8):1033-8
47. Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Chandraratna, R.A., Ellenbogen, R.G., Geyer, J.R., Overland, R.P., Strand, A.D., Tapscott, S.J., Olson, J.M. (2004): „The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas.“ Cancer Res 64:7794-7800
48. Hamilton, S.R., Liu, B., Parsons, R.E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S.M., Krush, A.J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B., (1995): „The molecular basis of Turcot's syndrome.“ N Engl J Med. 332(13):839-47
49. Harris, W.J., Huang, X., Lynch, J.T., Spencer, G.J., Hitchin, J.R., Li, Y., Ciceri, F., Blaser, J.G., Greystoke, B.F., Jordan, A.M., Miller, C.J., Ogilvie, D.J., Somervaille, T.C. (2012): „The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells.“ Cancer Cell 21(4):473-87
50. Hatten, M.E., Alder, J., Zimmerman, K., Heintz, N. (1997): „Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation.“ Curr Opin Neurobiol. 7(1):40-7
51. Hatten, M.E., Roussel, M.F. (2011): „Development and cancer of the cerebellum.“ Trends Neurosci. 34(3):134-42
52. Hatton, B.A., Villavicencio, E.H., Tsuchiya, K.D., Pritchard, J.I., Ditzler, S., Pullar, B., Hansen, S., Knoblaugh, S.E., Lee, D., Eberhart, C.G., Hallahan, A.R., Olson, J.M. (2008): „The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread.“ Cancer Res 68:1768-1776
53. Hayami, S., Kelly, J.D., Cho, H.S., Yoshimatsu, M., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H.I., Neal, D.E., Yamaue, H., Ponder, B.A., Nakamura, Y., Hamamoto, R. (2011): „Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers.“ Int J Cancer 128(3):574-86

54. He, X.M., Wikstrand, C.J., Friedman, H.S., Bigner, S.H., Pleasure, S., Trojanowski, J.Q., Bigner, D.D. (1991): „Differentiation characteristics of newly established medulloblastoma cell lines (D384 Med, D425 Med, and D458 Med) and their transplantable xenografts.“ Lab Invest. 64(6):833-43
55. Hovestadt, V., Smith, K. S., Bihannic, L., Filbin, M.G., Shaw, M.L., Baumgartner, A., DeWitt, J.C., Groves, A., Mayr, L., Weisman, H.R., Richman, A.R., Shore, M.E., Goumnerova, L., Rosencrance, C., Carter, R.A., Phoenix, T.N., Hadley, J.L., Tong, Y., Houston, J., Ashmun, R.A., DeCuypere, M., Sharma, T., Flasch, D., Silkov, A., Ligon, K.L., Pomeroy, S.L., Rivera, M.N., Rozenblatt-Rosen, O., Rusert, J.M., Wechsler-Reya, R.J., Li, X.N., Peyrl, A., Gojo, J., Kirchhofer, D., Lötsch, D., Czech, T., Dorfer, C., Haberler, C., Geyeregger, R., Halfmann, A., Gawad, C., Easton, J., Pfister, S.M., Regev, A., Gajjar, A., Orr, B.A., Slavc, I., Robinson, G.W., Bernstein, B.E., Suvà, M.L., Northcott, P.A. (2019): Resolving medulloblastoma cellular architecture by single-cell genomics.” Nature 572:74-79
56. Hovestadt, V., Ayrault, O., Swartling, F.J., Robinson, G.W., Pfister, S.M., Northcott, P.A. (2020): „Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients.” Nat Rev Cancer 20(1):42-56
57. Huang, X., Wang, S., Lee, C.K., Yang, X., Liu, B. (2011): „HDAC inhibitor SNDX-275 enhances efficacy of trastuzumab in erbB2-overexpressing breast cancer cells and exhibits potential to overcome trastuzumab resistance.“ Cancer Lett. 307(1):72-79
58. Huang, Y., Greene, E., Murray Stewart, T., Goodwin, A.C., Baylin, S.B., Woster, P.M., Casero, R.A. Jr. (2007): „Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes.“ Proc Natl Acad Sci U S A. 104(19):8023-8
59. Jacobsen, P.F., Jenkyn, D.J., Papadimitriou, J.M. (1985): „Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice.“ J Neuropathol Exp Neurol. 44(5):472-85
60. Jaremko, J.L., Jans, L.B., Coleman, L.T., Ditchfield, M.R. (2010): „Value and limitations of diffusion-weighted imaging in grading and diagnosis of pediatric posterior fossa tumors.“ AJNR Am J Neuroradiol. 31(9):1613-6
61. Jin, L., Hanigan, C.L., Wu, Y., Wang, W., Park, B.H., Woster, P.M., Casero, R.A. (2013): “Loss of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) suppresses growth and

alters gene expression of human colon cancer cells in a p53- and DNMT1(DNA methyltransferase 1)-independent manner.” Biochem J. 1:459–468.

62. Johansen, C., Boice, J. Jr., McLaughlin, J., Olsen, J. (2001): „Cellular telephones and cancer--a nationwide cohort study in Denmark.“ J Natl Cancer Inst. 93(3):203-7
63. Johnson, R.A., Wright, K.D., Poppleton, H., Mohankumar, K.M., Finkelstein, D., Pounds, S.B., Rand, V., Leary, S.E., White, E., Eden, C., Hogg, T., Northcott, P., Mack, S., Neale, G., Wang, Y.D., Coyle, B., Atkinson, J., DeWire, M., Kranenburg, T.A., Gillespie, Y., Allen, J.C., Merchant, T, Boop, F.A., Sanford, R.A., Gajjar, A., Ellison, D.W., Taylor, M.D., Grundy, R.G., Gilbertson, R.J. (2010): „Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma.“ Nature 466(7306):632-6
64. Jones, D.T., Jager, N., Kool, M., Zichner, T., Hutter, B., Sultan, M., Cho, Y.J., Pugh, T.J., Hovestadt, V., Stütz, A.M., Rausch, T., Warnatz, H.J., Ryzhova, M., Bender, S., Sturm, D., Pleier, S., Cin, H., Pfaff, E., Sieber, L., Wittmann, A., Remke, M., Witt, H., Hutter, S., Tzaridis, T., Weischenfeldt, J., Raeder, B., Avci, M., Amstislavskiy, V., Zapatka, M., Weber, U.D., Wang, Q., Lasitschka, B., Bartholomae, C.C., Schmidt, M., von Kalle, C., Ast, V., Lawerenz, C., Eils, J., Kabbe, R., Benes, V., van Sluis, P., Koster, J., Volckmann, R., Shih, D., Betts, M.J., Russell, R.B., Coco, S., Tonini, G.P., Schüller, U., Hans, V., Graf, N., Kim, Y.J., Monoranu, C., Roggendorf, W., Unterberg, A., Herold-Mende, C., Milde, T., Kulozik, A.E., von Deimling, A., Witt, O., Maass, E., Rössler, J., Ebinger, M., Schuhmann, M.U., Frühwald, M.C., Hasselblatt, M., Jabado, N., Rutkowski, S., von Bueren, A.O., Williamson, D., Clifford, S.C., McCabe, M.G., Collins, V.P., Wolf, S., Wiemann, S., Lehrach, H., Brors, B., Scheurlen, W., Felsberg, J., Reifenberger, G., Northcott, P.A., Taylor, M.D., Meyerson, M., Pomeroy, S.L., Yaspo, M.L., Korbel, J.O., Korshunov, A., Eils, R., Pfister, S.M., Lichter, P. (2012): „Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma.“ Nature 488:100–105
65. Judkins, A.R., Mauger, J., Ht, A., Rorke, L.B., Biegel, J.A. (2004): „Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 in pediatric CNS neoplasms.“ Am J Surg Pathol. 28(5):644-50
66. Kawamura, C., Kizaki, M., Yamato, K., Uchida, H., Fukuchi, Y., Hattori, Y., Koseki, T., Nishihara, T., Ikeda, Y. (2000): „Bone morphogenetic protein-2

induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3.“ Blood 96(6):2005-11

67. Keles, G.E., Berger, M.S., Srinivasan, J., Kolstoe, D.D., Bobola, M.S., Silber, J.R. (1995): „Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines.“ Oncol Res. 7(10-11):493-503.
68. Kenney, A.M., Cole, M.D., Rowitch, D.H. (2003): „Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors.“ Development. 130(1):15-28
69. Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., Cavenee, W.K. (2002): „The WHO classification of tumors of the nervous system.“ J Neuropathol Exp Neurol. 61(3):215-29
70. Kleihues, P., Schäuble, B., zur Hausen, A., Estève, J., Ohgaki, H. (1997): „Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families.“ Am J Pathol. 150(1):1-13
71. Kleinman, C.L., Gerges, N., Papillon-Cavanagh, S., Sin-Chan, P., Pramatarova, A., Quang, D.A., Adoue, V., Busche, S., Caron, M., Djambazian, H., Bemmo, A., Fontebasso, A.M., Spence, T., Schwartzentruber, J., Albrecht, S., Hauser, P., Garami, M., Klekner, A., Bognar, L., Montes, J.L., Staffa, A., Montpetit, A., Berube, P., Zakrzewska, M., Zakrzewski, K., Liberski, P.P., Dong, Z., Siegel, P.M., Duchaine, T., Perotti, C., Fleming, A., Faury, D., Remke, M., Gallo, M., Dirks, P., Taylor, M.D., Sladek, R., Pastinen, T., Chan, J.A., Huang, A., Majewski, J., Jabado, N. (2014): „Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR.“ Nat Genet. 46(1):39-44
72. Kleinman, G.M., Hochberg, F.H., Richardson, E.P. Jr. (1981): „Systemic metastases from medulloblastoma: report of two cases and review of the literature.“ Cancer 48(10):2296-309
73. Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N.E., Lakeman, A., van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N.S., Caron, H.N., Cloos, J., Mrsić, A., Ylstra, B., Grajkowska, W., Hartmann, W., Pietsch, T., Ellison, D., Clifford, S.C., Versteeg, R. (2008): „Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features.“ PLoS One. 28;3(8):e308
74. Korshunov, A., Ryzhova, M., Jones, D.T., Northcott, P.A., van Sluis, P.,

Volckmann, R., Koster, J., Versteeg, R., Cowdrey, C., Perry, A., Picard, D., Rosenblum, M., Giangaspero, F., Aronica, E., Schüller, U., Hasselblatt, M., Collins, V.P., von Deimling, A., Lichter, P., Huang, A., Pfister, S.M., Kool, M. (2012): „LIN28A immunoreactivity is a potent diagnostic marker of embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR).“ Acta Neuropathol. 124(6):875-81

75. Korshunov, A., Sturm, D., Ryzhova, M., Hovestadt, V., Gessi, M., Jones, D.T., Remke, M., Northcott, P., Perry, A., Picard, D., Rosenblum, M., Antonelli, M., Aronica, E., Schüller, U., Hasselblatt, M., Woehrer, A., Zheludkova, O., Kumirova, E., Puget, S., Taylor, M.D., Giangaspero, F., Peter Collins, V., von Deimling, A., Lichter, P., Huang, A., Pietsch, T., Pfister, S.M,, Kool, M. (2014): „Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR), ependymoblastoma, and medulloepithelioma share molecular similarity and comprise a single clinicopathological entity.“ Acta Neuropathol. 128(2):279-89
76. Kouzarides, T. (2000): „Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?“ EMBO J. 19(6):1176-1179
77. Künkele, A., De Preter, K., Heukamp, L., Thor, T., Pajtler, K.W., Hartmann, W., Mittelbronn, M., Grotzer, M.A., Deubzer, H.E., Speleman, F., Schramm, A., Eggert, A., Schulte, J.H. (2012): „Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas.“ Neuro Oncol. 14(7):859-69
78. Lakowski, B., Roelens, I., Jacob, S. (2006): „CoREST-like complexes regulate chromatin modification and neuronal gene expression.“ J Mol Neurosci 29(3):227-239
79. Lee, A., Kessler, J.D., Read, T.A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W.B., Johnson, J.E., Wechsler-Reya, R.J. (2005): „Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum.“ Nat Neurosci. 8(6):723-9
80. Lee, C., Rudneva, V. A., Erkek, S., Zapatka, M., Chau, L.Q., Tacheva-Grigorova, S.K., Garancher, A., Rusert, J.M., Aksoy, O., Lea, R., Mohammad, H.P., Wang, J., Weiss, W.A., Grimes, H.L., Pfister, S.M., Northcott, P.A., Wechsler-Reya, R.J. (2019): “Lsd1 as a therapeutic target in Gfi1-activated medulloblastoma.” Nature Communications 10:332
81. Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2005): „An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation.“ Nature 437(7057):432-435

82. Lee, M.G., Wynder, C., Bochar, D.A., Hakimi, M.A., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2006): „Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes.“ Mol Cell Biol. 26(17):6395-402
83. Lee, M.G., Wynder, C., Schmidt, D.M., McCafferty, D.G., Shiekhattar, R. (2006): „Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications.“ Chem Biol. 13(6):563-7
84. Lewis, P.M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A., McMahon, A.P. (2004): „Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum.“ Dev Biol. 270(2):393-410
85. Lim, S., Janzer, A., Becker, A., Zimmer, A., Schüle, R., Buettner, R., Kirfel, J. (2010): „Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology.“ Carcinogenesis 31(3):512-20
86. Little, M.P., de Vathaire, F., Shamsaldin, A., Oberlin, O., Campbell, S., Grimaud, E., Chavaudra, J., Haylock, R.G., Muirhead, C.R. (1998). „Risks of brain tumour following treatment for cancer in childhood: modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy.“ Int J Cancer. 78(3):269-75
87. Logan, C.Y., Nusse, R. (2004): „The Wnt signaling pathway in development and disease.“ Annu Rev Cell Dev Biol. 20:781-810
88. Louis, D.N., Perry, A., Burger, P., Ellison, D.W., Reifenberger, G., von Deimling, A., Aldape, K., Brat, D., Collins, V.P., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fuller, G.N., Giangaspero, F., Giannini, C., Hawkins, C., Kleihues, P., Korshunov, A., Kros, J.M., Beatriz Lopes, M., Ng, H.K., Ohgaki, H., Paulus, W., Pietsch, T., Rosenblum, M., Rushing, E., Soylemezoglu, F., Wiestler, O., Wesseling, P. (2014): „International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading.” Brain Pathol 24(5):429-35
89. Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W. (2016): “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.” Acta Neuropathol 131(6):803-20
90. Marino, S. (2005): „Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control.“ Trends Mol Med. 11(1):17-22
91. McMahon, A.P., Bradley, A. (1990): „The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is

required for development of a large region of the mouse brain.“ Cell 62(6):1073-85

92. McManamy, C.S., Lamont, J.M., Taylor, R.E., Cole, M., Pearson, A.D., Clifford, S.C., Ellison, D.W. (2003): „United Kingdom Children's Cancer Study Group. Morphophenotypic variation predicts clinical behavior in childhood non-desmoplastic medulloblastomas.“ J Neuropathol Exp Neurol. 62(6):627-32
93. McManamy, C.S., Pears, J., Weston, C.L., Hanzely, Z., Ironside, J.W., Taylor, R.E., Grundy, R.G., Clifford, S.C., Ellison, D.W. (2007): „Clinical Brain Tumour Group. Nodule formation and desmoplasia in medulloblastomas-defining the nodular/desmoplastic variant and its biological behavior.“ Brain Pathol. 17(2):151-64
94. Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Müller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Günther, T., Buettner, R., Schüle, R. (2005): „LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription.“ Nature 437:436-439
95. Miale, I.L., Sidman, R.L. (1961): „An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum.“ Exp Neurol. 4:277-96
96. Milde, T., Lodrini, M., Savelyeva, L., Korshunov, A., Kool, M., Brueckner, L.M., Antunes, A.S., Oehme, I., Pekrun, A., Pfister, S.M., Kulozik, A.E., Witt, O., Deubzer, H.E. (2012): „HD-MB03 is a novel Group 3 medulloblastoma model demonstrating sensitivity to histone deacetylase inhibitor treatment.“ J Neurooncol. 110(3):335-48
97. Milde, T., Oehme, I., Korshunov, A., Kopp-Schneider, A., Remke, M., Northcott, P., Deubzer, H.E., Lodrini, M., Taylor, M.D., von Deimling, A., Pfister, S., Witt, O. (2010): „HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth.“ Clin Canc Res 16:3240–3252
98. Milker-Zabel, S., Zabel, A., Thilmann, C., Zuna, I., Hoess, A., Wannenmacher, M., Debus, J. (2002): „Results of three-dimensional stereotactically-guided radiotherapy in recurrent medulloblastoma.“ J Neurooncol. 60(3):227-33
99. Morales, D., Hatten, M.E. (2006): „Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage.“ J Neurosci. 26(47):12226-36
100. Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., Jackman, S., Krzywinski, M., Scott, D.W., Trinh, D.L., Tamura-Wells, J., Li, S., Firme, M.R.,

Rogic, S., Griffith, M., Chan, S., Yakovenko, O., Meyer, I.M., Zhao, E.Y., Smailus, D., Moksa, M., Chittaranjan, S., Rimsza, L., Brooks-Wilson, A., Spinelli, J.J., Ben-Neriah, S., Meissner, B., Woolcock, B., Boyle, M., McDonald, H., Tam, A., Zhao, Y., Delaney, A., Zeng, T., Tse, K., Butterfield, Y., Birol, I., Holt, R., Schein, J., Horsman, D.E., Moore, R., Jones, S.J., Connors, J.M., Hirst, M., Gascoyne, R.D., Marra, M.A. (2011): „Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma.“ Nature 27;476(7360):298-303

101. Neglia, J.P., Robison, L.L., Stovall, M., Liu, Y., Packer, R.J., Hammond, S., Yasui, Y., Kasper, C.E., Mertens, A.C., Donaldson, S.S., Meadows, A.T., Inskip, P.D. (2006): „New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study.“ J Natl Cancer Inst.98(21):1528-37

102. Northcott, P. A., Buchhalter, I., Morrissy, A.S., Hovestadt, V., Weischenfeldt, J., Ehrenberger, T., Gröbner, S., Segura-Wang, M., Zichner, T., Rudneva, V.A., Warnatz, H.J., Sidiropoulos, N., Phillips, A.H., Schumacher, S., Kleinheinz, K., Waszak, S.M., Erkek, S., Jones, D.T.W., Worst, B.C., Kool, M., Zapatka, M., Jäger, N., Chavez, L., Hutter, B., Bieg, M., Paramasivam, N., Heinold, M., Gu, Z., Ishaque, N., Jäger-Schmidt, C., Imbusch, C.D., Jugold, A., Hübschmann, D., Risch, T., Amstislavskiy, V., Gonzalez, F.G.R., Weber, U.D., Wolf, S., Robinson, G.W., Zhou, X., Wu, G., Finkelstein, D., Liu, Y., Cavalli, F.M.G., Luu, B., Ramaswamy, V., Wu, X., Koster, J., Ryzhova, M., Cho, Y.J., Pomeroy, S.L., Herold-Mende, C., Schuhmann, M., Ebinger, M., Liau, L.M., Mora, J., McLendon, R.E., Jabado, N., Kumabe, T., Chuah, E., Ma, Y., Moore, R.A., Mungall, A.J., Mungall, K.L., Thiessen, N., Tse, K., Wong, T., Jones, S.J.M., Witt, O., Milde, T., Von Deimling, A., Capper, D., Korshunov, A., Yaspo, M.L., Kriwacki, R., Gajjar, A., Zhang, J., Beroukhim, R., Fraenkel, E., Korbel, J.O., Brors, B., Schlesner, M., Eils, R., Marra, M.A., Pfister, S.M., Taylor, M.D., Lichter, P. (2017): “The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes.” Nature 547:311-317

103. Northcott, P.A., Jones, D.T., Kool, M., Robinson, G.W., Gilbertson, R.J., Cho, Y.J., Pomeroy, S.L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M.D., Pfister, S.M. (2012): „Medulloblastomics: the end of the beginning.“ Nat Rev Cancer 12(12):818-34

104. Northcott, P.A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C.G.,

Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S.C., Hawkins, C.E., French, P., Rutka, J.T., Pfister, S., Taylor, M.D. (2011): „Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants.“ J Clin Oncol. 29(11):1408-14

105. Northcott, P.A., Nakahara, Y., Wu, X., Feuk, L., Ellison, D.W., Croul, S., Mack, S., Kongkham, P.N., Peacock, J., Dubuc, A., Ra, Y.S., Zilberberg, K., McLeod, J., Scherer, S.W., Sunil Rao, J., Eberhart, C.G., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Lach, B., Grundy, R., Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Van Meter, T., Carlotti, C.G., Boop, F., Bigner, D., Gilbertson, R.J., Rutka, J.T., Taylor, M.D. (2009): „Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma.“ Nat Genet. 41(4):465-72

106. Northcott, P.A., Shih, D.J.H., Peacock, J., Garzia, L., Morrissy, A.S., Zichner, T., Stütz, A.M., Korshunov, A., Reimand, J., Schumacher, S.E., Beroukhim, R., Ellison, D.W., Marshall, C.R., Lionel, A.C., Mack, S., Dubuc, A., Yao, Y., Ramaswamy, V., Luu, B., Rolider, A., Cavalli, F.M., Wang, X., Remke, M., Wu, X., Chiu, R.Y., Chu, A., Chuah, E., Corbett, R.D., Hoad, G.R., Jackman, S.D., Li, Y., Lo, A., Mungall, K.L., Nip, K.M., Qian, J.Q., Raymond, A.G., Thiessen, N.T., Varhol, R.J., Birol, I., Moore, R.A., Mungall, A.J., Holt, R., Kawauchi, D., Roussel, M.F., Kool, M., Jones, D.T., Witt, H., Fernandez-L, A., Kenney, A.M., Wechsler-Reya, R.J., Dirks, P., Aviv, T., Grajkowska, W.A., Perek-Polnik, M., Haberler, C.C., Delattre, O., Reynaud, S.S., Doz, F.F., Pernet-Fattet, S.S., Cho, B.K., Kim, S.K., Wang, K.C., Scheurlen, W., Eberhart, C.G., Fèvre-Montange, M., Jouvet, A., Pollack, I.F., Fan, X., Muraszko, K.M., Gillespie, G.Y., Di Rocco, C., Massimi, L., Michiels, E.M., Kloosterhof, N.K., French, P.J., Kros, J.M., Olson, J.M., Ellenbogen, R.G., Zitterbart, K., Kren, L., Thompson, R.C., Cooper, M.K., Lach, B., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Fontebasso, A., Albrecht, S., Jabado, N., Lindsey, J.C., Bailey, S., Gupta, N., Weiss, W.A., Bognár, L., Klekner, A., Van Meter, T.E., Kumabe, T., Tominaga, T., Elbabaa, S.K., Leonard, J.R., Rubin, J.B., Liau, L.M., Van Meir, E.G., Fouladi, M., Nakamura, H., Cinalli, G., Garami, M., Hauser, P., Saad, A.G., Iolascon, A., Jung, S., Carlotti, C.G., Vibhakar, R., Ra, Y.S., Robinson, S., Zollo, M., Faria, C.C., Chan, J.A., Levy, M.L., Sorensen, P.H., Meyerson, M., Pomeroy, S.L., Cho, Y.J., Bader, G.D., Tabori, U., Hawkins, C.E., Bouffet, E., Scherer, S.W., Rutka, J.T., Malkin, D., Clifford, S.C., Jones, S.J., Korbel, J.O., Pfister, S.M.,

Marra, M.A., Taylor, M.D. (2012): “Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes.” Nature 488:49–56

107. Oberdoerffer, P., Sinclair, D.A. (2007): „The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing.“ Nat Rev Mol Cell Biol. 8(9):692-702

108. Ogasawara, D., Suzuki, T., Mino, K., Ueda, R., Khan, M.N., Matsubara, T., Koseki, K., Hasegawa, M., Sasaki, R., Nakagawa, H., Mizukami, T., Miyata, N. (2011): „Synthesis and biological activity of optically active NCL-1, a lysine-specific demethylase 1 selective inhibitor.“ Bioorg Med Chem. 19(12):3702-8

109. Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S. (2014): „CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010.“ Neuro Oncol. 16(5):760

110. Parsons, D.W., Li, M., Zhang, X., Jones, S., Leary, R.J., Lin, J.C., Boca, S.M., Carter, H., Samayoa, J., Bettegowda, C., Gallia, G.L., Jallo, G.I., Binder, Z.A., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D.R., Gerhard, D.S., Fults, D.W., VandenBerg, S., Berger, M.S., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Clara, C., Phillips, P.C., Minturn, J.E., Biegel, J.A., Judkins, A.R., Resnick, A.C., Storm, P.B., Curran, T., He, Y., Rasheed, B.A., Friedman, H.S., Keir, S.T., McLendon, R., Northcott, P.A., Taylor, M.D., Burger, P.C., Riggins, G.J., Karchin, R., Parmigiani, G., Bigner, D.D., Yan, H., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E. (2011): „The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma.“ Science 331:435–439

111. Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., Vescovi, A.L. (2006): „Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells.“ Nature 444(7120):761-5

112. Pizzo, P.A., Poplack, D.G. (2011): „Principles and Practice of Pediatric Oncology“, Ausgabe 6, Philadelphia, Wolters Kluwer, Kapitel 26B

113. Pollock, J.A., Larrea, M.D., Jasper, J.S., McDonnell, D.P., McCafferty, D.G. (2012): „Lysine-specific histone demethylase 1 inhibitors control breast cancer proliferation in ERα-dependent and -independent manners.“ ACS Chem Biol. 7(7):1221-31

114. Pöschl, J., Stark, S., Neumann, P., Gröbner, S., Kawauchi, D., Jones, D.T., Northcott, P.A., Lichter, P., Pfister, S.M., Kool, M., Schüller, U. (2014):

„Genomic and transcriptomic analyses match medulloblastoma mouse models to their human counterparts.” Acta Neuropathol 128(1):123-36

115. Pugh, T. J., Weeraratne, S. D., Archer, T.C., Pomeranz Krummel, D.A., Auclair, D., Bochicchio, J., Carneiro, M.O., Carter, S.L., Cibulskis, K., Erlich, R.L., Greulich, H., Lawrence, M.S., Lennon, N.J., McKenna, A., Meldrim, J., Ramos, A.H., Ross, M.G., Russ, C., Shefler, E., Sivachenko, A., Sogoloff, B., Stojanov, P., Tamayo, P., Mesirov, J.P., Amani, V., Teider, N., Sengupta, S., Francois, J.P., Northcott, P.A., Taylor, M.D., Yu, F., Crabtree, G.R., Kautzman, A.G., Gabriel, S.B., Getz, G., Jäger, N., Jones, D.T., Lichter, P., Pfister, S.M., Roberts, T.M., Meyerson, M., Pomeroy, S.L., Cho, Y.J. (2012): „Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations.” Nature 488(7409):106-10

116. Qin, Y., Zhu, W., Xu, W., Zhang, B., Shi, S., Ji, S., Liu, J., Long, J., Liu, C., Liu, L., Xu, J., Yu, X. (2014): „LSD1 sustains pancreatic cancer growth via maintaining HIF1α-dependent glycolytic process.“ Cancer Lett. 347(2):225-32

117. Rausch, T., Jones, D.T.W., Zapatka, M., Stütz, A.M., Zichner, T., Weischenfeldt, J., Jäger, N., Remke, M., Shih, D., Northcott, P.A., Pfaff, E., Tica, J., Wang, Q., Massimi, L., Witt, H., Bender, S., Pleier, S., Cin, H., Hawkins, C., Beck, C., von Deimling, A., Hans, V., Brors, B., Eils, R., Scheurlen, W., Blake, J., Benes, V., Kulozik, A.E., Witt, O., Martin, D., Zhang, C., Porat, R., Merino, D.M., Wasserman, J., Jabado, N., Fontebasso, A., Bullinger, L., Rücker, F.G., Döhner, K., Döhner, H., Koster, J., Molenaar, J.J., Versteeg, R., Kool, M., Tabori, U., Malkin, D., Korshunov, A., Taylor, M.D., Lichter, P., Pfister, S.M., Korbel, J.O. (2012): „Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations.” Cell 148(1-2):59-71

118. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T. (2000): „Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases.“ Nature 406:593-599

119. Rios, I., Alvarez-Rodríguez, R., Martí, E., Pons, S. (2004): „Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling.“ Development. 131(13):3159-68

120. Rorke, L.B. (1983): „The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors.“ J Neuropathol Exp Neurol. 42(1):1-15

121. Roth, R.B., Hevezi, P., Lee, J., Willhite, D., Lechner, S.M., Foster, A.C., Zlotnik, A. (2006): „Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS.“ Neurogenetics. 7(2):67-80

122. Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. (2001): „Histone acetyltransferases.“ Annu Rev Biochem. 70:81-120

123. Rubinstein, L.J. (1985): „Embryonal central neuroepithelial tumors and their differentiating potential. A cytogenetic view of a complex neuro-oncological problem.“ J Neurosurg. 62(6):795-805

124. Ruiz i Altaba, A., Palma, V., Dahmane, N. (2002): „Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain.“ Nat Rev Neurosci. 3(1):24-33

125. Rutkowski, S., Bode, U., Deinlein, F., Ottensmeier, H., Warmuth-Metz, M., Soerensen, N., Graf, N., Emser, A., Pietsch, T., Wolff, J.E., Kortmann, R.D., Kuehl, J. (2005): „Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone.“ N Engl J Med. 352(10):978-86

126. Rutkowski, S., von Hoff, K., Emser, A., Zwiener, I., Pietsch, T., Figarella-Branger, D., Giangaspero, F., Ellison, D.W., Garre, M.L., Biassoni, V., Grundy, R.G., Finlay, J.L., Dhall, G., Raquin, M.A., Grill, J. (2010): „Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international meta-analysis.” J Clin Oncol 28(33):4961-8

127. Sareddy, G.R., Nair, B.C., Krishnan, S.K., Gonugunta, V.K., Zhang, Q.G., Suzuki, T., Miyata, N., Brenner, A.J., Brann, D.W., Vadlamudi, R.K. (2013): „KDM1 is a novel therapeutic target for the treatment of gliomas.“ Oncotarget. 4(1):18-28

128. Schulte, J.H., Lim, S., Schramm, A., Friedrichs, N., Koster, J., Versteeg, R., Ora, I., Pajtler, K., Klein-Hitpass, L., Kuhfittig-Kulle, S., Metzger, E., Schüle, R., Eggert, A., Buettner, R., Kirfel, J. (2009): „Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy.“ Cancer Res. 69(5):2065-71

129. Serce, N., Gnatzy, A., Steiner, S., Lorenzen, H., Kirfel, J., Buettner, R. (2012): „Elevated expression of LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) during tumour progression from pre-invasive to invasive ductal carcinoma of the breast.“ BMC Clin Pathol. 12:13

130. Sharma, T., Schwalbe, E. C., Williamson, D., Sill, M., Hovestadt, V., Mynarek, M., Rutkowski, S., Robinson, G.W., Gajjar, A., Cavalli, F.,

Ramaswamy, V., Taylor, M.D., Lindsey, J.C., Hill, R.M., Jäger, N., Korshunov, A., Hicks, D., Bailey, S., Kool, M., Chavez, L., Northcott, P.A., Pfister, S.M., Clifford, S.C. (2019): „Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes." Acta Neuropathol 138(2):309-326

131. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Y. (2004): „Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." Cell 119:941–953

132. Shi, Y.J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., Shi, Y. (2005): „Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors." Mol Cell. 19(6):857-64

133. Shimizu, R., Kikuchi, J., Wada, T., Ozawa, K., Kano, Y., Furukawa, Y. (2010): „HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells." Leukemia 24(10):1760-8

134. Singh, M.M., Manton, C.A., Bhat, K.P., Tsai, W.W., Aldape, K., Barton, M.C., Chandra, J. (2011): „Inhibition of LSD1 sensitizes glioblastoma cells to histone deacetylase inhibitors." Neuro Oncol. 13(8):894-903

135. Sprüssel, A., Schulte, J.H., Weber, S., Necke, M., Händschke, K., Thor, T., Pajtler, K.W., Schramm, A., König, K., Diehl, L., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Speleman, F., Jastrow, H., Heukamp, L.C., Schüle, R., Dührsen, U., Buettner, R., Eggert, A., Göthert, J.R. (2012): „Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation." Leukemia 26(9):2039-51

136. Strahl, B. D., Allis, C. D. (2000): „The language of covalent histone modifications." Nature 403:41–45

137. Sturm, D., Orr, B.A., Toprak, U.H., Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Capper, D., Sill, M., Buchhalter, I., Northcott, P.A., Leis, I., Ryzhova, M., Koelsche, C., Pfaff, E., Allen, S.J., Balasubramanian, G., Worst, B.C., Pajtler, K.W., Brabetz, S., Johann, P.D., Sahm, F., Reimand, J., Mackay, A., Carvalho, D.M., Remke, M., Phillips, J.J., Perry, A., Cowdrey, C., Drissi, R., Fouladi, M., Giangaspero, F., Łastowska, M., Grajkowska, W., Scheurlen, W., Pietsch, T., Hagel, C., Gojo, J., Lötsch, D., Berger, W., Slavc, I., Haberler, C., Jouvet ,A., Holm, S., Hofer, S., Prinz, M., Keohane, C., Fried, I., Mawrin, C., Scheie, D., Mobley, B.C., Schniederjan, M.J., Santi, M., Buccoliero, A.M., Dahiya, S., Kramm, C.M., von

Bueren, A.O., von Hoff, K., Rutkowski, S., Herold-Mende, C., Frühwald, M.C., Milde, T., Hasselblatt, M., Wesseling, P., Rößler, J., Schüller, U., Ebinger, M., Schittenhelm, J., Frank, S., Grobholz, R., Vajtai, I., Hans, V., Schneppenheim, R., Zitterbart, K., Collins, V.P., Aronica, E., Varlet, P., Puget, S., Dufour, C., Grill, J., Figarella-Branger, D., Wolter, M., Schuhmann, M.U., Shalaby, T., Grotzer, M., van Meter, T., Monoranu, C.M., Felsberg, J., Reifenberger, G., Snuderl, M., Forrester, L.A., Koster, J., Versteeg, R., Volckmann, R., van Sluis, P., Wolf, S., Mikkelsen, T., Gajjar, A., Aldape, K., Moore, A.S., Taylor, M.D., Jones, C., Jabado, N., Karajannis, M.A., Eils, R., Schlesner, M., Lichter, P., von Deimling, A., Pfister, S.M., Ellison, D.W., Korshunov, A., Kool, M. (2016): “New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs.” Cell. 164(5): 1060–1072

138. Suikki, H.E., Kujala, P.M., Tammela, T.L., van Weerden, W.M., Vessella, R.L., Visakorpi, T. (2010): „Genetic alterations and changes in expression of histone demethylases in prostate cancer.“ Prostate 70(8):889-98

139. Sun, L., Moritake, T., Zheng, Y.W., Suzuki, K., Gerelchuluun, A., Hong, Z., Zenkoh, J., Taniguchi, H., Tsuboi, K. (2013): „In vitro stemness characterization of radio-resistant clones isolated from a medulloblastoma cell line ONS-76.“ J Radiat Res. 54(1):61-9

140. Tamura, K., Shimizu, K., Yamada, M., Okamoto, Y., Matsui, Y., Park, K.C., Mabuchi, E., Moriuchi, S., Mogami, H. (1989): „Expression of major histocompatibility complex on human medulloblastoma cells with neuronal differentiation.“ Cancer Res. 49(19):5380-4

141. Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., Zhao, Y. (2011): „Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification.“ Cell 146, 1016–1028

142. Taylor, M.D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C.C., Mainprize, T.G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A.M., Stavrou, T., Scherer, S.W., Dura, W.T., Wainwright, B., Squire, J.A., Rutka, J.T., Hogg, D. (2002): „Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma.“ Nat Genet. 31(3):306-10

143. Taylor, M.D., Northcott, P.A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.J.,

Clifford, S.C., Eberhart, C.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D.W., Lichter, P., Gilbertson, R.J., Pomeroy, S.L., Kool, M., Pfister, S.M. (2012): „Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus.“ Acta Neuropathol. 123(4):465-72

144. Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., Schreiber, S.L. (1998): „Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex.“ Nature 395:917-921

145. Triscott, J., Lee, C., Foster, C., Manoranjan, B., Pambid, M.R., Berns, R., Fotovati, A., Venugopal, C., O'Halloran, K., Narendran, A., Hawkins, C., Ramaswamy, V., Bouffet, E., Taylor, M.D., Singhal, A., Hukin, J., Rassekh, R., Yip, S., Northcott, P., Singh, S.K., Dunham, C., Dunn, S.E. (2013): „Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children.“ Cancer Res. 73(22):6734-44

146. Ueda, R., Suzuki, T., Mino, K., Tsumoto, H., Nakagawa, H., Hasegawa, M., Sasaki, R., Mizukami, T., Miyata, N. (2009): „Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors.“ J Am Chem Soc. 131(48):17536-7

147. Uziel, T., Zindy, F., Xie, S., Lee, Y., Forget, A., Magdaleno, S., Rehg, J.E., Calabrese, C., Solecki, D., Eberhart, C.G., Sherr, S.E., Plimmer, S., Clifford, S.C., Hatten, M.E., McKinnon, P.J., Gilbertson, R.J., Curran, T., Sherr, C.J., Roussel, M.F. (2005): „The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation.“ Genes Dev. 19(22):2656-67

148. Uziel, T., Zindy, F., Sherr, C.J., Roussel, M.F. (2006): „The CDK inhibitor p18Ink4c is a tumor suppressor in medulloblastoma.“ Cell Cycle 5(4):363-5

149. von Hoff, K., Hartmann, W., von Bueren, A.O., Gerber, N.U., Grotzer, M.A., Pietsch, T., Rutkowski, S. (2010): „ Large cell/anaplastic medulloblastoma: outcome according to myc status, histopathological, and clinical risk factors.” Pediatr Blood Cancer 54(3):369-76

150. Wang, J., Scully, K., Zhu, X., Cai, L., Zhang, J., Prefontaine, G.G., Krones, A., Ohgi, K.A., Zhu, P., Garcia-Bassets, I., Liu, F., Taylor, H., Lozach, J., Jayes, F.L., Korach, K.S., Glass, C.K., Fu, X.D., Rosenfeld, M.G. (2007): „Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes.“ Nature 446(7138):882-7

151. Waszak, S.M., Northcott, P.A., Buchhalter, I., Robinson, G.W., Sutter, C., Groebner, S., Grund, K.B., Brugières, L., Jones, D.T.W., Pajtler, K.W., Morrissy, A.S., Kool, M., Sturm, D., Chavez, L., Ernst, A., Brabetz, S., Hain, M., Zichner, T., Segura-Wang, M., Weischenfeldt, J., Rausch, T., Mardin, B.R., Zhou, X., Baciu, C., Lawerenz, C., Chan, J.A., Varlet, P., Guerrini-Rousseau, L., Fults, D.W., Grajkowska, W., Hauser, P., Jabado, N., Ra, Y.S., Zitterbart, K., Shringarpure, S.S., De La Vega, F.M., Bustamante, C.D., Ng, H.K., Perry, A., MacDonald, T.J., Hernáiz Driever, P., Bendel, A.E., Bowers, D.C., McCowage, G., Chintagumpala, M.M., Cohn, R., Hassall, T., Fleischhack, G., Eggen, T., Wesenberg, F., Feychting, M., Lannering, B., Schüz, J., Johansen, C., Andersen, T.V., Röösli, M., Kuehni, C.E., Grotzer, M., Kjaerheim, K., Monoranu, C.M., Archer, T.C., Duke, E., Pomeroy, S.L., Shelagh, R., Frank, S., Sumerauer, D., Scheurlen, W., Ryzhova, M.V., Milde, T., Kratz, C.P., Samuel, D., Zhang, J., Solomon, D.A., Marra, M., Eils, R., Bartram, C.R., von Hoff, K., Rutkowski, S., Ramaswamy, V., Gilbertson, R.J., Korshunov, A., Taylor, M.D., Lichter, P., Malkin, D., Gajjar, A., Korbel, J.O., Pfister, S.M. (2018): “Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort.” Lancet Oncol 19(6):785-798

152. Waszak, S.M., Robinson, G.W., Gudenas, B.L., Smith, K.S., Forget, A., Kojic, M., Garcia-Lopez, J., Hadley, J., Hamilton, K.V., Indersie, E., Buchhalter, I., Kerssemakers, J., Jäger, N., Sharma, T., Rausch, T., Kool, M., Sturm, D., Jones, D.T.W., Vasilyeva, A., Tatevossian, R.G., Neale, G., Lombard, B., Loew, D., Nakitandwe, J., Rusch, M., Bowers, D.C., Bendel, A., Partap, S., Chintagumpala, M., Crawford, J., Gottardo, N.G., Smith, A., Dufour, C., Rutkowski, S., Eggen, T., Wesenberg, F., Kjaerheim, K., Feychting, M., Lannering, B., Schüz, J., Johansen, C., Andersen, T.V., Röösli, M., Kuehni, C.E., Grotzer, M., Remke, M., Puget, S., Pajtler, K.W., Milde, T., Witt, O., Ryzhova, M., Korshunov, A., Orr, B.A., Ellison, D.W., Brugieres, L., Lichter, P., Nichols, K.E., Gajjar, A., Wainwright, B.J., Ayrault, O., Korbel, J.O., Northcott, P.A., Pfister, S.M. (2020): “Germline Elongator mutations in Sonic Hedgehog medulloblastoma.” Nature 580(7803):396-401

153. Wetmore, C., Eberhart, D.E., Curran, T. (2000): „The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line

mutation of patched.“ Cancer Res 60:2239-2246

154. Willmann, D., Lim, S., Wetzel, S., Metzger, E., Jandausch, A., Wilk, W., Jung, M., Forne, I., Imhof, A., Janzer, A., Kirfel, J., Waldmann, H., Schüle, R., Buettner, R. (2012): „Impairment of prostate cancer cell growth by a selective and reversible lysine-specific demethylase 1 inhibitor.“ Int J Cancer 131(11):2704-9

155. Wissmann, M., Yin, N., Müller, J.M., Greschik, H., Fodor, B.D., Jenuwein, T., Vogler, C., Schneider, R., Günther, T., Buettner, R., Metzger, E., Schüle, R. (2007): „Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression.“ Nat Cell Biol. 9(3):347-53

156. Wright, J.H. (1910): „Neurocytoma or Neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized.“ J Exp Med. 12(4):556-61

157. Yang, M., Gocke, C.B., Luo, X., Borek, D., Tomchick, D.R., Machius, M., Otwinowski, Z., Yu, H. (2006): „Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone demethylase.“ Mol Cell. 23(3):377-87

158. Yoon, K., Gaiano, N. (2005): „Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants.“ Nat Neurosci. 8(6):709-15

159. Zeltzer, P.M., Boyett, J.M., Finlay, J.L., Albright, A.L., Rorke, L.B., Milstein, J.M., Allen, J.C., Stevens, K.R., Stanley, P., Li, H., Wisoff, J.H., Geyer, J.R., McGuire-Cullen, P., Stehbens, J.A., Shurin, S.B., Packer, R.J. (1999): „Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study.“ J Clin Oncol. 17(3):832-45

160. Zhang, L., Goldman, J.E. (1996): „Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum.“ J Comp Neurol. 370(4):536-50

161. Zhang, Y., Reinberg, D. (2001): „Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails.“ Genes Dev. 15, 2343-2360

162. Zhao, H., Ayrault, O., Zindy, F., Kim, J.H., Roussel, M.F. (2008): „Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development.“ Genes Dev. 22(6):722-7

7 Anhang

7.1 Verzeichnis Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad in Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatous-polyposis-coli
ATOH1	Atonal BHLH Transcription Factor 1
ATRT	Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor
BMP	Bone morphogenetic protein (Knochenmorphogenetisches Protein)
BSA	Rinderserum - Albumin
CCNU	Lomustin
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
CT	Computertomographie
CTNNB1	Catenin Beta 1
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ETMR	Embryonaler Tumor mit mehrreihigen Rosetten
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
GNCP	granulären neuronalen Vorläuferzellen
h	Stunde
HDAC	Histon-Deacetylasen
JMJD2C	Jumonji domain 2C
KLF10	Kruppel Like Factor 10
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A
MAO	Monoaminooxidase
MB	Medulloblastom
min	Minute

mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NGS	Next generation sequencing
nm	Nanometer
PBST	Phosphate buffered saline with Tween
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentium hydrogenium
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
Ptch	Protein-Patched-Homolog
PTCH1	Protein patched homolog 1
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT- PCR	Reverse Transkriptions- PCR
Shh	sonic-hedgehog
Smad5	Mothers against decapentaplegic homolog 5
SMO	Smoothened
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SUFU	Suppressor of fused homolog
Taq	Polymerase aus Thermus aquaticus
TP53	Tumorsuppressorprotein p53
V	Volt
WHO	World Health Organization

Die gängigen SI-Einheiten sind im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt und werden als bekannt vorausgesetzt.

7.2 Verzeichnis Abbildungen

Abb. 1: Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms..... 12

Abb. 2: Demographische, klinische und molekulare Merkmale des Medulloblastoms 15

Abb. 3: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in primären Medulloblastomen und Kleinhirngewebe..... 49

Abb. 4: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Medulloblastom Subgruppen..... 50

Abb. 5: Repräsentative immunhistochemische Färbung von Tissue Microarrays..... 51

Abb. 6: Semiquantitative Auswertung der relativen LSD1-Expression der immunhistochemischen Färbungen der Medulloblastome und Kleinhirne 51

Abb. 7: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in murinen medulloblastischen Tumoren und murinem Kleinhirngewebe 52

Abb. 8: LSD1-Expression auf Proteinebene in murinen Medulloblastommodellen und murinem Kleinhirngewebe 53

Abb. 9: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene in etablierten Medulloblastomzelllinien und der Neuroblastomzellienie SK-N-BE als Positivkontrolle 53

Abb. 10: Relative *LSD1*-Expression auf mRNA-Ebene 72h nach siLSD1-Transfektion 54

Abb. 11: LSD1-Expression auf Proteinebene 72h nach siLSD1-Transfektion..... 54

Abb. 12: Vergleich der Viabilität von DAOY und ONS-76 Zellen gemessen mittels MTT-Assay 72h nach siLSD1-Transfektion im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen..... 55

Abb. 13: Vergleich der Proliferation von DAOY und ONS-76 Zellen gemessen mittels BrdU-Test von DAOY und ONS-76 Zellen 72h nach siLSD1-Transfektion im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen. 56

Abb. 14: Vergleich der Apoptose von DAOY und ONS-76 Zellen gemessen mittels Cell Death ELISA® 72h nach siLSD1-Transfektion im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen 57

Abb. 15: Auflichtmikroskopie der Unterseite der Boyden-Kammern nach DAPI-Färbung, ONS-76 96h nach Tranfektion mit siLSD1..... 58

Abb. 16: Anzahl der Zellen auf der Unterseite der Boyden-Kammer pro mm² 24h nach Ausplattieren von DAOY und ONS-76 Zellen nach vorheriger siLSD1-Transfektion für 72h im Vergleich zu nur mit Transfektionsmedium behandelten Zellen..... 58

Abb. 17: Übersicht von regulierten Genen (Heatmap) 72h nach siLSD1-Transfektion bzw. Behandlung mit Transfektionsreagenz von ONS-76 Zellen. Analyse mittels Affymetrix U133 Plus 2.0 Microarray 59

Abb. 18: Relative *BMP2*-Expression auf mRNA-Ebene in ONS-76 72h nach Transfektion mit siLSD1 60

Abb. 19: Messung der Phosphorylierung von SMAD5 auf Proteinebene in ONS-76 72h nach Transfektion mit siLSD1 60

Abb. 20: Messung der Zellviabiltät mittels MTT Assay 72h nach Tranylcypromin-Behandlung von DAOY und ONS-76 mit angegebenen Konzentrationen..... 61

Abb. 21: Messung der Zellviabiltät mittels MTT Assay nach Behandlung für 72h mit dem LSD1-spezifischen Inhibitor NCL-1von DAOY und ONS-76 Zellen 62

Abb. 22: a) GNCP's in Kultur b) Immunfluorezenzfärbung der GNCP`s mit ßIII-Tubulin und DAPI 63

Abb. 23: Expression von *ATOH1* auf mRNA-Ebene in GNCP's im Vergleich zu Gliazellen bei 7 Tagen alten Mäusen..... 63

Abb. 24: Relative *LSD1*-Expression der GNCP's transgener SmoA1-, SmoM2 und Ptch+/- Mäusen sowie Black6N-Mäusen an postnatalen Tagen 7, 14 und 28 64

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Kristian Pajtler für die Überlassung des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung sowie durchgängige Unterstützung im wissenschaftlichen aber auch klinischen Arbeiten.

Bei Herrn PD Alexander Schramm möchte ich mich für die konstruktiven Ratschläge und Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit bedanken, sowie für die Organisation vieler sportlicher Veranstaltungen. Dies hat das Arbeiten und den Zusammenhalt im Laborteam so besonders gemacht.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Angelika Eggert für die Möglichkeit bedanken im hämato-onkologischen Labor der Kinderklinik III meine Promotion anzufangen.

Dem gesamten Team des hämato-onkologischen Labors der Kinderklinik III danke ich für die sehr spannende, lehrreiche und auch lustige Zeit. Mein besonderer gilt hier besonders Annette, Johannes, Gabriele, Ines, Katharina, Harald, Theresa, Andrea O., Sabine, Simon, Annika, Anja, Sven, Kristina, Sebastian, Natalie und Kathrin M..

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und Ermutigung bedanken.

Der größte Dank geht an meinen Mann! Bent, vielen Dank für deine Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen auf mittlerweile einem so langen gemeinsamen Lebensweg. Meine drei „Männer“- ihr seid mein Leben!

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.