

## **SYNTETISK LETALITET SOM FORKLARING PÅ GENSIDIGT EKSKLUSIVE TET2 OG WT1 MUTATIONER.**

**PROJEKT FORSKERSPIRER 2021 | SUNDHEDSVIDENSKAB**

**Jakob Magnus Schasching - Sønderborg Statsskole**

**Forskerkontakt: Dr Kasper Rasmussen - University of Dundee**



## INDHOLD

Indledning .....	2
Afgræsning og problemformulering .....	3
Baggrund og teori.....	3
TET-enzymene.....	3
TETi76.....	4
WT1 og TET2 .....	5
Metoder.....	6
Oprettelse og dyrkning af cellekulturer.....	7
5-hmC bestemmelse ved dot blot assays .....	7
LC50 bestemmelse.....	8
Fremgangsmåde og budget .....	9
Budget: .....	10
Konklusion .....	10
Tak.....	11
Referencer .....	11
Figurer.....	13
Bilag.....	14
Bilag 1: Dot blot protokol.....	14
Bilag 2: Kommentarer til dot blot protokol .....	16



## INDLEDNING

I 1922 opdagede den amerikanske videnskabsmand Calvin Bridges at visse fænotyper aldrig blev observeret samtidigt i *Drosophila Melanogaster* fluer. I dag ved vi at disse fænotyper skyldes mutationer, og Bridges var dermed den første til at opdage princippet om syntetisk letalitet, der omhandler at en kombination af to bestemte mutationer er dødeligt for en celle, mens mutationerne hver for sig ikke er [1]. For ca. 20 år siden blev det foreslået at princippet om syntetisk letalitet kunne bruges til at udvikle nye kræftterapier, ved at identificere syntetisk letale genpar, hvor det ene gen ofte er muteret i kræftceller. Hvis produktet af det andet gen kan hæmmes, er det dermed muligt selektivt at dræbe kræftceller med disse mutationer [2]. Syntetisk letalitet er en af grundene til at gener kan være muteret gensidigt eksklusivt i kræft, dvs. at samtidige mutationer af to gener er meget sjældne. Derudover kan dette også skyldes princippet om functional redundancy, nemlig at to gener virker i samme pathway, og at en mutation i det første gen vil have samme konsekvens som en mutation i det andet gen. Dermed er der ikke nogen fordel for en kræftcelle at have begge mutationer [3]. Et eksempel på to gener der er muteret gensidigt eksklusivt indenfor kræft, er generne for det epigenetiske enzym TET2 og transskriptionsfaktoren WT1, der er muteret gensidigt eksklusivt indenfor kræftformen Acute Myeloid Leukemia (AML) [4-5]. Dette projekt handler om at undersøge om TET2 og WT1 er muteret gensidigt eksklusivt på grund af functional redundancy eller syntetisk letalitet. Dette kunne have betydning for behandling af patienter med WT1 mutationer, som forekommer i 6-15% af AML-patienter, og er associeret med en værre overlevelseschance og større resistens mod kemoterapi [6].



## AFGRÆSNING OG PROBLEMFORMULERING

Dette projekt undersøger hvorfor WT1 og TET2 er muteret gensidigt eksklusivt i kræftformen AML. For at undersøge dette vil jeg behandle AML-kræftceller som har lave eller høje niveauer af WT1 med TET-inhibitoren TETi76, og bestemme LC50 (Den koncentration, hvor halvdelen af cellerne er døde). Hvis TETi76 viser sig at være bedre til at dræbe eller hæmme væksten af cellerne med lave WT1 niveauer, vil dette være et tegn på at WT1 og TET2 er muteret gensidigt eksklusivt pga. syntetisk letalitet. Min problemformulering lyder dermed:

"Vil behandling med TET-inhibitoren TETi76 være syntetisk letalt overfor AML-kræftceller med lave niveauer af transskriptionsfaktoren WT1?"

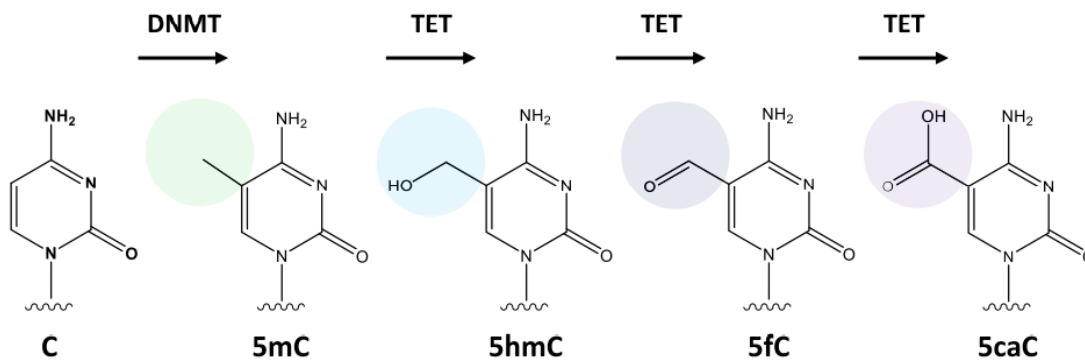
Da det er meget sikkert at generne for de to proteiner er muteret gensidigt eksklusivt, men ikke er sikkert at de to proteiner virker i samme pathway og der dermed er mulighed for functional redundancy, er min hypotese at behandling med TET-inhibitoren TETi76 vil være syntetisk letalt overfor AML-celler med lave niveauer af WT1, og at de to proteiner dermed er muteret gensidigt eksklusivt fordi samtidige mutationer af disse to gener er dødeligt for cellen (syntetisk letalitet).

## BAGGRUND OG TEORI

### TET-enzymene

Methylering af DNA-basen cytosin er en af de mest undersøgte epigenetiske modifikationer. DNA methylering faciliteres af DNA methyltransferase enzymer (DNMT), og er forbundet med en lavere aktivitet af det pågældende gen [7]. DNA-methylering blev anset som en permanent epigenetisk ændring, og det var derfor overraskende da man i 2009 opdagede at det såkaldte TET1 protein kan oxidere 5-methylcytosin til 5-hydroxymethylcytosin [8]. Siden hen har man i alt identificeret 3 TET-enzymene (TET1, TET2, TET3). Disse er ikke kun i stand til at oxidere 5-methylcytosin (5-mC) til 5-hydroxymethylcytosin (5-hmC), men faciliterer også den videre oxidation af 5-hydroxymethylcytosin til 5-formylcytosin (5-fC) og derefter 5-carboxylcytosin (5-caC). Disse oxidationsprodukter af 5-mC spiller en rolle i både en aktiv

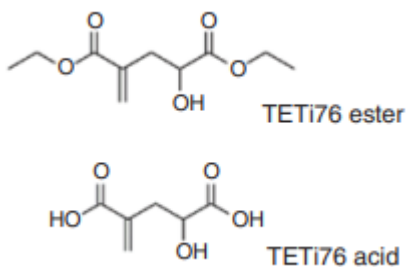
og en passiv demetyleringsproces, hvor cytosin DNA-basen genskabes og det pågældende gen dermed aktiveres igen [9]. Derudover fungerer disse oxidationsprodukter også som egentlige epigenetiske markører, ligesom methylgrupper, hvor 5-hmC generelt er forbundet med aktivering af gener. [10]



Figur 1: TET-enzymernes oxidation af 5-mC

## TETi76

Tidligere i år udviklede et forskerhold en TET-inhibitor, der er i stand til at hæmme TET-enzymernes aktivitet. Ved hjælp af computermødelles udviklede de en række stoffer der var i stand til at hæmme enzymernes aktivitet, men molekylet som de valgte at kalde TETi76 (se figur 2), viste sig at være mest effektiv. [11]



Figur 2: Struktur af TETi76



## WT1 og TET2

TET2 udfører omkring 60% af TET-enzymernes arbejde i hæmatopoietiske celler, og er derfor det TET-enzym der oftest er muteret i forskellige former for leukæmi, som fx AML [11]. TET2 mutationer fører til ophobning af 5-mC og nedsatte niveauer af 5-hmC og forstyrrer den normale differentiering af blodceller [11].

Wilms Tumor Protein 1 (WT1) er en transskriptionsfaktor der originalt har fået sit navn da dette protein er muteret i ca 20% af patienter med Wilms tumor (nephroblastoma) [6]. WT1 er dog også muteret i AML, og i 2014 observerede man at dette gen er muteret gensidigt eksklusivt med genet for enzymet TET2 [4]. Det er derudover blevet vist at WT1 og TET2 kan binde sig til hinanden og at WT1 hjælper med at lokalisere TET2 til DNA, og at WT1 proteinet dermed indirekte regulerer TET2s aktivitet [4-5]. Ud fra disse resultater er de to gener muteret gensidigt eksklusivt fordi en mutation i WT1 genet vil have samme konsekvens som en mutation i TET2 genet, nemlig nedsat aktivitet af TET2 enzymet. Proteinerne virker dermed i samme pathway, og det vil ikke være en fordel at begge gener er muteret i samme celle for udviklingen af AML. Dvs. ifølge denne forklaring er generne muteret som de er pga. functional redundancy [5]. Min forskerkontakt Kasper Rasmussen er dog skeptisk om interaktionen mellem WT1 og TET2 overhovedet finder sted og hvis hvilken betydning dette har. Nogle af metoderne brugt i artiklerne hvor de påviser interaktionen mellem TET2 og WT1 er nemlig associeret med mange fejlkilder ifølge min forskerkontakt, og han har aldrig selv set denne interaktion i hans eksperimenter. Der er dermed mulighed for at TET2 og WT1 er muteret gensidigt eksklusivt fordi samtidige mutationer af disse gener er en ulempe eller endda dødeligt for cellen (syntetisk letalitet), og at dette er uafhængigt af en interaktion mellem disse to proteiner. Grundlaget for TET2s og WT1s interaktion og dets betydning for udviklingen af kræft er nemlig ikke så stærk, mens det er meget sikkert at disse to gener er muteret gensidigt eksklusivt.



## METODER

For at undersøge min problemformulering vil jeg behandle to cellelinjer (En med lav og en med høj WT1 expression) med TET-inhibitoren TETi76 og sammenligne LC50 (Den koncentration af TETi76, hvor 50% af cellerne er døde). Hvis det viser sig at LC50 værdien er lavere hos cellerne med lave niveauer af WT1, er dette et tegn på at generne for WT1 og TET2 er muteret gensidigt eksklusivt pga. syntetisk letalitet. TETi76 nedsætter nemlig TET-aktiviteten og skaber en fænotype der minder om fænotypen man ser ved en TET2 mutation [11].

Derudover vil jeg udføre dot blot assays for at måle 5-hmC niveauerne i de to cellelinjer med og uden behandling af TETi76. Dot blot assays udføres for at bekræfte at TETi76 hæmmer TET-enzymernes aktivitet, da 5-hmC niveauerne så burde falde.

Projektet har til hensigt at bidrage med at forbedre behandling for patienter med WT1 mutationer. Da WT1 mutationer observeret i AML fører til tabet af proteinets zinc finger domain som er nødvendigt for at proteinet kan binde sig til DNA, eller fører til at proteinet slet ikke udtrykkes [6], er det rimeligt at bruge celler med forskellige niveauer af WT1 i stedet for WT1 muterede celler.

De to cellelinjer jeg skal arbejde med, skal helst være nært beslægtede, men med forskellige niveauer af WT1 proteinet. Ud fra disse kriterier har jeg valgt at arbejde med K-562 og NOMO-1 cellelinjerne. Disse to cellelinjer har nemlig henholdsvis høje og lave niveauer af WT1 proteinet [12-13]. Hos K-562 er dette bekræftet både ved at kigge på mRNA og protein niveauer, mens det kun er bekræftet via mRNA niveauer i NOMO-1 cellerne. Cellerne er begge AML kræftcellelinjer, og er dermed begge myeloide celler. Da jeg bestemmer og sammenligner LC50 værdier for to forskellige cellelinjer, betyder dette at der er nogle usikkerheder ved dette, som fx hvis den ene cellelinjer vokser hurtigere end den anden. Hvis man skulle udføre et større projekt, ville det derfor være mere optimalt fx at lave en RNAi knockdown af WT1.



## Oprettelse og dyrkning af cellekulturer

De to cellelinjer jeg har valgt at arbejde med, er begge hæmatopoietiske celler, og skal derfor dyrkes i suspension culture, dvs. cellerne skal dyrkes i et flydende vækstmedie. Til begge cellelinjer skal der benyttes samme vækstmedie, og derudover skal de inkuberes ved samme temperatur og Co<sub>2</sub> koncentration (37 grader celsius og 5% Co<sub>2</sub>). Cellerne bestilles fra Leibniz Institute DSMZ og leveres i frossen tilstand. Som første skridt skal cellerne derfor optøs efter protokollen angivet i [14]. Efter oprettelsen af cellekulturerne undersøges cellerne under mikroskopet for at tjekke cellernes tilstand og for at lede efter tegn på kontamination. Efter en dag undersøges cellerne igen. For at sikre at cellerne ikke overskrider den optimale koncentration der er angivet for den specifikke cellelinje, tælles cellerne jævnligt ved hjælp af trypan blue exclusion som beskrevet i [15]. Når nødvendigt oprettes der nye kolonier som beskrevet i [16]. Cellerne dyrkes i T-75 culturing flasks.

## 5-hmC bestemmelse ved dot blot assays

For at sammenligne 5-hydroxymethylcytosin niveauerne af de to cellelinjer før og efter behandling med TETi76 vil jeg gøre brug af dot blot assays. Grunden til at jeg har valgt denne metode er at den er velegnet til at sammenligne globale 5-hmC niveauer og derudover er nem og billig at udføre. En af ulemperne ved metoden er at den ikke er særlig kvantitativ [17], men da formålet med dette forsøg er at bestemme og sammenligne globale 5-hmC niveauer, er dette ikke en større ulempe.

DNAet ekstraheres fra cellerne ved brug af produktet "monarch gDNA purification kit" og den tilhørende protokol. Selve dot blot analysen udføres efter protokollen vist i bilag 1 som er specifik for min forskerkontakt Kaspers laboratorie. I bilag 2 har jeg lavet en række noter der uddyber og forklarer de forskellige trin.

Dot blot assays minder meget om andre blotting teknikker, og gør også brug af immunodetection til at identificere det ønskede stof (fx et protein eller en DNA-modifikation). Efter at ens prøve er blevet immobiliseret på en membran, inkuberes prøven med et primært antistof. Dette primære antistof er specifikt for det stof man leder efter, og i mit forsøg bruger jeg derfor et 5-hmC antistof. Efter det primære antistof har bundet sig, inkuberer man prøven med et sekundært antistof. Dette sekundære antistof skal anse det primære antistof

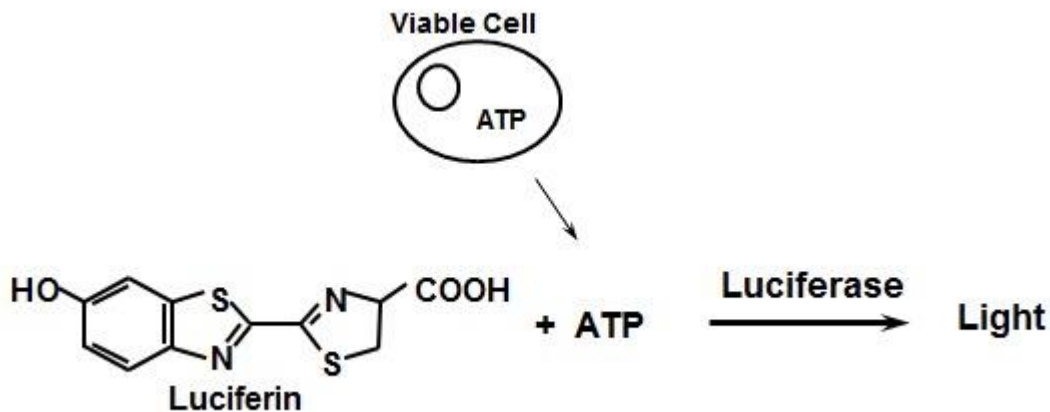




som en epitop, dvs dets Fab region binder sig til det primære antistofs Fc region. Da Fc regioner ikke ændrer sig fra dyreart til dyreart, kan man bruge et slags sekundært antistof mod mange forskellige primære antistoffer. I mit forsøg bruger jeg et rabbit 5-hmC antistof og mit sekundære antistof er derfor et Goat Anti-Rabbit antistof. Udover at binde sig til det primære antistof, er det sekundære antistof også koblet til enzymet horseradish peroxidase (HRP). Ved tilførsel af en ECL (Enhanced Chemiluminescence) reagent, som fungerer som substrat for enzymet, opstår der et lyssignal der kan detekteres og bruges til bestemmelse af 5-hmc niveauerne [17-18].

## **LC50 bestemmelse**

For at bestemme LC50 vil jeg behandle de to cellelinjer med forskellige koncentrationer af TETi76 i løbet af 3 dage. For at få en ide om hvilke koncentrationer jeg skal afprøve, vil jeg først udføre et pilotforsøg, hvor jeg tager udgangspunkt i allerede bestemte LC50 værdier for TETi76 [11]. Ud fra de forskellige koncentrationer brugt og antallet af celler der dør, kan LC50 værdien udregnes. For at bestemme antallet af celler der dør i løbet af de 3 dage, vil jeg gøre brug af promedias "celltiter-glo luminescent viability assay". Disse assays bestemmer antallet af levende (viable) celler, ved at måle mængden af ATP tilstede. Når en celle dør og dens membran bliver beskadiget, mister cellen evnen til at producere ATP og ATPase enzymerne opbruger hurtigt den resterende mængde ATP. Celltiter-glo blandingen indeholder et stof til nedbrydning af cellernes membran, en ATPase inhibitor og enzymet luciferase, der skaber et lyssignal i en reaktion med cellernes ATP og stoffet Luciferin. Dette lyssignal kan derefter opfanges af et luminometer og antallet af viable cells kan bestemmes. Assays udføres som beskrevet i [19]. Disse forsæg udføres i 96-well plates.



Figur 3: Virkemåden af Celltiter-glo assays.

Jeg har valgt denne metode til at bestemme antallet af levende celler da disse assays er billige, nemme at udføre med få fejlkilder sammenlignet med andre viability assays [19].

## FREMGANGSMÅDE OG BUDGET

Projektet udføres i min forskerkontakt Kasper Rasmussens laboratorie ved University of Dundee, hvor alt nødvendigt apparatur står til rådighed.

Projektet kommer til at tage ca. 2 uger at udføre. Første uge bruges på at fremdyrke mine cellekulturer som beskrevet tidligere. Når jeg efter ca. en uge har nok celler at arbejde med, starter jeg med LC50 pilotforsøget, ved at udtage celler fra cellekulturen og fordele disse i 8 grupper. Cellerne behandles med forskellige koncentrationer af TETi76 i en periode på 3 dage. Et estimat for hvilke koncentrationer jeg skal afprøve i pilotforsøget, finder jeg i [11], hvor forskellige LC50 værdier for TETi76 er blevet bestemt. Dagen efter udtages celler af hver cellelinje fra den oprindelige cellekultur. Disse behandles med TETi76 i 24 timer, hvorefter dot blot assays bliver udført både med DNA fra cellerne der er blevet behandlet med TETi76 og celler der ikke er blevet behandlet med TETi76. Efter 3 dage bestemmes antallet af levende celler i LC50 pilotforsøget, og ud fra disse resultater kan den egentlig bestemmelse af LC50 værdierne forberedes. 8 grupper af celler af hver cellelinje behandles her med 7 forskellige koncentrationer af TETi76 i 3 dage, hvor den sidste gruppe fungerer som kontrol. For at opnå statistisk signifikans udføres forsøget i tripliket.

**Budget:**

Indkøbssted	Produkt	Pris (DKK)
DSZM	K562 celler	2975
DSZM	NOMO-1 celler	2975
Sigma Aldrich	Vækstmedie	1280
New England Biolabs	Monarch gDNA purification kit	997
Sigma Aldrich	Hybond XL-Membran	2940
Active Motif	Rabbit 5-hmC primary antibody	855
Santa Cruz Biotechnology	Secondary antibody	558
Sigma Aldrich	Methylene blue	200
gbiosciences	SSC Buffer (20x)	155
Aniara	SSC Buffer (2x)	415
Promega	TE-buffer	387
Sigma Aldrich	Ammonium acetate	470
Cyanagen	ECL reagent	781
Promega	Celltiter-glo viability assay	964
Sigma Aldrich	Cell culture flasks (Eppendorf T-75)	787
Fisher Scientific	96-well plates	2210
Pris i alt		18949

TETi76 er ikke et stof der er kommercielt tilgængeligt, men min forskerkontakt er i kontakt med forskerne der har udviklet molekylet, og de er i gang med at underskrive en MTA (Materials Transfer Agreement) omkring at han kan modtage noget af stoffet.

**KONKLUSION**

På baggrund af resultaterne af beskrevne eksperiment, kan det vurderes om TET2 og WT1 er muteret gensidigt eksklusivt fordi proteinerne virker i samme pathway og der ikke er



fordel ved mutationer i begge gener (functional redundancy), eller om samtidige mutationer af disse gener sjældent ses fordi disse celler vil have en ulempe i forhold til andre celler, eller dør helt ud (syntetisk letalitet). Da det ikke er sikkert at TET2 og WT1 interagerer, men det er meget sikkert at de to gener er muteret gensidigt eksklusivt, forventer jeg at TETi76 vil hæmme væksten eller dræbe cellerne med lave niveauer af WT1 i større grad sammenlignet med cellerne der udtrykker højere niveauer af WT1. Hvis generenes mutationsmønster skyldes syntetisk letalitet kan dette have betydning for behandling af AML-patienter med WT1 mutationer, da det så ville være muligt dræbe disse kræftceller, fx via behandling med en TET-inhibitor som TETi76, eller andre behandlingsformer der efterligner effekten af en TET2 mutation. Det ville være oplagt at forske videre ved brug af RNA-interferens eller CRISPR genome editing for at kunne sammenligne effekten af behandling med TETi76 på samme cellelinje, frem for at skulle bruge to forskellige cellelinjer.

## TAK

Mange tak til min forskerkontakt Kasper Rasmussen for vejledning, svar på mine mange spørgsmål og hjælp med at finde relevant litteratur. Uden ham ville projektet ikke have været muligt.

Forskerkontakt: Dr Kasper Rasmussen, Principal Investigator, School of life sciences, University of Dundee.

## REFERENCER

[1] Huang, A., Garraway, L.A., Ashworth, A. *et al.* Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nat Rev Drug Discov* **19**, 23–38 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0046-z>

[2] Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science*. 1997 Nov 7;278(5340):1064-8. doi: 10.1126/science.278.5340.1064. PMID: 9353181.



- [3] Peter J. Campbell. Cliques and Schisms of Cancer Genes. *Cancer Cell*. Volume 32, Issue 2. 2017. Pages 129-130. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.009>.
- [4] Rampal R, Alkalin A, Madzo J, et al. DNA hydroxymethylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia. *Cell Rep*. 2014;9(5):1841-1855. doi:10.1016/j.celrep.2014.11.004
- [5] Wang Y, Xiao M, Chen X, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Mol Cell*. 2015;57(4):662-673. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.023
- [6] Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(6):672-679. doi:10.3324/haematol.2015.141796
- [7] Moore, L., Le, T. & Fan, G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* **38**, 23–38 (2013). <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- [8] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-935. doi:10.1126/science.1170116
- [9] Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 2016;30(7):733-750. doi:10.1101/gad.276568.115
- [10] Sardina JL, Graf T. A new path to leukemia with WIT. *Mol Cell*. 2015;57(4):573-574. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.005
- [11] Guan Y, Tiwari AD, Phillips JG, et al. A Therapeutic Strategy for Preferential Targeting of TET2 Mutant and TET-dioxygenase Deficient Cells in Myeloid Neoplasms. *Blood Cancer Discov*. 2021;2(2):146-161. doi:10.1158/2643-3230.BCD-20-0173
- [12] Pons M, Reichardt CM, Hennig D, et al. Loss of Wilms tumor 1 protein is a marker for apoptosis in response to replicative stress in leukemic cells. *Arch Toxicol*. 2018;92(6):2119-2135. doi:10.1007/s00204-018-2202-3



[13] Broad institute cancer dependency map, expression 21q3 dataset:

[https://depmap.org/portal/interactive/?filter=&regressionLine=false&associationTable=false&x=slice%2Fexpression%2F37157%2Fentity\\_id&y=slice%2Fexpression%2F40822%2Fentity\\_id&color=](https://depmap.org/portal/interactive/?filter=&regressionLine=false&associationTable=false&x=slice%2Fexpression%2F37157%2Fentity_id&y=slice%2Fexpression%2F40822%2Fentity_id&color=)

[14] Suggestions for handling cultures on receipt:

<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/human-and-animal-cell-lines/culture-technology/suggestions-for-handling-cultures-on-receipt>

(Besøgt den 20.10.21)

[15] Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3.B.1-A3.B.3. Published 2015 Nov 2. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111

[16] Cell culture protocol 5: Subculture of suspension cell lines

<https://www.sigmaaldrich.com/DK/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/subculture-of-suspension>

(Besøgt den 20.10.21)

[17] Tomasz P. Jurkowski. Chapter Thirteen - Technologies and applications for the assessment of 5-hydroxymethylcytosine. In *Translational Epigenetics, Epigenetics Methods*. Academic Press. Volume 18. 2020. Pages 261-278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819414-0.00013-6>.

[18] Introduction to secondary antibodies. Thermo Fisher Scientific:

<https://www.thermofisher.com/dk/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/introduction-secondary-antibodies.html>

(Besøgt den 22.10.21)

[19] Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; May 1, 2013.

## FIGURER



### Figur 1:

Tomasz P. Jurkowski. Chapter Thirteen - Technologies and applications for the assessment of 5-hydroxymethylcytosine. In *Translational Epigenetics, Epigenetics Methods*. Academic Press. Volume 18. 2020. Pages 261-278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819414-0.00013-6>.

### Figur 2:

Guan Y, Tiwari AD, Phillips JG, et al. A Therapeutic Strategy for Preferential Targeting of TET2 Mutant and TET-dioxygenase Deficient Cells in Myeloid Neoplasms. *Blood Cancer Discov.* 2021;2(2):146-161. doi:10.1158/2643-3230.BCD-20-0173

### Figur 3:

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; May 1, 2013.

## BILAG

### Bilag 1: Dot blot protokol

#### Introduction

Use Monarch gDNA purification kit to get the gDNA before starting the dot blot.

#### Materials

- › 2X SSC
- › 10-fold dilution of 20X SSC
- › Methylene blue stain solution
- › 0.02% Methylene blue (w/v) in 300mM sodium acetate (pH 5.2)
- › Equipment:
  - › Bio-dot apparatus
  - › TE buffer
  - › 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA
  - › 0.8M NaOH in water (make fresh each time)
  - › 2M Ammonium acetate in water
  - › PBS-T (0.1%)
  - › Hybond-XL membrane (7.5 x 11 cm<sup>2</sup>)



## Procedure

### Preparing the DNA for samples

1. Aliquot 4ug of gDNA into eppendorf tube.
2. Add TE buffer to a total of 100 µl.
3. Sonicate DNA for 20 cycles (15sec on, 30 sec off, low setting) at 4°C.
4. To denature the sonicated DNA, add 100ul of fresh 0.8M NaOH and incubate for 10min at 99°C.
5. Cool on ice and add 200ul of 2M Ammonium Acetate (pH 7) to neutralize.
6. Make two fold dilutions of DNA starting from 2000 ng
7. For each dilution, add 2X SSC to a total volume of 200ul

### Spotting the DNA on the membrane

8. Pre-wet the membrane by placing the membrane gently into a tray of the 2X SSC solution.
9. Assemble the Bio-Dot apparatus. Apply the vacuum and then retighten the screws that hold the apparatus together.
10. Switch off the vacuum. Load the samples to each well (200ul). Fill all the rest wells with 200ul 2X SSC.
11. Adjust the flow value to setting 3 (the manifold is exposed to both air and the vacuum). Switch on the vacuum. Use a finger to cover the value port exposed to air. The amount of vacuum reaching the manifold will be regulated by the pressure of your finger on the value.
12. After all the sample has filtered through, switch off the vacuum, disassemble the Bio-Dot apparatus. Could use P200 tips to pipette the wells only contain 2X SSC to ensure all the liquid has filtered through.
13. Crosslink DNA at 1200 x 100 µj/cm<sup>2</sup> (i.e. 1200 on display) with UVC (254 nm bulbs)

### Methylane blue stain

14. Soak the baked membrane in PBS-T (0.1%)
15. Cut excess off the membrane
16. Stain the membrane in 0.02% methylene blue in 0.3M sodium acetate for 2-3 min.
17. Destain in deionized water for several washes until the membrane is not very blue
18. Place the membrane in a polypocket and scan the membrane with Scanner in Ellis office
19. Wash the membrane for 5min in 2X SSC
20. Wash the membrane for 5min in PBS-T (0.1%)

### Blocking and incubating with primary and secondary antibody

21. Block the membrane in PBS-T (0.1%) containing 10% BSA at least for 1 hour. Block as long as you can.
22. Incubate with primary antibody overnight (cold room)  
anti-5hmC - (1:1000 - Active motif)  
In PBS-T (0.1%) containing 10% BSA and NaAz (from firdge)
23. Wash the membrane for 10min in PBS-T (0.1%), repeat three times
24. Incubate with HRP-labelled secondary antibody (1:10.000 in blocking solution) for 1h  
Anti-Rabbit for 5hmC  
1ul anti-rabbit in PBS-T (0.1%) containing 10% milk





25. Wash the membrane for 10min in PBS-T (0.1%), repeat 4 times

26. Detect with ECL reagent

## **Bilag 2: Kommentarer til dot blot protokol**

TE-buffer: Blanding af tris(hydroxymethyl)aminomethane (en pH buffer) og Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Denne opløsning bruges som pH puffer og til at gøre DNA mere opløseligt og samtidigt beskytte DNAet.

Crosslinking: Behandling med UV-lys gør at DNA-prøverne binder sig bedre til membranen.

PBS-T: Phosphate buffered saline med polysorbate 20. Bruges hovedsageligt til at vaske membranen, fx for at vaske de antistoffer væk, som ikke har bundet sig og ville resultere i et falsk signal.

Methylene Blue stain: Methylene Blue stain udføres som kontrol, for at sikre sig at man har loadet membranen jævnt med DNA.

BSA: Bovine Serum Albumin. Membranen blokeres med dette protein da det binder sig til non specific binding sites, for at undgå at ens primære og sekundære antistoffer binder sig til andet end hvad de burde.