Aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. R. Ackermann

Interaktion genetischer und epigenetischer Veränderungen in Karzinomen des Harntraktes

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Andrea Regina Florl
aus Oberhausen

Düsseldorf
2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Auch als elektronische Version im Katalog der Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität verfügbar:
http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/Mathematisch-Naturwissenschaftliche/2002/Florl.pdf

Referent:	Prof. Dr. W.A. Schulz
Korreferent:	Prof. Dr. U. Rüther

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2002

Die Sorge um den Menschen selbst und sein Schicksal muss stets das Hauptanliegen aller fachwissenschaftlichen Bestrebungen bilden ...

Das sollte man mitten unter seinen Diagrammen und Gleichungen nie vergessen.

Albert Einstein (1879-1955)

Für meine Eltern.

1 EINLEITUNG 1
1.1 DNA-Methylierung als epigenetische Veränderung 1
1.2 Funktion der DNA-Methylierung 2
1.3 Veränderung der DNA-Methylierungsmuster in Tumoren 5
1.4 Das Harnblasenkarzinom 6
1.4.1 Molekularbiologische Veränderungen 8
1.5 Zellzyklusregulation 10
1.6 Der CDKN2-Locus auf Chromosom 9 12
1.7 Das Nierenzellkarzinom 14
1.7.1 Molekularbiologische Veränderungen 14
1.8 Ziel der Arbeit 15

2 MATERIAL UND METHODEN 16
2.1 Humane Zellinien und ihre Kultivierung 16
2.1.1 Harnblasenkarzinom-Zellinien 16
2.1.2 Nierenkarzinom-Zellinien 17
2.2 Gewebeproben 18
2.3 Blutproben 18
2.4 Vektoren 18
2.4.1 Plasmide 18
2.4.2 Cosmide und BACs 19
2.5 Bakterien 19
2.5.1 Bakterienstämme und ihre Anzucht 19
2.5.2 Transformation kompetenter One Shot TOP10 / TOP10F' Zellen 19
2.5.2.1 Blau-Weiß-Selektion 20
2.6 Chemikalien 20
2.7 Enzyme 21
2.8 Antikörper 22
2.9 Molekularbiologische Kits 22
2.10 Medien, Puffer und Lösungen 23
2.10.1 Bakterienmedien 23
2.10.2 Standardlösungen 23
2.10.3 Lösungen Western-Blot 24
2.10.4 Lösungen Southern-Blot: 26
2.10.5 Lösungen Polyacrylamid-Gele 26
2.11 Spezielle Materialien und Geräte 27
2.12 Software 28

2.12.1 Programme 28
2.12.2 Datenbanken 28
2.13 Sequenzen 28
2.13.1 Oligonukleotidprimer 28
2.13.2 Hybridisierungssonden 32
2.14 Isolierung von Nukleinsäuren 33
2.14.1 Plasmid-DNA 33
2.14.1.1 Minipräparation 33
2.14.1.2 Midi- / Maxipräparation 33
2.14.2 BAC-DNA 33
2.14.3 Genomische DNA 33
2.14.3.1 Kulturzellen 33
2.14.3.2 Gewebe 34
2.14.3.3 EDTA-Blut 34
2.14.4 RNA-Präparation aus Kulturzellen 34
2.15 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösungen 35
2.16 Enzymatische Reaktionen 35
2.16.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen 35
2.16.2 Klonierung von DNA-Fragmenten 35
2.16.2.1 Vektordephosphorylierung 35
2.16.2.2 Ligation 36
2.16.3 Klonierung von PCR-Produkten 36
2.17 Gelelektrophoretische Methoden 36
2.17.1 DNA-Agarosegelelektrophorese 36
2.17.2 Polyacrylamidgelelektrophorese 36
2.17.2.1 Native Polyacrylamidgele 36
2.17.2.2 SSCP-Gele 37
2.17.2.3 Sequenziergele 37
2.17.2.4 Gele zur Mikrosatelliten- und Deletions-Analyse 37
2.18 Isolierung von DNA-Fragmenten 38
2.18.1 Isolierung aus Agarosegelen 38
2.18.2 Isolierung aus Polyacrylamidgelen 38
2.19 Southern-Blot 38
2.19.1 Alkalischer Transfer für radioaktive Hybridisierung 38
2.19.2 Transfer mit Hochsalzpuffer für Digoxigenin Hybridisierung 38
2.20 Herstellung markierter Sonden 39
2.20.1 Radioaktive Markierung mittels Random priming 39
2.20.2 Digoxigeninmarkierung durch PCR 39
2.21 Hybridisierung 39
2.21.1 Hybridisierung mittels radioaktiver Sonde 39

2.21.2 Hybridisierung mittels Digoxigenin-markierter Sonde 40
2.22 Nachweis der markierten DNA 40
2.22.1 Autoradiographie 40
2.22.2 Luminographische Detektion von DIG-11-dUTP 40
2.23 Polymerase-Kettenreaktion 41
2.23.1 Standard-Protokoll 41
2.23.2 Mikrosatelliten-Analyse 41
2.23.3 Untersuchung auf homozygote Deletionen 42
2.23.4 Mutationsanalyse mittels SSCP 43
2.23.5 Restriktions-Assay 43
2.24 DNA-Analyse mittels Bisulfit 44
2.24.1 Bisulfitumwandlung 44
2.24.2 Methylierungs-spezifische-PCR (MS-PCR) 44
2.24.3 Bisulfitsequenzierung 44
2.25 Vectorette-Klonierung 45
2.25.1 Erstellung von Vectorette-DNA-Bibliotheken 45
2.25.2 Long-Range-PCR 45
2.26 Sequenzierung 46
2.27 Reverse Transkription 46
2.28 Proteinanalyse-Verfahren 47
2.28.1 Herstellung von Zellysaten für die Proteinanalyse 47
2.28.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 47
2.28.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 47
2.28.4 Western Blot 47
2.28.5 Immunodetektion 48

3 ERGEBNISSE 49
3.1 Molekulare Charakterisierung des CDKN2-Locus in Harnblasenkarzinomen 49
3.1.1 Untersuchung auf Verlust der Heterozygotie 50
3.1.2 Nachweis von homozygoten Deletionen 55
3.2 Methylierungsanalyse des CDKN2A-Gens 57
3.2.1 Restriktions-Assay 57
3.2.2 Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR) 59
3.2.3 Bisulfitsequenzierung 60
3.3 Mutationsanalyse des CDKN2A-Gens 62
3.4 Korrelation Verlust CDKN2A / LINE1-Hypomethylierung 63
3.5 PCR-Analyse des CDKN2-Locus in humanen Karzinomzellinien 64

3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierungs-Analyse (FISH) 67
3.7 Klonierung der Chromosom 9p Deletionsenden in Karzinom-Zellinien 69
3.7.1 Strategien zur Herstellung geeigneter Hybridisierungssonden 69
3.7.2 Amplifikation einer Vectorette-Bibliothek 73
3.7.3 Weitere Bruchpunktanalysen 76
3.8 Expressions-Analyse von Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien 79
3.8.1 Expression des CDKN2A-Gens 79
3.8.2 Expression des Retinoblastom-Gens (RB1) 80
3.8.3 Expression des MTAP-Gens 83
3.9 DNA-Methylierungsanalysen in Nierenkarzinom-Zellinien 85
3.9.1 Genomweite Hypomethylierung 85
3.9.2 Hypermethylierung des CDKN2A-Gens 87
3.9.3 Hypermethylierung des VHL-Gens 88

4 DISKUSSION 89
4.1 Der CDKN2-Locus im Harnblasenkarzinom 89
4.1.1 Molekulare Charakterisierung 89
4.1.2 Analyse der Promotor-Hypermethylierung 91
4.1.3 Mutationsanalyse 93
4.1.4 Bezug zu anderen genetischen und epigenetischen Veränderungen 94
4.2 Der CDKN2-Locus in humanen Karzinom-Zellinien 95
4.3 Klonierung der Deletionsenden 97
4.4 Expressionsanalyse in Karzinomzellinien 99
4.5 Methylierungsanalyse in Nierenkarzinom-Zellinien 102
4.6 Konsequenzen der Interaktion genetischer und epigenetischer Veränderungen 104

5 ZUSAMMENFASSUNG 106

6 LITERATUR 108

7 ANHANG 123

8 ABKÜRZUNGEN 125

9 DANKSAGUNG 126

1 EINLEITUNG

1.1 DNA-Methylierung als epigenetische Veränderung

Epigenetik bezeichnet das Studium von mitotisch und meiotisch vererbten stabilen Veränderungen der Genexpression, die nicht auf Variationen der DNA-Sequenz begründet sind [Wolffe & Matzke, 1999]. Epigenetische Effekte sind in vielen Eukaryonten bekannt: *Repeat induced gene silencing,* Paramutationen und genomisches Imprinting in Pflanzen, *Mating type und Telomere silencing* in Hefe, *position effect variegation* in Drosophila sowie X-Chromosom–Inaktivierung und genomisches Imprinting in Säugetieren.

Ein wichtiger Mechanismus bei diesen Phänomenen ist die DNA-Methylierung. Darunter wird die physiologische, kovalente Anheftung eines Methylrestes an bestimmte Basen der DNA verstanden. Im Säugergenom ist die Methylierung auf Cytosin-Reste, bevorzugt in der palindromischen Nukleotidabfolge des Dinukleotids CpG, beschränkt. In höheren Pflanzen findet sich die Methylierung zudem in der Sequenz CpNpG [Gruenbaum *et al.*, 1981]. Die Modifizierung des Cytosinrestes erfolgt postreplikativ und wird durch DNA-Methyltransferasen vermittelt, wobei eine Methylgruppe auf das Kohlenstoffatom 5 des Cytosins übertragen wird. Für diesen Methyl-Gruppentransfer wird S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Cofaktor benötigt [Szyf, 1996].

Beim Säugetier liegen 70-80 % aller CpG-Stellen methyliert vor [Razin *et al.*, 1984], das entspricht 2,5-7 % der Cytosin-Reste im Genom [Adams & Burdon, 1985]. Im Laufe der Evolution hat sich der CpG-Anteil in der Wirbeltier-DNA verringert, die Nukleotidfolge CpG tritt etwa nur ein Fünftel so oft auf, wie nach der Basenzusammensetzung erwartet würde. Dieses ist auf häufige Desaminierung von Cytosinresten und deren unzureichende DNA-Reparatur im Falle von Methylcytosin zurückzuführen.

Das Muster der DNA-Methylierung ist spezifisch für jeden Zelltyp und wird im Zuge der Embryonalentwicklung durch drei unabhängige Methyltransferasen etabliert [Bestor, 2000]. Die am besten charakterisierte und am häufigsten in somatischen Zellen zu findende Methyltransferase ist DNMT1. Dieses 193 kDa Protein ist während der S-Phase an den Replikationsorten im Kern (*replication foci*) lokalisiert und interagiert mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einem für die DNA-Replikation und DNA-Reparatur essentiellen Protein [Leonhardt *et al.*, 1993]. DNMT1 wird auch als Erhaltungsmethylase (*maintenance*) angesehen, da sie eine 10-40fach erhöhte Spezifität für hemimethylierte DNA-Sequenzen im Vergleich zu nicht methylierten Sequenzen aufweist [Pradhan *et al.*, 1999]. Sie ist unverzichtbar für die Embryonalentwicklung [Li *et al.*, 1992], das Imprinting [Li *et al.*, 1993, Howell *et al.*, 2001] und die X-Chromosom-Inaktivierung [Beard *et al*., 1995]. Yoder

und Bestor konnten [1998] das DNMT2-Protein charakterisieren, welches in frühen Stadien der Säugetierentwicklung aktiv ist. Eine Transmethylaseaktivität konnte jedoch bislang weder in biochemischen noch in genetischen Test gezeigt werden. Eine Funktion könnte diesem Protein bei der Centromerausbildung zukommen [Bestor, 2000].

In *Drosophila melanogaster*, in der bisher keine CpG-Methylierung sondern nur eine sehr schwache CpT-Methylierung in embryonalen Stadien detektiert werden konnte [Lyko *et al.*, 2000], findet sich neben einem DNMT1-ähnlichen Protein auch ein DNMT2-Homolog [Hung *et al.*, 1999]. Die DNA-Methyltransferase-Aktivität von DNMT2 ist möglicherweise eher spezifisch für eine CpT-Methylierung [Lyko *et al.*, 2000]. Die Homologien in der *Drosophila*-Sequenz bezüglich DNMT1 und DNMT2 werden allerdings von Bestor [2000] kritisch bewertet.

Ebenfalls 1998 konnte eine dritte Gruppe von DNA-Methyltransferasen, bestehend aus DNMT3a und DNMT3b, charakterisiert werden. Diese zeigen eine gleich starke Aktivität gegenüber hemi- und nichtmethylierter DNA [Okano *et al.*, 1998]. Aufgrund dieser Tatsache und den Erkenntnissen aus Mausmodellen werden sie als *de-novo*-Methylasen betrachtet. Mäuse mit einer gezielt eingeführten homozygoten Inaktivierung des DNMT3a-Gens (Knockout-Mäuse) werden zwar lebend geboren, sind jedoch zwergwüchsig und sterben im Alter von vier Wochen. DNMT3b-Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig: Mutierte Embryos zeigen eine große Anzahl an Störungen in ihrer Entwicklung und eine starke Wachstumsbeeinträchtigung beginnend mit dem 9. Tag. Beschränken sich die Mutationen nur auf die C-terminale Domäne des Gens, tritt in den Mäusen eine Demethylierung der centromerischen DNA-Sequenzen auf, ähnlich wie es beim ICF-Syndrom im Menschen zu beobachten ist (vgl. Kapitel 1-3.) [Okano *et al.*, 1999].

1.2 Funktion der DNA-Methylierung

Hinweise auf die Funktion der DNA-Methylierung liefert die Tatsache, daß CpG-Dinukleotide im Säugetiergenom nicht gleichmäßig verteilt sind. Es gibt Abschnitte von einigen hundert Basenpaaren, in denen das Dinukleotid bis zu zehnmal häufiger als sonst vorkommt. Solche CpG-Inseln treten vermehrt in Promotorregionen von Haushaltsgenen auf [Bird, 1986].

Repetitive DNA-Sequenzen, CpG-haltige Satelliten des Heterochromatins, ebenso wie der 5'-untranslatierte und codierende Bereich von inaktiven gewebe- oder entwicklungsspezifischen Genen liegen in somatischen Zellen meist hochmethyliert vor. Insgesamt ergibt sich für viele Gene eine umgekehrte Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression [Doerfler *et*

al., 1983, Adams & Burdon, 1985]. DNA-Methylierung ist meist mit einer Inaktivierung der betroffenen DNA-Sequenzen und einer Transkriptionhemmung assoziiert.

Es werden im wesentlichen zwei Mechanismen unterschieden, welche die Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung erklären können, [Zahava & Cedar, 1997]: Durch Methylierung an CpG-Stellen in Promotorregionen kommt es zum einen zu einer Hemmung der Bindung von bestimmten Transkriptionsfaktoren, welche in ihrer Erkennungssequenz dieses Dinukleotid enthalten. Hierzu zählen u.a. AP-2, CREB, c-Myc/Myn, E2F1, NFkB, ERS-2, HIF1α und PEA-3 [Bergmann *et al*., 1998]. Im Gegensatz dazu binden einige Faktoren methylierungsunabhängig. Die Faktoren Sp1, CTF und YY1 sind beispielsweise nicht sensitiv gegenüber Methylierung [Mostoslavsky *et al*., 1997], andere besitzen ohnehin kein CpG Dinukleotid in ihrer Bindungssequenz [Singal & Ginder, 1999]. Ein anderer Mechanismus der Repression der Transkription erfolgt durch Bindung von Repressorproteinkomplexen, die Methyl-CpGs erkennen; dazu gehören MeCP1 und MeCP2. MBD1, MBD2, MBD3 und MBD4 und MeCP2 bilden eine Familie von Proteinen, die mit hoher Affinität über eine gemeinsame Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) an Methylcytosin binden kann. Sie können mit anderen Proteinen, u. a. mit Histondeacetylasen, assozieren. Durch Deacetylierung der Histonkomplexe wird die DNA im Promotorbereich dichter gepackt und eine Transkriptionshemmung hervorgerufen wird. Die beschriebenen Mechanismen schließen einander nicht aus, vielmehr vermutet man, daß sie synergistisch wirken.

In Prokaryonten nimmt die Methylierung weitere wichtige Funktionen wahr. Zum einen macht sie eine Unterscheidung von Eigen– und Fremd-DNA im Rahmen eines Modifikations-Restriktions-Systems möglich und schützt die DNA vor dem Abbau durch Restriktionsenzyme. Zum anderen ist die vom *dam*-Gen kodierte DNA-Adenin-Methylase für die Markierung des parentalen DNA-Stranges verantwortlich. Dieses ist für das postreplikative Mismatch-Repairsystem von großer Bedeutung, da nur Basen am unmethylierten Strang einer hemimethylierten DNA ausgetauscht werden können. MBD4 könnte eine verwandte Funktion zum *dam*-Gen in Eukaryonten haben [Bellacosa, 2001].

In Eukaryonten wirkt sich die Methylierung ebenfalls nicht nur auf die Transkription aus. Bedingt durch die Größe des Genoms von Säugetieren sind dabei dessen Organisation und differentielle Genexpression von entscheidender Bedeutung.

Hierbei kann die DNA-Methylierung, ähnlich wie bei Prokaryonten, auch als eine Art „Immunantwort“ gegenüber Fremd-DNA auf zellulärer Ebene angesehen werden [Doerfler, 1991; Yoder *et al.*, 1997]. In diesem Sinne konnten Renckens *et al*. [1992] zeigen, daß in transgenen Pflanzen die Transkription fremder DNA durch DNA-Methylierung des

Selektionsmarkers verhindert wird. Aber auch endogene retrotransposable Elemente, wie z.B. Retroviren, LINE1- und Alu-Elemente werden durch *de-novo*-Methylierung inaktiviert und ihre Expression wird unterdrückt. Transponierbare Elemente machen in ihrer Gesamtheit mehr als ein Drittel des menschlichen Genoms aus, wobei LINE1-Sequenzen mehr als 15% des Genoms bilden [Kazazian *et al*., 1998; Li *et al*., 2001]. Unter den LINE1-Kopien sind mehr als 90% aufgrund einer Verkürzung am 5‘-Ende, Nonsens-Mutationen oder sonstiger Veränderungen funktionell inaktiv [Fanning & Singer, 1987]. Wahrscheinlich existieren nur 3.000-4.000 Vollängentranskripten mit einer Größe von ca. 6 kb, von denen wiederum nur etwa 50 aktive Elemente im diploiden menschlichen Genom vermutet werden [Sassaman *et al*., 1997]. Einige dieser aktiven Elemente konnten aufgrund einer *de novo* Insertion in ein aktives Gen isoliert werden, z.B. im myc-Locus in einem Mammakarzinom [Morse *et al*., 1988], im APC-Gen in einem Colonkarzinom [Miki *et al*., 1992] oder in Exon 48 des Dystrophin-Gens [Holmes *et al.*, 1994].

Eine weitere Funktion kommt der DNA-Methylierung beim genomischen Imprintig („elterliche Prägung“) zu. Einige Gene werden durch parentalspezifische Methylierungsmuster kontrolliert und entsprechend exprimiert. Bekanntestes Beispiel sind die auf Chromosom 11p15 benachbart liegenden Gene H19 und Igf2. Sie unterliegen einer entgegengesetzten Prägung, wobei das väterliche Allel des H19-Gen methyliert vorliegt und nur das mütterliche Allel transkribiert wird [Tremblay *et al.*, 1995; Stoger *et al.*, 1993]. Das Igf2-Gen wird dagegen ausschließlich vom väterlichen Allel abgelesen. Dieses festgelegte Methylierungsmuster bleibt während der Gametogenese bestehen, während im Gegensatz dazu nicht geprägte Bereiche des Genoms während der Zellteilung komplett demethyliert werden und im Blastocysten-Stadium einer de novo-Methylierung unterliegen [Jaenisch, 1997; Reik & Walter, 2001].

Eine ähnliche Aufgabe hat die DNA-Methylierung bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms im weiblichen Organismus, zum Ausgleich der Gendosen. Ausgehend vom *X-chromosome-inactivation center* (Xic) wird das Xist-Gen auf dem später inaktiv vorliegenden X-Chromosom exprimiert. Das Xist-RNA-Transkript akkumuliert im Zellkern und führt durch einen bisher noch nicht völlig verstandenen Mechanismus zur Kondensierung des Chromatins und zur DNA-Methylierung. Diese dauerhafte Inaktivierung des X-Chromosom wird im späten Blastozystenstadium eingeleitet [Heard *et al.*, 1997; Avner *et al*., 2001].

1.3 Veränderung der DNA-Methylierungsmuster in Tumoren

Cytosin und Methylcytosin gehen durch hydrolytische Desaminierung am Kohlenstoffatom C4 spontan oder chemisch induziert in Uracil bzw. in Thymin über. Das Reparaturenzym Uracil-DNA-Glycosylase erkennt das Uracil als veränderte Base, so daß es durch ein Cytosin ersetzt werden kann. Der fälschlich eingebaute Thymin-Rest dagegen wird als normaler Bestandteil der DNA von der Thymin-DNA-Glycosylase nicht derartig effizient ausgetauscht [Laird & Jaenisch, 1994]. Dieses ist der häufigste Mechanismus, der zur Entstehung von Punktmutationen führt. 24% aller Mutationen im p53-Gen in menschlichen Tumoren beruhen auf der Transition von CpG nach TpG oder CpA [Magewu & Jones, 1994; Hollstein *et al.*,1998].

In der Onkogenese spielen eine generelle Verminderung der DNA-Methylierung (Hypomethylierung) wie auch eine abschnittsweise Erhöhung der DNA-Methylierung (Hypermethylierung) eine wichtige Rolle. Beide Mechanismen könne dabei getrennt voneinander oder aber auch in Kombination auftreten. Eine Verringerung der DNA-Methylierung tritt sowohl bei einer genomweiten Hypomethylierung als auch bei der spezifischen Hypomethylierung von Proto-Onkogenen, wie beispielsweise bcl-2 in Leukämien [Hanada *et al.*, 1993] und k-ras in Lungen- und Colonkarzinomem [Feinberg & Vogelstein, 1983[A]] auf. Dieses steht in einem Gegensatz zur Hypermethylierung der Promotoren von Tumorsuppressor- und anderen Genen (Übersicht siehe Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1. Geninaktivierungen durch Promotorhypermethylierung.

Gen	***Tumortyp***	***Referenz***
CDKN2A	Melanom, Lymphom	Gonzalgo *et al*., 1997; Myohanen *et al*., 1998
CDKN2B	Leukämie	Botava *et al.*, 1997
RB1	Retinoblastom	Greger *et al.*, 1989; Ohtani-Fujita *et al.*, 1997
VHL	Nierenzellkarzinom	Prowse *et al.*, 1997
hMLH1	Colonkarzinom	Herman *et al.*, 1998; Veigl *et al.*, 1998
APC	Colonkarzinom	Hiltunen *et al.*, 1997
BRCA1	Brustkrebs	Esteller *et al*., 2001
E-cadherin	Brustkrebs, Prostatakarzinom	Graff *et al.*, 1995
pTEN	Prostatakarzinom	Rennie & Nelson 1998
GSTP1	Prostatakarzinom	Lee *et al.*, 1994

Die Hypermethylierung ist bei den in der Tabelle aufgeführten Genen als Mechanismus ihrer Inaktivierung in menschlichen Tumoren sicher belegt. Diese Art der Inaktivierung wird als vergleichbar effizient im Vergleich zu Deletionen und Punktmutationen angesehen [Baylin *et al*., 2001].

Einige Krankheiten beim Menschen wurden mit unterschiedliche Arten von Veränderungen der DNA-Methylierung assoziiert. Sie alle haben eine mentale Retardierung der Patienten zur Folge. Das **ICF-Syndrom** beruht auf unterschiedlichen Mutationen in der katalytischen Domäne des DNMT3B-Gens [Xu *et al*., 1999; Hansen *et al*., 1999]. Es kommt zu Hypomethylierung von repetitiven Sequenzen und zu einer Instabilität der centromernahen Regionen, die Chromosomen-Aberationen nach sich zieht [Franceschini *et al.*, 1995].

Das **Rett-Syndrom** resultiert aus Mutationen in dem auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisierten MeCP2-Gen. Die Mehrzahl der Veränderungen sind Punktmutationen, ausgelöst durch eine C zu T Transition in der Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) [Nan *et al.*, 1997; Ballestar *et al.*, 2000].

Das **Fragiles-X-Syndrom** wird durch *de novo* Methylierung der Promotor Region des FMR1-Gen, welches ebenfalls auf dem langen Arm des X-Chromosom liegt, ausgelöst. Dieses Gen zeichnet sich durch einen hochpolymorphen CCG-Repeat aus, dessen Wiederholungssequenz in betroffenen Patienten von 29 auf über 200 ansteigt [Kremer *et al.*, 1991; Oberle *et al.*, 1991].

1.4 Das Harnblasenkarzinom

Harnblasenkarzinome entsprechen in der Bundesrepublik Deutschland etwa 2% aller bösartigen Tumore beim Menschen und gehören zu den häufigsten malignen Tumoren des Urogenitaltraktes. Männer sind 2-3mal häufiger von dieser Krankheit betroffen als Frauen. Das Harnblasenkarzinom tritt überwiegend im höheren Lebensalter auf, wobei das Durchschnittsalter 67 Jahre beträgt; nur 1% der Patienten sind jünger als 40 Jahre [Rübben, 2001].

Die Auslösung eines malignen Tumors durch chemische Kanzerogene ist beim Harnblasenkarzinom seit mehr als 100 Jahren bekannt und bei kaum einer anderen Krebsart so gut erforscht [Rehn, 1895]. Als Kanzerogene wirken neben aromatischen Aminen (z.B. Benzidin, 2-β-Naphthylamin) und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen vor allem Nikotingenuß und verschiedene Medikamente. Ob Süßstoffe wie Sacharin und Zyklamat beim Menschen - analog zum Tierversuch - Blasentumore hervorrufen, ist ebenso fraglich wie die Wirkung eines erhöhten Kaffeekonsums [Hautmann & Huland, 2001].

In Europa leiten sich 92% aller Harnblasenkarzinome aus dem Übergangsepithel der ableitenden Harnwege ab (Transitionalzellkarzinome; TCC), in 7% findet man Plattenepithelkarzinome, sehr selten sind Adenokarzinome (1%) [Hautmann & Huland, 2001].

In Übereinkunft mit der internationalen Union gegen den Krebs (UICC, *Unio Internationalis Contra Cancrum*) werden Urothelkarzinome anhand des TNM-Systems charakterisiert (*Staging*), es beschreibt den Tumorstadium anhand von drei Kategorien [TNM, 1997]. Das Stadium „T" kennzeichnet die lokale Ausdehnung des Primärtumors gemäß klinischer und bioptischer Untersuchung (vgl. Abbildung 1-1). Ta-Tumore wachsen papillär ins Lumen der Blase und weisen eine vergleichsweise gute Prognose auf. Während T1-Tumore in die Lamina propria infiltrieren, werden invasive Tumore als T2 (Muskel-infiltrierend), T3 (Fettgewebe-infiltrierend) und T4 (Gewebe-übergreifend) beschrieben. Eine Unterteilung in die Substadien a, b und c ist je nach Tiefe der Muskelinfiltration üblich. Für eine zuverlässige Aussage über den Tumor bedarf es zusätzlich einer histopathologischen Beurteilung der Zell- und Gewebedifferenzierung. Sie wird in bis zu vier unterschiedlichen Malignitätsgraden (*Grading*) von G1 = gut differenziert bis G4 = undifferenziert angegeben [Sökeland, 1987; Merkle, 1997].

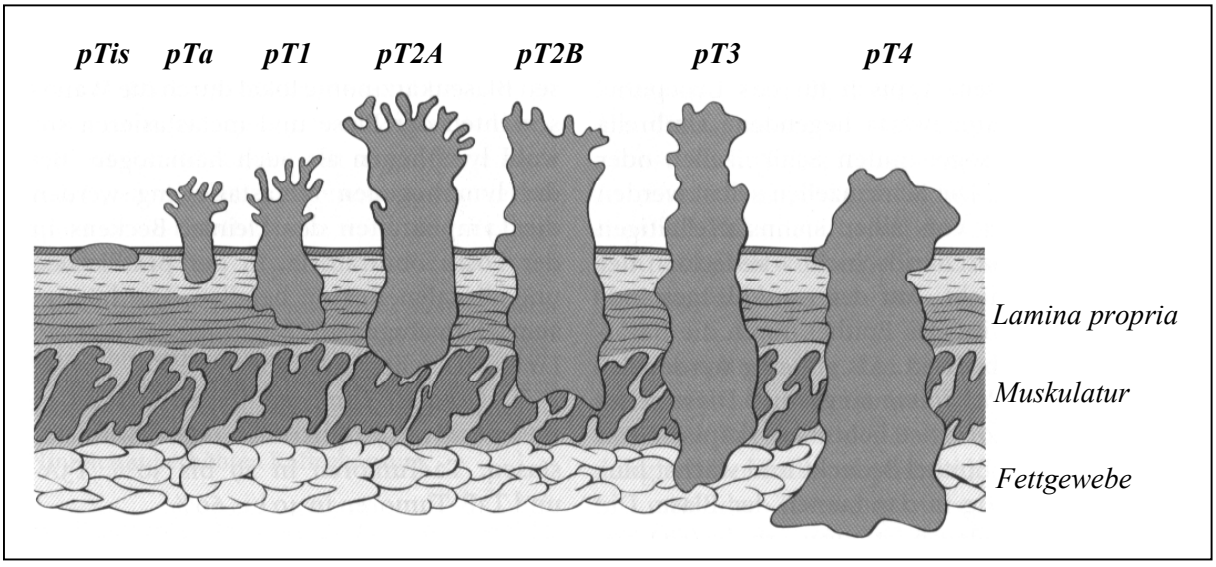

Abbildung 1-1. Klassifikation der Wachstumsstadien im Harnblasenkarzinom, aus Hautmann und Huland [2001].

Zusätzlich wird neben dem Metastasierungszustandes eines regionalen Lymphknotens (N) auch das Vorhandensein von Fernmetastasen einschließlich entfernt gelegener Lymphknoten (M) angegeben. Handelt es sich bei der Einstufung des Tumors um einen histopathologisch gesicherten Befund, so wird dem jeweiligen Symbol das Präfix „p“ vorangestellt.
Eine Sonderform des Harnblasenkarzinoms stellt das Carcinoma in situ (pTis) dar. Es wächst intraepithelial und nicht infiltrierend, zeichnet sich jedoch durch einen hohen Malignitätsgrad und durch eine hohe Progressionsneigung aus (vgl. Abbildung 1-1).
Beim Urothelkarzinom sind die einzelnen Stadien dieser Entwicklung nicht nur morphologisch zu verfolgen, auch cytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen geben Aufschluß über den Verlauf der Tumorgenese.

1.4.1 Molekularbiologische Veränderungen

Bei invasiven Harnblasentumoren finden sich vielfältige genetische Veränderungen, die über mehrere Stadien der Tumorentwicklung hinweg akkumulieren [Übersicht bei Cordon-Cardo, 1998; Orntoft & Wolf, 1998; Knowles, 1999[A]; Rabbani *et al*., 2000].
Ausgehend vom Normalurothel können invasive Harnblasenkarzinome offenbar auf zwei verschiedenen Wegen entstehen (vgl. Abbildung 1-2). Ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese kann der vollständige, wie auch Teilverlust von Chromosom 9 sein [Williamson, 1995]. Dieses Ereignis kennzeichnet mit einer Häufigkeit von über 30% eher gut differenzierte papilläre Tumore. Diese gehen nur zu 10% in invasive Tumore über, zeichnen sich also eher durch eine gute Prognose aus. Die Anzahl an genetischen Veränderungen ist in Ta-Tumoren begrenzt: zu nur 3% finden sich beispielsweise Mutationen von TP53. Ein früher TP53 Verlust hingegen zeichnet das Carcinoma in situ aus. Diese Vorläufer gehen mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 40% in invasive Karzinome über und werden deshalb als ihre häufigste Vorstufe betrachtet.
Bereits in T1-Tumoren finden sich oft mehr als 10 chromosomale Veränderungen [Richter *et al.*, 1997], deren Zahl in weiter fortgeschrittenen Stadien noch zunehmen kann [Hovey *et al.*, 1998]. Von Verlust sind am häufigsten das Chromosom 9 (60%), die Chromosomenarme 11p, 13q, 17p und 8p betroffen. Überrepräsentiert sind häufig Chromosom 7 sowie die Chromosomenarme 5p, 1q, 8q, 10q, 17q. Ein Teil der Tumoren verfügt über Amplifikation von Bereichen der Chromosomen 5p, 6p und 20q.

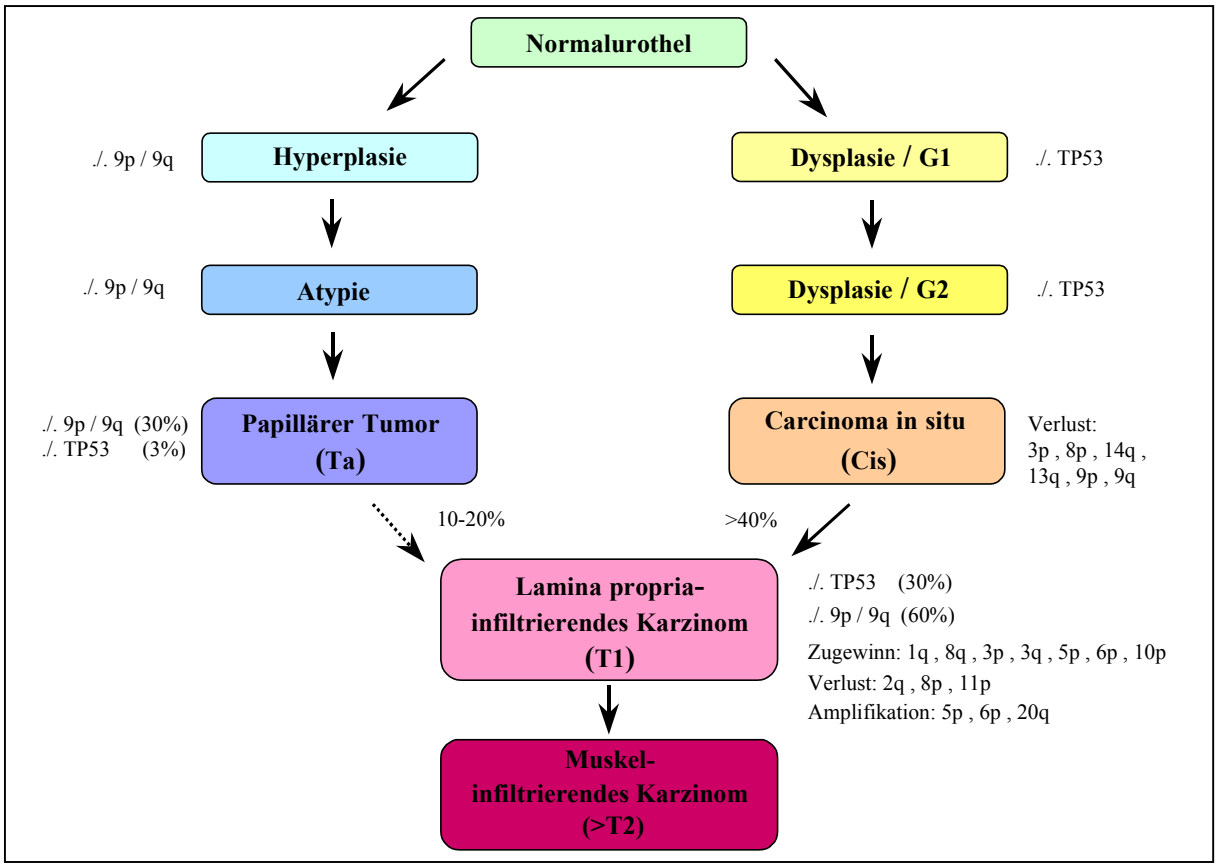

Abbildung 1-2. Ablaufdiagramm der genetischen Veränderungen während der Progression im TCC, vereinfacht nach Spruck *et al.* [1994] und Knowles [2001]. ./., Verlust des jeweiligen Abschnittes, ausführliche Erklärungen finden sich im Text.

Für die Entstehung und Progression von Harnblasenkarzinomen stellen chromosomale Veränderungen offenbar eine wesentliche Ursache dar. Wie es zu dieser Chromosomeninstabilität kommt, ist bisher nicht bekannt.

Neben DNA-Hypermethylierung von CpG-reichen Promotorregionen in Tumor-suppressorgenen (z.B. CDKN2A-Gen, vgl. Tabelle 1-1) weisen 95% aller fortgeschrittenen Tumoren eine Verminderung des Methylcytosingehalts von bis zu 60% auf [Jürgens *et al.*, 1996; Florl *et al.*, 1999]. Die genomweite Hypomethylierung stellt damit ein sehr häufiges Ereignis in Urothelkarzinomen dar. Während die Mechanismen, der DNA-Methylierung durch Methyltransferasen (vgl. Kapitel 1.1) bereits gut erforscht sind, ist der Mechanismus, der zu einer Methylierungsverminderung des Genoms führt, noch nicht genau geklärt. Neben einer passiven Demethylierung [Jost & Bruhat, 1997] wurden auch biochemische Wege diskutiert [Razin *et al.*, 1986; Vairapandi & Duker, 1993; Jost & Jost, 1995].

Die im Harnblasenkarzinom veränderten Genabschnitte kodieren zum einen für Onkogene, die durch Mutation oder Amplifikation eine Aktivierung erfahren; nachgewiesen sind Punktmutationen von Ras, Überexpression von c-myc und ERBB2. Zum anderen können Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Mehrere betroffene Tumorsuppressorgene besitzen eine wichtige Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus am G1-S Kontrollpunkt (vgl. Kapitel 1.5). Fast alle fortgeschrittenen Karzinome weisen mindestens einen Defekt in dem Rb-Regulationssystem $p15^{INK4b}$/$p16^{INK4a}$ - CDK4/6 - Cyclin D – RB und dem p53-Kontrollsystem $p14^{ARF}$ - MDM2 - p53 - $p21^{Cip1}$ auf. Diese Zusammenhänge werden nachfolgend genauer dargestellt.

1.5 Zellzyklusregulation

Der Teilungszyklus der meisten Körperzellen umfaßt vier koordinierte, komplex regulierte Vorgänge: Zellwachstum, Replikation der DNA, Verteilung der duplizierten Chromosomen auf die Tochterzellen und die Zellteilung selbst. Um eine ordnungsgemäße Übertragung der genetischen Information von einer Zelle auf die beiden Tochterzellen zu garantieren, gibt es im Zellzyklus verschiedene Kontrollpunkte, die dafür sorgen, daß die nächste Phase erst dann beginnen kann, wenn die vorherige Phase vollständig und fehlerfrei abgeschlossen ist. Einer dieser Kontrollpunkte liegt in der späten G_1-Phase vor der Verdopplung der DNA in der Synthese-Phase. Wurde z.B. die DNA durch physikalische oder chemische Mutagene geschädigt, so wird entweder der Eintritt in die S-Phase verzögert, um eine Reparatur der Defekte zu ermöglichen, oder die Zelle wird durch Apoptose eliminiert. Einen Überblick über einige Vorgänge am G_1/S-Kontrollpunkt, der auch als Restriktionspunkt
‚R' bekannt ist und mit dem „Start"-Punkt des Zellzyklus von Hefe vergleichbar ist [Pardee, 1989], gibt die nachstehende Abbildung 1-3.

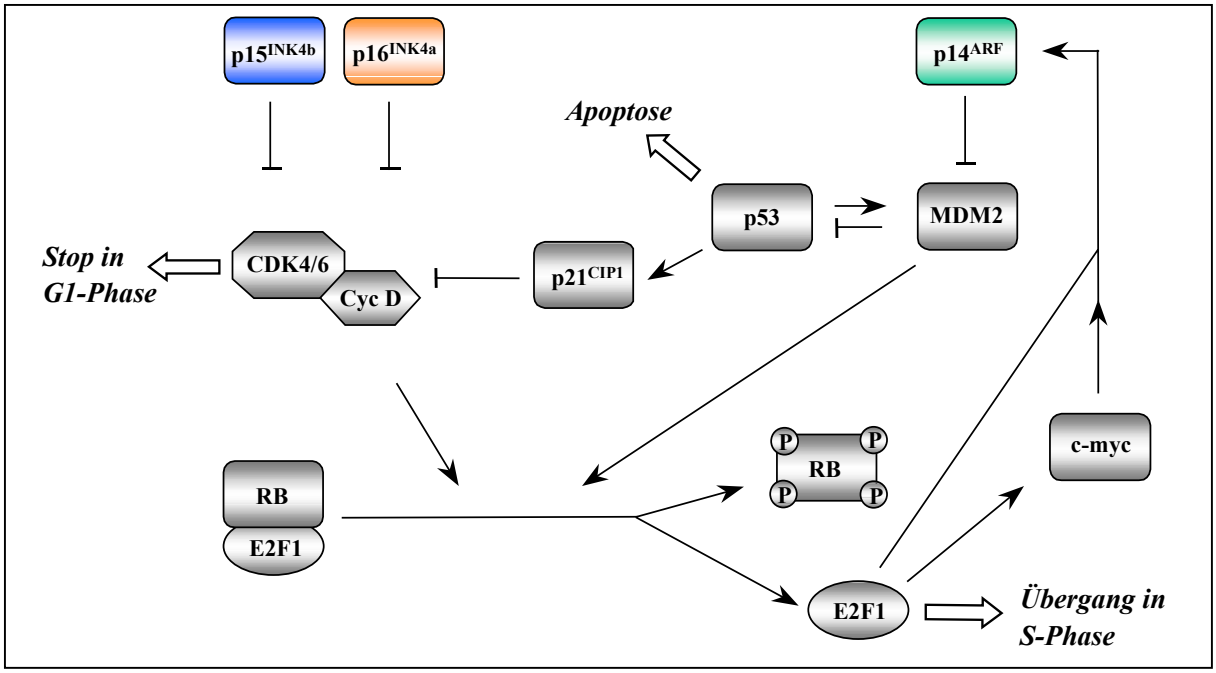

Abbildung 1-3. Ausgewählte Zusammenhänge am G1/S-Kontrollpunkt. Die Interaktion der einzelnen Proteine ist im Text ausführlich erklärt.

Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch zyklinabhängige Proteinkinasen, bezeichnet als CDKs („*cyclin dependent kinases*“) reguliert. In der aktiven Form stellen sie Heterodimere aus einer katalytischen Kinase- und einer regulatorischen Zyklin-Untereinheit dar. Ihre Aktivität wird zusätzlich durch Phoshorylierung reguliert. Spezifische Kombinationen zwischen verschiedenen Zyklinen und Kinasen sind charakteristisch für jede Phase des Zellzyklus. Die CDKs unterliegen einer negativen Regulation durch Inhibitorproteine zyklinabhängiger Kinasen (CKI). Es werden zwei Klassen von CKIs unterschieden: Die Cip-Familie ist eine Gruppe strukturell verwandter Proteine, die in der Lage sind, Komplexe von CDK2-ZyklinE bzw. CDK4 und CDK6 mit den D-Zyklinen zu binden und damit zu inhibieren. Dazu gehört unter anderem $p21^{CIP1}$ [Harper *et al.*, 1993], welches nach DNA-Schädigung nicht nur den durch p53–Aktivierung ausgelösten Zellzyklusarrest vermittelt, sondern durch Interaktion mit PCNA unmittelbar auch die DNA-Replikation hemmen kann. In Tumoren finden sich nur sehr selten Mutationen in diesem Gen, vielmehr konnte eine Überexpression gegenüber Normalgewebe sowohl in Lungenkarzinomen [Marchetti *et al.*, 1995], als auch in Frühstadien von Harnblasen-karzinomen [Clasen *et al.*, 1998] festgestellt werden.

Die zweite Klasse von CKIs besteht aus vier Proteinen, welche bis zu 40% Homologie zueinander aufweisen: $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, $p18^{INK4c}$ und $p19^{INK4d}$. Sie werden zusammenfassend auch als INK-Proteine bezeichnet und sind, im Gegensatz zur Cip-Familie,

spezifische Inhibitoren der CDK4/6 – CyclinD-Komplexe, wodurch es zu einem Stop in der G1-Phase kommt.

Auf $p15^{INK4b}$ und $p16^{INK4a}$ wird in Kapitel 1.6 näher eingegangen. Veränderungen von $p18^{INK4c}$ und $p19^{INK4d}$ sind in menschlichen Tumoren bislang nicht gefunden worden, ihre physiologische Bedeutung ist ebenfalls noch unklar [Santarius *et al*., 2000; Bartkova *et al*., 2000].

Von zentraler Bedeutung für den Übergang der Zellen in die S-Phase ist die Phosphorylierung von RB, einem nukleären Protein, welches durch das RB1-Gen codiert wird. Es wurde als erstes Tumorsuppressorgen beim Menschen beschrieben [Cavenee *et al.*, 1983]. Durch Inaktivierung von RB, zunächst vermittelt durch den CDK4/6-Cyclin D-Komplex [Gooderich *et al*., 1992], wird unter anderem die Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F1 aufgehoben. In seiner freien Form stimuliert E2F1 die Expression einer Vielzahl von Genen, deren Produkte für den Eintritt in die S-Phase und die Replikation der DNA von Bedeutung sind. E2F1-aktivierte Gene kodieren unter anderem für $p14^{ARF}$ und c-Myc, welches seinerseits auch $p14^{ARF}$ aktiviert. Trotz des gemeinsamen Exons 2 mit $p16^{INK4a}$ fungiert $p14^{ARF}$ nicht als CDK-Inhibitor (vgl. Kapitel 1.6).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, um die Entstehung maligner Zellen zu verhindern, ist die Apoptose als Antwort auf einen irreparablen DNA-Schaden. Diese wird vor allem durch p53 induziert, einem Tumorsuppressorgen, welches in etwa der Hälfte aller menschlichen Tumoren mutiert ist und damit zu den am häufigsten veränderten Genen zählt [Lane, 1992]. Unter Normalbedingungen wird p53 über einen negativen Rückkopplungsmechanismus mit MDM2 (*Murine Double Minute chromosome-2,* daher beim Menschen die Bezeichnung *hDM2*) durch Blockierung seiner Transkriptionsdomäne und Proteolyse auf einem niedrigen Expressions Niveau gehalten. Die Wirkung von MDM2, welches ebenfalls in der Lage ist, die Phosphorylierung von RB zu stimulieren, wird durch aktiviertes $p14^{ARF}$ gehemmt. Bei Aktivierung von p53 wird über die Transkription von $p21^{CIP1}$ der CDK4/6-Cyclin D-Komplex gehemmt, die Phosphorylierung von RB blockiert und ein Stop in der G1-Phase ausgelöst.

1.6 Der CDKN2-Locus auf Chromosom 9

Insgesamt ist das Chromosom 9 eines der am häufigsten deletierten Chromosomen in menschlichen Tumoren [Hall & Peters, 1996]. Harnblasenkarzinome weisen in mehr als 60% aller Tumoren einen Verlust der Chromosomenarme 9p oder 9q oder sogar beider Arme auf. Auf dem kurzen Arm des Chromosom 9, in der G-Bande 9p21, sind in einem Bereich von ca. 40 kb zwei Gene lokalisiert, die für insgesamt drei Proteine kodieren (vgl. Abbildung 1-4).

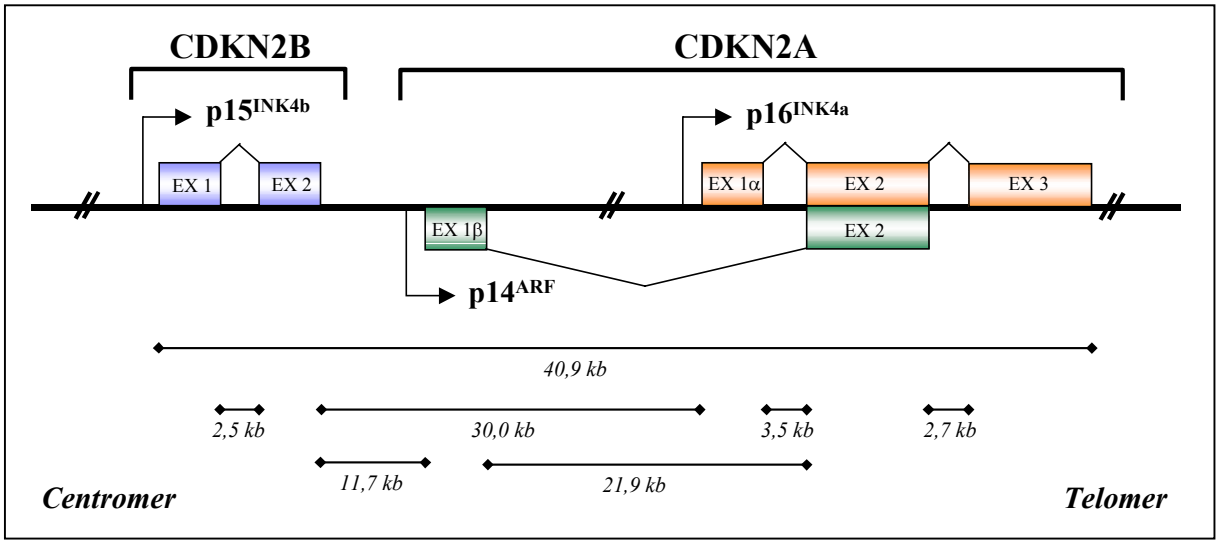

Abbildung 1-4. Der CDKN2-Locus auf Chromosom 9p21. Der betrachtete Bereich ist 40,9 kb groß, die zusätzlich aufgeführten Größenskalen geben die Introngrößen an.

Das CDKN2A Gen wurde von Serrano *et al.* [1993] und von Kamp *et al.* [1994][A] unabhängig von einander identifiziert. Es war zunächst unter den Namen MTS1 (*Multiple Tumor Suppressor*) und CDK4I (*CDK4–inhibitor)* bekannt. Das Primärtranskript hat eine Länge von 987 bp und setzt sich aus 3 Exons zusammen. Das von ihm codierte $p16^{INK4a}$ Protein zeigt eine Größe von 16 kDa. Quelle *et al.* [1995] entdeckten ein alternatives Spleißprodukt des CDKN2A Gens in der Maus. Es besteht aus zwei Exons, wobei das Exon 2 des CDKN2A Gens durch ein alternatives Leseraster transkribiert wird. Dieses β-Transkript ist 642 bp lang und codiert für das nach seiner Proteingröße benannte $p19^{ARF}$ Protein. Im Menschen findet sich mit einer 50%igen Homologie das etwas kleinere $p14^{ARF}$ Protein. Dieses hat keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu $p16^{INK4a}$. Erst Stott *et al.* [1998] erkannten die Funktion von $p19^{ARF}$/$p14^{ARF}$ im Zellzyklus (vgl. Kapitel 1.5).

Das zweites Gen in diesem Locus, CDKN2B, wurde ebenfalls [1994] von Hannon und Beach sowie parallel von Stone *et al*. [1995] entdeckt. Es besteht aus 2 Exons, das Primärtranskript hat eine Länge von 859 bp und kodiert für das 15 kDa große $p15^{INK4b}$ Protein.

Die Häufigkeit, mit der Deletionen und Mutationen im CDKN2-Locus in Tumorzellen auftreten, ließ vermuten, daß es sich sowohl bei CDKN2A als auch bei CDKN2B um Tumorsuppressorgene handelt. Die Proteine $p16^{INK4a}$ und $p15^{INK4b}$ agieren als Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) und damit als negative Regulatoren des Zellzyklus. Die Struktur der beiden Proteine ist sehr ähnlich; so weist das CDKN2B Exon 2 eine 97%ige Homologie zu $p16^{INK4a}$ auf [Shapiro & Rollins, 1996].

Die Art und Weise, wie die drei Proteine im Zellzyklus involviert sind, ist in Kapitel 1.5 näher erläutert.

1.7 Das Nierenzellkarzinom

Der häufigste maligne Tumor der Niere ist mit 80-90% das Nierenzellkarzinom [Hautmann & Huland, 2001]. Es macht rund 3% aller Tumore des männlichen und ca. 2% aller Tumore des weiblichen Geschlechts aus [Boeckmann & Jakse, 2001]. Nierenzellkarzinome manifestieren sich am häufigsten in der Altersgruppe um 60 Jahre.

Während im Tierexperiment Nierenzellkarzinome durch aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, Nitrosamine, Aflatoxine, Östrogene, Blei, Bestrahlung und Geflügelleukämieviren ausgelöst werden können, liegen für die Karzinome des Menschen noch keine zuverlässigen ätiologischen Anhaltspunkte vor. Als mögliche Faktoren werden Tabak- und Kaffeegenuß, fettreiche Kost und hormonelle Einflüsse diskutiert; besonders gefährdet sind Kadmium exponierte Menschen [Altwein & Rübben, 1991]. Etwa 1-2% der Nierenzellkarzinome zeigen eine familiäre Häufung, sie treten vor allem bei Patienten mit einem von Hippel-Lindau-Syndrom auf (vgl. Kapitel 1.7.1).

Histologisch lassen sich fünf Typen des Nierenzellkarzinoms ihrem histogenetischen Ursprung entsprechend unterscheiden [Thoenes *et al.*, 1986]: Klarzelliger Typ (79%), Chromophiler Typ (10%), Chromophober Typ (5%), Duct-Bellini-Typ (1%) und das Onkozytom (5%) als benigne geltende Läsion.

Die anatomische Ausbreitung eines Nierenzellkarzinoms wird ähnlich, wie bei den Blasentumoren, nach den Kriterien des TNM-Systems der UICC definiert.

1.7.1 Molekularbiologische Veränderungen

Für die fünf verschiedenen histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms wurden Konstellationen von chromosomalen Veränderungen beschrieben, die für jede Unterart spezifisch sind [Kovacs, 1994]. Beim klarzelligen Nierenzellkarzinom stellen Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p) mit 98%iger Häufigkeit die typische genetische Veränderung dar, dann folgen Duplikationen von 5q (50%) und Allelverluste von 6q, 8p, 9p, 14q (50%). Auf Chromosom 3p werden mehrer Tumorsuppressorgene (TS-Gene) vermutet [van den Berg & Buys, 1997]. Das bisher am besten charakterisierte TS-Gen ist das von-Hippel-Lindau-Gen (VHL), welches auf 3p25-26 lokalisiert ist. In allen hereditären und in 50% aller sporadisch auftretenden klarzelligen Nierenzellkarzinome liegt es inaktiviert vor [Tory *et al.*, 1989, Hosoe *et al.*, 1990]. Zur Inaktivierung des Gens kann es zum einen durch homozygote Deletion, zum anderen durch Verlust eines Allels bei gleichzeitigem Auftreten von Punktmutation oder Hypermethylierung kommen [Herman *et al.*, 1994; Prowse *et al.*, 1997]. Auch andere Gene werden im Nierenzellkarzinom durch Hypermethylierung inaktiviert, darunter vor allem das CDKN2A-Gen [Herman *et al.*, 1995; Pfeifer *et al.*, 2000].

1.8 Ziel der Arbeit

Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch genetische oder epigenetische Veränderungen gilt als eine wesentliche Ursache für die Entstehung von Karzinomen. In dieser Arbeit wurde am Beispiel des auf Chromosom 9p21 liegenden CDKN2-Locus die Interaktion von genetischen und epigenetischen Veränderungen untersucht. Der Locus codiert zwei Tumorsuppressorgene, deren Inaktivierung in vielen menschlichen Tumoren, auch im Harnblasenkarzinom, beschrieben ist. Zwei Aspekte bestimmten die Fragestellung:

Der erste Abschnitt der Arbeit befasst sich mit der relativen Bedeutung von Deletionen, Punktmutationen und Promotor-Hypermethylierung bei der Inaktivierung von CDKN2A. Mit gezielt ausgewählten Gen- und Mikrosatellitenmarkern wurde für eine Reihe von Harnblasenkarzinom-Gewebeproben ermittelt, in welchen Tumoren der betrachtete Genabschnitt deletiert vorliegt. Dazu diente der Nachweis des Verlustes von Heterozygotie (‚LOH') und von homozygoten Deletionen. In den Tumorproben wurde mit Verlust eines Allels weiterhin bestimmt, in welchem Umfang Promotor-Hypermethylierung und Punktmutationen zur Inaktivierung des zweiten Allels beitragen.

Der zweite Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, in wieweit Interaktionen zwischen genomweiter DNA-Hypomethylierung und den im CDKN2-Locus gefundenen Veränderungen bestehen. Vor allem soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob durch Methylierungsveränderungen aktivierte repetitive Elemente mittels homologer Rekombinationsprozesse oder durch Retrotransposition an der Entstehung von Deletionen beteiligt sein können. Für einige Tumorsuppressorgene werden recht häufig homozygote Deletionen des entsprechenden Genabschnittes beobachtet. Deren Entstehungsmechanismen sind noch weitgehend unbekannt und damit auch die Frage, warum diese Art der Inaktivierung bei manchen Genen gegenüber Punktmutationen oder epigenetischen Veränderungen durch Promotor-Hypermethylierung überwiegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher - unterstützt durch zytogenetische Untersuchungen - das Ausmaß homozygoter Deletionen in Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien bestimmt. Die so lokalisierten Deletionsenden wurden anschließend durch Klonierung und Sequenzierung genauer charakterisiert, um Aufschluß über die mechanistische Grundlage zu gewinnen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Humane Zellinien und ihre Kultivierung

2.1.1 Harnblasenkarzinom-Zellinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2-1 aufgeführten Harnblasenkarzinom-Zellinien, welche freundlicherweise zum einen von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, USA über Herrn Prof. Dr. Schmitz-Dräger und zum anderen von Dr. M.A. Knowles, ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds, UK zur Verfügung gestellt wurden, untersucht.

Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft. Alle Zellinien wurden regelmäßig auf eventuelle Kontaminationen durch Mykoplasmen getestet.

Die Harnblasenkarzinom-Zellinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit stabilisiertem Glutamin, 15% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO_2 kultiviert. Sie wuchsen adhärent in 175 cm^2-Kulturflaschen mit je 14 ml Medium und wurden alle 2-4 Tage 1:5 passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums kurz mit PBS gewaschen und anschließend bis zu 5 min mit Trypsin/EDTA (0,02% / 0,05%) bei 37°C behandelt. Die Karzinomzellen wurden vom Flaschenboden abgelöst und in 10 ml frischem Medium/FCS aufgenommen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 400 x g wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert und 1-2 ml der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurden die mit PBS gewaschenen und trypsinierten Zellen mit 1 ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO suspendiert und in 2 ml-Kryoröhrchen überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen bei –70°C in einer Styroporbox für ca. 24 h eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen so kurz wie möglich bei 37°C inkubiert, dann in 10 ml Medium aufgenommen, nach 5-minütiger Zentrifugation bei 400 x g der Überstand abgesaugt und das in frischem Medium resuspendierte Pellet in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

Tabelle 2-1. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Harnblasenkarzinom-Zellinien. –, Daten nicht sicher bekannt; *, Zellinien stammen aus einem Gebiet in China mit endemischen Harnblasenkarzinomen.

Zellinie	*Staging*	*Grading*	*Geschlecht des Patienten*	*Alter des Patienten*
5637	–	–	m	68
HT-1376	–	–	w	58
SD	–	–	–	–
VMCub1	–	–	m	–
253J	–	–	–	–
SW1710	–	–	w	84
BFTC905*	pTa	G3	w	51
BFTC909*	–	G3	m	64
RT-4	pT2	G1	m	63
RT-112	–	G2	w	–
647v	–	G2	–	–
639v	–	G3	m	69
EJ	–	–	–	–
T-24	–	G3-4	w	81
J82	pTa	G1-2	m	58
DSH1	–	–	–	–
UM-UC3	–	–	m	–

2.1.2 Nierenkarzinom-Zellinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nierenkarzinomlinien (vgl. Tabelle 2-2) wurden aus Tumoren von histologisch klarzelligen oder chromophil/papillären Typen des Nierenzellkarzinoms etabliert [Gerharz *et al*., 1993]. Ihre Kultivierung entspricht im wesentlichen der der Harnblasenkarzinomzellinien, jedoch wurden dem DMEM-Medium 10% FCS und ein Vitaminzusatz beigefügt.

Tabelle 2-2. Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nierenkarzinom-Zellinien.

Zellinien-Name in Literatur	*Staging*	*Grading*	*Tumor-Typ*	*Zellinien-Name in dieser Arbeit*
clearCa-9	pT2	G1	klarzellig	1227
clearCa-6	pT3b	G3	klarzellig	1519
chromphi-3	pT3a	G2	chromophil	1892
clearCa-28	pT2	G3	klarzellig	1987
clearCa-29	pT2	G1	klarzellig	2000
clearCa-5	pT3b	G3	klarzellig	1370
clearCa-14	pT3b	G3	klarzellig	1765

2.2 Gewebeproben

Für die Isolierung von DNA und RNA standen Gewebeproben von Harnblasen- und Nierenzellkarzinomen sowie Normalgewebe von Patienten der Urologischen Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung. Die Einwilligung aller Patienten wurde mittels eines Formblattes routinemäßig eingeholt, und die Ethikkomission der HHU hat über die entsprechenden Projekte positiv entschieden. Alle Gewebe wurden unmittelbar nach Begutachtung durch einen Pathologen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei −80°C gelagert.

2.3 Blutproben

Für die Aufarbeitung genomischer DNA aus Blutproben wurde EDTA-Blut von Patienten der Urologischen Klinik genutzt.

2.4 Vektoren

2.4.1 Plasmide

Folgende kommerziell erhältlichen Plasmide fanden Verwendung:

pUC18	Amersham Pharmacia	Freiburg
pCR® II-TOPO®	Invitrogen	Groningen, NL
pCR4®-TOPO®	Invitrogen	Groningen, NL

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide konstruiert:

Name	*Vektor*	*Insert*	*Schnittstelle*
p253J-BamHI	pCR® II-TOPO®	253J BamHI-Vectorette	T/A-Klonierung
pSW1710-HindIII	pCR4®-TOPO®	SW1710 HindIII-Vectorette	T/A-Klonierung
pNTZ1370-EcoRI	pCR4®-TOPO®	1370 BamHI-Vectorette	T/A-Klonierung
pSW1710-450	pCR4®-TOPO®	PCR Produkt 450bp	T/A-Klonierung
pSW1710-465	pCR4®-TOPO®	PCR Produkt 465 bp	T/A-Klonierung
pC5	pUC18	Cosmid c5	umkloniert
pNTZ2000-EcoRI	pCR4®-TOPO®	2000 BamHI-Vectorette	T/A-Klonierung

2.4.2 Cosmide und BACs („Bacterial Artificial Chromosome“)

Das Cosmid c5 wurde freundlicherweise von der Firma Myriad Genetics, Inc. Utah, USA zur Verfügung gestellt.

Die BAC-Klone RP11-70L8, RP11-145E5 und RP11-149I2 entstammen dem Sanger Centre, Hinxton, Cambridgeshire, UK.

2.5 Bakterien

2.5.1 Bakterienstämme und ihre Anzucht

Folgende Bakterienstämme der Firma Invitrogen, Groningen, NL, fanden Verwendung:

E.coli-Stamm TOP10

F$^-$ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G

E.coli-Stamm TOP10F’

F’ {*lac*I^q Tn*10* (Tet^R)} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G

Die Kultivierung der E. coli-Stämme erfolgte in LB-Medium bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) für mind. 14 h. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Die BACs enthaltenden Stämme wurden in TB-Medium mit 0,2% Glucose inkubiert und ihre Selektion mit Hilfe von Chloramphenicol [40 µg/ml] durchgeführt.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurde 1 ml einer frischen Übernachtkultur mit 15% (v/v) Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt und anschließend bei −70°C gelagert.

Zur kurzfristigen Sicherung sowie zur erneuten Anzucht von Gefrierkulturen wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten, mit entsprechendem Antibiotikum versehen, ausgestrichen, im 37°C-Brutschrank über Nacht inkubiert und Einzelklone wiederum in LB_{Amp}-Medium angezogen.

2.5.2 Transformation kompetenter One Shot TOP10 / TOP10F’ Zellen

Langsam auf Eis aufgetaute kompetente Zellen wurden mit 2 µl T/A-Ligationsansatz (vgl. 2.16.3) bzw. mit 50 ng Plasmid-DNA versehen und je nach Größe des Plasmids 10-30 min auf Eis aufbewahrt. Nach einem Hitzeschock von 30 s bei 42°C im Wasserbad und Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien mit 250 µl vorgewärmten SOC-Medium versehen

und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden zwischen 50 µl und 200 µl der Bakteriensuspension auf mit Antibiotika versetzten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert.

2.5.2.1 Blau-Weiß-Selektion

Für eine Blau-Weiß-Selektionierung der transformierten Bakterien wurden die Agarplatten 60 min vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes mit 40 µl X-Gal [40 mg/ml DMF] und für TOP10F'mit ebenfalls 40 µl IPTG [100 mM] ausgestrichen.
Positive Klone erscheinen weiß bis blaßblau, da das LacZ-Gen des Vektors aufgrund der Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen wird.
Bei dem Plasmid pCR4-TOPO ist diese Art der Selektionierung nicht notwendig, da bei einer erfolgreichen Klonierung das CcdB-Gen des Vektors zerstört wird, dessen Expresssion das Bakterium vergiften würde.
Alle Experimente mit veränderten Organismen wurden unter Beachtung der Vorschriften des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993 (BGBl.1, S. 2066), sowie der Gentechnik-Sicherheitsverordnung vom 14.03.1995 (BGBl.1, S. 297) durchgeführt.

2.6 Chemikalien

[α-^{32}P]-dCTP, 3.000 Ci/mmol	Hartmann Analytic	Braunschweig
AccuGel 29:1, 40%	National Diagnostics Inc. über Biozym	Atlanta, USA Oldendorf
Acrylamid 37,5:1, 30% (f. Westernblot)	AppliChem	Darmstadt
Agar	Life Technologies	Karlsruhe
Agarose	Biozym	Oldendorf
BSA (Bovine Serum Albumin)	Serva	Heidelberg
DNA-Längenstandards	PeqLab	Erlangen
dNTP-Mix	PeqLab	Erlangen
fötales Kälberserum	Seromed Biochrom	Deisenhofen
Hefeextrakt	Life Technologies	Karlsruhe
IPTG	Roche	Mannheim
Oligo (dT15)	Roche	Mannheim
Protein Längenstandard	Life Technologies	Karlsruhe
Stop Loading Buffer (f. Sequenzierung)	Amersham Pharmacia	Freiburg

Long Ranger™ Gel-Solution	FMC	Rockland, USA
(f. Sequenzierung)	über Biozym	Oldendorf
Magermilchpulver	neuform	Lüneburg
PBS	Biochrom	Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
SequaGel ultra pure	National Diagnostics Inc.	Atlanta, USA
	über Biozym	Oldendorf
Tripure™	PeqLab	Erlangen
Trypsin	Biochrom	Berlin
Trypton	Life Technologies	Karlsruhe
Tween 20	Serva	Heidelberg
X-Gal	Roche	Mannheim
Zellkulturmedien	Life Technologies	Karlsruhe

2.7 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega	Mannheim
DyNAzyme^{TM}II	Finnzyme OY	Espoo, FIN
DNA Polymerase	über Biometra	Göttingen
DyNAzyme^{TM}II	Finnzyme OY	Espoo, FIN
DNA Polymerase EXT	über Biometra	Göttingen
Expand Long Template	Roche	Mannheim
HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN	Hilden
Restriktionsendonukleasen	Roche	Mannheim
	New England Biolabs	Frankfurt/Main
	MBI Fermentas	St. Leon-Rot
SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase)	Roche	Mannheim
SequiTherm EXCEL^{TM} II	Epicentre Technologies	Madison, USA
DNA Polymerase	über Biozym	Oldendorf
T4-DNA Ligase	Roche	Mannheim

2.8 Antikörper

anti-α-tubulin 3-5-1-2	Sigma Aldrich Chemie	Deisenhofen
HRP-conjugated anti-mouse antibody aus ECL-Kit	Amersham-Pharmacia,	Freiburg
Rb C-15	Santa Cruz Biotechnology	SantaCruz,USA

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.
Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Frickenhausen), Falcon/Becton Dickinson (Meylen Cedex, FR) und Nunc (Roskilde, DK) bezogen.

2.9 Molekularbiologische Kits

Kits folgender Firmen fanden Verwendung:

Blood&Cell Culture DNA Midi Kit	QIAGEN	Hilden
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche	Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche	Mannheim
ECL Western Blotting System	Amersham Pharmacia	Freiburg
CpGenome™ DNA Modification Kit	Q-Biogene	Heidelberg
Oligolabelling Kit	Amersham Pharmacia	Freiburg
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche	Mannheim
Proteinassay DC	BioRad	München
QIAfilter® Plasmid Midi/Maxi-Kit	QIAGEN	Hilden
QIAGEN® Large-Construct Kit	QIAGEN	Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN	Hilden
QIAprep Spin® Mini Kit	QIAGEN	Hilden
rediprime™II-Labelling system	Amersham Pharmacia	Freiburg
RNeasy®Mini/Midi	QIAGEN	Hilden
Thermo Sequenase, DYEnamic Direkt cycle sequencing kit	Amersham Pharmacia	Freiburg
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen	Groningen, NL
Vectorette II System	Sigma Genosys	Cambridge, UK

2.10 Medien, Puffer und Lösungen

2.10.1 Bakterienmedien

LB-Medium (1000 ml):

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad	H_2O
pH 7,5	

LB-Agar:

LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar

autoklavieren und entsprechendes Antibiotikum nach Abkühlen zusetzen.

TB-Medium (1000 ml):

12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin
ad 900 ml	dH_2O, nach dem Autoklavieren 100 ml einer sterilen $KHPO_4$-Lösung (0,17 M KH_2PO_4 / 0,72 M K_2HPO_4) zugeben.

SOC Medium (100ml):

2,0 g	Trypton
0,5 g	Hefeextrakt
0,05 g	NaCl
ad	dH_2O,

autoklavieren und vor Gebrauch folgende sterile Lösungen zusetzen:

0,25 ml	1 M KCl
1 ml	2 M $MgCl_2$ (1 M $MgCl_2$*6 H_2O, 1 M $MgSO_4$*7 H_2O)
1 ml	2 M Glucose
pH 7,0	

2.10.2 Standardlösungen

5x TBE (1000 ml):

54 g	Tris-Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad	dH_2O

20x SSC:

3 M	NaCl
0,3 M	Na-Citrat
pH 7,0	

50x TAE (1000 ml):

242 g	Tris-Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad	dH_2O

6x Ladepuffer für Agarosegele:

30%	Glycerin
0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol
0,2%	EDTA
pH 8,0	

DEPC-Wasser:

0,1% (v/v)	Diethylpyrocarbonat in dH_2O, > 4 h bei RT inkubieren, autoklavieren

HEPES-Puffer:

20 mM	HEPES
150 mM	NaCl
pH 7,4	

PBS:

137,0 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na_2HPO_4
1,5 mM	KH_2PO_4
pH 7,2	

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 mM	EDTA pH 8,0

2.10.3 Lösungen Western-Blot

5x Laufpuffer (1000 ml):

15,14 g	Glycin
30,285 g	Tris-Base

25 ml	SDS (20%ige Lösung)
ad	dH_2O

Polyacrylamidgel:

(a) Trenngel (Ansatz für 2 Gele à 6,2 cm x 8,7 cm)

5,9 ml	dH_2O
5,0 ml	Acrylamid
3,8 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
150 µl	10% SDS
150 µl	10% APS
6 µl	TEMED

(b) Sammelgel (Ansatz für 2 Gele à 6,2 cm x 8,7 cm)

0,75 g	Saccharose
3,2 ml	dH_2O
0,833 ml	Acrylamid
0,333 ml	1 M Tris, pH 6,8
50 µl	10% SDS
33 µl	10% APS
3,3 µl	TEMED

Western-Blot-Puffer:

25 mM	Tris-Base
150 mM	Glycin
10%	Methanol
pH 8,3	

Entfärber:

10%	Essigsäure
12%	Isopropanol

Lämmli-Puffer:

120 mM	Tris-Base
10%	SDS
10%	Glycerol
25%	β-Mercaptoethanol
0,01%	Bromphenolblau

Blockpuffer:

0,1%	Tween 21 in PBS
10%	Magermilchpulver

2.10.4 Lösungen Southern-Blot:

Southern-Blot-Hybridisierungspuffer:

0,25 M	Na_2HPO_4, pH 7,2 mit Phosphorsäure
0,25 M	NaCl
1 mM	EDTA, pH 7,6
7%	SDS

Denaturierungslösung:

1,5 M	NaCl
0,5 M	NaOH

Neutralisierungslösung:

0,5 M	Tris pH 7,2
1,5 M	NaCl
1 mM	EDTA

2.10.5 Lösungen Polyacrylamid-Gele

SSCP-Ladepuffer:

95%	Formamid
20 mM	EDTA
0,05%	Bromphenolblau
0,05%	Xylencyanol

SSCP-Polyacrylamidgel (10%ig):

8 ml	AccuGel 29:1 40%
3,5 g	Harnstoff
3 ml	10x TBE
ad 30 ml	dH_2O
200 µl	10% APS
20 µl	TEMED

PA-Gel (6%ig):

4,5 ml	AccuGel 29:1 40%
3 ml	10x TBE
ad 30 ml	dH_2O
200 µl	10% APS
20 µl	TEMED

PAGE-Gel (LOH/HD) (8%ig):

11,2 ml	SequaGel Ultra Pure 25%

20,3 ml	8 M Harnstoff
3,5 ml	10x TBE
ad 35 ml	dH_2O
240 µl	10% APS
24 µl	TEMED

Sequenziergel (6%ig):

4,2 ml	Long Ranger Gel-Solution
14,7 g	Harnstoff
4,2 ml	10x TBE
ad 35 ml	dH_2O
240 µl	10% APS
24 µl	TEMED

2.11 Spezielle Materialien und Geräte

Gel Print 2000i	MWG-Biotech	Ebersberg
GelBond Polyester-Folie	Biozym	Oldendorf
GeneVac SF50	Biometra	Göttingen
Hybond-N+	Amersham Pharmacia	Freiburg
Hyperfilm (ECL)	Amersham Pharmacia	Freiburg
Immobilon™-P	Millipore	Eschborn
LI-COR-Sequencer 4000/4200	LI-COR Inc.	USA
	über MWG Biotech GmbH	Ebersberg
MicroSpin™ Colum	Amersham Pharmacia	Freiburg
Minigel-Twin	Biometra	Göttingen
PerfectBlue Horizontale Gelsysteme	PeqLab	Erlangen
pH-Meter	WTW	Weilheim
Spektralphotometer	Eppendorf	Köln
Spektralphotometer, Uvikon	Kontron	Neufehrn
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
T3 ThermoCycler	Biometra	Göttingen
Trio Thermoblock	Biometra	Göttingen
Vertikal-Elektrophoresystem ADJ-2	PeqLab	Erlangen
Whatman Chromatographiepapier	Whatman	Maidstone, UK
X-OMAT MS Röntgenfilme	Kodak	Stuttgart

2.12 Software

2.12.1 Programme

Adobe Photo Deluxe Home Edition 3.0, Adobe Systems Inc., 1999

Clone, Scientific & Educational Software, 4.0, Serial No. 35014, 1995

MACAW - Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench 2.0.5, NCBI, 1995

Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences, Inc., 1992

ONE-Dscan 1.2, Scananalytics, CSP Inc., 1997

2.12.2 Datenbanken

Blast (Blast 2.1, PSI-Blast) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST]

Censor Server Data Entry Form
[http://www.girinst.org/Censor_Server-Data_Entry_Forms.html]

Human Genome Browser [http://www.genome.cse.ucsc.edu/goldenPath/octTracks.html]

Human Genome Server - The Sanger Centre [http://www.ensembl.org]

PubMed, Nucleotide, Protein, OMIM [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]

RepeatMasker [http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker]

The Genome Database [http://www.gdbwww.gdb.org/]

2.13 Sequenzen

2.13.1 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Selbst kreierte Primer wurden durch Verwendung des Programms Oligo 4.1 auf ihrer optimalen Amplifikationsbedingungen sowie auf ihre Position und Länge in der jeweils angegebenen Accession-Nr. hin überprüft und ausgewählt. Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entsprechend ihrer Verwendung gruppiert und sind nachfolgend aufgeführt.

Mikrosatellitenanalyse

Bezeichnung	*Sequenz (5' ⇒ 3')*	*Tm [°C]*	*Accession-Nr.*	*Position [bp]*
D9S168 fwd	*ggt ttg tgg tct ttg taa gg	55,3	GDB188111	–
D9S168 rev	tgg ttt gtt tgt ata act atc att g	54,8	GDB188111	–
D9S157 fwd	*agc aag gca agc cac att tc	57,3	GDB187914	–
D9S157 rev	tgg gga tgc cca gat aac tat atc	61,0	GDB187914	–
D9S942 fwd	*gca aga ttc caa aca gta	49,1	GDB370738	–
D9S942 rev	ctc atc ctg cgg aaa cca tt	57,3	GDB370738	–

Bezeichnung	*Sequenz (5' ⇒ 3')*	*Tm [°C]*	*Accession-Nr.*	*Position [bp]*
D9S162 fwd	*gca atg acc agt taa ggt tc	55,3	GDB188003	–
D9S162 rev	aat tcc cac aac aaa tct cc	53,2	GDB188003	–
D9S171 fwd	*agc taa gtg aac ctc atc tct gtc t	61,3	GDB188218	–
D9S171 rev	acc cta gca ctg atg gta tag tct	61,0	GDB188218	–
D9S782 fwd	aga aat ctg ttc tca ccc cc	57,3	GDB354826	–
D9S782 rev	ttt gca ggc ctc tga gtt ctc	57,3	GDB354826	–
D9S1846 fwd	aat ggc tgg ttc tag gac tg	57,3	GDB611070	–
D9S1846 rev	aaa ctg gtc tgg tgt ttg c	54,5	GDB611070	–
D9S2016 fwd	gat ctc cta gcc tgt gcc tc	61,4	GDB678963	–
D9S2016 rev	tca tat gca gta cat tag cca tca	57,6	GDB678963	–
c5.3F	gtg gta gaa cta gga cag gg	59,4	AL449423	72387-69
c5.3R	ctg tgt taa gcc ttc ata ga	53,2	AL449423	72230-49
R2.3F	gaa aat gaa act gta ccc att g	54,7	AL449423	81856-77
R2.3R	ggg aca cac att aaa tac act	54,0	AL449423	82138-18
R2.7F	gag aac agg ttt tgg gca g	56,7	AL449423	88852-34
R2.7R	aac tag acc tag gga taa gg	55,3	AL449423	88688-707
Homozygote Deletion				
p16 Ex1α/F	*gaa gaa aga gga ggg gct g	58,8	AL449423	66398-79
p16 Ex1α/R	gcg cta cct gat tcc aat tc	57,3	AL449423	66718-00
p16 Ex2/F	*gga aat tgg aaa ctg gaa gc	55,3	AL449423	63145-26
p16 Ex2/R	tca gat cat cag tcc tca cc	57,3	AL449423	62670-89
p16 Ex3/F	ccg gta ggg acg gca aga ga	63,5	AL449423	60119-00
p16 Ex3/R	ctg tag gac cct cgg tga ctg	63,7	AL449423	59951-71
p15 Ex1/F	aag agt gtc gtt aag ttt acg	54,0	AC000049	25089-109
p15 Ex1/R	aca tcg gcg atc tag gtt cca	59,8	AC000049	25403-383
p15 Ex2/F	tga gta taa cct gaa ggt gg	55,3	AC000049	27658-77
p15 Ex2/R	ggg tgg gaa att ggg taa g	56,7	AC000049	28178-60
p16 Ex1β/F	tgc gca ggt tct tgg tga cc	61,4	AL449423	85109-90
p16 Ex1β/R	cat cat gac ctg gtc ttc ta	55,3	AL449423	84912-31
GAPDH ExG/F	*aac gtg tca gtg gtg gac ctg	61,8	J04038	4395-4415
GAPDH ExG/R	agt ggg tgt cgc tgt tga agt	59,8	J04038	4554-4534
Sequenzierungen				
T3	*aat taa ccc tca cta aag gg	53,2	–	–
T7	*taa tac gac tca cta tag gg	53,2	–	–
M13 fwd (-29)	*cac gac gtt gta aaa cga c	54,5	–	–
M13 rev (-29)	*cag gaa aca gct atg acc	53,7	–	–

* ***Primer IRD 800 markiert***

RT-PCR

Bezeichnung	*Sequenz (5' ⇒ 3')*	*Tm [°C]*	*Accession-Nr.*	*Position [bp]*
RB1-S	tac tgc aaa tgc aga gac aca	49,2	XM_007211	2011-2029
RB2-AS	tgt tcc ctc cag gaa tcc gta	55,7	XM_007211	2550-2529
GAPDH350.1-S	tcc cat cac cat ctt cca	62,3	M33197	276-293
GAPDH350.2-AS	cat cac gcc aca gtt tcc	61,9	M33197	655-638
mRNAp16 fwd	caa cgc acc gaa tag tta cg	57,3	XM_027619	114-133
mRNAp16 rev	agc acc acc agc gtg tc	57,6	XM_027619	564-548
Actin fwd	tga cgg ggt cac cca cac tgt gcc cat cta	61,0	NM_001101	541-70
Actin rev	cta gaa gca ttt gcg gtg gac gat gga ggg	61,0	NM_001101	1201-172
MTAPmRNAfwd	tgg ctc gct tgg ttc cct ta	59,4	XM_011800	47-66
MTAPmRNArev	ctc ctg ggc agc cat gct ac	63,5	XM_011800	982-963
Restriktionsassay				
RA p16Ex1α S	agc ctt cgg ctg gac tgg ctg g	65,7	AL449423	66586-66
RA p16Ex1α AS	ctg gat cgg cct ccg acc gta	65,7	AL449423	66465-85
MS-PCR				
p16-M-S	tta tta gag ggt ggg gcg gat c	66,1	AL449423	66694-71
p16-M-AS	gac ccc gaa ccg cga ccg taa	65,7	AL449423	66545-65
p16-U-S	tta tta gtg ggt ggg gtg gat tgt	61,0	AL449423	66694-71
p16-U-AS	caa ccc caa acc aca acc ata a	58,4	AL449423	66545-65
VHL-M-S	tgg agg att ttt ttg cgt acg c	58,4	AF010238	481-502
VHL-M-AS	gaa ccg aac gcc gcg aa	57,6	AF010238	639-613
VHL-U-S	gtt gga gga ttt ttt tct gta tgt	55,9	AF010238	479-503
VHL-U-AS	ccc aaa cca aac acc aca aa	55,3	AF010238	644-625
Bisulfitsequenzierung				
p16Seq-F2	cct cca gcg gct ttg agg gac agg	63,7	AL449423	66773-51
p16Seq-R2	cta cct gat tcc aat tcc cct gca	64,0	AL449423	66382-405
p16Seq-R*	*cta cct gat tcc aat tcc cct gca	64,0	AL449423	66382-405
SSCP				
p16Ex2 SSCP F	gcc gac ccc gcc act ctc ac	67,6	AL449423	62929-10
p16Ex2 SSCP R	cac cag cgt gtc cag gaa gc	63,5	AL449423	62861-80

Bruchpunktanalyse

Bezeichnung	*Sequenz (5' ⇒ 3')*	*Tm [°C]*	*Accession-Nr.*	*Position [bp]*
Intr2-3p16_1fwd	gtagaagcaggcatgcgtag	59,4	AC000048	22658-39
Intr2-3p16_2fwd	ccttctcttactccccaaca	57,3	AC000048	23446-27
Intr2-3p16_2rev	tgttggggagtaagagaagg	57,3	AC000048	23427-46
Intr2-3p16_3fwd	gctgaaactgccaacattac	55,3	AC000048	24044-25
Intr2-3p16_4fwd	caaacacctaccctctgcta	57,3	AC000048	24561-42
Intr2-3p16_4rev	tagcagagggtaggtgtttg	57,3	AC000048	24542-61
prenestp16_4rev	ccg cag tct agg cct tga a	58,8	AC000048	24522-40
p14fwd	gga gcc agg aat aaa ata ag	53,2	AL449423	85611-592
p14rev	tta cga aat cac acc aaa ca	51,2	AL449423	84855-74
9p21_1fwd	att ccc aag gtt ttc tcc a	52,4	AL449423	80070-88
9p21_14rev	tga aag tgg atg gtg tat gg	55,3	AL359922	159933-13
9p21_15fwd	aga atc aga cat cag gca ca	55,3	AL359922	158866-86
9p21_16fwd	tgt cat tat tga tca gtt ca	49,1	AL359922	75573-92
9p21_17rev	cta cta cca gca aga ggt ca	57,3	AL359922	74517-498
9p21_18fwd	gtg ctg aat tct tag tgt ca	53,2	AL359922	73721-40
9p21_19rev	gga ggc ata ggc act gaa ga	59,4	AL359922	87793-74
9p21_20fwd	gaa gga ctc tga caa tgc tg	57,3	AL359922	87263-82
9p21_21rev	gaa gag ctt tct cca aag ta	53,2	AL359922	142678-97
9p21_22fwd	ggt tgc ata cac aat tag ta	51,2	AL359922	142292-311
9p21_23rev	caa ggc ctg aga tta ctc tg	57,3	AL359922	141396-77
9p21_24fwd	aac gtg tgt ttg gcc act ag	57,3	AL359922	141061-80
9p21_25rev	gag cag cta atg aac aca tc	55,3	AL359922	131453-34
9p21_26fwd	tca ttt tac ctc aat cag ca	51,2	AL359922	131120-39
9p21_27rev	aaa tgt ggc aag aac tcc tc	55,3	AL359922	122454-35
9p21_28fwd	cat cat ggg aaa gct gta gt	55,3	AL359922	121836-55
9p21_29rev	tca cag cca ttt aca gga g	54,5	AL157937	54090-72
9p21_30fwd	ggc tga gaa tcg caa aag a	54,5	AL157937	53557-75
9p21_31rev	gat tgg aca tta ggg agc	51,4	AL157937	46387-70
9p21_32fwd	cag ttt ggc agg aag ttt ta	53,2	AL157937	45957-76
9p21_33rev	tct tcc tcg cat agc att ag	55,3	AL157937	41505-486
9p21_34fwd	gtg gct ccc ttt cat ctt c	56,7	AL157937	41097-115
9p21_35rev	att ttt cca ttc cag gtg ac	53,2	AL157937	35865-46
9p21_36fwd	aga gag gtg tgg tgg tga	56,0	AL157937	35189-72
9p21_39fwd	gat gac cta acc tct tcc aa	55,3	AL157937	4520-39
9p21_40rev	gaa ctt gag aaa cac ctt gg	55,3	AL157937	4879-60
9p21_41fwd	gta gca ttg aga cca tct aa	53,2	AL157937	146804-23
9p21_42rev	ttg taa gaa gcc act atg ta	51,2	AL157937	147046-27

Bezeichnung	*Sequenz (5' ⇒ 3')*	*Tm [°C]*	*Accession-Nr.*	*Position [bp]*
9p21_43fwd	ttc ata cat ctc gga ctg g	54,5	AL354709	109119-37
9p21_44rev	aag agt acg aaa gtc agg a	54,5	AL354709	109639-21
9p21_45fwd	gcc tta gat tgg tga ctg g	56,7	AL354709	101109-27
9p21_46rev	agg agt cag aaa gtc agg a	52,4	AL354709	101551-33
9p21_47fwd	gtt ttg ctg gtt cat cac t	52,4	AL354709	26808-27
9p21_48rev	tct atc agg caa act tat c	50,2	AL354709	27361-43
9p21_49fwd	cat tgg tag aca gtg gtt ga	55,3	AL354709	20775-94
9p21_50rev	cca aac agc act tac agc aa	55,3	AL354709	21195-76
9p21_51fwd	agt ctg cct ata tgg gtt a	52,4	AL354709	8942-60
9p21_52rev	ttg ttt cag cag tag ttt a	48,0	AL354709	9444-42
9p21_53fwd	aga tga agt gga tgg gaa c	54,5	AL354709	3427-45
9p21_54rev	acg gag caa taa acc caa c	54,5	AL354709	4439-21
9p21_55rev	cac tcc gaa cca aaa tga t	52,4	AL354709	2032-14
9p21_55fwd	atc att ttg gtt cgg agt g	52,4	AL354709	2014-32
9p21_56rev	gct tcc ata atg tcc ttt c	52,4	AL354709	2821-03
9p21_57fwd	gtt cct tca gcc agc cag t	58,8	AL354709	1198-217
p15 Ex1/F	aag agt gtc gtt aag ttt acg	54,0	AC000049	25089-109
nestp15 Ex1/F	gtc gtt aag ttt acg gcc aac	57,9	AC000049	25095-115
D9S942 fwd	gca aga ttc caa aca gta	49,1	AL449423	81458-41
nestD9S942 fwd	aat ggt ttc cgc agg atg aga g	60,3	AL449423	81380-58
p16 Ex1β/F	tgc gca ggt tct tgg tga cc	61,4	AL449423	85109-90
nestp16 Ex1β/F	ctt ggt gac cct ccg gat tc	61,4	AL449423	85099-80

2.13.2 Hybridisierungssonden

Name	*Entstehung*	*Größe*	*Verwendung*
SondeL1-*Pst*I	Restriktionsverdau *Pst*I	600 bp	Hypomethylierung
p15 DIG Sonde 253J	`p15 Ex2 fwd` `p15 Ex2 rev`	315 bp	centromerischer Bruchpunkt 253J

SondeSW1710	`D9S942fwd`
	`9p21_1fwd`
	Restriktionsverdau *BamH*I
		654 bp	centromerischer Bruchpunkt SW1710

SondeNTZ1370	`Intr2-3p16_2rev` `Intr2-3p16_3fwd`	816 bp	telomerischer Bruchpunkt 1370
SondeNTZ2000	`p14fwd` `p14rev`	830 bp	centromerischer Bruchpunkt 2000

2.14 Isolierung von Nukleinsäuren

2.14.1 Plasmid-DNA

2.14.1.1 Minipräparation

Aus 2 ml einer 5 ml Übernachtkultur wurden die Bakterien abzentrifugiert (10.000 g, 10 min), und dann mit Hilfe des Qiaprep Minikits die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Intaktheit der Plasmide und der relative Anteil hochspiralisierten Plasmids wurde auf einem Agarosegel geprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Jede Plasmidpräparation wurde zur Kontrolle mittels eines Restriktionsenzyms verdaut.

2.14.1.2 Midi- / Maxipräparation

1 ml einer 5 ml Übertagkultur (8 Stunden) wurde in eine 200 ml Übernachtkultur eingesetzt. Für eine Midipräparation wurden 50 ml, für eine Maxipräparation 200 ml der Kultur abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mittels des *Qiafilter Plasmid Midi-* bzw. *Maxi-Kits* nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.14.2 BAC-DNA

Für die Anzucht der BAC-Vektoren pBACe3.6 wurde das im Vergleich zu LB-Medium gehaltvollere TB-Medium unter Zugabe von 0,2% Glukose gewählt. Als Antibiotikum wurde in Methanol gelöstes Chloramphenicol in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Zur Isolierung der BAC-DNA wurden zunächst 3 ml einer Übertagkultur in 50 ml einer Übernachtkultur eingesetzt. Diese zweite Vorkultur wurde am nächsten Morgen vollständig in eine 500 ml Kultur ohne Antibiotikazusatz überführt. Nach einer weiteren Inkubation für 6-8 h bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und die DNA mit Hilfe des *QIAGEN Large-Construct Kits* nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.14.3 Genomische DNA

Die Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus Kulturzellen, Gewebestücken sowie aus Blutproben wurde über Affinitätschromatographie mit Hilfe des *QIAGEN Blood & Culture DNA Kits* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die vorherige Lyse des jeweiligen Materials ist nachfolgend beschrieben.

2.14.3.1 Kulturzellen

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 175 cm^2-Kulturflasche wurden nach Absaugen des Mediums zunächst trypsiniert und unter Zugabe von 2 ml frischem Medium/FCS mit 1500 x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und

zentrifugiert bevor es mit einem Volumenteil Zell-Lysispuffer und 3 Volumenteilen dH_2O für 10 min auf Eis inkubiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen unter Zugabe des Nukleus-Lysispuffers und QIAGEN Protease [20 mg/ml] bei 50°C für 2 h inkubiert.

2.14.3.2 Gewebe

Die Gewebestücke wurden zunächst in einem eisgekühlten Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert. Anschließend wurden 100 mg Gewebepulvers nach Zugabe des Lysispuffers und QIAGEN Protease [20 mg/ml] bei 50°C über Nacht inkubiert.

2.14.3.3 EDTA-Blut

5 ml EDTA-Blut wurden mit 5 ml Zell-Lysispuffer und 15 ml dH_2O für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1500 x g für 10 min bei 4°C wurden die Nukleoli pelletiert und unter Zugabe des Nukleus-Lysispuffers und QIAGEN Protease [20 mg/ml] ebenfalls bei 50°C für 2 h inkubiert.

2.14.4 RNA-Präparation aus Kulturzellen

RNA wurde entweder unter Verwendung des TriPure-Reagenz oder mit Hilfe des *RNeasy-Kits* aus den Harnblasen- und Nierenzellinien isoliert. Für die Isolierung von zellulärer RNA mit Tripure wurde zunächst das Medium einer konfluent bewachsenen 175 cm^2 Zellkulturflasche dekantiert und der Monolayer zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml TriPure wurden die Zellen 5 min bei RT inkubiert. Das Zelllysat wurde in zwei Eppendorfgefäße überführt und jeweils unter Zugabe von 200 µl Chloroform 15 s kräftig geschüttelt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g/4°C wurde die wäßrige Phase in zwei neue Gefäße überführt, jeweils mit 1,5 ml Isopropanol versetzt und die RNA für 15 min bei RT präzipitiert. Anschließend wurde die RNA bei 12.000 x g/4°C für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließender Zentrifugation gewaschen, kurz getrocknet und in 20 µl RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen.
Die Isolierung der RNA unter Verwendung des RNeasy-Kits entsprach den Angaben des Herstellers und fand sowohl im Mini- als auch im Midi-Format Anwendung.

2.15 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte für die genomische DNA, cDNA, Plasmid-DNA, Cosmid-DNA und BAC-DNA durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm in einer 1:20 Verdünnung. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist nach Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} ein Verhältnis von 1,8–2,0 auf.
Die Intaktheit der genomischen DNA wurde durch Auftragen von 1 µg unverdauter DNA auf ein 0,7% Agarosegel elektrophoretisch überprüft.
Die quantitative Charakterisierung von RNA erfolgte in einer 1:25 Verdünnung entsprechend der oben beschriebenen DNA-Untersuchung, wobei eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

2.16 Enzymatische Reaktionen

2.16.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Untersuchung der gewonnenen Plasmid-DNA oder zur Isolierung definierter DNA-Fragmente wurden 1 µg bzw. 5 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen in einem 2-4-fachen Überschuß (2-4 U/µg DNA)in dem entsprechenden Puffer 1 h bei 37°C verdaut.
Für die L1-Southern-Blot-Analyse wurde 1 µg genomische DNA 3 h mit dem Enzyme *Msp*I bzw. mit seinem methylierungssensitiven Isoschizomer *Hpa*II verdaut. Dazu wurde die DNA in dem entsprechenden Puffer aufgenommen und mit einem 8-10-fachen Restriktionsenzymüberschuß (8-10 U/µg DNA) bei 37°C verdaut.
Bei den zur Bruchpunktanalyse untersuchten DNAs wurden 5 µg mit jeweils 2-4 U/µg DNA der Enzyme *EcoR*I, *Hind*III und *BamH*I im entsprechenden Puffer 1 h bei 37°C verdaut.

2.16.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.16.2.1 Vektordephosphorylierung

Um die Möglichkeit einer Religation eines mittels Restriktionsenzym symmetrisch verdauten Plasmids in einer Ligation auszuschließen, wurde der Vektor pUC18 dephosphoryliert. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 5 µg Vektor in 1x Puffer mit 1 U SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase) 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inaktivierung des Enzyms bei 65°C.

2.16.2.2 Ligation

Für einen intermolekularen Ligationsansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl in der Regel 25 ng pUC18-Vektor-DNA, 1 U T4-DNA-Ligase, 2 µl Ligase-Puffer [10x] mit der nach folgender Formel berechneten Insert-Menge über Nacht bei 16°C inkubiert.

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}\,[\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}\,[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}}\,[\text{bp}] \,/\, \text{Länge}_{\text{Vektor}}\,[\text{bp}]$$

2.16.3 Klonierung von PCR-Produkten

Bei der PCR-Reaktion wird häufig am 3'-Ende eines neu synthetisierten DNA-Stranges ein zusätzliches Adenosin-Nukleotid angehängt. Dieses kann zur Klonierung genutzt werden, in dem man einen T/A-Klonierungsvektor verwendet, der einen komplementären Thymidin-Überhang aufweist.

Nach Aufreinigung des zu klonierenden PCR-Produktes (vgl. 2.18.1) wurde 1–3 µl mit 10 ng Vektor, 120 mM NaCl und 6 mM $MgCl_2$ auf ein Volumen von 10 µl gebracht und 10 min bei RT inkubiert. Für die anschließende Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes eingesetzt (vgl. 2.5.2).

2.17 Gelelektrophoretische Methoden

2.17.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben sowie ein geeigneter Längenstandard wurde mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 100 V aufgetrennt. Die Dichte des Gels (0,7%-3%) wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße gewählt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung, wobei das Gel 5–20 Minuten in einer Lösung aus 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm betrachtet wurde.

2.17.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.17.2.1 Native Polyacrylamidgele

Nicht-denaturierende Polyacrylamidgele (PA-Gele) wurden zur Analyse von PCR-Produkte durchgeführt, bei denen eine höhere Sensitivität als im Agarosegel nötig war. Die 6%ige Gellösung (vgl. 2.10.5) wurde zur Stabilisierung des Gels bei der nachfolgenden Färbung auf eine zwischen zwei vertikale Glasplatten gelegte Polyester-Folie gegossen. Es wurden 10 µl PCR-Produkt mit 4 µl Ladepuffer vermischt und über eine Laufstrecke von 20 cm bei 150-200V für 4-6 h aufgetrennt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte mittels Silberfärbung. Dazu wurde das Gel nach einer 20-minütigen Fixierung in 10% Ethanol, 0,5% Eisessig für

weitere 20 min in einer 1%igen Silbernitratlösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel kurz mit dH_2O gewaschen und solange in Entwickler geschwenkt, bis die Banden deutlich erkennbar waren. Die Aufbewahrung erfolgte in handelsüblicher Haushaltsfolie.

2.17.2.2 SSCP-Gele

Mit Hilfe der SSCP-Analyse (*Single Strand Conformation Polymorphism*) werden DNA-Fragmente detektiert, die aufgrund von Mutationen oder Polymorphismen eine andere Wanderungsgeschwindigkeit im Gel zeigen als Kontrollfragmente.
Nach Reinigung der PCR-Ansätze mit 1:1 Chloroform/Isoamylalkohol wurden ca. 100-300 ng DNA mit 4 µl formamidhaltigem Ladepuffer vermischt, 5 min bei 95°C denaturiert und direkt von der Heizplatte auf ein 10%iges partiell denaturierendes Polyacrylamidgel (vgl. 2.10.5) aufgetragen. Die DNA-Einzelstränge wurden in 1x TBE über eine Strecke von 30 cm bei 300-400 V über 24-26 h bei 4°C aufgetrennt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte ebenfalls mittels Silberfärbung (vgl. 2.17.2.1).

2.17.2.3 Sequenziergele

Zur Erstellung eines 0,2 mm dicken Gels wurden 35 ml der unter 2.10.5 beschriebenen Acrylamid-Sequenziergel-Lösung zwischen gesäuberte Glasplatten gegossen und nach Einsetzen eines Vorkamms 60 min auspolymerisiert. Das Gel wurde in 1x TBE-Laufpuffer in das LI-COR-Sequenziergerät eingesetzt und nach Entfernung des Vorkamms für mind. 15 min einem Vorlauf bei 1500 V unterzogen. Danach wurde die Gelkante mit 1x TBE-Puffer gespült, ein Haifischzahnkamm eingesetzt und 1 µl der frisch denaturierten Sequenzierprobe je Slot aufgetragen. Die Fragmente wurden über Nacht unter Bedingungen des Herstellers elektrophoretisch bei 1500 V aufgetrennt. Die anschließende Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels der serienmäßigen LI-COR-Software des Sequenziergeräts.

2.17.2.4 Gele zur Mikrosatelliten- und Deletions-Analyse

Sowohl die Mikrosatelliten- als auch die Deletions-Analyse der Tumor-DNAs wurde mit Hilfe von 8%igen Polyacrylamidgelen am LI-COR Sequenziergerät durchgeführt. Die Bedingungen entsprachen den unter 2.17.2.3 erwähnten, jedoch fand eine andere Acrylamidlösung (vgl 2.10.5) Verwendung.

2.18 Isolierung von DNA-Fragmenten

2.18.1 Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Extraction Kits* nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die gesuchte, durch Ethidiumbromid im Agarosegel angefärbte und unter UV-Licht sichtbar gemachte Bande ausgeschnitten und das Gelstück mit 3 Volumen Puffer QC bei 50°C aufgelöst. Die DNA wurde auf ein Silicagel-Säulchen aufgetragen und nach einem Waschschritt mit 30 µl dH_2O aus der Membran eluiert.

2.18.2 Isolierung aus Polyacrylamidgelen

Aus einem silbergefärbten Polyacrylamidgel wurden definierte Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNA-Fragmente wurden dann durch 10-minütiges Aufkochen in 100 µl dH_2O aus dem Gel eluiert.

2.19 Southern-Blot

2.19.1 Alkalischer Transfer für radioaktive Hybridisierung

Der Transfer der DNA aus Agarosegelen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N^+) erfolgte unter alkalischen Bedingungen nach Southern [1975] mit Modifikationen von Reed und Mann [1985]. Dabei wurde die verdaute, gelelektrophoretisch aufgetrennte Genom-DNA zunächst in einer 0,25 M HCl-Lösung depuriniert und anschließend für 30 min in Denaturierungslösung geschwenkt. Durch Kapillarkraft wurde die DNA in 0,4 M NaOH aus dem Gel auf die Membran übertragen. Nach 14-16 h Transfer wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und getrocknet.

2.19.2 Transfer mit Hochsalzpuffer für Digoxigenin Hybridisierung

Das Gel wurde zunächst 30 min in Denaturierungslösung geschwenkt, danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation in Neutralisierungslösung, 5 min in 2x SSC. Die Membran wurde kurz in dH_2O, dann in 20x SSC geschwenkt. Geblottet wurde in 20x SSC. Nach 14-16 h Transfer wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und getrocknet.

2.20 Herstellung markierter Sonden

2.20.1 Radioaktive Markierung mittels Random priming

Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Church und Gilbert [1984]: Die Membranen wurden bei 65°C für mindestens eine Stunde in der Hybridisierungslösung 2.10.4 vorinkubiert. Als Hybridisierungssonden dienten verschiedene Plasmid-DNA-Fragmente, die nach der Zufallsprimermethode mittels eines *Oligolabelling Kits* nach Feinberg und Vogelstein [1983]^{B} mit [α-^{32}P]-dCTP bei 37°C für 1 h markiert wurden.

Zur Minimierung des unspezifischen Hintergrundes in den nachfolgenden Hybridisierungsreaktionen wurden die markierten Sonden über eine MicroSpin™ Säule nach Anleitung des Herstellers von überschüssigen Nukleotiden gereinigt.

2.20.2 Digoxigeninmarkierung durch PCR

Zur Herstellung einer DIG-markierten Hybridisierungssonde wurden 100 ng DNA mit je 30 pmol Primer (`p15 Ex1/F` und `p15 Ex1/R`) in 1x PCR-Puffer mit 5% DMSO, 100 µM DIG-dNTP-Mix (bestehend aus dATP, dCTP und dGTP [je 2 mM], dTTP [1,5 mM] und DIG-11-dUTP [0,5 mM]) und 2 U DyNAzyme DNA Polymerase auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden im Biometra T3 Thermocycler mit Deckelheizung wie folgt inkubiert:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 5 min		
35	95 °C / 30 s	55 °C / 40 s	72 °C / 30 s
1			72 °C / 10 min

Nach Auftrennung des gesamten PCR-Ansatzes auf einem 1,5%igen Agarosegel und Ausschneiden der korrekten Banden aus dem Gel wurde das PCR-Produkt wie unter 2.18.1 beschrieben aus dem Gel eluiert.

2.21 Hybridisierung

2.21.1 Hybridisierung mittels radioaktiver Sonde

Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht mit 0,1 ml/cm^2 frischer Hybridisierungslösung, der 50 ng der zuvor bei 100°C für 5 min denaturierten radioaktiven DNA-Sonde zugesetzt wurden. Die Filter wurden dann mit 2x SSC/0,1% SDS je 30 min bei

50°C und 65°C gewaschen, anschließend mit 0,1x SSC/0,1% SDS je 15 min bei den gleichen Temperaturen inkubiert. Abschließend wurden die Membranen kurz in 2x SSC geschwenkt.

2.21.2 Hybridisierung mittels Digoxigenin-markierter Sonde

Die Vorhybridisierung der Membranen erfolgte in einem Hybridisierungsofen mindestens eine Stunde lang bei 65°C mit 20 ml/100 cm^2 Dig Easy Hyb-Hybridisierungslösung. Anschließend wurden die Filter für 6 h mit 2,5 ml/100 cm^2 frischer Hybridisierungslösung und 20% des resuspendierten, frisch denaturierten PCR-Fragmentes (vgl. 2.20.2) inkubiert.
Die Filter wurden im Anschluß daran zuerst mit 2x SSC/0,1% SDS und dann mit 0,1x SSC/ 0,1% SDS jeweils zweimal 5 min bei 65°C gewaschen.

2.22 Nachweis der markierten DNA

2.22.1 Autoradiographie

Die markierten Filter wurden in Frischhaltefolie eingewickelt und gegen Kodak X-OMAT DS-Filme mit molybdänhaltiger Verstärkerfolie je nach Intensität des Signals für eine Zeitspanne von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen bei -70°C exponiert.
Zum Ablösen der Sonde wurde der Filter in kochendes 0,1% SDS gegeben und bis zum Abkühlen auf 37°C darin geschwenkt.

2.22.2 Luminographische Detektion von DIG-11-dUTP

Zur Detektion wurde die Membran kurz in Waschpuffer (Puffer 1 + 0,3% Tween-20; Puffer 1: 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5) gewaschen und dann zur Blockierung in Puffer 2 (Blockierungsvorratslösung/Puffer 1, im Verhältnis 1:10) 60 min inkubiert. Der an Alkalische Phosphatase gebundene Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 75 mU/ml (750 U/ml, 1:10.000 in Puffer 2 verdünnt) auf die Filter gegeben und wiederum 60 min inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper 4x 15 min mit Hilfe des Waschpuffers entfernt. Es folgte eine 5-minütige Äquilibrierung der Membranen mit Puffer 3 (0,1 M Tris; pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM $MgCl_2$).
Die Lumineszenznachweisreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml CSPD® [Bronstein *et al*., 1991] (25 mM, 1:100 in Puffer 3 verdünnt) unter Lichtausschluß gestartet. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurden die Membranen in eine Folie eingeschweißt, die Chemilumineszenz-Reaktion bei 37°C präinkubiert und durch 5-sekündige bis 30-minütige Exposition auf Hyperfilm ECL-Filmen dokumentiert.

Zum Ablösen der alkali-labilen Sonde wurden die Membranen zunächst in dH_2O, dann 2x 15 min in 0,2 M NaOH; 0,1% SDS bei 37°C und zuletzt in 2x SSC gewaschen. Die erneute Hybridisierung und Detektion erfolgte nach obiger Vorschrift.

2.23 Polymerase-Kettenreaktion

2.23.1 Standard-Protokoll

Ein Standard-Reaktionsansatz enthält 100 ng DNA, 1x PCR Puffer, 150 µM dNTP-Mix, je 30 pmol Primer und 1 U DyNAzyme DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Die PCR-Bedingungen wurden auf den Biometra T3 Thermocycler mit Deckelheizung wie folgt gewählt:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 5 min		
30	95 °C / 30 s	55 °C / 40 s	72 °C / 30 s
1			72 °C / 10 min

Die Temperatur der Primer-Anlagerung wurde meist 2-4°C unterhalb des Tm-Wertes der benutzten Primer-Paare gewählt. Die Dauer der Primer-Verlängerung hängt von der Länge des entstehenden PCR-Produkts ab, wobei ca. 1000 bp pro Minute amplifiziert werden können.

Es wurden jeweils 20 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer versehen und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Agarosekonzentration des Gels wurde nach der erwarteten Größe des Amplifikats justiert.

2.23.2 Mikrosatelliten-Analyse

Das menschliche Genom besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlich langen Di-oder Trinukleotidrepeats, sog. Mikrosatellitenmarkern. In dieser Arbeit fanden meist hochpolymorphe Dinukleotidrepeatmarker Verwendung, da die meisten Individuen heterozygot in Bezug auf ihre Repeatlänge sind. Nach Amplifikation dieser Marker kann eine Aussage über einen eventuellen Allelverlust getroffen werden.

Die PCR-Methodik fand modifiziert nach An *et al*. [1996] Anwendung. Die Marker D9S942 und D9S171 wurden in einer Duplex-PCR mit Standard-Mix amplifiziert. Es wurden jedoch nur 15 pmol je Primer eingesetzt, da die benutzten Primer (`D9S942 fwd/D9S942 rev` und `D9S171 fwd/D9S171 rev`) für eine Analyse mit dem LI-COR Automaten fluoreszenz-markiert waren (IRD800).

Für die Marker D9S168, D9S162 und D9S157 wurde eine Triplex-PCR mit Standard-Mix etabliert. Die Konzentration der verwendeten Primer `D9S168 fwd/D9S168 rev`,

D9S162 fwd/D9S162 rev und D9S157 fwd/D9S157 rev lag bei 19/10/17 pmol je Primer für den jeweiligen Mikrosatellitenmarker.

Sowohl die Duplex-, wie auch die Triplex-PCR wurde folgenden Temperaturzyklen unterzogen:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 5 min		
26	95 °C / 30 s	55 °C* / 30 s	72 °C / 60 s
1			72 °C / 10 min

*Die Primer-Anlagerungstemperatur wurde für jedes Primerpaar in Abhängigkeit des jeweiligen Tm-Wertes gewählt (vgl. 2.13.1).

Je 4 µl des 1:10 verdünnten PCR-Produkt wurden mit 4 µl *Stop Loading Buffer* (Amersham) versehen und 1 µl 8%iges Polyacrylamidgel (vgl. 2.10.5) aufgetragen und auf dem LI-COR-Automaten gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Mikrosatellitenmarker D9S1846, D9S2016 und D9S782 wurden nur in Zellinien, nicht in Tumor-DNA, untersucht. Ihre Analyse wurde unter Standard-PCR-Bedingungen im 3%igen Agarosegel durchgeführt.

2.23.3 Untersuchung auf homozygote Deletionen

Die Analyse der Exon 1α und Exon 2 des CDKN2A-Gens auf homozygote Deletion wurde für Tumor-DNA in 50 µl Standard-PCR-Mix (+5% DMSO) mit Hilfe von je 15 pmol fluoreszenzmarkierten Primern auf dem LI-COR Automaten durchgeführt. Zum quantitativen Nachweis der beiden Exon-Amplifikate wurde für alle Tumor-DNAs das GAPDH-Gen jeweils coamplifiziert (ebenfalls je 15 pmol). Die Untersuchung für das Exon 3, Exon 1β, sowie für beide Exone des CDKN2B Gen wurden nur für Zellinien-DNA durchgeführt. Diese PCRs wurden analog zur Mikrosatellitenanalyse unter Standard-PCR-Bedingungen mit 5% DMSO unter Auftrennung im 2%igen Agarosegel durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden im Biometra T3-Cycler gewählt:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 5 min		
30*	95 °C / 30 s	55 °C / 40 s	72 °C / 30 s
1			72 °C / 10 min

*GAPDH Primer wurden 10 Zyklen später hinzugegeben.

Je 4 µl des 1:20 verdünnten PCR-Produkt wurden mit 4 µl *Stop Loading Buffer* (Amersham) versehen und 1 µl auf ein 8%iges Polyacrylamidgel (2.10.5) aufgetragen und auf dem LI-COR-Automaten gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.23.4 Mutationsanalyse mittels SSCP

Zur Mutationsanalyse des Exon 2 des CDKN2A-Gens wurden zwei sich überlappenden und den kodierenden Bereich vollständig umfassende PCR-Fragmente amplifiziert (Lage der Primer vgl. Abbildung 3-7).

Das Amplifikat mit den Primern `p16 Ex2/F` und `p16 Ex2SSCP/R` (Anlagerungstemperatur 55°C) zeigt im Standard-PCR-Mix unter Zugabe von 5% DMSO eine Länge von 285 bp und wird im weiteren Verlauf als ‚Teil1' bezeichnet. Bei einer Temperatur von 65°C ergibt sich mit zusätzlichen 4,5 mM MgCl und den Primern `p16 Ex2SSCP/F` und `p16 Ex2/R` ein als ‚Teil2' bezeichnetes 260 bp-Fragment.

Alle Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichten und im Biometra Trio-Block folgendermaßen inkubiert:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 5 min		
34	95 °C / 45 s	55/65 °C / 45 s	72 °C / 45 s
1			72 °C / 10 min

Die Auftrennung erfolgte wie unter 2.17.2.2 beschrieben im 10%igen Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung.

2.23.5 Restriktions-Assay

Zunächst wurden 500 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl einem Restriktionsverdau (vgl. 2.16.1) mit jeweils 10 U der Enzym *Hpa*II und *Msp*I für zunächst 3 h unterzogen. Danach wurden weitere 5 U des jeweiligen Enzyms zugegeben und die Ansätze für weitere 3 h inkubiert.

100 ng der *Hpa*II-verdauten, der *Msp*I-verdauten oder 100 ng unverdaute DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1x PCR-Puffer, 50 pmol je Primer, 3,5 mM MgCl 1,2 mM dNTP-Mix, 5% DMSO und 1,2 U Qiagen Hotstar Taq nach Überschichtung mit einem Tropfen Öl unter folgenden Bedingungen im Biometra Trio-Block amplifiziert:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 15 min		
30	95 °C / 30 s	67 °C / 30 s	72 °C / 60 s
1			72 °C / 10 min

Die PCR-Produkte wurden auf einem nicht-denaturierenden 6%igem Polyacrylamidgel (vgl.2.17.2.1) gelelektrophoretisch aufgetrennt und über eine Silberfärbung nachgewiesen.

2.24 DNA-Analyse mittels Bisulfit

2.24.1 Bisulfitumwandlung

Die chemische Umwandlung von Cytosinbasen in Uracil innerhalb denaturierter genomischer DNA mittels Bisulfit beruht auf einer Methode nach Clark *et al*. [1994]. Durch Umwandlung der DNA unter Verwendung des *CpGenome DNA Modification Kits* ergaben sich im Vergleich zur Originalmethode reproduzierbarere Ergebnisse, so daß alle DNAs nach Angaben des Hesterstellers Q-Biogene behandelt wurden.

Es wurde jeweils 1 µg DNA zur Umwandlung eingesetzt und nach Fällung der DNA in 20 µl dH_2O aufgenommen. Die Proben wurden bei –20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.24.2 Methylierungs-spezifische-PCR (MS-PCR)

Die *methylation-specific-PCR* wurde sowohl für das CDKN2A-Gen als auch für das VHL-Gen nach einer Methode von Herman *et al*. [1996] leicht modifiziert durchgeführt.

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 100 ng bisulfitbehandelte DNA (vgl. 2.24.1) in 1x PCR-Puffer mit 50 pmol je Primer, 3,5 mM MgCl, 1,2 mM dNTP-Mix und 1,2 U Qiagen Hotstar Taq mit einem Tropfen Öl überschichtet und im Biometra Trio-Block wie folgt der Amplifikation unterzogen:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 15 min		
30	94 °C / 30 s	55/60 °C* / 40 s	72 °C / 30 s
1			72 °C / 10 min

* CDKN2A-Gen mit 55°C, VHL-Gen mit 60°C Primer-Anlagerung.

2.24.3 Bisulfitsequenzierung

Für die Bisulfitsequenzierung wurden zunächst 100 ng der unter 2.24.1 umgewandelte DNA mit je 15 pmol der Primer `p16-Seq fwd` und `p16-Seq rev` (Lage der Primer ist in Abbildung 3-7 zu erkennen) in einem Gesamtvolumen von 25 µl in 1x PCR-Puffer mit 200 µM dNTP-Mix und 0,6 U Qiagen Hotstar Taq im T3-Cycler wie nachfolgend beschrieben der Amplifikation unterzogen:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 15 min		
40	94 °C / 30 s	60 °C / 30 s	72 °C / 30 s
1			72 °C / 10 min

Der vollständige PCR-Ansatz wurde zur Aufreinigung in einem 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt und die entstandenen Produkte anschließend wie unter 2.18.1 beschrieben aus dem Gel extrahiert und die DNA in dH_2O eluiert.
Für die Sequenzierung wurden 4 µl des aufgereinigten PCR-Produktes in die unter 2.26 beschriebene Sequenzierreaktion mit dem IRD800-markierten Sequenzierprimer `p16-Seq rev/2` eingesetzt und auf dem LI-COR-Automaten analysiert.

2.25 Vectorette-Klonierung

2.25.1 Erstellung von Vectorette-DNA-Bibliotheken

Zunächst wurde 1 µg genomische DNA mit 10 U der Enzymen *Eco*RI, *Hind*III oder *BamH*I mit 4 µl Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 40 µl 1 h lang restringiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms wurden, unter Zugabe von 2 mM ATP, 2 mM DTT und 1 U T4 DNA Ligase, 3 pmol korrespondierenden Vectorette-Sonde an die entstandenen DNA-Fragmente ligiert. Dazu wurde der Ansatz 3mal je 60 min bei 20°C und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Vectorette-DNA-Bibliothek wurde mit 200 µl dH_2O verdünnt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.25.2 Long-Range-PCR

Zur Amplifizierung der unter 2.25.1 erstellten Vectorette-Bibliotheken wurde 1 µl der aliquotierten DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1x PCR-Puffer 3 (Roche), 350 µM dNTP-Mix, 30 pmol Primer (je ein Vectorette-spezifischer und ein genspezifischer) und 1,5 U Expand Long Template Taq (Roche) wie folgt inkubiert:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	93 °C / 2 min *		
10	93 °C / 10 s	55 °C / 30 s	68 °C / 6 min
20	93 °C / 10 s	55 °C / 30 s	68 °C / 6 min +20 s§
1			68 °C / 10 min

*Die Polymerase wurde erst nach dem ersten Denaturierunsschritt hinzugegeben.
§ Die Zeit der Primer-Verlängerung wurde für jede erstellte Vektorette-Bibliothek optimiert, sie lag zwischen 4-8 min mit einer Verlängerung von 20 s pro Zyklus bei dem 11-20ten Schritt.

Nach jeder Amplifikation erfolgte eine Reamplifikation unter gleichen PCR- und Zyklusbedingungen mit jeweils 1 µl des ersten Ansatzes und mit anderen, nach innen versetzten Primerpaaren (nestVectorette/nestGenspezifisch). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte im 0,6-1%igem Agarosegel mit anschließender Extraktion und Elution der

DNA (2.18.1). Diese aufgereinigten Amplifikate wurde sofort in eine T/A-Klonierungsvektor ligiert (2.16.3), transformiert (2.5.2) und schließlich sequenziert (2.26).

2.26 Sequenzierung

Die nicht-radioaktive Sequenzierung von Plasmiden wurde mit Hilfe des LI-COR-Automaten unter Verwendung des *Thermosequenase Kits* durchgeführt.
Zunächst wurde ein Sequenzier-Premix, bestehend aus einem Gesamtvolumen von 25 µl mit je 1 µg DNA, 2 pmol Sequenzierprimer, 3 µl DMSO und 6 U SequiTherm EXELII™ DNA Polymerase, hergestellt. In 0,2 ml Reaktionsgefäßen wurden 1,5 µl der jeweiligen Nukleotidlösung mit 6 µl Premix vermischt und mit Mineralöl überschichtet.
Die Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95 °C / 2 min		
30	95 °C / 15 s	Tm / 30 s	70 °C / 1 min

Anschließend wurden 4 µl der Sequenzierreaktion mit 2 µl *Stop Loading Buffer* (Amersham) vermischt, 3 min bei 96°C denaturiert und sofort auf das Sequenziergel (vgl. 2.17.2.3) aufgetragen.

2.27 Reverse Transkription

Die Transkription von mRNA zu DNA wurde mit Hilfe der AMV Reversen Transkriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Promega durchgeführt. In einem Voransatz von 10 µl wurden zunächst 2 µg zelluläre RNA mit DEPC-Wasser und 160 ρmol Oligo dT_{15}-Primer für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl eines Ansatzes, bestehend aus 2 µl $MgCl_2$ [50 mM], 2 µl Reverse Transkriptase Puffer [10x], 2 µl dNTP-Mix [je 10 mM], 20 U RNase-Inhibitor und 8,5 U AMV-RT, wurden die Proben zunächst 45 min und nach Zugabe von weiteren 5 U AMV-RT nochmals 30 min bei 42°C inkubiert. Abschließend wurde die AMV-RT 5 min bei 95°C denaturiert und die entstandenen cDNAs bei –80°C gelagert.

2.28 Proteinanalyse-Verfahren

2.28.1 Herstellung von Zellysaten für die Proteinanalyse

Zur Proteinextraktion wurden 2 ml Proteinlysepuffer auf eine mit PBS gewaschene, konfluent bewachsene 175 cm^2 Zellkulturflasche gegeben und 1 h auf Eis geschwenkt. Um die Viskosität des Lysats zu minimieren, wurde es 3-4mal durch eine 25G Nadel passiert.

2.28.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Durchführung der Proteinbestimmungen wurden 20 µl des Lysats auf einer ELISA-Platte mit 10 µl der im Proteinassay DC-Kit enthaltenen Lösung A (Alkalische Kupfertartrat Lösung) und 80 µl Lösung B (Folin Reagenz) vermischt. Nach 20 min wurde die Extinktion bei 690 nm gemessen. Als Proteinstandard diente eine Albuminverdünnungsreihe, und der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde über die Standardreihe berechnet.

2.28.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer Methode von Laemmli [Laemmli, 1970] mittels einer Mini-Twin-Gel-Kammer mit einer Laufstrecke von 8 cm. Es wurden jeweils 8 µg/10 µl Zelllysat mit gleichem Volumen Lämmlipuffer vermischt, 5 min bei 96°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung ins Eisbad gestellt.
Zur Erstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurde nach Polymerisation des Trenngels und Reinigung des zuvor mit Isobutanol überschichteten Gelrandes das Sammelgel gegossen. Nach einer erneuten 45-minütigen Polymerisation wurden die Proben sowie 10 µg des Protein-Längenstandards in die ausgespülten Taschen aufgebracht und eine Proteintrennung in 1x Laufpuffer bei 110 V für ca. 1 h durchgeführt.

2.28.4 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel auf 3 mit Blotpuffer angefeuchtete Whatman-papiere gelegt und auf ihnen eine Immobilon-Membran (in Methanol angefeuchtet und in Blotpuffer abgespült) und wiederum 3 Lagen feuchtes Whatmanpapier geschichtet. Dieser Sandwich wurde mit der Gelseite zur Anode gerichtet in die Blotkammer eingespannt. Der Transfer erfolgte für mind. 1 h bei 100 V. Die vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch eine einstündige Färbung des Gels mit 0,25% Coomassie-Blau G, 50% Methanol und 10% Essigsäure mit anschließender Entfärbung bestätigt.

2.28.5 Immunodetektion

Vor der anschließenden Detektion wurde die Membran zunächst bei 4°C in Blockpuffer über Nacht inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (1:5000 in Blockpuffer verdünnt) wurde die Membran dreimal für 10 min in PBS/0,1% Tween unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem peroxidase-gekoppelten anti-mouse Sekundärantikörper (1:2000 in Blockpuffer verdünnt) erneut für 1 h inkubiert. Nach abschließender dreifachen Waschung wurde ca. 0,125 ml/cm^2 Membran ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 gemischt und zur Proteindetektion exakt 1 min lang auf die abgetropfte Membran aufgebracht.

3 ERGEBNISSE

3.1 Molekulare Charakterisierung des CDKN2-Locus in Harnblasenkarzinomen

Durch molekulargenetische Analysen des CDKN2-Locus auf Chromosom 9p21 sollte zunächst ein Überblick über die Intaktheit dieses Chromosomenabschnittes in Harnblasentumoren gewonnen und im weiteren Verlauf festgestellt werden, ob und durch welchen Mechanismus die dort liegenden Tumorsuppressorgene, v.a. CDKN2A, inaktiviert wurden.

Für diese Untersuchung standen Gewebeproben von 86 Urothelkarzinomen (TCC) aus der Urologischen Klinik Düsseldorf zur Verfügung. Die Histologie von 85 dieser Proben ist in Tabelle 3-1 zusammenfassend aufgeführt. Die nicht aufgeführte Probe entstammte einem *Carcinoma in situ*.

Die Einstufung der Karzinome bzgl. ihres Stadiums und des Grads wurde entsprechend der UICC Klassifikation von 1997 für Harnblasenkarzinome vorgenommen (vgl. 1.4.1).

Tabelle 3-1. Histologien der verwendeten Harnblasenkarzinome. Insgesamt standen 86 TCCs zur Verfügung, ein *Carcinoma in situ* ist nicht in der Tabelle aufgeführt.

Staging / *Grading*	*pTa*	*pT1*	*pT2*	*pT3*	*pT4*	*Σ*
G1	*2*	*–*	*1*	*–*	*–*	***3***
G2	*3*	*4*	*8*	*7*	*1*	***23***
G3	*–*	*6*	*14*	*23*	*12*	***55***
G4	*–*	*–*	*–*	*2*	*2*	***4***
Σ	***5***	***10***	***23***	***32***	***15***	***85***

64 Proben stammen von männlichen Patienten, 22 von weiblichen Patienten. Das Patientenalter bei Tumordiagnose lag zwischen 41 und 97 Jahren, wobei das Durchschnittsalter 65 Jahre betrug. Die Gewebeproben wurden wie unter 2.14.3.2 beschrieben aufgearbeitet und zur DNA-Isolierung eingesetzt.

3.1.1 Untersuchung auf Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH)

Es wurden zunächst 5 Mikrosatellitenmarker ausgesucht, die den zu betrachtenden CDKN2-Locus umschließen. Jeweils einer war auf jeder Seite deutlich außerhalb des Locus als Kontrolle angeordnet. Einer wurde möglichst nah am 5'-Bereich des p16 Gens ausgewählt und zwei weitere wurden nahe dem 3'-Bereich des Gens gewählt. Ihre genau Lage in Bezug auf die Gene, welche für $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ und $p15^{INK4b}$ kodieren, ist in Abbildung 3-1 schematisch verdeutlicht. Der Mikrosatellitenmarker D9S171 liegt centromerisch von CDKN2B, der Marker D9S942 ist zentral zwischen CDKN2A Exon 1β und Exon 1α lokalisiert. Die Marker D9S162, D9S157 und D9S168 liegen telomerisch von CDKN2A Exon 3, wobei sich D9S168 weit außerhalb des Locus befindet.

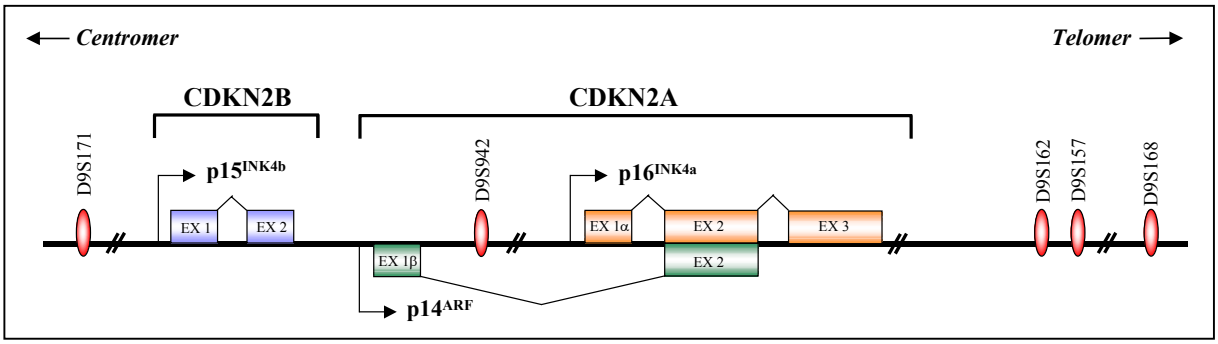

Abbildung 3-1. Lage der zur LOH-Analyse verwendeten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 9p21 in Harnblasenkarzinomen.

Zum einen wurde eine Duplex-PCR für die Mikrosatelliten-Marker D9S171 und D9S942 unter Verwendung der Primerpaare `D9S171fwd/D9S171rev` und `D9S942fwd/D9S942rev` durchgeführt. Die Amplifikate der beiden Allele waren für den Marker D9S171 zwischen 159 und 177 bp groß, für den Marker D9S942 zwischen 100 und 130 bp. Zum anderen wurde eine Triplexreaktion für die Marker D9S162, D9S157 und D9S168 mit den Primerpaaren `D9S162fwd/D9S162rev`, `D9S157fwd/D9S157rev` und `D9S168fwd/D9S168rev` optimiert. Die Fragmentlängen der Allele waren für die jeweiligen Marker zwischen 172 und 196, 133 und 149 und 227 und 247 bp lang (Primersequenzen vgl. 2.13.1, PCR-Bedingungen vgl. 2.23.2).
Die Duplex- und Triplexanalysen wurden für alle zur Verfügung stehenden TCC-Tumor-DNAs sowie für ihre korrespondierende Normalgewebe-DNA jeweils 3mal durchgeführt. Falls keine Gewebeprobe aus dem Normalurothel zur Verfügung stand, wurde DNA aus Blut des Patienten (vgl. 2.14.3) zur Analyse eingesetzt.
Abbildung 3-2 zeigt typische Ergebnisse der Duplex-PCR für die Proben #197, #193, #86 und #94 sowie Ergebnisse aus der Triplex-PCR für die Proben #124, #152, #85, #91 und #74. Für

jede Probe sind die Produkte aus dem Normalgewebe (N) und dem Tumorgewebe (T) direkt nebeneinander aufgetragen.

Jeder der fünf untersuchten Marker zeigt nach Amplifikation bei allen untersuchten Proben ein für ihn charakteristisches Muster, bestehend aus Banden unterschiedlicher Intensität. Neben der intensivsten Hauptbande zeigen sich jeweils mehrere ‚Schattenbanden', welche auf Produkte fehlerhafter Amplifikation (‚Stottern') zurückzuführen sind.

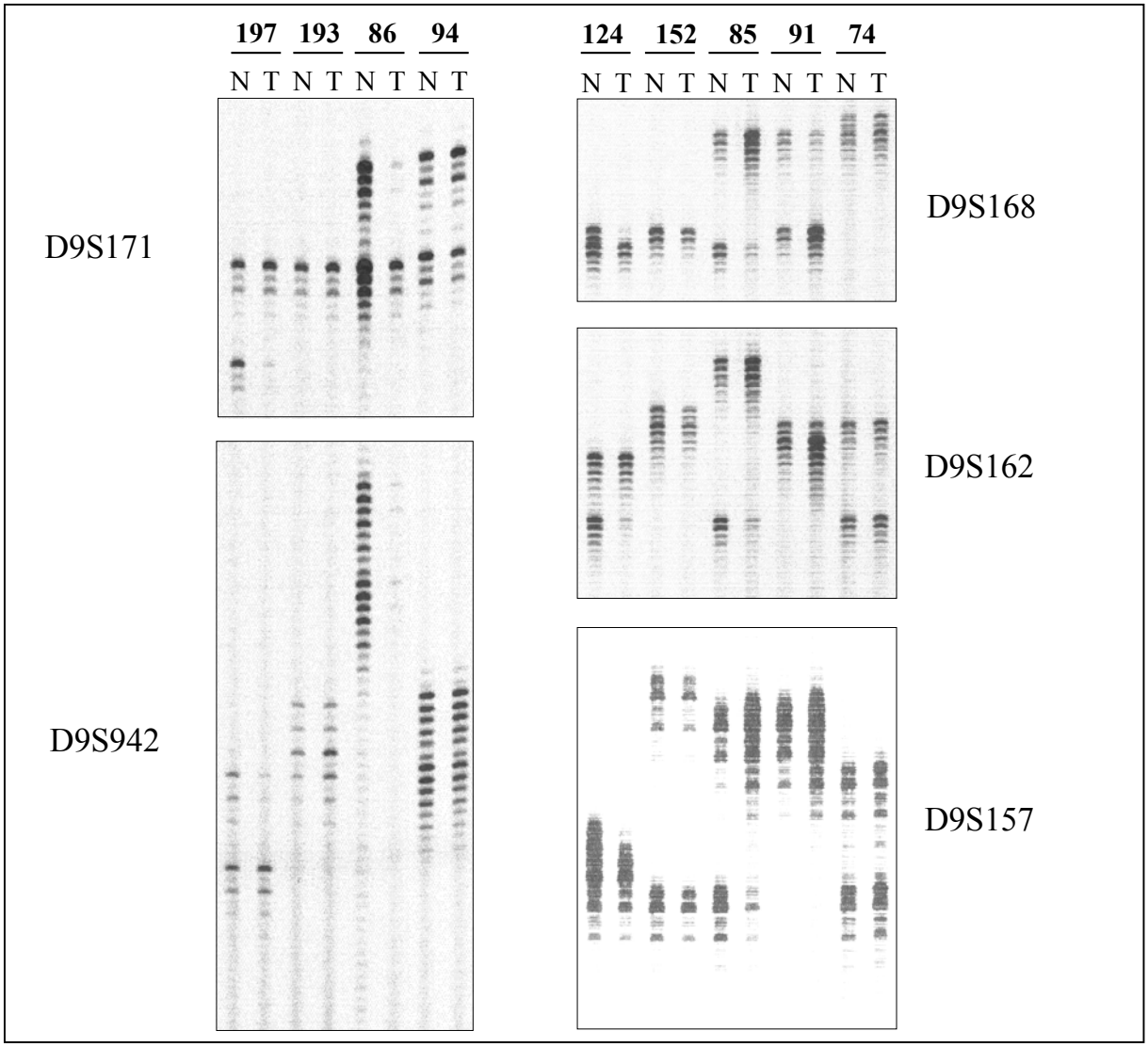

Abbildung 3-2. Bandenmuster nach Amplifikation der Mikrosatellitensequenzen im Bereich des CDKN2-Locus und Auftrennung mittels eines DNA-Sequenzierautomaten (LICOR, MWG Biotech, Ebersberg). Linke Seite Duplex-PCR mit den Markern D9S171 und D9D942, rechte Seite Triplex-PCR mit den Markern D9S162, D9S168 und D9S157. N, Normalgewebe bzw. Blut; T, Tumorgewebe.

In keiner der untersuchten Proben ist, wie eigentlich bei einem Verlust der Heterozygotie zu erwarten, ein völliges Verschwinden eines Allels zu beobachten; vielmehr läßt sich in einigen Tumorproben eine verringerte relative Intensität einer Bande im Vergleich zum Normalgewebe feststellen. Dieses ist auf einen unterschiedlich hohen Anteil an Nicht-Tumorzellen in dem entnommenen Tumorgewebe zurückzuführen.

Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten wurde mittels ONE-Dscan Software durchgeführt und ist in Abbildung 3-3 exemplarisch für 3 Proben aus der Multiplex-PCR für die Marker D9S171 und D9S942 dargestellt. Die Hauptbanden des Normalgewebes dienen zum einen zur Absicherung des heterozygoten Status für die ausgewählten Mikrosatellitenmarker, zum anderen ist ihre Intensität ein Maß für die Gesamtmenge im Normalgewebe im Vergleich zu den Banden im Tumorgewebe, da die PCR nicht bis zur Sättigung durchgeführt wurde. Daher entspricht die DNA-Menge der Fläche unter den jeweiligen Peaks. Zur mathematischen Berechnung dieser Flächen wurden sie durch eine Gauß'sche Normalverteilungsfunktion angenähert, (vgl. den roten Graphen in Abbildung 3-3). Die Auswertung von Duplex- und Triplex-PCR Reaktionen ermöglicht auch die Entdeckung von homozygoten Deletionen.

Die Tumorprobe #197T zeigt sowohl im Marker D9S171 als auch im Marker D9S942 einen massiven Verlust eines Allels im Vergleich zur Normalprobe #197N, also LOH (*loss of heterozygosity*). Die Gewebeprobe #193 ist im Normalgewebe für den Marker D9S171 homozygot und damit für den Assay nicht informativ, für den Marker D9S942 zeigt die Tumorprobe im Vergleich zum Normalgewebe keinen Unterschied in der Bandenintensität. Die Probe #86T zeigt einen LOH für den Marker D9S171, im Marker D9S942 liegt ein Verlust beider Allele vor (homozygote Deletion, HD).

Ein Intensitätsverlust eines Allels im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe von mehr als 40% wurde als LOH für den entsprechenden Markern definiert. Die Rationale für diesen Grenzwert ist in Abbildung 3-4 erläutert.

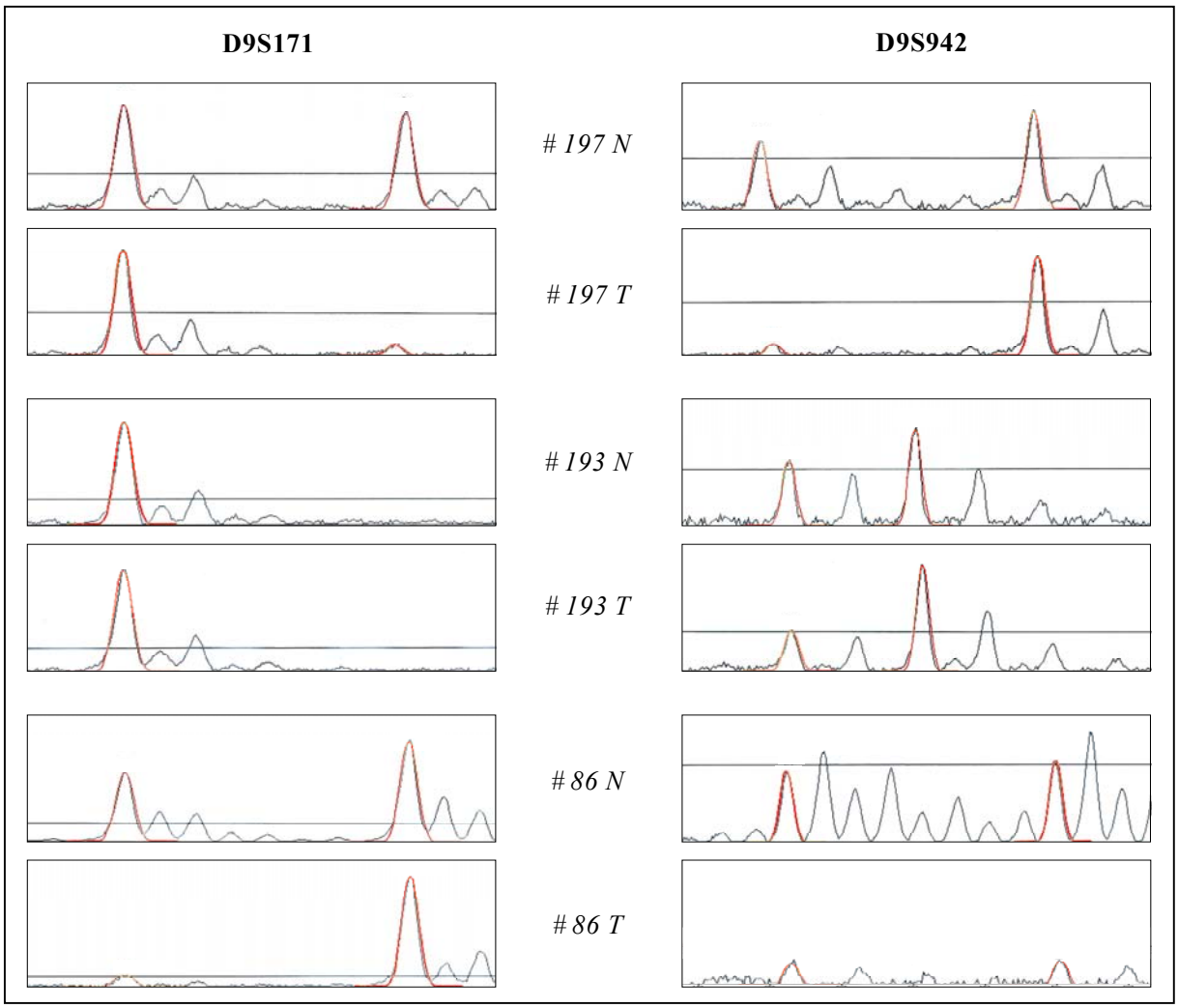

Abbildung 3-3. Analyse des Verlustes der Heterozygotie im CDKN2-Locus. Elektrophoretogramm fluoreszenz-markierter PCR-Produkte nach Amplifikation der Mikrosatelliten D9S942 und D9S171. Auswertung der Bandenmuster mittels ONE-Dscan Software. Roter Graph, Gauß'sche Normalverteilungsfunktion. Formel zur Berechnung der Intensitätsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe: $(M1_T^A+M1_T^B / M1_N^A+M1_N^B) / (M2_T^A+M2_T^B / M2_N^A+M2_N^B)$.
$M1_T^A$: Mikrosatellitenmarker 1, Allel A der Tumorprobe, usw.

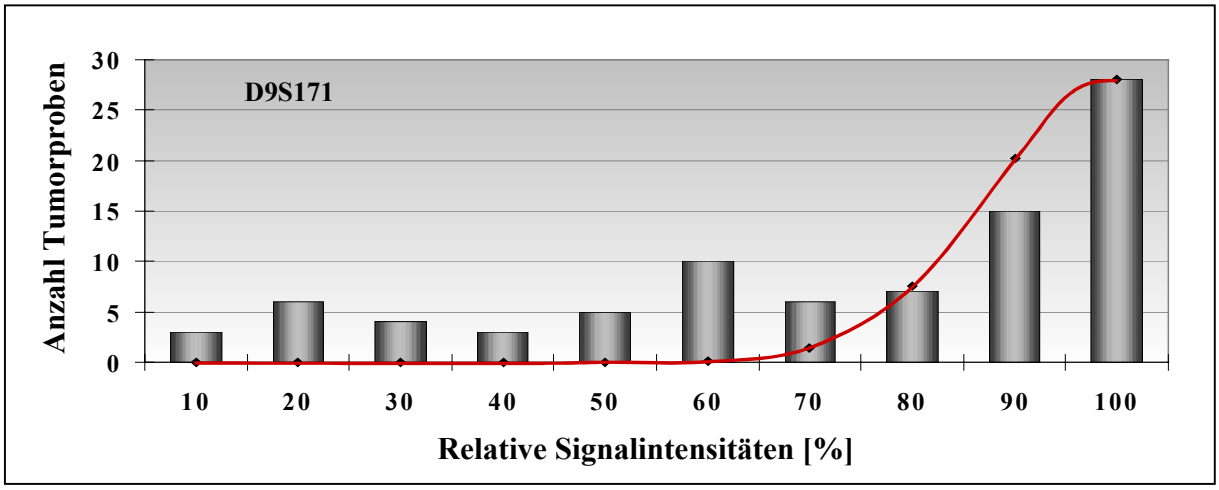

Abbildung 3-4. Bestimmung des Grenzwertes zur LOH Analyse. Der Wert wurde auf 60% festgelegt, da bei diesem Wert bei allen untersuchten Markern keine Probe mehr unterhalb der Gauß'schen Kurve lag, welche eine Normalverteilung des reinen Meßfehlers der Methode anzeigt.

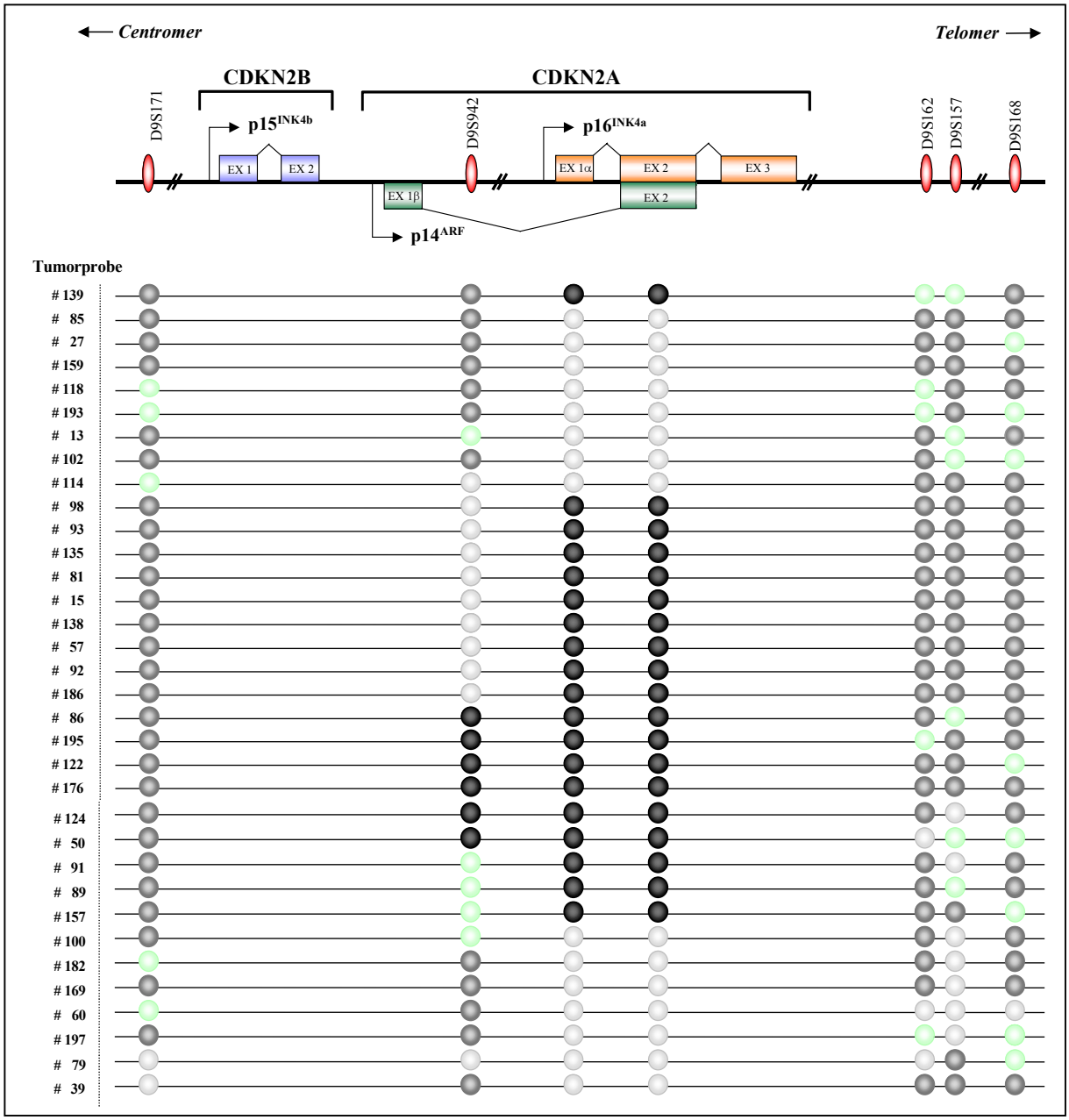

Abbildung 3-5. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der LOH-Analyse und dem Nachweis der homozygoten Deletionen (HD) (vgl. Abbildung 3-6). 34 von 86 Tumorproben zeigen den Verlust eines oder mehrerer Mikrosatellitenmarker, 19 Proben weisen eine HD auf. Schwarze Kugel, HD; graue Kugel, LOH; weiße Kugel, Retension; grüne Kugel, nicht informativ.

34 von 86 Proben zeigten reproduzierbare LOHs in einem oder mehreren Markern (vgl. Abbildung 3-5). Acht diese 34 Tumoren zeigten in allen fünf untersuchten Marker einen Verlust der Heterozygotie, 10 zeigten keine Veränderung im Marker D9S942, obwohl die angrenzenden Marker LOH aufwiesen, sechs zeigten homozygote Deletion des Markers D9S942 (vgl. #86T in Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3).

3.1.2 Nachweis von homozygoten Deletionen

Anschließend wurden alle 86 Tumorproben im Hinblick auf eine homozygote Deletion des CDKN2A-Gens durch quantitative PCR untersucht. Für sechs Proben lag die Vermutung nahe, daß eine homozygote Deletion dieses Genabschnittes vorliegt, da sich bereits bei der LOH-Analyse eine homozygote Deletion des intragenischen Mikrosatellitenmarkers D9S942 gezeigt hatte (vgl. #86 in Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3).

Zu diesem Zweck wurde für jede Tumorprobe sowohl für das Exon 1α als auch für das Exon 2 des CDKN2A-Gens eine quantitative PCR optimiert (vgl. 2.23.3) und diese für jede Probe dreifach durchgeführt. Die Lage der verwendeten genspezifischen Primer ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Die Harnblasenkarzinom-Zellinie SD, mit einer weit über das CDKN2A-Gen hinausreichenden Deletion, diente als Negativkontrollprobe. Als Positivkontrolle wurde DNA aus Leukozyten eingesetzt. Beide Kontrollen wurden bei jedem PCR-Durchgang mitgeführt.

Da das Chromosom 12 in Harnblasentumoren meist unverändert vorliegt, wurde für jede Tumor- und Kontrollprobe das auf diesem Chromosom lokalisierte Haushaltsgen GAPDH mit den für Exon G spezifischen Primern `GAPDH350.1-S` und `GAPDH350.1-AS` amplifiziert und als Referenzbande benutzt. (Primersequenz vgl. 2.13.1). Die nachfolgende Abbildung 3-6 zeigt die entstandenen Bandenmuster der drei unterschiedlichen PCRs im Polyacrylamidgel für 19 Tumorproben und für beide Kontrollen.

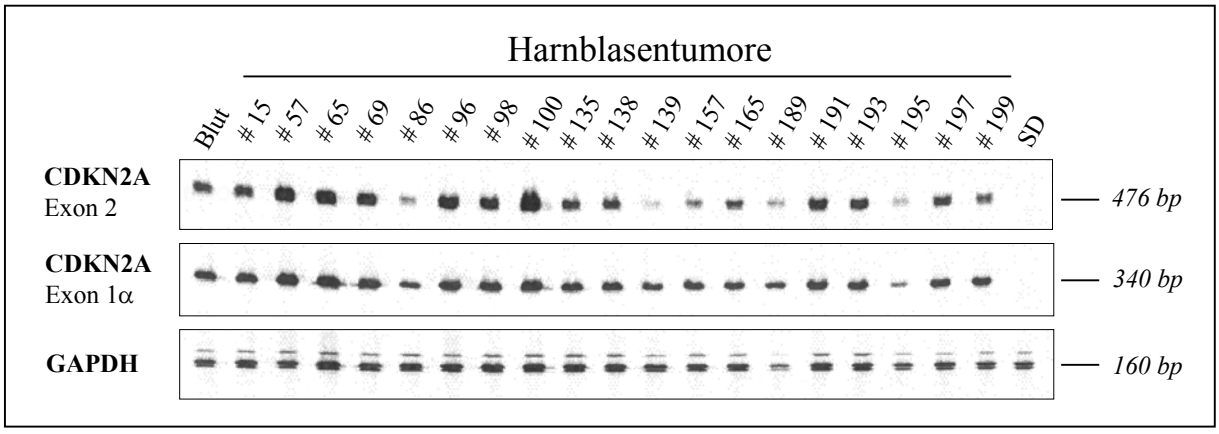

Abbildung 3-6. Homozygote Deletion in Harnblasentumorgeweben. Proben #86, #139, #157 und #195 zeigen deutlichen Verlust des genspezifischen Signals gegenüber der GAPDH-Bande (vgl. Abbildung 3-5).

Die Bandenintensitäten wurden ebenfalls mit Hilfe der ONE-Dscan-Software ermittelt (vgl. Abbildung 3-3). Die Verhältnisse der CDKN2A Exon 1α bzw. Exon 2-Banden zur GAPDH-Bande wurde für die Positivkontrolle auf 100% festgelegt, wogegen das Bandenverhältnis der Negativkontrolle als 0% definiert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Intensitätsabnahme der CDKN2A-Exon-Banden im Vergleich zur GAPDH-Bande von mehr als 40% als homozygote Deletion definiert. Diese Ergebnisse sind zusammengefasst mit den LOH-Ergebnissen in Abbildung 3-5 dargestellt.

19 der untersuchten 86 Tumorproben zeigten einen homozygoten Verlust der beiden untersuchten Exone des CDKN2A Gens (22%). Alle 19 Proben wiesen ebenfalls einen LOH in einem oder mehreren flankierenden Mikrosatellitenmarkern auf (vgl. Abbildung 3-5).

Bei den sechs Proben, die in der LOH Untersuchung eine homozygote Deletion (HD) des Markers D9S942 gezeigt hatten, ist CDKN2A ebenfalls in die Deletion involviert. Neun der 10 Proben ohne Veränderung im gen-nahe gelegenen Marker D9S942 in der LOH-Analyse zeigten ebenfalls HD. Dies gilt ebenfalls für die drei Proben, die bei der LOH-Analyse für den Marker D9S942 nicht informativ waren. Bei der 19ten Probe mit HD handelt es sich um die Tumorprobe #139, welche einen LOH im Marker D9S942 gezeigt hatte.

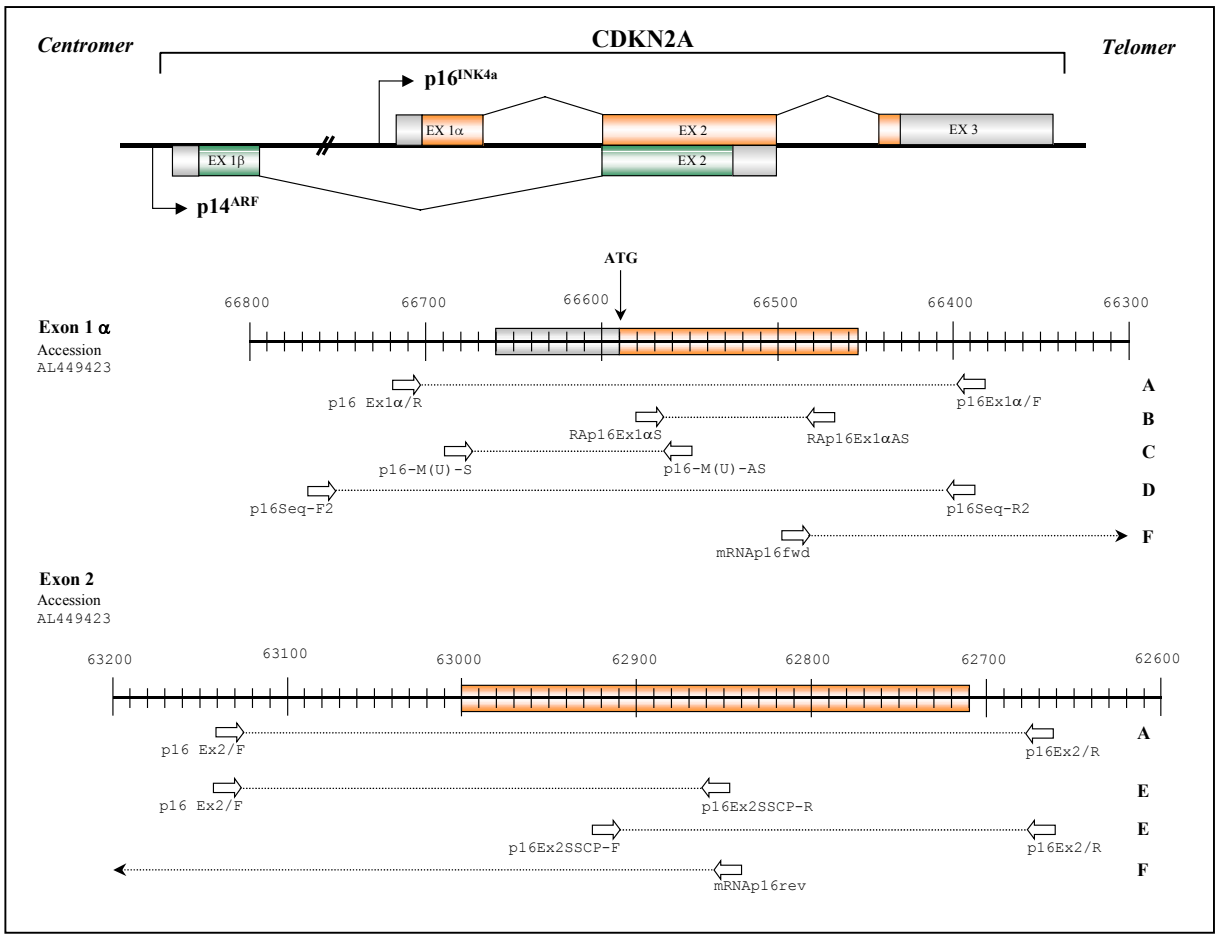

Abbildung 3-7. Lage der verwendeten Primer zur Untersuchung des CDKN2A-Locus: **A**: Homozygote Deletion (3.1.2), **B**: Restriktions-Assay (3.2.1), **C**: MS-PCR (3.2.2), **D**: Bisulfit-Sequenzierung (3.2.3), **E**: SSCP-Analyse (3.3) und **F**: RT-PCR (3.8.1). Primersequenzen vgl. 2.13.1.

3.2 Methylierungsanalyse des CDKN2A-Gens

Zur Untersuchung der Promotor-Region und der das Exon 1α des CDKN2A-Gens umfassenden CpG-Inseln auf Hypermethylierung als mögliche Ursache der Geninaktivierung fanden in dieser Arbeit drei verschiedene PCR-Techniken Anwendung. Je nach Methode konnte der Methylierungssstatus von bis zu 31 CpG-Dinukleotiden erfaßt werden. Eine Kombination aus drei unabhängigen Methoden ermöglicht die doppelte Verifizierung jedes Ergebnisses und minimiert die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen (vgl. Kapitel 4.1.2.) Die Position der für jede der drei PCR-Techniken spezifisch ausgewählten Primer kann der Abbildung 3-7 entnommen werden. Von den insgesamt 86 Harnblasentumoren wurden für die Analyse vorwiegend diejenigen Proben ausgewählt, die LOH in einem oder mehreren Markern gezeigt hatten, in denen das CDKN2A Gen jedoch keine homozygote Deletion aufwies.

3.2.1 Restriktions-Assay

Dem Restriktions-Assay liegt ein Restriktionsverdau der genomischen DNA durch ein methylierungs-sensitives Enzym mit anschließender Amplifikation über die Schnittstelle hinweg zu Grunde. Die Primer `RAp16Ex1αS` und `RAp16Ex1αAS` wurden so ausgewählt, daß sie eine *Hpa*II-Schnittstelle innerhalb des Exon 1α flankieren und dadurch das in ihr liegende CpG-Dinukleotid auf Hypermethylierung überprüft werden kann (vgl. Abbildung 3-7 B).
Ein PCR-Signal wird nur dann erwartet, wenn das CpG-Dinukleotid in der Erkennungssequenz dieser Schnittstelle methyliert ist und somit von dem methylierungs-sensitiven Enzyms *Hpa*II nicht geschnitten werden kann. Da ein Signal nach Amplifikation ebenso von ungeschnittener DNA aus einem nicht vollständigen Restriktionsverdau herrühren kann, wurde jede DNA-Probe durch einen zusätzlichen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Msp*I, einem methylierungs- insensitiven Isoschizomer des *Hpa*II (vgl. 2.16.1), auf vollständigen Verdau hin untersucht.
Zunächst wurde die Nachweisempfindlichkeit dieser Methodik durch ein Gemisch von in diesem Genabschnitt nichtmethylierter und hypermethylierter DNA bestimmt. Dazu wurden definierte Mengen DNA der Harnblasenkarzinom-Zellinie T24, in der Hypermethylierung des CDKN2A-Locus bekannt ist, Blut-DNA beigemischt. Diese Gemische wurden jeweils in die Restriktionsverdaus mit anschließender Amplifikation eingesetzt (vgl. 2.25.5). Abbildung 3-8 zeigt ein Foto der Amplifikate im Polyacrylamidgel. Demnach kann durch diese Methode ein Anteil von 2% hypermethylierter DNA vor dem Hintergrund einer Normalprobe eindeutig

nachgewiesen werden. Auch nach Restriktionsverdau mit *Msp*I entstehen teilweise schwache Banden, welche letztendlich die Sensitivität und Spezifität der Methode limitieren (vgl. 4.1.2).

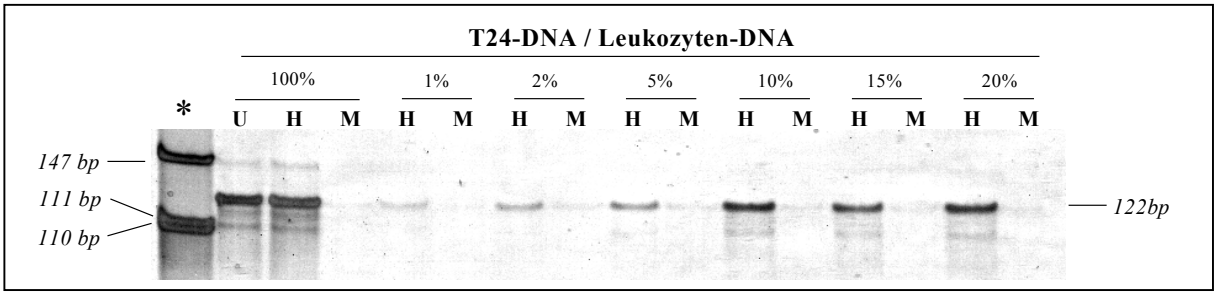

Abbildung 3-8. Verdünnungsreihe T24/Leukozyten-DNA. U, unverdaute Probe; H, *Hpa*II-verdaute Probe; M, *Msp*I-verdaute Probe; *, Längenstandard.

Im Anschluß an diese Voruntersuchung wurden 33 der insgesamt 86 zur Verfügung stehenden Tumorproben ausgewählt. 18 Proben zeigten keinen Verlust der Heterozygotie in einem der fünf untersuchten Mikrosatellitenmarker, wogegen die übrigen 15 Proben einen LOH in mindestens einem dieser Marker, jedoch keine HD des CDKN2-Locus aufwiesen (vgl. Abbildung 3-5). Zusätzlich zu den *Hpa*II- und *Msp*I-verdauten DNAs wurde ebenfalls für jede Probe eine unverdaute DNA als Kontrolle für hinreichende Amplifikation in die PCR eingesetzt. DNA von der Zellinie T24 und aus Leukozyten wurden als Positiv- und Negativkontrollen bei jedem PCR-Durchgang mitgeführt.

Die nachstehende Abbildung 3-9 zeigt die entstandenen und über ein Polyacralymidgel aufgetrennten Amplifikate aus 5 Tumorproben, sowie für die beiden Kontrollen.

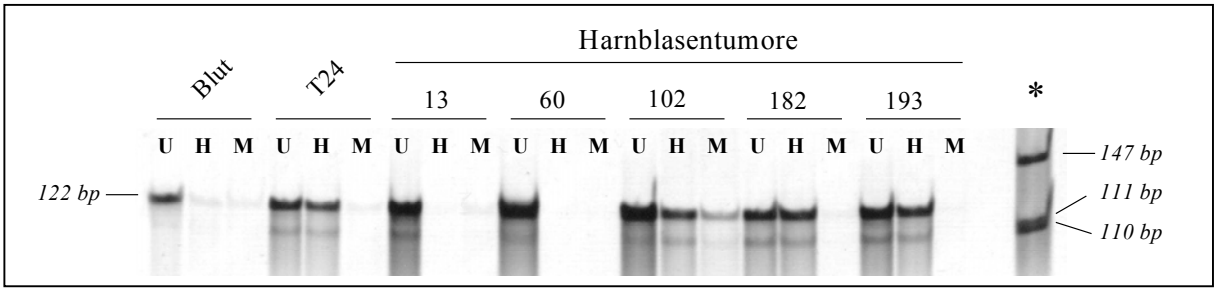

Abbildung 3-9. Restriktionsassay. U, unverdaute Probe; H, *Hpa*II-verdaute Probe; M, *Msp*I-verdaute Probe; *, Längenstandard.

Alle unverdauten Proben (U) zeigen das spezifische 122 bp PCR-Fragment. In den Proben #13 und #60 ist genau wie in der Blutprobe weder nach Verdau mit *Hpa*II (H) noch mit *Msp*I (M) eine Bande zu erkennen. Die Proben #102, #182 und #193 weisen genau wie die Zellinien T24 ein Signal nach *Hpa*II-Verdau auf. In der *Msp*I-Spur der Probe #102 ist ein schwaches Amplifikat zu erkennen, was auf einen unvollständigen Restriktionsverdau hindeutet. Insgesamt zeigen nur drei der untersuchten 33 Proben ein positives Signal im *Hpa*II-Verdau (#102, #182, #193). Diese drei Tumorproben hatten auch in der LOH-Analyse einen Verlust von mindestens zwei Markern gezeigt (vgl. Abbildung 3-5).

3.2.2 Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR)

Bei der Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Behandlung wird die Tatsache ausgenutzt, dass Cytosinreste einer Einzelstrang-DNA durch die katalytische Wirkung von Bisulfit (HSO_3^-) hydrolytisch zu Uracil desaminieren. 5-Methyl-Cytosin dagegen reagiert nicht auf diese Weise und kann weiterhin als Cytosin nachgewiesen werden [Clark *et al*., 1994].

Nach einer Bisulfitbehandlung einzelsträngiger DNA sind daher die Sequenzen der unmethylierten und methylierten DNA nicht mehr identisch und werden von unterschiedlichen Primern erkannt (vgl. Abbildung 3-7 C, Primersequenzen 2.13.1). Durch die MS-PCR wird somit der Methylierungsstatus von sieben CpGs innerhalb des CDKN2A-Gens überprüft (vgl. Abbildung 3-12 A).

Für diesen Ansatz wurden die schon unter 3.2.1 beschriebenen 33 Tumor-DNA-Proben zunächst einer Bisulfitbehandlung unterworfen (vgl. 2.24.1) und anschließend entweder mit Primern spezifisch für unmethylierte DNA (u), oder für methylierte DNA (m) nach Konversion unter den jeweils optimierten PCR-Bedingungen amplifiziert (vgl. 2.24.2).

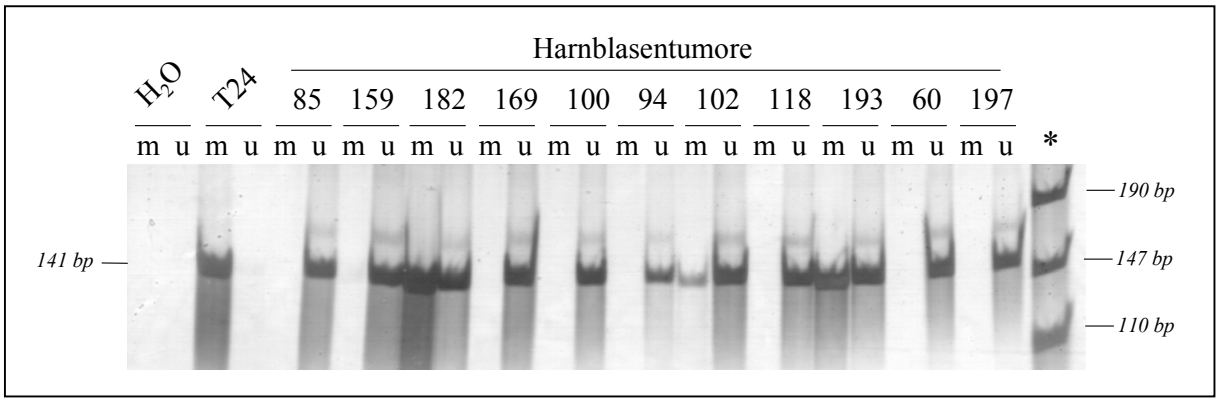

Abbildung 3-10. MS-PCR von CDKN2A Exon 1α. Amplifikation von Bisulfit-behandelter DNA aus einer Harnblasenkarzinom-Zellinie und 11 Harnblasenkarzinomen. m, Primerpaar spezifisch für methylierte DNA; u, Primerpaar spezifisch für unmethylierte DNA; *, Längenstandard.

Abbildung 3-10 zeigt die Ergebnisse der beiden PCRs für insgesamt 11 Proben sowie für die Zellinie T24, die hier ebenfalls als Kontrolle für starke Hypermethylierung dieses Genabschnittes diente.

Die Zellinie T24 zeigt mit den methylierungsspezifischen Primern (m) das zu erwartende 141 bp Amplifikat. Die PCR mit den Primern spezifisch für unmethylierte DNA (u) liefert bei T24 kein Produkt. Alle Tumorproben weisen hingegen ein starkes Signal in der u-Spur auf, welches von dem enthaltenen Normalgewebe in den Proben herrührt und ebenfalls schon in der LOH-Analyse beobachtet werden konnte. Nur die drei Proben, die bereits im Restriktionsassay als hypermethyliert charakterisiert wurden (#102, #182, #193, vgl. 3.2.1), zeigen ein Amplifikat mit den methylierungsspezifischen Primern.

3.2.3 Bisulfitsequenzierung

Die mit den Primern `p16SeqF2` und `p16SeqR2` amplifizierten PCR-Produkte wurden mit dem IRD800-markierten Primer `p16SeqR*` mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers direkt sequenziert (vgl. 2.26). Durch diese Sequenzierung nach Bisulfitbehandlung kann eine Aussage über den Methylierungszustand von insgesamt 31 CpGs getroffen werden (vgl. Abbildung 3-12 A).

Insgesamt wurden sieben Tumorproben, die LOH, aber keine HD aufwiesen sowie zwei Zellinien (5637 als negative und T24 als positive Kontrolle) untersucht. Abbildung 3-11 zeigt das Sequenziermuster über einen Bereich von 40 bp mit insgesamt vier markierten CpGs (CpG ^{19} bis CpG ^{22}) beispielhaft für die beiden Zellinien-DNAs 5637 und T24 sowie für die Tumorgewebe-DNAs #182 und #193.

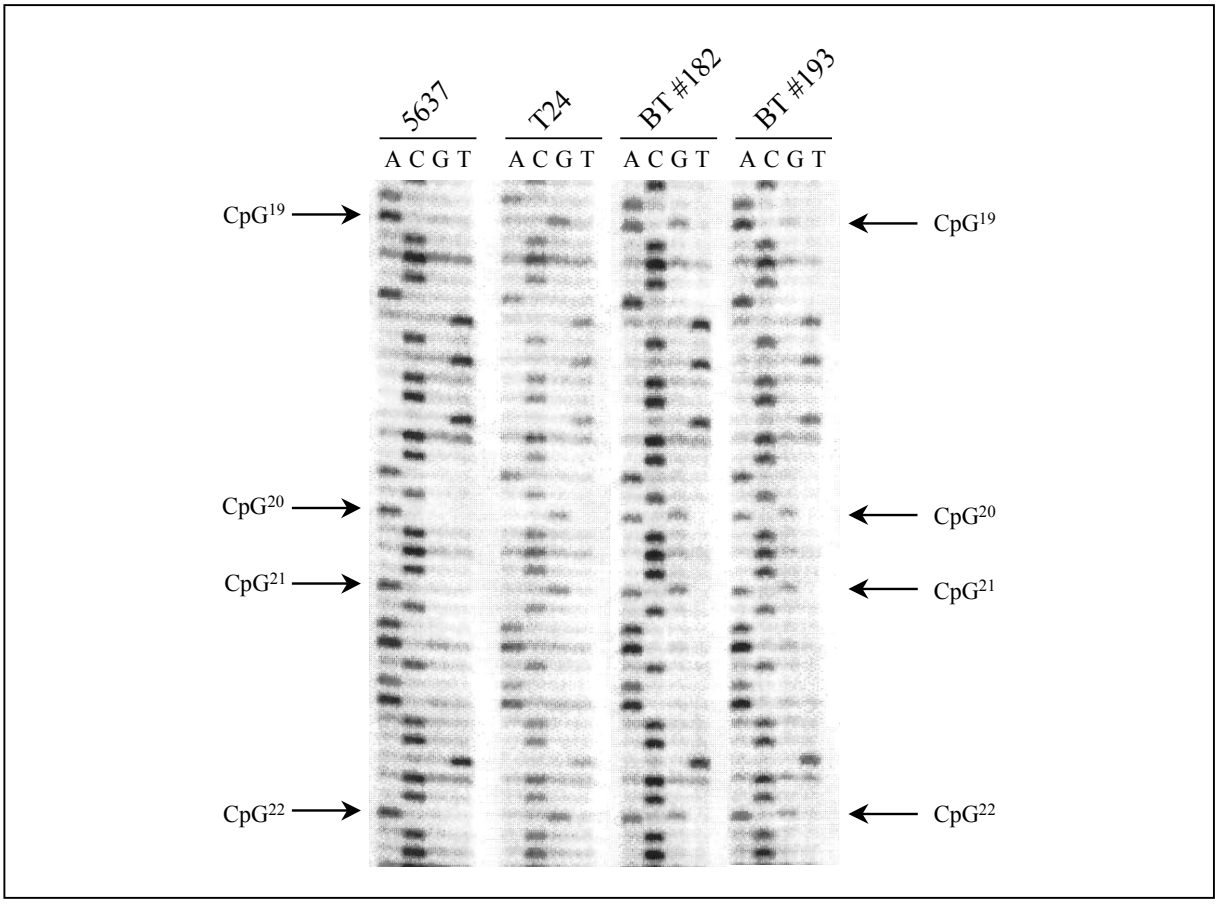

Abbildung 3-11. Genomische Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung der Harnblasenkarzinom-Zellinien 5637 und T24 sowie von zwei Harnblasenkarzinomen. Abgebildete Sequenz entspricht dem 3‘>5‘-Srang nach Konversion.

Die als Normalkontrolle fungierende Zellinie 5637 zeigt an den betrachteten CpGs jeweils ein Adenosin-Signal, was aus dem im Gegenstrang zu Uracil konvertierten Cytosin herrührt. Die stark methylierte Zellinie T24 zeigt an diesen Stellen jeweils ein Guanin, welches im Gegenstrang mit einem methylierten und deshalb nicht konvertierten Cytosin gepaart ist. Die beiden Zellinien #182 und #193 zeigen nicht nur Guanin-Signale an den vier in Abbildung 3-11 markierten CpGs, sondern ebenso wie T24 über die gesamten betrachteten 31 CpGs (vgl. Abbildung 3-12 B). Parallel dazu ist in beiden Proben ein fast gleich intensives Adenosin-Signal zu erkennen, was wahrscheinlich von DNA aus normalen Zellen in den Tumorproben herrührt.

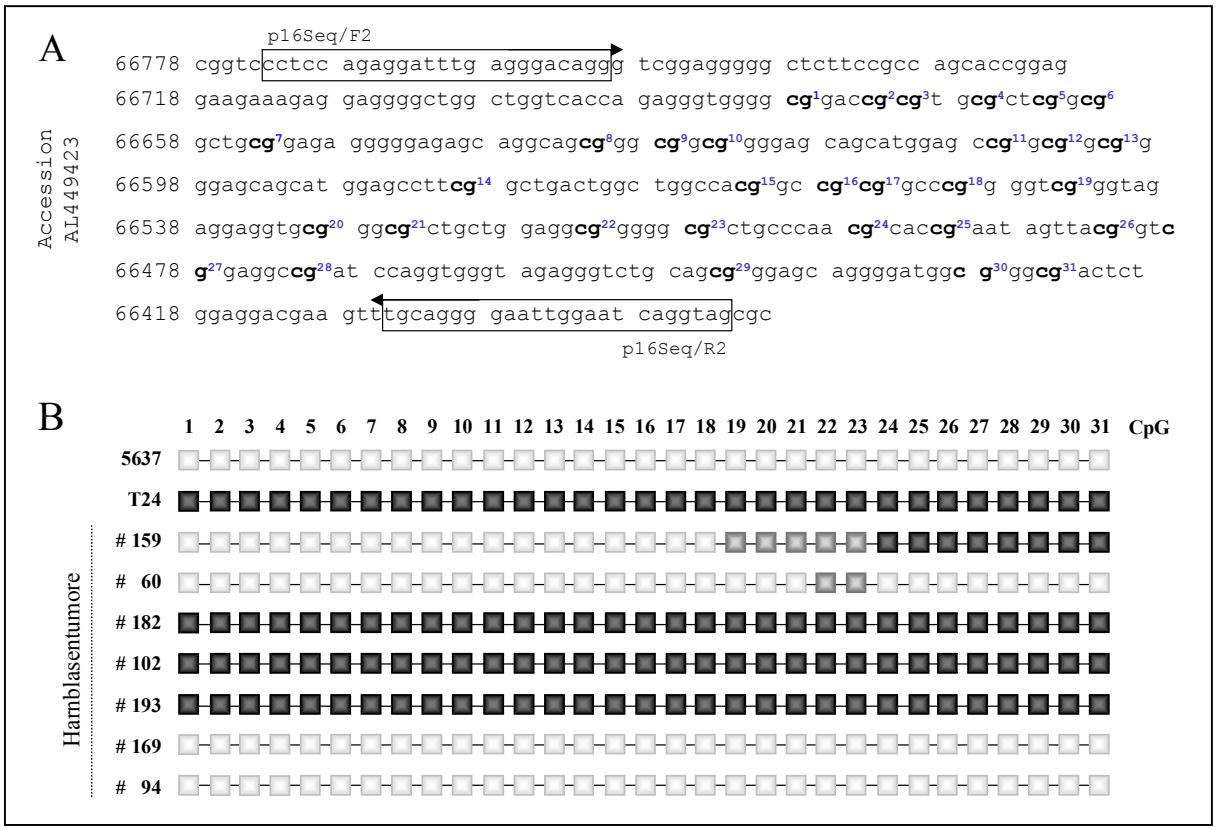

Abbildung 3-12. Zusammenfassung der Ergebnisse nach Bisulfitsequenzierung **A** Ausschnitt aus dem GenBank Eintrag AL449423.für das CDKN2A Exon 1α. Die betrachteten CpGs sind fett markiert und mit Nummern versehen. **B** Schematische Darstellung des Methylierungsstatus jedes der betrachteten 31 GpGs von zwei Harnblasenkarzinom-Zellinien und sieben Harnblasen-karzinomproben. Weiße Quadrate, nicht methyliert; schwarze Quadrate, methyliert, graue Quadrate, schwache Methylierung.

10 der untersuchten 15 Tumorproben zeigen nach Sequenzierung keine Veränderung gegenüber der Zellinie 5637. In drei der Tumorproben (Proben #182, #102 und #193) waren ebenso wie in der Zellinie T24 alle betrachteten 31 CpGs methyliert. Die Probe #159 zeigte eine gegenüber dem Hintergrund nur undeutliche Methylierung an den CpGs 19-23, die Cytosine 24-31 waren konsistent methyliert identifiziert werden. Für die Probe #60 zeigte sich ein schwache Methylierung an den CpGs 22 und 23.

3.3 Mutationsanalyse des CDKN2A-Gens

Als weiterer Mechanismus zur Geninaktivierung sind für viele Tumore in der Literatur Punktmutationen im CDKN2A Exon 2 beschrieben. Im Harnblasenkarzinom gilt diese Veränderung als eher selten (vgl. Kapitel 4.1.3).

Für eine Untersuchung mittels *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) wurde der kodierende Bereich des Exon 2 durch zwei sich überlappende Fragmente amplifiziert (vgl. Abbildung 3-7 E). Auf diese Weise wurden nach Optimierung der PCR- und Gelbedingungen insgesamt 16 Tumorproben untersucht. 12 der Proben wiesen einen LOH, jedoch weder eine homozygote Deletion noch Hypermethylierung des CDKN2A Promotorbereiches auf. Vier Tumorproben dienten zusammen mit DNA aus Bluproben als Negativkontrolle. Die Zellinien 639v und VMCub1 dienten mit einer nachgewiesene Mutationen im Teil 1 bzw. Teil 2 als positive Kontrollen in dieser Analyse [Liu *et al.*,1995].

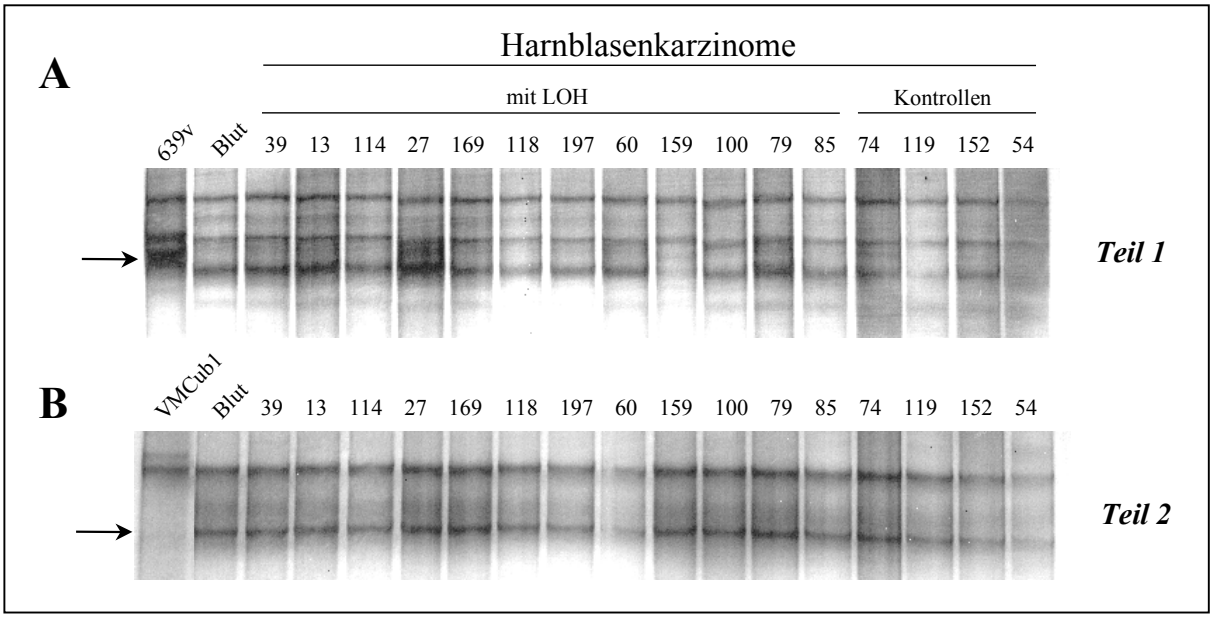

Abbildung 3-13. SSCP-Analyse von Harnblasentumoren. CDKN2A Exon 2 wurde durch zwei sich überlappende PCR-Fragmente untersucht und die Einzelstränge über ein PAA-Gel aufgetrennt. **A** Teil 1: 285 bp-PCR-Fragment und **B** Teil 2: 260 bp-PCR-Fragment. Abweichende bzw.fehlende Banden sind in den beiden Zellinien durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Punktmutation in der Zellinie 639v machte sich im Einzelstrang als ein deutlicher *Shift* einer Bande im ersten, 285 bp-großen Fragment im PAA-Gel bemerkbar. In der Zellinie VMCub1 kennzeichnete der Verlust eines Bandensignals die bestehende Punktmutation im zweiten Fragment. Nach Sequenzierung der PCR-Produkte für die beiden Zellinien bestätigte sich die Mutation für 639v in einer G>A Transition, für die VMCub1 ergab sich eine G>C Transversion.

In den Blasentumorproben wurden jedoch auch mit unterschiedlichen Gelbedingungen keine reproduzierbar abweichenden Banden gefunden (vgl. Abbildung 3-13). Einige Banden, die in einzelnen Experimenten eine anscheinend aberrante Wanderung zeigten, wurden aus dem Gel herausgeschnitten (vgl. 2.18.2) und die eluierte PCR-Produkte nach T/A-Klonierung sequenziert. Es wurden jedoch keine Abweichungen in der DNA-Sequenz für diese Tumoren gefunden.

3.4 Korrelation Verlust CDKN2A / LINE1-Hypomethylierung

Um die Veränderungen auf Chromosom 9 mit dem Ausmaß der Veränderungen der Gesamtmethylierung korrelieren zu können, wurde das Methylierungsmuster von repetitiven LINE1-Sequenzen in Harnblasenkarzinomproben bestimmt. Dazu wurde *Hpa*II bzw. *Msp*I verdaute DNA im Southern-Blot mit einer aus einem aktivem LINE1-Element gewonnenen Sonde hybridisiert (vgl. Kapitel 3.9.1 und Abbildung 3-31 als Beispiel einer solchen Analyse in Nierenkarzinom-Zellinien). 85 Proben der in dieser Arbeit für CDKN2A untersuchten 86 Harnblasentumoren konnten auf diese Weise analysiert werden. 15 Proben waren bereits in meiner Diplomarbeit [Florl, 1998] untersucht worden, 70 weitere kamen noch hinzu (vgl. Florl *et al*. [1999]). Von einer Probe stand leider kein Material in der für diese Untersuchung notwendigen Qualität zur Verfügung. Die Ergebnisse der Methylierungsuntersuchung für die einzelnen Proben finden sich im Anhang (Tabelle 7-1).

In der nachfolgenden Abbildung 3-14 sind die Ergebnisse der Methylierungsuntersuchung gegen die Resultate der LOH- und HD-Analyse aufgetragen.

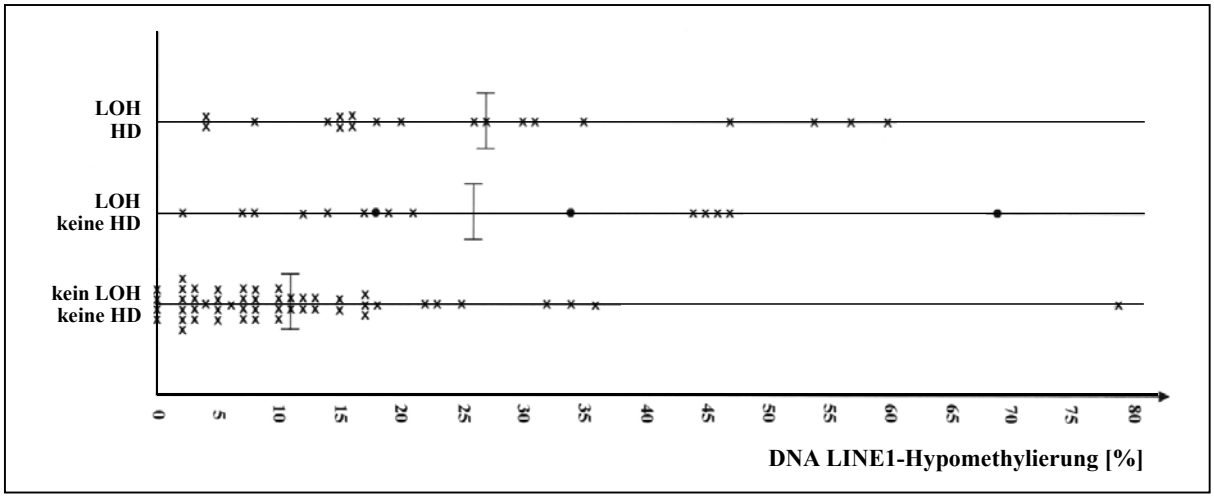

Abbildung 3-14. Genomweite DNA-Hypomethylierung und Deletionen am CDKN2A-Locus in Harnblasentumoren. Das Ausmaß an LINE1- Hypomethylierung ist für jeden Tumor in % dargestellt. Die drei Tumoren, die in der Promotor-Methylierungsanalyse positiv waren, sind als ausgefüllte Kreise dargestellt. Die senkrechten Balken geben den Mittelwert der Hypomethylierung in jeder Gruppe an. Wilcoxon-Test p = 0,000123 (kein LOH/HD vs. LOH/HD) und 0,000906 (kein LOH/HD vs. LOH/keine HD).

Die mittlere Hypomethylierung der Proben ohne eine nachgewiesene Veränderung auf Chromosom 9p lag bei 11 ± 13% (Mittelwert ± Standardabweichung). Die Proben mit LOH, jedoch ohne HD wiesen einen Mittelwert von 26 ± 19% auf, bei den Proben mit LOH und HD des CDKN2A Gens lag der Mittelwert bei 27 ± 17%. Im Vergleich der Gruppe ohne Veränderungen mit der zweiten bzw. dritten Gruppe ergab sich eine statistische Signifikanz im Wilcoxon-Test $p = 0{,}000123$ bzw. $p = 0{,}000906$. Eine hohe Signifikanz bleibt auch nach einer Bonferroni-Adjustierung erhalten: $p=0{,}003$ bzw. $p=0{,}0018$.
Die drei Proben mit Hypermethylierung am CDKN2A-Promotor (#182, #102, #193; mit Kreisen dargestellt) zeigen ebenfalls deutliche LINE1-Hypomethylierung.

3.5 PCR-Analyse des CDKN2-Locus in humanen Karzinomzellinien

Da sich die genauere Charakterisierung von Deletionen des CDKN2-Locus in Harnblasentumorgeweben aufgrund des Anteils an normalem Stromagewebe schwierig gestaltet, wurde diese in geeigneten Harnblasenkarzinom-Zellinien vorgenommen. Der CDKN2-Locus wurde zunächst in 18 Harnblasenkarzinom-Zellinien mit den schon in Kapitel 3.1 beschriebenen Gen- und Mikrosatellitenmarkern auf Deletionen untersucht. Diese sieben Marker wurden um vier genspezifische und sechs Mikrosatellitenmarker erweitert. Dazu wurden PCRs für CDKN2A Exon 1β und Exon 3 sowie CDKN2B Exon 1 und 2 etabliert. Außerdem wurden drei weitere Mikrosatellitenmarker telomerisch von CDKN2A Exon 3 gewählt: D9S1846, D9S2016 und D9S782. Die Verwendung der Marker R2.7, R2.3 und c5.3 erlaubte eine genauere Kartierung eventueller Bruchpunkte zwischen CDKN2B Exon 2 und CDKN2A Exon 1β (vgl. Abbildung 3-15).

Außer den Harnblasenkarzinom-Zellinien wurden sieben Nierenkarzinom-Zellinien für alle beschriebenen Marker untersucht. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchung von 18 Harnblasenkarzinom- sowie sieben Nierenkarzinom-Zellinien sind in nachfolgender Abbildung 3-15 zusammen gestellt.

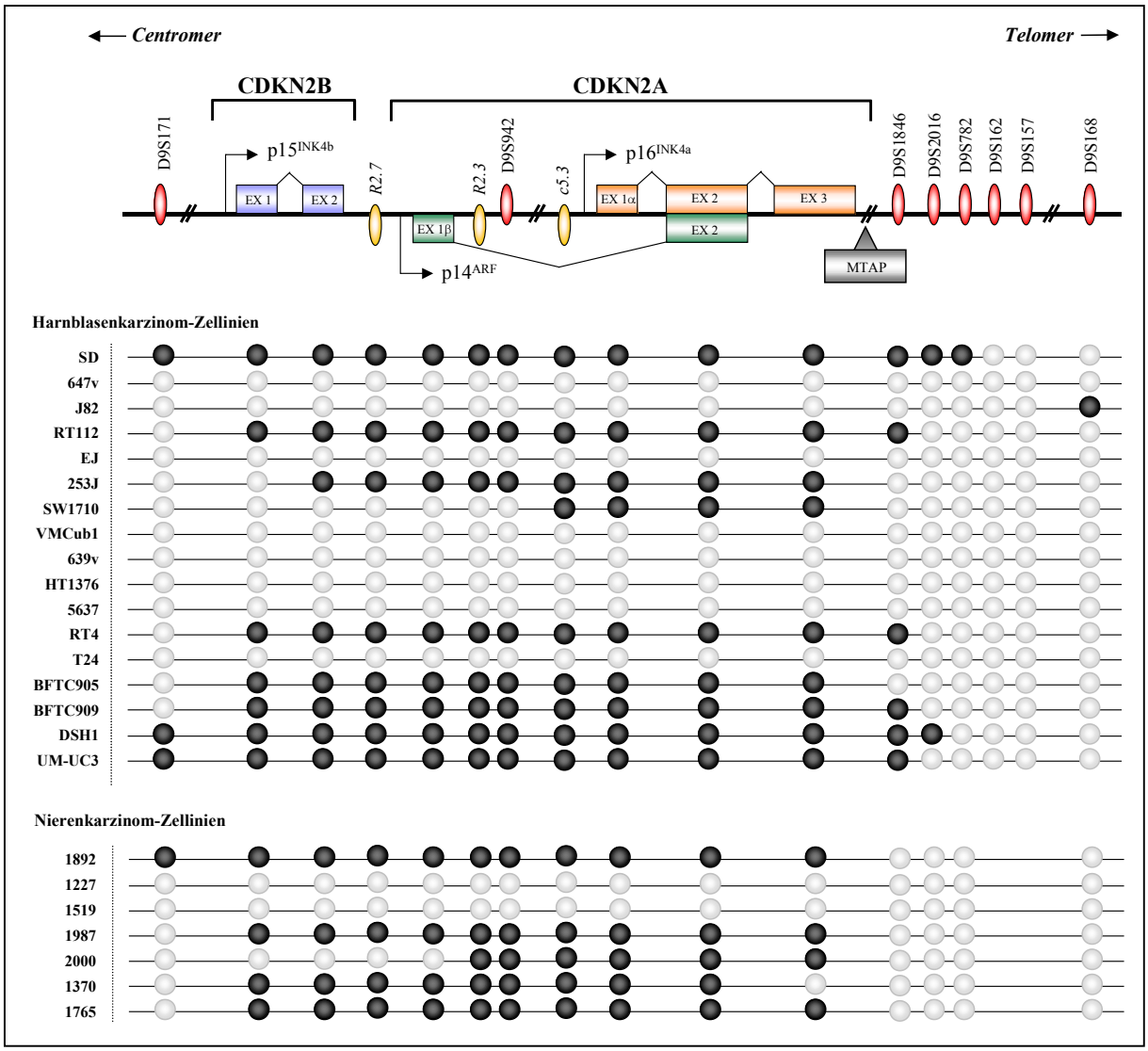

Abbildung 3-15. Oben: Schematische Übersicht über den CDKN2-Locus mit Lage aller verwendeten Mikrosatelliten- und genspezifischen Marker. **Mitte:** Status der CDKN2B und CDKN2A Gene in Harnblasenkarzinom-Zellinien. **Unten:** Status der CDKN2B und CDKN2A Gene in Nierenkarzinom-Zellinien. Scharze Kugel, homozygote Deletion (HD); weiße Kugel, Retension.

Neun der 18 untersuchten Zellinien zeigten eine Deletion im betrachteten Locus, wobei die Länge divergierte. SD besitzt die umfangreichste Deletion (mind. 3 Mbp), gefolgt von UM-UC3 und DSH1. In allen drei Zellinien ist centromerisch jeweils der Marker D9S171 mit betroffen, telomerisch reicht die Deletion hinter dem CDKN2A Exon 3 über den Marker D9S1846 hinaus; in der Zellinie SD erstreckt sie sich sogar noch über den Marker D9S782 hinweg. Die Deletionen in den Zellinien RT112, RT4, BFTC909 und BFTC905 schließen CDKN2B Exon 1 mit ein, D9S171 bleibt jedoch erhalten. Das telomerische Ende der Deletion schließt bei drei Zellinien den Marker D9S1846 mit ein, bei BFTC905 endet sie vor diesem Marker. Die Zellinien 253J und SW1710 zeigten insgesamt kleinere Deletionen, wobei das centromerische Ende jeweils im betrachteten Locus lag: in der Zellinie 253J zwischen CDKN2B Exon 1 und Exon 2 und für SW1710 zwischen CDKN2A Exon 1β und 1α. Durch PCR-Untersuchungen weiterer Marker konnte dieses Deletionsende in der Zellinie SW1710 zwischen den Markern D9S942 und c5.3 lokalisiert werden. Ihr telomerisches Ende schließt CDKN2A Exon 3 ein. Die Zellinie J82 zeigt keine Deletion im CDKN2-Locus, doch fehlt ihr der telomerische Markers D9S168.

Von den sieben untersuchten Nierenkarzinom-Zellinien zeigten die Linien 1227 und 1519 in keinem der untersuchten Marker einen Verlust. Eine PCR-Analyse der Marker D9S162 und D9S157 wurde im Gegensatz zu den Harnblasenkarzinom-Zellinien nicht durchgeführt, da in allen Zellinien die telomerischen Marker D9S782 und D9S168 nachweisbar waren (vgl. Abbildung 3-15).
Die Zellinie 1892 weist die größte Deletion auf, bei ihr ist sowohl das Exon 3 als auch der centromerische Marker D9S171 eingeschlossen. Bei den Zellinien 1987 und 1765 ist sowohl CDKN2B als auch CDKN2A von der Deletion betroffen, sowohl die centromerischen, als auch die telomerischen Marker sind vorhanden. Die Linie 1370 zeigt einen Bruch zwischen Exon 2 und Exon 3, ihre Deletion schließt den CDKN2B-Genlocus mit ein. Die Zellinie 2000 zeigt eine Deletion mit einem Bruch zwischen den CDKN2A Exonen 1β und 1α, der durch den Marker R2.3 weiter spezifiziert wurde. Telomerisch schließt die Deletion das Exon 3 mit ein.

3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierungs-Analyse (FISH)

Zur cytogenetischen Charakterisierung von Veränderungen auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 wurde, in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Hameister, Institut für Humangenetik, Universität Ulm, eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zusammen mit einem *Chromosome Painting* spezifisch für Chromosom 9, entsprechend der von seiner Arbeitsgruppe beschriebenen Methode [Bruch *et al*., 2000] durchgeführt. Dazu wurde DNA von den BAC Klonen RP11-70L8, RP11-149I2 und RP11-145E5 (vgl. 2.14.2) präpariert und markiert.

Die Sequenzen der drei Klone überlappen und umschließen den CDKN2-Locus, wobei dieser vollständig von RP11-149I2 abgedeckt wird. Die Anordnung der BAC-Klone zueinander und in Bezug auf den Locus kann der nachstehenden Abbildung 3-16 entnommen werden.

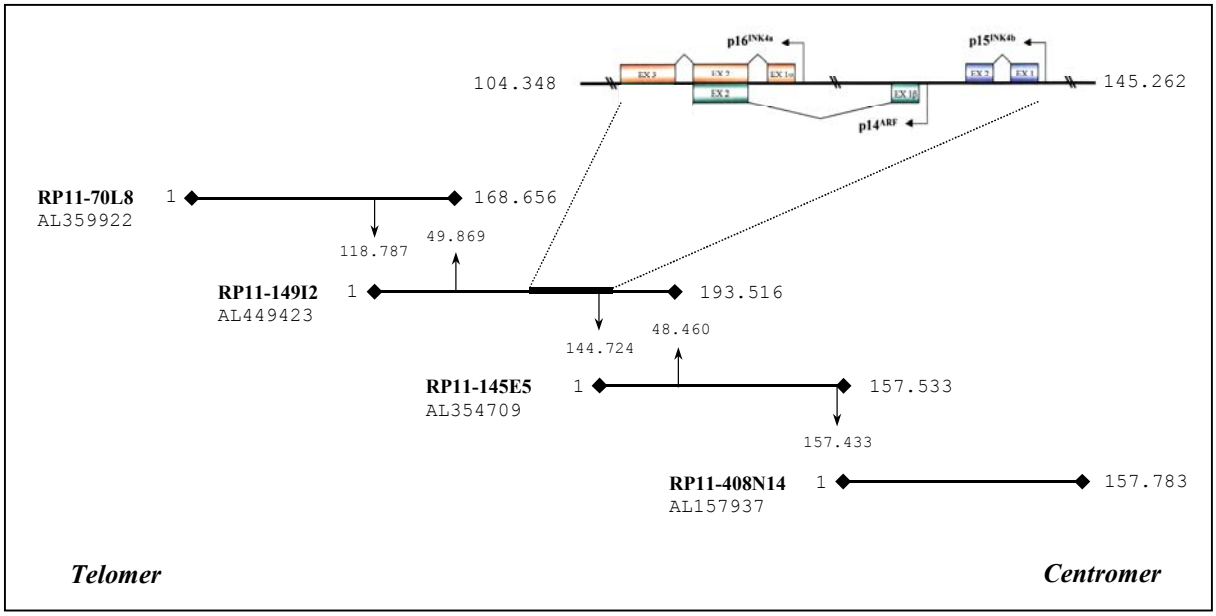

Abbildung 3-16. Anordnung der BACs maßstabsgerecht zueinander. RP11-149I2 enthält den gesamten CDKN2-Locus. Die BACs wurden überlappend sequenziert. Die Länge ihrer Überlappung ist eingezeichnet, ebenfalls der Name und die Accessionnummer des GenBank-Eintrags und ihre jeweilige Länge (in bp).

Diese Untersuchung wurde für die beiden Zellinien 253J und SW1710 durchgeführt. In der Zellinie SW1710 fanden sich 2-3 normal erscheinende Chromosomen 9, ein im kurzen Arm deletiertes Chromosom 9 und verschiedene Fragmente, die an andere Chromosomen fusioniert sind. Alle normalen Chromosomen zeigten Signale mit allen drei BACs. Auf den anderen Chromosom 9 Fragmenten konnte mit keinem der BACs ein Signal gesehen werden. In der Zellinie 253J waren 2-3 normale Chromosomen 9 vorhanden und zwei im kurzen Arm deletierte Chromosomen. Die Deletionschromosomen waren für alle drei BACs deletiert. Insgesamt gaben alle drei BACs Signale an der erwarteten Stelle auf Chromosom 9.

Abbildung 3-17 zeigt jeweils eine ausgewählte Metaphase der Zellinien 253J und SW1710 nach Hybridisierung mit dem BAC RP11-149I2.

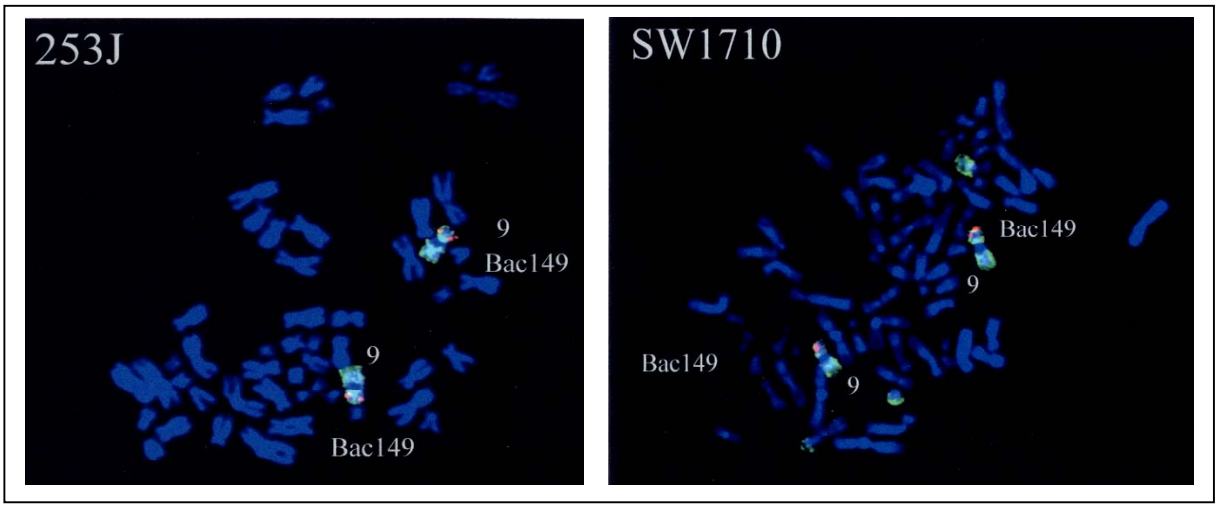

Abbildung 3-17. Fluoreszenz in situ Hybridisierung für die Zellinien 253J und SW1710. Grün, *Chromosome Painting;* rot, Hybridisierung mit BAC RP11-149I2.

In grün dargestellt ist das *Chromosome painting* spezifisch für Chromosom 9. Das rote Signal in der Nähe der Telomere des kurzen Arms von Chromosom 9 zeigt die Hybridisierung mit dem BAC Klon RP11-149I2.

253J zeigt ein sehr schwaches Hybridisierungssignal mit dem BAC an beiden Chromosomen 9. In der Zellinie SW1710 erkennt man zwei vollständige Chromosomen 9, deren BAC-Hybridisierungssignal sehr nah am Telomer liegt. Drei weitere Chromosomenstücke wurden ebenfalls mit dem *Paint* markiert, zeigten jedoch keine Hybridisierung mit RP11-149I2.

Diese Ergebnisse bestätigen die in Kapitel 3.5 gefundenen interstitiellen Deletionen für die beiden Zellinien.

3.7 Klonierung der Chromosom 9p Deletionsenden in Karzinom-Zellinien

Nach eingehender PCR-Analyse der humanen Karzinom-Zellinien (vgl. Kapitel 3.5) wurden bei den Harnblasenkarzinom-Zellinien 253J und SW1710 sowie bei den Nierenkarzinom-Zellinien 1370 und 2000 Bruchpunkte innerhalb des CDKN2-Locus festgestellt. Diese Deletionenden wurden im Verlauf der Arbeit weiter eingegrenzt, kloniert und schließlich sequenziert. Eine Übersicht über das methodische Vorgehen ist in einem Ablaufdiagramm (Abbildung 3-18) schematisch dargestellt und gliedert sich in zwei Hauptschritte.

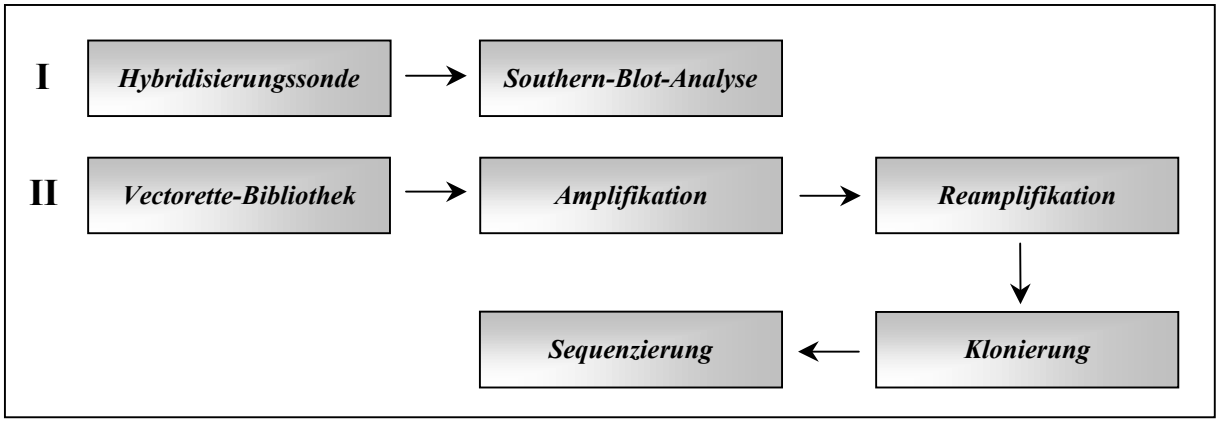

Abbildung 3-18. Schematische Darstellung der Methodenabfolge zur Bruchpunktklonierung; sie gliedert sich in zwei Abschnitte.

Im ersten Schritt wurde, um die Lage der Deletionsenden noch genauer abschätzen zu können und die Bruchpunkte abzusichern, eine Southern-Blot-Analyse für jede dieser vier Zellinien etabliert. Dazu wurde zunächst wie unter 3.7.1 beschrieben eine geeignete Hybridisierungssonde hergestellt. Das Ergebnis des Southern-Blots bestimmt zum einen die Wahl des entsprechenden Restriktionsenzyms und Vectorette-Linkers und gibt zum anderen einen wichtigen Hinweis auf die Größe des zu erwartenden Produktes in der späteren Vectorette-Amplifizierung. Im zweiten Schritt wurde von jeder Zellinie eine Vectorette-Bibliothek hergestellt (vgl. 2.25.1) und diese mit zwei ineinander geschachtelten Primerpaaren doppelt amplifiziert (vgl. 2.25.2). Das entstandene PCR-Produkt wurde in einen T/A-Klonierungsvektor ligiert (vgl. 2.16.3), in *E.coli* transformiert (vgl. 2.5.2) und sequenziert (2.26).

3.7.1 Strategien zur Herstellung geeigneter Hybridisierungssonden

Die oben beschriebenen Zellinien DNAs wurden jeweils zusammen mit Leukozyten-DNA und drei weiteren Zellinien-DNAs (5 µg) jeweils mit den Enzymen *Eco*RI, *Hind*III und *Bam*HI restringiert (vgl. 2.16.1), gelelektrophoretisch im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. 2.17.1) und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet (vgl. 2.19.1 und 2.19.2).

Die Hybridisierungsonden wurden so ausgewählt, daß sie möglichst nahe am Ende der Abschnitte hybridisieren, die in den deletierten Zellinien noch erhalten sind. Alle vier Sonden wurden durch Amplifikation von Leukozyten-DNA hergestellt und anschließend mittels der in Kapitel 2.20.1 bzw. 2.20.2 beschriebenen Methode radioaktiv- oder Digoxigenin- (für 253J) markiert.

Zum Nachweis einer Deletion in der Zellinie **253J** konnte das bereits in der LOH-Analyse erfolgreich mit den Primern `p15ex1fwd` und `p15ex1rev` amplifizierte 315 bp-PCR-Produkt des CDKN2B Exon 1 als Sonde für den centromerischen Bruchpunk eingesetzt werden.

Eine Hybridisierungssonde zum Nachweis ebenfalls centromerischen Bruchs in der Zellinie **SW1710** wurde aus einem PCR Produkt mit den Primern `D9S942fwd` und `9p21_1fwd` hergestellt. Die Lage der Primer in Bezug auf den Locus ist der Abbildung 3-19 zu entnehmen. Dieses Amplifikat war mit einer Länge von 1.389 bp für eine Sonde zu groß, es wurde deshalb mit dem Restriktionsenzym *BamH*I verdaut. Es ergaben sich 3 Fragmente, in den Größen 693 bp, 654 bp und 42 bp, von denen das 654 bp-Fragment zunächst als Sonde Verwendung fand.

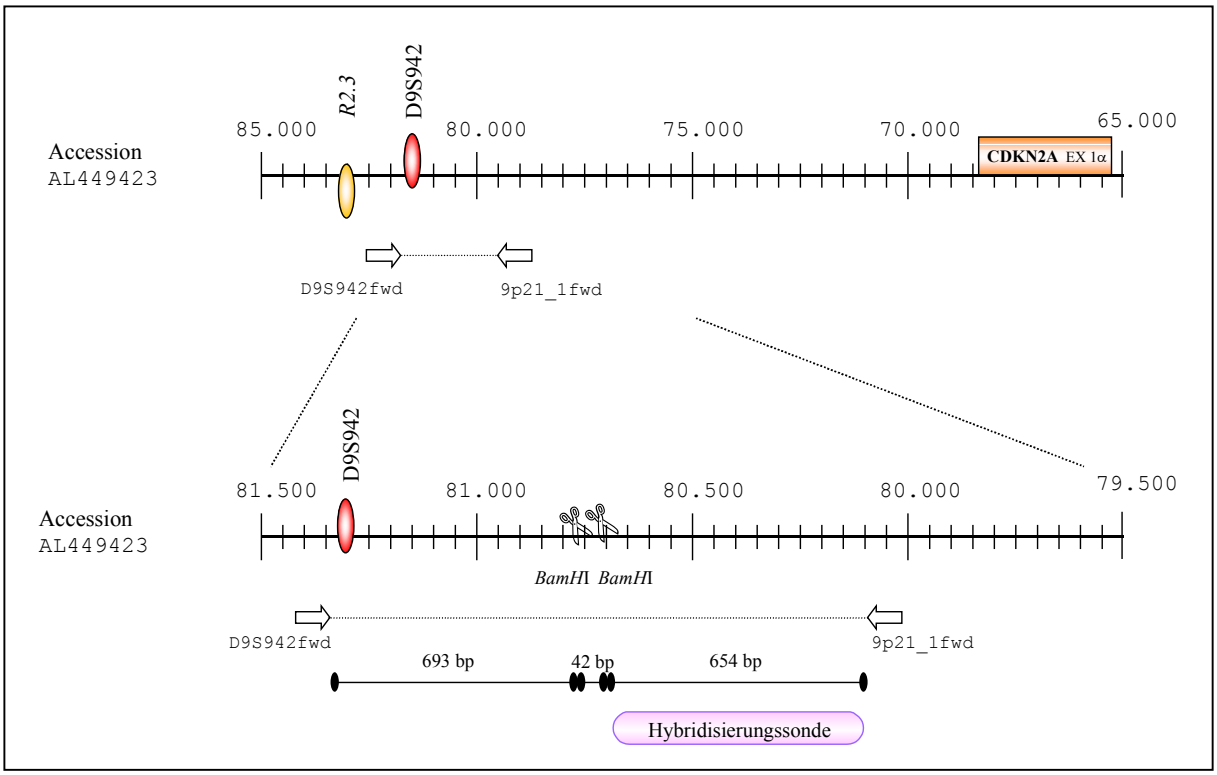

Abbildung 3-19. Vorgehensweise bei der Erstellung einer Hybridisierungssonde zur Bestimmung der Deletionsenden in der Harnblasenkarzinom-Zellinie SW1710. Lage des verwendeten Primerpaares und der Sonde in Bezug zu den *Bam*HI-Restriktionsenzymschnittstellen.

Als Hybridisierungssonde für den Nachweis des centromerischen Bruchpunktes in der Nierenkarzinom-Zellinie **2000** wurde ein 830 bp-Fragment mit den Primern `p14fwd` und `p14rev` amplifizierte. Dieses Produkt schließt das zur Hybridisierung alleine nicht ausreichend große CDKN2A Exon 1β ein.

Für den telomerischen Bruch der Zellinie **1370** wurde zunächst die Deletion zwischen dem CDKN2A Exon 2 und Exon 3 weiter eingegrenzt. Zu diesem Zweck wurden vier PCRs etabliert, deren Amplifikate sich teilweise überlappen und damit die Intron-Sequenz vollständig abdecken (vgl. Abbildung 3-20).

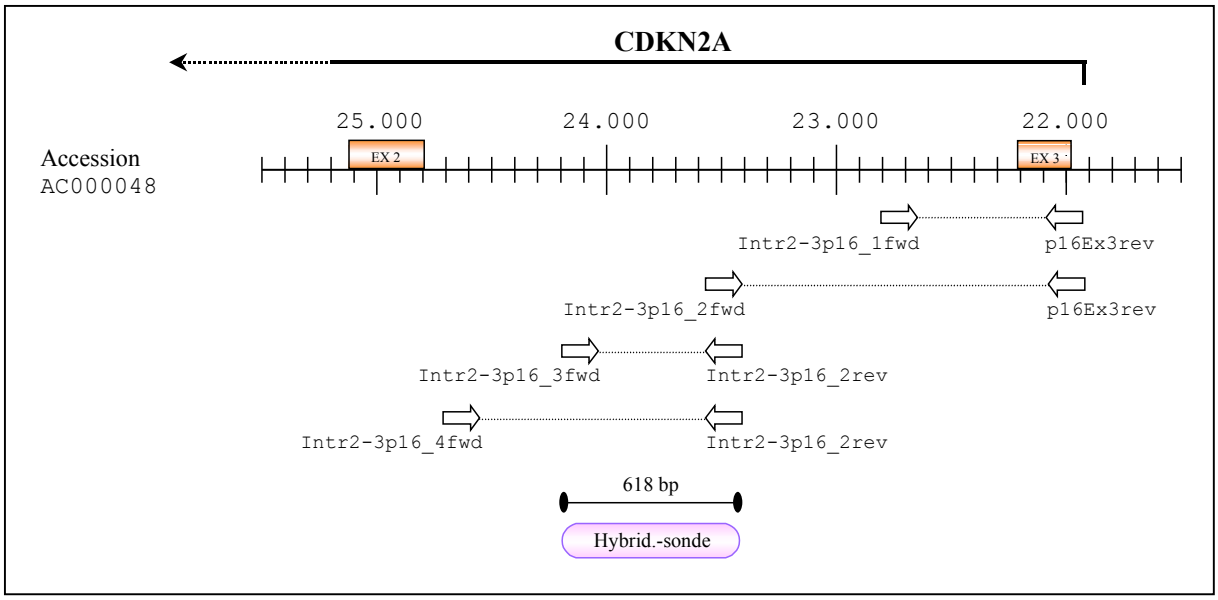

Abbildung 3-20. Lage der verwendeten Primer zum Eingrenzen der intragenischen Deletion in der Nierenkarzinom-Zellinie 1370 sowie Position der ausgewählten Hybridisierungsonde.

Die Zellinie war für alle vier ausgewählten Primerpaare positiv, so daß das PCR Produkt mit den Primern `Intr p16 2-3_3fwd` und `Intr p16 2-3_2rev` zur Herstellung einer geeigneten Hybridisierungssonde (618 bp) zum Einsatz kam.

Für alle erstellten Hybridisierungssonden wurde durch Datenbankrecherche mittels RepeatMasker überprüft, daß ihre genomische Sequenz keine bekannten repetitiven Sequenzen enthielt.

Die Hybridisierungssignale der entsprechenden Sonden spezifisch für die Zellinien 253J, SW1710, 1370 und 2000 sowie für die jeweils ausgewählten Kontroll-DNAs sind in Abbildung 3-21 A-D zu erkennen.

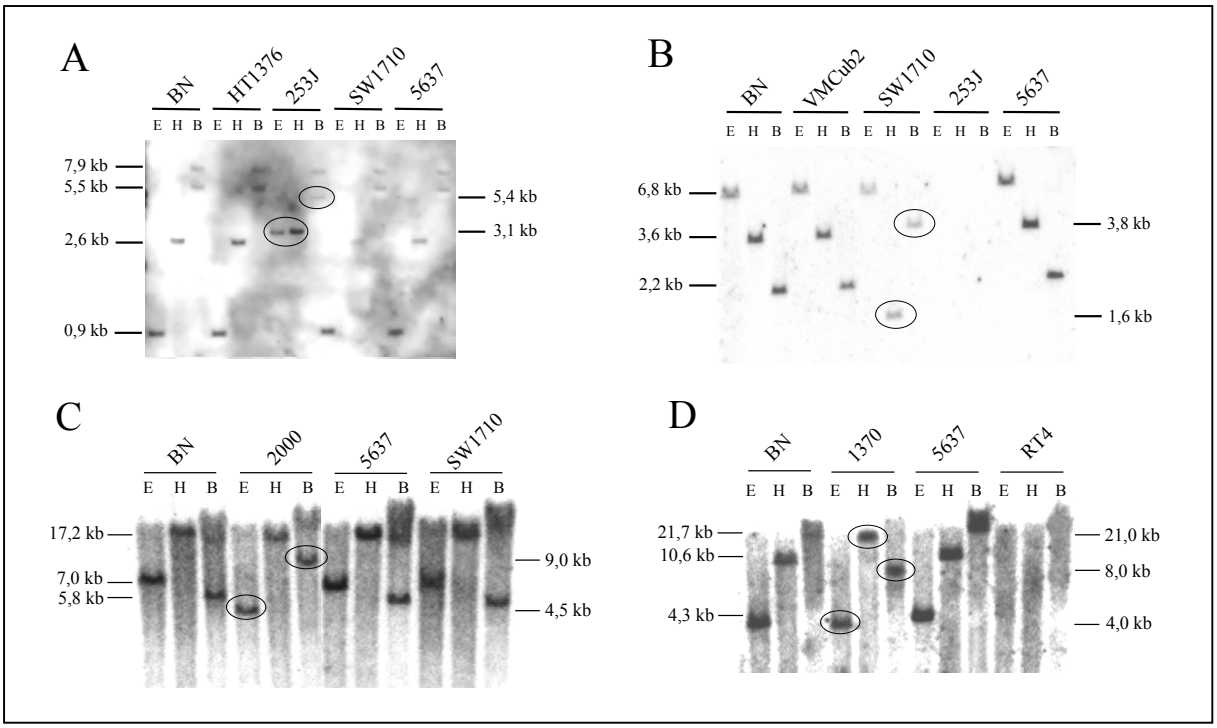

Abbildung 3-21. Southern Blot Hybridisierung spezifisch für die Zellinie **A.** 253J **B.** SW1710 **C.** 2000 und **D.** 1370. Die jeweils veränderten Banden in den Zellinien sind markiert. Die Bandengröße der Kontroll-DNAs ist auf der linken Seite des jeweiligen Blots zu erkennen, die veränderte Bandengröße in der Zellinien-DNA ist auf der rechten Seite des Blots zu erkennen. BN, Normalurothel.

Die durch die Sonde markierten Fragmente sollten sich in den Zellinien mit Deletionen in ihrer Größe von der Normalurothel- und Zellinienkontrolle unterscheiden. Im Blot B und D ist je eine Zellinie aufgetragen, die kein Hybridisierungssignal mit der entsprechenden Sonde zeigt, da sie im Bereich der Hybridisierung deletiert ist (vgl. Abbildung 3-15).

Die nachstehende Tabelle 3-2 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Bandengrößen.

Tabelle 3-2. Tatsächliche Größe von Banden nach Southern-Blot Hybridisierung von Zellinien mit Deletionen im Vergleich zu unveränderter DNA aus Blutproben. Die Größenangaben der neu entstandenen Hybridisierungsfragmente für die Zellinien sind ca.-Werte (vgl. Abbildung 3-21. A-D). Kursive Zahlen, veränderte Fragmentgröße zur Kontrolle.

	Sonde 253J		***Sonde SW1710***		***Sonde 1370***		***Sonde 2000***	
	im Blut [bp]	*in 253J [bp]*	*im Blut [bp]*	*in SW1710 [bp]*	*im Blut [bp]*	*in 1370 [bp]*	*im Blut [bp]*	*in 2000 [bp]*
***EcoR*I**	909	*3.100*	6.800	6.800	4.280	*4.000*	7.073	*4.500*
***Hind*III**	2.577	*3.100*	3.641	*1.600*	10.558	*21.000*	17.208	17.208
***BamH*I**	5.508 7.929	*5.400* 7.929	2.200	*3.800*	21.688	*8.000*	5.824	*9.000*

3.7.2 Amplifikation einer Vectorette-Bibliothek

Um die durch Southern-Blot Analyse in den Zellinien verifizierten Deletionsenden zu klonieren, fand das Vectorette-System Anwendung. Dieses methodische Vorgehen ist in Abbildung 3-22 exemplarisch für die Zellinie 253J dargestellt.

Zunächst wurde die DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Dann wurde ein Vectorette-Linker an die verdaute DNA ligiert (vgl. 2.25.1). Durch Amplifikation mit einem genspezifischen Primer und einem Linker-Primer konnte das gewünschte Fragment in einer *Long-Range-PCR* doppelt amplifiziert werden auch ohne das zweite Ende der Ausgangs-DNA zu kennen (vgl. 2.25.2). Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend kloniert und sequenziert (vgl. 2.16.3 und 2.26).

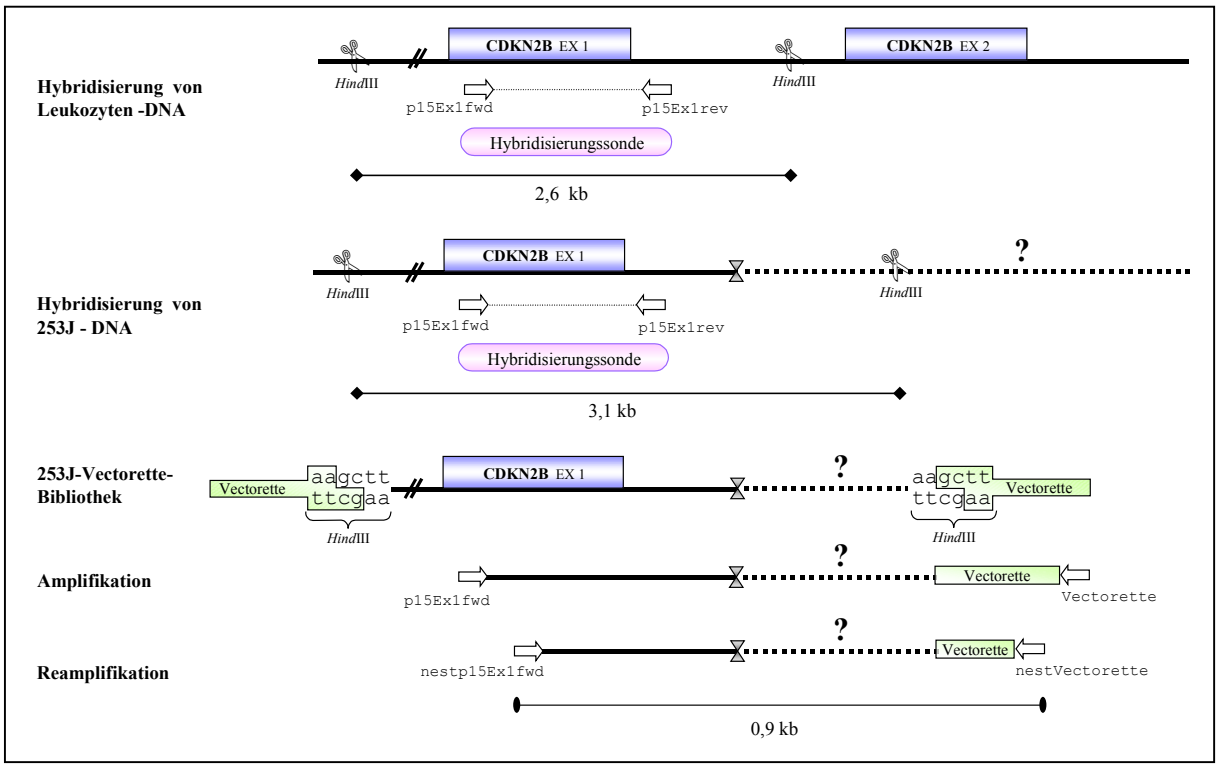

Abbildung 3-22. Methodische Vorgehensweise zur Klonierung der Deletionsenden für die Harnblasenkarzinom-Zellinie 253J.

In der Zellinie 253J detektiert die Hybridisierungssonde, spezifisch zum Nachweis der Deletion (vgl. 3.7.1), im Southern Blot nach *Hind*III Restriktionsverdau ein ca. 3,1 kb-Fragment (vgl. Tabelle 3-3). In der Leukozyten-DNA ergibt sich dagegen das erwartete 2,6 kb-Fragment. Die 3'-gelegene *Hind*III-Restriktionsschnittstelle liegt also in einem unbekannten Genomabschnitt. Für die Zellinie 253J wurde daher eine *Hind*III-Vectorette-Bibliothek hergestellt. Die zur Amplifikation benutzten genspezifischen PCR-Primer `p15ex1fwd` und `nestp15ex1fwd` lagen von der 5'-gelegenen *Hind*III-Restriktionsschnittstelle

etwa 2,2 kb einwärts. Durch Kombination mit den vectorettespezifischen Primern `Vectorette` und `nestVectorette` wird also ein ca. 900 bp PCR-Produkt erwartet.

Für die anderen drei deletierten Zellinien ergab sich nach Erstellung der jeweils geeigneten Vectorette-Bibliothek ein analoges Vorgehen:

SW1710-*Hind*III-Vectorette: Im Southern Blot konnte ein im Vergleich zur Blut-DNA ein von 3,6 kb auf 1,6 kb verkürztes *Hind*III-Fragment nachgewiesen werden. Die genspezifischen Primer `D9S942fwd` und `nestD9S942fwd` lagen in Bezug zur 5'*Hind*III-Schnittstelle 600 bp einwärts und ergaben mit den Vectorette-Primern ein ca. 1000 bp PCR-Produkt.

1370-*EcoR*I-Vectorette: Das *EcoR*I-Fragment verkürtzte sich im Vergleich zur Leukozyten-DNA von 4,3 kb auf ca. 4,0 kb. Da die genspezifischen Primer `prenestp16_4rev` und `p16_4rev` 3,4 kb einwärts von der 3'-gelegenen *EcoR*I-Schnittstelle lagen, war ein ca. 600 bp PCR-Fragment zu erwarten.

2000-*EcoR*I-Vectorette: Das durch *EcoR*I-Restriktionsverdau entstandene Fragment verkleinerte sich in der Zellinie gegenüber der Normalkontrolle von 7,0 kb auf 4,5 kb. Das zu erwartende PCR-Produkt hatte aufgrund der in Bezug zur 5'-gelegenen *EcoR*I Schnittstelle 3,3 kb einwärts liegenden genspezifischen Primern `p16Ex1β` und `nestp16Ex1β` ein Länge von ca. 1200 bp.

Nach Klonierung und Sequenzierung der entstandenen PCR-Produkte wurde ein Sequenzabgleich der Vectorette-Plasmide mit Hilfe des Programms BLAST (vgl. 2.12.2) gegenüber der GenBank durchgeführt. Es ergaben sich für die vier Zellinien die in Abbildung 3-23 dargestellten Sequenzhomologien. Es sind für jede Zellinie drei Basensequenzen dargestellt, wobei die mittlere Sequenz dem sequenzierten Vectorette-Plasmid der Zellinie entspricht. Die obere und untere Nukleotidabfolge zeigen die homologen Abschnitte zu einem BAC-Klon (vgl. Lage der BACs in Abbildung 3-16).

Wie nach der cytogenetischen Untersuchung der Zellinie 253J und SW1710 erwartet (vgl. 3.6), lagen jeweils beide Enden der Deletion auf Chromosom 9p, ähnliches ergab sich für die beiden Nierenkarzinom-Zellinien 1370 und 2000.

Die beiden Enden der Deletionen in allen vier untersuchten Zellinien waren nicht homolog zueinander, sie zeigten an ihren Bruchpunkten lediglich jeweils zwei Basenpaar-Sequenzüberlagerungen (vgl. Abbildung 3-23, fett markiert). Das Ausmaß der sich daraus für die einzelnen Zellinien ergebenden interstitiellen Deletionen ist in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

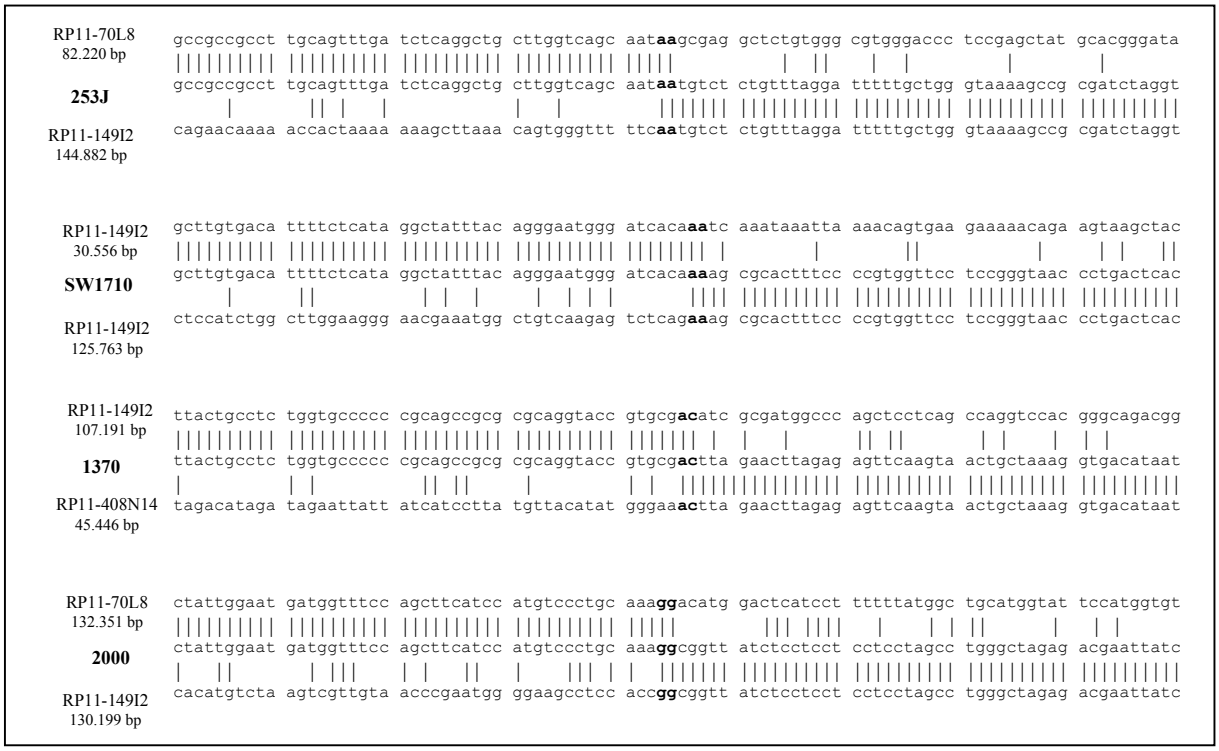

Abbildung 3-23. Sequenzhomologien der charakterisierten CDKN2 Deletionsenden in den Harnblasenkarzinom-Zellinien 253J und SW1710 sowie in den Nierenkarzinom-Zellinen 1370 und 2000 mit den BAC-Klonen RP11-70L8, RP11-149I2 und RP11-408N14 aus der Region 9p21. Homologien sind durch eine Verbindung der Nukleotide gekennzeichnet; fett markierte Basen zeigen homologe Region zwischen den Deletionsenden an.

Tabelle 3-3. Übersichtstabelle über die klonierten Deletionsenden in den Harnblasenkarzinom-Zellinien 253J und SW1710 sowie in den Nierenkarzinom-Zellinien 1370 und 2000. ^{C} centromerischer Bruchpunkt; ^{T}, telomerischer Bruchpunkt

Zellinie	*Bruch*	*BAC*	*Position*	*Größe der Deletion*
253J	253J^{C}	RP11-149I2	144.925	Δ 181.449 bp
	253J^{T}	RP11-70L8	82.263	
SW1710	SW1710^{C}	RP11-149I2	125.810	Δ 95.207 bp
	SW1710^{T}	RP11-149I2	30.603	
		RP11-70L8	159.202	
1370	1370^{C}	RP11-408N14	45.492	Δ 240.412 bp
	1370^{T}	RP11-149I2	107.237	
2000	2000^{C}	RP11-149I2	130.242	Δ 116.640 bp
	2000^{T}	RP11-149I2	13.602	
		RP11-70L8	132.394	

3.7.3 Weitere Bruchpunktanalysen

Die telomerischen Deletionsenden der Zellinien 253J, SW1710 und 2000 sind alle in einer Region von ca. 80 kb auf dem BAC RP11-70L8 lokalisiert und liegen jeweils in einem LINE-Element (vgl. Abbildung 3-24 Unten). Daher wurde vermutet, daß die telomerischen Deletionsenden für die Zellinien, welche ebenso wie die beschriebenen Zellinien einen Verlust des CDKN2A Exon 3 zeigten, den telomerischen Marker D9S1846 jedoch noch aufwiesen, ebenfalls auf dem BAC RP11-70L8 zu finden sind. Es handelt sich dabei zum einen um die Harnblasenkarzinom-Zellinie BFTC905, zum anderen um die Nierenkarzinom-Zellinien 1892, 1987 und 1765 (vgl. Abbildung 3-15). Um die Deletionsenden einzugrenzen wurden ausgehend von den schon bekannten Bruchpunkten der Zellinien 253J, SW1710 und 2000 PCRs für sieben weitere Abschnitte im BAC RP11-70L8 durchgeführt. Die Lage der ausgewählten Primerpaare ist der untenstehenden Abbildung 3-24 zu entnehmen, sie sind in der Nähe der schon klonierten Bruchpunkte, außerhalb der repetitiven Elemente lokalisiert.

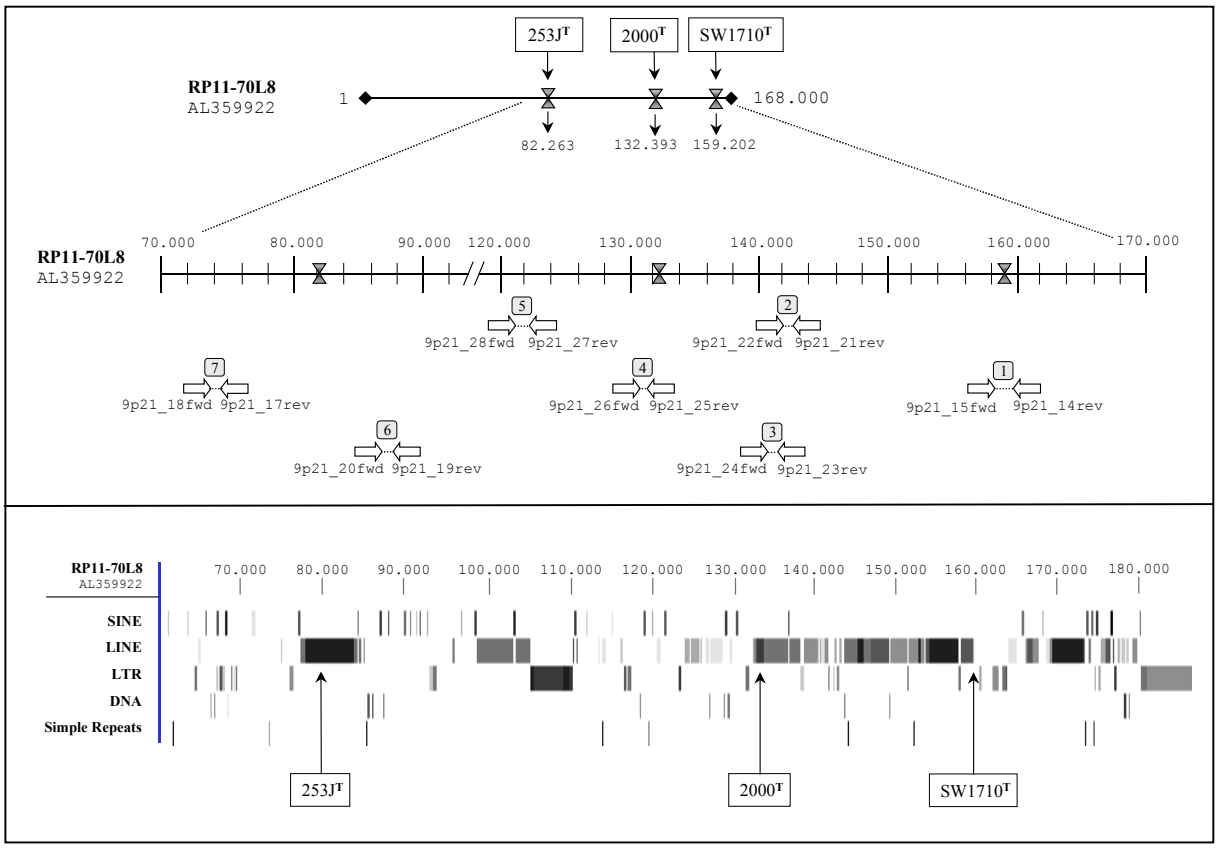

Abbildung 3-24. **Oben**: Lage der gewählten Primerpaare im BAC RP11-70L8. **Unten**: Übersicht über die auftretenden repetitiven Elemente in dieser Region. Unterschiedliche Graustufen der Balken repräsentieren dabei unterschiedliche Elemente. Die Helligkeit zeigt das evolutionäres Alter an, je dunkler der Balken, desto jünger das Mitglied. Verändert nach *Human Genome Browser.*

Die Resultate der in Abbildung 3-24 eingezeichneten PCRs mit den Primerpaaren 1-7 sind für die untersuchten Zellinien in der nachstehenden Tabelle 3-4 zusammengefaßt.

Tabelle 3-4. Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse zur Lokalisierung der telomerischen Bruchpunkte für die Zellinien 1892, 1987, 1765 und BFTC905.
+, PCR-Signal vorhanden; –, PCR-Signal nicht vorhanden.

	D9S1846	***7***	***6***	***5***	***4***	***3***	***2***	***1***	***CDKN2A Exon3***
1892	+	–	–	–	–	–	–	–	–
1987	+	+	+	+	+	+	+	–	–
1765	+	+	+	+	+	–	–	–	–
BFTC905	+	+	+	+	–	–	–	–	–

Für die Zellinie 1892 waren alle sieben ausgewählten PCRs negativ, d.h. ihr telomerisches Deletionsende liegt auf einem weiter telomerisch liegenden BAC. Für die drei anderen Zellinien konnte das telomerische Deletionsende in dem BAC RP11-70L8 lokalisiert werden. Es wurde für die Zellinie 1987 zwischen den Nukleotiden 142.000 und 168.000 eingegrenzt, für die Zellinie 1765 wurde der Bruch zwischen den PCR-Primerpaaren 3 und 4, d.h. zwischen den Nukleotiden 132.000 und 141.000 eingegrenzt. Der Bruch in der Zellinie BFTC905 ließ sich zwischen den Positionen 122.000 und 132.000 festmachen. Die Deletionsenden aller drei Zellinien liegen ebenfalls in dem betrachteten LINE Areal (vgl. Abbildung 4-1). Eine weitere Einengung der Deletionsenden ist nicht möglich, da nur noch repetitive Elemente zwischen den jeweils ausgewählten PCR-Primern liegen.

Für die centromerisch von CDKN2B gelegenen Bruchpunkte fand für die Harnblasenkarzinom-Zellinien RT112, RT4, BFTC905 und BFTC909, sowie für die Nierenkarzinom-Zellinien 1987 und 1765 ein ähnliches Auswahlverfahren Anwendung: Zunächst wurden sechs Primerpaare ausgewählt, die den BAC RP11-408N14 abdecken auf dem bereits das centromerische Deletionsende der Zellinie 1370 charakterisiert worden war (vgl. Abbildung 3-25). Die Zellinien BFTC909, 1987 und 1765 waren für alle sechs ausgewählten Primerpaare positiv. Für sie wurden acht weitere Primerpaare, den angrenzenden BAC RP11-145E5 umspannend, ausgewählt auf dem die Zellinie 253J ihren centromerischen Bruch zeigte. Eine Übersicht der PCR-Ergebnisse gibt Tabelle 3-5.

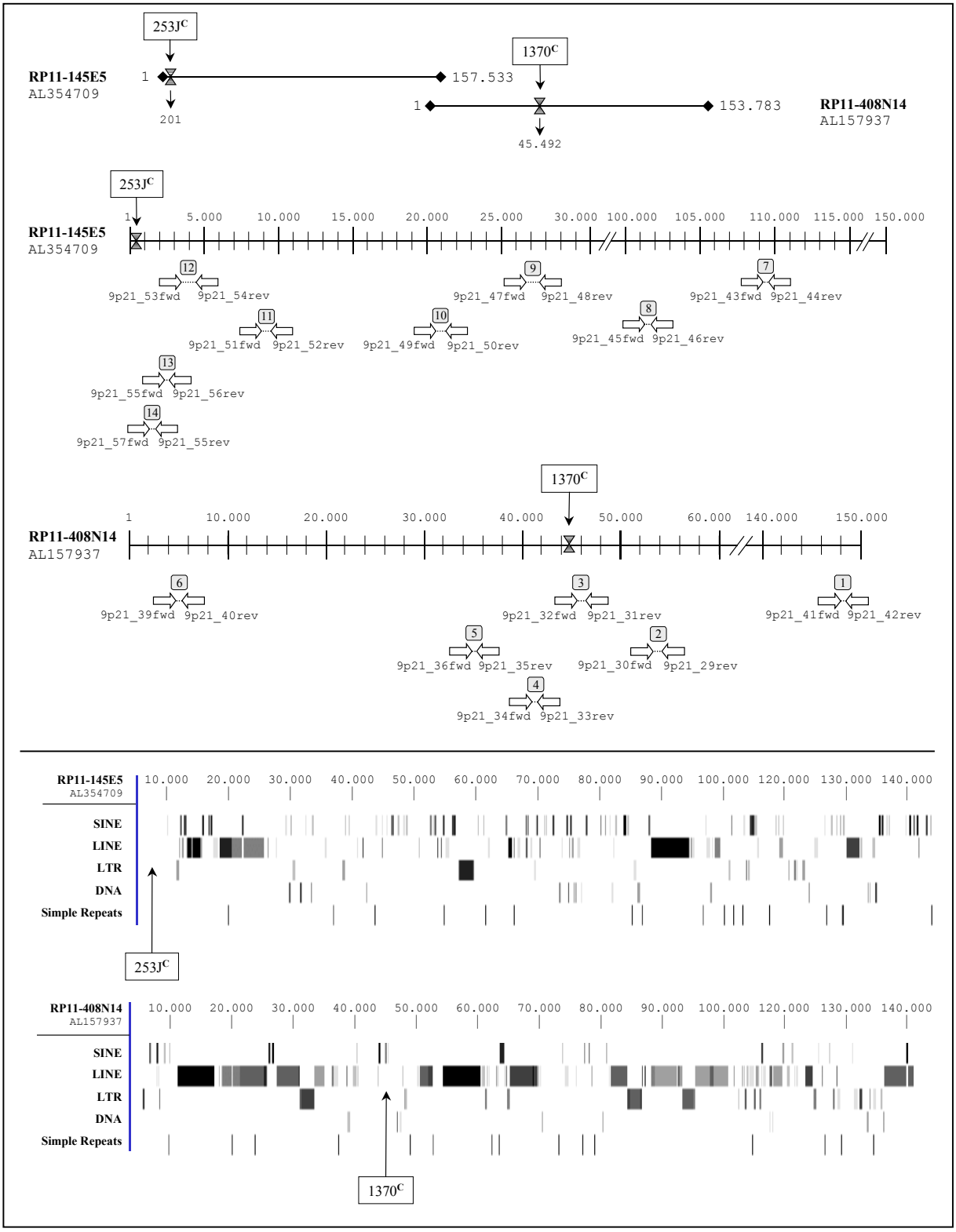

Abbildung 3-25. **Oben**: Lage der gewählten Primerpaare im BAC RP11-145E5 und RP11-408N14. **Unten**: Übersicht über die auftretenden repetitiven Elemente in diesen Regionen. Unterschiedliche Graustufen der Balken repräsentieren dabei unterschiedliche Elemente. Die Helligkeit zeigt das evolutionäres Alter an, je dunkler der Balken, desto jünger das Mitglied. Verändert nach *Human Genome Browser*.

Tabelle 3-5. Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse zur Lokalisierung der centromerischen Deletionsenden in den Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien.
+, PCR-Signal vorhanden; –, PCR-Signal nicht vorhanden; n.u., nicht untersucht.

	CDKN2B Exon1	*14*	*13*	*12*	*11*	*10*	*9*	*8*	*7*	*6*	*5*	*4*	*3*	*2*	*1*	*D9S171*
RT112	–	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	–	–	–	–	–	–	+
RT4	–	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	–	–	–	–	–	–	+
BFTC905	–	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	–	–	–	–	–	+	+
BFTC909	–	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
1987	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1765	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Für die Zellinien RT112 und RT4 waren die ersten sechs ausgewählten PCRs auf dem BAC RP11-408N14 negativ, d.h. ihr centromerisches Deletionsende ist auf einem der angrenzenden BACs in Richtung des Makers D9S171 zu suchen. Für die Zellinie BFTC905 ließ sich ihr Deletionsende zunächst auf einen Bereich von ca. 80.000 bp auf dem BAC RP11-408N14 eingrenzen (zwischen Primerpaar 1 und 2), für BFTC909 liegt die Deletion auf dem distalen Ende des BAC RP11-145E5, innerhalb einer Region von ca. 45.000 bp (zwischen Primerpaar 6 und 7). Die centromerischen Deletionsenden der Zellinien 1987 und 1765 sind in der Nähe des Bruchpunktes der Zellinie 253J und damit sehr nah am CDKN2B Gen lokalisiert. Keiner der Bruchpunkte ließ sich bisher einem spezifischen LINE-Areal zuordnen (vgl. Abbildung 3-25 unten).

3.8 Expressions-Analyse von Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien

3.8.1 Expression des CDKN2A-Gens

Zur Komplementierung der Analyse des CDKN2A-Gens auf der DNA-Ebene (vgl. Kapitel 3.5) wurde der Expressionsstatus dieses Gen in sechs Nierenkarzinom-Zellinien und neun ausgewählten Harnblasenkarzinom-Zellinien überprüft. Die mittels RT-PCR aus mRNA gewonnene cDNA (vgl. 2.27) wurde zum einen mit den für CDKN2A spezifischen Primern (vgl. Abbildung 3-7) `mRNAp16fwd` und `mRNAp16rev` zu einem 176 bp Fragment amplifiziert, zum anderen ergab sich mit den Primern `GAPDH350.1-S` und `GAPDH350.1-AS` ein 379 bp cDNA-GAPDH-Amplifikat zum semiquantitativen Vergleich. Das Ergebnis der Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zeigt Abbildung 3-26.

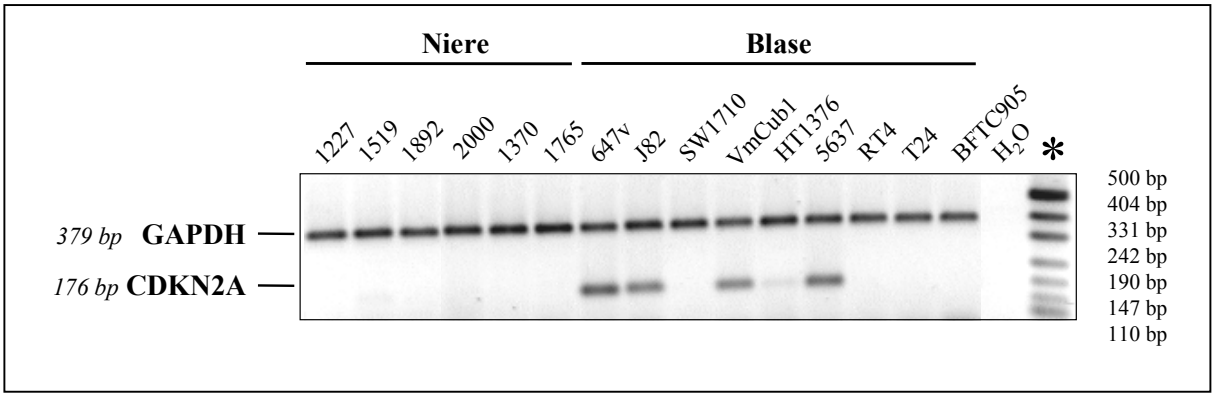

Abbildung 3-26. RT-PCR Analyse der CDKN2A-Expression humaner Nierenzellkarzinom- und Harnblasenkarzinom-Zellinien**.**

In allen untersuchten Proben war das GAPDH Transkript deutlich nachzuweisen. Von den neun untersuchten Harnblasenkarzinom-Zellinien zeigten SW1710, RT4 und BFTC905 eine homozygote Deletion des CDKN2A-Gens (vgl. Abbildung 3-15), diese fungierten in der Expressionsanalyse als Negativkontrollen. Von den übrigen sechs Linien, die keine größere Verluste auf DNA-Ebene zeigten, wies HT1376 und T24 kein intaktes Transkript auf. Keine der sechs untersuchten Nierenkarzinom-Zellinien zeigte eine genspezifische Bande, obwohl die Zellinien 1227 und 1519 im Gegensatz zu den anderen vier Zellinien keine homozygote Deletion dieses Locus aufwiesen (vgl. Abb. 3-15 und Kapitel 3.9.2)

3.8.2 Expression des Retinoblastom-Gens (RB1)

Zur Ermittlung des Expressionsstatus des RB1-Gens in humanen Karzinom-Zellinien wurde neben der Bestimmung auf RNA-Ebene eine Western-Blot-Analyse etabliert (vgl. 2.28). Der Transkriptnachweis erfolgte analog zu dem unter 3.8.1 beschriebenen, mittels semiquantitativer Amplifikation der cDNA mit den genspezifischen Primern `RB1-S` und `RB1-AS` im Vergleich zu GAPDH.

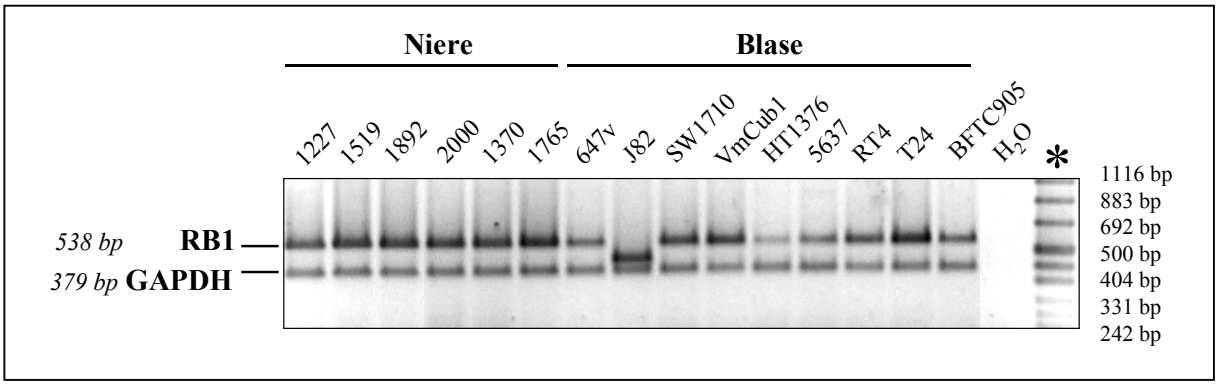

Abbildung 3-27. RT-PCR-Analyse der RB1-Expression in Nierenkarzinom- und Harnblasen-karzinom-Zellinien.

Wiederum ist die GAPDH-Bande in allen der 15 untersuchten Zellinien deutlich bei 379 bp zu erkennen. Von den sechs untersuchten Nieren-Zellinien zeigten alle das 538 bp-RB1-Transkript in gleichem Ausmaß. Bis auf die Zellinien J82 zeigten ebenfalls alle Harnblasenkarzinom-Zellinien das erwartete PCR-Produkt, jedoch in deutlich unterschiedlicher Stärke (vgl. HT1376 zu T24). J82 zeigt ein um ca.100 bp verkürztes Amplifikat im Agarosegel. Nach Sequenzierung des PCR-Produktes hat sich bestätigt, daß es sich um eine schon bekannte Deletion des Exon 21 handelt [Horowitz *et al*., 1989] (vgl. Abbildung 3-28), die in der cDNA 105 Basenpaare umspannt.

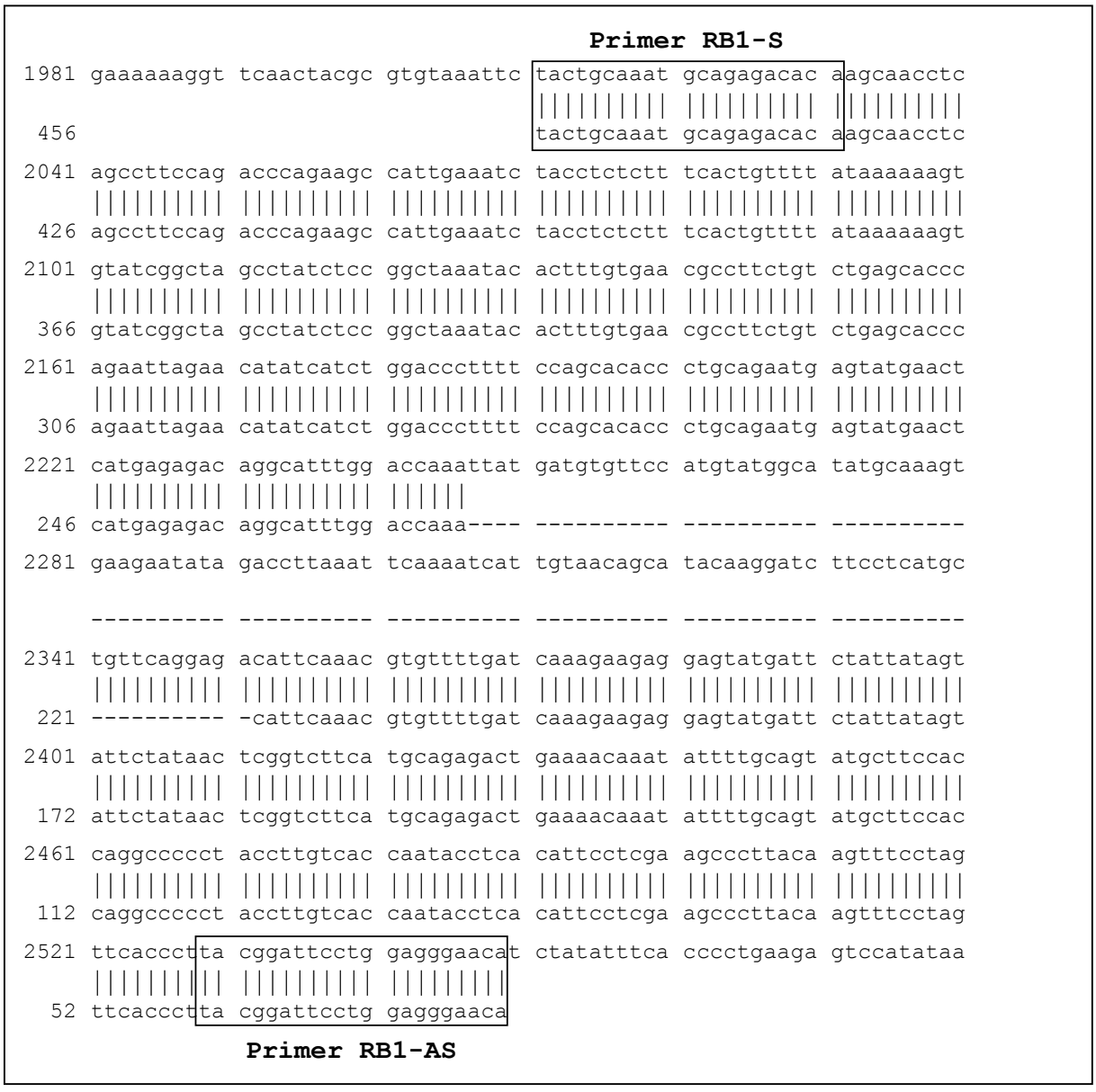

Abbildung 3-28. Sequenzierte Deletion im RB1-Gen der Harnblasenkarzinom-Zellinie J82: 105 Nukleotide sind in der cDNA deletiert, das entspricht 35 Aminosäuren. Oberer Strang: cDNA des RB1-Gens (Accessionnummer XM_007211); unterer Strang, kloniertes RB1-PCR-Produkt der Zellinie J82.

Da RB1-Deletionen oft intragenisch sind und mit den ausgewählten Primern nicht unbedingt erfaßt werden, wurde zudem für die sechs Nierenkarzinom-Zellinien eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung 3-29 dargestellt.

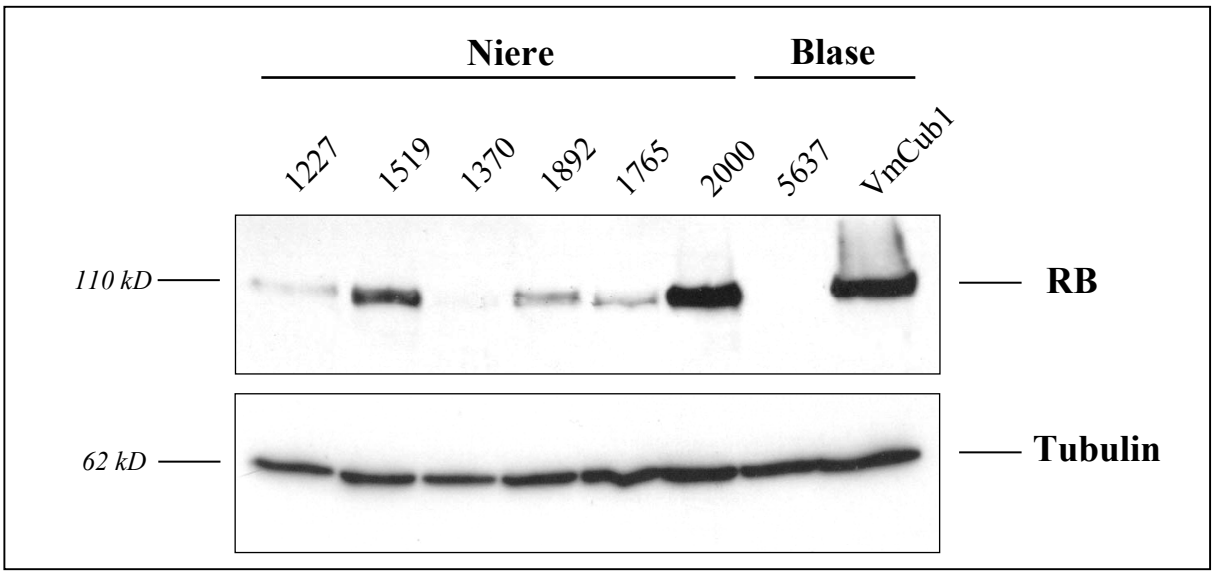

Abbildung 3-29. Western-Blot-Analyse der RB-Proteinexpression in sechs Nierenkarzinom-Zellinien sowie in zwei Harnblasenkarzinom-Zellinein, die als Kontrolle dienten. Im unteren Teil ist die Tubulinexpression derselben Zellinien dargestellt. Der abgebildete Film wurde 10 Sekunden exponiert.

Das obere Bandenmuster zeigt die RB-Expression in sechs Nierenkarzinom- und zwei Harnblasenkarzinom-Zellinien. Das RB-Protein erscheint erwartungsgemäß bei 110 kD, die entstandenen Banden zeigen jedoch starke Intensitätsvariationen zwischen den einzelnen Zellinien. Die in der unteren Abbildung gezeigten Banden stellen die Tubulin-Expression in den selben acht Zellinien dar und belegen, daß gleiche Mengen Protein aufgetragen worden waren.

Obwohl alle sechs Nierenkarzinom-Zellinien ein intaktes Transkript auf RNA-Ebene zeigten, ist auf Protein-Ebene eine deutliche Verminderung der RB-Proteinmenge in vier von sechs Zellinien zu erkennen. Im Gegensatz zu 1519 und 2000 ist das Protein in den Zellinien 1227, 1370, 1892 und 1765 eher schwach bis gar nicht nachweisbar. Zusätzlich wurden zwei Harnblasen-Zellinien untersucht, von den 5637 mit einem kompletten Verlust des RB-Proteins als Negativkontrolle und VMCub1 als Positivkontrolle in dieser Western-Blot-Analyse fungierte [Grimm *et al.*, 1995, Steinhoff, 2001]. Eine genaue Analyse der Proteinexpression der anderen Harnblasenkarzinom-Zellinien wurde in dem hiesigen Labor bereits zuvor durchgeführt [Steinhoff, 2001]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-6 im Vergleich mit den in dieser Arbeit hinzugewonnenen Expressionsdaten aufgeführt.

3.8.3 Expression des MTAP-Gens

Die Analyse der Deletionen in den Harnblasenkarzinom- und Nierenkarzinom-Zellinien in Kapitel 3.5 hatte gezeigt, daß in einigen das MTAP-Gen, welches telomerisch von CDKN2A liegt, ebenfalls beeinträchtigt sein könnte (vgl. Abbildung 3-15).

Zur Ermittlung des MTAP-Expressionsstatus auf RNA-Ebene wurden sechs Nierenkarzinom- und neun Harnblasenkarzinom-Zellinien mittels semiquantitativer PCR der cDNA mit den genspezifischen Primern `MTAPmRNAfwd` und `MTAPmRNArev` im Vergleich zum Haushaltsgen β-Aktin (Primer `Actin fwd` und `Actin rev`) amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-30 dargestellt.

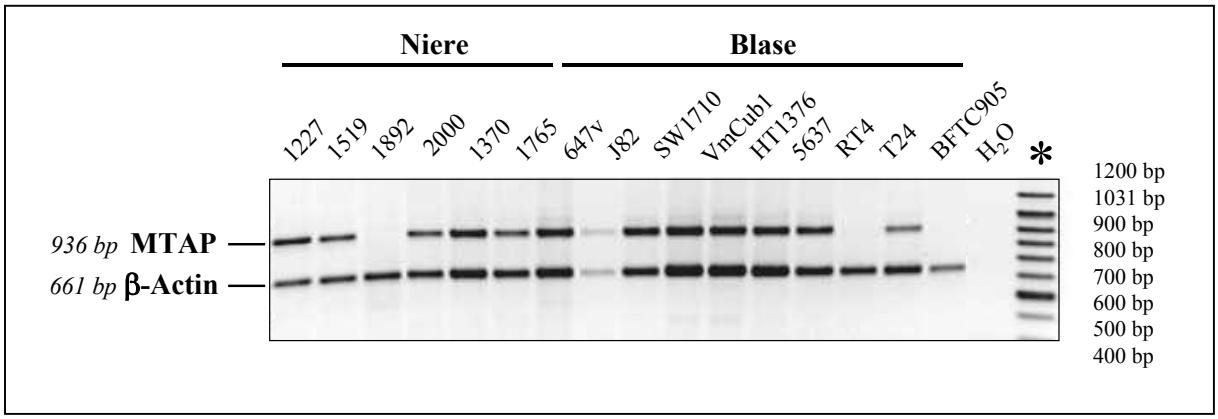

Abbildung 3-30. RT-PCR-Analyse der MTAP-Expression in Harnblasenkarzinom-Zellinien.

In allen untersuchten Proben ist das zur Kontrolle amplifizierte β-Aktin-Fragment (661 bp) deutlich zu erkennen. In den Zellinien J82 und BFTC905 sind die Banden im Vergleich zu den anderen Zellinien etwas schwächer, was auf eine geringere Konzentration der cDNA zurückzuführen ist. Das genspezifische PCR-Produkt hat eine Größe von 936 bp und ist in der Nierenkarzinom-Zellinie 1892 und den Harnblasenkarzinom-Zellinien RT4 und BFTC905 nicht vorhanden.

Die nachfolgende Tabelle 3-6 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse aus Kapitel 3.8.1, 3.8.2 und 3.8.3 für die untersuchten Nieren- und Harnblasenkarzinom-Zellinien.

Tabelle 3-6. Zusammfassende Ergebnisse der Expressionsanalyse. Die in der RB-Western-Analyse mit * gekennzeichneten Ergebnisse stammen aus Grimm *et al*., [1995]. –, negativ; +, positiv; ↓, Expression erniedrigt; ↑, Expression erhöht; n.u., nicht untersucht.

		***CDKN2A* RT-PCR**	***RB1* RT-PCR**	***RB* Western**	***MTAP* RT-PCR**
Nierenkarzinom-Zellinien	**1227**	–	+	↓	+
	1519	–	+	+	+
	1892	–	+	↓	–
	2000	–	+	↑	+
	1765	–	+	↓	+
	1370	–	+	↓	+
	1987	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Harnblasenkarzinom-Zellinien	**647v**	+	+	–*	+
	J82	+	–	–*	+
	SW1710	–	+	+*	+
	VMCub1	+	+	+	+
	HT1376	–	+	–*	+
	5637	+	+	–	+
	RT4	–	+	n.u.	–
	T24	–	+	+*	+
	BFTC905	–	+	n.u.	–

3.9 DNA-Methylierungsanalysen in Nierenkarzinom-Zellinien

3.9.1 Genomweite Hypomethylierung

Zur Untersuchung der genomweiten Hypomethylierung in Nierenkarzinom-Zellinien wurde in ihnen das Methylierungsmuster von repetitiven L1-Sequenzen mittels Southern-Blot-Analyse betrachtet. Hierzu wurde aus einer klonierten LINE-Sequenz (pL1.2B) eine 0,6 kb-Hybridisierungssonde durch *Pst*I-Restriktionsverdau hergestellt (vgl. 2.16.1, 2.18.1 und 2.20.1). Das betrachtete L1.2B-Element enthält acht Restriktionsschnittstellen für das Enzym *Msp*I, sowie für sein Isoschizomer *Hpa*II (vgl. Abbildung in [Florl, 1998]). Die *Pst*I-Sonde liegt zwischen der vierten und fünften *Msp*I-Schnittstelle (M_4 und M_5) und detektiert nach *Hpa*II/*Msp*I-Verdau der genomischen DNA ein 1,4 kb-Fragment. Weitere Banden werden durch Mutationsereignisse an den 5‘ gelegenen Schnittstellen M_3 und M_4 erwartet (1,6 kb und 1,8 kb) sowie in Kombination mit dem Auftreten von Veränderungen an M_5 und M_6 (3,1 kb, 3,2 kb und 3,4 kb).

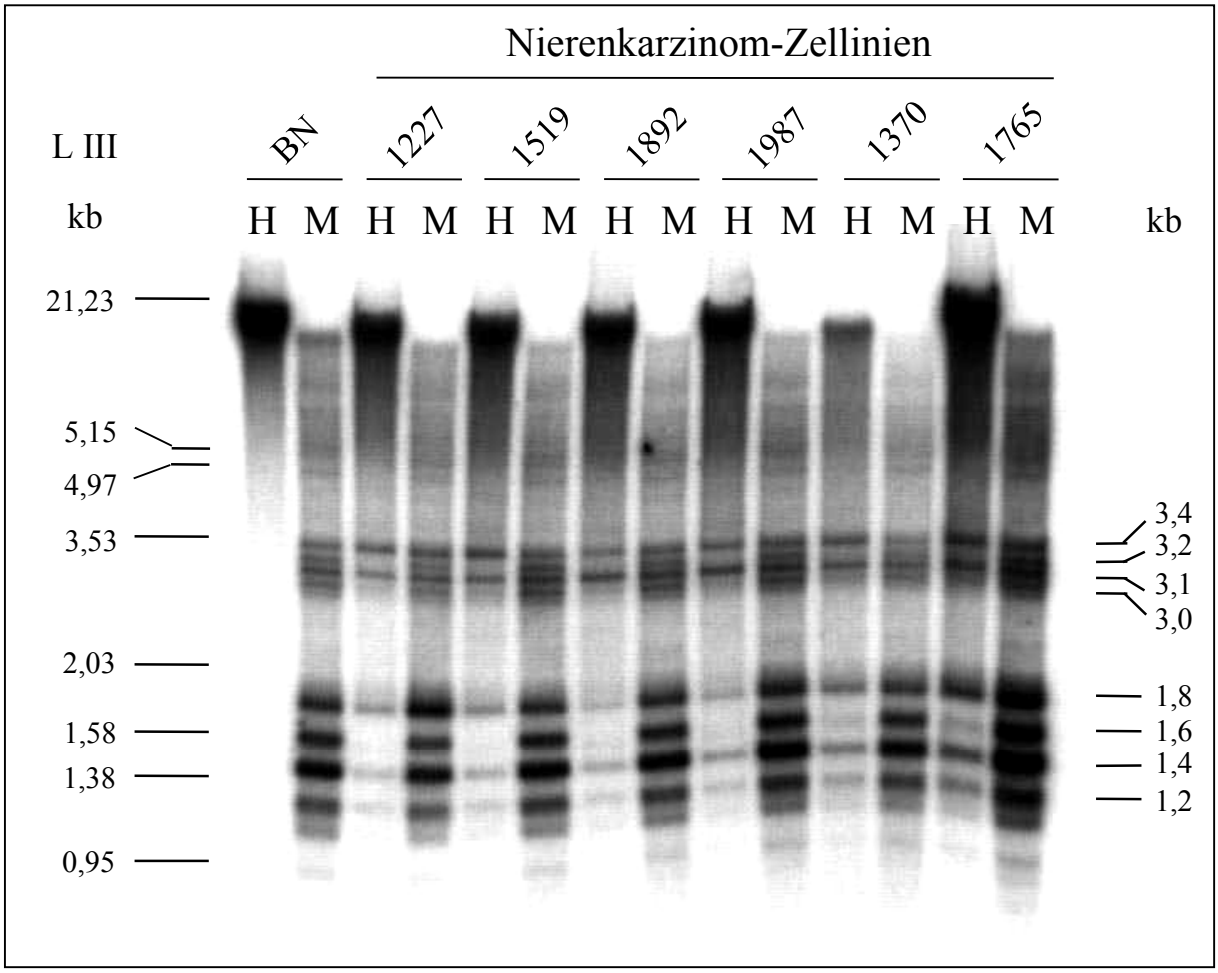

Abbildung 3-31. LINE1-Hypomethylierung von Nierenkarzinom-Zellinien der Passage 10-20. H, *Hpa*II-verdaute Probe; M, *Msp*I-verdaute Probe; BN, DNA aus normalem Harnblasengewebe.

Sowohl im MspI-Verdau (M) des normalen Harnblasengewebes (BN) als auch in den sechs Nierenkarzinom-Zellinien können deutlich zwei Gruppen von Banden erkannt werden. Aus der unteren Gruppe sind die erwarteten Fragmente (1,8-1,4 kb) zu erkennen, wobei das 1,4 kb-Hauptfragment das intensivste Bandensignal zeigt. Zusätzlich ist eine 1,2 kb Bande zu erkennen. In der oberen Gruppierung sind ebenfalls vier Banden zu erkennen (3,4-3,0 kb), wobei jeder dieser Banden hinsichtlich ihres 5'-Endes einem Fragment aus der unteren Gruppe entspricht. Das 3'-Ende liegt für die obere Gruppe an der Schnittstelle M_7 im Gegensatz zu der unteren Gruppe, bei der alle Fragment an der Schnittstelle M_5-Enden.
Nach *Hpa*II-Verdau (H) liegen im Normalgewebe alle Sequenzen immer noch hochmolekular vor, d.h. alle *Hpa*II-Stellen der betrachteten LINE-Sequenzen sind nahezu vollständig methyliert. Im Gegensatz dazu zeigen die *Hpa*II-Spuren von vier der sechs Nierenkarzinom-Zellinien ein deutliches Bandenmuster. Die entstandenen Fragmente entsprechen denen des MspI-Verdaus, haben jedoch eine geringere Intensität.
Auf diese Weise wurden sowohl frühe (<5) als auch späte Passagen (zwischen 10 und 20) der gleichen Nierenkarzinom-Zellinien betrachtet. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 3-32 dargestellt.

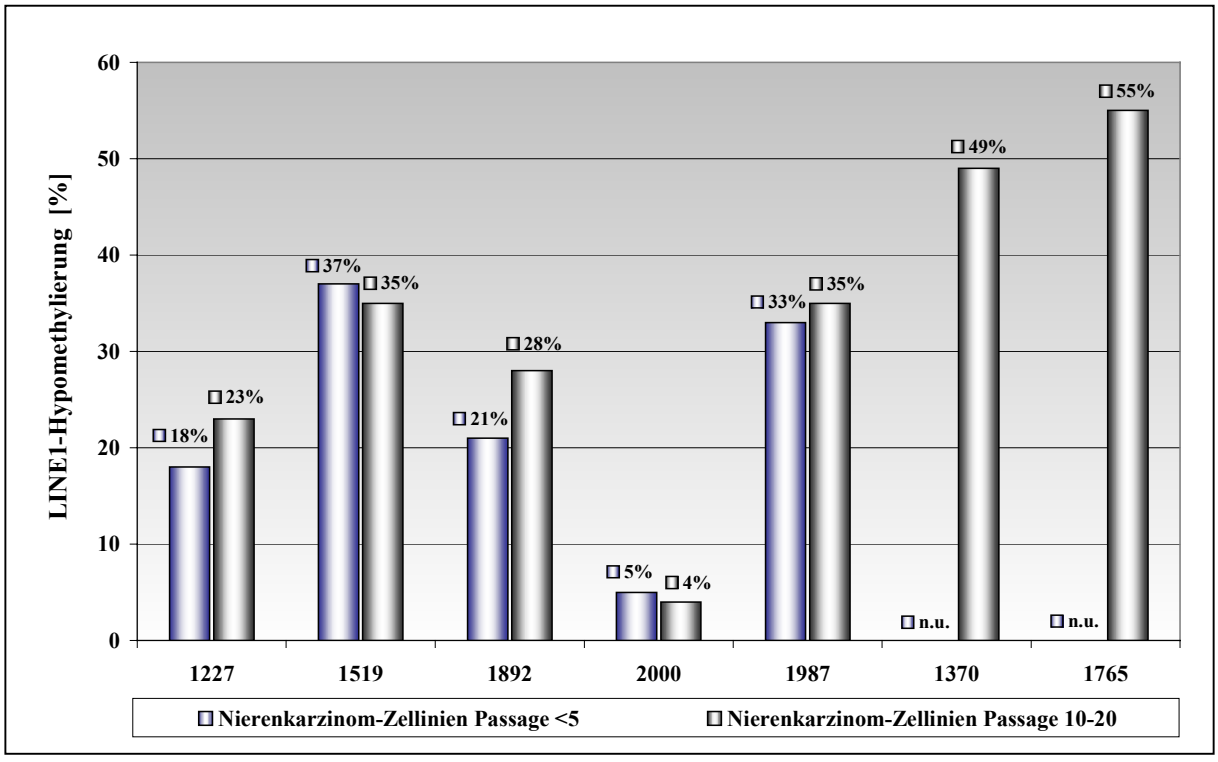

Abbildung 3-32. LINE1-Hypomethylierung von frühen und späten Passagen der Nierenkarzinom-Zellinien im Vergleich.

Von den Linien 1370 und 1765 standen keine frühen Passagen zur Verfügung. Die anderen fünf Zellinien zeigten im Rahmen der Meßgenauigkeit das gleiche Ausmaß an Methylierungsverlust bezüglich der untersuchten LINE1 Sequenzen.

3.9.2 Hypermethylierung des CDKN2A-Gens

Analog zu dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Restriktions-Assays zur Hypermethylierungsuntersuchung der CpG-reichen Promotorregion des CDKN2A-Gens für Harnblasentumore wurde diese Analyse hier für die Zellien 1227 und 1519 durchgeführt. Beide zeigten keine Expression des CDKN2A-Gens (vgl. Abbildung 3-26), wiesen jedoch keine homozygote Deletion des Locus auf (vgl. Abbildung 3-15); eine Inaktivierung des Gens durch Hypermethylierung wäre also denkbar.

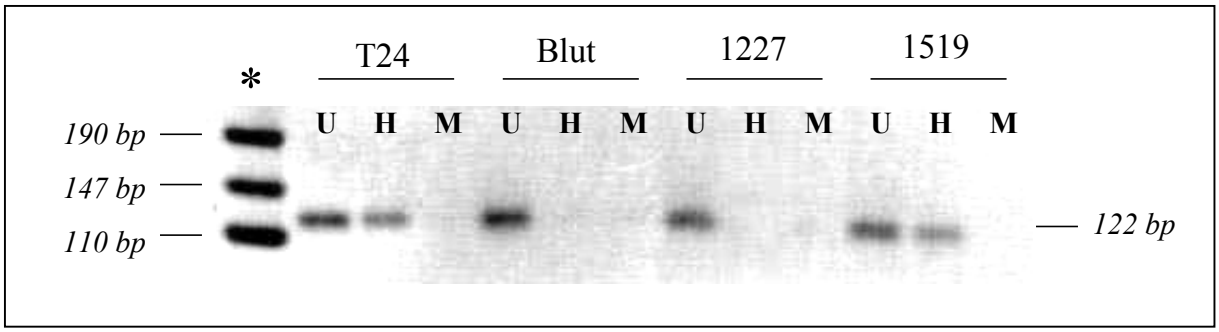

Abbildung 3-33. Restriktionsassay der Nierenkarzinomzellinien 1227 und 1519. T24 und Blut wurden als Kontrollen mitgeführt. U, unverdaute Probe; H, *Hpa*II-verdaute Probe; M, *Msp*I-verdaute Probe; *, Längenstandard.

Abbildung 3-33 zeigt die Auftrennung der ungeschnittenen, der nach *Hpa*II-Verdau so wie nach *Msp*I-Verdau amplifizierten PCR-Produkte im Agarosegel. Beide Zellinien zeigen ebenso wie die Kontrollen ein Amplifikat mit der ungeschnittenen DNA. Von den beiden Nierenkarzinom-Zellinien zeigte neben der Zellinie T24, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde nur die Linie 1519 ein 122 bp-Signal nach *Hpa*II-Verdau. In dieser Zellinien liegt demnach eine Hypermethylierung vor.

3.9.3 Hypermethylierung des VHL-Gens

Das auf Chromosom 3p liegende VHL-Gen wurde bei 32 Nierenkarzinom-Zellinien [Meyer *et al*., 2000], darunter auch die in dieser Arbeit bisher erwähnten sieben Linien, auf Promotor-Hypermethylierung mittels MS-PCR von bisulfitumgewandelter DNA untersucht (vgl. Kapitel 3.2.2).

Die DNAs wurden sowohl mit Primern spezifisch für unmethylierte DNA (u) als auch mit Primern spezifisch für methylierte DNA (m) amplifiziert (Primersequenz vgl. 2.13.1). Die Nierenkarzinom-Zellinie SK-RC54 diente als Positvkontrolle in diesem Assay. Sie zeigte nach Amplifikation der DNA durch Vorhandensein eines methylierten wie auch eines unmethylierten Allel sowohl das 158 bp PCR-Produkt aus methylierter DNA wie das 7 bp größere PCR-Produkt aus unmethylierter DNA. Abbildung 3-34 zeigt ein Polyacrylamidgel mit 11 Zellinien sowie Kontrollen.

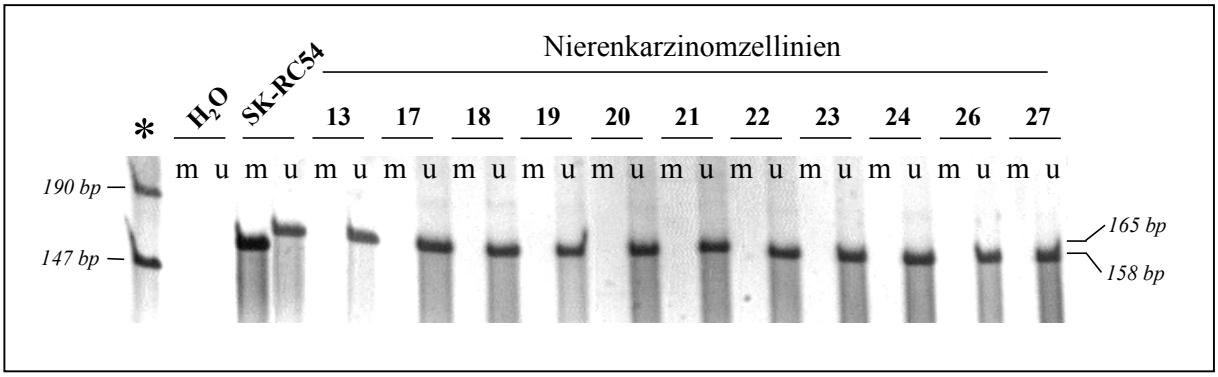

Abbildung 3-34. Methylierungs-spezifische-PCR des VHL-Gen in Nierenkarzinom-Zellinien. u, Primer spezifisch für unmethylierte Sequenzen; m, Primer spezifisch für methylierte Sequenzen.

Alle 11 abgebildeten sowie die restlichen 20 Nierenkarzinom-Zellinien zeigten lediglich das 158 bp Signal, amplifiziert mit den Primern spezifisch für unmethylierte DNA. Die Nierenkarzinom-Zellinie SK-RC54 war daher die einzige, in der eine VHL-Geninaktivierung durch Promotorhypermethylierung nachzuweisen war.

4 DISKUSSION

4.1 Der CDKN2-Locus im Harnblasenkarzinom

4.1.1 Molekulare Charakterisierung

Die somatische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TS-Gene) wurde am Beispiel des Retinoblastoms für heriditäre und sporadische Karzinome bereits in einer wegweisenden Studie von Knudson [1971] postuliert. Sein theoretisches Konzept (Two-Hit-Hypothese) konnte von Cavenee *et al*. [1983] experimentell bestätigt werden und bildet seitdem das Paradigma für die meisten Untersuchungen von TS-Genen.

Bei der Inaktivierung von TS-Genen wird die Funktion eines Allels durch Missense-Mutationen oder kleinere Deletionen zerstört oder eingeschränkt. Darüber hinaus tritt eine Veränderung des zweiten Allels auf. Diese Inaktivierung des zweiten Allels kann durch epigenetische Veränderungen erfolgen, beispielsweise durch Hypermethylierung CpG-reicher Promotorsequenzen. Häufig geht das zweite Allel insgesamt verloren; dabei ist ein Verlust der Heterozygotie (LOH) eines oder mehrerer flankierender Mikrosatellitenmarkern zu beobachten. Die Mechanismen, welche zur Entstehung eines LOH führen, sind noch weitgehend unbekannt; nur wenige Arbeiten haben sich bisher mit dieser Fragestellung beschäftigt [Cavenee *et al*., 1983; Stanbridge, 1990; Thiagalingam *et al*., 2001]. Prinzipiell kommen mehrere Mechanismen in Frage: der Verlust eines ganzen Chromosoms wird durch mitotische *Nondisjunction* verursacht. Homologe wie nicht-homologe (illegitime) Rekombination kann zum Austausch des intakten gegen ein mutiertes Allel oder zu kleineren Deletionen führen [Lasko *et al*., 1991]. Homologe sowie nichthomologe Rekombinations-ereignisse liegen auch Translokationen zu Grunde, wie sie z.B. bei der Entstehung des Philadelphia-Chromosoms auftreten. Diese können ebenfalls zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens führen.

Welcher Mechanismus bei der Inaktivierung überwiegt, variiert in Abhängigkeit der betroffenen Gene und hängt stark vom Tumortyp und –klasse ab [Bishop & Schiestl, 2000]. Beispielsweise ist die Deletion beider Allele, d.h. eine homozygote Deletion, in Tumoren ein eher seltenes Ereignis, welches bislang nur für wenige Gene beschrieben wurde. Neben RB1 (13q14) [T'Ang *et al*., 1988] und PTEN (10q23) [Li *et al*., 1997] betrifft sie vor allem die auf Chromosom 9p21 lokalisierten Gene CDKN2A und CDKN2B, die für negative Regulatoren des Zellzyklus kodieren. Das CDKN2A Gen liegt vor allem im familiären Melanom in einem hohen Maße deletiert und/oder mutiert vor. Eine hohe Rate an homozygoten Deletionen und

Punktmutationen dieses Gens wurden ebenfalls im Pankreaskarzinom [Caldas *et al.*, 1994] und im Ösophaguskarzinom [Mori *et al.*, 1994] gezeigt.
Im Harnblasenkarzinom wurden vor allem Deletionen des CDKN2A Gens gefunden, die Ergebnisse aus mehreren Arbeitsgruppen variierten jedoch stark. Die größte Studie wurde von Cairns *et al*. [1995][A] an 285 Harnblasenkarzinomen durchgeführt. In 177 Tumoren (62%) wurde eine Veränderung von Chromosom 9p21 nachgewiesen. Von diesen zeigten 126 Tumore (44%) homozygote Deletionen und 51 (18%) einen LOH im CDKN2-Locus. Dieses Ergebnis hebt sich mit seinem hohen Anteil an homozygoten Deletionen recht deutlich vom Großteil der anderen Arbeiten ab. Balazs *et al*. [1997] wiesen 30% HD in 17 Tumoren mittels FISH-Analyse nach. Baud *et al*. [1999] hingegen identifizierten nur bei 7% von 44 untersuchten Tumoren eine HD, konnten jedoch bei 48% der Proben LOH zeigen. Orlow *et al*. [1999] detektierten in 110 Tumoren ebenfalls nur bei 10% HD und bei 8% LOH. Packenham *et al*. [1995] fanden 21% HD und 33% LOH, ähnlich zu den Daten von Williamson *et al*. [1995] mit 20% HD und 22% LOH.

In der vorliegenden Arbeit wurden 86 Harnblasenkarzinome durch eine Mikrosatellitenanalyse mit 5 Markern auf Verlust der Heterozygotie (LOH) im und um den CDKN2 Locus überprüft. In den selben Proben wurde ebenso der Anteil an homozygoten Deletionen (HD) im CDKN2A Gen bestimmt. Die Ergebnisse zur Häufigkeit der HD sind mit einem Anteil von 20% nahezu deckungsgleich mit den Werten von Packenham *et al*. [1995] und Williamson *et al*. [1995]. Der Anteil von 40% LOH liegt im Vergleich zur Literatur relativ hoch und ist zwischen den Ergebnissen von Packenham *et al*. [1995] und Baud *et al*. [1999] einzuordnen.

Die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Veröffentlichungen wie auch die Differenzen zu dieser Arbeit lassen sich zum einen sicherlich auf Unterschiede der untersuchten Populationen bezüglich der genetischen Konstitution und der Art der Exposition gegenüber Karzinogenen zurückführen. Auch unterschieden sich die untersuchten Tumorproben bezüglich des Anteils verschiedener Tumorstadien. Zum anderen könnte eine Ursache für die breite Streuung der Ergebnisse darin begründet sein, daß in manchen Untersuchungen Harnblasentumoren mit unterschiedlicher Histologie Verwendung fanden. Eine strikte Unterscheidung scheint unter diesem Aspekt erforderlich, da Tsutsumi *et al.* [1998] deutliche Unterschiede zwischen Plattenepithelkarzinomen und Übergangs-epithelkarzinomen zeigen konnten. In Plattenepithelkarzinomen der Blase detektierte seine Gruppe 52% HD des CDKN2A Gens, in Übergangsepithelkarzinomen der Blase mit

Plattenepithelkarzinomanteilen waren dagegen nur 30% HD zu finden. Promotor-Hypermethylierung wurde nur in den Platten-epithelkarzinombereichen detektiert.

Unterschiede in den Ergebnissen sind wahrscheinlich außerdem auf die eingesetzten Techniken zurückzuführen. So wurde bei der LOH-Analyse üblicherweise eine Verminderung des Mikrosatelliten-Markersignals im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe von 50% als LOH definiert (vgl. Diskussion in [An *et al*., 1996]). In dieser Arbeit wurde durch den Einsatz eines automatischen Sequenziergerätes unter Anwendung fluoreszenz-markierter Primer die Sensitivität der Analyse gegenüber der häufig durchgeführten Silberfärbung entscheidend erhöht. Es konnte für alle untersuchen Mikrosatellitenmarker bereits ein Verlust des Signals von 40% als gesicherter LOH angenommen werden (vgl. Abbildung 3-4). Wegen der Amplifikation von DNA aus Stromazellen in nicht-mikrodisseziertem Material machen sich homozygot deletierte Abschnitte inmitten eines Abschnittes, der LOH zeigt, in einer scheinbaren Retention der Homozygotie bemerkbar. Durch die verwendete Duplex- bzw. Triplex-PCR wird dieser experimentelle Artefakt erkennbar und konnte gezielt dazu genutzt werden, um homozygote Deletionen aufzufinden. Der Verdacht auf HD wurde jeweils durch die anschließende quantitative PCR erhärtet.

4.1.2 Analyse der Promotor-Hypermethylierung

Es ist noch nahezu unbekannt, welcher Mechanismus der DNA-Hypermethylierung von TS-Genen in Tumoren zugrunde liegt. Am häufigsten wird jedoch eine Überexpression der DNA-Methyltransferase impliziert [Belinsky *et al*., 1996; Baylin & Herman, 2000], doch wird diese längst nicht in allen Tumoren beobachtet in denen Hypermethylierung auftritt [Robertson & Jones, 2000]. Es werden seit längerem Hypothesen vertreten, daß Karzinogene Hypermethylierung auslösen. Beispiele dafür sind Nickel und Arsen, welche eine Veränderung der Chromatinstruktur induzieren, die eine Hypermethylierung nach sich ziehen könnte [Mass & Wang, 1997]. Ausgehend von der Basenspezifität der DNA Methyltransferase hat Smith [1998] postuliert, daß es zu einer Aktivierung dieses Enzyms kommen kann, wenn die Replikation durch Karzinogen-Addukte an DNA-Basen angehalten wird (*Activation by Stalling*). Bei der Betrachtung eines bekanntermaßen durch Karzinogene ausgelösten Tumors, wie dem Harnblasenkarzinom, kann diese Möglichkeit nicht vernachlässigt werden.

In ersten Publikationen wurde die Hypermethylierung der CpG-Insel, welche die Promotorregion und das Exon 1α des CDKN2A Gens umfasst, im Harnblasenkarzinom als ein relativ häufiger Mechanismus der Geninaktivierung beschrieben: Merlo *et al*. [1995] detektierten in 20% der untersuchten Harnblasentumore hypermethylierte Promotoren des CDKN2A Gens. Akao *et al*. [1997] beschrieben Hypermethylierung für 37,5% einer japanische Patientengruppe. Gonzalez-Zulueta *et al*. [1995] fanden die Promotorregion sogar in 12 von 18 (67%) untersuchten Proben in hypermethyliertem Zustand vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im augenfälligen Gegensatz zu den oben aufgezeigten Literaturdaten. Nur in drei von 34 untersuchten Tumorproben mit LOH (das entspricht 11%) konnte eine Hypermethylierung der CDKN2A-Promotorregion nachgewiesen werden.

Die Hypermethylierung der CpG-Insel in diesem Bereich des Gens wurde zum einen mittels Restriktions-Assay und zum anderen durch Methylierungs-spezifische-PCR (MS-PCR) untersucht. Mit beiden, voneinander unabhängigen Methoden wurden identische Ergebnisse erzielt. Bei der umfassenderen Bisulfitsequenzierung zeigte sich zusätzlich ein Tumor hypermethyliert. Die Veränderung der Methylierung war jedoch auf den kodierenden Bereich des Exon 1α beschränkt und konnte deshalb durch die beiden anderen Methoden nicht nachgewiesen werden. Ihre funktionelle Relevanz ist fraglich.

Die Diskrepanzen zu den Literaturwerten könnten zum einen, ähnlich wie zuvor bereits diskutiert, aus unterschiedlichen Probenpopulationen herrühren. Es dürften aber auch methodische Probleme eine erhebliche Rolle spielen. Der Restriktions-Assay tendiert durch den häufig unvollständigen Restriktionsverdau der DNA-Proben in einem hohen Maße zu falsch-positiven Ergebnissen. Dieses sollte stets durch einen Kontrollverdau mit dem methylierungs-insensitiven Restriktionsenzym *Msp*I überprüft werden (vgl. Abbildung 3-9 Probe #102). Die MS-PCR kann ebenfalls falsch-positive Ergebnisse durch Amplifikation unvollständig bisulfit-umgewandelter DNA liefern. Auch in diesem Assay ist es von entscheidender Bedeutung, daß sowohl positive als auch negative Kontrollen mitgeführt werden (vgl. Abbildung 3-10). Beide Methoden wurden in dieser Arbeit zur gegenseitigen Validierung der Ergebnisse parallel an identischem Probenmaterial durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen in Bezug auf die Hypermethylierung der untersuchten Harnblasenkarzinom–Zellinien gut mit der Literatur überein. Dies belegt grundsätzlich die richtige Etablierung der angewandten Methoden. Es verdeutlicht zugleich, daß auch beim CDKN2 Gen zwischen Methylierungsveränderungen in Zellkultur und Primärtumor unterschieden werden muß. Bei der Etablierung von Zellinien treten häufig Veränderungen in der DNA-Methylierung auf [Antequera & Bird, 1993]. Eine vermehrte Methylierung von Zellinien gegenüber Tumorgeweben wurde im Harnblasenkarzinom auch schon für das

Calcitonin-Gen beschrieben [Jürgens *et al*., 1996]. Trotzdem beziehen sich einige der ersten Berichte über Hypermethylierung des CDKN2A-Gens auf Zellinien oder auf Veränderungen in Exon 2, welches keinen Einfluß auf die Transkription hat. Zusammenfassend liegt der Schluss nahe, daß Hypermethylierung als Inaktivierungsmechanismus des CDKN2A Gens im Harnblasenkarzinom von geringer Bedeutung ist.

4.1.3 Mutationsanalyse

Eine umfassende Übersicht aller bisher in Tumoren charakterisierten Punktmutationen im CDKN2A Gen findet sich bei Ruas und Peters [1998]. Die Mutationen finden sich über den gesamten Genabschnitt hinweg. Viele Arbeiten beschränken sich auf Untersuchungen des Exon 2, da es den größten Teil des Transkripts ausmacht und sich die Mutationen gleichzeitig auf $p16^{INK4a}$ und $p14^{ARF}$ auswirken.

Im Harnblasenkarzinom gelten Punktmutationen in der kodierenden Region des CDKN2A-Gens als selten. So konnten Packenham *et al*. [1995] in keinem von 28 untersuchten Harnblasentumoren Punktmutationen nachweisen. Ebenso gelang es Orlow *et al*. [1999] nicht, unter 110 Tumoren eine einzige Mutation zu detektierten. Baud *et al*. [1999] identifizierten lediglich drei Proben mit Punktmutationen in 44 untersuchten Harnblasentumoren. In der vorliegenden Arbeit konnten Punktmutationen mittels SSCP-Analyse des CDKN2A Exon 2 in zwei Harnblasenkarzinom-Zellinien, jedoch in keinem der 16 Tumorgewebeproben mit LOH, detektiert werden.

Für die Harnblasenkarzinom-Zellinie VMCub1 wurde eine homozygote Transversion von GAT>CAT im Codon 108 von $p16^{INK4a}$ nachgewiesen. Dieses entspricht einem Austausch der Aminosäuresequenz Asparagin zu Histidin (N108H). In der $p14^{ARF}$–Sequenz führt diese Punktmutation zu einem Aminonsäureaustausch von Arginin zu Prolin im Codon 122. Eine solche Punktmutation wurde bereits im Pankreaskarzinom nachgewiesen [Moskaluk *et al*., 1997]. Bei der Zellinie 639v liegt die Punktmutation für $p16^{INK4a}$ im Codon 55 (GGC>GAC). Diese Transition entspricht einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Asparaginsäure (G55D). Dieser Basenaustausch führt jedoch im β-Transkript des CDKN2A Gens zu keiner veränderten Aminosäuresequenz und damit nicht zu einem Verlust der $p14^{ARF}$ Funktion.

Liu *et al*. [1995] beschrieben Punktmutationen für die Zellinie VMCub1 im Codon 100 und für 639v im Codon 50, diese sind wahrscheinlich identisch mit denen in dieser Arbeit gefundenen Mutationen. Die ursprünglich publizierte Nummerierung der Codons im CDKN2A Gen war fehlerhaft, und wurde erst nach 1995 korrigiert [Ruas & Peters, 1998].

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen daher die allgemeine Auffassung, daß Punktmutationen seltene Ereignisse in Harnblasenkarzinomen darstellen. Insgesamt sind demnach homozygote Deletionen gegenüber Promotor-Hypermethylierung und Punktmutationen als Inaktivierungsmechanismen des CDKN2A Gens im Harnblasenkarzinom favorisiert.

4.1.4 Bezug zu anderen genetischen und epigenetischen Veränderungen

In der Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Deletionen des CDKN2-Locus und dem Ausmaß genomweiter Hypomethylierung in Harnblasenkarzinomen gezeigt werden. Bei allen Tumorproben, die im Rahmen dieser Arbeit eine HD des CDKN2A Gens und/oder LOH in der Region 9p21 zeigten, konnte DNA-Hypomethylierung von LINE1-Elementen nachgewiesen werden. In einer statistischen Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, daß das Ausmaß an LINE1-Hypomethylierung bei Proben, die LOH oder HD aufwiesen, signifikant höher war als bei den Proben ohne jede Veränderung. Zwischen Proben mit HD sowie in Proben, die lediglich LOH aufwiesen, war das Ausmaß an Hypomethylierung dagegen vergleichbar (vgl. Abbildung 3-14 und Tabelle 7-3).
Die im Harnblasenkarzinom sehr häufige genomweite Hypomethylierung [Jürgens *et al*., 1996, Florl *et al*., 1999] wurde in dieser Arbeit anhand der verminderten Methylierung von LINE1-Sequenzen nachgewiesen. Deren Methylierungsgrad verläuft jedoch parallel zu dem anderer repetitiver Sequenzen, beispielsweise endogener Retroviren (z.B. HERV-K) [Florl, 1998; Florl *et al*., 1999] und Satellitensequenzen, wie sie im juxtacentromerischen Heterochromatin im Chromosomenabschnitt 9q12 zu finden sind [Kimura *et al*., 2001]. Die Korrelation bezieht sich damit auch auf die Veränderung der DNA-Methylierung über das gesamte Genom hinweg.
Interessant ist, daß die drei Karzinome, die eine Promotor-Hypermethylierung des CDKN2A-Locus zeigten (vgl. Abbildung 3-14, Proben #102, #182, #193), ebenfalls deutliche - zwischen 17% und 69% - Hypomethylierung der repetitiven LINE1-Sequenzen aufwiesen. Dieses ist ein weiteres Beispiel dafür, daß genomweite Hypomethylierung und gen-spezifische Hypermethylierung häufig gemeinsam auftreten, die Gründe hierfür sind nicht bekannt [Baylin *et al*., 1998; Schulz 1998].

Das Auftreten von homozygoten Deletionen im CDKN2A Gen korreliert nach den Ergebnissen dieser Arbeit nur tendenziell mit dem Stadium und Grad der untersuchten Tumorproben. Dieses ist ein eher überraschendes Resultat, denn der Verlust des TS-Gens CDKN2A beeinträchtigt sowohl die Funktion von RB1 als auch von TP53 und müßte deshalb mit der Tumorprogression in Zusammenhang stehen. Eine genauere Diskussion der klinischen

Parameter in Bezug zu den detektierten Verlusten des CDKN2A-Gens in den Harnblasentumoren findet sich in Florl *et al*. [2000] (vgl. zusätzlich Tabelle 7-2).
Durch eine homozygote Deletion des CDKN2A Gens ist neben dem $p16^{INK4a}$ Protein auch immer das $p14^{ARF}$ Proteine von einer Inaktivierung betroffen. Durch Funktionsverlust von $p14^{ARF}$ bleibt MDM2 in der Tumorzelle aktiv, inhibiert die Funktion und beschleunigt den von p53. Verlust von $p14^{ARF}$ ist daher in der Tumorgenese ein alternativer Mechanismus zur Mutation von p53 bei intaktem CDKN2A-Locus. Es ließe sich daher vermuten, daß HD von CDKN2A und Mutationen von p53 alternativ zueinander auftreten [Markl & Jones, 1998]. Die identische Serie von Karzinomen war bereits durch SSCP- und immunhistochemischen Analysen auf Mutationen von p53 untersucht worden [Steinhoff, 2001]. Ein Vergleich der Daten zeigte, daß eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Auftreten von Deletionen im CDKN2A-Locus und p53 Mutationen nicht bestand. Auch in den untersuchten Harnblasenkarzinom-Zellinien traten p53-Mutationen und HD von CDKN2A gleichzeitig auf.

4.2 Der CDKN2-Locus in humanen Karzinom-Zellinien

Es wird seit längerem vermutet, daß eine Verringerung des Methylierungsgehaltes im Genom zur genomischen Instabilität in Tumoren beiträgt [Schulz, 1998; Ehrlich, 2000; Baylin *et al*., 2001]. Vor diesem Hintergrund könnte die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen dem Ausmaß an LINE1-Hypomethylierung und dem Auftreten von Deletionen des CDKN2A Gens im Harnblasenkarzinom dadurch begründet sein, daß Hypomethylierung die Entstehung von Deletion begünstigt. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß in Zellen mit Inaktivierung der DNA-Methyltransferase 1 gehäuft Genmutationen durch Deletionen auftreten [Chen *et al*., 1998]. Welcher Mechanismus der Entstehung dieser Deletionen zu Grunde liegt, ist allerdings nicht bekannt; vermutet wird eine Erhöhung der Rekombinationsfrequenz. Eine genauere Charakterisierung der Deletionsenden könnte einen Aufschluß über die beteiligten Mechanismen geben.

Da es sich in den vorangegangenen Versuchen gezeigt hat, daß das zur Verfügung stehende Tumormaterial einen großen Anteil an Stromagewebe aufweist (vgl. Kapitel 3.1.1), schien diese grundlegende Untersuchung an Tumorgeweben nicht möglich, es wurden daher Tumorzellinien verwendet. *In vitro*–Zellkultursyteme sind als Modell zur Untersuchung biologischer, biochemischer, genetischer und molekularbiologischer Mechanismen der Karzinogenese gut geeignet. Ein offensichtlicher Vorteil ist die unbegrenzte Menge an zur Verfügung stehenden Materials. Durch Selektion und Anpassung an *in vitro*-Bedingungen

sind in Zellinien einige genetische Veränderungen häufiger als im Primärtumor vorzufinden. Harnblasenkarzinom-Zellinien spiegeln in Bezug auf Veränderungen vieler Tumorsuppressorgene, wie TP53, RB1 und CDKN2A jedoch die *in vivo*-Verhältnisse gut wieder. Sie können daher zur Klärung der Fragestellung nach den Mechanismen die zur Entstehung von Deletionen führen herangezogen werden.
Etwas kritischer muß die Situation in Nierenkarzinom-Zellinien betrachtet werden, da homozygote Deletionen von CDKN2A in Geweben selten beschrieben sind; genomweite Hypomethylierung ist in Geweben nicht nachweisbar [Florl *et al*., 1999]. Es ist möglich, daß beide Veränderungen erst während der Etablierung der Zellen in Kultur auftreten oder daß während der Kultivierung auf Zellen mit diesen Veränderungen selektioniert wird (vgl. auch Kapitel 4.5).

Das CDKN2A Gen wurde in vielen verschiedenen Zellinien als homozygot deletiert charakterisiert. So detektierten Liu *et al.* [1995] in 67% der untersuchten Ösophaguskarzinom-Zellinien und in 50% der Pankreaskarzinom-Zellinien eine HD von Exon 1 und Exon 2. Ähnliche Resultate sind für Karzinomzellinien aus Lunge, Brust, Gehirn, Knochenmark, Haut und Lymphozyten bekannt [Ruas & Peters 1998]. Williamson *et al.* [1995] fanden in 8 von 16 Harnblasenkarzinom-Zellinien das CDKN2A Gen homozygot deletiert vor, darunter befanden sich 11 der 17 Harnblasenkarzinom-Zellinien, welche in dieser Arbeit analysiert wurden. Die Ergebnisse bezüglich der HD des CDKN2A Gens dieser Proben stimmen überein. Die Deletionsenden waren jedoch von Williamson nur sehr grob charakterisiert worden. Mit dem Fortschreiten der Kartierung und Sequenzierung des menschlichen Genoms bestand nun die Möglichkeit, durch Auswahl weiterer Mikrosatellitenmarker das Ausmaß der identifizierten Deletionen zu präzisieren. Für die verwendeten Nierenkarzinom-Zellinien lagen in Bezug auf den Deletionszustand des CDKN2-Locus keine Literaturdaten zum Vergleich vor. Kinoshita *et al*. [1995] fanden jedoch in neun von 10 anderen Nierenkarzinom-Zellinien homozygote Deletionen von CDKN2A.

Von den 17 Blasen- und acht Nierenkarzinom-Zellinien zeigten 10 bzw. sechs Deletionen im betrachteten Locus. Sie variierten erheblich in ihrer Länge. Die größte Deletion zeigte die Harnblasenkarzinomzellinie SD, sie reicht vom telomerischen Marker D9S171 bis über den centromerischen Marker D9S782 hinaus. Da die genomische Sequenz in diesem Bereich noch nicht vollständig ist, kann die genaue Größe dieser Deletion noch nicht exakt bestimmt werden. Sie überspannt jedoch mindestes 5 Mbp.

Die Harnblasenkarzinom-Zellinie SW1710 zeigte mit ca. 95 kb die kleinste Deletion im CDKN2-Locus. Die Harnblasenkarzinom-Zellinien 253J sowie die Nierenkarzinom-Zellinien 1370 und 2000 zeigten Deletionen zwischen 116 und 240 kb. Bei diesen vier Zellinien machte die Tatsache, daß jeweils ein Ende der Deletion im Genabschnitt lokalisiert ist, die genauere Charakterisierung der Deletionsenden möglich (vgl. Abbildung 3-15).

Alle Deletionen schließen das CDKN2A Gen ein, dehnen sich jedoch centromerisch nicht in allen Linien über das CDKN2B Gen hin aus. Dieses Ergebnis bestätigt die Literaturdaten, nach denen bisher keine Deletionen von CDKN2B alleine in menschlichen Tumoren gefunden wurden. Mäuse, in denen selektiv nur das CDKN2B Gen entfernt worden war, zeigten auch nach einer zweijährigen Beobachtung keinerlei Tumore [Roussel, 1999].

In einigen Zellinien schloß die Deletion das telomerisch von CDKN2A Exon 3 gelegene MTAP-Gen ein (vgl. Abbildung 3-15). Seine Funktion wird im Zusammenhang mit Veränderungen der DNA-Methylierung in Kapitel 4.4 diskutiert.

4.3 Klonierung der Deletionsenden

Deletionen können durch illegitime Rekombinationen zwischen homologen repetitiven Sequenzen entstehen, wie es für das NF1 Gen in Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 gezeigt wurde [Dorschner *et al*., 2000]; denkbar sind auch Retrotranspositionen intakter LINE1-Elemente, die in einzelnen Tumoren als Ursache von Genfusionen [Liu *et al*., 1997] oder Genzerstörungen [Miki *et al*., 1992] identifiziert wurden. Für beide Mechanismen müssten sich Hinweise an Deletionsenden in den Zellinien finden lassen.

Die Konsensus-Sequenz eines vollständigen LINE1-Elementes ist ca. 6 kb lang [Kazazian & Moran, 1998] (vgl. Kapitel 1.2). Sie besteht aus vier Abschnitten. Die 5‘ UTR (untranslatierte Region) enthält einen internen Promotor. Es folgen zwei offene Leseraster (ORF1, ORF2), von denen eines für ein ca. 40 kDa RNA-bindendes Protein und das andere für ein Protein mit Reverser Transkriptase Aktivität kodiert. Die 3‘ nicht-translatierte Region (3‘UTR) endet mit einem poly-A-Schwanz. LINE1–Elemente liegen im Genom gewöhnlich sehr stark methyliert vor. Durch Hypomethylierung könnten sie aktiviert werden und transponieren. Transpositionsvorgänge dieser Art können Mutationen durch Insertion eines LINE1-Elements in ein Gen (vgl. Kapitel 1.2), aber auch Insertionen und Deletionen zur Folge haben.

Sowohl in Harnblasentumoren sowie auch in Zellinien ist die DNA-Methylierung von LINE1-Elementen meist stark vermindert [Florl *et al*., 1999]. Dieses Ergebnis bezieht sich vor allem auf vollständig erhaltene und damit zur Transposition befähigte Elemente, da eine

entsprechende Hybridisierungssonde im Southern Blot verwendet wurde. Es wurden ebenfalls spezifische Transkripte von LINE1 in Zellinien nachgewiesen [Florl *et al*., 1999].

Die Charakterisierung der Deletionsenden um das CDKN2A-Gen in vier Zellinien ergab weder Hinweise auf homologe Rekombinationen zwischen repetitiven Elementen, noch auf eine Insertion solcher Elemente durch Transposition. Die Deletionsenden zeigten keine längeren zueinander homologen Abschnitte, es konnten lediglich Überlagerungen von jeweils zwei Nukleotiden nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3-23). Der Befund der Basenduplikation legt vielmehr nahe, daß die Deletionsenden als Folge der Verknüpfung von nichthomologen offenen DNA-Enden (*Nonhomologous DNA End Joining,* NHEJ) zustande gekommen sind.

NHEJ ist in Säugetierzellen der bevorzugte Reparatur-Mechanismus von primären Doppelstrangbrüchen. Bei dieser nichthomologen Rekombination bedarf es nur einer minimalen Überlappungen der Sequenzen zwischen dem Ende des DNA-Doppelstrangbruchs und der Sequenz mit der dieser verbunden wird. Eine homologe Rekombination erfordert dagegen längere Abschnitte mit identischen Gensequenzen, wie z.B. bei Rekombinationsprozessen während der Meiose. NHEJ konnte speziell nachgewiesen werden, wenn homologe Rekombination, z.B. durch Inaktivierung eines der beteiligten Proteine BRCA1, BRCA2 und RAD51, unterbunden wurde [Critchlow *et al*. 1998, Taylor *et al*. 1998].

Für die Deletionen im CDKN2-Locus waren Rekombinationen zwischen repetitiven Sequenzen offenbar nicht verantwortlich, jedoch wurde eine Beteiligung von LINE1-Elemente nachgewiesen. Die telomerischen Deletionsenden für die Zellinien 253J, 2000 und SW1710 lagen in einem Areal von repetitiven Sequenzen, das überwiegend aus LINE1-Elementen bestand. Die telomerischen Deletionsenden von drei weiteren Zellinien konnten ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert werden (vgl. Abbildung 4-1), weswegen sich ihre Klonierung als sehr schwierig erwieß. Dieses Areal besteht aus einer Vielzahl von LINE-Sequenzen, die unterschiedlichen Familien zuzurechnen sind (vgl. Graustufen in Abbildung 4-1) und daher unterschiedlichen Alters sind. Die Entstehung von Arealen dieser Art wird begünstigt durch bevorzugte Integration von LINE-Elementen in die Nähe oder direkt in andere LINE-Elemente hinein. Dieses ist nur zum Teil durch die Spezifität der von LINE-kodierten Endonuklease bedingt [Moran, 1999], wird aber auch auf die Spezifität der lokalen Chromatinstruktur zurückgeführt [Kazazian, 1998]. Eine solche Anhäufung von repetitiven Elementen scheint also eine bevorzugte Stelle für Bruchpunkte darzustellen, die zu Deletionen des CDKN2A-Gens führen. Möglicherweise entstehen dort, oder zumindest in der Umgebung, bevorzugt DNA-Doppelstrangbrüche.

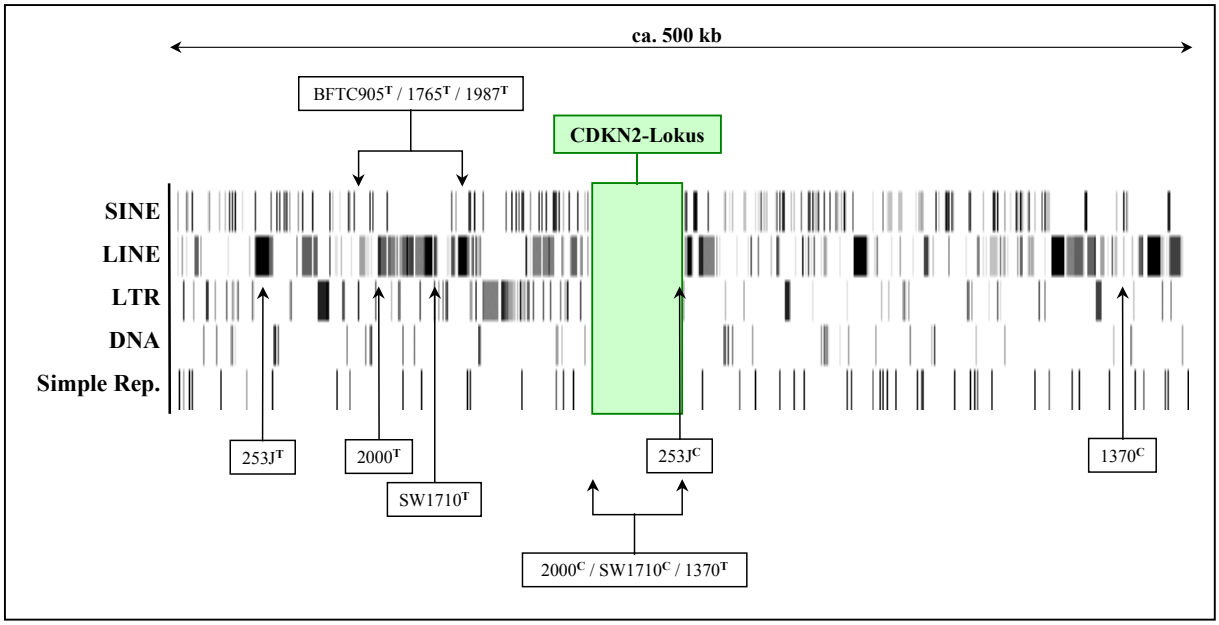

Abbildung 4-1. Verteilung der ermittelten Bruchpunkte für Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien auf Chromosom 9p21.

Homozygote Deletionen sind bisher nur in wenigen TS Genen gefunden worden, die Gründe dafür sind unbekannt (vgl. Kapitel 4-1.1). Die oben diskutierten Befunde legen die Vermutung nahe, daß ihre Entstehung vom Vorhandensein von Arealen repetitiver Elemente in ihrer chromosomalen Umgebung begünstigt wird. Dieser Zusammenhang könnte auch für das RB1-Gen zutreffen, in dem häufig intragenische Deletionen auftreten und das reich an LINE1-Sequenzen ist. Ein spezifischerer Hinweis darauf ergibt sich auch aus dieser Arbeit: In der Harnblasenkarzinom-Zellinie J82 wurde auf cDNA-Ebene der Verlust des RB1 Exon 21 detektiert (vgl. Abbildung 3-27 und 3-28). Zwischen diesem verlorengegangenen Exon und dem Exon 22 befindet sich ebenfalls ein LINE-Areal. Zur weiteren Überprüfung dieser Spekulation wäre die exakte Bestimmung der Deletionsenden im RB1-Gen in Zellinien wie z.B. J82 nötig.

4.4 Expressionsanalyse in Karzinomzellinien

In vielen verschiedenen Tumorarten tritt alternativ eine Inaktivierung entweder des CDKN2A Gens oder des auf Chromosom 13q14 lokalisierten RB1 Gens auf. Letzteres ist außer im Retinoblastom auch in Osteosarkomen [Friend *et al*., 1986], Lungenkarzinomen [Harbour *et al*., 1988], Mammakarzinomen [T'Ang *et al*., 1988] und Prostatakarzinomen [Bookstein *et al*., 1990] mutiert oder deletiert. Promotor-Hypermethylierung wurde nur als Mechanismus der Inaktivierung des zweiten Allels beim hereditären Retinoblastom nachgewiesen [Greger *et al*., 1989]. Im Urothelkarzinom findet sich zu 30% LOH auf Chromosom 13q14 (Cairns *et al*.,

1991, Bender *et al*., 1998). Darüber hinaus konnte in mehreren Untersuchungen konsistent, zuerst von Cordon-Cardo *et al*. [1992], vorwiegend in muskelinvasiven Urothelkarzinomen eine signifikante Verminderung der Proteinexpression gezeigt werden. Das RB1 Protein hat eine herausragende Bedeutung für die Regulation des G1-S-Übergangs im Zellzyklus und wird dabei durch $p16^{INK4a}$ beeinflußt, dessen Expression es reguliert (vgl. 1.4.3). Die Kontrolle des Zellzyklus kann in Tumoren daher alternativ durch Verlust oder RB1-Inaktivierung gestört werden. In vielen Tumoren ist sogar eine inverse Korrelation zwischen der Expression der beiden Proteine zu finden. Entsprechend konnte in 13 von 15 der in dieser Arbeit untersuchten Karzinom-Zellinien alternativ entweder ein Verlust von $p16^{INK4a}$ oder RB1 gezeigt werden (vgl. Tabelle 4-1.).

In allen Zellinien mit homozygoter Deletion des CDKN2A-Gens war – wie zu erwarten – keine mRNA durch RT-PCR nachzuweisen. Auch die Harnblasenkarzinom-Zellinie T24 zeigte keine Expression der $p16^{INK4a}$-mRNA, obwohl das kodierende Gen intakt erschien. Hier konnte die bereits beschriebene [Bender *et al*., 1998] Hypermethylierung der Promotor-Region des CDKN2A Gens als Inaktivierungmechanismus bestätigt werden (vgl. Abbildung 3-9 und 3-10). Sowohl für die Zellinie 647v als auch für 5637 konnte eine $p16^{INK4a}$-mRNA nachgewiesen werden. In beiden Fällen zeigte sich auch ein RB1-Signal in der RT-PCR, welches sich in der Western Blot Analyse jedoch nicht bestätigen ließ. Wahrscheinlich liegen der Inaktivierung des RB1 Gens in diesen Zellinien Deletionen in einem vom PCR-Assay nicht umfaßten Exon (d.h. vor Exon 19, oder hinter Exon 23) oder Stopmutationen zu Grunde. Dagegen entdeckte die verwendete RT-PCR-Methode die Deletion des Exon 21 in der Zellinie J82. VMCub1 zeigte neben einer RB1 Expression auch ein Signal in der RT-PCR. Eine Inaktivierung des CDKN2A Gens geschieht dort wohl durch die detektierte Missens-Mutation im Exon 2.

Keine der sechs untersuchten Nierenzellinien zeigte eine $p16^{INK4a}$ Expression in der RT-PCR. In vier Fällen ist dieses auf eine homozygote Deletion des CDKN2A Gens zurückzuführen. Die Zellinie 1519 zeigte eine Hypermethylierung der Promotorregion des CDKN2A Gens, welche zu einer Inaktivierung des Gens führte (vgl. Abbildung 3-33). Die Ursache der fehlenden Expression in der sechsten Zellinie 1227 wurde nicht näher untersucht; in Frage kommt eine Spleiß- oder Nonsensmutation mit Destabilisierung der mRNA. In allen Nierenkarzinom-Zellinien ließ sich RB1 Expression sowohl durch RT-PCR als auch durch Western Blot Analyse nachweisen. Allerdings war auffällig, daß die Expression zum Teil recht niedrig war (vgl. Abbildung 3-29). Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1. Zusammengefaßte Ergebnisse der Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien. Die in der RB-Western-Analyse mit * gekennzeichneten Ergebnisse stammen aus Grimm *et al*., [1995]. n.u., nicht untersucht.

Zellinie	*CDKN2B PCR*	*CDKN2A PCR*	*RA-PCR p16 Ex1α*	*CDKN2A RT-PCR*	*RB1 RT-PCR*	*RB Western*
1227	+	+	nicht methyliert	–	+	+
1519	+	+	methyliert	–	+	+
1892	–	–	n.u.	–	+	+
2000	+	–	n.u.	–	+	+
1765	–	–	n.u.	–	+	+
1370	–	–	n.u.	–	+	–
1987	–	–	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
647v	+	+	nicht methyliert	+	+	–*
J82	+	+	nicht methyliert	+	–	–*
SW1710	+	–	n.u.	–	+	+*
VMCub1	+	+	nicht methyliert	+	+	+
HT1376	+	+	nicht methyliert	–	+	+*
5637	+	+	nicht methyliert	+	+	–
RT4	–	–	n.u.	–	+	n.u.
T24	+	+	methyliert	–	+	+*
BFTC905	–	–	n.u.	–	+	n.u.

Viele der homozygoten Deletionen des CDKN2A Gens schließen das ebenfalls auf Chromosom 9p21 telomerisch liegende MTAP-Gen ein oder reichen so nahe heran, daß seine Expression beeinträchtigt sein könnte. Das MTAP-Gen kodiert für 5‘-Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP). Diese hydrolysiert ein Endprodukt der Polyamin-Biosynthese zu Vorläufern für die Biosynthese von Adenosin bzw. Methionin. Die essentielle Aminosäure Methionin ist wiederum Vorläufer von S-Adenosylmethionin (SAM), welches als Substrat für den Methylgruppentransfer fungiert. Ein Ausfall der MTAP-Aktivität könnte daher die DNA-Methylierung durch verminderte Resynthese von Methionin beeinträchtigen. Wahrscheinlich bedeutsamer ist, daß eine Anhäufung von MTA rückwirkend zu einer Akkumulation von decarboxyliertem SAM führt, welches als Inhibitor vieler Methyltransferasen, speziell auch der DNA-Methyltransferase 1 wirkt und auf diese Weise eine DNA-Hypomethylierung induzieren könnte. Dieser Mechanismus wurde für bestimmte Inhibitoren der Polyamin-Biosynthese bereits beschrieben [Frostesjo *et al*., 1997].

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit eine RT-PCR für die MTAP mRNA etabliert und die Expression des Gens in den untersuchten Karzinomzellinien gemessen. Wie zu erwarten, konnte in den Zellinien, in denen homozygote Deletionen das MTAP Gen teilweise oder vollständig erfaßt haben, keine Expression detektiert werden. Die Zellinien, bei denen nur angrenzende Bereiche von einer Deletion betroffen waren, zeigten zumindest qualitativ unveränderte Expression. In diesen Zellen lag jedoch ebenfalls eine deutliche Hypomethylierung der DNA vor (vgl. in Tabelle 4-2, z.B. Zellinie 1370, 1765, J82). Zusammenfassend ist daher auszuschließen, daß ein MTAP–Verlust ausschlaggebend für die beobachtete Hypomethylierung ist.

Tabelle 4-2. Gegenüberstellung der LINE1-Hypomethyierung und der MTAP-Expression in Nieren- und Harnblasenkarzinom-Zellinien.

Zellinien	1227	1519	1892	2000	1765	1370	647v	J82	SW1710	VMCub1	HT1376	5637	RT4	T24	BFTC905	253J
LINE1-Hypomethylierung [%]	23	35	33	4	55	49	20	53	33	22	49	11	37	23	25	3
MTAP RT-PCR	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–

4.5 Methylierungsanalyse in Nierenkarzinom-Zellinien

Genomweite Hypomethylierung ist eine der konsistentesten Veränderungen im Harnblasenkarzinom. Sie tritt im Prostatakarzinom hingegen nur mäßig häufig auf und ist im Nierenzellkarzinom sogar allem Anschein nach ohne jegliche Bedeutung [Florl, 1998]. In 34 untersuchten Nierenkarzinom-Gewebeproben unterschiedlicher Stadien und Malignitätsgrade konnte keine Hypomethylierung von LINE1-Sequenzen nachgewiesen werden. Umso erstaunlicher ist es, daß Hypomethylierung in Nierenkarzinom-Zellinien recht häufig detektiert wurden [Florl *et al.*, 1999]. Es ist zu vermuten, daß entweder während der Kultivierung auf die wenigen Zellen mit Hypomethylierung selektioniert wird oder daß bei der Adaptation von Nierenkarzinomzellen an die Kultur Veränderungen auftreten, die sich auf die DNA-Methylierung auswirken.

Das konträre Methylierungsmuster von Primärtumoren im Vergleich zur Zellinie prädestiniert das Nierenkarzinom als Modell zur Untersuchung der Mechanismen, welche zur Verringerung der DNA-Methylierung in Tumoren führen.

Ein erstes Experiment in dieser Hinsicht wurde mit fünf Nierenkarzinom-Zellinien durchgeführt, von denen sehr frühe sowie spätere Passagen für einen Vergleich zur Verfügung standen. Im Rahmen der Genauigkeit der gut etablierten Southern-Blot-Hybridisierung ergaben sich keine signifikanten Differenzen in der DNA-Methylierung zwischen

unterschiedlichen Passagen der gleichen Zellinie (vgl. Abbildung 3-32). Dieses unerwartete Resultat läßt darauf schließen, daß das veränderte Methylierungsmuster während der ersten Passage in Kultur etabliert ist. Um diese Annahme zu stützen, wäre es erforderlich, den der Zellkultur zugrundeliegenden Primärtumor auf seinen Methylierungsgrad hin zu überprüfen. Auf diese Weise soll gänzlich ausgeschlossen werden, daß bereits der Tumor das für die entsprechende Zellinie ermittelte Maß an Hypomethylierung aufzeigte. Dieses konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit experimentell nicht bestätigt werden, da die DNA der zugehörigen Primärtumore nicht in ausreichender Qualität für diese Art der Untersuchung zur Verfügung stand. Um die recht unwahrscheinliche Annahme endgültig auszuschließen, müssten zukünftig Primärtumore und ihre zugehörigen Zellkulturen auf Hypomethylierung untersucht werden.

Nicht in gleichem Maße, aber dennoch auffällig, ist auch die Diskrepanz zwischen der berichteten Häufigkeit von homozygoten Deletionen des CDKN2-Locus in Nierenkarzinomgeweben und in den Nierenkarzinom-Zellinien [Cairns *et al*., 1995[B]; Grady *et al*., 2001]. In einer Arbeit [Kinoshita *et al*., 1995] wurden sowohl Nieren-Gewebe wie Zellinien untersucht und nur in einem von 55 Geweben, aber in neun von 10 Zellinien wurden homozygote Deletionen nachgewiesen. Für Harnblasenkarzinome ist sehr spezifisch gezeigt worden, daß die Etablierung immortaler Zellinien die Inaktivierung von RB1 oder CDKN2A voraussetzt [Yeager & Reddel, 1999], für viele andere Tumorarten wird dieses angenommen. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen es sehr wahrscheinlich, daß auch die Etablierung von Nierenkarzinom-Zellinien bevorzugt beim Fehlen von CDKN2A gelingt. Der Vergleich zwischen Primärtumoren und Zellinien könnte auch darüber Aufschluß geben, v.a. wenn auch die Tumoren mit untersucht werden, bei denen nur eine kurzzeitige Kultivierung gelingt.

Ähnlich wie es für Harnblasenkarzinome gezeigt werden konnte, scheint sich auch für Nierenkarzinom-Zellinien eine Korrelation zwischen dem Auftreten von LINE1-Hypomethylierung und von Deletionen des CDKN2A-Locus abzuzeichnen.

Im Gegensatz zur DNA-Hypomethylierung wurde eine Promotor-Hypermethylierung als Inaktivierungsmechanismus von TS-Genen sowohl in Gewebe als auch in Zellkulturen von Nierenkarzinomen beschrieben. Für das CDKN2A Gen sowie für das VHL-Gen liegen diesbezüglich Untersuchungsergebnisse vor [Herman *et al.*, 1994].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Nierenkarzinom-Zellinien 1227 und 1519, welche keine Deletionen des CDKN2A Gens aufwiesen, mittels Restriktionsassays auf Hypermethylierung des Promotorbereiches des betrachteten Locus analysiert. Es ergab sich nur für die Linie 1519 ein positives Ergebnis.

Für das VHL Gen konnte in 32 untersuchten Nierenkarzinom-Zellinien keine Hypermethylierung der Promotorregion mittels MS-PCR nachgewiesen werden. Sie scheint als Inaktivierungsmechanismus des VHL Gens in Nierenkarzinom-Zellienien eine untergeordnete Rolle einzunehmen. In diesen Zellinien konnten vor allem Punktmutationen des Gens gezeigt werden, die damit von entscheidender Bedeutung sind [Meyer *et al.*, 2000]. Wie in dieser Publikation diskutiert, gibt es erhebliche Unterschiede in der berichteten Häufigkeit der VHL-Inaktivierung durch Promotor-Hypermethylierung. Dafür kommen die unter 4.1.3 für CDKN2A diskutierten Faktoren in Frage. Beim VHL-Gen kommt noch hinzu, daß – ähnlich wie beim RB1 Gen – Promotorhypermethylierung recht häufig in Tumoren bei hereditären Fällen, d.h. bei Von-Hippel-Lindau Patienten, gefunden wurde [Prowse *et al*., 1997].

4.6 Konsequenzen der Interaktion genetischer und epigenetischer Veränderungen in Karzinomen des Harntrakts

Im Hinblick auf die Interaktion von genetischen und epigenetischen Veränderungen bieten Harnblasenkarzinom- und Nierenzellkarzinomgewebe ein sehr unterschiedliches Bild. Im Harnblasenkarzinom ist offenbar schon in einem recht frühen Stadium die Regulation der DNA-Methylierung fundamental gestört. Fast alle Karzinome weisen DNA-Hypomethylierung auf [Florl *et al*., 1999]. Im Verlauf der Karzinogenese nimmt die Hypomethylierung an mehreren Genloci zu [Salem *et al*., 2000]. Allerdings hat nach den Erkenntnissen dieser Arbeit und neueren Publikationen die Hypermethylierung gerade bei der Inaktivierung des CDKN2A-Gens nur eine begrenzte Bedeutung. Eine genomweite Veränderung der DNA-Methylierungsmuster ist beim Nierenzellkarzinom im Gewebe nicht nachweisbar. Hypermethylierung einzelner Gene könnte in diesem Tumor relevant sein [Pfeifer *et al*., 2000, Herman *et al*., 1994], doch scheint dieser, zumindest bei dem für den klarzelligen Subtyp fundamentalen VHL-Gen, ein seltener Mechanismus der Inaktivierung zu sein. Um so erstaunlicher ist die häufige Veränderung des Gesamtniveaus der DNA-Methylierung bei der Etablierung von Nierenkarzinomzellinien. Hiermit stellt sich die Frage, was einer solchen Veränderung zu Grunde liegen könnte.

Eine Möglichkeit besteht darin, daß in Nierenkarzinom-Zellinien eine Beziehung zwischen Veränderungen in und um den CDKN2-Locus auf Chromosom 9 und genomweiter DNA-Hypomethylierung bestehen könnte, wie sie statistisch signifikant in Harnblasen-karzinomgeweben nachweisbar ist (vgl. Abbildung 3-14). Auch in fast allen Zellinien aus diesem Tumortyp mit Verlust der CDKN2A-Funktion ist die DNA-Methylierung insgesamt

vermindert. Selbstverständlich können die Ursachen der in dieser Arbeit gefundenen Assoziationen nur durch zukünftige funktionelle mechanistische Experimente aufgeklärt werden.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die Assoziation zwischen Veränderungen von CDKN2A und DNA-Hypomethylierung beruht auf dem recht gut belegten Zusammenhang zwischen chromosomaler Instabilität und DNA-Hypomethylierung, wie er beispielsweise im ICF-Syndrom offenbar wird [Ehrlich, 2000]. Hypomethylierung repetitiver Sequenzen, beim ICF-Syndrom juxtacentromerischer Satellitensequenzen, führt zu illegitimen mitotischen Rekombinationen und Rearrangements spezifischer Chromosomen [Tuck-Muller *et al*., 2000]. Dieser Mechanismus könnte auch für den häufigen Verlust eines oder beider Arme von Chromosom 9 im Harnblasenkarzinom verantwortlich sein und damit die Ursache des beobachteten LOHs darstellen. Dafür spricht, daß LOH von Chromosom 9 häufig über ganze Chromosomenarme hinweg beobachtet wird [Keen & Knowles, 1994; Kimura *et al*., 2001]. Ein weiterer vorstellbarer Mechanismus wäre eine erhöhte Häufigkeit von illegitimen Rekombinationen zwischen den im Genom verteilten repetitiven Sequenzen, wofür wegen ihrer Häufigkeit und Größe v.a. LINE1 Sequenzen in Frage kommen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint dieser Mechanismus zumindest an der Entstehung der interstitiellen Deletionen, die zur Inaktivierung eines Allels des CDKN2A Gens führen, nicht beteiligt zu sein (vgl. Kapitel 4.3). Gefunden wurden vielmehr Hinweise darauf, daß diese durch Doppelstrangbrüche zustande kommen, die entweder bevorzugt in LINE1 Sequenzen entstehen oder bei der Reparatur durch NHEJ mit diesen rekombinieren. Möglich bleibt, daß DNA-Hypomethylierung die Entstehung solcher Doppelstrangbrüche fördert.

Selbstverständlich besteht die Möglichkeit, daß die Beziehung zwischen dem Verlust der Funktion von CDKN2A und der DNA-Hypomethylierung reziprok ist, d.h. der Verlust der Funktion von $p16^{INK4a}$ oder $p14^{ARF}$ zur Veränderung der DNA-Methylierung führt. Dafür spräche u.a. auch, daß Zellinien mit Verlust der Funktion des RB-Proteins durch Veränderungen im RB1 Gen oftmals sehr ausgeprägte DNA-Hypomethylierung aufweisen. Zwischen dem RB-Protein und der DNA-Methyltransferase 1 wurde eine unmittelbare Interaktion auf der Proteinebene gezeigt [Robertson *et al*., 2000], auch der Promotor des DNMT1 Gens wird von Rb beeinflußt [Bigey *et al*., 2000; Slak *et al*., 2001]. Wahrscheinlich trägt diese Interaktion dazu bei, im Verlauf des Zellzykluses DNA-Methylierung mit der DNA-Replikation zu koordinieren. Es wäre daher zu untersuchen, wie sich ein Verlust des CDKN2A Gens auf diese Koordination auswirkt und ob durch Inaktivierung dieses $p16^{INK4a}$ Proteins womöglich Veränderungen der DNA-Methylierung ausgelöst werden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Harnblasenkarzinom ist die Inaktivierung des CDKN2A-Gens auf Chromosom 9p21 eine der häufigsten Veränderungen. An ihr sind genetische Veränderungen in Form von Genverlusten und Punktmutationen sowie epigenetischen Veränderungen in Form von Promotor-Hypermethylierung in unterschiedlichem Maße beteiligt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden 86 Gewebeproben von Harnblasenkarzinomen auf Veränderungen im CDKN2-Locus hin untersucht. 40% der Karzinome zeigten einen Verlust der Heterozygotie einer oder mehrer Mikrosatellitenmarker in der Umgebung des CDKN2-Locus. Von diesen Proben wiesen 56% eine homozygote Deletion des CDKN2A-Gens auf. Eine Promotor-Hypermethylierung (10%) erwies sich in dieser Untersuchung ebenso wie Punktmutationen (0%) als seltener Mechanismus der Inaktivierung. Ein Vergleich verschiedener Methoden zur Untersuchung der Promotor-Hypermethylierung ergab Hinweise auf mögliche methodische Artefakte, welche zur Überschätzung des Beitrags dieser Veränderung in anderen Berichten geführt haben könnten.

Homozygote Deletionen des CDKN2-Locus werden im Harnblasenkarzinom offensichtlich gegenüber anderen Inaktivierungsmechanismen bevorzugt. Die Ursachen dafür sind nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung ergab sich aus einem anderen Befund der Arbeit: Genverluste im CDKN2-Locus korrelieren statistisch signifikant mit dem Grad der DNA-Hypomethylierung von LINE1-Elementen in den untersuchten Tumoren. Daraus ergab sich die Hypothese, daß bei der Entstehung von Deletionen homologe Rekombinationsprozesse oder Retrotranspositionen, hervorgerufen durch genomweite DNA-Hypomethylierung und der damit verbundenen Aktivierung von transponierbaren Elementen, eine Rolle spielen könnten.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Enden von Deletionen um den CDKN2-Locus in Harnblasen- und Nierenkarzinom-Zellinien untersucht. Unter 17 Harnblasen- und sieben Nierenkarzinom-Zellinien besaßen 14 Zellinien Deletionen, welche einen Umfang von 95 kb bis 5 Mbp aufwiesen und teilweise beträchtlich über den CDKN2-Locus hinaus reichten. In vier Zellinien gelang die exakte Charakterisierung sowohl ihrer centromerischen, als auch ihrer telomerischen Deletionsenden. In keiner dieser Zellinien konnte eine Rekombination zwischen homologen Sequenzen an ihren Deletionsenden nachgewiesen werden, vielmehr zeigten sich jeweils Überlappungen von zwei Nukleotiden, wie sie bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch nichthomologe Rekombination auftreten können. Die telomerischen Endpunkte von insgesamt sechs der 14 Zellinien waren in einer Region auf dem BAC RP11-70L8 lokalisiert, welche eine dichte Aufeinanderfolge von repetitiven Sequenzen enthält, vornehmlich LINE1-Elemente. Solche Bereiche des Genoms

könnten in Tumorzellen bevorzugte Bruchpunkte darstellen. Der beobachtete Zusammenhang zwischen Hypomethylierung von DNA und erhöhter Häufigkeit von Genverlusten könnte demnach durch eine Destabilisierung solcher Sequenzen zustande kommen. Eine erhöhte Häufigkeit von illegitimen Rekombinationen zwischen LINE1-Elementen oder von Retrotranspositionen erscheint jedoch unwahrscheinlich.

Ergänzend wurden weitere Untersuchungen an Nierenkarzinom-Zellinien vorgenommen. In allen untersuchten Zellinien war die Expression des CDKN2-Locus verlorengegangen, in vier Fällen wurde eine homozygote Deletion, in einem Fall Promotor-Hypermethylierung detektiert. Eine Hypermethylierung des VHL-Tumorsuppressorgens wurde nur in einer Zellinie beobachtet. Im Gegensatz zu Nierenkarzinomgeweben fand sich eine genomweite Verminderung der DNA-Methylierung in den Tumorzellinien. Sie entsteht offenbar sehr früh während der Kultivierung, da sie bereits in den ersten verfügbaren Passagen im selben Ausmaße nachweisbar war wie in späteren. Damit wurde ein Zellkultursystem identifiziert, in dem die Mechanismen der Entstehung von DNA-Hypomethylierung analysiert werden können.

6 LITERATUR

- Adams RLP und Burdon RH (1985)
  Molecular Biology of DNA Methylation.
  Springer Verlag, New York.
- Akao T, Kakehi Y, Itoh N, Özdemir E, Shimizu T, Tachibana A, Sasaki MS, Yoshida O (1997)
  A high prevalence of functional inactivation by methylation modification of $p16^{INK4A}$/CDKN2/MTS1 gene in primary urothelial cancers.
  Jpn J Cancer Res **88**: 1078-1086
- Altwein JE und Rübben H (1991)
  Urologie.
  Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- An H-X, Niederacher D, Picard F, van Roeyen C, Bender HG Beckmann MW (1996)
  Frequent allele loss on 9p21-22 defines a smallest common region in the vicinity of the CDKN2 gene in sporadic breast cancer.
  Genes, Chromosomes Cancer **17**: 14-20
- Antequera F, Bird A (1993)
  CpG islands.
  In: *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. **64**:169-185
  Birkhäuser Verlag, Basel
- Avner P und Herad E (2001)
  X-chromosom inactivation: counting, choice and initiation.
  Nat Rev Genet **2**: 59-67
- Balazs M, Carroll P, Kerschmann R, Sauter G, Waldman FM (1997)
  Frequent homozygous deletion of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization.
  Genes Chromosomes Cancer **19**: 84-89
- Ballestar E, Yusufzai TM, Wolffe AP (2000)
  Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA.
  Biochemistry **39**(24):7100-6
- Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J (2000)
  Lack of p19INK4d in human testicular germ-cell tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis.
  Oncogene **19**(36): 4146-50
- Batova A, Diccianni MB, Yu JC, Nobori T, Link MP, Pullen J, Yu AL (1997)
  Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia.
  Cancer Res **57**(5): 832-6
- Baud E, Catilinia P, Bignon YJ (1999)
  p16 involvement in primary bladder tumors: analysis of deletions and mutations.
  Int J Oncol **14**: 441-445
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998)
  Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.
  Adv Cancer Res **72**: 141-96
- Baylin SB, Herman JG (2000)
  DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.
  Trends Genet **16**(4): 168-74

- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001)
  Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.
  Hum Mol Genet **10**(7): 687-92
- Beard C, Li E, Jaenisch R (1995)
  Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells.
  Genes Dev **9**(19): 2325-34
- Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP (1996)
  Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer.
  Proc Natl Acad Sci USA **93**(9): 4045-50
- Bellacosa A (2001)
  Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer.
  J Cell Physiol **187**(2): 137-44
- Bender CM, Pao MM, Jones PA (1998)
  Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines.
  Cancer Res **58**: 95-101
- Bergman Y und Mostoslavsky R (1998)
  DNA demethylation: turning genes on.
  Biol Chem **379**(4-5): 401-7
- Bestor TH (2000)
  The DNA methyltransferases of mammals.
  Hum Mol Genet **9**: 2395-2402
- Bigey P, Ramchandani S, Theberge J, Araujo FD, Szyf M (2000)
  Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene.
  Gene **242**(1-2):407-18
- Bird AP (1986)
  CpG-rich islands and the function of DNA methylation.
  Nature **321**: 209-231
- Bishop AJ, Schiestl RH (2000)
  Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects.
  Hum Mol Genet **9**(16): 2427-334
- Boeckmann W und Jakse G (2001)
  Uroonkologie 3. Aufl. Rübben H (Hrsg.)
  Springer Verlag, Berlin 23-29
- Bookstein R, Shew JY, Chen PL, Scully P, Lee WH (1990)
  Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene.
  Science **247**(4943): 712-5
- Bronstein I, Edwards B, Voyta JC (1991)
  Novel chemiluminescent adamantyl 1,2-dioxetane enzyme substrates.
  In : Stanley P. and Kricka L.J. (eds.), Bioluminescence and Chemiluminescence.
  Current Status: 73-82, John Wiley, Chichester, England.
- Bruch J, Schulz WA, Haussler J, Melzner I, Bruderlein S, Moller P, Kemmerling R, Vogel W, Hameister H (2000)
  Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines.
  Cancer Res **60**(16): 4526-30

- Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991)
  Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma.
  Oncogene **6**(12): 2305-9
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, et al. (1995)[A]
  Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours.
  Nat Genet **11**(2): 210-2
- Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D (1995)[B]
  Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas.
  Cancer Res **55**(2): 224-7
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994)
  Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma.
  Nat Genet **8**(1): 27-32
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983)
  Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma.
  Nature **305**(5937):779-84
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998)
  DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates.
  Nature **395**(6697): 89-93
- Church GM und Gilbert W (1984)
  Genomic sequencing.
  Proc Natl Acad Sci USA **81**: 1991-95
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994)
  High sensitivity mapping of methylated cytosines.
  Nucleic Acids Res **22** (15):2990-2997
- Clasen S, Schulz WA, Gerharz CD, Grimm MO (1998)
  Frequent and heterogeneous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma.
  Br J Cancer **77**(4): 515-21
- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE (1992)
  Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer.
  J Natl Cancer Inst **84**(16): 1251-6
- Cordon-Cardo C (1998)
  Molecular alterations in bladder cancer.
  Cancer Surv **32**: 115-31
- Critchlow SE, Jackson SP (1998)
  DNA end-joining: from yeast to man.
  Trends Biochem Sci **23**(10): 394-8
- Doerfler W (1983)
  DNA methylation and gene activity.
  Annu Rev Biochem **52**: 93-124

- Doerfler W (1991)
  Patterns of DNA methylation--evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal.
  Biol Chem Hoppe Seyler **372**(8): 557-64
- Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K (2000)
  NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences.
  Hum Mol Genet **9**(1): 35-46
- Ehrlich M (2000)
  DNA hypomethylation and cancer.
  Ehrlich M (ed.) DNA alterations in cancer, Natick: Eaton Publishing: 273-291.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001)
  A gene hypermethylation profile of human cancer.
  Cancer Res **61**(8): 3225-9
- Fanning TG, Singer MF (1987)
  LINE-1: a mammalian transposable element.
  Biochim Biophys Acta **910**(3): 203-12
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983)[A]
  Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.
  Nature **301**: 89
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983)[B]
  A technique for radiolabeling DNA restrictionendonuclease fragments to high specific activity.
  Anal Biochem **132**: 6-13
- Florl, AR (1998)
  Methylierung von repetitiven DNA-Sequenzen in urologischen Tumoren.
  Diplomarbeit, Biologie, HHU Düsseldorf
- Florl AR, Loewer R, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA (1999)
  DNA methylation and expression of L1 LINE and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinoma.
  Br. J. Cancer **80**: 1312-1321
- Florl AR, Franke KH, Niederacher D, Gerharz CD, Seifert HH, Schulz WA. (2000)
  DNA methylation and the mechanisms of CDKN2A inactivation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
  Lab Invest **80**(10): 1513-1522
- Franceschini P, Martino S, Ciocchini M, Ciuti E, Vardeu MP, Guala A, Signorile F, Camerano P, Franceschini D, Tovo PA (1995)
  Variability of clinical and immunological phenotype in immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome.
  Eur J Pediatr **154**(10): 840-6
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986)
  A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma.
  Nature **323**(6089): 643-6
- Frostesjo L, Holm I, Grahn B, Page AW, Bestor TH, Heby O (1997)
  Interference with DNA methyltransferase activity and genome methylation during F9 teratocarcinoma stem cell differentiation induced by polyamine depletion.
  J Biol Chem **272**(7): 4359-66

- Gerharz CD, Moll R, Storkel S, Ramp U, Thoenes W, Gabbert HE (1993)
  Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic, and chromophobe types of human renal cell carcinoma in vitro.
  Am J Pathol **142**(3): 851-9
- Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, van Turnout JM, Jones PA (1995)
  Methylation of the 5'CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing.
  Cancer Res **55**: 4531-4535
- Gonzalgo ML, Bender CM, You EH, Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Hayward NK, Jones PA, Fountain JW (1997)
  Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors.
  Cancer Res **57**(23): 5336-47
- Goodrich DW, Chen Y, Scully P, Lee W-H (1992)
  Expression of the Retinoblastoma Gene Product in Bladder Carcinoma Cells Associates with a Low Frequency of Tumor Formation.
  Cancer Res **52**: 1968-1973
- Grady B, Goharderakhshan R, Chang J, Ribeiro-Filho LA, Perinchery G, Franks J, Presti J, Carroll P, Dahiya R (2001)
  Frequently deleted loci on chromosome 9 may harbor several tumor suppressor genes in human renal cell carcinoma.
  J Urol **166**(3): 1088-92
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB (1995)
  E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas.
  Cancer Res **55**(22): 5195-9
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B (1989)
  Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma.
  Hum Genet Sep **83**(2): 155-8
- Grimm MO, Jurgens B, Schulz WA, Decken K, Makri D, Schmitz-Drager BJ (1995)
  Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines.
  Urol Res **23**: 293-300
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A (1981)
  Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA.
  FEBS Lett **124**: 67-71
- Hall M, Peters G (1996)
  Genetic alteration of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer.
  Adv Cancer Res **68**: 67
- Hanada M, Delia D Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC (1993)
  bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
  Blood **82**: 1820
- Hannon GJ, Beach D (1994)
  p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.
  Nature **371**(6494): 257-61

- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM (1999)
  The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome.
  Proc Natl Acad Sci USA **96**(25): 14412-7
- Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ (1988)
  Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC.
  Science **241**(4863): 353-7
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993)
  The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.
  Cell **75**(4): 805-16
- Hautmann RE und Huland H (2001)
  Urologie 2. Aufl
  Springer Verlag, Berlin.
- Heard E, Clerc P, Avner P (1997)
  X-chromosom inactivation in mammals.
  Annu Rev Genet **31**: 571-610
- Herman JG, Latif F, Wenig Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DSR, Gnarra JR, Linehan WM, Baylin SB (1994)
  Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma.
  Proc Natl Acad Sci USA **91**: 9700-9704
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB (1995)
  Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers.
  Cancer Res **55**: 4525-4530
- Herman JG, Graff JR, Myohänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996)
  Methylation-specific PCR: a novel assay for methylation status of CpG islands.
  Proc Natl Acad Sci USA **93**: 9821-9826
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB (1998)
  Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma.
  Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6870-5
- Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myohanen S, Paakkonen M, Marin S, Kosma VM, Janne J (1997)
  Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma.
  Int J Cancer **70**(6): 644-648
- Hollstein M, Moeckel G, Hergenhahn M, Spiegelhalder B, Keil M, Werle-Schneider G, Bartsch H, Brickmann J (1998)
  On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene.
  Mutat Res **20**, 405(2):145-154
- Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH Jr (1994)
  A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion.
  Nat Genet **7**(2): 143-148

- Horowitz JM, Yandell DW, Park SH, Canning S, Whyte P, Buchkovich K, Harlow E, Weinberg RA, Dryja TP (1989)
  Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene.
  Science **243**(4893): 937-40
- Hosoe S, Brauch H, Latif F, Glenn G, Daniel L, Bale S, Choyke P, Gorin M, Oldfield E, Berman A, et al. (1990)
  Localization of the von Hippel-Lindau disease gene to a small region of chromosome 3.
  Genomics **8**(4): 634-40
- Hovey RM, Chu L, Balazs M, deVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM (1998)
  Genetic Alterations in Primary Bladder Cancers and Their Metastases.
  Cancer Res **58**: 3555-3560
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR (2001)
  Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene.
  Cell **104**(6): 829-38
- Hung M-S, Karthikeyan N, Huang B, Koo H-C, Kiger J, Shen C-KJ (1999)
  Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosin) methyltransferases.
  Proc Natl Acad Sci USA **96**: 11940-11945
- Jaenisch R (1997)
  DNA methylation and imprinting: why bother?
  Trends Genet **13**(8): 323-329
- Jost JP und Jost YC (1995)
  Mechanism of active DNA demethylation during embryonic development and cellular differentiation in vertebrates.
  Gene **157 (**1-2): 265-6
- Jost JP und Bruhat A (1997)
  The formation of DNA methylation patterns and the silencing of genes.
  Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **57**: 217-48
- Jürgens B, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA (1996)
  Hypomethylation of L1 LINE Sequences Prevailing in Human Urothelial Carcinoma.
  Cancer Res **56**: 5698-703
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al (1994)[A]
  Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus
  Nat Genet **8**(1): 23-6
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994)[B]
  A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.
  Science **264**(5157): 436-40
- Kazazian HH Jr (1998)
  Mobile elements and disease.
  Curr Opin Genet Dev **8**(3): 343-50
- Kazazian HH Jr und Moran JV (1998)
  The impact of L1 retrotransposons on the human genome.
  Nat Genet **19**(1): 19-24
- Keen AJ, Knowles MA. (1994)
  Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder.
  Oncogene **9**(7): 2083-8

- Kimura F, Florl AR, Seifert H-H, Maas S, Knowles MA, Schulz WA (2001)
  Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
  Im Druck
- Kinoshita H, Yamada H, Ogawa O, Kakehi Y, Osaka M, Nakamura E, Mishina M, Habuchi T, Takahashi R, Sugiyama T, et al. (1995)
  Contribution of chromosome 9p21-22 deletion to the progression of human renal cell carcinoma.
  Jpn J Cancer Res **86**(9): 795-9
- Knowles MA (1999)[A]
  The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application
  BJU Int **84**(4): 412-27
- Knowles MA (1999)[B]
  Identification of novel bladder tumour suppressor genes.
  Electrophoresis **20**: 269-279
- Knowels MA (2001)
  What we could do now: molecular pathology of bladder cancer.
  J Clin Pathol: Mol Pathol **54**: 215-221
- Knudson AG Jr (1971)
  Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.
  Proc Natl Acad Sci USA **68**(4): 820-823
- Kovacs G (1994)
  The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours.
  World J Urol **12**(2): 64-68
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991)
  Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n.
  Science **252**(5013): 1711-4
- Laemmli UK (1970)
  Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
  Nature **227**(259): 680-5
- Laird PW und Jaenisch R (1994)
  DNA methylation and cancer.
  Hum Mol Genet **3**: 1487-95
- Lane DP (1992)
  p53, guardian of the genome.
  Nature **358**(6381):15-6
- Lasko D, Cavenee W, Nordenskjold M (1991)
  Loss of constitutional heterozygosity in human cancer
  Annu Rev Genet **25**: 281-314
- Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG (1994)
  Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis.
  Proc Natl Acad Sci USA **91**(24): 11733-7
- Leonhardt H und Bestir TH (1993)
  Structure, function and regulation of mamalian DNA methyltransferase.
  In: Jost PJ, Saluz HP, DNA methylasion: molecular biology and biological significance.
  Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz

- Li E, Bestor TH und Jaenisch R (1992)
  Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.
  Cell **69**: 915-926
- Li E, Beard C und Jaenisch R (1993)
  Role for DNA methylation in genomic imprinting.
  Nature **366**: 362-365
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997)
  PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.
  Science **275**(5308): 1943-7
- Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A (2001)
  Evolutionary analyses of the human genome.
  Nature **409**(6822): 847-9
- Liu J, Nau MM, Zucman-Rossi J, Powell JI, Allegra CJ, Wright JJ (1997)
  LINE-I element insertion at the t(11;22) translocation breakpoint of a desmoplastic small round cell tumor.
  Genes Chromosomes Cancer **18**(3): 232-9
- Liu Q, Neuhausen S, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Eddington K, Allalunis-Turner MJ, Skolnick MH, Fujimura FK, et al. (1995)
  CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines.
  Oncogene **11**(11): 2455
- Lyko F, Ramsahoye, BH, Jaenisch R (2000)
  DNA methylation in Drosophila melanogaster.
  Nature **408**: 538-540
- Magewu AN und Jones PA (1994)
  Ubiquitous and tenacious methylation of CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain ist frequent appearence as a mutational hot spot in human cancer.
  Mol Cell Biol **14**: 4225
- Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Ghella A, Merlo G, Angeletti CA, Palma PD, Bevilacqua G (1995)
  P21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: Evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation.
  Oncogene 12: 1319-1324
- Markl ID, Jones PA (1998)
  Presence and location of TP53 mutation determines pattern of CDKN2A/ARF pathway inactivation in bladder cancer.
  Cancer Res **58**(23): 5348-53
- Mass MJ und Wang L (1997)
  Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis.
  Mutat Res **386**(3): 263-77
- Merkle W (1997)
  Urologie.
  Hippokrates Verlag, Stuttgart

- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995)
  5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers.
  Nat Med **1**: 686-692
- Meyer AJ, Hernandez A, Florl AR, Enczmann J, Gerharz CD, Schulz WA, Wernet P, Ackermann R (2000)
  Novel mutations of the von hippel-lindau tumor-suppressor gene and rare DNA hypermethylation in renal-cell carcinoma cell lines of the clear-cell type.
  Int J Cancer **87**(5): 650-653
- Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y (1992)
  Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer.
  Cancer Res **52**(3): 643-645
- Moran JV (1999)
  Human L1 retrotransposition: insights and peculiarities learned from a cultured cell retrotransposition assay.
  Genetica **107**(1-3): 39-51
- Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y (1994)
  Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma.
  Cancer Res **54**(13): 3396-7
- Morse B, Rotherg PG, South VJ, Spandorfer JM (1988)
  Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma.
  Nature **333**(6168): 87-90
- Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE (1997)
  p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma.
  Cancer Res **57**(11): 2140-3
- Mostoslavsky R, Bergman Y (1997)
  DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system.
  Biochim Biophys Acta **1333**(1): 29-50
- Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG (1998)
  Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia.
  Cancer Res **58**(4): 591-593
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997)
  MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin.
  Cell **88**(4): 471-81
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL (1991)
  Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome.
  Science **252**(5010): 1097-102

- Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K, Sakai T (1997)
  Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma.
  Cancer Genet Cytogenet **98**(1): 43-9
- Okano M, Xie S, Li E (1998)
  Cloning and characterisation of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.
  Nat Genet **19**: 219-220
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li W (1999)
  DNA methyltransferases Dnmt3a und Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development.
  Cell **99**: 247-257
- Orlow I, LaRue H, Osman I, Lacombe L, Moore L, Rabbani F, Meyer F, Fradet Y, Cordon-Cardo C (1999)
  Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumors.
  Am J Pathol **155**: 105-113
- Orntoft TF und Wolf H (1998)
  Molecular alterations in bladder cancer.
  Urol Res **26**: 223-233
- Packenham JP, Taylor JA, Anna CH, White CM, Devereux TR (1995)
  Homozygous deletions but no sequence mutations in coding regions of p15 or p16 in human primary bladder tumors.
  Mol Carcinog **14**: 147-151
- Pardee AB (1989)
  G1 events and regulatiuon of cell proliferation.
  Science **246**: 603
- Pfeifer GP, Tang M, Denissenko MF (2000)
  Mutation hotspots and DNA methylation.
  Curr Top Microbiol Immunol **249**:1-19
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999)
  Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.
  J Biol Chem **274**(46): 33002-10
- Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, Resche F, Affara NA, Maher ER (1997)
  Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors.
  Am J Hum Genet **60**(4): 765-71
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995)
  Alternative Reading Frames of the INK4a Tumor Suppressor Gene Encode Two Unrelated Proteins Capable of Inducing Cell Cycle Arrest.
  Cell **83**: 993-1000
- Rabbani F, Cordon-Cardo C (2000)
  Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer.
  Urol Clin North Am **27**(1): 83-102

- Razin A, Webb C, Szyf M *et al*. (1984)
  Variations in DNA methylation patterns; formation and nucleosome locking model for their function.
  Prog Clinic Biol Res **198**: 239-253
- Razin A, Szyf M, Kafri T, Roll M, Giloh H, Scarpa S, Carotti D, Cantoni GL (1986)
  Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA demethylation during differentiation.
  Proc Natl Acad Sci **83**(9): 2827-31
- Reed KC und Mann DA (1985)
  Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes.
  Nucl Acids Res **13**: 7207-21
- Rehn L (1895)
  Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern.
  Arch Klin Chir **50**: 588-600
- Reik W, Walter J (2001)
  Genomic imprinting: parental influence on the genome.
  Nat Rev Genet **2**(1):21-32.
- Renckens S, De Greve H, Van Montagu M, Hernalsteens JP (1992)
  Petunia plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation.
  Mol Gen Genet **233**(1-2): 53-64
- Rennie PS, Nelson CC (1998)
  Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer.
  Cancer Metastasis Rev **17**(4):401-409
- Richter J, Jiang F, Görög J-P, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G (1997)
  Marked Genetic Differences between Stage pTa and Stage pT1 Papillary Bladder Cancer Detected by Comparative Genomic Hybridization.
  Cancer Res **57**: 2860-2864
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000)
  DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters
  Nat Genet **25**(3): 338-42
- Robertson KD, Jones PA (2000)
  DNA methylation: past, present and future directions.
  Carcinogenesis **21**(3): 461-7
- Roussel MF (1999)
  The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer.
  Oncogene **18**(38): 5311-7
- Ruas M und Peters G (1998)
  The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives.
  Biochim Biophys Acta **1378**(2): 115-77
- Rübben H
  Uroonkologie.
  Springer Verlag, Berlin, 3. Aufl: 818-822
- Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA (2000)
  Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer.
  Cancer Res **60**(9): 2473-6

- Santarius T, Kirsch M, Nikas DC, Imitola J, Black PM (2000)
  Molecular analysis of alterations of the p18INK4c gene in human meningiomas.
  Neuropathol Appl Neurobiol **26**(1): 67-75
- Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV, Kimberland ML, Naas TP, DeBerardinis RJ, Gabriel A, Swergold GD, Kazazian HH Jr (1997)
  Many human L1 elements are capable of retrotransposition.
  Nat Genet **16**(1): 37-43
- Schulz WA (1998)
  DNA methylation in urological malignancies.
  Int J Oncol **13**(1): 151-167
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993)
  A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.
  Nature **366**(6456): 704-7
- Shapiro GI, Rollins BJ (1996)
  p16INK4A as a human tumor suppressor.
  Biochim Biophys Acta **1242**(3): 165-9
- Singal R, Ginder GD (1999)
  DNA methylation.
  Blood **93**(12): 4059-70
- Slack A, Pinard M, Araujo FD, Szyf M (2001)
  A novel regulatory element in the dnmt1 gene that responds to co-activation by Rb and c-Jun.
  Gene **268**(1-2): 87-96
- Smith SS (1998)
  Stalling of DNA methyltransferase in chromosome stability and chromosome remodelling.
  Int J Mol Med **1**(1): 147-56
- Sökeland J (1987)
  Urologie.
  Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Southern EM (1975)
  Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
  J Mol Biol **98**: 503-507
- Spruck CH 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS, Cote R, et al. (1994)
  Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder.
  Cancer Res **54**(3): 784-8
- Stanbridge EJ (1990)
  Human tumor suppressor genes.
  Annu Rev Genet **24**: 615-57
- Steinhoff C (2001)
  Nutzung tumorspezifischer Veränderungen für die selektive Reexpression des Tumorsuppressorgens p53 in Harnblasenkarzinomen.
  Dissertation, Biologie, HHU Düsseldorf
- Stoger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H und Barlow DP (1993)
  Maternal-specific Methylation of the Imprinted Mouse Igf2r Locus Identifies the Expressed Locus As Carrying the Imprinting.
  Signal Cell **73**(1): 61-71

- Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A (1995)
  Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene.
  Oncogene **11**(5): 987-91
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G (1998)
  The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2.
  EMBO J **17**(17): 5001-14
- Szyf M (1996)
  The DNA Methylation Machinery as a Target for Anticancer Therapy.
  Pharmacol Ther **70**: 1-37
- T'Ang A, Varley JM, Chakraborty S, Murphree AL, Fung YK (1988)
  Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma.
  Science **242**(4876): 263-6
- Taylor EM und Lehmann AR (1998)
  Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms.
  Int J Radiat Biol **74**(3): 277-86
- Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001)
  Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers.
  Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2698-702
- Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ (1986)
  Histopathology and classification of renal cell tumors.
  Path Res Pract **181**: 125-143
- TNM Classification of Malignant Tumours (1997)
  UICC International Union Against Cancer
  Springer Verlag, New York
- Tory K, Brauch H, Linehan M, Barba D, Oldfield E, Filling-Katz M, Seizinger B, Nakamura Y, White R, Marshall FF, et al. (1989)
  Specific genetic change in tumors associated with von Hippel-Lindau disease.
  J Natl Cancer Inst **81**(14): 1097-101
- Tremblay KD, Saam JR, Ingram RS, Tilghman SM, Bartolomei MS (1995)
  A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene.
  Nat Genet **9**(4): 407-413
- Tsutsumi M, Tsai YC, Gonzalgo ML, Nichols PW, Jones PA (1998)
  Early acquisition of homozygous deletions of p16/p19 during squamous cell carcinogenesis and genetic mosaicism in bladder cancer.
  Oncogene **17**(23): 3021-7
- Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, Ehrlich M (2000)
  DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients.
  Cytogenet Cell Genet **89**(1-2): 121-8
- Vairapandi M, Duker NJ (1993)
  Enzymic removal of 5-methylcytosine from DNA by a human DNA-glycosylase.
  Nucleic Acids Res **21**(23): 5323-7

- van den Berg A und Buys CH (1997)
  Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development.
  Genes Chromosome Cancer **19:** 59-76
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD (1998)
  Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers.
  Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8698-702
- Williamson MP, Elder PA, Shaw ME, Devlin J, Knowles MA (1995)
  p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer.
  Hum Mol Genet **4**: 1569-1577
- Wolffe AP und Matzke MA (1999)
  Epigenetics: regulation through repression.
  Science **286**(5439): 481-6
- Xu GL, Bestor TH, Bourchis, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequinot E (1999)
  Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene.
  Nature **402**: 187-191
- Yeager TR, Reddel RR (1999)
  Constructing immortalized human cell lines.
  Curr Opin Biotechnol **10**(5): 465-9
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997)
  Cytosin methylation and the ecology of intragenomic parasites.
  Trends Genet **13**: 335-340
- Yoder JA und Bestor TH (1998)
  A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast.
  Hum Mol Genet **7**(2): 279-84
- Zahava S und Cedar H (1997)
  DNA methylation: A molecular lock.
  Current Biology **7**: 305-307

7 ANHANG

Tabelle 7-1. Übersicht über alle 86 untersuchten Harnblasentumore. Die Ergebnisse der LINE1-Hypomethylierung sind ebenso wie die Ergebnisse aus der LOH-Analyse für fünf Mikrosatellitenmarker und der HD-Analyse dargestellt.

Patienten #	m/w	Alter	T	N	M	G	Tumorhistologie	L1-Hypometh.[%]	D9S171	D9S942	D9S162	D9S157	D9S168	Homozygote Deletion p16 Exon 1:	Exon 2:
125	m	42	pTa	N0	M0	G1	Urothelcarcinom	2	0,89	0,84	0,90	0,99	0,98	0,87	0,80
122	m	71	pTa	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	8	0,23	0,83	0,08	0,07	0.07	0,13	0,12
141	m	72	pTa	Nx	Mx	G1	Urothelcarcinom	3	0,80	0,64	0,72	n.i.	0,75	0,94	0,73
31	w	45	pTa	Nx	Mx	G2	Urothelcarcinom	8	0,90	0,75	n.i.	n.i.	0,92	0,80	0,64
62	m	66	pTa	Nx	Mx	G2	Urothelcarcinom	0	n.i.	0,89	0,99	0,97	0.94	0,98	0,79
91	m	64	pT1	Nx	Mx	G2	Urothelcarcinom	35	0,19	n.i.	0,24	0,96	0.14	0,24	0,20
92	m	71	pT1	Nx	Mx	G2	Urothelcarcinom	26	0,56	0,86	0,49	0,45	0,38	0,44	0,52
79	m	52	pT1	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	7	0,86	0,97	1,00	0,39	n.i.	0,95	0,81
143	m	59	pT1	N0	M0	G2	NB Urothelcarcinom	34	n.i.	0,74	0,88	0,88	n.i.	0,99	0,61
139	w	65	pT1	N0	M0	G2-3	NB Urothelcarcinom	20	0,09	0,25	n.i.	n.i.	0,11	0,36	0,11
86	w	66	pT1	N0	M0	G2-3	Urothelcarcinom	15	0,18	0,70	0,19	0,20	0,15	0,21	0,14
2	m	67	pT1	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	2	0,92	0,91	0,99	0,86	0,97	0,96	0,58
170	w	61	pT1	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	3	0,99	1,00	0,90	0,74	0.94	0,43	0,67
57	m	70	pT1	Nx	Mx	G3	Urothelcarcinom	57	0,12	0,84	0,09	0,41	0.53	0,49	0,31
128	m	50	pT1	pN0	M0	G3	Urothelcarcinom	0	0,97	0,98	0,95	n.i.	0,88	0,75	0,73
108	m	46	pTis	%	%	%	Urothelcarcinom	36	0,69	0,89	0,66	0,67	n.i.	0,91	0,72
124	w	55	pT2	N0	M0	G2	NB Urothelcarcinom	14	0,49	0,87	0,16	0,52	0,10	0,24	0,05
93	m	56	pT2	N0	Mx	G2	Urothelcarcinom	4	0,65	0,97	0,68	0,57	0,66	0,64	0,62
69	m	61	pT2	Nx	Mx	G1	Urothelcarcinom	3	0,98	0,98	0,96	0,83	0.91	0,98	0,86
74	m	83	>pT2	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	11	0,79	0,79	1,00	0,95	0.98	0,50	0,83
195	m	60	pT2a	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	54	0,26	0,81	0,16	0,10	0,11	0,17	0,29
27	m	70	pT2a	N0	Mx	G2	Urothelcarcinom	2	0,34	0,48	0,32	0,32	n.i.	0,94	0,70
3	m	66	pT2a	N0	Mx	G2	Urothelcarcinom	2	n.i.	0,93	0,96	0,99	0.99	0,86	0,81
140	m	74	pT2a	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	0	n.i.	0,66	n.i.	0,94	0,92	0,87	0,86
189	m	62	pT2a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	8	n.i.	0,87	0,83	0,93	0,94	0,91	0,73
113	m	70	pT2a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	10	0,95	0,89	0,99	0,96	n.i.	0,99	0,87
120	m	75	pT2a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	10	0,95	0,94	0,98	0,99	0,99	0,69	0,78
45	m	64	pT2a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	8	0,99	0,87	0,96	0,75	0.86	0,79	0,70
182	w	63	pT2a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	17	n.i.	0,38	0,52	0,70	0,45	1,00	0,85
163	m	67	pT2a	N1	M0	G2	Urothelcarcinom	3	0,85	0,90	0,85	n.i.	0,92	0,68	0,74
191	m	73	pT2a	Nx	Mx	G2	Urothelcarcinom	32	n.i.	0,73	0,99	1,00	0,97	0,75	0,96
159	m	76	pT2b	cN3	M1	G3	NB Urothelcarcinom	18	0,46	0,59	0,39	0,42	0,25	0,84	0,77
63	w	72	pT2b	N0	M0	G2-3	NB Urothelcarcinom	2	0,85	0,64	0,79	0,62	n.i.	0,99	0,55
138	m	53	pT2b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	31	0,24	0,84	0,29	0,27	0,30	0,53	0,52
172	m	58	pT2b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	17	0,93	0,74	0,94	0,88	0.91	0,74	0,79
152	m	59	pT2b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	2	0,95	0,92	0,90	0,98	n.i.	0,86	0,63
99	w	81	pT2b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	5	0,97	0,95	n.i.	0,78	1,00	0,94	0,82
96	w	64	pT2b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	23	0,97	0,95	0,99	n.i.	n.i.	0,93	0,65
4	m	52	pT2b	pN0	M0	G3	Urothelcarcinom	22	0,78	0,86	n.i.	0,77	0.80	0,78	0,79
176	m	65	pT3	N0	M0	G4	Urothelcarcinom	60	0,08	0,98	0,08	0,18	0,08	0,15	0,13
136	m	68	pT3	N2	M0	G2	NB Urothelcarcinom	13	0,93	0,82	0,88	0,82	n.i.	0,81	0,67
15	m	77	pT3	Nx	Mx	G3	Urothelcarcinom	18	0,42	0,96	0,44	0,36	n.i.	0,48	0,42
169	m	71	pT3a	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	19	0,54	0,46	0,54	0,70	0,41	0,97	0,59
104	m	70	pT3a	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	5	0,87	0,97	0,91	0,87	0,84	0,98	0,91
13	m	60	pT3a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	21	0,59	n.i.	0.43	n.i.	0.56	0,96	0,96
78	m	64	pT3a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	8	0,97	n.i.	0,95	0,85	0.90	0,58	0,98
161	m	46	pT3a	N1	M0	G3	Urothelcarcinom	11	0,98	0,95	0,92	n.i.	0,84	0,81	0,84
119	m	57	pT3a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	5	0,87	0,90	1,00	n.i.	0,94	0,94	0,96
37	m	65	pT3a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	7	0,91	0,95	n.i.	0,70	0,94	0,78	0,78
132	w	72	pT3a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	12	0,98	0,87	0,92	0,94	0,91	0,76	0,70
30	w	60	pT3a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	25	1,00	0,99	n.i.	0,93	n.i.	0,79	0,70
193	m	52	pT3a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	69	n.i.	0,56	n.i.	0,37	n.i.	0,87	0,85
199	w	79	pT3aii	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	17	0,82	0,86	0,82	0,78	0,93	0,87	0,60
50	w	69	pT3b	N0	M0	G2	NB Urothelcarcinom	30	0,11	0,61	0,83	n.i.	n.i.	0,11	0,02
25	m	61	pT3b	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	0	0,83	0,68	0,96	1,00	1.00	0,71	0,93
184	m	87	pT3b	N0	M0	G2	Urothelcarcinom	15	n.i.	0,89	0,97	0,90	0,88	0,91	1,00
10	m	65	pT3b	N0	Mx	G2	Urothelcarcinom	4	0,88	0,95	n.i.	0,95	0,98	0,63	0,66
85	m	73	pT3b	N0	M0	G2-3	Urothelcarcinom	46	0,37	0,06	0,09	0,11	0.06	0,76	0,94
186	m	69	pT3b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	47	0,37	0,99	0,39	0,71	0,44	0,49	0,15
157	m	68	pT3b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	16	0,50	n.i.	0,33	0,43	n.i.	0,60	0,28
100	m	74	pT3b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	8	0,54	n.i.	0,51	0,69	0,52	0,57	0,54
106	w	41	pT3b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	n.u.	0,88	1,00	0,87	0,87	n.i.	0,71	0,79
39	w	77	pT3b	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	44	0,97	0,67	0,71	0,57	0,57	0,86	0,83
135	m	71	pT3b	N1	M0	G3	Urothelcarcinom	16	0,19	0,91	0,22	n.i.	0,20	0,55	0,51
116	m	64	pT3b	N1	M0	G3	Urothelcarcinom	5	n.i.	0,87	0,97	0,93	n.i.	0,98	0,73
43	w	75	pT3b	N1	M0	G3-4	Urothelcarcinom	13	0,60	0,93	n.i.	n.i.	0.82	0,99	0,58
167	w	55	pT3b	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	2	0,75	0,73	0,80	0,72	0,79	0,93	0,82
52	m	66	pT3b	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	6	0,90	0,79	0,86	0,97	0.71	0,73	0,69
81	w	67	pT3bi	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	4	0,51	0,95	n.i.	0,48	0,61	0,46	0,27
40	w	73	pT3bii	N0	Mx	G3	Urothelcarcinom	18	0,76	0,78	0,89	0,93	0.66	0,92	0,98
9	m	67	pT3bii	pN2	M0	G3	Urothelcarcinom	7	0,97	0,96	n.i.	0,95	0,98	0,69	0,87
89	m	46	pT4	N2	M0	G4	Urothelcarcinom	15	0,68	n.i.	0,62	n.i.	0,58	0,64	0,68
98	m	45	pT4a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	27	0,51	0,88	0,54	0,60	0,51	0,62	0,59
67	m	63	pT4a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	7	0,76	0,95	n.i.	0,84	n.i.	0,67	0,87
149	m	67	pT4a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	12	0,92	0,94	0,82	0,93	0,87	0,91	0,58
54	w	60	pT4a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	17	0,96	0,99	0,80	0,88	0.86	0,71	0,70
77	m	76	pT4a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	7	n.i.	0,96	0,85	0,78	0.72	0,77	0,87
82	m	59	pT4a	N0	M0	G3	Urothelcarcinom	10	n.i.	0,83	0,97	0,94	n.i.	0,92	0,83
60	w	81	pT4a	N0	M0	G4	Urothelcarcinom	14	n.i.	0,47	0,98	0,91	0.94	0,61	0,95
42	m	73	pT4a	N1	M0	G3	Urothelcarcinom	10	0,84	0,99	0,92	0,99	0.78	0,79	0,83
174	m	62	pT4a	N1	M0	G3	Urothelcarcinom	79	0,98	0,95	n.i.	n.i.	n.i.	0,73	0,95
197	m	61	pT4a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	47	0,12	0,19	n.i.	0,88	MI	0,64	0,71
102	m	68	pT4a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	34	0,57	0,56	0,49	n.i.	n.i.	0,78	0,95
118	w	82	pT4a	N2	M0	G3	Urothelcarcinom	12	n.i.	0,47	n.i.	0,47	0,42	0,75	0,61
180	m	64	pT4a	pN0	M0	G2	Urothelcarcinom	15	0,68	0,95	0,73	0,84	0,70	0,74	0,66
114	m	65	pT4a	pN2	M0	G3	Urothelcarcinom	45	n.i.	0,94	0,31	0,41	0,16	0,56	0,96

Tabelle 7-2. Übersicht über die gefundenen Veränderungen im CDKN2-Locus korreliert mit *Stage* und *Grade* der Harnblasentumoren. Insgesamt standen 86 Tumore zur Verfügung, ein *Carcinoma in situ* ist nicht in der Tabelle aufgeführt.

	pTa			**pT1**			**pT2**			**pT3**			**pT4**		
	Σ	LOH	HD	Σ	LOH	HD	Σ	LOH	HD	Σ	LOH	HD	Σ	LOH	HD
G1	**2**	–	–	–	–	–	**1**	–	–	–	–	–	–	–	–
G2	**3**	1 33%	2 66%	**4**	3 75%	2 50%	**8**	4 50%	2 25%	**7**	2 29%	3 43%	**1**	–	–
G3	**1**	–	–	**6**	3 50%	3 50%	**13**	3 23%	2 15%	**23**	10 44%	8 35%	**12**	6 50%	2 17%
G4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	**2**	1	1	**2**	1	–

Tabelle 7-3. Übersicht über die durchgeführten statistischen Analysen.

Obs	**Gruppe1**	**Gruppe2**	**Two-sample Wilcoxon Statistic**	**Wilcoxon Statistic, Standardized**	**P-value, Wilcoxon Test (Two-sided)**	**Adj.P-Wert Bonferroni-Holm**
1	ohne	LOH+HD	965.5	3.84090	0.000123	0.000368
2	ohne	LOH	719.5	3.31806	0.000906	0.001813
3	LOH	LOH+HD	260.0	-0.06941	0.944667	0.944667

8 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	*Bacterial Artificial Chromosome* (künstliches Bakterienchromosom)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
dpm	*disintegration per minute* (Zerfall pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanidin
HD	Homozygote Deletion
IPTG	Isopropyl-beta-D1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
LB	*Luria Broth*
LOH	*Loss of Heterozygosity*, Verlust der Heterozygotie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Polymerase Kettenreaktion)
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	*rotations per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SSC	*Standard Sodium Citrat*-Puffer
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	*Terrific Broth*
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethyl-ethylendiamin
TK	Thymidin Kinase
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid

9 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. W.A. Schulz für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas. Seine fachliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Seine Begeisterung für Fragen der DNA-Methylierung hat mich stets motiviert.

Herrn Prof. Dr. U. Rüther danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft diese im Fachbereich Biologie zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. R. Ackermann danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und seinen Einsatz für das wissenschaftliche Labor der Urologischen Klinik sowie für seine Unterstützung und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B.J. Schmitz-Dräger danke ich für die Bereitstellung der Harnblasenkarzinom-Zellinien, Herrn Prof. Gerharz danke ich für die freundliche Überlassung der Nierenkarzinom-Zellinien.

Prof. Dr. H. Hameister, Humangenetik, Ulm danke ich für die Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Frau Dr. S. Scheuring, BMFZ, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf danke ich für die Sequenzierung des 253J-Vectorette-Konstruktes.

Allen medizinischen Kollegen und Kolleginnen gilt mein Dank für die Bereitstellung von Gewebe- und Blutproben sowie für ihre Neugierde an meiner Arbeit.

Meinen Kollegen und Kolleginnen in der Arbeitsgruppe, Frau Dr. B. Schmidt, Herrn Dr. F. Kimura, Herrn cand. biol. I. Thievessen, Frau cand. med. S. Maas, Frau cand. med. S. Swiatkowski, Frau C. Hader, Frau A. Prior , Frau V. Larisch und Herrn A. Radzewitz danke ich für Ihre stete Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen. Die freundliche Atmosphäre im Labor half mir auch die schwierigen Phasen während meiner Arbeit gut zu überstehen. Im Besonderen möchte ich Frau Dr. C. Steinhoff für die Durchführung der statistischen Analysen und Herrn Dr. M.V. Cronauer für die Unterstützung bei der Durchsicht des Textes danken.

Darüberhinaus möchte ich allen Mitgliedern des Instituts für Neuropathologie und der Kinderklinik für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre danken. Dabei möchte ich Frau Dr. M. Wolter, Frau Dr. U. Brosius und Herrn Dr. P. Roehrig hervorheben, die stets ein offenes Ohr für meine fachlichen Belange hatten.
Herrn Dr. C. Mahothka, Institut für Pathologie, gilt mein Dank für seine ständige spontane Hilfe und Diskussionsbereitschaft.

Durch intensive Diskussionen und konstruktive Anmerkungen haben mir alle Mitglieder des Graduiertenkollegs Toxikologie geholfen, den Gesamtzusammenhang meiner Daten nicht aus den Augen zu verlieren.

Meinen Eltern, H. und D. Florl sowie meiner Großmutter Frau F. Gromm möchte ich besonders für den familiären Rückhalt und die Förderung weit über mein Studium hinaus danken. Ohne ihre motivierende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn P. Linnemann danke ich besonders für seine Geduld und sein Verständnis, welches ich beim Erstellen dieser Arbeit häufig beansprucht habe. Er hat wie sonst niemand ihre Höhen und Tiefen miterlebt und stets an ihren Erfolg geglaubt.

Zu guter Letzt möchte ich es nicht versäumen, allen meinen Freunden zu danken, die mir trotz der Erstellung dieser Arbeit in den vergangenen Jahren treu geblieben sind.