

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

Fehlregulation der DNA-Methylierung in urologischen Karzinomen

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Thilo Laner

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. W. A. Schulz
Korreferent:	Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung:	15. Dezember 2004
-----------------------------	-------------------

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 DNA-Methylierung und ihre Funktion als Mechanismus der Epigenetik	1
1.2 DNA-Methyltransferasen	3
1.3 Epigenetische Veränderungen in Tumoren	4
1.4 Epigenetische Veränderungen in Harnblasen- und Prostatakarzinomen	5
1.5 Die Inaktivierung des X-Chromosoms	6
1.6 Die Rolle des <i>XIST</i> -Gens bei der Inaktivierung des X-Chromosoms	7
1.7 Zielsetzung der Arbeit	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Geräte und Zubehör	11
2.2 Software	11
2.2.1 Programme	11
2.2.2 Datenbanken	12
2.3 Chemikalien	12
2.4 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	14
2.4.1 Bakterienmedien	14
2.4.2 Standardpuffer	15
2.4.3 Lösungen Western Blot	16
2.4.4 Lösungen Polyacrylamidgele	18
2.4.5 Lösungen Northern-Blot-Analyse	18
2.5 Molekularbiologische Kits	19
2.6 Enzyme	20
2.7 Antikörper	20
2.8 Oligonukleotidprimer	20
2.9 Vektoren	22
2.9.1 Plasmide	22
2.10 Bakterien	23
2.10.1 Bakterienstämme und ihre Aufzucht	23
2.10.2 Transformation kompetenter TOP10/ XL2blu MRF ⁻ -Zellen	23
2.11 Gewebe- und Blutproben	24
2.12 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung	24
2.12.1 Etablierte Zelllinien	24
2.12.2 Kultivierung von Harnblasenkarzinom-Zelllinien	25
2.12.3 Kultivierung von Prostatakarzinom-Zelllinien	25
2.13 Anlegen von humanen Urothel-Primärkulturen	25
2.14 MTT-Test	26
2.15 Transkriptions- und Translationsinhibierung in Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Urothel-Primärkulturen	27
2.16 Isolierung von Nukleinsäuren	27
2.16.1 Plasmid-DNA	27
2.16.2 Genomische DNA	28
2.16.3 Kulturzellen	28
2.16.4 Gewebe	28
2.16.5 EDTA-Blut	28
2.17 RNA-Isolation	29
2.17.1 RNA-Präparation aus Kulturzellen	29
2.17.2 RNA- Präparation aus EDTA-Blut	29
2.18 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der Nukleinsäuren	29
2.19 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
2.20 Enzymatische Reaktionen	30

Inhaltsverzeichnis

2.20.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	30
2.20.2 Klonierung von PCR-Produkten	30
2.21 Gelelektrophoretische Methoden	30
2.21.1 DNA-Agarosegelelektrophorese	30
2.21.2 RNA-Agarosegelelektrophorese	31
2.21.3 Sequenziergele	31
2.22 DNA-Analyse mit Hilfe von Bisulfit	31
2.22.1 Bisulfitumwandlung	31
2.22.2 Nested-PCR.....	32
2.22.3 Sequenzierung	33
2.22.4 Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR)	34
2.23 Reverse Transkription	34
2.24 Proteinanalyse-Verfahren.....	35
2.24.1 Herstellung von Zell-Lysaten für die Proteinanalyse.....	35
2.24.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.24.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.24.4 Western-Blot	36
2.24.5 Immunochemische Detektion	36
2.25 Northern-Blot.....	36
2.26 Herstellung markierter Sonden	37
2.27 Hybridisierung	37
2.28 Nachweis der markierten cDNA-Sonden	37
2.29 Light-Cycler Real Time RT-PCR	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Methylierungsanalyse des <i>XIST</i> -Gens.....	39
3.1.1 Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	39
3.1.2 Überprüfung auf einen PCR-Bias bei der Methylierungs-Analyse Bisulfit- umgewandelter DNA	40
3.1.3 Vergleich der Methylierungsmuster des <i>XIST</i> -Gens in Prostatagewebe, Karzinom- Zelllinien, Karzinomgewebe und Leukozyten.....	41
3.3 Expressionsanalyse von <i>XIST</i>	45
3.3.1 Standard-RT-PCR	45
3.3.2 Real-Time-RT-PCR Analyse der <i>XIST</i> -Expression	46
3.4 Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR).....	48
3.5 mRNA- und Protein-Turnover der DNA-Methyltransferase 1 in Blasenkarzinom- Zelllinien und in Uroepithel-Primärkulturen.....	50
3.5.1 Protein „Turnover“-Assay	50
3.5.2 mRNA „Turnover“ Assay.....	52
4. Diskussion	53
4.1 Epigenetische Veränderungen im Prostatakarzinom	53
4.2 DNA-Methylierungs- und Expressionsanalysen des <i>XIST</i> -Gens	54
4.3 DNMT1 in TCC-Zelllinien.....	56
5. Zusammenfassung	58
6. Literatur.....	60
7. Anhang	69
8. Danksagung	71

1. Einleitung

1.1 DNA-Methylierung und ihre Funktion als Mechanismus der Epigenetik

Unter DNA-Methylierung versteht man die kovalente Bindung eines Methylrestes an Basen der DNA. Sie kommt sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten vor. Es gibt verschiedene Formen der DNA-Methylierung, die sich darin unterscheiden, welche Base methyliert ist und an welcher Position der Base der Methylrest gebunden wird. Zum einen wird das 5-Kohlenstoffatom des Cytosinrestes zu C5-Methylcytosin methyliert. Zum anderen findet man eine Methylierung des Stickstoffatoms in N4-Methylcytosin und N6-Methyladenin.

In Prokaryonten dient sie der Kennzeichnung bestimmter Bakterienstämme durch die Methylierung von Adenin- und Cytosinresten. Fremde DNA mit einem abweichendem oder fehlendem Methylierungsmuster werden erkannt und von dem Modifikations-Restriktions-Systems abgebaut. Die vom *dam*-Gen kodierte DNA-Adenin-Methylase ist für die Unterscheidung replizierter von nichtreplizierter DNA anhand der Methylierung von Adeninresten verantwortlich. Dieses ist für das postreplikative Mismatch-Repairsystem wichtig, da nur Basen am unmethylierten Strang einer hemimethylierten DNA ausgetauscht werden können.

In Eukaryoten stellt die DNA-Methylierung an Cytosinresten einen wichtigen Mechanismus der Epigenetik dar und steht vor allem mit der Transkriptionskontrolle in Verbindung. Die Methylierung bzw. Demethylierung von DNA kann mitotisch und meiotisch vererbte Veränderungen der Genexpression zur Folge haben, aber anders als bei den üblichen genetischen Veränderungen bleiben die Nucleotid-Sequenzen erhalten [Wolffe & Matzke, 1999]. Im Säugergenom sind nur Cytosinreste fast ausschließlich in der palindromischen Dinucleotidabfolge CpG methyliert. In höheren Pflanzen ist neben der CpG-Methylierung auch DNA-Methylierung in der Sequenz CpNpG bekannt [Gruenbaum et al., 1981]. In *Drosophila melanogaster* wurde bisher keine CpG-Methylierung sondern nur eine schwache CpT-Methylierung in embryonalen Stadien detektiert [Lyko et al., 2000].

Im Säugergenom liegen 70-80% aller CpG-Stellen methyliert vor [Razin et al., 1984], was 2,5-7% der Cytosin-Reste im Genom entspricht [Adams & Burdon, 1985]. Ihre Häufigkeit beträgt nur etwa 20% des Wertes, den man aufgrund des Anteils der GC-Basenpaare erwarten

1. Einleitung

würde. Diese im Verlauf der Evolution entstandene Abweichung ist darauf zurückzuführen, daß Cytosinreste häufig desaminiert werden. Im Falle von Methylcytosin entsteht Thymin, was von dem Reperatursystem nicht erkannt wird. Bestimmte Regionen des Genoms, speziell die Promotorregionen von Haushaltsgenen, besitzen eine erhöhte Frequenz an CpG-Nukleotiden, die CpG-Inseln genannt werden [Bird, 1986]. Diese Bereiche bleiben regulär unmethyliert. CpG-Inseln von inaktiven gewebe- oder entwicklungsspezifischen Genen, sowie repetitive DNA-Sequenzen liegen in somatischen Zellen meist hochmethyliert vor. Die DNA-Methylierung ist essentiell für eine normale Entwicklung, da sie eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des X-Chromosoms, bei der Inaktivierung parasitärer, invasiver und endogener Elemente, bei der gewebespezifischer Genexpression, sowie beim Imprinting spielt [Jaenisch, 1997; Surani, 1998; Bestor, 2000]. Zurückzuführen ist dies auf die Funktion, welche die DNA-Methylierung bei der transkriptionellen Genrepression spielt [Razin, 1998]. DNA-Methylierung ist meist mit einer Inaktivierung der DNA-Sequenzen und einer Transkriptionshemmung assoziiert.

Es gibt mehrere Mechanismen, mit denen die Transkriptionshemmung durch DNA-Methylierung erklärt werden kann. Zum einen können spezifische Transkriptionsfaktoren durch methylierte CpG-Stellen in ihren Erkennungssequenzen an der Bindung gehindert werden. Hierzu zählen u.a. AP-2, c-Myc, E2F und NFκB [Bergmann et al., 1998]. Andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1, CTF und YY1 binden methylierungsunabhängig und sind nicht sensitiv gegenüber DNA-Methylierung [Tante *et al.*, 1993; Mostoslavsky *et al.*, 1997]. Da nur wenige Transkriptionsfaktoren auf den Methylierungsstatus stark reagieren, ist es wahrscheinlich, daß die direkte Störung der Bindung von Transkriptionsfaktoren eher eine untergeordnete Rolle bei der Repression von Genen spielt [Bird und Wolffe 1999]. Ebenso wird diskutiert, daß das Abschalten eines Gens durch Methylierung eng mit dem Remodellieren einer Chromatinstruktur verbunden ist, welche die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren an den Promoter dieses Gens herabsetzt [Razin *et al.*, 1998]. Ein weiterer Mechanismus, der zur Repression der Transkription führt, wird durch das Binden von Repressorproteinkomplexen an methylierte CpG-Sequenzen verursacht. Bestandteile solcher Repressorproteinkomplexe sind MBD2, MBD3 und MeCP-2. Sie wurden wegen der hohen Homologie ihrer Methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD) mit weiteren Proteinen zu einer Familie zusammengefasst. Aber nicht alle Vertreter dieser Familie binden spezifisch an methylierte DNA [Hendrich & Tweedie, 2003]. Ihre transkriptionshemmende Funktion ist, durch die Assoziation mit anderen Proteinen u. a. mit Histonacetylasen, vor allem auf eine

1. Einleitung

über Histondeacetylierung hervorgerufene dichtere Packung der Chromatinstruktur zurückzuführen. Die beschriebenen Mechanismen schließen einander nicht aus, vielmehr vermutet man, daß sie synergistisch wirken.

1.2 DNA-Methyltransferasen

Verantwortlich für die Methylierung der Cytosinbasen sind die DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Als erstes wurde die DNA-Methyltransferase 1 entdeckt, die für das Beibehalten eines bereits in der Zelle existierenden Methylierungsstatus nach der DNA-Replikation sorgt. Aus diesem Grund wurde dieses Enzym als Erhaltungsmethylase (maintenance-DNMT1) bezeichnet. Sie wird nur in proliferierenden Zellen exprimiert und ist auf die DNA-Replikation abgestimmt reguliert. 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*) [Chuang *et al.*, 1997], einem für die DNA-Replikation und DNA-Reperatur essentiellen Protein [Leonhardt *et al.*, 1993]. DNMT1 besitzt *in vitro* eine 10-40-fache erhöhte Affinität für hemimethylierte DNA im Vergleich zu nicht methylierten Sequenzen [Pradhan *et al.*, 1999]. Eine zweite Gruppe von Methyltransferasen wurde durch Versuche mit *Dnmt-knock-out*-ES-Zellen evident, die trotzdem *de novo*-Methylierung aufwiesen. Deshalb wurde davon ausgegangen, daß neben der *Dnmt1* auch von dieser unabhängige *de novo*-Methyltransferasen existieren [Lei *et al.*, 1996]. 1998 wurden die DNMT3a und DNMT3b als *de novo*-Methyltransferasen charakterisiert. Sie besitzen eine gleich starke Aktivität gegenüber hemi- und nichtmethylierter DNA [Okano *et al.*, 1998]. Es konnte gezeigt werden, daß die *Dnmt3a* *in vitro* eine *de-novo*-Aktivität besitzt [Fatemi *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2002]. Aus Studien über das humane ICF Syndrom [Xu. *et al.*, 1999; Hansen 2003], das auf einer Mutation in der katalytischen Domäne der DNMT3b beruht, und aus Versuchen mit „knock-out“ Mäusen geht hervor [Okano *et al.*, 1999], daß die DNMT3b für die Methylierung repetitiver Sequenzen essentiell ist.

1.3 Epigenetische Veränderungen in Tumoren

Neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Proto-Onkogenen durch genetische Veränderungen, wie Punktmutationen und Deletionen, wird die Dysregulation der Genexpression durch Veränderungen des Methylierungsmusters, als epigenetischer Mechanismus für die Entstehung und Progression von Tumoren verantwortlich gemacht. In der Onkogenese sind zwei Veränderungen der DNA-Methylierung bekannt. Es kommt eine generelle Verminderung der DNA-Methylierung (Hypomethylierung) wie auch eine abschnittsweise Erhöhung der DNA-Methylierung (Hypermethylierung) vor. Beide Mechanismen können getrennt voneinander oder in Kombination auftreten. Eine DNA-Hypermethylierung wurde in verschiedenen Tumortypen im Promotorbereich von Tumorsuppressor- und anderen Genen nachgewiesen. Für viele Gene ist die Hypermethylierung als Mechanismus ihrer Inaktivierung sicher belegt. Beispiele hierfür stellen die Promotorhypermethylierung des *BRCA1*-Gens beim Brustkrebs [Esteller *et al.* 2000], des *RBI*-Gens im Retinoblastom [Greger *et al.*, 1989], des *APC* im Colonkarzinom und des *GSTP1*-Gens im Prostratakarzinom dar.

Eine Verringerung der DNA-Methylierung kann sowohl bei einer genomweiten Hypomethylierung als auch bei einer spezifischen Hypomethylierung von Proto-Onkogenen gefunden werden. Durch Hypomethylierung könnten Proto-Onkogene, wie z. B. *BCL-2* in Leukämien [Hanada *et al.*, 1993] und *KRAS* in Lugen- und Kolonkarzinomen [Feinberg & Vogelstein, 1983] aktiviert werden.

Eine genomweite Hypomethylierung wird häufig in repetitiven Sequenzen, wie Retrotransposonen und Sequenzen endogener Retroviren, beobachtet. Solche Sequenzen sind in der normalen somatischen Zelle dicht methyliert, wodurch ihre Transkription unterdrückt wird. Zu solchen retrotransposablen Elementen gehören z. B. *LINE1*-Elemente, die etwa 17% des menschlichen Genoms ausmachen [Goodier *et al.*, 2004].

Eine Hypomethylierung der *LINE1*-Sequenzen wurde in verschiedenen Tumoren, wie z. B. lymphatischer Leukämie (Dante *et al.*, 2001), im Harnblasenkarzinom [Jürgens *et al.*, 1996], im Leberzellkarzinom (Takai *et al.*, 2000) und im Prostatakarzinom [Santourlidis *et al.*, 1999] gefunden.

Die Mechanismen der DNA-Methylierung, die zu einem abweichenden Methylierungsmuster in Tumoren führen, sind bisher nicht genau geklärt. Es gibt eine Reihe von Studien, die die Promotorhypermethylierung verschiedener Gene in verschiedenen Tumoren mit einer

1. Einleitung

Überexpression der DNMT1 erklären. Bei den meisten Untersuchungen wurde der erhöhte Expressionsspiegel der DNMT1 nicht in Bezug zu der Expression von Proliferations-assoziierten Genen, wie z.B. PCNA oder H4, gesetzt, so daß die Überexpression im Tumor eine Konsequenz der starken Proliferation sein könnte. In verschiedenen Studien konnte in Kolonkarzinomen nach einer Normalisierung auf die Proliferation keine erhöhte Expression der DNMT1 nach einer Normalisierung auf die Proliferation festgestellt werden [Lee *et al.*, 1996; De Marzo *et al.*, 1999; Eads *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2003].

Mit der Überexpression der DNMT1 als einzigem Mechanismus der DNA-Methylierung im Tumor ist es schwierig, das gleichzeitige Auftreten von Promotorhypermethylierung und von globaler Hypomethylierung zu erklären. Die wichtigste Funktion der DNMT1 in somatischen Zellen ist die Erhaltung der gesamten DNA-Methylierung, so daß sich eine Änderung in ihrer Expression wahrscheinlich stärker auf die gesamte DNA-Methylierung als auf die Methylierung spezifischer CpG-Stellen auswirkt. Neben einer veränderten DNMT1-Expression in Tumoren werden daher Proteine als potentielle Regulatoren der DNA-Methylierung diskutiert, die abweichende Protein-Protein-Interaktionen mit DNMT1 assoziierten Proteinen oder Proteinkomplexen aufweisen. Hierzu zählen Rb [Robertson *et al.*, 2000^A], p21^{WAF1}, ein Zellzyklusprotein, das an den DNMT1-PCNA-Komplex bindet [Chuang *et al.*, 1997], und Chromatinproteine [Rountree *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000^A], wie z.B. ATRX [Gibbons *et al.*, 2000]. Mutationen in dem ATRX-Gen werden mit Hypomethylierung in Tumoren assoziiert. Als ein weitere Faktor, der *in vivo* in Leukozyten zu einer Hypomethylierung führen kann, wird eine unzureichende Konzentration an S-Adenosyl-Methionin (SAM) angesehen [Yi *et al.*, 2000].

1.4 Epigenetische Veränderungen in Harnblasen- und Prostatakarzinomen

Als epigenetische Veränderungen kennt man im Prostata- (PCa) und im Harnblasenkarzinom die Hyper- und die Hypomethylierung. 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]. Für die Entstehung und Progression von Harnblasenkarzinomen stellt Chromosomeninstabilität offenbar eine wichtige Ursache dar. Neben der DNA-Hypermethylierung von Promotorregionen in Tumorsuppressorgenen, wie z.B. dem *CDKN2A*-Gen, weisen etwa 95% aller fortgeschrittenen Tumoren eine Verminderung des

1. Einleitung

Methylcytosingehalts von bis zu 60% auf [Jürgens *et al.*, 1996; Florl *et al.*, 1999].

Im Prostatakarzinom tritt bei einer Reihe von Genen Hypermethylierung der Promotoren sehr spezifisch und sehr früh auf. Weitere Gene werden im Verlauf der Tumورprogression hypermethyliert. Zu solchen Genen zählen Gene der DNA-Reparatur, des Zellzyklus und der Apoptose, so daß ihre Hypermethylierung für die Initiation und Progression des Karzinoms verantwortlich sein könnte. Die häufigste Veränderung betrifft dabei den Promotor des *GSTP1*-Gens, das für die Glutathion-S-Transferase codiert. Die Glutathion-S-Transferase schützt Prostatazellen vor der Schädigung durch Karzinogene und reaktive, elektrophile Substanzen. Durch eine erhöhte Mutationsrate könnte dieser Verlust zu einem Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen führen und die Entstehung eines Karzinoms begünstigen. Verschiedene andere Gene wie *APC*, *CDH1*, *CDKN2A*, *RASSF1A* und *RARβ2* sind mit unterschiedlicher Häufigkeit, oftmals aber gleichzeitig im Prostatakarzinom hypermethyliert [Graff *et al.*, 1995; Nakayama *et al.*, 2001; Maruyama *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2003; Yegnasubramanian *et al.*, 2004, Florl *et al.*, 2004, Kang *et al.*, 2004]. Während die Promotorhypermethylierung in mehr als 82% der Prostatakarzinome ausgeprägt ist, ist die DNA-Hypomethylierung seltener zu finden. Als Indikator für die globale Hypomethylierung in Prostatakarzinomzellen eignet sich der Methylierungsstatus der *LINE1*-Sequenzen. Ihre Hypomethylierung kann zu einer Fehlexpression führen und erleichtert offenbar fehlerhafte Rekombinationen. Wahrscheinlich korreliert deswegen die Hypomethylierung der *LINE1*-Elemente mit der genomischen Instabilität [Florl *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2002]. Im Prostatakarzinom korreliert die Hypomethylierung generell ebenfalls mit dem Vorhandensein von Metastasen [Bedford & van Helden, 1987]. Eine kleine Untergruppe der Prostatakarzinome zeigt eine ausgeprägte Hypermethylierung mehrerer Gene und eine Hypomethylierung der *LINE1*-Elemente. Das gleichzeitige Auftreten beider Veränderungen der DNA-Methylierung ist mit der Progression der Tumoren assoziiert [Florl *et al.*, 2004].

1.5 Die Inaktivierung des X-Chromosoms

Da weibliche Organismen zwei X-Chromosomen, männliche aber nur ein X-Chromosom besitzen, haben weibliche doppelt so viele X-chromosomale Gene wie männliche Organismen. Zur Gendosis-Kompensation wird bei Säugetieren eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen während der frühen embryonalen Entwicklung

1. Einleitung

inaktiviert. Die Inaktivierung betrifft beim Menschen zufällig entweder das paternale oder das maternale X-Chromosom. Sie geht von dem *X-inactivation center* (XIC) aus und breitet sich in beide Richtungen entlang des Chromosoms aus. Einmal festgelegt bleibt das betreffende X-Chromosom unbeeinflusst durch alle Zellteilungen genetisch stumm. Andere Arten haben andere Mechanismen für eine Einstellung des X-chromosomal Gleichgewichts zwischen männlichen und weiblichen Organismen entwickelt. Zum Beispiel schafft *Drosophila melanogaster* einen Ausgleich durch die Steigerung der Gen-Expression um das Doppelte beim einzigen X-Chromosom in männlichen Organismen [Kelley & Kuroda, 2000]. Dahingegen ist bei *Caenorhabditis elegans* die Gen-Expression der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen um die Hälfte gegenüber dem einzigen X-Chromosoms in männlichen Zellen verringert [Meyer, 2000].

1.6 Die Rolle des *XIST*-Gens bei der Inaktivierung des X-Chromosoms

Der Mechanismus der X-Chromosom-Inaktivierung ist zumindest beim Menschen nicht im Einzelnen aufgeklärt. Als belegt kann angesehen werden, daß das Gen *XIST* (*X inactive specific transcript*) für die Initiation der Inaktivierung verantwortlich ist. Es liegt im XIC und wird während der Inaktivierung auf dem inaktiven X-Chromosom (X_i) in Form einer ca. 17 kb langen RNA, die kein offenes Leseraster besitzt und nicht translatiert wird, exprimiert. Der Promotor des *XIST*-Gens ist auf dem X_i nicht methyliert, wohingegen die *XIST*-Transkription durch die Methylierung des Promotors auf dem aktiven X-Chromosoms (X_a) der Frau und dem X-Chromosom des Mannes unterdrückt ist. Die *XIST*-RNA kann am

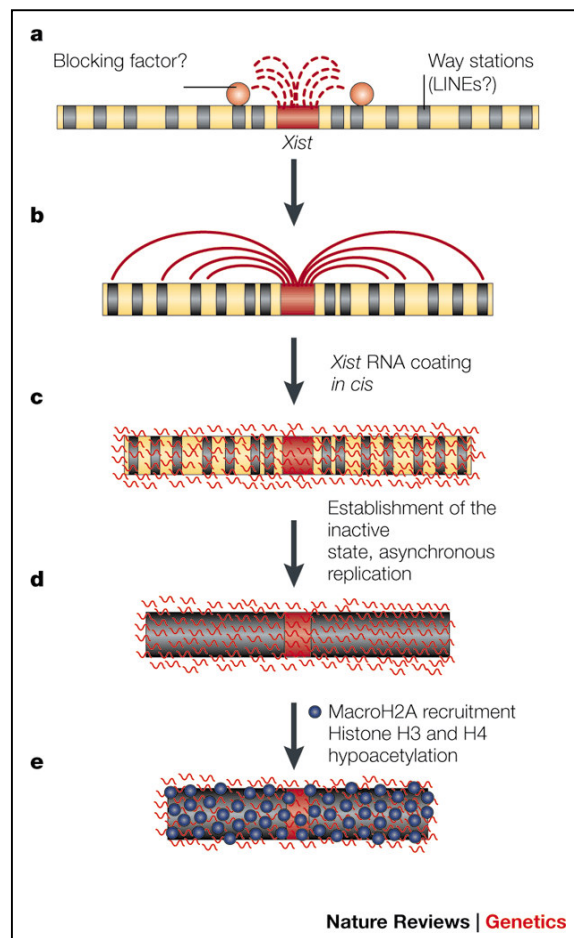


Abbildung 1-1: Ein Modell für den möglichen Ablauf der X-Chromosom Inaktivierung, aus Avner & Heard [2001]

1. Einleitung

X_i nachgewiesen werden, aber wie sie dort die Einleitung und Aufrechterhaltung der Inaktivierung bestimmt, ist bisher nicht bekannt. Ein möglicher Mechanismus ist in Abb. 1-1 dargestellt.

In der frühen Embryonalphase sind beide X-Chromosome in der weiblichen Säugerzelle und das einzige X-Chromosom in der männlichen Zelle aktiv. In dieser Phase der Entwicklung findet man XIST-Transkripte nur in der Nähe ihres Gens (vgl. Abb. 1-1a). Man vermutet, daß die Hochregulation der Transkription und die Assoziation der Transkripte mit dem Chromosom durch unbekannte Faktoren unterbunden wird. Kurz nach ihrer Synthese werden die Transkripte wieder abgebaut. Erst nach Beginn der Differenzierung akkumuliert das XIST-Transkript am X_i und breitet sich in *cis* auf diesem Chromosom aus (vgl. Abb. b). 1998 schlug Lyon *LINE1*-Elemente auf dem X-Chromosom als „way stations“ für die Ausbreitung der Inaktivierung vor [Lyon, 1998; Hansen *et al.*, 2003]. Das humane X-Chromosom enthält zwei mal mehr *LINE1*-Elemente als die Autosome, mit der größten Häufung von *LINE1*-Elementen im XIC [Bailey *et al.*, 2000]. Dagegen kommt die Transkription auf dem aktiven X-Chromosom in weiblichen Säugerzellen und auf dem X-Chromosom in männlichen Zellen zum Erliegen. Durch die Anlagerung der XIST-RNA ist der inaktive Status des X-Chromosoms etabliert, der mit einer Heterochromatisierung und einer Replikation in der späten S-Phase einhergeht [Schmidt & Migeon, 1990]. Bei dem Prozess der Heterochromatisierung ist eine Kaskade von Chromatinmodifikationen involviert, wie die Methylierung von Lysin 9 im Histon H3 [Heard *et al.*, 2001], die Hypoacetylierung der Histone H3 und H4 [Jeppesen & Turner, 1993] und die Bindung der Histonvariante macroH2A1 [Costanzi & Pehrson, 1998].

Neben der Chromatinmodifikation scheint die DNA-Methylierung für die Aufrechterhaltung der X-Chromosom-Inaktivierung eine wichtige Rolle zu spielen. Hierfür spricht, daß die Promotoren der meisten auf dem X_i-Chromosom liegenden Gene, unter anderem auch Haushaltsgene, hypermethyliert sind [Mohandas *et al.*, 1981].

Einige Krankheiten wurden mit unterschiedlichen Arten von Veränderungen der DNA-Methylierung auf dem X-Chromosom assoziiert. Das ICF-Syndrom beruht auf Mutationen in der katalytischen Domäne des *DNMT3*-Gens [Xu *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 1999]. Als Folge findet man auf dem X_i Promotorhypomethylierung einiger Gene und hypomethylierte *LINE1*-Sequenzen [Hansen, 2003]. Jedoch bleibt die X-Chromosom-Inaktivierung im Wesentlichen bei diesem Syndrom funktionell erhalten.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

- 1) Im Prostatakarzinom können Promotorhypermethylierung und globale Hypomethylierung beobachtet werden. Während die Hypermethylierung bestimmter Gene ein frühes Ereignis im Verlauf der Krankheit ist, ist die globale Hypomethylierung ein späterer Prozess im Karzinom, der mit Vorhandensein von Metastasen korreliert. Die Assoziation der globalen Hypomethylierung mit dem Progress des Prostatakarzinoms könnte bei der Identifizierung besonders aggressiver Formen dieses heterogenen Krebses hilfreich sein. Als Indikator für die globale Hypomethylierung dient der Methylcytosin-Gehalt der *LINE1*-Sequenzen, der mit der HPLC-Methode oder mit der Southern-Blot-Methode bestimmt wird. Es existiert aber keine PCR-Methode mit der kleine Mengen klinischen Materials mit geringem Zeitaufwand zuverlässig auf *LINE1*-Hypomethylierung getestet werden können. Ein Grund hierfür liegt darin, daß solche repetitive Sequenzen in ihrem Methylierungsmuster nicht genügend homogen sind, so daß auf PCR basierende Methoden Hypomethylierung gegen einen Hintergrund von einigen Sequenzen, die auch im gesunden Gewebe weniger stark methyliert sind, detektieren müssen. Im Gegensatz hierzu ist die gute Sensivität der Messung von Hypermethylierung darauf begründet, daß in normalen Zellen die DNA-Methylierung in den CpG-Inseln von Einzelkopie-Genen konsistent fehlt. Eine Möglichkeit die Sensitivität der Detektion von Hypomethylierung zu erhöhen, wäre eine einzelne Sequenz zu untersuchen, die in normalen Zellen stark methyliert ist und im Tumor parallel mit den repetitiven Sequenzen hypomethyliert wird. Eine solche Sequenz könnte der *XIST*-Promotor sein, die in der gesunden männlichen Zelle nur einmal vorhanden ist und dicht methyliert ist.

Da der Methylierungsstatus des *XIST*-Gens im Prostatakarzinom unbekannt war, sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob sich dieser in Prostatakarzinom-Zelllinien und Prostatakarzinomgewebe mit verschieden ausgeprägter globaler Hypomethylierung ändert. Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine Abnahme der DNA-Methylierung des *XIST*-Promotors zu einer Transkription des Gens führt. Drittens sollte festgestellt werden, ob ein verändertes Methylierungsmuster des *XIST*-Promotors oder die *XIST*-Expression diagnostisch nützlich sein könnte.

1. Einleitung

- 2) In vielen Karzinomen und besonders im Harnblasenkarzinom findet man eine ausgeprägte globale Hypomethylierung. Die Mechanismen, die zu dieser globalen Hypomethylierung führen, sind nicht genau geklärt. Es wurde berichtet [Kimura *et al.*, 2003], daß in Harnblasenkarzinom-Zelllinien und in Transitionalzellkarzinomen die DNMT1-Expression auf mRNA- und Proteinlevel relativ zur Proliferation im Vergleich zu normalem Blasengewebe und uroepitheliale Gewebe vermindert ist. In Reporter-gen-Assays wurde gezeigt, daß die Differenz in der DNMT1-Expression zwischen normalen Zellen und Tumorzellen nicht durch Regulation des Promotors hervorgerufen wird. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll durch Inhibierung der Transkription und Translation überprüft werden, ob die festgestellte verminderte DNMT1-Expression posttranskriptionell oder posttranslatorisch reguliert wird.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Zubehör

Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg
Gel Print 2000i	MWG-Biotech	Ebersberg
GelBond Polyester-Folie	Biozym	Oldendorf
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
S&S Gel-Blotting Papier	Schleicher&Schuell	Dassel
Spektralphotometer	Eppendorf	Köln
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
T3 ThermoCycler	Biometra	Göttingen
TRIO Thermoblock	Biometra	Göttingen
X-OMAT MS Röntgenfilme	Kodak	Stuttgart

2.2 Software

2.2.1 Programme

Clone, Scientific & Educational Software, 4.0, Serial No. 35014, 1995
Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences, Inc., 1992

2. Material und Methoden

2.2.2 Datenbanken

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

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/>]

Primer3 [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi]

2.3 Chemikalien

Acrylamid 37,5:1, 30% (f. Westernblot)	AppliChem	Darmstadt
Agar	Life Technologies	Karlsruhe
Agarose	PeqLab	Erlangen
Agarose	Sigma Aldrich	Deisenhofen
α -Amanitin	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich	Deisebhofen
Ampicilin	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	Deisenhofen
BSA	Pierce	Rockford USA
	über Perbio	Bonn
DNA-Längenstandards	PeqLab	Erlangen
dNTP-Mix	PeqLab	Erlangen
EDTA	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Ethanol, absolut	Merk	Darmstadt
Glucose	Merk	Darmstadt
Glycerin	Merk	Darmstadt
Glycerol	Merk	Darmstadt
Harnstoff	Merk	Darmstadt
Hefeextrakt	Life Technologies	Karlsruhe
HotStar [10x] PCR-Puffer	QIAGEN	Hilden

2. Material und Methoden

Kaliumchlorid	Merk	Darmstadt
Oligo (dT15)	Roche	Mannheim
Protein Längenstandard	BIORAD	Karlsruhe
Stop Loading Buffer (f. Sequenzierung)	Amersham Pharmacia	Freiburg
Long Ranger™ Gel-Solution (f. Sequenzierung)	FMC über Biozym	Rockland, USA Oldendorf
Magermilchpulver	Trade Service International	Zeven
Magnesiumchlorid	Merk	Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merk	Darmstadt
MTT (Nr. M 5655)	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merk	Darmstadt
Mineralöl	Sigma Aldrich	Deisenhofen
PBS	Biochrom	Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
Saccharose	Merk	Darmstadt
Salzsäure	Merk	Darmstadt
SequaGel ultra pure	National Diagnostics Inc. über Biozym	Atlanta, USA Oldendorf
Tris (Base)	Merk	Darmstadt
Trypsin	Biochrom	Berlin
Trypton	Life Technologies	Karlsruhe
Tween 20	Serva	Heidelberg
Q-Solution [5x]	QIAGEN	Hilden

2.4 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

2.4.1 Bakterienmedien

LB-Medium (1000 ml):

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad	H ₂ O

pH 7,5

LB-Agar:

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

autoklavieren und 100µg/ml Ampicilin nach Abkühlen zusetzen.

SOC Medium (100 ml):

2,0 g	Trypton
0,5 g	Hefeextrakt
0,05 g	NaCl
ad	dH ₂ O,

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 ₂ O, 1 M MgSO ₄ *7 H ₂ O)
1 ml	2 M Glucose

pH 7,0

2. Material und Methoden

2.4.2 Standardpuffer

5x TBE (1000 ml):

54 g	Tris-Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad	dH ₂ O

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 ₂ O

6x Ladepuffer für Agarosegele:

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

2. Material und Methoden

PBS:

137,0 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,2	

TE-Puffer:

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

2.4.3 Lösungen Western Blot

5x Laufpuffer (1000 ml):

15,14 g	Glycin
30,285 g	Tris-Base
25 ml	SDS (20%ige Lösung)
ad	dH ₂ O

Polyacrylamidgel:

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

6,9 ml	dH ₂ O
4,0 ml	Acrylamid
3,8 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
150 µl	10% SDS
150 µl	10% APS
6 µl	TEMED

2. Material und Methoden

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

0,75 g	Saccharose
3,37 ml	dH ₂ O
0,666 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	

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. Material und Methoden

2.4.4 Lösungen Polyacrylamidgele

Sequenziergel (6%ig):

4,2 ml	Long Ranger Gel-Solution
14,7 g	Harnstoff
4,2 ml	10x TBE
ad 35 ml	dH ₂ O
233 µl	10% APS
23 µl	TEMED

2.4.5 Lösungen Northern-Blot-Analyse

10 X MOPS-Puffer, pH 7,2:

0,2 M MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)
0,05 M NaAcetat
0,01 M EDTA
ad 500 ml dH₂O
autoklavieren

Gelneutralisierung:

50 mM NaOH
0,5 M Tris/HCl pH 7

2. Material und Methoden

Northern-Blotpuffer:

10 x SSC

Hybridisierungspuffer:

1 M Na₂HPO₄ pH 7,2

5 M NaCl

0,2 M EDTA pH 7,6

14 % SDS

10 % Formamid

ad 100 ml dH₂O

Waschpuffer 1:

2 x SSC

0,1 % SDS

Waschpuffer 2:

0,1 x SSC

0,1 % SDS

2.5 Molekularbiologische Kits

Kits folgender Firmen fanden Verwendung:

Blood&Cell Culture DNA Mini Kit	QIAGEN	Hilden
ECL Western Blotting System	Amersham Pharmacia	Freiburg
CpGenome™ DNA Modification Kit	Q-Biogene	Heidelberg
Proteinassay DC	BioRad	München
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN	Hilden
QIAprep Spin® Mini Kit	QIAGEN	Hilden
Thermo Sequenase, DYEnamic		
Direkt cycle sequencing kit	Amersham Pharmacia	Freiburg

2. Material und Methoden

SequiTherm EXEL™ II DNA Sequenzierung KIT	Epicentre Technologies, über Biozym	
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen	Groningen, NL
Das LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I-Kit	Roche	Mannheim

2.6 Enzyme

HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN	Hilden
Restriktionsendonukleasen	Roche	Mannheim
	MBI Fermentas	St. Leon-Rot
SequiTherm EXCEL™ II DNA Polymerase	Epicentre Technologies über Biozym	Madison, USA Oldendorf
SuperScript II Reversen Transkriptase	Invitrogen	Groningen, NL
Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas	St. Leon-Rot

2.7 Antikörper

anti- α -tubulin 3-5-1-2	Sigma Aldrich Chemie	Deisenhofen
HRP-conjugated anti-mouse antibody aus ECL-Kit	Amersham-Pharmacia	Freiburg
Dnmt-1 60B1220	BioCarta Europe GmbH	Hamburg
c-Myc (9E10): sc-40	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg

2.8 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Selbst entworfene Primer wurden durch Verwendung der Programme *Oligo 4.1* auf ihre Amplifikationsbedingungen sowie ihre Position und Länge in der jeweils angegebenen Accession-Nr. hin überprüft und ausgewählt.

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz	Amplifikation	Verwendung	Referenz / Acc.Nr.
Äußerer Primer1: XISTbsfw	5'-GTTTAGAAATGAAGTTTATTTTA-3'	437 bp	1. nested PCR XIST Region I	U80460; 18144-18168
Äußerer Primer 2: XISTbsrev	5'-CTCAAAATATTCCAAATACTTC-3'	437 bp	1. nested PCR XIST Region I	U80460; 18559-18581
Innerer Primer 1 : NestXISTbsfw	5'-TTGTTTTTATTGGGTAAATTTTG-3'	365 bp	2. nested PCR XIST Region I	U80460; 18216-18238
Innerer Primer 2 : XISTbsrev	5'-CTCAAAATATTCCAAATACTTC-3'	365 bp	2. nested PCR XIST Region I	U80460; 18559-18581
Äußerer Primer 1: XCRfwbs1	5'-GAAAGTATTTGGAATATT-3'	552 bp	1. nested PCR XCR Region II	U80460; 18559-18581
Äußerer Primer2 : XCRrvbs1	5'-CAACCCACAAAACCAAC-3'	552 bp	1. nested PCR XCR Region II	U80460; 19095-19111
Innerer Primer1 : XCRfwNestbs	5'-TTGGAATTATTTTGGTTG-3'	500 bp	2. nested PCR XCR Region II	U80460; 18611-18629
Innerer Primer2 : XCRrvbs1	5'-CAACCCACAAAACCAAC-3'	500 bp	2. nested PCR XCR Region II	U80460; 19095-19111
GAPDH350s	5'TCCCATCACCATCTTCCA3'	379 bp	RT-PCR	M33197
GAPDH350as	5'CATCACGCCACAGTTTCC3'	379 bp	RT-PCR	M33197
β-actin-fw	5'TGACGGGGTCAC3'	661 bp	RT-PCR	Stratagene
β-actin-rv	5'CTAGAAGCATT3'	661 bp	RT-PCT	Stratagene
QXIST1	5'ACGCTGCATGTGTCCTTAGTAGTC3'	102 bp	RT-PCR	Chow <i>et al.</i> 2002
QXIST2	5'ATTGAGCCTCTTATAGCTGTTTG3'	102 bp	RT-PCR	Chow <i>et al.</i> 2002
XIST_fw	5'GTGGATAGAACACTGACTCTTGC3'	717 bp	RT-PCR	Kawakami <i>et al.</i> 2003/M97168 10705-10727
XIST_rv	5'GAGCCTAAGGAGACATGACTACT3'	717 bp	RT-PCR	Kawakami <i>et al.</i> 2003 / M97168 ; 11400-11422
XCR-U-fw	5'TGTTTTTTTGTATTGGGGTTGTG3'	280 bp	MS-PCR	Kawakami <i>et al.</i> 2004 / M97168

2. Material und Methoden

XCR-U-rv.2	5' ACAACTAACCTAAACCAATTATA CA3'	280 bp	MS-PCR	Kawakami <i>et al.</i> 2004 / M97168
XCR-M-fw	5' TGT TTT TTT TGT TAT CGGGGTCGCG3'	264 bp	MS-PCR	Kawakami <i>et al.</i> 2004 / M97168
XCR-Mrv	5' CGAATTATACGACAAATCTAAATA ACG3'	264 bp	MS-PCR	Kawakami <i>et al.</i> 2004 / M97168
XMF	5' AATTAAAGTAGGTATTCGCGGTTC G3'	241	MS-PCR	Weinhausel <i>et al.</i> 2001 / U80460
XMR	5' TTTTCCTTAACCCATCGAAATATC G3'	241	MS-PCR	Weinhausel <i>et al.</i> 2001 / U80460
XUF	5' AAAAGTGGTTGTTATTTTAGATTTG TT3'	198	MS-PCR	Weinhausel <i>et al.</i> 2001 / U80460
XUR	5' CTACCTCCCAATACAACAATCACAC 3'	198	MS-PCR	Weinhausel <i>et al.</i> 2001 / U80460
T3	5'*AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG3'	-	Sequenzierung	-
M13fwd (-29)	5'*CAC GAC GTT GTA AAA CGA C3'	-	Sequenzierung	-

2.9 Vektoren

2.9.1 Plasmide

Folgende Plasmide fanden Verwendung:

pCR4[®]-TOPO[®]

Invitrogen

Groningen, NL

pCMV-HMT-neo

Dr. P. M. Vertino

Johns Hopkins Oncology
Center, Baltimore

2. Material und Methoden

2.10 Bakterien

2.10.1 Bakterienstämme und ihre Aufzucht

Folgende Bakterienstämme fanden Verwendung:

E.coli-Stamm TOP10 (Firma Invitrogen, Groningen, NL)

F^{mcrA} Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

E. coli-Stamm XL2blu MRF⁺ (Firma Stratagene, Amsterdam, NL)

Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 lac [F⁺proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam]

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) für mind. 14 Stunden. Zur Selektion von Plasmid-Transformanten wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Zur kurz- bis mittelfristigen Aufbewahrung wurden die Bakterien auf entsprechenden LB-Agarplatten bei 4°C gelagert. Für eine langfristige Sicherung von Bakterienklonen wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei –70°C eingefroren.

2.10.2 Transformation kompetenter TOP10/ XL2blu MRF⁺-Zellen

2 µl T/A-Ligationsansatzes (vgl. 2.20.2) wurden zu den langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurden die Zellen in 250 µl SOC-Medium bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden zwischen 50 µl und 200 µl der Bakteriensuspension auf mit Ampicillin versetzten LB-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2. Material und Methoden

2.11 Gewebe- und Blutproben

Gewebeproben für die Isolierung von DNA und RNA standen von Patienten der Urologischen Klinik zur Verfügung. Alle Gewebe wurden unmittelbar nach Begutachtung durch einen Pathologen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Harnleiter zur Kultivierung von normalen uroepithelialen Zellen wurden aus Nephrektomie-Operationen der Urologischen Klinik zur Verfügung gestellt. Für die Isolierung von DNA und RNA aus Blutproben wurde EDTA-Blut von Patienten der Urologischen Klinik verwendet. Die Einwilligung aller Patienten wurde mittels eines Formblattes routinemäßig eingeholt, und die Ethikkommission der HHU hat über die entsprechenden Projekte positiv entschieden.

2.12 Humane Zelllinien und ihre Kultivierung

2.12.1 Etablierte Zelllinien

Die Harnblasenkarzinomzelllinien VMCub1 und SW1710 stammen ursprünglich von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, NY, USA. Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft.

Die Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP wurde von Prof. Schmitz-Dräger, Urologische Klinik HHU, zur Verfügung gestellt. Die Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3 bzw. 22RV1 stammen von Prof. Culig, Urologisches Forschungslabor der Medizinischen Universität Innsbruck bzw. von Dr. Meye, Karl Gustav Carus Universität Dresden.

Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontaminationen durch Mykoplasmen hin getestet.

2. Material und Methoden

2.12.2 Kultivierung von Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Die adhärent wachsenden Harnblasenkarzinom-Zelllinien VmCub1 und SW1710 wurden in 175 cm² Kulturflaschen in 12 ml Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Gibco BRL) mit 15% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 10 mg/ml Gentamycin bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Sie wurden alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:5 passagiert. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/ 0,02%) 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die vom Flaschenboden abgelösten Karzinomzellen wurden in 10 ml Medium/FCS aufgenommen und bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Zur Weiterkultivierung wurden 1-2 ml der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

Für eine langfristige Aufbewahrung wurden die trypsinisierten Zellen in 1 ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO suspendiert und in 2 ml-Kryoröhrchen überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht bei -80°C und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C angetaut, in 10 ml kaltem Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 400 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das in Medium resuspendierten Zellpellet in neuen Kulturflaschen ausgesät.

2.12.3 Kultivierung von Prostatakarzinom-Zelllinien

Die Prostatakarzinom-Zelllinien wurden in gleicher Weise wie die Harnblasenkarzinom-Zelllinien kultiviert.

2.13 Anlegen von humanen Urothel-Primärkulturen

Gewebe zur Isolierung uroepithelialer Zellen wurden in HBSS mit 10 mM Hepes und 20 KIU/ml Aprotinin transportiert. Die Präparation und Kultivierung erfolgte nach Southgate *et al.* (1994). Der Harnleiter wurde freipräpariert, mit PBS gewaschen, der Länge nach aufgeschnitten und mit der Muskosa-Seite nach oben bei 4°C über Nacht in PBS unter Zusatz von 0,1% EDTA und Aprotinin inkubiert. Die PBS-Lösung wurde abgesaugt und die

2. Material und Methoden

oberste Mukosa-Schicht wurde mit Pasteur-Pipetten in KFSM (Keratinozyten Serum Freies Medium) unter Zusatz von 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat, 100 U/ml Penicillin, 4 ng/ml EGF, 30 ng/ml Choleratoxin und 1% Rinderhypophysenextrakt abgeschabt. Die Mukosastückchen wurden mit einer Glas-Pipette abgesaugt, durch Pipettieren weiter suspendiert und in einer mit Kollagen Typ IV beschichteten 175 cm² Kulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Bei einem Konfluenzgrad von ca. 80% wurden die Zellen 1:3 passagiert.

2.14 MTT-Test

Der MTT-Test dient zur Messung von Lebensfähigkeit und Wachstum. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, daß das schwach gefärbte 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl-tetrazolium-Bromid (MTT) in lebenden Zellen durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien in stark gefärbte Formazanderivate umgewandelt wird. Nach der Lyse der Zellen kann die Intensität der Formazanlösung photometrisch bestimmt werden (Testwellenlänge 570nm, Referenzwellenlänge 620 nm).

Der MTT-Test wurde zur Messung der Toxizität der Transkriptionsinhibitoren α -Amanitin, Actinomycin D und des Translationsinhibitors Cycloheximid für die Harnblasenkarzinom-Zelllinien SW1710 und VmCub1 durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 48 Stunden in Medium unterschiedlicher Konzentrationen der Inhibitoren in Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Zugabe von 20 µl steriler MTT-Lösung und Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden unter 10 minütigem Schütteln in 100 µl MTT-Lysispuffer aufgelassen. Die photometrische Auswertung erfolgte am ELISA-Reader.

	Konzentration in µg/ml				
α -Amanitin	0	1	2	4	8
Actinomycin-D	0	1	2	4	8
Cycloheximid	0	5	10	20	40

2. Material und Methoden

2.15 Transkriptions- und Translationsinhibierung in Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Urothel-Primärkulturen

Die Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Primärkulturen wurden wie unter 2.12.2 und 2.13 beschrieben bis zu einem Konfluenzgrad von ca. 80-90% kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in den entsprechenden Medien aufgenommen, abzentrifugiert und resuspendiert. VmCub1, SW1710 und die Primärkulturzellen wurden in einer Verdünnung von 1:12, 1:8 und 1:4 in jeweils acht bzw. vier 175 cm² Kulturflaschen im entsprechendem Medium ausgesät und weiterkultiviert. Bei einem Konfluenzgrad von ca. 40% bzw. ca. 70% wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und Medium mit den Transkriptionsinhibitoren bzw. mit dem Translationsinhibitor zugegeben (vgl. 2.14). Nach Inkubationszeiten von 0,5, 1, 2, 4 und 8 Stunden bzw. 2, 4, 8, 12, 24, 31, und 48 Stunden wurde das Medium abgenommen. Die Gesamt-RNA wurde wie unter 2.16.3 beschrieben isoliert. Die Proteinextrakte wurden wie unter 2.24.1 beschrieben gewonnen.

2.16 Isolierung von Nukleinsäuren

2.16.1 Plasmid-DNA

Plasmidisolierung bis 20 µg DNA aus transformierten E. coli-Zellen (Minipräp) erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. 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 Restriktionsenzymys verdaut.

2. Material und Methoden

2.16.2 Genomische DNA

Die Isolierung hochmolekularer genomischen DNA aus Gewebe, Kulturzellen 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.

2.16.3 Kulturzellen

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 175 cm²-Kulturflasche wurden nach Absaugen des Mediums trypsiniert und unter Zugabe von Medium/FCS mit 1500 x g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in einem Volumenteil Zell-Lysispuffer und 3 Volumenteilen dH₂O resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen unter der Zugabe des Nukleus-Lysispuffers und QIAGEN Proteinase K [20 mg/ml] über Nacht bei 50°C inkubiert.

2.16.4 Gewebe

Zunächst wurden die Gewebestücke in einem trockeneisgekühlten Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver homogenisiert. 100 mg Gewebepulver wurde nach Zugabe des Lysispuffer und QIAGEN Proteinase K [20 mg/ml] über Nacht bei 50°C inkubiert.

2.16.5 EDTA-Blut

5 ml EDTA-Blut wurden mit 5 ml Zell-Lysispuffer und 15 ml dH₂O für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Nucleuli wurden mit 1500 x g pelletiert, in Nukleulus-Lysispuffer und QIAGEN Proteinase K [20 mg/ml] über Nacht bei 50°C inkubiert.

2. Material und Methoden

2.17 RNA-Isolation

2.17.1 RNA-Präparation aus Kulturzellen

Die Isolierung der RNA aus den Blasenkarzinom- und Prostatakarzinom-Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy-Kits nach Angaben des Herstellers.

2.17.2 RNA- Präparation aus EDTA-Blut

Die Isolierung der RNA aus EDTA-Blut wurde mit Hilfe des RNaeasy Blood Mini-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.18 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung für die genomische DNA, Plasmid-DNA und RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm und 280 nm in einer 1:25 Verdünnung.

2.19 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kit* 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 und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Die DNA wurde auf ein Silicagel-Säulchen aufgetragen und nach einem Waschschriff mit 10 µl dH₂O aus der Membran eluiert.

2. Material und Methoden

2.20 Enzymatische Reaktionen

2.20.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Untersuchung der gewonnenen Plasmid-DNA oder zur Isolierung definierter DNA-Fragmente wurden 2 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen in einem 4-8-fachen Überschuß (2-4 U/µg DNA) in dem entsprechenden Puffer 1 h bei 37°C verdaut.

2.20.2 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, indem man einen T/A-Klonierungsvektor verwendet, der einen komplementären Thymidin-Überhang aufweist. Nach Aufreinigung des zu klonierenden PCR-Produktes (vgl. 2.19) wurden 4 µl davon mit 10 ng pCR-TOPO-Vektor, 120 mM NaCl und 6 mM MgCl₂ auf ein Volumen von 10 µl gebracht und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die anschließende Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes eingesetzt (vgl. 2.20.2).

2.21 Gelelektrophoretische Methoden

2.21.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben sowie ein geeigneter Längenstandard wurden mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 100-120 V aufgetrennt. Die Dichte des Gels (0,8%-2,5%) 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 einer Wellenlänge von $\lambda=302$ nm betrachtet wurde.

2. Material und Methoden

2.21.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen auf einem 1%-igen Agarosegel in 1 x MOPS-Puffer. Als Denaturierungsmittel wurde dem Agarosegel Formaldehyd in einer Endkonzentration von 2,9 % zugegeben. 10 µg RNA wurden in 1 x MOPS-Puffer, 17,5 % Formaldehyd und 50 % deionisiertem Formamid für 15 Minuten bei 68°C denaturiert. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurden diese auf das Gel aufgetragen und bei 4°C aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 3 x für 5 Minuten in DEPC-H₂O geschwenkt, um dem Gel das Formaldehyd zu entziehen.

2.21.3 Sequenziergele

Zur Erstellung eines 0,2 mm dicken Gels wurden 35 ml der unter 2.4.4 beschriebenen Acrylamid-Sequenziergel-Lösung zwischen gesäuberte Glasplatten gegossen und nach Einsetzen eines Vorkamms 60 Minuten auspolymerisiert. Das Gel wurde in 1 x TBE-Laufpuffer in das LI-COR-Sequenziergerät eingesetzt und nach Entfernung des Vorkamms für mind. 15 Minuten einem Vorlauf bei 1500 V unterzogen. Danach wurde die Gelkante mit 1 x TBE-Puffer gespült, ein Haifischzahnkamm eingesetzt und 1 µl der frisch denaturierten Sequenzierprobe je Spur aufgetragen. Die Fragmente wurden über Nacht elektrophoretisch bei 1500 V aufgetrennt. Die anschließende Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels der serienmäßigen LI-COR-Software des Sequenziergerätes.

2.22 DNA-Analyse mit Hilfe von Bisulfit

2.22.1 Bisulfitumwandlung

Die chemische Umwandlung von Cytosinbasen in Uracil innerhalb denaturierter genomischer DNA mittels Bisulfit beruht auf einer Methode nach Clark *et al.* [1994]. Die DNA-Proben wurden mit dem *CpGenome DNA Modification Kits* nach Angaben des Herstellers Q-Biogene behandelt. Es wurde jeweils 1 µg DNA zur Umwandlung eingesetzt und nach Fällung der DNA in 20 µl dH₂O aufgenommen. Die Proben wurden bei –20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2. Material und Methoden

2.22.2 Nested-PCR

Für die Sequenzierung wurden bisulfitmodifizierte DNA-Proben nach folgenden Bedingungen in einer Nested-PCR amplifiziert.

Ein Standard-Reaktionsansatz enthält in einem Reaktionsvolumen von 50 µl 100 ng Bisulfit umgewandelte DNA, je 20 pmol Primer, 3,0 mM MgCl₂, 150 µM dNTP-Mix, 1x PCR-Puffer und 1 U Hot-Star-Polymerase. Das Reaktionsgemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und auf den Biometra TRIO Thermoblock wie folgt gewählt:

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	15 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	} 35
Primer-Anlagerung	X°C	30 sec	
Primer-Verlängerung	72°C	1 min	
Primer-Verlängerung	72°C	12 min	1

Programm-Schritt	Primerpaar	Temperatur X=
Primer-Anlagerung	XISTbsfw / XISTbsrv	58°C
Primer-Anlagerung	NestXISTbsfw / XISTbsrv	56°C
Primer-Anlagerung	XCRfwbs1 / XCRrvbs1	52°C
Primer-Anlagerung	XCRfwNestbs / XCRrvbs1	56°C

Es wurden jeweils 40 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer versehen und über ein 2%-iges

2. Material und Methoden

Agarosegel aufgetrennt. Die Isolierung der PCR-Fragmente erfolgte wie unter 2.19 beschrieben.

Das PCR-Fragment wurde in den Sequenzierungsvektor *pCR4-TOPO* (vgl. 2.20.2) kloniert und in *TOP10 E. coli*-Zellen transformiert (vgl. 2.10.2).

2.22.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der bisulfitumgewandelten DNA wurde mit Hilfe des *SequiThermTMII DNA Sequencing Kits* durchgeführt. Die Markierung der DNA erfolgte durch Verwendung von IRD800-gekoppelten Oligonukleotiden. Über die Fluoreszenzmarkierung erfolgte die Detektion der DNA-Stränge. Gelelektrophorese und Detektion wurden mit dem LI-COR-Sequencer 4000/4200 durchgeführt. Zunächst wurde ein Sequenzier-Premix, bestehend aus einem Gesamtvolumen von 17 µl mit je 3 µg DNA, je 4 pmol der Sequenzierprimer T7 oder M13, 7,2 µl 3,5 x SequiTherm Exel II Sequenzierungs-Puffer und 5 U SequiTherm EXEL II DNA Polymerase, hergestellt. In 0,5 ml Reaktionsgefäßen wurden 2 µl des jeweiligen Di-Desoxynukleotidlösung mit 4 µl Premix vermischt und mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Die Denaturierungs- und Primer-Verlängerungsschritte erfolgten im TRIO-Thermoblock.

Die Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	5 min.	} 2
Primer-Anlagerung	Raumtemperatur	5 min.	
Primer-Verlängerung	70°C	5 min	

Anschließend wurden 5 µl der Sequenzierreaktion mit 2 µl *Stop Loading Buffer* (Amersham) vermischt, 5 Minuten bei 96°C denaturiert und sofort auf das Sequenziergel (vgl. 2.4.4) aufgetragen.

2. Material und Methoden

2.22.4 Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR)

Die MS-PCR (*methylation-specific-PCR*) wurde für das *XIST*-Gen nach einer Methode von Herman *et al.* [1996] leicht modifiziert durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 100 ng bisulfitbehandelte DNA in 1x PCR-Puffer mit 20 pmol je Primer, 3,0 mM MgCl₂, 150 mM dNTP-Mix und 1,0 U Qiagen Hotstar Taq mit einem Tropfen Öl überschichtet und im Biometra TRIO-Thermoblock wie folgt amplifiziert:

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	15 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	} 35
Primer-Anlagerung	*60°C/63°C	30 sec	
Primer-Verlängerung	72°C	45 sec	
Primer-Verlängerung	72°C	7 min	1

*Die Temperatur der Primeranlagerung betrug für die nicht-methylierungsspezifischen Primer 63°C und für die methylierungsspezifischen Primer 60°C.

2.23 Reverse Transkription

Die Transkription von mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe der SuperScript II Reversen Transkriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Promega durchgeführt. In einem Voransatz von 12 µl wurden zunächst 2 µg zelluläre RNA mit Wasser, 500 ng Oligo dT₁₅-Primer und 10 mM dNTP-Mix für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Auf Eis wurden 7 µl eines Ansatzes, bestehend aus 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 40 U RNase-Inhibitor, zunächst 2 Minuten und nach Zugabe von 200 U SuperScript II RT weitere 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach einer Inaktivierung bei 70°C wurden die entstandenen cDNAs bei -80°C gelagert.

2. Material und Methoden

2.24 Proteinanalyse-Verfahren

2.24.1 Herstellung von Zell-Lysaten für die Proteinanalyse

Zur Proteinextraktion wurden 2 ml Proteinlysepuffer auf eine mit PBS gewaschene, konfluent bewachsene 175 cm² Zellkulturflasche gegeben und 1 h auf Eis geschwenkt. Um die Viskosität des Lysats zu minimieren, wurde es 3-4 mal durch eine 27G Nadel passiert.

2.24.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Durchführung der Proteinbestimmungen wurden 10 µl des Lysats auf einer ELISA-Platte mit 4 µl der im Pierce BCA-Protein Assay enthaltenen Lösung A und 196 µl Lösung B vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen. Als Proteinstandard diente eine Albumin-Verdünnungsreihe. Der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wurde über die Standardreihe berechnet.

2.24.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und ihrer durch das angelagerte SDS erzeugten Nettoladung, wobei die Eigenladung der Proteine zu vernachlässigen ist (Laemmli, 1970). Es wurden jeweils 20 µg Gesamtproteinextrakt mit 10 µl Lämmli-puffer (5x) vermischt, 5 Minuten bei 96°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung ins Eisbad gestellt. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel und Trenngel lag bei 8%. Es wurden vertikal laufende Minigele von 6,2 x 8,7 cm in Verbindung mit der Apparatur Mini-V8.10 der Firma Life Technologies verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 140V bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

2. Material und Methoden

2.24.4 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel in Blotpuffer äquilibriert. Für die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Fa. Milipore) wurde das „Tankblotting“-Verfahren angewendet (Blotkammer der Fa. Wattman). Zwischen beide Teile der Gitterkammer wurde ein „Sandwich“, bestehend aus einem Transferkissen, einer Lage Whatman Papier, der in 100% Methanol aktivierten PVDF-Membran, dem SDS-Gel, einer weiteren Lage Whatman Papier und dem zweiten Transferkissen, gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte für mind. 1,5 Stunden bei 150 V (konst. Spannung).

2.24.5 Immunochemische Detektion

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden bei 4°C über Nacht mit 10% (w/v) Milchpulver in TBS abgesättigt. Die Bindung des Primärantikörpers (Dnmt-1 60B1220 1:250, anti- α -tubulin 3-5-1-2 1:5000, c-Myc (9E10): sc-40 1:500) erfolgte in 5% (w/v) Milchpulver in TBS bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges zehninütiges Waschen mit TBS/0,1% Tween entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem peroxidasegekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper (1:2000 in TBS / 5% Milchpulver) erneut für 1 Stunde inkubiert. Nach abschließender dreifachen Waschung wurde ca. 0,125 ml/cm² Membran ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 gemischt und zur Proteindetektion exakt 1 Minute lang auf die abgetropfte Membran aufgebracht.

2.25 Northern-Blot

Die in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA wurde zur weiteren Untersuchung auf eine Hybond H+-Nylonmembran kapillargeblottet. Dazu wurde das Agarosegel für 30 Minuten in 50 mM NaOH geschwenkt, um die RNA partiell zu hydrolysieren. Nach einer 30-minütigen Neutralisierung in 0,5 M Tris/HCl (pH 7) wurde der Kapillarblot luftblasenfrei aufgebaut. Die RNA wurde über Nacht in 10 x SSC-Blotpuffer auf die Nylonmembran geblottet. Nach einem 5-minütigem Waschschrift in 2 x SSC-Puffer wurde die RNA durch 2 minütige Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) auf der Membran fixiert. Diese wurde bis zur

2. Material und Methoden

Hybridisierung bei -20°C gelagert.

2.26 Herstellung markierter Sonden

Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Church und Gilbert [1984]. Die Membranen wurden bei 65°C für mindestens eine Stunde in der Hybridisierungslösung (vgl. 2.4.5) vorinkubiert. Als Hybridisierungssonde für die XIST-mRNA diente ein 1,1 kbp großes Plasmid-cDNA-Fragment, welches durch eine Restriktion von pCMV-HMT-neo mit *Bam*HI gewonnen wurde. Für die Kontrollhybridisierung wurde die GAPDH-cDNA (1,3 kbp) als Sonde verwendet. Die radioaktive Markierung der Hybridisierung wurde nach der Zufallsprimermethode mittels eines *Oligolabeling Kits* [Feinberg u. Vogelstein, 1983] mit [α - ^{32}P]-dCTP bei 37°C für 1 Stunde durchgeführt. Zur Minimierung des unspezifischen Hintergrundes in den nachfolgenden Hybridisierungsreaktionen wurden die markierten Sonden über eine MicroSpinTM Säule nach Herstellerangaben von überschüssigen Nukleotiden gereinigt.

2.27 Hybridisierung

Die Hybridisierungen erfolgten bei 65°C über Nacht mit $0,1 \text{ ml/cm}^2$ frischer Hybridisierungslösung, der 50 ng der zuvor bei 100°C für 5 Minuten denaturierten radioaktiv markierten Sonde zugesetzt wurde. Die Membranen wurden mit $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS je 30 Minuten bei 50°C und 65°C gewaschen und anschließend kurz in $2 \times \text{SSC}$ geschwenkt.

2.28 Nachweis der markierten cDNA-Sonden

Die markierten Membranen wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen und gegen Kodak X-OMAT DS-Filme je nach Intensität des Signals für eine Zeitspanne von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen bei -70°C exponiert.

2.29 Light-Cycler Real Time RT-PCR

Die Reverse Transkription von RNA, gefolgt von einer *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), ist eine extrem sensitive Methode, um spezifische mRNAs zu detektieren und zu quantifizieren. Aus Geweben oder Zellen isolierte RNA wurde im ersten Schritt als Template für die Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) mittels SuperScript II Reversen Transkriptase eingesetzt. Die cDNA wurde wiederum als Template für die folgende PCR verwendet, die mit spezifischen Primern arbeitet, um eine bestimmte cDNA-Region zu amplifizieren. Um bessere quantitative Aussagen über eingesetzte mRNA Mengen machen zu können, kommen *Real-Time* RCR-Maschinen wie der *LightCycler* von Roche zum Einsatz. Über eine Fluorimeter-Komponente erfasst der *LightCycler* die Bindung von Fluorophoren wie *SYBR Green* an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenz von *SYBR Green* wird verstärkt, wenn das Molekül an die kleine Furche der DNA bindet. Diese Bindung erfolgt sequenzunabhängig. Es wurde das Amplifikationssystem *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I* von Roche verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 10 µl nach Herstellerangaben durchgeführt. In der XIST-PCR wurde zusätzlich 1x Q-Solution (Qiagen) eingesetzt. Die Produktbildung wird nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt. Nach im Durchschnitt 40 Replikationszyklen wurden die Schmelzkurven der gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	94°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 sec	} 40
Primer-Anlagerung	59°C ^A / 65°C ^B	10 sec ^A / 20 sec ^B	
Primer-Verlängerung	72°C	15 sec ^A / 25 sec ^B	

A: Bedingungen für GAPDH

B: Bedingungen für XIST und β-Aktin

3. Ergebnisse

3.1 Methylierungsanalyse des *XIST*-Gens

Für die Untersuchungen des *XIST*-Methylierungsstatus standen 12 Prostatakarzinome, 4 Prostatakarzinom-Zelllinien, 3 Prostatanormalgewebe und Leukozyten aus peripheren Blut (PBL) zur Verfügung. Die klinischen Daten der Patienten und die Histologie der 12 Prostatakarzinomproben ist in Tabelle 6-1 zusammengefasst. Die Einstufung der Karzinome bezüglich ihres Stadiums und Grades wurde entsprechend der WHO Klassifikation von 1997 vorgenommen. Die Gewebeproben wurden wie unter 2.16.4 aufgearbeitet und zur DNA-Isolierung eingesetzt. Grundlegend für alle folgenden Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung war eine vorherige Bisulfit-Umwandlung der zu untersuchenden DNA-Proben. Bisulfit katalysiert die Desaminierung von Cytosinresten in Einzelstrang-DNA zu Uracil. 5-Methyl-Cytosin wird durch Bisulfit nicht umgewandelt und kann weiterhin als Cytosin nachgewiesen werden.

3.1.1 Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung

Durch die Sequenzierung nach der Bisulfitbehandlung konnte eine Aussage über den Methylierungszustand von insgesamt 29 CpGs in zwei Regionen des *XIST*-Gens getroffen werden (Abb. 3-1). Die erste Region umfasst den *XIST* Minimalpromotor mit 8 CpG-Stellen. Die 5 ersten CpG-Stellen liegen vor dem Transkriptionsstart. An den Minimalpromotor schließt sich die *XCR*-Region (*XIST conserved repeats*) an, in der 21 CpG-Stellen überprüft wurden. Die in Tabelle 6-1 dargestellten DNA-Proben wurden nach der Bisulfitbehandlung in einer Nested-PCR mit den entsprechenden Primern (vgl. 2.8) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den Sequenzierungsvektor pCR4 einkloniert und in den *E. coli*-Stamm TOP10 transformiert. Aus bakteriellen Einzelzellkolonien wurden die Plasmide isoliert und zum Sequenzieren eingesetzt.

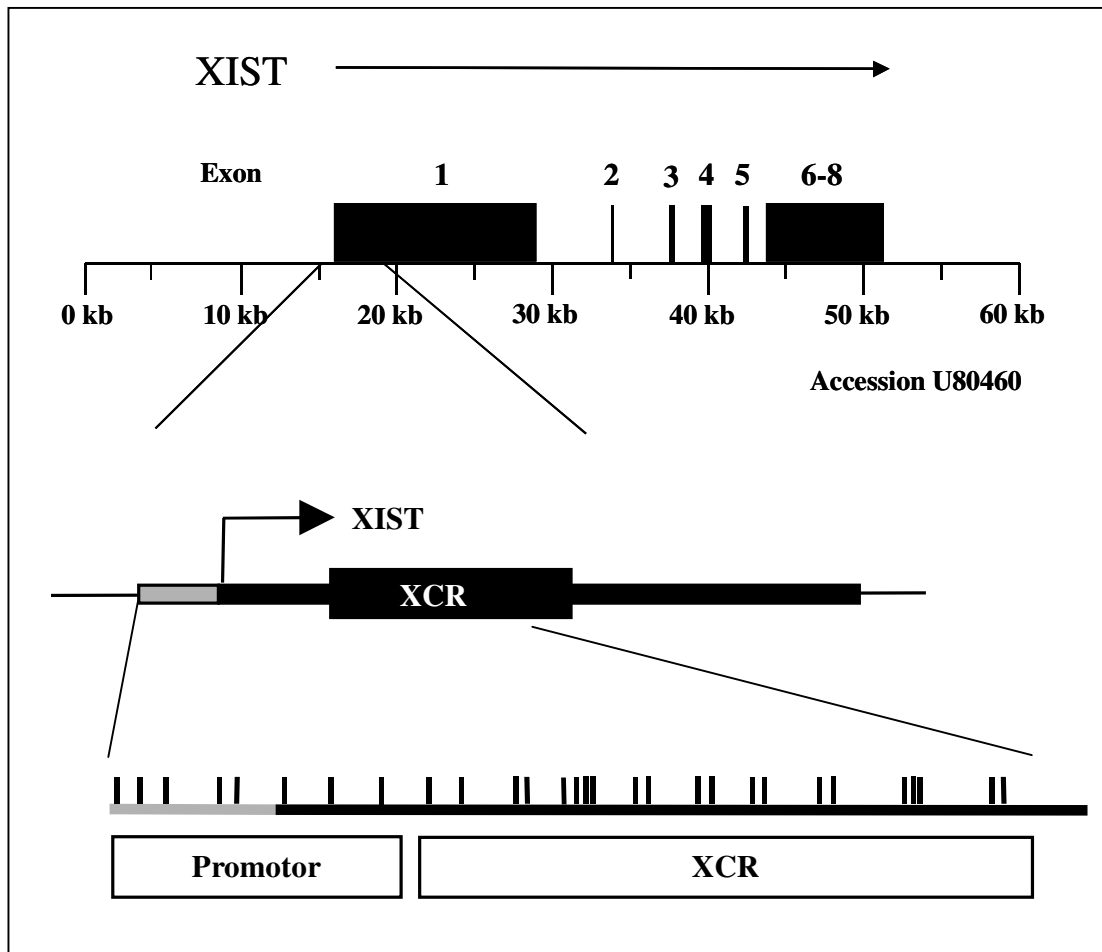


Abbildung 3-1: Sequenzierter Bereich des *XIST*-Gens, bestehend aus dem Minimalpromotor (grau) und einem Teil des *XCR*-Motivs (schwarz). Die senkrechten Balken symbolisieren die untersuchten CpG-Stellen.

3.1.2 Überprüfung auf einen PCR-Bias bei der Methylierungs-Analyse Bisulfit-umgewandelter DNA

Wenn die zu amplifizierende DNA-Region sich in ihrem Methylierungsstatus unterscheidet, dann weist die Bisulfit-umgewandelte DNA einen unterschiedlichen Cytosin-Gehalt auf. Stark methylierte DNA ist nach der Umwandlung weiterhin relativ cytosinreich, wohingegen unmethylierte DNA eine AT-reiche Sequenz besitzt. Dies ist bei der *XIST*-Promotorregion in weiblichen Zellen der Fall. Auf dem aktiven X-Chromosom der Frau ist der Promotor stark methyliert, wohingegen der Promotor auf dem inaktiven X-Chromosom unmethyliert ist. Es wäre möglich, daß eine der beiden Sequenzpopulationen während der PCR bevorzugt

3. Ergebnisse

Abbildung 3-2 stellt einen schematischen Überblick über das Methylierungsmuster in Leukozyten (PBL) von gesunden Frauen und Männern, sowie in Prostatanormalgewebe dar. Wie erwartet war der Promotor der sequenzierten Allele in Leukozyten von Frauen etwa zur einen Hälfte stark methyliert, und zur anderen Hälfte stark unmethyliert. Diese Ergebnisse stimmen mit der Vorstellung damit überein, daß in somatischen Zellen das 5'-Ende des stummen *XIST* Allels auf dem X_a methyliert ist, und das exprimierte Allel auf dem X_i unmethyliert ist. In Leukozyten der Männer war der Promotor dicht methyliert. In einigen Allelen trat vereinzelt eine unmethylierte Stelle an den 8 untersuchten CpG-Stellen auf, während die Mehrzahl der Allele vollständig methyliert waren. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in den 3 Proben des Prostatanormalgewebes festgestellt. Hier war ebenfalls die Mehrzahl der Allele vollständig methyliert und nur in einigen Allelen war eine CpG-Stelle unmethyliert. In der Probe N-222 wurde ein Allel mit 3 unmethylierten Stellen (4-6) gefunden. Im Gegensatz hierzu konnte eine deutliche Hypomethylierung in den Prostatakarzinomzelllinien beobachtet werden (Abb. 3-3). In den 3 Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP, 22RV1 und PC3 waren zwischen 32% und 39% aller CpG-Stellen unmethyliert, wohingegen DU145 mit 19% dichter methyliert war. Nur in LNCaP und DU145 wurden vollständig methylierte Allele gefunden. In den Prostatakarzinom-Zelllinien wurden Allele mit 1-7 unmethylierten Stellen gefunden, wobei häufig die CpG-Stellen an den Positionen 5-8 unmethyliert waren. Eine ähnlich hohe Hypomethylierung konnte in der zweiten CpG-reichen Region *XCR* festgestellt werden. Auch hier war DU145 die mit 13% Hypomethylierung am stärksten methylierte Zelllinie. In einigen Prostatakarzinom-Gewebeproben (Abb. 3-3) konnte ebenfalls eine Hypomethylierung festgestellt werden, die aber nicht so ausgeprägt war wie im *XIST*-Promotor der PCa-Zelllinien. Besonders in der Gruppe B und C war die Mehrzahl der Proben mit Allelen, die 2-4 unmethylierte Stellen zeigten, vertreten. Gruppe A stellt die Gruppe mit der geringsten Hypomethylierung dar. Die Proben dieser Gruppe lassen sich auf Grund ihres Methylierungsmusters und der Anzahl ihrer unmethylierter CpG-Stellen nicht von benignen Gewebeproben unterscheiden. Eine bessere Unterscheidung kann man erzielen, wenn man als Kriterium für Hypomethylierung mindestens zwei CpG-Stellen in mindestens zwei Allelen heranzieht. Hiernach wäre keine benigne Gewebeprobe, eine Tumorseite der Gruppe A, zwei Proben aus Gruppe B und alle Proben der Gruppe C positiv.

3. Ergebnisse

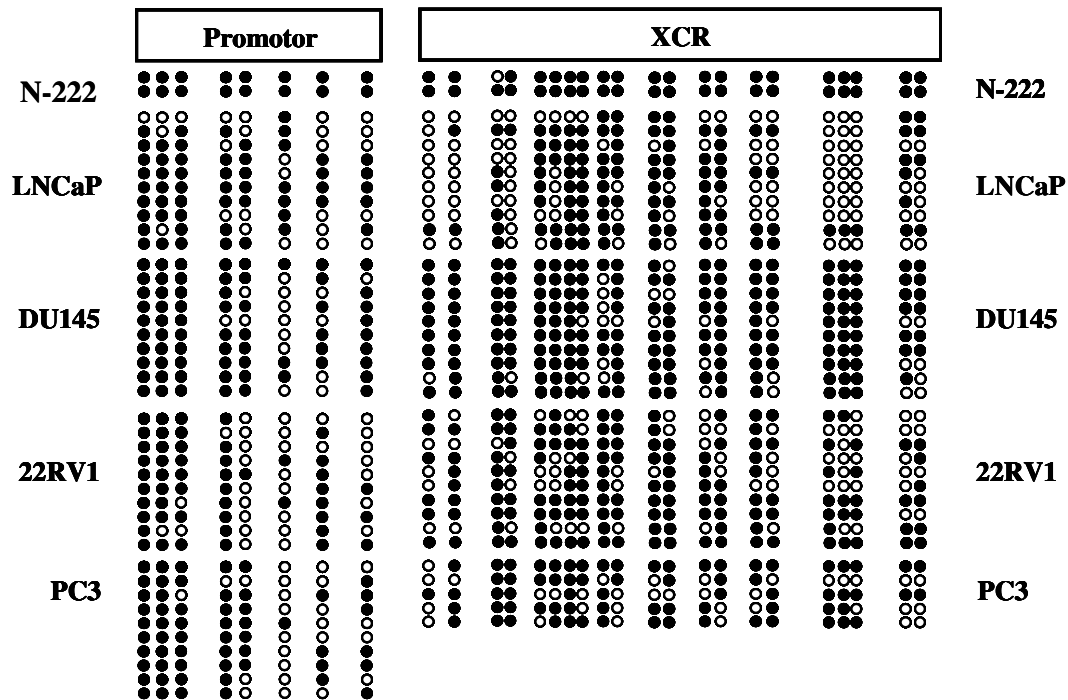
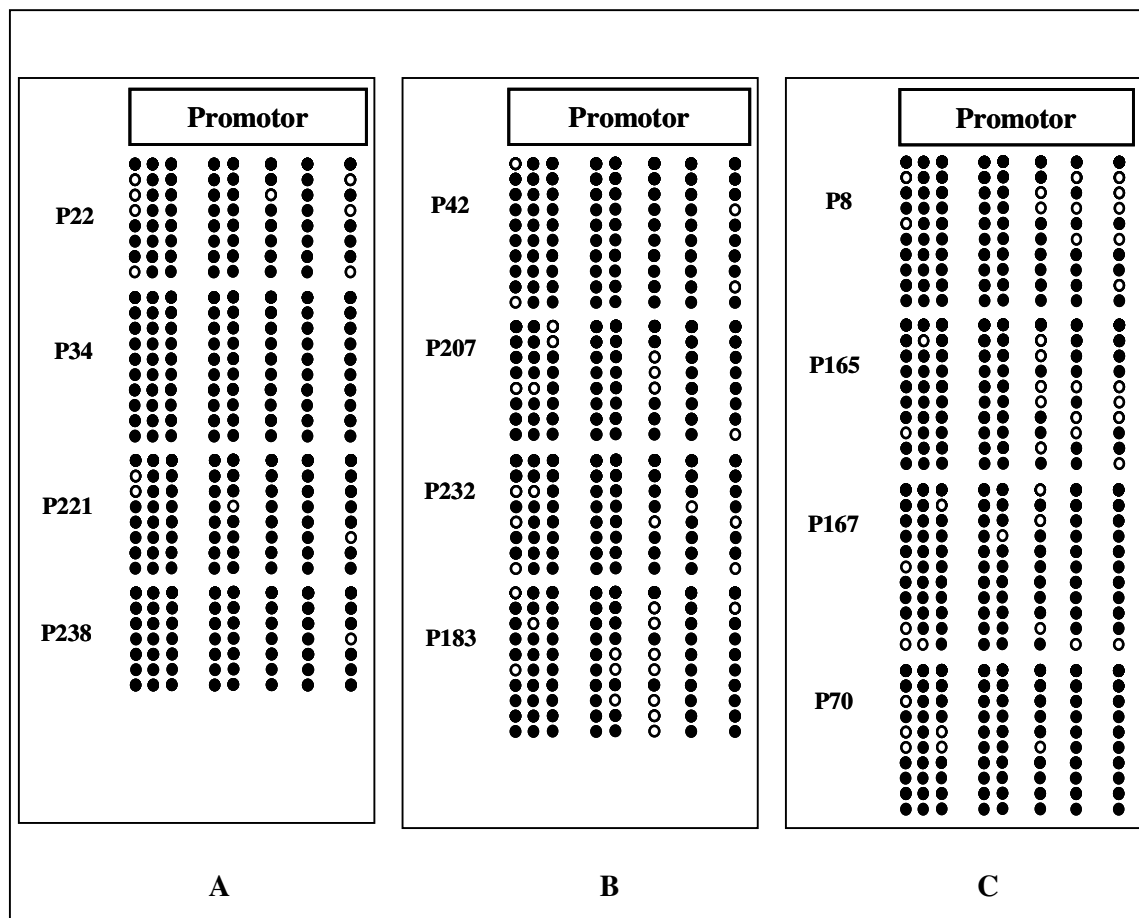


Abbildung 3-3: Methylierungsmuster des *XIST*-Promotors, des *XCR*-Motivs von Prostatakarzinom-Zelllinien (oben) und des *XIST*-Promotors von Prostatakarzinomen (unten), die Allele sind in Reihen angeordnet, schwarze Kugeln stellen methylierte, weiße Kugeln unmethylierte Cytosinreste dar.



3. Ergebnisse

3.2 Korrelation *LINE1*-Hypomethylierung / *XIST*-Hypomethylierung

In Abbildung 3-3 sind die Prostatakarzinomgewebeprobe in drei Gruppen geordnet. Gruppe A, B und C entsprechen keiner (0 %), einer mittleren (13-19 %) und einer ausgeprägten (30-49 %) *LINE1*-Hypomethylierung (vgl. Tabelle 6-2). Vergleicht man die drei Gruppen miteinander, so zeichnet sich der Trend ab, daß sich in diesen Proben mit der Zunahme der *LINE1*-Hypomethylierung die *XIST*-Hypomethylierung erhöht. In der Tat gab es eine mäßig gute Korrelation (Abb. 3-4) zwischen dem Ausmaß der *LINE1*-Hypomethylierung und dem Prozentsatz der *XIST*-Hypomethylierung. Ähnlich verhält es sich bei den Prostatakarzinom-Zelllinien. Hier zeigen die 3 Zelllinien LNCaP, 22RV1 und PC3 eine ausgeprägte Hypomethylierung sowohl in den *LINE1*-Sequenzen wie auch im *XIST*-Promotor und dem *XCR*-Motiv. DU145 zeigte die niedrigste *LINE1*-, *XIST*- und *XCR*-Hypomethylierung.

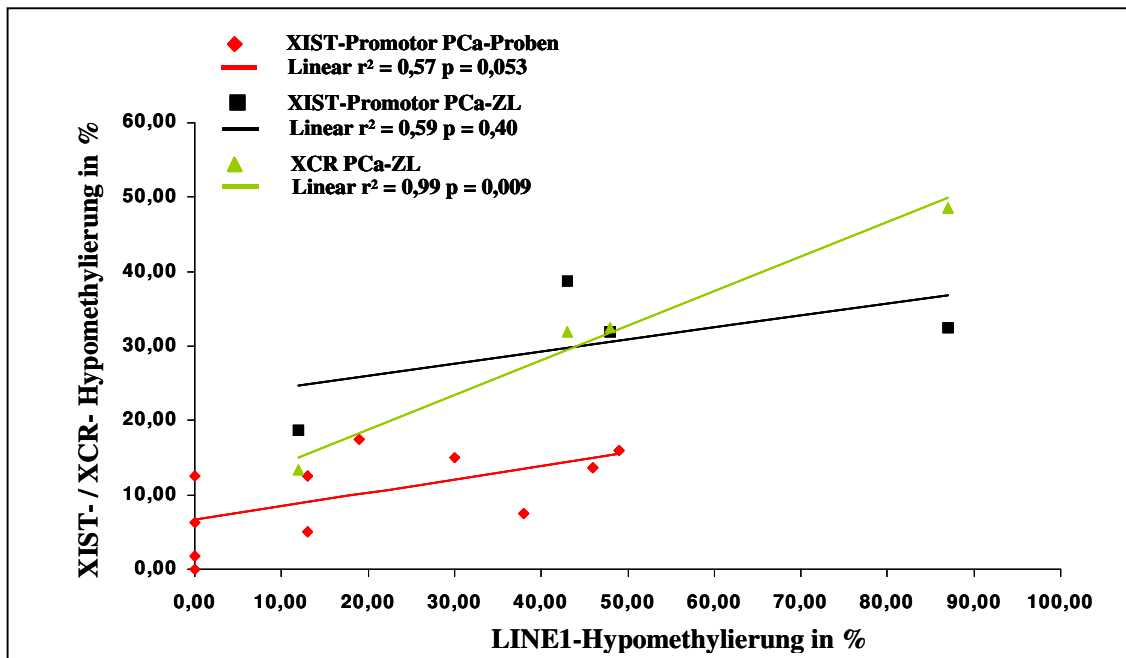


Abbildung 3-4: Korrelation zwischen dem Ausmaß der *LINE1*- und der *XIST*- bzw. *XCR*-Hypomethylierung in PCa-Proben und PCa-Zelllinien

3.3 Expressionsanalyse von XIST

Betrachtet man die Methylierungsmuster der stark hypomethylierten Prostatakarzinomproben und besonders das der Prostatakarzinom-Zelllinien, so fällt auf, daß sie sich dem Muster auf dem inaktiven X-Chromosom in weiblichen Zellen annähern. Da in weiblichen Zellen die XIST-mRNA exprimiert wird, wurde überprüft, ob die Hypomethylierung zu einer Expression des XIST-Gens in männlichen Zellen führt. Dazu wurden zunächst die von allen Proben am stärksten hypomethylierten Prostatakarzinomzelllinien in einer Standard-PCR und später zusätzliche Proben in der sensitiveren und quantitativeren Realtime-RT-PCR auf ihre XIST-Expression überprüft.

3.3.1 Standard-RT-PCR

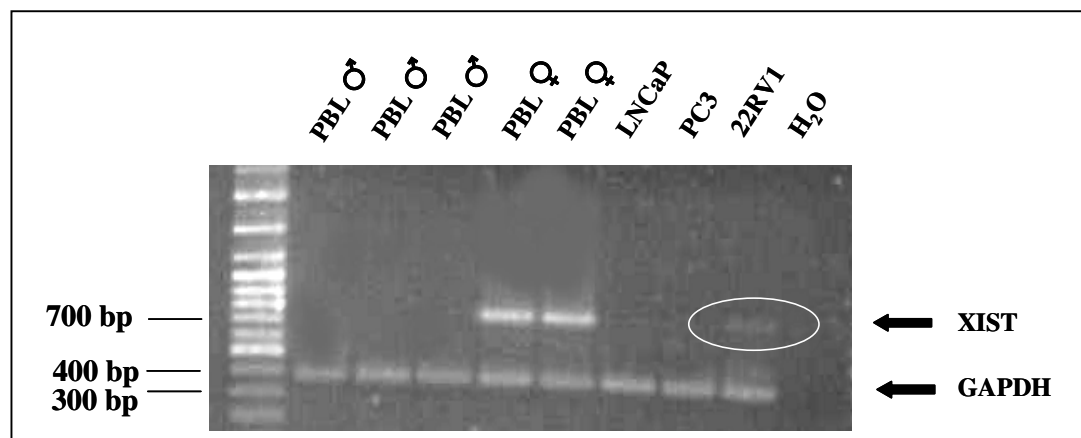


Abbildung 3-5 : RT-PCR-Analyse der XIST-Expression in Leukozyten und in PCa-Zelllinien

Als erstes wurde der XIST Expressionsstatus in den drei Zelllinien LNCaP, PC3 und 22RV1, die die stärkste Hypomethylierung aufwiesen, überprüft. Die mittels RT-PCR aus mRNA gewonnen cDNAs (vgl. 2.23) wurde zum einen mit den für das XIST spezifischen Primern (vgl. 2.8) XIST_fw und XIST_rv zu einem 717 bp Fragment amplifiziert, zum anderen ergab sich mit den Primern GAPDH350.1-s und GAPDH.1-AS ein 379 bp cDNA-GAPDH-Amplifikat zum semiquantitativen Vergleich. Abb. 3-5 zeigt das Ergebnis der Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2%-igen Agarosegel. In allen untersuchten Proben war das GAPDH-

3. Ergebnisse

Transkript nachzuweisen. Die in der Expressionsanalyse als Negativprobe fungierenden Leukozyten von Männern zeigten kein Transkript. Wie erwartet wiesen die Leukozyten der Frauen ein XIST-PCR-Produkt auf. Von den drei Zelllinien zeigte nur 22RV1 eine gerade zu erkennende genspezifische Bande.

3.3.2 Real-Time-RT-PCR Analyse der XIST-Expression

Da die Expression von XIST der relativ stark hypomethylierten Zelllinie 22RV1 ein sehr schwaches Signal geliefert hat und bei den stärker methylierten Prostatakarzinomproben mit einem noch schwächeren Signal zu rechnen war, wurde die wesentlich sensitivere Real-Time-PCR-Methode zur Expressionsanalyse eingesetzt. Neben den vier Prostatakarzinom-Zelllinien wurden drei Prostatanormalgewebeproben und fünf Prostatakarzinomproben auf ihren XIST Expressionsstaus hin untersucht. Als Negativ- bzw. Positivprobe diente cDNA aus männlichen bzw. weiblichen Leukozyten. Der Transkriptnachweis erfolgte wie unter 2.29 beschrieben mit den Primern QXIST1 und QXIST2 im Vergleich zu GAPDH und β -Aktin.

Das XIST-Transkript konnte auch mit dieser Methode nach 40 Zyklen nicht in männlichen Leukozyten nachgewiesen werden, wohingegen der Wendepunkt nach 23-24 Zyklen in weiblichen Leukozyten erreicht wurde. Dies stellt bei einer Effizienz der Amplifikation von 1,8/Zyklus eine 104-fache Differenz in der Expression dar. Im Gegensatz zu den männlichen Leukozyten konnte eine deutliche XIST-Expression in den Prostatagewebeproben gefunden werden (Abb. 3-6). In den drei benignen Prostatagewebeproben reichte die XIST-Expression relativ zur β -Aktin von AU 3-19 und relativ zu GAPDH von AU 7-80. Im Vergleich wurden in den Prostatakarzinomproben Werte für XIST/ β -Aktin mRNA von AU 5-104 und für XIST/GAPDH mRNA von AU 7-251 gemessen. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hypomethylierung des *XIST* Promotors und dem Level der XIST Expression gefunden werden.

3. Ergebnisse

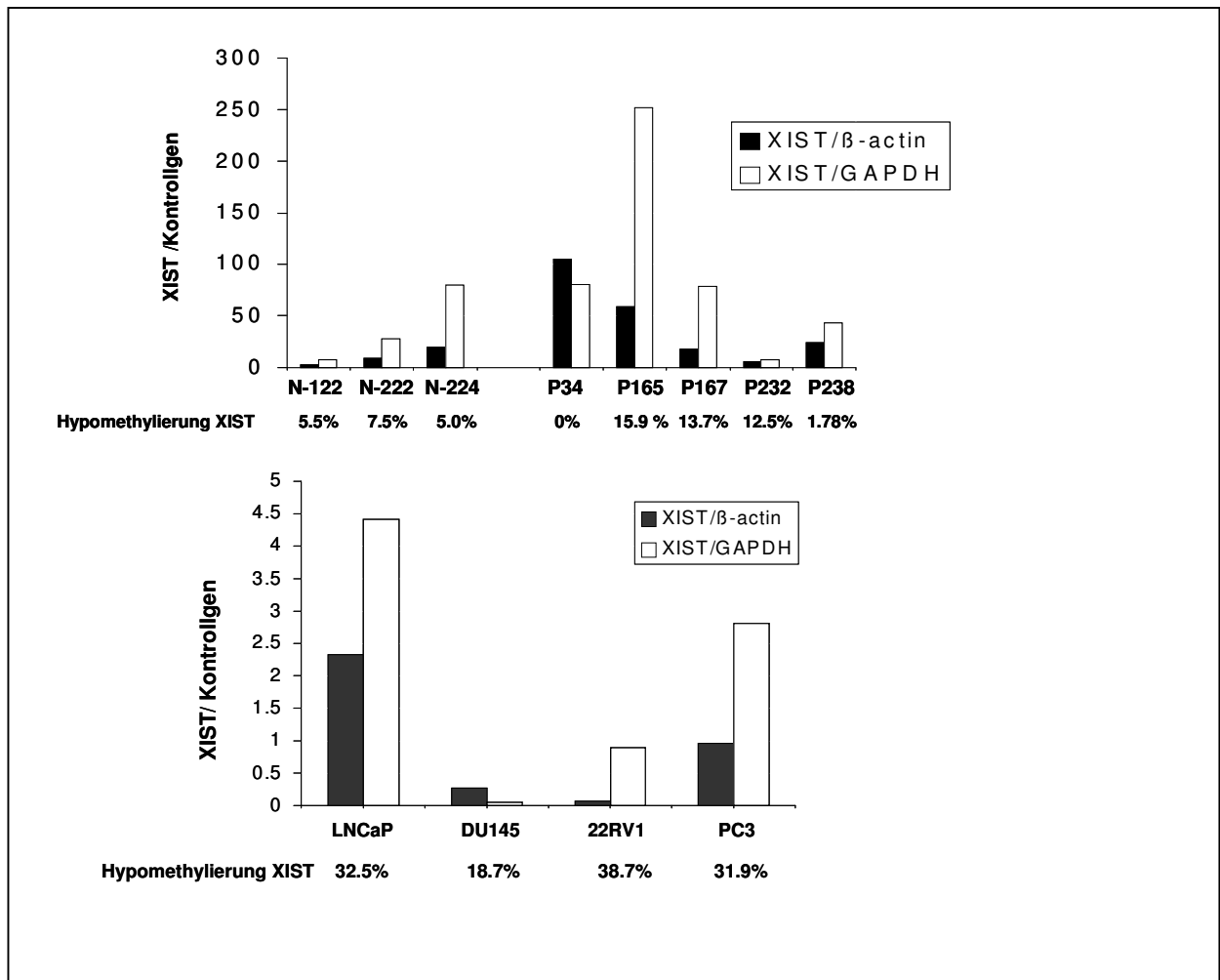


Abbildung 3-6: Real-Time-RT-PCR Analyse der XIST-Expression in Bezug zu Kontrollgenen in benignen Prostatagewebe (N), in PCa-Proben (P) und in PCa-Zelllinien

Bei einem Vergleich der Expression in verschiedenen Typen von Geweben, wie zum Beispiel zwischen der in Leukozyten und der in Prostatagewebe oder der in benignem und malignem Prostatagewebe, ist es schwer, Referenzgene zu finden, die ein konstantes Expressionsniveau im selben Gewebetyp und auch in verschiedenen Geweben besitzen. Daher könnte der nur geringe Unterschied in der Expression an den Variationen in der Expression der Referenzgenen liegen. Jedoch war die Zyklenzahl, an der ein vergleichbares Niveau der XIST-Expression erreicht wurde, auch zwischen benignem Prostatagewebe und Prostatakarzinom nicht durchweg unterschiedlich (vgl. Tabelle 6-3) und reichte von 29,8-33,6 im normalen Gewebe und von 27,7-32,9 im Karzinomgewebe. Unter den Prostatakarzinom-

3. Ergebnisse

Zelllinien wurde das niedrigste Niveau der XIST-Expression, sowohl in absoluten Zyklen gemessen als auch im Verhältnis zu β -Aktin und GAPDH, in DU145 festgestellt, die die höchste XIST Methylierung aufwies. Die XIST-Expression nahm in den drei stärker hypomethylierten Zelllinien LNCaP, 22RV1 und PC3 nicht um mehr als das zehnfache zu. Die absoluten PCR Zyklenzahlen für die Prostatagewebeprobe und die Prostatakarzinomzelllinien sind in Abb.3-7 dargestellt.

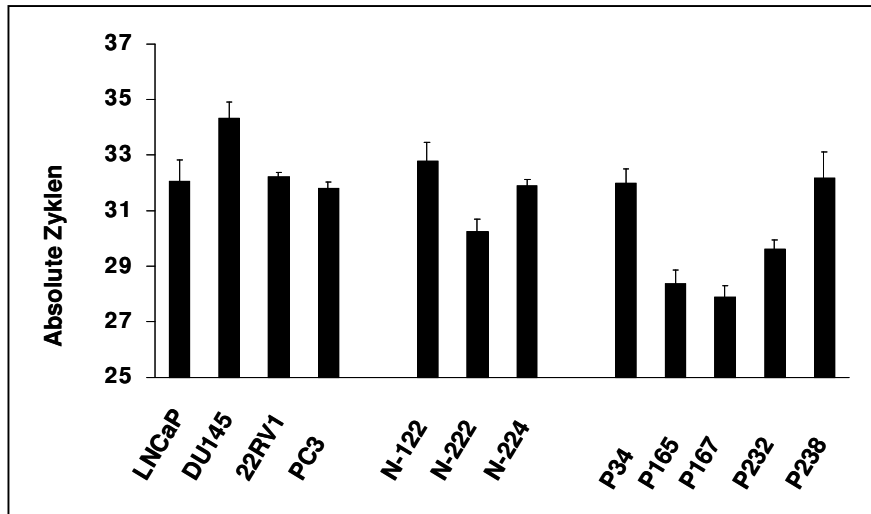


Abbildung 3-7: Real-Time-RT-PCR Analyse der XIST-Expression in benignen Prostatagewebe (N), in PCa-Proben (P) und in PCa-Zelllinien, absolute Zyklenzahl der Wendepunkte

3.4 Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR)

Wie unter 2.22.1 beschrieben, unterscheiden sich nach einer Bisulfitbehandlung einzelsträngiger DNA die Sequenzen der unmethylierten und methylierten DNA. Diese werden entweder von Primern spezifisch für unmethylierte DNA (U) oder von Primern spezifisch für methylierte DNA (M) erkannt (vgl. 2.8). Somit ist die MS-PCR eine Methode, mit der man den Methylierungsstatus von CpG-Stellen in der gesamten Population der Allele einer DNA Probe bestimmen kann. Die Aussage beschränkt sich jedoch nur auf die CpG-Stellen, die in den Primersequenzen enthalten sind. In den PCR Reaktionen mit den Primerpaaren XUF, XUR und XCR-U-Fw, XCR-U-rv ist nur mit einem PCR-Produkt zu rechnen, wenn XIST-Allele vorhanden sind, die an allen untersuchten CpGs unmethyliert

3. Ergebnisse

sind. Mit Hilfe der Bisulfit- Umwandlung und nachfolgenden vier MS-PCRs wurde der Methylierungsstatus für zehn CpGs in der *XCR* Region des *XIST*-Gens überprüft (Abb. 3-8). Für diesen Ansatz wurden DNA der vier Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, DU145, 22RV1 und PC3) und eines Prostatanormalgewebes, sowie Leukozyten-DNA von Männern und Frauen, zunächst einer Bisulfitbehandlung unterworfen (vgl. 2.22.1) und anschließend mit den entsprechenden Primern unter den jeweils optimierten PCR-Bedingungen amplifiziert (vgl. 2.22.4).

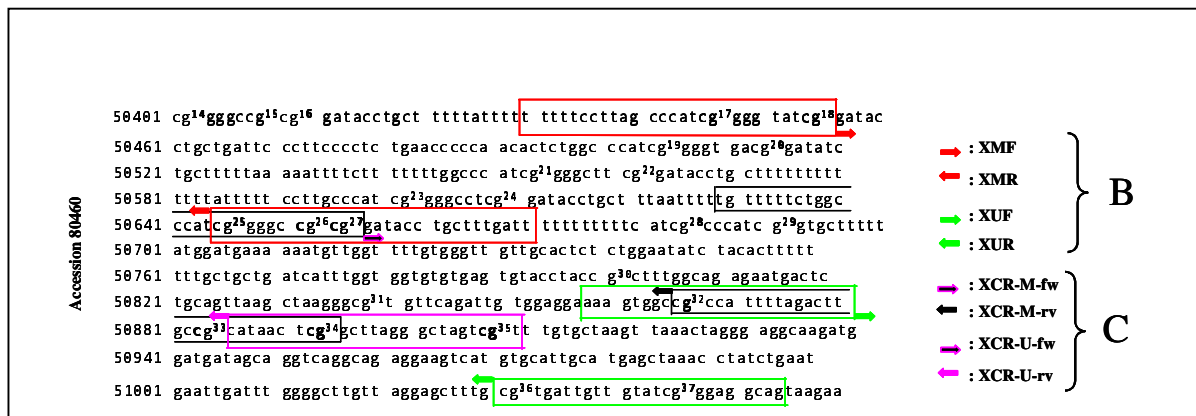


Abbildung 3-8: Die Lage der zu den MS-PCR verwendeten Primern im *XCR*-Motiv, Die zu einander gehörenden Primer sind gleichfarbig markiert.

Abbildung 3-9 B und C zeigen die Ergebnisse der PCRs für die vier Prostatakarzinom-Zelllinien sowie für Leukozyten von Frauen und Männern, die hier als Positiv- bzw. Negativkontrolle für starke Hypomethylierung dieses Genabschnittes dienten. Alle von den untersuchten Proben zeigen mit den methylierungsspezifischen Primern (M) die zu erwartenden Amplifikate. Die PCRs mit den Primern spezifisch für unmethylierte DNA (U) liefert nur bei der Positivkontrolle (PBL von Frauen), jedoch nicht bei den Zelllinien, ein Produkt.

3. Ergebnisse

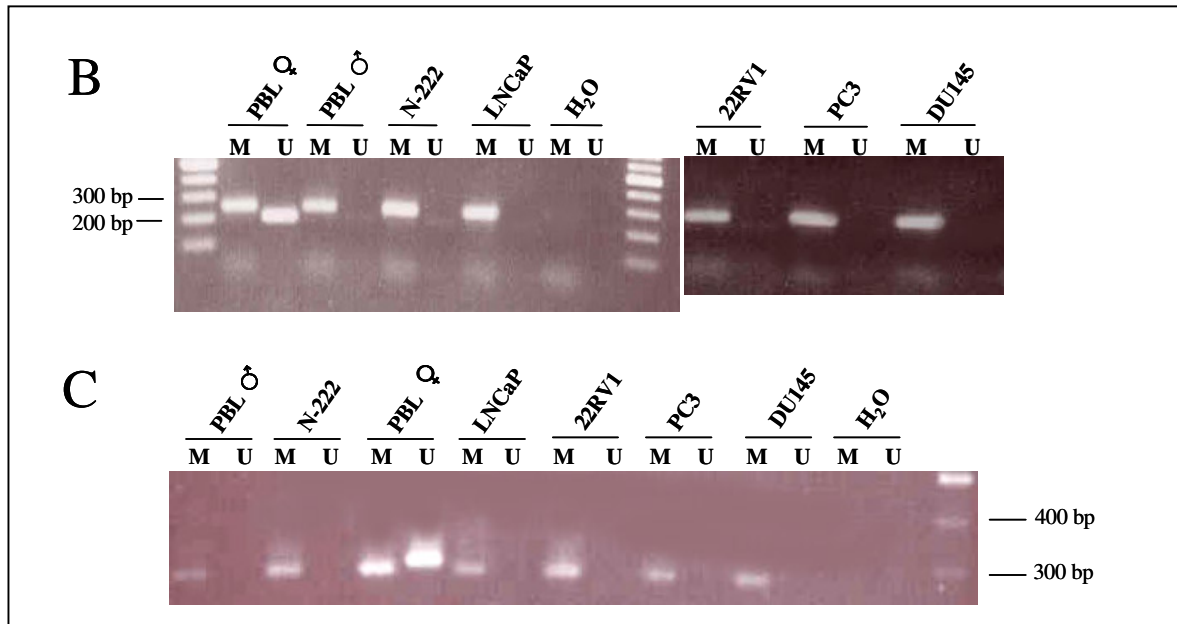


Abbildung 3-9: Ergebnisse der MS-PCRS mit den in Abb. 3-6 zusammengefassten Primern.

3.5 mRNA- und Protein-Turnover der DNA-Methyltransferase 1 in Blasenkarzinom-Zelllinien und in Uroepithel-Primärkulturen.

3.5.1 Protein „Turnover“-Assay

Um die Geschwindigkeit der Abnahme des DNMT1 Proteins in den Blasenkarzinom-Zelllinien SW1710 und VMCub1, sowie als Vergleich dazu in Uroepithel-Primärkulturen zu überprüfen wurden die Translation, wie unter 2.15 beschrieben, mit Cycloheximid inhibiert und der Verlauf der Proteinkonzentrationen mittels der Westernblot Methode analysiert. Hierfür wurde eine Konzentration von 20 µg/ml Cycloheximid verwendet, die mehr als 50% der Zellen im MTT-Test (vgl. 2.14) überlebt hatten. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 3-10 dargestellt. Die jeweils obersten Bandenmuster zeigen das DNMT1 Protein. In den Harnblasen-Zelllinien ist genauso wie in den Urothel-Zellen in dem Zeitraum von 48 Stunden keine Abnahme des Proteins nach Beginn der Translationsinhibierung zu erkennen. Intensitätsschwankungen der Banden sind darauf zurückzuführen, daß nicht immer gleiche Mengen an Protein aufgetragen worden sind. Im unteren Bandenmuster ist die α -Tubulin-

3. Ergebnisse

Expression dargestellt, die als Kontrolle für Unterschiede in der Auftragsmenge dienen sollte. Durch die Detektion des kurzlebigen c-MYC-Proteins sollte sichergestellt werden, daß Cycloheximid in der eingesetzten Konzentration die Translation unterbindet. In VmCub1 ist es nach einem Zeitraum von 4 Stunden abgebaut und nicht mehr nachzuweisen.

Die in Abb. 3-10 dargestellten Ergebnisse sind aus einer Serie von Westernblot-Analysen die abschließenden Analysen und bestätigen die Beobachtungen der zuvor durchgeführten Versuche, in denen engere Zeitintervalle, von 30 Minuten bis 24 Stunden, zur Inkubation gewählt wurden.

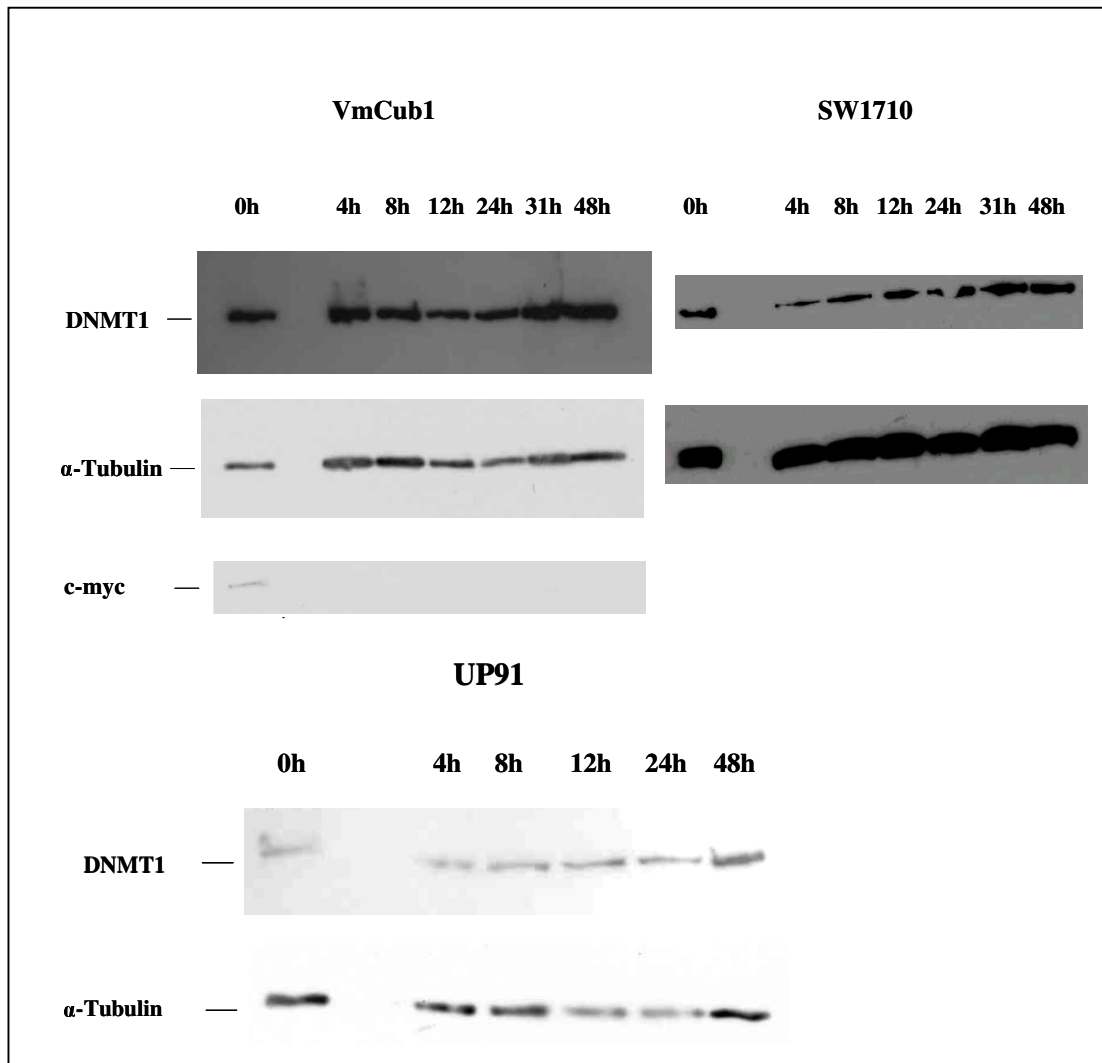


Abbildung 3-10: Westernblot-Analyse des Verlaufs des DNMT1 Proteins in Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Urothel-Zellen nach Behandlung mit Cycloheximid

3. Ergebnisse

3.5.2 mRNA „Turnover“ Assay

Wie unter 2-15 beschrieben wurden die zwei Harnblasenkarzinom-Zelllinien und die Urothel-Primärkulturen mit jeweils 4 µg/ml α -Amanitin und 4 µg/ml Actinomycin-D inkubiert und der Verlauf der DNMT1-mRNA mittels der Northernblot Methode analysiert. Die Ergebnisse nach der Transkriptionshemmung durch α -Amanitin sind in Abb. 3-11 dargestellt. Die in der Reihe dargestellten Banden zeigen die mRNA-Expression der DNMT1 im Vergleich zu der mRNA-Expression von GAPDH als Kontrolle. Innerhalb des Zeitraums von 4 Stunden ist weder eine signifikante Abnahme der DNMT1-mRNA in den Harnblasenkarzinom-Zelllinien noch in den Urothelzellen zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse (Abb. 3-12) wurden nach der Inkubation mit Actinomycin D beobachtet.

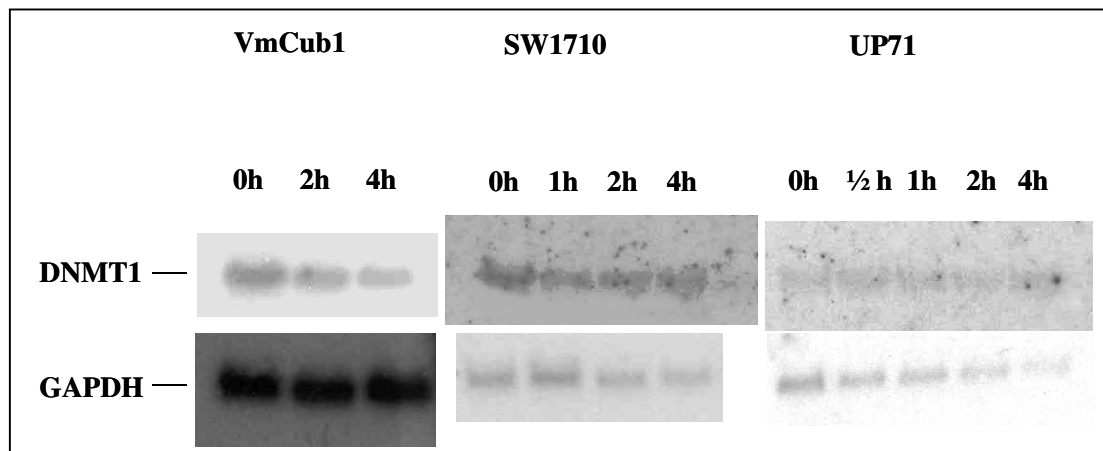


Abbildung 3-11: Northernblot-Analyse des Verlaufs der DNMT1-mRNA in Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Urothel-Zellen nach Behandlung mit Amanitin

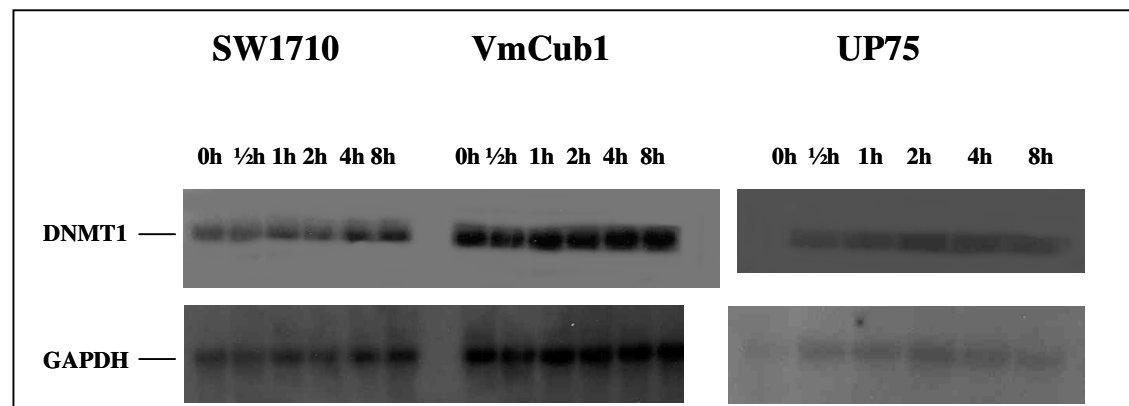


Abbildung 2-12 : Northernblot-Analyse des Verlaufs der DNMT1-mRNA in Harnblasenkarzinom-Zelllinien und Urothel-Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D

4. Diskussion

4.1 Epigenetische Veränderungen im Prostatakarzinom

Bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms sind multiple molekulare Veränderungen involviert, wobei epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. Zum einen werden in Tumoren CpG-Inseln fälschlich methyliert (Hypermethylierung), was häufig mit dem Abschalten der Transkription des Gens einhergeht. Zum anderen verringert sich die dichte Methylierung inaktiver Sequenzen, möglicherweise bis hin zur Fehlexpression von Retroelementen und ektopischen Genen.

Die Hypermethylierung einer ganzen Zahl von Genen tritt im Prostatakarzinom sehr früh und spezifisch auf, so daß die Hoffnung besteht, anhand der Muster hypermethylierter Gene eine Klassifikation des Prostatakarzinoms vornehmen zu können. Ebenfalls eignet sich der Nachweis der Hypermethylierung solcher Gene als Tumormarker in der Diagnostik sehr gut. Zum Beispiel konnten verschiedene Arbeitsgruppen die Hypermethylierung des *GSTP1*-Promotors im Blutplasma, Ejakulat und im Urinsediment bei Prostatakarzinompatienten nachweisen, was zur Identifizierung von Prostatakarzinomen routinemäßig verwendet werden kann [Nakayama *et al.*, 2004]. Von Florl *et al.* wurde neben einer Subklasse von Prostatakarzinomen, die eine Hypermethylierung verschiedener Gene aufweisen, eine weitere identifiziert, die sich zusätzlich durch eine Hypomethylierung von *LINE1*-Elementen auszeichnet. Diese letztere Subklasse scheint die weiter fortgeschrittene Prostatakarzinome zu beinhalten [Florl *et al.*, 2004], was die globale Hypomethylierung für die Diagnostik interessant macht. Wie unter 1.7 beschrieben, erschwert die Natur dieser Sequenzen eine schnelle und zuverlässige Messung der globalen Hypomethylierung.

Ein Ziel der Arbeit war es zu überprüfen, ob die globale Hypomethylierung in Prostatakarzinomen nicht nur auf repetitive Sequenzen beschränkt ist, sondern sich auf einzelne Gene, wie zum Beispiel das *XIST*-Gen, ausdehnt.

4.2 DNA-Methylierungs- und Expressionsanalysen des *XIST*-Gens

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Methylierung des *XIST*-Gens von 12 Prostatakarzinomen, 4 Prostatakarzinom-Zelllinien, 3 Prostatanormalgewebe und Leukozyten von Männern und Frauen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß in der Prostata der *XIST*-Promotor wie in Leukozyten von Männern stark methyliert ist. Im Gegensatz hierzu konnte eine deutliche Hypomethylierung des *XIST*-Promotors in Prostatakarzinom-Zelllinien festgestellt werden, die sich bis in das *XCR*-Motiv fortsetzt. In einigen Prostatakarzinomen konnte ebenfalls eine Hypomethylierung des *XIST*-Promotors beobachtet werden. Ordnet man diese Proben nach ihrem Ausmaß der *LINE1*-Hypomethylierung, so scheint die Hypomethylierung des *XIST*-Promotors mit der der *LINE1*-Elemente zuzunehmen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die globale Hypomethylierung im Prostatakarzinom nicht nur auf repetitive Sequenzen beschränkt ist, sondern auch bei einzelnen Genen auftritt.

Einige der Prostatakarzinom-Gewebeproben lassen sich auf Grund ihres Methylierungsmusters und der Anzahl der unmethylierten CpG-Stellen jedoch nicht von benignen Gewebeproben unterscheiden. Wenn man nur Proben mit mindestens zwei hypomethylierten CpG-Stellen in mindestens zwei Allelen als positiv wertet, würden Tumormproben mit niedriger Hypomethylierung negativ gewertet werden, aber alle Tumormproben mit ausgeprägter *LINE1*-Hypomethylierung wären positiv.

Hierbei wurde nur die Anzahl und nicht die Position der unmethylierten CpG-Stellen beachtet. Aus diesem Grund wurde für die MS-PCR die Strategie gewählt, eher eine möglichst hohe Anzahl von CpG-Stellen gleichzeitig als bestimmte Positionen einzelner Stellen, zu untersuchen. Die Lage der Primer wurde auf Grund der dichten Lage der CpG-Stellen im *XCR*-Motiv gewählt. In zwei verschiedenen MS-PCRs wurden jeweils mindestens vier CpG-Stellen gleichzeitig auf ihren Methylierungsstatus geprüft, so daß nur Proben mit einer hohen *XCR*-Hypomethylierung, in denen alle vier CpG-Stellen gleichzeitig nicht methyliert sind, ein PCR-Produkt liefern. Die Ergebnisse zeigen, daß die Hypomethylierung in keiner der untersuchten Proben für ein positives Ergebnis ausreichend war.

Auf Grund der starken Hypomethylierung des *XIST*-Promotors und des *XCR*-Motivs in der Prostatakarzinom-Zelllinien wurden Leukozyten von Männern und Frauen, drei Prostatanormalgewebeproben, fünf Prostatakarzinomgewebeproben mit unterschiedlicher *LINE1*-Hypomethylierung auf die Expression der *XIST*-RNA untersucht. Zu prüfen war, ob sich das in der Sequenzierung gefundene unterschiedliche Ausmaß an Hypomethylierung in

4. Diskussion

der Expression der XIST-RNA widerspiegelt. Hiernach wäre zu erwarten, daß die innerhalb einer Gewebegruppe am stärksten hypomethylierten Proben die höchste XIST-RNA Expression zeigen. Die gemessene Expression der XIST-RNA wurde zu der von Haushaltsgenen in Bezug gesetzt. In allen untersuchten Proben, außer in den männlichen Leukozyten, die als Negativprobe dienten, konnte ein XIST-Transkript nachgewiesen werden. Innerhalb der PCa-Zelllinien konnte entsprechend den Erwartungen ein Verhältnis zwischen der Hypomethylierung und der XIST-Expression festgestellt werden. Trotz erheblicher Unterschiede in dem Ausmaß der Demethylierung ist der Unterschied in der XIST-Expression jedoch gering. In den Prostatakarzinomen war kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hypomethylierung der Proben und ihrer XIST-Expression offensichtlich, die sich vielmehr nur sehr geringfügig von der gutartigen Prostatagewebeproben unterschied. Auf Grund der geringen Unterschiede in der XIST-Expression zwischen normalem und bösartigem Prostatagewebe, sowie zwischen Gewebeproben mit unterschiedlich stark methylierten *XIST*-Promotor, eignet sich die XIST-Expression nicht für eine sichere Unterscheidung dieser Proben.

Einige Gene, darunter besonders Mitglieder der tumorspezifischen Antigenfamilien *LAGE* und *MAGE*, werden im Hoden und in verschiedenen Krebsarten exprimiert, nicht aber in der Mehrzahl von somatischen Geweben. Die Expression dieser Gene, einschließlich *MAGE-1*, steht im direkten Verhältnis zu ihrer Promotorhypermethylierung [De Backer *et al.*, 1999, De Smet *et al.*, 1996]. Bestimmte Gene sind in ihrer gesamten 5'-Region in Krebszellen demethyliert, in denen sie exprimiert werden. Dies scheint für das *XIST*-Gen nicht der Fall zu sein. In Prostatakarzinomgewebe ist der Grad der Hypomethylierung wesentlich geringer als in den Prostatakarzinom-Zelllinien. Trotz des erheblichen Unterschieds im Ausmaß der Hypomethylierung in den Zelllinien, spiegelt sich diese nicht entsprechend in der Expression wider. Die gezeigten Ergebnisse und die Tatsache, daß bei vergleichbarem Niveau der Methylierung XIST in gutartigem Prostatagewebe, aber nicht in männlichen Leukozyten exprimiert wird, deuten darauf hin, daß DNA-Methylierung beim „Silencing“ des Gens keine Schlüsselrolle einnimmt. Vielmehr scheint die DNA-Methylierung neben anderen Mechanismen den letzten Schritt in der Transkriptionsrepression des *XIST*-Gens als eine Art „Verriegelungs“-Mechanismus darzustellen [Lock *et al.*, 1987].

4.3 DNMT1 in TCC-Zelllinien

In vielen fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen findet man neben einer Promotorhypermethylierung eine deutlich ausgeprägte Verminderung des Methylcytosingehalts, die sich besonders stark in repetitiven Sequenzen, wie z.B. den *LINE1* Retrotransposons bemerkbar macht. Eine Methylierung dieser Sequenzen setzt eine angemessene Expression der DNMT1 während der Replikation voraus. In der gesunden Zelle wird sie überwiegend während der Proliferation exprimiert und zusammen mit der Replikation durch bisher unbekannte Mechanismen reguliert. In Versuchen mit der Fibroblasten-Zelllinie Balb/c 3T3 der Maus [Szyf *et al.*, 1991, Detich *et al.*, 2001], der humanen Blasentumor-Zelllinie T24 und der Fibroblasten-Zelllinie LD98 [Robertson *et al.*, 2000] wurde der Zellzyklus durch serumfreies Medium synchronisiert und der Verlauf des mRNA-Spiegels in den einzelnen Zellzyklus-Phasen bestimmt. In quieszenten Zellen konnte keine mRNA-Expression gemessen werden. In durch Serum zur Proliferation stimulierten Zellen stieg der Dnmt1/DNMT1-mRNA-Spiegel mit dem Eintritt der Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus langsam wieder an und erreichte sein Maximum in der S-Phase. Zur Charakterisierung der Regulation der Dnmt1-Expression wurden „run-on“ Transkriptionsmessungen von quieszenten und proliferierenden Balb/c 3T3 Zellen durchgeführt, die sich in ihrem Level aber nicht unterschieden, so daß die Transkription des Gens zellzyklusunabhängig erfolgen muß und die Verminderung des mRNA-Spiegels auf post-transkriptioneller Ebene geschehen muß [Szyf *et al.*, 1991]. Von Liu *et al.* wurde 1996 gezeigt, daß die Dnmt1 in differenzierenden Myoblasten der Maus post-transkriptionell und post-translatorisch reguliert wird. Hierzu wurde der „turnover“ der mRNA und des Proteins von proliferierenden Myoblasten mit dem von differenzierenden Zellen verglichen. Während der Differenzierung nahm die Halbwertszeit der Dnmt1-mRNA bzw. des Dnmt1-Proteins von 5 h bzw. 18 h in proliferierenden Zellen auf 1.5 h bzw. 4.5 h ab [Liu *et al.*, 1996]. Im Gegensatz hierzu wurde berichtet, daß diese Koordination auf der Promotorebene durch den Ras-AP-1 Signalwegs erreicht wird. Hiernach soll die Transkription der DNMT1 durch AP-1 Faktoren aktiviert werden, wenn die Proliferation durch Wachstumsfaktoren induziert wird [Rouleau *et al.* 1995, Bakin *et al.*, 1999, Deng *et al.* 2001]. Weiterhin wurde berichtet, daß der *DNMT1* Promotor unter den Einfluß des *RB1* Tumorsuppressorgen steht [Bigey *et al.*, 2000]. Von Kimura *et al.* [2003] wurde gezeigt, daß in TCC-Zelllinien die Expression der DNMT1 auf mRNA- und auf Proteinebene bezogen auf die von Haushaltsgenen wie *GAPDH* und

4. Diskussion

Tubulin vergleichbar mit der von proliferierenden normalen Urothelzellen war. Setzt man die Expression in Bezug zu der des Proliferationsmarkers PCNA, ist sie bis zu 25% geringer als in normalen Zellen. Ein ähnliches Verhältnis wurde in Transitionalkarzinomgewebe gefunden. In Reporter-gen-Assays konnte in den untersuchten Proben zwischen Tumor- und Normalzellen kein Unterschied in der Promotorregulation der DNMT1 durch Faktoren des AP-1-Signalwegs festgestellt werden, ebenso in TCC-Zelllinien, die eine RB1 Defizienz aufwiesen. Es blieb die Frage offen, ob die Koordination der DNMT1-Expression und der Zellproliferation post-transkriptionell reguliert wird. Dazu wurden in dieser Arbeit in den TCC-Zelllinien VMCub1 und SW1710, sowie zum Vergleich in Urothelzellen die Transkription und Translation inhibiert und der Level der mRNA- bzw. der Protein-Level über einen Zeitraum von 8 bzw. 48 Stunden beobachtet. Ein mögliches Ergebnis, daß die verminderte DNMT1-Expression im Vergleich zur Proliferation und DNA-Synthese hätte erklären können, wäre ein schnellerer Abbau des DNMT1 Transkriptes oder des Proteins in den Tumor-Zelllinien im Vergleich zu normalen Urothelzellen (Abb. 4-1 A). Dies ist aber in den untersuchten TCC-Zelllinien nicht der Fall. Es konnte kein Unterschied in dem „Turnover“ der DNMT1 mRNA und des Proteins festgestellt werden.

Es scheint daher, daß die Expression der DNMT1 in TCC-Zellen nicht dysreguliert ist, sondern eher ihre Regulierung von der Zellproliferation entkoppelt ist. Dies ist in Abbildung 4-1 B schematisch dargestellt.

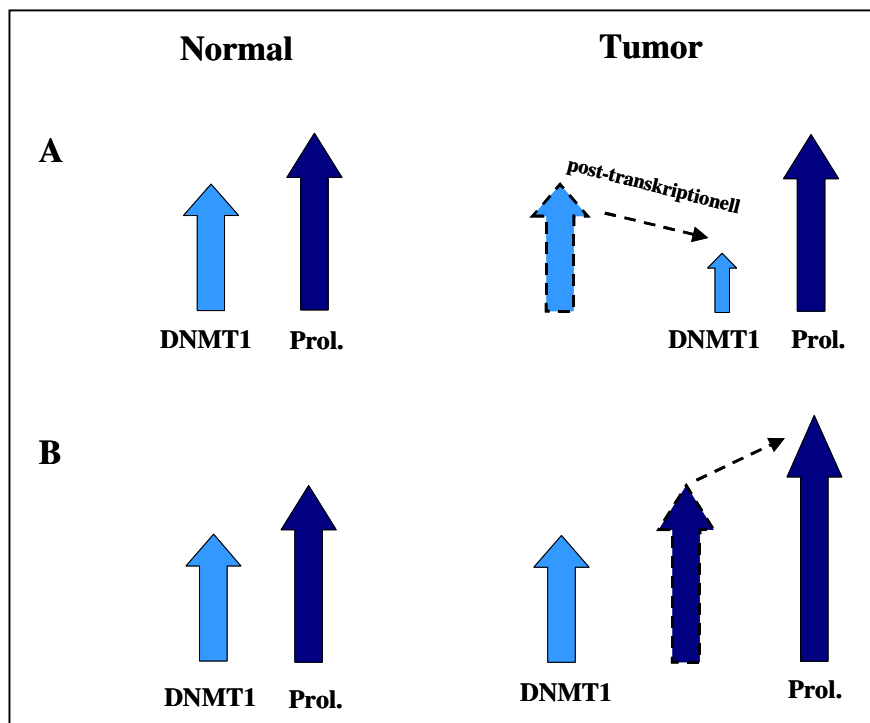


Abbildung 4-1: Mögliche Modelle zur Erklärung der relativ zur Proliferation verminderten DNMT1-Expression

5. Zusammenfassung

- 1) In Prostatakarzinomen treten sowohl Promotorhypermethylierung wie auch globale Hypomethylierung auf. Während die Hypermethylierung bestimmter Gene ein frühes Ereignis im Verlauf der Krankheit ist, ist die globale Hypomethylierung ein späterer Prozess im Karzinom, der mit dem Vorhandensein von Metastasen korreliert. Das gleichzeitige Auftreten beider Veränderungen der DNA-Methylierung ist mit der Progression der Tumoren assoziiert, so daß ihre Detektion bei der Identifizierung besonders aggressiver Formen dieses heterogenen Krebses sehr hilfreich sein könnte. Während der Nachweis der Promotorhypermethylierung, z. B. des *GSTP1*-Gens, als Tumormarker zur Identifizierung von Prostatakarzinomen routinemäßig in der klinischen Diagnostik bevorsteht, existiert noch keine Methode, mit der das Ausmaß der globalen Hypomethylierung in klinischen Material mit akzeptablem Zeitaufwand zuverlässig bestimmt werden kann. Ein Grund hierfür liegt darin, daß repetitiven Sequenzen in ihrem Methylierungsmuster nicht ausreichend homogen sind. Eine Möglichkeit, die Sensitivität der Detektion der Hypomethylierung zu erhöhen, wäre eine einzelne Sequenz zu untersuchen, die in normalen Zellen stark methyliert ist und im Tumor parallel mit den repetitiven Sequenzen hypomethyliert wird. Eine solche Sequenz könnte der Promotorbereich des *XIST*-Gens darstellen. Dieses Gen ist für die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen der Frau verantwortlich und ist in der gesunden männlichen Zelle nur einmal vorhanden, ist dicht methyliert und bleibt untranskribiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Methylierung des *XIST*-Gens in 12 Prostatakarzinomen, 4 Prostatakarzinom-Zelllinien, 3 Prostatanormalgeweben und Leukozyten von Frauen und Männern bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß der *XIST*-Promotor in Prostatakarzinom-Zelllinien und in Prostatakarzinomgewebe in unterschiedlichem Ausmaß hypomethyliert ist. Generell nahm die *XIST*-Hypomethylierung in Proben mit verschieden stark ausgeprägter *LINE1*-Hypomethylierung parallel zu dieser zu. Eine auffällige Häufung an nichtmethylierten CpG-Stellen konnte besonders bei den Prostatakarzinom-Zelllinien in einem als XCR bezeichneten Abschnitt direkt hinter dem Transkriptionsstart festgestellt werden. Es konnte jedoch kein tumorspezifisches Methylierungsmuster der untersuchten *XIST*-Sequenz gefunden werden anhand dessen eine sichere Unterscheidung zwischen benignem und malignem Prostatagewebe möglich ist.

5. Zusammenfassung

Allerdings konnte ein Kriterium definiert werden, dass Prostatakarzinome mit starker *LINE1*-Hypomethylierung, die üblicherweise weit fortgeschrittene Stadien aufweisen, auszeichnet.

Im Gegensatz zu den männlichen Leukozyten konnte ein XIST-Transkript in den benignen und malignen Prostatagewebeproben sowie in den Prostatagewebeproben nachgewiesen werden. Hypomethylierung und Expression von XIST verhielten sich tendenziell parallel zueinander, deutlich jedoch nur in den Prostatakarzinom-Zelllinien. Trotz erheblicher Demethylierung war der Anstieg in der XIST-Expression jedoch gering, sie blieb in allen Fällen weit unter dem Niveau in weiblichen Leukozyten. Auf Grund der geringen Unterschiede in der XIST-Expression zwischen normalem und bösartigem Prostatagewebe eignet sich diese nicht zur Diskriminierung dieser Proben.

- 2) Im Harnblasenkarzinom findet man generell eine ausgeprägte Hypomethylierung. Die Mechanismen, die zu dieser globalen Hypomethylierung führen, sind nicht geklärt. Die Erhaltung eines korrekten Methylierungsmusters setzt eine angemessene Expression der DNMT1 während der Replikation voraus. In der gesunden Zelle ist ihre Expression durch noch unbekannte Mechanismen zellzyklusabhängig reguliert. In Harnblasenkarzinom-Zelllinien und -geweben ist die DNMT1 Expression auf mRNA- und Protein-Niveau relativ zur Proliferation im Vergleich zu normalem Blasengewebe und zu Uroepithelzellen vermindert. Bezüglich der Regulation des Promotors gibt es jedoch keinen Unterschied. In quieszenten Zellen der Maus geschieht die Verminderung des DNMT1-mRNA-Spiegels auf post-transkriptioneller Ebene. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die DNMT1-Expression in den Harnblasenkarzinom-Zelllinien SW1710 und VMCub1 post-transkriptionell oder post-translationell anders als in normalen uroepithelialen Zellen reguliert wird. In den Halbwertszeiten von mRNA und Protein wurde jedoch keine Differenz detektiert. Es scheint daher, daß die Expression der DNMT1 in TCC-Zellen nicht dereguliert ist, sondern eher ihre Regulation von der übermäßigen Zellproliferation entkoppelt ist.

6. Literatur

- Adams RLP und Burdon RH (1985)
Molecular Biology of DNA Methylation.
Springer Verlag, New York
- Attwood JT, Yung RL, Richardson BC (2002)
DNA methylation and the regulation of gene transcription.
Cell Mol Life Sci. **59(2)**:241-57
- Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A, Eichler EE (2000)
Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis
Proc Natl Acad Sci U S A. **97(12)**:6634-9
- Bakin AV, Curran T (1999)
Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos.
Science. **283(5400)**:387-90
- Bedford MT, van Helden PD (1987)
Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate.
Cancer Res. **47(20)**:5274-6
- Bergmann 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(16)**:2395-402
- 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
- Bird AP und Wolffe AP (1999)
Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin
Cell. **99(5)**:451-4
- Boumil RM, Lee JT (2001)
Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation.
Hum Mol Genet. **10(20)**:2225-32
- Chow JC, Hall LL, Lawrence JB, Brown CJ (2002)
Ectopic XIST transcripts in human somatic cells show variable expression and localization.
Cytogenet Genome Res. **99(1-4)**:92-8
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF (1997)
Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1
Science. **277(5334)**:1996-2000

6. Literatur

- Church GM, Gilbert W (1984)
Genomic sequencing.
Proc Natl Acad Sci U S A. **81(7)**:1991-5
- Costanzi C, Pehrson JR (1998)
Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals
Nature. **393(6685)**:599-601
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R (2001)
Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation
J Cell Biol. **153(4)**:773-84
- Dante R, Dante-Paire J, Rigal D, Roizes G (1992)
Methylation patterns of long interspersed repeated DNA and alphoid repetitive DNA from human cell lines and tumors.
Anticancer Res. **12(2)**:559-63
- De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P (1999)
Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis.
Cancer Res. **59(13)**:3157-65
- De Marzo AM, Marchi VL, Yang ES, Veeraswamy R, Lin X, Nelson WG (1999)
Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis
Cancer Res. **59(16)**:3855-60
- Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, McCune WJ, Hanash SM, Richardson BC (2001)
Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients.
Arthritis Rheum. **44(2)**:397-407
- De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T (1996)
The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.
Proc Natl Acad Sci U S A. **93(14)**:7149-53
- Detich N, Ramchandani S, Szyf M (2001)
A conserved 3'-untranslated element mediates growth regulation of DNA methyltransferase 1 and inhibits its transforming activity.
J Biol Chem. **276(27)**:24881-90
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW (1999)
CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression
Cancer Res. **59(10)**:2302-6
- Ehrlich M (2002)
DNA methylation in cancer: too much, but also too little.
Oncogene. **21(35)**:5400-13
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG (2000)
Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors
J Natl Cancer Inst. **92(7)**:564-9

6. Literatur

- Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S (2004)
Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers.
Am J Pathol. **164(2)**:689-99
- Fanning TG, Singer MF (1987)
LINE-1: a mammalian transposable element
Biochim Biophys Acta. **910(3)**:203-12
- Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. (2002)
Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA.
Eur J Biochem. **269(20)**:4981-4.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983)
Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts
Nature. **301(5895)**:89-92
- Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA (1999)
DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas.
Br J Cancer. **80(9)**:1312-21
- Florl AR, Steinhoff C, Muller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, Ackermann R, Schulz WA (2004)
Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation.
Br J Cancer. **91(5)**:985-94
- Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O' Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR (2000)
Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation.
Nat Genet. **24(4)**:368-71
- Goodier JL, Ostertag EM, Engleka KA, Seleme MC, Kazazian HH Jr (2004)
A potential role for the nucleolus in L1 retrotransposition.
Hum Mol Genet. **13(10)**:1041-8. Epub 2004 Mar 17
- Goto T, Monk M (1998)
Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans
Microbiol Mol Biol Rev. **62(2)**:362-78
- 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. **83(2)**:155-8
- Grigg G, Clark S (1994)
Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA.
Bioessays. **16(6)**:431-6
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A (1981)
Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA.
FEBS Lett **124**: 67-71

6. Literatur

- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A (2001)
Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters.
Nucleic Acids Res. **29(13)**:E65-5
- 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(6)**:1820-8
- 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 U S A. **96(25)**:14412-7
- Hansen RS (2003)
X inactivation-specific methylation of LINE-1 elements by DNMT3B: implications for the Lyon repeat hypothesis
Hum Mol Genet. **12(19)**:2559-67
- Hautmann RE und Huland H (2001)
Urologie 2. Aufl
Springer Verlag, Berlin
- Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL (2001)
Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation
Cell. **107(6)**:727-38
- Hendrich BD, Plenge RM, Willard HF (1997)
Identification and characterization of the human XIST gene promoter: implications for models of X chromosome inactivation.
Nucleic Acids Res. **25(13)**:2661-71
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996)
Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.
Proc Natl Acad Sci U S A. **93(18)**:9821-6
- Jaenisch R. (1997)
DNA methylation and imprinting: why bother?
Trends Genet. **13(8)**:293-5.
- Jeppesen P, Turner BM (1993)
The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression
Cell. **74(2)**:281-9
- Jones PA, Baylin SB (2002)
The fundamental role of epigenetic events in cancer.
Nat Rev Genet. **3(6)**:415-28
- Jurgens B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA (1996)
Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma
Cancer Res. **56(24)**:5698-703
- Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS (2004)
Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia.
J Pathol. **202(2)**:233-40

6. Literatur

- Kawakami T, Okamoto K, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y (2003)
The roles of supernumerical X chromosomes and XIST expression in testicular germ cell tumors.
J Urol. **169(4)**:1546-52
- Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y (2004)
XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer
Lancet. **363(9402)**:40-2
- Kelley RL, Kuroda MI (2000)
The role of chromosomal RNAs in marking the X for dosage compensation
Curr Opin Genet Dev. **10(5)**:555-61
- Kimura F, Seifert HH, Florl AR, Santourlidis S, Steinhoff C, Swiatkowski S, Mahotka C, Gerharz CD, Schulz WA (2003)
Decrease of DNA methyltransferase 1 expression relative to cell proliferation in transitional cell carcinoma.
Int J Cancer. **104(5)**:568-78
- Lee PJ, Washer LL, Law DJ, Boland CR, Horon IL, Feinberg AP (1996)
Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation.
Proc Natl Acad Sci U S A. **93(19)**:10366-70
- Lensch R, Gotz C, Andres C, Bex A, Lehmann J, Zwergel T, Unteregger G, Kamradt J, Stoeckle M, Wullich B (2002)
Comprehensive genotypic analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice.
Int J Oncol. **21(4)**:695-706
- Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E (1996)
De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells
Development. **122(10)**:3195-205
- Leonhardt H und Bestir TH (1993)
Structure, function and regulation of mamalian DNA methyltransferase.
In: Jost PJ, Saluz HP, DNA methylation: molecular biology and biological significance.
Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz
- Lin IG, Han L, Taghva A, O' Brien LE, Hsieh CL (2002)
Murine de novo methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA in vitro.
Mol Cell Biol. **22(3)**:704-23.
- Liu Y, Sun L, Jost JP (1996)
In differentiating mouse myoblasts DNA methyltransferase is posttranscriptionally and posttranslationally regulated.
Nucleic Acids Res. **24(14)**:2718-22
- Lock LF, Takagi N, Martin GR (1987)
Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation.
Cell. **48(1)**:39-46
- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R. (2000)
DNA methylation in *Drosophila melanogaster*.
Nature. **408(6812)**:538-40
- Lyon MF (1998)
X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis
Cytogenet Cell Genet. **80(1-4)**:133-7

6. Literatur

- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP, Gazdar AF (2002)
Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features
Clin Cancer Res. **8(2)**:514-9
- Meyer BJ (2000)
Sex in the wormcounting and compensating X-chromosome dose
Trends Genet. **16(6)**:247-53
- Migeon BR (2002)
X chromosome inactivation: theme and variations
Cytogenet Genome Res. **99(1-4)**:8-16
- Migeon BR, Chowdhury AK, Dunston JA, McIntosh I (2001)
Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation.
Am J Hum Genet. **69(5)**:951-60. Epub 2001 Sep 12
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ (1981)
Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation
Science. **211(4480)**:393-6
- Mostoslavsky R und Bergman Y (1997)
DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system
Biochim Biophys Acta. **1333(1)**:F29-50
- Nakayama T, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Ito H, Yatani R, Shiraishi T (2001)
The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers.
Lab Invest. **81(7)**:1049-57
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999)
DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development
Cell. **99(3)**:247-57
- Okano M, Xie S, Li E (1998)
Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases
Nat Genet. **19(3)**:219-20
- Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA (1998)
Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA.
Nucleic Acids Res. **26(21)**:5009-10
- 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
- Prokhortchouk E, Hendrich B (2002)
Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs?
Oncogene. **21(35)**:5394-9

6. Literatur

- Razin A (1998)
CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection
EMBO J. **17**(17):4905-8
- 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 (1998)
CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection
EMBO J. **17**(17):4905-8
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA (1999)
The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.
Nucleic Acids Res. **27**(11):2291-8
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000^A)
DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters
Nat Genet. **25**(3):338-42
- Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA (2000^B)
Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells.
Nucleic Acids Res. **28**(10):2108-13
- Robertson KD (2001)
DNA methylation, methyltransferases, and cancer
Oncogene. **20**(24):3139-55
- Rouleau J, MacLeod AR, Szyf M (1995)
Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway.
J Biol Chem. **270**(4):1595-601
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB (2000)
DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci
Nat Genet. **25**(3):269-77
- Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, Schulz WA (1999)
High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate
Prostate. **39**(3):166-74
- Schmidt M, Migeon BR (1990)
Asynchronous replication of homologous loci on human active and inactive X chromosomes
Proc Natl Acad Sci U S A. **87**(10):3685-9
- Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH, Visakorpi T (2002)
Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma.
Genes Chromosomes Cancer. **35**(1):58-65
- Surani MA (1998)
Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line
Cell **93**(3):309-12.

6. Literatur

- Szyf M, Bozovic V, Tanigawa G (1991)
Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression.
J Biol Chem. **266(16)**:10027-30
- Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T (2000)
Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis
Jpn J Clin Oncol. **30(7)**:306-9
- Tatematsu KI, Yamazaki T, Ishikawa F (2000)
MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase.
Genes Cells. **5(8)**:677-88
- Tate PH und Bird AP (1993)
Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression
Curr Opin Genet Dev. **3(2)**:226-31
- Vasques LR, Klockner MN, Pereira LV (2002)
X chromosome inactivation: how human are mice?
Cytogenet Genome Res. **99(1-4)**:30-5
- Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ (1997)
Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA.
Nucleic Acids Res. **25(21)**:4422-6
- Weinhausel A, Haas OA (2001)
Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR.
Hum Genet. **108(6)**:450-8
- Wolffe AP, Matzke MA. (1999)
Epigenetics: regulation through repression.
Science. **286(5439)**:481-6.
- Xiong Z, Laird PW (1997)
COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay.
Nucleic Acids Res. **25(12)**:2532-4
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E (1999)
Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene
Nature. **402(6758)**:187-91
- Yamada Y, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T (2003)
Aberrant methylation of the vascular endothelial growth factor receptor-1 gene in prostate cancer
Cancer Sci. **94(6)**:536-9
- Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A, Murata T, Takahashi H, Suzuki H, Ito H, Tsukino H, Katoh T, Sugimura Y, Shiraishi T (2003)
Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate.
Int J Cancer. **106(3)**:382-7
- Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP (2004)
A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements.
Nucleic Acids Res. **32(3)**:e38

6. Literatur

- Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG (2004)
Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer
Cancer Res. **64(6)**:1975-86
- Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ (2000)
Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation.
J Biol Chem. **275(38)**:29318-23

7. Anhang

Geschlecht	Patientenalter	Tumorstadium	Gleason Score	Gewebe	Bezeichnung
m	66	pT4 pN1 M+	10	T	P8
m	73	pT3b pN1 M0	9	T	P22
m	60	pT3a pN0 M0	7	T	P34
m	73	pT3b pN0 M0	8	T	P42
m	66	pT2b pN0 M0	7	T	P70
m	71	pT3a pN0 M0	7	T	P165
m	67	pT3a pN0 M0	9	T	P167
m	67	pT3a pN0 M0	6	T	P183
m	58	pT3b pN0 M0	8	T	P207
m	59	pT3b pN0 M0	9	T/N	P221/N-222
m	70	pT2b pN1 M0	7	T	P232
m	62	pT2a pN0 M0	6	T	P238
m	65	-	-	N	N-122
m	71	-	-	N	N-224
m	50			PCaZL	LNCaP
m	?			PCaZL	22RV1
m	69			PCaZL	DU145
m	62			PCaZL	PC3
m	72	-	-	PBL	1189
m	81	-	-	PBL	1248
m	83	-	-	PBL	1251
w	23	-	-	PBL	1330
w	33	-	-	PBL	1331
w	21	-	-	PBL	1332

Tabelle 6-1: Übersicht über die untersuchten Proben

		Hypomethylierung		
DNA-Bezeichnung		LINE1	XIST-Promotor	XCR
LNCaP		87 %	32,5 %	48,6 %
DU145		12 %	18,7 %	13,3 %
22RV1		43 %	38,7 %	31,9 %
PC3		48 %	31,9 %	32,4 %
A	P22	0 %	12,5 %	
	P34	0 %	0 %	
	P221	0 %	6,25 %	
	P238	0 %	1,78 %	
B	P42	13 %	5 %	
	P207	13 %	12,5 %	
	P232	13 %	12,5 %	
	P183	19 %	12,5 %	
C	P8	30 %	15 %	
	P165	49 %	15,9 %	
	P167	46 %	13,7 %	
	P70	38 %	7,5 %	

Tabelle 6-2: Übersicht über das Ausmaß der *LINE1*- und *XIST*-Hypomethylierung in den sequenzierten Proben

8. Danksagung

Aufrichtig gedankt sei jedem Einzelnen, der, in welcher Form auch immer, zum Zustandekommen, zur Fortführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat!

Mein besonderer Dank gilt

- Meinen Eltern für die Unterstützung vor und während meines Studiums
- Prof. Dr. W. A. Schulz für die Überlassung des Themas und der Arbeitsstelle
- Prof. Dr. F. Wunderlich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft diese im Fachbereich Biologie zu vertreten.
- Herrn Prof. Dr. R. Ackermann danke ich für die Unterstützung des urologischen Forschungslabors sowie für das Interesse an dieser Arbeit.
- den Kollegen des urologischen Forschungslabors für die großen und kleinen Gefallen und Anregungen
- meiner Freundin, die mich immer wieder aufgebaut hat und meine schlechte Laune ertragen mußte