

Aus der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

Epigenetische Veränderungen von Genen auf 3q25.32
im Prostatakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Kloth
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Arthur Schulz

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg

„Prognosen sind schwierig, besonders wenn sie die Zukunft betreffen.“

(zugeschrieben Karl Valentin, Mark Twain, Winston Churchill u. a.)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kloth M, Goering W, Ribarska T, Arsov C, Sorensen KD, Schulz WA. "*The SNP rs6441224 influences transcriptional activity and prognostically relevant hypermethylation of RARRES1 in prostate cancer.*" (2012) **Int J Cancer** 131(6): E897-904.

Goering W, **Kloth M**, Schulz WA. "*DNA methylation changes in prostate cancer.*" (2012) **Methods Mol Biol** 863: 47-66.

Kloth M, Goering W, Ribarska T, Arsov A, Schulz WA. " Epigenetic inactivation of two adjacent genes at 3q25.32 is associated with a worse outcome after radical prostatectomy." (2012) **Der Urologe** 51(1): 101 (Abstract)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung	XII
1. Einleitung	1
1.1 Urologische Onkologie und das Prostatakarzinom	1
1.2 Das Prostatakarzinom	3
1.2 Maligne Tumoren der Niere.....	8
1.3 Die untersuchten Gene und Genomregionen.....	11
2. Ziele der Arbeit.....	17
3. Material & Methoden.....	19
3.1 Untersuchte Prostatakarzinomgewebe	19
3.2 Untersuchte Nierenkarzinomgewebe	20
3.3 Eingesetzte Materialien und Geräte	21
3.4 Zellkultur	25
3.5 Behandlung von PCa Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin	26
3.6 Transiente Transfektion von PCa Zelllinien.....	26
3.7 Stabile Transfektion und <i>Colony-forming Assay</i>	27
3.8 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Promoteraktivität in PCa-Zelllinien	27
3.9 RNA-Isolation aus Zelllinien	27
3.10 cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	28
3.11 Isolation genomischer DNA aus PCa-Zelllinien	28
3.12 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA.....	29

Inhaltsverzeichnis

3.13	Chromatin-Immunopräzipitation	30
3.14	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
3.15	Quantitative Real-Time PCR	33
3.16	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.17	PCR-Aufreinigung und DNA-Extraktion aus Agarosegelen	34
3.18	TA-Klonierung in pCR4-TOPO und pCR2.1	35
3.19	Restriktion und Ligation	35
3.20	Transformation und Kultur von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	36
3.21	Minipräparation von Plasmid-DNA	37
3.22	Maxipräparation von Plasmid-DNA	37
3.23	DNA-Sequenzierung	38
3.24	Statistische Auswertung	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Epigenetische Charakterisierung der 3q25.32 Region im Prostatakarzinom	40
4.2	Charakterisierung von Expression und DNA-Methylierung des alternsassozierten Gens <i>KLOTHO</i> im Prostatakarzinom und Nierenzellkarzinom	66
4.3	Charakterisierung von <i>SMARCD3</i> im Prostatakarzinom	73
5.	Diskussion	77
5.1	Analyse der genomischen Region 3q25.32 im Prostatakarzinom	77
5.2	Regulation von <i>KLOTHO</i> in PCa und Nierenzellkarzinomen	89
5.3	Analysen zu <i>SMARCD3</i> und <i>COQ7</i> im Prostatakarzinom	91
6.	Literaturverzeichnis	93
7.	Appendix	105
	Eidesstattliche Versicherung	110
	Danksagung	111

Tabellenverzeichnis

Einleitung

Tab. 1-1	TNM-Klassifikation für Prostatakarzinome nach UICC	5
Tab. 1-2	TNM-Klassifikation für Nierenzellkarzinome nach UICC.....	9
Tab. 1-3	Vergleich der Hypermethylierungshäufigkeit ausgewählter Gene in Prostatakarzinom (PCa) und klarzelligem Nierenzellkarzinom (CCRCC).....	10

Material & Methoden

Tab. 3-1	Charakteristik der untersuchten Patienten und Karzinomgewebe	19
Tab. 3-2	Charakteristik der untersuchten Nierenzellkarzinome.....	20
Tab. 3-3	Charakteristika der untersuchten Zelllinien	21
Tab. 3-4	Verwendete Medien und Additive.....	21
Tab. 3-5	Verwendete Chemikalien.....	22
Tab. 3-6	Verwendete Geräte.....	22
Tab. 3-7	Verwendete Kits.....	23
Tab. 3-8	Primersequenzen	24
Tab. 3-9	Verwendete Plasmide	25
Tab. 3-10	Reaktionsansatz Mastermix A	28
Tab. 3-11	Reaktionsansatz Mastermix B	28
Tab. 3-12	Reaktionsansatz der CHIP	31
Tab. 3-13	Reaktionsansatz HotStar Taq	32
Tab. 3-14	PCR-Programm HotStar Taq	32
Tab. 3-15	Reaktionsansatz KOD PCR	32
Tab. 3-16	PCR-Programm KOD PCR.....	32
Tab. 3-17	Reaktionsansatz SybrGreen.....	33
Tab. 3-18	PCR-Programm SybrGreen	33
Tab. 3-19	Reaktionsansatz TaqMan	34
Tab. 3-20	PCR-Programm TaqMan	34
Tab. 3-21	Reaktionsansatz pCR4-TOPO	35
Tab. 3-22	Reaktionsansatz pCR2.1	35

Ergebnisse

Tab. 4-1	Assoziation von Karzinom-spezifischer Hypermethylierung mit dem Gleason-Score.....	43
Tab. 4-2	Prädiktive Wertigkeit mittels Cox Regressionsanalyse nach Dichotomisierung anhand der Karzinom-spezifischen Methylierung im Vergleich zu den quantitativ kontinuierlichen Daten	45
Tab. 4-3	Uni- und multivariate Cox Regressionsanalyse der intensivierten 3q25.32 Methylierung und traditionellen klinisch-pathologischen Parametern	48
Tab. 4-4	Bestimmung der prognostischen Wertigkeit mittels Cox-Regressionanalyse nach Randomisierung	49
Tab. 4-5	Genotypfrequenzen von rs6441224 und rs9841	50
Tab. 4-6	Vorhersage von Transkriptionsfaktoraffinitäten des rs6441224-Genotyps.....	52
Tab. 4-7	Spearman-Korrelation der Genexpression auf 3q25	60
Tab. 4-8	Cox-Regressionanalyse der Expression von 3q25.32 Genen.....	61
Tab. 4-9	Cox-Regressionanalyse der <i>KLOTHO</i> -Expression und Methylierung mit dem Endpunkt biochemisches Rezidiv	72
Tab. 4-10	Cox-Regressionanalyse der <i>SMARCD3</i> -Expression mit dem Endpunkt biochemisches Rezidiv.....	73

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1-1	Häufige Tumorerkrankungen in der Urologie.....	1
Abb. 1-2	Klassifizierung des Differenzierungsgrades durch den Gleason Score.	4
Abb. 1-3	Lage der untersuchten Gene auf der genomischen Region 3q25.32.	11

Ergebnisse

Abb. 4-1	Vereinfachte Darstellung der untersuchten Region 3q25.32.....	40
Abb. 4-2	Quantitative DNA-Methylierungsanalyse von <i>LXN</i> und <i>RARRES1</i> im PCa.....	41
Abb. 4-3	Quantitative <i>RARRES1</i> Methylierung in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern.....	43
Abb. 4-4	Quantitative <i>LXN</i> -Methylierung in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern.....	44
Abb. 4-5	Kaplan-Meier-Kurve zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs.....	45
Abb. 4-6	Klassifizierung des untersuchten Patientenkollektivs durch Clusteranalyse und deren prognostische Wertigkeit.	47
Abb. 4-7	Assoziation des Genotyps von rs6441224 mit der quantitativen Methylierung von <i>RARRES1</i>	51
Abb. 4-8	Bestimmung der Aktivität des <i>RARRES1</i> Minimal-Promoter im Luciferase Assay	53
Abb. 4-9	Methylierungsanalyse von <i>RARRES1</i> und <i>LXN</i> mittels Pyrosequenzierung in PCa-Zelllinien und epithelialen Prostatazellen (PrEC).....	55
Abb. 4-10	Expression und epigenetische Regulation von <i>RARRES1</i> und <i>LXN</i> in PCa-Zelllinien.	57
Abb. 4-11	Einfluss der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von <i>RARRES1</i> und <i>LXN</i> auf die transkriptionelle Aktivität des jeweiligen Gens in PCa-Gewebe.....	58
Abb. 4-12	Expressionsanalyse der auf 3q25 liegenden Gene.	59
Abb. 4-13	Abhängigkeit der relativen Expression von <i>RARRES1</i> von klinisch-pathologischen Parametern	62
Abb. 4-14	Abhängigkeit der relativen Expression von <i>LXN</i> von klinisch-pathologischen Parametern	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4-15	Abhängigkeit der relativen Expression von <i>MLF1</i> und <i>MFSD1</i> von klinisch-pathologischen Parametern.....	64
Abb. 4-16	Abhängigkeit der relativen <i>GFM1</i> -Expression von klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score	65
Abb. 4-17	Relative Expression von <i>KLOTHO</i> in klarzelligen (CCRCC) und chromophoben Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu Normalgeweben der Niere.	66
Abb. 4-18	Relative Expression von <i>KLOTHO</i> in Prostatakarzinomgeweben.....	67
Abb. 4-19	Analyse der DNA-Methylierung von <i>KLOTHO</i> mittels Pyrosequenzierung in Prostatakarzinomgeweben	68
Abb. 4-20	Bisulfit-Sequenzierung in der Technik nach Sanger in PCa-Zelllinien	69
Abb. 4-21	Expressionsanalyse mittels qRT-PCR in PCa-Zelllinien.....	70
Abb. 4-22	Abhängigkeit der relativen Expression von <i>KLOTHO</i> von klinisch-pathologischen Parametern	71
Abb. 4-23	Quantitative <i>KLOTHO</i> -Methylierung in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern	72
Abb. 4-24	Expressionsanalyse von <i>SMARCD3</i> in PCa und benignen Kontrollgeweben.....	73
Abb. 4-25	Abhängigkeit der relativen <i>SMARCD3</i> -Expression von den klinisch-pathologischen Parametern.....	74
Abb. 4-26	Bisulfit-Sequenzierung der Promoterregion beider <i>SMARCD3</i> -Isoformen in den PCa-Zelllinien PC-3 und Du145.....	75
Abb. 4-27	Überexpression und <i>Colony-forming Assay</i> von pIRES2-EGFP-Expressionskonstrukten mit den <i>SMARCD3</i> -Isoformen 1 und 2 sowie <i>COQ7</i> in der PCa Zelllinie PC-3.....	76

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor	PrEC	Prostataepithelzellen
AUC	Fläche unter der Kurve	QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
BPH	Benigne Prostatahyperplasie	RNA	Ribonukleinsäure
CCRCC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
CRCC	Chromophobes Nierenzellkarzinom	RPP	Radikale Prostatektomie
C-index	Konkordanzindex	SCNA	<i>Somatic copy nnumber alteration</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	SNV	<i>Single nucleotide variant</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase	UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	VHL	Von-Hippel-Lindau
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure	5-aza-dC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i>		
EtBr	Ethidiumbromid		
FCS	Fetales Kälberserum		
FRET	Fluoreszenz-Energietransfer		
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie		
LRES	<i>Long-Range Epigenetic Silencing</i>		
LINE	<i>Longe Interspersed Nuclear Element</i>		
PCa	Prostatakarzinom		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PSA	Prostata-spezifisches Antigen		

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) besitzt eine Vielzahl epigenetischer Veränderungen die als diagnostische und prädiktive Marker genutzt werden können. Durch die Entwicklung von neuen Messverfahren ist mittlerweile eine Quantifizierung solcher Veränderungen möglich und eröffnet neben der Verbesserung einer klinisch-pathologischen Charakterisierung ebenso die Aufklärung von biologisch-funktionellen Zusammenhängen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde unter Nutzung von Pyrosequenzierung die quantitative Methylierung der beiden auf 3q25.32 benachbarten Gene, *RARRES1* (*TIG1*) und dem paralogen *LXN*, analysiert und klinisch-pathologisch korreliert. Weiterhin wurde die wechselseitige Interaktion von Methylierung, regionaler Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) und der Genaktivität untersucht.

In 60% der Patienten lag eine Tumor-spezifische Methylierung von *RARRES1* vor. Die multivariate Analyse zeigte, dass die Bestimmung der quantitativen Methylierung von *RARRES1* als unabhängiger prognostischer Marker nutzbar ist. Darüber hinaus gelang der Nachweis, dass die Methylierung von *RARRES1* durch rs6441224 beeinflusst wird. In der bioinformatischen Vorhersage von Transkriptionsfaktor-Bindestellen zeigte sich eine Allel-spezifische Affinitätsänderung von Transkriptionsfaktorbindestellen, hierunter das im Prostatakarzinom als Onkogen charakterisierte ERG. Übereinstimmend wurde unter Nutzung von Luciferase-Promoter-Assays nachgewiesen, dass es sich bei *RARRES1* um ein ETS1/ERG-Zielgen handelt. Eine Methylierung des benachbarten *LXN* lag in 29% der Karzinomgewebe vor und trat in 92% der Fälle gemeinsam mit einer Methylierung des Nachbargens *RARRES1* auf. Die Expressionsmessungen ergaben, dass die Genotyp-assoziierte Methylierung von *RARRES1* mit einem regionalen epigenetischen *Silencing* von 3q25.32 einhergeht.

Neben den Analysen zur genomischen Region 3q25.32 im Prostatakarzinom wurden weiterhin die Genexpression, epigenetische Regulation und Überexpression von *KLOTHO*, *COQ7* und *SMARCD3* im Prostata- und Nierenzellkarzinom untersucht. Hier zeigte sich eine teils deutlich niedrigere Expression in Karzinomgeweben, welche nur zu geringen Anteilen auf einen hypermethylierten Zustand des Promoters zurückzuführen war.

1. Einleitung

1.1 Urologische Onkologie und das Prostatakarzinom

Die vier häufigsten Tumorentitäten der urologischen Onkologie machen ca. 36% aller malignen Neuerkrankungen des Mannes aus. Hierzu zählen das besonders häufige Prostatakarzinom, weiterhin die verhältnismäßig selteneren Karzinome der Blase und Niere sowie Hodentumore. Für das weibliche Geschlecht zeigt sich entsprechend ein prozentualer Anteil von nur 4,5% an allen malignen Neuerkrankungen. Trotz des großen Anteils des PCa an allen Neuerkrankungen in der urologischen Onkologie (64%, Abb 1-1 A), macht es nur etwa die Hälfte aller malignitätsassoziierten Sterbefälle aus (Abb 1-1 B) (1).

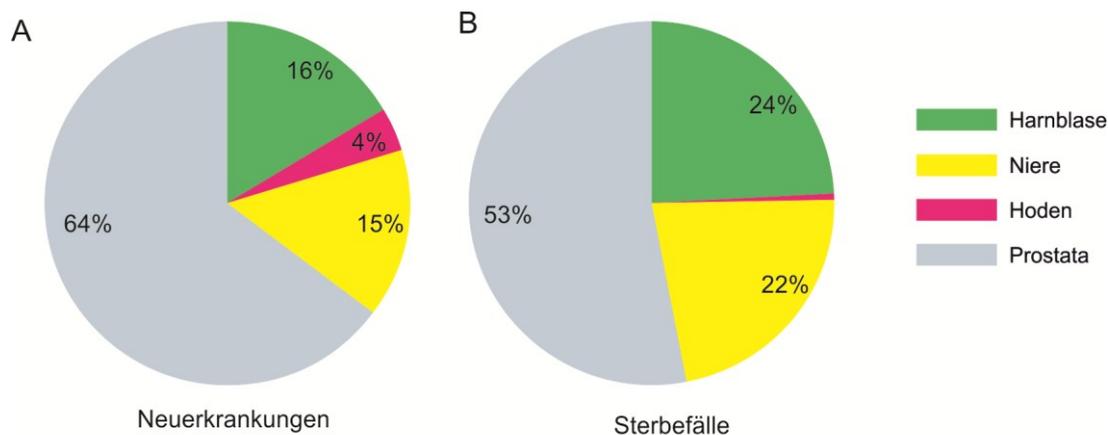


Abb. 1-1 Häufige Tumorerkrankungen in der Urologie. Darstellung der prozentualen Anteile an Neuerkrankungen (A) und Sterbefällen (B) der vier häufigsten malignen Tumorerkrankungen in der urologischen Onkologie in Deutschland. Die Datenerhebung erfolgte durch die Krebsregister der Bundesländer (1).

Die Diskrepanz zwischen Inzidenz und Mortalität beim Prostatakarzinom unterstreicht damit die besondere Bedeutung von prognostischen und prädiktiven Vorhersagen. Neben den routinemäßig genutzten prognostischen Parametern, beispielsweise dem Gleason-Score oder auch dem präoperativen PSA-Wert, konnten in den letzten Jahren zahlreiche weitere Faktoren charakterisiert werden.

Einleitung

Hierzu gehören auch epigenetische Biomarker. Allgemein umschreibt Epigenetik die Fähigkeit der Übertragung von solchen Informationen auf Tochterzellen, welche nicht durch den Genotyp codiert vorliegen. Typischerweise erfolgt die Informationsspeicherung durch Modifikationen der DNA und den Histonen beziehungsweise der Interaktion von DNA-Methylierung und dem Histoncode (2). Epigenetische Aberrationen in Tumorzellen zeichnen sich insbesondere durch die hieraus folgende veränderte transkriptionelle Regulation der jeweiligen Zielgene aus. Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Verlust der Expression des betroffenen Gens durch einen hypermethylierten Promoter, beispielsweise die epigenetische Stilllegung von *GSTP1*, *MLH1* oder *CDKN2A/p16* (3-5).

Epigenetische Biomarker besitzen insbesondere beim Prostatakarzinom eine besondere Bedeutung, da sie im Rahmen der Diagnostik teilweise eine herausragende Sensitivität bei hoher Spezifität besitzen. Die DNA-Methylierung zeichnet sich darüber hinaus allgemein durch eine hohe chemische Stabilität aus. In Folge von verbesserten Quantifizierungsmöglichkeiten werden epigenetische Biomarker vermutlich einen zunehmenden Einfluss in Diagnostik und patientenorientierten Therapieentscheidungen besitzen (6, 7).

Die für die Analysen ausgewählten Gene zeigten in einer Vorarbeit eine veränderte Expression in Prostatakarzinomen mit Chromosom8-Aberrationen und LINE-1-Hypomethylierung im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne diese Merkmale (8). In der vorliegenden Arbeit wurden hiervon die Gene *LXN*, *KL*, *COQ7* und *SMARCD3* betrachtet.

1.2 Das Prostatakarzinom

1.2.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 65000 der häufigste maligne Tumor des Mannes in Deutschland und besitzt ein mittleres Erkrankungsalter von 70 Jahren (1). Durch die Nutzung des PSA-Wertes in flächendeckenden Vorsorgeuntersuchungen folgte eine Vorverlagerung des Patientenalters bei Erstdiagnose und eine - nicht in allen Studien nachweisbare - niedrigere Mortalität (9, 10). Diese Entwicklungen gehen aktuell mit einem verhältnismäßig größeren Anteil an Überdiagnosen und therapiebedingten Einschränkungen der Lebensqualität einher (11). Die Komplexität folgt dabei insbesondere aus dem hochvariablen Krankheitsverlauf des Prostatakarzinoms (12, 13).

1.2.2 Klinisch-pathologische Klassifikation des Prostatakarzinoms

Die Prostata kann in ihrem Aufbau in eine periphere Zone und eine Transitionszone untergliedert werden. Während die sehr häufig auftretende benigne Hyperplasie (BPH) insbesondere in der inneren Transitionszone nachgewiesen werden kann, entstammen 70-80% der Prostatakarzinome der peripheren Zone. Das normale Prostataepithel besteht aus einer Basalzell-Schicht und einer darüber gelegenen Schicht sekretorischen Zylinderepithels. Das Prostatakarzinom zeigt in diesem Zusammenhang im Allgemeinen einen charakteristischen Verlust der Basalzellschicht (Abb. 1-2). Die Drüsenstruktur des Adenokarzinoms und damit der Differenzierungsgrad wird zur Klassifizierung durch den Gleason-Score genutzt. Hierbei werden regelhaft die beiden am häufigsten detektierten Differenzierungsgrade der Stanzbiopsien von 1 bis 5 klassifiziert und folgend addiert. Eine sehr niedrige Differenzierung entspricht demnach einem Gleason-Score von 10 (Abb. 1-2) (14). Neben der Klassifizierung durch den Gleason-Score wird das klinische Stadium bzw. die Ausbreitung des Prostatakarzinoms weiterhin durch die TNM-Klassifikation beschrieben (Tab. 1-1).

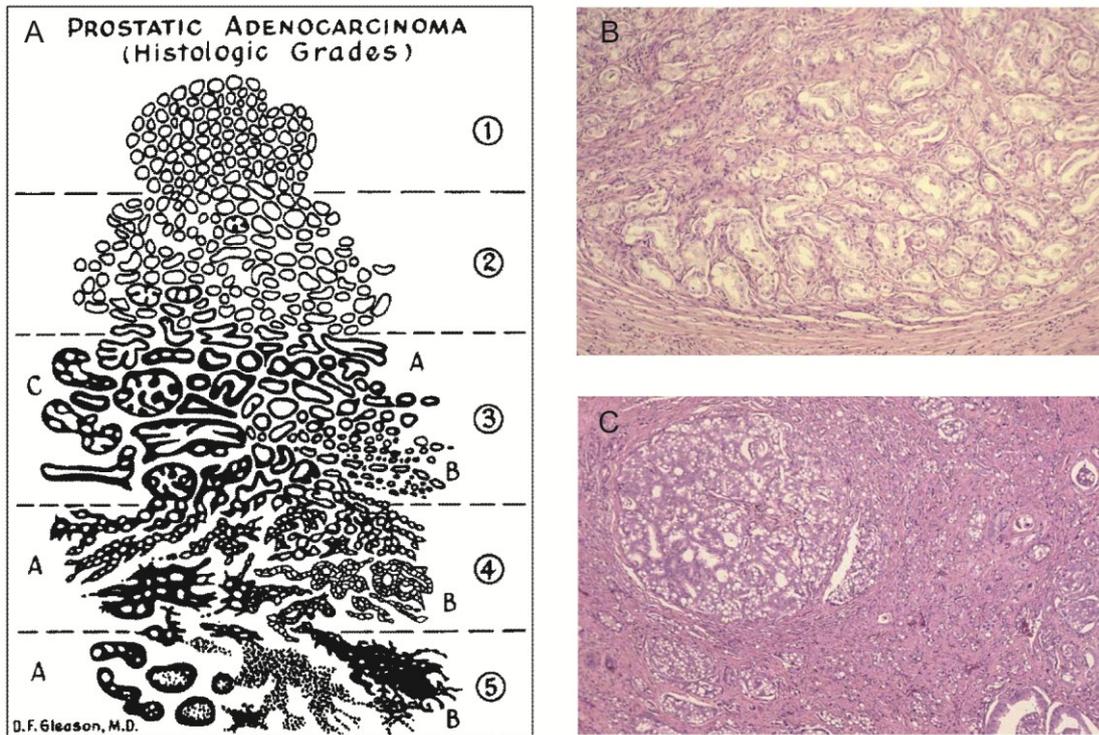


Abb. 1-2 Klassifizierung des Differenzierungsgrades durch den Gleason Score. Schematische Darstellung der verschiedenen Grade des Gleason Score (A). Repräsentative Darstellung eines Prostatakarzinoms mit einem Gleason-Score von $2 + 2 = 4$, sowie eines wenig differenziertem PCa mit einem Gleason-Score von $5 + 4 = 9$ (B, C) (14).

1.2.3 Risikofaktoren für das Prostatakarzinom

Von der Vielzahl an beschriebenen Risikofaktoren können insbesondere ein erhöhtes Alter bei Neuerkrankung, eine signifikante Heredität und die Assoziation mit der Ethnizität erwähnt werden (15, 16). Weitere Risikofaktoren umfassen u. a. die Prostatitis, der Diabetes mellitus, Adipositas sowie die Ernährung (17-20). Im Fall des Auftretens eines Prostatakarzinoms bei Verwandten 1. Grades zeigte sich eine Verdopplung des Risikos zur Erkrankung (21, 22). Weiterhin konnte in mehreren Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) ein Zusammenhang der genetischen Variation in verschiedenen genomischen Regionen mit dem Auftreten eines PCa nachgewiesen werden. Hierzu zählen mehrere Abschnitte der Region 8q24 (MYC) und der Regionen 8p22 (MSR1), 17p11 (HPC2/ELAC2), 17q12 und 17q24.3, außerdem die chromosomalen Regionen 1q25 (HPC1/RNASEL), 1q42-1q43 (PCAP), 1q36 (CAPB), 20q13 (HPC20) und Xq27-q28 (HPCX). (23-25).

Einleitung

Tab. 1-1 TNM-Klassifikation für Prostatakarzinome nach UICC

Tx	Es kann keine Aussage zur Ausdehnung des Primärtumors getroffen werden.
T1	Der Tumor ist klein und nicht tastbar. Er wird zufällig im Rahmen einer Prostataoperation wegen BPH oder erhöhter PSA-Werte gefunden (Inzidentalumor).
T1a	Der Tumor befällt weniger als 5 % des Gewebes.
T1b	Der Tumor befällt mehr als 5 % des Gewebes.
T1c	Der Tumor wurde durch eine Nadelbiopsie diagnostiziert.
T2	Der Tumor liegt noch innerhalb der Prostatakapsel.
T2a	Der Tumor befällt weniger als 50 % eines Seitenlappens.
T2b	Der Tumor befällt mehr als 50 % eines Seitenlappens.
T2c	Der Tumor befällt beide Seitenlappen.
T3	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel hinaus ausgebreitet.
T3a	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel ausgebreitet ohne die Samenblasen zu befallen.
T3b	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel ausgebreitet und befällt die Samenblasen.
T4	Der Tumor hat Nachbarstrukturen befallen (infiltriert) oder ist fixiert (unverschieblich).
Nx	Es kann keine Aussage zu regionären Lymphknotenmetastasen getroffen werden.
N0	Keine Metastasen in den regionären Lymphknoten.
N1	Metastasen in den regionären Lymphknoten.
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar.
M1	Der Tumor hat Fernmetastasen gebildet.
M1a	Metastasen in anderen Lymphknoten (nicht regionäre Lymphknoten).
M1b	Metastasen in den Knochen.
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen.

1.2.4 Häufige genetische Veränderungen

Die Tumorbilogie des Prostatakarzinoms ist im Vergleich mit anderen Tumorentitäten, wie dem klarzelligen Nierenzellkarzinom (s. 1.3), heterogen (26). Die bedeutendsten genetischen Aberrationen sind Veränderungen der Genanzahl (SCNA, *Somatic Copy Number Alterations*) und strukturelle Rearrangements. Punktmutationen in typischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen lassen sich zwar nachweisen, treten aber nur unregelmäßig und insgesamt in einer geringen Häufigkeit auf. Hierzu zählen unter anderem auch typische Mutationen von *TP53* und *PIK3CA*, wohingegen Mutationen in *RAS*-Genen selten sind (26). Verhältnismäßig häufiger treten dagegen spezifische Deletionen des *Phosphatase Tensin Homolog* (*PTEN*), einem negativen Regulator des PI3K-Signalwegs, auf (27, 28). Diese rekurrente Aberration lässt sich in ca. 20% aller Prostatakarzinome nachweisen und ist die häufigste von verschiedenen genetischen Veränderungen, die zu einer Überaktivität dieses

Einleitung

Signalwegs führen. Die damit einhergehende Aktivierung von *AKT/PKB* ist mit einer Herunterregulation des CDK-Inhibitors *p27^{KIP1}* assoziiert und führt zu einer Deregulation des Zellzyklus (29, 30). In Abhängigkeit der Aktivität des PI3K-Signalwegs erfolgt weiterhin eine Veränderung der Regulation von AR-Zielgenen (31). In diesen Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass das Prostatakarzinom eine ausgeprägte primäre Androgenabhängigkeit besitzt, welche mit der Transition G1-S verbunden ist (32). Die Aktivierung des Androgenrezeptors (AR) ermöglicht folgend die CyclinD-CDK4/6 abhängige Phosphorylierung von RB1 und damit dessen Inaktivierung (33). Veränderungen von Genen der Androgen-Antwort finden sich daher in der Mehrzahl des Prostatakarzinoms, insbesondere auch beim fortgeschrittenen PCa sowie in Folge eines therapeutischen Androgenentzugs (34-36).

Prostatakarzinome zeigen darüber hinaus häufig chromosomale Translokationen, die in vielen Fällen zu onkogenen Fusionsgenen führen. Die häufigste und möglicherweise bedeutsamste ist die in bis zu 50% der Fälle auftretende Fusion *TMPRSS2-ERG* (37), die zu einer androgenabhängigen Überexpression des ERG-Transkriptionsfaktors in frühen Prostatakarzinomstadien führt und die auch bei Androgenentzug reaktiviert werden kann (38).

Zu den charakteristischen numerischen Veränderungen gehören der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 8 (8p) und Amplifikationen von 8q stadienabhängig in ebenfalls bis zu 50% der Fälle (39-41). Interessanterweise liegen die zwei in der PCa-Tumorgenese kooperierenden Gene *NKX3.1* und *MYC* auf 8p und 8q24 (42). Neben Veränderungen des Chromosoms 8 finden sich weiterhin häufige Zugewinne oder Amplifikationen des Chromosoms 7 mit der unter anderen hierauf lokalisierten H3K27-Methyltransferase *EZH2* (43).

1.2.5 Häufige epigenetische Veränderungen

Im Gegensatz zu der heterogenen Präsentation an genetischen Aberrationen besitzt das PCa eine ausgeprägte Neigung zur Ansammlung von rekurrenten epigenetischen Veränderungen. Hierzu zählen insbesondere Veränderungen der DNA-Methylierung und Chromatinstruktur sowie eine stabile transkriptionelle Deregulation bestimmter Gene (7, 44, 45). Die epigenetische Repression und DNA-Hypermethylierung von einzelnen Genen bzw.

Einleitung

Tumorsuppressorgenen kann dabei auch über chromosomale Regionen ausgebreitet vorkommen und wird folgend als *Long-Range Epigenetic Silencing* (LRES) bezeichnet (46-48). Eine Hypomethylierung von Retroelementen findet dagegen vor allem in fortgeschrittenen Tumoren statt (49, 50). Eine der häufigsten Veränderungen im PCa überhaupt ist die DNA-Methylierung von *GSTP1*, welche bereits frühzeitig in der intraepithelialen Neoplasie (PIN) nachweisbar ist (3, 51). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zahlreiche Gene als hypermethyliert beschrieben. Für viele dieser Methylierungsveränderungen konnte ein Nutzen im Rahmen der Diagnostik, aber auch teils in der prognostischen und prädiktiven Vorhersage gezeigt werden (7). Die bereits beschriebene Methylierung von *GSTP1* kann hierbei als gutes Beispiel für einen diagnostischen Biomarker angeführt werden; sie besaß in verschiedenen Studien eine Sensitivität und Spezifität von über 90% (7). Während im Fall von *GSTP1* nur eine, wenn überhaupt, geringgradige prognostische Wertigkeit nachgewiesen werden konnte, zeigte die Hypermethylierung des Homeobox-Transkriptionsfaktor-Gens *PITX2* eine gute Vorhersagekraft in Bezug auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs (52, 53).

Interessanterweise konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Auftreten des Fusionstranskripts *TMPRSS2-ERG* bzw. die Überexpression von *ERG* mit dem Methylierungsgrad verschiedener Gene korreliert. Dieses Verhalten wurde u. a. einer Interaktion mit dem *ERG*-Zielgen *EZH2* zugeschrieben (54-56). Die Interaktion zwischen epigenetischem *Silencing* von Tumorsuppressorgenen sowie Transkriptionsfaktor-Netzwerken zeigt sich weiterhin durch die Regulation von *NKX3.1* durch *ETS/ERG* bzw. *EZH2* (57). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass strukturelle Rearrangements, wie *TMPRSS2-ERG*, insbesondere in *early-onset* Karzinomen häufig sind (58). Neben diesen prinzipiell spezifischen Veränderungen wurde eine Assoziation zwischen höherem Lebensalter und der Zunahme der Hypermethylierung von CpG-Inseln berichtet (59). Wie bereits beschrieben, besitzt das PCa ein medianes Erkrankungsalter von 70 Jahren. Somit scheint eine altersassoziierte Komponente die Ausprägung der epigenetischen Veränderungen zu beeinflussen, wie es ebenfalls für kolorektale Karzinome beschrieben wurde (60). Vor dem Hintergrund der besonders stark ausgeprägten Altersabhängigkeit der Prostatakarzinom-Inzidenz sind daher altersassoziierte Gene von besonderem Interesse.

1.2 Maligne Tumoren der Niere

1.2.1 Epidemiologie von malignen Nierentumoren

In Deutschland treten maligne Tumore der Niere mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 5600 bei Frauen und einer deutlich höheren Inzidenz von ca. 9000 bei Männern auf (1). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 75%. Der Anteil der Neuerkrankungen an allen malignen Tumorerkrankungen liegt für beide Geschlechter zwischen 3-4%, der Anteil an den gesamten Sterbefällen zwischen 2-3%.

1.2.2 Klinisch-pathologische Klassifikation von malignen Nierentumoren

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (CCRCC) repräsentiert mit 80% den größten Anteil an den malignen Nierentumoren und entstammt dem Tubulusepithel, insbesondere dem der Rinde. Neben dem mikroskopisch klarzelligen Erscheinungsbild ist der Tumor makroskopisch häufig durch Hämorrhagien und Cysten-artige Läsionen gekennzeichnet. Das CCRCC neigt darüber hinaus zu einem Wachstum in die Nierenvenen und zur hämatogenen Metastasierung. Das im Erwachsenenalter zu 10-15% auftretende papilläre Nierenzellkarzinom ist durch sein häufig multifokales und auch bilaterales Auftreten gekennzeichnet. Charakteristisch ist sein papilläres Wachstum. Mit einem Anteil von nur 5% an allen malignen Nierentumoren ist das chromophobe Nierenzellkarzinom (CRCC) verhältnismäßig selten. Charakteristisch für das CRCC ist eine große Anzahl von im Cytoplasma nachweisbaren Makrovesikeln. Während klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome ihren Ursprung gewöhnlicherweise im proximalen Tubulusepithel besitzen, entsteht das chromophobe Nierenzellkarzinom wahrscheinlich aus den eosinophilen Zwischenzellen des Sammelrohrs (61). Das klinische Stadium bzw. die Ausbreitung von malignen Nierentumoren wird unter Nutzung der TNM-Klassifikation beurteilt (Tab. 1-2).

Einleitung

Tab. 1-2 TNM-Klassifikation für Nierenzellkarzinome nach UICC

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor ≤ 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenale Fettkapsel, aber nicht Gerota'sche Faszie
T3b	Tumorausbreitung in Nierenvenen oder Hohlvene unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumorausdehnung in Hohlvene oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumorausdehnung über Gerota'sche Faszie hinaus
NX	Benachbarte (regionäre) Lymphknoten sind nicht beurteilbar
N0	Kein Anhalt für benachbarte Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem benachbarten Lymphknoten
N2	Metastase in mehr als einem benachbarten Lymphknoten
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen treten am häufigsten in der Lunge, im Skelett und in den Lymphknoten, eher selten im Gehirn und in der Leber

1.2.3 Risikofaktoren des klarzelliges Nierenzellkarzinoms

Das Auftreten von klarzelliges Nierenzellkarzinomen konnte in mehreren Studien mit Lebensstil-bedingten Faktoren assoziiert werden. Hierzu zählen insbesondere das Rauchen, die arterielle Hypertonie und Adipositas (62-64). Neben diesen Faktoren wurde weiterhin ein Zusammenhang mit der chronischen Niereninsuffizienz, insbesondere auch bei Vorkommen von Nierenzysten, nachgewiesen (65). Darüber hinaus zeigte sich eine familiäre Häufung im Zusammenhang mit dem Morbus von Hippel-Lindau und der Tuberosen Sklerose (66, 67). Im Fall des Vorliegens eines Morbus von Hippel-Lindau (vgl. *VHL*) liegt die Lebenszeit-Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms bei 45%.

1.2.4 Häufige genetische und epigenetische Veränderungen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Wie bereits beschrieben, zeigen ca. 80 % aller klarzelligen Nierenzellkarzinome eine Mutation oder Deletion von *VHL*. Bei *VHL* handelt es sich um eine E3 Ubiquitin-Ligase, die in Abhängigkeit des Sauerstoffangebots die Ubiquitin-abhängige Degradation des Transkriptionsfaktors *HIF-1 α* kontrolliert (68). Bei der Antwort auf eine physiologische Hypoxie regulieren *HIF-1 α* und *HIF-2 α* die Transkription, beispielsweise durch die Induktion des Wachstumsfaktors *VEGF-A*, der eine direkte Aussprossung von neuen Gefäßen vermittelt. Weiterhin erfolgt, insbesondere im Fall von *HIF-2 α* , eine Interaktion mit dem Protoonkogen *MYC* (69). Die hypoxische Genantwort im *VHL*-abhängigen CCRCC geht in einem Teil der Fälle mit Mutationen in den Histon-modifizierenden Enzymen *PBRM1*, *SETD2*, *KDM5C* und *UTX* einher (70, 71).

Obwohl die Ausprägung für epigenetische Veränderungen, insbesondere der DNA-Methylierung, offenbar schwächer ausgeprägt ist als im PCa, konnten zahlreiche Gene als hypermethyliert nachgewiesen werden (72, 73). Neben dem CCRCC-typischen *VHL* sind davon auch mehrere aus anderen Tumorentitäten bekannte putative Tumorsuppressorgene betroffen, beispielsweise auch die ebenfalls im PCa hypermethylierten Gene *RASSF1A* und *GSTP1* (74). Ein Vergleich der Hypermethylierungshäufigkeit von ausgewählten Genen im Prostatakarzinom und klarzelligen Nierenzellkarzinom ist in der folgenden Tabelle 1-3 zu finden (7, 72-74).

Tab. 1-3 Vergleich der Hypermethylierungshäufigkeit ausgewählter Gene in Prostatakarzinom (PCa) und klarzelligem Nierenzellkarzinom (CCRCC)

Gen	PCa	CCRCC
<i>RASSF1A</i>	80%	45%
<i>GSTP1</i>	90%	12%
<i>RARβ2</i>	75%	12%

1.3 Die untersuchten Gene und Genomregionen

1.3.1 Gene der genomischen Region 3q25.32

Verschiedene Tumorentitäten zeichnen sich durch Amplifikationen des langen Arms von Chromosom 3 (3q) aus. Im Fall des PCa zeigte sich die 3q25-26 Amplifikation und damit einhergehend erhöhte Kopienanzahlen des Onkogens *PIK3CA* in ca. 30% der Fälle (75, 76). *PIK3CA* liegt in der genomischen Region 3q26.32-33 und besitzt einen Abstand von ca. 20 Mb zur untersuchten Region 3q25.32 (Abb. 1-3). In diesem Kontext ist daran zu erinnern, dass das Prostatakarzinom verhältnismäßig häufig Veränderungen im PI3K-Signalweg aufweist, hierzu außer *PIK3CA* Amplifikationen auch Deletionen der Phosphatase *PTEN* gehörend (26-28). Weiterhin konnte für den ebenfalls auf 3q gelegenen Genlocus *TLOC1/SEC62* eine besonders häufige Amplifikationsrate von 50% nachgewiesen werden (77). Demnach liegt 3q25.32 offensichtlich innerhalb einer tumorbiologisch bedeutenden Region, die im Regelfall nicht durch Deletionen charakterisiert ist.

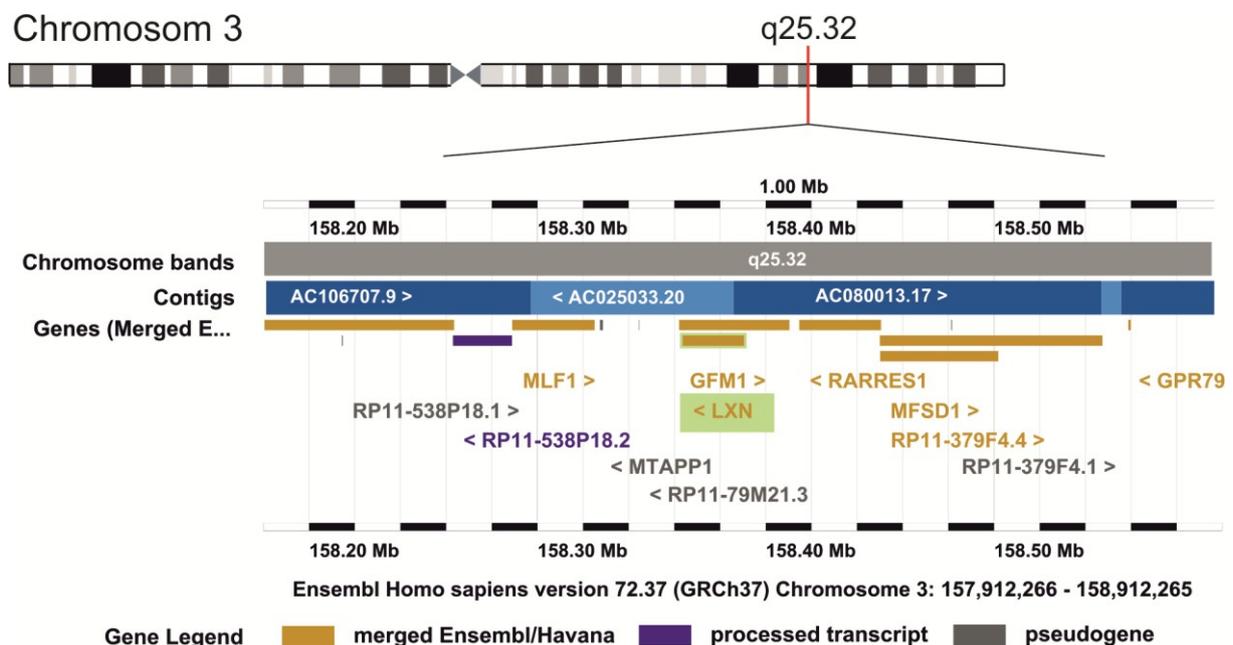


Abb. 1-3 Lage der untersuchten Gene auf der genomischen Region 3q25.32. Als Besonderheit erkennt man die Lage von *LXN* im Intron des auf dem komplementären Strang codierten Gens *GFM1*.

Einleitung

Die Auswahl der untersuchten Gene erfolgte, wie bereits beschrieben, aufgrund einer in der Literatur beschriebenen Interaktion von *LXN* mit Prozessen des Alterns und der in vorherigen *Microarray*-Analyse nachweisbaren geringeren Expression als in Normalgeweben der Prostata (8). Die Ausweitung der Analysen auf das Nachbargen *RARRES1* erschien aufgrund dessen häufig nachgewiesenen Methylierung in einer Vielzahl von Tumoren interessant und zudem aufgrund seiner Paralogie zu *LXN*. Im Folgenden werden biologische Funktion und pathophysiologische Relevanz der auf 3q25.32 liegenden Gene genauer dargestellt.

LXN

Der endogene *Tissue Carboxypeptidase Inhibitor (TCI)*, bekannt als *Latexin (LXN)*, ist der einzig bekannte Metallo-carboxypeptidase-Inhibitor in Säugetieren und besitzt eine starke Homologie zu Cystatinen (78). *Latexin* besteht aus 2 Cystatin-Modulen mit einer aus 41 Aminosäuren bestehenden Zwischensequenz (79). Trotz seiner im Vergleich zu anderen Organen, beispielsweise der Prostata, verhältnismäßig niedrigen Expression im Gehirn, wurde *LXN* zunächst als Marker in der Entwicklung einer Subpopulation von Neuronen im lateralen Neocortex beschrieben (80, 81). Eine besondere Bedeutung konnte in Bezug auf die Regulation des hämatopoetischen Stammzellpools nachgewiesen werden (82). In einer QTL-Analyse zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der *Latexin*-Expression und der Anzahl von hämatopoetischen Stammzellen. Diese direkte Interaktion mit dem Stammzellpool führte folgend zur Diskussion eines potentiellen Einflusses von *Latexin* auf Prozesse des Alterns (83). Weiterhin ist *LXN* durch sein Vorkommen in Mastzell-Granula in Entzündungsprozesse (84) und in die BMP2-abhängige Differenzierung von Chondrozyten involviert (85). Eine Untersuchung von *LXN* in Bezug auf den epigenetischen Status war insbesondere interessant, da eine Tumor-spezifische DNA-Methylierung von *LXN* in Melanom-Zelllinien, beim Medulloblastom und beim Magenkarzinom bereits beschrieben war (86-88), nicht aber in urologischen Tumoren. Weiterhin liegt das Gen in direkter Nachbarschaft zum ebenfalls untersuchten Tumor-Suppressorgen *RARRES1*. Auch *RARRES1* wurde in einer Vielzahl an malignen Tumoren als häufig hypermethyliert beschrieben (s. u.). Die beiden Gene sind paralog, ihre Verwandtschaft wird durch den ähnlichen Aufbau aus einer aus zwei Cystatin-Modulen bestehenden "Latexin-Domäne" evident (89). Strukturell unterscheidet sich *RARRES1* durch eine zusätzliche Transmembran-Domäne. Zur weiteren Charakterisierung eines Zusammenhangs bereits entdeckter epigenetischer Veränderungen

erfolgte daher eine regionale Analyse epigenetischer Veränderungen der 3q25.32-Region im Prostatakarzinom.

RARRES1

RARRES1 wurde zunächst im Rahmen der Retinsäure-Antwort als Zielgen entdeckt, daher die Bezeichnung "*Retinoic Acid Receptor Responder 1*". Trotz der spezifischen und ausgeprägten Expressionsinduktion nach Zugabe des Retinoids Tazaroten (90) ist die Funktion von *RARRES1* noch nicht vollständig aufgeklärt. Strukturell zeichnet sich *RARRES1* durch eine ausgeprägte Homologie zum benachbarten und paralogen Gen *LXN* mit einer zusätzlichen Transmembrandomäne aus (89). Des Weiteren konnte eine Interaktion mit der Carboxypeptidase *AGBL2* und ein hieraus resultierender Einfluss auf die Tubulin-Tyrosinierung nachgewiesen werden (91). Dieser Prozess wirkt sich auf die Ausbildung von Zellfortsätzen und die Zellmotilität aus (92).

Jing et al. beschrieben 2002 in über 90% aller Prostatakarzinome eine Herunterregulation von *RARRES1*. Nach Wiederherstellung der Expression zeigte sich eine geringere Invasivität und Tumorigenität (93). Folgend konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Herunterregulation von *RARRES1* in ca. 60% der PCa durch DNA-Methylierung verursacht wird (94, 95). Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Assoziation der *RARRES1*-Methylierung mit einer schlechteren Prognose deutete die Assoziation mit dem Gleason-Score an (96). Allerdings konnten weitere Studien keine Korrelation mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines biochemischen Rezidivs nachweisen (97).

MLF1 (Myeloid Leukemia Factor 1)

Die t(3;5)(q25;q35) Translokation zählt zu den balancierten Translokationen im Myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) (98). Hierbei erfolgt ein *Rearrangement* von Nucleophosmin (*NPM*) und dem *Myeloid Leukemia Factor 1 (MLF1)* zum Fusionstranskript *NPM/MLF1* (99). Die hieraus resultierende erhöhte Expression von *MLF1* geht dabei mit der malignen Progression des MDS einher (100). Eine erhöhte Expression von *MLF1* konnte ebenfalls in Plattenepithelkarzinomen der Lunge und des Ösophagus nachgewiesen werden (101). Entgegen diesen Berichten einer Überexpression wurde *MLF1* auch als hypermethyliert, bzw. negativ reguliert, im Magenkarzinom beschrieben (102). *MLF1* wechselt durch posttranslationale Modifikation

Einleitung

und auch in Folge der t(3,5) (q25, q35) Translokation seine zelluläre Lokalisation vom Cytoplasma in den Nucleus (103). Weiterhin konnte es als Interaktionspartner von 14-3-3 Proteinen, *MLF1P*, *CSN3* und *MADM* beschrieben werden. Funktionell führt MLF1 zu einer Inhibition der Erythropoetin-abhängigen Differenzierung und der Expression von $p27^{KIP1}$ in hämatopoetischen Zellen (104, 105). Paradoxe Weise konnte weiterhin gezeigt werden, dass MLF1 eine MDM2-unabhängige und CNS-Komplex-abhängige Stabilisierung von *p53* ermöglicht (103, 106). Eine Beschreibung in urologischen Tumoren lag nicht vor.

GFM1* und *MFSD1

Das Gen *GFM1* codiert für den mitochondrialen Elongationsfaktor EFG1 und besitzt demnach eine essentielle Rolle in der mitochondrialen Translation und folgend der oxidativen Phosphorylierung (107). Bei *MFSD1* handelt es sich um ein Mitglied der Superfamilie der *Solute Carrier* (SLC) Transporter (108). Über spezifischere Funktionen von *GFM1* sowie *MFSD1* im Menschen ist nur wenig bekannt. Eine Beschreibung in urologischen Tumoren lag wiederum nicht vor.

1.3.2 *KLOTHO* (*KL*)

Das durch das Gen *KL* kodierte Protein *KLOTHO* wurde in der Maus als Suppressor des Alternsprozesses entdeckt. In Folge des *knock-outs* von *KL* in Mäusen konnte ein mit alternden Menschen vergleichbarer Phänotyp festgestellt werden. Charakteristisch zeigten sich Atherosklerose, Osteoporose, Lungenemphyse, Hautatrophie, Thymusatrophie, ektope Kalzifikationen, Atrophie der Genitalien und zusätzlich eine erheblich verkürzte Lebensspanne (109, 110). Dagegen konnte durch Überexpression eine Verlängerung der Lebensspanne von Mäusen um 30% erreicht werden (111). Die Expression von *KL* erfolgt besonders im distalen Konvolut der Niere und dem Plexus choroideus (109). Durch alternatives Spleißen des *KL*-Transkripts erfolgt die Translation einer sezernierten oder membranständigen *KLOTHO* Variante (112). Darüber hinaus kann die membranständige Variante durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 proteolytisch gespalten werden. Dieser Prozess kann durch Insulin in Abhängigkeit des PI3K-Signalwegs induziert und weiterhin spezifisch durch TIMP3 inhibiert werden (113). *KLOTHO* interagiert mit einer Vielzahl an FGF-Rezeptoren und insbesondere als Co-Rezeptor von FGF23. Hieraus folgt in der Niere eine Suppression der Phosphat-Reabsorption und der Vitamin-D-Biosynthese

Einleitung

durch Hemmung der 1,25-Hydroxylase (114). Neben dem Einfluss auf die FGF23-abhängige Regulation des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels inhibiert *KLOTHO* weiterhin die Wirkung von IGF-1 (115). Hierbei überschneidet sich die auf den Alternsprozess suppressive Wirkung von *KLOTHO* mit mehreren modellhaften *C. elegans*-Phänotypen, hierunter die *loss of function* Mutationen im Insulin Rezeptor Homolog *daf-2*, dem abhängigen *PI3K*-Homolog *age-1* und ebenso dem FOXO-Homolog *daf-16* (116, 117). *KLOTHO* besitzt weiterhin eine inhibierende Wirkung auf den WNT-Signalweg und führt folgend zur Degradation von β -Catenin und damit zu einer Verringerung der TCF-abhängigen Proliferation (118).

Im Mammakarzinom zeigte sich eine verringerte Expression von *KLOTHO*, die mit einer Hypermethylierung in Zelllinien sowie in 35% der untersuchten Karzinomgewebe einher ging (119, 120). Hypermethylierung von *KLOTHO* konnte weiterhin im Magen-, Colon- und Zervixkarzinom nachgewiesen werden (121-123). Eine Beschreibung in urologischen Tumoren lag nicht vor.

1.3.3 *COQ7*

Das *COQ7*-homologe Gen *clk-1* wurde als eines der ersten altersassoziierten Gene im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Während ein kompletter Verlust von *Mclk-1* in der Maus letal ist, besitzen heterozygote *Knock-out* Mäuse (*Mclk-1*^{+/-}) im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen ein verlängertes Leben (124). *COQ7* ist im Komplex mit *COQ1-8* in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und besitzt durch seine Funktion in der Ubichinon(UQ)-Synthese einen direkten Einfluss auf das allgemein als Antioxidans bekannte CoenzymQ (UQ₁₀) und die Atmungskette (125). In *Mclk-1* +/- Mäusen zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant niedrigere Konzentration an UQ₉ in der inneren im Verhältnis zur äußeren mitochondrialen Membran (126). Dementsprechend führt ein Verlust von *COQ7* bzw. seinen Homologen zu einer Akkumulation von 6-Demethoxyubichinon (DMQ₆) und einer damit einhergehenden gestörten Übertragung der Elektronen von den Komplexen I und II auf Komplex III der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette. Hieraus folgt ein direkter Einfluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (127). Wie genau aus diesen Mechanismen eine Verlängerung des Lebens in den jeweiligen Modellorganismen resultiert, ist noch nicht bekannt (128). Im Gegensatz zu seiner gut untersuchten Funktion bei altersassoziierten Prozessen sind die Funktionen des auf Chromosom 7 beherbergten *COQ7* in der Tumorbilogie nicht untersucht.

1.3.4 Der *BRAHMA*-assoziierte Faktor *SMARCD3*

Das Gen *SMARCD3* kodiert für *BAF60c*, dem *BRAHMA*-assoziierten Faktor 60c, einer Untereinheit des BAF-Komplexes. Es ist insbesondere in der Differenzierung und Transdifferenzierung von Herzmuskelzellen involviert (129, 130). Der BAF-Komplex setzt sich aus Mitgliedern der *SWI/SNF*-Familie zusammen und repräsentiert neben der *ISWI*- und *CDH*-Familie die Gruppe der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Enzyme (131). Ein Verlust von *SMARCD3* in Mäusen führt zur Letalität um E10-11 und ist durch eine abnormale Entwicklung von Herz- und Skelettmuskulatur gekennzeichnet (132). Neben dieser essentiellen Funktion in der Entwicklung von Säugetieren besitzt die *SWI/SNF*-Familie eine zunehmende Bedeutung in der Tumorbilogie (133), insbesondere durch den Nachweis rekurrenter Mutationen in *BRG-1* (*BRAHMA-related gene 1*), *ARID1A* (*BAF250A*), *ARID1B* (*BAF250b*), *ARID2* (*BAF200*) und *PBRM1* (*BAF180*) in verschiedenen Tumorarten, darunter Prostata- und Nierenkarzinom (134).

BAF60c wurde als wichtige Komponente der Genregulation durch Nukleäre Rezeptoren (NR) charakterisiert und interagiert u.a. direkt mit *PPAR γ* und *RAR* (135, 136). In Bezug auf die Regulation der Androgen-abhängigen Regulation konnte weiterhin gezeigt werden, dass die *BAF60*-Proteine a-c über das FxxLF-Motif des Androgen-Rezeptors (AR) als Co-Aktivatoren wirken und darüber hinaus die Androgen-abhängige Expression von *TMPRSS2* fördern (137). Die Expression von *SMARCD3* scheint insbesondere über p63, einem Mitglied der p53-Familie, reguliert zu werden (138).

2. Ziele der Arbeit

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Auswahl der untersuchten Gene anhand einer zuvor durchgeführten Expressionsanalyse von Prostatakarzinomgeweben (8). Dabei wurden in einer Microarray-Analyse etwa 300 Gene identifiziert, deren Expression besonders in Karzinomen mit ausgeprägter LINE1-Hypomethylierung und typischen Veränderungen von Chromosom 8 verändert war. Von diesen wurden hier vor allem solche betrachtet, die in Folge einer Literaturrecherche als alternansassoziiert beschrieben waren. Hierzu zählen das auf Chromosom 3q25.32 liegende Gen *LXN* kodierend für einen Proteaseinhibitor, das auf Chromosom 13q3.1 liegende Gen *KLOTHO* kodierend für einen membranständigen oder sezernierten FGFR23-Co-Rezeptor bzw. IGF1-Inhibitor und das auf Chromosom 16p12.3 liegende Gen *COQ7* kodierend für ein Enzym im Ubichinon-Syntheseweg. Im Verlauf der Arbeit kam das auf Chromosom 7q36.1 liegende Gen *SMARCD3* (BAF60c) hinzu; es kodiert für eine Untereinheit des Chromatin-Remodellierungskomplexes SWI/SNF (auch bekannt als BAF-Komplex). Da keines der untersuchten Gene auf Chromosom 8 lokalisiert ist, kann man die Hypothese aufstellen, dass ihre veränderte Regulation im Karzinom mit Störungen in epigenetischen Mechanismen, v.a. der DNA-Methylierung, zusammenhängt. Daher wurde zunächst jeweils der DNA-Methylierungszustand untersucht.

Für *LXN* wurde der Zusammenhang zwischen Genexpression und DNA-Methylierung in einem klinisch charakterisierten Kollektiv von Prostatakarzinomen und in PCa-Zelllinien detailliert untersucht. Die initialen Ergebnisse führten im Fall von *LXN* zu einer Ausweitung der Analysen auf einen größeren Abschnitt der chromosomalen Region 3q25.32, insbesondere auf das benachbarte und bereits in anderen Arbeiten als häufig methyliert beschriebene Gen *RARRES1*. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen im Einzelnen:

1. Besteht eine Abhängigkeit zwischen der Karzinom-spezifischen Methylierung von *LXN* und *RARRES1* sowie mit ihrer Expression und der weiterer benachbarter Gene, nämlich *MLF1*, *GFM1* und *MFSD1*?
2. Bestehen Zusammenhänge von DNA-Methylierung oder Expression dieser Gene und klinischen Parametern, insbesondere der Prognose?
3. Ist die DNA-Methylierung wesentlich für die Repression von *LXN* und *RARRES1* und geht sie mit Veränderungen in Histonmodifikationen einher?

Ziele der Arbeit

4. Die Nutzung der Pyrosequenzierung für die DNA-Methylierungsanalyse erlaubte weiterhin eine gleichzeitige Bestimmung des Genotyps von häufig heterozygoten SNPs der Region. Hieraus folgte weiterhin die Frage nach möglichen Einflüssen des Genotyps auf Karzinom-spezifische epigenetische Veränderungen in der Region 3q25.32.

Die Untersuchungen zu den Genen in 3q25.32 bildeten den Hauptteil der Arbeit (Abschnitt 4.1). Für *KL* wurde ebenfalls der Zusammenhang von DNA-Methylierung und Genexpression in den Geweben und in Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Da die stärkste Expression von *KL* in der Niere stattfindet, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie auch die Expression in Nierenkarzinomen verfolgt (Abschnitt 4.2). Für *SMARCD3* ergaben eigene Untersuchungen (Abschnitt 4.3) keine Hinweise auf veränderte DNA-Methylierung; dies war auch das Ergebnis eines entsprechenden Pilotprojektes für *COQ7*. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Expressionskonstrukte für die beiden Proteinprodukte hergestellt, die für künftige funktionelle Analysen Verwendung finden könnten (Abschnitt 4.3).

3. Material & Methoden

3.1 Untersuchte Prostatakarzinomgewebe

Die Untersuchung wurde an Karzinomgeweben von 86 Patienten nach radikaler retropubischer Prostataktomie (RRP) durchgeführt (Tab. 3-1). Das mediane Alter des untersuchten Kollektivs betrug 66 Jahre. Die Behandlung der Patienten durch RRP erfolgte im Zeitraum von 1997-2002 in der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die mediane Dauer des *Follow-up* lag bei 92 Monaten.

Tab. 3-1 Charakteristik der untersuchten Patienten und Karzinomgewebe
(Die Angaben in Klammern geben den jeweiligen Anteil in Prozent an)

Variabel	Kategorie	DNA-Proben	<i>Follow-up</i> vorhanden	mRNA-Proben
Alter	< 60	17 (19.8)	15 (19.0)	5 (11.9)
	60-69	45 (52.3)	41 (51.9)	19 (45.2)
	70-79	24 (27.9)	23 (29.1)	18 (42.9)
Tumorstadium	T pT2a	8 (9.3)	8 (10.1)	4 (9.5)
	pT2b	32 (37.2)	29 (36.7)	14 (33.3)
	pT3a	27 (31.4)	26 (32.9)	15 (35.7)
	pT3b	19 (22.1)	16 (20.3)	9 (21.4)
N	0	72 (83.7)	66 (83.5)	33 (78.6)
	1	14 (16.3)	13 (16.5)	9 (21.4)
M	0	86 (100)	79 (100)	42 (100)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gleason Score	< 7	27 (31.4)	24 (30.4)	11 (26.2)
	7	35 (40.7)	33 (41.8)	23 (54.7)
	> 7	24 (27.9)	22 (27.9)	8 (19.0)
Resektionsrand	R0	43 (50.0)	41 (51.9)	15 (35.7)
	R1	43 (50.0)	38 (48.1)	27 (64.3)
Biochemisches Rezidiv	Nein	45 (52.3)	45 (57.0)	24 (57.1)
	Ja	41 (47.7)	34 (43.0)	18 (42.9)
Gesamt		86	79	42

Als Schwellenwert für ein biochemisches Rezidiv wurde ein PSA-Wert von 0,2 ng/ml definiert. Die zur Kontrolle eingesetzten benignen Prostata-Normalgewebe stammten aus Patienten mit einem medianen Alter von 69. Die Untersuchungen an den Prostatageweben waren von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität gebilligt worden (Studiennummer 2114) und alle Patienten hatten der Verwendung ihrer entnommenen Gewebe für wissenschaftliche Untersuchungen schriftlich zugestimmt.

3.2 Untersuchte Nierenkarzinomgewebe

Bei den untersuchten Nierenkarzinomgeweben handelte es sich um 36 klarzellige (CCRCC) und 6 chromophobe Nierenzellkarzinome (Tab. 3-2). Als Kontrolle dienten 18 Normalgewebe der Niere.

Die Untersuchungen an den Nierengeweben waren von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität gebilligt worden (Studiennummer-3998) und alle Patienten hatten der Verwendung ihrer entnommenen Gewebe auch für wissenschaftliche Untersuchungen schriftlich zugestimmt.

Tab. 3-2 Charakteristik der untersuchten Nierenzellkarzinome
(Die Angaben in Klammern geben den jeweiligen Anteil in Prozent an)

Typ	Stadium	Anzahl
CCRCC	Gesamt	36
	T1	6 (16,7)
	T2	7 (19,4)
	T3	5 (13,9)
	unbekannt	18 (50,0)
chromophobes RCC	Gesamt	6

3.3 Eingesetzte Materialien und Geräte

3.3.1 Zelllinien

Tab. 3-3 Charakteristika der untersuchten Zelllinien

Name	Androgenabhängigkeit	Herkunft	Literaturreferenz
LNCaP	sensitiv	Lymphknotenmetastase	(139)
PC-3	unabhängig	Knochenmetastase	(140)
Du145	unabhängig	Hirnmetastase	(141)
22Rv1	moderat sensitiv	Xenograft	(142)
MDAPCa2b	sensitiv	Knochenmetastase	(143)
PrEC	unabhängig	Normales Prostataepithel	(144)

3.3.2 Medien und Additive

Tab. 3-4 Verwendete Medien und Additive

Zelllinien	Medium	Additive	Antibiotikum
PC-3, Du145, 22Rv1, LNCaP	RPMI1640 Glutamax (Gibco, Karlsruhe)	10% FCS	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
MDAPCa2b	BRFF-HPC1 (AthenaES, Baltimore)	20% FCS 2 mM L-Glutamin Collagen Typ IV	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
PrEC	PrEGM Bulletkit (Lonza, Verviers)		100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
HT1739, SD, T24, EJ	DMEM Glutamax (Gibco, Karlsruhe)	10% FCS	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

3.3.3 Chemikalien

Tab. 3-5 Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
5-Aza-2-Deoxycytidin	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Luria Base Agar Miller	Difco
Luria Broth Baserot	Invitrogen
Kanamycinsulfat	Serva
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma
Geneticin	Invitrogen
TAE 50x	5 Prime
X-Gal	peqlab
Agarose	Sigma

3.3.5 Geräte

Tab. 3-6 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Pyromark Workstation Q24	Qiagen, Hilden
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
ABI7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
LB 9506 MiniLumat	Berthold Technologies
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Avanti 30	Beckmann Coulter, Krefeld
Allegra 21R	Beckmann Coulter, Krefeld
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Neolab, Heidelberg
Heraeus Zellkultur	Fischer Scientific, Schwerte
Zellkulturmikroskop Eclipse 200	Nikon, Tokyo
Nanodrop Spektrometer	Peqlab, Erlangen

3.3.6 Eingesetzte Kits

Tab. 3-7 Verwendete Kits

Anwendung	Name	Hersteller
RNA-Isolierung	RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
	Qia Shredder Säulen	Qiagen, Hilden
DNA-Isolierung	Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen, Hilden
PCR	HotStar Taq Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
	Novagen KOD DNA Polymerase	Merck, Darmstadt
Real-Time PCR	QuantiTect SybrGreen PCR Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid-Isolierung	Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
	Fast Plamid Mini Kit	5Prime, Hamburg
Klonierung	TOPO TA Cloning Kit pCR4.0	Invitrogen, Karlsruhe
	TOPO Cloning Kit pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe
Methylierungsanalyse	EZ DNA Methylation Gold Kit	Zymo Research, Freiburg
Chromatinimmunopräzipitation	ChIP IT Express Kit	Active Motif, Brüssel
Promoteraktivitätsanalyse	Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega, Mannheim
Pyrosequenzierung	Pyromark PCR Kit	Qiagen, Hilden
	Pyromark Gold Q24 Reagents	Qiagen, Hilden

3.3.7 Primer

Tab. 3-8 Primersequenzen

Anwendung	Gen	Sequenz	Annealing Tm
Pyrosequenzierung	<i>LXN</i>	Fwd :GATGTAGGGAGTTTGGGTTTAA Rev: AACTCACCTCCATACTAACTTATTT	58 °C
		Seq: GAGTTGAGGAAGAAGAT	
		Fwd: GGGAAATTATAGTTTAAATGTTTGGAGAA Rev: CCCATAAAACCACTCCTTTTC	59 °C
		Seq: ACCCCTAAATTCTCTC	
	<i>KLOTHO</i>	HS_KL_01_PM PyroMark CpG Assay	Qiagen
Methylierungsspezifische PCR	<i>LXN</i>	M-Fwd: GTTTAAATAGTAGTTTTTCGGAGTC M-Rev: AATAACAAAACGCCGCCGT U-Fwd: GGTTTAAATAGTAGTTTTTGGAGT M-Fwd: ACCAATAACAAAACACCACCCA	55 °C 55 °C
		<i>RARRES1 (TIG1)</i>	M-Fwd: GTAGTACGGGCGGGTCGC M-Rev: GACATCGCTCCGCAACG U-Fwd: GAGGTAGTATGGGTGGGTTGT U-Rev: AATACTAAAATACAACATCACCTCCA
	<i>LXN</i>	Fwd: GGATGTAGGGAGTTTGGGTT Rev: TTCCATTCCRAATAAAACAATAAC	53 °C
		<i>KLOTHO</i>	Fwd: GTTTAGGTTAGTAGTATTAGTAGTA Rev: CTCCAAACTACTCTCAAAAAAC
	<i>SMARCD3 TSS 1</i>	Fwd: GAGTAGAGATTGTTAGGTAGG Rev: ATCCCTAACTCATTATTAACCTC	55 °C
	<i>SMARCD3 TSS 2</i>	Fwd: GTTGGGGGAAAAGTTGGAATTG Rev: CCCCTCAAACCTACCTAAC	65 °C
Expressionsanalyse	<i>LXN</i>	Hs00220138_m1	Applied Biosystems
	<i>RARRES1</i>	Hs00161204_m1	Applied Biosystems
	<i>GFM1</i>	Hs00227997_m1	Applied Biosystems
	<i>TBP</i>	4326322E	Applied Biosystems
	<i>MFSD1</i>	Fwd: GGAAGTGCATATGGCTTCATG Rev: CCGAGAATCCAGTATCATAACCAG	55 °C
	<i>MLF1</i>	Fwd: GGTCAACCAGGAGTTCATCAAT Rev: TGCCACTCCTCATCAAAAGC	55 °C
Klonierungen	<i>RARRES1 Promoter</i>	Fwd: AATTCTCGAGATTCTCGGGGAGGCGTCCC Rev: AAATTAAGCTTTCTGTAGCGAGCCCGGTCC	60 °C
	<i>SMARCD3 Isoform1</i>	Fwd: AGCAGATCCTCAGAATGGC Rev: GTTCCGTCGTGCTGCTTAT	60 °C
	<i>SMARCD3 Isoform2</i>	Fwd: CAGGACTCAGAGGGGAGAGT Rev: AGGTGGCAGAGGAGTGATG	60 °C
	<i>COQ7</i>	Fwd: AGGGCACTATTGGCCAGTTC Rev: CAGGCAAACTGGACACACTT	65 °C
	ChIP	<i>RARRES1</i>	Fwd: TCTGTAGCGAGCCCGGGTCC Rev: CCCCAACCCGACCCTCTCC
<i>LXN</i>		Fwd: TGGGGAGGGAGTCAGTGGGC Rev: GGGACGCTGCATGCGGTGTA	60°C

Fortsetzung Tab. 3-8

Anwendung	Gen	Sequenz	Tm
ChIP	<i>GAPDH</i>	Fwd: TACTAGCGGTTTTACGGGCG Rev: TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	60 °C
	<i>CTCF</i>	Fwd: GAACAGCCCATGCTCTTGGAG Rev: CAGAGCCCAAGCCAAAGAC	60 °C

3.3.8. Plasmide

Tab. 3-9 Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pCR4	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA4/TO	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pIRES2-EGFP	Clontech, Saint-Germain-en-Laye
pGL3basic	Promega, Mannheim

3.4 Zellkultur

Die Kultur der PCa-Zelllinien LNCaP, PC-3, Du145 und 22Rv1 erfolgte in *RPMI1640 GlutaMAX* (Gibco, Karlsruhe), supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml). Die Kultur der PCa Zelllinie MDAPCa2b erfolgte auf kollagenbeschichteten Zellkulturschalen in *BRFF-HPC1* (AthenaEs, Baltimore), supplementiert mit 20% FCS, 2 mM Glutamin und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml). Die Kultur der epithelialen Prostatazellen (PrEC) erfolgte in *PrEGM* (Lonza, Verviers). Die Kultur der Blasenkarzinomzelllinien T24, SD, EJ und HT1367 erfolgte in *DMEM GlutaMAX* (Gibco, Karlsruhe), supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml).

Zum Passagieren wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS oder HEPES-BS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe) von der Zellkulturschale gelöst. Nach einer Inkubation von 1-5 min, je nach Zelltyp, wurde die Protease Trypsin durch Zugabe des jeweiligen Mediums inaktiviert und die Zellen in ein 15 ml Röhrchen (Falcon) überführt und bei 300 x g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen wieder ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 80-90% inkubiert.

Zur Kultur von MDAPCa2b wurde humanes Collagen Typ IV aus der Plazenta (Sigma Aldrich, St. Gallen) auf eine Konzentration von 2 mg/ml in 0,2 % Essigsäure gelöst und steril filtriert. Diese Stocklösung wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch 1:5 in autoklavierten dH₂O verdünnt. Die Lösung wurde folgend auf die verwendeten Zellkulturschalen aufgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kollagenlösung entfernt, die Zellkulturschalen trocknen gelassen und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Die wiederum bei 37°C getrockneten Zellkulturschalen konnten mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert werden.

3.5 Behandlung von PCa Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Das Cytidin-Analogon 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) inhibiert DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und hat folgend einen hypomethylierenden Einfluss auf die behandelten Zellen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 2 µM 5-Aza-dC über einen Zeitraum von 3 Tagen inkubiert. Das Medium wurde dabei zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Konzentration jeden Tag ersetzt.

Die Aufnahme von 5-Aza-dC in die Zelle erfolgt aktiv durch Nukleosid-Transporter (SLC 28A, 22, 15, 29A). Das aufgenommene inaktive Nukleosid muss anschließend ATP-abhängig durch Deoxycytidin-Kinase phosphoryliert werden. Das entstandene 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Triphosphat wird während der Replikation in die DNA inkorporiert und geht dann eine stabile kovalente Bindung mit DNMTs ein. Diese kovalente Bindung führt zu einer DNMT-Degradation, einhergehend mit einer Hypomethylierung der zellulären DNA.

3.6 Transiente Transfektion von PCa Zelllinien

Die Transfektion der Plasmid-DNA in PCa Zelllinien erfolgte unter Nutzung von *X-tremeGENE 9* (Roche, Basel). Die jeweiligen PCa Zelllinien wurden in Antibiotika-freien Medium ausgesät und bei einer Konfluenz von 50-70% zur Transfektion genutzt. Die Vorbereitung des Transfektionsansatzes erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Nach der Zugabe von 100 µl *OptiMEM* (Gibco, Karlsruhe) und 3-6 µl *X-tremeGENE 9* Transfektionsreagenz wurde der Ansatz für 5 sec leicht gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1-2 µg Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde wiederum leicht gevortext und folgend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde je nach Größe der genutzten Kulturschale eine

definierte Menge des Transfektionsansatz über das gesamte *well* verteilt. In der Regel wurden für ein Well einer 6-Well-Platte 3 µl Transfektionsreagenz und 1 µg Plasmid eingesetzt.

3.7 Stabile Transfektion und *Colony-forming Assay*

Der *Colony-forming Assay* kann zur Analyse des Einflusses eines auf einem Plasmid kodierten Proteins auf die transfizierte Zelllinie genutzt werden. Bei jeder Kolonie handelt es sich prinzipiell um einen stabil transfizierten Klon, der durch die Selektion mit dem jeweiligen Antibiotikum entstanden ist. Ein parallel zum Resistenzgen durch das Plasmid exprimiertes Protein kann somit durch einen Einfluss auf die Zellviabilität einen Einfluss auf die Anzahl der Kolonien ausüben. Bei den transfizierten Plasmiden handelte es sich um pIRES2-EGFP-Konstrukte (Appendix IV), welche in die PCa-Zelllinie PC-3 transfiziert wurden. Der Vektor pIRES2-EGFP zeichnet sich durch eine Geneticin(G418)-Resistenz aus. Die Selektion erfolgte bei einer Konzentration von ca. 200 µg/ml über einen Zeitraum von 4 Wochen.

3.8 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Promoteraktivität in PCa-Zelllinien

Die Promoteraktivität im Luciferase exprimierenden Vektor pGL3basic (Appendix III) wurde in den PCa-Zelllinien PC-3 und Du145 mittels *Dual Luciferase Assay* (Promega, Mannheim) bestimmt. Hierzu wurden die Zelllinien mit den pGL3basic-Konstrukten in 6 *well*-Kulturschalen transfiziert bzw. mit den pCDNA3-Konstrukten äquimolar kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 48 h mit PBS gewaschen und in der Kulturschale unter Zugabe von 0,5 ml 1x PBL Lysepuffer durch leichtes Schütteln für 15 min lysiert. Im Luminometer-Messröhrchen wurden 100 µl LARII Reaktionsmix vorpipettiert und folgend mit 20 µl Lysat gemischt. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte im *Miniluminat LB 9506* (EG&G Berthold).

3.9 RNA-Isolation aus Zelllinien

Die im Folgenden beschriebene RNA-Isolation erfolgte unter Nutzung des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen, Hilden). Die zur RNA-Isolation genutzten Zellen wurden nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gewaschen und dann durch die Zugabe von 350-600 µl RLT in der Zellkulturschale lysiert. Das Zelllysat wurde zur Homogenisierung auf eine *QiaShredder*-Säule

überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das homogenisierte Lysat 1:1 mit 70% Ethanol gemischt und auf eine *RNeasy* Säule überführt. Die an die Säule gebundene RNA wurde in mehreren Zentrifugationsschritten durch 700 µl RW1 und anschließend 2x mit je 500 µl RPE gewaschen. Abschließend erfolgte die Elution der RNA mit 30-50 µl RNase-freien H₂O. Die Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde im *NanoDrop 1000 Spektrophotometer* (Peqlab, Erlangen) analysiert und bei -70°C gelagert.

3.10 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die reverse Transkription bezeichnet die Synthese von cDNA aus einer isolierten RNA. Hierzu wurden 2 µg der aufgereinigten RNA mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Zugabe von 2 µl Mastermix A (Tab. 3-10) wurde die Probe für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Der Denaturierungsansatz wurde mit 8 µl Mastermix B (Tab. 3-11) gemischt, kurz zentrifugiert und 10 min bei 25°C und folgend 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 70°C über einen Zeitraum von 15 min gestoppt und die Probe anschließend auf Eis gestellt, bzw. bei -20°C gelagert.

Tab. 3-10 Reaktionsansatz Mastermix A

Komponente	Eingesetzte Volumina
Oligo(dT) [0,5 µg/µl]	0,6 µl
Random [0,2 µg/µl]	0,125 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
ad 50 µl ddH ₂ O	0,275 µl

Tab. 3-11 Reaktionsansatz Mastermix B

Komponente	Eingesetzte Volumina
5x FS Puffer	4 µl
DTT [0,1 M]	2 µl
RNase Inhibitor [40 U/µl]	1 µl
SSIIRT [200 U/µl]	1 µl

3.11 Isolation genomischer DNA aus PCa-Zelllinien

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte unter Nutzung des *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Zunächst wurden die adhärennten Zellen 2x mit PBS gewaschen und mittels Schaber von der T75-Zellkulturschale (Sarstedt) entfernt, in ein 15 ml Röhrchen (Falcon) überführt und bei 1500 xg für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Lyse wurden 0,5 ml dieser Zellsuspension eingesetzt und 1:1 mit eiskaltem Puffer C1 und 1,5 ml dH₂O und durch Invertieren gemischt. Die

lysierten Zellen wurden bei 1300 xg für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellkerne wurden wiederum mit 0,25 ml eiskaltem Puffer C1 und 0,75 ml dH₂O resuspendiert, bei 1300 xg für 15 min zentrifugiert und anschließend in 1 ml Puffer GC resuspendiert und gevortext. Die durch Puffer GC lysierten Zellkerne wurden weiterhin bei 50°C für 45 min mit 25 µl Proteinase K behandelt. Nach der Equilibrierung des *GenomicTip 20/G* (Qiagen, Hilden) mit 1 ml Puffer QBT konnte die Probe auf die Säule aufgetragen werden und wurde 3x mit Puffer QC gewaschen. Die Elution der genomischen DNA erfolgte mit 2 ml Puffer QF. Anschließend wurde diese mit 1,4 ml Isopropanol und folgend 1 ml 70% Ethanol durch je 15-minütige Zentrifugationen bei 12000 xg gefällt und in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

3.12 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA

Die Bisulfit-Behandlung genomischer DNA wird genutzt, um eine Analyse der DNA-Methylierung zu ermöglichen. Unter Behandlung von genomischer DNA mit Natrium-Bisulfit erfolgt eine Umwandlung von unmethyliertem Cytosin in Uracil, während methyliertes Cytosin nicht modifiziert wird und beide damit beispielsweise durch eine Sequenzierung unterscheidbar werden. Die Bisulfit-Behandlung wurde unter Nutzung des *EZ DNA Methylation Gold Kit* (Zymo Research) durchgeführt. Die zur Bisulfit-Konversion eingesetzte DNA-Menge betrug zwischen 200 und 500 ng und wurde auf ein Volumen von 20 µl mit dH₂O aufgefüllt. Das *CT Conversion* Reagenz wurde unter Zugabe von 900 µl dH₂O, 300 µl *M-Dilution* und 50 µl *M-Dissolving* frisch angesetzt. Je Probe wurden 20 µl genomische DNA mit 130 µl *CT Conversion* Reagenz gemischt, für 10 min bei 98°C denaturiert und anschließend 2,5 h bei 64°C inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe von 600 µl *M-Binding* und Übertragung der Probe auf die *Zymo-Spin IC* Säule. Die an die Säule gebundene DNA wurde nach kurzer Zentrifugation bei 10000 xg mit 100 µl *M-Wash* gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Desulfonierung für 20 min durch 200 µl *M-Desulphonation*. Die auf der Säule befindliche DNA wurde wiederum mit 200 µl *M-Wash* durch Zentrifugation gewaschen und abschließend mit 10 µl *M-Elution* eluiert.

3.13 Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) erlaubt die *in vivo*-Analyse von Protein/DNA-Interaktionen. Die Vorgehensweise der ChIP kann in folgende 3 Schritte untergliedert werden:

1. Fixierung und Ultraschall-Behandlung des Chromatins,
2. die eigentliche Immunpräzipitation durch den spezifischen Antikörper und
3. die Analyse der angereicherten genomischen DNA.

Zur Durchführung der ChIP wurden das *ChIP IT Express* und *ChIP IT Control Kit Human* (ActiveMotif, Brüssel) eingesetzt.

3.13.1 Fixierung und Ultraschall-Behandlung des Chromatins

Nach Entfernung des Mediums der in einer 15 cm Kulturschale adhärent wachsenden Zellen, wurden diese für 10 min mit 20 ml Fixier-Lösung (0,54 ml 37% Formaldehyd in 20 ml Serum-freiem Medium) auf einem Schüttler fixiert. Die Fixier-Lösung wurde abgesaugt, die Zellen für 5 sec mit PBS gewaschen und anschließend die Fixierung durch Zugabe von 10 ml *Glycine Stop-Fix* Lösung gestoppt. Nach 5 min auf einem Schüttler wurden die Zellen wiederum für 5 sec mit 10 ml PBS gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden daraufhin in 5 ml PBS mit 25 µl PMSF von der Kulturschale gekratzt und in ein 15 ml Röhrchen auf Eis überführt. Nach Zentrifugation bei 720 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS mit je 5 µl PIC/PMSF resuspendiert. Zur Isolierung der Zellkerne wurde die Zellsuspension unter Nutzung eines Glaskolben-Homogenisators behandelt und anschließend bei 2400 x g zentrifugiert. Die Ultraschallbehandlung der in 350 µl *Shearing Puffer* resuspendierten Zellkerne erfolgte durch 5 Zyklen à 20 sec mit einer Pause von 30 sec bei 25% der maximalen Intensität. Nach der Ultraschallbehandlung wurde durch Zentrifugation bei 18000 x g für 15 min der das Chromatin enthaltende Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und konnte bei -80°C gelagert werden. Die DNA-Konzentration wurde mittels *NanoDrop 1000 Spektrophotometer* (Peqlab, Erlangen) analysiert. Die Größe der DNA-Fragmente konnte durch Gelelektrophorese ermittelt werden und betrug zwischen 200 und 1500 bp.

3.13.2 Durchführung der ChIP

Ausgehend von der zuvor bestimmten DNA-Konzentration wurden 10 µg des Ultraschall-behandelten Chromatins für einen ChIP-Reaktionsansatz eingesetzt (Tab. 3-12). Der Reaktionsansatz wurde in Silikon-beschichteten 1,7 ml Reaktionsgefäßen für 4 h bei 4°C inkubiert. Die zur ChIP eingesetzten Antikörper richteten sich gegen H3K9ac (#ab4441), H3K9me3 (#ab8898; beide Abcam, Cambridge) und H3K27me3 (#39535; Active Motif, Brüssel). Weiter wurden Kontrollantikörper gegen RNA Polymerase II und IgG (beide ChIP-IT Control KIT Human, Active Motif) eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die magnetischen Beads auf dem Boden des Reaktionsgefäßes unter Nutzung eines Magneten gesammelt und der Überstand verworfen. Die *Beads* wurden nacheinander mit je 800 µl ChIP Puffer 1 und 2x mit ChIP Puffer 2 gewaschen und anschließend mit 50 µl Elutionspuffer AM2 gemischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT erfolgte die Zugabe von 50 µl *Reverse Cross-Linking* Puffer. Die magnetischen Beads wurden wiederum durch einen Magneten gesammelt und der Chromatin beinhaltende Überstand abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß für 15 min bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf RT erfolgte die Zugabe von 2 µl Proteinase K und wiederum ein Inkubationsschritt für 1 h bei 37°C. Abschließend wurden 2 µl Proteinase K Stop Lösung zugegeben und die Probe konnte zur Analyse mittels *Real-Time* PCR verwendet werden.

Tab. 3-12 Reaktionsansatz der ChIP

Komponente	Eingesetzte Volumina
magnetische Protein G Beads	25 µl
ChIP Puffer 1	10 µl
Chromatin (10 µg)	x µl (<60 µl)
PIC (Proteinase Inh. Cocktail)	1 µl
dH2O	ad 200 µl Gesamtvolumen
Antikörper (zuletzt zugegeben)	1-3 µg

3.13.3 Analyse der angereicherten DNA mittels quantitativer *Real-Time* PCR

Die Quantifizierung der angereicherten DNA erfolgte mittels quantitativer *Real-Time* PCR. Die im Regelfall mit einem aktiven transkriptionellen Status assoziierte Histonmodifikation H3K9ac wurde in Relation zur Anreicherung des Haushaltsgens *GAPDH* gemessen, die

üblicherweise inaktiven Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 in Relation zu dem methyliert vorliegenden Gen *CTCF*. Die verwendeten Primer sind in Tabelle aufgeführt (Tab. 3-6).

3.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Technik zur Amplifikation spezifischer Gensequenzen. Während die zur PCR eingesetzten DNA-abhängigen DNA-Polymerasen ansonsten eine nahezu identische Funktion besitzen, hängt die Mutationsrate der PCR vom Vorhandensein einer 3'-5' Korrekturlesefunktion ab. Daher wurden je nach Produktlänge verschiedene Polymerasen eingesetzt. Während die genutzte *HotStar Taq* Polymerase (Qiagen, Hilden) keine Korrekturlesefunktion besaß, lag diese im Fall der für längere Produkte genutzten *KOD High-Fidelity-Polymerase* (Merck, Darmstadt) vor. Ein weiterer Unterschied der eingesetzten Polymerasen liegt in den verschiedenen PCR-Bedingungen (Tab. 3-13 – 3-16).

3.14.1 PCR-Bedingungen der HotStar Taq Polymerase

Tab. 3-13 Reaktionsansatz HotStar Taq

Komponente	Eingesetzte Volumina
10x Taq Puffer	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,75 µl
Primer [100 µM]	Je 0,15 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
Template DNA	1-2 µl
ad 50 µl ddH ₂ O	39-40 µl

Tab. 3-14 PCR-Programm HotStar Taq

	Zeit	Temperatur	Wdh.
Initiale	15 min	95°C	1
Denaturierung			
Denaturierung	20 s	95°C	35-
Annealing	20 s	T _m -3°C	40
Extension	1min/kb	72°C	
Finale Extension	10 min	72°C	1

3.14.2 PCR-Bedingungen der KOD High-Fidelity-Polymerase

Tab. 3-15 Reaktionsansatz KOD PCR

Komponente	Eingesetzte Volumina
5x HiFi Puffer	10 µl
dNTPs [10 mM]	0,75 µl
Primer [10 µM]	Je 0,15 µl
KOD Polymerase	0,25 µl
Template DNA	1-2 µl
ad 50 µl ddH ₂ O	34-35 µl

Tab. 3-16 PCR-Programm KOD PCR

	Zeit	Temperatur	Wdh.
Initiale	2 min	98°C	1
Denaturierung			
Denaturierung	15s	98°C	30-35
Annealing	15s	T _m +3°C	
Extension	15s/kb	72°C	
Finale Extension	2 min	72°C	1

3.15 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR (qPCR) ermöglicht neben der Amplifikation auch die fluoreszenzabhängige Quantifizierung der gebildeten DNA. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional zur gebildeten DNA-Menge zu. Eine Quantifizierung kann im Allgemeinen nur in der exponentiellen Phase der PCR stattfinden und das Überschreiten des definierten Ct-Wertes (*Cycle threshold*) ist demnach abhängig von der Menge der Ausgangssequenz. Der Ct-Wert entspricht damit der Anzahl an Zyklen, um dieses definierte Fluoreszenzniveau zu erreichen. Die Auswertung erfolgte mit einer Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung mit den Haushalts-Genen TBP und 18S RNA unter Nutzung von Pfaffl's $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Die im Rahmen der quantitativen Real-Time PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3-6 gelistet. Die quantitative Real-Time PCR wurde in zwei verschiedenen Methoden mit einem ABI 7500 (ABI, Darmstadt) durchgeführt, nämlich *QuantiTect Sybr Green* (Qiagen, Hilden) und *TaqMan* (ABI, Darmstadt).

3.15.1 Quantitative Real-Time PCR mit Sybr Green

Der Fluoreszenzfarbstoff *Sybr Green* ist durch eine Zunahme der Fluoreszenz nach Interkalation in doppelsträngiger DNA charakterisiert. Die gemessene Intensität ist demnach proportional zur gebildeten doppelsträngigen DNA; dieses Verfahren ist nur wertig, wenn die zu messende Zielsequenz spezifisch amplifiziert wird.

Tab. 3-17 Reaktionsansatz SybrGreen

Komponente	Eingesetzte Volumina
2x QuantiTect Sybr Green PCR Master Mix	12,5 μ l
Primer [100 μ M]	Je 0,1 μ l
Template DNA	2 μ l
ad 25 μ l ddH ₂ O	10,3 μ l

Tab. 3-18 PCR-Programm SybrGreen

	Zeit	Temperatur	Wdh.
Initiale Denaturierung	15 min	95°C	1
Denaturierung	15 s	95°C	40
Annealing	30 s	T _m -5°C	
Extension	30 s	72°C	

3.15.2 Quantitative Real-Time PCR mit *TaqMan*-Sonden

Bei *TaqMan*-Sonden handelt es sich um kurze Oligonukleotide, die am 5'- und 3'-Ende jeweils mit einem Fluorophor und einem Quencher gekoppelt sind. Es handelt sich demnach um ein Verfahren nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Im Verlauf der PCR bindet die zur Zielsequenz komplementäre Sonde und wird während der Extensionsphase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase degradiert. Die nun emittierte Fluoreszenz kann zur Quantifizierung gemessen werden.

Tab. 3-19 Reaktionsansatz TaqMan

Komponente	Eingesetzte Volumina
2x Taqman Master Mix	10 µl
20x TaqMan Assay	1 µl
Template DNA	2 µl
ad 20 µl ddH ₂ O	7 µl

Tab. 3-20 PCR-Programm TaqMan

	Zeit	Temperatur	Wdh.
Initiale	10	95°C	1
Denaturierung	min		
Denaturierung	15 s	95°C	40
Anneal./Extension	60 s	60°C	

3.16 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde eine Agarose-Konzentration zwischen 0,5 und 2,0% gewählt und in TAE-Puffer erhitzt. Nachdem die Proben mit Ladepuffer gemischt waren, konnten diese und der entsprechende Marker in die Taschen des gegossenen und abgekühlten Gels pipettiert werden. Die Auftrennung erfolgte bei 90-120 V im Laufpuffer TAE (5Prime, Hamburg). Nach 10 min Inkubation in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml EtBr in ddH₂O) konnte das Gel unter einer UV-Lampe analysiert werden.

3.17 PCR-Aufreinigung und DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren nach einer PCR zur Entsalzung und Entfernung von Komponenten kann essentiell für die Weiterbehandlung der Proben sein. Die PCR-Aufreinigung und ebenso DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte unter Nutzung von *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel, Düren). Hierbei unterschieden sich die zwei Verfahren nur im ersten Schritt. Im Fall der PCR-Aufreinigung wurde das Volumen der eingesetzten PCR im Verhältnis 1:2 mit Puffer NTI gemischt und direkt auf die *NucleoSpin*

Säule gegeben. Im Fall der Gel-Extraktion wurde das Gel-Fragment mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und anschließend im Verhältnis 100 mg:200 µl Puffer NTI gemischt. Nachdem das Gelstück nach 5-10 min bei 50°C aufgelöst worden war, konnte es auf die *NucleoSpin* Säule aufgetragen werden. Nach 30 sec Zentrifugation bei 11000 x g erfolgten zwei Waschschriffe mit 700 µl Puffer NT3 und folgend wurde die Membran durch 60s Zentrifugation bei 11000 x g getrocknet. Die DNA wurde abschließend mit 15-30 µl Puffer NE von der Membran eluiert und mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer (PeqLab, Erlangen) analysiert.

3.18 TA-Klonierung in pCR4-TOPO und pCR2.1

Die TA-Klonierung bezeichnet eine Technik zur Klonierung von PCR-Produkten mit einem 3'-terminalen A-Überhang in einen bereits linearisierten Vektor mit 5'-terminalem T-Überhang. Der 3'-terminale A-Überhang wird dabei durch die in der PCR genutzte *Taq*-Polymerase synthetisiert. Der Vektor pCR4-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) zeichnet sich darüber hinaus durch eine kovalente Bindung von Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus aus und ermöglicht damit eine Ligase-unabhängige Ligation. Die Restriktionskarten beider Vektoren befinden sich in Appendix I und II. Während der Reaktionsansatz der pCR4-TOPO-Klonierung (Tab. 3-21) nur 5 min inkubiert und anschließend direkt zur Transformation eingesetzt wurde, musste im Fall der Ligase-vermittelten Ligation von pCR2.1 (Invitrogen Karlsruhe, Tab. 3-22) eine Inkubation von mindestens 2 h bei 16°C bzw. Raumtemperatur erfolgen.

Tab. 3-21 Reaktionsansatz pCR4-TOPO

Komponente	Eingesetzte Volumina
PCR-Produkt	0,5-4 µl
Salt Lösung	1 µl
dH ₂ O	ad 5 µl
pCR4-TOPO Vektor	1 µl

Tab. 3-22 Reaktionsansatz pCR2.1

Komponente	Eingesetzte Volumina
PCR-Produkt	0,5-6 µl
10x Ligation Puffer	1 µl
pCR2.1 Vektor	2 µl
dH ₂ O	ad 9 µl
T4-Ligase	1 µl

3.19 Restriktion und Ligation

Die Restriktion erfolgte unter Nutzung eines abgestimmten Enzym-Puffer-Systems (Fermentas, Mannheim). Vor Sequenzierungen der Vektoren pCR4-TOPO und pCR2.1

erfolgten Kontrollrestriktionen mit *EcoRI* unter Verwendung von 1 µg Plasmid-DNA bei 37°C für 1,5h. Die zur Klonierung der pIRES2-EGFP und pCDNA4/TO Expressionsvektoren (Appendix IV und V) und des pGL3basic-Reportervektors (Appendix III) genutzten Primer sind in Tabelle 3-8 gelistet. Die Klonierung des *RARRES1*-Promoters mit dem jeweiligen rs6441224-Allel in den pGL3basic-Reportervektor erfolgte nach Sequenzierung in pCR4-TOPO unter Nutzung der in den Primern integrierten Restriktionsschnittstellen XhoI und HindIII. Die Subklonierung der *SMARCD3*- und *COQ7*-Expressionsvektoren aus pCR4-TOPO oder pCR2.1 in pIRES2-EGFP und pCDNA4/TO erfolgte durch Restriktion mit *EcoRI*. Die Kontrolle der Orientierung erfolgte durch Restriktion und Sequenzierung. Vor Auswahl der zur Restriktion eingesetzten Enzyme erfolgte ein *in silico*-Restriktionsverdau mit dem im Internet frei zugänglichen Programm NEBCutter2.0. Nach der Restriktion wurden die Fragmente, wie bereits in Abschnitt 3.16 beschrieben, über Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Die Ligation der aufgereinigten und kompatiblen DNA-Fragmente erfolgte unter Nutzung von T4-DNA-Ligase und dem zugehörigen 10x Puffer (Fermentas, Mannheim) in einem 10 µl Ansatz bei 16°C über Nacht. Das in der Ligation eingesetzte molare Verhältnis von Insert:Vektor betrug ca. 5:1 und wurde unter Nutzung von 25 ng Vektor mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse des Inserts (ng)} = \frac{\text{Länge des Inserts (bp)}}{\text{Länge des Vektors (bp)}} \times 125 \text{ ng}$$

Die Expressionsvektoren pCDNA3-ERG und pCDNA3-ETS wurden freundlicherweise von Dr. Michelle Hoffmann (Düsseldorf) und Prof. Nicolas Wernert (Bonn) zur Verfügung gestellt.

3.20 Transformation und Kultur von chemisch kompetenten *E. coli*

Bei chemisch-kompetenten *E. coli* handelt es sich im Allgemeinen um mit divalenten Kationen behandelte Zellen, welche unter kurzer Hitze-Behandlung eine Kompetenz zur Aufnahme von freier DNA, bspw. Plasmid-DNA besitzen. Vor Beginn der Transformation wurde ein Wasserbad auf 42°C aufgeheizt und LB-Agarplatten bei 37°C vorgewärmt. Der eingesetzte chemisch kompetente *E. coli*-Stamm TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde bei -80°C gelagert und auf Eis aufgetaut. Vom Ligationsansatz wurden 2-4 µl zu den auf Eis ruhenden TOP10 gegeben, mit der Pipettenspitze verrührt und anschließend für 15 min inkubiert. Die Hitze-Behandlung erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 30 sec. Danach wurden die Bakterine wieder auf Eis überführt und konnten direkt auf die vorgewärmten LB-

Agarplatten ausplattiert werden. Die Ansätze wurden nach Zugabe von 300 ml SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Schüttler bei 37°C für 1 h vorkultiviert und anschließend ausplattiert. Nach Inkubation der LB-Agarplatten über Nacht wurden einzelne Kolonien gepickt und in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C für maximal 16 h in einem Schüttler kultiviert. Die Konzentration von Ampicillin betrug 50-100 µg/ml und die Konzentration von Kanamycin 50 µg/ml.

3.21 Minipräparation von Plasmid-DNA

Bei der Minipräparation handelt es sich um eine schnelle Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer bakteriellen 1,5 - 3 ml LB-Kultur. Die Minipräparation wurde unter Nutzung von *FastPlasmid Mini* (5 Prime, Darmstadt) durchgeführt. Während die im folgenden Abschnitt 3.21 beschriebene Maxipräparation eine herkömmliche Plasmid-Aufreinigung unter Nutzung alkalischer Lyse darstellt, handelte es sich bei *FastPlasmid Mini* um ein Lysozym-vermitteltes Verfahren. Hierzu wurden 1,5 ml der über Nacht kultivierten LB-Kulturen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 12000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl kalte *Complete Lysis Lösung* vollständig durch Vortexen aufgelöst und für mindestens 3 min inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf die Säule übertragen und für 30 sec bei 12000 x g zentrifugiert, mit 400 µl Washpuffer gewaschen und zum Trocknen wieder für 1 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer.

3.22 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Im Rahmen der durchgeführten Maxipräparation mittels Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen, Hilden) erfolgte eine herkömmliche Aufreinigung unter Nutzung alkalischer Lyse, die sehr reine Plasmide ergibt. Das zur Maxipräparation eingesetzte Kulturvolumen betrug ca. 100-200 ml und wurde am Vortag durch 100 µl einer Starterkultur angeimpft. Die Kultur wurde zunächst bei 6000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 10 ml P1 resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurde die Lösung nach Zugabe von 10 ml P2 5x invertiert und anschließend für 5 min inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 10 ml P3, das sich bildende Präzipitat wurde folgend durch Nutzung von *QIAfilter* Säulen entfernt. Die gereinigte Plasmid-haltige Lösung wurde anschließend auf den zuvor durch 10 ml QBT äquilibrierten *QIAGEN-tip 500* gegeben und mit 2x 30 ml QC gewaschen. Die Elution erfolgte

mit 15 ml QF. Die DNA-Fällung geschah durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 30 min. Das Pellet wurde in 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 15000 x g und 20°C für 10 min gewaschen und anschließend in 200 µl dH₂O oder TE resuspendiert.

3.23 DNA-Sequenzierung

3.23.1 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung basiert auf einer Primer- und DNA-Polymerase-abhängigen Synthese einer komplementären Sequenz. Die zu sequenzierende DNA-Sequenz wird durch Biotin immobilisiert und die für die Synthese benötigten dNTPs werden zyklisch, getrennt voneinander zugegeben. Im Fall eines Einbaus in den Strang wird bei der DNA-Polymerase-vermittelten Hydrolyse der verwendeten dNTPs bzw. des dATP-Substrats dATP α S Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt. Im nächsten Schritt der Reaktionskette wird APS unter Verbrauch des freigesetzten PP_i durch Sulfurylase zu ATP umgewandelt. Das gebildete ATP kann, im Gegensatz zu dATP α S, nun die Luciferase vermittelte Reaktion von Luciferin in Oxyluciferin antreiben und führt zu einer Lichtemission. Die Intensität des emittierten Lichts ist somit nicht nur von der zyklischen dNTP-Zugabe abhängig, sondern insbesondere auch von dem quantitativen Verbrauch des jeweiligen dNTPs und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung. Weiterhin werden überschüssige dNTPs fortlaufend durch Apyrase abgebaut.

Die Pyrosequenzierung wurde zur quantitativen Methylierungsanalyse sowie Analyse des Genotyps genutzt und erfolgte unter Nutzung eines PyroMark Q24 (Qiagen, Hilden) mit Vakuum-Arbeitsstation. Die zu sequenzierende DNA-Sequenz wurde unter Nutzung von biotinyliertem Primer (Tab. 3-6) mittels PCR amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Zur Vorbereitung der Proben wurden 20 ml des PCR-Produkts mit 2 µl Sepharose-Streptavidin-Beads (Qiagen, Hilden), 40 µl *Binding Puffer* und 18 µl dH₂O gemischt und für 10 min bei 1500 rpm in einem Schüttler gemixt. Der Sequenzierprimer wurde zu einer Konzentration von 0,3 µM in *Annealing Puffer* verdünnt und 25 µl auf eine PyroMark Q24-Platte vorpipettiert. Unter Nutzung der Vakuumstation wurden die Proben für je 5 sec in 70% Ethanol gewaschen und folgend in 0,2 N NaOH denaturiert. Vor Übertragung der Proben auf die vorbereitete PyroMark Q24 Platte erfolgte ein Waschschrift

für 10 sec in *Wash Puffer*. Die Primer-Anlagerung geschah durch eine Inkubation von 2 min bei 80°C. Abschließend wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt und waren damit für die Messung im PyroMark Q24 verwendbar.

Die Auswertung der Methylierung erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittels der quantitativ gemessenen Methylierung der jeweiligen CpGs. Am *LXN*-Promoter wurden hierfür die CpGs 1-5, am *RARRES1*-Promoter die CpGs 2-7 und am *KLOTHO*-Promoter die CpGs 1-4 berücksichtigt.

3.23.2 DNA-Sequenzierung in der Technik nach Sanger

Die Sequenzierung von klonierten Plasmiden bzw. der Expressionskonstrukte erfolgte durch den Sequenzierservice des Biologisch-medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die eingesetzte Methodik zeichnet sich durch den Einbau von Didesoxy(tri)nukleotid in den zu sequenzierenden Strang und dem hiermit assoziierten Kettenabbruch aus. Die entstandenen Fragmente werden durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Basenfolge kann folgend aus dem Fluoreszenz-Signal der spezifisch markierten Nukleotide abgeleitet werden.

3.24 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Nutzung von STATA 11 (STATA) und Sigmaplot 11 (Systat). Die Informationen zu den genutzten statistisch-mathematischen Vorgehensweisen finden sich in den zugehörigen Legenden bzw. im Fließtext.

4. Ergebnisse

4.1 Epigenetische Charakterisierung der 3q25.32 Region im Prostatakarzinom

4.1.1 Quantitative Bestimmung der Hypermethylierung von *LXN* und *RARRES1*

Die mittels Prosequenzierung durchgeführte quantitative Analyse der DNA-Methylierung von *RARRES1* und *LXN* erfolgte in Karzinomgeweben von 86 Patienten nach radikaler retropubischer Prostatektomie (RRP) sowie 21 benignen Kontrollgeweben (Abb. 4-1).

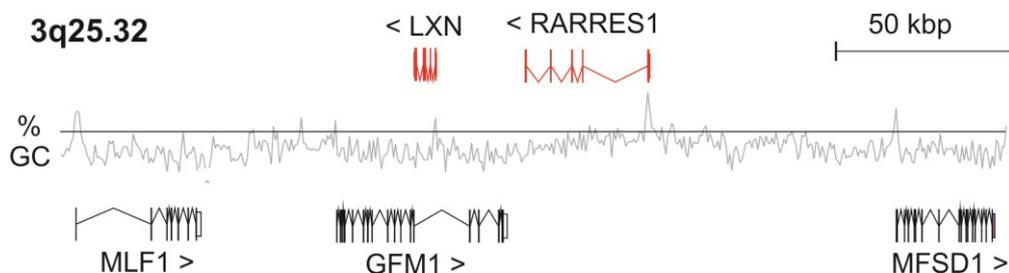


Abb. 4-1 Vereinfachte Darstellung der untersuchten Region 3q25.32. Die Bestimmung der DNA-Methylierung, Genexpression und Verteilung von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) erfolgte in den Promoterregionen der benachbarten sowie paralogen Gene *LXN* und *RARRES1*. Für die auf dem Gegenstrang befindlichen Gene *MLF1*, *GFM1* und *MFSD1* wurden Expressionsanalysen durchgeführt.

Die untersuchten Promotoren zeigten beide eine hochsignifikante Hypermethylierung im untersuchten Karzinomgewebe im Vergleich zu benignen Kontrollgeweben. Eine Karzinom-spezifische Hypermethylierung - entsprechend einer Spezifität von 1.0 - lag am *LXN* Promoter bei über 6,5% und am *RARRES1*-Promoter bei über 8,5% Methylierung vor (Abb. 4-2 A). Unter Nutzung dieser Karzinom-spezifischen Grenzwerte konnte bei 29% der Patienten eine *LXN*- und bei 60% eine *RARRES1*-Hypermethylierung nachgewiesen werden. Charakteristisch für eine Karzinom-spezifische Hypermethylierung war der senkrechte Anstieg beider ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Kurven auf die beschriebene Sensitivität von 0,29 und 0,6 (Abb. 4-2 B/C). Der von 0.29 flach ansteigende Verlauf der ROC-Kurve der DNA-Methylierung am *LXN*-Promoter stimmte darüber hinaus mit dem Vorhandensein eines größeren Anteils grenzwertig *LXN*-hypermethylierter Karzinomgewebe

Ergebnisse

überein. Die als AUC angegebene Fläche unter der Kurve diene demgegenüber zur Veranschaulichung der gesamten Häufigkeitsverteilung der Richtig- und Falsch-Positiven und betrug 0,73 für *LXN* und 0,82 für *RARRES1*.

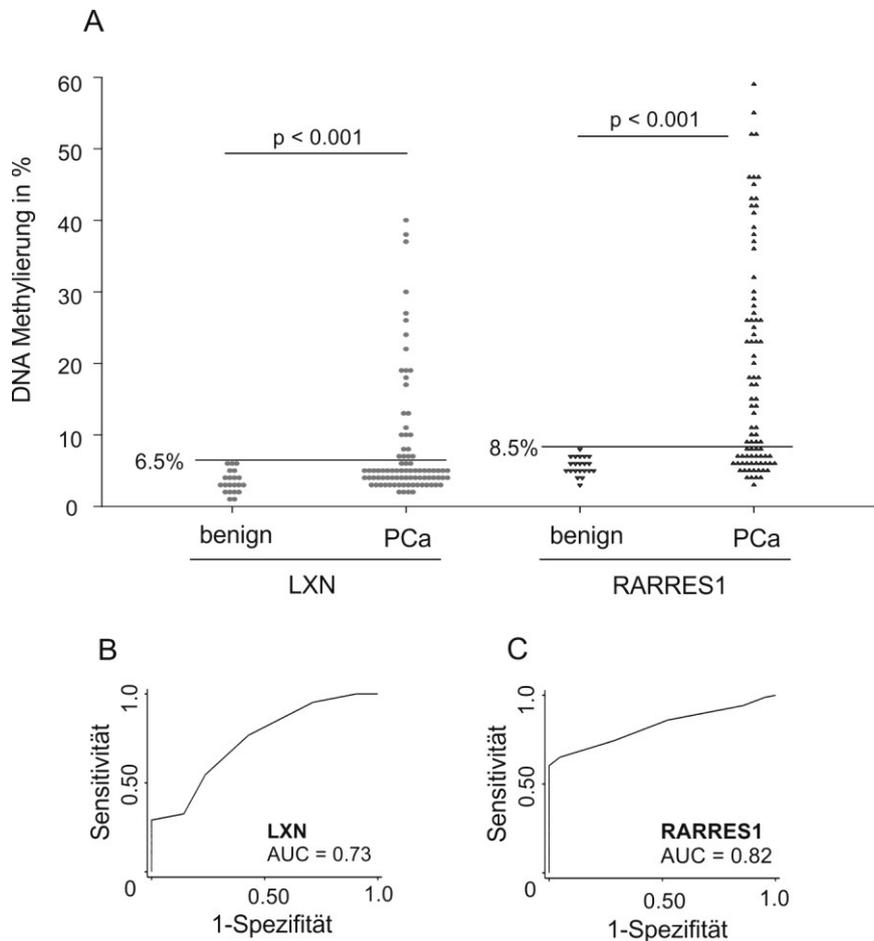


Abb. 4-2 Quantitative DNA-Methylierungsanalyse von *LXN* und *RARRES1* im PCa. Die Grenze zur Karzinom-spezifischen Methylierung lag am *LXN*-Promoter bei 6,5% und am *RARRES1*-Promoter bei 8,5% (A). Folglich konnte bei 29% der Patienten eine *LXN*- und bei 60% eine *RARRES1*-Hypermethylierung detektiert werden. Die aus der ROC Kurve resultierende Fläche unter der Kurve betrug 0,73 für die Messung der *LXN* Methylierung und 0,82 für die *RARRES1* Methylierung.

Es zeigte sich weiterhin eine ausgeprägte positive Korrelation der quantitativen Methylierung beider Gene (Spearman's $\rho = 0.4$, $p = 0.000147$). Ein besonderes Merkmal der gemessenen epigenetischen Veränderungen auf 3q25.32 lag darin, dass in 92% der Patienten mit Karzinom-spezifischer *LXN*-Hypermethylierung eine Hypermethylierung von *RARRES1* detektiert werden konnte, während umgekehrt in lediglich 44% der Patienten mit

RARRES1-Hypermethylierung ebenfalls eine *LXN*-Hypermethylierung vorlag (exakter Fischer Test $p < 0.001$).

4.1.2 Analyse der DNA-Methylierung von *RARRES1* und *LXN* in Abhängigkeit häufig genutzter klinisch-pathologischer Klassifikationen

Die veränderte DNA-Methylierung auf 3q25.32 im Prostatakarzinom wurde im Folgenden anhand der Abhängigkeit der klinisch-pathologischen Parameter Gleason-Score, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus charakterisiert. Hierbei zeigte sich eine nicht statistisch signifikante Tendenz stärkerer *RARRES1*-Methylierung zu einem höheren Gleason-Score und Tumorstadium (Abb. 4-3 A/B). Bei Betrachtung einer Abhängigkeit des Lymphknotenstatus erkennt man ebenfalls einen deutlichen Unterschied der Mediane, welcher im Rahmen der statistischen Analyse wiederum nicht signifikant war (Abb. 4-3 C).

Die nur in der Hälfte der Fälle detektierte Hypermethylierung von *LXN* zeigte dagegen keine Unterschiede in Bezug zu den untersuchten klinisch-pathologischen Klassifikationen. Allerdings waren Karzinomgewebe mit *LXN*-Hypermethylierung besonders häufig in Tumoren mit einem Gleason-Score von 7 und höher vorzufinden. Aufgrund der verhältnismäßig seltener vorkommenden Hypermethylierung von *LXN* im Vergleich zur Anzahl an Gleason 7 und höher klassifizierten Tumoren war daher wiederum eine nicht signifikante Assoziation erkennbar (Abb. 4-4 A). Dementsprechend zeigte sich in der Verteilungsanalyse mittels Chi-Quadrat Test unter Nutzung der Klassifikation auf Basis der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung eine statistisch signifikante Assoziation der *LXN*-Hypermethylierung mit dem Gleason-Score, während eine Karzinom-spezifische Hypermethylierung von *RARRES1* nicht signifikant mit dem Gleason-Score assoziiert war (Tab. 4-1). Für die weiterhin untersuchten klinisch-pathologischen Parameter Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus konnte dagegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 4-4 B-D).

Ergebnisse

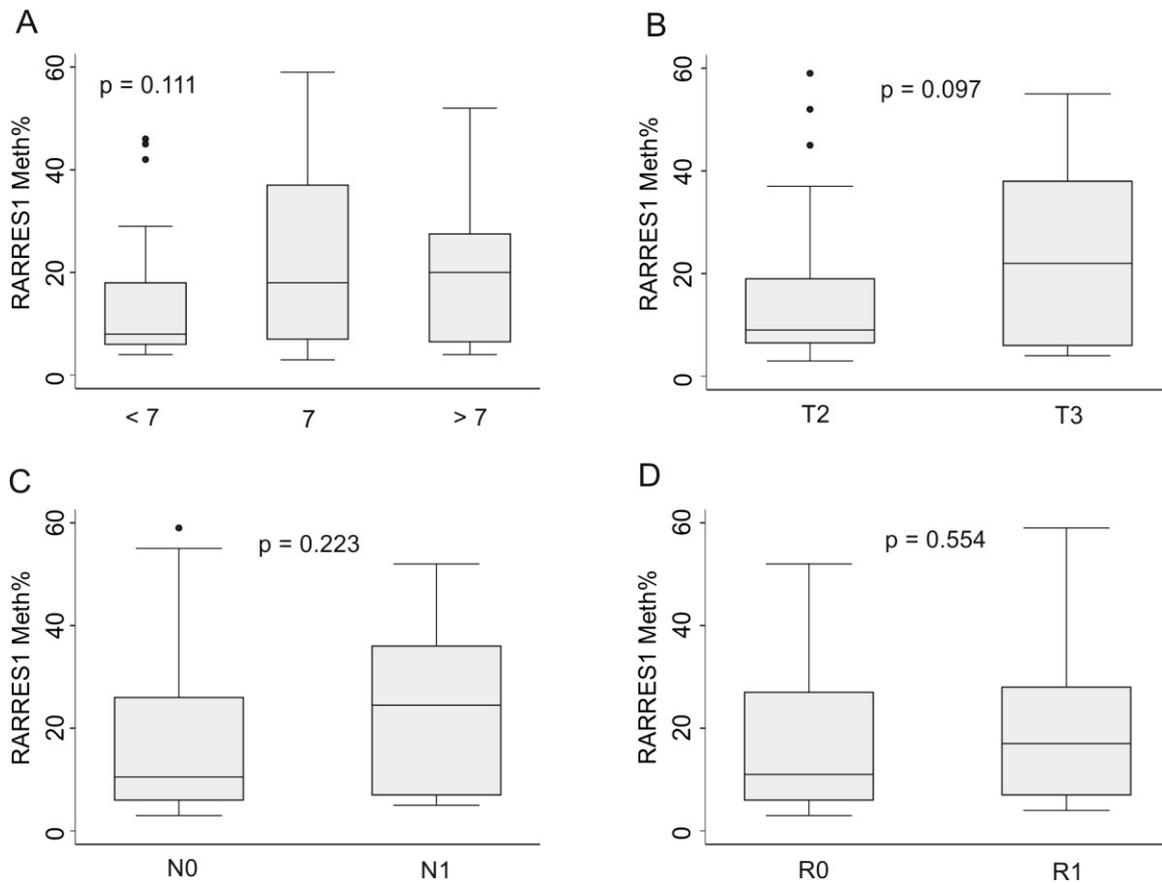


Abb. 4-3 Quantitative *RARRES1* Methylierung in Abhängigkeit von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

Tab. 4-1 Assoziation von Karzinom-spezifischer Hypermethylierung mit dem Gleason-Score

		Gleason-Score			Chi-Quadrat-Test
		<7	7	>7	p-Wert
<i>LXN</i>	Meth	3 (11%)	11 (31%)	11 (64%)	p = 0.022
	UnMeth	24 (89%)	24 (69%)	13 (54%)	
<i>RARRES1</i>	Meth	13 (48%)	24 (69%)	15 (62%)	p = 0.257
	UnMeth	14 (52%)	11 (31%)	9 (38%)	

Ergebnisse

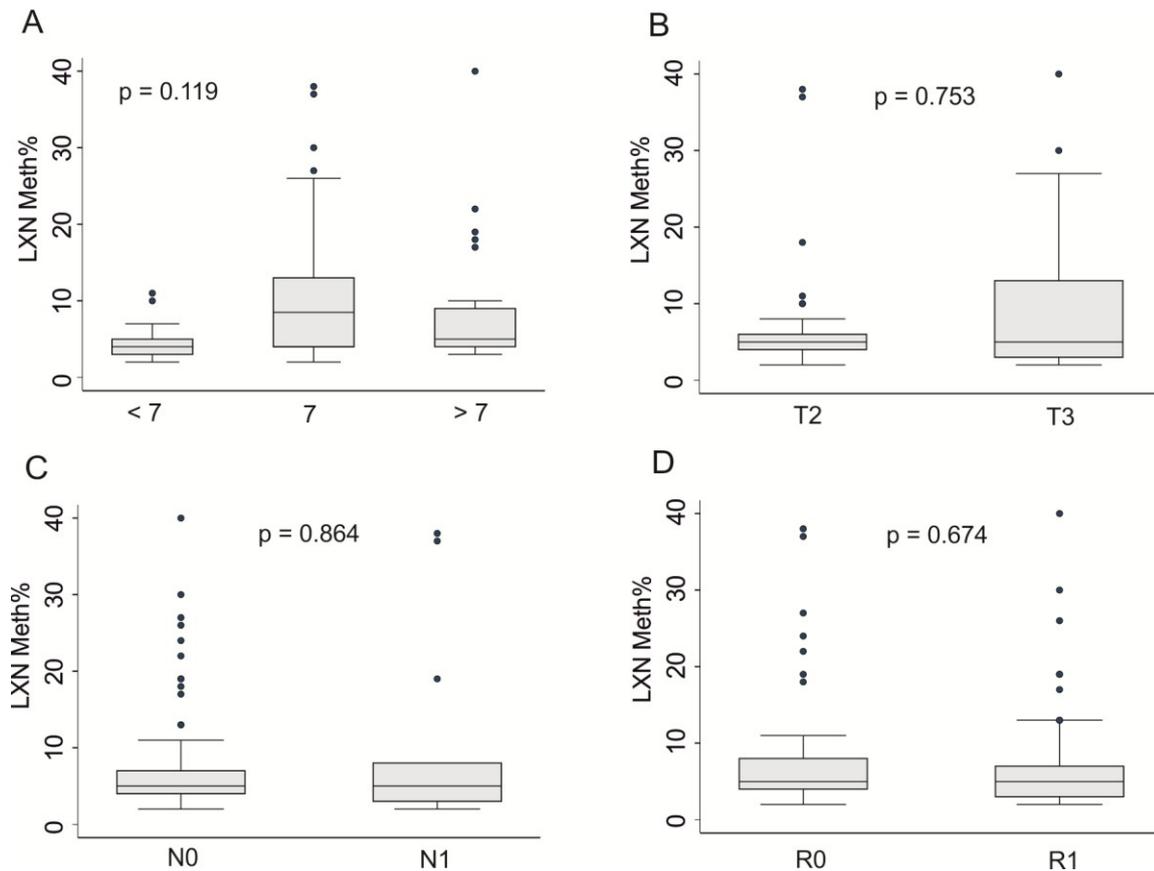


Abb. 4-4 Quantitative *LXN*-Methylierung in Abhängigkeit von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

4.1.3 Prognostische Wertigkeit der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von *LXN* und *RARRES1*

Um die statistische Analyse der Beziehung zwischen den als kontinuierliche Größen vorliegenden Hypermethylierungsdaten und den kategoriellen klinischen Daten zu erleichtern, ist eine Dichotomisierung der Hypermethylierungsdaten sinnvoll. Dazu wurde zunächst die Einteilung anhand der Grenzwerte für die karzinomspezifische Hypermethylierung verwendet. Diese betrug für *LXN* 6,5% und für *RARRES1* 8,5% (Abb. 4-2 A). Unter Nutzung dieser Grenzen konnte ein signifikant häufigeres Auftreten (log-rank Test $p = 0,048$) eines biochemischen Rezidivs der Patienten mit *LXN*-Hypermethylierung nachgewiesen werden, während keine signifikante Assoziation mit der Hypermethylierung von *RARRES1* vorlag (Abb. 4-5). Die Analyse der quantitativ kontinuierlichen Daten mittels Cox-Regression ergab hingegen für die *RARRES1*-Hypermethylierung eine hochsignifikante

Ergebnisse

Assoziation mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs, während die *LXN*-Hypermethylierung sich als nicht signifikant darstellte.

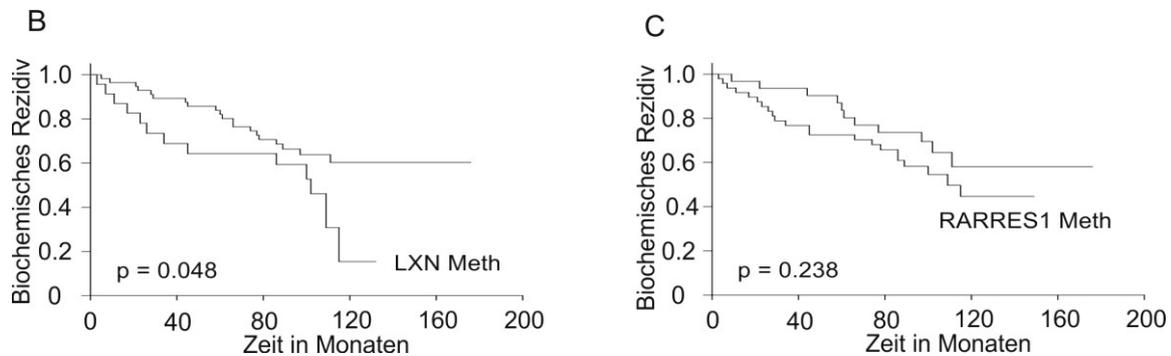


Abb. 4-5 Kaplan-Meier-Kurve zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs in Tumoren mit einer Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von *LXN* (A) und *RARRES1* (B). Die statistische Analyse erfolgte unter Nutzung des log-rank Tests.

Tab. 4-2 Prädiktive Wertigkeit mittels Cox Regressionsanalyse nach Dichotomisierung anhand der Karzinom-spezifischen Methylierung im Vergleich zu den quantitativ kontinuierlichen Daten

Datentyp	Gen	HR (95% KI)	p-Wert	c-Index
Karzinom-spezifische Dichotomisierung	<i>RARRES1</i>	1.54 (0.74-3.18)	0.242	0.559
	<i>LXN</i>	2.01 (0.99-4.05)	0.053	0.566
Kontinuierliche Daten	<i>RARRES1</i>	1.033 (1.013-1.053)	0.001	0.627
	<i>LXN</i>	1.028 (0.992-1.064)	0.124	0.544

4.1.4 Clusteranalyse der quantitativen Hypermethylierung von *LXN* und *RARRES1*

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, kann ein nicht optimaler Grenzwert die prognostische Wertigkeit des durchgeführten Tests stark einschränken. Die Suche nach dem optimalen Grenzwert eines Tests, im Sinne einer maximal prognostischen Aussagekraft der gebildeten Gruppen, besitzt daher eine herausragende Bedeutung. Um die Ausprägung der Methylierung an beiden Promotoren zu berücksichtigen, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Die auf diese Weise durchgeführte Dichotomisierung erfolgte durch den Algorithmus der euklidischen *k-medians* Clusterzentrenanalyse. Die hieraus folgende Aufteilung führte zur Bildung einer Gruppe von Karzinomgeweben mit intensiv hypermethylierter 3q25.32 Region. Diese im Folgenden als Cluster „*high*“ bezeichnete

Ergebnisse

Gruppe umfasste 34 der untersuchten 86 Patienten (39,6%) und war durch eine *RARRES1*-Hypermethylierung von über 20% gekennzeichnet. Dagegen lag bei 53 Patienten eine geringere 3q25.32-Methylierung und somit eine Zugehörigkeit zu Cluster „low“ vor (Abb. 4-6 A). Übereinstimmend mit der bereits beschriebenen Korrelation der untersuchten *RARRES1*- und *LXN*-Hypermethylierung besaßen 80% der Patienten mit Zugehörigkeit zu Cluster „high“ eine Karzinom-spezifische *LXN*-Hypermethylierung (exakter Fischer Test $p < 0,001$).

4.1.5 Prognostische Wertigkeit der 3q25.32-Methylierung nach Clusteranalyse

Die durch Clusteranalyse gebildeten Gruppen wurden folgend hinsichtlich ihrer klinisch-pathologischen Bedeutsamkeit untersucht (Abb. 4-6 A-D). Die durch eine stärkere Methylierungsintensität gekennzeichneten Patienten aus dem Cluster „high“ zeigten eine höhere Rate an biochemischen Rezidiven als die zum Vergleich herangezogenen Patienten aus dem Cluster „low“. Diese erhöhte Rezidivrate (Kaplan-Meier-Schätzer) entsprach 5 Jahre nach radikaler Prostatektomie 40% der Patienten im Cluster „high“ und 12% der Patienten im Cluster „low“. Die ermittelten Rezidivraten der beiden Cluster steigerten sich weiterhin auf einen maximalen Unterschied nach 10 Jahren, entsprechend 81% der Patienten im Cluster „high“ und 29% der im Cluster „low“ (Abb. 4-6 B). Die prognostische Vorhersagekraft der Klassifizierung wurde weiterhin in Patienten mit einem Gleason-Score von 7 und in Patienten mit Organ-begrenztem Tumorwachstum analysiert. Im Fall des gemeinsamen Auftretens eines Gleason-Score von 7 und der Zugehörigkeit zum Cluster „high“ lag die Rezidivrate nach 5 Jahren bei 45% und nach 10 Jahren bei 100%, während eine Zugehörigkeit zum Cluster „low“ nach 5 Jahren mit einer Rezidivrate von 17% und nach 10 Jahren von 23% einherging (Abb. 4-6 C). Beim gemeinsamen Auftreten eines, zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie vorliegenden Organ-begrenzten Wachstums mit der Zugehörigkeit zum Cluster „high“, lag die Rezidivrate nach 5 Jahren bei 50% im Vergleich zu 4% bei Zugehörigkeit zum Cluster „low“, nach 10 Jahren bei 60% im Fall von Cluster „high“ und 14% im Fall von Cluster „low“ (Abb. 4-6 D). Bei der Analyse der prognostischen Wertigkeit durch Kaplan-Meier Kurven ist zu beachten, dass bei den gebildeten Gruppen das Ereignisrisiko proportional ist und demnach proportionale Hazardraten vorliegen, allgemein sichtbar an einem Nicht-Vorhandensein von Schnittpunkten (Abb. 4-6 B-C). Diese proportionalen Hazardraten bilden eine Voraussetzung für die im Anschluss durchgeführte Cox-Regressionsanalyse und damit ebenso für die multivariate Analyse.

Ergebnisse

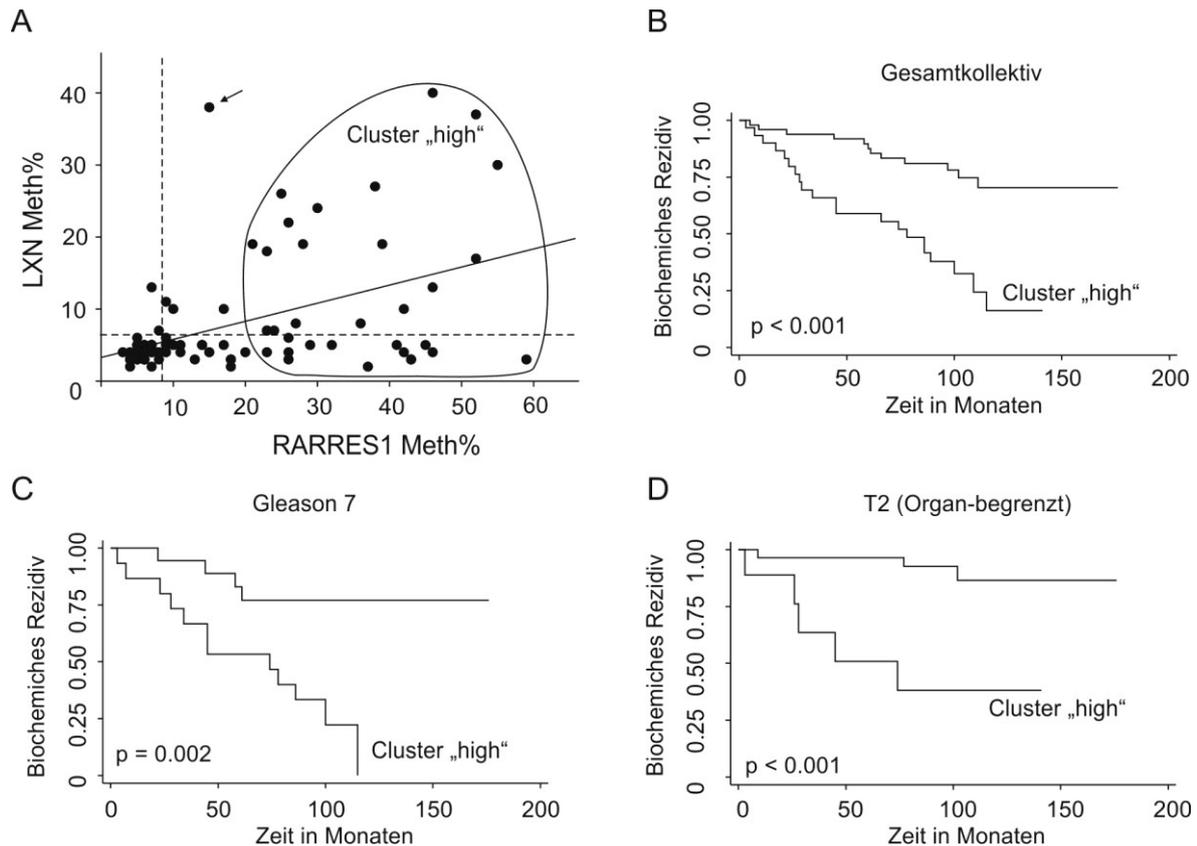


Abb. 4-6 Klassifizierung des untersuchten Patientenkollektivs durch Clusteranalyse und deren prognostische Wertigkeit. Die Klassifizierung unter Nutzung der quantitativen Messung beider Tests erfolgte durch die euklidische *k-medians* Clusterzentrenanalyse. Der resultierende Cluster „low“ umfasste 52 der 86 Patienten (60,4%), während 34 Patienten in Cluster „high“ eingeordnet wurden. Die gestrichelten Linien geben die Grenzen der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von *RARRES1* und *LXN* an (A). Kaplan-Meier-Analyse der prognostischen Wertigkeit nach Dichotomisierung durch die Clusterzentrenanalyse in allen Karzinompatienten (B), in Patienten mit einem Gleason-Score von 7 (C) und mit einem Organ-begrenzten Tumorstadium (D).

Zur weiteren Analyse des prognostischen Potentials erfolgte eine univariate als auch multivariate Cox-Regressionsanalyse. Diese Analyse erfolgte wiederum unter Berücksichtigung typischerweise zur Prognoseabschätzung eingesetzter klinisch-pathologischer Parameter. Hierzu gehörten der Gleason-Score, das Tumorstadium, der Resektionsstatus und der Lymphknotenstatus (Tab. 4-3).

Ergebnisse

Tab. 4-3 Uni- und multivariate Cox Regressionsanalyse der intensivierten 3q25.32 Methylierung und traditionellen klinisch-pathologischen Parametern

Variable	Kategorie	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
		HR (95% CI)	p-Wert	c-index	HR (95% CI)	p-Wert	c-index
3q25.32 DNA-Methylierung	„low“	1			1		
	„high“	4.29 (2.09-8.78)	p < 0.001	0.67	2.77 (1.26-6.10)	p = 0.011	
Gleason	< 7	1			1		
	7	3.12 (1.14-8.55)	p = 0.027		1.92 (0.66-5.56)	p = 0.229	
	> 7	3.49 (1.23-9.94)	p = 0.019	0.61	1.50 (0.47-4.86)	p = 0.496	
Tumorstadium	pT2	1			1		
	pT3	3.4 (1.56-7.70)	p = 0.002	0.63	1.62 (0.64-4.06)	p = 0.306	
Resektionsränder	R0	1			1		
	R1	2.21 (1.08-4.51)	p = 0.029	0.59	1.42 (0.65-3.15)	p = 0.376	
Lymphknoten	N0	1			1		
	N1	3.05 (1.44-6.42)	p = 0.003	0.60	1.88 (0.82-4.28)	p = 0.134	

0.753

0.696

Die Hazardrate diente zum Vergleich der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines biochemischen Rezidivs der Patienten in der aufgeführten Kategorie. Der *Harrel's concordance index* (C-Index) bezeichnet dagegen die prognostische Genauigkeit des jeweiligen Modells und besitzt einen Maximalwert von 1,0. Äquivalent zu der im Rahmen der ROC-Analyse beschriebenen AUC liegt im Fall von 0,5 ein Zufallsprozess vor.

Die Hazardrate kann im vorliegenden Fall als Ereignisrisiko für ein biochemisches Rezidiv angesehen werden und ist in der univariaten Cox-Regressionanalyse für Cluster „high“ im Vergleich zu Cluster „low“ um den Faktor 4,29 erhöht (Tab. 4-3). Die Charakterisierung des untersuchten Kollektivs anhand der üblicherweise genutzten klinisch-pathologischen Parameter zeigte in der univariaten Analyse signifikante Assoziationen von Gleason-Score, Tumorstadium, Resektions- und Lymphknotenstatus mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs. Der c-Index von Cluster „high“ ergab 0,67, während der c-Index bei Einzelbetrachtung der üblicherweise genutzten Parameter maximal, nämlich für das Tumorstadium, bei 0,63 lag.

Ergebnisse

In der multivariaten Analyse der üblicherweise genutzten Parameter konnte ein c-Index von 0,696 erreicht werden. Unter Hinzunahme des Methylierungsstatus auf 3q25.32 wurde im untersuchten Kollektiv eine Verbesserung der prognostischen Genauigkeit auf 0,753 ermöglicht. Darüber hinaus verblieb in der multivariaten Analyse einzig der Methylierungsstatus als signifikant assoziierter Parameter eines biochemischen Rezidivs.

4.1.6 Prognostischen Wertigkeit der Methylierungsanalyse nach Randomisierung des Kollektivs in 2 Gruppen

Die durchgeführte Untersuchung ist durch ein retrospektives Studiendesign charakterisiert. Zur Verringerung eines *Bias* durch nicht bekannte Unterschiede im untersuchten Patientenkollektiv erfolgte eine vollständige Randomisierung der Patienten in 2 gleich große Gruppen (*training* und *test*). Im Gesamtkollektiv, sowie nach Randomisierung, zeigte sich eine stark ausgeprägte Assoziation der quantitativen (kontinuierlichen) *RARRES1*-Methylierung mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs (Tab. 4-4).

Tab. 4-4 Bestimmung der prognostischen Wertigkeit mittels Cox-Regressionsanalyse nach Randomisierung

Datentyp	Gen / Region	Training set (n=40)			Test set (n = 39)		
		HR (95% CI)	p-Wert	c-index	HR (95% CI)	p-Wert	c-index
Karz.-spez. Hypermeth.	<i>RARRES1</i>	1.99 (0.66-6.08)	0.223	0.571	1.11 (0.40-3.06)	0.844	0.526
	<i>LXN</i>	1.83 (0.73-4.65)	0.199	0.558	1.96 (0.61-6.26)	0.256	0.553
kontin. Methylierung	<i>RARRES1</i>	1.028 (1.002-1.055)	0.036	0.621	1.044 (1.009-1.079)	0.011	0.594
	<i>LXN</i>	1.037 (0.989-1.086)	0.130	0.578	1.014 (0.959-1.071)	0.630	0.476
Clusteranalyse	Cluster „high“	4.13 (1.47-11.63)	0.007	0.660	4.16 (1.42-12.15)	0.009	0.664

4.1.7 Untersuchung zur Assoziation des Genotyps von rs6441224 und rs9841 und der Promotermethylierung auf 3q25.32

Neben der quantitativen Bestimmung der DNA-Methylierung erfolgte weiterhin eine Bestimmung des Genotyps ausgewählter Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP). Die hierfür ausgewählten SNPs lagen in den Promoterregionen von *RARRES1* und *LXN* und wurden nach ihrer in Datenbanken beschriebenen Verteilungshäufigkeit ausgewählt. Der im

Ergebnisse

Promoter von *RARRES1* liegende SNP rs6441224 besaß laut *dbSNP* (SNP Database) eine *Minor Allele Frequency* (MAF) von 0,448 und der im *LXN*-Promoter liegende rs9841 eine MAF von 0,368. Im Vergleich zu diesen Literaturwerten betrug die im untersuchten Kollektiv mittels Pyrosequenzierung ermittelte MAF des rs6441224 SNP 0,424 und die des rs9841 SNP 0,401 (Tab. 4-5), lagen also im erwarteten Bereich.

Tab. 4-5 Genotypfrequenzen von rs6441224 und rs9841

	rs6441224			rs9841		
	C/C	C/T	T/T	A/A	A/T	T/T
Häufigkeit absolut	30/86	39/86	17/86	31/86	41/86	14/86
(%)	(34,9)	(45,5)	(19,8)	(36,0)	(47,7)	(16,3)
MAF		0,424			0,401	
(MAF dbSNP)		(0,448)			(0,368)	

Die Analyse einer Assoziation zwischen dem jeweiligen Genotyp und der Promotermethylierung ergab eine signifikant stärkere *RARRES1*-Hypermethylierung bei Vorhandensein des rs6441224-T-Allels (Abb. 4-7 A). Dagegen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp von rs9841 und der Methylierung am *LXN*-Promoter aufgedeckt werden. Zur Bestimmung einer von rs6441224 ausgehenden prognostischen Beeinflussung erfolgte des Weiteren eine Kaplan-Meier Analyse und Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Cox Regressionsanalyse. Hierbei zeigte sich, übereinstimmend mit der bereits beschriebenen prognostischen Wertigkeit der *RARRES1*-Hypermethylierung, eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines biochemischen Rezidivs im Falle der homozygoten Patienten mit dem rs6441224-T/T-Genotyp (Abb. 4-7 B).

Ergebnisse

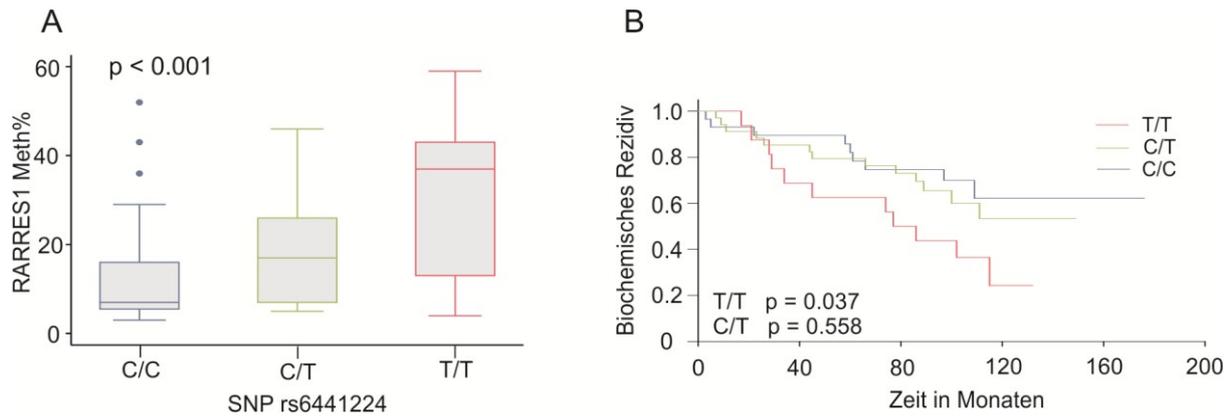


Abb. 4-7 Assoziation des Genotyps von rs6441224 mit der quantitativen Methylierung von *RARRES1* (A). Prognostische Wertigkeit des Genotyps von rs6441224 in Bezug zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs (B).

4.1.8 Bioinformatische Vorhersage der durch den rs6441224-Genotyp beeinflussten Transkriptionsfaktoraffinität

Die bioinformatische Analyse der von rs6441224 beeinflussten Transkriptionsfaktoraffinität erfolgte unter Nutzung des Programms *TRAP* (*Transcription Factor Affinity Prediction*). Die Einstellung *sTRAP* erlaubte hierbei einen direkten Vergleich der Sequenzen mit dem T- bzw. C-Allel des *RARRES1*-Promoters. Bei den für die Vorhersage der Transkriptionsfaktoraffinität genutzten Matrizen handelte es sich um die Version *Transfac* 12.1. In der Analyse zeigte sich im Allgemeinen, dass die dem C-Allel entsprechende Promotersequenz eine höhere Bindungsaffinität für eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren besitzen sollte. Im Besonderen deutete sich eine ausgeprägte Beeinflussung der Bindungsaffinität von *ETS*-Transkriptionsfaktoren an (Tabelle 4-6).

Ergebnisse

Tab. 4-6 Vorhersage von Transkriptionsfaktoraffinitäten des rs6441224-Genotyps

Rang	Differenz log(p) beider Sequenzen	A (T) Sequenz p-Wert	G (C) Sequenz p-wert	Matrix_ID	Matrix Name
1	-1.48	0.233	0.00777	M00193	V\$NF1_Q6
2	-1.15	0.238	0.017	M00771	V\$ETS_Q4
3	-0.863	0.104	0.0143	M00743	V\$CETS168_Q6
4	-0.846	0.176	0.025	M00806	V\$NF1_Q6_01
5	-0.716	0.376	0.0723	M00032	V\$CETS1P54_01
6	-0.648	0.868	0.195	M00808	V\$PAX_Q6
7	-0.498	0.884	0.281	M00619	V\$ALX4_01
8	-0.488	0.297	0.0967	M00339	V\$ETS1_B
9	-0.469	0.217	0.0737	M00531	V\$NERF_Q2
10	-0.442	0.363	0.131	M01078	V\$CETS1P54_03

4.1.9 Bestimmung der *RARRES1*-Promoteraktivität in Abhängigkeit von rs6441224 und den Transkriptionsfaktoren *ETS1/ERG*

Der experimentelle Nachweis der durch den SNP rs6441224 beeinflussten Transkriptionsfaktoraffinität erfolgte durch Bestimmung der *RARRES1*-Promoteraktivität im Luciferase-Assay. Hierzu wurde ein C- bzw. T-Allel tragender *RARRES1*-Minimal-Promoter in den Vektor pGL3basic kloniert und die Promoteraktivität in den Zelllinien Du145 und PC-3 untersucht. Darüber hinaus erfolgten Co-Transfektionen mit Expressionsplasmiden für ETS1 und ERG, zwei Mitgliedern der bereits beschriebenen ETS-Transkriptionsfaktor Familie.

Hierbei zeigte sich, dass der klonierte *RARRES1* Minimal-Promoter mit dem rs6441224-C-Allel eine signifikant höhere Promoteraktivität besaß als der dem T-Allel entsprechende und durch stärkere Hypermethylierung gekennzeichnete Vergleichspromoter (Abb. 4-8 A/B). Weiterhin war eine deutliche Zunahme der *RARRES1*-Promoteraktivität bei Co-Transfektion mit ETS1 und ERG nachweisbar. Die Zunahme der Promoteraktivität beider Allele erfolgte hierbei gleichermaßen, entsprechend dem geringen Einfluss einer Veränderung der Bindungsstelle an Position 12 der PWM (*Positional Weight Matrix*) M00771 (Abb. 4-8 C).

Ergebnisse

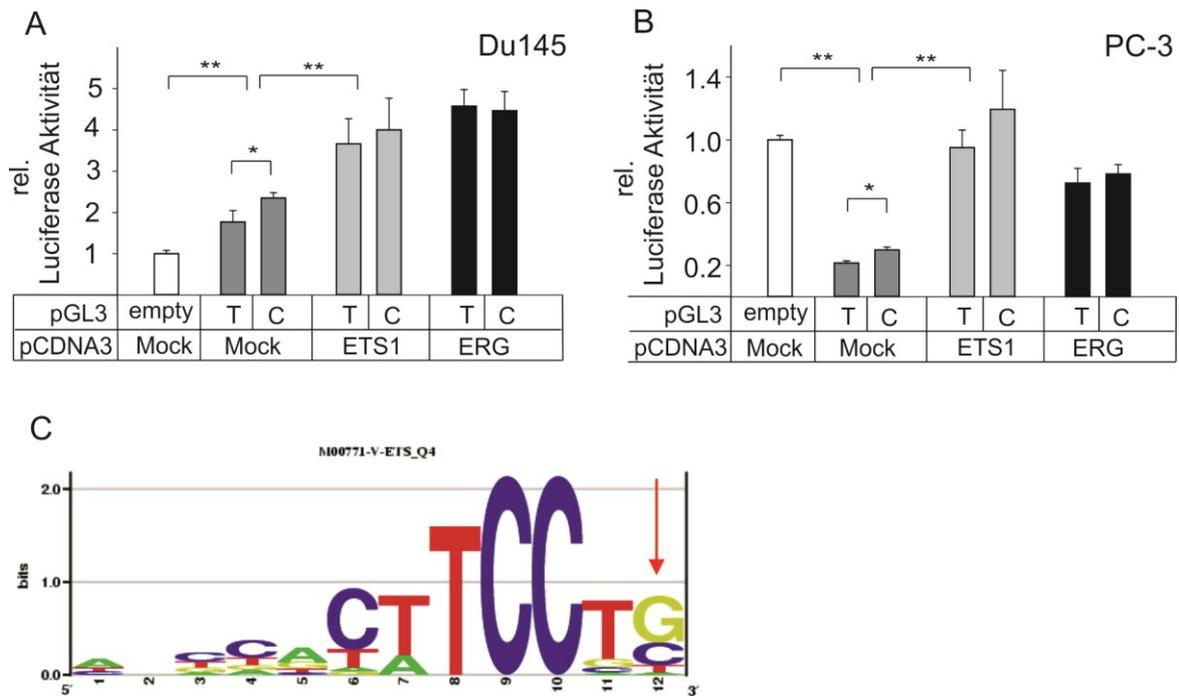


Abb. 4-8 Bestimmung der Aktivität des *RARRES1* Minimal-Promoters mit rs6441224 C- oder T-Allel im Luciferase Assay in den Zelllinien Du145 (A) und PC-3 (B). Das rs6441224 T-Allel zeigte im Vergleich zum C-Allel eine signifikant niedrigere basale Promoteraktivität. Bei Ko-Transfektion der pGL3basic-/pCDNA3-Konstrukte mit ETS1 oder ERG Expressionsplasmiden nahm die Aktivität beider Promotersequenzen in den beiden Zelllinien jeweils zu. (C) *Positional Weight Matrix* (PWM) M00771 zur Veranschaulichung der Modulation der ETS-Bindungsaffinität durch das C(G)- bzw. T(A)-Allel des rs6441224 SNP an der Position 12 (roter Pfeil).

Des Weiteren zeigte sich, dass die Aktivität des klonierten *RARRES1* Minimal-Promoters in der *RARRES1* hypermethylierten Zelllinie PC-3 im Vergleich zur *RARRES1* unmethylierten Zelllinie Du145 deutlich reprimiert war. Diese Repression konnte durch Co-Transfektion mit *ETS1* und *ERG* aufgehoben bzw. verringert werden (Abb. 4-8 B).

4.1.10 Methylierungsanalyse von *RARRES1* und *LXN* in verschiedenen Zelllinien, Leukozyten und Fibroblasten

Zur weiteren Charakterisierung der im Gewebe detektierten Methylierungsmuster auf 3q25.32 wurde die DNA-Methylierung von *RARRES1* und *LXN* in Zelllinien aus PCa und Blasenkarzinom, Leukozyten sowie Fibroblasten untersucht. Dabei erfolgte die weitere Analyse durch verschiedene Methoden, die sich in Bezug auf ihre Aussage ergänzen können. Zum Einsatz kamen verschiedene Techniken zur Analyse von DNA-Methylierung, hierzu zählend die Pyrosequenzierung, die Bisulfit-Sequenzierung nach der Technik von Sanger und

Ergebnisse

die MS-PCR. Am Beispiel der Zelllinie LNCaP zeigte sich, dass die genutzten Methoden im Allgemeinen vergleichbare Ergebnisse liefern können.

Wie in der quantitativen Messung der DNA-Methylierung von *RARRES1* und *LXN* durch Pyrosequenzierung erkennbar, besaß LNCaP eine ausgeprägte Methylierung der beiden untersuchten Promotoren (Abb. 4-9 A). Äquivalent hierzu zeigte sich ein stark hypermethylierter Zustand des *RARRES1*-Promoters in der Analyse durch MS-PCR und der des *LXN* Promoters durch Sanger-Sequenzierung (Abb. 4-9 B/E). Eine starke *RARRES1*-Hypermethylierung konnte daneben in den PCa-Zelllinien 22Rv1, PC-3 und in der Blasenkarzinom-Zelllinie HT1376 nachgewiesen werden (Abb. 4-9 A-D). Eine geringere Hypermethylierung lag dagegen in der Blasenkarzinom-Zelllinie EJ vor. Eine gemeinsam auftretende Hypermethylierung konnte, neben LNCaP, in den PCa-Zelllinien 22Rv1 und geringgradig in PC-3 sowie der Blasenkarzinom-Zelllinie HT1376 nachgewiesen werden (Abb. 4-9 A/C). Die Zelllinie Du145 zeigte dagegen das einzigartige Muster einer sichtlich Allel-spezifischen Hypermethylierung von *LXN*, die ohne das gemeinsame Vorhandensein einer ausgeprägten *RARRES1*-Hypermethylierung vorlag (4-9 A/E). Im Vergleich zu den teilweise eindeutig unmethylierten Tumorzelllinien lag in Leukozyten eine leichte Hypermethylierung von *RARRES1* und *LXN* vor (Abb. 4-9 C-E).

Ergebnisse

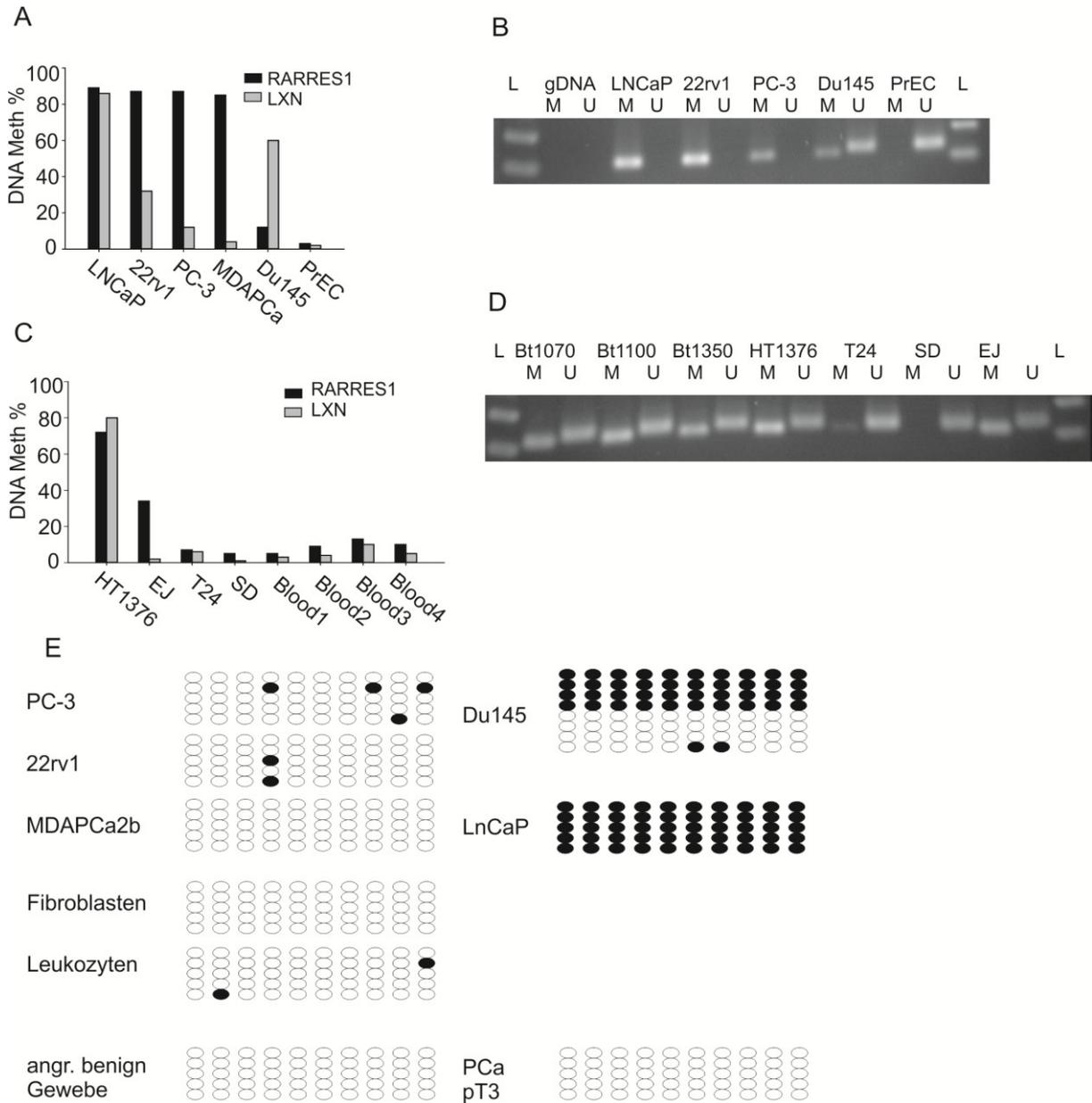


Abb. 4-9 Methylierungsanalyse von *RARRES1* und *LXN* mittels Pyrosequenzierung in PCa-Zelllinien und epithelialen Prostatazellen (PrEC) (A) sowie in Blasenkarzinom-Zelllinien und Leukozyten (C). MS-PCR-Analyse des *RARRES1*-Promoters in PCa-Zelllinien und PrEC (B) sowie Blasenkarzinom-Zelllinien und Leukozyten (D). Methylierungsanalyse von *LXN* mittels Sanger-Sequenzierung in PCa-Zelllinien, Fibroblasten und Leukozyten sowie benignem und malignem Prostatagewebe.

4.1.11 Einfluss von Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin auf *RARRES1* und *LXN* Expression in PCa Zelllinien

Die Analyse des Methylierungsstatus und der Genexpression in PCa-Zelllinien zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen gemeinsam auftretender Methylierung und niedriger Expression beider Gene (vgl. Abb. 4-10 A und B). Bemerkenswert ist hierbei die teilweise starke Ausprägung der Methylierungs-abhängigen Herabregulation von *RARRES1* und auch *LXN* in den untersuchten Zelllinien im Vergleich zum Median des benignen Normalgewebes. Daher wurde untersucht, ob eine Reinduktion der Genexpression durch den DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-dC erzielt werden kann (Abb. 4-10 B). Hierbei zeigte sich, dass die Reinduktion abhängig von der Ausbreitung der Methylierung auf 3q25.32 war. Während in Anwesenheit von 2 μ M 5-Aza-dC im Fall der Zelllinie LNCaP nur eine Reinduktion um den Faktor 27 erreicht werden konnte, war vergleichsweise im Fall der Zelllinie PC-3 eine ca. 140-fache Reinduktion möglich. Das Auftreten einer gemeinsamen Methylierung von *RARRES1* und *LXN* könnte demnach als Ausbreitung eines inaktiven epigenetischen Zustands interpretiert werden, der weiterhin durch die Analyse von Chromatinmodifikationen durch Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) untersucht wurde (Abb. 4-10 C-E).

4.1.12 Bestimmung von Chromatinmodifikationen am *RARRES1*- und *LXN*-Promoter

Bei den untersuchten Chromatinmodifikationen handelte es sich um K9ac, K9me3 und K27me3 am Histon H3. Im Vergleich mit dem Methylierungsstatus und der Expression von *RARRES1* und *LXN* ist erkennbar, dass der Nachweis einer DNA-Hypermethylierung und die damit assoziierte niedrige transkriptionelle Aktivität mit dem Vorkommen von K9me3 und K27me3 einhergeht (Abb. 4-10 ABDE). Dagegen konnte das Vorkommen von K9ac besonders stark am unmethylierten und transkriptionell aktiven *RARRES1* Promoter der Zelllinie Du145 nachgewiesen werden (Abb. 4-10 A-C). Weiterhin erscheint die Ausbreitung der Methylierung auf 3q25.32 mit einheitlichen Chromatinmodifikationen verbunden zu sein, die unter anderem durch K9me3 und K27me3 repräsentiert werden. Die stärkste relative Anreicherung der mit inaktivem Chromatin assoziierten Modifikationen K9me3 und K27me3 im Verhältnis zur Anreicherung am *CTCF*-Promoter konnte dabei in der stark 3q25.32 methylierten Zelllinie LNCaP detektiert werden. Die stärkste relative Anreicherung der

Ergebnisse

aktiven Modifikation K9ac im Verhältnis zur Anreicherung am *GAPDH*-Promoter lag dagegen am *RARRES1*-Promoter der unmethylierten bzw. *LXN*-hemimethylierten Zelllinie Du145 vor.

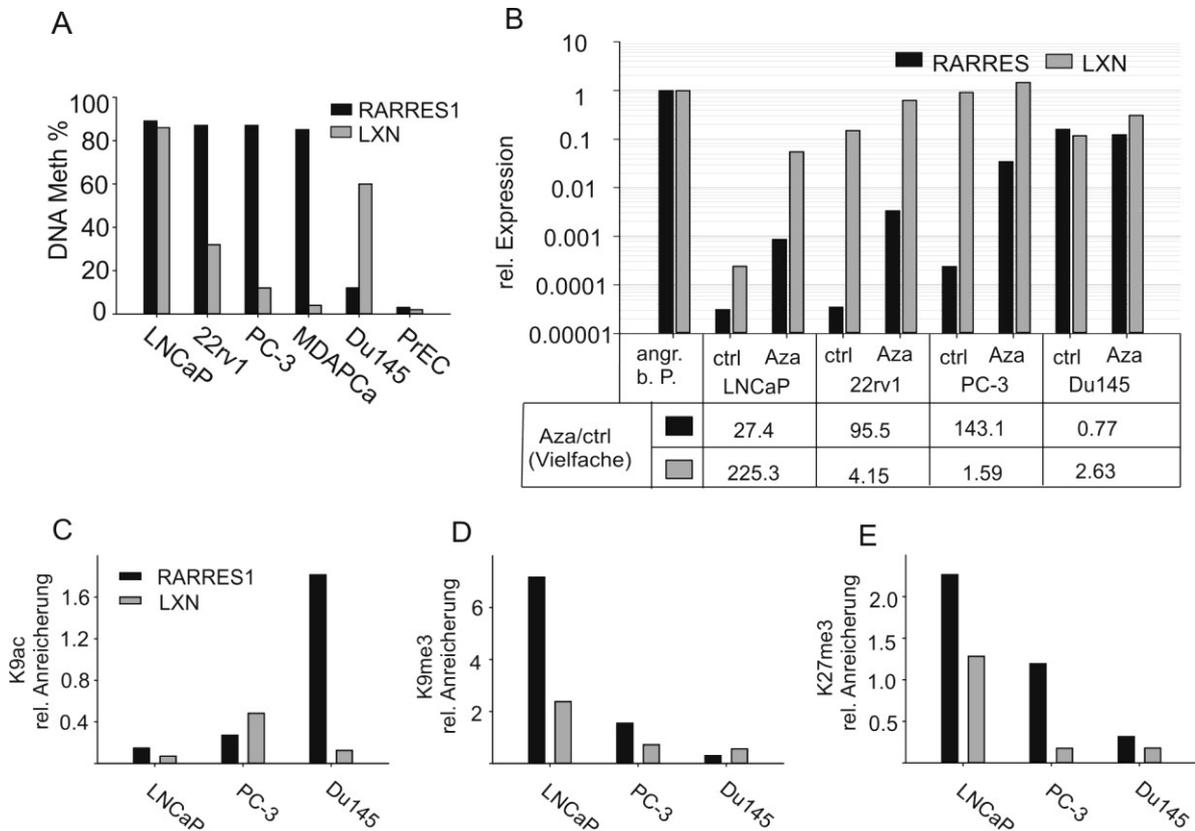


Abb. 4-10 Expression und epigenetische Regulation von *RARRES1* und *LXN* in PCa-Zelllinien. (A) DNA-Methylierung gemäß Pyrosequenzierung (vgl. Abb. 4-9A). (B) Semi-logarithmische Darstellung der relativen Expression von *RARRES1* und *LXN* in den PCa Zelllinien LNCaP, 22Rv1, PC-3 und Du145 im Vergleich zu benignem Prostatagewebe (als 1 gesetzt) gemessen mittels qRT-PCR. Basale Werte (ctrl) und Expression nach Behandlung mit 2 μ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin. Die Ausprägung der Reinduktion ist unter der Grafik als Verhältnis von Behandlung/Kontrolle angegeben. Die Versuche erfolgten in Triplikaten. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) erfolgte die Analyse des Modifikationszustands von H3 an den *RARRES1* und *LXN* Promotern in den Zelllinien LNCaP, PC-3 und Du145 für die Modifikationen K9ac (C), K9me3 (D) und K27me3 (E).

4.1.13 Expressionsanalyse von *LXN* und *RARRES1* in Geweben in Abhängigkeit des DNA-Methylierungsstatus

Um die Beeinflussung der Genexpression durch den Methylierungsstatus von *RARRES1* und *LXN* in den Karzinomgeweben zu ermitteln, wurde die Expression von *RARRES1* und *LXN* mittels RT-qPCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass eine Karzinom-spezifische Hypermethylierung von *LXN* signifikant mit einer niedrigeren Expression assoziiert war (Abb. 4-11 A). Dagegen konnte kein signifikanter Einfluss einer Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von *RARRES1* auf dessen Expression in PCa Geweben nachgewiesen werden (Abb. 4-11 B). Aufgrund der in Zelllinien vorkommenden Assoziation zwischen niedriger Expression und einer Ausbreitung der Hypermethylierung zum Nachbarn *LXN* sowie der ausgeprägten positiven Korrelation der Genexpression von *RARRES1* und *LXN* in Geweben, wurde auch der Einfluss der *LXN* Hypermethylierung auf die Expression von *RARRES1* untersucht. Hierbei zeigte sich, dass PCa-Gewebe mit einer Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von *LXN* eine deutliche Tendenz zu einer niedrigeren Expression von *RARRES1* besaßen (Abb. 4-11 C).

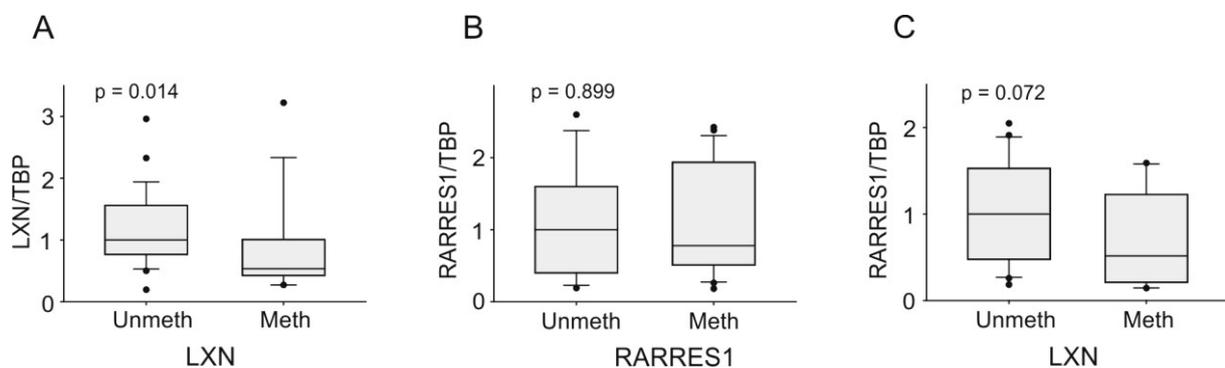


Abb. 4-11 Einfluss der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung von *RARRES1* und *LXN* auf die transkriptionelle Aktivität des jeweiligen Gens in PCa-Geweben. Genexpression von *LXN* (A) und *RARRES1* (B) in Abhängigkeit des jeweiligen Methylierungsstatus. Genexpression von *RARRES1* in Abhängigkeit der Karzinom-spezifischen *LXN* Hypermethylierung (C).

4.1.14 Analyse der Genexpression auf 3q25.32 in PCa-Geweben und angrenzenden benignen Kontrollgeweben.

Um einen Einfluss der epigenetischen Veränderungen auf die transkriptionelle Regulation von weiteren Genen der 3q25.32-Region zu gewinnen, wurde weiterhin die Expression von *GFM1*, *MFSD1* und *MLF1* mittels RT-qPCR untersucht. Im Gegensatz zu den beiden gleichgerichtet orientierten und benachbarten Genen *RARRES1* und *LXN*, liegen diese drei Gene auf dem Gegenstrang. Besonders bemerkenswert ist hierbei die Lage von *LXN* in einem Intron des entgegengesetzt orientierten *GFM1* als *Antisense*-Transkript (vgl. Abb. 4-1).

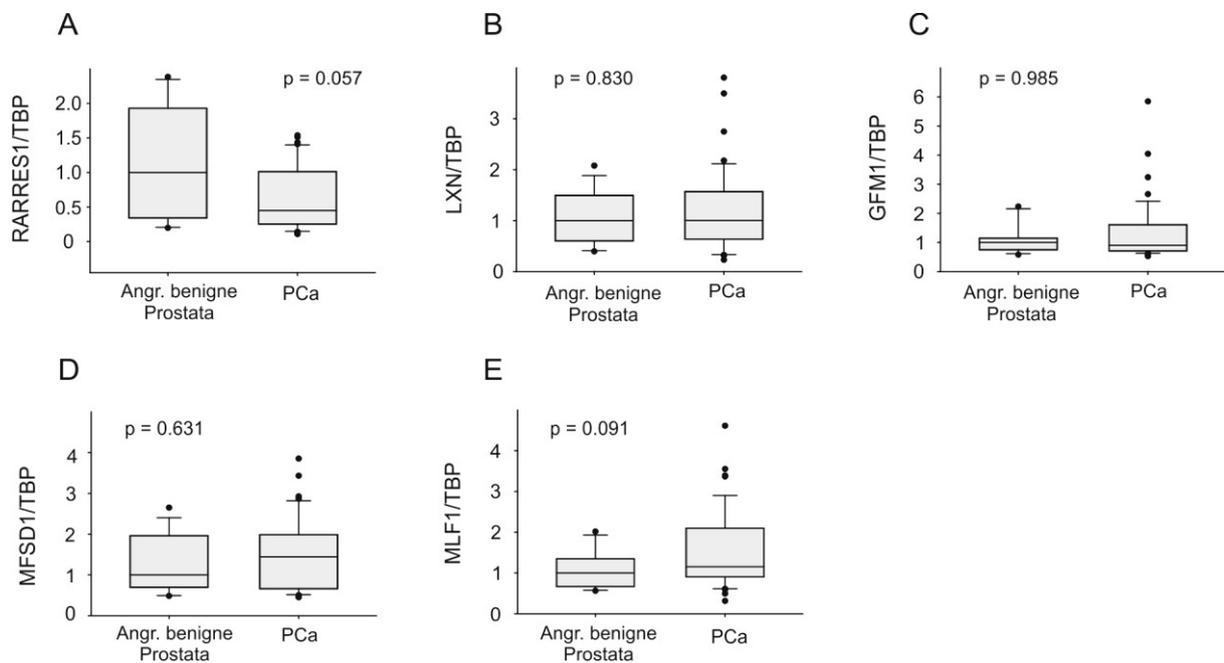


Abb. 4-12 Expressionsanalyse der auf 3q25 liegenden Gene *RARRES1* (A), *LXN* (B), *GFM1* (C), *MFSD1* (D) und *MLF1* (E) in benignen Kontrollgeweben und PCa-Geweben.

Beim Vergleich der Expression von *RARRES1* in benignen Prostatageweben und PCa-Geweben zeigte sich eine deutliche Tendenz zu einer niedrigeren Expression im Karzinomgewebe (Abb. 4-12 A). Obwohl keine veränderte Expression des Nachbargens *LXN* nachweisbar war (Abb. 4-12 B), konnte eine starke Korrelation der Expression von *RARRES1* und *LXN* in Prostata-Normalgewebe und PCa-Gewebe festgestellt werden (Tab. 4-7). Das durch seine besondere genomische Lage mit *LXN* interagierende *GFM1* zeigte ebenfalls keine statistisch signifikant veränderte Expression beim Vergleich von Normalgeweben und

Ergebnisse

Karzinomgeweben (Abb. 4-12 C). Die Expression von *MFSD1* und *MLF1* war nicht signifikant verändert, doch wiesen einige Karzinome deutlich erhöhte Expression von *MLF1* auf ($p = 0.092$).

Dagegen zeigte sich eine leichtgradig positive Korrelation zu *LXN* in den Karzinomgeweben, während keine Korrelation in Normalgewebe nachweisbar war (Tab. 4-7). Für die Expression von *MFSD1* ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Abb. 4-12 D). Für *MLF1* war eine leichtgradige Tendenz zu einer höheren Expression im Karzinomgewebe detektierbar (Abb. 4-12 E).

Tab. 4-7 Spearman-Korrelation der Genexpression auf 3q25

Gene		Normalgewebe				Karzinomgewebe			
		<i>LXN</i>	<i>GFM1</i>	<i>MFSD1</i>	<i>MLF1</i>	<i>LXN</i>	<i>GFM1</i>	<i>MFSD1</i>	<i>MLF1</i>
<i>RARRES1</i>	Spearman's rho	0,879	0,291	0,104	-0,456	0,708	0,217	-0,835	-0,14
	p-Wert	$2 \cdot 10^{-7}$	0,323	0,723	0,111	$2 \cdot 10^{-7}$	0,152	0,584	0,358
<i>LXN</i>	Spearman's rho		0,269	0,242	-0,269		0,472	-0,053	0,080
	p-Wert		0,326	0,414	0,362		0,001	0,718	0,588
<i>GFM1</i>	Spearman's rho			0,115	-0,082			-0,239	0,106
	p-Wert			0,696	0,778			0,114	0,485
<i>MFSD1</i>	Spearman's rho				0,213				0,188
	p-Wert				0,453				0,205

4.1.15 Cox-Regressionsanalyse der Expression von 3q25.32-Genen mit dem Endpunkt biochemisches Rezidiv

Bei einer Cox-Regressionsanalyse mit Endpunkt biochemisches Rezidiv zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression von *RARRES1* oder *LXN* und dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs (Tab. 4-8), allerdings lagen die Hazardraten erwartungsgemäß unter 1 für beide Gene. Dagegen besaßen die ebenfalls analysierten, auf dem Gegenstrang liegenden Gene *GFM1*, *MLF1* und *MFSD1*, Hazardraten über 1. Erhöhte Expression von *MLF1* war signifikant mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs assoziiert ($p = 0,002$).

Tab. 4-8 Cox-Regressionsanalyse der Expression von 3q25.32 Genen

Gen	HR (95% CI)	p-Wert	c-index
<i>LXN</i>	0.72 (0.35-1.47)	0.369	0.617
<i>RARRES1</i>	0.58 (0.19-1.79)	0.341	0.596
<i>GFM1</i>	1.28 (0.94-1.74)	0.113	0.658
<i>MLF1</i>	2.26 (1.35-3.76)	0.002	0.676
<i>MFSD1</i>	1.09 (0.60-1.98)	0.790	0.525

4.1.16 Analyse der Genexpression von 3q25.32 Genen in Abhängigkeit häufig genutzter klinisch-pathologischer Parameter

Wie bereits beschrieben, tendierte *RARRES1* zu einer niedrigeren Expression im Karzinomgewebe im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe ($p = 0,057$; Abb. 4-12 A), zeigte allerdings keine signifikanten Expressionsunterschiede in Abhängigkeit seines Methylierungsstatus ($p = 0,899$; Abb. 4-11 B). Ein Zusammenhang der veränderten Expression mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs war ebenso nicht nachweisbar (Tab. 4-8). Eine weitere Charakterisierung der veränderten Expression erfolgte anhand der klinisch-pathologischen Parameter Gleason-Score, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus. Hierbei zeigte sich, dass eine signifikant niedrigere *RARRES1*-Expression in T3-Tumoren nachweisbar war (Abb. 4-13 B). Bei den weiterhin untersuchten Parametern Gleason-Score, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus konnte dagegen keine bzw. nur eine geringfügige Tendenz zu einer einhergehenden Expressionsänderung nachgewiesen werden (Abb. 4-13 ACD).

Ergebnisse

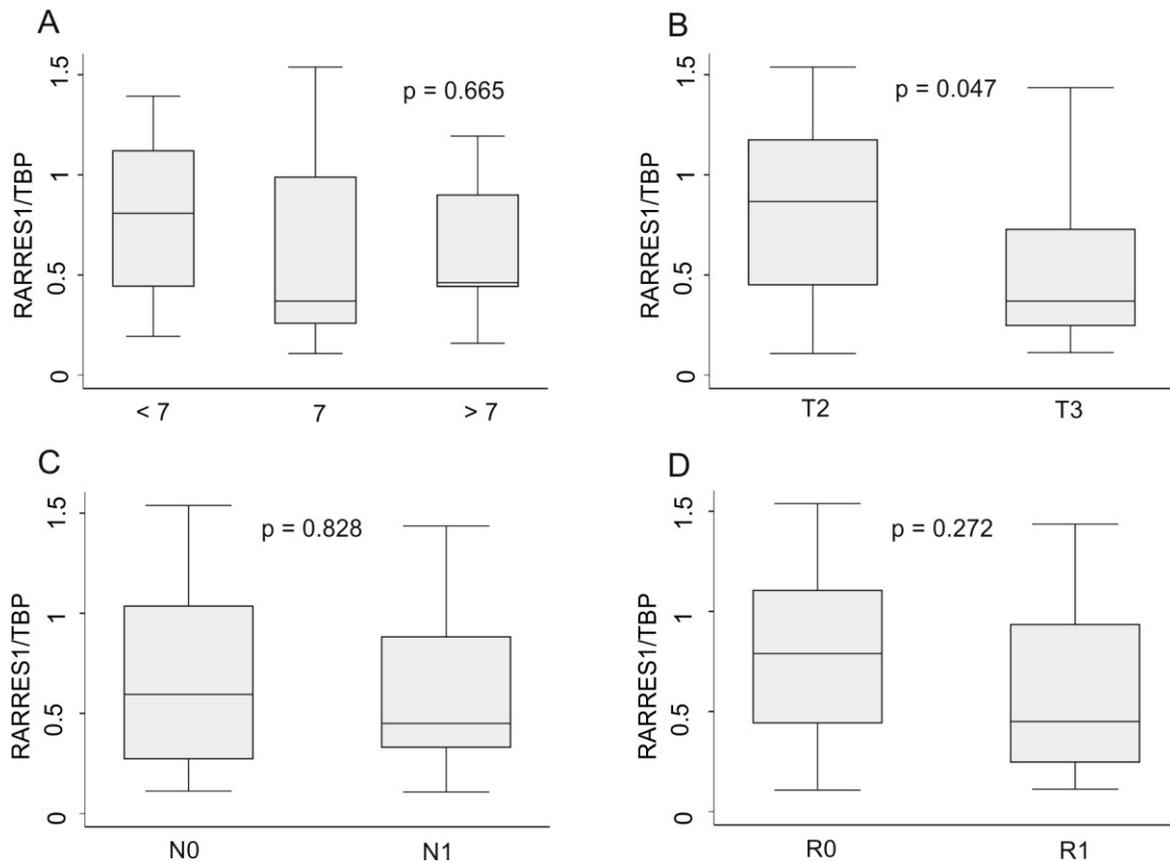


Abb. 4-13 Abhängigkeit der relativen Expression von *RARRES1* von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

Im Gegensatz zu *RARRES1* zeigte *LXN* im Vergleich von Karzinomgewebe und Normalgewebe der Prostata keine Tendenz zu veränderter Expression, allerdings eine signifikant niedrigere Expression in Geweben mit methyliertem *LXN*-Promoter ($p = 0,014$; Abb. 4-11 A). Ein Zusammenhang der veränderten Expression mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs lag, ebenso wie im Fall von *RARRES1*, nicht vor (Tab. 4-8). Die weitere Charakterisierung einer veränderten Expression durch die beschriebenen klinisch-pathologischen Parameter zeigt eine tendenzielle Assoziation einer niedrigen *LXN*-Expression mit einem höheren Gleason-Score ($p = 0,123$) und einem positiven Lymphknotenstatus ($p = 0,161$) (Abb. 4-14 A-D).

Ergebnisse

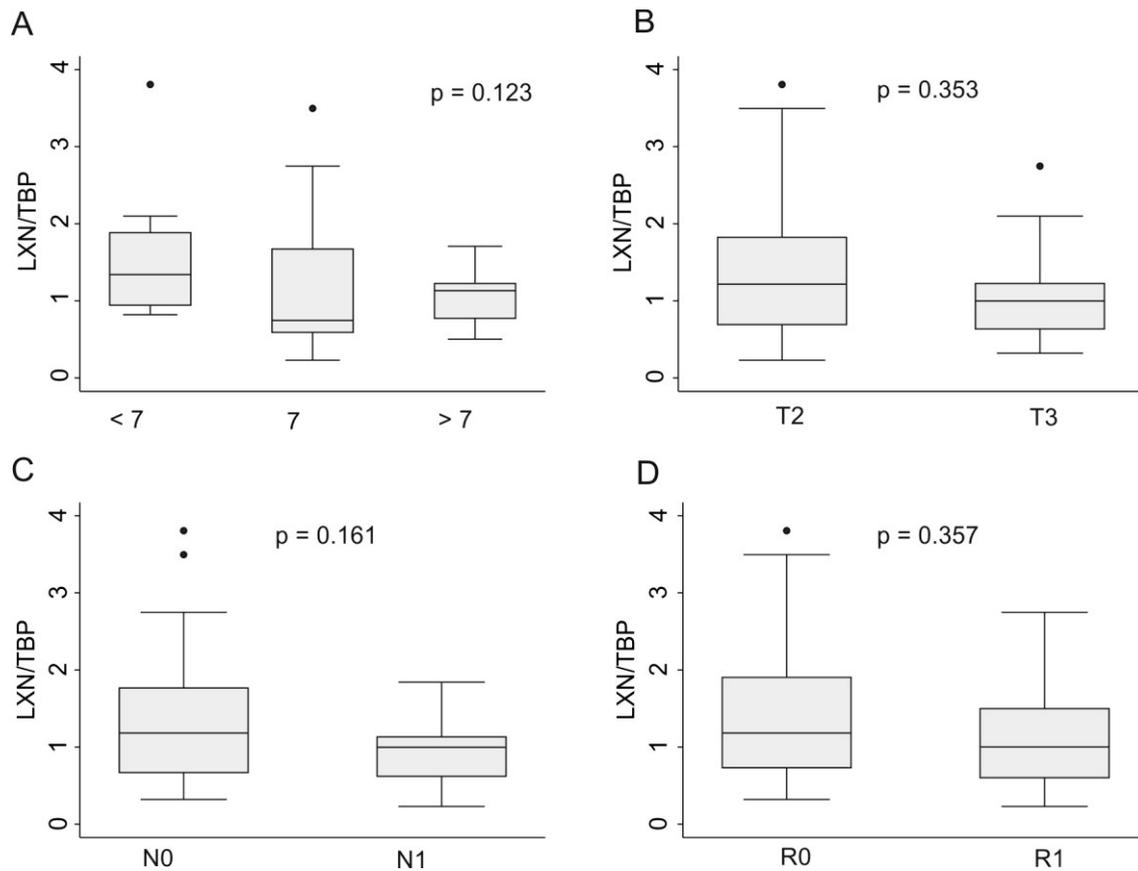


Abb. 4-14 Abhängigkeit der relativen Expression von *LxN* von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

Das auf dem Gegenstrang befindliche Gen *MLF1* zeigte eine tendenziell höhere Expression in Karzinomgeweben als in benignen angrenzenden Geweben ($p = 0,091$; Abb. 4-12 E) und darüber hinaus eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs ($p = 0,002$, Tab. 4-8). Dieses Expressionsverhalten spiegelte sich auch in einem Zusammenhang mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern wider. So zeigte sich eine nicht signifikante Verschiebung zu einem höheren Median in Tumoren mit einem höheren Gleason-Score sowie in T3-Tumoren (Abb. 4-15 A). Eine weitere Assoziation mit dem Tumorstadium, Lymphknoten- oder Resektionsstatus konnte nicht festgestellt werden (Abb. 4-15 B-D).

Ergebnisse

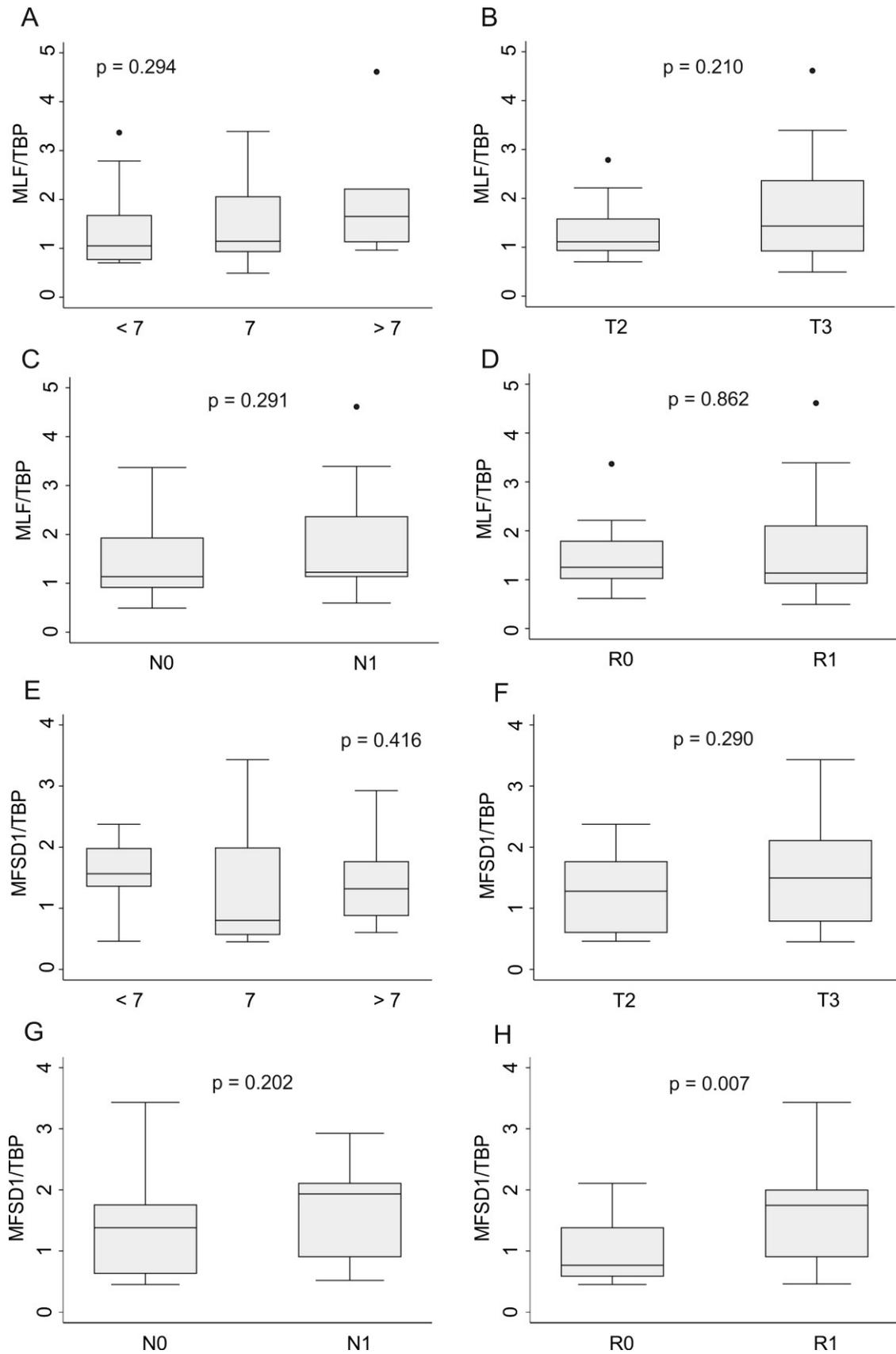


Abb. 4-15 Abhängigkeit der relativen Expression von *MLF1* (A-D) und *MFSD1* (E-H) von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A/E), Tumorstadium (B/F), Lymphknotenstatus (C/G) und Resektionsstatus (D/H).

Ergebnisse

Für die *MFSD1* Expression konnte eine unerwartete Assoziation mit dem Resektionsstatus nachgewiesen werden (Abb. 4-15 H). Weitere Assoziationen waren wiederum nicht feststellbar (Abb. 4-15 E-G).

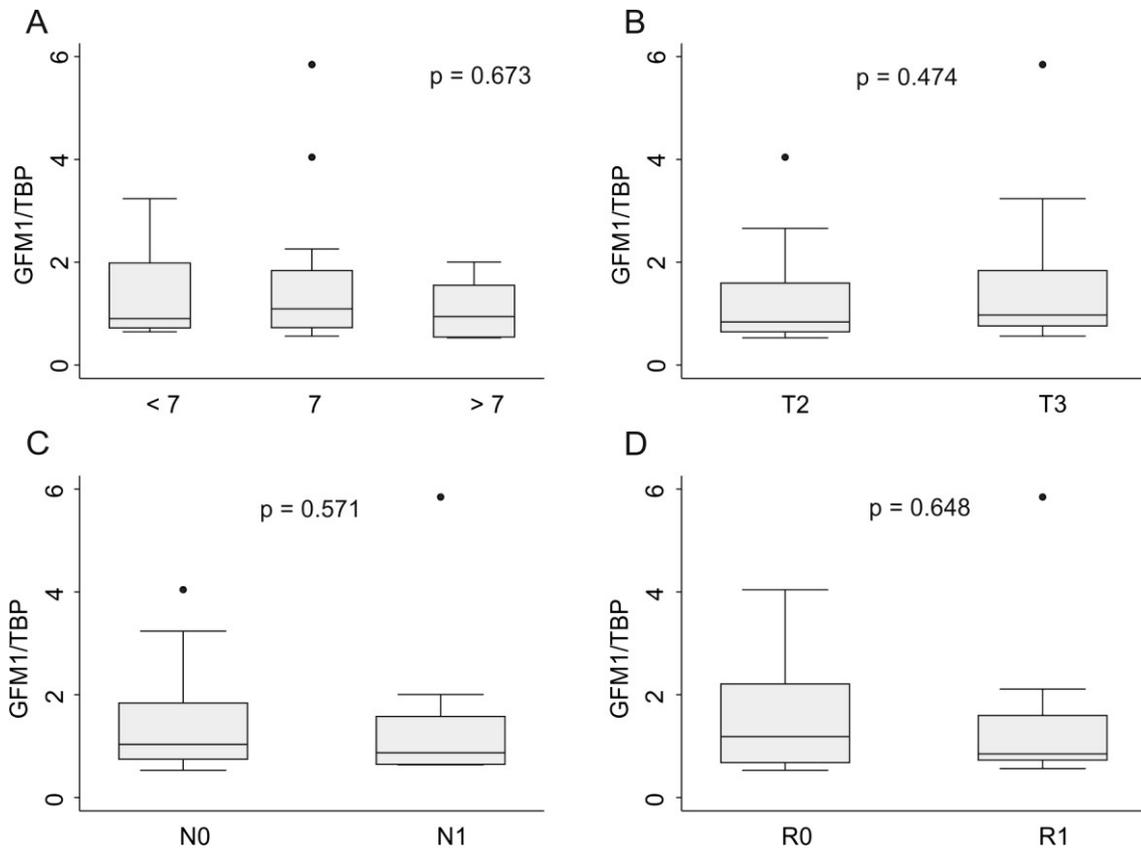


Abb. 4-16 Abhängigkeit der relativen *GFM1*-Expression von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

Das ebenfalls auf dem Gegenstrang befindliche und *LXN* in einem Intron beherbergende Gen *GFM1* zeigte keine Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der untersuchten klinisch-pathologischen Klassifikationsgrößen (Abb. 4-16 A-D).

4.2 Charakterisierung von Expression und DNA-Methylierung des altersassoziierten Gens *KLOTHO* im Prostatakarzinom und Nierenzellkarzinom

4.2.1 Expressionsanalyse von *KLOTHO* im klarzelligen und chromophoben Nierenzellkarzinom

Die mittels quantitativer RT-PCR durchgeführte Bestimmung der *KLOTHO*-Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom (CCRCC) im Vergleich zum Normalgewebe der Niere ergab eine hochsignifikant niedrigere Expression im Karzinomgewebe (Abb. 4-17 A). Die für diesen Expressionsunterschied folgend in der ROC-Analyse bestimmte *area under the curve* (AUC) betrug 0.9 (Abb. 4-17 B). Nicht nur im klarzelligen Nierenzellkarzinom, sondern auch in Gewebe aus chromophoben Nierenzellkarzinomen lag die *KLOTHO* Expression signifikant unter der in benignen Nierengeweben (Abb. 4-17 A). Die AUC für die Messung in chromophoben Nierenzellkarzinom betrug 0.83 (Abb. 4-17 B).

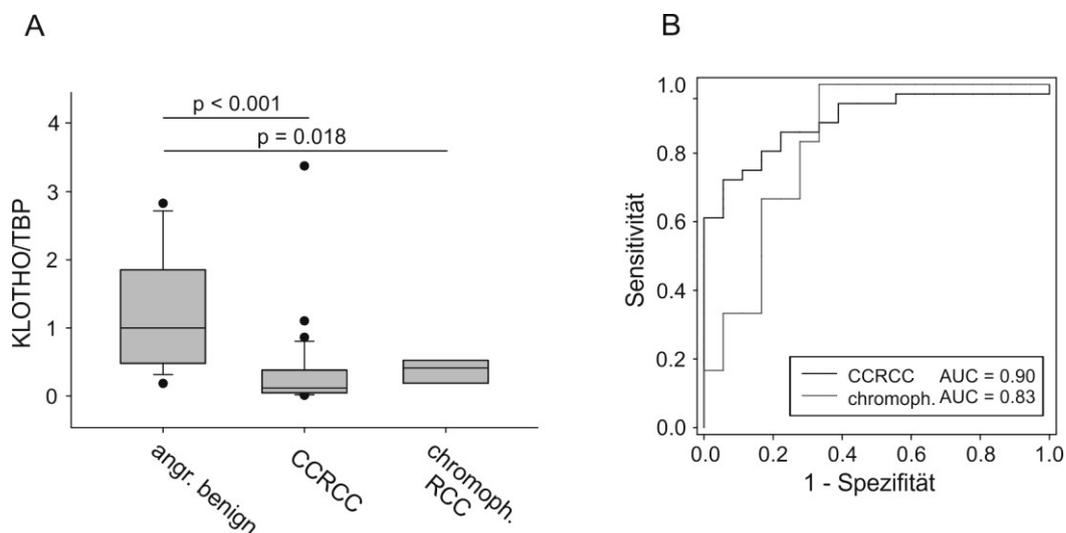


Abb. 4-17 Relative Expression von *KLOTHO* in klarzelligen (CCRCC) und chromophoben Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu Normalgeweben der Niere (A). ROC Kurve der Expressionsmessung in CCRCC und chromophoben Nierenzellkarzinomen (B).

4.2.2 Expressionsanalyse von *KLOTHO* in Prostatakarzinomgeweben

Die Expressionsanalyse von *KLOTHO* in Gewebe aus Prostatakarzinomen nach RRP sowie in angrenzenden Normalgeweben zeigte ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression von

Ergebnisse

KLOTHO im Tumorgewebe (Abb. 4-18 A). Die Auswertung mittels ROC-Kurve ergab eine Fläche von 0.69 unter der Kurve (AUC) (Abb. 4-18 B). Die Expression von *KLOTHO* in normalen Prostatagewebe war im direkten Vergleich zur Expression in Nierengewebe bereits niedrig. Die anhand der medianen Ct-Werte berechnete Differenz zwischen Prostata und benignen Nierengewebe betrug ca. 5 Zyklen, entsprechend einem Unterschied um den Faktor 30. Weiterhin anzumerken ist der, mit dieser niedrigeren Expression einhergehende, bereits in Normalgewebe hohe Ct-Wert von im Median 34,7.

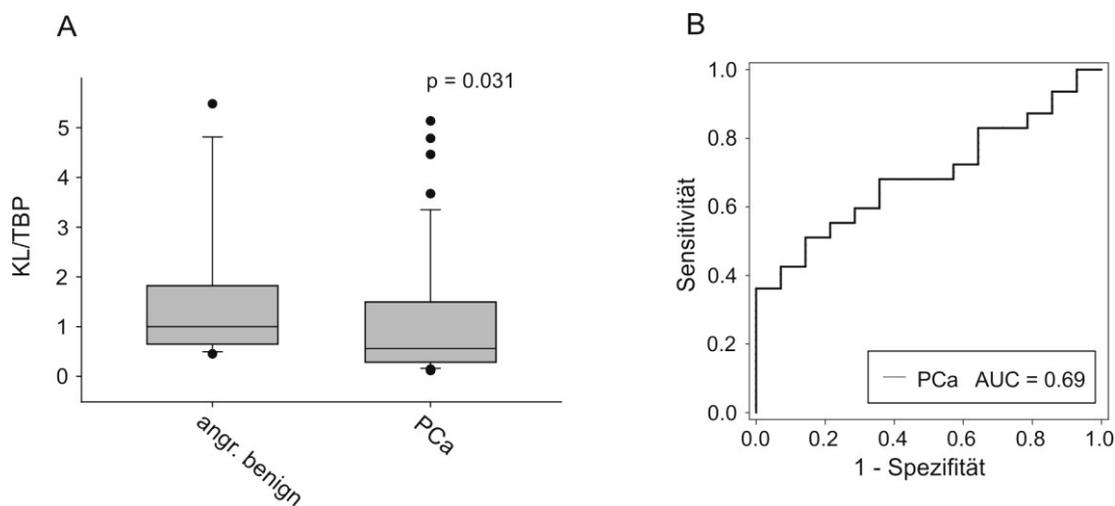


Abb. 4-18 Relative Expression von *KLOTHO* in Prostatakarzinomgeweben und benignen Kontrollgeweben (A). ROC-Kurve der Expressionsmessung (B).

4.2.3 DNA-Methylierungsanalyse von *KLOTHO* in Prostatakarzinomgeweben

Zur Beurteilung des Einflusses und der Interaktion zwischen DNA-Methylierung und der erniedrigten Expression von *KLOTHO* im Tumorgewebe erfolgte eine Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung. Hierbei zeigte sich eine Karzinom-spezifische (> 5%) Hypermethylierung in 27% der untersuchten Fälle. Nur 6 Karzinome wiesen eine Hypermethylierung von über 10% auf. Entsprechend lag keine statistische Signifikanz ($p = 0.421$) für eine differentielle Verteilung im untersuchten Kollektiv vor (Abb. 4-19 A). Die Analyse mittels ROC ergab eine Fläche unter der Kurve von 0.58 (Abb. 4-19 B). Allerdings zeigte sich ein Einfluss der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung auf die *KLOTHO* Genexpression durch eine niedrigere Expression in *KLOTHO*-methylierten PCa-Geweben (Abb. 4-19 C).

Ergebnisse

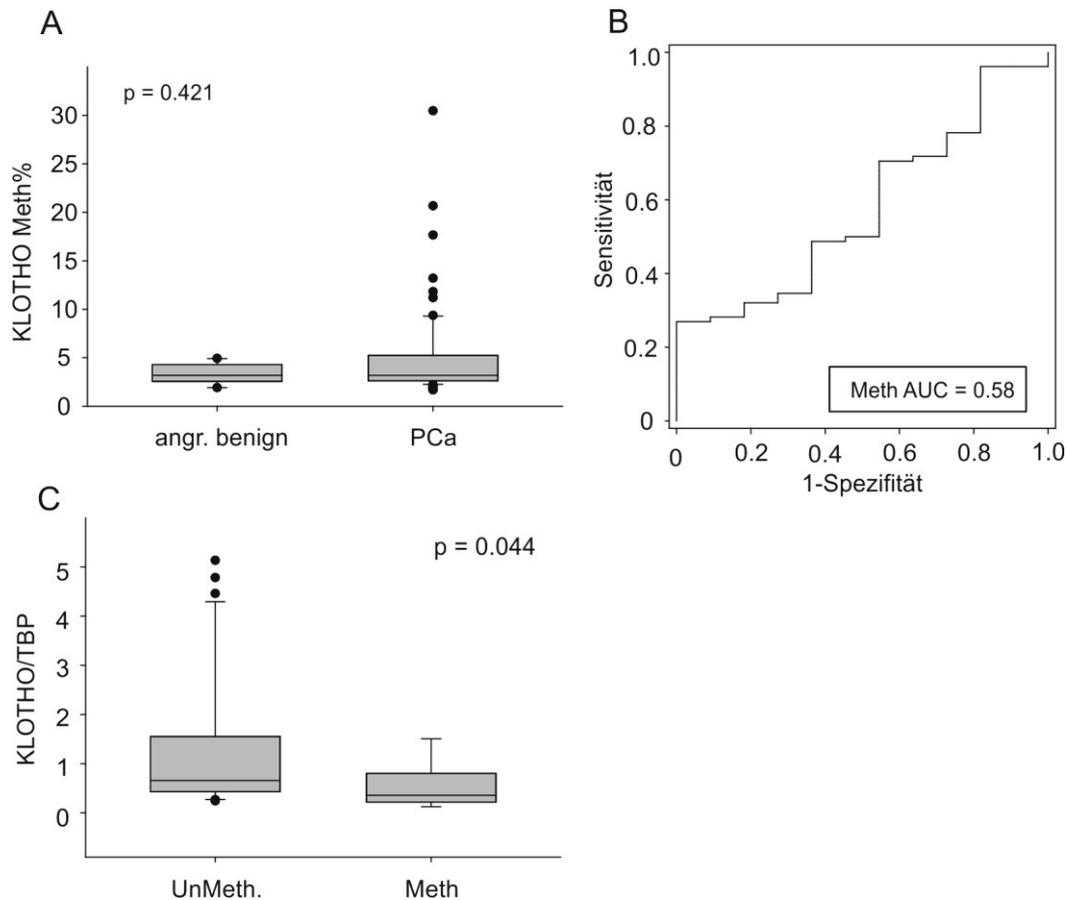


Abb. 4-19 Analyse der DNA-Methylierung von *KLOTHO* mittels Pyrosequenzierung in Prostatakarzinomgeweben und benignen Kontrollgeweben (A). ROC-Kurve der Methylierungsanalyse (B). Abhängigkeit der *KLOTHO* Expression von der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung (C).

Im direkten Vergleich der im Rahmen der ROC-Analyse berechneten AUC besitzt die Messung der DNA-Methylierung demnach eine geringere Validität als die zuvor beschriebene Expressionsanalyse von *KLOTHO* für die Identifizierung eines PCa (vgl. Abb. 4-18 B und 4.19 B).

4.2.4 DNA-Methylierungs- und Expressionsanalyse in PCa Zelllinien, Fibroblasten und Leukozyten

Die Methylierungsanalyse von *KLOTHO* in Zelllinien, Fibroblasten und Leukozyten erfolgte durch eine konventionelle Bisulfit-Sequenzierung in der Technik nach Sanger (Abb. 4-20). Die

Ergebnisse

untersuchte Region lag bei -350bp - +89bp von der Transkriptionsstartstelle von *KLOTHO* und umfasste nahezu vollständig die CpG-Insel im Promoter. Die Bestimmung der Methylierung der analysierten Proben erfolgte in jeweils 4 Klonen.

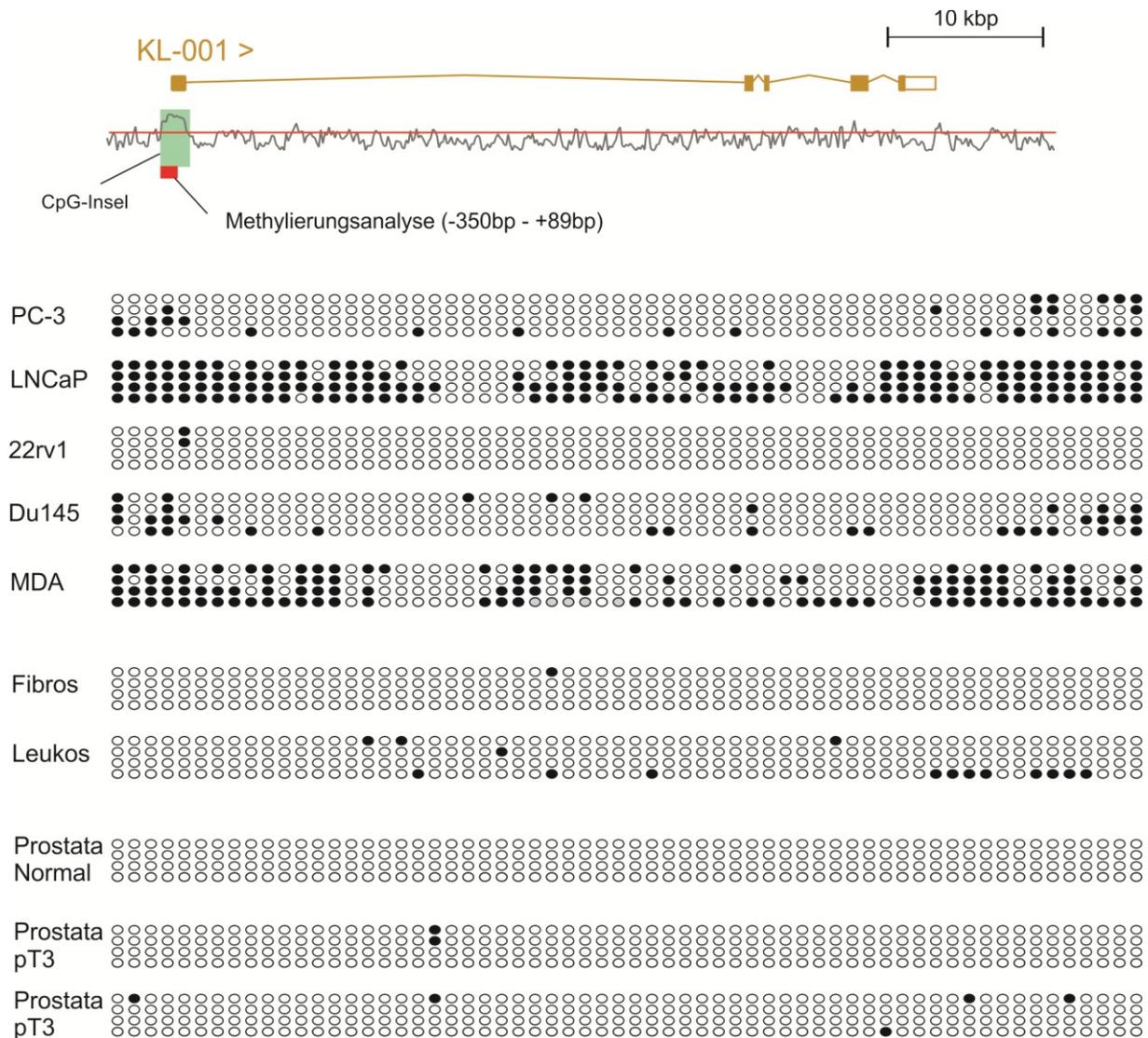


Abb. 4-20 Bisulfit-Sequenzierung in der Technik nach Sanger in den PCa-Zelllinien PC-3, LNCaP, 22Rv1, Du145 und MDAPCa2b sowie Fibroblasten (Fibros) und Leukozyten (Leukos). Ebenfalls erfolgte die Analyse von PCa und Normalgewebe der Prostata.

Für die Zelllinien LNCaP und MDAPCa2b konnte eine starke Hypermethylierung festgestellt werden, während für die PCa-Zelllinien PC-3 und Du145 eine leichte Hypermethylierung nachweisbar war. Dagegen zeigte die PCa-Zelllinie 22Rv1 keine detektierbare Hypermethylierung in der untersuchten Region. Die ebenfalls durchgeführte Analyse von

Ergebnisse

Fibroblasten und Leukozyten ergab sporadische Methylierung einzelner CpG-Stellen (Abb. 4-20).

Die bereits beschriebene niedrige Expression in der Prostata zeigte sich ebenfalls im Rahmen der Expressionsmessung in den PCa Zelllinien LNCaP, PC-3, Du145 und 22Rv1. Hier lag der Ct-Wert im Vergleich zum Karzinomgewebe noch höher, so dass die Messung erheblich schwieriger und ihre Zuverlässigkeit eingeschränkt ist (Abb. 4-21 B). Eine Induktion durch den DNMT-Inhibitor 5-Aza-dC war - mit diesen Einschränkungen - in der Zelllinie PC-3 möglich (Abb. 4-21 A). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Expression auch in diesen Fällen nicht unter einem Ct-Wert von 35 blieb.

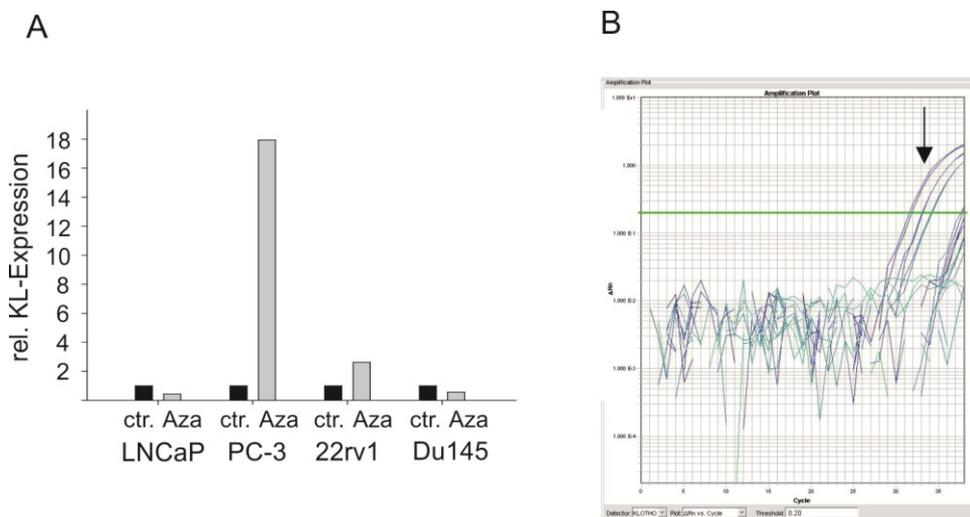


Abb. 4-21 Expressionsanalyse mittels qRT-PCR in den PCa-Zelllinien LNCaP, PC-3, Du145 und 22Rv1 und Induktionsversuche mit dem DNMT-Inhibitor 5-Aza-dC (A). Amplifikationskurven der durchgeführten qRT-PCR zur Demonstration der sehr niedrigen Expression von *KLOTHO* in PCa-Zelllinien. Der erkennbare Standard (Pfeil) wurde mit cDNA aus Nierengewebe erstellt (B). ctr: unbehandelt; Aza: 5 μ M 5-Aza-dC über 3 d.

4.2.5 Analyse der Genexpression und DNA-Methylierung von *KLOTHO* in Abhängigkeit häufig genutzter klinisch-pathologischer Parameter

Wie bereits beschrieben, lag eine signifikant niedrigere Expression von *KLOTHO* im Karzinomgewebe im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe vor. Eine weitere Charakterisierung der veränderten Expression erfolgte anhand der klinisch-pathologischen Parameter Gleason-Score, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus. Im Fall

Ergebnisse

des Gleason-Scores zeigte sich eine Tendenz zu einer besonders niedrigen Expression in wenig differenzierten Tumoren mit einem Gleason-Score über 7 (Abb. 4-22 A). Diese Tendenz erreichte allerdings keine statistische Signifikanz in der durchgeführten *Kruskal-Wallis*-Analyse. Bei den weiteren untersuchten Parametern Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus konnte dagegen keine Tendenz zu einer abhängigen Expressionsänderung nachgewiesen werden (Abb. 4-22 B-D).

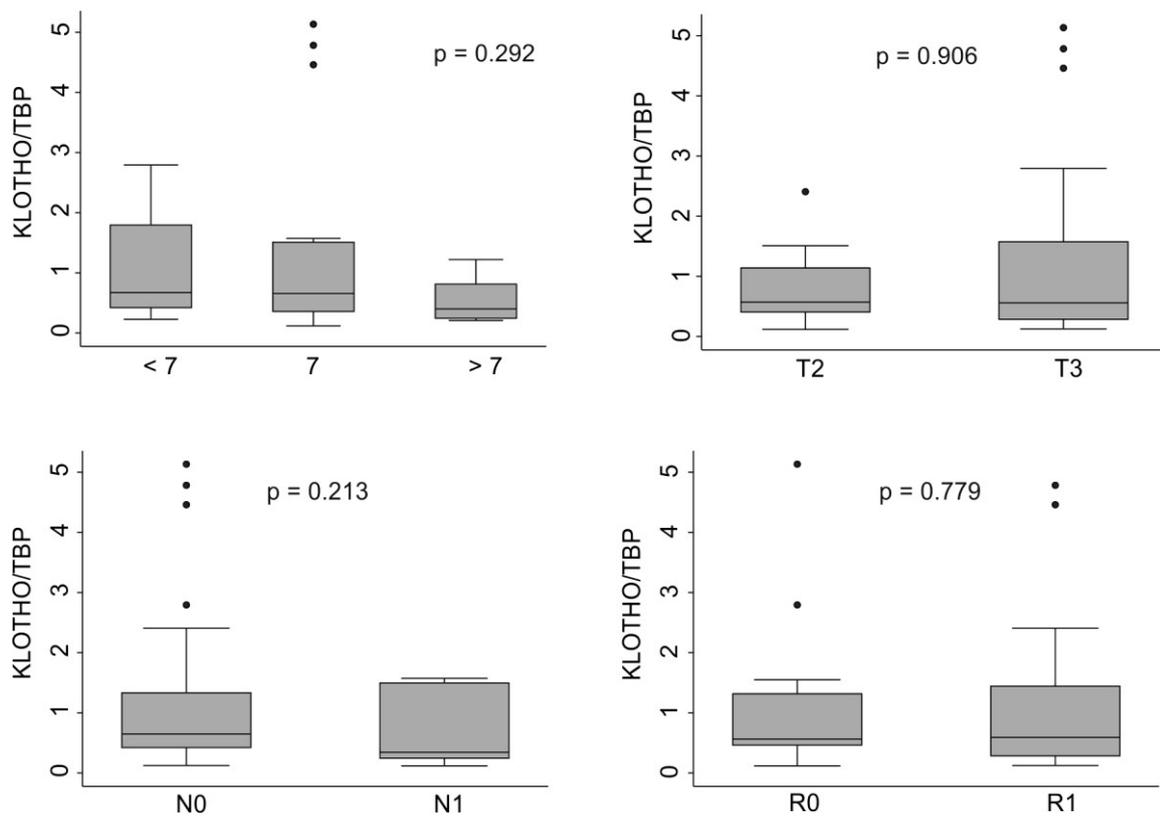


Abb. 4-22 Abhängigkeit der relativen Expression von *KLOTHO* von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

Weiterhin konnte keine Abhängigkeit zwischen der quantitativen Methylierung von *KLOTHO* und den beschriebenen klinisch-pathologischen Klassifikationen gezeigt werden (Abb. 4-23 A-D). Die ebenfalls durchgeführte Cox Regressionsanalyse zeigte weder einen Einfluss der *KLOTHO* Expression noch der quantitativen Methylierung auf die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines biochemischen Rezidivs (Tab. 4-9).

Ergebnisse

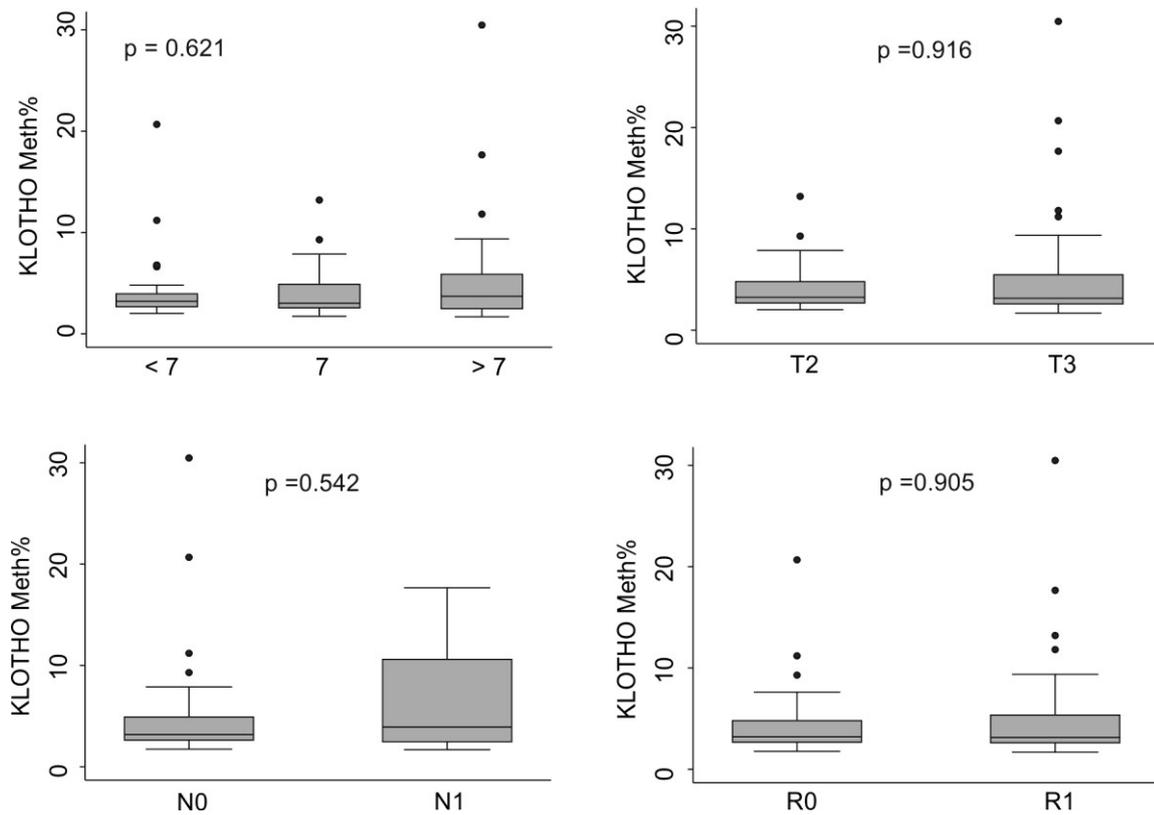


Abb. 4-23 Quantitative *KLOTHO*-Methylierung in Abhängigkeit von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

Tab. 4-9 Cox-Regressionsanalyse der *KLOTHO*-Expression und Methylierung mit dem Endpunkt biochemisches Rezidiv

Messung	HR (95% CI)	p-Wert	c-index
Expression	1.121 (0.769-1.633)	0.552	0.466
Methylierung	1.015 (0.958-1.075)	0.606	0.498

4.3 Charakterisierung von *SMARCD3* im Prostatakarzinom

4.4.1 Expressionsanalyse von *SMARCD3* im PCa und Zelllinien

Die mittels quantitativer Real-Time RT-PCR durchgeführte Expressionsanalyse von *SMARCD3* wies eine signifikant niedrigere Expression in Karzinomgeweben gegenüber den benignen Kontrollgeweben nach (Abb. 4-24 A). Darüber hinaus zeigte sich im Verhältnis zum Median der Messung in benignen Kontrollgewebe eine deutlich niedrigere Expression in PCa-Zelllinien, insbesondere der Zelllinie PC-3. Die exemplarisch untersuchten Blasenkarzinomzelllinien zeigten eine mit den PCa-Zelllinien vergleichbare niedrige Expression (Abb. 4.24 B).

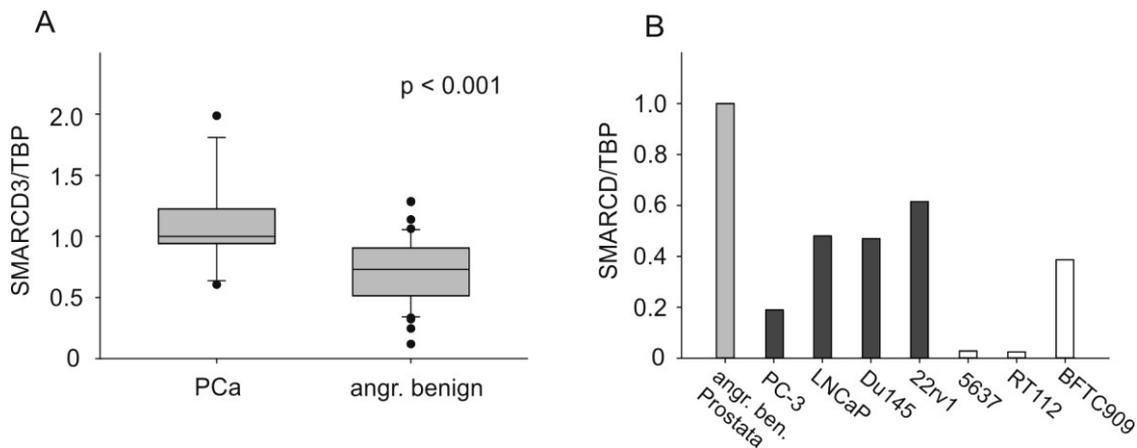


Abb. 4-24 Expressionsanalyse von *SMARCD3* in PCa und benignen Kontrollgeweben (A). Analyse der Expression in Zelllinien aus PCa und Blasenkarzinom (B).

Neben dieser hochsignifikant niedrigeren Expression im PCa konnte unter Verwendung der Cox-Regressionsanalyse eine signifikante Assoziation der Expressionsänderung mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs nachgewiesen werden (Tab. 4-10).

Tab. 4-10 Cox-Regressionsanalyse der *SMARCD3*-Expression mit dem Endpunkt biochemisches Rezidiv

Messung	HR (95% CI)	p-Wert	c-index
<i>SMARCD3</i>	0.104 (0.013-0.817)	0.031	0.672

Ergebnisse

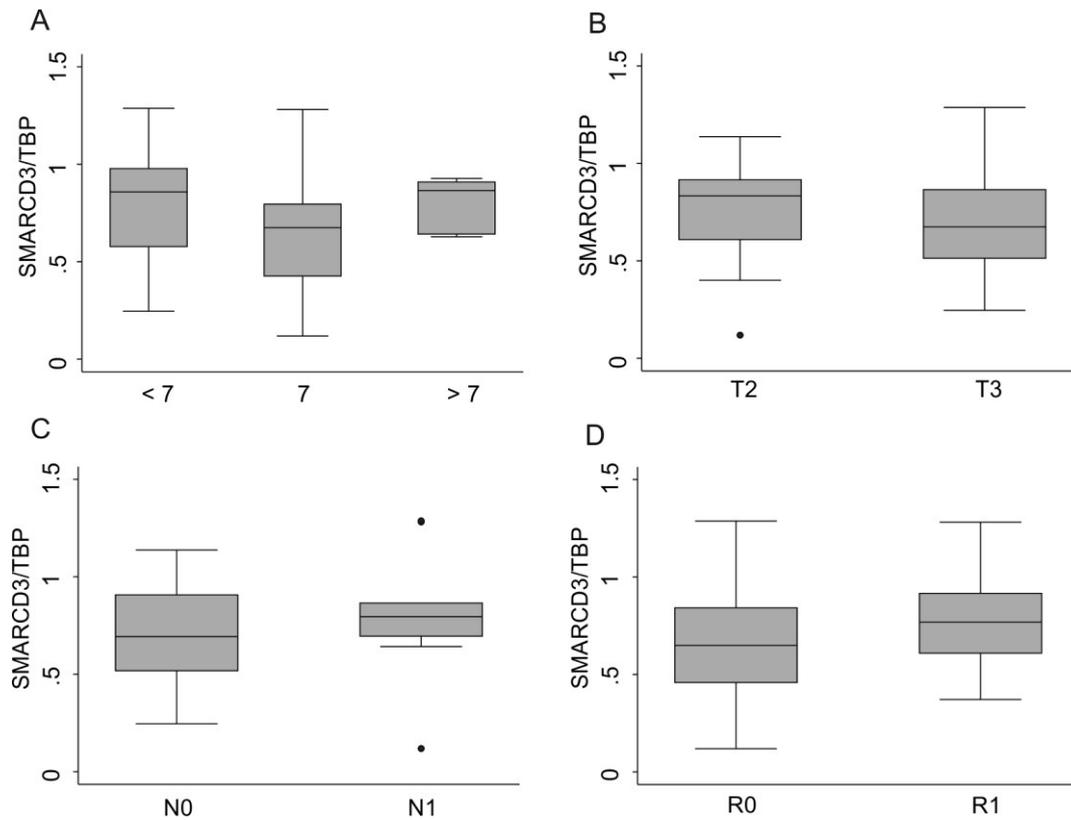


Abb. 4-25 Abhängigkeit der relativen *SMARCD3*-Expression von den klinisch-pathologischen Parametern Gleason-Score (A), Tumorstadium (B), Lymphknotenstatus (C) und Resektionsstatus (D).

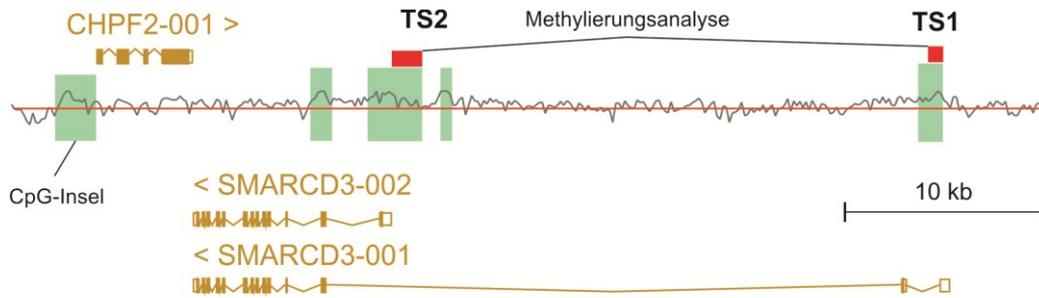
Wie bereits beschrieben, lag eine signifikant niedrigere Expression von *SMARCD3* im Karzinomgewebe der Prostata im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe vor. Eine weitere Charakterisierung der veränderten Expression erfolgte anhand der klinisch-pathologischen Parameter Gleason-Score, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Resektionsstatus. Hierbei konnte keine signifikante Assoziation, auch keine Tendenz zu einer einhergehenden Expressionsänderung, nachgewiesen werden (Abb. 4-25 A-D).

4.4.2 DNA-Methylierungsanalyse von *SMARCD3* in den PCa Zelllinien

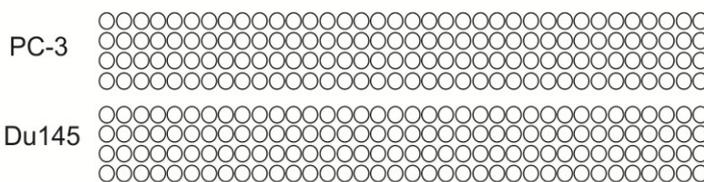
Zur Analyse der Methylierung in den PCa-Zelllinien PC-3 und Du145 erfolgte eine konventionelle Bisulfit-Sequenzierung in der Technik nach Sanger. Im Fall von *SMARCD3* war zu beachten, dass das Gen die Bildung von zwei Isoformen erlaubt. Aufgrund der unterschiedlichen Transkriptionsstartstellen beider Isoformen erfolgte die Analyse an zwei Promoterregionen mit einem Abstand von ca. 30 kb (Abb. 4-26). Die zur Analyse gewählten Zelllinien PC-3 und Du145 besaßen im Vergleich zu weiteren PCa-Zelllinien eine niedrige bis

Ergebnisse

mittlere Expression. In der Methylierungsanalyse zeigte die Zelllinie PC-3 keine Methylierung der untersuchten Promoterregionen. In Du145 konnte an der Transkriptionsstartstelle 1 (TSS1) ebenfalls keine Methylierung nachgewiesen werden, während an TSS2 wiederholt eine unspezifische Sequenz amplifiziert wurde.



Transkriptionsstartstelle 1 (TS1):



Transkriptionsstartstelle 2 (TS2):



Du145 unspezifische Sequenz

Abb. 4-26 Bisulfit-Sequenzierung der Promoterregion beider *SMARCD3*-Isoformen in den PCa-Zelllinien PC-3 und Du145.

4.4.3 Überexpression beider *SMARCD3* Isoformen und *COQ7* im *Colony-forming Assay* in der PCa Zelllinie PC-3

Nach Transfektion der pIRES2-EGFP Expressionsvektoren mit den *SMARCD3* Isoformen 1 und 2 sowie *COQ7* in die PCa-Zelllinie PC-3 konnte im Vergleich zur Kontrolle, dem Leervektor pIRES-EGFP2, ein starker Expressionsanstieg mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Die Untersuchung eines zellulären Einflusses der jeweiligen Überexpression auf die Zelllinie PC-3 erfolgte mittels *Colony-forming Assay* unter Selektion mit Geneticin (G418).

Ergebnisse

Hierbei zeigte sich nach 4 Wochen Behandlung kein Unterschied zwischen der Positivkontrolle und den Überexpressionen beider *SMARCD3* Isoformen und *COQ7*.

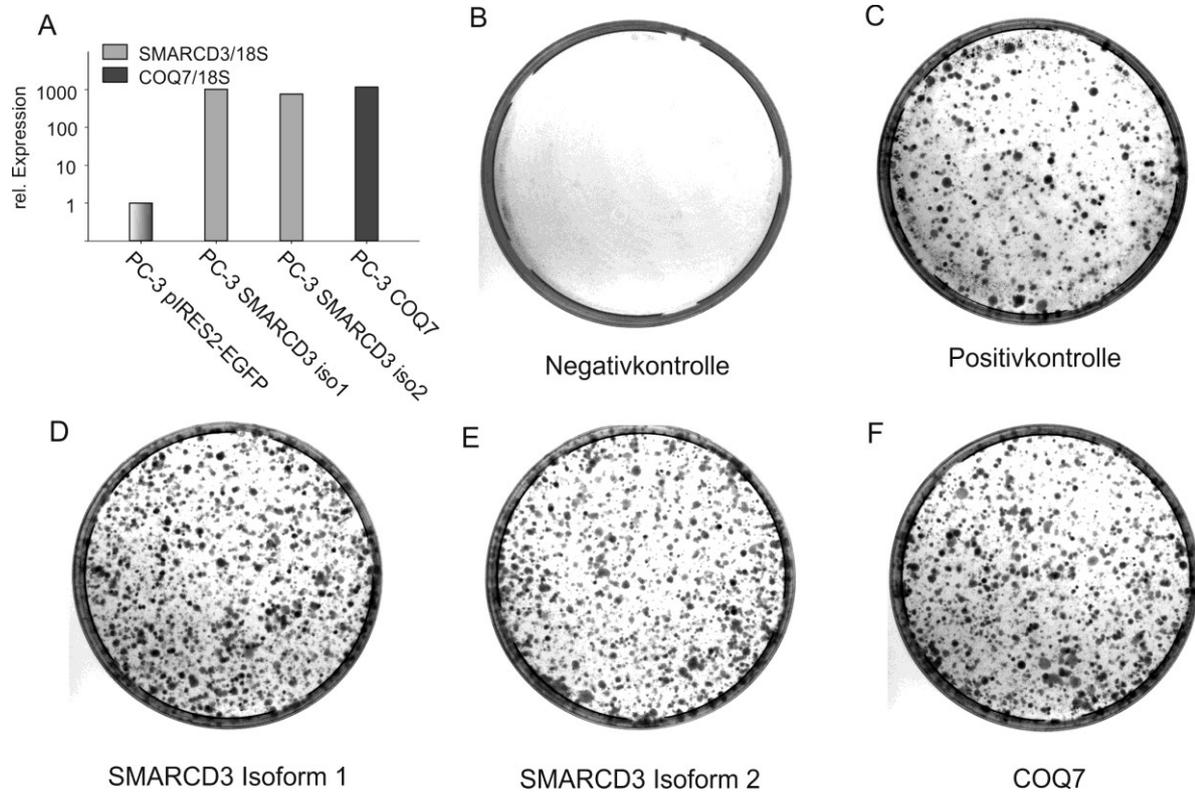


Abb. 4-27 Überexpression von pIRES2-EGFP-Expressionskonstrukten mit den *SMARCD3*-Isoformen 1 und 2 sowie *COQ7* in der PCa Zelllinie PC-3 (A). Colony-forming Assay nach Transfektion der Expressionskonstrukte in PC-3 und Behandlung mit Geneticin (G418) für 4 Wochen (B-F). Die Negativkontrolle wurde nicht transfiziert (B), während der Leervektor pIRES2-EGFP als Positivkontrolle genutzt wurde (C).

5. Diskussion

5.1 Analyse der genomischen Region 3q25.32 im Prostatakarzinom

Die Genprodukte der auf 3q25.32 gelegenen paralogen Gene *LXN* und *RARRES1* besitzen beide einen modularen Aufbau aus Cystatin-Untereinheiten und sind entsprechend als Proteaseinhibitor charakterisiert oder gehen Interaktionen mit Proteasen ein (79, 89, 91). Die Nachbarschaft von entwicklungs-genetisch bzw. funktionell verwandten Genen in einer genomischen Region ist allgemein nicht ungewöhnlich und kann insbesondere an der nah verwandten Cystatin-Familie nachvollzogen werden.

RARRES1, auch bekannt als *TIG1*, gehört zu den am häufigsten methylierten Genen in zahlreichen Tumorentitäten (145). Durch die besondere Beziehung zwischen *RARRES1* und *LXN* erschien die Untersuchung einer möglicherweise bestehenden Abhängigkeit der epigenetischen bzw. transkriptionellen Regulation im Sinne einer regionalen Koordination interessant und wurde daher besonders berücksichtigt.

5.1.1 Die Hypermethylierung von *LXN* ist mit einem hypermethylierten Status des Nachbargens *RARRES1* assoziiert

Eine Karzinom-spezifische Hypermethylierung von *LXN* zeigte sich in 29% der untersuchten Karzinomgewebe, während die Hypermethylierung von *RARRES1* in 60% der Fälle auftrat. Die gemessene *RARRES1*-Methylierung entsprach den in der Literatur zu findenden Werten von ca. 50-70% (94, 96). Im Fall der *LXN*-Hypermethylierung handelte es sich hingegen um die Erstbeschreibung im Prostatakarzinom. Bereits zuvor war der Nachweis einer Hypermethylierung im Magenkarzinom, Medulloblastom und in Melanom-Zelllinien erfolgt (86-88).

Die Analyse zum gemeinsamen Auftreten der Hypermethylierung beider Gene zeigte, dass nahezu alle Fälle mit Karzinom-spezifischer *LXN*-Hypermethylierung eine nachweisbare Hypermethylierung von *RARRES1* besaßen. Im Fall eines fokalen Beginns der DNA-Hypermethylierung scheint somit eine Ausbreitung der DNA-Methylierung über die beiden auf 3q25.32 benachbarten Gene stattzufinden und kann als ein regionales epigenetisches *Silencing* betrachtet werden. Ein solches Verhalten von DNA-Methylierung konnte im PCa für

die genomische Region 2q14.12 ebenfalls gezeigt werden (48). Die zu beobachtende Ausbreitung kann prinzipiell als ein "Spreading" angesehen werden (146).

Entsprechend dem gemeinsamen Auftreten der Hypermethylierung von *RARRES1* und *LXN* konnte eine positive Korrelation der quantitativ gemessenen Hypermethylierung nachgewiesen werden. Zum Vergleich erfolgte ebenfalls eine Korrelation mit der häufig nachweisbaren und prognostisch bedeutsamen Methylierung des auf Chromosom 4q25 gelegenen Gens *PITX2* (52, 53, 147). Bei der durchgeführten Analyse zeigten sich vergleichbare Korrelationskoeffizienten.

Demnach scheint ein Zusammenhang zwischen einer globalen Methylierungsneigung und dem gemeinsamen Auftreten der *RARRES1*- und *LXN*-Methylierung zu bestehen. Dieses häufig zu beobachtende Verhalten kann nicht nur im PCa beobachtet werden, sondern könnte mit dem *CpG-island methylator phenotype* (CIMP) im kolorektalen Karzinom verglichen werden (148).

5.1.2 Korrelation der Methylierung von *RARRES1* und *LXN* mit klinisch-pathologischen Parametern

Die Bestimmung der Methylierung zahlreicher Gene konnte in verschiedenen Tumorentitäten mit klinisch-pathologischen Parametern assoziiert werden. Hierbei ist in der Mehrzahl der Messungen zu berücksichtigen, dass diese häufig auf qualitativen oder auch semi-quantitativen Messungen beruhen und dementsprechend die Reproduzierbarkeit in verschiedenen Laboren erschwert ist. In qualitativen Studien zur Methylierung von *RARRES1* konnte der Nachweis einer Korrelation mit dem Gleason-Score bzw. dem Tumorstadium erbracht werden (96, 149). Eine Bestätigung dieser Assoziationen bzw. eine prognostische Wertigkeit in Bezug auf die Vorhersage eines biochemischen Rezidivs konnte in weiteren qualitativen Studien nicht gezeigt werden (97).

Durch die Nutzung der Pyrosequenzierung konnte im Rahmen der durchgeführten Arbeit eine quantitative Analyse der *RARRES1*-Methylierung durchgeführt werden. In Bezug auf den Gleason-Score und das Stadium ließen sich zwar Tendenzen zu einer höheren Methylierung feststellen, diese waren allerdings nicht signifikant und entsprachen demnach den bereits durchgeführten Studien (97, 150). Im Fall der quantitativen Methylierung von *LXN* zeigte sich darüber hinaus ebenfalls eine deutliche Tendenz zu einer Assoziation zwischen

zunehmender Methylierungsintensität und Gleason-Score, welche sich nach Dichotomisierung auf Basis der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung als signifikant darstellte.

Folgend scheint die durch ausgebreitete Hypermethylierung bzw. *LXN*-Hypermethylierung charakterisierte Subpopulation mit niedriger differenzierten Tumoren einherzugehen. Ob es sich hierbei um einen für die genomische Region 3q25.32 spezifischen Effekt handelt oder hierdurch ein globaler Phänotyp repräsentiert wird, ist nicht abschließend beurteilbar und muss in unabhängigen Studien geprüft werden.

5.1.3 *RARRES1* kann als epigenetischer Biomarker zur Vorhersage eines bioschemischen Rezidivs genutzt werden

Die prognostische Wertigkeit nach radikaler retropubischer Prostatektomie wurde anhand des häufig genutzten Endpunkts "Biochemisches Rezidiv", gleichbedeutend mit dem Ansteigen des PSA-Werts über 0,2ng/ml im Serum, untersucht. Durch die Nutzung des biochemischen Rezidivs, anstelle der bei anderen Tumorentitäten vergleichsweise häufiger genutzten Mortalität, konnten daher keine Aussagen über eine Vorhersage der Mortalität stattfinden. Im Allgemeinen ist zwar davon auszugehen, dass dem rezidivbedingten Versterben ein biochemisches Rezidiv vorausgeht, allerdings besteht keine Assoziation zwischen dem Zeitraum des Auftretens eines biochemischen Rezidivs und der systemischen Progression (151). Weiterhin folgt durch das hohe Lebensalter der Patienten und die niedrige 5-Jahressterblichkeit von nur 8% eine hohe Rate an Todesfällen, die nicht auf das Tumorleiden zurückzuführen sind (1). Aus den genannten Gründen und dem retrospektiven Studiendesign mit *Follow-up* Daten von bis zu 15 Jahren diente die prognostische Analyse ausschließlich der orientierenden Bestimmung einer prädiktiven Wertigkeit und muss in unabhängigen Kollektiven reproduziert werden.

Weiterhin können Klassifizierungen wie die durchgeführte Dichotomisierung von quantitativen Methylierungsdaten mit einem Verlust an Information einhergehen (152). Dieser prinzipiell wünschenswerte Informationsgehalt besitzt allerdings eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit klinischen Klassifikationen. Eine Möglichkeit der Integration solcher verschiedener Datenstrukturen liegt in der Nutzung von Nomogrammen (153). Eine weitere Möglichkeit liegt in der Dichotomisierung bzw. Klassifizierung der quantitativen Daten. In der

durchgeführten Arbeit erfolgte die Dichotomisierung unter Nutzung der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung (Spezifität = 1.0) und der *k-Medians*-Clusterzentrenanalyse (154).

Die durch die Clusteranalyse charakterisierte hochmethylierte Gruppe zeigte eine stark ausgeprägte prädiktive Vorhersagekraft in Bezug auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs nach radikaler retropubischer Prostatektomie. Diese Vorhersagekraft ist darüber hinaus unabhängig von den typischerweise zur Prognoseabschätzung genutzten Parametern Gleason-Score, TNM-Stadium, Resektionsrändern und Lymphknotenstatus (155). Wie durch die multivariate Cox-Regressionsanalyse und Harrel's c-index gezeigt (156), kann eine zusätzliche Bestimmung der DNA-Methylierung auf 3q.25.32, insbesondere der *RARRES1*-Methylierung, somit eine Verbesserung der Vorhersage eines biochemischen Rezidivs ermöglichen. Unter Berücksichtigung der Clusteranalyse zeigte sich weiterhin, dass eine Dichotomisierung der quantitativen Daten zu keinem Verlust an prädiktiver Wertigkeit – gemessen am jeweiligen Signifikanzniveau – führte. Demnach scheint der durch den Algorithmus der *k-Medians*-Clusterzentrenanalyse resultierende Grenzwert im analysierten Kollektiv nur zu einem geringen bzw. keinem Verlust an prädiktiver Information zu führen.

Die in der Cox Regressionsanalyse als hochprädiktiv bestimmte quantitative *RARRES1*-Methylierung könnte darüber hinaus in Nomogramme eingebunden werden (157), vergleichbar mit dem in diesem Zusammenhang bereits genutzten präoperativen PSA-Wert (153, 158, 159).

Trotz der vielen bekannten Methylierungsereignisse im Prostatakarzinom konnte nur in wenigen Fällen eine prädiktive Wertigkeit in unabhängigen Studien reproduziert werden (7). Bei dem wahrscheinlich am besten charakterisierten Beispiel handelt es sich um *PITX2*. Hierbei konnte in multizentrischen Studien gezeigt werden, dass die intensivierete Methylierung von *PITX2* als prädiktiver Marker genutzt werden kann (52, 53). Durch die ausgeprägte Korrelation mit der Methylierung von *RARRES1* und *LXN* weisen diese Ergebnisse damit auf eine im jeweiligen Karzinom bestehende Assoziation einer Subgruppe an methylierten Genen mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs hin. Somit eröffnet sich die Möglichkeit für eine weitere Charakterisierung damit einhergehender Methylierungsereignisse, die womöglich mit einem aggressiveren Phänotyp verbunden sind.

5.1.6 Der Genotyp des rs6441224 SNP ist mit der Methylierung von *RARRES1* assoziiert

Im Rahmen der Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung erfolgte die Bestimmung des Genotyps von zwei häufig heterozygoten SNPs. Zu diesen gehörte rs6441224, ca. 140 bp von der *RARRES1* Transkriptionsstartartstelle (TSS) und der ca. 20 bp von der *LXN* TSS entfernt liegende rs9841 SNP. Die Berücksichtigung dieser häufig heterozygoten SNPs in den Methylierungsanalysen ermöglichte dabei nicht nur die Korrelation mit dem Ausmaß der stattfindenden Hypermethylierung in Karzinomgeweben, sondern diente auch weiterhin als interne Kontrolle der Genotyphäufigkeit. Die Verteilungshäufigkeit der SNPs in untersuchten *Fresh-Frozen* Geweben des untersuchten Kollektivs entsprach denen der *SNP Database* (dbSNP).

In der Analyse zur Abhängigkeit der *RARRES1*-Methylierung vom Genotyp zeigte sich ein ausgeprägter Zusammenhang zwischen dem T-Allel von rs6441224 und der Methylierungsintensität. Eine vergleichbare genetisch-epigenetische Interaktion in Karzinomen konnte bisher nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden. Hierzu gehören die Methylierung von *MLH1* im kolorektalen Karzinom sowie von *MGMT* im Fall von Lungenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen (160-162). Weiterhin konnte im Rahmen von genomweiten Analysen in Normalgeweben ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DNA-Methylierung und SNVs (*Single Nucleotide Variants*) gezeigt werden (163).

Eine weitere Auffälligkeit der untersuchten Methylierung lag in ihrer offenbar Allel-spezifischen Abhängigkeit. Im Allgemeinen kann DNA-Methylierung bzw. die stabile Weitergabe einer epigenetischen Information häufig in Abhängigkeit des parentalen Ursprungs im Rahmen des Imprintings beobachtet werden (164). Darüber hinaus konnte in Maus-Experimenten eine Abhängigkeit des Methylierungsstatus vom parentalen Ursprung und angrenzenden Nukleotid-Variationen gezeigt werden (165). Demnach scheint eine Interaktion zwischen Genotyp, DNA-Methylierung und regionaler Genregulation zu bestehen.

Neben der prognostischen Assoziation der DNA-Methylierung zeigte sich eine solche ebenfalls für das rs6441224-T-Allel. Allgemein konnte in verschiedenen GWAS-Studien ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp von SNPs und dem Auftreten eines aggressiven PCa

nachgewiesen werden (166-169). Die Besonderheit der beschriebenen Interaktion zwischen rs6441224 im *RARRES1*-Promoter liegt hierbei in der epigenetischen Kopplung.

5.1.7 Der SNP rs6441224 beeinflusst die Transkriptionsfaktor-Affinität von *RARRES1* und liegt in einer ERG-Bindestelle

Um eine mögliche Beeinflussung der Transkriptionsfaktoraffinität durch rs6441224 zu untersuchen, erfolgte eine bioinformatische Analyse mittels TRAP (*Transcription factor Affinity Prediction*) (170). Im Allgemeinen zeigte sich eine niedrigere Affinität für eine Reihe an Transkriptionsfaktoren, insbesondere die *ETS*-Transkriptionsfaktor-Familie.

Diese besitzt im PCa durch die häufigste rekurrente genetische Aberration, der Fusion *TMPRSS2-ERG*, eine besondere Bedeutung (37). Der experimentelle Nachweis der Transkriptionsfaktoraffinität durch Luciferase-Reporter-Assays und Koexpression mit *ERG* und *ETS1* stand hierbei im Einklang mit den Ergebnissen der bioinformatischen Analyse. Allerdings konnte trotz der ausgeprägten Induktion der transfizierten *RARRES1*-Promotersequenzen mit dem rs6441224-T- und C-Allel im Fall der Koexpression mit *ERG* und *ETS1* kein Unterschied zwischen den beiden Allelen detektiert werden. Im Fall der nicht physiologischen Überexpression binden Mitglieder der *ETS*-Transkriptionsfaktor-Familie demnach auch an die weniger affine Sequenz mit dem rs6441224-T-Allel. Dies ist möglicherweise durch die Position des SNPs im Randbereich der *ETS*-Bindestelle und einem damit verhältnismäßig geringeren Einfluss auf die Bindungsaffinität begründet.

Wie bereits zuvor beschrieben, zeigte das rs6441244-T-Allel eine ausgeprägte Assoziation mit der Hypermethylierung des *RARRES1*-Promoters. Demnach scheint eine geringere Promoteraktivität des *RARRES1*-Promoters mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Hypermethylierung einherzugehen. Eine vergleichbare Situation konnte durch die Interaktion von rs16906252 mit der Methylierung von *MGMT* nachgewiesen werden (171). Eine mögliche Erklärung der Genotyp-abhängigen Methylierung von *RARRES1* im Prostatakarzinom und *MGMT* im Lungenkarzinom liegt anscheinend in einer generellen Resistenz Transkriptionsfaktor-besetzter Promoter in Bezug auf eine *de novo* DNA-Methylierung (163, 172, 173). Insbesondere im Fall von SP1-Bindestellen konnte ein Einfluss auf die Methylierung von Promoter-assoziierten CpG-Inseln nachgewiesen werden (174, 175).

Somit scheint der Genotyp durch die direkte Modulation der Transkriptionsfaktoraffinität indirekt die Methylierung von Genen zu beeinflussen. Hieraus könnte übertragen werden, dass eine bereits niedrige Expression bzw. Promoteraffinität von Tumorsuppressorgenen potentiell zu einer Hypermethylierung beiträgt. In der jeweiligen Tumorzelle würde dieses Potential zu einem stabilen transkriptionellen Silencing führen und mit einem Selektionsvorteil einhergehen. Ein solcher Mechanismus würde der epigenetischen Regulation durch Polycomb-vermittelter Methylierung entsprechen (176). Die Interaktion zwischen Genotyp und Tumor-Epigenom könnte darüber hinaus einen Einfluss auf die Heredität des PCa und Karzinome im Allgemeinen besitzen (15).

5.1.8 Die Methylierungsmuster auf 3q25.32 in PCa Geweben sind ebenfalls in Zelllinien detektierbar

Die in Karzinomgeweben teilweise regional ausgebreitet und teilweise lokal begrenzt vorliegende Hypermethylierung trat prinzipiell in 3 verschiedenen Methylierungsmustern auf. Diese entsprachen dem gemeinsamen Auftreten der Hypermethylierung von *LXN* und *RARRES1* und der alleinigen Hypermethylierung von *RARRES1* bzw. der von *LXN*.

Die Methylierungsanalysen wurden unter Nutzung unterschiedlicher Techniken durchgeführt. Hierzu gehörend die Pyrosequenzierung, die Sequenzierung in der Technik nach Sanger und die methylierungsspezifische MS-PCR. Neben dem Einsatz als Kontrolle, können diese Techniken sich in Bezug auf die Information gegenseitig ergänzen. Während die Pyrosequenzierung eine quantitative Analyse der DNA-Methylierung erlaubt, hat die Sequenzierung in der Technik nach Sanger einen höheren Informationsgehalt im Fall einer Allel-spezifischen Methylierung (ASM).

Die Methylierungsanalyse in PCa Zelllinien ergab, dass die in Karzinomgeweben nachweisbaren Methylierungsmuster ebenfalls in den untersuchten Zelllinien detektierbar waren. Der in Karzinomgeweben verhältnismäßig selten auftretende Fall einer alleinigen *LXN*-Hypermethylierung konnte in der Zelllinie Du145 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung entsprachen dabei einer potentiellen ASM, die unabhängig von der häufigen *RARRES1*-Hypermethylierung nachweisbar war. Eine Allel-spezifische Methylierung kann in Regionen mit und ohne Imprinting stattfinden (177). Beim *Imprinting* handelt es sich um ein Allel-spezifisches *Silencing* eines maternalen bzw. paternalen Allels und damit der

Regulation der Genexpression. Entsprechend fällt dem Imprinting eine besondere Bedeutung im Prozess der X-Inaktivierung zu (164). Im Rahmen der Tumorbilogie kann gehäuft ein *Loss of Imprinting* (LOI) und auch ein *Gain of Imprinting* nachgewiesen werden (178). Allerdings zeigten sich in der Literaturrecherche keine Hinweise auf ein *Imprinting* der Region 3q25.32. Hingegen konnte für die auf 7q32 clusterförmig vorliegenden potentiellen Substrate des Carboxypeptidase-Inhibitors *LXN* ein *Imprinting* nachgewiesen werden (179). Weiterhin zeichnet sich der *LXN*-Promoter bzw. die 5'-UTR (*Untranslated Region*) durch das Vorhandensein einer hochkonservierten *CTCF*-Bindestelle aus. Bei dem Transkriptionsfaktor *CTCF* handelt es sich um ein Zinkfingerprotein, das im *Imprinting* des *IGF2/H19* Locus als *Insulator* wirkt (180, 181).

Somit handelt es sich im Fall der offenbar Allel-spezifischen Methylierung des *LXN*-Promoters von Du145 am ehesten um eine verhältnismäßig selten auftretende spezifische Methylierungsveränderung, die möglicherweise sogar in einigen Normalgeweben nachweisbar sein könnte.

Neben dem Nachweis des Vorkommens der in PCa-Geweben vorkommenden Methylierungsmuster in PCa Zelllinien, erfolgte weiterhin der Nachweis einer veränderten 3q25.32-Methylierung in den Blasenkarzinom-Zelllinien HT1376 und EJ. Demnach scheint die Ausbreitung der auf 3q.25.32 stattfindenden Hypermethylierung, gleichbedeutend mit dem gemeinsamen Auftreten am *RARRES1* und *LXN*-Promoter, nicht nur im PCa stattzufinden, sondern auch in weiteren Tumorentitäten. Dieser Aspekt ist insbesondere unter Berücksichtigung der in verschiedenen Karzinomen häufig vorkommenden *RARRES1*-Hypermethylierung interessant (145).

5.1.9 Der Nachweis einer ausgebreiteten 3q25.32-Hypermethylierung geht mit einer geringeren Genexpression einher und ist mit einem inaktiven Chromatinstatus assoziiert

In den untersuchten PCa-Zelllinien zeigte sich ein ausgeprägter Zusammenhang zwischen intensiver DNA-Methylierung sowie einer teilweise erheblich verringerten Genexpression. Wie zu erwarten, scheint demnach eine lokal intensivere DNA-Methylierung mit einer stärkeren epigenetischen Repression bis hin zu einem *Silencing* verbunden zu sein (2). Durch die Methylierungsanalyse der benachbarten Gene konnte neben der lokal gemessenen DNA-

Methylierung ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer Ausbreitung der DNA-Methylierung auf 3q25.32 untersucht werden. Hier zeigte sich, dass das gemeinsame Auftreten von *RARRES1*- und *LXN*-Hypermethylierung mit einer niedrigeren Expression verbunden war als im Falle einer alleinigen *RARRES1*-Hypermethylierung. Dieser Mechanismus könnte durch ein Ausschalten distaler *Enhancer*-Elemente erklärt werden (182). Interessanterweise ging die gemeinsame Hypermethylierung weiterhin mit einer geringeren Restoration der Expression nach Behandlung mit dem *DNMT*-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin einher.

Neben der Interaktion zwischen DNA-Methylierung und Genexpression erfolgte weiterhin die Analyse einer Assoziation mit den Chromatinmodifikationen H3K9ac, H3K9me3 und H3K27me3. Während es sich im Fall von K9ac um eine mit einer aktiven Genexpression assoziierte Histonmodifikation handelt, liegt gewöhnlich eine Anreicherung von K9me3 und K27me3 im Fall eines inaktiven Expressionsstatus des jeweiligen Gens vor (183, 184). Dieses Verhalten konnte in den untersuchten PCa-Zelllinien bestätigt werden. Eine besonders starke Anreicherung der aktiven Histonmodifikation K9ac war demnach am *RARRES1*-Promoter der Zelllinie Du145 nachweisbar und steht damit im Einklang mit der transkriptionellen Aktivität. In Bezug auf den hemimethylierten Status des Nachbargens und CTCF-Target *LXN* stellt sich die Frage nach einer Interaktion mit *Enhancer*-Elementen, wie sie beispielsweise am *IGF2/H19*-Locus nachweisbar ist (181, 185). In Bezug auf einen inaktiven Expressionsstatus, insbesondere im Fall der ausgebreitet und auch besonders intensiv hypermethylierten Zelllinie LNCaP, konnte eine Assoziation mit einer besonders starken Anreicherung von K9me3 und K27me3 nachgewiesen werden, einem prinzipiell *Polycomb*-abhängigen Charakteristikum (2). Zusammenfassend kann abgeleitet werden, dass der Nachweis einer regional ausgebreiteten Hypermethylierung mit einem epigenetischen *Silencing* verbunden ist.

5.1.10 Analyse der Genexpression von Nachbargenen auf 3q25.32 in PCa-Geweben

Die Analyse und Korrelation der Genexpression der auf 3q25.32 befindlichen Nachbargene erfolgte in Bezug auf die Frage, ob es sich bei der gemeinsam auftretenden Hypermethylierung von *RARRES1* und *LXN* um einen lokal begrenzten Prozess handelt, oder ob es sich hierbei um einen regional ausgebreiteten Prozess bzw. ein LRES handelt (47, 48).

Weiterhin liegt *LXN* in einem Intron des auf dem Gegenstrang orientierten *GFM1* und könnte neben seiner kodierenden Funktion prinzipiell als Antisense-RNA (aRNA) interferieren (186), allerdings zeigte sich keine inverse Korrelation.

Zunächst konnte eine hochsignifikant positive Korrelation zwischen der Genexpression von *RARRES1* und *LXN* nachgewiesen werden. Demnach scheinen die beiden Gene, über das gemeinsame Auftreten der Karzinom-spezifischen Hypermethylierung hinaus, eine auch in Normalgewebe nachweisbare Co-Regulation zu besitzen. Diese Co-Regulation könnte somit die Grundlage für die ebenfalls gemeinsame epigenetische Regulation in Karzinomen bilden. In der Zwischenzeit konnten die beschriebenen Zusammenhänge durch eine unabhängige Untersuchung von Oldridge et al. bestätigt werden (187).

5.1.11 Die quantitative Expression des *Myeloid Leukemia Factor 1 (MLF1)* ist ein hochsignifikanter Prädiktor eines biochemischen Rezidivs

Abgegrenzt zu der zuvor beschriebenen gemeinsamen Regulation konnte für *MLF1* interessanterweise eher ein Trend zu einer erhöhten Expression in Karzinomgeweben nachgewiesen werden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese eines lokal begrenzten Prozesses im Sinne eines regionalen epigenetischen *Silencings*.

Die Assoziation der quantitativen *MLF1*-Expression mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs erscheint unter Berücksichtigung seiner Bedeutung beim myelodysplastischen Syndroms besonders interessant (98, 99). Hierbei interagiert *MLF1* mit dessen Differenzierung und somit der Progression (100). Weiterhin zeigte sich eine Interaktion mit der *COP*-abhängigen Prozessierung von *TP53* (103, 106). Eine Untersuchung seiner Funktion im Prostatakarzinom bietet sich an.

5.1.12 Zusammenfassung zur Charakterisierung von 3q25.32 im Prostatakarzinom

Die Untersuchungen der Region 3q25.32 zeigen besonders eindrücklich, dass epigenetische Veränderungen im PCa zumindestens teilweise koordiniert ablaufen und durch den Genotyp beeinflusst werden. Am Beispiel von *RARRES1* und *LXN* wurde in der durchgeführten Arbeit hierfür insbesondere die räumliche Komponente einer Koordination epigenetischer Veränderungen untersucht.

Obwohl sich das PCa durch eine Vielzahl an häufig auftretenden epigenetischen Aberrationen auszeichnet (7), konnte bislang keine Charakterisierung von hieraus abgeleiteten Subpopulationen gelingen. Die Besonderheit liegt hierbei in einer großen Anzahl an Genen (z.B. *GSTP1*), die so häufig methyliert vorliegen, dass sie qualitativ nicht für eine Klassifizierung geeignet sind (95). Weiterhin erfolgte die Methylierungsanalyse in Karzinomgeweben häufig unter Nutzung der qualitativen bzw. semi-quantitativen MS-PCR, welche je nach Untersuchung am Beispiel der relativ häufig durchgeführten *RARRES1*-Analyse durchaus zwischen 40-90% schwanken kann (94, 96, 150). Eine epigenetische Klassifizierung auf der Basis von standardisierten, quantitativen Analysen und dem damit einhergehenden höheren Informationsgehalt besitzt dagegen weitaus mehr prädiktives Potential. Am Beispiel von *PITX2* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass dessen quantitative Hypermethylierung in mehreren multizentrischen Studien das Auftreten eines biochemischen Rezidivs voraussagen kann (52, 53). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte quantitative Methylierungsanalyse durch Pyrosequenzierung kann momentan als der Goldstandard angesehen werden und wurde zur Analyse des bereits zuvor in Karzinomgeweben als methyliert beschriebenen putativen TSGs *RARRES1* und des im PCa noch unbekanntes auf 3q25.32 gelegenen Nachbargens *LXN* eingesetzt.

Zunächst wurde gezeigt, dass die Hypermethylierung von *RARRES1* nicht nur auf dessen Promoter begrenzt ist, sondern häufig gemeinsam mit dem Nachbargen *LXN* auftritt. Neben dem Vorkommen dieser gemeinsamen epigenetischen Veränderungen im PCa war weiterhin ein Nachweis in Zelllinien des Blasenkarzinoms möglich. Aufgrund der gemeinsamen transkriptionellen Regulation beider Gene kann von einer gegenseitigen Beeinflussung der Methylierungswahrscheinlichkeit ausgegangen werden. In Bezug auf die Beeinflussung der Methylierungswahrscheinlichkeit durch den rs6441224-Genotyp und dessen Beeinflussung

Diskussion

der Promoteraktivität kann von einer allgemeinen Verbindung zwischen Promoteraktivität und Anfälligkeit eines epigenetischen *Silencing* ausgegangen werden. Im untersuchten Fall konnte zudem durch die bioinformatische Analyse gezeigt werden, dass die im Luciferase-Assay weniger aktive Sequenz eine geringere Affinität für Transkriptionsfaktoren besaß.

Diese Befunde passen somit zu dem allgemeinen Modell, dass ein durch Transkriptionsfaktoren besetzter Promoter eine geringere Methylierungsanfälligkeit besitzt als ein unbesetzter Promoter (163, 172, 173). Die Interaktion zwischen Genotyp und Karzinom-spezifischer Methylierung scheint nicht nur im PCa stattzufinden, sondern auch in anderen Tumorentitäten, beispielsweise dem Lungenkarzinom (171).

Zusammenfassend ließ sich somit nachweisen, dass der Genotyp eines PCa-Patienten einen ausgeprägten Einfluss auf epigenetische Veränderungen und eine besondere Bedeutung in deren Koordination besitzt.

5.2 Regulation von *KLOTHO* in PCa und Nierenzellkarzinomen

Das altersassoziierte Protein *KLOTHO* kann in seiner membranständigen Form oder humoral als Co-Rezeptor von *FGFRs* sowie als Antagonist der *IGF1*- und *WNT*-Signalwege wirken. Aus diesen vielfältigen Interaktionen resultiert eine Zelltyp- und Gewebe-spezifische Wirkung (110). Eine epigenetische Inaktivierung von *KLOTHO* konnte in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, allerdings bisher nicht in urologischen Tumoren (119, 121-123).

In den im PCa durchgeführten Analysen zeigte sich im Vergleich zum Normalgewebe eine signifikante Herunterregulation von *KL*, welche allerdings nicht generell mit einer DNA-Hypermethylierung des Promotors in Verbindung gebracht werden konnte. Vielmehr war in einigen Karzinomgeweben und einigen PCa-Zelllinien, am deutlichsten in den beiden Androgen-abhängigen Zelllinien LNCaP und MDA-PCa-2b, eine heterogene und mäßig verstärkte DNA-Methylierung nachzuweisen. Mittels Pyrosequenzierung wurde eine Karzinom-spezifische Methylierung in 27% der Gewebe nachgewiesen. Stärkere Methylierung ging mit der geringsten Expression einher, doch war die statistische Signifikanz grenzwertig ($p = 0.044$). Diese Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass die verstärkte DNA-Methylierung eher eine Konsequenz als eine Ursache der verminderten Expression darstellt, wie dies z.B. auch für *ID4* in der gleichen Gewebeserie beobachtet wurde (188). In Karzinomen allgemein (176) und speziell im Prostatakarzinom (189) werden häufig Gene hypermethyliert, die im normalen Gewebe wenig aktiv sind und im Tumor dann völlig inaktiviert werden (176). Angesichts des relativ niedrigen Expressionsniveaus von *KLOTHO* in der Prostata im Vergleich zur Niere wäre das plausibel.

Untersuchungen zur Promoter-Methylierung von *KLOTHO* in weiteren Tumorentitäten zeigten ein gehäuftes Auftreten einer Karzinom-spezifischen Hypermethylierung. So konnte eine Häufigkeit von ca. 40 % untersuchter hepatozellulärer Karzinome und Zervixkarzinome nachgewiesen werden (123, 190). Weiterhin wurde eine erniedrigte Expression in duktal-invasiven Mammakarzinomen und eine Hypermethylierung in mehreren MammaCa-Zelllinien berichtet (119).

Weder Expressions- noch Methylierungsveränderungen von *KLOTHO* bieten sich nach den vorliegenden Ergebnissen als diagnostische oder prognostische Biomarker im PCa an. Dagegen ergab die Expressionsmessung in klarzelligen und auch chromophoben

Diskussion

Nierenzellkarzinomen mit einer AUC von 0,9 eine vergleichsweise sehr gute Abgrenzung zum Normalgewebe der Niere. Eine Erklärung für die deutlichen Expressionsunterschiede liegt hierbei wahrscheinlich darin, dass sich im distalen Konvolut der Niere die höchste *KL*-Expression findet (109). Interessanterweise besitzt das klarzellige Nierenzellkarzinom seinen Ursprung gewöhnlich im proximalen Tubulusepithel, während das ebenfalls untersuchte chromophobe Nierenzellkarzinom wahrscheinlich aus den eosinophilen Zwischenzellen des Sammelrohrs entsteht (61). Beide untersuchten Entitäten von Nierenkarzinomen besitzen somit ihren Ursprung aus Nierenzellen mit einer geringeren *KL*-Expression. Die als vermindert gemessene Expression muss also in diesem Sinne nicht als Karzinom-spezifische Herunterregulation interpretiert werden, sondern könnte die Beibehaltung der niedrigen Expression in den Ausgangszellen des Tumors darstellen. Dennoch könnten diese teilweise deutlich ausgeprägten Expressionsunterschiede mindestens in Karzinomen der Niere zur Abgrenzung von Normal- und Tumorgewebe genutzt werden, beispielsweise im Rahmen immunhistochemischer Analysen. Diese könnten - bei ausreichender Sensitivität der Antikörper - auch in der Prostata diagnostisch nutzbar sein.

5.3 Analysen zu *SMARCD3* und *COQ7* im Prostatakarzinom

Der *BRAHMA*-assoziierte Faktor 60c, kodiert durch *SMARCD3*, ist eine Untereinheit des ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexes SWI/SNF. Eine Hauptfunktion von *BAF60c* scheint hierbei die Interaktion mit Nuklearrezeptoren zu sein, insbesondere wirkt es als Co-Aktivator von AR, PPAR γ und RARs (135-137). In der Prostata und insbesondere in PCa-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der Baf60-Subfamilie, hierunter auch Baf60c, mit dem Androgenrezeptor spezifisch über FxxL-Motive interagieren und die Androgen-Antwort direkt modulieren (137). Interessanterweise zeigte sich des Weiteren eine Interaktion zwischen der Hemmung der Androgenantwort durch die miR-99-Familie und *SMARCD1* (191).

In den durchgeführten Expressionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass *SMARCD3* in PCa-Geweben im Vergleich zu angrenzenden Normalgeweben deutlich herunterreguliert ist. Aufgrund der Beeinflussung der AR-Antwort (125) ist es wahrscheinlich, dass diese veränderte Expression eine funktionelle Bedeutung besitzt (137).

Neben der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Herunterregulation von *SMARCD3*, konnte bereits in zuvor durchgeführten Analysen ebenfalls eine deutlich ausgeprägte Herunterregulation von *COQ7* in der gleichen Gewebsserie festgestellt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Konstruktion von Plasmiden zur Überexpression der beiden *SMARCD3*-Isoformen und von *COQ7* in den Vektor pIRES2-EGFP. Um einen ersten Eindruck zur möglichen Wirkung dieser Konstrukte zu erhalten, wurde ihr Einfluss auf Klonogenität der PCa Zelllinie PC-3 untersucht. Hierbei konnte für beide Gene keine Veränderung im *Colony forming Assay* nachgewiesen werden. Demnach scheint die Überexpression beider Gene in der Zellkultur nicht mit deutlich ausgeprägten Selektionsnachteilen verbunden zu sein. Für *SMARCD3* ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei PC-3 um eine Androgen-unabhängige PCa Zelllinie handelt (192). In der Androgen-abhängigen PCa-Zelllinie LNCaP beeinflussen die Mitglieder der BAF60-Proteinfamilie (BAF60a-c) die Expression verschiedener Androgenrezeptor-Zielgene in unterschiedlichem Ausmaß (125). Folgend stellt sich die Frage, wie sich Expressionsverminderungen in *SMARCD3*/BAF60c auf den Phänotyp von Prostatakarzinomen und speziell ihre Androgenantwort auswirken. Diese Wechselwirkung ist insbesondere durch die nachgewiesene Korrelation einer verminderten Expression von *SMARCD3* mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs interessant.

Diskussion

Die DNA-Methylierungsanalyse der beiden *SMARCD3*-Promotoren in PCa-Zelllinien ergab dagegen keinen Hinweis auf Veränderungen. Wie die Beispiele *LXN*, *RARRES1* und *KL* mit vielen anderen belegen, sind PCa-spezifische Hypermethylierungen in aller Regel in solchen Zelllinien nachweisbar. Daher wurden Analysen an Geweben in der vorliegenden Arbeit hinten angestellt. Selbstverständlich schließen die durchgeführten Experimente eine Bedeutung der DNA-Methylierung bei der verminderten Expression von *SMARCD3* im PCa nicht aus. Beispielsweise könnte die DNA-Methylierung auch an Enhancersequenzen verändert sein oder, wie für den *IGF2/H19*-Locus beschrieben, die Interaktion von Enhancer und Promoter beeinflussen (193). Daneben könnten auch andere stabile epigenetische Mechanismen, wie verstärkte PRC2-abhängige H3K27me₃-Methylierung (189), eine Rolle spielen.

Es gibt jedoch einen interessanten Hinweis auf einen bestimmten Mechanismus, da *SMARCD3* ein Zielgen von p63 zu sein scheint (138). Dieser Transkriptionsfaktor ist ein Basalzellmarker und wird aus diesem Grund auch in der pathologischen Routinediagnostik verwendet (194-196). *TP63* gehört zu den am stärksten herunterregulierten Genen im PCa überhaupt. Die Herunterregulation von *SMARCD3* könnte daher eine Konsequenz des Verlustes von p63 darstellen.

Für *COQ7* konnte in der Klonogenitätsanalyse ebenfalls keine Veränderung nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Funktion von *COQ7* in der Biosynthese von Ubiquinon bzw. CoenzymQ erscheint das Ausbleiben einer direkten Antwort in Bezug auf die Zellviabilität nicht überraschend. Trotz des nur geringen Einflusses von *COQ7* in der durchgeführten Klonogenitätsanalyse erscheint seine Bedeutung auf die Zellviabilität in alternden Geweben wichtig. Diese Interaktion wird durch die Auswirkung auf die Lebensspanne von heterozygoten *mclk-1 (COQ7)* +/- Mäusen erkennbar (124, 126, 127). Interessant ist hierbei auch die Tendenz zur zunehmenden Homozygotie in der alternden Leber dieser Tiere. Trotz solcher klaren Assoziationen und der relativ gut charakterisierten enzymatischen Funktion von *COQ7* ist seine biologische Funktion in Alternsprozessen sowie der Tumorbilogie noch nicht befriedigend geklärt (128).

6. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008. **8. Ausgabe**
2. Baylin, S. B., and Jones, P. A. (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* **11**, 726-734
3. Meiers, I., Shanks, J. H., and Bostwick, D. G. (2007) Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology* **39**, 299-304
4. Shima, K., Noshio, K., Baba, Y., Cantor, M., Meyerhardt, J. A., et al. (2011) Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review. *Int J Cancer* **128**, 1080-1094
5. Jacinto, F. V., and Esteller, M. (2007) Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis* **22**, 247-253
6. Goering, W., Kloth, M., and Schulz, W. A. (2012) DNA methylation changes in prostate cancer. *Methods Mol Biol* **863**, 47-66
7. Jeronimo, C., Bastian, P. J., Bjartell, A., Carbone, G. M., Catto, J. W., et al. (2011) Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur Urol* **60**, 753-766
8. Schulz, W. A., Alexa, A., Jung, V., Hader, C., Hoffmann, M. J., et al. (2007) Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer* **6**, 14
9. Schroder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L., Ciatto, S., et al. (2009) Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* **360**, 1320-1328
10. Schroder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L., Ciatto, S., et al. (2012) Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* **366**, 981-990
11. Heijnsdijk, E. A., Wever, E. M., Auvinen, A., Hugosson, J., Ciatto, S., et al. (2012) Quality-of-life effects of prostate-specific antigen screening. *N Engl J Med* **367**, 595-605
12. Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., and Negri, E. (2013) European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol* **24**, 792-800
13. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**, 277-300
14. Humphrey, P. A. (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* **17**, 292-306
15. Bratt, O. (2002) Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* **168**, 906-913
16. Morton, R. A., Jr. (1994) Racial differences in adenocarcinoma of the prostate in North American men. *Urology* **44**, 637-645
17. Hebert, J. R., Hurley, T. G., Olendzki, B. C., Teas, J., Ma, Y., et al. (1998) Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1637-1647
18. Dennis, L. K., Lynch, C. F., and Torner, J. C. (2002) Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* **60**, 78-83
19. Kasper, J. S., and Giovannucci, E. (2006) A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 2056-2062
20. Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., et al. (2009) Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* **301**, 39-51

Literaturverzeichnis

21. Johns, L. E., and Houlston, R. S. (2003) A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* **91**, 789-794
22. Zeegers, M. P., Jellema, A., and Ostrer, H. (2003) Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer* **97**, 1894-1903
23. Jin, G., Lu, L., Cooney, K. A., Ray, A. M., Zuhlke, K. A., et al. (2012) Validation of prostate cancer risk-related loci identified from genome-wide association studies using family-based association analysis: evidence from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). *Hum Genet* **131**, 1095-1103
24. Ishak, M. B., and Giri, V. N. (2011) A systematic review of replication studies of prostate cancer susceptibility genetic variants in high-risk men originally identified from genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 1599-1610
25. Liu, H., Wang, B., and Han, C. (2011) Meta-analysis of genome-wide and replication association studies on prostate cancer. *Prostate* **71**, 209-224
26. Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., et al. (2010) Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* **18**, 11-22
27. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., et al. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947
28. Grasso, C. S., Wu, Y. M., Robinson, D. R., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., et al. (2012) The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239-243
29. Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A., and Akslen, L. A. (2003) Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 1474-1479
30. Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (2001) Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet* **27**, 222-224
31. Carver, B. S., Chapinski, C., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Chen, Y., et al. (2011) Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell* **19**, 575-586
32. Schiewer, M. J., Augello, M. A., and Knudsen, K. E. (2012) The AR dependent cell cycle: mechanisms and cancer relevance. *Mol Cell Endocrinol* **352**, 34-45
33. Kokontis, J. M., Hay, N., and Liao, S. (1998) Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* **12**, 941-953
34. Koochekpour, S. (2010) Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl* **12**, 639-657
35. Barbieri, C. E., Baca, S. C., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Blattner, M., et al. (2012) Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* **44**, 685-689
36. Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., et al. (2013) Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* **153**, 666-677
37. Clark, J. P., and Cooper, C. S. (2009) ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **6**, 429-439

38. Cai, C., Wang, H., Xu, Y., Chen, S., and Balk, S. P. (2009) Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* **69**, 6027-6032
39. Liu, W., Xie, C. C., Zhu, Y., Li, T., Sun, J., et al. (2008) Homozygous deletions and recurrent amplifications implicate new genes involved in prostate cancer. *Neoplasia* **10**, 897-907
40. Arbieva, Z. H., Banerjee, K., Kim, S. Y., Edassery, S. L., Maniatis, V. S., et al. (2000) High-resolution physical map and transcript identification of a prostate cancer deletion interval on 8p22. *Genome Res* **10**, 244-257
41. El Gammal, A. T., Bruchmann, M., Zustin, J., Isbarn, H., Hellwinkel, O. J., et al. (2010) Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 56-64
42. Anderson, P. D., McKissic, S. A., Logan, M., Roh, M., Franco, O. E., et al. (2012) Nkx3.1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* **122**, 1907-1919
43. Saramaki, O. R., Tammela, T. L., Martikainen, P. M., Vessella, R. L., and Visakorpi, T. (2006) The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 639-645
44. Schulz, W. A., and Hatina, J. (2006) Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* **10**, 100-125
45. Cooper, C. S., and Foster, C. S. (2009) Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer* **100**, 240-245
46. Coolen, M. W., Stirzaker, C., Song, J. Z., Statham, A. L., Kassir, Z., et al. (2010) Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol* **12**, 235-246
47. Clark, S. J. (2007) Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**, R88-95
48. Devaney, J., Stirzaker, C., Qu, W., Song, J. Z., Statham, A. L., et al. (2011) Epigenetic deregulation across chromosome 2q14.2 differentiates normal from prostate cancer and provides a regional panel of novel DNA methylation cancer biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 148-159
49. Florl, A. R., Steinhoff, C., Muller, M., Seifert, H. H., Hader, C., et al. (2004) Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* **91**, 985-994
50. Yegnasubramanian, S., Haffner, M. C., Zhang, Y., Gurel, B., Cornish, T. C., et al. (2008) DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res* **68**, 8954-8967
51. Lee, W. H., Morton, R. A., Epstein, J. I., Brooks, J. D., Campbell, P. A., et al. (1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11733-11737
52. Banez, L. L., Sun, L., van Leenders, G. J., Wheeler, T. M., Bangma, C. H., et al. (2010) Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. *J Urol* **184**, 149-156

53. Vinarskaja, A., Schulz, W. A., Ingenwerth, M., Hader, C., and Arsov, C. (2013) Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis. *Urol Oncol* **31**, 622-627
54. Yu, J., Mani, R. S., Cao, Q., Brenner, C. J., Cao, X., et al. (2010) An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* **17**, 443-454
55. Borno, S. T., Fischer, A., Kerick, M., Falth, M., Laible, M., et al. (2012) Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation. *Cancer Discov* **2**, 1024-1035
56. Schulz, W. A., Ingenwerth, M., Djuidje, C. E., Hader, C., Rahnenfuhrer, J., et al. (2010) Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation. *BMC Cancer* **10**, 505
57. Kunderfranco, P., Mello-Grand, M., Cangemi, R., Pellini, S., Mensah, A., et al. (2010) ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One* **5**, e10547
58. Weischenfeldt, J., Simon, R., Feuerbach, L., Schlangen, K., Weichenhan, D., et al. (2013) Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell* **23**, 159-170
59. Kwabi-Addo, B., Chung, W., Shen, L., Ittmann, M., Wheeler, T., et al. (2007) Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clin Cancer Res* **13**, 3796-3802
60. Toyota, M., and Issa, J. P. (1999) CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* **9**, 349-357
61. Zambrano, N. R., Lubensky, I. A., Merino, M. J., Linehan, W. M., and Walther, M. M. (1999) Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *J Urol* **162**, 1246-1258
62. Hunt, J. D., van der Hel, O. L., McMillan, G. P., Boffetta, P., and Brennan, P. (2005) Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* **114**, 101-108
63. Weikert, S., Boeing, H., Pischon, T., Weikert, C., Olsen, A., et al. (2008) Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* **167**, 438-446
64. Pischon, T., Lahmann, P. H., Boeing, H., Tjonneland, A., Halkjaer, J., et al. (2006) Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* **118**, 728-738
65. Bonsib, S. M. (2009) Renal cystic diseases and renal neoplasms: a mini-review. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 1998-2007
66. Dixon, B. P., Hulbert, J. C., and Bissler, J. J. (2011) Tuberous sclerosis complex renal disease. *Nephron Exp Nephrol* **118**, e15-20
67. Bader, H. L., and Hsu, T. (2012) Systemic VHL gene functions and the VHL disease. *FEBS Lett* **586**, 1562-1569
68. Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N. M. (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**, 437-443
69. Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A., and Simon, M. C. (2007) HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **11**, 335-347

70. Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C. K., et al. (2011) Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* **469**, 539-542
71. Dalglish, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., et al. (2010) Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* **463**, 360-363
72. Morris, M. R., and Maher, E. R. (2010) Epigenetics of renal cell carcinoma: the path towards new diagnostics and therapeutics. *Genome Med* **2**, 59
73. Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., et al. (2013) Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* **45**, 860-867
74. Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Uzzo, R. G., Al-Saleem, T., Greenberg, R. E., et al. (2004) Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 3972-3979
75. Sattler, H. P., Lensch, R., Rohde, V., Zimmer, E., Meese, E., et al. (2000) Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* **45**, 207-215
76. Topping, N., Borre, M., Sorensen, K. D., Andersen, C. L., Wiuf, C., et al. (2007) Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array. *Br J Cancer* **96**, 499-506
77. Jung, V., Kindich, R., Kamradt, J., Jung, M., Muller, M., et al. (2006) Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **4**, 169-176
78. Normant, E., Martres, M. P., Schwartz, J. C., and Gros, C. (1995) Purification, cDNA cloning, functional expression, and characterization of a 26-kDa endogenous mammalian carboxypeptidase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12225-12229
79. Pallares, I., Bonet, R., Garcia-Castellanos, R., Ventura, S., Aviles, F. X., et al. (2005) Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3978-3983
80. Hatanaka, Y., Uratani, Y., Takiguchi-Hayashi, K., Omori, A., Sato, K., et al. (1994) Intracortical regionality represented by specific transcription for a novel protein, latexin. *Eur J Neurosci* **6**, 973-982
81. Arimatsu, Y., Ishida, M., Takiguchi-Hayashi, K., and Uratani, Y. (1999) Cerebral cortical specification by early potential restriction of progenitor cells and later phenotype control of postmitotic neurons. *Development* **126**, 629-638
82. Liang, Y., Jansen, M., Aronow, B., Geiger, H., and Van Zant, G. (2007) The quantitative trait gene latexin influences the size of the hematopoietic stem cell population in mice. *Nat Genet* **39**, 178-188
83. Liang, Y., and Van Zant, G. (2008) Aging stem cells, latexin, and longevity. *Exp Cell Res* **314**, 1962-1972
84. Uratani, Y., Takiguchi-Hayashi, K., Miyasaka, N., Sato, M., Jin, M., et al. (2000) Latexin, a carboxypeptidase A inhibitor, is expressed in rat peritoneal mast cells and is associated with granular structures distinct from secretory granules and lysosomes. *Biochem J* **346 Pt 3**, 817-826
85. Kadouchi, I., Sakamoto, K., Tangjiao, L., Murakami, T., Kobayashi, E., et al. (2009) Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 600-604

Literaturverzeichnis

86. Anderton, J. A., Lindsey, J. C., Lusher, M. E., Gilbertson, R. J., Bailey, S., et al. (2008) Global analysis of the medulloblastoma epigenome identifies disease-subgroup-specific inactivation of COL1A2. *Neuro Oncol* **10**, 981-994
87. Muthusamy, V., Premi, S., Soper, C., Platt, J., and Bosenberg, M. (2013) The Hematopoietic Stem Cell Regulatory Gene Latexin Has Tumor-Suppressive Properties in Malignant Melanoma. *J Invest Dermatol*
88. Li, Y., Basang, Z., Ding, H., Lu, Z., Ning, T., et al. (2011) Latexin expression is downregulated in human gastric carcinomas and exhibits tumor suppressor potential. *BMC Cancer* **11**, 121
89. Aagaard, A., Listwan, P., Cowieson, N., Huber, T., Ravasi, T., et al. (2005) An inflammatory role for the mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: relationship to cystatins and the tumor suppressor TIG1. *Structure* **13**, 309-317
90. Nagpal, S., Patel, S., Asano, A. T., Johnson, A. T., Duvic, M., et al. (1996) Tazarotene-induced gene 1 (TIG1), a novel retinoic acid receptor-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol* **106**, 269-274
91. Sahab, Z. J., Hall, M. D., Me Sung, Y., Dakshanamurthy, S., Ji, Y., et al. (2011) Tumor suppressor RARRES1 interacts with cytoplasmic carboxypeptidase AGBL2 to regulate the alpha-tubulin tyrosination cycle. *Cancer Res* **71**, 1219-1228
92. Whipple, R. A., Matrone, M. A., Cho, E. H., Balzer, E. M., Vitolo, M. I., et al. (2010) Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res* **70**, 8127-8137
93. Jing, C., El-Ghany, M. A., Beesley, C., Foster, C. S., Rudland, P. S., et al. (2002) Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* **94**, 482-490
94. Tokumaru, Y., Sun, D. I., Nomoto, S., Yamashita, K., and Sidransky, D. (2003) Re: Is TIG1 a new tumor suppressor in prostate cancer? *J Natl Cancer Inst* **95**, 919-920
95. Tokumaru, Y., Harden, S. V., Sun, D. I., Yamashita, K., Epstein, J. I., et al. (2004) Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 5518-5522
96. Zhang, J., Liu, L., and Pfeifer, G. P. (2004) Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene. *Oncogene* **23**, 2241-2249
97. Rosenbaum, E., Hoque, M. O., Cohen, Y., Zahurak, M., Eisenberger, M. A., et al. (2005) Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* **11**, 8321-8325
98. Yoneda-Kato, N., Look, A. T., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Raimondi, S. C., et al. (1996) The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* **12**, 265-275
99. Arber, D. A., Chang, K. L., Lyda, M. H., Bedell, V., Spielberger, R., et al. (2003) Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Hum Pathol* **34**, 809-813
100. Matsumoto, N., Yoneda-Kato, N., Iguchi, T., Kishimoto, Y., Kyo, T., et al. (2000) Elevated MLF1 expression correlates with malignant progression from myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **14**, 1757-1765
101. Chen, J., Guo, L., Peiffer, D. A., Zhou, L., Chan, O. T., et al. (2008) Genomic profiling of 766 cancer-related genes in archived esophageal normal and carcinoma tissues. *Int J Cancer* **122**, 2249-2254

Literaturverzeichnis

102. Watanabe, Y., Kim, H. S., Castoro, R. J., Chung, W., Estecio, M. R., et al. (2009) Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology* **136**, 2149-2158
103. Yoneda-Kato, N., and Kato, J. Y. (2008) Shuttling imbalance of MLF1 results in p53 instability and increases susceptibility to oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* **28**, 422-434
104. Molzan, M., Weyand, M., Rose, R., and Ottmann, C. (2012) Structural insights of the MLF1/14-3-3 interaction. *FEBS J* **279**, 563-571
105. Winteringham, L. N., Kobelke, S., Williams, J. H., Ingley, E., and Klincken, S. P. (2004) Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* **23**, 5105-5109
106. Yoneda-Kato, N., Tomoda, K., Umehara, M., Arata, Y., and Kato, J. Y. (2005) Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *EMBO J* **24**, 1739-1749
107. Galmiche, L., Serre, V., Beinat, M., Zossou, R., Assouline, Z., et al. (2012) Toward genotype phenotype correlations in GFM1 mutations. *Mitochondrion* **12**, 242-247
108. Sreedharan, S., Stephansson, O., Schioth, H. B., and Fredriksson, R. (2011) Long evolutionary conservation and considerable tissue specificity of several atypical solute carrier transporters. *Gene* **478**, 11-18
109. Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., et al. (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45-51
110. Kuro-o, M. (2012) Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **21**, 362-368
111. Kurosu, H., Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Nandi, A., et al. (2005) Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309**, 1829-1833
112. Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-lida, T., Nagai, R., Kuro-o, M., et al. (1998) Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 626-630
113. Chen, C. D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S. E., and Abraham, C. R. (2007) Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19796-19801
114. Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., et al. (2006) Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* **281**, 6120-6123
115. Utsugi, T., Ohno, T., Ohyama, Y., Uchiyama, T., Saito, Y., et al. (2000) Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism* **49**, 1118-1123
116. Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A., and Ruvkun, G. (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 536-539
117. Murphy, C. T. (2006) The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp Gerontol* **41**, 910-921
118. Liu, H., Fergusson, M. M., Castilho, R. M., Liu, J., Cao, L., et al. (2007) Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* **317**, 803-806
119. Rubinek, T., Shulman, M., Israeli, S., Bose, S., Avraham, A., et al. (2012) Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 649-657

Literaturverzeichnis

120. Wolf, I., Levanon-Cohen, S., Bose, S., Ligumsky, H., Sredni, B., et al. (2008) Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* **27**, 7094-7105
121. Wang, L., Wang, X., Jie, P., Lu, H., Zhang, S., et al. (2011) Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res* **1**, 111-119
122. Pan, J., Zhong, J., Gan, L. H., Chen, S. J., Jin, H. C., et al. (2011) Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol* **32**, 729-735
123. Lee, J., Jeong, D. J., Kim, J., Lee, S., Park, J. H., et al. (2010) The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* **9**, 109
124. Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E., et al. (2005) Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev* **19**, 2424-2434
125. Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* **1660**, 171-199
126. Stepanyan, Z., Hughes, B., Cliche, D. O., Camp, D., and Hekimi, S. (2006) Genetic and molecular characterization of CLK-1/mCLK1, a conserved determinant of the rate of aging. *Exp Gerontol* **41**, 940-951
127. Lapointe, J., and Hekimi, S. (2008) Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mclk1+/- mice. *J Biol Chem* **283**, 26217-26227
128. Lapointe, J., and Hekimi, S. (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1-8
129. Lickert, H., Takeuchi, J. K., Von Both, I., Walls, J. R., McAuliffe, F., et al. (2004) Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* **432**, 107-112
130. Takeuchi, J. K., and Bruneau, B. G. (2009) Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* **459**, 708-711
131. Hargreaves, D. C., and Crabtree, G. R. (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* **21**, 396-420
132. de la Serna, I. L., Ohkawa, Y., and Imbalzano, A. N. (2006) Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat Rev Genet* **7**, 461-473
133. Wilson, B. G., and Roberts, C. W. (2011) SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 481-492
134. Shain, A. H., and Pollack, J. R. (2013) The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS One* **8**, e55119
135. Debril, M. B., Gelman, L., Fayard, E., Annicotte, J. S., Rocchi, S., et al. (2004) Transcription factors and nuclear receptors interact with the SWI/SNF complex through the BAF60c subunit. *J Biol Chem* **279**, 16677-16686
136. Flajollet, S., Lefebvre, B., Cudejko, C., Staels, B., and Lefebvre, P. (2007) The core component of the mammalian SWI/SNF complex SMARCD3/BAF60c is a coactivator for the nuclear retinoic acid receptor. *Mol Cell Endocrinol* **270**, 23-32
137. van de Wijngaart, D. J., Dubbink, H. J., Molier, M., de Vos, C., Trapman, J., et al. (2009) Functional screening of FxxLF-like peptide motifs identifies SMARCD1/BAF60a as an androgen receptor cofactor that modulates TMPRSS2 expression. *Mol Endocrinol* **23**, 1776-1786

Literaturverzeichnis

138. Osada, M., Park, H. L., Nagakawa, Y., Yamashita, K., Fomenkov, A., et al. (2005) Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Mol Cell Biol* **25**, 6077-6089
139. Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., et al. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **43**, 1809-1818
140. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., and Jones, L. W. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **17**, 16-23
141. Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H., and Paulson, D. F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* **21**, 274-281
142. Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., 2nd, Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., et al. (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 403-409
143. Navone, N. M., Olive, M., Ozen, M., Davis, R., Troncoso, P., et al. (1997) Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. *Clin Cancer Res* **3**, 2493-2500
144. Sobel, R. E., Wang, Y., and Sadar, M. D. (2006) Molecular analysis and characterization of PrEC, commercially available prostate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **42**, 33-39
145. Youssef, E. M., Chen, X. Q., Higuchi, E., Kondo, Y., Garcia-Manero, G., et al. (2004) Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. *Cancer Res* **64**, 2411-2417
146. Turker, M. S. (2002) Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* **21**, 5388-5393
147. Cottrell, S., Jung, K., Kristiansen, G., Eltze, E., Semjonow, A., et al. (2007) Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. *J Urol* **177**, 1753-1758
148. Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., et al. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-8686
149. Cho, N. Y., Kim, B. H., Choi, M., Yoo, E. J., Moon, K. C., et al. (2007) Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol* **211**, 269-277
150. Ellinger, J., Bastian, P. J., Jurgan, T., Biermann, K., Kahl, P., et al. (2008) CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* **71**, 161-167
151. Boorjian, S. A., Thompson, R. H., Tollefson, M. K., Rangel, L. J., Bergstralh, E. J., et al. (2011) Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *Eur Urol* **59**, 893-899
152. MacCallum, R. C., Zhang, S., Preacher, K. J., and Rucker, D. D. (2002) On the practice of dichotomization of quantitative variables. *Psychol Methods* **7**, 19-40
153. Kattan, M. W., Eastham, J. A., Stapleton, A. M., Wheeler, T. M., and Scardino, P. T. (1998) A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **90**, 766-771
154. Bradley, P. S., Mangasarian, O. L., and Street, W. N., eds (1997) *Clustering via Concave Minimization* Vol. 9, MIT Press

Literaturverzeichnis

155. Thompson, I., Thrasher, J. B., Aus, G., Burnett, A. L., Canby-Hagino, E. D., et al. (2007) Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J Urol* **177**, 2106-2131
156. Kattan, M. W. (2004) Evaluating a new marker's predictive contribution. *Clin Cancer Res* **10**, 822-824
157. Kattan, M. W. (2010) Evaluating a marker's contribution to a nomogram: the GEMCaP example. *Clin Cancer Res* **16**, 1-3
158. Kattan, M. W., Zelefsky, M. J., Kupelian, P. A., Scardino, P. T., Fuks, Z., et al. (2000) Pretreatment nomogram for predicting the outcome of three-dimensional conformal radiotherapy in prostate cancer. *J Clin Oncol* **18**, 3352-3359
159. Kattan, M. W., Potters, L., Blasko, J. C., Beyer, D. C., Fearn, P., et al. (2001) Pretreatment nomogram for predicting freedom from recurrence after permanent prostate brachytherapy in prostate cancer. *Urology* **58**, 393-399
160. Ogino, S., Hazra, A., Tranah, G. J., Kirkner, G. J., Kawasaki, T., et al. (2007) MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **28**, 1985-1990
161. Hawkins, N. J., Lee, J. H., Wong, J. J., Kwok, C. T., Ward, R. L., et al. (2009) MGMT methylation is associated primarily with the germline C>T SNP (rs16906252) in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Mod Pathol* **22**, 1588-1599
162. Chen, H., Taylor, N. P., Sotamaa, K. M., Mutch, D. G., Powell, M. A., et al. (2007) Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1. *Int J Cancer* **120**, 1684-1688
163. Neph, S., Vierstra, J., Stergachis, A. B., Reynolds, A. P., Haugen, E., et al. (2012) An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. *Nature* **489**, 83-90
164. Reik, W., and Lewis, A. (2005) Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* **6**, 403-410
165. Xie, W., Barr, C. L., Kim, A., Yue, F., Lee, A. Y., et al. (2012) Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell* **148**, 816-831
166. Bensen, J. T., Xu, Z., Smith, G. J., Mohler, J. L., Fontham, E. T., et al. (2013) Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: a case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate* **73**, 11-22
167. Gallagher, D. J., Vijai, J., Cronin, A. M., Bhatia, J., Vickers, A. J., et al. (2010) Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality. *Clin Cancer Res* **16**, 2819-2832
168. FitzGerald, L. M., Kwon, E. M., Conomos, M. P., Kolb, S., Holt, S. K., et al. (2011) Genome-wide association study identifies a genetic variant associated with risk for more aggressive prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 1196-1203
169. Nam, R. K., Zhang, W., Siminovitch, K., Shlien, A., Kattan, M. W., et al. (2011) New variants at 10q26 and 15q21 are associated with aggressive prostate cancer in a genome-wide association study from a prostate biopsy screening cohort. *Cancer Biol Ther* **12**, 997-1004
170. Thomas-Chollier, M., Hufton, A., Heinig, M., O'Keefe, S., Masri, N. E., et al. (2011) Transcription factor binding predictions using TRAP for the analysis of ChIP-seq data and regulatory SNPs. *Nat Protoc* **6**, 1860-1869

Literaturverzeichnis

171. Leng, S., Bernauer, A. M., Hong, C., Do, K. C., Yingling, C. M., et al. (2011) The A/G allele of rs16906252 predicts for MGMT methylation and is selectively silenced in premalignant lesions from smokers and in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **17**, 2014-2023
172. Gebhard, C., Benner, C., Ehrich, M., Schwarzfischer, L., Schilling, E., et al. (2010) General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer Res* **70**, 1398-1407
173. Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., et al. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74
174. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., et al. (1994) Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**, 435-438
175. Mummaneni, P., Yates, P., Simpson, J., Rose, J., and Turker, M. S. (1998) The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse aprt gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic Acids Res* **26**, 5163-5169
176. Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., et al. (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* **39**, 232-236
177. Tycko, B. (2010) Allele-specific DNA methylation: beyond imprinting. *Hum Mol Genet* **19**, R210-220
178. Jelinic, P., and Shaw, P. (2007) Loss of imprinting and cancer. *J Pathol* **211**, 261-268
179. Kayashima, T., Yamasaki, K., Yamada, T., Sakai, H., Miwa, N., et al. (2003) The novel imprinted carboxypeptidase A4 gene (CPA4) in the 7q32 imprinting domain. *Hum Genet* **112**, 220-226
180. Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M., et al. (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**, 486-489
181. Wallace, J. A., and Felsenfeld, G. (2007) We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 400-407
182. Aran, D., Sabato, S., and Hellman, A. (2013) DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol* **14**, R21
183. Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286-298
184. Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12-27
185. Kurukuti, S., Tiwari, V. K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., et al. (2006) CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10684-10689
186. Lapidot, M., and Pilpel, Y. (2006) Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Rep* **7**, 1216-1222
187. Oldridge, E. E., Walker, H. F., Stower, M. J., Simms, M. S., Mann, V. M., et al. (2013) Retinoic acid represses invasion and stem cell phenotype by induction of the metastasis suppressors RARRES1 and LXN. *Oncogenesis* **2**, e45
188. Vinarskaja, A., Goering, W., Ingenwerth, M., and Schulz, W. A. (2012) ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate cancer. *World J Urol* **30**, 319-325

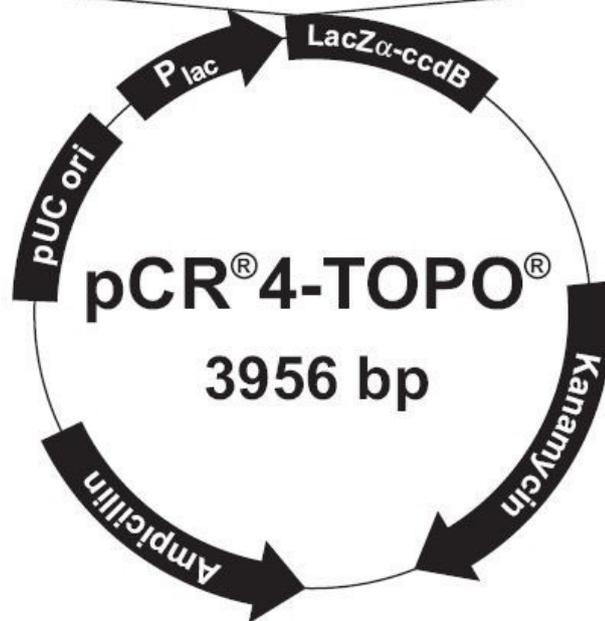
Literaturverzeichnis

189. Gal-Yam, E. N., Egger, G., Iniguez, L., Holster, H., Einarsson, S., et al. (2008) Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12979-12984
190. Xie, B., Zhou, J., Yuan, L., Ren, F., Liu, D. C., et al. (2013) Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* **44**, 795-801
191. Sun, D., Lee, Y. S., Malhotra, A., Kim, H. K., Matecic, M., et al. (2011) miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* **71**, 1313-1324
192. van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Johannes, W. U., Smith, E. E., et al. (2003) Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**, 205-225
193. Kaffer, C. R., Srivastava, M., Park, K. Y., Ives, E., Hsieh, S., et al. (2000) A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 locus. *Genes Dev* **14**, 1908-1919
194. Weinstein, M. H., Signoretti, S., and Loda, M. (2002) Diagnostic utility of immunohistochemical staining for p63, a sensitive marker of prostatic basal cells. *Mod Pathol* **15**, 1302-1308
195. Di Como, C. J., Urist, M. J., Babayan, I., Drobnjak, M., Hedvat, C. V., et al. (2002) p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* **8**, 494-501
196. Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., et al. (2000) p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* **157**, 1769-1775

7. Appendix

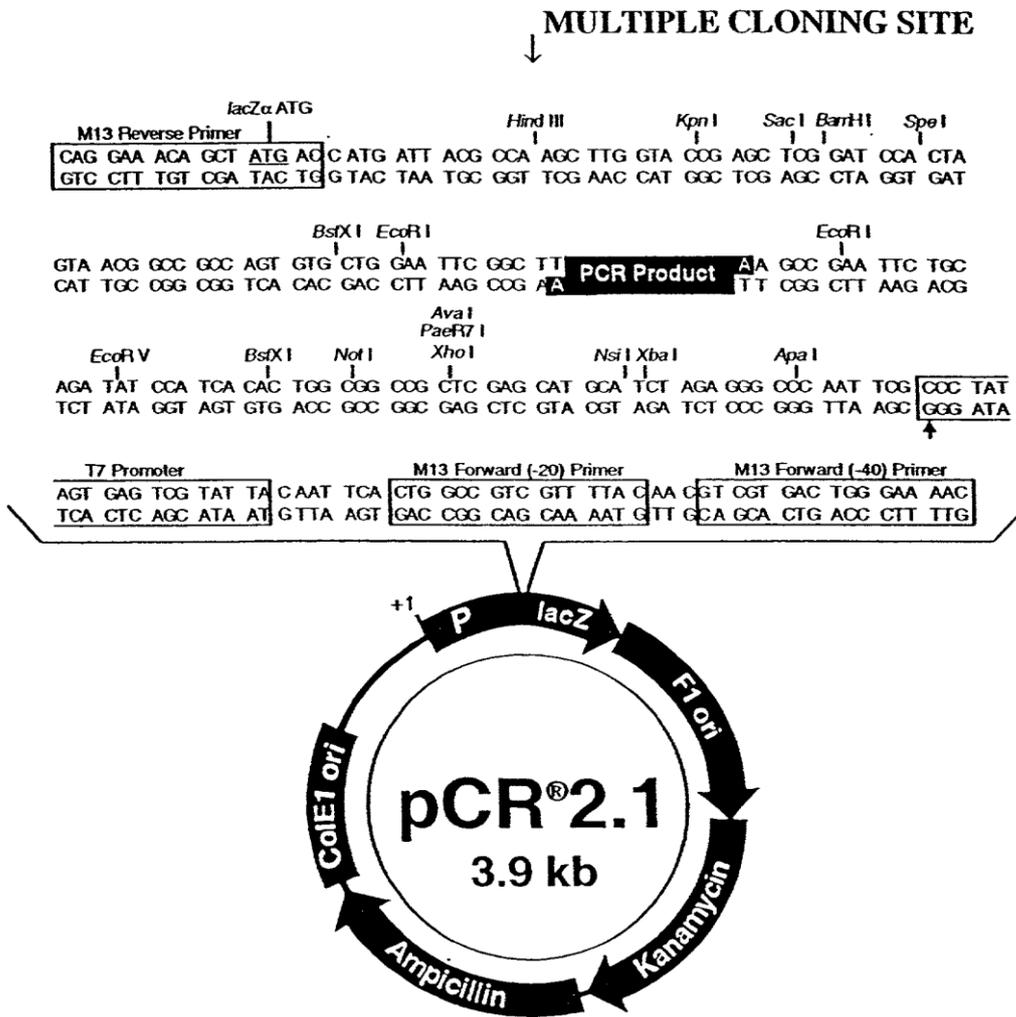
Appendix I Vektorkarte pCR-4-TOPO

		LacZ α initiation codon				T3 priming site	
	M13 Reverse priming site						
201	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTCA	GAATTAACCC	TCACTAAAGG	
	GTGTGTCCTT	TGTCGATACT	GGTACTAATG	CGGTTTCGAGT	CTTAATTGGG	AGTGATTTC	
	Spe I	Pst I	Pme I	EcoR I		EcoR I	Not I
261	GACTAGTCCT	GCAGGTTTAA	ACGAATTTCG	CCTT	PCR Product	AAGGGC	GAATTCGCGG
	CTGATCAGGA	CGTCCAAATT	TGCTTAAGCG	GGA	A	TTCCCG	CTTAAGCGCC
			T7 priming site			M13 Forward (-20) priming site	
311	CCGCTAAATT	CAATTCGCC	TATAGTGAGT	CGTATTACAA	TTCACTGGCC	GTCGTTTTAC	
	GGCGATTTAA	GTTAAGCGGG	ATATCACTCA	GCATAATGTT	AAGTGACCGG	CAGCAAAATG	

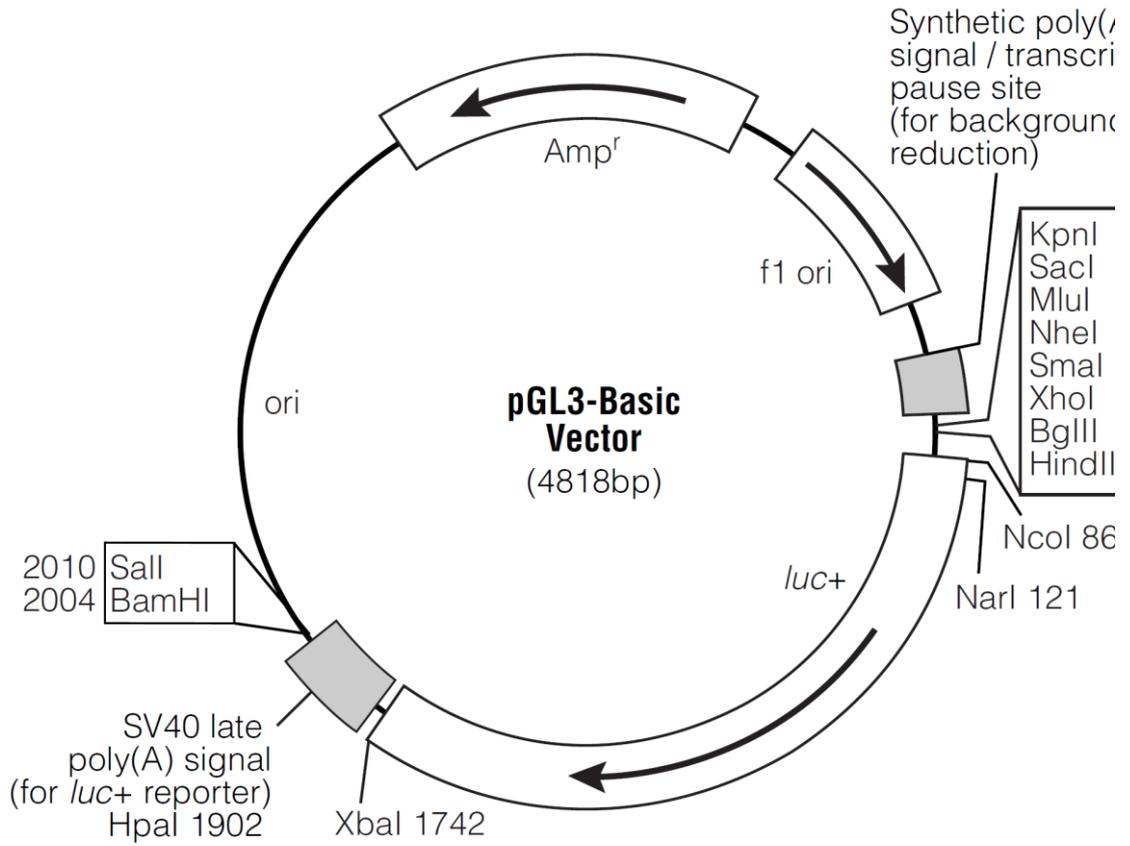


Appendix

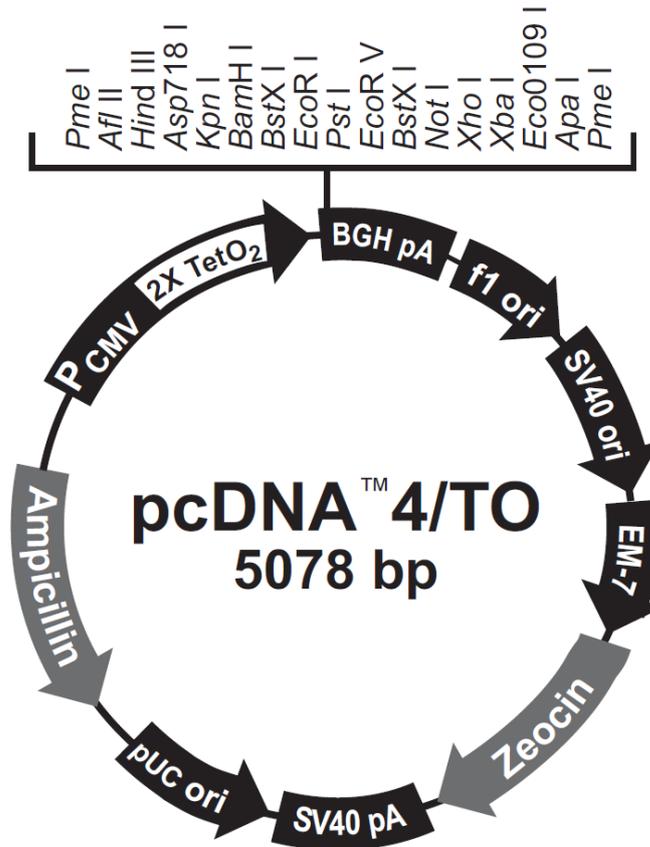
Appendix II Vektorkarte pCR2.1



Appendix III Vektorkarte pGL3basic



Appendix V Vektorkarte pcDNA4/TO



**Comments for pcDNA™ 4/TO
5078 nucleotides**

- CMV promoter: bases 232-958
- TATA box: bases 804-810
- Tetracycline operator (2X TetO₂) sequences: bases 820-859
- CMV forward priming site: bases 769-789
- Multiple cloning site: bases 967-1077
- BGH reverse priming site: bases 1089-1106
- BGH polyadenylation sequence: bases 1095-1319
- f1 origin: bases 1365-1793
- SV40 promoter and origin: bases 1803-2143
- EM-7 promoter: bases 2183-2249
- Zeocin™ resistance gene: bases 2250-2624
- SV40 early polyadenylation sequence: bases 2754-2884
- pUC origin: bases 3267-3937
- b/a* promoter: bases 4937-5041 (complementary strand)
- Ampicillin (*b/a*) resistance gene: bases 4082-4942 (complementary strand)

Continued on next page

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

08.12.2013, Michael Kloth

Unterschrift

Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Wolfgang Arthur Schulz, der es nicht nur geschafft hat seine persönliche Freude an der Thematik weiterzugeben, sondern auch diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich ganz herzlich allen aktuellen aber auch ehemaligen Mitarbeitern des Labors danken, insbesondere Dr. Wolfgang Goering, Dr. Teodora Ribarska, Dr. Michelle Hoffmann, Dr. Christian Arsov, Christiane Hader und Stefan Bleckmannn.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen ohne Wenn und Aber unterstützt und mir niemals das Gefühl, eine Last zu sein, gegeben hat.

Ohne Freunde ist das Leben nur halb so schön, daher vielen Dank an alle die mich im Zeitraum der Anfertigung der Doktorarbeit ertragen mussten und Teile der Arbeit auch zur Korrektur gelesen haben.