

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

# **Epigenetische Regulation Stammzell-erhaltender Gene im Prostatakarzinom**

**Inaugural-Dissertation**

zur

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

vorgelegt von

**Michèle Janine Hoffmann**

aus Schwelm

Düsseldorf  
Juni 2006

Aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik  
des Universitätsklinikums Düsseldorf  
an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. W.A. Schulz

Koreferent: Prof. Dr. D. Riesner

Koreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2006

***Faith in Fact***

*I should have more faith.  
I ought to know by this time  
that when a fact appears to be opposed  
to a long train of deduction,  
it invariably proves to be capable  
of bearing some other interpretation.*

*Sherlock Holmes*

***meinen Eltern***

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Epigenetische Mechanismen und beteiligte Faktoren	1
1.1.1	Veränderungen der DNA-Methylierung	1
1.1.2	Chromatinremodellierung	5
1.1.3	Zusammenhänge zwischen Histonmodifikationen und Chromatinstatus	6
1.1.4	Polycomb Proteine als epigenetische Regulatoren	9
1.1.5	Die Chromatinfaktoren CTCF und CTCFL	12
1.2	Das Prostatakarzinom	15
1.3	Stammzellen, Krebs und Tumorstammzellen	20
1.4	Ziel der Arbeit	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
2.1	Humane Zelllinien	30
2.1.1	Prostatakarzinom-Zelllinien	30
2.1.2	Teratokarzinom-Zelllinien	30
2.1.3	Harnblasenkarzinom-Zelllinien	30
2.2	Gewebeproben	31
2.3	Vektoren und Konstrukte	33
2.4	Bakterienstämme	33
2.5	Chemikalien	34
2.6	Enzyme	35
2.7	Antikörper	36
2.8	Molekularbiologische Kits	36
2.9	Medien, Puffer und Lösungen	37
2.9.1	Bakterienmedien, autoklaviert	37
2.9.2	Standardlösungen	37
2.9.3	Lösungen Western-Blot-Analyse	38
2.9.4	Lösungen Immuncytochemie	40
2.9.5	Spezielle Materialien und Geräte	40
2.10	Software	41
2.10.1	Programme	41
2.10.2	Datenbanken	41
2.11	Oligonukleotidprimer	41
2.12	Umgang mit Bakterienzellen	44
2.12.1	Kultur von <i>E.coli</i> -Zellen	44
2.12.2	Plasmidpräparationen	44
2.13	Klonierung	45
2.13.1	Verdau von DNA durch Restriktionsendonucleasen	45
2.13.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
2.13.3	Auffüllreaktion	45
2.13.4	Ligation	46
2.13.5	Transformation von ultrakompetenten Zellen	46
2.13.6	Blau-Weiss-Selektion	46
2.13.7	Klonierung von PCR-Produkten	47
2.14	Kultivierung humaner Zellen	47
2.14.1	Kultivierung von Prostatakarzinom-Zellen	47
2.14.2	Kultivierung von Teratokarzinom-Zellen	48
2.14.3	Kultivierung von Urothelkarzinom-Zellen	48
2.14.4	Primärzellkultur	48
2.14.5	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren	49
2.15	Analytische und funktionelle Tests an humanen Zellen	49

2.15.1	MTT-Test	49
2.15.2	Cell Titer Glo®-Test	50
2.15.3	BrdU-Inkorporationstest	50
2.15.4	Giemsa-Färbung	51
2.15.5	DNA-Transfektion	51
2.15.6	Dual-Luciferase® Reporter Test-System	52
2.15.7	siRNA-Transfektion	53
2.16	Präparation von Nukleinsäuren aus humanen Zellen	54
2.16.1	DNA-Präparation aus Zelllinien	54
2.16.2	DNA Präparation aus Spermien	55
2.16.3	RNA-Präparation aus Zelllinien	55
2.16.4	RNA-Präparation aus Spermien	55
2.17	Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren	56
2.18	RT-PCR	56
2.18.1	Reverse Transkription	56
2.18.2	Qualitative PCR	57
2.18.3	Quantitative PCR	58
2.19	DNA-Analyse mittels Bisulfit	62
2.19.1	Bisulfitumwandlung	62
2.19.2	Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)	62
2.19.3	Sequenzierung	63
2.19.4	<i>In vitro</i> Methylierung	64
2.20	Western-Blot-Analyse	65
2.20.1	Präparation von Proteinlysaten	65
2.20.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	66
2.20.3	Protein Blot	67
2.20.4	Immundetektion	67
2.20.5	Stripping	67
2.21	Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression in Geweben	68
2.22	Immunocytochemische Analyse von Proteinexpressionen	68
2.23	FACS-Analysen zur Identifizierung von Tumorzellen mit Stammzell-Phänotyp	69
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>72</b>
3.1	Expressionsanalyse der Kandidatengene	72
3.1.1	Die Polycomb-Gene <i>EZH2</i> und <i>BMI-1</i>	72
3.1.2	Die Histondeacetylase SIRT1	77
3.1.3	Die de novo DNA-Methyltransferase DNMT3B	78
3.1.4	Das Pluripotenzgen <i>OCT4</i>	79
3.1.5	Die Chromatinfaktoren <i>CTCF</i> und <i>CTCF</i>	81
3.1.6	Statistische Zusammenhänge zwischen Expression und klinischen Parametern	90
3.1.7	Einfluss von DNA-Methylierung und Histondeacetylierung auf die Kandidatengene	93
3.2	Einfluss der DNA-Methylierung auf die Promotoren von <i>OCT4</i> und <i>CTCF</i>	96
3.2.1	Promotorhypermethylierung	96
3.2.2	Aktivität und Methylierungssensitivität des <i>CTCF</i> -Promotors	99
3.2.3	Korrelationen zwischen Methylierungsveränderungen und Gen-Expressionsdaten	102
3.3	Funktionelle Analyse des <i>CTCF</i> -Gens	105
3.3.1	siRNA-Analyse	105
3.3.2	Transfektionsexperimente mit einem <i>CTCF</i> -Expressionskonstrukt	106

---

3.3.3	Untersuchungen zur Kolo-kalisation von CTCFL, CTCF und der RNA-Polymerase II	108
3.4	Anreicherung von Prostatakarzinom-Zellen mit Stammzell-Phänotyp	116
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>120</b>
4.1	Analyse der Expression von Kandidatenfaktoren in Gewebeproben	121
4.2	Methylierungsanalyse der Gene <i>OCT4</i> und <i>CTCFL</i>	138
4.3	Funktionelle Untersuchung des <i>CTCFL</i> -Gens	145
4.4	Tumorstammzellen im Prostatakarzinom	149
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>156</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>158</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>159</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>173</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>175</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Epigenetische Mechanismen und beteiligte Faktoren

Unter Epigenetik versteht man vererbare Modifikationen, die zu veränderten Genexpressionen führen, ohne die primäre Basensequenz der DNA zu verändern [Paulsen und Ferguson-Smith, 2001]. Epigenetische Mechanismen sind entscheidend für die Kontrolle von Entwicklungsabläufen während der Embryonalentwicklung und der Gametogenese, für die gewebespezifische Genexpression und die generelle Abschaltung von Genen. Störungen können zu Fehlregulationen in Entwicklungsprozessen wie der Inaktivierung des X-Chromosoms, der *Imprinting*-Muster und zu verschiedenen Anomalien führen [Li, 2002].

Drei verschiedene Mechanismen sind allgemein als epigenetisch akzeptiert: die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und die RNA-assoziierte Stilllegung von Genen [Jones, 2005]. Die ersten beiden sind Grundlage dieser Arbeit.

Epigenetische Markierungen durch kovalente Modifikationen von DNA und Histonen tragen zur Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem Chromatin bei und sind als solche vererbbar. Histonmodifikationen stellen universelle regulatorische Mechanismen unter Eukaryoten dar, während DNA-Methylierung eher bei höheren eukaryotischen Organismen mit komplexeren Genomen von Bedeutung ist [Li, 2002].

Auch bei der Tumorentstehung sind epigenetische Veränderungen mittlerweile als fundamentale Mechanismen etabliert.

#### 1.1.1 Veränderungen der DNA-Methylierung

DNA-Methylierung findet man bei Mammaliern vornehmlich als Methylierung von Cytosinresten in CpG-Dinukleotiden. Die kovalente, postreplikative Anheftung eines Methylrestes wird von zwei unterschiedlichen Klassen von DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert, DNMT1 und DNMT3A bzw. DNMT3B. Die Methyltransferase DNMT1 dient durch ihre erhöhte Spezifität für hemimethylierte DNA-Abschnitte zur Erhaltung der Methylierung während der Replikation [Pradhan et al., 1999]. DNMT3A und DNMT3B werden aufgrund ihrer erhöhten Aktivität gegenüber nichtmethylierter DNA als *de-novo*-Methylasen betrachtet [Bestor, 2000; Okano et al., 1998]. Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass auch die DNMT1 als *de-novo*-Methylase physiologisch von Bedeutung ist [Goll und Bestor 2005].

Das 5-Methylcytosin in CpG-Dinukleotiden ist hauptsächlich auf repetitive Sequenzen wie LINE und SINE-Retrotransposon-Elemente, sowie auf CpG-reiche Satelliten verteilt, die etwa

die Hälfte des Genoms ausmachen. Nur einen kleinen Anteil von ca. 5% der DNA steuern die Einzelkopiegene bei. In regulatorischen Bereichen von etwa der Hälfte aller Gene sind oft Cluster von CpG-Dinukleotiden als sog. CpG-Inseln zu finden. Diese bleiben meist, auch im Laufe von Methylierungsveränderungen, unmethyliert [Razin, 1998].

Innerhalb eines humanen Lebenszyklus gibt es zwei Phasen mit starken Methylierungsveränderungen - während der Gametogenese und während der frühen Embryonalentwicklung. Bekanntermaßen sind sowohl das paternale als auch das maternale Genom notwendig für die Embryonalentwicklung, wobei diese funktionellen Unterschiede auf differentieller Expression der parentalen Allele beruhen, dem sog. *Imprinting*. Die differentielle Expression wird wesentlich durch unterschiedliche Methylierung der elterlichen Allele bewirkt. Das *Imprinting*-Muster der Gameten wird während der Embryonalentwicklung in somatischen Zellen aufrechterhalten. Im Verlauf der Gametogenese wird das *Imprinting* jedoch in den Primordialen Keimzellen (PGC) gelöscht und während der Reifung der Gameten neu gesetzt (vgl. Abb. 1.1) [Allegrucci et al., 2005; Reik und Walter, 2001; Li, 2002].

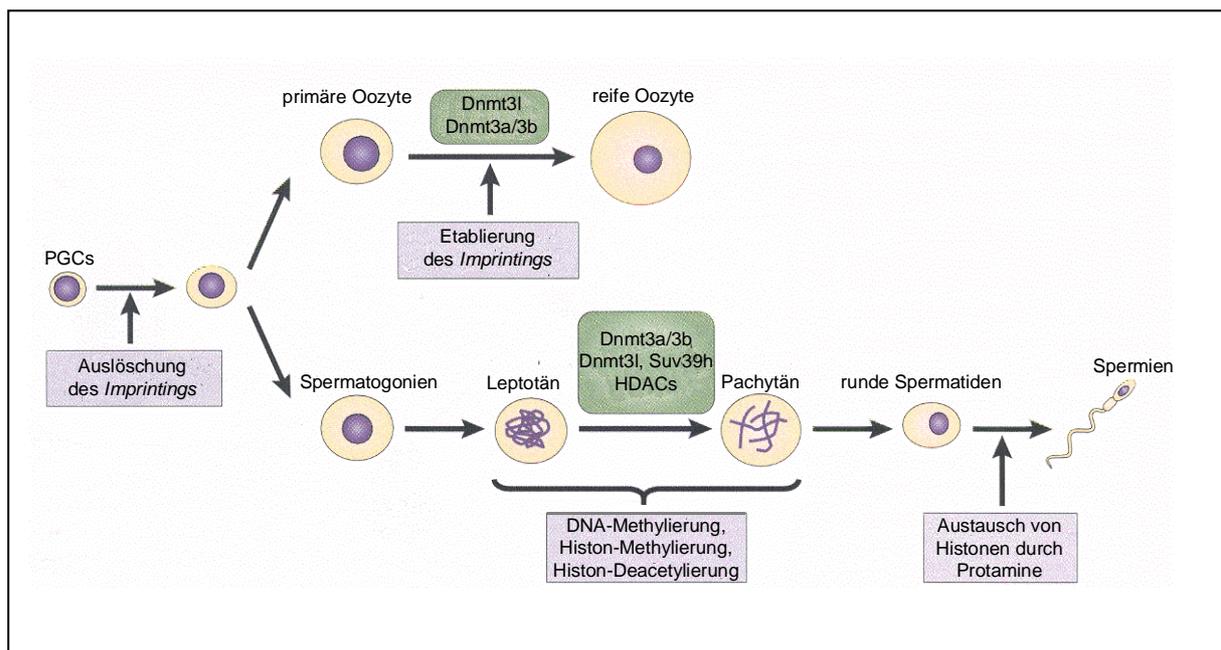


Abb. 1.1 : Epigenetische Reprogrammierung der Methylierungsmarken während der Gametogenese [modifiziert aus Li, 2002]. PGC: Primordiale Keimzellen; HDAC: Histondeacetylase (vgl. 1.1.3).

Starke DNA-Methylierungsveränderungen finden außerdem während der frühen Embryonalentwicklung statt. Nach der Ausbildung der Zygote werden sowohl die paternalen als auch die maternalen Chromosomen einer erheblichen Demethylierung unterworfen, die bis zum Blastocystenstadium dafür sorgt, dass die meisten Methylierungsmarken, die dem Muster der Gameten entsprechen, ausgelöscht werden (vgl. Abb. 1.2, schwarze Linie). Nur die

Methylierung von Genen, die durch *Imprinting* reguliert werden, bleibt erhalten (gestrichelte rote Linie). Nach der Implantation wird in einer Welle von *de-novo*-Methylierungen das Methylierungsmuster neu gesetzt (grüne Linie). Entsprechend ist das Expressionsniveau der DNMT3A und DNMT3B in diesem Stadium der frühen Embryonalentwicklung besonders hoch [Craig, 2005].

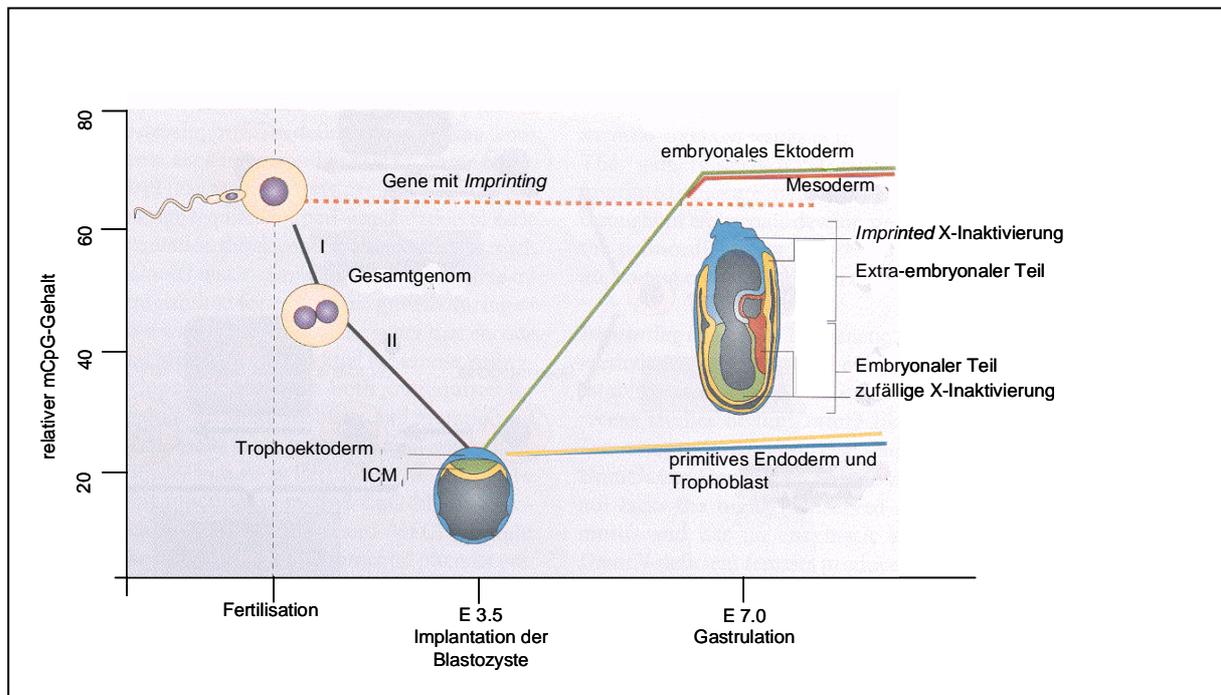


Abb. 1.2: Reprogrammierung der DNA-Methylierung während der Embryonalentwicklung der Maus [modifiziert aus Li 2002]. Der relative Gehalt methylierter CpG-Stellen (y-Achse) ist gegen den zeitlichen Verlauf der Embryonalentwicklung (x-Achse) aufgetragen.

Welche Rolle diese De- und anschließende Remethylierung für die frühe Entwicklung spielen, ist nicht vollkommen geklärt. Man nimmt an, dass die Demethylierung zu einer Dekondensation des Chromatins führt und somit eine transkriptionelle Aktivierung von zygotischen Genen, die in der frühen Embryonalentwicklung entscheidend sind, ermöglicht wird. Darüber hinaus könnte es nachfolgende genomische Reprogrammierungen durch Histonmodifikationen und Chromatin-Remodellierung erleichtern und die *de-novo*-Methylierung die Repression von Retrotransposons sichern [Kimmins und Sassone-Corsi, 2005; Craig, 2005]. Entsprechend werden während der Embryonalentwicklung, insbesondere um den Zeitpunkt der Implantation bis zur Gastrulation, viele regulatorische Chromatin-Faktoren gebraucht, wie z.B. Chromatin-remodellierende Proteine, Transkriptionsfaktoren und DNA- bzw. Histon-modifizierende Enzyme wie DNA- und Histon-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen.

Starke Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster treten außerdem pathologisch in Krebszellen auf. Hier gibt es zwei Arten von Veränderungen, die DNA-Hypermethylierung

und die DNA-Hypomethylierung.\* Ausführlich untersucht ist das Phänomen der DNA-Hypermethylierung. Diese führt zu einer Hypermethylierung von CpG-reichen Promotorregionen, die normalerweise von der Methylierung verschont bleiben. Entsprechend folgt eine Repression der Genaktivitäten. Bekannte Beispiele sind die Promotorhypermethylierung von *p16 (CDKN2A)*, *GST-P1*, *RARB2*, und *RASSF1A* [Myohanen et al., 1998; Lee et al., 1994; Esteller, 2002; Grote et al., 2005; Dammann et al., 2005]. DNA-Methylierung kann die Genaktivität durch verschiedene Mechanismen blockieren. Sie kann zu einer direkten Blockade der Bindung von Transkriptionsfaktoren führen, oder über eine Bindung von Methylgruppen-bindenden Proteinen (MeCPs, *Methyl CpG binding proteins*) wirken. Diese Proteine beinhalten eine spezielle Domäne (MBD, *methyl CpG binding domain*), mit der sie an methylierte CpG-Stellen binden können. Diese rekrutieren weitere Korepressoren, Histon-Deacetylasen und ATP-abhängige Chromatinremodellierungs-Komplexe (vgl. 1.1.2, 1.1.3), die einen repressiven Chromatinstatus herbeiführen und so zur Inaktivierung der betroffenen Gene beitragen [Craig, 2005].

Experimentell und therapeutisch können DNA-Methylierungen durch den DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-aza-2'-Desoxycytidin (5-aza-dC) beeinflusst werden. 5-aza-dC ist ein Pyrimidin-Analog, welches in die genomische DNA inkorporiert wird. Dort bildet es durch kovalente Bindung einen Komplex mit der DNMT1, die für die Aufrechterhaltung der Methylierung während der Replikation zuständig ist. Durch ihre kovalente Bindung an 5-aza-dC wird sie jedoch inaktiviert, so dass im Laufe der Zellteilungen die Methylierung verloren geht und betroffene Gene zur Reexpression gelangen können [Karpf und Jones, 2002; Strathdee und Brown, 2002]. Unter dem Handelsnamen Decitabine wird der Inhibitor erfolgreich u.a. zur Therapie bei Leukämien und beim myelodisplastischen Syndrom in Phase III Studien eingesetzt [Silverman et al., 2002].

Die zweite Methylierungs-Veränderung stellt die genomweite DNA-Hypomethylierung dar, die zu einer Reduktion des 5-Methylcytosins im Genom um bis zu 70% führt und sich u.a. in der Hypomethylierung von repetitiven LINE-Sequenzen widerspiegelt [Ehrlich, 2002]. Sie wird vor allem im Prostatakarzinom im Laufe der Progression zunehmend beobachtet [Santourlidis et al., 1999]. Die globale Hypomethylierung wird heute nicht mehr als zufälliges Ereignis betrachtet. Neben repetitiven Sequenzen sind einige Einzelkopiegene von der Hypomethylierung betroffen [Hoffmann und Schulz, 2005] und können zur Reexpression

---

\* Die Begriffe Hyper- und Hypomethylierung beziehen sich jeweils auf den Normalzustand eines Gewebes oder Zelltyps und bedeuten entsprechend eine Zunahme von Methylierungen an CpG-Stellen oder eine Verminderung.

gelangen. Hierzu gehören vor allem die sog. *Cancer-Testis* Antigene (vgl.1.1.5). Aber auch andere ektopische Marker und Gene, die Tumorzellen einen Vorteil bei der Anpassung an das sich in Tumoren ändernde Mikromilieu bieten, sind betroffen. Darüber hinaus könnte die generelle Hypomethylierung auch zu chromosomaler Instabilität führen und die Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen begünstigen.

Bei Prostatakarzinomen findet man eine Untergruppe mit starker Hypomethylierung und zusätzlich mit Veränderungen auf Chromosom 8. Diese nehmen einen besonders aggressiven Verlauf und weisen auf einen Zusammenhang zwischen Hypomethylierung und chromosomaler Instabilität hin [Schulz et al., 2002].

In einigen Karzinomen zeigen Hyper- und Hypomethylierung eine Korrelation. Beim Kolonkarzinom treten beide Veränderungen früh auf. Beim Harnblasenkarzinom findet man eine Hypomethylierung schon in frühen Stadien mit einem Anstieg der Hypermethylierung während der Progression [Florl et al.,1999; Maruyama et al., 2001]. Diese Befunde lassen vermuten, dass beide Veränderungen unterschiedliche Ursachen haben. Die Grundlage für das unterschiedliche zeitliche Auftreten der Hypomethylierung in den einzelnen Tumorentitäten ist bis dato ungeklärt. Es häufen sich aber Hinweise darauf, dass Methylierungsmuster in normalen Geweben durch Interaktion zwischen DNA-Methylierung und dem Chromatinstatus etabliert und aufrecht erhalten werden.

### 1.1.2 Chromatinremodellierung

Das Chromatin stellt einen hoch organisierten, kondensierten Protein-DNA-Komplex dar, in dem DNA mit Histonproteinen assoziiert ist. Eine fundamentale Einheit dieses Polymers ist das Nukleosom. Dieses besteht aus 147 Basenpaaren DNA, die um ein Histonoktamer gewunden ist. Das Histonoktamer setzt sich aus jeweils zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 zusammen [Luger et al., 1997]. Aus diesen Komplexen ragen die N-Termini heraus, interagieren mit anderen Nukleosomen und führen so zu einer übergeordneten Struktur. Diese herausragenden Histonschwänze sind Ziel einiger Histonmodifikationen, die zusätzlich die Chromatinstruktur beeinflussen und somit sowohl zur Unterscheidung von Heterochromatin und Euchromatin beitragen als auch zur Regulation von Genaktivität [Hake et al., 2004].

Die Chromatin-Remodellierung kann auf verschiedene Arten erreicht werden: durch kovalente Histonmodifikationen, durch Austausch der klassischen Histone gegen Histonvarianten, oder durch Aufbrechen der Grundnukleosomenstruktur über Lockerung der Histon-DNA-Kontakte; und schließlich durch direkte Modifikation der DNA selbst.

Zur Lockerung der Histon:DNA-Kontakte, die eine mechanische Verschiebung der Nukleosomen ermöglicht, stehen verschiedene Chromatin-Remodellierungs-Komplexe zur Verfügung. Sie gehören zu ATP-abhängigen Multi-Protein-Komplexen der SWI2/SNF2 Familie und unterteilen sich in verschiedene Unterfamilien, die nach der konservierten ATPase-Komponente eingeteilt werden [Gibbons, 2005]. Einzelne sind bei der Tumorigenese impliziert. Diese Multi-Proteinkomplexe variieren die Nukleosomenstruktur durch nichtkovalente Veränderungen, in dem sie die Energie der ATP-Hydrolyse nutzen. Diese führt zu einer vorübergehenden Lockerung der DNA-Histon-Struktur, so dass die Nukleosomen auf der DNA beweglich sind. Hierdurch wird Transkriptionsfaktoren der Zugang zu den Genen erleichtert. Umgekehrt kann dieses aber auch den Zugang von Faktoren ermöglichen, die durch Rekrutierung weiterer Proteine (vgl. 1.1.3) zu einer Heterochromatisierung beitragen.

### 1.1.3 Zusammenhänge zwischen Histonmodifikationen und Chromatinstatus

Ein Zusammenhang zwischen Histonmodifikationen und Heterochromatisierung wurde zuerst in *Drosophila* entdeckt. Hier wurde gefunden, dass das *Drosophila* Polycomb-Gen *Su(var)3-9* eine Histonmethyltransferase-Aktivität enthält, die spezifisch ist für Methylierungen am Lysin 9 im Histon H3 (H3K9) und eine Ausbreitung der Heterochromatisierung beim Phänomen der „*position effect variegation*“ reguliert [Reuter und Spierer, 1992]. Die Histonmethyltransferase-Aktivität geht von einer SET-(*Suvar3-9*, *E(z)*; *Trithorax*) Domäne aus, die hochkonserviert ist und in einigen Chromatin-modifizierenden Proteinen enthalten ist [Sims et al., 2003].

Im Allgemeinen findet man eine Reihe verschiedener Modifikationen an Histonschwänzen. Hierzu gehören vor allem Methylierungen an Lysinresten. Sie können als mono-, di- oder tri-Methylierung vorkommen. Je nach Lysinrest und je nach Anzahl der Methylreste markieren diese Modifikationen einen aktiven oder inaktiven Chromatinabschnitt. Methylierungen an H3K9 gelten neben denen an H3K27 und H4K20 als wichtige repressive Veränderungen. Sie stehen z.B. im Zusammenhang mit der Inaktivierung des X-Chromosoms [Plath et al., 2003]. Im Gegensatz dazu werden Methylierungen an H3K4, H3K36 und H3K79 in aktivierten Regionen des Genoms gefunden [Santos-Rosa und Caldas, 2005]. Neben den Lysinen können auch Argininreste methyliert werden. Phosphorylierungen finden an Serin- und Threoninresten statt. Ferner tragen poly-ADP-Ribosylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung zu Variationen bei, die insgesamt als Histon-Code bezeichnet werden. Durch Veränderung der Chromatinstruktur oder der Bindemöglichkeiten von Effektorproteinen wirken sie auf die Transkription von Genen [Allis et al., 2004]. Die Histonmethylierungen an Lysinresten werden in dieser Arbeit im Vordergrund stehen.

Histonacetylasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) modifizieren Histonschwänze und tragen zu einer offenen bzw. zu einer kompakteren Chromatinstruktur bei. Entsprechend ist ein deacetylierter, kompakter Zustand charakteristisch für Heterochromatin. Ein verändertes Niveau von Histonacetylasen und –deacetylasen ist mit aberranter Genexpression assoziiert und kann zur Tumorentstehung beitragen [Mei et al., 2004; Santos-Rosa und Caldas, 2005]. Einen künstlichen *in vitro*-Ansatzpunkt bieten kommerzielle Histondeacetylierung-Inhibitoren wie die Hydroxam-Säuren Suberoylanilidohydroxam-Säure (SAHA) und Trichostatin A (TSA). Durch Zugabe dieser Inhibitoren auf Zellkulturen können diese leicht reversiblen Modifikationen beeinflusst werden und ein acetylierter Zustand von Lysin erreicht werden. Dadurch werden durch Deacetylierung verursachte Abschaltungen von Genexpressionen aufgehoben. Dieser Mechanismus bietet auch Ansätze für die Tumorthherapie. Ein bekanntes Beispiel der Expressionsinduktion in Tumorzellen durch HDAC-Inhibitoren ist das *p21/CDKN1A*-Gen [Li und Wu, 2004]. Die Histondeacetylasen werden in drei große Untergruppen unterteilt und agieren jeweils in Multi-Proteinkomplexen. Zwei wichtige Komplexe der HDAC-Klasse I sind der SIN3- (*switch independent protein 3*) und der NuRD-Komplex (*nucleosome remodeling complex*). Der NuRD-Komplex wird von methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBD, vgl. 1.1.1) rekrutiert und bereitet mit der Histondeacetylierung eine folgende Histonmethylierung vor. Im allgemeinen wird jedoch angenommen, dass unter normalen Bedingungen Histonmodifikationen frühe Ereignisse sind, die vor der DNA-Methylierung stattfinden [Mutskov und Felsenfeld, 2004] und so z.B. die H3K9-Methylierung als Signal wirkt für DNA-Methyltransferasen, die selber geringe Sequenzspezifität besitzen. [Sims et al., 2003]. Die dritte Klasse der Histondeacetylasen unterscheidet sich durch ihre Abhängigkeit vom Coenzym NAD<sup>+</sup>. Ein wichtiger Vertreter dieser Familie der Sirtuine ist SIRT1. Diese Histondeacetylase steht in Verbindung mit p53-induzierter Apoptose und ist von Bedeutung für das Überleben der Zelle unter physiologischem Stress. Ein hohes Expressionsniveau während der Embryonalentwicklung konnte in der Maus gezeigt werden. Ein Zusammenhang mit der Regulation von Genexpressionen auf Chromatinebene wird vermutet [Pruitt et al., 2006 PloS Genetics]. Anders als die Histondeacetylasen der Klasse I und II, werden Sirtuine nicht durch Inhibitoren wie TSA und SAHA beeinflusst.

Während Acetylierungen als leicht reversibel gelten, werden Lysinmethylierungen als stabilere Markierungen von Genaktivitäten angesehen, die diesen Zustand auf Dauer erhalten. Diese Annahme stützt sich u.a. darauf, dass lange kein Enzym identifiziert werden konnte, das die Demethylierung von Histonen katalysiert. So stand lediglich der Austausch gegen Histonvarianten als Mittel zur Verfügung. In neuerer Zeit wurde ein Enzym namens LSD1

(Lysin Demethylase 1) entdeckt, welches durch eine Amin-Oxidase-Reaktion Lysine demethylieren kann [Shi et al., 2004]. Dieses Enzym wirkt spezifisch auf die Methylierung an H3K4, die einen aktiven Zustand markiert. Die Enzymspezifität kann jedoch unter Vermittlung des Androgenrezeptors zur Methylierung an H3K9 verschoben werden, die für einen inaktiven Chromatinstatus steht. Durch die Aufhebung dieser repressiven Methylierungsmarken können zahlreiche Gene zur Aktivierung gelangen [Metzger et al., 2005].

Durch Wechselwirkung der verschiedenen Histonmodifikationen untereinander werden Bindungsvoraussetzungen geschaffen für Proteine, die zusätzlich an der Chromatinregulation beteiligt sind und miteinander interagieren.

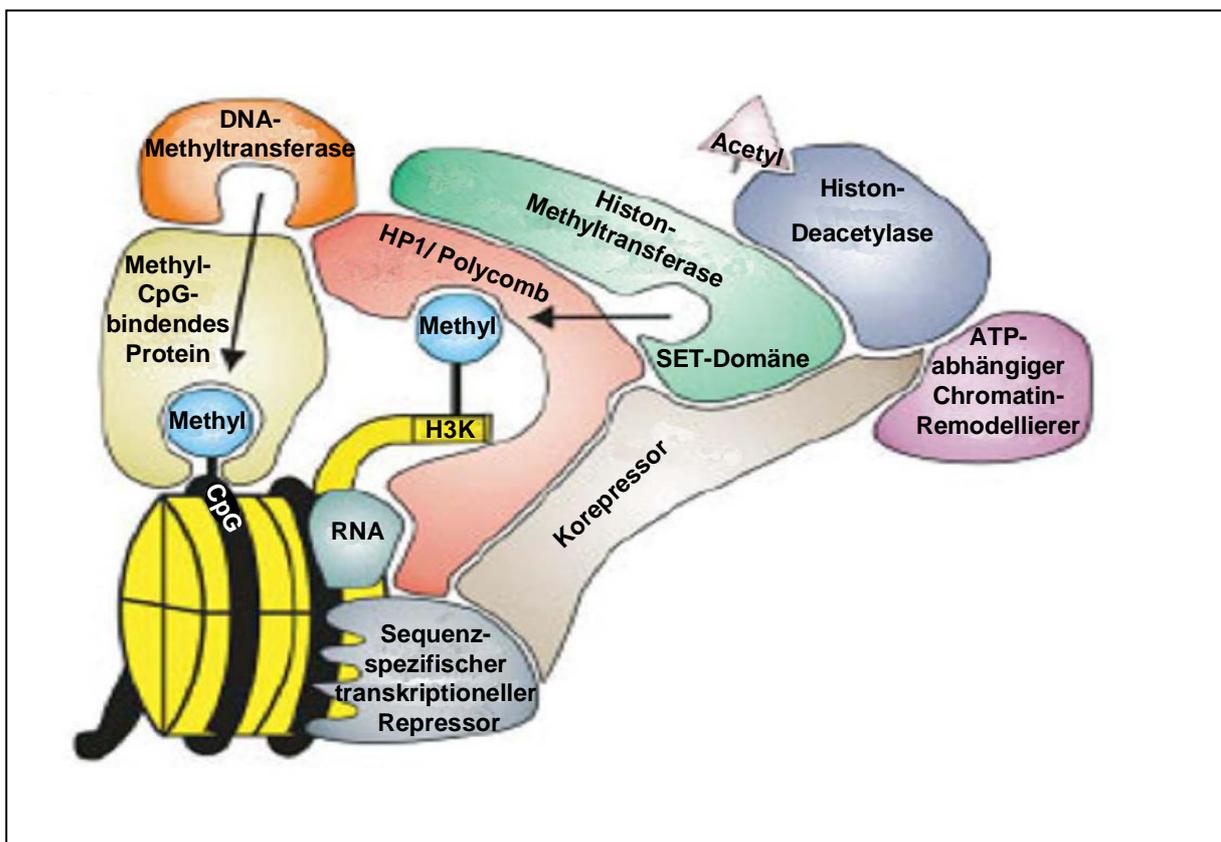


Abb. 1.3: Übersicht möglicher Interaktionen zwischen DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und Chromatinfaktoren [modifiziert aus Craig, 2005]. Sowohl an dem Histonkomplex (gelb) mit terminalen Histonschwänzen (H3K) als auch an dem dort herum gewundenen DNA-Abschnitt (schwarz) können verschiedene Modifikationen stattfinden. Sowohl mit diesen Modifikationen als auch mit der DNA selbst kann eine Vielzahl regulatorischer Faktoren interagieren, z.B. das Heterochromatin-Protein 1 (HP1).

Abb. 1.3: bietet eine Übersicht einiger beteiligter Komponenten und Sequenzen von Interaktionen während der Chromatin-Modifikation. Diese kann durch Bindung eines sequenzspezifischen transkriptionellen Repressors oder einer nicht translatierten RNA an die DNA ausgelöst werden. Diese rekrutieren weitere Korepressoren oder das Heterochromatin-

Protein 1 (HP1) bzw. Polycomb-Homologe (vgl. 1.1.4). Ein gebundener Korepressor interagiert nach Methylierung am Histon H3 mit einem Chromatin-Remodellierungs-Komplex, der DNA-Histon-Assoziationen lockert. Histondeacetylasen können angreifen und Histonmethyltransferasen, die meistens eine SET-Domäne beinhalten, addieren Methylgruppen an denselben Histonschwanz. Bis zu drei Methylgruppen sind möglich, wodurch weitere funktionelle Unterschiede entstehen. In einer alternativen Sequenz können auch Histonmethyltransferasen und methylierte Lysinreste die Polycomb-Homologe oder HP1 rekrutieren, welches dann DNMTs binden kann und zu einer Methylierung von DNA führt. Damit impliziert die Histonmethylierung die Methylierung von DNA. Diese Sequenz ist bisher aber bei Mammaliern noch nicht bewiesen.

Umgekehrt können methylierte CG-Stellen in der DNA von einem methyl-CpG bindenden Protein erkannt werden, welches dann z.B. mit Histondeacetylasen, oder einem Polycomb-Homolog interagieren kann. Polycomb Homologe verfügen teilweise selber über eine Histonmethyltransferaseaktivität durch eine SET-Domäne, so dass aus der DNA-Methylierung eine Histonmethylierung resultieren kann.

#### 1.1.4 Polycomb Proteine als epigenetische Regulatoren

Polycomb- und Trithorax-Proteine wurden zuerst bei *Drosophila melanogaster* beschrieben, wo sie die stabile Kontrolle von Homöoboxgenen übernehmen, die zuvor transient durch Segmentierungsgene geleistet wurde. Homöoboxgene sind während fötaler Entwicklungsprozesse maßgeblich an der Regulation von Zellschicksalen beteiligt. Mutationen führen zu pleiotropen Effekten und homöotischen Transformationen. Zusammen formen Polycomb- und Trithoraxproteine ein zelluläres Gedächtnis, welches dafür verantwortlich ist, den epigenetischen Status der Zielgene während der gesamten Lebenszeit eines Organismus aufrecht zu erhalten [Gunster et al., 2001]. Während die Trithorax-Proteine aktivierend auf die Genexpression wirken, agieren die Polycomb-Proteine (PcG) inhibierend. Die Regulation erfolgt auf der Chromatinebene durch Etablierung eines repressiven Chromatinstatus über Histon-Deacetylierung und –Methylierung bzw. Assoziation mit Chromatin-Remodellierungs-Faktoren, so dass z. B. eine Bindung von Transkriptionsfaktoren ausgeschlossen wird.

PcGs binden in *Drosophila* an spezielle regulatorische Elemente, sog. PREs (*polycomb response element*), die jedoch bis jetzt in Mammaliern noch nicht identifiziert worden sind. Das YY1-Protein kann als einziges direkt an DNA binden. Im Gegensatz zur Fliege werden die Polycomb-Proteine in Mammaliern gewebe- und zelltypspezifisch exprimiert.

Es gibt mehrere humane Polycomb-Orthologe, die im allgemeinen in zwei verschiedenen Proteinkomplexen organisiert sind, dem PRC1 (*polycomb repressive complex*) und dem PRC2 [Valk-Lingbeek et al., 2004]. Durch den Komplex PRC2 wird die Repression initiiert. Der Kern dieses Komplexes besteht aus den Proteinen EZH2, EED und SUZ12. Die Aufrechterhaltung der Repression wird durch den PRC1 Komplex gewährleistet, der u.a. aus den Proteinen RNF2, HPC, EDR und BMI-1 besteht. Je nach Gewebe und Zelltyp variiert die Zusammensetzung der Komplexe, wobei es jedoch nicht zu einer Vermischung der beiden Komplexe kommt [Gunster et al., 2001]. Sie spielen u.a. eine Rolle bei der Embryonalentwicklung, Hämatopoese, X-Inaktivierung, Zellzykluskontrolle und Selbsterneuerung. Entsprechend wurden auch Zusammenhänge zwischen veränderter Polycomb-Genexpression und der Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten beobachtet.

Das *EZH2*-Gen, welches auf Chromosom 7q35 lokalisiert ist, wurde zunächst als überexprimiert in fortgeschrittenen Tumoren und Metastasen der Prostata und der Mamma beschrieben. In denen soll es mit erhöhter Invasivität der Tumoren und aggressivem klinischen Verlauf assoziiert sein [Kleer et al., 2003; Varambally et al., 2002]. In neueren Studien wurde eine Überexpression außerdem in Tumoren der Lunge und Endometrium, sowie in Lymphomen [Raaphorst, 2005] und Melanomen berichtet [Bracken et al., 2003]. In einigen Tumorarten wurden Amplifikationen des *EZH2*-Gens gefunden, die auch mit einer Erhöhung der Expression korrelierten; für Prostatakarzinome wurden dort keine Amplifikationen berichtet [Bracken et al., 2003]. Saramäki et al. fanden solche kürzlich in Prostatakarzinom-Zelllinien und -Geweben, vor allem bei fortgeschrittenen, hormonrefraktären Tumoren [Saramäki et al., 2006]. Ferner wurde eine Regulation von *EZH2* und *EED* über den pRB-E2F-Signalweg beschrieben, so dass eine häufig in Tumoren vorkommende Deregulation des Signalweges zu einer Überexpression von *EZH2* führen könnte. Obwohl die Expression von *EZH2* nicht vom Zellzyklus abhängig ist, konnte ein hohes Expressionsniveau nur in proliferierenden Zellen gezeigt werden [Bracken et al., 2003]. Zudem gibt es durch Studien an Mäusen Hinweise auf eine Beteiligung von *Ezh2* bei der Aufrechterhaltung von Stammzell-Pluripotenz und eine Koexpression mit dem frühen Pluripotenz-Gen *Oct3/4* [Cao und Zhang, 2004].

EZH2 enthält, wie einige andere Chromatinfaktoren, eine SET-Domäne, mit deren Hilfe es die (Tri-) Methylierung von Lysin 27 am Histon H3 (H3K27) reguliert. In dieser Weise ist es auch an der Inaktivierung des X-Chromosoms zur Dosiskompensation beteiligt. EZH2 kann aber auch bis zu zwei Methylgruppen auf H3K9 übertragen. Die Methylierung von H3K27 durch EZH2 verbindet den PRC2-Komplex mit PRC1-Komplex, da methyliertes H3K27 als

Bindungsstelle für das im PRC1 vorkommende HPC gilt. Ferner wird angenommen, dass die Methylierung an H3K27 benötigt wird, um Promotoren von Zielgenen durch DNA-Methylierung endgültig abzuschalten [Lund und van Lohuizen, 2004]. Welche Methylierung EZH2 setzt, wird beeinflusst durch die Zusammensetzung des gesamten PRC2-Komplexes. Variationen in der Zusammensetzung des Komplexes und verschiedene Assoziationen mit anderen Proteinen führen zu veränderten Substratspezifitäten und werden neuerdings auch als PRC3 oder PRC4 bezeichnet.

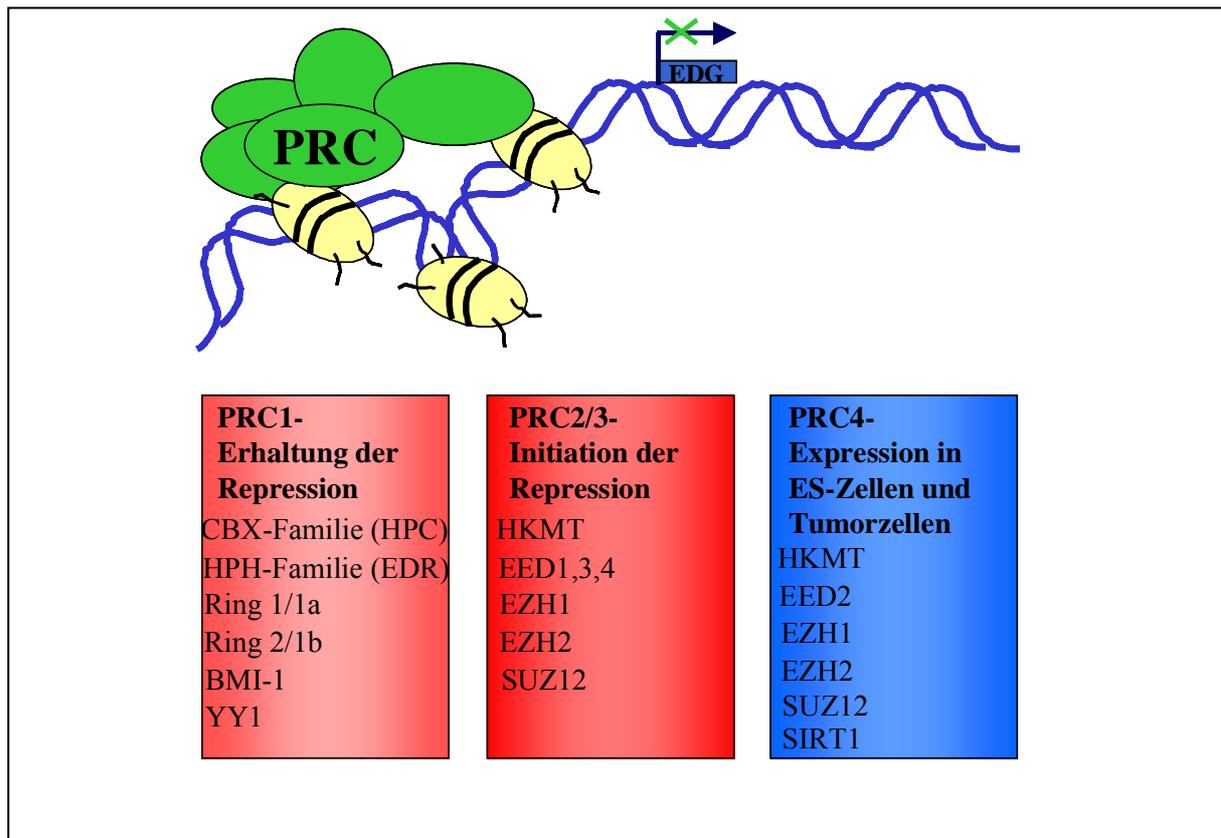


Abb. 1.4: Übersicht über die Zusammensetzung und Funktion der Polycomb-Komplexe PRC1 und PRC2, sowie den Abwandlungen des PRC2-Komplexes, PRC3 und PRC4 [modifiziert aus Baylin und Ohm, 2006]. Im Allgemeinen wirken diese Komplexe (grüne Ovale) repressiv auf Gene, die an Entwicklung und Differenzierung (EDG) beteiligt sind, in dem sie z.B. Methylgruppen auf Lysinreste von Histonschwänzen (vgl. 1.1.3) übertragen (schwarze Striche an beige gefärbten Ovalen).

Zum PRC1-Komplex gehört u.a. das Polycomb-Protein BMI-1 (*B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*). Das Gen für *BMI-1* ist auf Chromosom 10p13 lokalisiert. Ursprünglich wurde es als kooperierendes Onkogen von *c-Myc* entdeckt [Jacobs et al., 1999]. BMI-1 wirkt repressiv auf die Loci  $p16^{INK4a}$  und  $p19^{ARF}$  und beeinflusst damit die RB- (Retinoblastom) und p53-Signalwege. Eine Repression von  $p16$  durch BMI-1 führt dazu, dass RB phosphoryliert wird und E2F-abhängige Gentranskription zur Zellzyklusprogression und DNA-Synthese führt. Weiterhin behindert ein fehlendes p19-Protein die Aktivierung von  $p53$  und verhindert dadurch Zellzyklusarrest und Apoptose [Park et al., 2004]. *BMI-1* hat physiologisch ein hohes Expressionsniveau in hämatopoetischen und neuralen Stammzellen.

Die Expressionsmuster von *BMI-1* und *EZH2* sind unter physiologischen Bedingungen häufig konträr. Es gibt Hinweise darauf, dass das Stammzellschicksal teilweise durch Polycomb-Proteine reguliert wird und speziell BMI-1 an der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen und an der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen beteiligt ist [Lessard und Sauvageau, 2003; Molofsky et al., 2003].

Außerdem wurde eine erhöhte *BMI-1*-Expression in einer Population von Tumorzellen mit stammzellähnlichem Phänotyp bei Leukämien und in soliden Tumoren von Gehirn und Brust gefunden [Dick et al., 2003; Valk-Lingbeek et al., 2004; Liu et al., 2005]. Dort könnte es ein stammzellähnliches Transkriptionsprogramm und konstitutive Selbsterneuerung erlauben. Überexpression tritt auch bei Lymphomen, Osteosarkomen, Kolon- und Leberkarzinomen sowie einigen Lungenkarzinomen auf. Die Mechanismen der Expressionsregulation von *BMI-1* selbst, sowie seine Bedeutung für das Prostatakarzinom sind unklar.

#### 1.1.5 Die Chromatinfaktoren CTCF und CTCFL

Die Ausbreitung einer Heterochromatisierung kann durch sog. *boundary*-Elemente verhindert werden. Die daraus resultierende Unterteilung des Genoms in funktionell unabhängige Domänen wird durch den CCCTC-bindenden Faktor (CTCF) vermittelt. Durch verschiedene Kombinationen seiner elf Zink-Finger-Domänen kann CTCF an eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Sequenzen binden, u.a. an *Imprinting*-Kontrollregionen (ICR) und an CpG-Inseln [Klenova et al., 2002; Dunn und Davie, 2003]. Durch seine methylierungsabhängige Bindung an ICRs trägt er zur Regulation des *Imprintings* bei, indem er über die Möglichkeit der Interaktion von *Enhancern* mit Genpromotoren entscheidet. Ferner kann dieser Faktor gezielt Regionen vor einer Methylierung der DNA schützen. Unter physiologischen Bedingungen ist *CTCF* bis auf das Stadium der Spermatozyten ubiquitär exprimiert. Das *CTCF*-Gen liegt auf Chromosom 16q22, einer Region, die häufig durch Mutationen oder Allelverluste in Karzinomen betroffen ist. Eine künstliche Überexpression wirkt inhibierend auf die Zellproliferation.

Im Jahr 2002 wurde ein paraloges Gen namens *BORIS* (*Brother of Regulator of Imprinting Sites*) bzw. *CTCFL* (*CCCCTC-binding factor-like*) in Hodenextrakten beschrieben [Loukinov et al., 2002]. Dieses Protein hat alle 11 Zink-Finger-Domänen mit CTCF gemeinsam, unterscheidet sich jedoch in den Domänen-flankierenden Regionen und den beiden Termini, so dass unterschiedliche Funktionen und Wirkungen auf den Chromatinstatus zu vermuten sind. Im Gegensatz zu CTCF wurde CTCFL als hodenspezifisches Protein beschrieben, mit einander ausschließendem Expressionsmuster von CTCF und CTCFL während der männlichen Keimzellentwicklung. Während CTCF ausschließlich in murinen postmeiotischen

runden Spermatiden gefunden wurde, war die CTCFL Expression in früheren Stadien, den primären Spermatocyten detektierbar. Diese Analyse ergab sowohl im Cytoplasma als auch in Nuklei CTCFL-Färbungen. Ähnliche Ergebnisse sind im humanen Hoden beschrieben [Loukinov et al., 2002]. Die Resultate einer gleichzeitigen Färbung mit einem 5-Methylcytosin-spezifischen Antikörper führten zu der Annahme, dass Expression von CTCFL und Auslöschung sowie Reetablierung der vererbten Methylierungsmarken im Zusammenhang stehen.

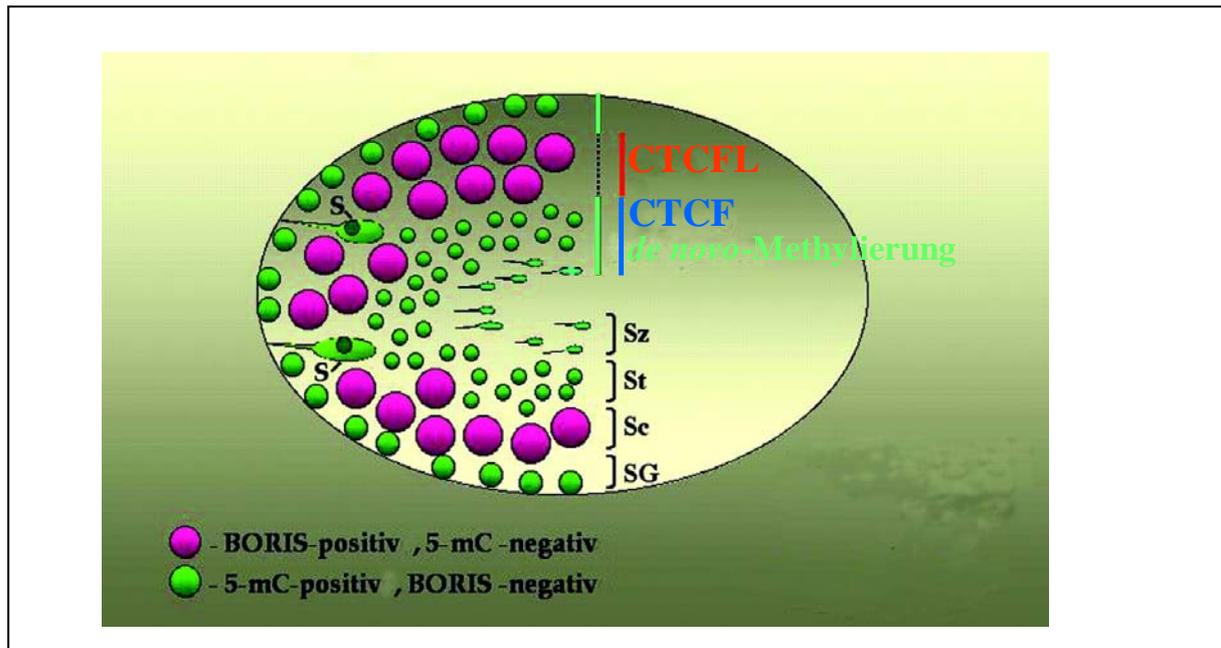


Abb. 1.5: Modell für Löschung (schwarz gestrichelt) und Reetablierung der DNA-Methylierung (grün) sowie Expression von CTCFL (rot) und CTCF (blau) in den Stadien der Spermatogenese. Innerhalb eines Hodentubulus erfolgt die Reifung der Stadien der Spermatogenese von Außen nach Innen. SG: Spermatogonien, Sc: Spermatozyten, St: Spermatiden, Sz: Spermatozoen, S: Sertoli-Zellen. [modifiziert aus Loukinov et al., 2002].

Ferner wurden mögliche Kompetitionen zwischen den beiden Proteinen um Bindungsstellen, vor allem im Falle einer Deregulation, angenommen, die zu aberranten DNA-Methylierungsmustern beitragen könnten [Robertson, 2005]. Weitere Spekulationen über Interaktion mit einer nicht identifizierten Histonmethyltransferase wurden angestellt [Loukinov et al., 2002; Klenova et al., 2002].

Mit seiner Lokalisation auf Chromosom 20q13.2 liegt das *CTCFL*-Gen, wie auch *CTCF*, in einer Region, die in verschiedenen Tumorarten von chromosomalen Aberrationen betroffen ist. Während der Locus 16q22 jedoch häufiger einem Allelverlust unterliegt, finden im Bereich 20q13 meistens Amplifikationen statt. Gen-Amplifikationen von *CTCFL* sind nicht beschrieben. Verweise auf unpublizierte Befunde zu Überexpressionen von *CTCFL* in verschiedenen Tumoren führten zur Eingliederung des Gens in die Klasse der sog. *Cancer-Testis* Antigene [Loukinov et al., 2002; Zendman et al., 2003].

Per Definition zeichnen sich diese Gene dadurch aus, dass sie normalerweise nur in Keimzellen innerhalb des Hoden exprimiert werden, aber nicht in normalen somatischen Geweben. Zusätzlich gelangen sie in Tumoren zur Reexpression. Als Schlüsselmechanismus für die Reaktivierung wird die Demethylierung von Promotoren angesehen. Es gibt aber auch Fälle, in denen alleinige Hypomethylierung für eine Aktivierung nicht ausreichend ist. Die *Cancer-Testis* Antigene werden in zwei Gruppen unterteilt: Die erste Gruppe umfasst einzelne Gene wie CTCFL, die auf autosomalen Chromosomen liegen. Über die einzelnen Gene ist im Allgemeinen wenig bekannt. Zur zweiten Gruppe gehören Gene, die häufig als Multigen-Familien auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, wie z.B. die *MAGE*-Gene [Zendman et al., 2003; De Smet et al., 1997]. Diese Gruppe wurde häufiger untersucht, z.B. wurde die Induktion durch den Methylierungsinhibitor 5-aza-dC gezeigt. Einige *MAGE*-Proteine scheinen an der Zellzyklusregulation und Transkriptionskontrolle beteiligt zu sein, jedoch sind wenige Details definitiv. Wegen ihrer Eigenschaften als tumorspezifische Antigene sind *MAGE*-Proteine als Ziele für die Immuntherapie genutzt worden.

## 1.2 Das Prostatakarzinom

Die Prostata ist eine exokrine Drüse des männlichen Urogenitaltrakts. Ihre physiologische Funktion besteht in der Produktion des alkalischen Prostatasekrets. Dieses ist zu etwa einem Drittel Bestandteil des Ejakulats und enthält sowohl Glykoproteine als auch Enzyme, die aktivierend auf die Spermien wirken.

Das Prostatakarzinom (PCa) ist generell der zweithäufigste bösartige Tumor des Mannes, doch fallen dabei geographische und ethnische Unterschiede auf. Epidemiologische Studien deuten auf besonders niedrige Inzidenzen bei Asiaten und besonders hohe bei Nordamerikanern afrikanischer Abstammung hin. Es geht zu 70% von Epithelien der peripheren Zone der Prostata aus. In der zentralen Zone finden im Alter vorwiegend entzündliche Prozesse statt. Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) geht aus der Übergangszone hervor. Beim Prostatakarzinom handelt es sich in 97% der Fälle um Adenokarzinome, die in 35% solitär im Drüsenepithel entstehen und zu 65% multizentrisch sind. [Alken und Walz, 1998].

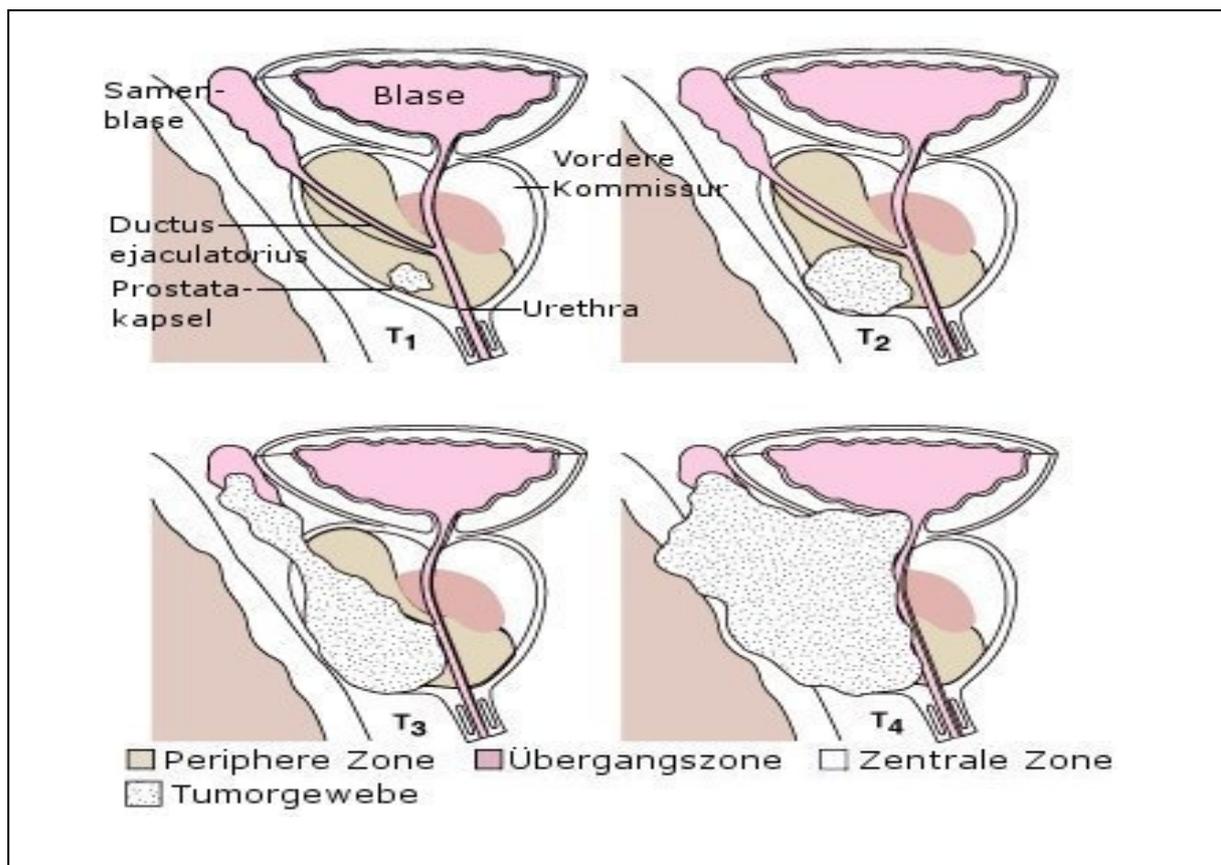


Abb. 1.6: Anatomie des männlichen Urogenitaltrakts mit Einteilung der Prostata in die drei unterschiedlichen Zonen und Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms [www.prostateline.com].

Die Einteilung der Stadien erfolgt nach dem TNM-System (vgl. Tab. 1.1).

Tab. 1.1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms [6.Aufl. UICC 2002]

<b>Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation</b>	
<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist T1a Tumor zufälliger histologischer Befund (inzidenzielles Karzinom) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes T1b Tumor zufälliger histologischer Befund (inzidenzielles Karzinom) in mehr als 5% des resezierten Gewebes T1c Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt T2a Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger T2b Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens T2c Tumor infiltriert beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel T3a Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) T3b Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhals, Sphinkter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)
<b>N</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen M1a Nicht regionärer Lymphknotenbefall M1b Knochenmetastasen M1c andere Manifestation

Der Tumor breitet sich zunächst lokal intraprostatisch aus (pT1). Ein makroskopischer Befall eines oder beider Prostatalappen entspricht dem Stadium T2. Der Durchbruch durch die Prostatakapsel und die Infiltration des umliegenden Gewebes (T3) findet erst spät statt und geht mit einer Verschlechterung der Prognose einher. In ca. 52% der pT3-Fälle sind die Lymphknoten von Metastasen befallen. Werden weitere Strukturen von Nachbarorganen wie z.B. Blasenhalshals oder Rektum befallen, liegt ein pT4-Tumor vor. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit diagnostiziertem klinisch manifestem Karzinom ist mit Knochenmetastasen zu rechnen. Im Vergleich zur Gradeinteilung der Differenzierung nach Dohm in Grade G1-G3 (differenziert bis undifferenziert), unterteilt der an der Drüsenstruktur orientierte Gleason-Score in 10 Untergruppen (2-4, gut differenziert; 5-7 mäßig differenziert; 8-10 undifferenziert) und soll bessere prognostische Aussagen erlauben.

Die Therapie des PCa erfolgt stadienbezogen. Beim Primärtumor kommen eine kurative Prostatektomie oder Bestrahlung in Betracht. Im Falle von Metastasen kommt eine Hormontherapie zum Einsatz, die zur chemischen Kastration führt. Da Androgene das Wachstum des Tumors stimulieren, erfolgt der Androgenentzug bzw. die Verabreichung von Östrogenen. Etwa 80% der PCa sprechen auf den Hormonentzug an. Bei den meisten

Patienten hält dieses jedoch nur etwa 12-33 Monate an. Danach kommt es häufig zu einer erneuten Tumorprogression und der Ausbildung eines hormonrefraktären Tumors [Rizzo et al., 2005]. Die Entscheidung über Diagnose und therapeutische Maßnahmen im Einzelfall wird durch Heterogenität hinsichtlich verschiedener Differenzierungsstadien innerhalb eines Tumors und der Multifokalität erschwert. Aufgrund der zunehmenden Anzahl von Vorsorgeuntersuchungen in den letzten Jahren z.B. mit Hilfe eines PSA-Tests werden immer mehr Prostatakarzinome in früheren Stadien erkannt. So verlagert sich der Bedarf von weiteren Markern zur Früherkennung, zu Markern mit prognostischer Relevanz, die eine Subklassifizierung ermöglichen und eine Eingruppierung von aggressiven Tumoren erlauben.

Das prostataspezifische Antigen (PSA) ist ein Glykoprotein, das vorwiegend im Prostatasekret sezerniert wird. Ein geringer Teil gelangt in die Blutbahn, wobei der Serumspiegel mit dem Prostatavolumen korreliert. Im Falle eines Tumors nimmt der PSA-Spiegel zu. Durch die Verbesserung der PSA-Testsysteme der letzten Jahre ist eine sensitivere Bestimmung auch von niedrigeren Konzentrationen möglich geworden. Dennoch ist das PSA als Tumormarker weder absolut spezifisch noch sehr sensitiv und kann auch durch andere Umstände falsch-positiv beeinflusst werden. Der PSA-Spiegel kann auch bei gutartigen Prostataerkrankungen wie der BPH erhöht sein und tendiert generell zu einer Erhöhung im Laufe des Alters. Umgekehrt kommen auch Prostatakarzinome vor, die nur sehr wenig PSA sezernieren und nicht detektiert werden. So ergibt sich eine beträchtliche Grauzone [Schulz, 2005].

Wie bei anderen Tumorarten treten auch beim Prostatakarzinom neben dem sporadischem Karzinom auch hereditäre Formen auf. Beide Formen unterscheiden sich jedoch nicht deutlich genug hinsichtlich molekularer Veränderungen. Während bei anderen Tumorarten hereditäre Formen zur Aufklärung von Schlüsselereignissen beigetragen haben, waren Studien beim Prostatakarzinom weniger erfolgreich. Es wurden zwar in verschiedenen Studien jeweils einzelne Marker herausgestellt, diese konnten jedoch durch andere Studien und in verschiedenen Populationen nicht bestätigt werden [Schulz, 2005; Simard et al., 2003]. Am besten reproduzierbar wurden in hereditären Karzinomen Mutationen und Polymorphismen im *RNASE-L-Locus* gefunden. RNASE L ist an einem Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen, besonders doppelsträngiger RNA, beteiligt [Silverman, 2003].

In sporadischen Karzinomen treten verschiedene Veränderungen auf, nach wie vor fehlen jedoch definitive Marker. Im Gegensatz zu anderen Tumoren, gibt es beim Prostatakarzinom wenige Hinweise auf wichtige Onkogene, die für die Entstehung von Tumoren und deren Progression entscheidend sein könnten. Das bei vielen anderen

Tumorarten implizierte RAS-Gen spielt beim Prostatakarzinom keine Rolle. Eine erhöhte c-Myc-Expression, z.B. durch Amplifikationen, kommt vor allem in metastatischen Prostatakarzinomen vor und führt zu einer verstärkten Zellproliferation. Als weitere Onkogene gelten Bcl-2, als antiapoptotischer Faktor, sowie ErbB2 (Her2/Neu), welches zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehört [Karan et al., 2003]. Die Proliferation des prostatistischen Epithels wird außerdem durch eine spezielle Gruppe von Transkriptionfaktoren, den ETS-Faktoren reguliert. Einige dieser Mitglieder findet man in Prostatakarzinomen überexprimiert [Tomlins et al., 2005].

Als für das Prostatakarzinom charakteristische Aberrationen sind, neben genomischen Alterationen in Form von Mutationen und chromosomalen Veränderungen, besonders epigenetische Mechanismen von Bedeutung. Darüber hinaus gibt es einige signifikante Befunde zu veränderten Genexpressionen von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren, die spezifisch für das Prostatakarzinom sind.

Hinsichtlich der genomischen Veränderungen wurden einige Polymorphismen in verschiedenen Loci beschrieben. Assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Prostatakarzinome sind Polymorphismen der Gene *GST-T1* und *IGF-1* [Schalken et al., 2005].

Chromosomale Veränderungen betreffen den Verlust oder Zugewinn von Regionen einzelner Chromosomenarme. Von Deletionen betroffene Chromosomenarme sind 2q, 3p, 4q, 5q, 6q, 7q, 8p, 9q, 10p, 10q, 11p, 12p, 13q, 15q, 16q, 17 p, 17q, 18q, 19q, 20q, 21q und auf dem Y-Chromosom [Dong, 2001]. In einigen Regionen konnten Tumorsuppressorgene identifiziert werden, die durch einen Chromosomenarm-Verlust betroffen sind [Dong, 2006]. Hierzu zählen u.a. das *RBI*-Gen und der Transkriptionsfaktor *KLF5* auf Chromosom 13q, das *p27 KIP1*-Gen auf Chromosom 12p, sowie die Gene für *PTEN* und *p16* auf Chromosom 10q bzw. 9p. Am häufigsten ist der Chromosomenarm 8p von Deletionen betroffen. Diese werden einerseits als frühes Ereignis im Laufe der Tumorigenese betrachtet, andererseits werden sie auch als assoziiert mit höherem Tumorgrad und –stadium beschrieben. Darüber hinaus wurde eine starke Assoziation mit genomweiter DNA-Hypomethylierung gefunden, die im Laufe der Tumorprogression zunimmt [Schulz et al., 2002]. Zahlreiche Versuche zur Identifizierung potentieller Kandidatengene auf Chromosom 8 wurden unternommen. Eines der wichtigsten Kandidatengene in der betroffenen Region ist der prostataspezifische Transkriptionsfaktor *NKX3.1*, der für die Zelldifferenzierung in der Entwicklung der normalen Prostata von Bedeutung ist [Schulz und Hatina, 2006; Shen und Abate-Shen, 2003]. Sein Expressionsverlust steht im Zusammenhang mit der Tumorprogression [Hughes et al., 2005]. Mutationen werden u.a. bei *PTEN* gefunden. Dieses Gen begrenzt die Aktivität des AKT-Kinase-Signalwegs. Es ist in einem Drittel aller hormonrefraktären Prostatakarzinome

mutiert, zumeist bei hohen Tumorstadien [DeMarzo et al., 2003]. Speziell im Prostatakarzinom zeigen viele Tumorsuppressorgene ein auffälliges Verhalten. Obwohl häufig ein Allelverlust in Tumoren auftritt, sind Inaktivierungen beider Allele durch Mutationen, homozygote Deletionen oder Promotor-Hypermethylierungen eher selten und auf sehr fortgeschrittene Tumoren beschränkt [Schulz und Hatina, 2006]. Trotzdem geht die Expression dieser Gene häufig verloren. Für diese Befunde könnten Haploinsuffizienz oder andere epigenetische Mechanismen als DNA-Hypermethylierung einen Erklärungsansatz für die Inaktivierung bieten.

Unter epigenetischen Mechanismen werden Veränderungen von DNA-Methylierung und Chromatin zusammengefasst, die beide miteinander interagieren (vgl. 1.1). Durch DNA-Hypermethylierung sind im PCa bis dato etwa 30 Gene mit variierender Prävalenz betroffen. In 70 - 95% der Fälle beobachtet man Hypermethylierungen der Gene *GST-P1*, *RARB2*, *RASSF1A*, *APC*, *COX2*, *MDR1*, *TIG1* und *HIC1* [Schulz und Hatina, 2006; Li et al., 2005]. Eine Untergruppierung von Karzinomen basierend auf Methylierungsmarkern ist denkbar. Da bei den Genen *GST-P1* und *RARB2* keine Hypermethylierung in normalem Prostatagewebe nachgewiesen werden kann, gelten diese als besonders spezifische und auch sensitive Marker [Florl et al., 2004]. Während *RARB2* die Differenzierung von Zellen durch Retinsäure vermittelt, ist das GST-P1-Genprodukt am Fremdstoffmetabolismus beteiligt. Für die Hypermethylierung des *GST-P1*-Gens werden Testsysteme entwickelt, die eine Detektion in Körperflüssigkeiten erlauben sollen. Auf diese Weise soll die Zahl der Prostatabiopsien bei der Diagnostik des Karzinoms reduziert werden [Schalken et al., 2005].

Im Prostatakarzinom findet man auch eine genomweite Hypomethylierung, die mit fortschreitender Progression zunimmt und vor allem repetitive Sequenzen betrifft [Santourlidis et al., 1999; Schulz et al., 2002]. In jüngerer Zeit wurden auch einige betroffene Einzelkopiegene beschrieben [Hoffmann und Schulz, 2005], speziell im Prostatakarzinom die Heparanase [Ogishima et al., 2005]. Ebenso sind Veränderungen der Histonmodifikationen beschrieben, die mit veränderten Chromatinstrukturen zusammenhängen könnten (vgl. 1.1).

Für einzelne regulative Chromatinproteine wie EZH2, YY1 und LSD1 sind Überexpressionen in Prostatakarzinomen nachgewiesen worden [Varambally et al., 2002; Seligson et al., 2005; Metzger et al., 2005]. Denkbar sind auch Einflüsse auf andere spezifisch in Prostatakarzinomen überexprimierte Gene, z.B. für Telomerase (hTert), Hepsin, einer Transmembran-Serinprotease, und AMACR, der an der Oxidation von Fettsäuren in Peroxisomen beteiligten  $\alpha$ -Methylacyl-Coa-Racemase [Hughes et al., 2005].

Modifikationen von DNA und Histonen sowie andere regulatorische Chromatinproteine interagieren mit einem in Ansätzen bekannten Netzwerk von transkriptionellen Aktivatoren

und Repressoren in der Prostata. Dieses Netzwerk kontrolliert normalerweise Proliferation und Differenzierung in der Prostata und verknüpft Signale von zahlreichen Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zelladhäsionsmolekülen. Im Prostatakarzinom können sowohl solche Signale, aber auch das Netzwerk selbst gestört sein. Eine wesentliche Komponente des Netzwerks ist der Androgenrezeptor. Die Funktion des Androgenrezeptors ist neben genetischen Aberrationen wie Punktmutationen oder Genamplifikation auch durch Hypermethylierung oder vielfältig veränderte Expressionen von Korepressoren oder Koaktivatoren beeinträchtigt [Feldman und Feldman, 2001]. Eine zweite Komponente ist *NKX3.1*, das ein Zielgen des Androgenrezeptors ist [Shen und Abate-Shen, 2003]. Dessen Expression geht häufig, wie oben erwähnt, im Laufe der Progression verloren.

### 1.3 Stammzellen, Krebs und Tumorstammzellen

Der Entdeckung von hämatopoetischen Stammzellen folgte die Identifizierung von adulten Stammzellen in verschiedenen Geweben. Diesen wenigen multipotenten Gewebestammzellen steht eine breite Masse von Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades gegenüber. Hierbei muß eine Balance erhalten werden, durch kontinuierliche Ersetzung seneszenter oder apoptotischer ausdifferenzierter Zellen oder kurzfristige Regeneration nach Verletzungen des Gewebes. Das hierarchische System innerhalb eines Gewebes basiert auf den Stammzellen. Sie sind undifferenziert und multipotent. Obwohl sie unter normalen Bedingungen wenig oder nicht teilungsaktiv sind, besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung und unbegrenztes proliferatives Potential. Ein beteiligter Regulator ist wahrscheinlich das *OCT4*-Gen, dessen Aktivität u.a. durch epigenetische Mechanismen vermittelt wird. Die Plastizität der Stammzellen wird wesentlich von der Umgebung durch Bildung von sog. Stammzell-Nischen beeinflusst. Durch Teilungen gehen über verschiedene Vorläuferzellen schließlich terminal differenzierte Zellen hervor [Miller et al., 2005]. Bei diesem Übergang verändern sich sowohl Morphologie und Funktion der Zelle als auch die Genexpressionsmuster wesentlich. Gene für die Erhaltung von Pluripotenz und Selbsterneuerung müssen abgeschaltet, zelltyp-spezifische Gene aktiviert werden. Die Regulation dieser Expressionsveränderungen wird durch epigenetische Mechanismen vermittelt [Wu and Sun, 2006; Feinberg et al., 2006].

In den letzten Jahren durchgeführte Untersuchungen an Tumorzellen ergaben weitreichende Parallelen zum Stammzell-Phänotyp hinsichtlich Immortalität, Differenzierungsgrads und epigenetischen Status. Für einige tumorassoziierte Signalwege, wie z.B. Notch-, Sonic

Hedgehog- und Wnt-Signalwege, sowie für BMI-1 als Chromatinregulator konnte eine regulative Bedeutung für die Selbsterneuerung von Stammzellen gezeigt werden [Lessard und Sauvageau, 2003; Beachy et al., 2004; Valk-Lingbeek et al., 2004]. Die Annahme, dass die in Tumoren beobachtete DNA-Hypomethylierung nicht zufällig stattfindet und neben repetitiven Elementen auch gezielt Einzelkopiegene betroffen sind, hat sich zunehmend bestätigt [Hoffmann und Schulz, 2005]. Monk und Holding postulierten bereits früher, dass es in Tumorzellen durch die dort gefundenen epigenetischen Veränderungen zur Reexpression früher, embryonaler Gene kommt, die den Tumorzellen einen Stammzell-Phänotyp verleihen [Monk und Holding, 2001]

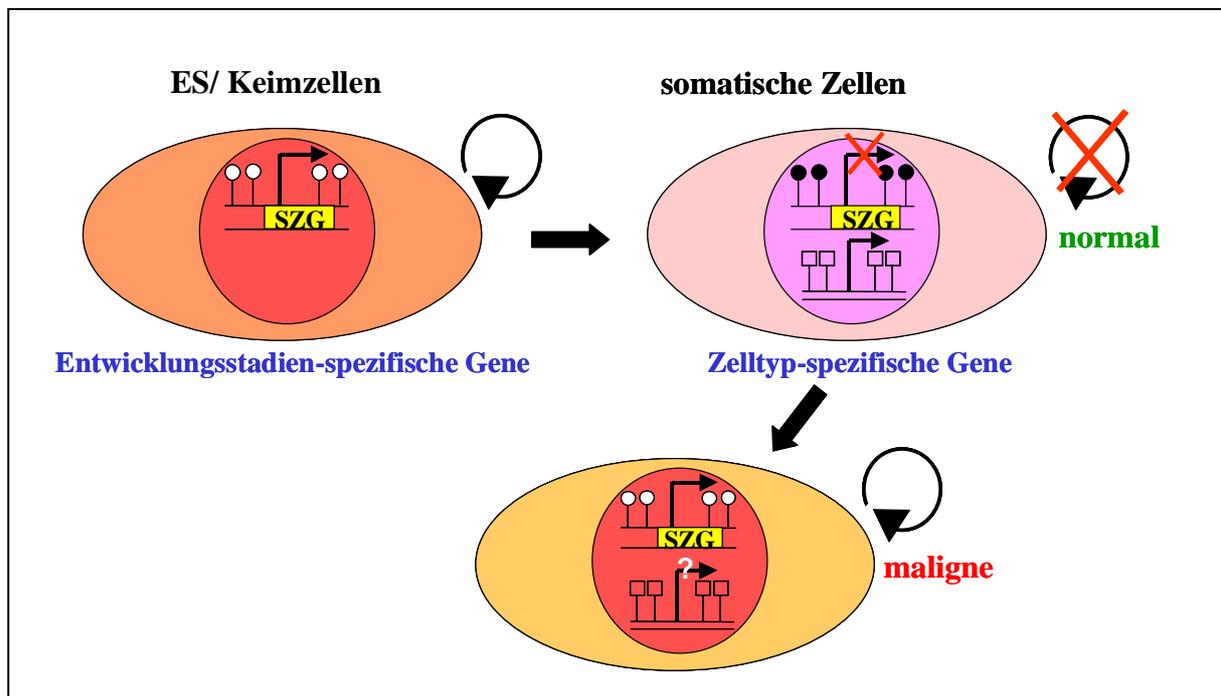


Abb. 1.7: Modell für die Hypothese der Reexpression früherer Gene in Zellen mit Stammzellphänotyp aus soliden Tumoren, SZG: Stammzell-erhaltende Genexpression. Potentielle Kandidatengene sind entwicklungsstadien-spezifisch in embryonalen Stammzellen und Keimzellen exprimiert und bedeutsam für deren Eigenschaften. Im Laufe der Differenzierung werden sie physiologisch durch regulative epigenetische Veränderungen inaktiviert. In Prostatakarzinomen könnte eine genomweite DNA-Hypomethylierung auch diese Gene betreffen und eine Reexpression in vielen Tumorzellen erlauben.

Basierend auf dem Postulat von Monk und Holding stellt Abb. 1.7 ein Modell zur Arbeitshypothese für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit am Prostatakarzinom dar. Demnach werden frühe embryonale Gene, die in Verbindung mit Stammzell-Charakteristika wie Selbsterneuerung und Pluripotenz stehen, im Laufe der Differenzierung von somatischen Zellen durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung abgeschaltet. In diesen Zellen werden von nun an zelltyp-spezifische Gene exprimiert. In transformierten, malignen Zellen ändern sich die Expressionsmuster. Durch im Prostatakarzinom prominente DNA-

Hypomethylierung könnte eine Reaktivierung der Stammzell-erhaltenen Gene induziert werden.

Im selben Jahr stellten Reya et al. eine weitere Hypothese auf, die sich auch auf Parallelen zwischen Stammzellen und Tumorzellen stützt. Diese Hypothese betrachtet aberrante Stammzellen als Ausgangspunkt einer Zellhierarchie in Tumoren [Reya et al., 2001]. Demnach sollte eine deregulierte Selbsterneuerung von Stammzellen zur Tumorentstehung führen und diese jeweiligen Gewebestammzellen den Ausgangspunkt von Transformationen in den verschiedenen Krebsarten bilden (vgl. 4.4). Diese Hypothese basiert auf Beobachtungen, dass bei Leukämien nur eine kleine Subpopulation von Zellen ein unbegrenztes proliferatives Potential aufwies und im Xenograft-Modell immunsupprimierter Mäuse tumorigen war [Bonnet und Dick, 1997]. Weitere Hinweise boten die schlechten Ausbeuten bei der Etablierung von Zelllinien aus Tumorgeweben und die geringe Effizienz, mit der Karzinom-Zelllinien in Xenograft-Modellen Tumore bilden. Die bei verschiedenen Tumorarten beobachtete Heterogenität hinsichtlich des Differenzierungsgrades der Zellen innerhalb eines Tumors, ist mit der Idee einer undifferenzierten Voläufierzelle als Ausgangspunkt der Tumorigenese gut in Einklang zu bringen [Al-Hajj und Clarke, 2004; Polyak und Hahn, 2006].

Inzwischen gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen eine kleine Population dieser mutmaßlichen Tumorstammzellen aus unterschiedlichen soliden Tumoren oder entsprechenden Zelllinien zu isolieren. Da gewebespezifische Stammzell-Marker weitgehend unbekannt sind, wurden für die Isolation zwei verschiedene Verfahren verwendet, die auf der Ausnutzung allgemeiner Stammzeleigenschaften beruhen (vgl. 2.23). Einige Arbeitsgruppen nutzten die Expression des Oberflächenantigens CD133 aus. Dieses wurde ursprünglich auf hämatopoetischen Stammzellen entdeckt. Andere verwendeten zur Isolation den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342. Da Stammzellen über ein spezifisches Transportersystem verfügen, können diese den Farbstoff aktiv herauspumpen, während differenzierte Zellen gefärbt bleiben. Mit diesen Methoden gelang die Isolation u.a. aus Gehirntumoren, Mamma- und Lungenkarzinomen [Singh et al., 2003; Hirschmann-Jax et al., 2004; Yuan et al., 2004; Al-Hajj et al., 2003; Kondo et al., 2004], sowie gastrointestinalen Tumoren [Haraguchi et al., 2006] und Retinoblastomen [Seigel et al., 2005]. Nachdem im Jahr 2004 Stammzellen aus normalem Prostatagewebe isoliert worden waren [Richardson et al., 2004], gelang kürzlich auch die Isolation von Tumorstammzellen aus Prostatatumoren [Collins et al., 2005]. Der Anteil dieser Tumorstammzellen lag meistens nur zwischen 0,01% und 2% aller Tumorzellen. Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential sowie Tumorigenität dieser Zellen wurden jeweils durch funktionelle Analysen bestätigt. Die

Identifizierung dieser Zellen bleibt jedoch schwierig, da keine genaue Charakterisierung der Zellen vorgenommen wurde und bisher keine spezifischen Stammzell-Marker gefunden werden konnten. Eine genaue Untersuchung des Genexpressions-Profiles dieser isolierten Zellen wurde bis dato nicht berichtet.

So konnte trotz dieser deutlichen Hinweise auf ihre Existenz die genaue Herkunft der Tumorstammzellen noch nicht geklärt werden und wird auf Grund verschiedener Modelle kontrovers diskutiert (vgl. 4.4). Ausgangspunkt dieser Debatte ist die Frage, woher die sog. Tumorstammzellen überhaupt ihre Fähigkeiten zur deregulierten Selbsterneuerung erhalten. So gibt es zum einen die Möglichkeit, dass wahre Gewebestammzellen durch Transformationen aberrant werden und durch gesteigerte Proliferation zu einem präneoplastischem Stadium führen, dass durch weitere Aberrationen zunehmend maligne wird. Zum anderen bestünde theoretisch die Möglichkeit, dass eine weiter differenzierte Vorläuferzelle durch Dedifferenzierung die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wieder erlangt [Dean et al., 2005; Bonnet, 2005; Galderisi et al., 2006].

Für die Theorie der direkten Abstammung von einer wahren Stammzelle gibt es zwei häufig zitierte Argumente. Zum einen sind dies die bereits aktivierten Mechanismen zur Selbsterneuerung. Diese müssten dann in der Tumorstammzelle nur aufrecht erhalten werden und wären einfacher zu erlangen als eine Reaktivierung dieses Mechanismus in einer differenzierteren Zelle. Zum anderen überdauern Stammzellen lange Zeitperioden und haben dadurch mehr Gelegenheit Mutationen zu akkumulieren, als reifere kurzlebige Zellen [Bonnet, 2005]. Eine Gegenfrage zum letzten Argument stellte R. Weinberg, der die niedrigere Proliferationsrate von ruhenden Stammzellen zu bedenken gab, die theoretisch weniger Gelegenheit zur Akkumulation einer Vielzahl von Mutationen bietet [4th Heinrich Behr Symposium zu Stem Cells and Cancer, Heidelberg März 2006].

Im Prostatakarzinom ist die Frage nach der Herkunft der Tumorstammzellen durch die Unklarheiten über die Entstehungsmechanismen der verschiedenen Kompartimente des Prostataepithels zusätzlich erschwert.

Das Prostataepithel setzt sich im wesentlichen aus drei verschiedenen Zelltypen zusammen, den Basalzellen, die den äußeren Rand der Drüsentubuli umgeben, den sekretorischen luminalen Zellen, die in das Innere der Drüsen hineinreichen und eingestreuten Neuroendokrinen Zellen. Schon in der normalen Prostata ist die genaue hierarchische Abstammung dieser Zellen von der Gewebestammzelle unklar. Man nimmt an, dass es unter den Basalzellen Stammzellen oder Vorläuferzellen gibt, aus denen durch Teilung und Differenzierung über intermediäre Zellen sekretorische Zellen hervorgehen [van Leenders et

al., 2003]. Sowohl Basalzellen als auch sekretorische Zellen exprimieren Marker, die auch im embryonalen Urogenitalsinus gefunden werden. Dennoch konnten auch spezifische Markermoleküle für jede Differenzierungsstufe gefunden werden [Bui und Reiter, 1998; Tokar et al., 2005]. Während Basalzellen die Cytokeratine CK5 und CK14 und das nukleäre Protein p63 exprimieren, findet man bei sekretorischen Zellen die Cytokeratine CK8 und CK18, den Androgenrezeptor und PSA-Expression. Schwierigkeiten bei der Zuordnung von Stammzellen und die Lokalisation ihrer Nischen innerhalb des Prostatagewebes entstehen weiter durch die Existenz von intermediären Zellen (*transit amplifying cells*), die Marker beider Zellpopulationen exprimieren und proliferieren. Da bis dato kein eindeutiger Prostata-Stammzellmarker gefunden werden konnte, gelang Collins et al. die Isolation von Tumorstammzellen aus Prostatakarzinomen nach längerer Zeit nur mit Hilfe des sonst allgemein verwendeten Oberflächenmarkers CD133 [Collins et al., 2005]. Daher konnte auch im Prostatakarzinom die genaue Abstammung dieser Zellen nicht geklärt werden. Es bleibt offen, ob die Heterogenität der Prostata Tumoren von einer wahren Stammzelle ausgeht, die in viele verschiedene Subtypen differenzieren kann, oder ob Transformationen einer sekretorischen Zelle zu ihrer Dedifferenzierung führen. Entartete, den sekretorischen ähnliche Zellen machen den größten Anteil der Tumormasse aus und Basalzellen können auf Grund der Entartung der Drüsenstruktur nicht mehr identifiziert werden. Das Fehlen von Basalzellmarkern wie Cytokeratin CK5 und CK14 oder p63 wird sogar zur histologischen Diagnostik genutzt (vgl. Abb. 1.8).

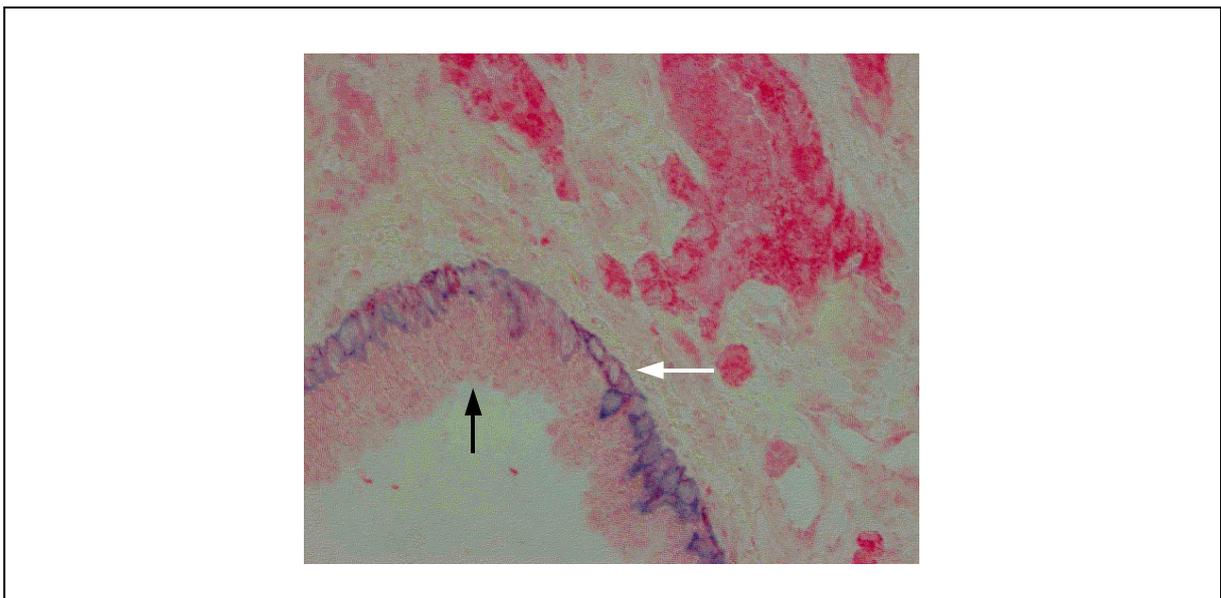


Abb. 1.8: Immunhistochemische Färbung von Prostatakarzinomgewebe. In der unteren linken Bildhälfte befindet sich eine normale Drüse mit deutlichem Lumen. Am äußeren Drüsenrand ist die Basalzellschicht mit einem Antikörper gegen basale Zytokeratine blau angefärbt (weißer Pfeil). Darunter liegen die mit einem Antikörper gegen das cytosolische Signaltransduktionsprotein SPRY2 leicht rosa gefärbten sekretorischen luminalen Zellen (schwarzer Pfeil). Im angrenzenden Tumorgewebe (oben rechts) ist eine klare Drüsenstruktur verloren gegangen und Basalzellen fehlen.

Zusätzliche Fragen hinsichtlich des genauen Modells zu Tumorstammzellen als Ausgangspunkt solider Tumoren werfen die Funde von sehr kleinen Tumorstammzell-Populationen (s.o.) auf. Geht man von einer wahren Stammzelle mit deregulierter Selbsterneuerung als Ausgangspunkt aus, so müsste sich die Population dieser Stammzellen vergrößern und ginge mit einer entsprechenden Überexpression von Genen für die Selbsterneuerung einher (vgl. C in Abb. 4.1). Eine solche Überexpression wurde bei einzelnen Tumorarten gefunden [Dean et al., 2005; Lessard und Sauvageau, 2003]. Bleibt die Stammzell-Population aber klein, müsste sich die Population der intermediären Übergangszellen vergrößern, um die zunehmende Tumormasse zu generieren (vgl. D in Abb. 4.1. D).

Die Charakterisierung von Tumorstammzellen und die damit verbundene mögliche Aufklärung der zugrunde liegenden Transformationsmechanismen sind von entscheidender Bedeutung für die Therapie von Tumorerkrankungen. Da vermutlich residuale Tumorstammzellen, die nicht durch gängige Chemotherapeutika auszulöschen sind, zur Rezidivbildung in einem Zeitraum von mehreren Jahren führen, könnte nur eine Therapie mit einem gezielten Angriff gegen die Tumorstammzellen eine Langzeitheilung ermöglichen. Speziell im Prostatakarzinom vermutet man einen Zusammenhang zwischen Tumorstammzellen und der Entwicklung einer Androgen-Unabhängigkeit [Feldman und Feldman, 2001]. Diese Vermutung beruht u.a. auf ersten Hinweisen auf normale Stammzellen in der Prostata, die sich aus Beobachtungen zum Androgenentzug, z.B. durch Kastration im Rattenmodell und beim Menschen ergaben. Dieser Entzug führte zu einem massiven Größenverlust der Prostata durch Zelltod. Ein kleinerer Anteil von Zellen konnte offensichtlich jedoch auch ohne Androgene überleben und nach Androgengabe eine normal große Prostata mit ihren verschiedenen Zelltypen regenerieren. Da diese normalen Prostata-Stammzellen den Androgenrezeptor nicht exprimieren, könnte dieses auch für Tumorstammzellen gelten und diese dadurch androgen-unabhängig machen [Rizzo et al., 2005]. Sollten die mutmaßlichen Tumorstammzellen Ausgangspunkt der Tumorigenese sein, könnte ein Verbleib solcher Zellen nach einer Therapie zur Ausbildung eines Androgen-resistenten Tumors führen.

Gezielte Ansatzpunkte für einen Angriff gegen Tumorstammzellen könnten z.B. durch Analysen des Expressionsprofils der isolierten Zellen mittels Microarrays aufgedeckt werden.

### Das Pluripotenzgen *OCT4*

Aufgrund der Bedeutung epigenetischer Mechanismen sowohl für Embryonalentwicklung als auch Stammzellerhaltung würde man bei diesen Prozessen eine Beteiligung von Genen erwarten, die durch solche Mechanismen selbst reguliert sind und/ oder Einfluss auf diese ausüben. In diesem Zusammenhang und mit Hinblick auf die Hypothese der Reexpression embryonaler Gene durch Hypomethylierung (vgl. Abb. 1.7) erscheint das Pluripotenzgen *OCT4* besonders interessant. Das auf Chromosom 6p21 lokalisierte *OCT4*-Gen (auch *OCT3/4* genannt) kodiert für einen Faktor, der in unmittelbarem Zusammenhang mit Stammzellerhaltung und epigenetischen Mechanismen steht. *OCT4* ist einer der frühesten in der Embryonalentwicklung exprimierten Transkriptionsfaktoren, der auch als *POU5F1* bekannt ist. Er gilt bei höheren Mammaliern als Masterregulator früher embryonaler Gene. Viele Erkenntnisse über diesen Faktor stammen aus Studien an Mäusen. Das Gen wird zunächst in der inneren Zellmasse des Embryos exprimiert. Dort gilt *Oct4* als Stammzell-Überlebensfaktor, da das genaue Expressionsniveau entscheidend ist für das Schicksal der embryonalen Stammzellen [Gidekel et al., 2003]. Fehlende Expression führt zur Entwicklung zum Trophoektoderm, während Überexpression in einer Differenzierung zu extraembryonalem Endoderm und Mesoderm resultiert [Niwa et al., 2000]. Im Laufe der weiteren Entwicklung wird seine Expression herunterreguliert und auf primordiale Keimzellen beschränkt. Seine Beteiligung am Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung impliziert eine strenge Regulation von *OCT4* selbst. Bei Mäusen wurde gezeigt, dass das Gen während der Embryonalentwicklung durch DNA-Methylierung abgeschaltet wird. Zudem gibt es Hinweise auf weitere regulatorische Elemente, die auch dazu beitragen, das Gen in primordialen Keimzellen vor DNA-Methylierung zu schützen, damit es dort konstitutiv exprimiert werden kann und zur Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustandes beiträgt [Gidekel und Bergman, 2002].

Da nicht alle regulatorischen Regionen von *OCT4* zwischen Mensch und Maus konserviert sind, können nicht alle Erkenntnisse aus Mäusen ohne weiteres auf die menschliche Entwicklung übertragen werden [Nordhoff et al., 2001]. Eine Studie an einer humanen Teratokarzinom-Zelllinie hat gezeigt, dass die putative *OCT4*-Promotorregion dort zunächst unmethyliert ist und nach Induktion der Differenzierung der Zelllinie mittels Retinsäurebehandlung zunehmend methyliert wird [Deb-Rinker et al., 2005]. Während aktivierende Transkriptionsfaktoren die Region verlassen, binden dort Repressorkomplexe.

Wegen seiner Funktion bei der Erhaltung der Pluripotenz von Stammzellen wurde *OCT4* als Kandidat für die Aufrechterhaltung eines ähnlichen Phänotyps in einer Population von

Tumorzellen postuliert [Chambers und Smith, 2004]. Gut untersucht ist die Expression des humanen *OCT4* in Keimzelltumoren. Dort wird es vornehmlich in Seminomen und Embryonalkarzinomen als Untergruppe der Keimzelltumoren exprimiert und ist wahrscheinlich für die Erhaltung des Stammzellcharakters dieser Tumorzellen mit verantwortlich [Loijenga et al., 2003; Jones et al., 2004].

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Die Einführung der PSA-Diagnostik hat die Früherkennung des Prostatakarzinoms (PCa) entscheidend erleichtert. Dennoch verbleiben schwierige Probleme und es ergeben sich Neue. Zum einen sind Sensitivität und Spezifität der PSA-Diagnostik begrenzt, zum anderen bedürfen nicht alle Prostatakarzinome einer definitiven Therapie wie Prostatektomie oder externe Strahlentherapie. Da sich das Prostatakarzinom hinsichtlich molekularer Veränderungen, klinischem Verlauf und Prognose als heterogener Tumor darstellt, fehlen aussagekräftige prognostische Marker, die eine Subgruppierung der Prostatakarzinome erlauben und aggressive Tumoren identifizieren, so dass jeweils angemessene Therapiestrategien eingeschlagen werden können. Anders als bei anderen Tumorarten, hat beim PCa ein Vergleich mit hereditären Formen keine für diesen Zweck brauchbaren Kandidatengene ergeben. So werden diese immer noch auf unterschiedlichen Wegen gesucht (vgl. 1.2).

Eine prominente molekulare Veränderung im Prostatakarzinom stellen Aberrationen in den DNA-Methylierungsmustern dar, die sowohl Hypermethylierung als auch Hypomethylierung umfassen (vgl. 1.2). Die Ursachen bzw. Mechanismen für beide Veränderungen und für ihren zeitlichen Verlauf sind immer noch ungeklärt. Im Laufe der letzten Jahre hat sich eine immer enger werdende Verknüpfung zwischen der DNA-Methylierung und dem Chromatinstatus und damit der transkriptionellen Aktivität von Genen ergeben [Robertson, 2002]. Eine Reihe neuer beteiligter regulierender Faktoren wurde entdeckt und komplexe wechselseitige Interaktionen zwischen DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikationen wurden beschrieben (vgl. 1.1). Ein Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren, die an diesen Interaktionen beteiligt sein können, auf ihre Expression, Regulation und Rolle bei den Methylierungsveränderungen im Prostatakarzinom zu untersuchen. Hierdurch sollten Hinweise auf mögliche Mechanismen der Methylierungsveränderungen erzielt und eventuell Markergene für das Prostatakarzinom gewonnen werden. Zu den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren zählen die Polycomb-Gene *EZH2* und *BMI-1*, die Histondeacetylase SIRT1, die DNA-Methyltransferase DNMT3B, das *Cancer-Testis* Antigen *CTCF* und das Pluripotenzgen *OCT4*.

Während sich differenzierte, somatische Zellen von embryonalen Zellen und Keimzellen hinsichtlich ihres DNA-Methylierungsmusters und Chromatinstatus unterscheiden, können zwischen Tumorzellen und frühen Entwicklungsstadien Parallelen gefunden werden. Im Unterschied zu genetischen Aberrationen sind epigenetische Veränderungen variabel und reversibel und könnten daher wesentlich zur Heterogenität von Tumorzellen innerhalb eines

Tumors beitragen [Ohlsson et al., 2003]. Die Annahme, dass die in Tumoren beobachtete DNA-Hypomethylierung neben repetitiven Elementen auch gezielt Einzelkopiegene betrifft, hat sich zunehmend bestätigt [Hoffmann und Schulz, 2005]. Speziell im Prostatakarzinom stellt sich die Frage, ob eine zunehmende DNA-Hypomethylierung oder andere epigenetische Mechanismen zu der von Monk und Holding postulierten Reexpression von Genen, die Tumorzellen einen undifferenzierten Stammzell-ähnlichen Phänotyp verleihen [Monk und Holding, 2001], führt. Auch unter diesem Aspekt wurden *EZH2*, *BMI-1*, *SIRT1*, *DNMT3B*, *CTCF* und *OCT4* hypothesenorientiert auf Grund ihrer funktionellen Bedeutung für Pluripotenz, Selbsterneuerung und epigenetische Mechanismen als Kandidaten ausgewählt. Die Expression dieser Gene in der Gesamttumormasse von Prostatakarzinomen und ihre Regulation- soweit sinnvoll- sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Erklärungsansätze für den stammzellähnlichen Phänotyp von Tumorzellen wurden von Reya et al. [2001] noch weitergeführt. Ihre Hypothese führte diesen Phänotyp nicht nur auf die Reexpression einzelner Stammzell-erhaltender Gene zurück, sondern postulierte eine Abstammung der Tumorzellen von transformierten Gewebestammzellen (vgl. C in Abb. 4.1 C). Da die Richtigkeit des Modells bis dato nicht bewiesen ist und mutmaßliche isolierte Tumorstammzellen nicht genau spezifiziert sind, ist unklar ob die Herkunft ihrer Stammzeleigenschaften tatsächlich auf der direkten Transformation einer Gewebestammzelle beruht oder auf einem Rückgewinn dieser Eigenschaften durch Dedifferenzierung fortgeschrittenerer Vorläuferzellen. Je nachdem könnte der Anteil von Tumorzellen mit Expression der Kandidatengene stark unterschiedlich sein.

Die Resultate der Analysen von Kandidatengenegen der vorliegenden Arbeit sollten Aufschluss geben über die Richtigkeit der Modelle zur Existenz von Tumorstammzellen und ihrer Herkunft. Die Untersuchung der Expression mutmaßlich beteiligter Faktoren könnte Hinweise auf die der Transformation zugrunde liegenden Mechanismen erbringen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind nicht nur unter grundlegenden tumorbiologischen Fragestellungen von Interesse. Ein verbessertes Verständnis der beteiligten Mechanismen wird dringend für die Optimierung von Antitumor-Therapien benötigt, die auch Tumorstammzellen erfassen und womöglich nur auf diese Weise einen Langzeit-Therapieerfolg ermöglichen werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Humane Zelllinien**

#### 2.1.1 Prostatakarzinom-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene humane Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Diese stammen von der American Type Culture Collection (ATCC). Bei LNCaP handelt es sich um eine Zelllinie aus einer Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Europäers [Horoszewicz et al., 1983]. PC-3 stammt aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Europäers mit einem Grad IV Adenokarzinom [Kaighn et al., 1979]. DU145 resultiert aus einer Gehirnmastase eines 69-jährigen Europäers [Stone et al., 1978]. Die Zelllinie 22Rv1 wurde über ein Xenograft aus Mäusen isoliert [Sramkoski et al., 1999].

#### 2.1.2 Teratokarzinom-Zelllinien

Die Teratokarzinom-Zelllinien TERA-1, TERA-2 [Fogh et al., 1977] und NTERA-2 [Andrews, 1988] wurden jeweils aus Lungenmetastasen von Embryonalkarzinomen eines 47-jährigen bzw. von 22-jährigen Kaukasiern generiert. Alle drei Linien wurden von Dr. Bettina Schmidt, ehemals Urologische Klinik, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie NCCIT entstammt einem Teratokarzinom eines adulten Japaners. Diese wurde freundlicherweise von Dr. R. Löwer, Paul-Ehrlich Institut Langen, bereit gestellt.

#### 2.1.3 Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Bei den untersuchten Harnblasenkarzinom-Zelllinien (TCC-Zelllinien) handelt es sich ausschliesslich um Urothelkarzinom-Zelllinien (vgl. Tab. 2.1). Diese wurden freundlicherweise von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, USA über Herrn Prof. Dr. Schmitz-Dräger und von Dr. M.A. Knowles, ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds, UK zur Verfügung gestellt. Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft.

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Harnblasenkarzinom (TCC)-Zelllinien mit Informationen zum Tumor aus dem sie etabliert wurden (-, Daten nicht sicher bekannt); [Masters et al., 1986; Williams., 1980]

Zelllinie	Tumorstadium	Tumorgrad	Geschlecht des Patienten	Alter des Patienten
5637	-	-	M	68
HT-1376	pT2	G3	W	58
SD	-	-	-	-
VMCub1	-	-	M	-
VMCub2	-	-	-	-
253J	pT4	G4	M	53
SW1710	-	-	W	84
BFTC905	pTa	G3	W	51
BFTC909	-	G3	M	64
RT-4	pT2	G1	M	63
RT-112	-	G2	W	-
647v	pT1	G2	M	59-
639v	-	G3	M	69
J82	pTa	G1-2	M	58
UM-UC3	-	-	M	-

## 2.2 Gewebeproben

Die für die Isolation von DNA und RNA verwendeten Proben der Prostatakarzinome sowie die Normalgewebeproben wurden aus der Gewebebank der Urologischen Klinik, Universität Düsseldorf, bereitgestellt. Sie stammen von Patienten der Urologischen Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf. Die Einwilligung aller Patienten wurde mittels eines Formblatts routinemässig eingeholt, und die Ethikkommission hat über die entsprechenden Projekte positiv entschieden. Alle Gewebe wurden unmittelbar nach Begutachtung durch einen Pathologen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Eine Auflistung der verwendeten Gewebeproben mit entsprechendem pathologischem Befund gibt die nachfolgende Tabelle.

Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Prostatagewebeproben mit zugehörigem pathologischem Befund (PT: Prostatatumor).

Proben	Alter	Tumorstadium	Lymphknotenstadium	Metastasen	Gleason-Summe
PT 36	72	pT3b	pN0	M0	7
PT 38	75	pT2b	pN0	M0	7
PT 50	67	pT3b	pN1	M0	7
PT 65	62	pT3b	pN0	M0	7
PT 83	76	pT3b	pN0	M0	7
PT 89	68	pT2b	pN0	M0	3
PT 93	73	pT3b	pN0	M0	7
PT 95	74	pT3b	pN1	M0	10
PT 97	71	pT3a	pN0	M0	7
PT 99	67	pT2b	pN0	M0	5
PT 101	68	pT3a	pN0	M0	8
PT 105	59	pT3a	pN0	M0	5
PT 107	59	pT3a	pN0	M0	7
PT 117	68	pT3b	pN0	M0	5
PT 119	63	pT3b	pN1	M0	9
PT 121	65	pT2b	pN0	M0	6
PT 127	71	pT2b	pN0	M0	6
PT 133	72	pT2b	pN1	M0	7
PT 139	65	pT3b	pN1	M0	9
PT 141	69	pT2b	pN0	M0	4
PT 145	70	pT4	pN1	M0	7
PT 161	64	pT2b	pN0	M0	5
PT 163	65	pT3a	pN1	M0	5
PT 169	72	pT3a	pN0	M0	7
PT 171	61	pT2b	pN0	M0	5
PT 175	73	pT2b	pN0	M0	8
PT 183	67	pT3a	pN0	M0	6
PT 187	68	pT2b	pN0	M0	8
PT 189	63	pT2b	pN0	M0	7
PT 191	72	pT2b	pN0	M0	7
PT 205	73	pT3a	pN0	M0	7
PT 213	59	pT2a	pN0	M0	7
PT 215	58	pT3a	pN0	M0	7
PT 217	62	pT2b	pN0	M0	8
PT 219	64	pT4	pN0	M0	7
PT 225	62	pT3b	pN0	M0	6
PT 227	72	pT2a	pN1	M0	7
PT 230	68	pT2a	pN0	M0	7
PT 232	70	pT2b	pN1	M0	7
PT 236	74	pT3a	pN0	M0	7
PT 238	62	pT2a	pN0	M0	6
PT 245	66	pT3a	pN0	M0	7
PT 247	55	pT3b	pN1	M0	7
PT 253	61	pT3a	pN1	M0	7
PT 256	71	pT3b	pN0	M0	7

Außerdem flossen 7 Proben aus normalem Prostatagewebe von Patienten im Alter von 55 bis 73 Jahren in die Analysen ein. Hiervon entstammten alle Proben einer Prostatektomie. Das entnommene Gewebe lag möglichst weit von tumorösem Material entfernt und wurde von einem Pathologen entnommen.

In der Primärzellkultur wurden normale Uroepithelzellen kultiviert. Das Ausgangsmaterial hierfür stammte aus jeweils einem Harnleitersegment, das Patienten der Urologischen Klinik während Nephrektomien entnommen wurden. Auch für diese Proben liegt das Einverständnis der Patienten und der Ethikkommission vor.

Die verwendeten Ejakulatproben wurden freundlicherweise von Dr. Kruse, andrologische Abteilung der Hautklinik, zur Verfügung gestellt.

### 2.3 Vektoren und Konstrukte

Folgende Plasmide kamen zum Einsatz

- |                                  |             |                            |
|----------------------------------|-------------|----------------------------|
| • pGL3-Basic                     | Promega     | Mannheim                   |
| • pBluescript II KS +            | Stratagene  | Californien, USA           |
| • pCR <sup>®</sup> 4-TOPO        | Invitrogen  | Mannheim                   |
| • pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO      | Invitrogen  | Mannheim                   |
| • pReceiverM03                   | Genecopoeia | Maryland, USA              |
| • pRL-TK                         | Promega     | Mannheim                   |
| • p850                           |             | Steinhoff and Schulz, 2003 |
| • CTCFL-GFP-Expressionskonstrukt |             |                            |
|                                  | Genecopoeia | Maryland, USA              |
| • CTCFL Promotor/pGL3-Konstrukt  |             | diese Arbeit               |

### 2.4 Bakterienstämme

Während der Transformation kompetenter Bakterien wurden folgende *E.coli*-Stämme eingesetzt:

- |  |                             |                             |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| • One Shot <sup>®</sup> TOP10          | Invitrogen                  | Mannheim                    |
| • One Shot <sup>®</sup> TOP 10 F'      | Invitrogen                  | Mannheim                    |
| • Epicurian Coli <sup>®</sup> XL2-Blue |                             |                             |
|  | MRF' ultrakompetente Zellen | Stratagene Californien, USA |

## 2.5 Chemikalien

• Acrylamid 37,5:1 30%	AppliChem	Darmstadt
• Agarose	Sigma-Aldrich	Steinheim
• Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• Aprotinin	Calbiochem	Darmstadt
• 6 x Auftragspuffer	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot
• 5-Aza-2`-Desoxycytidin	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• Cholera toxin	Calbiochem	Darmstadt
• Collagen	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• Cycloheximid	AppliChem	Darmstadt
• 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT)	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• DMSO	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• DNA-Längenstandards	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot
• dNTP-Mix	PeqLab	Erlangen
• FACSFlow™	BD Biosciences	Heidelberg
• Fötale Kälberserum	Seromed Biochrom	Deisenhofen
• Fugene 6 Transfektions-Reagenz	Roche	Mannheim
• Geneticinsulfat (G418)	Gibco BRL	Paisley, Schottland
• HEPES	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• HiPerFect	Qiagen	Hilden
• Hoechst 33342	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• IPTG	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• Luria Agar	Becton, Dickinson	Sparks,MD, USA
• Luria Broth Base	Gibco BRL	Paisley, Schottland
• Magermilchpulver	Trade Service Int.	Zewen
• Oligo (dT15)	Roche	Mannheim
• PBS	Biochrom	Berlin
• Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
• Protein-Auftragspuffer	Fermentas	St.- Leon-Rot
• Proteinase Inhibitor-Mix	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen

• Protein-Marker	PeqLab	Erlangen
• Random Primer	Roche	Mannheim
• RNAI-Marker	Boehringer	Mannheim
• SAHA	Biomol	Hamburg
• Sigma Blocker	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• Stop Loading buffer	Amersham Pharmacia	Freiburg
• TAE, SSC	Eppendorf	Hamburg
• Trypsin/EDTA	Biochrom	Berlin
• Trypsininhibitor	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
• Tween 20	SERVA	Heidelberg
• Vectashield	Vector	Californien, USA
• Versene	Gibco BRL	Paisley, Schottland
• X-Gal	Boehringer	Mannheim
• Zellkulturmedien	Gibco BRL	Paisley, Schottland

Alle weiteren Chemikalien wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

## 2.6 Enzyme

• DyNazyme <sup>TM</sup> II DNA-Polymerase	Finnzyme OY über Biometra	Espoo, Finnland Göttingen
• HotStarTaq-DNA-Polymerase	QIAGEN	Hilden
• Klenow Fragment	Roche	Mannheim
• LightCycler® FastStartDNA Master <sup>Plus</sup> SYBR Green I	Roche	Mannheim
• LightCycler® FastStartDNA Master <sup>Plus</sup> HybProbe	Roche	Mannheim
• Proteinase K	Qiagen	Hilden
• QuantiTect <sup>TM</sup> SYBR® Green PCR Kit	Qiagen	Hilden
• Restriktionsendonukleasen	Roche	Mannheim
	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot
• Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot

- |                                 |               |               |
|---------------------------------|---------------|---------------|
| • Shrimp Alkalische Phosphatase | Roche         | Mannheim      |
| • Superscript                   | Invitrogen    | Mannheim      |
| • T4-DNA-Ligase                 | Roche         | Mannheim      |
|                                 | MBI Fermentas | St.- Leon-Rot |
| • T4 DNA Polymerase             | MBI Fermentas | St.- Leon-Rot |

## 2.7 Antikörper

- |  |                       |                   |
|--|-----------------------|-------------------|
| • anti- $\alpha$ -Tubulin                                  | Sigma Aldrich Chemie  | Deisenhofen       |
| • anti-BMI-1   | Abgent                | Californien, USA  |
| • anti-BMI-1   | Prof. A.P. Otte       | Amsterdam, NL     |
| • anti-c-Myc   | Santa Cruz            | Heidelberg        |
| • anti CTCF  | Abcam                 | Cambridge, UK     |
| • anti-CTCF  | BD Biosciences        | Heidelberg        |
| • anti-CTCFL   | Abcam                 | Cambridge, UK     |
| • anti-EZH2  | Upstate               | Dundee, UK        |
| • anti-RNAPoIII  | Abcam                 | Cambridge, UK     |
| • anti-CD133 (293C3)-PE                                    | Miltenyi              | Bergisch-Gladbach |
| • Cy3-anti-Maus  | JacksonImmunoResearch | Cambridgeshire,UK |
| • FITC-anti-Kanninchen                                     | JacksonImmunoResearch | Cambridgeshire,UK |
| • HRP-conjugiert Ziege-anti-Maus/<br>Ziege-anti-Kanninchen | Santa Cruz            | Heidelberg        |
| • Alexa 488-anti Kanninchen                                | Invitrogen            | Mannheim          |

## 2.8 Molekularbiologische Kits

- |  |         |          |
|--|---------|----------|
| • BCA <sup>TM</sup> Protein Assay                    | Pierce  | Bonn     |
| • Blood & Cell Culture<br>DNA Midi Kit               | Qiagen  | Hilden   |
| • BrdU Cell Proliferation ELISA                      | Roche   | Mannheim |
| • CellTiter-Glo®<br>Luminescent Cell Viability Assay | Promega | Mannheim |
| • CpGenome <sup>TM</sup>                             |         |          |

	DNA Modification Kit	Q-Biogene	Heidelberg
•	Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega	Mannheim
•	ECL Western Blot Analysis System	Amersham	Freiburg
•	Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf	Hamburg
•	MinElute™ Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
•	QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Hilden
•	RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden
•	RNeasy® Micro Kit	Qiagen	Hilden
•	TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen	Groningen, Holland

## 2.9 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.9.1 Bakterienmedien, autoklaviert

#### LB-Medium :

25 g Luria Broth Base  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

#### LB-Agar:

30,5 g Luria Agar Base  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O  
nach Abkühlen entsprechend Antibiotikum zugeben

#### 2 x YT-Medium:

16 g Trypton  
10 g Hefe Extrakt  
5 g NaCl  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

### 2.9.2 Standardlösungen

#### DEPC-H<sub>2</sub>O:

0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in dH<sub>2</sub>O,  
mind. 4 h bei RT rühren lassen, autoklavieren

#### Ethidiumbromid-Lösung:

0,5 mg/ml Ethidiumbromid

MTT-Lösung:

5 mg/ml MTT in PBS,  
steril filtriert

MTT-Lysispuffer:

0,6% Eisessig  
10% SDS  
in DMSO

PBS, pH 7,2:

137,0 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

TE-Puffer:

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

Trypsininhibitor:

0,5 mg/ml in PBS

## 2.9.3 Lösungen Western-Blot-Analyse

RIPA-Puffer, pH 7,4:

50 mM Tris-Base  
150 mM NaCl  
1% Nonidet P40  
0,5% Na-Desoxycholat  
0,1% SDS  
10 mM NaF  
10 mM Na-Pyrophosphat  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA  
1 mM Na-Vanadat  
20 mM  $\beta$ -Glyzerophosphat  
1 Tablette Proteaseinhibitorcocktail pro 10 ml  
(Zugabe vor Gebrauch)  
Lagerung bei -20°C

HB-Puffer:

10 mM Tris-Base, pH 7,3  
10 mM KCl  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
4  $\mu$ l/ml Proteinase Inhibitor Mix (Sigma P8340)

Lysis-Puffer:

HB-Puffer + 0,4% NP-40

Puffer C:

20 mM HEPES, pH 7,9  
400 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM DTT  
4 µl/ml Proteinase Inhibitor Mix

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

5,9 ml dH<sub>2</sub>O  
5 ml Acrylamid 37,5:1, 30%  
3,8 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8  
150 µl 10% SDS  
150 µl 10% APS  
6 µl TEMED

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

0,75 g Saccharose  
3,2 ml dH<sub>2</sub>O  
0,883 ml Acrylamid 37,5:1, 30%  
0,333 ml 1 M Tris pH 6,8  
50 µl 10% SDS  
33 µl 10% APS  
3,3 µl TEMED

Laufpuffer :

28,4 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1% SDS  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Western-Blot-Puffer, pH 8,3:

25 mM Tris-Base  
150 mM Glycin  
10% Methanol

Blockpuffer:

5% Magermilchpulver in PBS

Antikörper-Lösungen:

0,1% Tween 20 in PBS  
1% Magermilchpulver  
entsprechende Verdünnung des Antikörpers

Waschlösung:

0,1% Tween 20 in PBS

Stripping-Lösung:10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

2% SDS

62,5 mM Tris HCl pH 6,8

## 2.9.4 Lösungen Immuncytochemie

TBS-Puffer, pH 7,4:

165 mM NaCl

50 mM Tris

Saponin:

5 mg/ml in TBS

Natrium-Borhydrid:

1 mg/ml in TBS

Evansblue-Färbelösung:

1% in PBS

## 2.9.5 Spezielle Materialien und Geräte

- |                               |                      |               |
|-------------------------------|----------------------|---------------|
| • AbiPrism377                 | Applied Biosystems   | Darmstadt     |
| • Agilent Chip                | Agilent Technologies | Waldbronn     |
| • Cytomics FC 500             | Beckman Coulter      | Krefeld       |
| • ELISA Easy Reader           | SLT-Labinstruments   | Österreich    |
| • EASY-CAST <sup>TM</sup>     |                      |               |
| Elektrophoresis Systems       | Owl Scientific       | USA           |
| • FACSCalibur                 | Becton Dickinson     | Heidelberg    |
| • Gel Print 2000i             | MWG-Biotech          | Ebersberg     |
| • Hyperfilm ECL               | Amersham Pharmacia   | Freiburg      |
| • Immobilon <sup>TM</sup> -P  | Millipore            | Bedford, USA  |
| • LightCycler II              | Roche                | Mannheim      |
| • Mikroskop Eclipse E 400     | Nikon                | Düsseldorf    |
| • Mikroskop Eclipse TE 2000-S | Nikon                | Düsseldorf    |
| • Mini-V8.10 Vertical         |                      |               |
| Gel Electrophoresis System    | Biometra             | Göttingen     |
| • MiniLumat LB9506            | Berthold             | Bundoor, Vic, |

		Australien
• Nanodrop	Nanodrop Technologies	Wilmington, DE, USA
• pH-Meter	WTW	Weilheim
• Power Supply	Biometra	Göttingen
• Spektralphotometer	Eppendorf	Köln
• Sterilfilter	Millipore	Eschborn
• T3 ThermoCycler	Biometra	Göttingen
• Trio Thermoblock	Biometra	Göttingen
• Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac	Turku, Finland
• Whatman Filterpapier	Whatman	Maidstone, UK

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammten von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Falcon/Becton Dickinson (Meylen Cedex, Frankreich) und Nunc (Rokkilde, Dänemark). Zentrifugen der Firmen Eppendorf und Beckmann standen zur Verfügung.

## 2.10 Software

### 2.10.1 Programme

- Genesis 1.0
- Lucia G Version 4.80
- ACT-1
- SPSS 12.0
- Reference Manager 10.0

### 2.10.2 Datenbanken

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.ensemble.org>
- <http://expasy.org/sprot>
- <http://www.atcc.org>

## 2.11 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Genspezifische siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen, die Negativkontrolle (non targeting) von der Firma Qiagen.

Tab. 2.3: verwendete Oligonukleotide für RT-PCR-Analysen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	TM	Amplifikat	Verwendung	Referenz
CTCFL fwd	CAGGCCCTACAAGTGTAAACGACTGCAA	66,5 °C	270 bp	CTCFL-Expression	Loukinov et al., 2002  eigen
CTCFL rev	GCATTCGTAAGGCTTCTCACCTGAGTG	66,5 °C			
CTCFL Sonde	AGTAAATTGAAGCGCCATGTCCGATC	63,2 °C			
CTCF fwd	TCGCAAGTGGACACCCAAATC	59,8 °C	175 bp	CTCF-Expression	Loukinov et al., 2002
CTCF rev	GAACCCATTCAGGGGAAAAGC	59,8 °C			
OCT4 fwd	GGTATTCAGCAAACGACCATC	60,3 °C	540 bp	OCT4-Expression	eigen
OCT4 rev	TGGGAGAGCCCAGAGTGGTGAC	65,8 °C			
EZH2 fwd	GCCAGACTGGGAAGAAATCTG	59,8 °C	276 bp	EZH2-Expression	eigen
EZH2 rev	TGTGTTGGAAAATCCAAGTCA	54,0 °C			
BMI-1 fwd	AGCAGCAATGACTGTGATGCACTTA	61,3 °C	244 bp	BMI-1-Expression	eigen
BMI-1 rev	GTTCTCCAGCATTGTGTCAGTCCATC	63,0 °C			
DNMT3B fwd	GACTTGGTGATTGGCGGAA	56,7 °C	270 bp	DNMT3B-Expression	Kimura et al., 2003
DNMT3B rev	GGCCCTGTGAGCAGCAGA	60,5 °C			
p21	GTGAGCGATGGAACCTTCGAC	59,4 °C	325 bp	p21-Expression	eigen
p21	TTCCTCTTGAGAAGATCAGC	57,9 °C			
Aktin 661 fwd	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	72,2 °C	661 bp	Aktin-Expression	Schmidt et al., 2001
Aktin 661 rev	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG	70,9 °C			
GAPDH350 fwd	TCCCATCACCATCTTCCA	53,7 °C	350 bp	GAPDH-Expression	Schmidt et al., 2001
GAPDH350 rev	CATCACGCCACAGTTCC	56,0 °C			
CK18 fwd	AGTCTGTGAGAACGACATCC	67,2 °C	312 bp	CK18-Expression	eigen
CK18 rev	TGGTGCTCTCTCAATCTGC	65,1 °C			

Tab. 2.4: verwendete Oligonukleotide für Promotoranalysen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	TM	Amplifikat	Verwendung	Referenz
CTCFL Promhyp fwd	GAGGAGAGTAGGTGGGTTTGA	59, °C	163 bp	Bisulfitsequenzierung	eigen
CTCFL Promhyp rev	CACTACCACCCTCCACTCTC	61,4 °C			
OCT 4 Promhyp fwd2	AAGTTTTTGTGGGGGATTTGTAT	55,3 °C	185 bp	Bisulfitsequenzierung	Deb-Rinker et al., 2005
OCT 4 Promhyp rev2	CCACCCACTAACCTTAACCTCTA	60,6 °C			
CTCFL PromKlon fwd	CCAGTATCTCAGTGCCTCCTG	61,8 °C	557 bp	Promotorkonstrukt <i>in vitro</i> Methylierung	eigen
CTCFL PromKlon rev	CTGCCTCGTGCACCGCGTG	65,3 °C			

Tab. 2.5: verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	TM	Verwendung	Referenz
CTCFL Konstr1 fwd	ACCATGGCAGCCACTGAGATCTC	64,2 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL Konstr2 fwd	CGCAAGAGATGGAGGTGTTGCAG	64,2 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL Konstr3 fwd	CCTTCCGTACGGTCACTCTGCTG	66,0 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL Konstr4 fwd	CTACGTGTGCATATGCGCAAC	59,8 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL Konstr5 fwd	CATCCTGAAGGAAGCCACAAAG	60,3 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL Konstr6 rev	GTCAGGATGTACTTCTCGCTC	59,8 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL KonstrD2rev	TCTGAGCAATTCACCAAGATC	55,9 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL KonstrE2rev	GCAGCAGTGTGTGGCCATTAG	61,8 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
CTCFL KonstrF2rev	GAACCTTCCACTGTGATGTCTG	60,3 °C	CTCFL-GFP Expressionskonstrukt	eigen
Seq pG13Basic fwd	CAGTGCAAGTGCAGGTGCCAG	63,7 °C	CTCFL-Promotorkonstrukt	eigen
Seq pG13Basic rev	TCCATCTTCCAGCGGATAGAATG	60,6 °C	CTCFL-Promotorkonstrukt	eigen
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	64,0 °C	Plasmid-Sequenzierung	Promega
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	53,2 °C	Plasmid-Sequenzierung	Promega
M13 fwd	CACGACGTTGTAACGAC	54,5 °C	Plasmid-Sequenzierung	Promega

## 2.12 Umgang mit Bakterienzellen

### 2.12.1 Kultur von *E.coli*-Zellen

Die Anzucht der Bakterienstämme wurde in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) für 16-18 h vorgenommen. Die Selektion von Plasmid-transformierten Bakterien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) zum Medium.

Zur vorübergehenden Sicherung sowie zur erneuten Anzucht von Gefrierkulturen wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten (50 µg/ml Ampicillin; LB<sub>Amp</sub>) in 10 cm-Schalen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone konnten danach in LB<sub>AMP</sub>-Medium kultiviert werden.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurden 850 µl einer frischen Bakterienkultur mit 170 µl 87%-igen Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt und anschliessend als 15%-ige Glycerinlösung bei -70 °C gelagert.

### 2.12.2 Plasmidpräparationen

Für eine Plasmidpräparation im Mini-Format wurden 4 ml-Kulturen einzelner Klone angesetzt (50 µg/ml Ampicillin). Nach Inkubation bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) über Nacht wurden 2 ml der Mini-Kultur zur Präparation der Plasmid-DNA mit Hilfe des Eppendorf Fast Plasmid Mini Kits eingesetzt. Diese erfolgte nach Herstellerangaben über alkalische Lyse und Säulenaffinitätschromatographie.

Für eine Plasmidpräparation im Maxi-Format wurden aus einer 4 ml über-Tag-Kultur (8 h) 500 µl für eine 250 ml über-Nacht-Kultur eingesetzt (50 µg/ml Ampicillin). Die komplette über-Nacht-Kultur wurde zur Präparation der Plasmid-DNA mit dem QIAfilter® Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die DNA-Konzentration sowie die Reinheit der Präparationen wurden photometrisch bestimmt. Zur Verifizierung der präparierten Plasmid-DNA wurde eine Restriktionsverdau (vgl. 2.13.1) mit anschliessender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Hochdurchsatz-Plasmidpräparationen für anschliessende Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit erledigt. Zur Vorbereitung wurden jeweils 1,2 ml YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) pro Well einer speziellen 96-Well-Platte (Qiagen) verteilt. Anschliessend wurde jedes Well mit einem einzelnen Klon angeimpft. Die luftdurchlässig verschlossene Platte wurde für 24 h bei 325 rpm bei 36 °C inkubiert. Plasmidpräparation und Sequenzierung (vgl. 2.19.3) wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) übernommen.

## 2.13 Klonierung

### 2.13.1 Verdau von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Zur Untersuchung der gewonnenen Plasmid-DNA bzw. zur Isolierung definierter DNA-Fragmente wurden 1 µg bzw. 5 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonucleasen in 4-5-fachem Überschuss (4-5 U/µg DNA) in einen 20 µl-Ansatz gegeben. Der zugehörige Restriktionspuffer wurde einfach eingesetzt. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde der Restriktionsverdau mit 6 x Ladepuffer gestoppt und auf einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Klonierungen vorgenommen:

- CTCFL-Promotor/pGL3Basic; zur Herstellung dieses Konstrukts wurde eine Teilsequenz des *CTCFL*-Promotors (557 bp), die zuvor mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits in den pCR2.1-TOPO-Vektor inseriert worden war, mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* herausgeschnitten und in den pGL3-Vektor eingefügt. Dieses Konstrukt wurde später zur Transfektion von Zellen eingesetzt um die Aktivität des *CTCFL*-Promotors in verschiedenen Zelllinien unter Einfluss von *in vitro*-Methylierung zu analysieren.
- pReceiverMO3; zur Untersuchung der Effekte einer *CTCFL*-Überexpression wurde ein kommerzielles Expressionkonstrukt benutzt, welches den kompletten ORF mit einem GFP-Anhang in einem Expressionsvektor beinhaltet. Bei der Transfektion wurde als Kontrolle der leere Vektor transfiziert. Hierfür wurde zuvor der ORF mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* herausgeschnitten.

### 2.13.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschten PCR- oder DNA-Fragmente zur weiteren Klonierung wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des MinElute Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben isoliert. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

### 2.13.3 Auffüllreaktion

Um den leeren pReceiverMO3-Vektor zu religieren, wurden zunächst die überhängenden 5'-Enden aufgefüllt. Für die Reaktion wurde 1 µg Plasmid-DNA in einen 20 µl-Ansatz eingesetzt. Zusammen mit einfach eingesetztem Puffer, 2 mM dNTPs und 1 U T4 DNA Polymerase wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Ansatz wurde direkt weiter verwendet für die Ligationen mit glatten Enden (vgl. 2.13.4).

#### 2.13.4 Ligation

Für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt, die durch das Knüpfen kovalenter Phosphodiesterbindungen zwischen den freien gegensträngigen 3'- und 5'-OH-Gruppen doppelsträngige DNA-Enden verbindet. Für einen Ligationsansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 100 ng linearisierte Vektor-DNA, 1 U T4-DNA-Ligase (Roche), 2 µl Ligase-Puffer [10x] und 50-100 ng isolierte Insert-DNA über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für die Ligation des pReceiverMO3-Vektors mit glatten Enden wurde der komplette Ansatz der Auffüllreaktion (vgl. 0) verwendet. Diesem wurde einfach eingesetzter Enzympuffer, PEG (5%) und 5 U T4-Ligase (Fermentas) zugesetzt. Nach 1 h bei 22 °C und 10 min bei 65 °C zur Enzyminaktivierung wurden 30 ng DNA aus dem Ligationsansatz zur Transformation eingesetzt.

#### 2.13.5 Transformation von ultrakompetenten Zellen

Die Epicurian Coli<sup>®</sup>XL2-Blue MRF<sup>™</sup> ultrakompetenten Zellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur effektiven Aufnahme von Fremd-DNA aus. Jedes Aliquot (70 µl) wurde mit 1 µl β-Mercaptoethanol (Endkonzentration 25 mM) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Aus dem Ligationsansatz wurden 30 ng Fremd-DNA pro Aliquot hinzugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in kompetente Zellen während der Transformation wird durch einen kurzzeitigen Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C erreicht. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden jedem Aliquot 450 µl auf 42 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt und die Zellen 1 h bei 37 °C bei 250 rpm geschüttelt. Anschliessend wurden 100 und 250 µl der Bakteriensuspension auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.13.6 Blau-Weiss-Selektion

Zur Identifizierung positiver Klone nach Transformationen wurde teilweise eine Blau-Weiss-Selektion benutzt. Bei Verwendung von TOP10 F'-Zellen wurde hierfür vor dem Ausplattieren 40 µl einer 2%-igen X-Gal-Lösung und 7 µl einer 20%-igen IPTG-Lösung auf die Platte aufgebracht. Die beiden Komponenten dienen als Substrat bzw. Induktor für das β-Galactosidase-Gen, dessen Expression zur Blaufärbung von Klonen ohne Insert führt. Diese Zellen zeichnen sich durch ein enthaltenes Episom aus, welches dazu führt, dass inserierte, u.U. toxische Sequenzen nicht exprimiert werden. Außerdem enthalten sie einen Repressor des *LacZ*-Gens, welcher die Induktion durch IPTG erfordert. Bei normalen TOP10-Zellen ist

das *LacZ*-Gen konstitutiv aktiv, so dass zur Blau-Weiss-Selektion nur X-Gal hinzugegeben werden muss. Nach Inkubation über Nacht können positive, weiße Klone von negativen, blau gefärbten unterschieden werden.

### 2.13.7 Klonierung von PCR-Produkten

Bei der PCR-Reaktion hängt die Taq-Polymerase häufig ein zusätzliches Adenosin-Nukleotid an das 3'-Ende eines neu synthetisierten DNA-Stranges an. Dieses wird beim TOPO TA Klonierungs Kit zur Klonierung von PCR-Produkten genutzt, da der enthaltene Klonierungsvektor einen komplementären Thymidin-Überhang aufweist.

Für die Klonierung eines PCR-Produktes muss dieses zunächst nach der Agarose-Gelelektrophorese isoliert werden (vgl. 2.13.2). Von dem frischen Eluat wurden 2 µl zur Ligation mit 10 ng Vektor, 120 mM NaCl und 6 mM MgCl<sub>2</sub> in einen Ansatz von 10 µl eingesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Für die anschließende Transformation von One Shot<sup>®</sup>TOP10- bzw. One Shot<sup>®</sup>TOP10 F'-Bakterienzellen mittels Hitzeschock (vgl. 2.13.5) wurden 2 µl des Ligationsansatzes verwendet.

## 2.14 Kultivierung humaner Zellen

### 2.14.1 Kultivierung von Prostatakarzinom-Zellen

Die Prostatakarzinom-Zelllinien wurden in RPMI Medium mit 10% hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum (FCS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (1% Pen/Strep) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. In 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit je 12 ml Medium wuchsen sie adhärent und wurden alle 2-4 Tage 1:8 passagiert. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums kurz mit PBS gewaschen und anschliessend bis zu 5 min mit Trypsin/EDTA [0,2% /0,05%] bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden sie in 5 ml frischem Medium/FCS aufgenommen und 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 8 ml frischem Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurde 1 ml in eine neue Flasche mit vorgelegtem Medium überführt.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurden die Zellen zunächst, wie zur Passage, gewaschen, abgelöst und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden sie in 1 ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO resuspendiert und in 2 ml-Kryoröhrchen überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen für 3-4 h bei -20°C, danach für 24 h bei -70°C eingefroren. Schliesslich wurden sie dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden sie möglichst kurz bei 37 °C inkubiert, dann in 10 ml Medium aufgenommen und nach 5-minütiger Zentrifugation bei 400 x g der Überstand abgesaugt. Das in frischem Medium resuspendierte Pellet wurde in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmässig auf eventuelle Kontamination von Mykoplasmen getestet.

#### 2.14.2 Kultivierung von Teratokarzinom-Zellen

Die Teratokarzinom-Zelllinien wurden in Analogie zu den Prostatakarzinom-Zellen kultiviert (vgl. 2.14.1). Die Zelllinie NCCIT wurde in RPMI Medium gehalten, die Zelllinien TERA-1 und TERA-2 in McCoy's Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Pen/Strep.

#### 2.14.3 Kultivierung von Urothelkarzinom-Zellen

Die Urothelkarzinom-Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit stabilisiertem Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Pen/Strep kultiviert. Kultur, Passage und Behandlung der Zellen mit Inhibitoren erfolgten wie unter 2.14.1 beschrieben.

#### 2.14.4 Primärzellkultur

Zum Anlegen einer Zellkultur von normalen Uroepithelzellen aus einer Ureter-Probe wurde das Präparat in einer Petrischale zweimal mit Waschpuffer (PBS/ 0,1% EDTA/ 0,33 KU Aprotinin/ 0,01 M HEPES) gewaschen. Nach Entfernung von Geweberesten mit einem sterilen Präparierbesteck wurde das Ureterstück in einer neuen Petrischale gewaschen. Der Länge nach aufgeschnitten wurde der Ureter, mit der Epithelseite nach oben, über Nacht in Waschpuffer bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung von mittelgroßen Zellkulturflaschen wurden diese jeweils mit 12 ml PBS gefüllt, eine Kollagenlösung (0,02 mg/ml) zugesetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch der Flaschen am nächsten Tag wurden diese einmal mit PBS gewaschen.

Am zweiten Tag wurde das Präparat zweimal mit Keratinocyten-SFM-Vollmedium (5% Pen/Strep, 0,03 µg/ml Cholera-toxin) gewaschen und unter dem Binokular mit 2 sterilen Glas-Pasteurpipetten die Epithelzellen abgestreift. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in KSFM resuspendiert und, je nach Pelletgröße, auf zwei bis drei mittelgroße vorbehandelte Zellkulturflaschen verteilt. Am dritten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

Bevor die normalen Uroepithel-Zellen für Experimente eingesetzt wurden, wurden diese zunächst einmal passagiert, um sie von Fibroblasten zu bereinigen. Hierzu wurden die Zellen

mit PBS gewaschen, 1 min mit 3 ml Versene inkubiert und anschliessend unter Beobachtung solange mit Trypsin/EDTA [0,2% / 0,05%] inkubiert, bis sich zuerst die Fibroblasten ablösen und abgesaugt werden konnten. Nach einer erneuten Inkubation mit 3 ml frischem Trypsin/EDTA wurde die Reaktion mit 3 ml Trypsininhibitor gestoppt und die Zellen 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Je nach Pelletgröße wurde die Zellsuspension auf mehrere mittelgroße unbehandelte Zellkulturflaschen verteilt.

#### 2.14.5 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Zur Behandlung sämtlicher Zelllinien unterschiedlicher Gewebeabstammung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-aza-dC), einem Inhibitor der DNA-Methylierung, wurden diese 3 Tage in Medium mit 2  $\mu$ M 5-aza-dC kultiviert. 5-aza-dC wurde täglich frisch zugesetzt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen gewaschen und zur Gewinnung von RNA eingesetzt. Die optimale 5-aza-dC-Konzentration, bei der noch mehr als 50% der Zellen lebensfähig ist, wurde zuvor mit Hilfe eines MTT-Tests ermittelt (vgl. 2.15.1).

Die Behandlung der Zelllinien mit dem Histon-Deacetylierungs-Inhibitor Suberoylanilidohydroxamsäure (SAHA) erfolgte ähnlich. Die Komponente wurde mit einer Endkonzentration von 2  $\mu$ M über 48 h täglich frisch zugesetzt. Auch diese Konzentration wurde nach einem MTT-Test festgelegt. Anschliessend wurden die Zellen, sowie jeweils ein unbehandelter und ein nur mit Lösungsmittel behandelter Ansatz zur Präparation von RNA verwendet.

Zur Inhibition der Translation wurden Prostatakarzinom-Zelllinien mit Cycloheximid (10  $\mu$ g/ml) behandelt. Der Inhibitor wurde für 48 h parallel zu mehreren Ansätzen hinzugegeben. Alle 12 h wurde ein Ansatz zur Präparation von Proteinlysate eingesetzt. Parallel zum 48 h-Ansatz wurde ein Ansatz nur mit Lösungsmittel (Ethanol) behandelt.

### 2.15 Analytische und funktionelle Tests an humanen Zellen

#### 2.15.1 MTT-Test

Der MTT-Test dient zur Messung von Lebensfähigkeit und Wachstum von Zellen. Er misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen unabhängig davon, ob sie gerade DNA synthetisieren oder nicht. Das 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-Bromid (MTT) gehört zu einer Klasse von Tetrazoliumsalzen. Es dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen, so dass das alkohollösliche dunkelblaue Formazan entsteht. Dieses wird nach Lyse der Zellen durch einen SDS-haltigen Puffer freigegeben. Die Intensität der

alkoholischen Formazanlösung wird photometrisch mittels eines ELISA-Lesegerätes bestimmt (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm).

Der MTT-Test wurde u.a. zur Messung der Toxizität verschiedener 5-Aza-2'-Desoxycytidin-Konzentrationen für verschiedene Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden Zellkulturen 3 Tage lang in Medium unterschiedlicher 5-aza-dC-Konzentrationen (0, 1, 2, 4  $\mu$ M) in Mikrotiterplatten kultiviert. Der Inhibitor wurde täglich frisch zugesetzt. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l der MTT-Lösung und Inkubation für 2 h im Brutschrank, wurde der Überstand abgegossen. 100  $\mu$ l des MTT-Lysispuffers wurden zugegeben, nach 5 min Mischen auf einem Schüttler erfolgte die Auswertung. Ähnlich wurden später verschiedene Konzentrationen des Histone-Deacetylierungs-Inhibitors SAHA getestet.

### 2.15.2 Cell Titer Glo®-Test

Auch der Cell Titer® Glo-Test dient zur quantitativen Bestimmung lebender Zellen und basiert auf der Quantifizierung von ATP, welches die proportionale Anzahl metabolisch aktiver Zellen mittels Luciferase signalisiert. Die Luciferase katalysiert die mono-Oxygenierung von Luciferin in der Gegenwart von Magnesium, ATP und Sauerstoff. Der Test wurde zunächst eingesetzt um die Toxizität verschiedener siRNA-Transfektionsreagenzien zu bestimmen. Hierfür wurde jeweils eine feste Zellzahl in 100  $\mu$ l Medium pro 96-Well ausgesät. Parallel wurden Hintergrundkontrollen angesetzt, die nur Medium ohne Zellen enthielten. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben mit den jeweiligen angepassten Mengen Transfektionsreagenz versetzt und für 72 h im Brutschrank inkubiert. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung des Chemolumineszenz-Signals erfolgte am Victor Counter (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm).

Nach Festlegung auf ein Transfektionsreagenz wurde mit Hilfe des Tests außerdem eine Verlaufskurve erstellt mit zwei verschiedenen siRNA Konzentrationen für Zeitwerte von 24, 48 und 72 h. Später wurde der Cell Titer® Glo-Test als funktioneller Test eingesetzt um Effekte des siRNA-Knock-downs des *CTCF* Gens auf die Proliferation zu untersuchen.

### 2.15.3 BrdU-Inkorporationstest

Der BrdU-Inkorporations-Test wurde ergänzend zum MTT-Test zur Bestimmung der Toxizität verschiedener 5-aza-dC-Konzentrationen durchgeführt. Dieser Test bestimmt die DNA-Syntheserate. Das den Zellen zugesetzte Bromdesoxyuridin wird als Thymidinanalogon während der DNA-Synthese eingebaut. Die BrdU-Markierung der vorbehandelten Zellen erfolgte bei 37 °C über Nacht nach Herstellerangaben. Nach Fixierung der Zellen wird die

zelluläre DNA denaturiert, damit das inkorporierte BrdU besser zugänglich wird für die Detektion mittels eines Antikörpers. Der Einsatz eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers ermöglicht die Detektion der Immunkomplexe über eine Substratreaktion. Die Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von Hydrogenperoxid die Oxidation von Diazylhydrazid, so dass das Reaktionsprodukt photometrisch messbar wird (ELISA-Reader; Testwellenlänge 405 nm, Referenzwellenlänge 570 nm). Dies korreliert mit der DNA-Syntheserate und meist auch mit der Anzahl proliferierender Zellen.

#### 2.15.4 Giemsa-Färbung

Diese einfache Färbemethode färbt die Kerne von Zellen magentafarben und das Zytoplasma grau-blau. Die Giemsa-Färbung wurde eingesetzt zur Bestimmung der nötigen individuellen G418 (Neomycin)-Konzentration zur Selektion der einzelnen Prostatakarzinom-Zelllinien, der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT und normaler Uroepithel-Zellen nach der Transfektion mit dem CTCFL-GFP-Konstrukt. Für die Giemsafärbung von Zellkulturen in 6-Well-Platten oder Petrischalen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Eine Fixierung erfolgte einmal mit PBS/Methanol (1:1) und zweimal mit Methanol. Anschliessend wurde durch Zugabe von 2 ml Giemsalösung/25 cm<sup>2</sup> für 2 min gefärbt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an destilliertem Wasser (2 min) wurde die Färbelösung abgossen und die Platten bzw. Schalen gründlich unter fliessendem Wasser gewaschen.

#### 2.15.5 DNA-Transfektion

Die Transfektion von Zelllinien, d.h. das Einbringen von fremdem genetischen Material in die Zellen, wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes FuGene (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses liposomale Transfektionsreagenz führt zur Komplexierung von Nukleinsäuren. Diese Komplexe fusionieren mit der Plasmamembran, so dass das fremde genetische Material in die Zellen gelangt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmidkonstrukte zur Transfektion verwendet.

Zur DNA-Transfektion wurden je nach Versuchsansatz und Proliferationsrate der Zellen  $1 \times 10^5$  Zellen in 10 cm- Schalen bzw. 6-Well-Platten ausgesät. Nach ca. 12 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschliessend mit 10 ml bzw. 800 µl Medium mit 2% FCS versehen. Der zuzugebende Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 2.6: Zusammensetzung des Mastermix pro Transfektionsansatz je nach Versuchsformat

1x Ansatz 10 cm-Schalen	1 x Ansatz 6-Well
5 µg Plasmid-DNA	1 µg Plasmid-DNA
10 µl Fugene	3 µl Fugene
ad 200 µl Medium ohne Zusätze	ad 100 µl Medium ohne Zusätze

Analog wurden entsprechende Ansätze mit einem Kontrollvektor und ein Leer-Ansatz ohne Plasmid-DNA jedoch mit Transfektionsreagenz verwendet.

Nach 48 h wurde mit der Selektion positiv transfizierter Zellen durch Zugabe angepasster Mengen G-418 (Geneticin-Sulfat) begonnen. Transfizierte Zellen profitieren von dem im Expressions-Konstrukt enthaltenen Neomycin-Resistenz-Gen. Die notwendigen Konzentrationen für die jeweiligen Zelllinien wurden zuvor mit untransfizierten Zellen mit anschließender Giemsa-Färbung bestimmt. Die Selektion wurde über acht Tage durchgeführt.

Tab. 2.7: G418 Endkonzentration für transfizierte Zelllinien

Zelllinie	Endkonzentration G418 [mg/ml]
22Rv1	1,5
PC-3	0,2
DU145	0,75
NCCIT	0,2

Zellen, die mit dem *CTCF*-GFP-Expressionskonstrukt transfiziert wurden, wurden fotografisch dokumentiert und zur Präparation von RNA eingesetzt. Zellen, die mit dem *CTCF*-Promotor-Konstrukt bzw. dem p850-Konstrukt transfiziert wurden, unterlagen keiner Selektion, sondern wurden 72 h nach der Transfektion lysiert und für den Luciferase-Test verwendet. Das p850-Konstrukt enthält den *L1.2B* Retrotransposon-Promotor, der transfiziert wurde als Vergleichswert eines Promotors mit starker Aktivität. Um diesen Test durchführen zu können, wurde jeder Ansatz mit dem pRL-TK-Vektor kotransfiziert. Der pRL-TK-Vektor enthält den Herpes simplex Virus Thymidinkinase-Promotor, um moderate Expression des *Renilla* Luciferase-Gens zu erzielen. Durch Kotransfektion dieses Vektors steht mit Hilfe der zweiten Luciferase eine interne Kontrolle zur Verfügung, die unter den verschiedenen Ansätzen einen Vergleich der Transfektionseffizienzen erlaubt.

#### 2.15.6 Dual-Luciferase® Reporter Test-System

Dieses System wird benutzt um eukaryotische Genexpression zu studieren. Hierbei werden zwei Reporterenzyme gemessen. Die Luciferase von *Photinus pyralis* korreliert dabei direkt mit der Aktivität der transfizierten Promotor-Konstrukte, während die Luciferase von *Renilla*

*reniformis* als interne Kontrolle verwendet wird, um die Transfektionseffizienz verschiedener Ansätze vergleichen zu können. Lichtemission wird erreicht durch Oxidation des Leuchtkäfer Luciferins unter Verbrauch von ATP,  $Mg^{2+}$  und  $O_2$ . Gemessen wurden jeweils die Ansätze mit den verschiedenen Promotorkonstrukten und mit den leeren Vektoren. Zur Analyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 x Lysepuffer lysiert. In für das verwendete Luminometer passenden Röhrchen wurden 10  $\mu$ l Lysat mit 50  $\mu$ l Luciferase Substrat vermischt und nach 2 min Inkubationszeit die Leuchtkäfer Luciferase-Aktivität gemessen. Anschliessend wurden 50  $\mu$ l Stop and Glo Reagenz® (Promega) zugegeben und sofort die Aktivität der *Renilla* Luciferase bestimmt. Entsprechende Leerwerte für die beiden Substrate wurden gemessen und in die Berechnung mit einbezogen.

#### 2.15.7 siRNA-Transfektion

Die Ausnutzung des Mechanismus der RNA Interferenz bietet eine effektive Methode zur Analyse von Gen-Funktionen. Dieser in Eukaryoten natürlich vorkommende Mechanismus gehört zum angeborenen zellulären Immunsystem und dient dazu die Expression von fremden Genen, die durch Infektionen in die Zellen gelangt sind, posttranskriptionell still zu legen. Dabei werden lange Transkripte doppelsträngiger RNA durch ein Homolog der dsRNA spezifischen RNase III namens *Dicer* zu kurzen interferierenden RNAs (siRNA) prozessiert. Diese binden an das Molekül RISC (RNA induced silencing complex mit ssRNase-Aktivität) und werden dort entwunden. Der antisense-Strang spezifiziert RISC zur Degradation der Ziel-mRNA.

Künstliche, gegen das gewünschte Zielgen synthetisierte siRNAs sind 21 Nukleotide lang. Diese werden mit Hilfe Lipid-basierter Reagenzien komplexiert und können so durch Transfektion in eukaryotische Zellen gelangen. Der siRNA-Effekt, hält typischerweise für mehrere Tage an und bietet über die nötige Basenkomplementarität hohe Spezifität.

Entsprechend wurden verschiedene spezielle siRNA-Transfektionsreagenzien zuvor auf Toxizität und Effektivität ausgetestet. Hierzu wurden Zelllinien mit diesen Mittel nach Herstellerangaben in verschiedenen Konzentrationen alleine oder in Kombination mit siRNAs transfiziert und anschliessend Cell Titer Glo®-Analysen (vgl. 2.15.2) bzw. quantitative RT-PCRs (vgl. 2.18.3) durchgeführt. Hierbei handelte es sich um drei verschiedene kommerzielle, nicht-validierte siRNAs gegen das Zielgen *CTCF* bzw. eine validierte siRNA gegen das Kontrollgen *GAPDH*. Zur Garantie von 75% Knock-down-Erfolg bietet die Firma Ambion drei verschiedene siRNAs für das *CTCF*-Gen an. Als Kontrolle wurde eine fluoreszenzmarkierte *non-targeting* siRNA transfiziert. Aufgrund der Resultate dieser

zahlreichen Vorversuche, wurde später HiPerFect (Qiagen) als Transfektionsreagenz festgelegt. Dieses zeichnete sich durch gute spezifische siRNA-Effekte bei niedrigen eingesetzten siRNA-Konzentrationen aus, so dass unspezifische Nebeneffekte minimiert werden sollten.

Zur Transfektion der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 und der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT wurden jeweils  $1,8 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-Well-Platten in Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Nach 12 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1,4 ml frischem Medium ohne Antibiotikum mit 10% FCS versehen. Für einen 100  $\mu$ l-Ansatz wurde die entsprechende Menge siRNA für eine Endkonzentration von 25 nM in Optimem-Medium verdünnt und mit 12  $\mu$ l HiPerFect Transfektionsreagenz gemischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tropfenweise auf den Zellen verteilt. Die verschiedenen CTCFL-siRNAs wurden jeweils einzeln und teilweise als Pool zur Transfektion eingesetzt. Ferner wurde eine Negativ-Kontrolle der Firma Qiagen verwendet und ein weiterer Ansatz enthielt nur Transfektionsreagenz und keine siRNA, um Nebeneffekte des Transfektionsreagenzes einbeziehen zu können. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frischem Medium versehen. Nach 72 h erfolgte die Zelllyse zur RNA-Präparation.

## **2.16 Präparation von Nukleinsäuren aus humanen Zellen**

### 2.16.1 DNA-Präparation aus Zelllinien

Hochmolekulare genomische DNA aus Kulturzellen wurde mit Hilfe des QIAGEN Blood & Cell Culture Kits isoliert. Hierzu wurden in Konfluenz gewachsene Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche zunächst gewaschen und trypsinisiert (vgl. 2.14.1) und nach Zugabe von frischem Medium/FCS bei 4 °C pelletiert (1500 x g, 10 min). Nach zweimaligem Waschen des Zellpellets mit kaltem PBS wurde es mit einem Volumen Zelllysispuffer und drei Volumen dH<sub>2</sub>O für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation wurden die Zellen nach Zugabe des Nukleus-Lysispuffers und QIAGEN Protease [20 mg/ml] über Nacht bei 50 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der genomischen DNA über Affinitätschromatographie nach Herstellerangaben.

### 2.16.2 DNA Präparation aus Spermien

Sperma-Proben von gesunden Männern wurden freundlicherweise von Dr. Kruse aus der andrologischen Abteilung der Hautklinik, Universität Düsseldorf, als Kontrolle zur Verfügung gestellt. Zur DNA-Präparation aus Spermien wurden diese zunächst aus dem Ejakulat aufgereinigt. Hierzu wurden jeweils 250 µl der Proben in einem Corex-Röhrchen mit 10 ml Puffer 1 (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) versetzt und für 10 sek bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 2500 g wurde der Überstand bis auf 1 ml verworfen, 10 sek gevortext und die Suspension in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Um auch die Spermien von den Gefäßwänden zu sammeln wurden weitere 0,5 ml Puffer 1 in das Corex-Röhrchen gegeben, gevortext und in das Eppendorf-Gefäß überführt. Im Anschluß an eine 2 minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 300 µl Puffer 2 (100 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS, 2% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Zusammen mit 100 µl Proteinase K [20 mg/ml] wurde die Lösung für 2 h bei 55 °C inkubiert. Danach wurden weitere 20 µl Proteinase K zugesetzt und für weitere 2 h inkubiert. Es wurden 400 µl Puffer AL aus dem QIAamp DNA Mini Kit und 400 µl Ethanol zugeben und die Lösung durch Vortexen gemischt. Zur Isolation der DNA über Affinitätschromatographie wurde nach Herstellerangaben mit Schritt 5 des Gewebeprotokolls aus dem QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbuch weiter verfahren.

### 2.16.3 RNA-Präparation aus Zelllinien

Zur RNA-Präparation aus Zellkulturen wurden diese in mittelgroßen Zellkulturflaschen bis zu 80% Konfluenz kultiviert. Zur Lyse der Zellen wurde 1 ml Trizol auf die Zellen gegeben und anschließend die Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kurzem Vortexen, wurde die Lösung für 3 min bei RT inkubiert. Eine Zentrifugation erfolgte bei 4 °C für 15 min mit 12000 g. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen 70%-igem Ethanol versetzt und 15 sek gevortext. Die RNA wurde über Säulenaffinitätschromatographie nach Herstellerangaben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert.

Bei Versuchsansätzen mit bis zu  $1 \times 10^5$  Zellen (z.B. 6-Well siRNA-Analyse) wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Micro Kits gewonnen. Hierbei wurden die Zellen mit dem zum Kit gehörigen Puffer lysiert und anschliessend nach Herstellerangaben fortgefahren.

### 2.16.4 RNA-Präparation aus Spermien

Auch zur Isolierung von RNA aus Spermien mussten diese zunächst aus Ejakulat aufgereinigt werden (vgl. 2.16.2). Nach erneuter Zentrifugation wurden diese jedoch nicht in Puffer 2 resuspendiert, sondern es wurde mit Schritt 2 des RNeasy Micro Kit Handbuchs fortgefahren und die Zellen durch Zugabe von 350  $\mu$ l RLT-Puffer lysiert. Die RNA-Isolation über Affinitätschromatographie erfolgte nach Herstellerangaben.

## 2.17 Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA, genomischer DNA und RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm vorgenommen.

Darüberhinaus wurde die RNA-Konzentration von Präparationen mit geringem Ausgangsmaterial am Nanodrop bestimmt. Die Qualität wurde mit Hilfe des Agilent Picochips im BMFZ als Auftragsarbeit analysiert.

## 2.18 RT-PCR

### 2.18.1 Reverse Transkription

Der Einsatz einer Reversen Transkriptase, einer viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, erlaubt die Transkription von RNA zu cDNA (*complementary DNA*). In dieser Arbeit wurde die SuperScript™ II Reverse Transkriptase des Herstellers Invitrogen verwendet. Die verwendeten cDNAs wurden aus RNA von Zelllinien und Gewebe nach folgendem Schema hergestellt:

2  $\mu$ g RNA wurden mit 0,04 nmol Oligo (dT)<sub>15</sub> Primern, jeweils 10 nmol dNTPs und sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12  $\mu$ l gebracht und für 5 min bei 65°C inkubiert. Ein Mastermix der übrigen Komponenten wurde pro Ansatz nach folgendem Schema angesetzt:

Tab. 2.8: Pipettierschema Mastermix Reverse Transkription

Komponenten	Endkonzentration
5 x Reaktionspuffer	1 x
0,1 M DTT	0,01 M
RNase Inhibitor	40 U

Nach einer kurzen Abkühlung der Proben auf Eis und Zugabe von 7  $\mu$ l Mastermix pro Probe folgte eine Inkubation von 2 min bei 42 °C. Im Anschluss an eine Zugabe von 200 U SuperScript™ II Reverse Transkriptase pro Probe wurden die Ansätze 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert. Die so hergestellten cDNAs wurden bei –20°C gelagert.

## 2.18.2 Qualitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte eingesetzt. Dabei wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren, ausgenutzt. Hierfür wird ein Nukleinsäure-Strang mit einem freien 3'-OH-Ende benötigt. Dieser wird in einer PCR künstlich durch kurze DNA-Fragmente, sog. Oligonukleotide oder Primer zur Verfügung gestellt. Die beiden Primer (*forward* und *reverse*) binden nach einem Denaturierungsschritt an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (Primeranlagerung oder *Annealing*) und können dann von der Polymerase verlängert werden, so dass der zwischen ihnen befindlich DNA-Abschnitt verdoppelt wird. Denaturiert man anschliessend die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge, so können neue Primermoleküle binden und eine Neusynthese stattfinden. Die Untersuchung der Expressionsniveaus von *CTCF* und seines Paralogen *CTCF* in Zelllinien aus Harnblasen- und Prostatakarzinomen mit und ohne Einfluss des Methylierungsinhibitors 5-aza-dC erfolgte mittels RT-PCR. Gleichzeitig wurden als Positivkontrollen die Expressionen von Proben aus Hoden-Tumor- und Hoden-Normalgewebe bestimmt. Um das Niveau der Expression besser einordnen zu können, wurde gleichzeitig ein Sequenzabschnitt des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. Als Probenmaterial wurde jeweils 1 µl cDNA des 20 µl Ansatzes aus der Reversen Transkription eingesetzt. Der zu pipettierende Mastermix der Reaktionen setzte sich pro 50 µl-Ansatz wie folgt zusammen.

Tab. 2.9: Mastermix Primerpaare *CTCF* und *CTCF*

Komponenten	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer Finnzymes	1 x
Fwd-Primer	20 pmol
Rev-Primer	20 pmol
dNTPs	jeweils 150 µM
DyNAzyme™II Taq DNA Polymerase	1 U
dH <sub>2</sub> O	ad 49 µl

Tab. 2.10: Mastermix Primerpaar *GAPDH* 350

Komponenten	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer Finnzymes	1 x
Fwd-Primer	25 pmol
Rev-Primer	25 pmol
dNTPs	jeweils 100 µM
DyNAzyme Taq™II DNA Polymerase	1 U
Formamid	2%
dH <sub>2</sub> O	ad 49 µl

Die Proben wurden jeweils in 0,5 ml-Einmalreaktionsgefäßen mit Mineralöl überschichtet. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen ergaben sich für den T3 ThermoCycler folgende PCR-Programme:

Tab. 2.11: zusammengefasste PCR-Bedingungen für die Primerpaare CTCFL/CTCF/GAPDH 350

Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
95 °C	5 min	1
94 °C	30 sec	30/ 35/ 30
57/ 56/ 54°C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	1

Die Dauer der Primer-Verlängerung hängt von der Länge des entstehenden PCR-Produkts ab, wobei 1000 bp pro Minute als Anhaltspunkt gelten kann.

Es wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt der Reaktionen mit 6 x Auftragspuffer vermischt und über ein Agarosegel (2%) aufgetrennt.

### 2.18.3 Quantitative PCR

Während die qualitative PCR nur eine Endpunktbetrachtung des Produkts erlaubt, bietet die quantitative *real-time* PCR (QRT-PCR) den Vorteil der Detektion des Produkts vom Ansatz bis zur Auswertung. Die entstandene Produktmenge wird während jedes PCR-Zyklus gemessen. Zudem lässt sich die Kinetik der Reaktion beobachten. Zur Verfolgung des entstehenden Amplikons gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Fluoreszenzdetektionssysteme: ein nichtspezifisches Detektionssystem, welches auf der Markierung des Amplikons durch interkalierende Farbstoffe basiert, und ein spezifisches, welches fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet. Beide Systeme beruhen auf dem Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Produkts. Aufgrund dieser Proportionalität ist zudem eine Quantifizierung der Ausgangsmenge des Templates möglich. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten interkalierendem Farbstoff handelt es sich um SYBR Green™ der Firma Roche, der eine Anregungswellenlänge von 597 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm besitzt.

Um zwischen korrektem Produkten und Artefakten durch Primerdimere o.ä. zu unterscheiden, führt man bei diesem Detektionssystem anschliessend eine Schmelzpunktanalyse durch. Dabei wird das Reaktionsgemisch im Anschluss an die eigentliche PCR in 1 °C-Schritten von der Primeranlagerungstemperatur + 5 °C bis auf 99 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Temperaturschritt, bei dem das Produkt schmilzt und der Farbstoff dissoziiert, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet und wird in der Ableitung als Peak dargestellt. Bei einer optimal eingestellten PCR ist ein einzelner spitz

zulaufender Peak zu erwarten, der das spezifische Produkt darstellt. Unterschiedlich große Produkte oder Produkte anderer Sequenzen haben unterschiedliche Schmelzpunkte.

Als alternatives Detektionssystem kommen fluoreszenzmarkierte Sonden zum Einsatz. Bei diesem Detektionssystem wird zum PCR-Ansatz zusätzlich ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid hinzugegeben, dessen Sequenz spezifisch für das zu amplifizierende Produkt ist und die zwischen den beiden Primern hybridisiert. Diese Sonden sind in der Regel 20-30 Basen lang und am 5'- und am 3'-Ende markiert. Konventionell wird hierfür 6-Carboxy-Fluorescein (FAM, Reporter) bzw. 6-Carboxy-Tetramethylrodamin (TAMRA, Quencher) verwendet. Die Emission der Fluoreszenz erfolgt erst bei Hybridisierung an die Zielsequenz, der Mechanismus beruht auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Während der Elongationsphase der PCR trifft die Polymerase auf die hybridisierte Sonde am 5'-Ende und hydrolysiert diese über ihre 5'-3' Exonukleaseaktivität. Durch diese Hydrolyse wird der Reporterfarbstoff räumlich von seinem Quencher getrennt und seine emittierte Fluoreszenz wird nicht mehr umgeformt, so dass sein Fluoreszenzanstieg messbar wird.

Die Fluoreszenz wird während jedes Zyklus gemessen. Ob Annealing- oder Elongationsschritt als Zeitpunkt der Messung definiert werden, ist vom Detektionssystem abhängig. Der gemessene Fluoreszenzwert wird in einer Amplifikationsgraphik auf der Ordinate gegen die Zyklenzahl auf der Abzisse dargestellt. Sowohl der Fluoreszenzfarbstoff, als auch die eingesetzten Materialien haben eine gewisse Grundfluoreszenz, die jedoch unterhalb des Schwellenwertes liegt. Der Schwellenwert (*Threshold*) errechnet sich aus der Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15, welche mit dem Faktor zehn multipliziert wird. Während der Amplifikation des Produkts kommt es erst nach einer gewissen Anzahl Zyklen zum Anstieg der Fluoreszenz, welcher im Laufe der Reaktion den Schwellenwert übersteigt. Der Schnittpunkt zwischen zunehmender Fluoreszenz und Schwellenwert nennt sich Cycle-Threshold ( $C_T$ ). Dieser Wert stellt den niedrigsten messbaren positiven Wert der QRT-PCR dar und gibt eine Zyklenzahl an. Dieser Wert steht in direktem Zusammenhang zur eingesetzten Ausgangskonzentration. Ist der  $C_T$ -Wert niedrig, so ist die Ausgangskonzentration hoch. Der  $C_T$ -Wert erlaubt die Quantifizierung einer Reaktion. Er verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge.

Zur Quantifizierung gibt es zwei verschiedene Strategien. Die absolute Quantifizierung beruht auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten mit bekannten Konzentrationen. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein Haushaltsgen bezogen und normalisiert. Eine weitere Optimierung der relativen Quantifizierung ermöglicht die Korrektur um die *real-time* PCR Effizienzen, die jeweils erzielt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene in zahlreichen Proben mit der Hilfe der QRT-PCR analysiert. Als Proben kamen cDNAs unterschiedlicher Gewebeherkunft und Zelllinienherkunft, mit oder ohne Inhibitoren behandelt, zum Einsatz. Diese wurden entweder pur oder in Verdünnungen von 1:5 oder 1:10 eingesetzt. Grundsätzlich wurden mindestens Doppelwerte, bei fraglichen Proben auch Mehrfachwerte, generiert.

Ein Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Genexpressionen wurden mit Hilfe eines Enzymmix, der auf SYBR Green™ (Roche) basiert, und unmarkierten Primern aus Eigendesign durchgeführt. Der Enzymmix des LightCycler® FastStartDNA Master<sup>plus</sup> SYBR Green I wurde nach Herstellerangaben vermischt. Der Standard-PCR-Mix, der bei der Analyse verschiedener Gene verwendet wurde, setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 2.12: Pipettierschema Standard-Mastermix

Komponenten	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl
Fwd-Primer	10 pmol
Rev-Primer	10 pmol
SYBR-Green Enzymmix	1 x
cDNA 1:5 Verdünnung	1 µl

Zielsequenzen folgender Gene wurde unter Verwendung des Standard-Mastermix amplifiziert: *GAPDH*, *β-Aktin* (nur jeweils 5 pmol Primer), *p21*, *CTCF*, *OCT4*, *BMI-1*, *EZH2*, *DNMT3B*.

Die PCR-Protokolle für die einzelnen Gene waren variabel. Alle begannen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min und endeten mit einem Kühschritt bei 40 °C für 30 sek. Alle Schmelzkurven begannen 5 °C oberhalb der Annealingtemperatur und beinhalteten 1 °C-Schritte bis zur Temperatur von 99 °C. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte während der Elongationsphase.

Amplifikationsschritte und Starttemperaturen für die Schmelzkurve waren genabhängig. Die genabhängigen Variationen werden nachfolgend im Detail angegeben.

Tab. 2.13: genabhängige Variationen der PCR-Protokolle der untersuchten Gene

Gen	Annealingtemperatur	Zyklenzahl
<i>GAPDH</i>	59	36
<i>β-Aktin</i>	65	40
<i>p21</i>	63	40
<i>CTCF</i>	61	40
<i>OCT4</i>	66	40
<i>BMI-1</i>	65	40
<i>EZH2</i>	60	45
<i>DNMT3B</i>	62	40

Die Gene *MAGE-A1*, *NY-ESO-1*, *SIRT1*, *CD133* sowie ein weiteres stabiles Referenzgen namens *TBP* wurden ebenfalls mit Hilfe des SYBR Green™- Systems analysiert. In diesen beiden Fällen stammte der Farbstoff jedoch von der Firma Qiagen als Komponente des QuantiTect® Primer Assays. Hierbei handelt es sich um ein validiertes kommerzielles Primerdesign für QRT-PCRs, basierend auf SYBR Green™. Die Primer bestehen aus einem Mix von Fwd- und Rev-Primer und wurden nach Herstellerangaben gelöst und nach folgendem Schema in den Mastermix für die beiden Gene eingesetzt:

Tab. 2.14: Pipettierschema Mastermix

Komponenten	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl
10 x QuantiTect® Primer Assay	1 x
2 x QuantiTect® SYBR Green	1 x
cDNA 1:5 Verdünnung	1 µl

Das Universalprotokoll für Primer dieser Produktserie beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 15 min. Anschliessend erfolgt die Amplifikation. Während der Elongationsphase wurde die Fluoreszenz detektiert. Nach der Schmelzpunktanalyse endete die Reaktion mit dem gewohnten Kühschritt.

Tab. 2.15: Universal-PCR-Protokoll QuantiTect® Primer Assays

Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
94 °C	15 sec	40
55 °C	20 sec	
72 °C	20 sec	
Schmelzkurve		
95 °C		
70 °C		
90 °C		

Die Bestimmung der Genexpression von *CTCF* erfolgte mit einer spezifischen markierten Sonde. Das Sondendesign wurde selbst vorgenommen und jeweils eine FAM- bzw. TAMRA-Markierung angehängt. Auch hier wurde ein Enzymmix der Firma Roche verwendet. Dieser stammte aus dem FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe Kit und wurde nach Herstellerangaben vermischt. Hierfür setzte sich der Mastermix wie folgt zusammen.

Tab. 2.16: Pipettierschema Mastermix

Komponenten	Endkonzentration
dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl
Fwd-Primer	10 pmol
Rev-Primer	10 pmol
Sonde	4 pmol
Enzymmix	1 x

Für die Analyse des *CTCF*-Gens wurden je Probe 2 µl unverdünnte cDNA eingesetzt.

Da der Einsatz von Sonden der Reaktion zusätzliche Spezifität verleiht, entfällt eine anschließende Schmelzpunktanalyse. Die Reaktionen beginnen zunächst mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min. Anschliessend erfolgt die Amplifikationsphase mit 45 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 66°C. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt hier während des Primeranlagerungsschrittes. Die Reaktion endet mit einem Kühschritt bei 40 °C für 30 sek.

## 2.19 DNA-Analyse mittels Bisulfit

### 2.19.1 Bisulfitumwandlung

Die Bisulfitumwandlung [Clark et al., 1994] denaturierter genomischer DNA wurde mit Hilfe des CpGenome™ DNA Modification Kits vorgenommen. Während das enthaltene Natriumbisulfit durch Desaminierung unmethylierte Cytosinreste in Uracilreste konvertiert, bleiben 5-Methylcytosinreste unverändert. So führt die Bisulfitumwandlung zu einer veränderten Sequenz unmethylierter DNA im Vergleich zur unbehandelten Ausgangs-DNA und zur behandelten methylierten DNA. Da anschließend die beiden Komplementärstränge nicht mehr exakt zueinander passen, wird mit dem angepassten Primerdesign ein Strang auf sein Methylierungsmuster untersucht.

Es wurde jeweils 1 µg DNA aus Zelllinien oder Gewebeproben eingesetzt und nach Herstellerangaben umgewandelt. Nach Fällung der umgewandelten DNA wird sie in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

### 2.19.2 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Für diese DNA-PCR wurden Primer konzipiert, die methylierte und unmethylierte Allele gleichmässig amplifizieren. Dabei sind die Primer komplementär zu einem Bereich um den Transkriptionsstart des zu untersuchen *CTCF* bzw. *OCT4* Gens. Hiermit sollte der Einfluss des Methylierungsstatus des Promotorbereichs in Zelllinien und Gewebeproben auf die Expression der beiden Gene überprüft werden. Von der Bisulfit-umgewandelten DNA wurden jeweils 4 µl des 50 µl Ansatzes zu einem Gesamtansatz von 50 µl aus folgenden Komponenten hinzugegeben:

Tab. 2.17: Pipettierschema Primerpaare CTCFL Promhyp und OCT4 Promhyp

Endkonzentration CTCFL	Komponenten	Endkonzentration OCT4
1 x	10 x Reaktionspuffer Qiagen	1 x
20 pmol	Fwd-Primer	10 pmol
20 pmol	Rev-Primer	10 pmol
100 $\mu$ M	dNTPs	150 $\mu$ M
1 U	HotStarTaq DNA Polymerase	1 U
ad 46 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O	ad 46 $\mu$ l

Die Amplifikation erfolgte im Biometra T3 Thermocycler mit Heizdeckel mit folgender Programmierung:

Tab. 2.18: PCR-Bedingungen Primerpaar CTCFL Promhyp

Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
95 °C	15 min	1
58 °C	5 min	
72 °C	45 sec	
94 °C	45 sec	30
58 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	1

Tab. 2.19: PCR-Bedingungen Primerpaar OCT4 Promhyp

Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
95 °C	15 min	1
95 °C	45 sec	40
58 °C	45 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1

Im Anschluss wird jeweils der gesamte PCR-Ansatz auf einem Agarosegel (2,5%) elektrophoretisch aufgetrennt, die spezifische Bande des PCR-Produkts ausgeschnitten und das PCR-Produkt eluiert (vgl. 2.13.2), um unverzüglich für die Ligation und Klonierung in den TA-Vektor mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits eingesetzt zu werden (vgl. 2.13.7). Um Aussagen über eine möglicherweise vorliegende Promotorhypermethylierung treffen zu können, wird aus mehreren Klonen die Plasmid-DNA präpariert (vgl. 2.12.2) und diese sequenziert.

### 2.19.3 Sequenzierung

Die zu sequenzierenden Proben wurden als Auftragsarbeit an das BMFZ gegeben. Dort wird die Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger unter Verwendung von „Dye Terminatoren“ durchgeführt. Üblicherweise werden T3- oder T7-Primer verwendet. Die

Sequenzier-Reaktion beruht auf der gezielten, aber statistisch verteilten Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese durch den Einbau eines Didesoxynukleotids. Diese haben keine freie 3'OH-Gruppe, so dass die Synthese bei Einbau eines solchen Didesoxynukleotids unterbrochen wird. Meistens werden parallel vier Ansätze vorbereitet, bei denen jeweils ein anderes Desoxynukleotid markiert ist. Eine genaue Auftrennung der markierten Syntheseprodukte unterschiedlicher Länge über Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt im BMFZ automatisiert mit Hilfe des ABI Prism<sup>TM</sup>-Sequenziergerätes.

#### 2.19.4 *In vitro* Methylierung

Zur Untersuchung der Sensibilität des *CTCF*-Promotors hinsichtlich DNA-Methylierung, wurde das hergestellte *CTCF*-Promotor-Konstrukt *in vitro* methyliert und anschliessend erneut in Zelllinien eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden später lysiert und in einem Luciferase-Test analysiert. Als Kontrollansatz galt das transfizierte Konstrukt ohne *in vitro* Methylierung und ein Vergleich zum *LINE1*-Promotor, der ebenfalls unbehandelt und *in vitro* methyliert eingesetzt wurde. Es kamen die DNA-Methylasen *SssI* und *HpaII* zum Einsatz. Während die *SssI* Methylase jedes C im Dinukleotid CG methyliert, modifiziert die *HpaII* Methylase das innere C in der Erkennungssequenz CCGG. Da zur Transfektion viel DNA benötigt wurde und entsprechende Verluste bei der Aufreinigung der methylierten DNA zu beachten waren wurden jeweils mehrer Ansätze zu 3 µg bzw. 4 µg gleichzeitig methyliert und vor der alkoholischen Fällung vereinigt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 2.20: Pipettierschema Mastermix *SssI*

Komponenten <i>SssI</i>	Endkonzentration
Plasmid-DNA	3 µg
Puffer NEB2	1 x
SAM	480 µM
<i>SssI</i> -Methylase	18 U
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Tab. 2.21: Pipettierschema Mastermix *HpaII*

Komponenten <i>HpaII</i>	Endkonzentration
Plasmid-DNA	4 µg
<i>HpaII</i> -Puffer	1 x
SAM	400 µM
<i>HpaII</i> -Methylase	8 U
BSA	5 µg
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die Reaktionsansätze wurden jeweils für 1,5 h bei 37 °C und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Zur alkoholischen Fällung wurden sie jeweils vereinigt. Nach Zugabe 1/5 fachen Volumens 4 M LiCl-Lösung und 2,5 fachem Volumens eisgekühlten Ethanol absolut, wurden die

Proben mindestens 30 min bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschliessend erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $12.000\text{ g}$ . Das DNA-Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in  $25\text{ }\mu\text{l}$  TE-Puffer gelöst. Zur Kontrolle der Effektivität der *in vitro* Methylierung wurden jeweils 500 ng DNA in einen Restriktionsverdau mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *HpaII* eingesetzt. Bei vollständiger Methylierung der Erkennungsstellen kann dieses Enzym die DNA nicht zerschneiden. Das Resultat wurde mittels DNA-Agarosegelelektrophorese (1%) dokumentiert.

## 2.20 Western-Blot-Analyse

Mit Hilfe einer immunologischen Technik, die *Western Blotting* genannt wird, können geringe Mengen eines Proteins in einer Zelle nachgewiesen werden. Mit dieser Methode sollte überprüft werden, wie sich das mRNA-Expressionsniveau von *CTCF* in mit Inhibitoren behandelten und unbehandelten Zelllinien auf Proteinebene fortsetzt. Dazu werden Proteine von Zellextrakten einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen. Die aufgetrennten Proteine werden dann auf einer Membran immobilisiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt über indirekte Immunfluoreszenz. Als Proben wurden Proteinlysate von Prostatakarzinom-Zelllinien verwendet. Diese wurden zuvor teilweise mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC oder Cycloheximid, einem Inhibitor der Translation, behandelt. Parallel wurden immer unbehandelte Ansätze mitgeführt. Zur Validierung der Resultate aus der siRNA-Analyse wurden auch transfizierte Zellen zur Gewinnung von Proteinlysaten eingesetzt. Als Positivkontrollen wurde das Lysat von normalem Hodengewebe eingesetzt. Um Aussagen über Expressionsunterschiede zwischen unterschiedlichen Zelllinien treffen zu können, wurde zusätzlich durch Immundetektion der Nachweis des  $\alpha$ -Tubulin-Proteins als Referenz geführt.

### 2.20.1 Präparation von Proteinlysaten

Zur Analyse der Kinetik des CTCFL-Proteins wurden Prostatakarzinom-Zelllinien über 48 h mit Cycloheximid behandelt. Der Inhibitor wurde dem Medium in einer Endkonzentration von  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Alle 12 h wurde jeweils ein Ansatz zur Präparation von Proteinlysaten verwendet. Parallel wurde auch ein Ansatz zum Zeitpunkt 0 h und eine Lösungsmittelkontrolle zur Präparation verwendet.

Ähnlich wurden Zellen mit 5-aza-dC behandelt und zusammen mit unbehandelten Ansätzen zur Präparation eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen zusammen mit RIPA-Puffer auf dem Schüttler für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt

und zur Homogenisierung mehrfach durch eine Kanüle gezogen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 12.000 g wurde der Überstand aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Präparation von Lysaten aus Hodengewebe wurde ähnlich verfahren. Als Ausgangsmaterial stand Gewebepulver zur Verfügung. Hiervon wurden 20 mg in RIPA-Puffer gelöst und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines käuflichen Nachweissystems nach Herstellerangaben.

Zur fraktionierten Präparation von Proteinlysaten wurden die Zellen trypsiniert und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in 400  $\mu\text{l}$  HB-Puffer resuspendiert und für 1 min bei 150 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  Lysispuffer resuspendiert. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert und dabei mehrfach vorsichtig invertiert. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 15 000 g, wurde der Überstand als zytoplasmatische Fraktion abgenommen. Das Pellet wurde mit dem Lysispuffer gewaschen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Kernpellet in 150  $\mu\text{l}$  Puffer C resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde das Lysat jede Minute kurz gevortext. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand als nukleäre Fraktion abgenommen.

### 2.20.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Unter denaturierenden Bedingungen können Proteine in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese über ihre unterschiedlichen Molekulargewichte aufgetrennt werden. Die Denaturierung der Proteine einer Probe wird durch einen SDS-haltigen Ladepuffer erreicht. Zur Reduktion von Disulfidbrücken enthält dieser Puffer zusätzlich Mercaptoethanol. Durch Bindung der SDS-Anionen an die Hauptketten des Proteins erhält dieser Komplex eine negative Ladung, die proportional zur Masse des Proteins ist. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins ist vernachlässigbar. Zusätzliches SDS im Laufpuffer hält das Protein im denaturierten Zustand. Aufgrund der anionischen Sulfatreste des Detergenz wandern die Proteine im elektrischen Feld zu Anode.

Für den Gellauf wurde zunächst ein 10%-iges Polyacrylamidgel als Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach 1-stündiger Polymerisation wurde die Sammelgellösung luftblasenfrei auf das Trenngel pipettiert und der Kamm eingesetzt. Nach Entnahme des Kamms wurden in der Laufkammer die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Pro Spur wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen. Hierzu wurde das entsprechende Probevolumen mit Auftragspuffer (2,5 µl/10 µl Probe) versetzt, 2 min bei 99 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschliessend mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V, der Trennlauf bei 150 V.

### 2.20.3 Protein Blot

Das Proteingel aus dem Elektrophoreselauf fand unmittelbar weitere Verwendung für den Proteinblot. Die Proteine wurden auf einer Immobilon<sup>TM</sup>-P-Membran immobilisiert. Dazu wurde der Elektroblot luftblasenfrei aufgebaut und anschliessend in die Kammer des Nassblotters eingesetzt. Der Blotvorgang erfolgte bei 2 mA/cm<sup>2</sup> Gel für etwa 1,5 h.

### 2.20.4 Immundetektion

Die Immundetektion der Zielproteine erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz. Hierfür wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen der Blotmembran durch einstündige Inkubation bei RT in Blockpuffer bzw. Sigma Solution gesättigt. Die Inkubation mit dem zielproteinspezifischen Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in Blockpuffer mit einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers (anti-CTCFL: 250 ng/ml; anti-Tubulin: 200 ng/ml, anti-c-Myc: 400 ng/ml). In mehreren Waschschritten wurden überschüssige Antikörper-Moleküle entfernt. Auch die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen- bzw. Ziege-anti-Maus-Antikörper) erfolgte für 1 h unter Schwenken mit der entsprechenden Lösung (beide 80 ng/ml) nach Herstellerangaben. Im Anschluss an mehrere Waschschriffe wurde die Peroxidasereaktion mit einem lumineszierenden Farbstoff gestartet. Hierfür wurden pro Membran 1 ml der im Kit enthaltenen Peroxidase-Nachweislösung mit 1 ml der *Enhancer*-Lösung vermischt und die Membran darin für 1 min geschwenkt. Die Membran wurde luftblasenfrei in Folie verpackt und in der Dunkelkammer gegen geeignete Chemolumineszenzfilme exponiert. Die Belichtungszeit variierte von 10 sec bis zu 3 min.

### 2.20.5 Stripping

Um eine Proteinmembran nach einer Immundetektion noch einmal einsetzen zu können, müssen zunächst die gebundenen Antikörper abgewaschen werden. Hierzu dient die *Stripping* Methode. Die Membran wird dazu in einem Falcon-Röhrchen mit 20 ml der frisch angesetzten *Stripping* Lösung für 30 min bei 50 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschliessend erfolgen jeweils 10 minütige Waschschriffe in PBS/ 0,1% Tween und 5%

Milchpulver in PBS/ 0,1% Tween bei RT. Nach erneutem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen kann mit der nächsten Antikörper- Inkubation begonnen werden.

### **2.21 Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression in Geweben**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Engers, Institut für Pathologie übernommen. Die verwendeten Paraffinschnitte von Gewebeproben wurden zunächst mit Xylol und Ethanol deparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach der Blockierung endogener Peroxidase-Aktivitäten erfolgte eine Antigendemaskierung mit Hilfe eines Citratpuffers (10 mM) für 15 min in einem Schnellkochtopf. Endogenes Biotin wurde mit Avidin und Biotin (0,02% in TBS-Puffer) für 15 min bei RT blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur (CTCFL Abcam 1:200; EZH2 Upstate 1:50; BMI-1 Dr. Otte 1:50), ein Waschschriff mit PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach einem Waschschriff mit PBS wurde das Nachweissubstrat zugegeben und die Präparate mit Hämatoxilin gegengefärbt. Zuletzt erfolgte die Eindeckelung.

### **2.22 Immuncytochemische Analyse von Proteinexpressionen**

Mit Hilfe der immuncytochemischen Analyse sollten die Resultate der immunhistochemischen Analyse bzgl. der intrazellulären Lokalisation des CTCFL-Proteins bestätigt werden. Zudem sollte zur Aufklärung der funktionellen Rolle von CTCFL und CTCF eine Kolokalisation untersucht werden. Hierzu wurden ferner Doppelfärbungen gegen RNA-Polymerase II vorgenommen.

Für die Färbungen wurden Zellen verschiedener Zelllinien in 6 Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät. Jeweils ein Ansatz wurde anschliessend 3 Tage mit 5-aza-dC behandelt (vgl. 2.14.1), ein zweiter Ansatz blieb unbehandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschliessend für 10 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Methanol fixiert. Nach einer 10 minütigen Trocknungsphase wurden die Zellen mit TBS-Puffer (150 mM Tris HCl, 33 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellkerne wurde eine Saponinlösung [5 mg/ml] für 5 min auf die Zellen gegeben. Nach Zugabe der Na-Borhydridlösung [1 mg/ml] für 5 min wurden die Zellen erneut mit TBS gewaschen. Zum Blocken wurden die Deckgläschen für 1 h auf 50  $\mu\text{l}$  Ziegen Serum, 1:50 in PBS verdünnt, gelegt. Nach einem Waschschriff wurden die Deckgläschen in die Antikörperlösungen gelegt und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer gelagert. Die Antikörper wurden in PBS verdünnt (CTCFL 5

$\mu\text{g/ml}$ ; CTCF BD 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , CTCF Abcam 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , RNAP II Abcam 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Zellen wurden erneut gewaschen und in die Sekundärantikörperlösungen gelegt (FITC-Ziege anti-Kaninchen 30  $\mu\text{g/ml}$  in PBS; Cy3-Ziege anti-Maus 7,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Alexa 488-Ziege anti-Kaninchen 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Zur Gegenfärbung der gesamten Zelle enthielten die Verdünnungen 0,01% Evansblue. Da die Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wurden die Zellen für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren Waschgängen wurden die Deckgläschen kurz getrocknet, eingedeckelt und fixiert. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop Nikon Eclipse E400.

Für die Doppelfärbungen erfolgten die Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern sequentiell. Zwischen erster und zweiter Färbung wurde ein zweiter Blockschritt mit Kaninchenserum (1:50 verdünnt) eingegeben. Zur Betrachtung der Zellen am konfokalen Mikroskop wurden die Kerne der Zellen vor dem Eindeckeln zusätzlich für 5 min mit Hoechst 33342 in einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  angefärbt.

### 2.23 FACS-Analysen zur Identifizierung von Tumorzellen mit Stammzell-Phänotyp

Die Durchflusszytometrie mit Hilfe des FACS-Gerätes (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht das Zählen und die quantitative Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. In diesem Strom werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einer Lichtquelle vorbeigeleitet. Dabei werden die Größe basierend auf der Vorwärtstreuung, die interne Komplexität anhand der Seitwärtstreuung des Lichts, sowie verschiedene potentielle Zelleigenschaften mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper gleichzeitig gemessen. Als Lichtquelle werden verschiedene Laser verwendet. Für die Analyse der Zellen mit Hilfe des Hoechst 33342-Farbstoffes wurde ein UV-Laser benötigt. Das von den Zellen abgestrahlte Licht wird zu Photodetektoren und Multipliern gelenkt, die die Signale detektieren und digitalisieren. Gängige Darstellungsmöglichkeiten sind das Streudiagramm (*Dot Plot*) und das Histogramm. Je nach FACS-Gerät besteht darüber hinaus die Möglichkeit verschiedene Zellpopulationen zu sortieren und getrennt voneinander zu sammeln.

Die Verwendung des Hoechst 33342-Farbstoffes beruht auf der Ausnutzung einer Stammzell-typischen Eigenschaft, der Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen. Diese wird durch Expression verschiedener ATP-Bindekassettentransporter (ABC-Transporter) vermittelt. Durch Nutzung der Energie aus der ATP-Hydrolyse ermöglichen sie einen aktiven Efflux der Substanzen. Zur Familie der ABC-Proteine gehört die Gruppe der *Multi Drug Resistance* Gene (MDR). Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, indem Tumorzellen mit dem DNA-

bindenden Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt werden. Zellen mit dieser Stammzell-Eigenschaft verlieren mit Hilfe des ABC-Systems ihre Färbung, differenziertere Tumorzellen bleiben gefärbt. Goodell et al. hatten zuerst entdeckt, dass eine Darstellung der Färbung bei zwei verschiedenen Wellenlängen im Dot Plot am FACS-Gerät eine kleine ungefärbte Population von Zellen abgrenzt [Goodell et al., 1996]. Diese sog. *Side Population* besitzt einen Stammzell-Phänotyp und tumorigene Eigenschaften.

Zur Sortierung verschiedener Zellpopulationen in Tumorzelllinien nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 wurden die Zellen zunächst trypsiniert und in vorgewärmtem Medium mit 2% FCS und 1 mM HEPES-Puffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz verteilt. Beim ersten Versuch wurden die Zellen jeweils für 60, 90 und 120 min mit dem Farbstoff gefärbt. Parallel wurde zu jeweils einem Ansatz zusätzlich Verapamil, ein Inhibitor des Transportersystems, in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  hinzugegeben. Bei Wiederholungsversuchen erfolgte die Färbung nur noch für 90 min, bei 37 °C mit einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342. Nach Ablauf der Färbezeit wurden die Zellen bei 900 x g zentrifugiert und in HBSS mit 2% FCS und 1 mM HEPES-Puffer so resuspendiert, dass die Zellen als Einzelzellsuspension vorlagen. Zur Färbung toter Zellen wurde zusätzlich eine Propidium-Iodid-Lösung zu einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Bis zur FACS-Analyse wurden die Zellen auf Eis gelagert. Bei der Überführung der Zellsuspension in spezielle FACS-Röhrchen wurde diese zusätzlich auf einen Nylon-Filter mit definierter Porengröße gegeben, um die Suspension von verklumpten Zellen zu bereinigen. Die FACS-Analyse mit anschließender Sortierung der Zellen wurde am Cytomics FC 500-Gerät vorgenommen, bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von 350 nm. Die Färbung der Zellen wurde in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen analysiert, im Blaubereich bei 424-444 nm und im Rotbereich bei 675 nm für Hoechst-ungefärbte Zellen. *Forward* und *Side Scatter*-Einstellungen, die eine Limitierung über Zellmorphologien erlauben, wurden nicht stark stringent gewählt. Zellreste und tote Zellen wurden ausgeschlossen. Die genaue Justierung des Geräts und Einstellung der Analyse-Parameter wurde freundlicherweise von Dr. J. Fischer entsprechend seiner Erfahrungen zum Versuchsansatz mit hämatopoetischen Zellen vorgenommen. Bis zu 3% der ungefärbten Zellen wurden als *Side Population* eingegrenzt und von den übrigen Zellen isoliert. Beide Zellfraktionen wurden jeweils in Vollmedium aufgenommen. Nach der Sortierung wurden die gewonnenen Zellen bei 900 x g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und zur Präparation von RNA eingesetzt (vgl. 2.16.3).

Ein zweiter Ansatz zur Identifizierung von mutmaßlichen Tumorstammzellen beruht auf der Verwendung eines allgemein für Stammzellen typischen Oberflächenmarkers. Das humane Prominin 1, ein transmembranäres Glykoprotein wurde ursprünglich als Oberflächenmarker namens CD133 bei einer Subpopulation von hämatopoetischen Stammzellen entdeckt [Miraglia et al., 1997]. Nach der Verwendung bei einigen normalen Geweben [Uchida et al., 2000; Corbeil et al., 2000; Richardson et al., 2004], gelang eine Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzell-Phänotyp erstmals bei Gehirntumoren [Singh et al., 2003]. Zur Anreicherung mit Hilfe eines Antikörpers gegen CD133 wurden im Laufe der Zeit zwei verschiedene Systeme verwendet. Neben der klassischen FACS-Analyse mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung des Antikörpers kam häufig ein System mit magnetischen Säulen und einer Kopplung des Antikörpers mit magnetischen Partikeln zum Einsatz.

Zur Identifizierung CD133-positiver Zellen in Tumorzelllinien mittels FACS-Analyse wurden die Zellen zunächst trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Zur Analyse wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz eingesetzt und in 80  $\mu\text{l}$  FACS Flow-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde nach Herstellerangaben 10  $\mu\text{l}$  des anti-CD133-Antikörpers (293C, Miltenyi) bzw. einer Isotypkontrolle hinzugegeben. Bei der Isotypkontrolle handelt es sich um einen Antikörper derselben Spezies, desselben Isotyps, der außerdem ebenfalls mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist, um hiermit eine potentielle Hintergrundfluoreszenz des spezifischen Antikörpers korrigieren zu können. Die Markierung der Zellen erfolgte bei 4 °C für 10 min. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Puffer gewaschen und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurden die Zellen in FACS-Flow-Puffer resuspendiert und mit Propidiumiodid mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml gefärbt. Zusätzlich wurde ein entsprechender Ansatz ohne jegliche Zugabe eines Antikörpers vorbereitet, um auch die Eigenfluoreszenz der Zellen abschätzen zu können.

Die Einstellungen der Parameter für die Analyse am FACSCalibur-Gerät, sowie die Bedienung des Gerätes wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. S. Bork vorgenommen. Hierbei wurden die Einstellungen so gewählt, dass sämtliche Hintergrundfluoreszenzen sowie tote Zellen ausgeschlossen wurden.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expressionsanalyse der Kandidatengene

##### 3.1.1 Die Polycomb-Gene *EZH2* und *BMI-1*

Aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung für epigenetische Mechanismen und Hinweisen auf eine Beteiligung an der Entstehung verschiedener Tumoren, wurden die beiden Polycomb-Gene *EZH2* und *BMI-1* als Kandidaten für die Arbeitshypothese dieser Arbeit betrachtet (vgl. 1.3,1.4). Ihre Expression in Prostata- und Urothelkarzinom-Zelllinien wurde zunächst mittels qualitativer, später mittels quantitativer RT-PCR charakterisiert. Dargestellt sind relative Expressionen nach Abgleich auf die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* als interne Kontrolle.

Im Vergleich zu Kontrollen aus zwei verschiedenen normalen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC) wiesen einige der untersuchten Urothelkarzinom-Zelllinien ein erhöhtes *EZH2* Expressionsniveau auf (graue Balken in Abb. 3.1). Die Prostatakarzinom-Zelllinien zeigten teilweise ein noch höheres Expressionsniveau.

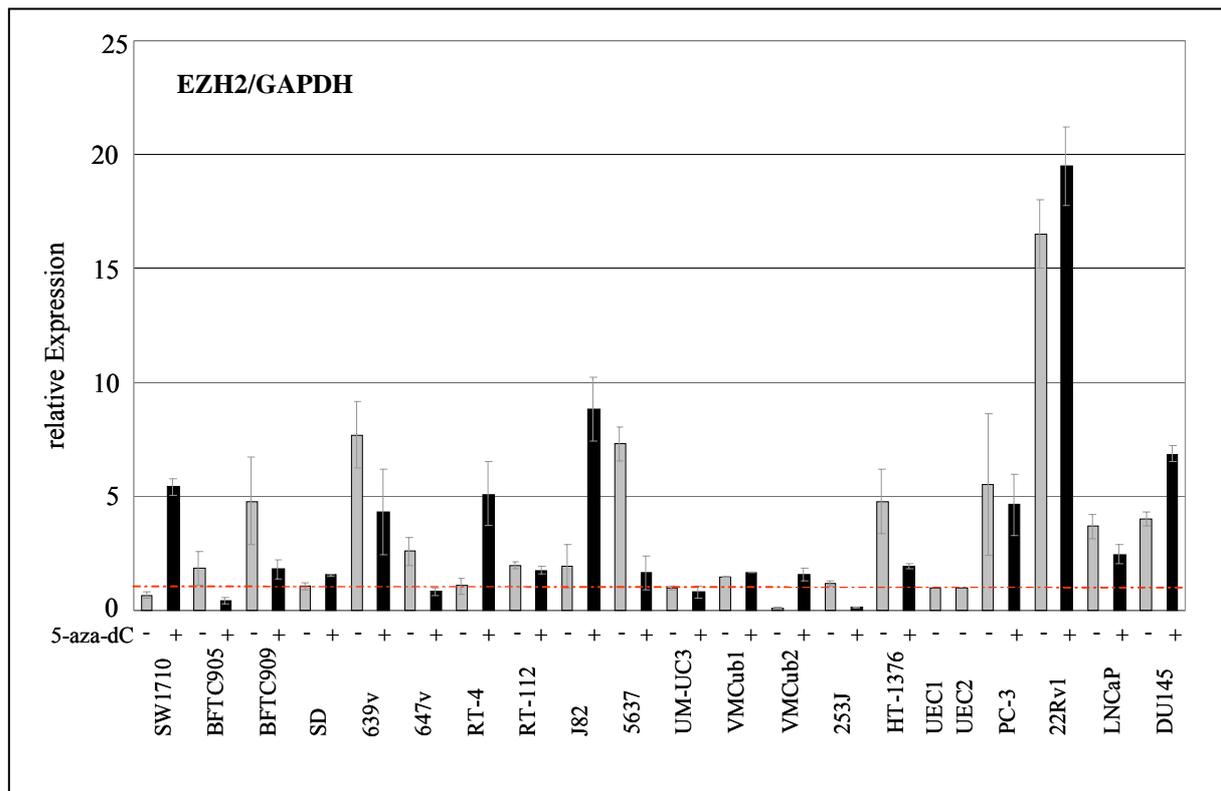


Abb. 3.1: *EZH2*-Expressionsniveau (graue Balken) in Urothelkarzinom-Zelllinien (SW1710 bis HT-1376), verschiedenen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC) und Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis DU145), relativ zum Haushaltsgen *GAPDH*. Das mittlere Expressionsniveau der beiden UEC wurde als 1 angenommen (rote Linie) und die übrigen Proben entsprechend normiert. Schwarze Balken geben das jeweilige Expressionsniveau nach Behandlung der Zellen mit 5-aza-dC an.

Um zu analysieren, ob die Expression durch DNA-Methylierung beeinflusst wird und induziert werden kann, wurden die Zelllinien parallel zu den unbehandelten Ansätzen mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-2'-Desoxycytidin behandelt und auch hier das Expressionsniveau bestimmt. Dabei zeigte sich, dass, von wenigen Ausnahmen mit mäßiger Erhöhung abgesehen, keine signifikante Induktion der *EZH2*-Expression erzielt werden konnte.

Analog wurde das Expressionsniveau des Polycomb-Gens *BMI-1* analysiert. Hier zeigte sich ein vergleichsweise niedriges Expressionsniveau in Urothelkarzinom-Zelllinien und ein höheres in Prostatakarzinom-Zelllinien. Die Werte der erhöhten *BMI-1*-Expressionen in Prostatakarzinom-Zelllinien lagen jedoch weit unter den Werten der erhöhten *EZH2*-Expression (siehe unterschiedliche Skalierungen der y-Achse in Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Wie bei der Analyse von *EZH2* konnte auch hier im allgemeinen keine signifikante Induktion durch Behandlung mit 5-aza-dC erreicht werden.

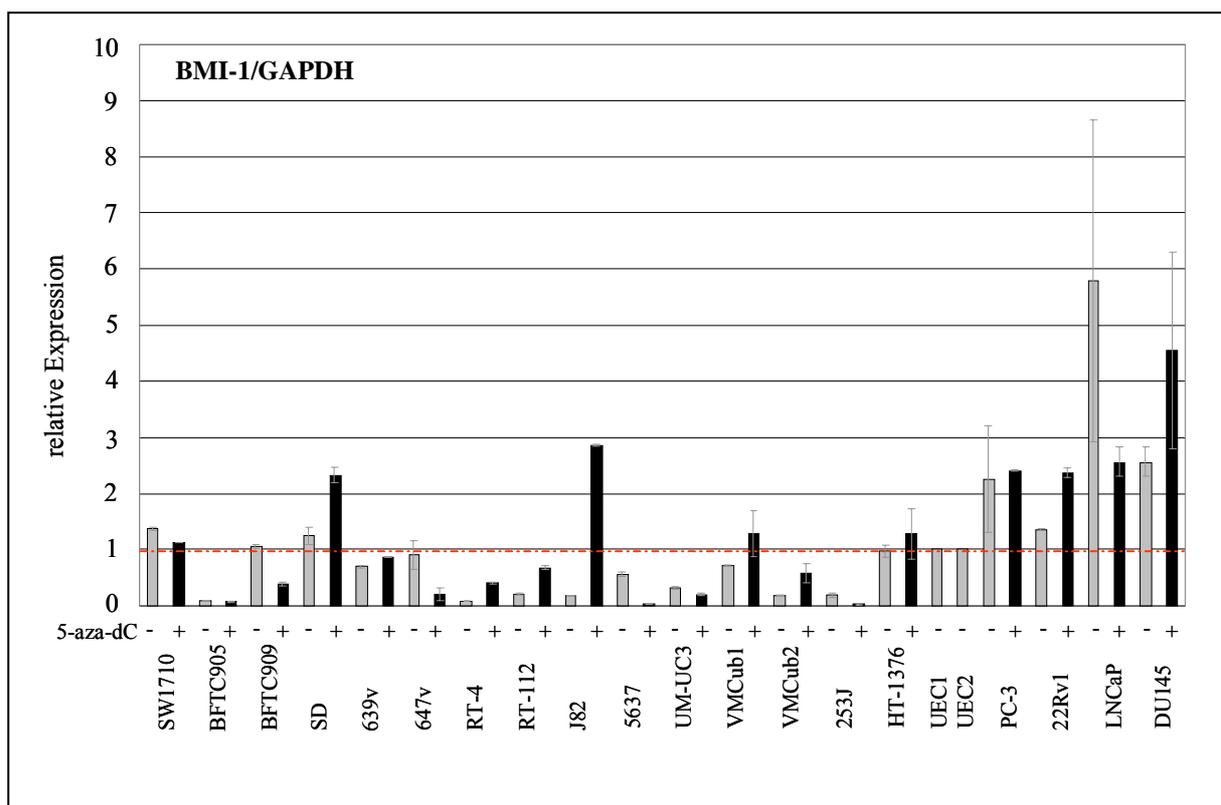


Abb. 3.2: *BMI-1* Expressionsniveau (graue Balken) in Urothelkarzinom-Zelllinien (SW1710 bis HT-1376), verschiedenen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC) und Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis DU145), relativ zum Haushaltsgen GAPDH. Das mittlere Expressionsniveau der beiden UEC wurde als 1 angenommen (rote Linie) und die übrigen Proben entsprechend normiert. Schwarze Balken geben das jeweilige Expressionsniveau nach Behandlung der Zellen mit 5-aza-dC an.

Um festzustellen, ob auch in Geweben von Prostatakarzinom-Patienten eine im Vergleich von Primärtumoren zu Normalgeweben erhöhte Expression der Polycomb-Gene festgestellt werden kann, wurden 45 Tumorgewebe- und 7 Normalgewebeproben mittels quantitativer

RT-PCR untersucht. Zur relativen Quantifizierung wurde außerdem die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* und von *Cytokeratin 18 (CK18)* bestimmt. Mit dem Bezug der Polycomb-Genexpressionen auf *CK18* werden die Werte jeweils um den Anteil stromaler Zellen korrigiert, da dieses Cytokeratin ausschliesslich in epithelialen Zellen exprimiert wird und der Anteil stromaler Zellen damit herausgerechnet wird.

Für *EZH2* ergibt sich in Relation zu beiden Kontrollgenen eine in Tumorgeweben erhöhte Expression ( $p=0,088$ ;  $p=0,235$ ). Die Unterschiede waren allerdings bei der üblichen Grenze von  $p<0,05$  nicht signifikant.

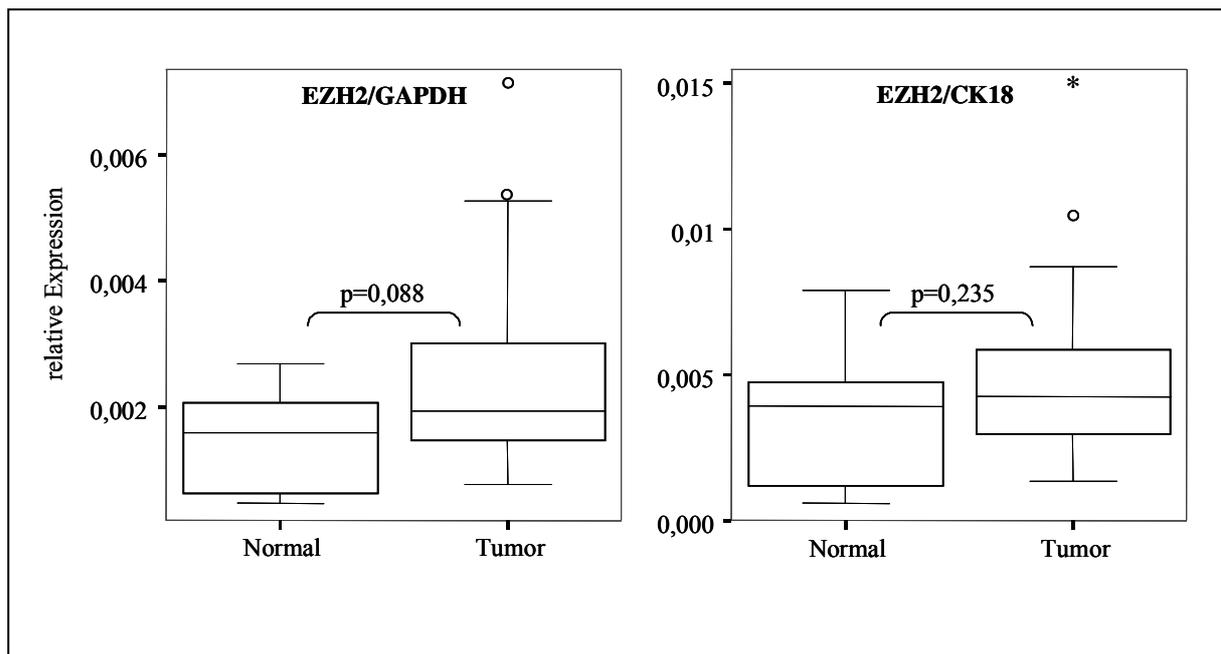


Abb. 3.3: *EZH2*-Expressionsniveau relativ zu *GAPDH* bzw. *CK18* in primären Prostatatumor- und Normalgeweben, dargestellt als Boxplot-Diagramme. Im Boxplot-Diagramm zeigt die untere Kante der Kästen den 25%-Wert, die obere den 75%-Wert. Innerhalb der Kästen liegen also 50% der Fälle. Als Sterne gekennzeichnet sind die Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen vom oberen bzw. unteren Kastenrand entfernt liegen. Ausreißer sind die Fälle, die 1,5 bis 3 Kastenlängen vom oberen bzw. unteren Kastenrand entfernt liegen. Diese sind mit einem Kreis gekennzeichnet. Von der unteren und oberen Kastenkante sind senkrechte Linien mit Querbalken gezogen, sog. Whiskers. Mit diesen Linien werden die größten und kleinsten Werte (ausgenommen Extremwerte und Ausreißer) eingegrenzt.

Analog wurde die Analyse für *BMI-1* relativ zu *GAPDH* und *CK18* durchgeführt. Entgegen der Ergebnisse der Expressionsanalyse in Prostatakarzinom-Zelllinien ergab sich für das Gewebe von Primärtumoren eine im Vergleich zu Normalgewebe erniedrigte Genexpression. Nach Korrektur um den Anteil epithelialer Zellen ergab sich für diesen Befund eine statistische Signifikanz ( $p=0,075$ ;  $p=0,001$ ).

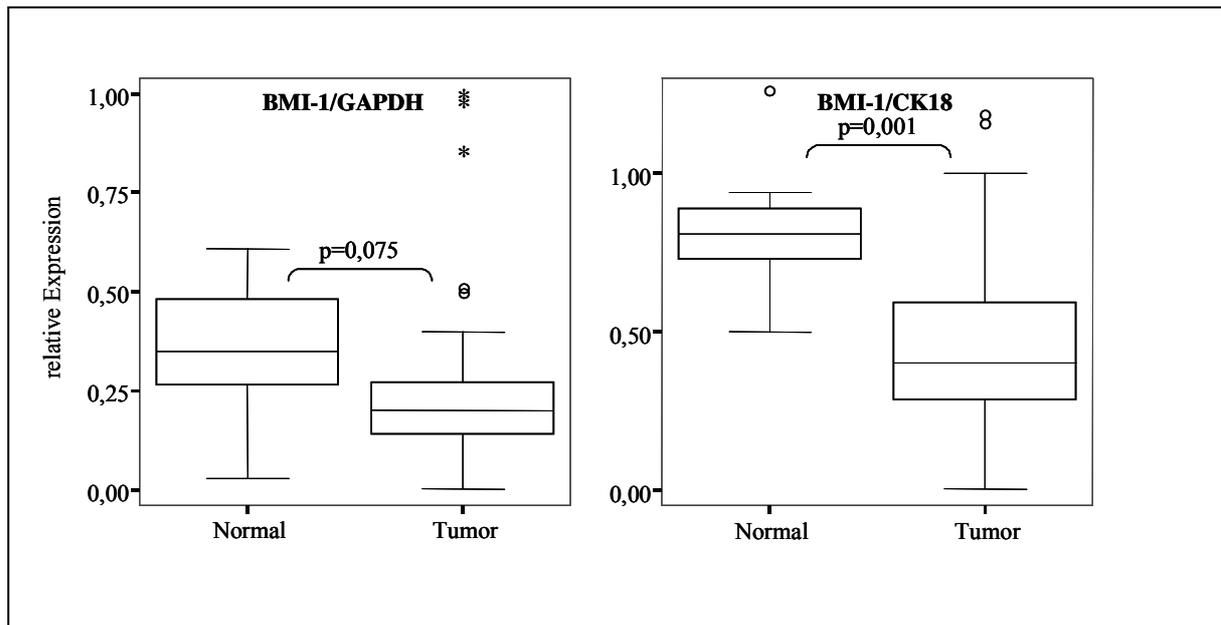


Abb. 3.4: *BMI-1*-Expressionsniveau relativ zu *GAPDH* bzw. *CK18* in primären Prostatatumor- und Normalgeweben, dargestellt als Boxplot-Diagramme.

Da die beiden Polycomb-Gene *EZH2* und *BMI-1* unter physiologischen Bedingungen häufig ein gegensätzliches Expressionsmuster zeigen, wurde die Expression beider Gene in den Gewebeproben auf eine lineare Abhängigkeit untersucht. Hierzu wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Für *EZH2* und *BMI-1* konnte kein Zusammenhang festgestellt werden ( $r=0,09$ ).

Später flossen die Expressionswerte dieser Gewebeproben in weitere statistische Analysen ein, um zu verfolgen ob eine Korrelation mit Methylierungsveränderungen besteht (vgl. 3.2.3).

Zur Validierung der Expressiondaten auf Proteinebene wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Patientenproben verwendet, die auch zuvor für die mRNA-Analyse eingesetzt wurden.

Auch auf Proteinebene konnte für *BMI-1* eine erniedrigte Expression in Tumorgewebe dargestellt werden (Abb. Abb. 3.5 A, B, C). Die Paraffinschnitte zeigten ein ausschließlich nukleäres Färbemuster, welches in normalen Drüsen besonders intensiv erschien. In normalen Drüsen zeigten sowohl Basalzellen (Abb. B Vergrößerungsausschnitt, weiße Pfeile) als auch sekretorische Zellen (schwarze Pfeile) positive Färbungen. In tumorösem Gewebe waren die *BMI-1*-Färbungen sichtbar schwächer, Basalzellen waren nicht mehr zu identifizieren.

Für *EZH2* ergab die immunhistochemische Analyse eine stärkere nukleäre Färbung im Tumorgewebe (Abb. D) im Vergleich zu normalen Drüsen (Abb. E). Auch hier waren sowohl Basalzellen (Abb. E, weiße Pfeile) als auch sekretorische Zellen (schwarzer Pfeil) gefärbt. Bei der Durchsicht verschiedener Paraffinschnitte fiel jedoch eine gewisse Heterogenität der

EZH2-Expression in Tumorgewebe auf. Abb. F stellt diese zwischen verschiedenen Tumorarealen innerhalb eines Schnittes dar.

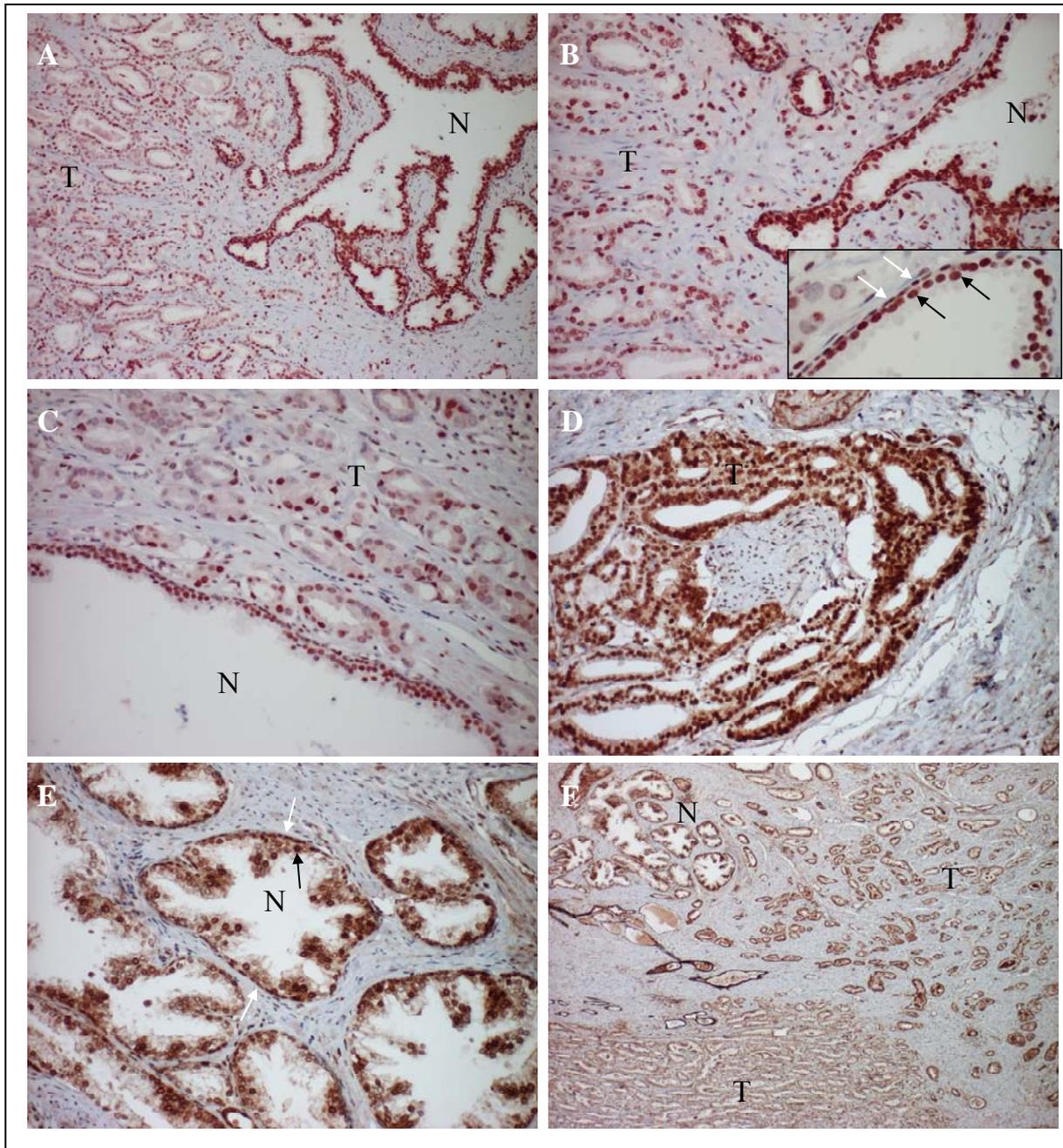


Abb. 3.5: Immunhistochemische Analyse der BMI-1- (A, B, C) und EZH2-Proteinexpression (D, E, F) in Paraffinschnitten mit tumorösen Arealen (T) und normalen Drüsen (N). In normalen Drüsen sind Basalzellen mit weißen Pfeilen kenntlich gemacht, sekretorische Zellen mit schwarzen Pfeilen.

### 3.1.2 Die Histondeacetylase SIRT1

Homologe für die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Sirtuin Histondeacetylase SIRT1 in der Hefe spielen eine zentrale Rolle in der epigenetischen Genregulation. Bei Mammaliern wird für das nukleäre Protein eine Rolle bei der Regulation von Entwicklung und Differenzierung vermutet. Kuzmichev et al. beschrieben eine Assoziation von SIRT1 mit Komponenten des PRC2-Komplexes (vgl. Abb. 1.4), dem auch EZH2 angehört [Kuzmichev et al., 2005]. Komponenten dieses nunmehr PRC4 genannten Komplexes wurden in einigen epithelialen Tumoren überexprimiert gefunden [Kuzmichev et al., 2005]. Die Befunde in 3.1.1 könnten demnach eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Polycomb-Komplexe im Prostatakarzinom anzeigen. Daher wurde die Expressionsanalyse des PRC4-spezifischen *SIRT1*-Gens unternommen, um dieser Vermutung nachzugehen.

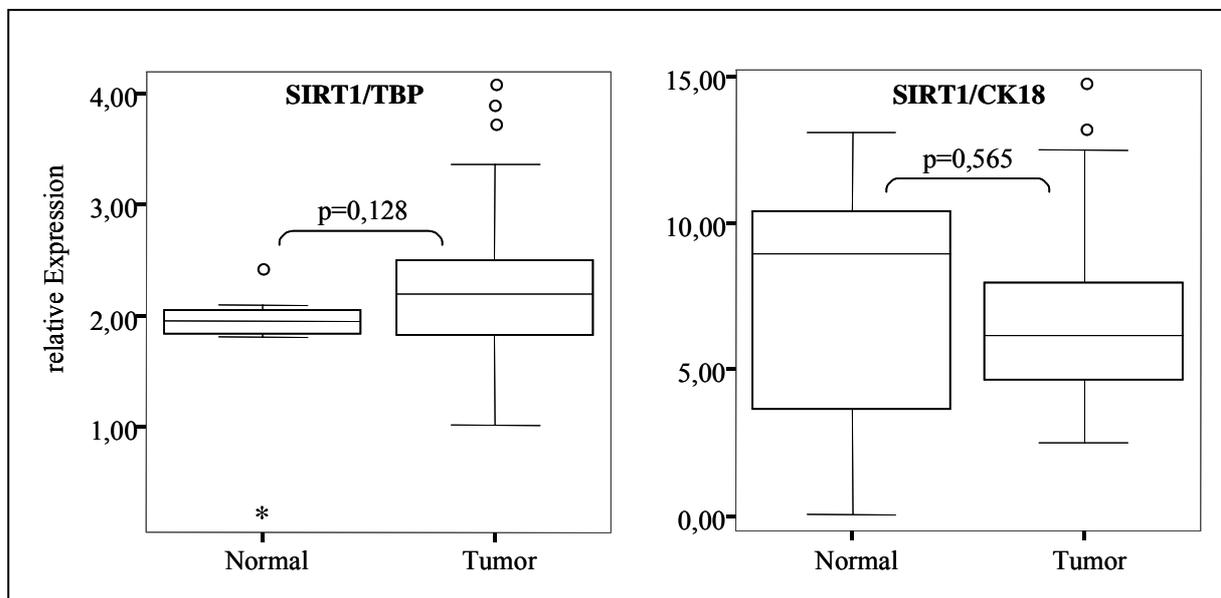


Abb. 3.6: *SIRT1*-Expressionsniveau relativ zu TBP bzw. CK18 in primären Prostatatumor- und Normalgeweben, dargestellt als Boxplot-Diagramme.

Da sich im Laufe dieser Arbeit Laborinterne Standards verändert haben, wurde bei dieser Analyse das Tata-Box bindende-Protein (TBP) als Referenzgen verwendet. In Analogie zum Poylcomb-Gen *EZH2*, wurde auch die Histondeacetylase *SIRT1* in Tumoren mit tendenziell erhöhter Expression gefunden ( $p=0,128$ ;  $p=0,565$ ), doch war der Zusammenhang nicht signifikant.

### 3.1.3 Die de novo DNA-Methyltransferase DNMT3B

Da die *de-novo* DNA-Methyltransferase DNMT3B besonders stark in frühen Entwicklungsstadien exprimiert wird, stellte sich vor dem Hintergrund der Hypothese einer Reexpression früher Gene in soliden Tumoren und der Hypothese der Tumorstammzellen (vgl. 1.3, 1.4) die Frage, ob auch *DNMT3B* in Prostatakarzinomen erhöht exprimiert ist. Zudem beschrieben Huntriss et al. für die Transkriptvariante *DNMT3B1*, als eine der drei *DNMT3B*-Transkriptvarianten, eine Assoziation mit der Toti- und Pluripotenz von humanen Zellen [Huntriss et al., 2004]. Zur Analyse der Expression über quantitative RT-PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die alle drei Transkriptvarianten erfassen [Kimura et al., 2003].

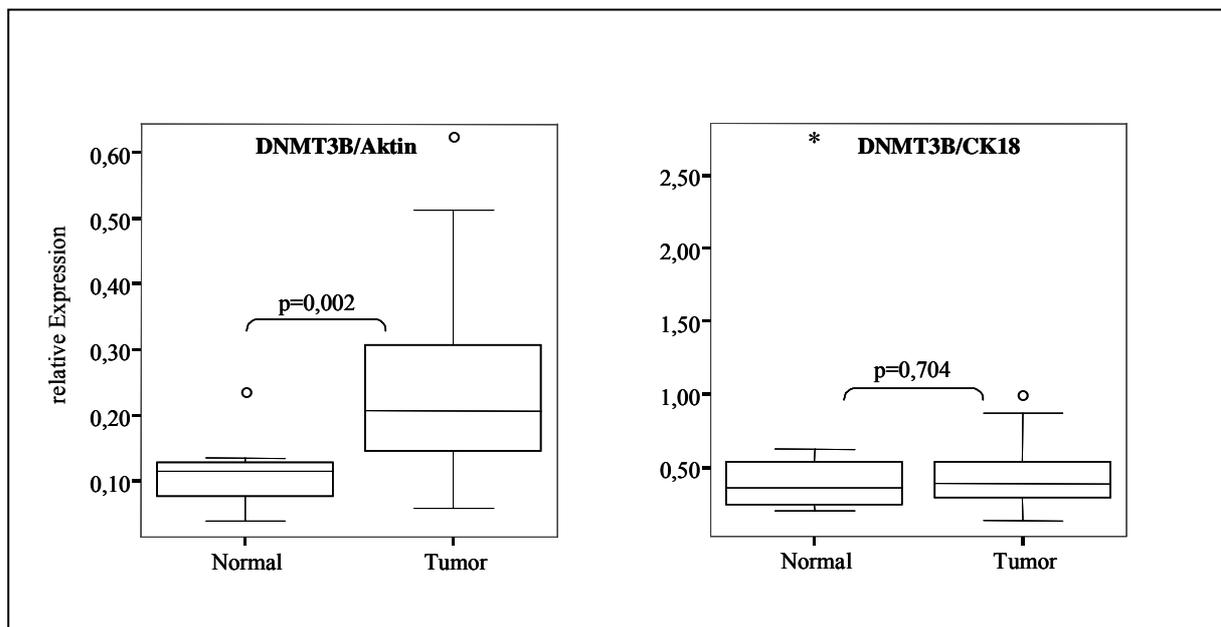


Abb. 3.7: *DNMT3B*-Expressionsniveau relativ zu Aktin bzw. CK18 in primären Prostata tumor- und Normalgeweben, dargestellt als Boxplot-Diagramme.

Die Analyse ergab eine deutlich erhöhte Expression der *DNMT3B* in Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben ( $p=0,002$ ;  $p=0,704$ ). Auffällig ist dabei, dass der zuvor hoch signifikante Unterschied bei Bezug auf *Aktin*, beim Bezug auf *CK 18* mRNA verloren geht (vgl. 4.1).

3.1.4 Das Pluripotenzgen *OCT4*

Das *OCT4*-Gen wird in embryonalen Stammzellen exprimiert und gilt als wichtiger Faktor für ihre Pluripotenz. Es gibt Hinweise darauf, dass die Genexpression im Laufe der Differenzierung durch DNA-Methylierung abgeschaltet wird. Eine Reexpression des Gens wurde insbesondere bei Keimzelltumoren beschrieben (vgl. 1.3). Darauf basierend wurde *OCT4* auf eine Reexpression im Prostatakarzinom, das sich durch zunehmende DNA-Hypomethylierung auszeichnet, untersucht. Die Genexpression wurde zu Beginn in verschiedenen Zelllinien, relativ zum Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin bestimmt. *GAPDH* kam als Vergleichsgen nicht in Frage, da auch Teratokarzinom-Zelllinien bzw. Hodengewebebeurproben analysiert wurden, die regelmäßig chromosomale Veränderungen von Chromosom 12 aufweisen, welche auch den *GAPDH*-Locus betreffen können [Schmidt et al., 2001]. Als Vergleichswert für eine erhöhte Expression wurde das Expressionsniveau der Teratokarzinom-Zelllinie TERA-2 herangezogen. Dieses wurde mit dem Wert 1 festgesetzt und die übrigen Werte entsprechend normiert. Danach zeigten die Urothel- und Prostatakarzinom-Zelllinien eine vergleichsweise sehr niedrige Expression (graue Balken) mit wenigen nach oben abweichenden Ausnahmen (s. unterschiedliche Skalierungen der y-Achsen).

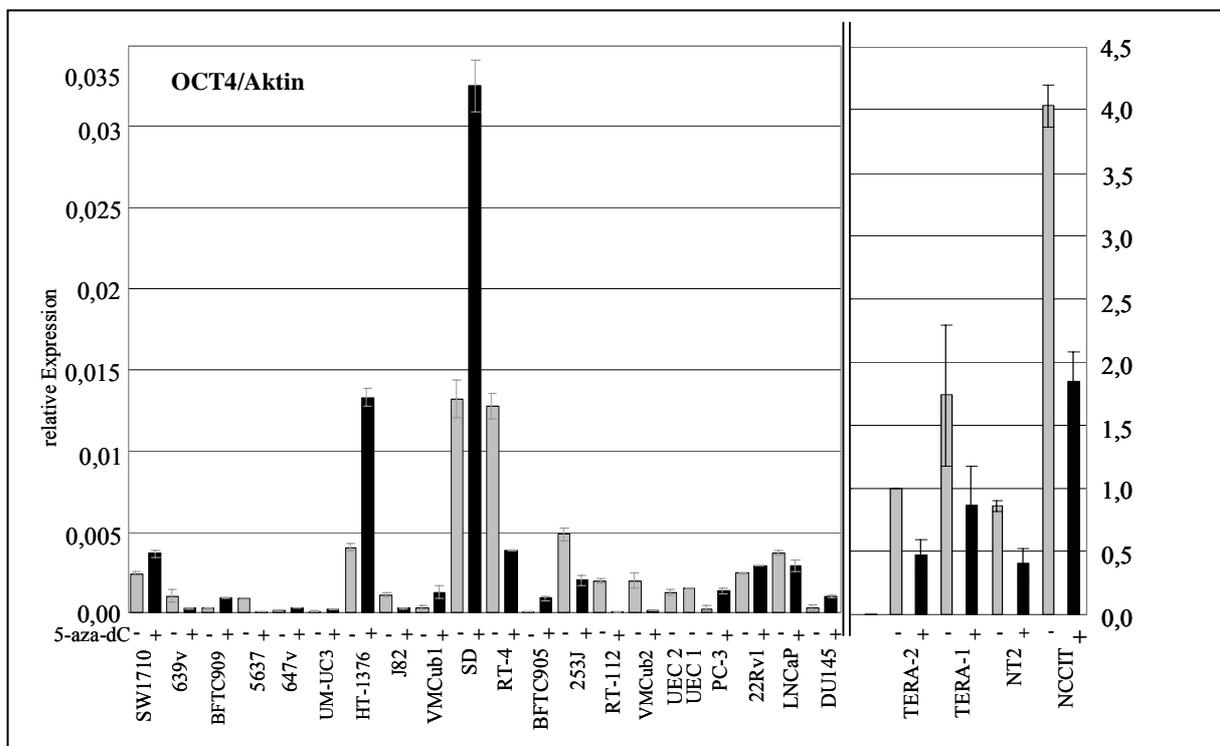


Abb. 3.8: *OCT4*-Expressionsniveau (graue Balken) in Urothelkarzinom-Zelllinien (SW1710 bis VMCub2), verschiedenen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC), Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis DU145) und Teratomkarzinom-Zelllinien (TERA-2 bis NCCIT), relativ zum Haushaltsgen Aktin. Das Expressionsniveau der Teratokarzinom-Zelllinie TERA-2 wurde als 1 angenommen und die übrigen Werte entsprechend normiert. Schwarze Balken geben das jeweilige Expressionsniveau nach Behandlung der Zellen mit 5-aza-dC an.

Da die größtenteils niedrige Expression durchaus auf DNA-Methylierungen des Gens beruhen konnte, wurde nach Behandlung der Zellen mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC das Expressionsniveau erneut bestimmt. In einigen Fällen, z.B. in den Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3 und DU145 sowie den Urothelkarzinom-Zelllinien HT-1376 und SD konnte eine begrenzte Induktion (schwarze Balken) erlangt werden, allerdings wurde das Expressionsniveau von Teratokarzinom-Zelllinien nicht annähernd erreicht. In diesen konnte ein erheblich höheres Grundniveau (bis zu 57-fach höher als in Prostatakarzinom-Linien) nachgewiesen werden (graue Balken). Der Methylierungsinhibitor war in allen vier Teratokarzinom-Zelllinien ineffektiv.

Die Expressionsanalyse wurde in Gewebeproben von 45 primären Prostatakarzinomen und 7 Normalgeweben wiederholt, um Hinweise auf einen Expressionsunterschied zu gewinnen. Als Referenzgene galten *Aktin* und *CK18*, um auch hier um den in der Tumorseite enthaltenen Anteil stromaler Zellen zu korrigieren. Die Gewebeproben der Tumoren zeigten eine erniedrigte *OCT4*-Expression im Vergleich zu Normalgeweben ( $p=0,629$ ;  $p=0,044$ ).

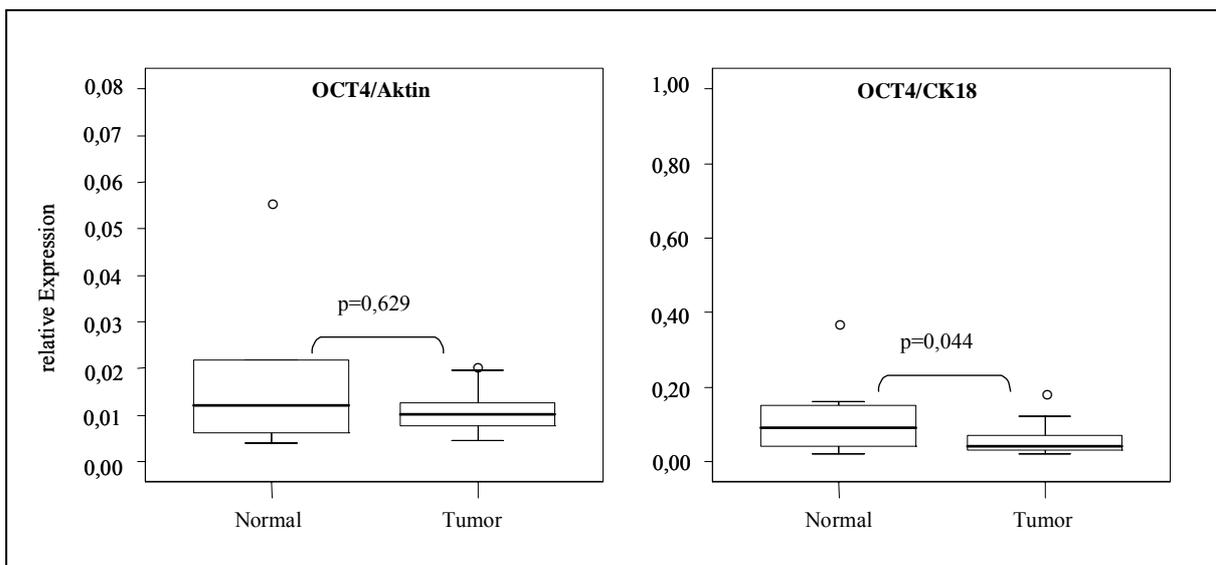


Abb. 3.9: *OCT4*-Expressionsniveau relativ zu *Aktin* bzw. *CK18* in primären Prostatakarzinom- und Normalgeweben, dargestellt als Boxplot-Diagramme.

Ein Vergleich der Expressionsstärke zwischen normalem Hodengewebe und normalem Prostatagewebe erbrachte eine 45-fach höhere Expression im Hoden (ohne Abbildung).

Da im Mausmodell Hinweise auf eine regulatorische Bedeutung von *Ezh2* auf das *Oct4*-Expressionsniveau gefunden wurden [Cao und Zhang, 2004], wurde auch hier ein linearer Zusammenhang überprüft. Die Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,435$  ( $p = 0,003$ ), der tatsächlich auf einen mäßig starken Zusammenhang hinweist.

Hinweise auf eine Repression der Genexpression durch Promotorhypermethylierung und statistische Zusammenhänge mit klinischen Parametern und Methylierungsveränderungen wurden später überprüft (vgl. 3.2.3).

### 3.1.5 Die Chromatinfaktoren *CTCF* und *CTCF*

Das *CTCF*-Gen ist als Chromatinfaktor mit regulatorischer Bedeutung für epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung bekannt. Er wird ubiquitär exprimiert. Demnach ergab die Analyse der *CTCF*-Genexpression mittels qualitativer RT-PCR eine ubiquitäre, starke Expression in allen untersuchten Proben. Für einen Vergleich mit dem Expressionsniveau im Hoden wurden anfänglich Proben aus normalem (B) und tumorösem Gewebe (A) verwendet. Durch die bereits starke Expression in unbehandelten Proben konnte, zumindest bei Verwendung der qualitativen RT-PCR mit Endpunktmessung, keine zusätzliche Steigerung der Expression durch den Methylierungsinhibitor 5-aza-dC festgestellt werden. Für die Analyse stand nur eine mit 5-aza-dC behandelte Kultur normaler Uroepithelzellen zur Verfügung.

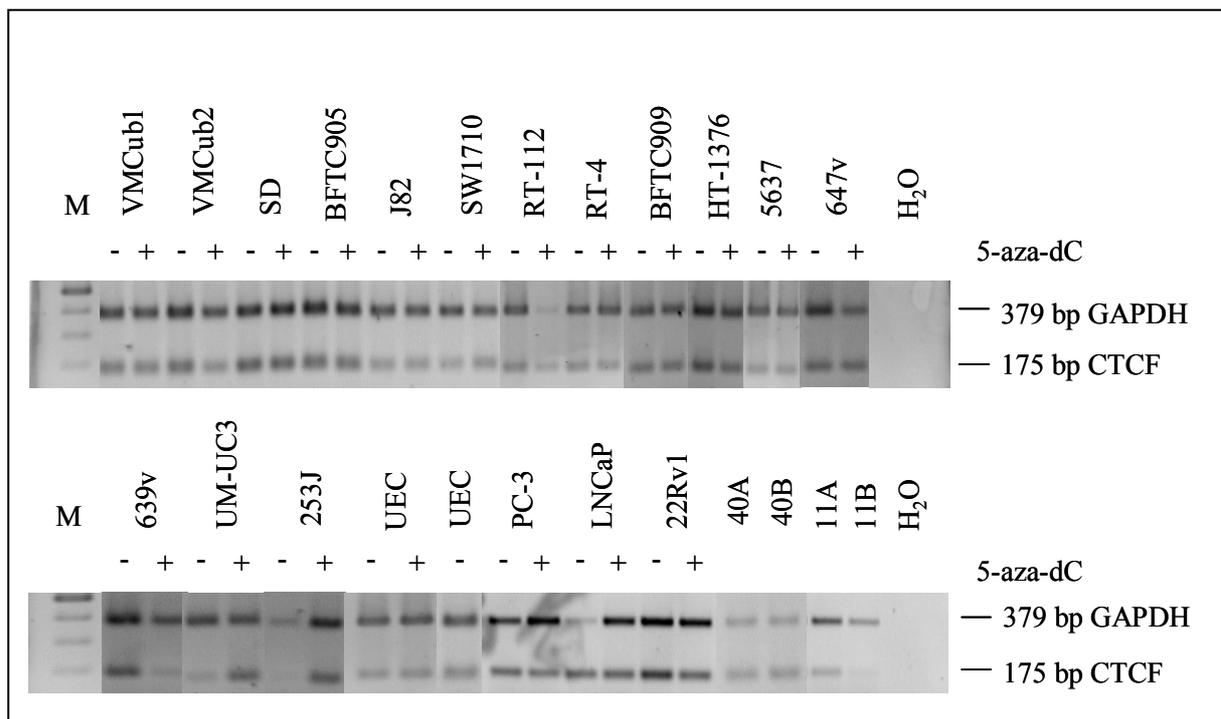


Abb. 3.10: *CTCF* Expressionsanalyse mittels qualitativer RT-PCR in Urothelkarzinom-Zelllinien (VMCub1 bis 253J), verschiedenen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC), Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis 22Rv1) und verschiedenen Hodengewebe-Paaren (A: Tumor, B: Normal). Als Kontrolle wurde parallel die Expression des Haushaltsgens GAPDH bestimmt. Paarweise wurde jeweils die Expression in unbehandelten (-) und in mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC (+) behandelten Ansätzen bestimmt.

Der später entdeckte paraloge Faktor, *CTCF* wurde als hodenspezifisch exprimiert beschrieben. Erste Studien wiesen auf eine Reexpression in verschiedenen Tumoren hin [Loukinov et al., 2002; Klenova et al., 2002]. Über seine funktionelle Bedeutung ist wenig bekannt.

Im Gegensatz zu *CTCF* ergab eine erste Expressionsanalyse für *CTCF* in Zelllinien mittels qualitativer PCR keine Expression in Urothel- und Prostatakarzinom-Zelllinien (-). Eine starke Expression zeigten aber die Kontrollen aus zwei verschiedenen Paaren Hodentumor- und Normalgewebe.

Besonders auffällig waren die starken Expressionssignale, die nach Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC (+) in allen Zelllinien, ausser in normalen Urothelzellen, induziert werden konnten.

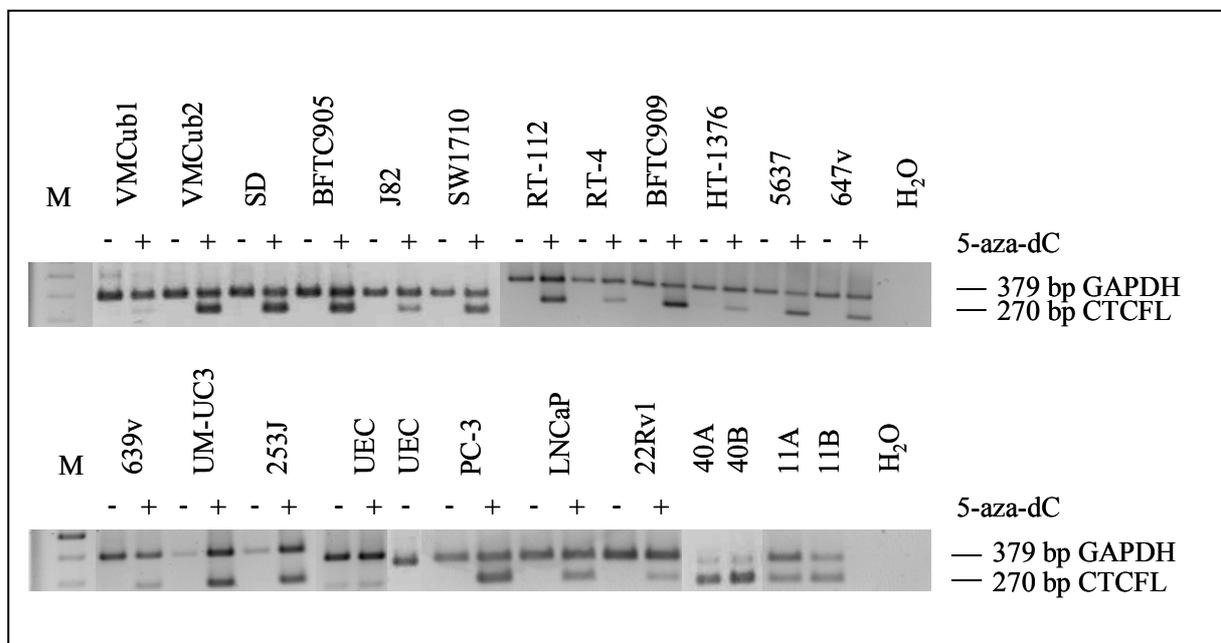


Abb. 3.11: *CTCF* Expressionsanalyse mittels qualitativer RT-PCR in Urothelkarzinom-Zelllinien (VMcub1 bis 253J), verschiedenen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC), Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis 22Rv1) und verschiedenen Hodengewebe-Paaren (A: Tumor, B: Normal). Als Kontrolle wurde parallel die Expression des Haushaltgens GAPDH bestimmt. Paarweise wurde jeweils die Expression in unbehandelten (-) und in mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC (+) behandelten Ansätzen bestimmt.

Eine Wiederholung der Expressionsanalyse für *CTCF* mittels quantitativer RT-PCR (vgl. Abb. 3.12) erwies das Ausmaß der Expressionsinduktion durch 5-aza-dC als teilweise mehr als 100-fach. Auch hier wurde das hohe Expressionsniveau der Teratokarzinom-Zelllinie TERA-2 auf den Wert 1 festgesetzt und die übrigen Werte normiert. Demnach erreicht keine der unbehandelten Zellen dieses Niveau, insgesamt sieben Zelllinien, davon alle vier Prostatakarzinom-Zelllinien, überstiegen dieses jedoch deutlich nach Induktion mit 5-aza-dC.

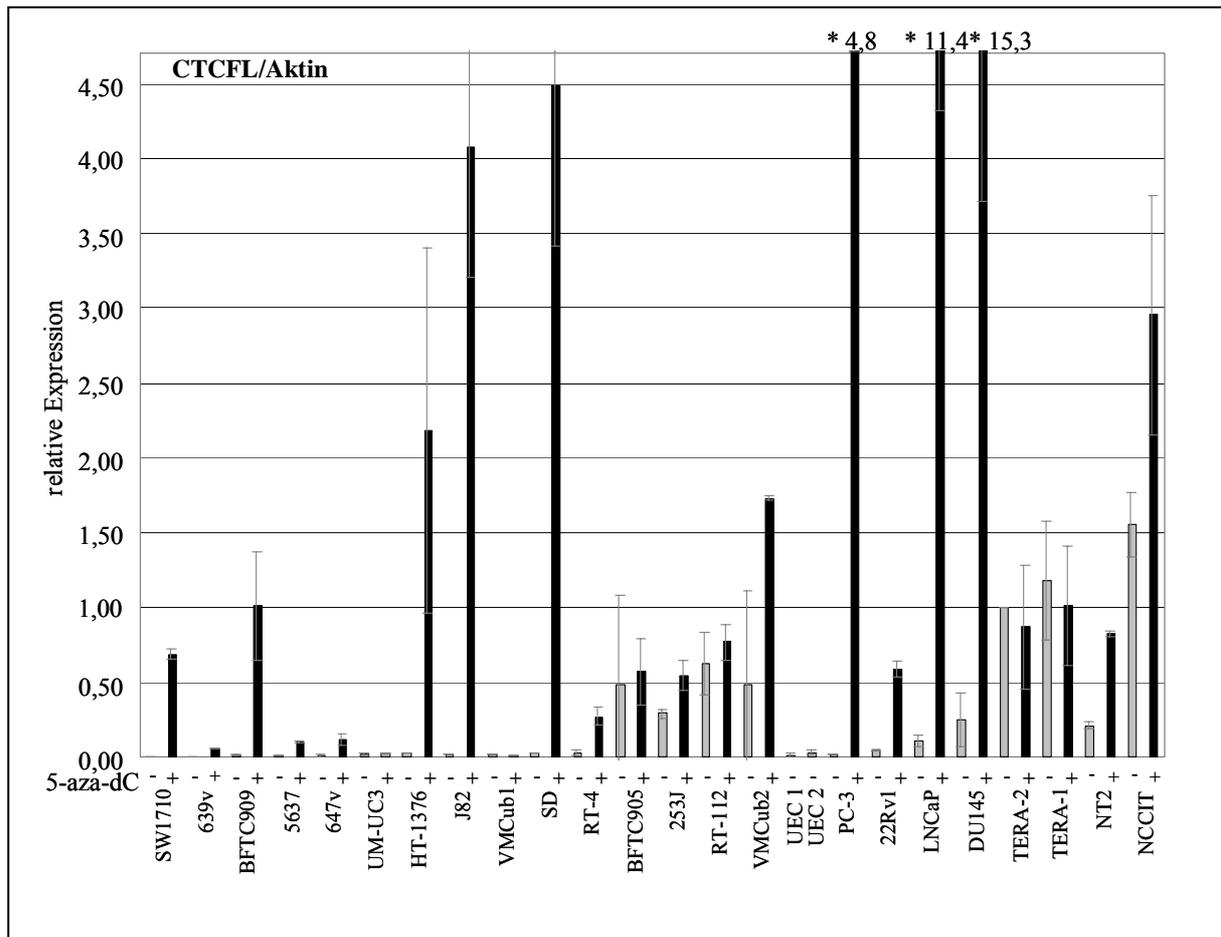


Abb. 3.12: CTCFL Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR in Urothelkarzinom-Zelllinien (SW1710 bis VMCub2), verschiedenen Uroepithel-Primärzellkulturen (UEC), Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis DU145) und Teratokarzinom-Zelllinien (TERA-2 bis NCCIT) relativ zu Aktin. Paarweise wurde jeweils die Expression in unbehandelten (-) und in mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC (+) behandelten Ansätzen bestimmt. Das Expressionsniveau der Teratokarzinom-Zelllinie TERA-2 wurde als 1 angenommen und die übrigen Werte entsprechend normiert.

In Analogie zu *OCT4* konnte auch für *CTCF*L ein höheres Grundniveau in verschiedenen Teratokarzinom-Zelllinien demonstriert werden. Die Unterschiede waren jedoch nicht so gravierend wie bei *OCT4*. Anders als bei den übrigen Zelllinien, einschließlich NT2 und NCCIT, konnte für TERA-1 und TERA-2 keine zusätzliche Induktion mit 5-aza-dC erreicht werden.

Die Untersuchung der Proben aus Primärtumoren und Normalgeweben ergab ein eher niedrigeres Expressionsniveau für Tumorproben im Vergleich zu Normalgewebe. Allerdings lagen die Werte in einzelnen Tumorproben deutlich über dem höchsten Normalniveau.

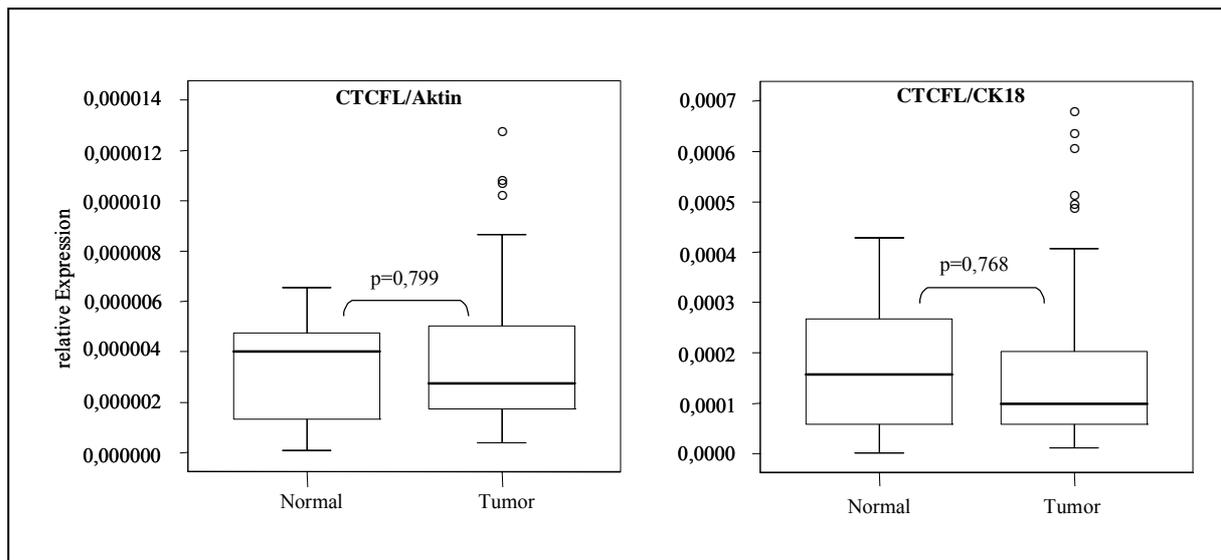


Abb. 3.13: CTCFL-Expressionsniveau relativ zu Aktin bzw. CK18 in primären Prostatatumor- und Normalgeweben dargestellt als Boxplot-Diagramme.

Ein Vergleich der Expressionsstärke zwischen normalem Hodengewebe und normalem Prostatagewebe, erbrachte eine 180-fach höhere Expression im Hoden (ohne Abbildung).

Zur Expressionsanalyse auf Proteinebene war erst erst spät ein kommerzieller Antikörper erhältlich. Ein zuvor von Dr. Klenova (University of Essex, UK) freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Aliquot eines als Auftragsarbeit hergestellten Huhn-Antikörpers hatte keine zuverlässigen Resultate erbracht. Nach den Angaben zur Proteingröße in der Swiss-Prot-Datenbank und laut persönlicher Kommunikation mit Dr. Klenova wurde für das CTCFL-Protein eine Proteinbande bei 75 bzw. 83 kDa erwartet. Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate aus normalem Hodengewebe verwendet. Diese wiesen eine Proteinbande bei ca. 83 kDa auf, die auch unter Beachtung der Bandenstärke für  $\alpha$ -Tubulin (50 kDa) als Ladungskontrolle, ein starkes Signal ergab. Außerdem wurden Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Den mRNA-Expressionsdaten entsprechend, zeigte die Zelllinie PC-3 auch die niedrigste Proteinexpression. Die übrigen Zelllinien-Lysate ergaben vergleichbar starke Proteinbanden, die jedoch nicht das Niveau normalen Hodengewebes erreichten. Entgegen den Resultaten der RT-PCRs konnte das CTCFL-Proteinniveau nicht durch eine 5-aza-dC Behandlung (+) gesteigert werden (vgl. Abb. 3.14)

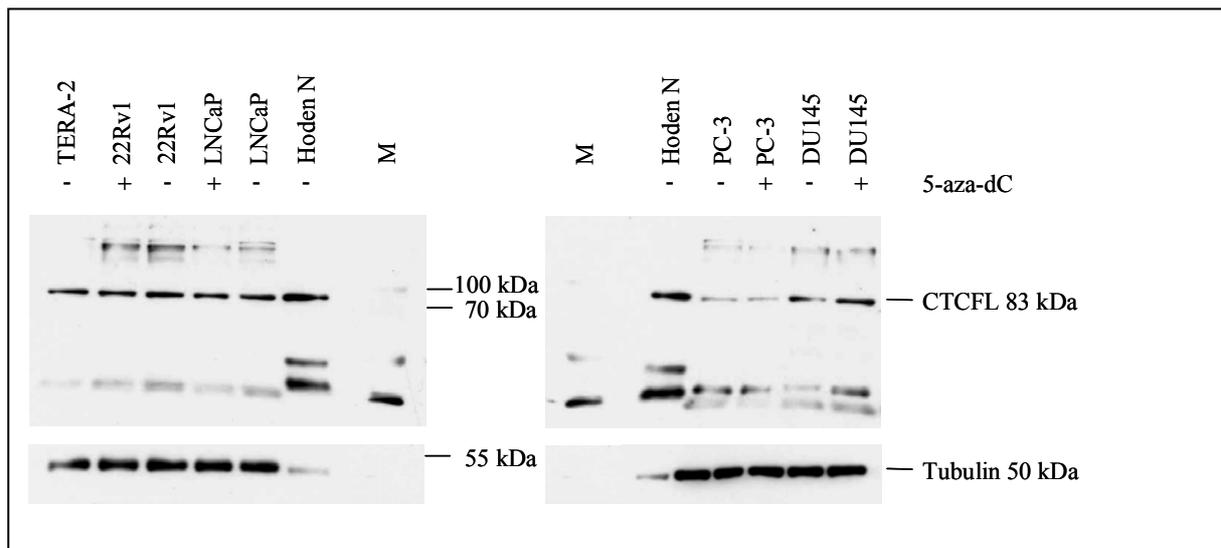


Abb. 3.14: Proteinblot zum Nachweis von CTCFL in Prostatakarzinom-Zelllinien mit (+) und ohne (-) 5-aza-dC Behandlung. Als Vergleichskontrollen wurden Proteinlysate aus normalem Hodengewebe und der Teratokarzinom-Zelllinie TERA-2 verwendet. Aufgetragen sind jeweils 30  $\mu$ g Protein. Als Ladungskontrolle erfolgte anschließend der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin.

Um auszuschließen, dass die übliche 3-Tages-Behandlung mit 5-aza-dC zu kurz war, um auf Proteinebene einen Effekt zu erzielen, wurden die Zelllinien 22Rv2 und DU145 sechs Tage lang behandelt und alle 24 h Proteinlysate gewonnen. Auch nach sechs Tagen Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor konnte keine Induktion von CTCFL auf Proteinebene nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Zur Ergründung der Proteinkinetik wurden dieselben Zelllinien mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteintranslation, behandelt. Während der 48-stündigen Behandlungszeit wurde alle 12 h jeweils ein Ansatz zu Proteinlysate aufgearbeitet. Zusätzlich zur Ladungskontrolle

$\alpha$ -Tubulin wurde der Proteinblot zum Nachweis von c-Myc eingesetzt, da für c-Myc eine einsetzende Inhibition der Proteintranslation unter Cycloheximid nach 24 h bekannt war [Hesketh, 1994].

Obwohl der Kontrollnachweis von c-Myc nach 24 h eine deutliche Reduktion der Proteinexpression zeigte, konnte für CTCFL zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung in der Bandenintensität beobachtet werden.

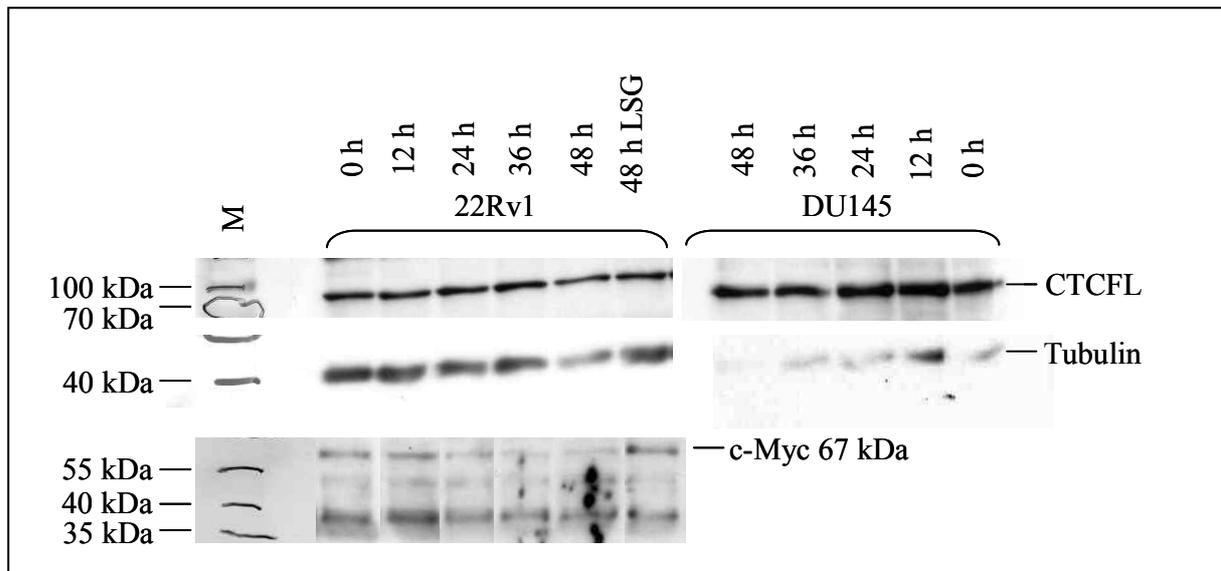


Abb. 3.15: Proteinblot zum Nachweis von CTCFL in 22Rv1 und DU145 während 48-stündiger Behandlung mit Cycloheximid. LSG: Lösungsmittel-Kontrolle. Aufgetragen sind jeweils 30  $\mu$ g Protein. Als Ladungskontrolle erfolgte der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin und von c-Myc zur Kontrolle der Wirksamkeit des Inhibitors.

Zur Untersuchung von Proteinexpressions-Unterschieden im Gewebe wurde Paraffin-Material immunhistochemisch mit dem CTCFL-Antikörper gefärbt (vgl. Abb. 3.16).

Auch hier diente normales Hodengewebe als Positivkontrolle für die Färbungen. Diese zeigen eine heterogene Färbung im Hodengewebe mit nukleärer Lokalisation in Spermatozyten (A) und zytoplasmatischer Lokalisation in Spermato gonien (A und B, weiße Pfeile), sowie in Leydig Zellen (A, Bildmitte). Repräsentative Schnitte aus Prostatagewebe erbrachten positive Signale in Tumorealen (C, linke Bildhälfte) und angrenzenden normalen Drüsen (C, rechte Bildhälfte). In normalen Drüsen fand sich eine starke zytoplasmatische Färbung in Basalzellen und sowohl eine zytoplasmatische, als auch membran-assoziierte Färbung in sekretorischen Zellen (D, E). Abbildung F zeigt Tumorgewebe derselben Patientenprobe mit rein zytoplasmatischer CTCFL-Proteinexpression.

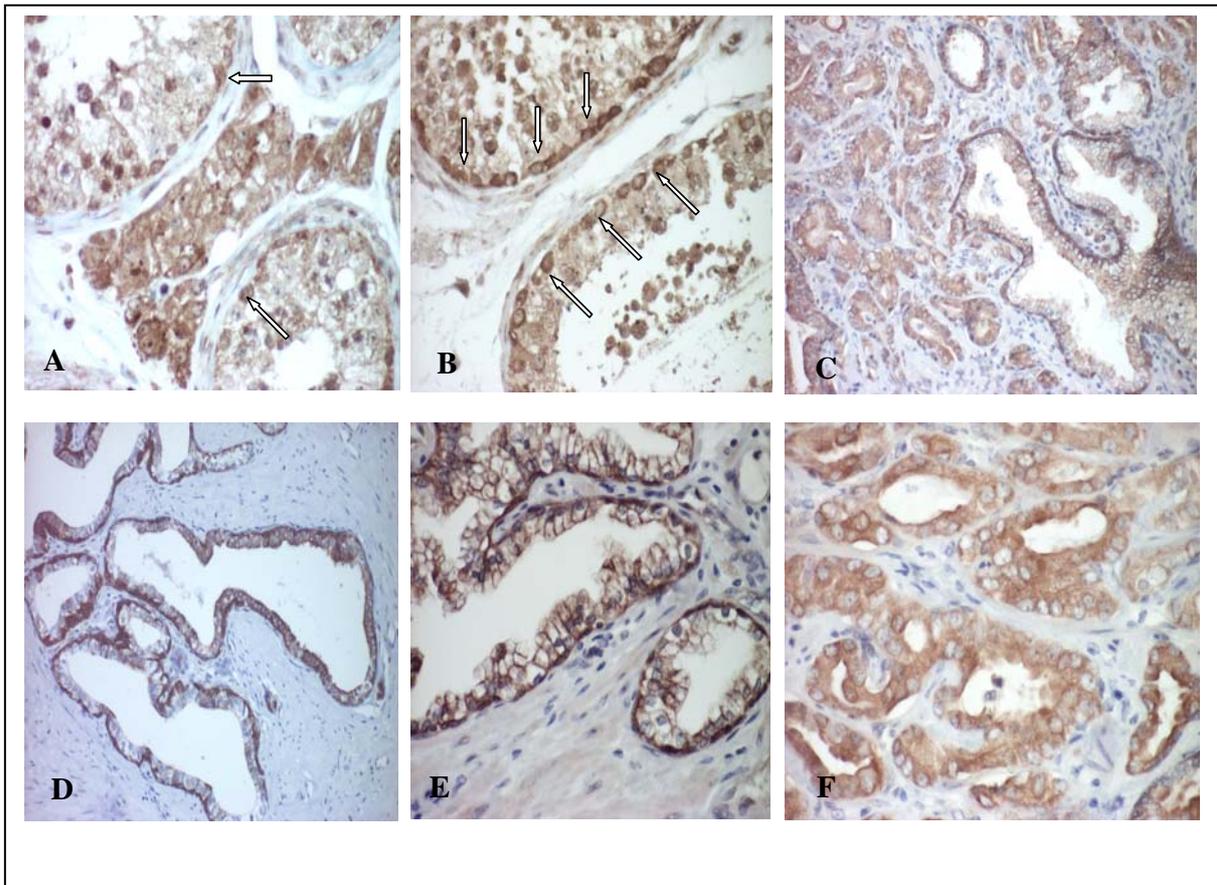


Abb. 3.16: Immunhistochemischer Nachweis von CTCFL (braune Färbung) in normalem Hodengewebe (A, B) und normalem (C, D, E) sowie tumorösem (C, F) Prostatagewebe. Weiße Pfeile weisen auf zytoplasmatische Expression in Spermatogonien hin.

Außerdem wurde der CTCFL-Antikörper zur Etablierung eines immunocytochemischen Färbeprotokolls verwendet. Dabei wurden verschiedene Zelllinien auf Deckgläschen ausgesät und parallel, mit 5-aza-dC behandelt und unbehandelt, zum Nachweis des CTCFL-Proteins eingesetzt.

Die Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT wurde als Positivkontrolle gefärbt (A), da diese auf mRNA-Ebene ein hohes Basalniveau gezeigt hatte. Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper (B) ergab keinen Hintergrund, so dass grüne Fluoreszenzsignale in den anderen Proben als spezifisch anzunehmen sind. Abbildungen C und D zeigen eine ausschließliche nukleäre Färbung von CTCFL in der Zelllinie LNCaP, die durch 5-aza-dC (D) offenbar stärker wurde. PC-3 erschien dagegen mit einem schwächeren Fluoreszenzsignal (E), welches sich durch 5-aza-dC auffällig um den Nukleus herum oder membranständig darstellt (F). Für DU145 (G, H) und 22Rv1 (I, J) waren keine auffälligen Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Ansätzen festzustellen. Bei beiden Zelllinien war das CTCFL Protein nukleär lokalisiert.

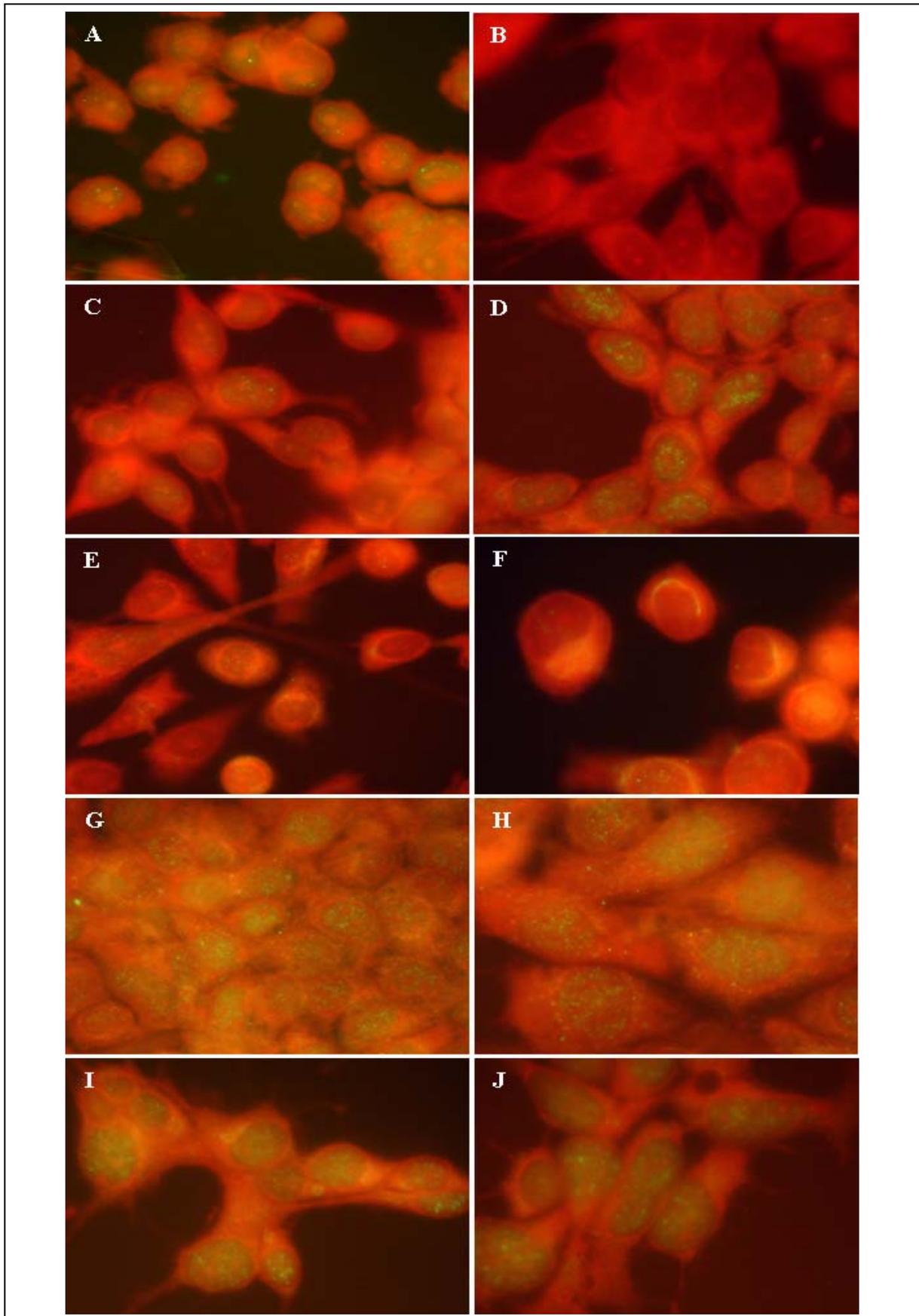


Abb. 3.17: Immunocytochemischer Nachweis von CTCFL (grüne Fluoreszenz) in einer Teratokarzinom-Zelllinie (NCCIT) und Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP bis 22Rv1) mit Evansblue-Gegenfärbung (rot). (A) NCCIT, (B) LNCaP Negativ-Kontrolle ohne Primärantikörper, (C) LNCaP, (D) LNCaP nach 5-aza-dC (E) PC-3, (F) PC-3 nach 5-aza-dC, (G) DU145, (H) DU145 nach 5-aza-dC, (I) 22Rv1, (J) 22Rv1 nach 5-aza-dC.

Eine fraktionierte Präparation von Proteinlysaten aus Prostatakarzinom-Zelllinien ermöglichte eine Trennung zwischen zytoplasmatischen und nukleären Proteinen. Die erfolgreiche Auftrennung wurde durch Immunnachweise von BMI-1, als nukleäres Protein, und GAPDH, als zytoplasmatisches Protein, kontrolliert. Anschließend ergab der Nachweis des CTCFL-Proteins folgende Ergebnisse:

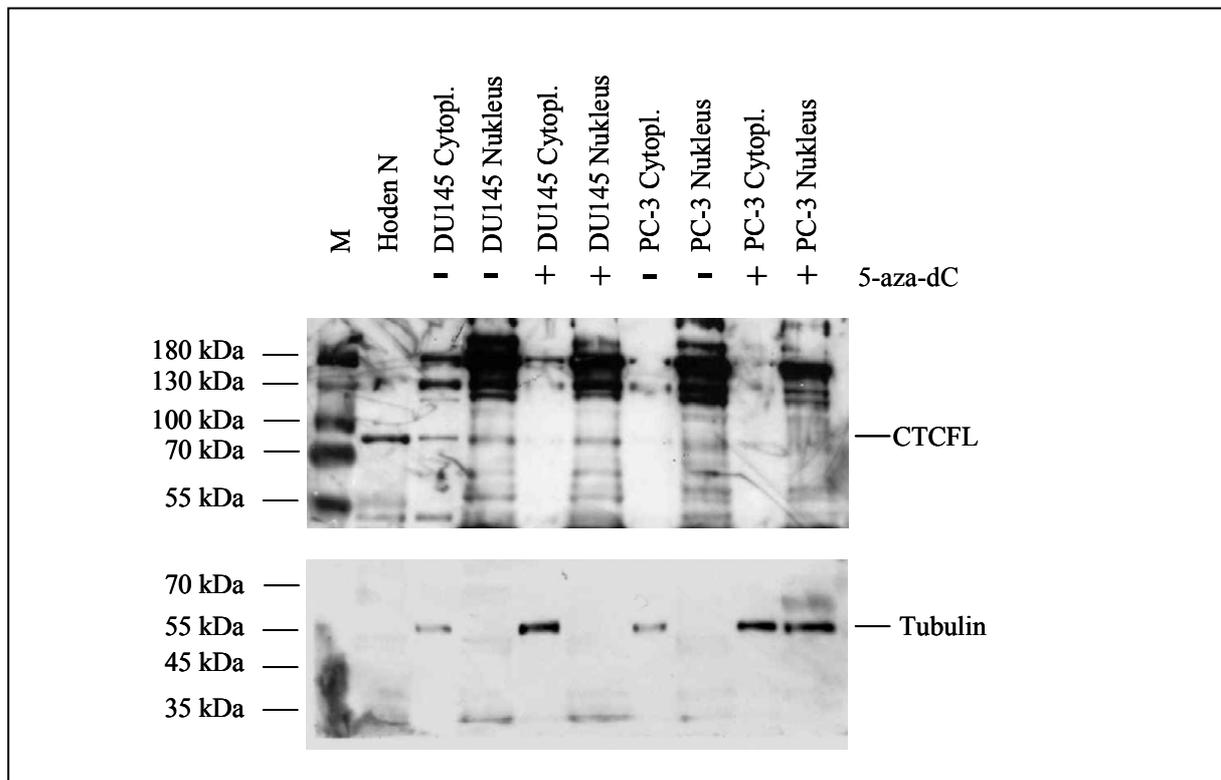


Abb. 3.18: Proteinblot zum Nachweis von CTCFL in und DU145 und PC-3 mit und ohne 5-aza-dC-Behandlung nach fraktionierter Proteinpräparation. Aufgetragen sind jeweils 30 µg Protein. Als Ladungskontrolle erfolgte der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin.

Die Auftrennung der Proteinlysate ergab auf dem Proteinblot eine CTCFL-Bande in den nukleären Fraktionen. Bei der Zelllinie DU145 findet sich auch in der unbehandelten zytoplasmatischen Fraktion ein schwaches Signal, das aber vermutlich auf eine Kontamination zurückzuführen ist. Die übrigen zytoplasmatischen Fraktionen sind ohne Nachweis. Bei der mit 5-aza-dC behandelten PC-3-Zelllinie ist das Verhältnis zwischen nukleärer und cytoplasmatischer Fraktion schwächer. Auch bei Unterscheidung der beiden Proteinfractionen von Zellen ist keine 5-aza-dC-Induktion auf Proteinebene nachweisbar.

### 3.1.6 Statistische Zusammenhänge zwischen Expression und klinischen Parametern

Um Aufschluss über eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Expressionsniveau der untersuchten Gene in den einzelnen Gewebeproben zu bekommen, wurde eine Clusteranalyse der RNA-Expressionsdaten durchgeführt.

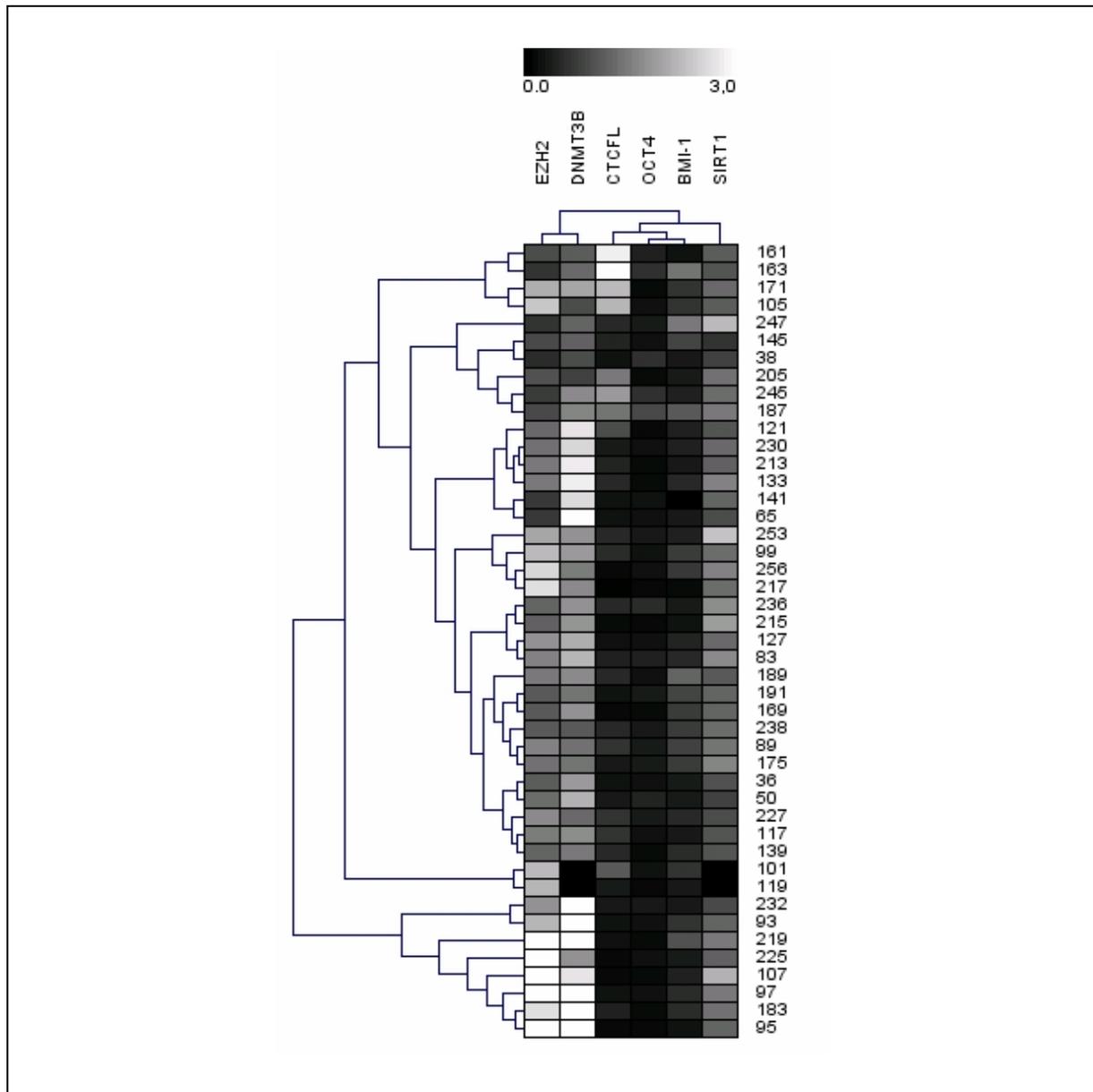


Abb. 3.19: Clusteranalyse für die Gene *EZH2*, *BMI-1*, *SIRT1*, *DNMT3B*, *OCT4* und *CTCFL* bei den untersuchten Prostatatumor-Gewebeproben (mit internen Fallnummern gekennzeichnet). Dunkel gefärbte Kästen zeigen ein niedriges Expressionsniveau an, weiße Kästen ein hohes Expressionsniveau.

Die hierarchische Clusteranalyse wurde mit Hilfe des Programmes Genesis durchgeführt. Im Dendrogramm sind bestehende Zusammenhänge in verschiedenen Knotenebenen durch verästelte Linien dargestellt. Die Höhe der einzelnen Clusterschritte ist ein Maß für die Höhe des Distanz-Koeffizienten [Janssen und Laatz, 2005] und die Enge des Zusammenhanges. Das Dendrogramm weist auf einen Zusammenhang zwischen den Genen *OCT4* und *BMI-1*, sowie *CTCFL* und *BMI-1* hin. Die Regressionsanalyse ergab eine positive Steigung mit  $r =$

0,297 bzw. 0,252. Für einen Zusammenhang zwischen *OCT4* und *CTCF* hatte  $r$  den Wert 0,377 ( $p=0,005$ ), für *EZH2* und *DNMT3B* lag  $r$  bei 0,468 ( $p=0,001$ ). Dabei fällt auf, dass die Gene *EZH2* und *DNMT3B* getrennt von den anderen Genen clustern.

Bei der Betrachtung der einzelnen Clustergruppen innerhalb der Tumorproben konnten keine auffälligen Zusammenhänge mit den klinischen Parametern wie z.B. Tumorstadium, Auftreten von Rezidiven und Metastasen festgestellt werden (s. Tab. 2.2), obwohl sich die Proben in zwei Hauptgruppen gliedern (PT161-PT139, PT232-PT95), von denen sich die Proben PT101 und PT119 abgrenzen. Insgesamt standen 45 Tumorgewebe-Proben unterschiedlichen Tumorstadiums und Gleason-Scores zur Verfügung (vgl. Tab. 2.2). Bei 12 Patienten wurden Lymphknoten-Metastasen gefunden. Die mittlere Follow-Up-Zeit betrug 64 Monate. Bei 13 Patienten kam es zu einem Rezidiv. Sechs Patienten entwickelten einen hormonrefraktären Tumor. Vier der untersuchten Patienten sind inzwischen verstorben, davon drei mit einem Prostatakarzinom als Todesursache. Um weiteren Aufschluss über eventuelle Korrelationen der Genexpression mit klinischen Parametern zu gewinnen, wurden die Proben in Gruppen aufgeteilt. Für eine Korrelation mit den Tumorstadien erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen, nach  $pT \leq 2$  und  $pT > 2$ . Nach einer Boxplot-Analyse ergab ein Vergleich der Mittelwerte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zu den Expressionen der einzelnen Gene. Während für *EZH2* ein Trend zu erhöhter Expression in höheren Stadien erkennen war ( $p=0,352$ ), konnte bei *CTCF* und *OCT4* eine erniedrigte Expression in höheren Stadien beobachtet werden ( $p=0,352$ ;  $p=0,294$ ).

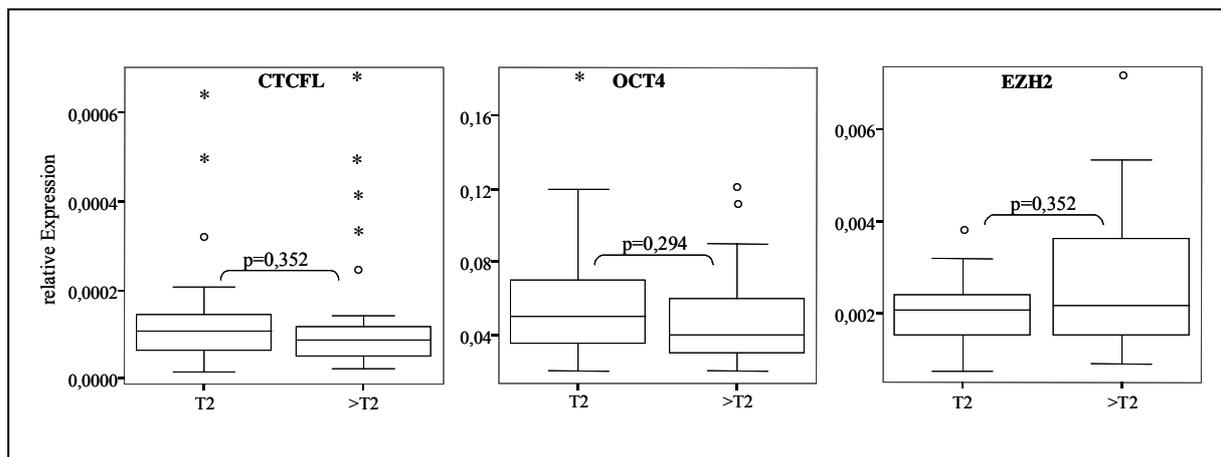


Abb. 3.20: Expressionsniveau der Gene *CTCF*, *OCT4* und *EZH2* in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

In Analogie zu *EZH2* ergab sich auch ein Trend zu erhöhter Expression in höheren Stadien für *SIRT1* ( $p=0,471$ ).

Zur Analyse der Proben anhand ihres Differenzierungsgrades wurden sie zunächst nach dem Wert ihrer Gleason-Summe zunächst in drei Gruppen aufgeteilt, Gleason 2-6, Gleason 7 und Gleason 8-10. Deutlichere Ergebnisse erbrachte jedoch eine Einteilung in zwei Gruppen (vgl.

Abb. 3.21). Als signifikantestes Ergebnis zeigte sich die *CTCF*-Expression erniedrigt mit zunehmender Dedifferenzierung des Tumors ( $p=0,022$ ).

Ein ähnliches Muster mit erniedrigter Expression in schlechter differenzierten Tumoren zeigte auch *OCT4* ( $p= 0,28$ ). Im Gegensatz dazu fanden sich Erhöhungen der Expressionen von *EZH2* und *SIRT1* mit zunehmender Entartung ( $p=0,266$ ;  $p=0,460$ ).

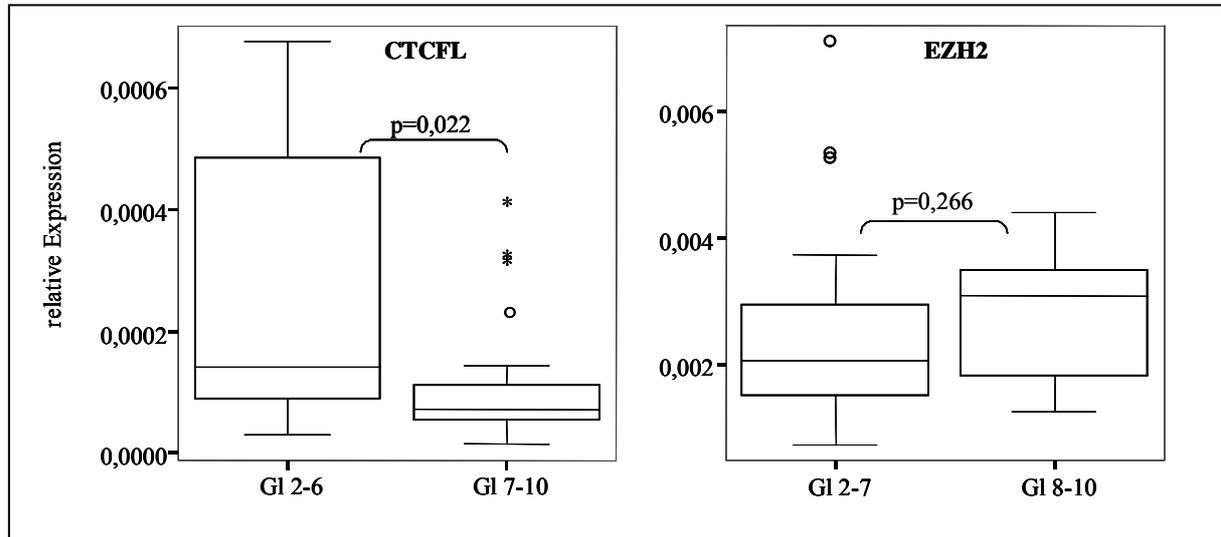


Abb. 3.21: Expressionsniveau der Gene *EZH2* und *SIRT1* in Abhängigkeit von der Gleason-Summe.

Eine Unterteilung der Proben nach Auftreten von Lymphknoten-Metastasen ergab keine Auffälligkeiten.

Die Kaplan-Meier –Überlebensanalyse ergab für vier der untersuchten Gene einen auffälligen Trend, von denen einer statistische Signifikanz erreichte. Bei *EZH2* ergab sich eine längere Überlebenszeit für Patienten mit niedriger Expression. Zu beachten ist, dass die Kurven bei den Analysen nicht den Wert 0 erreichen, da nur 13 von 45 Patienten überhaupt ein Rezidiv bekommen haben und bis dato vier Patienten verstorben sind. Für eine genauere Überlebensanalyse müssten die Patienten etwa 10 Jahre lang beobachtet werden.

Auch bei der *DNMT3B* bietet eine niedrigere Expression einen Überlebensvorteil, der sogar hoch signifikant ist. Bei der Analyse der Gene *BMI-1* und *SIRT1* stellt sich ein umgekehrter Trend dar. Hier bekommen Patienten mit niedriger Expression offenbar schneller ein Rezidiv. Für das *CTCF*-Gen wurde keine statistische Analyse durchgeführt, unter den vier Ausreißern mit hoher Expression entwickelte jedoch ein Patient ein Rezidiv. Dieses entspricht ungefähr der Rate von 13 Rezidiven bei 45 Patienten.

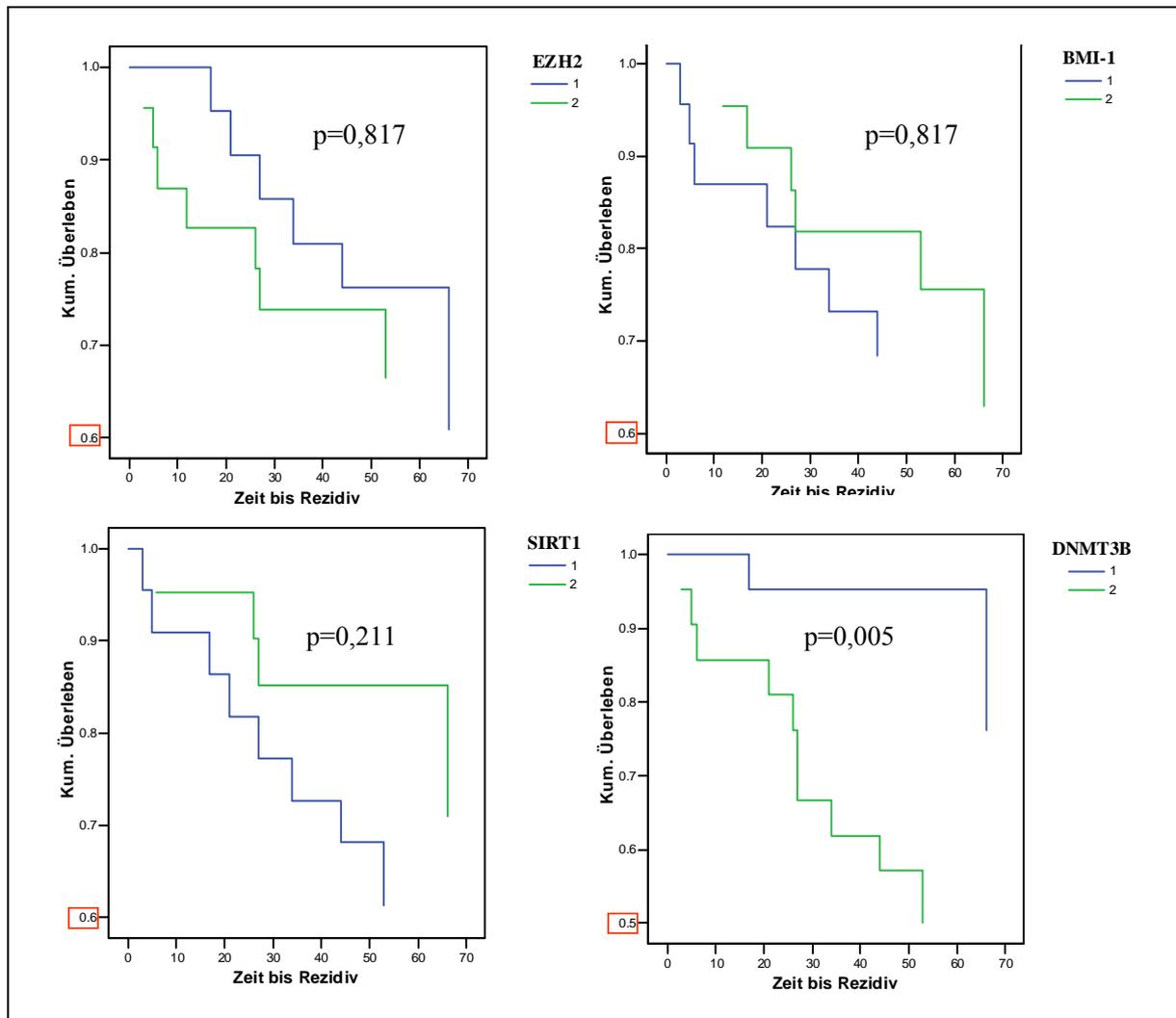


Abb. 3.22: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zur Abhängigkeit der Zeit bis zum Auftreten des Rezidivs von der Expression der Gene *EZH2*, *BMI-1*, *SIRT1* und *DNMT3B*. Gruppe 1: blau, Expressionswerte unter Median; Gruppe 2: grün, Expressionswerte über dem Median.

### 3.1.7 Einfluss von DNA-Methylierung und Histondeacetylierung auf die Kandidatengene

Während die Expressionsdaten für *CTCF* in mit 5-aza-dC behandelten Zelllinien deutlich auf eine Beteiligung der DNA-Methylierung bei der Regulation der Genexpression hinwiesen, blieb für die anderen, vermindert exprimierten Kandidatengene offen, ob eine Genregulation zusätzlich auf der Ebene der Histon-Deacetylierung stattfindet. Daher wurden Zelllinien mit dem Deacetylierungsinhibitor Suberoylanilidohydroxam-Säure (SAHA) behandelt, einzeln oder in Kombination mit 5-aza-dC (vgl. 2.14.5). Außerdem wurde ein unbehandelter Ansatz und eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Für *BMI-1* konnten keine Hinweise auf eine signifikante Induktion der Expression durch den Deacetylierungsinhibitor gefunden werden (ohne Abbildung). Für *OCT4* und *CTCF* konnte zwar bei einer Untersuchung verschiedener Zelllinien der induktive Effekt von 5-aza-dC erneut bewiesen werden, eine Behandlung mit

SAHA ergab aber keine zusätzliche Verstärkung. Eine Ausnahme stellte die Teratokarzinom-Zelllinie TERA-2 beim *CTCF*-Gen dar.

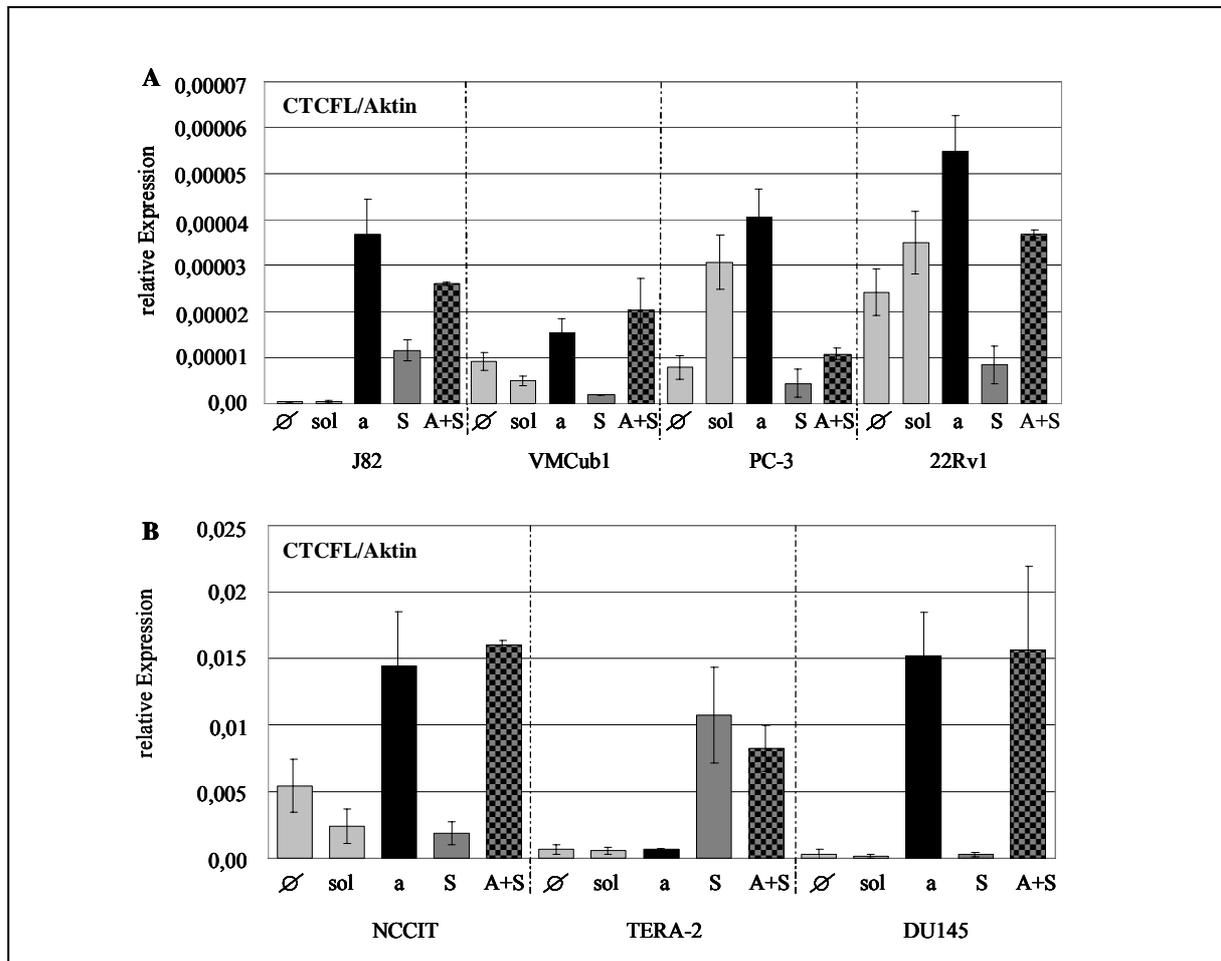


Abb. 3.23: (A), (B) Untersuchung der CTCFL-Expression relativ zu Aktin in unbehandelten und behandelten Ansätzen von Urothelkarzinom-Zelllinien (J82, VMCub1), Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3, 22Rv1, DU145) und Teratokarzinom-Zelllinien (NCCIT, TERA-2). ∅, unbehandelt; sol, Lösungsmittel; a, 5-aza-dC; S, SAHA; A+S, 5-aza-dC + SAHA.

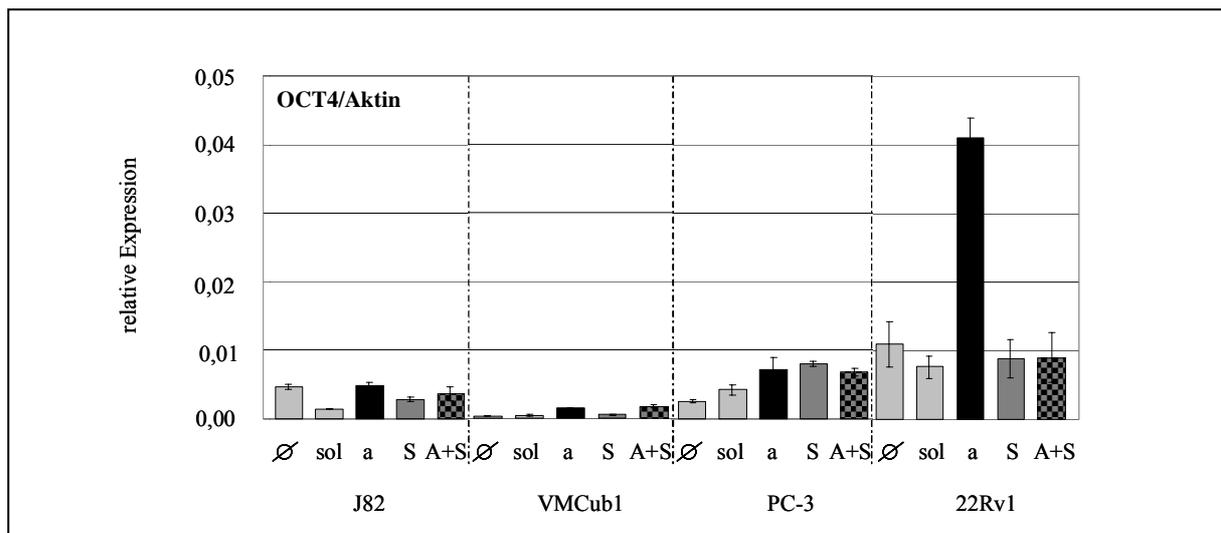


Abb. 3.24: Untersuchung der OCT4-Expression relativ zu Aktin in unbehandelten und behandelten Ansätzen. Abkürzungen s. Abb. 3.23.

Die verwendete Konzentration des Deacetylierungsinhibitors war zuvor im MTT-Test (vgl. 2.15.1) auf seine Zytotoxizität überprüft worden. Mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR für das *CDKN1A/p21<sup>CIP1</sup>*-Gen wurde er auf seine Effektivität getestet. In der Literatur war eine erhöhte *p21* Expression nach Behandlung mit Inhibitoren beschrieben worden. [Li und Wu, 2004; Gui et al., 2004]. Die Untersuchung der vorliegenden Arbeit ergab in allen untersuchten Zelllinien eine deutliche Induktion der Expression (dunkel graue Balken Abb. 3.25). Bei drei von vier Linien fiel der Effekt stärker als bei 5-aza-dC aus.

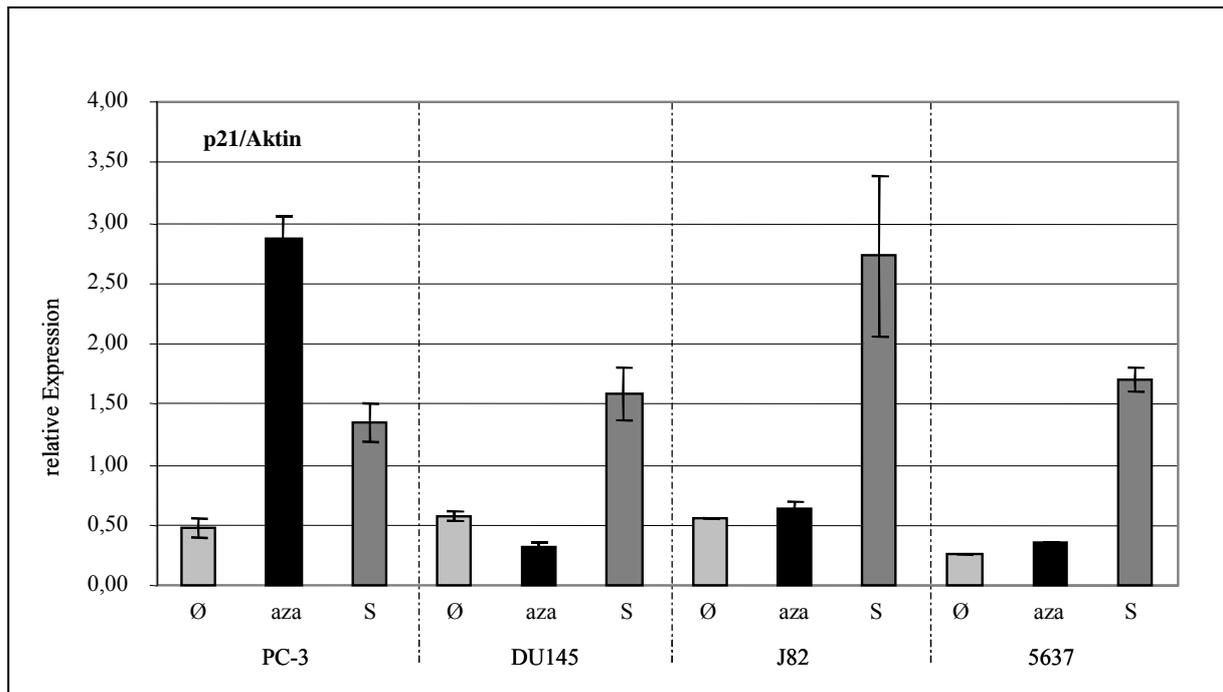


Abb. 3.25: Untersuchung der *p21*-mRNA-Expression relativ zu Aktin mittels quantitativer RT-PCR ohne (Ø) und mit Behandlung durch 5-aza-dC (aza) sowie SAHA (S). Es wurden jeweils zwei Prostata- und zwei Urothelkarzinom-Zelllinien verwendet.

### 3.2 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Promotoren von *OCT4* und *CTCF*

#### 3.2.1 Promotorhypermethylierung

*OCT4* gilt als Pluripotenzgen, sein Expressionsniveau ist entscheidend für das Schicksal embryonaler Stammzellen. Bei Mäusen wurde gezeigt, dass das Gen im Laufe der Entwicklung durch DNA-Methylierung still gelegt wird. Eine Studie an der humanen Teratokarzinomzelllinie NT2 hatte gezeigt, dass die putative *OCT4*-Promotorregion dort zunächst unmethyliert ist und nach Induktion der Differenzierung der Zelllinie durch Retinsäure zunehmend methyliert wird [Deb Rinker et al., 2005]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Abschnitt vor dem Transkriptionsstart auf den Methylierungszustand der CpG-Dinukleotide mittels Bisulfit-Sequenzierung (vgl. 2.19) untersucht. Dieser Abschnitt war in der NT2-Linie repräsentativ für die Methylierungsveränderungen insgesamt.

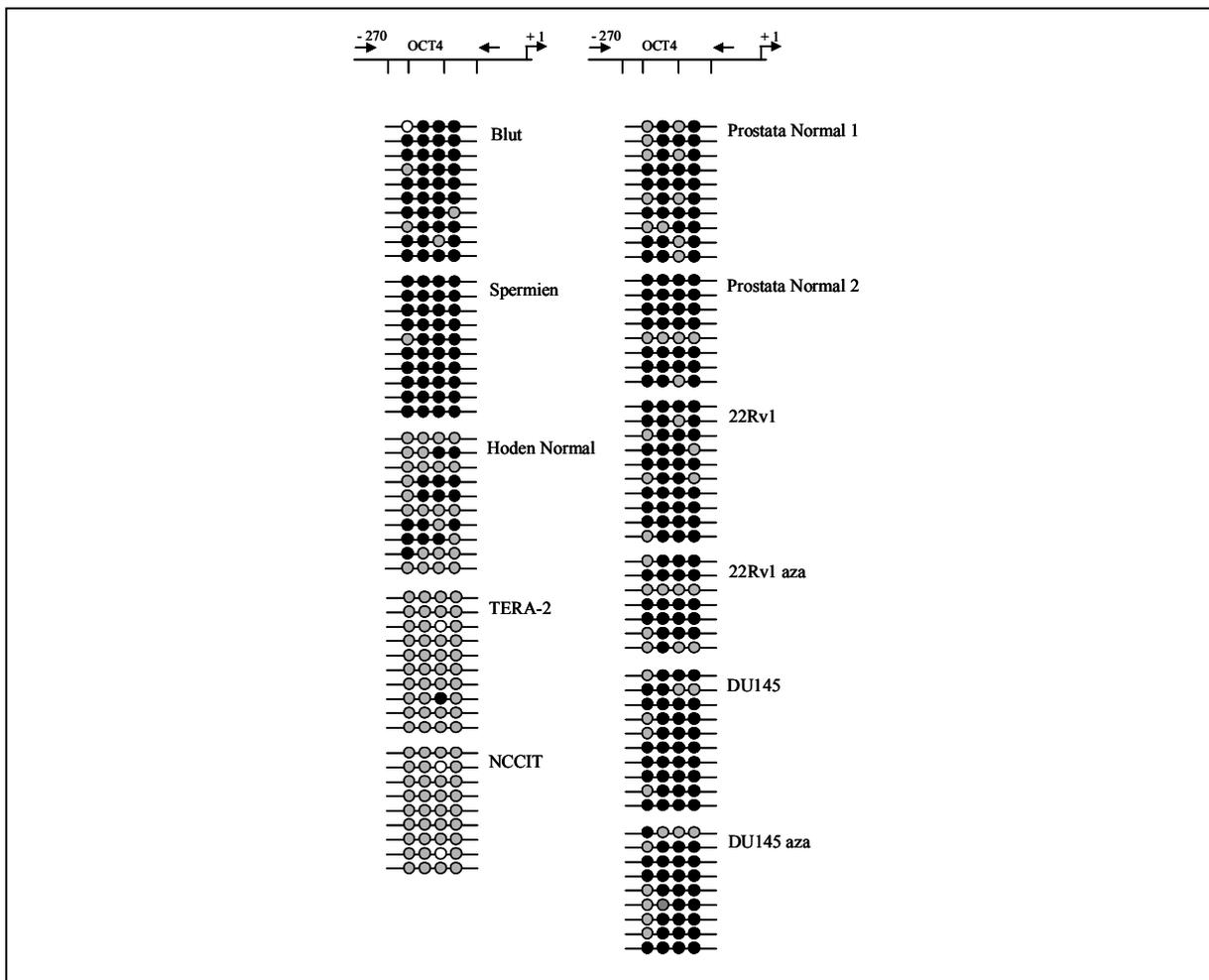


Abb. 3.26: Untersuchung des *OCT4*-Promotorbereiches mittels Bisulfitsequenzierung. Oben: Der Transkriptionsstart ist als +1 angegeben, Pfeile zeigen die Lokalisation der PCR-Primer an, senkrechte Striche unterhalb die relative Lage der vier untersuchten CpG-Dinukleotide zueinander. Unten: Jedes Kreissymbol steht für ein CpG-Dinukleotid; schwarze Kreise zeigen Methylierung an; graue Kreise bedeuten keine Methylierung. Bei weißen Kreisen war die Sequenz nicht informativ. Untersucht wurden DNA-Proben aus männlichem Blut, Spermien, normalem Hodengewebe, zwei Teratokarzinom-Zelllinien, normalem Prostatagewebe und zwei Prostatakarzinom-Zelllinien jeweils mit und ohne 5-aza-dC-Behandlung. Jede Reihe steht für ein untersuchtes Allel.

Die Methylierungsanalyse ergab für Blut- und Spermienproben nahezu vollständig methylierte Allele. Im Gegensatz dazu waren die Allele der Teratokarzinom-Zelllinien in Analogie zum hohen Genexpressionsniveau, absolut unmethyliert. Allele des normalen Hodengewebes zeigten ein variables Methylierungsmuster, jedoch ein schwächeres als Prostatagewebe. Zwischen Proben von Prostata-Normalgeweben und Prostatakarzinom-Zelllinien konnte kein auffälliger Unterschied des Methylierungsstatus festgestellt werden. Exemplarisch wurden zwei Prostatakarzinom-Zelllinien mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC behandelt. Dieser bewirkte eine Demethylierung einzelner Stellen.

Ausführlicher wurde die Promotorregion des *CTCF*-Gens untersucht, welches bereits in der Expressionsanalyse bei Behandlung mit 5-aza-dC eindeutige Ergebnisse geliefert hatte. Hier wurden in einem Areal vor dem Transkriptionsstart insgesamt 16 CpG-Dinukleotide auf ihren Methylierungsstatus untersucht (vgl. Abb. 3.27). Einige verschiedene Normalgewebe wurden als Kontrollen verwendet. Verschiedene Urothelkarzinom-Zelllinien wurden ausgewählt um Zellen mit unterschiedlichem Expressionsniveau zu untersuchen. Exemplarisch wurden einige mit 5-aza-dC behandelt. Neben verschiedenen Prostatatumorgeweben unterschiedlicher Expressionsstärke wurden alle Prostatakarzinom-Zelllinien mit und ohne 5-aza-dC-Behandlung betrachtet. Teratokarzinom-Zelllinien wurden nicht mit dem Methylierungsinhibitor behandelt, da diese ein höheres Grundniveau bei der Genexpressionsanalyse gezeigt hatten.



Abb. 3.27: Untersuchung des CTCFL-Promotorbereiches mittels Bisulfitsequenzierung. Senkrechte Striche unterhalb zeigen die relative Lage der 16 untersuchten CpG-Dinukleotide zueinander an. Untersucht wurden DNA-Proben aus männlichem Blut, Spermien, normalem und tumorösem Hodengewebe, Teratokarzinom-Zelllinien, normalen Harnblasengewebe und Uroepithel, Urothelkarzinom-Zelllinien mit und ohne 5-aza-dC-Behandlung, normalem und tumorösem Prostatagewebe sowie aus Prostatakarzinom-Zelllinien jeweils mit und ohne 5-aza-dC-Behandlung. Symbole s. Abb. 3.26. grüne Boxen: Normalproben; rot: 5-aza-dC.

Anders als bei *OCT4* zeigten sich sämtliche Allele dreier unterschiedlicher Spermienproben gesunder Männer als komplett unmethyliert, in Übereinstimmung mit dem physiologischen, gewebespezifischen Expressionsmuster des *CTCF*-Gens. Hodenproben von Tumor- und Normalgewebe boten ein variables Methylierungsmuster mit vielen unmethylierten Stellen, während die Allele der Teratokarzinom-Zelllinien durchgängig stark methyliert waren. Starke Methylierung war auch bei unbehandelten Urothelkarzinom-Zelllinien zu beobachten, eine 5-aza-dC-Behandlung resultierte in der Hypomethylierung einiger CpG-Stellen, vornehmlich unter denjenigen im proximalen Promotor-Bereich lokalisiert sind. Prostatagewebeproben zeigten ähnliche Methylierungsmuster wie die unbehandelten Zelllinien. Hier erschienen jeweils einzelne Stellen unmethyliert ohne erkennbares zusammenhängendes Muster.

### 3.2.2 Aktivität und Methylierungssensitivität des *CTCF*-Promotors

Der 5'-Bereich des *CTCF*-Gens, der die CpG-Insel in der vermutlichen Promotorregion beinhaltet, wurde ferner in einen Luciferase-Reportervektor kloniert, um die Promotoraktivität durch Transfektion in verschiedenen Zelllinien zu testen.

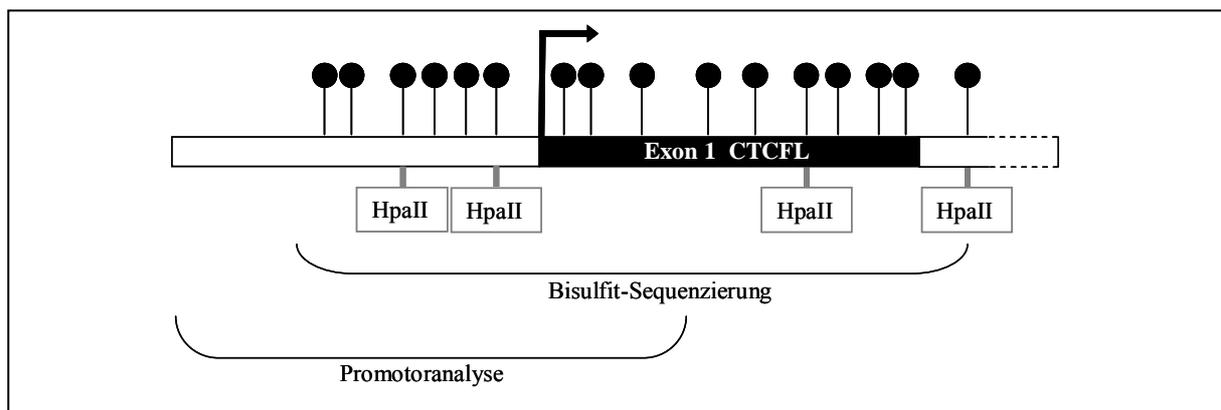


Abb. 3.28: Schematische Darstellung des 5'-Bereiches des *CTCF*-Gens. Als schwarze Kreise sind die 16 CpG-Dinukleotide dargestellt, die durch Bisulfitsequenzierung untersucht wurden. Der klonierte Bereich für die Aktivitätsanalyse des Promotors und Lokalisation der *HpaII*-Erkennungssequenzen sind ebenfalls gekennzeichnet. Der Transkriptionsstart (ATG) ist als Pfeil dargestellt.

Das *CTCF*-Promotorkonstrukt wurde in Zellen mit unterschiedlich hoher Genexpression transfiziert (vgl. Abb. 3.29). Hierzu gehörten die Teratokarzinom-Zelllinien TERA-1 und TERA-2, die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 und die Urothelkarzinom-Zelllinie VMcub1. Parallel wurden diese Zellen mit dem p850-Konstrukt transfiziert, welches den *LI.2B*-Retrotransposon-Promotor enthält. Ein Vergleich dieser beiden mit dem Reporter-Test (vgl. 2.15.6) zeigte für den *CTCF*-Promotor eine moderat starke Aktivität an (weiße Balken, in Abb. 3.29).

Nach einer *in vitro* Methylierung der beiden Konstrukte mit zwei verschiedenen Methylasen wurden diese erneut in die Zellen transfiziert. Zum Einsatz kamen die *HpaII*-Methylase

(graue Balken), die alle inneren Cytosine in der Erkennungssequenz CCGG methyliert, und die *SssI*-Methylase (schwarze Balken), die alle CpG-Dinukleotide modifiziert. Die Methylierung des *CTCF*-Konstruktes ergab in allen untersuchten Zelllinien eine Reduktion der Promotoraktivität. Die Methylierung mit der *SssI*-Methylase führte sogar beinahe zu einem völligen Aktivitätsverlust.

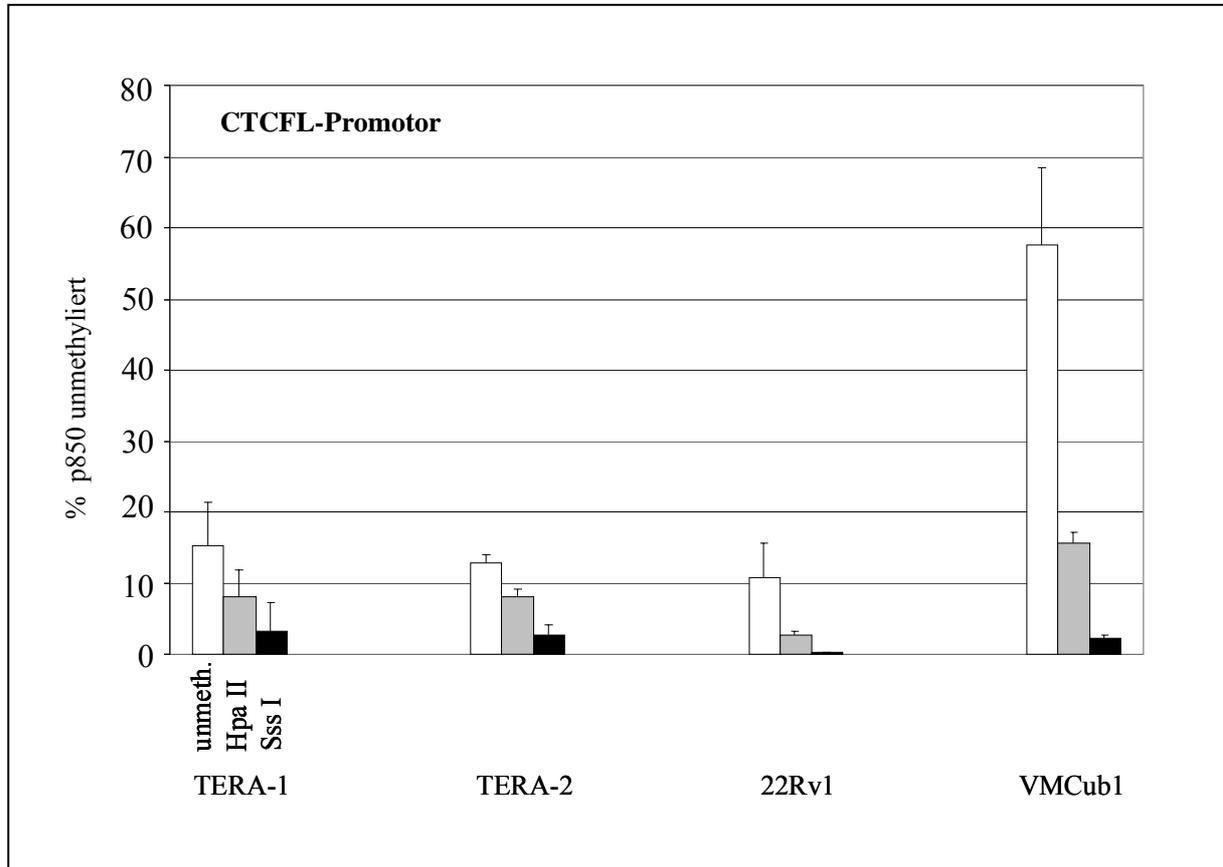


Abb. 3.29: Untersuchung der *CTCF*-Promotoraktivität und seiner Sensitivität gegenüber DNA-Methylierung relativ zum *L1.2B* Retrotransposon-Promotor in verschiedenen Zelllinien. Die Konstrukte wurden unmethyliert (weiße Balken), *HpaII*-methyliert (graue Balken) und *SssI*-methyliert (schwarze Balken) transfiziert.

Frühere Untersuchungen des *L1.2B*-Promotors hatten gezeigt, dass seine Aktivität durch *in vitro*-Methylierung stark gemindert werden kann [Steinhoff und Schulz, 2003]. Dabei waren jedoch keine Teratokarzinom-Zelllinien untersucht worden. Die Transfektion dieses *in vitro* methylierten Konstruktes wurde in der vorliegenden Arbeit zur Kontrolle der Modifikation durchgeführt.

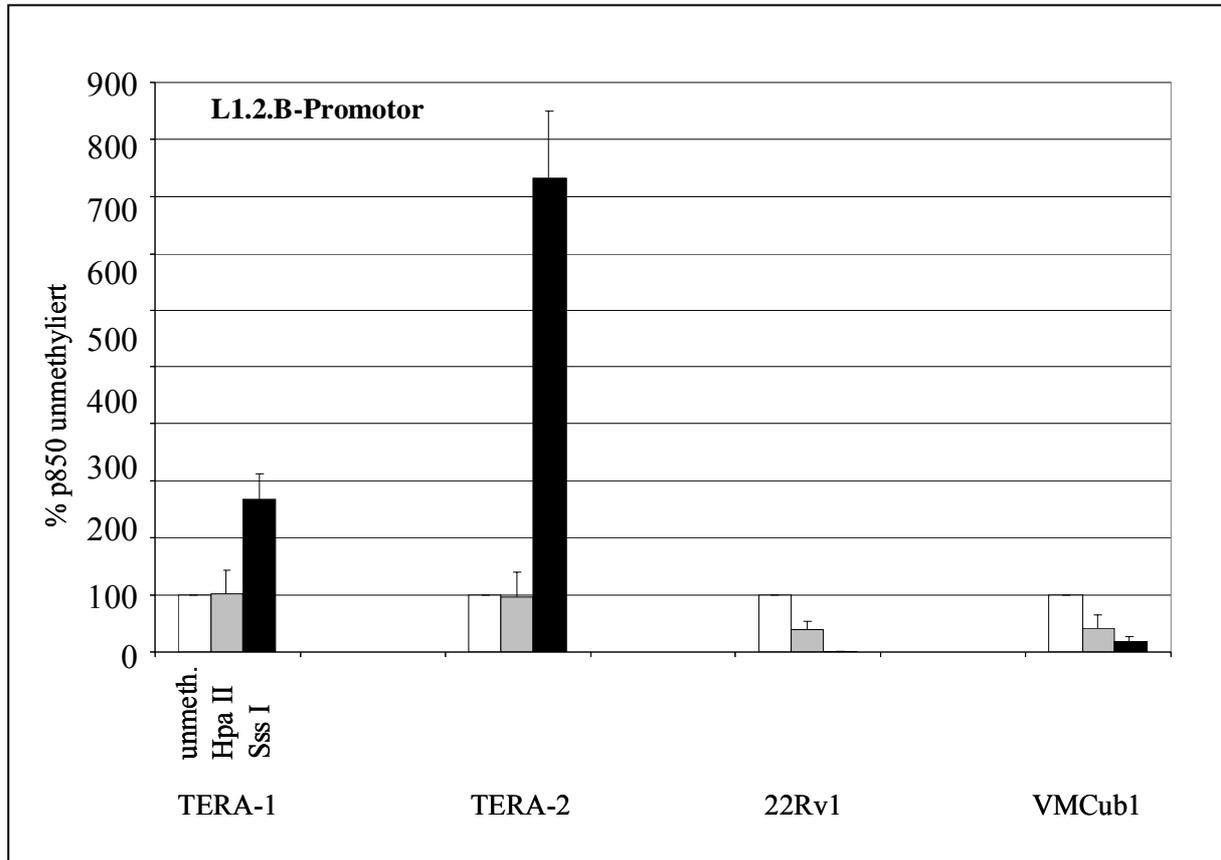


Abb. 3.30: Untersuchung des *L1.2B*-Retrotransposon-Promotors auf seine Sensitivität gegenüber DNA-Methylierung. Das Konstrukt wurden unmethyliert (weiße Balken), *HpaII*-methyliert (graue Balken) und *SssI*-methyliert (schwarze Balken) transfiziert.

Die Aktivität des *L1.2B*-Promotors wurde maßgeblich in den Zelllinien 22Rv1 und VMCub1 durch die Methylierung beeinflusst (graue und schwarze Balken in Abb. 3.30). In den Teratokarzinom-Zelllinien hatte diese Methylierung jedoch überraschend keinen reprimierenden Einfluss, obwohl bei diesen Linien die Methylierung des *CTCF*-Konstruktes bei erfolgreich war. Hieraus ergeben sich Schlussfolgerungen sowohl für den Mechanismus der über DNA-Methylierung vermittelten Repression des *CTCF*-Promotors als auch für eine Eigenschaft der Teratokarzinom-Zelllinien (vgl. 4.2).

### 3.2.3 Korrelationen zwischen Methylierungsveränderungen und Gen-Expressionsdaten

In Prostatakarzinomen werden sowohl Promotorhypermethylierungen als auch eine genomweite Hypomethylierung gefunden. Da alle untersuchten Kandidatengene im Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen stehen wurden Korrelationen ihrer Genexpression mit der Hypermethylierung untersucht. Die Daten zur Hypermethylierung stammten aus früheren Studien zu Methylierungsveränderungen im Prostatakarzinom [Santourlidis et al., 1999; Florl et al., 2004]. Diese umfassten einige der häufig als hypermethyliert gefundenen Gene, die u.U. auch direkte Zielgene für Methylierungsveränderungen durch die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene sein könnten. Hierbei handelt es sich um die Gene *RASSF1A*, *GST-P1*, *RARB2*, *APC* und *ASC* (vgl. 1.2). Für die Analyse wurden zunächst drei Methylierungskategorien gebildet, kein oder ein Gen mit Hypermethylierung (0), zwei oder drei Gene mit Hypermethylierung (1) und vier oder fünf Gene mit Hypermethylierung (2). Um die auf Hypermethylierung untersuchten Gene als einzelne Ziele sichtbar zu machen, wurde zudem die Methylierung jedes Gens mit den Expressionsdaten der Kandidatengene korreliert. Hieraus sind einige Ergebnisse exemplarisch in Tab. 3.1 aufgeführt.

Umgekehrt wurden auch Korrelationen mit dem Ausmaß der Hypomethylierung, dass in früheren Arbeiten bestimmt worden war [Schulz et al., 2002; Florl et al., 2004], in den Tumorproben untersucht. Hierzu wurde der Grad der Hypomethylierung (in %) zunächst kategoriell in drei Gruppen unterteilt, Patienten mit 0-3% Hypomethylierung, mit 4-9% und mit mehr als 10% Hypomethylierung. Bei einigen Fällen erschien jedoch später eine Einteilung in nur zwei Gruppen sinnvoller. Außerdem wurde in einer Regressionsanalyse der individuelle numerischen Wert der Hypomethylierung bei den einzelnen Patienten mit der Geneexpression korreliert und der Korrelationskoeffizient  $r$  bestimmt (vgl. Tab. 3.2).

Tab. 3.1: Korrelationen zwischen Expression der untersuchten Regulatorproteine und Methylierungszustand einzelner im PCa typischerweise hypermethylierter Gene (ausgewählte Ergebnisse)

Genexpression	DNA-Hypermethylierung	p-Wert
<i>CTCF</i>	<i>GST-P1</i>	0,041
<i>OCT4</i>	<i>GST-P1</i>	0,091
<i>EZH2</i>	<i>RARB2</i>	0,063
<i>BMI-1</i>	<i>APC</i>	0,024
<i>DNMT3B</i>	<i>GST-P1</i>	0,064
<i>DNMT3B</i>	<i>APC</i>	0,007
<i>DNMT3B</i>	<i>ASC</i>	0,025

Die Tabelle umfasst eine Auswahl der auffälligsten Ergebnisse, von denen vier tatsächlich statistisch signifikant sind und zwei auf die DNMT3B entfallen. Das häufigste Zielgen von Hypermethylierungen ist das *GST-P1*-Gen.

Eine Gegenüberstellung der Zusammenhänge von Genexpression mit DNA-Hyper- und – Hypomethylierung stellt Tabelle Tab. 3.2 dar. Die enthaltenen Ergebnisse basieren auf der ursprünglichen kategoriellen Einteilung in je drei Gruppen. Für die spätere graphische Darstellung einzelner exemplarischer Ergebnisse wurden die Proben hinsichtlich der DNA-Hypomethylierung teilweise nur in zwei Gruppen eingeteilt. Daraus ergeben sich entsprechend andere Signifikanzwerte.

Tab. 3.2: Ergebnisse der statistischen Analyse von Genexpressionen und kategorisierten Methylierungsveränderungen

Genexpression	DNA- Hypermethylierung	DNA- Hypomethylierung
	Signifikanz Tendenz Expression	Signifikanz Tendenz Expression
<i>CTCF</i>	p=0,120 niedrig in Kat. 2	p=0,242; r=0,236 niedrig bei >10%
<i>OCT4</i>	p=0,862 --	p=0,451; r=0,167 --
<i>EZH2</i>	p=0,618 niedrig in Kat. 0	p=0,280; r=0,336 hoch in >10%
<i>BMI-1</i>	p=0,325 niedrig in Kat. 2	p=0,275; r=0,026 hoch in >10%
<i>DNMT3B</i>	p=0,259 hoch in Kat. 2	p=0,182; r=0,216 hoch in >10%
<i>SIRT1</i>	p=0,883 --	p=0,905; r=0,216 niedrig bei >10%

Bei der Betrachtung von kategoriellen Methylierungsveränderungen ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Insbesondere für *CTCF* wird kein eindeutiger Trend erkennbar, obwohl diesem Gen ein Einfluss auf DNA-Methylierungsmuster zugeschrieben wurde (vgl. 1.1.5).

Die Korrelation der Genexpression mit den numerischen Werten der Hypomethylierung wurde in einer Regressionanalyse bestimmt und ergab die in Tab. 3.2 aufgeführten Werte für den Korrelationskoeffizienten  $r$ . Da sich bei diesem Wert ein starker Zusammenhang über einen Wert nahe 1 darstellt, ergibt dieser z.B. für *BMI-1* deutlich keinem Zusammenhang zwischen Genexpression und dem Ausmaß der Hypomethylierung. Auch bei dieser Analyse ergibt sich der stärkste Zusammenhang mit der DNA-Hypomethylierung bei *EZH2*.

Exemplarisch sind einige dieser Ergebnisse nachfolgend als Diagramm dargestellt:

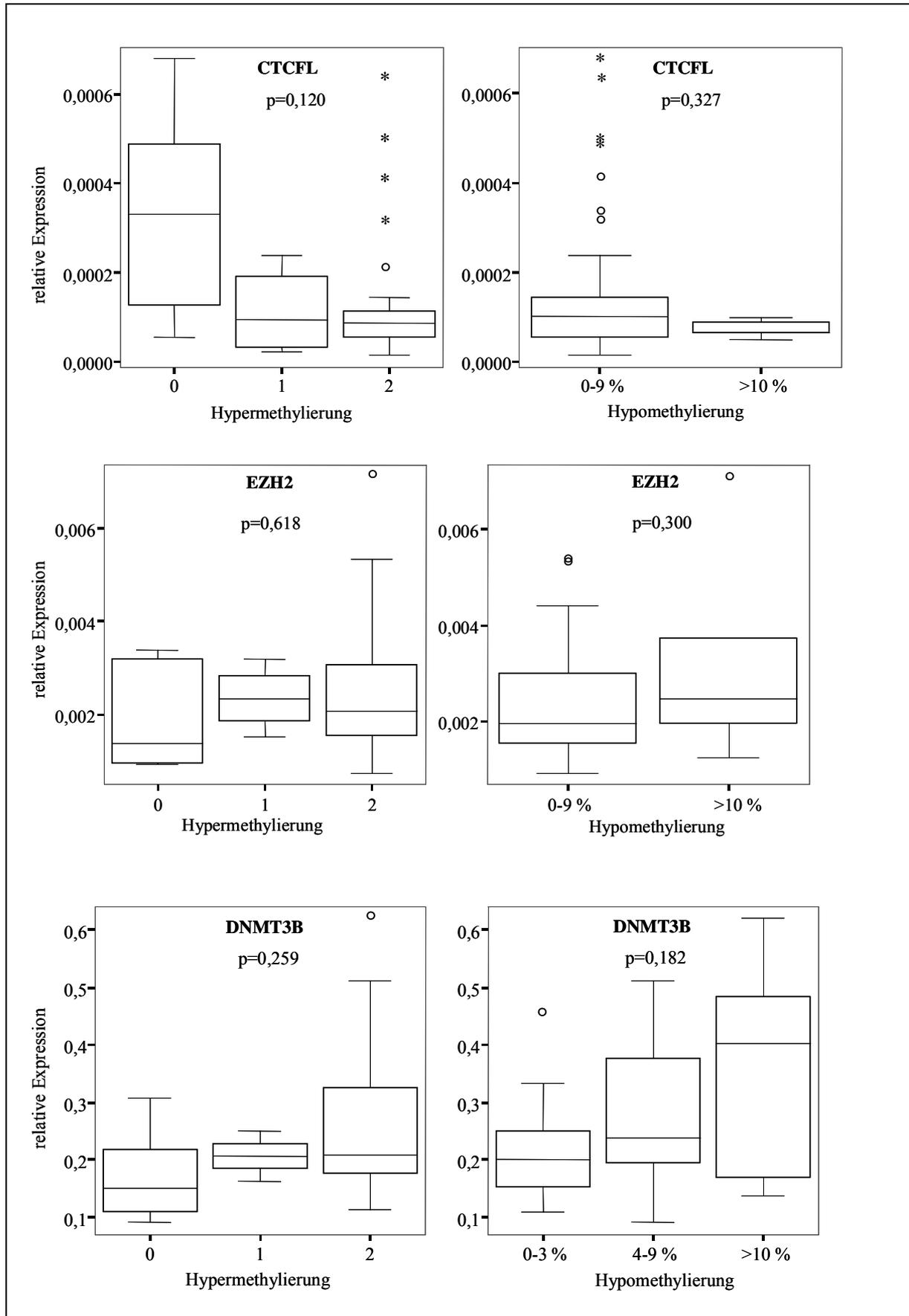


Abb. 3.31: Expression der Gene CTCFL, EZH2 und DNMT3B in den Proben verschiedener Kategorien der DNA-Hypermethylierung und DNA-Hypomethylierung.

### 3.3 Funktionelle Analyse des *CTCF*-Gens

#### 3.3.1 siRNA-Analyse

Die Expressionsanalyse von *CTCF* hatte bei Prostatakarzinomen auf einige Ausreißer hingewiesen (vgl. Abb. 3.13). Da über die funktionelle Bedeutung des *CTCF*-Gens bislang wenig bekannt war, eine proliferationssteigernde Rolle jedoch angenommen wurde, sollte eine siRNA-Analyse mit angeschlossenen Proliferationstests Aufschluss bringen.

Für die Analyse standen käufliche, jedoch nicht-validierte siRNAs gegen die *CTCF*-mRNA zur Verfügung. Um eine effektive Inhibition in 75% der Fälle zu garantieren, stellte die Firma Ambion drei verschiedene siRNAs zur Verfügung. Daher wurde zunächst zusätzlich eine siRNA gegen die mRNA des *GAPDH*-Gens verwendet, um anhand dieser validierten siRNA die Versuchsbedingungen für eine siRNA-Inhibition in verschiedenen Zellen zu etablieren. Außerdem wurde eine fluoreszenzmarkierte *non-targeting* Negativ-Kontrolle zur Abschätzung von eventuellen Nebeneffekten der siRNA-Transfektion verwendet. Die Fluoreszenz-Markierung erlaubte zusätzlich die Kontrolle der Transfektionseffizienz im Fluoreszenz-Mikroskop. Die Inhibition sollte in einer Prostatakarzinom-Zelllinie mit relativ höherer *CTCF*-Expression durchgeführt werden. Hierfür eignete sich DU145. Zusätzlich sollte auch eine Inhibition in der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT mit starker *CTCF*-Expression durchgeführt werden. Zunächst wurden in verschiedenen Experimenten einige Transfektionsreagenzien, verschiedene siRNA-Konzentrationen und Inkubationszeiten ausgetestet. Eine Transfektion mit einer siRNA-Endkonzentration von 25 nM mittels HiPerFect und eine Präparation der RNA nach 72 Stunden hatte die besten Resultate erzielt. SiRNA Nr.2 erschien ineffektiv. Eine Transfektion der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT mit einzelnen siRNAs gegen *CTCF*, sowie einer Kombination aus zwei ergab eine Reduktion des *CTCF*-Expressionsniveaus um bis zu 60% im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Dabei wurde mittels quantitativer RT-PCR die *CTCF*-Expression relativ zu *Aktin* bestimmt.

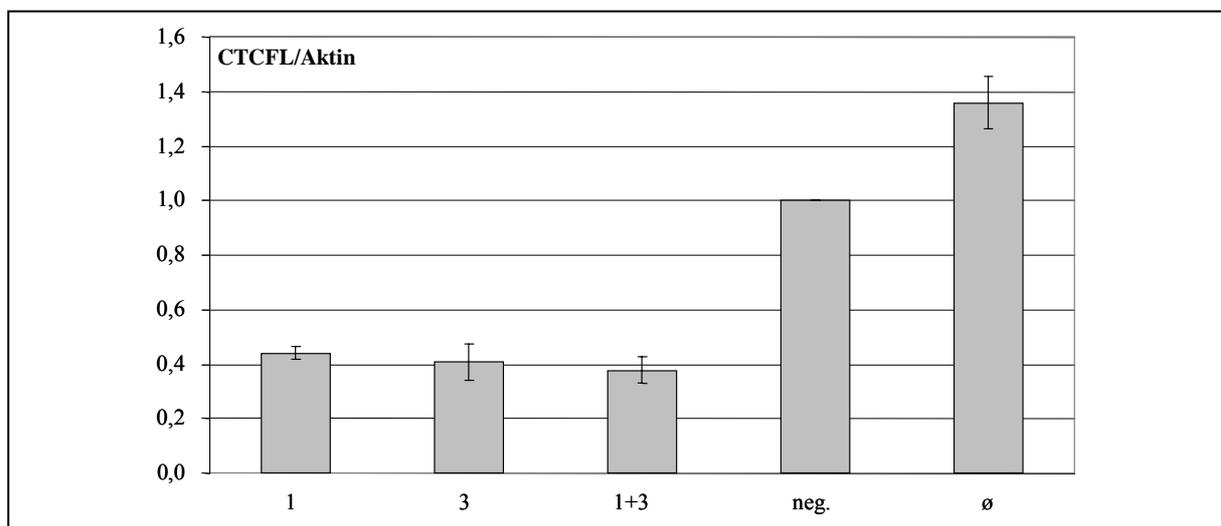


Abb. 3.32: Quantitative mRNA-Expressionsanalyse von *CTCF*L relativ zu Aktin in der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT nach Transfektion verschiedener siRNAs; siRNA 1 (1), siRNA 3 (3), Kombination von siRNA 1 und 3 zu äquimolaren Verhältnissen (insgesamt 25 nM; 1+3), Negativkontrolle (neg.) und einem untransfizierten Ansatz mit Transfektionsreagenz ( $\emptyset$ ). Das Expressionsniveau des Ansatzes mit der Negativkontrolle wurde auf den Wert 1 gesetzt und die übrigen Werte entsprechend normiert.

Zur Untersuchung der Bedeutung der *CTCF*L-Expression für das Proliferationspotential wurden Zellen der Linien NCCIT und DU145 entsprechend mit siRNA transfiziert und anschließend für verschiedene Proliferationstests wie einen MTT-Test (vgl. 2.15.2) oder BrdU-Test (vgl. 2.15.3) verwendet. Zunächst wurde eine bis zu 30% reduzierte Proliferationsrate in transfizierten Ansätzen mit erniedrigter *CTCF*L-Expression gefunden, diese konnte jedoch nicht bei Wiederholungen reproduziert werden.

Eine nachfolgende Untersuchung der *CTCF*L-Proteinexpression nach siRNA-Transfektion ergab keine Veränderungen im Proteinspiegel in den verschiedenen Ansätzen im Vergleich zu den Kontrollen (vgl. Abb. 3.33).

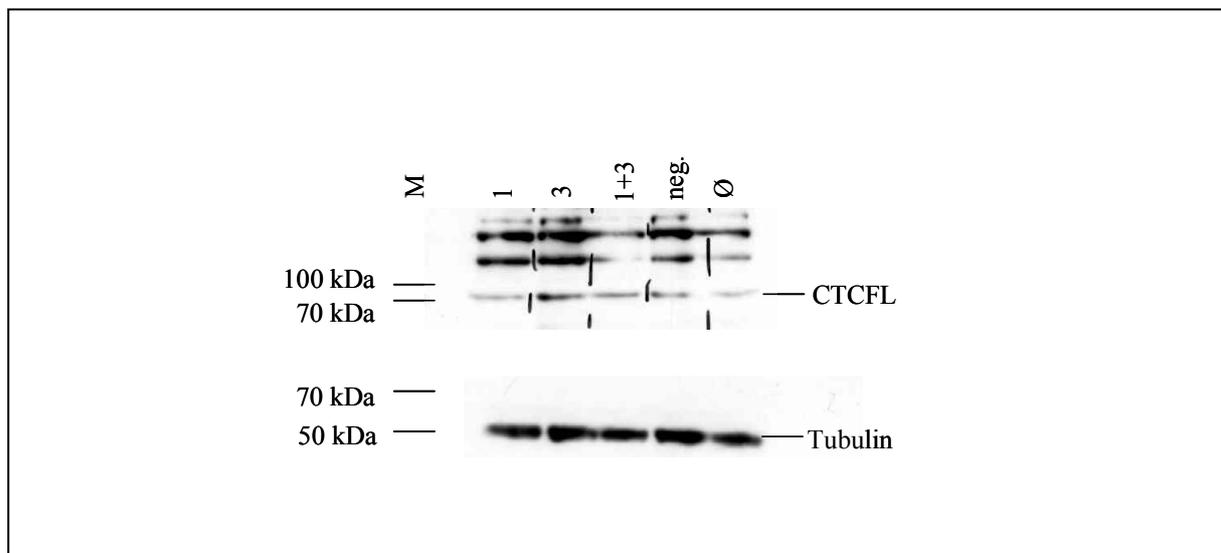


Abb. 3.33: Western-Blot zum Nachweis des *CTCF*L-Proteins nach siRNA-Transfektion der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT, bei der zuvor auf mRNA-Ebene eine Reduktion gezeigt werden konnte.  $\beta$ -Tubulin wurde anschließend als Ladungskontrolle detektiert.

### 3.3.2 Transfektionsexperimente mit einem *CTCF*L-Expressionskonstrukt

Als Parallelansatz zur Aufklärung der Bedeutung von *CTCF*L für die Proliferation sollte in Zelllinien mit niedriger *CTCF*L-Genexpression das Expressionsniveau künstlich erhöht werden. Hierzu wurde ein kommerzielles Konstrukt verwendet. Das in den Expressionvektor inserierte Fragment kodiert für ein Fusionsprotein aus *CTCF*L und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Für die Analyse wurden verschiedene Prostatakarzinom-Zelllinien mit dem Konstrukt transfiziert. Zum Vergleich wurden parallel Ansätze mit einem Leer-Konstrukt transfiziert, bei dem der *open reading frame* (ORF) des *CTCF*L-Gens zuvor herausgeschnitten

worden war. Über die GFP-Fluoreszenz konnte sowohl die Transfektionseffizienz kontrolliert werden, vor allem aber die ausschliessliche Lokalisation des CTCFL-Proteins im Nucleus nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.34).

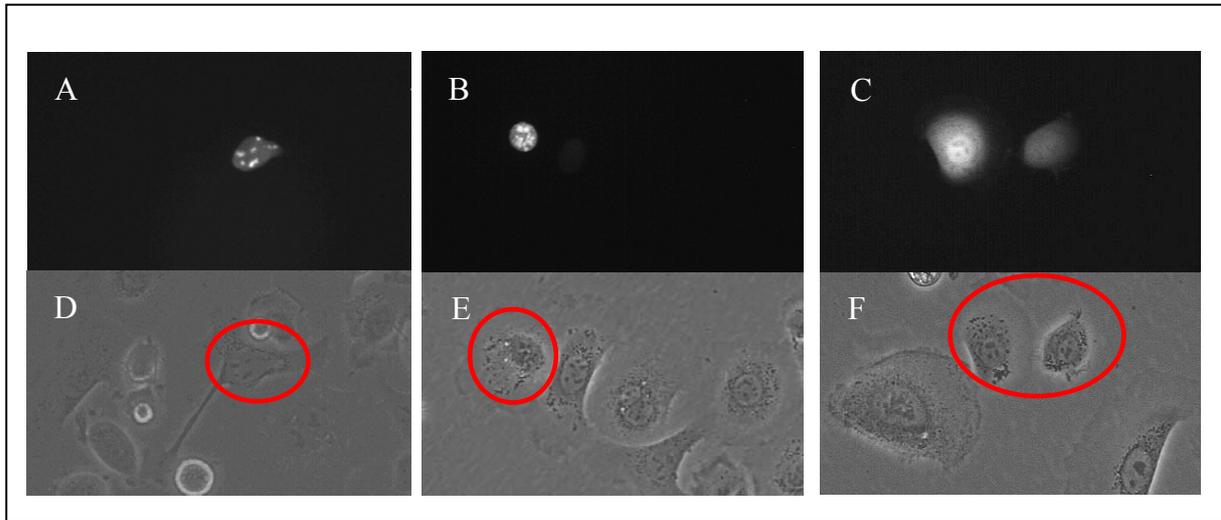


Abb. 3.34: Lokalisation der Fluoreszenz des transfizierten GFP-Expressionskonstruktes im Nucleus von Zellen der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3(A, B) im Vergleich zu mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen (C). Eine Betrachtung der fluoreszenzmarkierten Zellen im Phasenkontrast (D-F) erlaubt die genaue Zuordnung.

Eine lang andauernde Selektion der mit dem Expressionskonstrukt transfizierten Zellen gestaltete sich jedoch schwierig, da diese im Vergleich zu den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen sich schneller abrundeten, teilweise apoptotisch wurden und meistens ihre Adhärenz verloren. Eine vergleichende Expressionanalyse transfizierter und untransfizierter Zellen mittels quantitativer RT-PCR ergab eine 250-fache Induktion der mRNA (ohne Abb.).

Eine Sequenzierung des kommerziell erworbenen Konstrukts durch schrittweise Sequenzierung sowohl des Sinn-Stranges, als auch des Gegenstranges ergab drei Basenmutationen innerhalb des ORF, die nicht im Zusammenhang standen mit beschriebenen Polymorphismen, jedoch jeweils zu einem Aminosäure-Austausch führten.

### 3.3.3 Untersuchungen zur Kolo­kalisierung von CTCFL, CTCF und der RNA-Polymerase II

Der funktionelle Zusammenhang zwischen CTCF und CTCFL ist nach wie vor nicht geklärt. Robertson stellte erneut ein Modell zur Konkurrenz von CTCF und CTCFL in Tumoren auf [Robertson, 2005]. Vor diesem Hintergrund sollten Untersuchungen zur Kolo­kalisierung am konfokalen Mikroskop mit immunocytochemisch gefärbten Prostatakarzinom-Zelllinien Einsicht bringen. Zwei kürzlich publizierte Studien zur funktionellen Rolle von *CTCFL* [Hong et al., 2005; Vatolin et al., 2005] deuteten eher auf *CTCFL* als Transkriptionsfaktor hin als auf einen Chromatinfaktor. Eine Kolo­kalisationsanalyse von CTCFL und der RNA-Polymerase II (RNAPII) könnte Hinweise auf eine Lokalisation von CTCFL in transkriptionell aktiven Foci bringen und damit auf seine funktionelle Rolle.

Zunächst wurden Doppelfärbungen am konventionellen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Eine Überlagerung der Farbkanäle war aus technischen Gründen nicht möglich. Die Methode wurde mit der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT etabliert (vgl. Abb. 3.35), da diese auf mRNA-Ebene die höchste *CTCFL*-Expression ergeben hatte. Nachfolgend sind ferner einige Ergebnisse zur Prostatakarzinom-Linie DU145 exemplarisch dargestellt (vgl. Abb. 3.36).

Bei beiden Zelllinien ergaben sich auffällige Unterschiede in den Färbemustern von CTCF, CTCFL und RNAPII. CTCF- und CTCFL-Färbungen zeigten ein punktförmiges, fein über den Nukleus verteiltes Färbemuster, wobei die Färbesignale beider Proteine an unterschiedlichen Stellen lokalisiert erschienen. Die Färbung der RNAPII stellte sich weniger punktförmig dar und war in größeren, netzartigen Strukturen über den Zellkern verteilt. In Negativkontrollen mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (FITC, Cy-3) fehlten diese Färbemuster.

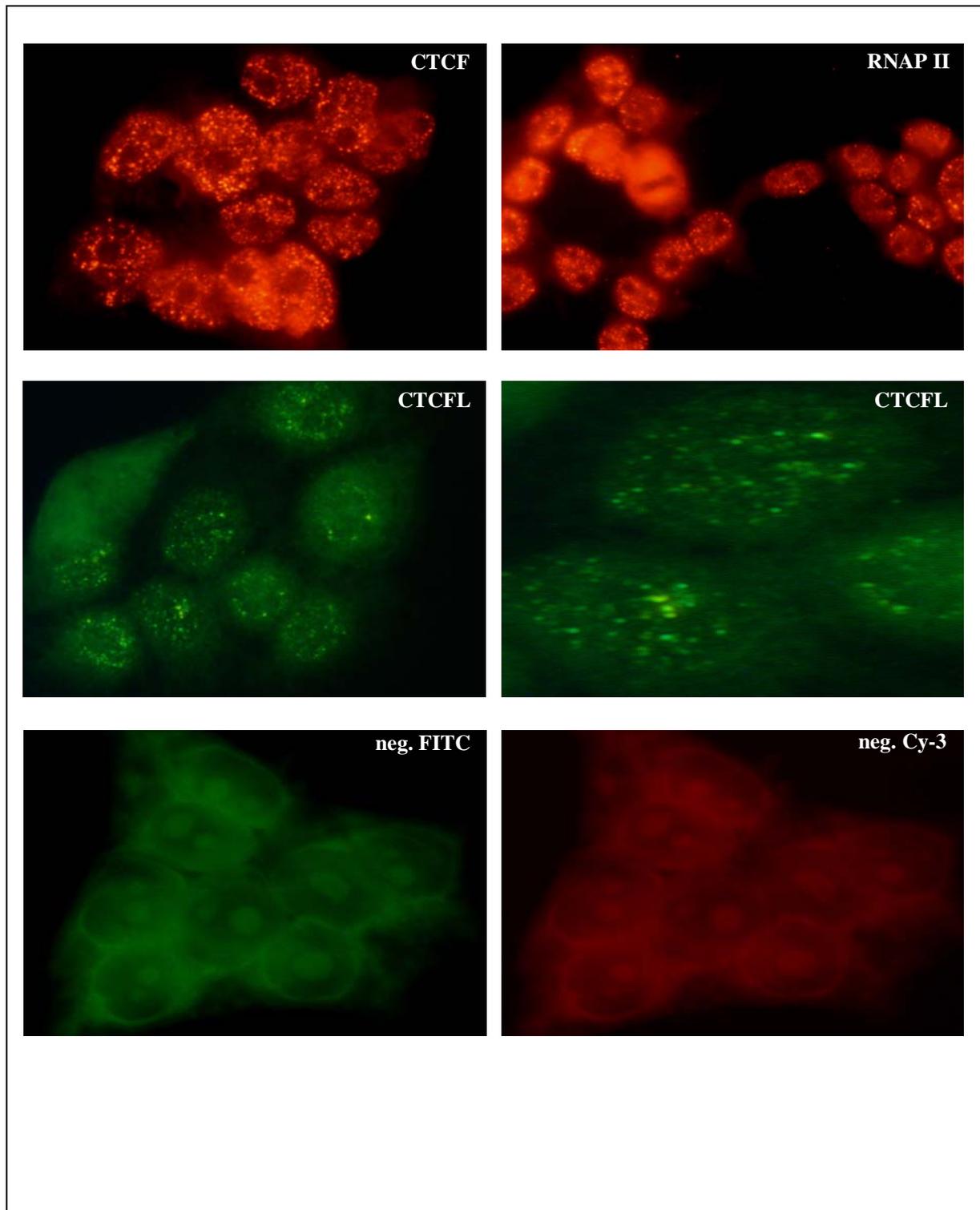
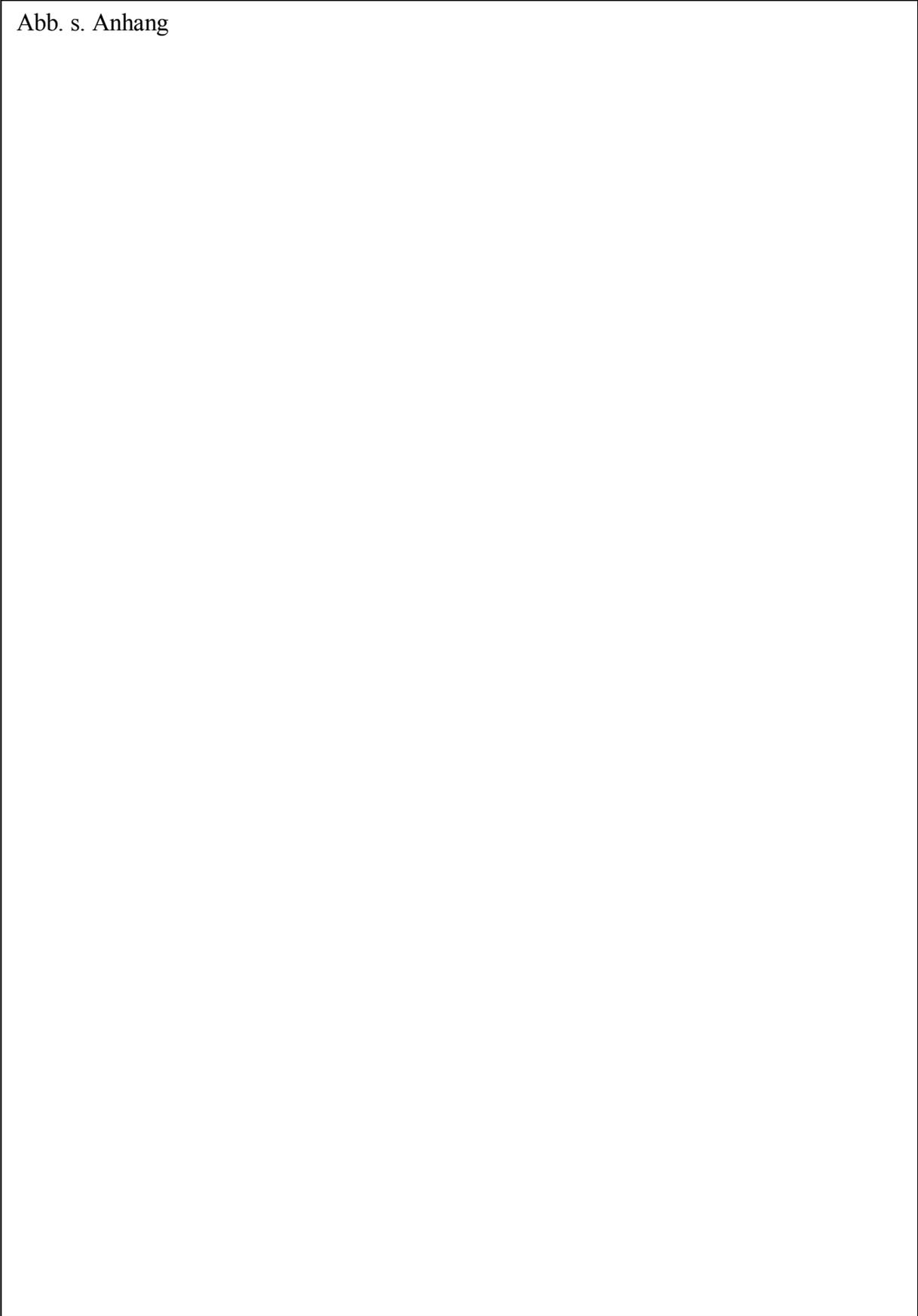


Abb. 3.35: Doppelfärbungen der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT als Positivkontrolle gegen CTCF, RNAP II und CTCFL, Negativkontrollen wurden ohne Primärantikörper gefärbt; Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop.

Abb. s. Anhang



*Abb. 3.36: Doppelfärbungen der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 gegen CTCF, RNAPII und CTCFL; Negativkontrollen wurden ohne Primärantikörper gefärbt; Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop.*

Diese Befunde sollten mit einer überlagerten Darstellung der Einzelfärbungen und einer besseren Auflösung am konfokalen Mikroskop weiter untersucht werden.

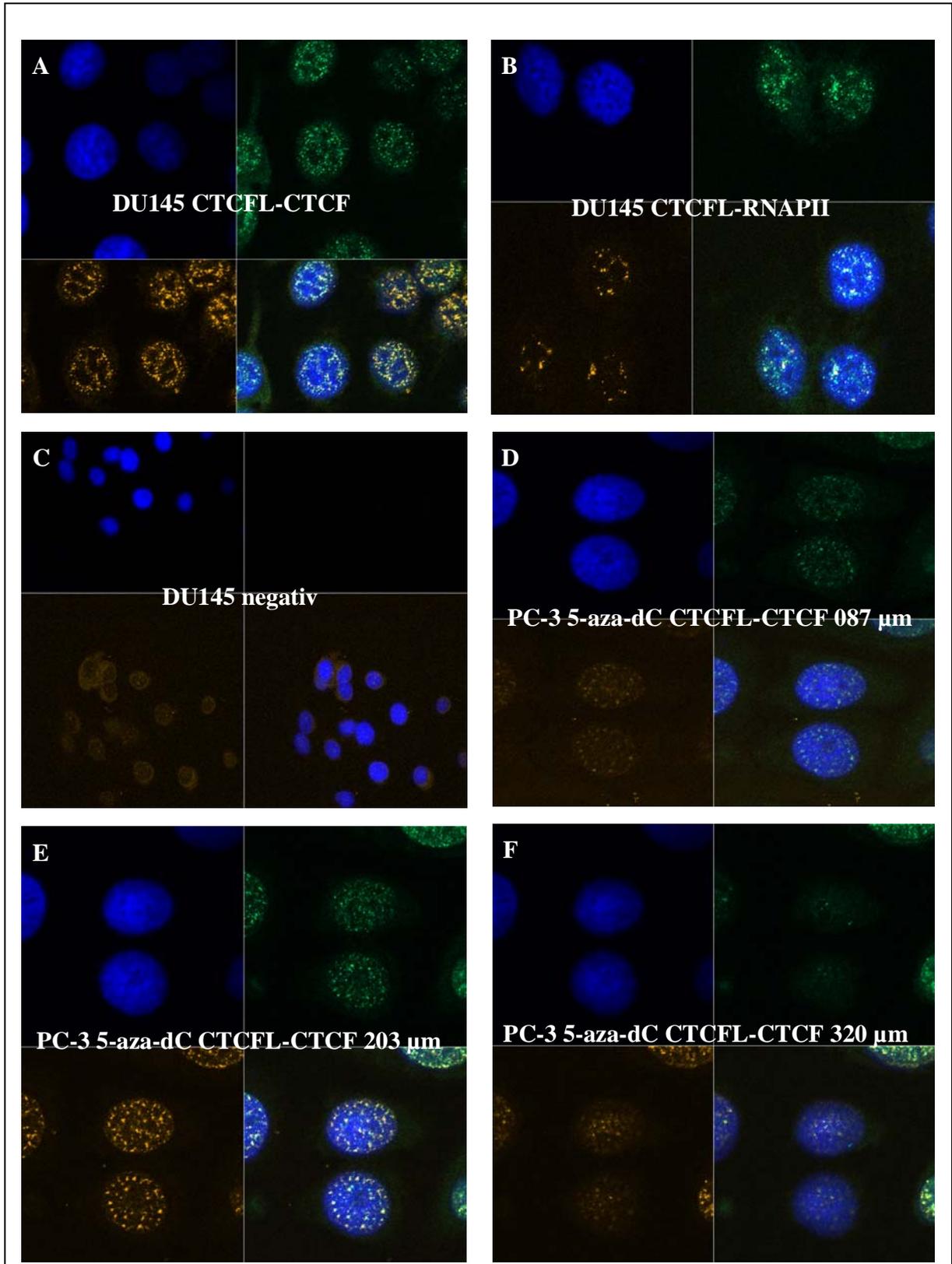


Abb. 3.37: Nukleäre Doppelfärbungen gegen CTCF (rot), CTCFL (grün) und RNAPII (rot), aufgenommen am konfokalen Mikroskop. Zellkerne sind mit Hoechst 33342 blau angefärbt. Grundsätzlich Darstellung pro Quartett: oben links: Hoechst 33342; oben rechts: grün (CTCFL); unten links: rot (CTCF oder RNAPII); unten rechts: Überlagerung.

Bei der Analyse am konfokalen Mikroskop wurden die Prostatakarzinom-Zelllinien DU145, PC-3 und LNCaP untersucht. Diese hatten bereits bei früheren immunocytochemischen Analysen einzelne Auffälligkeiten ergeben (vgl. Abb. 3.17). Hiervon standen jeweils unbehandelte und mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC behandelte Zellen zur Verfügung. Es wurden jeweils Doppelfärbungen von CTCFL und CTCF sowie von CTCFL und RNAPII vorgenommen. Nach der Auswahl einzelner charakteristischer Zellen bieten sich am konfokalen Mikroskop eine Reihe von Möglichkeiten zur Darstellung und Auswertung. Abb. 3.37 bietet einen Überblick über die beiden verschiedenen Doppelfärbungen bei unbehandelten DU145-Zellen (A,B) unter Betrachtung der Hoechst 33342-Fluoreszenz zur Markierung des Zellkerns und der einzelnen Farbkanäle der Antikörperfluoreszenzen, sowie in der Überlagerung. Bei einem Vergleich der Färbungen gegen CTCF und RNAP II (beide rot) fiel erneut auf, dass CTCF als ähnlich kleine Punkte wie CTCFL erschien, jedoch mit unterschiedlicher Lokalisation, während RNAPII größere Strukturen färbte. Die Negativkontrollen ergaben auch hier nur diffusen Hintergrund (C). Zahlreiche Feinschnitte durch den Zellkern (s. Angabe  $\mu\text{m}$  D-F) zeigten die unterschiedliche Verteilung der gefärbten Proteine innerhalb des Zellkerns von PC3-Zellen. Dieses fiel auch bei Analyse der anderen Zelllinien auf. CTCF und CTCFL waren nicht immer in denselben Schichten zu finden. Während CTCFL in nahezu jedem Schnitt zu sehen war, erschien CTCF eher in inneren Schichten des Zellkerns.

Bei der Koloalisations-Analyse konnte bestätigt werden, dass zwischen CTCFL und RNAPII mehr Übereinstimmungen zu finden sind als zwischen CTCFL und CTCF (vgl. Abb. 3.38).

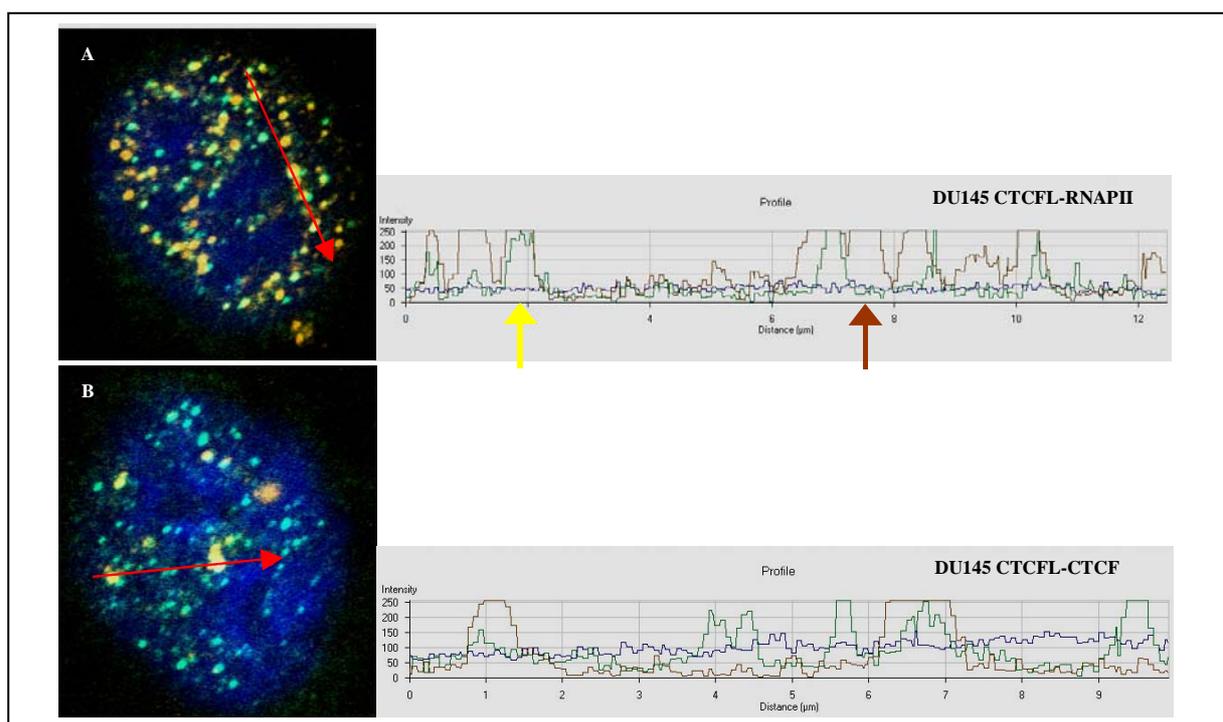


Abb. 3.38: Kolokalisations-Analyse für CTCFL gegen RNAPII (A) und CTCF (B) in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145. Die Signale der einzelnen Farbkanäle sind als Peaks dargestellt. Angegeben ist der Verlauf der Intensitäten entlang des roten Pfeiles, der die analysierte Strecke angibt. Gelber Pfeil: echte Kolokalisation; brauner Pfeil: falsch-positives Signal ohne Kolokalisation.

Betrachtet man in Abb. 3.38 zunächst die fotografische Darstellung der überlagerten Doppelfärbungen, so fällt bei CTCFL und RNAPII (A) eine größere Anzahl von gelben Punkten auf als bei CTCFL und CTCF (B). Gelbe Punkte resultieren aus der Überlagerung von roten und grünen Fluoreszenzen und deuten damit auf eine Kolokalisation hin (vgl. gelber Pfeil Abb. 3.38). Einzelne falsch-positive Farbsignale erscheinen bräunlich gelb (vgl. brauner Pfeil Abb. 3.38), können aber in der Profil-Darstellung deutlich von rein positiven Signalen unterschieden werden. Entsprechend zeigt auch die Profildarstellung mehr zusammenliegende und gleich hohe Peaks von CTCFL und RNAPII als von CTCFL und CTCF.

Eine weitere Möglichkeit zur Auswertung stellt das Histogramm dar, welches hier für DU145 ebenfalls eine stärkere Kolokalisation zwischen CTCFL und RNAPII (A in Abb. 3.39) als zwischen CTCFL und CTCF (B) darstellt. Ein doppelt gefärbter Zellkern wurde ausgewählt und verschiedene Areale mit sog. ROIs (*region of interest*) markiert. Für jedes ROI kann im Streudiagramm die lineare Verteilung der einzelnen Punkte im Rot- und Grünkanal angezeigt werden. Anschließend kann für jedes markierte Areal ein Überlappungs-Koeffizient und der übliche Korrelationskoeffizient  $r$  (nach Pearson) bestimmt werden. Der Überlappungs-Koeffizient wird nach der Methode von Manders und Verbeek bestimmt [Manders et al., 1992], er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Im Falle 1 kolokalisieren alle Pixel. Dieser Koeffizient war generell bei allen Analysen relativ hoch und offenbar empfindlich gegen Hintergrundsignale. Dagegen ergab der Korrelationskoeffizient  $r$  zu den Streudiagrammen eine genauere Abstufung.

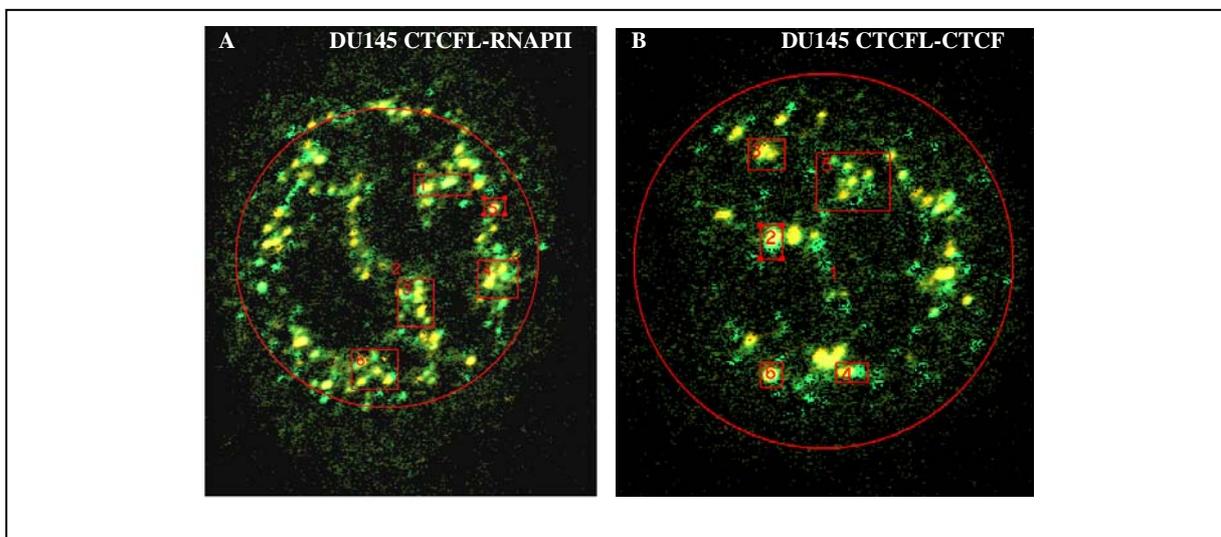


Abb. 3.39: Kolokalisation von CTCFL und RNAPII, sowie CTCFL und CTCF in DU145-Zellen. Innerhalb begrenzter Areale (ROIs, rote Kästen) können separat analysiert werden und lineare Zusammenhänge im Streudiagramm betrachtet werden.

Tab. 3.3: Koeffizienten-Werte der einzelnen ROIs für CTCFL gegen RNAPII (A) und CTCFL gegen CTCF(B) in DU145

ROI	Korrelationskoeffizient r (A)	Korrelationskoeffizient r (B)
1	0,55	0,24
2	0,31	0,29
3	0,43	0,32
4	0,33	0,00
5	0,77	0,22
6	0,25	0,29

Die in Abb. 3.39 eingezeichneten ROIs wurden exemplarisch ausgewählt um auch hier einen Überblick über echte Kolokalisationen zu gewähren. Für ROI2 wurde der gesamte Kern als Messareal bestimmt. Eine genaue Darstellung echter Kolokalisation ist jedoch nur mit kleinen Arealen möglich. Die insgesamt hohen Korrelationswerte zeigen eine deutliche Kolokalisation von CTCFL und RNAPII an.

Die Zelllinie PC-3 wurde verwendet um den induktiven Effekt von 5-aza-dC auf die CTCFL-Expression zu beweisen. Foto und Profil-Diagramm (A in Abb. 3.40) zeigen zunächst kaum Kolokalisation von CTCF und CTCFL. Bei Betrachtung der Histogramm-Abbildungen und Koeffizienten (vgl. Tab. 3.4) fällt eine deutliche Zunahme der Kolokalisationsereignisse nach Behandlung der Zellen mit 5-aza-dC auf (B und C).

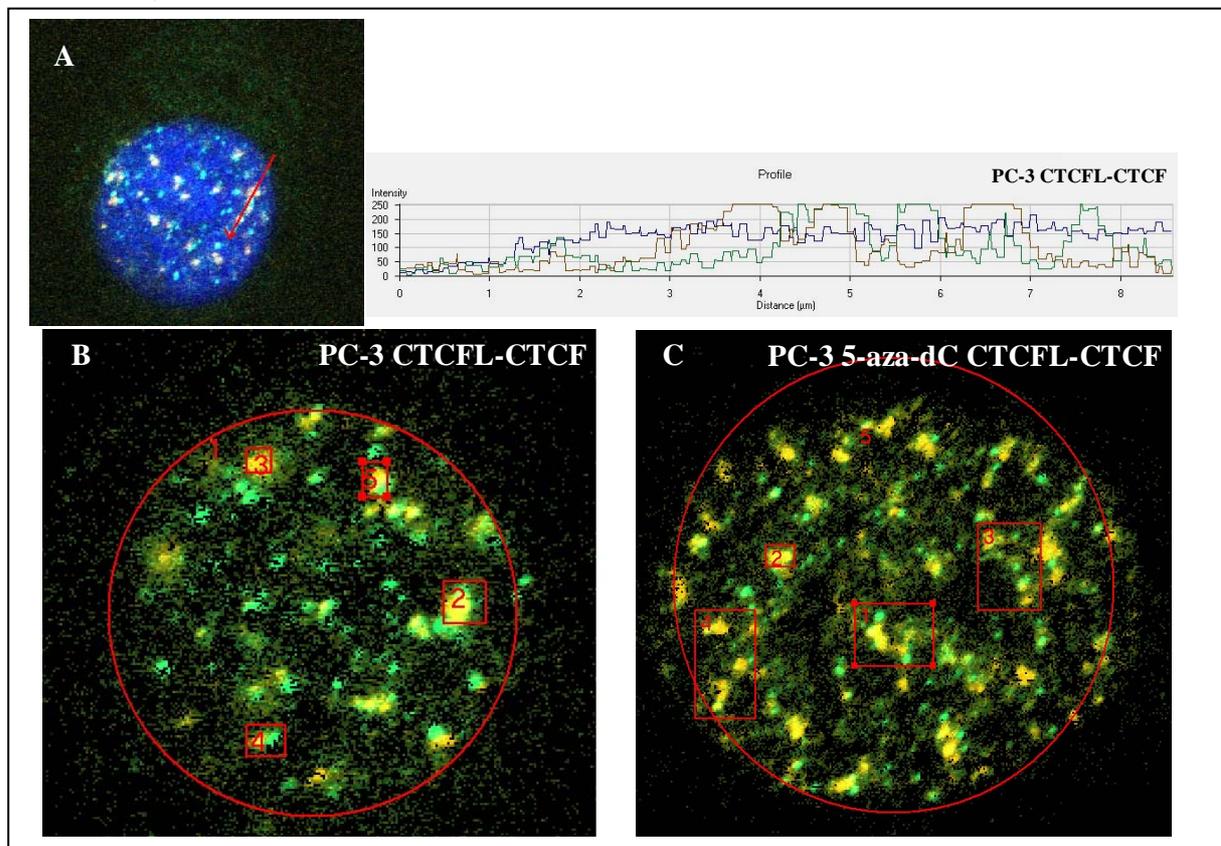


Abb. 3.40: Kolokalisations-Analyse für CTCFL gegen CTCF in der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 mit und ohne 5-aza-dC.

Tab. 3.4: Koeffizienten-Werte der einzelnen ROIs für CTCFL gegen CTCF in unbehandelten und behandelten - PC-3-Zellen

ROI	Korrelationskoeffizient r ohne 5-aza-dC	Korrelationskoeffizient r mit 5-aza-dC
1	0,23	0,28
2	0,35	0,43
3	0,00	0,26
4	0,10	0,25
5	0,46	0,26

Ein ähnlicher Befund konnte auch in der Zelllinie LNCaP bestätigt werden. Hier wurde eine Doppelfärbung von CTCFL und RNAPII in unbehandelten und behandelten Zellen untersucht. Obwohl hier schon in unbehandelten Zellen ein, im Vergleich zu CTCFL gegen CTCF, höheres Maß an Kolo-kalisation von CTCFL und RNAPII gezeigt werden konnte, wurde dieses durch Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor durch Induktion der CTCFL-Expression zusätzlich verstärkt (vgl. Abb. 3.41).

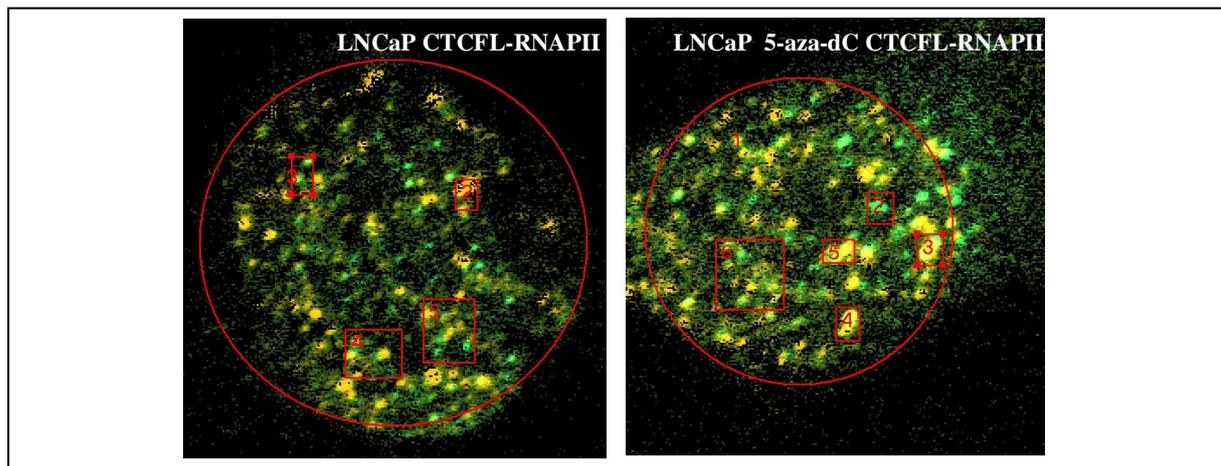


Abb. 3.41: Kolo-kalisationsanalyse für CTCFL gegen RNAPII in der Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP mit und ohne 5-aza-dC.

Auch die Werte der Korrelationskoeffizienten verschiedener Areale ergaben eine stärkere Kolo-kalisation von CTCFL und RNAPII nach 5-aza-dC-Behandlung.

Tab. 3.5: Koeffizienten-Werte der einzelnen ROIs für CTCFL gegen RNAPII in LNCaP

ROI	Korrelationskoeffizient r ohne 5-aza-dC	Korrelationskoeffizient r mit 5-aza-dC
1	0,08	0,13
2	0,06	0,17
3	0,30	0,27
4	0,03	0,45
5	0,00	0,21
		0,14

Bei beiden Histogrammen wurde mit ROI 1 der gesamte Zellkern als Areal ausgewählt. In diesem Fall ermöglicht auch dieses einen Überblick über die Variationen durch 5-aza-dC-Behandlung. Desweiteren scheint in allen untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien die

CTCF-Lokalisation stärker mit der RNA-Polymerase II zu korrelieren, als mit CTCF. Eine Kolokalisation mit CTCF kann durch CTCFL-Induktion über 5-aza-dC-Behandlung verstärkt werden.

### 3.4 Anreicherung von Prostatakarzinom-Zellen mit Stammzell-Phänotyp

In Ermangelung spezifischer Stammzellmarker bei den verschiedenen Tumorarten werden bislang für die Anreicherung von Zellen mit Stammzell-ähnlichem Phänotyp zwei verschiedene Verfahren verwendet, die allgemeine Eigenschaften von Stammzellen ausnutzen.

Der Oberflächenmarker CD133 wurde bei einer Subpopulation von hämatopoetischen Stammzellen entdeckt [Miraglia et al., 1997] und zu deren Isolation bei einigen normalen Geweben verwendet. Erste Berichte zum erfolgreichen Einsatz bei Tumorgewebe und – Zelllinien erfolgreich liegen vor (vgl. 1.3).

Bei dem Einsatz des fluoreszierenden Hoechst-Farbstoffes 33342 wird die durch ABC-Transporter vermittelte Resistenz von Stammzellen gegenüber zytotoxischen Substanzen ausgenutzt (vgl. 2.23).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst mit der Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzell-Phänotyp unter Verwendung des Hoechst 33342-Farbstoffes begonnen. Hierfür wurde die Prostatakarzinom-Zelllinie 22Rv1 auf Grund ihres bisher untersuchten Expressionsmusters (vgl. 3.1) und ihrer Herkunft (vgl. 2.1.1) ausgewählt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Zelllinie mit üblichen Einstellungen bei hämatopoetischen Zellen nur eine sehr geringe *Side Population* ergab. Bei einem weiteren Versuch wurden die Sortier-Bedingungen weniger stringent gesetzt (vgl. Abb. 3.42). Im linken unteren Quadranten setzt sich eine kleine Population von ungefärbten Zellen von den übrigen Zellen ab. So fielen 3% der Zellen in den SP-Rahmen und es konnten 80 000 Zellen gewonnen werden, die sich aus einer Anreicherung von SP-Zellen und einem Anteil Nicht-SP-Zellen zusammensetzten. Theoretisch sollten SP-Zellen in dieser Fraktion um einen Faktor  $>30$  gegenüber der Ausgangspopulation angereichert sein.

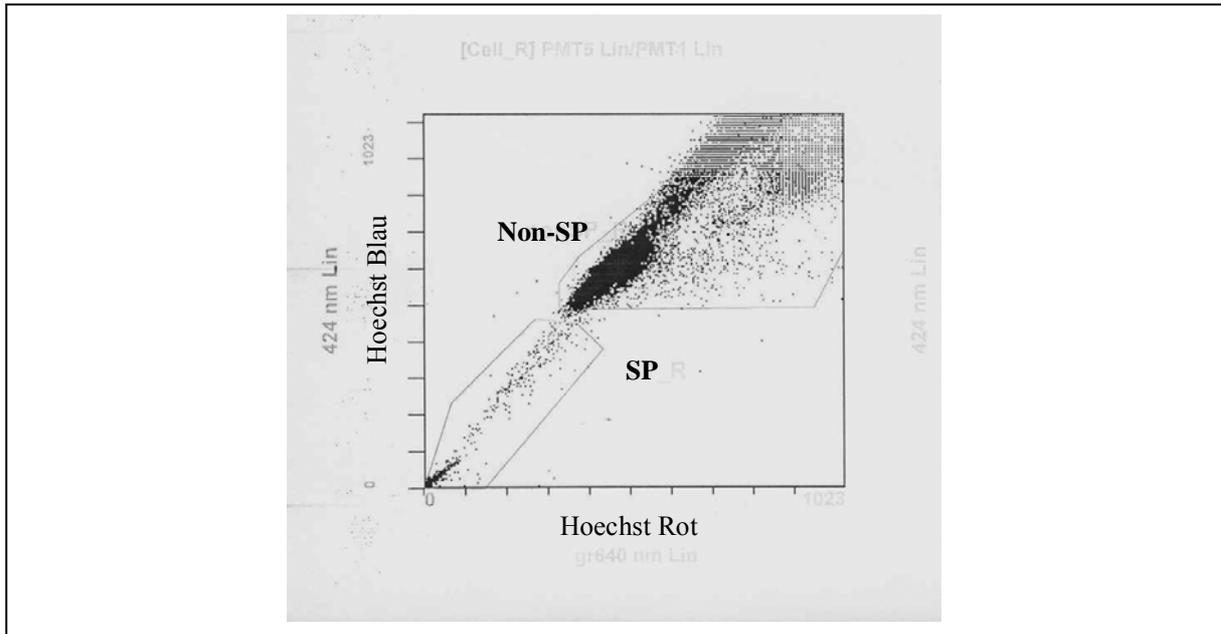


Abb. 3.42: Auswahlrahmen zur Anreicherung von 3% SP und den übrigen Non-SP-Zellen bei der FACS-Sortierung von 22Rv1-Zellen über Hoechst 33342. Bei der Analyse wird die Emission bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt (Hoechst Rot und Hoechst Blau; vgl. 2.23). Tote Zellen wurden über eine Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen.

Die isolierten Zellen wurden anschließend zur Präparation von RNA verwendet und für quantitative RT-PCR-Analysen eingesetzt. Ein Vergleich der SP-Fraktion zu den Non-SP-Zellen und einem Ansatz nicht sortierter 22Rv1-Zellen ergab für vier Kandidaten-Gene eine leicht erhöhte Expression in den SP-Zellen.

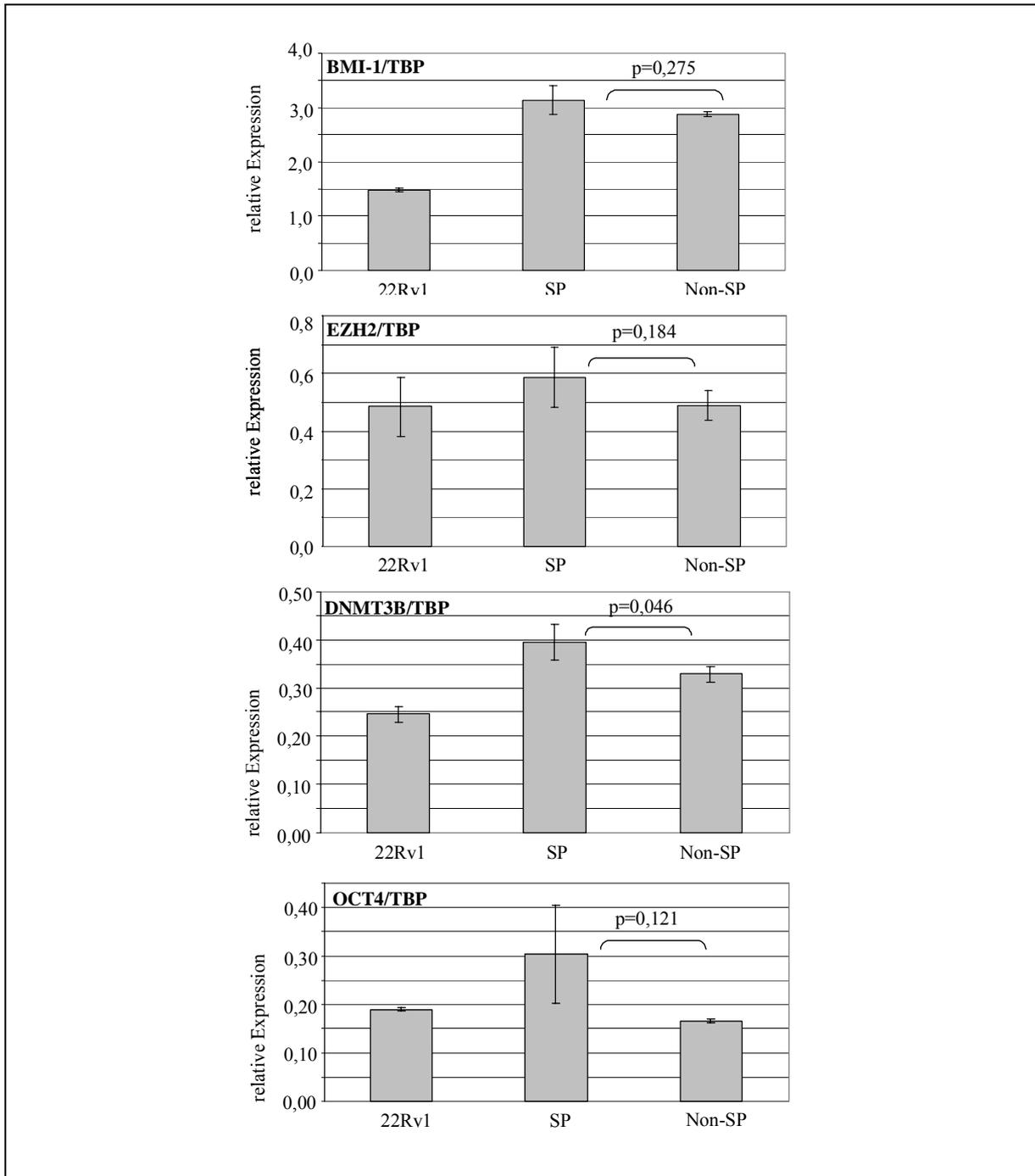


Abb. 3.43: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analyse für das Expressionsniveau der Gene BMI-1, EZH2, DNMT3B und OCT4 relativ zu TBP in der SP-Fraktion im Vergleich zu Non-SP-Zellen sowie nicht sortierten 22Rv1-Zellen. Der Signifikanzwert  $p$  für den Vergleich zwischen SP- zu Non-SP-Zellen ist angegeben.

Parallel wurde auch die CD133-Methodik zur Identifizierung von Stammzellen aus Tumorzelllinien verfolgt. Ein anti-CD133-Antikörper, der zuvor mit magnetischen Beads gekoppelt wurde, sollte eine Auftrennung der Zellen mit Hilfe eines Säulensystems der Firma Miltenyi ermöglichen. Bevor mit der Etablierung der Anreicherung von Zellen über dieses System begonnen wurde, sollte die Zelllinie 22Rv1 am FACS-Gerät zunächst mit einem fluoreszenzmarkierten CD133-Antikörper desselben Unternehmens auf die Existenz CD133-

positiver Zellen untersucht werden. Die Versuchsparmeter wurden mit Hilfe einer Isotypkontrolle eingestellt, um Eigenfluoreszenzen auszuschließen. Nach dieser Korrektur konnte keine distinkte Zellpopulation mit deutlicher Fluoreszenz durch Bindung des CD133-Antikörpers erkannt werden.

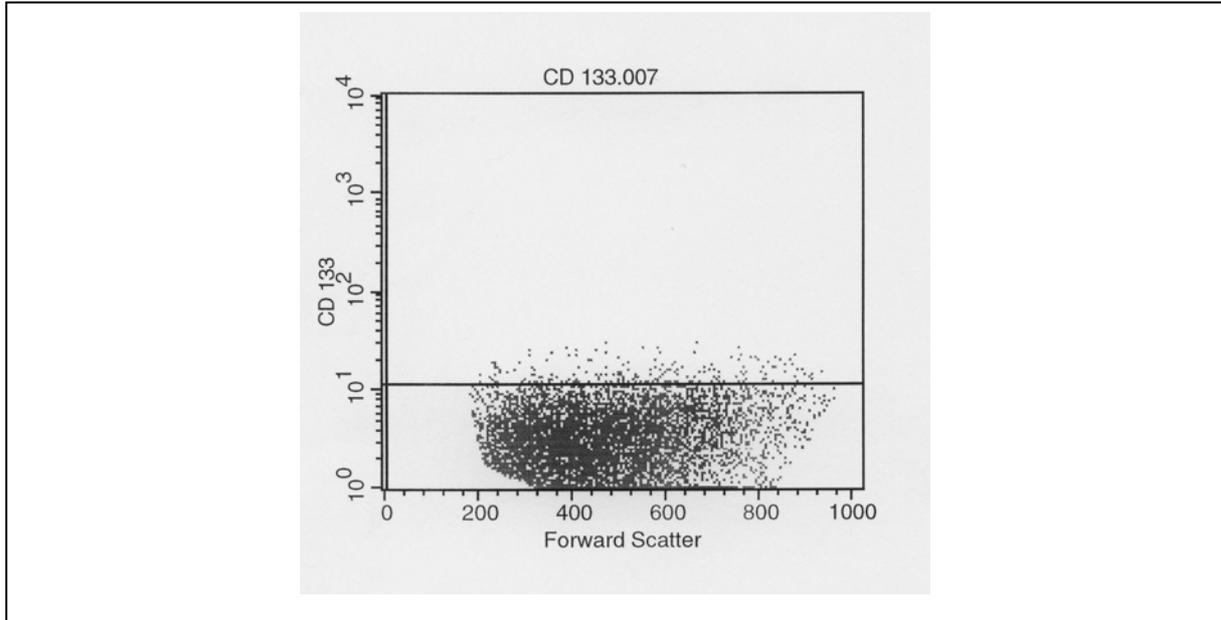


Abb. 3.44: FACS-Analyse von 22Rv1-Zellen auf CD133-Positivität mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers. Nach Abzug sämtlicher Hintergrundfluoreszenzen konnte oberhalb des Hintergrundes keine distinkte Population von Zellen eingegrenzt werden.

Daher sollte eine RT-PCR-Analyse Aufschluss darüber geben, ob eine CD133-Expression in Prostatakarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden kann.

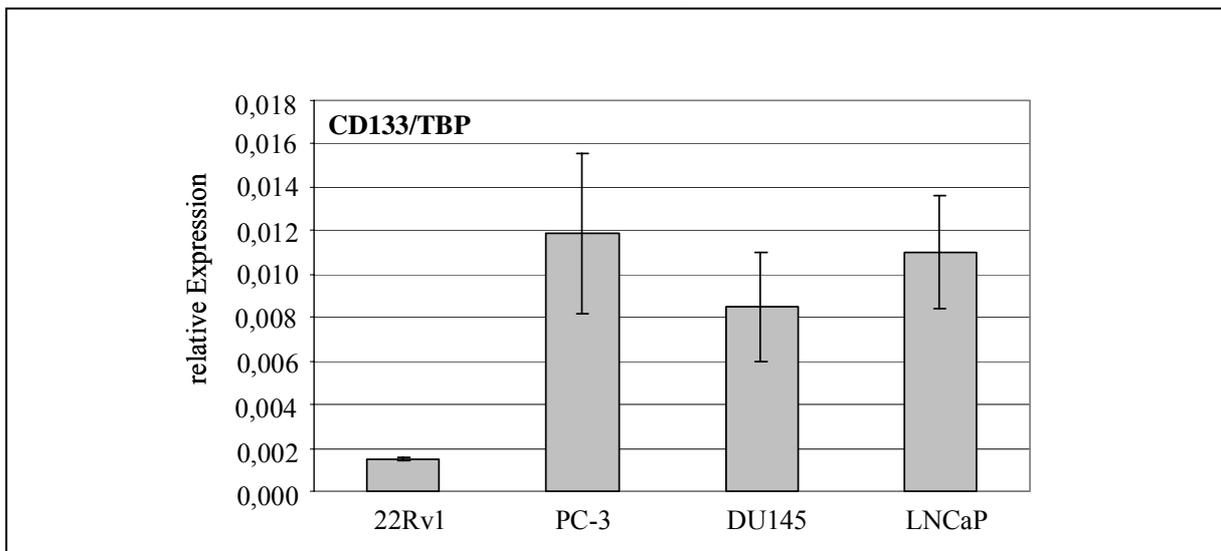


Abb. 3.45: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR zur CD133-Expression relativ zu TBP in Prostatakarzinom-Zelllinien.

Absolut liegen die Werte der CD133-Expression recht niedrig. Hinsichtlich des Expressionsniveaus unterscheiden sich die einzelnen Prostatakarzinom-Zelllinien.

## 4 DISKUSSION

Epigenetische Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entwicklungsabläufen und Differenzierungsprozessen, z.B. durch Festlegung von Zellschicksalen während der Embryonalentwicklung und Gametogenese. Der epigenetische Status von Stammzellen unterscheidet sich von somatischen Zellen (vgl. 1.1.1., 1.3). Inzwischen sind epigenetische Veränderungen auch als fundamentale Mechanismen bei der Tumorentstehung etabliert. Die Regulation der Modifikationen von DNA und Chromatin basiert auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Faktoren, Proteinkomplexe und Enzyme.

Beim Prostatakarzinom fehlen bisher Marker, die als Onkogene oder Tumorsuppressorgene charakteristisch sind für diese Tumorart. Für die Diagnostik und Optimierung der Therapiestrategien werden zusätzlich zum PSA-Test dringend aussagekräftige Marker zur Subgruppierung benötigt. Da im Prostatakarzinom auffallende epigenetische Veränderungen zu finden sind, wurden diese in der vorliegenden Arbeit als Ansatzpunkt für die Untersuchung des Prostatakarzinoms gewählt. Ausgewählte regulatorische Faktoren sollten auf ihre Eignung als Marker geprüft werden. Ihre Analyse sollte Hinweise erbringen auf die Anwendbarkeit der allgemein postulierten Modelle zu Tumorzellen mit stammzellähnlichem Phänotyp. Diese sind auch im Zusammenhang mit der Heterogenität von Tumoren zu betrachten, die auch beim Prostatakarzinom ein entscheidendes Problem darstellt.

In dieser Arbeit wurde eine Reihe verschiedener Gene für regulatorische Proteine untersucht. Diese wurden auf Grund mehrerer Aspekte ausgewählt. Einige der ausgewählten Faktoren stehen im Verdacht, einen direkten Einfluss auf Methylierungsmuster auszuüben (vgl. 1.1.1, 1.1.4 und 1.1.5). Damit kamen sie kausal für die in Prostatakarzinomen gefundenen Methylierungsveränderungen in Betracht (vgl. 1.3). Diese und weitere untersuchte Regulatoren konnten von Bedeutung sein für die Erhaltung von mutmaßlichen Tumorstammzellen und deren Phänotyp (vgl. 1.1.1, 1.1.4 und 1.3). Ein Teil der ausgewählten Gene könnte selbst durch Methylierung reguliert sein und damit auch Ziele der epigenetischen Veränderungen im Prostatakarzinom darstellen. Je nach Modell für die Tumorstammzell-Hypothese konnten die untersuchten Gene in einem größeren oder kleineren Anteil der Tumorzellen exprimiert sein.

Die Expression der Kandidatengene wurde in Gewebeproben von Prostatakarzinom-Patienten, in Prostatakarzinom-Zelllinien und bei mutmaßlichen Tumorstammzellen, die aus einer Prostatakarzinom-Zelllinie isoliert wurden, untersucht (vgl. 3.1. und 3.4). Anschließend wurden Zusammenhänge mit bereits früher bei diesen Patienten bestimmten

Methylierungsveränderungen analysiert (vgl. 3.2.3). Auch Zusammenhänge zu klinischen Parametern wurden geprüft (vgl. 3.1.6), da immer noch Bedarf an molekularen Markern besteht, die eine Abgrenzung von aggressiven Prostatatumoren erlauben (vgl. 1.2).

Für zwei Kandidatengene wurde ihre Regulation durch Methylierung genauer analysiert (vgl. 3.2). Da für einen dieser Faktoren bislang nur wenige Details zu seiner funktionellen Bedeutung bewiesen sind, wurde eine funktionelle Analyse begonnen (vgl. 3.3).

#### 4.1 Analyse der Expression von Kandidatenfaktoren in Gewebeproben

##### Die Polycomb-Gene *EZH2* und *BMI-1*

Eine bedeutende Gruppe von Proteinen, die auf der Chromatinebene die Repression transkriptioneller Aktivität regulieren, sind die Polycomb-Proteine (PcG; vgl. 1.1.4). Zusammen mit den aktivierenden Trithorax-Proteinen stellen sie eine Form des zellulären Gedächtnisses dar. Sie erhalten Zustände transkriptioneller Aktivität bzw. Inaktivität aufrecht, die zuvor durch vorübergehend wirkende regulatorische Faktoren initiiert wurden, und propagieren diese über Zellteilungen und Meiose hinweg [Jacobs und van Lohuizen, 2002].

Funde in neuerer Zeit deuteten darauf hin, dass auch das Schicksal von Stammzellen teilweise durch PcG-Gene reguliert ist [Gil et al., 2005]. Erste Hinweise kamen aus Studien an Mäusen. Lessard et al. und Park et al. konnten 2003 zeigen, dass *Bmi-1* das proliferative Potential von normalen und leukämischen Stammzellen bestimmt [Lessard und Sauvageau, 2003; Park et al., 2003]. *Bmi-1*-defiziente Mäuse erlitten einen Verlust an hämatopoetischen Zellen und Neuronen im Kleinhirn [Valk-Lingbeek et al., 2004]. Clarke vermutet ferner, dass *BMI-1* repressiv auf Gene wirkt, die an der Differenzierung beteiligt sind und dass *BMI-1* notwendig, aber allein nicht ausreichend für die Selbsterneuerung ist [4th Heinrich Behr Symposium zu Stem Cells and Cancer, Heidelberg März 2006].

Eine Überexpression von *BMI-1* wurde in einigen Tumorarten beschrieben. Hierzu gehören Colonkarzinome [Kim et al., 2004], Lymphome [Raaphorst, 2005], Medulloblastome [Leung et al., 2004; Shakova et al., 2005] und Lungenkarzinome [Breuer et al., 2005]. Für Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom wurde *BMI-1* als prognostischer Marker für die Progression vorgeschlagen [Mihara et al., 2006]. Eine Überexpression von *BMI-1* kann zu einer verminderten *p16/INK4a*- und *p19/ARF*-Expression führen, was die Progression innerhalb des Zellzyklus erleichtert, da *RB* schneller hyperphosphoryliert wird und *p53* leichter degradiert. Hierdurch werden Übergänge neoplastischer oder präneoplastischer Zellen

zur Apoptose oder Seneszenz verhindert. Über die *BMI-1*-Expression im Prostatakarzinom ist wenig bekannt.

Ein anderes Polycomb-Gen, das hinsichtlich seiner Bedeutung für Stammzellen und als prognostischer Marker in den Blickpunkt geraten ist, ist das *EZH2*-Gen. Beispiele für den regulatorischen Einfluss des Proteins auf die Pluripotenz geben die nachfolgenden Funde. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Ezh2* bereits in der totipotenten Zygote (E 0,5) zusammen mit anderen wichtigen Faktoren wie z.B dem Pluripotenzgen *Oct 4* exprimiert wird [Surani 4th Heinrich Behr Symposium zu Stem Cells and Cancer, Heidelberg März 2006]. Cao und Zhang vermuteten einen direkten regulatorischen Einfluss von *Ezh2* auf das *Oct 4*-Gen über die durch *EZH2*-vermittelten Methylierungen am H3K27 und Interaktion mit einer unbekanntem H3K9-spezifischen Histonmethyltransferase. In differenzierenden embryonalen P19 Zellen konnte eine Assoziation von *Ezh2* mit dem *Oct 4*-Promotor gezeigt werden [Cao und Zhang, 2004].

Der genaue Mechanismus zur Vererbung des durch die Polycomb-Proteine vermittelten repressiven Status ist immer noch ungeklärt [Taghavi und van Lohuizen, 2006]. Viré et al. [2006] postulierten *EZH2* auf Grund ihrer Ergebnisse als direktes Bindeglied zwischen Histon-Methylierungen und DNA-Methylierung. Ihre Resultate zur Interaktion von *EZH2* mit allen DNMT-Klassen, die sich bekanntlich funktionell stark unterscheiden, bedürfen der Bestätigung durch weitere Arbeiten. Das aufgestellte Modell postuliert, dass die durch *EZH2* vermittelten Methylierungen am H3K27 für die Bindung der DNA-Methyltransferasen an Zielpromotoren benötigt wird [Viré et al., 2006]. Taghavi und van Lohuizen erweiterten dieses Modell um einen zweiten Aspekt, wonach *EZH2* zur direkten Aktivierung der DNMT beiträgt und damit unmittelbar auf die DNA-Methylierung einwirken könnte [Hernandez-Munos et al., 2005; Taghavi und van Lohuizen, 2006].

Die Auswirkungen einer Dysregulation des von Polycomb-Proteinen beeinflussten Systems in Tumorzellen ist evident. Varambally et al. zeigten für *EZH2* einen Zusammenhang mit der Proliferation in Prostatakarzinom-Zelllinien [Varambally et al., 2002]. Ferner entdeckten sie eine *EZH2*-Überexpression in metastatischen, hormonrefraktären Prostatakarzinomen. Diese Ergebnisse wurden durch Microarray-Analysen von Knochenmarksmetastasen androgenunabhängiger Prostatakarzinome und primärer Tumore [Stanbrough et al., 2006], sowie durch Funde von *EZH2*-Genamplifikationen in weit fortgeschrittenen Fällen neu bestätigt [Saramäki et al., 2006]. Eine Assoziation der *EZH2*-Überexpression mit der Proliferation und Aggressivität wurde auch bei anderen Tumorarten gefunden. Hierzu gehören Mammakarzinome [Kleer et al., 2003; Collet et al., 2006], Harnblasenkarzinome [Raman et al., 2005], sowie Melanome und Karzinome des Endometriums [Bachmann et al., 2006].

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Expression von *BMI-1* und *EZH2* wurden in Prostatakarzinom- sowie Urothelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu kultivierten normalen Urothelzellen begonnen. Während Urothelkarzinom-Zelllinien eine niedrigere *BMI-1*-Expression als normale Urothelzellen (UEC1 und 2 in Abb. 3.2) zeigten, lag das Expressionsniveau der Prostatakarzinomzellen höher. Für Prostatakarzinomzellen fehlte ein unmittelbarer Vergleich zum Normalzustand, da vergleichbare Proben aus normalem Prostatagewebe (normale Prostataepithelzellen) nicht zur Verfügung standen. Prinzipiell lassen sich auch in Kultur nur normale Prostataepithelzellen mit einem basalzellähnlichen Phänotyp etablieren, da sekretorische Zellen in Kultur nicht überleben. Verglichen mit der bis zu 11-fachen erhöhten *EZH2*-Expression in Prostatakarzinomzellen fiel die *BMI-1*-Expression in diesen Zellen jedoch niedrig aus (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 3.2).

Für *EZH2* zeigten alle vier Prostatakarzinom-Zelllinien eine hohe Expression. Unter den Urothelkarzinom-Zelllinien fielen insgesamt vier von 15 mit deutlich erhöhter Expression im Vergleich zu den UEC-Proben auf. Zu diesen gehören vor allem Urothelkarzinom-Zelllinien für die bereits früher ein Verlust des RB-Proteins gezeigt werden konnte [Grimm et al., 1995]. Ein Einfluss des RB-Signalweges auf die *EZH2*-Regulation wurde beschrieben [Bracken et al., 2003]. Auch bei der Analyse von 45 primären, nicht-metastasierten Prostatatumorproben im Vergleich zu Normalgewebeproben, ergab sich eine erhöhte *EZH2*-Expression ( $p=0,088$ ; vgl. Abb. 3.3). Ähnliche Ergebnisse hatten auch Varambally et al. gezeigt, wobei ein stark signifikanter Anstieg der Expression erst bei metastasierten, hormonrefraktären Tumoren zu beobachten war. Bracken et al. konnten keine hohe Expression in primären Prostatatumoren finden, metastasierte Karzinome standen in ihrer Kohorte nicht zur Verfügung [Bracken et al., 2003]. Für die in dieser Arbeit untersuchte Probandengruppe standen ebenfalls keine metastasierten Karzinome zu Verfügung. Sechs der Patienten entwickelten einen hormonrefraktären Tumor, eine Regressionsanalyse mit der *EZH2*-Expression ergab jedoch keinen auffälligen Zusammenhang. Dafür zeichnete sich ein, wenn auch nicht signifikanter, Trend zu erhöhter Expression in höheren Tumorstadien ( $>pT2$ ) und undifferenzierteren Tumoren mit einer Gleason-Summe größer 8 ab ( $p=0,352$ ;  $p=0,266$ ; vgl. Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Bei der Überlebensanalyse der 13 Patienten mit Rezidiv trennten sich die Kurven der Patienten mit *EZH2*-Expression unterhalb des Medians (Gruppe 1) und oberhalb des Medians (Gruppe 2) deutlich (vgl. Abb. 3.22) und zeigten eine längere rezidivfreie Zeit für Patienten mit niedriger Expression an. Die Signifikanzwerte der dargestellten Überlebensanalysen mit deutlich voneinander getrennten Kurven der beiden Patientengruppen resultieren aus der jeweils niedrigen Fallzahl der zur Verfügung stehenden Proben. Die

eigenen Ergebnisse entsprechen damit der oben angeführten Literatur, wonach die *EZH2*-Expression in lokalisierten Prostatakarzinomen ansteigt, mit einer weiteren Zunahme im metastasierten Tumoren.

Im Gegensatz dazu wurde für *BMI-1* in Gewebeproben aus lokalisierten Tumoren eine statistisch signifikant erniedrigte Expression nachgewiesen ( $p=0,001$ ; vgl. Abb. 3.4). Einzelne Ausreißer und Extremwerte zeigten ein erhöhtes Expressionsniveau. Korrelationen mit klinischen Parametern konnten nicht gefunden werden. Diese Daten dieser Arbeit sind die ersten zur *BMI-1*-Expression im Prostatakarzinom.

Bei anderen Tumorarten wurde dagegen häufig eine erhöhte *BMI-1*-Expression gezeigt. In normalem bronchialem Epithel zeichnen sich ruhende Zellen durch *BMI-1*-Positivität und fehlende *EZH2*-Expression aus. Dieser Zustand spiegelt das gewohnte postulierte gegensätzliche Expressionmuster dieser Polycomb-Gene aus den beiden verschiedenen PcG-Komplexen wieder. In sich teilenden, neoplastischen Lungenkarzinomzellen nimmt die *BMI-1*-Expression weiter zu und die *EZH2*-Expression steigt an [Breuer et al., 2004]. Beim Lungenkarzinom wird diese Koexpression als frühe Veränderung angenommen, die vor dem Übergang zu starker Proliferation stattfindet und zu einem Verlust der Zellidentität führen könnte. Einen Übergang zur Koexpression findet man auch in Lymphomen, so dass Raaphorst in dieser Tumorart eine Unfähigkeit zur Herunterregulation des PRC1-Komplexes (*BMI-1*) annahm [Raaphorst, 2005].

In den untersuchten Prostatakarzinomen der vorliegenden Arbeit findet eine Verminderung statt, sie zeigen allenfalls aberrant erniedrigte *BMI-1*-Genexpression. Es gibt aber durchaus Beispiele für eine Assoziation von verminderter *BMI-1*-Expression mit erhöhter Zellproliferation; z.B. bei B-Zellen im Lymphknoten. Ruhende B-Zellen der Rindenzone zeigen eine verminderte *BMI-1*-Expression nach ihrem Übergang zu sich schnell teilenden Zentroblasten [Raaphorst et al, 2000]. Ferner beschrieben Gunster et al. in einer breit angelegten Analyse, dass sich die Expression der Polycomb-Proteine stark zwischen verschiedenen Geweben, sogar verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Gewebes und je nach Entwicklungszustand, unterscheiden kann [Gunster et al., 2001]. Demnach müssen sich die eigenen Funde einer niedrigen *BMI-1*-Expression in Prostata Tumoren und das von anderen Gruppen beschriebene höhere Expressionsniveau bei anderen Tumorarten nicht widersprechen.

Außerdem konnten die eigenen Ergebnisse zur Genexpression auf mRNA-Ebene durch eine immunhistochemische Analyse auf Proteinebene bestätigt werden. Normale Drüsen zeigten eine stärkere Färbung für *BMI-1* als Tumorareale (vgl. Abb. 3.5). Hier waren sowohl

Basalzellen als auch sekretorische Zellen gleichmäßig gefärbt. Vor dem Hintergrund der Abstammungstheorie von Tumorstammzellen deutet dieses Muster nicht auf einen Stammzellphänotyp hin. Auch in Tumorarealen waren beide Zelltypen gefärbt, dabei gab es eine deutliche Heterogenität mit gefärbten und nicht gefärbten Zellen. In der Summe erschien das Signal daher insgesamt schwächer. Die Heterogenität der BMI-1-Expression könnte auf eine Heterogenität der Zellen hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades hinweisen. Wenn z.B. Medulloblastome einen größeren Anteil undifferenzierter Zellen erhalten, in denen *BMI-1* als erhöht exprimiertes Gen zur Selbsterneuerung von Stammzellen beiträgt, so scheinen im Prostatakarzinom entweder weniger undifferenzierte Zellen vorhanden zu sein, oder *BMI-1* stellt hier keinen entscheidenden Faktor dar.

Die Stöchiometrie der Polycomb-Komplexe ist entscheidend für ihre Funktion [Cao und Zhang, 2004]. Wie bei anderen Tumorarten, ergab auch die eigene immunhistochemische Analyse für EZH2 eine teilweise erhöhte Expression, die sich heterogen zwischen verschiedenen Tumorarealen darstellte (vgl. Abb. 3.5). Eine Verschiebung in der relativen Komposition des PRC2-Komplexes auf mRNA- und Proteinebene konnte also durch die eigenen Daten auch für das Prostatakarzinom bestätigt werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass in einigen Tumorarten eine erhöhte *EZH2*-Expression aus einer Erhöhung der Genkopienzahl resultieren könnte. Bracken et al. untersuchten eine breite Palette von Tumorarten auf eine Amplifikation des *EZH2*-Gens und fanden diese bei 15% der Tumoren. Die Erhöhung der Genkopienzahl korrelierte zudem mit der Expression auf Proteinebene [Bracken et al., 2003]. Die Genkopienzahl in Prostatakarzinomen wurde dabei nicht untersucht. Kürzlich wurden Amplifikationen auch für Prostatakarzinome beschrieben. Sie treten selten in Primärtumoren auf und häuften sich erst im Laufe der Progression [Saramäki et al., 2006]. Hiermit wurde erneut die Bedeutung von *EZH2* für aggressive Tumoren belegt. Die Assoziation mit einem aggressiven Phänotyp zeichnete sich auch in der vorliegenden Arbeit ab, obwohl nur Primärtumoren untersucht wurden.

Entsprechend dieser Einschätzung konnte eine tendenziell höhere *EZH2*-Expression auch in Tumoren mit höherem Ausmaß an DNA-Hypomethylierung, und damit in weiter fortgeschrittenen Tumoren, gezeigt werden (vgl. Abb. 3.31). Eine Korrelation mit Hypermethylierungskategorien ergab keine Auffälligkeiten. Dabei wurde der Methylierungsstatus einzelner Gene, die häufig im Prostatakarzinom hypermethyliert sind, kategoriell zusammengefasst. Um auch zu untersuchen, ob eines dieser häufig methylierten Gene als Zielgen unter dem Einfluss von EZH2 und BMI-1 steht, wurde jeweils die Polycomb-Genexpression mit dem Methylierungsstatus der einzelnen Gene korreliert. Dabei

stellte sich ein Zusammenhang zwischen der EZH2-Expression und der Methylierung des RARB2-Gens heraus ( $p=0,063$ ), sowie zwischen der BMI-1-Expression und der Methylierung des APC-Gens ( $p=0,024$ ; vgl. Tab. 3.1). Da es sich um Mehrfachvergleiche handelt, müssten die Signifikanzwerte mit einer entsprechenden Methode korrigiert werden (z.B. nach Bonferroni) und die Assoziationen sind daher mit Vorsicht zu betrachten. Obwohl die bereits beschriebenen Interaktionen zwischen DNA- und Chromatinmodifikationen (vgl. 1.1) einen Einfluss von PcG-Proteinen auf die DNA-Methylierung ermöglichen, besteht speziell im Prostatakarzinom offenbar kein direkter Zusammenhang mit vielen typischen Veränderungen. Bei der Behandlung von Urothel- und Prostatakarzinom-Zelllinien mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC konnte keine Induktion der Polycomb-Genexpression festgestellt werden. Dies macht eine Bedeutung der DNA-Methylierung für die Regulation der Polycomb-Gene unwahrscheinlich.

#### Die Histondeacetylase SIRT1

SIRT1 gehört zur Sir 2-Familie der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Histondeacetylasen. Damit ist dieses Protein in die epigenetische Abschaltung von Genen involviert. Pruitt et al. zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen hypermethylierten Tumorsuppressorgenen und *SIRT1*-Expression [Pruitt et al., 2006]. Eine Inhibition von *SIRT1* führte zur Reexpression dieser Gene trotz Hypermethylierung. Als Onkogen reprimiert *SIRT1* offenbar Tumorsuppressorgene, indem es einen inaktiven Chromatinstatus etabliert. Vaquero et al. schlugen ein Modell vor, in dem SIRT1 die Deacetylierung von H4K16 katalysiert und das Histon H1 zur Induktion eines repressiven Chromatinstatus rekrutiert. Daran schließt sich eine Deacetylierung des Histons H1 an und eine Reduktion der aktivierenden Methylierung von H3K79 an Promotoren von Zielgenen und innerhalb ihrer kodierenden Regionen [Vaquero et al., 2004]. Darüber hinaus wirkt SIRT1 als Onkogen, indem es mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 interagiert und deren Funktion durch Deacetylierung des Proteins limitiert. Auf diese Weise regelt *SIRT1* stress-induzierte Faktoren herunter, verhindert Apoptose und fördert das Überleben unter Stress-Bedingungen [Ford et al., 2005]. Im Laufe der Tumorprogression kann daraus eine Selektion neoplastischer Zellen resultieren [Pruitt et al., 2006].

*SIRT1* wurde in einigen epithelialen Tumorarten, z.B. beim Mammakarzinom [Kuzmichev et al., 2005], aber auch bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie als überexprimiert beschrieben [Bradbury et al., 2005]. Außerdem wurde eine hohe *Sirt1*-Expression während der Embryonalentwicklung bei Mäusen gefunden. Das höchste Expressionsniveau findet sich

bereits in frühen Stadien (E 4,5). Expression in Gehirn und Herz lassen eine Rolle bei Neuro- und Kardiogenese vermuten. Eine hohe Expression in Neurosphären aus murinen Gehirnen (E 14,5) weisen auf eine Rolle bei neuronalen Stammzellen hin [Hisahara et al., 2005].

Kuzmichev et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen SIRT1 und dem Polycomb-Protein EZH2 in einem Mausmodell des Prostatakarzioms [Kuzmichev et al., 2005]. In neuerer Zeit wird der ursprünglich als PRC2 bekannte EZH2-Komplex, je nach Komposition, auch unter den Bezeichnungen PRC3 und 4 geführt (vgl. Abb. 1.4). Mit wechselnder Zusammensetzung und Assoziation mit anderen Proteinen ändern sich Substratspezifitäten und funktionelle Eigenschaften von PRC2. Für SIRT1 wurde eine spezifische Assoziation mit dem als PRC4 geführten Komplex gezeigt. Darüber hinaus sind sowohl *EZH2* und *SIRT1* z.B. in Mammakarzinomen überexprimiert.

Die Analyse der *SIRT1*-Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit unternommen, um bereits oben diskutierte Hinweise auf einen Übergang vom PRC2- zum PRC4-Komplex im eigenen Probenkollektiv von Prostatakarzinomen zu festigen. Eine tendenzielle *SIRT1*-Überexpression in Prostata Tumoren konnte gezeigt werden ( $p=0,128$ ; vgl. Abb. 3.6). In Analogie zu *EZH2* zeigte sich auch ein Trend zu erhöhter Expression in höheren Tumorstadien ( $p=0,471$ ) und höherer Gleason-Summe ( $p=0,460$ ). Die Kurven der Überlebensanalyse zwischen hoher und niedriger Expression bei Patienten mit Rezidiv trennten sich deutlich ( $p=0,211$ ; vgl. Abb. 3.22), wenngleich hier eine höhere *SIRT1*-Expression einen Überlebensvorteil anzeigt. Auch wenn eine Regressionsanalyse zwischen *EZH2* und *SIRT1* einen Koeffizienten  $r$  von 0,240 ergab und damit einen schwächeren Zusammenhang angibt, implizieren die eigenen Daten auch für das Prostatakarzinom eine veränderte Zusammensetzung des PRC2-Komplexes. Vorversuche zum *EED*-Gen, dass auch zum PRC2 (PRC3/4)-Komplex gehört, zeigten ebenfalls Veränderungen in einzelnen Prostata- und Urothelkarzinom-Zelllinien (ohne Abb.). Obwohl hierbei nicht zwischen den verschiedenen Formen von *EED* (vgl. Abb. 1.4) unterschieden wurde, deuten diese Ergebnisse ebenfalls auf Variationen der Komplexzusammensetzung im Prostatakarzinom hin.

Ein Zusammenhang zwischen *SIRT1*-Expression und Methylierungsveränderungen konnte nicht festgestellt werden.

### Die DNA-Methyltransferase DNMT3B

Wie bei *EZH2* und *SIRT1* konnte in dieser Arbeit auch eine stark erhöhte *DNMT3B*-Expression in Prostatatumorgewebe nachgewiesen werden ( $p=0,002$ ; vgl. Abb. 3.7). Bezieht man die *DNMT3B*-Expression auf *CK18*-Expression, so wird der Expressionsunterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe kleiner. Dieses weist auf Expressionsunterschiede in Subpopulationen der epithelialen Zellen hin, die eine weitere Untersuchung der *DNMT3B*-Expression in Geweben mittels immunhistochemischer Analyse erforderlich macht.

Nachdem die Clusteranalyse auf einen Zusammenhang zwischen *EZH2* und *DNMT3B* hingedeutet hatte (vgl. Abb. 3.19), ergab sich bei der Regressionanalyse der Genexpressionen mit  $r=0,468$  eine deutliche Korrelation der beiden Gene und spricht damit für die von Taghavi und van Lohuizen [2006] postulierte Interaktion von *EZH2* und DNMTs. In der Überlebensanalyse für Patienten mit Rezidiven ergab sich für die beiden Gruppen mit niedriger bzw. hoher *DNMT3B*-Expression ein hoch signifikanter Unterschied ( $p=0,005$ ). Demnach hängt eine hohe *DNMT3B*-Expression offenbar mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zusammen an einem Rezidiv zu erkranken. Die Korrelation mit weiteren klinischen Parametern ergab einen leichten nicht signifikanten Aufwärtstrend in Tumoren mit höherem Tumorstadium ( $p=0,541$ ). Auf Grund dieser Ergebnisse sollte die Eignung der *DNMT3B* als Marker für fortschreitende Prostatakarzinome mittels immunhistochemischer Analyse weiter untersucht werden.

Die eigenen Befunde stimmen mit der Literatur insoweit überein, als eine deutlich erhöhte *DNMT3B*-Expression in vielen Tumoren gefunden wurde [Esteller, 2005 ; Esteller, 2006]. Bezeichnend gilt dies auch für die Untergruppe der Embryonalkarzinome unter den Keimzelltumoren [Skotheim et al., 2005], die einen hohen Anteil an undifferenzierten Stammzellen enthalten.

Beispiele aus der Literatur zeigen die Bedeutung einer ausgeglichenen Aktivität von DNA-Methyltransferasen für die Prävention von neoplastischen Transformationen. Die veränderte Expression der DNA-Methyltransferasen 3A und 3B wurde bereits als Ursache für Methylierungsveränderungen in Tumoren untersucht [Robertson et al., 1999]. Ein künstlicher Knock-Out der DNA-Methyltransferasen *Dnmt1* und *Dnmt3b* in Mäusen führt zu einer Demethylierung aller untersuchten hypermethylierten Tumorsuppressorgene [Esteller, 2006]. Ein Knock-Out der *Dnmt3b*, jedoch nicht der *Dnmt3a*, führt in murinen embryonalen Fibroblasten zu einem partiellen Verlust der genomweiten DNA-Methylierung, was darauf hindeutet, dass die *Dnmt3b*, neben der wichtigen Erhaltungs-Methyltransferase *Dnmt1*, zur Aufrechterhaltung der Methylierung generell benötigt wird [Dodge et al., 2005]. Ferner

neigen *Dnmt3b*-defiziente Mäuse zu An- und Polyploidien, sowie Chromosomenbrüchen. Auch ein direkter repressiver Einfluss von DNA-Methyltransferasen auf die Transkription von Genen, ohne Beteiligung ihrer Enzymaktivität [Bachmann et al., 2001]

Die embryonale Lethalität bei *Dnmt3b*-Knock-Out-Mäusen ab Tag 13,5 pc [Dodge et al., 2005] steht in Analogie zur frühen Expression der *DNMT3B* in humanen Oocyten während der Meiose 2 und embryonalen 2-4-Zellstadien. Die als besonders früh exprimiert geltende Transkriptionsvariante *DNMT3B1* ist in undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen zu finden [Huntriss et al., 2004]. Diese Fakten waren verantwortlich für die Auswahl der *DNMT3B* als Kandidatengen, auch vor dem Hintergrund der Tumorstammzell-Hypothese. Eine Überexpression in Prostatatumoren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Diese übt offenbar einen unmittelbaren Einfluss auf den Methylierungsstatus einzelner Genpromotoren aus. Somit korrelierte die Überexpression mit einem Großteil der auf Hypermethylierung untersuchten Gene (*GSTP1*  $p=0,064$ ; *APC*  $p=0,007$ ; *ASC*  $p=0,025$ ), sowie tendenziell mit der höchsten Methylierungskategorie 2 ( $p=0,259$ ; vgl. Abb. 3.31). Eine zunehmende *DNMT3B*-Expression in Tumoren mit starker Hypomethylierung (vgl. Abb. 3.31) steht eventuell im Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferationsrate in diesen Tumoren. Darüber hinaus ist eine höhere Expression von DNA-Methyltransferasen nicht ausnahmslos mit einer verstärkten Methylierung gleichzusetzen. Vielmehr wären diese Ergebnisse durch ein Modell zu erklären, dass von Robertson aufgestellt wurde [Robertson, 2002]. Dieses Modell stützt sich auf die Annahme, dass der Zellkern in unterschiedliche Areale aufgeteilt ist, die sich hinsichtlich ihres Chromatinzustandes und damit transkriptioneller Aktivität unterscheiden. Je nach Bedarf werden Gene in transkriptionell aktive oder inaktive Regionen geleitet. Überexprimierte *DNMT3B* könnte daher im Zellkern fehlgeleitet werden und statt zu Methylierung inaktiver repetitiver Sequenzen zur Hypermethylierung aktiver Gene beitragen.

Aus therapeutischer Sicht stellen Tumore mit hoher *DNMT3B*-Expression ein sinnvolles Ziel für eine Therapie mit dem Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin dar, nachdem bei Mäusen gezeigt werden konnte, dass der zytotoxische Effekt dieses Inhibitors durch die *Dnmt3b* vermittelt wird [Oka et al., 2005]. Bei Leukämien und dem myelodysplastischem Syndrom wird dieses Mittel inzwischen erfolgreich eingesetzt [Issa, 2005; Kantarjian et al., 2006].

### Das Pluripotenzgen *OCT4*

*OCT4* gilt als zentraler Faktor für die Pluripotenz von Stammzellen. Dabei ist eine genaue Regulation des Expressionsniveaus entscheidend für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (vgl. 1.3). Während eine verminderte Expression bei Mausembryonen zur Ausbildung des Trophoectoderms führt, resultiert eine Überexpression in der Differenzierung zu Endoderm und Mesoderm [Niwa et al., 2000]. Indem *OCT4* die Balance zwischen Selbsterneuerung und Proliferation gegenüber einer Differenzierung aufrechterhält, gilt es nach Feinberg et al. auch als ein Beispiel für Tumor-Progenitor-Kandidatengene, welche in Stamm- oder Vorläuferzellen zu aberranten epigenetischen Veränderungen beitragen und zum neoplastischen Phänotyp führen [Feinberg et al., 2006]. Unter physiologischen Bedingungen findet man bei Mäusen eine hohe *Oct4*-Expression zunächst in der Morula. Später ist die Expression auf die innere Zellmasse und die primordialen Keimzellen beschränkt, in somatischen Zellen geht sie verloren [Pesce und Scholer, 2001]. Entsprechend findet man im adulten Hoden nur Expression in den Typ A Spermato gonien. Die Suche nach *OCT4*-Bindestellen in entsprechenden Zielgenen ergab ein Netzwerk von Signalwegen, mit denen *OCT4* und *Nanog*, als weiterer wichtiger regulativer Stammzell-Faktor, interagieren. Ein Differenzierung von Stammzellen wird somit vermieden [Loh et al., 2006]. Boyer et al. konnten weiter eine Interaktion von *OCT4* und *Nanog* mit dem TGF- $\beta$ - und Wnt-Signalweg zeigen. Ihre Daten deuten auf einen autoregulatorischen Feedback-Mechanismus zwischen *OCT4*, *Nanog* und dem Transkriptionsfaktor *Sox2* hin [Boyer et al., 2005].

Eine Überexpression des *OCT4*-Gens in Tumoren wurde für verschiedene Tumorarten beschrieben, wird jedoch, auch auf Grund der Unsicherheiten der Nachweistechiken, kontrovers diskutiert. Monk und Holding zeigten zunächst mittels RT-PCR *OCT4*-Expression in humanen Tumor-Zelllinien von Mamma-, Pankreas- und Kolonkarzinomen [Monk und Holding, 2001]. Zudem stellten sie Expressionmuster von weiteren, nicht annotierten, frühen embryonalen Genen dar, und verglichen die Phänotypen von präimplantierten embryonalen Zellen mit dem Phänotypen von Tumorzellen. Ezech et al. fanden nach RT-PCR-Analysen, neben anderen Pluripotenzgenen, eine erhöhte *OCT4*-Expression in Seminomen und Mammakarzinomen und attestierten damit Mammakarzinomen ein Stammzell-Profil [Ezech et al., 2005]. Bemerkenswert an diesen Untersuchungen ist der Nachweis der Expression bei der Analyse von Gesamttumoren, ohne vorherige Anreicherung von Zellen nach ihrem Stammzell-Phänotyp. Einen Hinweis auf *OCT4* als Stammzellmarker fanden Tai et al. mittels RT-PCR-Analysen von adulten humanen Stammzellen aus der Mamma, dem Pankreas und Kolon [Tai et al., 2005]. Dabei ist die Charakterisierung dieser Stammzellen jedoch

zweifelhaft. Diesen Befunden stehen Loijenga et al. kritisch gegenüber. Sie führten Analysen zur OCT4-Expression in verschiedenen Tumorarten auf Proteinebene durch und konnten ausschließlich in distinkten Klassen von Keimzelltumoren eine Expression nachweisen. Hierzu gehörten das Carcinoma in situ, das als obligate Präläsion gilt, die undifferenzierte Seminom-Klasse und Embryonalkarzinom-Zellen in Embryonalkarzinomen und Teratokarzinomen [Loijenga et al., 2003]. Entsprechend postulierten sie OCT4 als prognostischen Marker für die Subgruppierung von Keimzelltumoren. Dieser Vorschlag wurde auch in anderen klinisch orientierten Publikationen aufgegriffen [Jones et al., 2004; Richie, 2005]. Eine Analyse von Teratokarzinom-Zelllinien ergab eine OCT4-Expression in der TERA-2-Linie vor einer durch Retinsäure-induzierten Differenzierung und durchgängig in der NCCIT-Linie. Beides wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (vgl. Abb. 3.8). Auch Gidekel et al. kamen zu dem Schluss, dass *OCT4*-Expression in Keimzelltumoren den Zellen pluripotentes Potential verleiht und die *OCT4*-Expression entscheidend für die Aufrechterhaltung des malignen unreifen Phänotyps ist [Gidekel et al., 2003]. Positive Ergebnisse in anderen Tumorarten führen Loijenga et al. auf PCR-Artefakte auf Grund der Existenz von Pseudogenen zurück. Suo et al. weisen auf sechs verschiedene Pseudogene hin, von denen sie zwei in Tumoren transkribiert fanden [Suo et al., 2005].

Die zum Anfang der eigenen Arbeit verwendeten Primer wurden so ausgewählt, dass alle bis dato bekannten Transkriptvarianten von *OCT4* erfasst wurden. Da Pseudogen-Expression als scheinbare Überexpression auffällt, ist die in dieser Arbeit gefundene Verminderung der Expression sehr wahrscheinlich kein Artefakt. So ergab die Analyse in Urothelkarzinom-Zelllinien eine größtenteils erniedrigte Expression im Vergleich zu kultivierten normalen Uroepithelzellen (UEC; vgl. Abb. 3.8). Prostatakarzinom-Zelllinien zeigten ein im Vergleich dazu leicht erhöhtes Niveau, das jedoch bis zu 250-fach niedriger lag als die Expression in Teratokarzinom-Zelllinien (vgl. Abgleich auf die Linie TERA-2). Ein ähnliches Bild ergab die Untersuchung von Gewebeproben, in denen das Niveau in Tumoren signifikant niedriger war als in angrenzenden normalen Arealen ( $p=0,044$ ; vgl. Abb. 3.9). Mit zunehmendem Tumorstadium und Gleason-Summe war im Gegensatz zu den bisher betrachteten Genen eher ein Abwärtstrend zu erkennen ( $p=0,294$ ;  $p=0,28$ ; vgl. Abb. 3.21). Die Überlebensanalyse ergab keinen auffallenden Unterschied. Das Dendrogramm der Clusteranalyse wies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen *OCT4* und *BMI-1* bzw. *CTCF* hin, der sich in der Regressionsanalyse durch Korrelationskoeffizienten-Werte von  $r=0,297$  bzw.  $r=0,252$  als schwach herausstellte und nicht für eine direkte Interaktion dieser Faktoren spricht.

Entsprechend seiner funktionellen Rolle wurde für *OCT4* nicht unbedingt ein Einfluss auf Methylierungsveränderungen erwartet. Trotzdem wurde ein Trend zur Korrelation zwischen *OCT4*-Expression und Methylierungszustand des *GSTP1*-Gens ( $p=0,091$ ) gefunden.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass das Pluripotenzgen *OCT4* weder als Tumormarker in Betracht kommt, noch scheint eine Reaktivierung des Gens in der Tumormasse durch DNA-Hypomethylierung stattzufinden. Wichtig wäre es allerdings auch Metastasen zu untersuchen (vgl. EZH2), die jedoch beim Prostatakarzinom nur selten zur Verfügung stehen, da sie nur selten operativ entfernt werden. Mit *OCT4* und *BMI-1* wurden in dieser Arbeit zwei Marker mit einem in Tumoren erniedrigten Expressionsniveau gefunden, die generell als stark implizierte Kandidaten für die Tumorstammzell-Hypothese gelten und bei anderen Tumorentitäten angeblich überexprimiert gefunden wurden. Daher ist weniger die richtige Auswahl der Kandidaten als die Richtigkeit des Modells zur Tumorstammzell-Hypothese im Prostatakarzinom fraglich. Sollten diese tatsächlich existent sein, muss es sich, im Einklang mit publizierten Versuchen zur Isolation dieser Population (vgl. 1.3), um einen extrem geringen Anteil in der Tumormasse handeln.

#### Das Cancer-Testis Antigen *CTCF*

Ähnliche Schlussfolgerungen lassen sich auch für *CTCF* ziehen. Das *CTCF*-Gen (auch als *BORIS* bekannt) wurde in die Klasse der *Cancer-Testis* Antigene (CTA), neuerdings auch *Cancer/Germline* Gene genannt, eingruppiert (vgl. 1.1.5). Ständig werden neue Vertreter dieser Genklasse identifiziert, die sich durch ein spezifisches Transkriptionsmuster auszeichnen. Ihre Transkription ist gewöhnlich auf Keimzellen beschränkt und wird aberrant in Tumorzellen gefunden. Zu den bekanntesten CTAs gehören die *MAGE*-Gene [Melanoma Antigen; Zendman et al., 2003], die ausführlich in Melanoma-Zelllinien analysiert wurden, und in Melanomen als Ziel für Immuntherapien verwendet werden. Auch zur Expression in anderen Tumorarten gibt es zahlreiche Studien. Typisch für *MAGE*-Gene ist eine heterogene Expression sowohl unter den verschiedenen Tumorarten, als auch innerhalb einzelner Tumore [Simpson et al., 2005]. Bereits früh konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von CTAs mit einer DNA-Hypomethylierung ihrer Promotoren gezeigt werden [De Smet et al., 1996]. Diese gilt daher als wichtiger, wenn auch nicht ausschließlicher, Regulationsmechanismus dieser Gene und gehört zur Definition der CTAs.

Darüber hinaus konnte für das *MAGE-A3*-Gen gezeigt werden, dass die intratumoröse Heterogenität mit dem Methylierungsstatus des Genpromotors in den einzelnen Zellen oder Arealen korreliert [Sigalotti et al., 2004]. Häufig kann eine CTA-Expression überhaupt nur in einem kleinen Anteil von Zellen innerhalb eines Tumors nachgewiesen werden. Unklar ist, ob

die Expression von CTAs in Tumoren mit dem Auftreten von pluripotenten Tumorstammzellen gleichzusetzen ist. Alternativ könnte eine unspezifische Aktivierung der Gene durch die in Tumoren stattfindenden „globalen“ epigenetischen Veränderungen verursacht werden. Simpson et al. haben neuerdings postuliert, dass die Aktivierung von CTAs als Folge einer Aktivität übergeordneter stammzellinduzierender Faktoren stattfindet [Simpson et al., 2005]. Diese sind noch nicht identifiziert, sollten aber einen direkten Einfluss auf die DNA-Methylierung haben.

Dem *CTCF*-Gen wurde auf Grund der Beobachtungen von Klenova et al. [2002] und Loukinov et al. [2002] eine bedeutende Rolle bei der Reprogrammierung der Methylierungsmarken während der Spermatogenese zugeschrieben (vgl. 1.1.5). Das Gen selbst wird nach diesen Berichten physiologisch nur in primären Spermatozyten exprimiert. Mit diesen Voraussetzungen stellt *CTCF* einen Kandidaten dar, der entsprechende Forderungen des Modells von Simpson, sowie den Vorgaben von Feinberg et al. [2006] für ein Tumorprogenitor-Gen mit direktem Einfluss auf die DNA-Methylierung, erfüllt. Da zudem eine Regulation des Gens selbst durch DNA-Methylierung wahrscheinlich ist, wurde das *CTCF*-Gen für die in dieser Arbeit zugrundeliegenden Tumorstammzell-Hypothese von einer Reexpression früher Gene durch DNA-Hypomethylierung (vgl. 1.3) als Kandidat ausgewählt.

Die Untersuchung der *CTCF*-Expression in Urothel- und Prostatakarzinom-Zelllinien wurde zunächst mittels qualitativer RT-PCR durchgeführt. Als Positivkontrollen für die Reaktion ergaben die Tumor- und Normalproben aus Hodengewebe die erwartete starke Bande (vgl. Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu zeigte keine der untersuchten Zelllinien eine *CTCF*-Expression, während der paraloge Faktor *CTCF* konstitutiv exprimiert war (vgl. Abb. 3.10). Da auch der Einfluss der DNA-Methylierung untersucht werden sollte, wurden die selben Proben auch nach Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC untersucht. Dieses führte zu einer massiven Expressionsinduktion von *CTCF*, deren Bandenstärke in vielen Zellen dem Hodenniveau gleich kam. Auch die Reproduktion mittels quantitativer RT-PCR ergab, nach Abgleich auf die TERA-2-Linie, keine bis niedrige *CTCF*-Expression in UEC-Proben und Urothelkarzinom-Zelllinien, variierende Muster in den Prostatakarzinom-Zelllinien, mit höchstem Niveau in der Zelllinie DU145, und deutlich stärkere Expression in Teratokarzinom-Zelllinien (vgl. Abb. 3.12). Eine bis zu 100-fache Induktion der Genexpression durch 5-aza-dC wurde ebenfalls bestätigt.

Die Untersuchung der Prostata-Gewebeproben ergab ein eher niedrigeres Expressionsniveau in Tumorproben ( $p=0,768$ ), das Boxplot-Diagramm verdeutlicht jedoch einige Ausreißer und

Extremwerte (vgl. Abb. 3.13). Die Expression im normalem Hoden war 180-fach höher im Vergleich zu normalem Prostatagewebe.

Auf Proteinebene konnten zwar im Western-Blot Expressionsunterschiede unter den Prostatakarzinom-Zelllinien und zu normalem Hodengewebe verifiziert werden, jedoch nicht für die Induktion durch den Methylierungsinhibitor. Auf Grund längerer Induktionsversuche und der Untersuchung der Proteinkinetik mittels Translationsinhibitor (vgl. Abb. 3.15) ist eine auffällig lange Halbwertszeit des CTCFL-Proteins als Ursache zu vermuten. Darüber hinaus kommt die Translationseffizienz als Erklärung für die auf Proteinebene gewonnenen Erkenntnisse in Betracht. Insbesondere für keimzellspezifische Transkripte sind spezielle Mechanismen beschrieben, die auf die Stabilität und Translation der mRNAs einwirken. So werden z. B. einige Transkripte, die wichtig für die spätere männliche Keimzellentwicklung sind, zunächst mit einem kurzen Poly-A-Schwanz versehen und verbleiben untranslatiert im Cytoplasma. Bei Bedarf erfolgt dann eine Aktivierung der Transkripte durch eine Extension des Poly-A-Schwanzes und die Translation [Elliot, 2003]. Ob diese Erklärung auf CTCFL zutrifft ist unsicher, da die Länge des Poly-A-Schwanzes unbekannt ist.

Da das *CTCFL*-Gen bis dato wenig untersucht ist, stehen für die in dieser Arbeit erzielten Resultate wenige Vergleichsmöglichkeiten zur *CTCFL*-Expression in anderen Tumorarten zu Verfügung. Es wurde zwar eine angebliche Überexpression des Gens in 50% von 200 untersuchten Zelllinien und in bis zu 80% einiger Primärtumore berichtet [Klenova et al., 2002, Loukinov et al., 2002], die angekündigten Originaldaten wurden jedoch nie der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt. Da keine anderen Expressionsstudien veröffentlicht wurden, waren diese vorangekündigten Ergebnisse Grundlage für die Eingruppierung des *CTCFL*-Gens in die Klasse der CTAs und für in Übersichtsartikeln postulierte Modelle, die aber nach wie vor weitere Bestätigung verlangen [Kalejs und Erenpreisa, 2005]. Entsprechend führt eine Übersicht über die Expression der CTAs in verschiedenen Tumoren keine Daten für *CTCFL* auf, da keine originalen Angaben zur Verfügung standen [Scanlan et al., 2004]. In dieser Übersicht werden nach eigener Analyse der Autoren, Angaben zum Expressionsniveau des *CTCFL*-Gens in normalem Hoden ( $>2,0$ ) und normalem Prostatagewebe (0,01) gemacht. Diese Werte stehen in sehr guter Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Arbeit bestimmten 180-fach höheren Expression in normalem Hodengewebe (s.o.). In dieser Hinsicht unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Zuordnung des Gens zu den CTAs. Darüber hinaus konnte auch für andere CTAs wie z.B. *MAGE A-1* und *NY-ESO1* in primären Prostatakarzinomen keine Expression nachgewiesen werden [Fossa et al., 2004; Nakada et al.,

2003; Hudolin et al., 2006], so dass eine niedrige Expression des CTAs *CTCFL* in Prostatakarzinomen nicht ungewöhnlich erscheint.

Eine kürzlich erschienene Publikation zur funktionellen Bedeutung von *CTCFL* enthält Expressionsdaten, die mittels qualitativer RT-PCR generiert wurden, allerdings keinen Vergleich zum Hodenniveau [Vatolin et al., 2005]. Dort werden Zelllinien aus Melanomen, Neuroblastomen, Mamma- und Prostatakarzinomen mit Expression dargestellt. Von den fünf dort veranschaulichten Prostatakarzinom-Zelllinien standen in der vorliegenden Arbeit drei nicht zur Verfügung, die übrigen beiden übereinstimmenden Linien sind auch in dieser Publikation negativ und bestätigen damit genau die eigenen Funde. Außerdem beschreiben Vatolin et al. *CTCFL*-Expression in Primärtumoren der Mamma, der Prostata und des Kolons, wobei die verwendeten Tumoren nicht näher charakterisiert sind. Eine zweite Publikation dieser Arbeitsgruppe beschreibt eine *CTCFL*-Expression nach quantitativer RT-PCR in Lungenkarzinom-Zelllinien. Davon erreicht jedoch nur eine das physiologische Hodenniveau, die übrigen liegen 100-fach niedriger, also nach den Daten der vorliegenden Arbeit im Bereich der Expression normaler somatischer Gene [Hong et al., 2005].

Die Validierung der eigenen Daten gelang mit Hilfe einer immunhistochemischen Analyse der *CTCFL*-Proteinexpression in Prostatageweben im Vergleich zu normalem Hodengewebe (vgl. Abb. 3.16.). Diese ergab eine starke Färbung in normalen Hodentubuli, wobei das Färbesignal in Spermatozyten, die in der Literatur als einziges positives *CTCFL*-Stadium beschrieben werden, nukleär lokalisiert war, und in Spermato gonien und Leydig-Zellen zytoplasmatisch. In normalen Prostata drüsen waren sowohl Basalzellen als auch sekretorische Zellen zytoplasmatisch bzw. membran-assoziiert gefärbt. In angrenzenden Tumorarealen erschienen die Signale diffuser und schwächer, mit zytoplasmatischer Protein-Lokalisation. Ein ähnliches Färbemuster mit zytoplasmatischer und nukleärer Lokalisation im Hodengewebe wurde auch von Loukinov et al. beschrieben [2002]. Bei einer Western-Blot-Analyse mit fraktionierten Hodenlysaten erhielten sie eine Proteinverteilung von 10-30% im Nukleus und dem übrigen Protein im Zytoplasma. Da sie trotzdem *CTCFL*-Protein an CTCF-DNA-Bindestellen nachweisen konnten, standen diese Funde für Loukinov et al. nicht im Kontrast zur postulierten Funktion als Chromatinfaktor.

In jedem Fall verlangt die heterogene Proteinlokalisierung in zwei verschiedenen Geweben einen funktionsabhängigen Transport innerhalb der Zelle. Es gibt einige Hinweise darauf, dass gerade bei der Keimzellentwicklung der Transport von Transkriptions- und Chromatinfaktoren zwischen Nukleus und Zytoplasma stark reguliert wird [Hogarth et al., 2005]. Beispiele für einen gezielten Wechsel der Lokalisation zwischen Zytoplasma und Kern

stellen Mitglieder der HDAC-Klasse II [Kim et al., 2006] und OCT4 dar. Pesce et al. konnten für OCT4-Protein eine vorwiegend nukleäre Lokalisation in primordialen Keimzellen, Gonozyten und Spermatogonien zeigen, die in weiter differenzierten Stadien in das Zytoplasma übergang und zunehmend schwächer wurde [Pesce et al., 1998].

Für CTCFL wurde bisher kein Transfermechanismus beschrieben. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Datenbank-Analyse ergab zumindest ein nukleäres Lokalisationssignal innerhalb der *CTCFL*-Sequenz, die einen Kerntransport über sog. Importine ermöglichen könnte [Hogarth et al., 2005]. Ließen sich die Beobachtungen zu OCT4 auf das CTCFL-Protein übertragen, wären die Ergebnisse im Hoden kongruent und die zytoplasmatische Färbung im Prostatagewebe passte zu dem niedrigen Expressionsniveau auf mRNA-Ebene und dem Differenzierungszustand des Großteils der Zellen.

Eine immunocytochemische Analyse der Prostatakarzinom-Zelllinien und der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT als Positivkontrolle konnte schwache Expressionsunterschiede unter den Zelllinien bestätigen. Mit Ausnahme von PC-3-Zellen, die eher eine submembranäre Fluoreszenz ergaben, wiesen alle anderen Zellen ein nukleäres punktförmig verteiltes Proteinsignal auf. In Analogie dazu erbrachte eine eigene fraktionierte Proteinpräparation aus Prostatakarzinom-Zelllinien mit anschließendem Western-Blot CTCFL-Banden vorwiegend in nukleären Fraktionen. Unterschiede zwischen den Resultaten der immunhistochemischen und cytologischen Untersuchung sowie der Western-Blot-Analyse beruhen vermutlich auf der Spezifität des Antikörpers je nach Zustand des Antigens. Während die Ergebnisse der cytologischen Untersuchung klar und spezifisch erscheinen, ist der Antikörper auf dem Proteinblot weniger spezifisch. Auch im Vergleich zur immunhistochemischen Analyse bindet der Antikörper bei den cytologischen Untersuchungen spezifischer. Die Nachweistechniken beruhen auf verschiedenen Verfahren zur Denaturierung der Proteine, welches die Unterschiede erklären könnte. Offensichtlich erfordert eine weitere Analyse der CTCFL-Expression und –Funktion einen noch besseren Antikörper.

Eine allgemeine Reaktivierung des Gens in der Tumormasse konnte nicht festgestellt werden. Die Zuteilung zur Gruppe der *Cancer-Testis* Antigene konnte in sofern bestätigt werden, als eine Expression im Hoden, nicht aber in Normalproben gezeigt werden konnte und Regulation durch Methylierung impliziert scheint (vgl. 4.2). Die Ergebnisse könnten durch einen sehr kleinen Anteil von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften oder ein tatsächlich völliges Fehlen einer Induktion in der verwendeten Probenkohorte erklärt werden. Allerdings konnte die heterogene und teilweise auf wenige Zellen beschränkte Expression von anderen CTAs in verschiedenen Studien mittels RT-PCR nachgewiesen werden und scheiterte

offenbar nicht an der Sensitivität der Methode. Würden von der untersuchten Gesamttumormasse etwa 1% der Zellen eine 100-fach erhöhte Expression zeigen, die dem physiologischem Niveau im Hoden gleichkommen würde, so sollte dieses etwa in einem zweifachen Anstieg der Expression in der Gesamtmasse resultieren. Ein Anstieg in diesem Ausmaß wurde nur in einzelnen Proben gefunden.

Die statistische Analyse ergab im Dendrogramm für die untersuchten Tumorproben einen Zusammenhang zwischen *CTCF* und *OCT4* ( $r=0,377$ ) bzw. *BMI-1* ( $r=0,252$ ). Wie für *OCT4* ergab sich ein leichter Trend zu weiter erniedrigter Expression in Tumoren höheren Stadiums ( $p=0,352$ ) und eine signifikante Erniedrigung in Tumoren mit höherer Gleason-Summe ( $p=0,022$ ). Unter den 13 Patienten mit Rezidiven befand sich nur ein Patient in der Gruppe mit niedriger *CTCF*-Expression. In der Gruppe der Ausreißer wurde bislang bei einem Patienten ein Rezidiv festgestellt. Dieses entspricht ungefähr der Quote von 13 Rezidiven bei 45 Patienten in der Gesamtgruppe. Als Tumormarker kommt diesem Gen demnach keine Bedeutung zu.

Basierend auf der von Loukinov et al. postulierten funktionellen Bedeutung für die Reprogrammierung von Methylierungsmarken, sollte ein Einfluss einer erhöhten *CTCF*-Expression auf Methylierungsveränderungen zu erwarten sein. Anhand der selben Annahme stellte Robertson erneut das Modell einer Verdrängung des CTCF-Proteins von seinen Bindestellen durch ein überexprimiertes *CTCF*-Protein auf. Während das CTCF-Protein einen Schutz vor übergreifender Methylierung und Heterochromatisierung bildet, soll eine Bindung durch *CTCF* zu Hypermethylierung führen [Robertson, 2005]. Außerdem sieht er in einem anschließenden Zusammenbruch der Barrieren zwischen unmethylierten und methylierten Regionen die mögliche Ursache für eine zunehmende Hypomethylierung.

Bei der in dieser Arbeit gefundenen niedrigen *CTCF*-Expression ist jedoch fraglich, ob entsprechende Effekte beobachtet werden können. So zeigen die statistischen Analysen zwischen Expression und Hyper- bzw. Hypomethylierung ein unschlüssiges Ergebnis mit vielen Ausreißern und Extremwerten (vgl. Abb. 3.31). Der einzelne Zusammenhang zur Methylierung des *GST-P1*-Gens ( $p= 0,041$ ) ist, nach mathematischer Korrektur von Mehrfachvergleichen nicht signifikant.

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aus der Expressionsanalyse von sechs Kandidatengenen, ergibt eine Überexpression in Prostatakarzinomen für die Gene *EZH2*, *SIRT1* und *DNMT3B*. Während *EZH2* in der Literatur zunehmend als Marker für metastasierte Prostatakarzinome diskutiert wird, sollte in Zukunft die prognostische Aussagekraft der *DNMT3B* weiter untersucht werden.

Für diese drei überexprimierten Gene konnten keine Anhaltspunkte für eine Beteiligung der DNA-Methylierung an ihrer Genregulation gefunden werden. Anders als die Gene *OCT4* und *CTCF*, entsprechen diese also nicht der Vorstellung einer Reexpression früher embryonaler Gene durch DNA-Hypomethylierung im Prostatakarzinom. Bei den Genen *OCT4* und *CTCF* ist eine Beteiligung der DNA-Methylierung wahrscheinlich und soll im nachfolgenden Kapitel diskutiert werden. Eine Reexpression dieser beiden Gene im Prostatakarzinom bei Betrachtung der gesamten Tumormasse konnte nur in Einzelfällen gezeigt werden. Die Aktivierung dieser Gene sollte in angereicherten Tumorzellen mit Stammzellphänotyp erneut untersucht werden.

#### 4.2 Methylierungsanalyse der Gene *OCT4* und *CTCF*

Im Verlauf der Embryonalentwicklung finden weitreichende Reprogrammierungen der Genexpression und damit zusammenhängende Veränderungen der DNA-Methylierung und der Chromatinstruktur statt (vgl. 1.1.1). Im Laufe der Karzinogenese werden häufig ähnliche Veränderungen gefunden. Die Parallele lässt sich fortsetzen zwischen multipotenten Zellen und Tumorstammzellen in der Aktivierung von embryonalen Genen und Faktoren, die eine epigenetische Reprogrammierung ermöglichen.

In diesem Zusammenhang wurde *OCT4* in der vorliegenden Arbeit nicht nur auf seine Expression sondern auch auf seine Regulation durch DNA-Methylierung im Prostatakarzinom untersucht.

Experimente an Mäusen machen eine Beteiligung der DNA-Methylierung bei der Abschaltung des *Oct4*-Gens im Zuge der Differenzierung embryonaler Zellen sehr wahrscheinlich. Bei fehlgeschlagenen Klonierungsversuchen von Mäusen wurde eine fehlerhafte *OCT4*-Expression auf Grund mangelhafter epigenetischer Reprogrammierung als eine Ursache vorgeschlagen [Boiani et al., 2002; Bortvin et al., 2003]. Tatsächlich blieb *Oct4* im Zuge von *de-novo*-Methylierungen länger unmodifiziert als andere, gewebespezifische Gene [Gidekel und Bergmann, 2002]. Hierfür machten die Autoren in *cis* ein sog. Demodifikationselement im proximalen *Enhancer* verantwortlich. Ob dieses Element Schutz vor Methylierung bietet oder zu einer aktiven Demethylierung führt, konnte nicht geklärt werden. Darüber hinaus postulierten sie weitere in *trans* agierende Faktoren, die durch ihre Bindung einen Methylierungsschutz verleihen, jedoch im Laufe der Embryonalentwicklung verloren gehen oder durch andere Faktoren ausgetauscht werden. Hattori et al. fanden ein stärkeres Ausmaß an DNA-Methylierung des *Oct4*-Gens in differenzierten Zellen als in embryonalen Stammzellen und versuchten die fehlende Genexpression in murinen Trophoectoderm-Zellen

durch Behandlung mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC und dem Deacetylierungsinhibitor TSA zu induzieren. Während bei diesen Zellen die Einzelkomponenten jeweils erfolgreich waren, wurde für die Zelllinie NIH3T3 die Kombination aus beiden benötigt [Hattori et al., 2004]. Diese Resultate führten sie zu der Annahme eines entwicklungsstadien- und zelltypspezifischen Regulationsmechanismus, der u.a. auf einer Verknüpfung von DNA-Methylierung und Chromatinremodellierung beruht.

Auf Grund seiner erniedrigten Expression in Prostatatumor-Gewebeproben scheidet das *OCT4*-Gen vermutlich für die Determinierung hypothetischer Tumorstammzellen aus. Dennoch sollte die Regulation des Gens weiter untersucht werden, da dessen DNA-Methylierungsstatus nur in einer einzigen humanen Zelllinie berichtet war und ein Sequenzvergleich des *OCT4*-Gens zwischen Mensch, Maus und Rind wichtige Unterschiede aufgedeckt hatte. Die Protein-Sequenz ist zwischen Maus und Mensch zu 87% konserviert, die Sequenzen scheinen stärker konserviert zwischen Mensch und Rind [Nordhoff et al., 2001]. Das Gen weist zwei verschiedene *Enhancer*-Elemente auf. Während der distale *Enhancer* auf die entscheidende Expression im präimplantierten Embryo und in den primordialen Keimzellen einwirkt, aktiviert der proximale *Enhancer* die Expression im Epiblasten. Es werden vier sog. konservierte Regionen (CR) beschrieben, die in engem Zusammenhang mit anderen regulatorischen Einflüssen stehen. Eine wichtige Rolle spielt die am weitesten vom Transkriptionsstart entfernte CR4, die das entscheidende distale *Enhancer*-Element beherbergt. Diese Region ist zwischen Mensch und Maus nicht konserviert. Die Sequenzübereinstimmung liegt bei nur 55%. Nordhoff et al zeigten ferner, dass z.B. SP-Transkriptionsfaktoren, die vor allem in den konservierten Regionen binden, nach einer Induktion der Differenzierung mit Retinsäure nicht mehr gebunden waren. Vermutungen zur regulatorischen Beteiligung von nukleären Hormon-Rezeptoren an der Regulation während der frühen Embryonalentwicklung - ein entsprechendes responsives Element wurde beschrieben - konnten widerlegt werden, da diese erst deutlich nach der Herunterregulation des *Oct4*-Gens selbst zur Expression gelangten.

Bei eigenen Versuchen zur Expressionsinduktion durch den Methylierungsinhibitor 5-aza-dC in Zelllinien konnte in Einzelfällen, vor allem aber bei drei von vier Prostatakarzinom-Zelllinien eine Erhöhung des Niveaus erreicht werden (vgl. Abb. 3.8). In Teratokarzinom-Zelllinien, die ohnehin ein höheres Basalniveau haben, war die Substanz ineffektiv. Versuche, die Induktion durch Behandlung mit dem Deacetylierungsinhibitor SAHA zu verstärken, waren ineffektiv (vgl. Abb. 3.24), obwohl die Effektivität der eingesetzten Konzentrationen durch Induktion des *CDKN1A/p21<sup>CIP</sup>*-Gens nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 3.25).

Diese eigenen Befunde stehen scheinbar im Widerspruch zu der von Hattori et al. postulierten Kombination aus DNA-Methylierung und Chromatinmodifikationen, unterstreichen aber die Bedeutung der vielfach erwähnten zusätzlich regulatorischen Faktoren, neben der DNA-Methylierung. Weitere Beispiele aus der Literatur zeigen auch, dass sich embryonale Gene anders verhalten als *Cancer-Testis* Antigene und dass die DNA-Methylierung bei beiden Gen-Gruppen einen unterschiedlichen Stellenwert hat. Koslowski et al. fanden bei ihren Untersuchungen zu Aktivierungen von embryonalen Genen und *Cancer-Testis* Antigenen in Tumoren, 80% der betrachteten *Cancer-Testis* Antigene durch 5-aza-dC induzierbar, jedoch nur 18% der betrachteten embryonalen Gene [Koslowski et al., 2004]. Außerdem zeigten sie, dass den DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3B eine größere Bedeutung bei der Repression der *Cancer-Testis* Antigene zukommt, als bei den embryonalen Genen, die zur Aktivierung weiterer spezifischer Transkriptionsfaktoren bedürfen.

Die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Regulation des *OCT4*-Gens sollte mittels Bisulfidsequenzierung des Promotorbereiches genauer aufgeklärt werden. Die unter 3.2.1 dargestellte Analyse des *OCT4*-Promotors auf DNA-Hypermethylierung verwendete eines der von Deb-Rinker et al. veröffentlichten Primerpaare [Deb-Rinker et al., 2005]. In ihrer Arbeit zeigten die Autoren, dass die untersuchte Region in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstart liegt und nach Behandlung der Teratokarzinom-Zelllinie NT2 mit Retinsäure starke Methylierungsveränderungen durchläuft. Die Untersuchung der NT2-Linie stellte die erste in humanen Zelllinien dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit diesen Primern weitere humane Zelllinien und Gewebe untersucht. Die Analyse erbrachte vollständig methylierte Allele in Negativ-Kontrollen aus männlichem Blut und Spermien. In Analogie zur *OCT4*-Expression in Typ A Spermatogonien als einziges positives Stadium im adulten Hoden, war der Methylierungszustand in normalem Hodengewebe heterogen, vermutlich auf Grund der zellulären Heterogenität. Die Allele der stark exprimierenden Teratokarzinom-Zelllinien waren komplett unmethyliert. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl normale Prostata-Gewebeproben als auch Prostatakarzinom-Zelllinien ein etwas heterogenes, aber im Ganzen stark methyliertes Muster. Eine Behandlung mit 5-aza-dC führte stellenweise zu Methylierungsverlusten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine nahezu vollständige Demethylierung für ein normales Expressionsniveau nötig wäre. Ähnliches fanden Yamazaki et al., die im Rahmen von Klonierungsversuchen zeigten, dass *Oct4* extensiv demethyliert werden müsste, um zu erfolgreichen Klonierungen ohne Entwicklungsdefekte zu gelangen [Yamazaki et al., 2006]. Sie fanden in klonierten 4-Zellstadien eine residuale *Oct4*-Methylierung von 40%, d.h. weniger starke Methylierung als in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien mit und ohne 5-

aza-dC-Behandlung. Diese residuale Methylierung führte jedoch weiterhin zu einer Repression. Ferner beobachteten Deb-Rinker et al. bei ihren Differenzierungsexperimenten der humanen NT2-Linie eine zeitliche Verzögerung zwischen Abschaltung der Expression und Zunahme der Promotorhypermethylierung, die sie ebenfalls eine Verbindung von Chromatinmodifikationen, z.B. Histondeacetylierung und DNA-Methylierung postulieren ließ. Die DNA-Methylierung wirkt hierbei als endgültiger Mechanismus der Transkriptionsrepression, die bei *OCT4* nicht reversibel ist.

Neuesten Erkenntnissen zur *OCT4*-Regulation von Feldmann et al. zufolge, aber ohne Berücksichtigung möglicher Unterschiede zwischen Mensch und Maus, müsste *OCT4* durch Behandlung mit Deacetylierungsinhibitoren und durch Inhibition von Histonmethyltransferasen induzierbar sein [Feldmann et al., 2006]. Die Autoren führten Chromatin-Immunopräzipitationen an murinen embryonalen Zellen durch, die sie durch Retinsäure zur Differenzierung gebracht hatten um die Geschehnisse am *Oct4*-Promoter in ausdifferenzierenden Zellen nachvollziehen zu können. Auf Grund ihrer Resultate postulierten sie ein Modell für die Abfolge der Ereignisse bei der Inaktivierung der *OCT4*-Transkription [Feldmann et al., 2006]. Dieses beginnt mit einer transienten Bindung von Repressoren, die vermutlich die Bindung der H3K9-spezifischen Histonmethyltransferase G9a herbeiführen. Diese rekrutiert Histondeacetylasen, die zu einer Deacetylierung von H3K9, H3K14 und H3K4 führen und eine anschließende Methylierung dieser Lysinreste durch G9a und/oder andere Histonmethyltransferasen ermöglicht. Hier wäre eine Beteiligung der auch in dieser Arbeit untersuchten Histonmethyltransferase EZH2 denkbar, da diese zum einen häufig selbst im Komplex mit HDAC1 und HDAC2 vorliegt [Kamminga et al., 2006]. Zum anderen finden Feldmann et al. zusätzlich eine zunehmende Di- und Tri-Methylierung am H3K27, wie sie durch EZH2 vermittelt wird. Die Methylierung von H3K27 wird durch eine Bindung des Heterochromatin-Proteins HP1 begleitet und endet schließlich in einer höher organisierten repressiven Chromatinstruktur. Eine statistische Regressionanalyse der eigenen Daten ergab für *EZH2* und *OCT4* einen Korrelationswert von  $r = 0,435$ . Offenbar gibt es tatsächlich Interaktionen zwischen beiden.

Ein weiterer interessanter Punkt zu den zuvor diskutierten Inhibitor-Experimenten wurde kürzlich von Mc Garvey et al. publiziert [McGarvey et al., 2006]. Diese Autoren untersuchten Methylierungs- und Chromatinstatus von hypermethylierten Tumorsuppressorgenen, die sie durch Behandlung von Zelllinien mit 5-aza-dC reinduziert hatten. Dabei fanden sie heraus, dass die Transkription zwar in vielen Fällen aktiviert werden konnte, die Umgebung der Promotoren jedoch immer noch heterochromatische Eigenschaften beibehielt. So tauschten die Promotoren zwar Dimethylierungen am H3K9 gegen Acetylierungen aus und gewannen

aktivierende Dimethylierungen an H3K4, sie behielten jedoch auch repressive Histonmodifikationen wie Trimethylierungen an H3K9 und charakteristische repressive Methylierungen an H3K27. Diese Befunde sind wichtig für Therapiekonzepte bei Leukämien und dem Myelodysplastischem Syndrom, bei denen Methylierungsinhibitoren zum Einsatz kommen. Auftretende Remethylierungen nach Therapiepausen können auf diese Befunde zurückgeführt werden. In Analogie hierzu präsentierte J.P. Issa Daten zu Therapiestudien bei Leukämien, bei denen längere, wiederholte Therapiezyklen mit niedrigen Wirkstoffkonzentrationen zu den besten Therapierefolgen führten [4th Heinrich Beer Symposium Cancer and Stem Cells Heidelberg, März 2006].

Die Methylierungsanalyse von *OCT4* und *CTCF* ergab sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede. Während *OCT4* durch den Methylierungsinhibitor 5-aza-dC nur in Einzelfällen induziert werden konnte, hatte die starke Induktion von *CTCF* in allen Zelllinien einen deutlichen Hinweis auf die Beteiligung der DNA-Methylierung an der Genregulation erbracht. Versuche die Induktion durch Behandlung der Zellen mit dem Deacetylierungsinhibitor SAHA zu verstärken, waren, wie bei *OCT4*, ineffektiv (vgl. Abb. 3.23). Auch bei Hong et al. [2005] erbrachte die Behandlung mit einem Deacetylierungsinhibitor einer anderen Stoffklasse, dem Depsipeptid FK228 (DP), keine stärkere Induktion von *CTCF* in Lungenkarzinom-Zelllinien. Bei einer Kombination von 5-aza-dC und DP wurden jedoch die höchsten Expressionswerte gemessen. Solche Unterschiede sind vermutlich auf die spezifische Reaktivität verschiedener Zelllinien auf Inhibitoren unterschiedlicher Stoffklassen zurückzuführen [Kim und Robertson, 2006]. Die Ergebnisse von Hong et al. würden auf eine, auch für *OCT4* postulierte, Verknüpfung von DNA-Methylierung und Chromatinmodifikationen, wie z.B. Histondeacetylierungen, bei der Transkriptionsregulation des *CTCF*-Gens hindeuten.

Zur näheren Aufklärung sollte in dieser Arbeit der Methylierungszustand des Genpromotors in verschiedenen Proben mittels Bisulfitsequenzierung sichtbar gemacht werden (vgl. Abb. 3.27). Hier ergaben sich bei *CTCF* einige auffallende Unterschiede zum Methylierungsmuster des *OCT4*-Gens in verschiedenen Zelltypen (vgl. Tab. 4.1). Während die Negativkontrollen aus männlichem Blut vollständig methylierte Allele zeigten, ergaben drei unterschiedliche Spermienproben vollständig unmethylierte Allele. Dem niedrigen Expressionsniveau entsprechend zeigten verschiedene Zelllinien und Prostatagewebe eine starke Promotormethylierung. Diese war in Hodenproben deutlich aufgelockert, ein Unterschied zwischen Tumor- und Normal-Geweben jedoch nicht ersichtlich. Überraschend konsistente Methylierung war bei den Teratokarzinom-Zelllinien zu finden, obwohl diese

stärker *CTCF* exprimieren. 5-aza-dC-behandelte Proben zeigten entsprechend partielle, aber deutliche Demethylierungen, besonders im 5'-Bereich der untersuchten Sequenz, die dem Basalpromotor entspricht. Diese Ergebnisse weisen auf eine schrittweise Regulation durch Methylierung hin. Während eine eingeschränkte Transkription auch bei partieller Demethylierung möglich ist, benötigt eine drastische Erhöhung eine entsprechende Hypomethylierung. Ein ähnliches Stufenmodell fanden auch Hong et al. [2005] in Lungenkarzinom-Zelllinien. Auch hier waren Allele positiver Zellen heterogen methyliert. Noch stärkere Methylierungen waren in nicht exprimierenden Zelllinien und Normalproben zu finden, wobei sich das Muster bei beiden unterschied. Eine Behandlung mit 5-aza-dC resultierte in nur partieller Demethylierung, hatte aber bereits eine 40-fache Induktion zur Folge. Eine festere Fixierung des inaktiven Zustands in normalen Zellen konnte auch in der vorliegenden Arbeit mittels qualitativer RT-PCR-Analyse von Zelllinien und normalen uroepithelialen (UEC) nach 5-aza-dC-Behandlung gezeigt werden (vgl. Abb. 3.11).

Die bei der Analyse von *OCT4* und *CTCF* festgestellten Unterschiede sind in der nachfolgenden Tabelle 4.1 noch einmal zur Übersicht dargestellt:

Tab. 4.1: Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Genen *OCT4* und *CTCF* hinsichtlich ihrer Expression und ihres Methylierungsstatus in verschiedenen Geweben und Zelllinien

OCT4	CTCF
Expression-- Hoden: hoch Teratokarzinom-Linien: hoch Prostatagewebe: schwach	Expression-- Hoden: hoch Teratokarzinom-Linien: schwach Prostatagewebe: schwach
Effekte Inhibitoren -- der DNA-Methylierung: keine bis schwach der Deacetylierung: keine	Effekte Inhibitoren -- der DNA-Methylierung: stark der Deacetylierung: keine bis schwach
DNA-Methylierung-- männl. Blut: stark Spermien: stark Hoden: schwach, heterogen Teratokarzinom-Linien: keine Prostatatumore: stärker, heterogen	DNA-Methylierung-- männl. Blut: stark Spermien: keine Hoden: stärker, heterogen Teratokarzinom-Linien: stark Prostatatumore: stärker, heterogen
nahezu vollständige Demethylierung für Aktivierung des Gens notwendig	geringe und partielle Demethylierung ausreichend für Aktivierung des Gens
DNA-Methylierung als endgültiger irreversibler Mechanismus	DNA-Methylierung reversibel, Induktion möglich
weitere regulatorische, stadienspezifische Faktoren sind offensichtlich von großer Bedeutung	regulatorischer Effekt der Methylierung durch Inhibition der Bindung spezifischer Faktoren vermutet
Einfluss der Methylierung auf die Bindung anderer Faktoren im Modell gezeigt	beteiligte Faktoren nicht bekannt

### Promotorstudie

Der regulatorische Einfluss der DNA-Methylierung sollte durch Analysen zur Methylierungssensitivität des *CTCF*-Promotors weiter untersucht werden. Hierfür wurde ein selbst kloniertes Promotor-Konstrukt *in vitro* methyliert und in verschiedene Zelllinien transfiziert. Parallel wurde ein Konstrukt mit dem Retrotransposon-*LI.2B*-Promotor in die Zellen transfiziert. Hierbei handelt es sich um einen Promotor mit starker Aktivität. Durch den Vergleich der Promotoraktivität des *CTCF*-Gens mit der des *LI.2B*-Promotors lässt sich für *CTCF* eine moderat starke Promotoraktivität ablesen.

Durch *in vitro*-Methylierung des *CTCF*-Konstrukts wurde die Promotoraktivität deutlich beeinflusst, wobei sich je nach Enzym Abstufungen ergeben. Die Methylierung aller inneren Cytosine in der viermal vorkommenden Sequenz CCGG durch die *HpaII*-Methylase (vgl. Abb. 3.28) führte zu einer Reduktion der Promotoraktivität. Die Methylierung mit der *SssI*-Methylase, welche alle CpG-Stellen methyliert, führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der Promotoraktivität. Hieraus ergeben sich zunächst zwei Aspekte. Zum einen stehen die die Effekte der *HpaII*-Methylierung in Analogie zu den Ergebnissen der Expressionsanalyse und Bisulfidsequenzierung. Diese hatten für *CTCF* gezeigt, dass schon partielle Demethylierung zur Expression des Gens führt. Umgekehrt zeigt auch die Methylierung an einigen Stellen mit der *HpaII*-Methylase, dass eine residuale Promotoraktivität erhalten bleibt. Ferner hatte sich bei den o.g. Analysen ein Stufenmodell für die Regulation des *CTCF*-Gens durch Methylierung ergeben. Dieses wird durch den Verlust der Promotoraktivität bei Methylierung aller CpG-Stellen mit der *SssI*-Methylase bestätigt.

Zur Kontrolle der *in vitro*-Methylierung wurde auch das Konstrukt mit dem *LI.2B*-Promotor methyliert. Für diesen war bereits bei früheren Untersuchungen eine methylierungsabhängige Repression gezeigt worden. Diese wird durch Methylgruppen-bindende Proteine und mit ihnen assoziierten Repressorkomplexen vermittelt, also durch einen unspezifischen Mechanismus. Bei den früheren Untersuchungen waren Teratokarzinom-Zelllinien nicht betrachtet worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche Repression der *LI.2B*-Aktivität in der Prostata- und der Urothelkarzinom-Zelllinie, jedoch keine Repression in den beiden Teratokarzinom-Zelllinien. Dieser Effekt müsste in separaten Studien untersucht werden und deutet auf eine Defizienz dieser Linien hinsichtlich der Methylgruppen-bindenden Proteine oder ihrer assoziierten Repressoren hin. Da die Repression des *CTCF*-Promotors in den Teratokarzinom-Zelllinien jedoch erfolgreich war, lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Repression nicht über diese Faktoren vermittelt wird. Am wahrscheinlichsten wirkt die Methylierung also durch Hemmung der

Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren. Über Studien zur Bindung von Transkriptionsfaktoren am *CTCF*-Promotor wurde bisher nicht berichtet.

### 4.3 Funktionelle Untersuchung des *CTCF*-Gens

#### siRNA-Transfektion

Da bis vor kurzem wenige Details über die funktionelle Bedeutung des *CTCF*-Gens bekannt waren, sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Die Annahme einer proliferationssteigernden Funktion sollte durch Inhibition des Gens durch siRNA-Transfektion und Proliferationstests geprüft werden. Die Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT hatte zuvor das höchste Expressionsniveau gezeigt, das trotz einiger offensichtlicher *off-target*-Effekte wiederholt mit nicht validierten, kommerziellen siRNAs um bis zu 60% gesenkt werden konnte (vgl. Abb. 3.32). Eine Reduktion der Proliferationsrate konnte nicht reproduziert werden, obwohl die Inhibition erfolgreich war. Diese Befunde könnten durch die bereits diskutierte Stabilität des *CTCF*-Proteins erklärt werden, die eine funktionelle Durchsetzung der mRNA-Destabilisierung beschränkt. Eine Western-Blot-Analyse bestätigte die Stabilität, die Proteinexpression war trotz siRNA-Inhibition nicht reduziert (vgl. Abb. 3.33). Hierbei sind die bereits oben diskutierten Einschränkungen hinsichtlich der Spezifität des Antikörpers zu beachten (vgl. 4.1).

#### Transfektionsversuche mit einem *CTCF*-Expressionskonstrukt

Die umgekehrte Strategie wurde mit der Transfektion eines *CTCF*-Expressionskonstrukts in Zelllinien mit niedriger Gen-Expression verfolgt. Die Fluoreszenz des erfolgreich transfizierten Konstrukts erlaubte einen ausschließlichen Nachweis des Fusionsproteins im Nukleus. Der transfizierte leere Vektor führte zu Fluoreszenzen in Nukleus und Zytoplasma (vgl. Abb. 3.34). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Resultaten immuncytochemischer Färbungen (vgl. Abb. 3.17) und der Western Blot-Analyse mit fraktionierten Proteinlysaten (vgl. Abb. 3.18), die eine nukleäre Lokalisation des Proteins ergeben hatten und bestätigen die Spezifität des *CTCF*-Antikörpers in der immuncytochemischen Analyse.

Eine vollständige Selektion der mit dem Expressionkonstrukt positiv transfizierten Zellen, war auf Grund zytotoxischer Effekte nicht möglich. Diese Effekte waren nicht bei Zellen zu

beobachten, die mit dem Leer-Vektor transfiziert wurden. Eine vorläufige Expressionsbestimmung von *CTCF* in unvollständig selektionierten Zellen hatte bereits eine 250-fache Erhöhung ergeben, die als Ursache für die beobachtete Zytotoxizität gelten könnte. Eine parallel durchgeführte Sequenzierung zur Kontrolle des kommerziellen Konstruktes hatte im ORF drei Basenpaarmutationen ergeben, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch führen. Da das Unternehmen das korrigierte Konstrukt über mehrere Monate nicht zur Verfügung stellen konnte, bleibt zunächst offen, ob die Zytotoxizität auf einer Veränderung der funktionellen Eigenschaften durch die Mutationen beruht, oder auf eine zu starke Überexpression des *CTCF*-Proteins zurückzuführen ist.

Auch die Interpretation einer mit dem Konstrukt durchgeführten Induktions-Analyse bleibt offen. Auf Grund zweier Arbeiten aus der Literatur wurde die Induktion anderer *Cancer-Testis* Antigene wie *NY-ESO-1* und *MAGE-A1* durch Überexpression des *CTCF*-Gens in Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Obwohl die 250-fache Überexpression des *CTCF*-Gens festgestellt wurde, konnte keine erhöhte Expression der Gene *NY-ESO-1* und *MAGE-A1* in transfizierten Prostatakarzinom-Zellen gezeigt werden. Mit dem korrigierten Konstrukt könnte geklärt werden, ob die von Vatolin et al. und Hong et al. beschriebenen Beobachtungen nicht für Prostatakarzinom-Zelllinien gelten, oder ob die Funktionalität des *CTCF*-Proteins durch die drei Basenpaarmutationen eingeschränkt ist.

Vatolin et al. [2005] und Hong et al. [2005] hatten in ihren kürzlich publizierten Studien eine Induktion der *Cancer-Testis* Antigene *NY-ESO-1* und *MAGE-A1* durch Überexpression des *CTCF*-Gens in dermalen Fibroblasten und Lungenkarzinom-Zelllinien zeigen können. Die Aktivierung der Transkription ähnelte den Effekten der Induktion mit Hilfe des Methylierungsinhibitors 5-aza-dC. Der Nachweis der Aktivität des *MAGE-A1*-Gens erfolgte mittels qualitativer RT-PCR mit teilweise heterogenen Produktbanden. Auch eine vermeintliche *OCT4*-Induktion wurde dargestellt. Die Intensität des Hodenniveaus wurde nur in seltenen Fällen überschritten.

Bei weiteren Experimenten dieser Arbeitsgruppen stellte sich heraus, dass die bekannte Identität von DNA-Bindestellen für CTCF und *CTCF* sich auch auf den *MAGE-A1*-Promotor bezieht. Die regulative Funktion in *Imprinting*-Domänen übt CTCF durch eine methylierungsabhängige Bindung aus. Am *MAGE-A1*-Promoter fanden Vatolin et al. eine methylierungsunabhängige Bindung. Zusammen mit der Beobachtung einer zeitlichen Verzögerung von ein bis zwei Tagen zwischen *CTCF*- und *MAGE-A1*-Expression nach 5-aza-dC-Behandlung führte dieses zu dem Postulat einer direkten Vermittlung von epigenetischen Veränderungen am *MAGE-A1*-Promotor durch *CTCF* und dem Ausschluss einer Reaktivierung von CTAs durch genomweite Methylierungsveränderungen. Für einen

weiteren Beweis dieses Modell bedürfte es unbedingt weiterer Untersuchungen *in vivo*, u.a. durch den Nachweis einer *CTCF*-Überexpression in verschiedenen, gut charakterisierten Primärtumoren und korrelierenden Überexpressionen von CTAs. Bei einzelnen hormonrefraktären, metastasierten Prostatakarzinomen ist zwar eine Überexpression von *NY-ESO-1* gezeigt worden [Fossa et al., 2004; Nakada et al., 2003], Untersuchungen zu *CTCF* fehlen jedoch. Solange steht diese Hypothese im Widerspruch zu verschiedenen Expressionsstudien von CTAs unter physiologischen Bedingungen. Diese ergaben, dass z.B. *MAGE-A1* und *NY-ESO-1* während der Spermatogenese in früheren Stadien als *CTCF* exprimiert werden und mit Einsetzen einer *CTCF*-Transkription schwächer exprimiert werden [Zendman et al., 2003; Kalejs und Erenpreisa, 2005]. Ähnliches gilt für *OCT4*. Diese Abfolge interpretierten Zendman et al. als Hinweis darauf, dass *CTCF*-Expression in Karzinomen vermutlich Aberrationen von methylierungskontrollierten Tumor-assoziierten Genen induzieren kann, aber auf Grund seines späteren Expressionszeitpunktes im Verlauf der Spermatogenese als Masterinduktor von CTAs unwahrscheinlich ist.

#### Untersuchungen zur Kolokalisation von CTCFL, CTCF und der RNA-Polymerase II

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit zu CTCFL als Chromatin-oder Transkriptionsfaktor wurden mit Hilfe immuncytochemischer Färbungen und Auswertungen am konfokalen Mikroskop durchgeführt. Doppelfärbungen gegen CTCFL und CTCF bzw. CTCFL und RNA-Polymerase II (RNAPII) zeigten unterschiedliche, aber stets nukleäre Färbemuster (vgl.

Abb. 3.35, Abb. 3.36). Während die Signale der Proteine CTCFL und CTCF in der Aufsicht einer Zelle punktförmig über den Zellkern verteilt waren, lagen die Signale der RNAPII netzartig eher im Inneren des Zellkerns. Die hochauflösende Betrachtung verschiedener Dünnschnitte durch den Zellkern (vgl. Abb. 3.37) sowie eine dreidimensionale Simulation (ohne Abb.) ergab auch eine unterschiedliche Verteilung von CTCFL- und CTCF-Färbungen. Während das CTCFL-Protein in nahezu allen Schichten des Kerns zu finden war, lag das CTCF-Protein eher in inneren Schichten des Zellkerns verteilt. Dieses Muster deutet auf unterschiedliche Funktionen von CTCFL und dem Chromatinfaktor CTCF hin, für das kürzlich eine Funktion als Organisator von Chromatinstrukturen beschrieben wurde. Diese Chromatinstrukturen sollen aktive Gene in entsprechende Areale im Zentrum des Zellkerns dirigieren, damit diese Zugang zu Regionen erhöhter transkriptioneller Aktivität erlangen [Ling et al., 2006].

Die Unterteilung des Zellkerns in verschiedene Areale durch eine übergeordnete Chromatinstruktur ist allgemein anerkannt. Demnach unterscheiden sich Regionen durch genreiche und genarme Abschnitte, transkriptionell aktive und reprimierte Zonen und eine frühe oder späte Replikation [Zinner et al., 2006]. Aktive Areale befinden sich in zentraleren Regionen, inaktive Areale im Randbereich des Zellkerns. In der Studie von Zinner et al. konnte gezeigt werden, dass diese verschiedenen Regionen durch unterschiedliche posttranslationale Chromatinmodifikationen in Form von Methylierungen an Lysinresten markiert und vermittelt werden. Wie bereits oben beschrieben (vgl. 1.1.3) korrelieren spezifische Lysinmethylierungen an Histonschwänzen mit aktivem bzw. inaktivem Chromatin. Die Färbemuster einiger unterschiedlich modifizierter Lysinreste ähneln den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Das Färbemuster des dreifach methylierten H3K4 (tri-H3K4) ähnelt dem in dieser Arbeit festgestellten netzartigen Muster der RNAPII, die bekanntlich komplexiert in transkriptionell hoch aktiven Regionen vorliegt. Tri-H3K4 gilt als Marker für aktives Euchromatin und zeigt die stärkste Kolo-kalisation mit naszierender RNA. Die Proteine CTCFL und CTCF liegen punktförmig über den Zellkern verteilt und ähneln damit Färbungen von mono-H3K9, einem Marker für transkriptionell inaktive Domänen innerhalb euchromatischer Bereiche [Zinner et al., 2006]. Diese Färbemuster unterscheiden sich deutlich von denen, die heterochromatische Abschnitte markieren. Somit deuten diese Vergleiche für das CTCFL-Protein eher auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor und nicht als Chromatinfaktor hin. Diese Annahme wird unterstützt durch die in der vorliegenden Arbeit festgestellte stärkere Kolo-kalisation von CTCFL und RNAPII. Für CTCFL und CTCF konnte kaum Kolo-kalisation beobachtet werden (vgl. 3.3.3). Dieses zeigt eine Assoziation des CTCFL-Proteins mit spezifischen transkriptionell aktiven Bereichen an, während für CTCF eine breitere Beteiligung an der Chromatinorganisation möglich erscheint. Das Ausmaß der Kolo-kalisation konnte durch den Methylierungsinhibitor 5-aza-dC bei beiden Doppelfärbungen erhöht werden (vgl. Tab. 3.4, Tab. 3.5). Diese Ergebnisse lassen zunächst auf eine Induktion der CTCFL-Proteinexpression schliessen, die auf mRNA-Ebene festgestellt wurde, aber in der Western Blot-Analyse, vermutlich auf Grund der Antikörperspezifität, nicht bestätigt werden konnte. Dieses führt auch zu einer Zunahme der Kolo-kalisation von CTCFL und CTCF. Diese Beobachtungen wären dadurch zu erklären, dass eine größere Menge CTCFL-Protein und weitere durch 5-aza-dC vermittelte Methylierungsveränderungen zu einer Konkurrenz von CTCFL und CTCF um Bindungsstellen führt. Damit stellen diese Resultate einen experimentellen Beweis der von Robertson aufgestellten Hypothese [Robertson, 2005] zur Bedeutung von CTCFL und seiner Konkurrenz mit CTCF (vgl. 4.1). Abweichend von der Hypothese nach Robertson scheint

diese Konkurrenz, jedenfalls in somatischen Zellen, auf spezifische Abschnitte beschränkt zu sein und kann damit nicht für genomweite Methylierungsveränderungen verantwortlich sein.

#### 4.4 Tumorstammzellen im Prostatakarzinom

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung von Markergenen, die Tumorzellen einen stammzellähnlichen Phänotyp verleihen könnten. Da die Untersuchung von Gewebeproben und Zelllinien für drei potentielle Tumorstammzell-Marker keine auffällige Reaktivierung ergeben hatte, wurde in dieser Arbeit auch eine Anreicherung mutmaßlicher Tumorstammzellen unternommen. Hierdurch sollte geklärt werden, ob diese Zellen mit den gängigen Verfahren auch beim Prostatakarzinom zu isolieren sind und in welcher Weise die in dieser Arbeit erzielten Resultate mit der Theorie der Tumorstammzellen in soliden Tumoren übereinstimmen.

Eine allgemeine Reaktivierung hypothesenorientiert ausgewählter Kandidatengene in der gesamten Tumormasse konnte in der untersuchten Prostatatumor-Kohorte dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der berichtete Anteil von Tumorstammzellen in verschiedenen Geweben und Zelllinien ist mit 0,01% - 2% sehr klein. Wenn die Aktivierung solcher Gene auf die Tumorstammzellen beschränkt sein sollte, könnte der Nachweis einer Reaktivierung der Markergene bei Betrachtung der gesamten Tumormasse schwierig sein. Zur Isolation von Tumorzellen mit stammzellähnlichem Phänotyp werden zwei gängige Verfahren verwendet, . zum einen die Färbung von Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 mit anschließender FACS-Analyse, zum anderen die Isolation mittels eines Antikörpers gegen das Oberflächenantigen CD133.

In dieser Arbeit wurde für die Anreicherung die Prostatakarzinom-Zelllinie 22Rv1 eingesetzt. Diese Zelllinie wurde zunächst auf Grund ihres Expressionsprofils hinsichtlich der Kandidatengene und ihrer Herkunft (vgl. 2.1.1) ausgewählt. Bei dem Versuch der Anreicherung einer *Side Population* (vgl. 2.23, 3.4) unter Verwendung des Hoechst 33342-Farbstoffs stellte sich heraus, dass nur ca. 0,01% der 22Rv1-Zellen ungefärbt waren und eine Festsetzung der Auswahlgrenzen für diese kleine *Side Population* entsprechend erschwerte. Auch die Analyse einer Teratkarzinom-Zelllinie, die mit einem größeren Anteil SP-Zellen beschrieben worden war [Hirschmann Jax et al.,2004], brachte keine Erleichterung. Ein Literaturvergleich zeigte, dass auch bei anderen Versuchen zur Anreicherung mittels FACS-Gerät keine getrennten Populationen nachgewiesen werden konnten und die Auswahl der Grenzen nahezu willkürlich erscheint [Bhatt et al., 2003; Seigel et al., 2005]. In einigen

Studien wurde Verapamil, ein Inhibitor der ABC-Transporter, verwendet, um die Lokalisation der SP-Zellen anzuzeigen. Wie auch in den selbst durchgeführten Analysen, war dieses Verfahren nicht immer aussagekräftig genug, um eine klare Unterscheidung zwischen SP-Zellen und anderen Zellen zu treffen (ohne Abb.). Da auch Maitland und Collins in einem vorläufigen Bericht nur 0,01% Tumorstammzellen aus 50 Prostatakarzinom-Biopsien isolieren konnten, scheint der eigene Befund real niedrig [Maitland und Collins, 2005].

Bei einer Wiederholung der eigenen Isolationsversuche mittels FACS-Sortierung wurden die Auswahlgrenzen weniger stringent gewählt, da eine Anreicherung der Zellen trotz Kontamination gewöhnlicher differenzierter Tumorzellen, eine Validierung der Kandidaten erlauben würde und die Präparation hochwertiger RNA erleichtern sollte. Entsprechend konnte in einer quantitativen RT-PCR-Analyse durch einen Vergleich mit den übrigen Zellen der Sortierung (Non-SP) und mit nicht sortierten 22Rv1-Zellen für die Gene *BMI-1*, *EZH2*, *DNMT3B* und *OCT4* eine höhere relative Expression in SP-Zellen gezeigt werden (vgl. Abb. 3.43). Für *DNMT3B* erreichte diese eine statistische Signifikanz. Da es sich hier jedoch um eine bis zu 30-fache Anreicherung mutmaßlicher Tumorstammzellen handeln sollte, blieb der Anstieg der Expression deutlich unter den Erwartungen. Hieraus ergeben sich drei Möglichkeiten zur Erklärung.

Erstens, in dieser Arbeit wurden Zellen isoliert, die nicht der *Side Population* entsprechen. Auf Grund der Versuchsanordnung und den Berichten anderer Arbeitsgruppen ist dieses unwahrscheinlich. Rizzo et al. beschrieben kürzlich die Isolation von 1% SP-Zellen aus der Zelllinie 22Rv1 [Rizzo et al., 2005]. Eine Isolation von SP-Zellen aus dieser Zelllinie scheint also generell möglich zu sein.

Zweitens könnten die Befunde darauf hindeuten, dass die Zellen der *Side Population* nicht den gesuchten Tumorstammzellen des Prostatakarzinoms entsprechen. Dieses würde erklären, warum Maitland und Collins nach ihrem vorläufigen Bericht zur Isolation von *Side Population*-Zellen [Maitland und Collins, 2005] das Verfahren gewechselt haben und in einer späteren Originalarbeit die Isolation von mutmaßlichen Tumorstammzellen mittels CD133-Antikörper berichten [Collins et al., 2005]. Eine generelle Übereinstimmung zwischen der Population der SP-Zellen und der Population über CD133-isolierter Zellen scheint es nicht zu geben. In Neuroblastom-SP-Zellen wurden nur eine niedrige *CD133*-Expression gefunden [Hirschmann-Jax et al., 2004].

Die ansonsten erhobenen Daten (vgl. 4.1) deuten auf eine dritte Erklärung hin, die eine stark erhöhte Expression der untersuchten bedeutenden Faktoren in Zellen der *Side Population* ausschließt und damit Rückschlüsse auf das diskutierte Modell zu Tumorstammzellen in soliden Tumoren ermöglicht (vgl. Abb. 4.1).

Wie auch Collins et al. beide Methoden zur Anreicherung von Tumorstammzellen verfolgten, wurde auch in der vorliegenden Arbeit parallel der zweite gängige Ansatz verfolgt. Hierfür sollte die Existenz CD133-positiver Zellen in den verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien zunächst durch ein *Screening* am FACS-Gerät untersucht werden. Auch hier ergaben sich auf Grund der geringen Anzahl positiver, fluoreszierender 22Rv1-Zellen Schwierigkeiten bei der Einstellung der Parameter, so dass nach Abzug von Hintergrundfluoreszenzen keine abgegrenzten Populationen markierter und unmarkierter Zellen erkennbar waren (vgl. Abb. 3.44). Bei zukünftigen Analysen könnte durch eine Positivkontrolle und Erhöhung der zu analysierenden Zellzahl hinsichtlich der Anzahl CD133-positiver Zellen in Prostatakarzinom-Linien weiterer Aufschluss gewonnen werden. Als Positivkontrolle eignen sich jedoch einzig CD34-positive hämatopoetische Zellen, die nicht ohne weiteres zur Verfügung stehen.

Collins et al. [2005] beschrieben in ihrer späteren Publikation zum Prostatakarzinom immer noch die Anreicherung nur eines kleinen Anteils von Tumorzellen mit Stammzell-Phänotyp mittels CD133 (0,1% - 0,3%). Sie verwendeten für ihre zweite Analyse Prostatatumorgewebe von 40 Patienten unterschiedlicher Gleason-Summen, sowie metastatische Stadien. In jedem untersuchten Tumor konnten mutmaßliche Stammzellen gefunden werden. Auch für diese Zellen konnte Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential, sowie Invasivität und Überleben in der Suspensionskultur nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den bereits früher isolierten CD133-positiven Zellen (1%) aus normalem Prostatagewebe [Richardson et al., 2004], zeigten die aus Tumoren isolierten Zellen ein größeres Proliferationspotential. Immunhistochemische Analysen wiesen einen basalen Phänotyp mit Expressionen von CK5, CK14 und CK19 aus. Eine Färbung gegen CK18 ergab nur in einer Minderheit von Proben schwache Signale.

Eine zwischenzeitliche Analyse der *CD133*-Genexpression mittels quantitativer RT-PCR in der vorliegenden Arbeit ergab im Einklang mit dem FACS-Ergebnis ein niedriges Expressionsniveau bei verschiedenen Zelllinien (vgl. Abb. 3.45). Dabei muss berücksichtigt werden, dass zwischen der mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien und der Proteinexpression des Oberflächenantigens Unterschiede bestehen können. Für die Analysen der vorliegenden Arbeit wurde die 22Rv1-Zelllinie auf Grund ihrer Herkunft (vgl. 2.1.1) und der Expressionsmuster der verschiedenen Kandidatengene ausgewählt. Obwohl diese Zellen in der mRNA-Analyse durch die niedrigste *CD133*-Expression auffallen (vgl. Abb. 3.45), konnten sie dennoch nicht ungeeignet sein, da Rizzo et al. [2005] angeblich 1% *Side Population*-Zellen dieser Linie identifizieren konnten und Hirschmann-Jax et al. [2004] aus

Neuroblastomen SP-Zellen isolieren konnten, obwohl diese eine niedrige *CD133*-Expression aufwiesen (s.o.).

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Experimente zusammen mit der Expression der Kandidatengene in Urothelkarzinom- und Prostatakarzinom-Zelllinien, sowie in Prostata Tumorgewebe, stellt sich heraus, dass speziell für das Prostatakarzinom mit seinen charakteristischen epigenetischen Aberrationen keine allgemeine Reaktivierung von stark für Selbsterneuerung und Pluripotenz implizierten Genen in sämtlichen Tumorzellen nachgewiesen werden kann. Die Isolation von Tumorzellen mit Stammzell-Phänotyp ergibt extrem kleine Populationen. In diesen Zellen konnte keine aberrant erhöhte Expression von Genen wie *BMI-1* und *OCT4* gefunden werden, die z.B. auf eine deregulierte Selbsterneuerung schließen lassen würde. Auf Grund dieser erhobenen Daten kann das Modell zur Existenz von Tumorstammzellen in Prostata Tumoren präzisiert werden und ist nachfolgend dargestellt (vgl. Abb. 4.1)

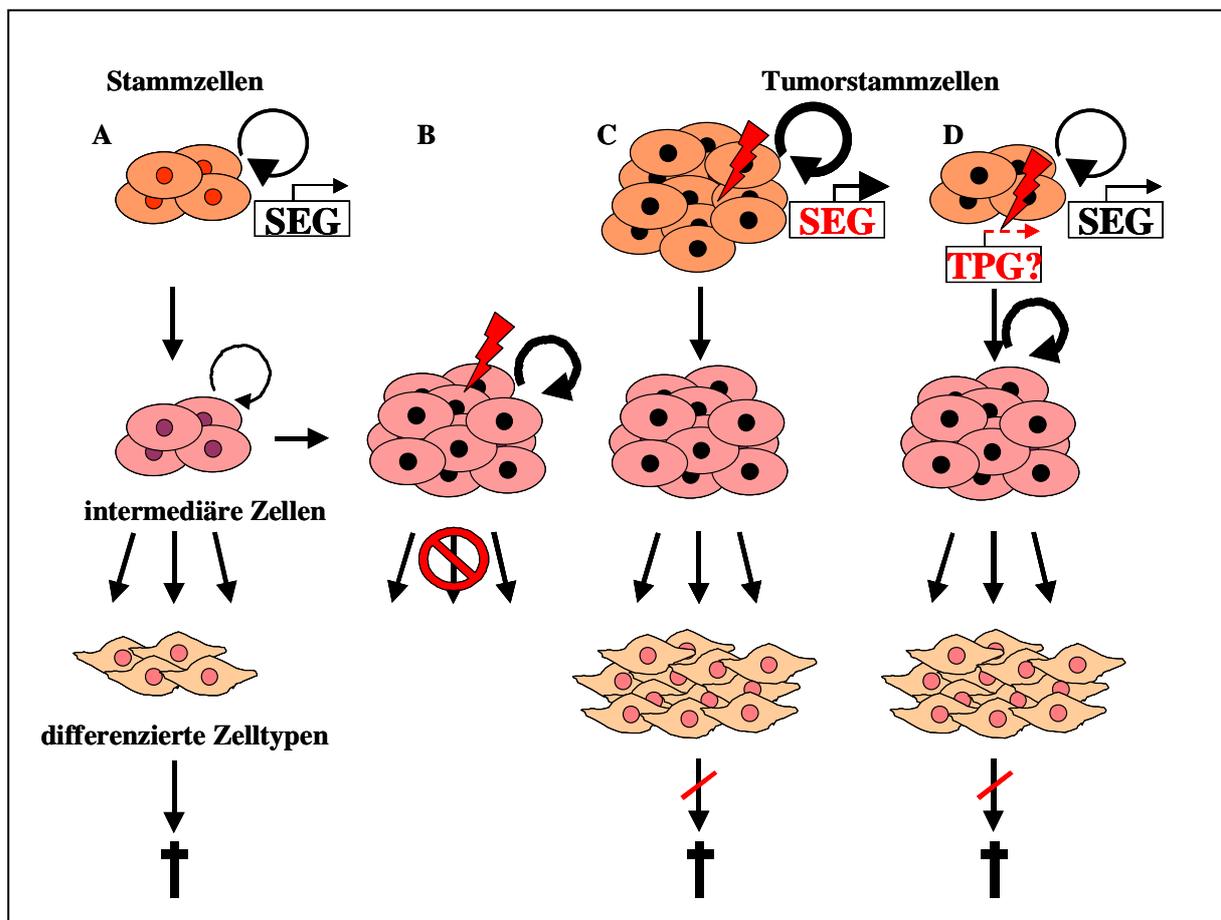


Abb. 4.1: Darstellung verschiedener diskutierter Modelle zur Stammzellhypothese in soliden Tumoren. SEG: Selbsterneuerungs-Gen, TPG: Tumor-Progenitor-Gen. Orange gefärbte Zellen stellen Stammzellen dar, rosa gefärbte Zellen sind intermediär und beige gefärbte Zellen sind ausdifferenziert. Schwarze Zellkerne weisen auf transformierte Zellen hin. Modell A stellt den Zustand in einem normalen Gewebe dar. Modell B beschreibt das herkömmliche Tumorigenese-Modell ohne Tumorstammzellen. In C ist das allgemein in der Literatur postulierte Modell zu Tumorstammzellen dargestellt. Nach den erhobenen dieser Arbeit ist eine Anpassung des Modell an die Verhältnisse im Prostatakarzinom in D veranschaulicht. Genauere Ausführungen s. Text.

Unter physiologischen Bedingungen sieht das derzeit diskutierte Stammzell-Modell in der normalen Prostata (A) eine kleine Population mit etwa 1% Gewebestammzellen vor [Richardson et al., 2004]. Im Rahmen der Selbsterneuerung durch asymmetrische Zellteilung generieren sie intermediäre Zellen, die noch Proliferationspotential besitzen und zu den verschiedenen Zelltypen der Prostata ausdifferenzieren können. Nach Seneszenz oder Apoptose werden diese ständig ersetzt.

Für die Tumorigenese herrschte vor der Entdeckung von Tumorstammzellen ein Modell vor, das auf einer Transformation der proliferierenden intermediären Zellen beruht (B), die zu verstärkter Proliferation und aberrant differenzierten Zellen führt.

Unter der Annahme von Tumorstammzellen wurde häufig das dritte Modell (C) diskutiert. Hierbei sorgen Deregulationen u.a. von Genen für die Selbsterneuerung zu einer entsprechenden Überexpression und damit zu einer verstärkten Proliferation der sonst eher ruhenden Stammzellen. Diese Proliferation würde jedoch eine größer werdende Population von Stammzellen und nachfolgend auch von intermediären Zellen implizieren. Dadurch müsste die Isolation von Tumorstammzellen einfacher und effektiver werden. Darüber hinaus ließe sich vermutlich eine Reaktivierung der für die Selbsterneuerung (SEG) entscheidenden Gene, auf Grund des größeren Anteils von Stammzellen in der Tumormasse, direkt in aufgearbeitetem makroskopischen Tumormaterial bestimmen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet, die erzielten Resultate sprechen deutlich dagegen.

Die Befunde von marginalen Tumorstammzell-Populationen von 0,01%-0,3% und die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von Kandidatengenen an Zelllinien, Tumorproben und isolierten Zellen sind mit einer zweiten, neuen Variante des Tumorstammzell-Modells (D) vereinbar. Auch hier sind Tumorstammzellen der Ausgangspunkt. Transformationen führen jedoch nicht zu einer Vergrößerung der Tumorstammzell-Population selbst, sondern nur der intermediären Zellen, die einen größeren Teil der Tumormasse ausmachen, weiter ausdifferenzieren und die zu beobachtende Heterogenität des Tumors vermitteln. Damit wäre das Expressionsniveau von SEGs in SP-Zellen dieser Arbeit eher eine normale Stammzeleigenschaft als pathologisch. Zu diesem Modell passen auch die von Feinberg et al. [2006] neu postulierten Tumor-Progenitor-Gene (TPG), die unter normalen Umständen die Stammzeleigenschaften durch Regulation von Pluripotenz und Selbsterneuerung vermitteln sollen.

Laut Feinberg et al. könnten epigenetische Aberrationen dieser TPGs zu einer Expansion der Vorläuferzellen (intermediäre Zellen) führen und zu ihrer malignen Entartung beitragen, indem sie das Gleichgewicht zwischen ihrem limitierten replikativen Potential und Neigung zur Differenzierung in Richtung Selbsterneuerung und Pluripotenz verschieben. Obwohl diese

Tumor-Progenitor-Gene noch nicht identifiziert sind, kämen einige der in dieser Arbeit untersuchten Kandidaten in Frage. Für Feinberg et al. würden sich gute Kandidaten durch ihren direkten Einfluss auf Veränderungen der DNA-Methylierung auszeichnen. In ihrer kürzlich veröffentlichten Publikation hierzu werden sogar *OCT4* und *EZH2* als konkrete Kandidaten aufgezählt. Außerdem weisen die Autoren darauf hin, dass auch unter den aberrant abgeschalteten Genen Kandidaten zu suchen sind. So käme z.B. das *APC*-Gen in Betracht, das zum Wnt-Signalweg gehört und bei *Drosophila* eine Rolle bei der asymmetrischen Zellteilung spielt. Dort reguliert es die Orientierung des Spindelapparates senkrecht zur Stammzellnische, so dass eine der Tochterzellen die Nische verlässt und mit der Differenzierung beginnt. Eine aberrant niedrige Expression könnte also dazu beitragen, dass Stammzellen die Grenzen der Nischen überschreiten. Im Prostatakarzinom ist das *APC*-Gen tatsächlich häufig von Hypermethylierung betroffen und gehörte daher zur Gruppe der Gene, die für Korrelationen zwischen Methylierungsveränderungen und Expression der untersuchten Kandidatengene herangezogen wurde. Hinweise auf eine generelle Aktivierung des Wnt-Signalweges in Prostatakarzinomen sind jedoch rar. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Aktivität des Hedgehog-Signalwegs (vgl. 1.3) und einiger zugehöriger Faktoren im Prostatakarzinom gezeigt [Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004], die vor dem Hintergrund der Tumorstammzell-Hypothese zu interpretieren wäre.

Nach Auswertung der erhobenen Daten und der Beobachtungen in der Literatur ist festzustellen, dass eine Isolierung von mutmaßlichen Tumorzellen mit anschließender Demonstration ihrer tumorigenen Eigenschaften nicht ausreichend ist. Weiterführende Analysen zur genauen Charakterisierung und Definition der isolierten Zellpopulationen werden unbedingt benötigt. Neben der gezielten Untersuchung von einzelnen ausgewählten Markern, wie in dieser Arbeit durchgeführt, sind breiter angelegte Expressionsanalysen z.B. in Form von Microarrays notwendig. Obwohl einigen Arbeitsgruppen bereits früher die Isolation von Tumorstammzellen gelang, gibt es bis dato keine Berichte über umfassende Untersuchungen von Genexpressionen. Expressionsprofil-Analysen der isolierten Tumorstammzellen im Vergleich zu anderen Zellpopulationen, wie z.B. intermediären Zellen und Zellen aus Metastasen, aber auch Stammzellen aus normalen Geweben, werden durch Entschlüsselung ihres Markerprofils zur genauen Einordnung der Zellen beitragen. Damit sollte sich klären lassen, welche Faktoren für den Stammzellcharakter verantwortlich sind und ob diese durch die Transformation verändert werden. Weiterhin lassen sich Unterschiede in den verschiedenen Tumorarten aufdecken. Hierdurch sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob die in anderen Tumoren implizierten Kandidaten, die teilweise in dieser Arbeit

---

untersucht wurden, auch im Prostatakarzinom entscheidend sind, oder ob andere im Vordergrund stehen. Die Charakterisierung des Methylierungsstatus der unterschiedlichen Fraktionen könnte zusätzlich Aufschluss über die hierarchischen Beziehungen bringen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Epigenetische Veränderungen spielen eine zentrale Rolle in der Tumorigenese. Diese basieren auf einer Vielzahl von Interaktionen beteiligter Mechanismen und Faktoren. Aus solchen Veränderungen ergeben sich Parallelen zwischen somatischen Tumorzellen und embryonalen Stammzellen. Diese Beobachtungen führten zu der allgemeinen Hypothese einer Reaktivierung von epigenetischen Regulatoren in Tumoren. Diese Reaktivierung kann durch Veränderungen der DNA-Methylierungen vermittelt sein und Faktoren betreffen, die z.B. für Pluripotenz und Selbsterneuerung entscheidend sind und somit Tumorzellen einen Stammzell-ähnlichen Phänotyp verleihen können.

Da aberrante DNA-Methylierungsmuster eine zentrale molekulare Veränderung im Prostatakarzinom darstellen, wurde die allgemeine Hypothese speziell am Beispiel dieser Tumorart verfolgt. Als Kandidaten wurden die Polycomb-Gene *EZH2* und *BMI-1*, die Histondeacetylase *SIRT1*, die DNA-Methyltransferase *DNMT3B*, das *Cancer-Testis* Antigen *CTCF* und das Pluripotenzgen *OCT4* untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sollten Rückschlüsse auf das Modell der Tumorstammzellen in soliden Tumoren am Beispiel des Prostatakarzinoms erlauben. Ferner könnten sich Hinweise auf mögliche Mechanismen der Methylierungsveränderungen und Markergene für das Prostatakarzinom ergeben.

Bei der Untersuchung von Zelllinien und der Gesamttumormasse primärer, lokalisierter Prostatatumore ergab sich für die Gene *EZH2*, *SIRT1* und *DNMT3B* eine erhöhte Expression im Vergleich zu Normalproben. Die Expressionanalysen deuten auf eine Verschiebung der Komposition des Polycomb-Komplexes PRC2 im Prostatakarzinom hin, obwohl die relative Zusammensetzung des Komplexes entscheidend für seine Substratspezifität und Funktionalität ist. Es ergaben sich Zusammenhänge für *EZH2* mit Tumorstadium und -grad. Die statistische Signifikanz für die *DNMT3B* setzte sich auch in der Überlebensanalyse und bei Zusammenhängen mit Methylierungsveränderungen der Tumorproben fort. Eine Eignung als prognostischer Marker sollte zukünftig weiter verfolgt werden.

Für die Gene *OCT4* und *CTCF* wurde bei Tumoren eine erniedrigte Expression festgestellt, für das *BMI-1*-Gen mit starker statistischer Signifikanz. Induktionsversuche mit den Inhibitoren der DNA-Methylierung (5-aza-dC) und der Histondeacetylierung (SAHA), ergaben eine bis zu 100-fach stärkere Expression des *CTCF*-Gens nach Behandlung von Zellen mit 5-aza-dC. Untersuchungen zum regulatorischen Einfluss der DNA-Methylierung auf die Gene *OCT4* und *CTCF* in unterschiedlichen humanen Geweben wurden bis dato nicht berichtet. In dieser Arbeit wurde für das *CTCF*-Gen eine stufenweise Regulation des moderat starken Promotors durch DNA-Methylierung festgestellt. Im Gegensatz dazu bewirkt sie bei *OCT4*

eine irreversible Festigung der Inaktivierung, die zuvor durch stadienspezifische Faktoren induziert wurde.

Funktionelle Analysen des wenig untersuchten CTCFL-Proteins zeigten zum einen eine auffallende Stabilität, die vermutlich durch keimzellspezifische Mechanismen reguliert wird, zum anderen eine vorwiegend nukleäre Lokalisation. Zusammen mit hoch auflösenden Untersuchungen zur Kolo­kalisierung von CTCFL, dem paralogen Faktor CTCF und der RNA-Polymerase II am konfokalen Mikroskop deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine funktionelle Bedeutung des CTCFL-Proteins als Transkriptionsfaktor hin.

Eine allgemeine Reaktivierung von epigenetischen Regulatoren beim Prostatakarzinom konnte nicht festgestellt werden. Da das in der Literatur diskutierte Tumorstammzell-Modell Stammzellen mit deregulierter Selbsterneuerung als Ausgangspunkt der Tumorigenese vorsieht, wurden stark implizierte Faktoren wie z.B. BMI-1 und OCT4 erneut untersucht. Für diese Gene war zuvor eine erniedrigte Expression bei der Untersuchung der Gesamt­tumormasse lokalisierter Tumoren gezeigt worden. Jedoch konnte auch nach einer Anreicherung von Zellen mit Stammzell-Phänotyp aus einer Tumorzelllinie bei diesen keine auffallende Überexpression der Gene *EZH2*, *BMI-1*, *DNMT3B* und *OCT4* festgestellt werden. Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit ergibt, dass das gängige Modell zu Tumorstammzellen in soliden Tumoren in dieser Form nicht auf das Prostatakarzinom zutrifft. Vielmehr lässt sich aus den eigenen Resultaten eine Variation des Modells entwickeln, nach der eine vergrößerte Population intermediärerer Zellen, die aus transformierten Stammzellen hervorgehen, für die beschriebene Heterogenität des Prostatakarzinoms verantwortlich ist.

## 6 ABSTRACT

DNA methylation and chromatin structure are interacting epigenetic mechanisms that have been recognized as essential components for the regulation of stem cell maintenance and cell differentiation, e.g. during spermatogenesis. Interestingly, some epigenetic factors are themselves inactivated by epigenetic mechanisms during differentiation. Moreover, epigenetic alterations such as genome wide DNA hypomethylation of repetitive sequences and DNA hypermethylation at specific gene promoters have a fundamental role in tumorigenesis. Tumor cells, especially presumptive tumor stem cells, share certain properties with stem cells. This raises the question to which extent epigenetic regulators important for spermatogenesis and embryonal development become reactivated in tumors, e.g. as a consequence of aberrant DNA hypomethylation, contributing in turn to further variation, e.g. in methylation patterns. Therefore, the potential reexpression of candidate genes and their interactions with alterations in DNA methylation was investigated in prostate cancers, which often display hypomethylation or hypermethylation. Candidates important for epigenetic mechanisms and stem cell phenotype are the polycomb genes *EZH2* and *BMI-1*, the histone deacetylase *SIRT1*, the DNA methyltransferase *DNMT3B*, the cancer testis antigen *CTCF* and the transcription factor *OCT4*.

Investigation of cell lines and primary prostate cancers demonstrated increased expression of the *EZH2*, *SIRT1* and *DNMT3B* genes, whereas *BMI-1* was significantly downregulated. Aberrant expression of *EZH2* and *BMI-1* was confirmed by immunohistochemical analysis. These findings can be interpreted as a shift in the relative composition of the polycomb complexes *PRC1* and *PRC2* during progression of prostate carcinoma. Increased expression of *DNMT3B* significantly correlated with changes in DNA methylation and survival of prostate cancer patients.

The *CTCF* and *OCT4* genes were unexpectedly downregulated in primary tumors. Bisulfite sequencing revealed strong methylation in prostate tissues, whereas testis tissues were less methylated. The methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine induced *CTCF* expression up to 100-fold in tumor cell lines. The other candidates, however, were neither influenced by the methylation inhibitor nor by the deacetylation inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). Methylation sensitivity of the moderately strong *CTCF* promoter was further proven by transfection experiments using the in vitro methylated promoter. Taken together, the data for *CTCF* and *OCT4* hints at a particularly important role for DNA methylation in stepwise regulation of *CTCF* expression, whereas *OCT4* gene seems to be inactivated also by other mechanisms.

Additional analyses of the *CTCF* protein demonstrated predominant nuclear localization in spermatocytes, but cytoplasmatic localization in normal and cancerous prostate tissues suggesting nuclear transfer as a further regulatory mechanism for the protein. Confocal studies for colocalisation with the paralogue factor *CTCF* and RNA polymerase II identify *CTCF* as a transcription factor rather than a chromatin protein.

In summary, a general reactivation of the investigated epigenetic regulators in prostate cancers at large could not be detected. Even after enrichment of presumptive tumor stem cells using Hoechst dye exclusion sorting, reactivation was found almost at a physiological level. These results suggest a modified model for the tumor stem cell hypothesis in prostate cancers, with maintenance of a small stem cell population, but increased self-renewal of intermediate precursors.

## 7 LITERATUR

- Al Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. und Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**: 3983-3988.
- Al Hajj, M. und Clarke, M. F. (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**: 7274-7282.
- Alken, W. und Walz, P. (1998) Urologie. *Chapman and Hall*, London, UK.
- Allegrucci, C., Thurston, A., Lucas, E. und Young, L. (2005) Epigenetics and the germline. *Reproduction*. **129**: 137-149.
- Andrews, P. W. (1987) Human teratocarcinoma stem cells: glycolipid antigen expression and modulation during differentiation. *J.Cell Biochem*. **35**: 321-332.
- Bachman, K. E., Rountree, M. R. und Baylin, S. B. (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J.Biol.Chem*. **276**: 32282-32287.
- Bachmann, I. M., Halvorsen, O. J., Collett, K., Stefansson, I. M., Straume, O., Haukaas, S. A., Salvesen, H. B., Otte, A. P. und Akslen, L. A. (2006) EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J.Clin.Oncol*. **24**: 268-273.
- Baylin, S. B. und Ohm, J. E. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat.Rev.Cancer* **6**: 107-116.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. und Berman, D. M. (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**: 324-331.
- Bestor, T. H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum.Mol.Genet*. **9**: 2395-2402.
- Bhatt, R. I., Brown, M. D., Hart, C. A., Gilmore, P., Ramani, V. A., George, N. J. und Clarke, N. W. (2003) Novel method for the isolation and characterisation of the putative prostatic stem cell. *Cytometry A* **54**: 89-99.
- Boiani, M., Eckardt, S., Scholer, H. R. und McLaughlin, K. J. (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*. **16**: 1209-1219.
- Bonnet, D. und Dick, J. E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat.Med*. **3**: 730-737.
- Bonnet, D. (2005) Cancer stem cells: lessons from leukaemia. *Cell Prolif*. **38**: 357-361.
- Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D. L., Yanagimachi, R., Page, D. C. und Jaenisch, R. (2003) Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* **130**: 1673-1680.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. und Young, R. A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947-956.

- Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E. und Helin, K. (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* **22**: 5323-5335.
- Bradbury, C. A., Khanim, F. L., Hayden, R., Bunce, C. M., White, D. A., Drayson, M. T., Craddock, C. und Turner, B. M. (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* **19**: 1751-1759.
- Breuer, R. H., Snijders, P. J., Smit, E. F., Sutedja, T. G., Sewalt, R. G., Otte, A. P., van Kemenade, F. J., Postmus, P. E., Meijer, C. J. und Raaphorst, F. M. (2004) Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia*. **6**: 736-743.
- Breuer, R. H., Snijders, P. J., Sutedja, G. T., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Postmus, P. E., Meijer, C. J., Raaphorst, F. M. und Smit, E. F. (2005) Expression of the p16(INK4a) gene product, methylation of the p16(INK4a) promoter region and expression of the polycomb-group gene BMI-1 in squamous cell lung carcinoma and premalignant endobronchial lesions. *Lung Cancer* **48**: 299-306.
- Bui, M. und Reiter, R. E. (1998) Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **17**: 391-399.
- Cao, R. und Zhang, Y. (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **14**: 155-164.
- Chambers, I. und Smith, A. (2004) Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* **23**: 7150-7160.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. und Frommer, M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2990-2997.
- Collett, K., Eide, G. E., Arnes, J., Stefansson, I. M., Eide, J., Braaten, A., Aas, T., Otte, A. P. und Akslen, L. A. (2006) Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin.Cancer Res.* **12**: 1168-1174.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. und Maitland, N. J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* **65**: 10946-10951.
- Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W. und Huttner, W. B. (2000) The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J.Biol.Chem.* **275**: 5512-5520.
- Craig, J. M. (2005) Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* **27**: 17-28.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C., Strunnikova, M., Rastetter, M., Baier, K. und Pfeifer, G. P. (2005) The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol.Histopathol.* **20**: 645-663.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. und Boon, T. (1996) The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 7149-7153.

- De Smet, C., Martelange, V., Lucas, S., Brasseur, F., Lurquin, C. und Boon, T. (1997) Identification of human testis-specific transcripts and analysis of their expression in tumor cells. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **241**: 653-657.
- Dean, M., Fojo, T. und Bates, S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat.Rev.Cancer* **5**: 275-284.
- Deb-Rinker, P., Ly, D., Jezierski, A., Sikorska, M. und Walker, P. R. (2005) Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. *J.Biol.Chem.* **280**: 6257-6260.
- DeMarzo, A. M., Nelson, W. G., Isaacs, W. B. und Epstein, J. I. (2003) Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* **361**: 955-964.
- Dick, J. E. (2003) Stem cells: Self-renewal writ in blood. *Nature* **423**: 231-233.
- Dodge, J. E., Okano, M., Dick, F., Tsujimoto, N., Chen, T., Wang, S., Ueda, Y., Dyson, N. und Li, E. (2005) Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J.Biol.Chem.* **280**: 17986-17991.
- Dong, J. T. (2001) Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **20**: 173-193.
- Dong, J. T. (2006) Prevalent mutations in prostate cancer. *J.Cell Biochem.* **97**: 433-447.
- Dunn, K. L. und Davie, J. R. (2003) The many roles of the transcriptional regulator CTCF. *Biochem.Cell Biol.* **81**: 161-167.
- Ehrlich, M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**: 5400-5413.
- Elliot D. (2003) Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development. *Cytogenetic and Genome Research* **103**: 210-216.
- Esteller, M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**: 5427-5440.
- Esteller, M. (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **45**: 629-656.
- Esteller, M. (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br.J.Cancer* **94**: 179-183.
- Ezech, U. I., Turek, P. J., Reijo, R. A. und Clark, A. T. (2005) Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* **104**: 2255-2265.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., und Henikoff, S. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat.Rev.Genet.* **7**: 21-33.
- Feldman B.J. und Feldman D. (2001) The development of androgen- independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 34-45.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H. und Bergman, Y. (2006) G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat.Cell Biol.* **8**: 188-194.

- Florl, A. R., Lower, R., Schmitz-Drager, B. J. und Schulz, W. A. (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br.J.Cancer* **80**: 1312-1321.
- Florl, A. R., Steinhoff, C., Muller, M., Seifert, H. H., Hader, C., Engers, R., Ackermann, R. und Schulz, W. A. (2004) Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br.J.Cancer* **91**: 985-994.
- Fogh, J., Fogh, J. M. und Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J.Natl.Cancer Inst.* **59**: 221-226.
- Ford, J., Jiang, M. und Milner, J. (2005) Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res.* **65**: 10457-10463.
- Fossa, A., Berner, A., Fossa, S. D., Hernes, E., Gaudernack, G. und Smeland, E. B. (2004) NY-ESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *Prostate* **59**: 440-447.
- Galderisi, U., Cipollaro, M. und Giordano, A. (2006) Stem cells and brain cancer. *Cell Death.Differ.* **13**: 5-11.
- Gibbons, R. J. (2005) Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum.Mol.Genet.* **14**: 85-92.
- Gidekel, S. und Bergman, Y. (2002) A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. *J.Biol.Chem.* **277**: 34521-34530.
- Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y. und Pikarsky, E. (2003) Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* **4**: 361-370.
- Gil, J., Bernard, D. und Peters, G. (2005) Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA Cell Biol.* **24**: 117-125.
- Goll, M. G. und Bestor, T. H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu.Rev.Biochem.* **74**: 481-514.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S. und Mulligan, R. C. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J.Exp.Med.* **183**: 1797-1806
- Grimm M.O., Jurgens B., Schulz W.A., Decken K., Makri D. und Schmitz-Drager B.J. (1995) Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines. *Urol. Res.* **23**: 293-300.
- Grote, H. J., Schmiemann, V., Geddert, H., Rohr, U. P., Kappes, R., Gabbert, H. E. und Bocking, A. (2005) Aberrant promoter methylation of p16(INK4a), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int.J.Cancer* **116**: 720-725.
- Gui, C. Y., Ngo, L., Xu, W. S., Richon, V. M. und Marks, P. A. (2004) Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 1241-1246.
- Gunster, M. J., Raaphorst, F. M., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., Fieret, E., Meijer, C. J. und Otte, A. P. (2001) Differential expression of human Polycomb group proteins in various tissues and cell types. *J.Cell Biochem.* **81**: 129-143.

- Hake, S. B., Xiao, A. und Allis, C. D. (2004) Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br.J.Cancer* **90**: 761-769.
- Haraguchi, N., Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Barnard, G. F. und Mori, M. (2006) Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* **24**: 506-513.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y. G., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S. und Shiota, K. (2004) Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J.Biol.Chem.* **279**: 17063-17069.
- Hernandez-Munoz, I., Taghavi, P., Kuijl, C., Neefjes, J. und van Lohuizen, M. (2005) Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *Mol.Cell Biol.* **25**: 11047-11058.
- Hesketh, R. (1994) The Oncogene Handbook. *Academic Press*, London, UK
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A. und Brenner, M. K. (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 14228-14233.
- Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H. und Horio, Y. (2005) Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: NAD-dependent histone deacetylase SIRT1 (Sir2alpha). *J.Pharmacol.Sci.* **98**: 200-204.
- Hoffmann, M. J. und Schulz, W. A. (2005) Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem.Cell Biol.* **83**: 296-321.
- Hogarth, C., Itman, C., Jans, D. A. und Loveland, K. L. (2005) Regulated nucleocytoplasmic transport in spermatogenesis: a driver of cellular differentiation? *Bioessays* **27**: 1011-1025.
- Hong, J. A., Kang, Y., Abdullaev, Z., Flanagan, P. T., Pack, S. D., Fischette, M. R., Adnani, M. T., Loukinov, D. I., Vatolin, S., Risinger, J. I., Custer, M., Chen, G. A., Zhao, M., Nguyen, D. M., Barrett, J. C., Lobanenkov, V. V. und Schrupp, D. S. (2005) Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 7763-7774.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A. und Murphy, G. P. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**: 1809-1818.
- Hudolin, T., Juretic, A., Spagnoli, G. C., Pasini, J., Bandic, D., Heberer, M., Kosicek, M. und Cacic, M. (2006) Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE-A3/4, and NY-ESO-1 in cancerous and benign prostatic tissue. *Prostate* **66**: 13-18.
- Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O. und O'Leary, J. (2005) Molecular pathology of prostate cancer. *J.Clin.Pathol.* **58**: 673-684.
- Huntriss, J., Hinkins, M., Oliver, B., Harris, S. E., Beazley, J. C., Rutherford, A. J., Gosden, R. G., Lanzendorf, S. E. und Picton, H. M. (2004) Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol.Reprod.Dev.* **67**: 323-336.

- Issa, J. P. (2005) Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* **2 Suppl 1**: 24-29.
- Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A. und van Lohuizen, M. (1999) Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev.* **13**: 2678-2690.
- Jacobs, J. J. und van Lohuizen, M. (2002) Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim.Biophys.Acta* **1602**: 151-161.
- Janssen, J. und Laatz, W. (2005) Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. *Springer*, Heidelberg
- Jones, P. A. (2005) Overview of cancer epigenetics. *Semin.Hematol.* **42**: S3-S8.
- Jones, T. D., Ulbright, T. M., Eble, J. N., Baldrige, L. A. und Cheng, L. (2004) OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.* **28**: 935-940.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. und Jones, L. W. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* **17**: 16-23.
- Kalejs, M. und Erenpreisa, J. (2005) Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int.* **5**: 4-15.
- Kamminga, L. M., Bystrykh, L. V., de Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B. und de Haan, G. (2006) The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* **107**: 2170-2179.
- Kantarjian, H., Issa, J. P., Rosenfeld, C. S., Bennett, J. M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., III, Shen, L., Nimer, S. D., Leavitt, R., Raza, A. und Saba, H. (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* **106**: 1794-1803.
- Karan, D., Lin, M. F., Johansson, S. L. und Batra, S. K. (2003) Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Int.J.Cancer* **103**: 285-293.
- Karhadkar, S. S., Bova, G. S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J. T., Berman, D. M. und Beachy, P. A. (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**: 707-712.
- Karpf, A. R. und Jones, D. A. (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* **21**: 5496-5503.
- Kim, J. H., Yoon, S. Y., Kim, C. N., Joo, J. H., Moon, S. K., Choe, I. S., Choe, Y. K. und Kim, J. W. (2004) The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett.* **203**: 217-224.
- Kim, T. Y., Bang, Y. J. und Robertson, K. D. (2006) Histone Deacetylase Inhibitors for Cancer Therapy. *in press*
- Kimmins, S. und Sassone-Corsi, P. (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**: 583-589.

- Kimura F., Seifert H.H., Florl A.R., Santourlidis S., Steinhoff C., Swiatkowski S., Mahotka C., Gerharz C.D. und Schulz W.A. (2003). Decrease of DNA methyltransferase 1 expression relative to cell proliferation in transitional cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **104**: 568-578.
- Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., Ghosh, D., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Hayes, D. F., Sabel, M. S., Livant, D., Weiss, S. J., Rubin, M. A. und Chinnaiyan, A. M. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**: 11606-11611.
- Klenova, E. M., Morse, H. C., III, Ohlsson, R. und Lobanenkova, V. V. (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin.Cancer Biol.* **12**: 399-414.
- Kondo, T., Setoguchi, T. und Taga, T. (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 781-786.
- Koslowski, M., Bell, C., Seitz, G., Lehr, H. A., Roemer, K., Muntefering, H., Huber, C., Sahin, U. und Tureci, O. (2004) Frequent nonrandom activation of germ-line genes in human cancer. *Cancer Res.* **64**: 5988-5993.
- Kuzmichev, A., Margueron, R., Vaquero, A., Preissner, T. S., Scher, M., Kirmizis, A., Ouyang, X., Brockdorff, N., Abate-Shen, C., Farnham, P. und Reinberg, D. (2005) Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**: 1859-1864.
- Lee, W. H., Morton, R. A., Epstein, J. I., Brooks, J. D., Campbell, P. A., Bova, G. S., Hsieh, W. S., Isaacs, W. B. und Nelson, W. G. (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.
- Lessard, J. und Sauvageau, G. (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* **423**: 255-260.
- Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., van Lohuizen, M. und Marino, S. (2004) Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* **428**: 337-341.
- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat.Rev.Genet.* **3**: 662-673.
- Li, H. und Wu, X. (2004) Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **324**: 860-867.
- Li, L. C., Carroll, P. R. und Dahiya, R. (2005) Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J.Natl.Cancer Inst.* **97**: 103-115.
- Ling, J. Q., Li, T., Hu, J. F., Vu, T. H., Chen, H. L., Qiu, X. W., Cherry, A. M. und Hoffman, A. R. (2006) CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science* **312**: 269-272.
- Liu, S., Dontu, G. und Wicha, M. S. (2005) Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* **7**: 86-95.

- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., Wei, C. L., Ruan, Y., Lim, B. und Ng, H. H. (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat.Genet.* **38**: 431-440.
- Looijenga, L. H., Stoop, H., de Leeuw, H. P., Gouveia Brazao, C. A., Gillis, A. J., van Roozendaal, K. E., van Zoelen, E. J., Weber, R. F., Wolffenbuttel, K. P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E. J., Schneider, D. T., Kononen, J., Sauter, G. und Oosterhuis, J. W. (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res.* **63**: 2244-2250.
- Loukinov, D. I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S. D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A. A., Cui, H., Niemitz, E. L., Rasko, J. E., Docquier, F. M., Kistler, M., Breen, J. J., Zhuang, Z., Quitschke, W. W., Renkawitz, R., Klenova, E. M., Feinberg, A. P., Ohlsson, R., Morse, H. C., III und Lobanenkova, V. V. (2002) BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 6806-6811.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. und Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260.
- Lund, A. H. und van Lohuizen, M. (2004) Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr.Opin.Cell Biol.* **16**: 239-246.
- Maitland N.J. und Collins A. (2005) A tumour stem cell hypothesis for the origins of prostate cancer. *BJU Int.* **96**: 1219-1223.
- Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van Driel, R. und Aten, J. A. (1992) Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J.Cell Sci.* **103**: 857-862.
- Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Harada, K., Virmani, A. K., Zochbauer-Muller, S., Farinas, A. J., Vakar-Lopez, F., Minna, J. D., Sagalowsky, A., Czerniak, B. und Gazdar, A. F. (2001) Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* **61**: 8659-8663.
- Masters, J. R., Hepburn, P. J., Walker, L., Highman, W. J., Trejdosiewicz, L. K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B. T., Riddle, P. R. und Franks, L. M. (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res.* **46**: 3630-3636.
- McGarvey, K. M., Fahrner, J. A., Greene, E., Martens, J., Jenuwein, T., und Baylin, S. B. (2006) Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res.* **66**: 3541-3549.
- Mei, S., Ho, A. D. und Mahlknecht, U. (2004) Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review). *Int.J.Oncol.* **25**: 1509-1519.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Gunther, T., Buettner, R. und Schule, R. (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**: 436-439.

- Mihara, K., Chowdhury, M., Nakaju, N., Hidani, S., Ihara, A., Hyodo, H., Yasunaga, S., Takihara, Y. und Kimura, A. (2006) Bmi-1 is useful as a novel molecular marker for predicting progression of myelodysplastic syndrome and patient prognosis. *Blood* **107**: 305-308.
- Miller, S. J., Lavker, R. M. und Sun, T. T. (2005) Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications. *Biochim.Biophys.Acta* **1756**: 25-52.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K. und Buck, D. W. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**: 5013-5021.
- Molofsky, A. V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I. K., Clarke, M. F. und Morrison, S. J. (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**: 962-967.
- Monk, M. und Holding, C. (2001) Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* **20**: 8085-8091.
- Mutskov, V. und Felsenfeld, G. (2004) Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J.* **23**: 138-149.
- Myohanen, S. K., Baylin, S. B. und Herman, J. G. (1998) Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* **58**: 591-593.
- Nakada, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Ono, T., Saika, T., Kurashige, T., Gnjatic, S., Ritter, G., Chen, Y. T., Stockert, E., Nasu, Y., Tsushima, T., Kumon, H., Old, L. J. und Nakayama, E. (2003) NY-ESO-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun.* **3**: 10-22.
- Niwa, H., Miyazaki, J. und Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat.Genet.* **24**: 372-376.
- Nordhoff, V., Hubner, K., Bauer, A., Orlova, I., Malapetsa, A. und Scholer, H. R. (2001) Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm.Genome* **12**: 309-317.
- Ogishima, T., Shiina, H., Breault, J. E., Tabatabai, L., Bassett, W. W., Enokida, H., Li, L. C., Kawakami, T., Urakami, S., Ribeiro-Filho, L. A., Terashima, M., Fujime, M., Igawa, M. und Dahiya, R. (2005) Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* **11**: 1028-1036.
- Ohlsson R., Kanduri C., Whitehead J., Pfeifer S., Lobanenkova V. und Feinberg AP. (2003) Epigenetic variability and the evolution of human cancer. *Adv Cancer Res.* **88**:145-168.
- Oka, M., Meacham, A. M., Hamazaki, T., Rodic, N., Chang, L. J. und Terada, N. (2005) De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* **24**: 3091-3099.
- Okano, M., Xie, S. und Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat.Genet.* **19**: 219-220.

- Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J. und Clarke, M. F. (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**: 302-305.
- Park, I. K., Morrison, S. J. und Clarke, M. F. (2004) Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J.Clin.Invest* **113**: 175-179.
- Paulsen, M. und Ferguson-Smith, A. C. (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J.Pathol.* **195**: 97-110.
- Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J. und Scholer, H. (1998) Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech.Dev.* **71**: 89-98.
- Pesce, M. und Scholer, H. R. (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* **19**: 271-278.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S. K., Cao, R., Worringer, K. A., Wang, H., de la Cruz, C. C., Otte, A. P., Panning, B. und Zhang, Y. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**: 131-135.
- Polyak, K. und Hahn, W. C. (2006) Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat.Med.* **12**: 296-300.
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D. und Roberts, R. J. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J.Biol.Chem.* **274**: 33002-33010.
- Pruitt, K., Zinn, R. L., Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Kang, S. H., Watkins, D. N., Herman, J. G. und Baylin, S. B. (2006) Inhibition of SIRT1 Reactivates Silenced Cancer Genes without Loss of Promoter DNA Hypermethylation. *PLoS.Genet.* **2**: e40.
- Raaphorst, F. M., van Kemenade, F. J., Fieret, E., Hamer, K. M., Satijn, D. P., Otte, A. P. und Meijer, C. J. (2000) Cutting edge: polycomb gene expression patterns reflect distinct B cell differentiation stages in human germinal centers. *J.Immunol.* **164**: 1-4.
- Raaphorst, F. M. (2005) Deregulated expression of Polycomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epithelial tumors. *Hum.Mol.Genet.* **14**: 93-100.
- Raman, J. D., Mongan, N. P., Tickoo, S. K., Boorjian, S. A., Scherr, D. S. und Gudas, L. J. (2005) Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin.Cancer Res.* **11**: 8570-8576.
- Razin, A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* **17**: 4905-4908.
- Reik, W. und Walter, J. (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat.Rev.Genet.* **2**: 21-32.
- Reuter, G. und Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* **14**: 605-612.
- Reyes, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. und Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111.
- Richardson, G. D., Robson, C. N., Lang, S. H., Neal, D. E., Maitland, N. J. und Collins, A. T. (2004) CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J.Cell Sci.* **117**: 3539-3545.
- Richie, J. P. (2005) OCT4 staining in testicular tumors. A sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. *J.Urol.* **174**: 569-570.

- Rizzo, S., Attard, G., und Hudson, D. L. (2005) Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.* **38**: 363-374.
- Robertson, K. D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F. A. und Jones, P. A. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2291-2298.
- Robertson, K. D. (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**: 5361-5379.
- Robertson, K. D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat.Rev.Genet.* **6**: 597-610.
- Sanchez, P., Hernandez, A. M., Stecca, B., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M. W., Datta, S. und Altaba, A. (2004) Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 12561-12566.
- Santos-Rosa, H. und Caldas, C. (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur.J.Cancer* **41**: 2381-2402.
- Santourlidis, S., Florl, A., Ackermann, R., Wirtz, H. C. und Schulz, W. A. (1999) High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* **39** : 166-174.
- Saramäki, O. R., Tammela, T. L., Martikainen, P. M., Vessella, R. L. und 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.
- Scanlan, M. J., Simpson, A. J. und Old, L. J. (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* **4**: 1-16.
- Schalken, J. A., Bergh, A., Bono, A., Foster, C., Gospadarowicz, M., Isaacs, W. B., Rubin, M., Schroder, F., Tribukait, B., Tsukamoto, T. und Wiklund, P. (2005) Molecular prostate cancer pathology: current issues and achievements. *Scand.J.Urol.Nephrol.Suppl.* **216**: 82-93.
- Schmidt, B. A., Rose, A., Steinhoff, C., Strohmeyer, T., Hartmann, M. und Ackermann, R. (2001) Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* **61**: 4214-4221.
- Schulz, W. A., Elo, J. P., Florl, A. R., Pennanen, S., Santourlidis, S., Engers, R., Buchardt, M., Seifert, H. H. und Visakorpi, T. (2002) Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes.Cancer* **35**: 58-65.
- Schulz, W. A. (2005) Molecular Biology of Human Cancers. *Springer*, Dordrecht, NL
- Schulz, W. A. und Hatina, J. (2006) Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J.Cell Mol.Med.* **10**: 100-125.
- Seigel, G. M., Campbell, L. M., Narayan, M. und Gonzalez-Fernandez, F. (2005) Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol.Vis.* **11**: 729-737.
- Seligson, D., Horvath, S., Huerta-Yepez, S., Hanna, S., Garban, H., Roberts, A., Shi, T., Liu, X., Chia, D., Goodglick, L. und Bonavida, B. (2005) Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *Int.J.Oncol.* **27**: 131-141.

- Shakhova, O., Leung, C. und Marino, S. (2005) Bmi1 in development and tumorigenesis of the central nervous system. *J.Mol.Med.* **83**: 596-600.
- Shen, M. M. und Abate-Shen, C. (2003) Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev.Dyn.* **228**: 767-778.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. und Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
- Sigalotti, L., Fratta, E., Coral, S., Tanzarella, S., Danielli, R., Colizzi, F., Fonsatti, E., Traversari, C., Altomonte, M. und Maio, M. (2004) Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **64**: 9167-9171.
- Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R. M., Nelson, D., Powell, B. L., DeCastro, C. M., Ellerton, J., Larson, R. A., Schiffer, C. A. und Holland, J. F. (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J.Clin.Oncol.* **20**: 2429-2440.
- Silverman, R. H. (2003) Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* **42**: 1805-1812.
- Simard, J., Dumont, M., Labuda, D., Sinnett, D., Meloche, C., El Alfy, M., Berger, L., Lees, E., Labrie, F. und Tavitigian, S. V. (2003) Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocr.Relat Cancer* **10**: 225-259.
- Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T. und Old, L. J. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat.Rev.Cancer* **5**: 615-625.
- Sims, R. J., III, Nishioka, K. und Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* **19**: 629-639.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. und Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **63**: 5821-5828.
- Skotheim, R. I., Lind, G. E., Monni, O., Nesland, J. M., Abeler, V. M., Fossa, S. D., Duale, N., Brunborg, G., Kallioniemi, O., Andrews, P. W. und Lothe, R. A. (2005) Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res.* **65**: 5588-5598.
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D., und Jacobberger, J. W. (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* **35**: 403-409.
- Stanbrough, M., Bubley, G. J., Ross, K., Golub, T. R., Rubin, M. A., Penning, T. M., Febbo, P. G. und Balk, S. P. (2006) Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* **66**: 2815-2825.
- Steinhoff, C. und Schulz, W. A. (2003) Transcriptional regulation of the human LINE-1 retrotransposon L1.2B. *Mol.Genet.Genomics* **270**: 394-402.
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. und Paulson, D. F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int.J.Cancer* **21**: 274-281.

- Stratthdee, G. und Brown, R. (2002) Epigenetic cancer therapies: DNA methyltransferase inhibitors. *Expert.Opin.Investig.Drugs* **11**: 747-754.
- Suo, G., Han, J., Wang, X., Zhang, J., Zhao, Y., Zhao, Y. und Dai, J. (2005) Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **337**: 1047-1051.
- Taghavi, P. und van Lohuizen, M. (2006) Developmental biology: two paths to silence merge. *Nature* **439**: 794-795.
- Tai, M. H., Chang, C. C., Kiupel, M., Webster, J. D., Olson, L. K. und Trosko, J. E. (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**: 495-502.
- Tokar, E. J., Ancrile, B. B., Cunha, G. R. und Webber, M. M. (2005) Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer. *Differentiation* **73**: 463-473.
- Tomlins S. A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., Lee C. Montie J.E. Shah R.B. Pienta K.J., Rubin M.A. and Chinnaiyan A.M. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**:644-658.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H. und Weissman, I. L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 14720-14725.
- Valk-Lingbeek, M. E., Bruggeman, S. W. und van Lohuizen, M. (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* **118**: 409-418.
- van Leenders, G. J., Gage, W. R., Hicks, J. L., van Balken, B., Aalders, T. W., Schalken, J. A. und De Marzo, A. M. (2003) Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am.J.Pathol.* **162**: 1529-1537.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Reinberg, D. (2004) Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol.Cell* **16**: 93-105.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M. A. und Chinnaiyan, A. M. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**: 624-629.
- Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Flanagan, P. T., Custer, M., Loukinov, D. I., Pugacheva, E., Hong, J. A., Morse, H., III, Schrupp, D. S., Risinger, J. I., Barrett, J. C. und Lobanenkov, V. V. (2005) Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.* **65**: 7751-7762.
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J. M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y. und Fuks, F. (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**: 871-874.
- Williams, R. D. (1980) Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol.* **17**: 359-363.

- Wu, H. und Sun, Y. E. (2006) Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr.Res.* **59**: 21R-25R.
- Yamazaki, Y., Fujita, T. C., Low, E. W., Alarcon, V. B., Yanagimachi, R. und Marikawa, Y. (2006) Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol.Reprod.Dev.* **73**: 180-188.
- Yu, F., Zingler, N., Schumann, G. und Stratling, W. H. (2001) Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res.* **29**: 4493-4501.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L. und Yu, J. S. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**: 9392-9400.
- Zendman, A. J., Ruiter, D. J. und Van Muijen, G. N. (2003) Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J.Cell Physiol* **194**: 272-288.
- Zimmer R., Albiez H., Walter J., Peters A.H., Cremer T. und Cremer M. (2006) Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem. Cell. Biol.* **125**: 3-19.

**8 ABKÜRZUNGEN**

5-aza-dC	5-aza-2'-Desoxycytidin
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BrDU	Brom-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CpG	Cytosin/Guanin-Dinukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E 11.5	<i>embryonic day</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
g	Schleuderziffer bei der Zentrifugation
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
H3	Histon H3
IPTG	Isopropyl-β-D1-thiogalactopyranosid
K9	Lysinrest Position 9
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LINE	<i>long interspersed nuclear element</i>
min	Minute
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pc	post coitum
PCa	Prostatakarzinom
PGC	<i>primordial germ cell</i>
PT	Prostatatumor
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	S-adenosyl-Methionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>
SSC	<i>standard sodium citrate buffer</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

---

TCC	<i>transitional cell carcinoma</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TM	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
UEC	<i>uroepithelial culture</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 9 DANKSAGUNG

- Zuerst gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, Frau G.C. Wupper-Hoffmann und Herrn K.F. Hoffmann für den familiären Rückhalt, sowie Ihre Förderung und Unterstützung von Anbeginn bis zu diesem Ziel und darüber hinaus. Sie haben am stärksten an mich und jegliches Gelingen geglaubt.
- Ich danke Herrn Prof. Dr. W.A. Schulz für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, das ständig an Bedeutung gewinnt und zu einem wichtigen Aspekt der Tumorbilogie geworden ist. Seine Unterstützung war wesentlich für diese Arbeit, sowie für weitere wissenschaftliche Ziele.
- Herrn Prof. Dr. D. Riesner danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft diese im Fachbereich Biologie zu vertreten. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. H. Bünemann für die erneute Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. R. Ackermann danke ich für die Möglichkeit zur Promotion im Forschungslabor der Urologischen Klinik, zur Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen und für seine stete Diskussionsbereitschaft.
- Herrn Dr. M. Müller danke ich für die Unterstützung der Arbeit von klinischer Seite und für Unterstützungen bei statistischen Analysen.
- Allen medizinischen Kolleginnen und Kollegen der Urologischen Klinik sei gedankt für ihre Mühe bei der Bereitstellung von Blut- und Gewebeproben.
- Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. R. Engers für die freundliche Übernahme der immunhistochemischen Analysen von Geweben, damit verbundenen Auswertungen und die Bereitstellung von Bildmaterial.
- Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit wurde dankenswerter Weise von Herrn Dr. J. Fischer mit der Durchführung der FACS-Analysen unter Verwendung des Hoechst-Farbstoffs unterstützt.
- Der Arbeitsgruppe Biochemie II danke ich für die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops. Insbesondere danke ich Frau Dr. A. Gohla für Ihre Hilfsbereitschaft, Anregungen und besondere Betreuung bei zeitintensiven Sitzungen am Mikroskop.
- Ich danke Frau Dipl.-Biol. S. Bork für ihre Geduld bei der Durchführung der FACS-Analyse unter Verwendung des CD133-Antikörpers. Herrn Dipl.-Biol. S. Raschke danke ich für allgemeinen und methodischen Austausch.
- Meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe, Frau C. Hader, Frau A. Meyer, Frau Dipl.-Biol. S. Fritzsche, Herrn Dr. F. Windhofer und Herrn Dr. J. Hatina danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft, sowie Unterstützung bei der Durchsicht des Textes. Hervorheben möchte ich Frau Dr. A. Linnemann-Florl für Rat und Tat in allen Lebenslagen. Herrn cand.med. M. Hornstein danke ich für eine herzliche Zusammenarbeit, kleinere Gefallen und Aufmerksamkeiten. Herrn Dr. M.V. Cronauer danke ich für telefonische Hilfestellungen.
- Herr S. Hahn hat verschiedene Stadien dieser Arbeit miterlebt. Ihm danke ich besonders für sein Verständnis und seine Unterstützung in jeder Hinsicht, häufig auch vor Ort.
- Zu guter Letzt möchte ich nicht versäumen, meinen Freunden und Bekannten zu danken, die in den vergangenen Jahren Treue gehalten haben. Der persönliche Kontakt und Austausch mit Frau Dipl.-Biol. T. Nussbaum war in den verschiedensten Etappen dieser Arbeit von Bedeutung

## CURRICULUM VITAE

### Persönliche Daten

wohnhaft in 58256 Ennepetal, Bergstr. 114  
geboren am 01.05.1978 in Schwelm  
ledig

### Berufliche Entwicklung

Juni 2006 Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
  
Note „magna cum laude“

seit 03.2003 wissenschaftliche Angestellte  
im Forschungslabor der Urologischen Klinik  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Promotion  
Experimentelle Arbeiten und Fortbildungen zu  
epigenetischen Veränderungen in urologischen Tumoren

### Berufsausbildung

02.1998 – 01.2003 Studium zur Diplom-Biologin  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10.1997-02.1998 Studium zur Diplom-Biologin  
an der Technischen Universität Darmstadt

05.2002 – 01.2003 Anfertigung der Diplom-Arbeit im Forschungslabor der  
Urologischen Klinik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

01.2002 Diplom-Prüfung Note „gut“

02.2000 Vordiplom-Prüfung

### Schulbildung

08.1988 – 06.1997 Städtisches Gymnasium Gevelsberg  
Abitur-Notendurchschnitt 2.1

08.1984 – 06.1988 Grundschule Gevelsberg-Silschede

Ennepetal, 16.05.2006

## **Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 16.05.06

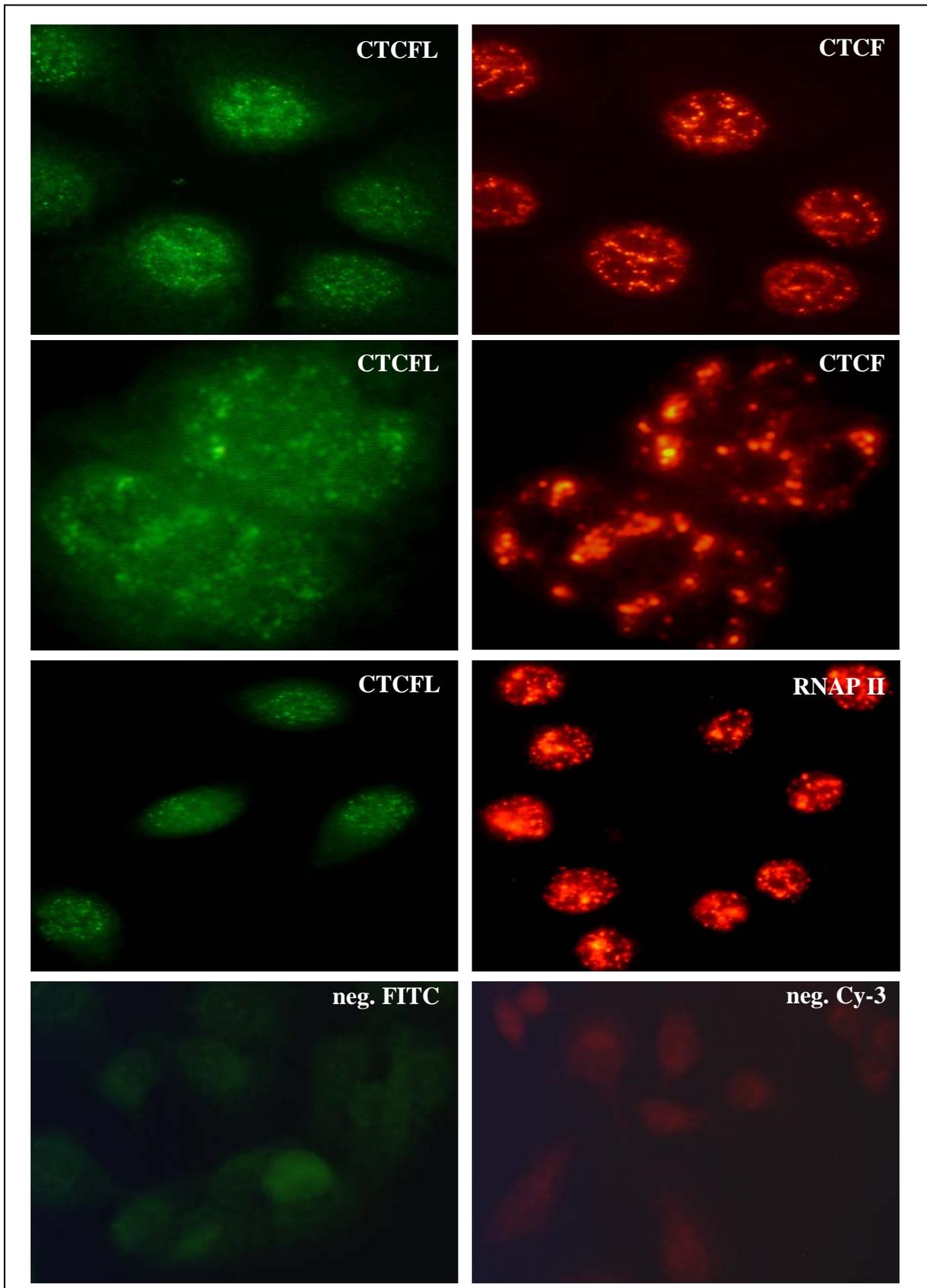


Abb. 3.36: Doppelfärbungen der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 gegen CTCF, RNAPII und CTCFL; Negativkontrollen wurden ohne Primärantikörper gefärbt; Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop.