

Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. P. Albers

**Epigenetische Veränderungen im Prostatakarzinom -
eine *in silico* Analyse**

Dissertation

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

vorgelegt von
Klaus-Marius Bastian

Düsseldorf 2018

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

gez:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Dagmar Wieczorek

Für meine liebe Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

2014 Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer. Ribarska T, Goering W, Droop J, **Bastian K-M**, Ingenwerth M, Schulz WA. *Epigenetics*. 2014;9(5):704-717. doi:10.4161/epi.28006.

2012 Specific changes in the expression of imprinted genes in prostate cancer- implications for cancer progression and epigenetic regulation.

Ribarska T, **Bastian K-M**, Koch A, Schulz WA. *Asian Journal of Andrology*. 2012;14(3):436-450. doi:10.1038/aja.2011.160.

Zusammenfassung

In der Krebsforschung haben DNA-Microarrays zur Diagnostik und zur Erforschung der differentiellen Genexpression wichtige Informationen geliefert. Die Menge der generierten Daten stellt die Wissenschaft vor neue Aufgaben, nämlich sie komplett auszuwerten oder mit anderen Datensätzen zu vergleichen. Auch für das Prostatakarzinom (PCa) hat sich diese Methodik etabliert und liefert wichtige neue Erkenntnisse für sein Entstehen oder sogar die Therapie. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Microarray-Datenbank Oncomine® alle bekannten elterlich genomisch geprägten Gene auf ihre Expression im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe analysiert. Davon waren 52 Gene in mindestens zwei Microarray-Studien untersucht worden; 10 Gene konnten in der Datenbank nicht gefunden werden. Bei 12 Genen wurde eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) bis hochsignifikante ($p < 0,001$) Veränderung der Genexpression von Tumor- gegenüber Normalgeweben gefunden; bei 9 der 12 Gene wurde eine verminderte Expression im Karzinomgewebe festgestellt. Eine weitere Analyse über die COPA-Methode ergab, dass sich lediglich die Genexpressionsveränderungen der elterlich geprägten Gene auf Chromosom 7q und 10q über Veränderung der DNA-Kopienzahl erklären lassen könnten. Alle in Oncomine® gefundenen Veränderungen konnten in einem Validierungs-Datensatz zumindest im Trend bestätigt werden. In einer Clusteranalyse konnten kleine Gruppen von zwei bis fünf Genen in einem Cluster zusammengeführt werden. Die Daten der vorliegenden in silico Analyse zeigen, dass eine spezifische Untergruppe von elterlich geprägten Genen im Prostatakarzinomgewebe, wahrscheinlich durch epigenetische Mechanismen, dereguliert ist. Die meisten dieser Gene gehören einem Netzwerk an, welches in seiner Gesamtheit das embryonale Wachstum und die Entwicklung reguliert; einige Mitglieder beeinflussen zudem den Zellzyklus. Überraschenderweise wurde ein neues potentiell Markergen im PCa gefunden: *PPP1R9A*, dessen Expression mit bekannten Markern des PCa korreliert, könnte ein interessantes Forschungsobjekt darstellen.

Abstract

In cancer research DNA microarrays have provided much information for diagnosis and investigation of differential gene expression. The amount of data generated represents a new challenge, particularly in terms of complete evaluation of data and of comparing data sets with one another. This method has also been established for investigating prostate cancer (PCa) and has provided important new findings on carcinogenesis or even therapy. In this study all known imprinted human genes were analyzed for their expression in prostate carcinoma tissue compared to healthy tissue using the commercially available microarray database Oncomine®. Of these, 52 genes were studied in at least two microarray studies; 10 genes could not be found in the database. In 12 genes, a statistically significant ($p < 0.05$) to highly significant ($p < 0.001$) change in gene expression was found in tumor tissues. For 9 of the 12 genes reduced expression in carcinoma samples was detected. An additional analysis using the COPA method showed that only gene expression changes of the imprinted genes on chromosomes 7q and 10q could be explained by a change in DNA copy number. All genetic changes found in Oncomine® were confirmed in a validation dataset. In a cluster analysis, small groups of two to five genes were grouped together. The data of this in silico analysis showed that a specific subgroup of imprinted genes in prostate cancer is deregulated probably by epigenetic mechanisms. Most of these genes belong to a network which regulates embryonic growth and development; some members also influence the cell cycle. Surprisingly, a new potential PCa marker gene was found: PPP1R9A, whose expression correlates with known PCa biomarkers, could be an interesting subject for PCa research.

Abkürzungs- und Definitionsverzeichnis

PCa = Prostatakarzinom

lncRNA = long non-coding (lange nicht-kodierende)

Ribonukleinsäure

DNA = Desoxyribonukleinsäure

RNA = Ribonukleinsäure

ICR = Imprinted control region

DMR = Differentiell methylierte Region

LOI = loss of imprinting

LOH = loss of heterozygosity

COPA = Cancer Outlier Profile Analysis

TNDM = transienter neonataler Diabetes mellitus

Reporters = Eine spezifische DNA-Sequenz, welche verwendet wird, die Genexpression durch Hybridisierung zu identifizieren.

Samples = Ein Überbegriff spezifisch in Oncomine® verwendet für einzelne Zelllinien oder Patientengewebe die als einzelne Microarray Daten dargestellt werden.

Datasets = Datenmengen bezogen auf eine bestimmte Publikation, welche durch den Autor und die Gewebeart gekennzeichnet wird.

Filters = Filter innerhalb eines ausgewählten Datenpools, welche angewendet werden um spezifische Analysen, Krebsarten, Stichprobenarten und Gen-Sets zu isolieren.

Concepts = Gendaten, die sowohl in Oncomine® als auch in Drittanbieterquellen wie Gene Ontology, KEGG Pathways, Human Protein Reference Database, etc. vorhanden sind.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS PROSTATAKARZINOM.....	2
1.2. MOLEKULARGENETIK DES PCA	5
1.3. EPIGENETIK DES PCA.....	8
1.4. GENOMISCHES IMPRINTING.....	11
2. ZIELE DER ARBEIT	15
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. VERWENDETE HARD- UND SOFTWARE	17
3.2. ERSTELLEN DER GENLISTE.....	17
3.3. RECHERCHE DER GENLISTE UNTER ONCOMINE [®] ™ VERSION 4.3 AUF RNA-BASIS	17
3.4. AUFLISTEN DER SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN UND NICHT SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN GENEXPRESSIONEN.....	20
3.5. AUFLISTEN DER GENE, DIE NICHT IN ONCOMINE [®] ™ REGISTRIERT SIND.....	21
3.6. ANALYSE DER GENEXPRESSION VON <i>EZH2</i> IN ONCOMIE™.....	21
3.7. DETAILLIERTE ANALYSE DER GENEXPRESSION ALLER SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN GENE	21
3.8. BERECHNUNG UND DARSTELLUNG DER KORRELATION DER EXPRESSION ALLER SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN GENE MIT DER EXPRESSION VON <i>EZH2</i>	22
3.9. ANALYSE DER DNA-DOSIS VERÄNDERUNG ALLER SIGNIFIKANT VERÄNDERTEN GENE.....	23
3.10. ONCOMINE [®] ™ PREMIUM RESEARCH	24
3.11. RECHERCHE NACH EINER GEEIGNETEN KONTROLLSTUDIE	25
3.12. KONTROLLE UND VALIDIERUNG DER GEFUNDENEN ERGEBNISSE	27
3.13. CLUSTERING DER GENE IM TAYLOR-DATENSATZ.....	28
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	31
4.1. IN SILICO GENEXPRESSIONSANALYSEN IN ONCOMINE [®] ™	31
4.1.1. <i>Signifikant veränderte Genexpression</i>	31
4.1.2. <i>Nicht signifikant veränderte Genexpression</i>	34
4.1.3. <i>Nicht gelistete Gene in Oncomine[®]™</i>	35
4.2. GENEXPRESSIONSANALYSEN AUS ONCOMINE [®] ™ VS. TAYLOR ET AL. (1)	36
4.2.1. <i>PLAGL1/ZAC1 und HYMAI</i>	36
4.2.2. <i>SGCE, PEG10, PPP1R9A</i>	40

4.2.3. <i>INPP5F</i>	45
4.2.4. <i>CDKN1C</i>	48
4.2.5. <i>MEG3/GTL2</i>	50
4.2.6. <i>NDN und SNRPN</i>	53
4.2.7. <i>PEG3</i>	55
4.2.8. <i>GNAS/NESP55</i>	56
4.3. KORRELATIONEN MIT DER GENEXPRESSION VON <i>EZH2</i>	58
4.4 CLUSTERING IM TAYLOR DATENSATZ.....	64
4.5. COPA ANALYSE IN ONCOMINE [®] ™	66
5. SCHLUSSFOLGERUNG	69
6. LITERATURVERZEICHNISS	73
7. ANHANG	87
8. DANKSAGUNG	110

1. Einleitung

In der heutigen Zeit stellt sich immer mehr die Frage nach dem Verhältnis zwischen Kosten und Nutzen vieler wissenschaftlich-experimenteller Arbeiten. Nicht zuletzt im medizinischen Bereich können Investitionen in Forschung getätigt werden, welche letztendlich nicht zum gewünschten Ergebnis führen. Die in dieser Arbeit beschriebene *in silico* Analyse der epigenetischen Veränderungen im Prostatakarzinom (PCa) stellt eine effiziente Methode dar, um das Verhältnis zwischen Kosten und Nutzen optimal zu gestalten. Hinzu kommt, dass immer häufiger große Datenmengen von Forschergruppen generiert werden, die in ihrer Tiefe und bei gegebenem Budget nicht im Ganzen betrachtet oder im Detail ausgearbeitet werden können. Zwar werden immer mehr neue bioinformatische Methoden entwickelt, die sich diesem Problem annehmen, jedoch können beispielsweise Clusteranalysen erst im Nachhinein bei schon bestehenden großen Datenmengen angewandt werden.

Bei einem gegebenen Ziel war es in dieser Arbeit möglich, die Kosten minimal zu halten. Somit folgt diese Arbeit dem Rationalprinzip, der Volkswirtschaftslehre (2), das längst in der Betriebs- und Volkswirtschaftslehre Einzug gehalten hat, jedoch im medizinischen und naturwissenschaftlichen Bereich nicht standardmäßig etabliert ist. Bei vielen naturwissenschaftlichen Arbeiten wird immer noch nach dem falschen und in der Volkswirtschaftslehre wie auch in der Betriebswirtschaftslehre nicht realisierbaren Prinzip vorgegangen, welches bei minimalem Aufwand das Maximum an Output ermöglichen soll.

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit sollte so gesehen sein, aus mehreren großen bestehenden Datensätzen eine Vorauswahl an Genen zu treffen, die sich signifikant im Prostatakarzinom im Vergleich zum Prostatanormalgewebe in ihrer Genexpression verändert haben, um somit effektiv und effizient eine Voranalyse als Grundlage zielgerichteter experimenteller Arbeiten zu erstellen.

1.1. Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist mit 63.710 Neuerkrankungen im Jahr 2012 und schätzungsweise 66.900 Neuerkrankungen im Jahr 2016 der häufigste maligne Tumor des Mannes und mit 25,4 % aller diagnostizierten Krebserkrankungen eine der häufigsten Krebsarten generell in Deutschland. (3) Bisher sind die Faktoren, die zur Entstehung des Prostatakarzinoms beitragen und seinen Verlauf beeinflussen, im Wesentlichen unbekannt. Alter, ethnische Herkunft, Lebensstil, aber auch vererbte Prädisposition scheinen die wichtigsten Einflussfaktoren darzustellen. Die Häufigkeit des Auftretens einer malignen Entartung der Prostata unterscheidet sich zwischen verschiedenen Populationen deutlich. Bei Männern schwarzafrikanischen Ursprungs tritt das PCa häufiger auf als bei Europäern und weißen Nordamerikanern. Seltener zu beobachten ist die Erkrankung bei asiatisch-stämmigen Männern. In einem internationalen Vergleich wurden bei der Altersgruppe zwischen 60 und 70 Jahren Prävalenzen zwischen 70/100.000 bei US-afroamerikanischen Männern und 14/100.000 bei griechischen Männern errechnet. (3) Der Unterschied zwischen den einzelnen Völkergruppen beruht nicht nur auf der ethnisch unterschiedlichen Genetik, sondern eher auf dem Einfluss von Umweltfaktoren wie Ernährung und Lebensstil. Gesichert ist auch, dass Androgene und vor allem eine Veränderung der Androgenantwort im Prozess der Entstehung des PCa eine entscheidende Rolle spielen. (4) Eine familiäre Häufung des PCa unter nahen Angehörigen ist ebenfalls als Risikofaktor anerkannt und eine Reihe von Genmutationen und Genpolymorphismen gehen mit einem erhöhten Risiko für ein PCa einher. (5) Die genauen Mechanismen der beteiligten vererbten Genveränderungen sind bisher jedoch meist nicht bis ins Detail verstanden.

Das PCa wird klinisch an Hand von zwei etablierten Klassifikationssystemen eingeteilt und entsprechend therapiert. Das TNM System, welches mit dem T-Stadium (T1a-T4) die Tumorgröße, dem N-Stadium die Lymphknotenmetastasierung und dem M-Stadium die Fernmetastasierung beschreibt, ist zusammen mit dem Grading nach Gleason der Goldstandard der PCa-Klassifikation. Zur Bestimmung des Gleason-Scores wird in repräsentativen feingeweblichen Proben aus Biopsien oder dem entnommenen Prostatapräparat die Differenzierung der Drüsenstruktur im Vergleich zum Normalgewebe untersucht. Die Einteilung erfolgt von eins bis fünf, je höher der Wert, desto weiter entartet und invasiver ist das Drüsengewebe. Der endgültige Gleason-Score wird aus der Summe der beiden Werte der zwei häufigsten Grade in den Proben berechnet. (6) Grundsätzlich werden im klinischen Alltag drei Methoden zur Detektion eines PCa standardmäßig angewandt. Die digitale rektale Untersuchung des Patienten ist die am einfachsten durchzuführende Untersuchung. Jedoch haben bei einem als pathologisch anzusehenden rektalen Tastbefund viele Karzinome die Organkapsel schon überschritten und sind nicht mehr kurativ therapierbar. (7) Neben der transrektalen Ultraschalluntersuchung, die der digitalen rektalen Untersuchung aktuell nicht überlegen ist, stellt in Deutschland die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens im Serum, kurz des PSA-Wertes, das wichtigste Verfahren dar. (7) Beim PSA handelt es sich um eine Serinprotease aus der Kallikrein-Familie, die von luminalen Epithelzellen der Azini und Ductus der Prostata gebildet wird. (8) Die Bestimmung des PSA-Wertes stellt seit Mitte der 80ziger Jahre eine Standardmethode dar, um Veränderungen der Prostata zu diagnostizieren. (9) Es besteht allerdings begründete Kritik an der Bestimmung des PSA-Wertes zur frühen Diagnosefindung eines Prostatakarzinoms, da vor allem die eindeutige Evidenz für den Nutzen eines populationsgebundenen Screenings fehlt (10) und der PSA-Wert auch bei anderen Erkrankungen wie der BPH und der Prostatitis erhöht sein kann. (11, 12) Der PSA-Wert ist also ein guter und vor allem kostengünstiger Marker zur Erkennung von Vergrößerungen der

Prostata, der sich jedoch nicht absolut spezifisch für das PCa darstellt. (13)

Es werden aktuell auch bildgebende Verfahren diskutiert um PCa zu diagnostizieren. Insbesondere das MRT nimmt in dieser Diskussion einen hohen Stellenwert ein. Trotzdem folgt bei einem erhöhten PSA-Wert in der Regel eine Prostatabiopsie, die ebenfalls nur in einem Teil der Untersuchungen eindeutige Ergebnisse liefert. Bei einer geringen Spezifität mit falsch positiven Ergebnissen, z.B. bei Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie, ist eine Prostatabiopsie nur in 25% der Patienten mit PSA-Werten zwischen 2 und 10 µg/l positiv. (14, 15)

Aus diesen Gründen gilt es weiterhin nach neuen diagnostischen und prognostischen Biomarkern für das PCa zu forschen. Einige Gene werden schon jetzt zusätzlich zum PSA als Biomarker in der Diagnostik und zur Prognose des Krankheitsverlaufes genutzt. (13, 16) Schon in mehreren Tumorentitäten konnte zum Beispiel das Gen enhancer of zeste homolog 2, kurz *EZH2*, mit einer vermehrten Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. (17) Im PCa hängt die Expression von *EZH2* mit dem Krankheitsverlauf zusammen. (18-21) *EZH2* beeinflusst als Histonmethyltransferase und als Coregulator verschiedener Transkriptionsfaktoren (22) unmittelbar die Tumorgenese in der Prostata. Im klinischen Alltag wird seit einiger Zeit ein wie *EZH2* durch Microarray-Expressionsanalysen entdeckter Biomarker zur Diagnoseverifizierung angewandt. (23) Das Gen *AMACR* codiert für die α -Methylacyl-CoA-Racemase; der immunhistochemische Nachweis dieses peroxisomalen Enzyms ergänzt als positiver Biomarker den negativen Biomarker des fehlenden Nachweises der Basalzellmarker p63 und Basalzellcytokeratine im klinischen Alltag. (24, 25) Diese Beispiele illustrieren, wie sich aus molekulargenetischen Analysen im PCa nicht nur immer mehr Erkenntnisse über die Molekulargenetik des PCa, sondern auch neue Möglichkeiten der Diagnostik, Prognose und auch Therapie gewinnen lassen.

1.2. Molekulargenetik des PCa

Genmutationen und Kopienzahlveränderungen größerer DNA-Abschnitte spielen bei der Entstehung und Progression vieler Tumorentitäten eine entscheidende Rolle. Beim Prostatakarzinom findet man wie in vielen anderen soliden Tumorentitäten Verluste, aber auch Zugewinne von genetischem Material. Zu Verlusten an Erbinformation kommt es vor allem bei den Chromosomen 1q, 2q, 4p/q, 5q 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, 17p, 18q, 20q, 21q, 22q, zu Zugewinnen auf den Chromosomen 1q, 7, 8q, 16p und 17q. (26-28) In letzter Zeit sind besonders die Zugewinne des langen Armes des Chromosoms 8 (8q24) genauer erforscht und mit einer schlechteren Prognose des PCa in Verbindung gebracht worden. (29, 30)

Während primäre Prostatakarzinome eher wenige Punktmutationen aufweisen, sind diese vor allem beim PCa nach Antiandrogentherapie und beim metastasierten PCa zu verzeichnen. (1, 31) Dort treten auch Mutationen klassischer Tumorsuppressoren wie *p53* und *RB1* vermehrt auf. Dies gilt auch für die Deletion des Tumorsuppressorgen *PTEN*. Diese führt zusammen mit der Aktivierung einer katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase zu einer Überaktivität des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweges. Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist auch an der Entstehung des Prostatakarzinoms beteiligt, besonders aber an der Entwicklung der Androgenresistenz und stimuliert das Tumorwachstum besonders im kastrationsresistenten Prostatakarzinom. (32) Eine Untergruppe an PCa ist jedoch trotz normaler *PTEN*-Expression bei einer relativen 8q Amplifikation und *ERG* Überexpression mit einem hohen Risiko eines Rezidives assoziiert. (33-35)

Während primäre Prostatakarzinome eher weniger Mutationen aufweisen, sind diese vor allem beim PCa nach Antiandrogentherapie und beim metastasierten PCa zu verzeichnen. (36) All dies unterstützt die Hypothese, dass das Prostatakarzinom nicht als heterogene Gruppe angesehen werden kann.

Eine der wichtigsten Alterationen stellt die Genfusion von *TMPRSS2* und *ERG* dar. Die Fusion des Gens einer androgenabhängigen Serinprotease (*TMPRSS2*) mit dem eines ETS Transkriptionsfaktors (*ERG*) ist hauptsächlich beim Übergang der nicht-invasiven prostatichen intraepithelialen Neoplasie (PIN) zum invasiven Prostatakarzinom zu beobachten. (37) Sie führt zur Überexpression von *ERG* und scheint die Zellproliferation, die Differenzierung, aber auch die Apoptose im PCa entscheidend zu beeinflussen. (38, 39)

Die Genfusion kommt meist durch eine Deletion der DNA-Abschnitte zwischen den auf Chromosom 21 lokalisierten Genen *ERG* und *TMPRSS2* zustande, alternativ durch eine Translokation. Das entstandene Fusionsgen *TMPRSS2-ERG* ist für das PCa hochspezifisch und zählt somit zu den bedeutendsten Onkogenen dieser Tumorart. (40) Erstaunlicherweise korreliert eine Überexpression von *EZH2* (7q) mit dem *TMPRSS2-ERG* Rearrangement. *EZH2* kodiert für eine Histon-Methyltransferase und stellt eine der vier Kernkomponenten des PRC2 Polycomb-Komplexes dar. Dieses Protein katalysiert die Di- und Trimethylierung des Lysins 27 am Histon H3. (41) Im PCa führt die Überexpression von *EZH2* zu genspezifischen Veränderungen der Histonmodifikation und der Expression. (22, 42, 43) Erhöhte Expression der *EZH2* Methyltransferase korreliert mit einer schlechten Prognose bei Prostatakarzinompatienten und kann als Marker für fortgeschrittene Stadien beim PCa genutzt werden. (20, 25) Möglicherweise charakterisiert die Überexpression von *EZH2* eine genetisch instabile und besonders aggressive Untergruppe des PCa. (44)

Eine weitere wichtige Besonderheit stellt die Androgenabhängigkeit der Prostatakarzinome dar. Primäre Prostatakarzinome sind in ihrem Wachstum meist androgenabhängig und sprechen somit meist gut auf eine Antiandrogentherapie an. Bei einer kleinen Untergruppe von PCa Patienten besteht eine primäre Resistenz gegenüber der Antiandrogentherapie, bei fast allen entwickelt sich eine Resistenz sekundär unter der Behandlung. Die Mechanismen der Antiandrogen-Resistenz sind vielfältig. Unter anderem kann eine Erhöhung der Androgen-Sensitivität der Karzinomzellen durch Amplifikation des *AR*-Gens entstehen. Bestimmte Punktmutationen im *AR*-Gen bewirken, dass andere Steroidhormone an den Androgenrezeptor binden können und somit eine unspezifische Aktivierung hervorrufen. Weiterhin kann der Androgenrezeptor unabhängig von der Ligandenbindung durch Phosphorylierung aktiviert werden. Beim „Androgen-Bypass“ erhalten die PCa-Zellen durch alternative Signaltransduktionswege ihr Wachstum aufrecht und/oder hemmen die Apoptose bei Androgenmangel. Auf diese Weise kann der genannte PI3K/Akt-Signalweg wirken. Zudem verstärken diese Signalwege durch Stabilisierung der *AR*-Homodimere die transkriptionale Aktivität des Androgenrezeptors. In der Regel kommt es dadurch zu einer Sensibilisierung des Androgenrezeptors, sodass geringere Konzentrationen von Androgen nach Bindung am Rezeptor ein Signal auslösen. (32, 45) Interessanterweise interagiert AR auch mit verschiedenen physiologischen Inhibitoren des *PI3K/Akt* Signalweges, unter anderem mit der im PCa vermindert exprimierten Inositolphosphatase *INPP4B*. (46) Inositolphosphatasen regulieren die Substratkonzentration von PI3-Kinasen; ihre veränderte Expression im PCa könnte zur Tumorgenese beitragen.

Viele Vorgänge während der Tumorentstehung des PCa sind jedoch nicht durch Basenmutationen oder chromosomale Alterationen im Sinne der klassischen Genetik erklärbar.

1.3. Epigenetik des PCa

An der Entstehung einer malignen veränderten Zelle sind in der Regel genetische und epigenetische Störungen beteiligt. (47) Die genauen Mechanismen der Interaktion von genetischen und epigenetischen Einflüsse auf die Entstehung des PCa sind Gegenstand aktueller Forschungen. Bei der Entstehung des PCa ergänzen Veränderungen der DNA-Methylierung, von Histonenmodifikationen und bestimmter regulatorischer RNA-Moleküle (48) die genetischen Veränderungen durch Insertionen, Deletionen, chromosomale Translokationen oder Punktmutationen.

DNA-Methylierung wird durch die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) DNMT1, DNMT3A und DNMT3B katalysiert. Sie erfolgt an Cytosinen in Cytosin-Guanosin Dinukleotiden (häufig als CpG-Stellen bezeichnet). In CpG-Inseln genannten Abschnitten der DNA kommen diese gehäuft vor. Die dichte Methylierung von CpG-Inseln führt zur verminderten Genexpression oder zum Stilllegen von Genen. (49) Aberrante Methylierung von CpG-Inseln wird als Hypermethylierung bezeichnet und ist im primären wie metastasierten Prostatakarzinom nachgewiesen; mit der Progression der Erkrankung tritt eine globale Hypomethylierung hinzu. (50) Eines der am besten erforschten Beispiele dieser epigenetischen Regulation stellt das Gen *GSTP1* dar. Eine Hypermethylierung in seinem Promotorbereich führt zu einer signifikant verminderten Expression. In der benignen Prostatahyperplasie ist *GSTP1* gering oder gar nicht methyliert. Bereits in der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie, einer anerkannten Vorstufe des PCa, wird jedoch häufig ein kompletter Verlust der *GSTP1* Expression durch Hypermethylierung im Promotorbereich gefunden. Mittlerweile sind viele andere Gene im PCa bekannt, die durch Hypermethylierung im Promotorbereich in ihrer Expression vermindert oder komplett stillgelegt werden. (51, 52) Diese Veränderungen werden als Biomarker für die Detektion der Karzinome im (Exprimat-)Urin oder im Blut intensiv erforscht. (53)

Zu der Hypermethylierung von CpG-Inseln treten vor allem während der Progression des Prostatakarzinoms weitreichend Veränderungen des globalen DNA-Methylierungsmusters auf, wobei große Bereiche auch hypomethyliert werden können. (54) Die aberranten DNA-Methylierungsmuster gehen mit veränderten Histonmodifikationsmustern und veränderter Chromatinstruktur einher. (55) Dabei interagieren der Polycomb-PRC2-Komplex mit seiner H3K27me3 Methyltransferase und DNA-Methyltransferasen in komplexer Weise bei der Repression von Zielgenen. (56-58)

Einen zunehmenden Stellenwert in der Erforschung der Tumorgenese nehmen nichtkodierende RNA-Moleküle ein. Viele von ihnen sind in die epigenetische Regulation eingebunden. Unterschieden werden zum einen kleine nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, darunter die sogenannten microRNAs (miRNA). Obwohl diese nur ca. 1% unseres Genoms ausmachen, beeinflussen sie fast 30% der Genexpression, v.a. durch Regulation der Translation und der mRNA-Stabilität. Auf diese Weise können einzelne miRNAs je nach Zielgen als Tumorsuppressoren oder Tumorpromotoren wirken. MiRNAs beeinflussen die Zellzykluskontrolle, die Zellmigration und Invasion. Über Wechselwirkungen dieser RNA-Moleküle mit den miRNAs von DNMTs oder Histon-modifizierenden Enzymen wirken sie auf epigenetische Mechanismen ein. (59, 60) Beim PCa beeinflussen sie über Interaktionen mit *EZH2* und *HDAC1* sogar das androgenunabhängige Tumorwachstum. (61)

Als zweite Klasse werden zum anderen lange nichtkodierende RNAs (abgekürzt lncRNAs), d.h. > 200 b lange RNAs ohne offenen Leserahmen unterschieden. Zu ihnen zählt der bekannte Prostatakarzinombiomarker *PCA-3*, der in Ergänzung zum PSA Verwendung findet. (62) Die Funktionen von lncRNAs sind vielfältig, doch wirken viele über Interaktion mit Chromatinregulatoren wie *EZH2*. (63, 64)

Spezifische lncRNAs wie *XIST* sind auch an der Regulation der X-Chromosomeninaktivierung in weiblichen Säugetierzellen beteiligt, wobei sie ebenfalls mit Chromatinregulatoren interagieren. (65) Ein erheblicher Anteil der Gene im menschlichen Genom, welche einer elterlichen Prägung unterliegen (s. 1.4), kodiert für lncRNAs; darunter sind die bekanntesten *H19* und *MEG3*.

1.4. Genomisches Imprinting

Die Epigenetik beschreibt die Vorgänge, die sich über eine festgelegte DNA-Sequenz hinaus abspielen und somit der Ontogenese, der Zelldifferenzierung und letztendlich der individuell unterschiedlichen (Aus)Prägung des Phänotyps der Individuen zugrunde liegen. (47, 49) Epigenetische Mechanismen beeinflussen langanhaltend die Genexpression von proteinkodierenden, aber auch von nicht proteinkodierenden Genen, ohne die DNA-Sequenz als solche zu verändern. Ein auffälliges epigenetisch determiniertes Phänomen ist das "Genomische Imprinting", die elterliche Prägung bestimmter Gene. Diese werden in allen oder in ausgewählten Geweben, beispielsweise der Plazenta oder dem Gehirn, nur von einem Allel exprimiert. Welches Allel exprimiert wird, hängt dabei davon ab, ob das Gen auf dem väterlichen oder mütterlichen Chromosom ererbt wurde. Zu Beginn dieser Arbeit waren beim Menschen rund 80 elterlich geprägte Gene bekannt. Die unterschiedliche Expression der beiden Allele wird durch epigenetische Mechanismen eingestellt. Viele elterlich geprägte Gene sind in Genclustern organisiert - als Gencluster wird eine lokale Gruppierung funktionell miteinander gekoppelter Gene bezeichnet.

Die Prägung bestimmter Gene ist häufig durch eine unterschiedliche DNA-Methylierung von regulatorischen Regionen innerhalb geprägter Gencluster auf den beiden Allelen gekennzeichnet. Diese regulatorischen Regionen werden in der Terminologie als Imprinting-Kontrollregionen (ICR) oder als differentiell methylierte Regionen (DMRs) zusammengefasst. Neben der DNA-Methylierung sind Chromatinregulatoren wie die oben beschriebene Histonmethyltransferase *EZH2* an der Etablierung und vermutlich auch Erhaltung der elterlichen Prägung beteiligt. (51)

Da epigenetische Fehlregulationen während der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms zur globale Störung von DNA-Methylierungs- und Histonmodifikationsmustern führen, stellt sich die Frage, inwiefern sich diese auf die diffizile Erhaltung des genomischen Imprinting auswirken. Zudem sind, wie in 1.2 beschrieben, im PCa Zugewinne, vor allem aber Verluste bestimmter Chromosomenabschnitte zu verzeichnen (26-28, 66), die sich auf die monoallelisch exprimierten elterlich geprägten Gene besonders stark auswirken könnten.

Für diese Vermutung gab es zu Beginn dieser Dissertation vor allem Hinweise zu einer Region auf Chromosom 11p15. Das dort gelegene geprägte Gen *IGF2*, welches für den Wachstumsfaktor Insulin like growth factor codiert, scheint von zentraler Bedeutung im PCa zu sein. Ein Verlust der Heterozygotie dieser Region konnte schon früh mit der Tumorgenese des PCa in Zusammenhang gebracht werden. (67)

Auch im Colorektal-Karzinom wurden genetische und epigenetische Veränderungen von *IGF2* als mögliche Ursachen der Entstehung impliziert. Es ist bekannt, dass es schon früh zu einem Verlust des Imprinting verbunden mit einer Hypomethylierung der *IGF2/H19* Region kommt. (68) Dies führte zur Auffassung, dass *IGF2* schon in einem frühen Stadium dereguliert wird, eventuell sogar schon bevor die Zellen sich maligne verändern, und somit einen potentiellen Biomarker im Colonkarzinom darstellen könnte. (69) Untersuchungen am Gewebe von Prostatatumoren ergaben, dass die *IGF2* Expression zwar vermindert war, sich jedoch nicht spezifisch für das Karzinom darstellt. (70)

Unklar war jedoch, ob diese Veränderungen auf spezifischen Störungen eines einzelnen geprägten Gens beruhen oder im Gegenteil sogar Ausdruck eines im Prostatakarzinom vorherrschenden „epigenetischen Chaos“ darstellen könnten. Auch einige andere elterlich geprägte Gene nehmen auf den IGF(2)-PI3K-Signalweg Einfluss und könnten somit durch Dysregulation eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression spielen. Schließlich wird die Hypothese diskutiert, ob die Veranlagung von Zellen maligne zu entarten, schon über epigenetische Mechanismen und Gene wie *IGF2* in früher Kindheit angelegt ist und somit zur Tumorentstehung prädisponiert. (70, 71)

1.5. Microarray-basierte Genexpressionsanalysen und die Oncomine® Datenbank

Die Microarray-Genexpressionsanalyse stellt eine Weiterentwicklung des bekannten Northern Blots dar und erlaubt die gleichzeitige Analyse der mRNA-Spiegel Tausender Gene. Bei älteren Verfahren wie dem Northern Blot werden die zu quantifizierenden Zielmoleküle, in der Terminologie als „targets“ bezeichnet, auf eine Membran aufgebracht und fixiert. Danach erfolgt die Hybridisierung mit radioaktiven oder fluoreszenzmarkierten Sonden. Im Gegensatz hierzu werden bei der Microarray Technologie bekannte DNA-Moleküle oder Oligonukleotide, sogenannte Sonden oder engl. „probes“, mit den zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten target-Nukleinsäuren hybridisiert. Als Trägermaterial dienen Glas oder Kunststoffe. Die Stellen, auf die die Sonden für ein Gen aufgebracht werden, werden als „Spots“ bezeichnet. Das Neuartige an der Mikroarray-Technologie ist die sehr hohe Dichte der Spots, mit der viele Tausend verschiedener Sequenzen nebeneinander auf einen Träger aufgebracht und parallel mit Hilfe von Robotern und Computern analysiert werden können. Somit können mit Microarrays eine große Anzahl von Sequenzen auf kleinstem Raum in minimaler Zeit analysiert werden.

Eine der neu auftretenden Schwierigkeit der Microarray-Forschung besteht darin, die große Masse an Daten untereinander zu vergleichen. Dies wird dadurch zusätzlich erschwert, dass verschiedene Arrays und Detektionsverfahren zur Verfügung stehen und selbst in Studien mit ähnlicher Fragestellung verschiedene solcher "Plattformen" verwendet werden. Um mehrere Datensätze aus verschiedenen Plattformen für die Forschung einfacher zugänglich zu machen, etablierte die Forschergruppe um Rhodes et al. im Jahre 2004 die Microarray-Datenbank Oncomine®. Hier konnte zum ersten Mal auf Ergebnisse unterschiedlicher Forschungsgruppen unkompliziert zugegriffen und diese unter benutzerdefinierten Kriterien verglichen werden. (72-74) Auch wenn die in Oncomine® hinterlegten Datensätze aus unterschiedlichen Zielsetzungen entstanden sind, tragen sie in der Gesamtheit eine Anzahl an Daten zusammen, die unmöglich in einem einzigen Experiment realisierbar wären. So wurde zum Beispiel durch eine in Oncomine® verfügbare Analyse das rekurrente genomische Rearrangement im PCa entdeckt, das zur Fusion des 5'-Endes von *TMPRSS2* mit dem *ERG* Gen aus der ETS-Familie führt. (37, 75) Andere Studien in Oncomine® konzentrierten sich auf die unterschiedliche Genexpression im PCa zwischen verschiedenen Stadien und Malignitätsgraden. (76) Auch Studien mit spezieller Zielsetzung, wie die Entdeckung der Überexpression von Hepsin, einer Serinprotease, in PCa-Geweben, welche womöglich einen pharmakologischen Angriffspunkt darstellen könnte, wurden im Datenpool von Oncomine® realisiert. (77) Zusammenfassend wurde es mit dieser globalen Datenbank möglich, eine suffiziente und valide Voranalyse auf Basis eines umfassenden Datenpools zu erstellen, der einfach zugänglich und relativ kostengünstig verfügbar ist. Selbstverständlich sollte bei jeder Voranalyse, die sich nur auf in Oncomine® hinterlegte Daten stützt, hinterfragt werden, wie valide die Daten sind. Die internen Qualitätskriterien sind zwar auf www.Oncomine.com einsehbar; aber nicht bei allen öffentlich zugänglichen Microarray-Datensätzen sind sie angewandt.

2. Ziele der Arbeit

Bei der Tumorentstehung und der Tumorprogression des PCa sind multiple molekulare Veränderungen involviert, wobei epigenetische Veränderungen eine zentrale Rolle spielen. Wieweit Veränderungen des genomischen Imprinting auch beim PCa vorkommen, ist abgesehen von einigen Untersuchungen zu *IGF2* kaum erforscht. (70, 78, 51)

Es ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- Welche derzeit bekannten elterlich geprägten Gene sind im Prostatakarzinom signifikant in ihrer Expression verändert?
- Sind die in ihrer Expression veränderten Gene in Clustern organisiert?
- Wenn ja, weisen die in gemeinsamen Clustern organisierten elterlich geprägten Gene koordinierte Expressionsveränderungen auf?
- Gibt es systematische Zusammenhänge der Veränderungen untereinander?
- Ist erkennbar, dass elterlich geprägte Gene einander in einem Netzwerk wechselseitig regulieren?
- Gibt es Hinweise, dass Veränderungen der Genexpression elterlich geprägter Gene im PCa mit bekannten Alterationen in epigenetischen Mechanismen korrelieren, speziell der Überexpression der Histonmethyltransferase *EZH2*, die auch am Imprinting beteiligt ist?
- Lassen sich die Genexpressionsänderungen in geprägten Genen durch genetische Mechanismen, besonders durch Chromosomenverluste oder –zugewinne erklären?
- Könnten einige dieser Gene oder ihre Genprodukte als Biomarker für die Diagnostik und Prognostik des Prostatakarzinoms in Frage kommen?

Diesen Fragestellungen wurde *in silico* mit Hilfe der Microarray Datenbank Oncomine®™ nachgegangen. Anschließend wurden die

Ergebnisse aus diesem Ansatz mit einer unabhängigen Referenz-Studie verglichen, um die Befunde zu validieren und auf ihre Qualität hin zu sichern.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Hard- und Software

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit diente ein Apple MacBook Pro 15'' mit 8 GB 1076 MHz DDR3 und 2,66 GHz Intel Core i7. Als voll-Unix System wurde Mac OS X Version 10.6.x-10.8.x verwendet. Zur einfachen Tabellenkalkulation wurde mit Apple Numbers '09 Version 2.1 und Microsoft Excel für Mac 2011 Version 14.1.2 gearbeitet. Fortgeschrittene Fragestellungen und die Bearbeitungen der deskriptiven Statistik wurden mit der Statistik Software R/R64 2.11.1 GUI 1.34 Leopard build 64-bit (5589) gelöst. Zur Vereinfachung wurde in R/R64 das Package R commander installiert. Beides kann als open source Software unter <http://www.r-project.org/> heruntergeladen werden.

Die Konsolenbefehle in R/R64 wurden selbst erstellt oder modifiziert, einige wurden direkt aus R-Commander übernommen.

3.2. Erstellen der Genliste

Bevor die Arbeit beginnen konnte, wurde eine Auswahl an Genen getroffen, die analysiert werden sollen. Zu diesem Zeitpunkt galten beim Menschen laut www.geneimprint.com 62 Gene gesichert als elterlich geprägt (imprinted). Diese Gene sollten in ihrer Gesamtheit in dieser Arbeit, *in silico*, auf ihre Veränderungen im Prostatakarzinom analysiert werden.

3.3. Recherche der Genliste unter Oncomine®™ Version 4.3 auf RNA-Basis

Alle 62 Gene wurden in Oncomine® Version 4.3 unter www.Oncomine.org auf ihre Genexpression im PCa untersucht. Anfangs wurde mit einem Free-Account gearbeitet, im weiteren Verlauf wurde für eine Woche eine „trial premium version“ geordert, um alle Gene auf „Concepts“ gezielt zu analysieren. Hierzu wurde die in Oncomine® integrierte Filterfunktion verwendet. Im ersten Schritt wurden nur Genexpressionsdaten analysiert, die unter die Filter „cancer type: Cancer vs. normal“, „analyses type: Prostate Cancer“, „data type: mRNA“ fielen.

Es wurde darauf geachtet, dass bei den gefilterten Studien nur Gewebeproben die Grundlage bilden (also nicht Zelllinien). Bei Etablierung dieser Filter wurden 13 Studien von Oncomine® ausgegeben, die im Folgenden die Grundlage der Suchen darstellen (Tabelle 1).

Jedes einzelne Gen wurde mit seinem Gen-Namen nach HGNC Nomenklatur mit Hilfe der Suchfunktion in Oncomine®™ gesucht. Die Gene wurden in jeder Studie mit dem drop down Menu „ordered by“ zum einen nach „over-expression: generank“ und zum anderen nach „under-expression: generank“ analysiert. Für die Parameter „p-value“, „Fold change“, und „Gene rank“ wurde jeweils „all“ ausgewählt. Nun wurde für jedes einzelne Gen in jeder Studie eine Boxplot Grafik erstellt, um die dazugehörigen Signifikanzen in Form des p-Wertes auszulesen. Um diese Grafik auszuwählen, wurde im Feld „differential analysis“ der Boxplot-Button bestätigt, um die gewünschte Darstellungsoption zu erlangen. Der p-Wert beschreibt das Ergebnis des Signifikanztests zur Prüfung der aufgestellten Nullhypothese. In Oncomine® basiert der p-Wert auf dem Student'schen t-Test. Ist der p-Wert kleiner als das vorab gewählte Signifikanz-Niveau, gilt das Ergebnis als statistisch signifikant. (79) Zur Veranschaulichung wurde mit einer weiteren integrierten Funktion von Oncomine®™ eine grafische Darstellung aller Genexpressionen von benignen und Primärtumorgewebe über alle Studien hinweg angefertigt. Hierbei wurde zunächst kein Gen ausgewählt und alle Studien, die unter die beschriebenen Filter fallen, im Feld „Datasets“ auf der „compare“ Linie markiert. Nun wurde jedes Gen in die Suchfunktion eingeben, um in den ausgewählten Studien grafisch verglichen zu werden. In dieser grafischen Darstellung folgt die Farbkodierung der „log₂ median-centered intensity“. Je blauer der Farbton, umso niedriger ist ein Gen exprimiert, je roter der Farbton, umso höher ist die Expression des jeweiligen Gens. Ist das Feld weiß, ergibt sich die Expression im Vergleich der Gewebe als unverändert. Ist ein Gen in der jeweiligen Studie nicht gemessen worden, wird das zugehörige Feld grau unterlegt (vgl. Abb. 4 und folgende). Der „Gen-

Rang“ beschreibt den Rang eines Gens in der Gesamtheit aller Studien, die dieses Gen gemessen haben. Hier gilt, dass das Gen mit dem niedrigsten p-Wert, also höchster Signifikanz, den Rang 1 bekommt, das mit dem höchsten p-Wert den höchsten Rang. Obwohl nur 14 Studien in Oncomine® unter den oben genannten Einstellungen gelistet waren, werden 16 Vergleichsstudien angezeigt. Die Studie von Tomlins et al. ist in drei Untergruppen unterteilt und untersucht jeweils normales Prostatagewebe gegen BPH, PIN und Karzinomgewebe. (80)

3.4. Auflisten der signifikant veränderten und nicht signifikant veränderten Genexpressionen

Datenset	Datentyp	Array Typ	Proben	Quelle
Holzbeierlein	mRNA	Human Genome U95A-Av2 Array Measured 8,603 genes, 12,651 reporters	50 PCA Primärtumore, 4 Normalgewebe	Am J Pathol 2004/01/01
Lapointe	mRNA	Tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) Measured 10,166 genes, 19,116 reporters	62 PCA Primärtumore, 41 Normalgewebe, 9 PCA Metastasen	Proc Natl Acad Sci U S A 2004/01/20
LaTulippe	mRNA	Human Genome U95A-Av2 Array Measured 8,603 genes, 12,651 reporters	32 PCS Primärtumore, 3 Normalgewebe	Cancer Res 2002/08/01
Liu	mRNA	Human Genome U133A Array Measured 12,624 genes, 22,283 reporters	44 PCA Primärtumore, 13 Normalgewebe	Cancer Res 2006/04/15
Luo	mRNA	Hu35KsubD Array, Hu35KsubC Array, Human Genome U95A-Av2 Array, Hu35KsubB Array, Hu35KsubA Array Measured 15,302 genes, 47,061 reporters	15 PCA Primärtumore, 15 Normalgewebe	Mol Carcinog 2002/01/01
Magee	mRNA	HumanGeneFL Array Measured 5,338 genes, 7,133 reporters	8 PCA Primärtumore, 3 PCA Metastasen, 4 Normalgewebe	Cancer Res 2001/08/01
Singh	mRNA	Human Genome U95A-Av2 Array Measured 8,603 genes, 12,651 reporters	52 PCA Primärtumore, 50 Normalgewebe	Cancer Cell 2002/03/01
Tomlins	mRNA	Platform not pre-defined in Oncomine Measured 10,656 genes, 19,928 reporters.	101 PCA Primärtumore	Nat Genet 2007/01/01
Vanaja	mRNA	Human Genome U133A Array, Human Genome U133B Array Measured 17,779 genes, 44,928 reporters	32 PCA Primärtumore, 8 Normalgewebe	Cancer Res 2003/07/15
Varambally	mRNA	Human Genome U133 Plus 2.0 Array Measured 19,574 genes, 54,675 reporters	13 PCA Primärtumore, 6 Normalgewebe	Cancer Cell 2005/11/01
Wallace	mRNA	Human Genome U133A 2.0 Array Measured 12,603 genes, 22,283 reporters	69 PCA Primärtumore, 18 Normalgewebe	Cancer Res 2008/02/01
Welsh	mRNA	Human Genome U95A-Av2 Array Measured 8,603 genes, 12,651 reporters	25 Primärtumore, 9 Normalgewebe	Cancer Res 2001/08/15
Yu	mRNA	Human Genome U95A-Av2 Array Measured 8,603 genes, 12,651 reporters	64 PCA Primärtumore, 25 PCA Metastasen, 23 Normalgewebe	J Clin Oncol 2004/07/15

Tabelle 1: Verwendete Datensätze der Datenbank Oncomine®, Stand 01.01.2012 (1, 31, 72, 76, 77, 80-89)

Um einen Überblick über die Ergebnisse in Oncomine® zu bekommen, wurden alle signifikanten und nicht signifikanten Veränderungen der Genexpression in einer gesonderten Tabelle zusammengestellt. Hierzu wurden mit Hilfe von Apple Numbers zwei Tabellen erstellt. Folgende

Parameter wurden als Spalte dargestellt: Gen, Lokalisation, Imprint (maternal oder paternal), Gesamtstudienzahl, p-Wert bei Überexpression, Zahl der Studien, die eine Überexpression beobachteten, p-Wert bei Unterexpression, Zahl der Studien, die eine Unterexpression beobachteten. Dies ergab eine Tabelle der signifikant veränderten Gene mit 12 Genen und eine Tabelle mit 40 nicht signifikanten Genen.

3.5. Auflisten der Gene, die nicht in Oncomine®™ registriert sind

Die Gene, die nicht in Oncomine®™ zu finden waren, jedoch unter die in 3.3 definierte Genliste fallen, wurden gesondert gelistet. Hierzu wurde lediglich der Genname, die Lokalisation und die Art der Prägung recherchiert.

3.6. Analyse der Genexpression von *EZH2* in Oncomie™

Um einen Zusammenhang mit der *EZH2*-Expression nachvollziehen zu können, wurde neben den 62 geprägten Genen weiterhin die Genexpression von *EZH2* in Oncomine® analysiert. Es wurde wie in 3.4. verfahren.

3.7. Detaillierte Analyse der Genexpression aller signifikant veränderten Gene

Die detaillierte Analyse der Genexpression erfolgte für die 12 signifikant veränderten Gene und *EZH2*. Hierzu wurde eine neue Tabelle erstellt, die neben den schon bekannten Parametern nun auch die „Foldchange“ und die Mediane der Genexpression sowohl im Normal-Gewebe als auch im Primärtumor enthält. Die Mediane konnten für jeden einzelnen Reporter aller Studien aus den Boxplotdiagrammen für jedes Gen in Oncomine® ausgelesen werden. Diese Tabelle wurde als duche ein Leerzeichen getrennter Text im „.txt Format“ gespeichert, um somit in R/R64 im nächsten Schritt eingelesen zu werden. Als Importeinstellungen wurden der Name als „Datenmatrix1“, die Datenfeldtrennzeichen als Leerzeichen, das Zeichen für fehlende Werte als „NA“ und die Dezimaltrennzeichen als Komma gewählt.

Die eingelesene Datenmatrix¹ enthält 91 Zeilen und 14 Spalten. Jedes Gen entspricht einer Spalte, die Zeilen sind die Gesamtheit aller aus Oncomine® exportierten Daten der 13 Studien. Weil sowohl Überexpression und Unterexpression des Gens *SNRPN* signifikant verändert waren, wurden die Expressionsmediane von *SNRPN* sowohl für die Über- als auch Unterexpression gelistet. Mit Hilfe von R/R64 wurden nun Boxplots der Mediane der relativen Genexpression von Normal- und von Tumorgewebe erstellt. Diese Grafiken wurden für jedes Gen angefertigt. Um in R/R64 gruppenbezogene Grafiken zu erstellen, musste zuerst die Variable für Tumor und die für Normalgewebe übereinander platziert werden. Die neue Variable wurde als „Mediane der relativen Genexpression“ und der neue Faktor als jeweiliger Gen-Name definiert.

Hierbei ist zu beachten, dass die Unterfunktionen „yaxt“ und „axis“ für jedes Gen neu definiert wurden. „Yaxt“ beschreibt den Vektor und „axis“ den anzuzeigenden Wertebereich der Y-Achse. Die Unterfunktion `pars=list` mit den Gruppen „whisklty“, „whisklwd“ und „whiskcol“ beschreibt das grafische Format des zu erstellenden Boxplots. Das Format der Achsen für Boxplot-Diagramme wurde mit dem Befehl „`par(las=1)`“ definiert, sodass beide Achsen auf gerade Zahlen genormt sind.

3.8. Berechnung und Darstellung der Korrelation der Expression aller signifikant veränderten Gene mit der Expression von *EZH2*

Um die Korrelation der einzelnen Gene mit *EZH2* zu berechnen, wurde die Methode nach Pearson gewählt. Es gilt die Annahme, dass die Grundgesamtheit der Daten normalverteilt ist.

Nachdem die Korrelation nach Pearson bestimmt wurde, sollte diese auf ihre Signifikanz getestet werden.

Signifikanz wie auch die Pearson'sche Korrelation wurden später in die fertigen Grafiken als p-Wert und r-Wert eingetragen. Zur graphischen Veranschaulichung der Korrelation wurde das Streudiagramm mit Boxplot an den Achsen und Kleinst-Quadrat Linie gewählt. Die Werte von

EZH2 wurden immer als X-Achsen-Werte definiert und die jeweiligen Werte des darzustellenden Gens als Y-Wert.

Die berechneten Korrelationen und die zugehörigen Wahrscheinlichkeiten wurden zum späteren Vergleich mit einer ausgewählten Kontrollstudie in einer Excel-Tabelle zusammengefasst.

3.9. Analyse der DNA-Dosis-Veränderung aller signifikant veränderten Gene

Neben der Analyse der Genexpression wurde auch die Gendosisveränderung der 12 signifikant veränderten Gene analysiert. Dazu wurde die COPA-Methode eingesetzt.

Die Cancer Outlier Profile Analysis, kurz COPA, ist eine Methode zur Bewertung und zum Aufstellen einer Rangfolge von Genen; es werden somit chromosomale Veränderungen in Unterguppen dedektiert. Mit Hilfe dieser Analyse wurden im Jahr 2005 rekurrente chromosomale Translokationen bzw. Deletionen im PCa entdeckt, die zur Fusion des 5'-Bereichs des androgen-induzierbaren *TMPRSS2*-Gens mit einem Gen aus der ETS-Familie führt. (37, 75) Ein hoher COPA-Wert eines bestimmten Gens zeigt eine hohe Signifikanz für das einzelne Quantil des entsprechenden Gens. Signifikant veränderte Gene werden in eine Rangfolge gesetzt. Ein hoher Gen-Rang (z.B. 1) sagt aus, dass nur wenige Gene in dem jeweiligen Datenset existieren, die im Vergleich zum ausgewählten Gen signifikant verändert sind und somit das Gen ein „Ausreißer“ Outlier in diesem Datensatz ist. (75)

Um die Gendosisveränderungen darzustellen wurden in Oncomine®™ folgende Filter verwendet: „Data Type: DNA“, „Cancer Type: Prostate Cancer“, „Analysis Type: Outlier Analysis“. Somit konnten die Daten in zwei Datensets recherchiert werden. (Tabelle 2)

	Datentyp	Array Typ	Proben	Plattform	Quelle
Demichelis	DNA	RefSeq Genes (UCSC refGene, July 2009, hg18, NCBI 36.1, March 2006) Measured 18,823 genes, 19,084 reporters	49 PCA Primärtumore	Affymetrix 250K Sty SNP platform	Genes Chromosomes Cancer 2009/04/01
Taylor	DNA	RefSeq Genes (UCSC refGene, July 2009, hg18, NCBI 36.1, March 2006) Measured 18,823 genes, 19,084 reporters	218 PCA Proben=181 Primärtumor und 37 Metastasen, 7 Xenografts und 6 Zelllinien	Agilent 244A CGH platform	Cancer Cell 2010/07/13

Tabelle 2: Verwendete Datensätze der Veränderung der Gendosis, Stand 01.04.2012

Für jedes Datenset wurden in Oncomine® das 5%, 10%, 25%, 75%, 90% und 95% Quantil der Ausreißer (Outlier) dargestellt. Jedes der 12 zuvor in der RNA-Analyse als signifikant gefundenen Gene wurde für die 5%, 10%, 15%, 75%, 90% und 95% Quantile analysiert. In dieser Analyse basiert der durch Oncomine® berechnete Genrang auf dem COPA-Wert. Der COPA-Wert ist der transformierte Expressionswert des jeweiligen Gens. Die COPA-Werte der oben beschriebenen Quantile wurden nun verwendet, um die 12 signifikant veränderten Gene in einer Excel-Tabelle aufzulisten. Hierbei wurden für jede Studie jeweils sechs Spalten mit den zugehörigen COPA-Werten erstellt. Von allen COPA-Werten eines Gens wurde über alle Messungen der Mittelwert berechnet. Dieser dient als Grundlage für die Bewertung, ob die Genkopienzahl eines Gens bedeutsam erhöht oder vermindert ist.

3.10. Oncomine®™ Premium Research

Alle gefundenen Ergebnisse wurden unter Oncomine®™ Version 4.4 mit einem Premium Research account nochmals validiert. Hierzu wurde ein Trial Premium Account bei der Firma Compendia Bioscience bestellt. Hiermit war es möglich, zwei Genlisten in einer Rich text Format Datei zu erstellen. Diese beiden Dateien konnten nun in ein zuvor freigeschaltetes „My Concept Konto“ in Oncomine®™ hochgeladen werden. Es war zu beachten, dass die Gene dieser Liste als HUGO Gene Symbole formatiert sein müssen. Damit war es nun möglich, alle unter 3.2. definierten elterlich geprägten Gene auf einmal in allen Studien darzustellen. Weiterhin wurde eine Liste der 12 signifikant veränderten Gene erstellt, die ebenfalls nun im direkten grafischen Vergleich darzustellen war. Um dies zu bewerkstelligen, wurde in die unter 3.3.

beschriebene Filterfunktion von Oncomine®™ der Filter „My concepts“ etabliert.

3.11. Recherche nach einer geeigneten Kontrollstudie

Oncomine®™ ist zwar eine anerkannte Plattform zur genomweiten Expressionsanalyse, jedoch sollten die gefundenen Ergebnisse an einer unabhängigen, wissenschaftlich anerkannten Studie kontrolliert und validiert werden. Zu diesem Zweck wurde die weithin als hervorragend eingeschätzte genomweite Expressionsanalyse der Arbeitsgruppe Taylor et al. (1) aus dem Jahr 2010 als Referenz verwendet. Diese Studie ist ebenfalls in Oncomine® gelistet, aber nur das DNA-Datenset, sodass sie für die RNA-Daten einen guten unabhängigen Vergleich darstellt. Außerdem sind diese Daten in dem cBio Cancer Genomics Portal unter <http://www.cbioportal.org/public-portal/> gut und anschaulich verfügbar. Die Daten wurden vom Server des cBio Cancer Genomic Portal heruntergeladen und in eine Text-Datei transponiert. Hiermit war es möglich, die Daten unter anderen Gesichtspunkten als die Arbeitsgruppe Taylor et al. (1) selbst zu analysieren. Die Proben dieses Datensatzes setzen sich wie in Tabelle 3 beschrieben zusammen. Es handelt sich hierbei um eine typische Screening Population aus den USA, was u. a. am Alters-Median von 58,3 Jahren erkennbar ist (Tabelle 3).

Allgemein		Klinisches Staging	
Primärtumore (mRNA)	181	cT1c	95 (52,4%)
Normal mRNA	30	cT2	76 (42%)
		cT3	9 (5%)
		cT4	0
Gleason Score		Alter	
5	2 (1%)	Median	58,3
6	101 (56%)	Mittelwert	58,3
7	61 (34%)	Standardabweichung	7
8	11 (6%)	Min-Max	37,3 - 83
9	6 (3%)		
Abstammung		PSA (ng/ml)	
afroamerikanisch	29 (16,1%)	Median	6
Asiatisch	4 (2,2%)	<4	31 (17,2%)
Weiß spanisch	0	4 - 10	105 (58,5%)
Weiß nicht spanisch	142 (78,5%)	>10	44 (24,5%)
Unbekannt	6 (3,3%)		

Tabelle 3: Auflistung der klinischen und Populationsparameter des Datensatzes von Taylor et al. (1) (Radikale Prostatektomie am Memorial Sloan Kettering Cancer Center)

3.12. Kontrolle und Validierung der gefundenen Ergebnisse

Die in 3.10. beschriebenen Daten wurden zur Validierung und Sicherung der Ergebnisse aus Oncomine®™ verwendet. Zuerst wurde die log₂ normierte Tabelle in Microsoft Excel importiert, um alle Werte für Tumor- und Normalgewebe auszuwählen. Die Werte für Zelllinien und Zellkulturen wurden nicht berücksichtigt. Danach wurde die Tabelle auf die Genexpressionswerte der 12 signifikanten Gene und die von *EZH2*, *AMACR*, *HOXB13* und *FOXA1* beschränkt. Diese Werte wurden in mit Tabstopp getrenntem Textformat gespeichert, um in R/R64 eingelesen zu werden. Zuerst wurde in R/R64 für jedes Gen mit dem T-Test für gepaarte Stichproben die Signifikanz der Messung berechnet. Nun wurde wie in Abschnitt 3.7. für jedes einzelne Gen ein Boxplot-Diagramm erstellt, in welches die zuvor berechnete Signifikanz eingetragen wurde. Die gleiche Methodik wie für alle 12 Gene und *EZH2* wurde für das Gen *AMACR* angewendet. *AMACR* wurde ausgesucht, da es als anerkannter Marker für das Prostata-Karzinom anzusehen ist und in zahlreichen Studien im PCa eine signifikante und deutliche Überexpression zeigte. (90, 91) Die Genexpression von *HOXB13* und *FOXA1* diente als Orientierung dafür, wie sich eine Korrelation nach Pearson in diesem Probensatz darstellt, wenn zwei Gene einander direkt regulieren. (92, 93) Es wurde für *HOXB13* und *FOXA1* ebenfalls ein Streudiagramm angefertigt, welches die Korrelation grafisch darstellt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Korrelation der Expression im Normalgewebe wie auch die im PCa-Gewebe erfasst wird. Auch in diesem Datenset wurden die Genexpressionen aller 12 zuvor als signifikant eingestuftene Gene mit der von *EZH2* verglichen. Dies wurde auch grafisch dargestellt. Es konnte die gleiche Methodik wie in 3.8. verwendet werden.

Neben den Daten der Genexpressionsveränderung wurden auch die DNA-Dosisveränderungen auf Basis der COPA-Methode aus Oncomine®™ validiert und mit geeigneten Kontrollstudien überprüft. Hierzu dienten zwei genomweite CGH-Microarray Studien als Grundlage. (26, 66) In diesen wurden die Stellen im Genom herausgefiltert, die sich in den jeweiligen Studien als signifikant verändert erwiesen. Diese wurden mit den COPA-Daten aus Oncomine® verglichen. Die Proben von Liu et al. umfassen 22 pathologisch gesicherte Prostata-Primärtumore, die mit radikaler Prostatektomie entfernt wurden. Somit bietet diese Studie einen direkten Vergleich zu den Daten aus Oncomine®. Um einen Vergleich zu detaillierten Daten aus Zelllinien-Experimenten zu bekommen, wurde die Studie von Saramäki et al. herangezogen. Diese Studie verwendete die LNCaP, DU145, PC-3 und 22Rv1 PCa Zelllinien, die alle von der American Type Culture Collection (Manassas, VA) erhältlich sind. Aus beiden Arbeiten wurden die DNA-Dosisveränderungen herausgearbeitet und nach chromosomaler Lokalisation geordnet. Außerdem wurden der Startpunkt und das Ende der Alteration in Basenpaaren notiert. Die Länge der beschriebenen Region wurde ebenfalls in Basen-Paaren berechnet. Um festzuhalten, welche Gene die veränderte Region enthält, wurde mit Hilfe des NCBI Map Viewer (Homo sapiens genome view, ^[L]_[SEP]Build 37.3) unter

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606 jede einzelne Region auf ihre enthaltenen Gene untersucht. Alle gefundenen Daten wurden in einer Numbers-Tabelle gelistet und mit denen der in Oncomine® gefunden COPA Alterationen verglichen.

.

3.13. Clustering der Gene im Taylor-Datensatz

Der unter 3.10. beschriebene Datensatz wurde weiterhin verwendet, um die Expression der 12 gefundenen Gene insgesamt auf Korrelationen zu untersuchen.

Hierzu wurden verschiedene statistische Verfahren verwendet, um eine Clusteranalyse durchzuführen. Neben den 12 in 3.3. gefundenen Genen

wurden wiederum *AMACR* und *EZH2* analysiert. Zuerst wurde eine Clusteranalyse erstellt, die auf dem paarweisen Korrelationsabstand basiert. Die Expressionswerte der Gene wurden vorab standardisiert, da nur die relative und nicht die absolute Veränderung dargestellt werden sollte. Ausgehend von den 14 Genen wird der Korrelationsabstand paarweise wie folgt berechnet:

$$d(x_i, x_j) = 1 - \text{Cor}(x_i, x_j) \quad i, j = 1, \dots, 14.$$

Damit ergibt sich eine symmetrische 14x14 Distanzmatrix, die jedem Paar von Gen i und j einen Wert $d(x_i, x_j)$ als deren Abstand zuordnet. Ausgehend von der Start-Partition, die jedem Gen ein eigenes Cluster zuordnet, werden im ersten Verfahrensschritt die Gene zusammengefasst, welche den geringsten Abstand $d(x_i, x_j)$ zueinander aufweisen. Auf der y-Achse werden diese Abstandsmaße abgebildet. Auf jeder Stufe werden die einander nächsten Cluster (diejenigen mit dem geringsten Abstand) miteinander vereint. Die Höhe der Verbindungslinie steht für den Korrelationsabstand $d(x_i, x_j)$ der Cluster, die zu einem neuen Cluster zusammengefügt werden. Je kleiner der Abstand, desto ähnlicher sind die zu einem Cluster zusammengefassten Gene. Abstände > 1 entstehen, wenn zwei Gene negativ korreliert sind (z.B. $\text{COR}(\text{HYMAI}, \text{SGCE}) = -0.18$), da sich der Abstand zwischen den beiden Genen wie folgt berechnet: $1 - (-0.18) = 1.18$. Zwei vereinigte Cluster repräsentieren einen neuen Knoten des Clusterdiagrammes. Sobald ein Cluster aus mehreren Genen besteht, ist jenes Verfahren zu wählen, nach dem die Abstandsberechnung zwischen den neuen und übrigen Clustern erfolgen soll.

Seien G und H zwei Cluster, bestehend aus jeweils n_i bzw. n_j Genen. Weiter sei $i \in G$ und $j \in H$. Nun wurde unter dem Single-Linkage-Verfahren der minimale Abstand zwischen einem Gen aus Cluster G und einem Gen aus Cluster H betrachtet.

$$D(G, H) = \min\{d(x_i, x_j)\}, i \in G, j \in H$$

Das Complete-Linkage-Verfahren bestimmt das neue Distanzmaß, indem der maximale Abstand zwischen einem Gen aus Cluster G und einem Gen aus Cluster H berechnet wird:

$$D(G,H) = \max\{d(x_i, x_j)\}, i \in G, j \in H$$

Das Ward-Verfahren beruht auf der Minimierung des Heterogenitätsmaßes, welches die Fehlerquadratsumme als Homogenitätskriterium wählt. Die Homogenität innerhalb einer Klasse wiederum wird anhand der Varianz gemessen, die durch die Vereinigung zweier Cluster zunimmt. Im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren werden also diejenigen Cluster vereinigt, die den Homogenitätsverlust minimieren:

$$D(G,H) = \min_{i,j} n_i n_j \| \bar{x}^i - \bar{x}^j \|^2$$

Damit impliziert das Verfahren die Fusion derjenigen Gruppen, welche die Fehlerquadratsumme am geringsten erhöhen. Alle anderen Grafiken und Analysen wurden mittels des Average-Linkage-Verfahrens erstellt, welches den mittleren Abstand verwendet:

$$D(G,H) = \frac{1}{n_G n_H} \sum_{i \in G, j \in H} d(x_i, x_j)$$

Die Distanzmatrix wird in jedem Schritt neu berechnet, wobei der neue Knoten im Diagramm die zwei vereinigten Cluster ersetzt. Vereinigt werden die Cluster, die gemäß der reduzierten Distanzmatrix den geringsten Abstand aufweisen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. In silico Genexpressionsanalysen in Oncomine®™

4.1.1. Signifikant veränderte Genexpression

Von 62 Genen, die laut Genimprint.com definitiv elterlich geprägt sind (Stand 01.07.2009), waren im ersten Schritt 12 Gene über alle Studien hinweg signifikant verändert (Abb. 1 und 2) oder zeigten eine deutliche Tendenz, wenn das Signifikanzniveau bei $p=0,05$ festgelegt wird. Ein p -Wert $p<0,001$ gilt als hochsignifikant. Abweichung zu einem niedrigeren Signifikanzniveau im Intervall von $0,05 > p > 0,1$ wurde toleriert, wenn Gene in einem Cluster organisiert sind.

Als einziges Gen über alle Studien hinweg signifikant überexprimiert war *PPP1R9A* mit einem p -Wert von $p=0,03$. *GNAS* zeigt eine Tendenz der Überexpression, mit einer Signifikanz von $p=0,017$. Die restlichen 10 Gene waren im Prostatakarzinomgewebe eher vermindert. Eine signifikante Unterexpression wiesen vier (*SGCE*, *MEG3*, *INPP5F*, *PEG3*) von 12 Genen auf; nur die Unterexpression von *CDKN1C* war hochsignifikant. Bei den Genen *PLAGL1*, *PEG10*, *NDN* zeigte sich eine Tendenz zur signifikanten Unterexpression. Sie wurden weiter betrachtet, da sie wie oben erwähnt in Clustern organisiert sind. (Abb. 4)

Gen Symbol	Gen Produkt	Chromosomale Lokalisation	Expression	Differenzierte Expression im PCA	Anzahl an Studien			Gesamtanzahl der Studien	
					überexprimiert	p-Wert	unterexprimiert		
HYMAI	hydatidiform mole associated and imprinted (non-protein coding)	6q24.2	paternal	↓	0	0,944	3	0,008	4
PLAGL/ZAC1	Zinc finger protein PLAGL1	6q24-q25	paternal	↓	1	0,495	12	0,068	16
SGCF	Epsilon-sarcoglycan	7q21-q22	paternal	↓	1	1,000	11	0,002	15
PEG10	Paternally expressed gene 10 protein	7q21	paternal	↓	1	0,812	6	0,072	14
PPP1R9A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	7q21.3	maternal	↑	5	0,003	0	0,814	6
INPP5F	Inositol polyphosphate 5-phosphatase F	10q26.11	paternal	↓	0	0,126	10	0,050	15
CDKN1C	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	11p15.5	maternal	↓	0	0,090	12	5,91E-04	12
MEG3/GIL2	maternally expressed 3 (non-protein coding)	14q32	maternal	↓	4	0,345	13	0,003	15
NDN/PWCR	Necdin	15q11.2-q12	paternal	↓	0	0,990	10	0,052	14
SNRPN	Small nuclear nonucleoprotein-associated protein N	15q11.2	paternal	↓ ↑	6	0,031	7	0,036	16
PEG3	Paternally expressed gene 3 protein	19q13.4	paternal	↓	2	0,552	10	0,013	16
GNAS/NESP55	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1	20q13.32	paternal	↑	11	0,026	6	0,008	15

Tabelle 4: Zusammenfassung der Genexpressionsergebnisse aus der Microarray Datenbank Oncomine®. (94)

Aufgrund dieser einfachen Analyse kann zunächst postuliert werden, dass kein systematischer Zusammenhang zwischen der Regulation elterlicher Prägung und der Tumorgenese des PCa besteht. Die Veränderungen lassen sich am wahrscheinlichsten auf Veränderungen in der Expression einzelner Gene begründen. Diese Hypothese wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, dass das Gen *CDKN1C* das einzig hochsignifikant ($p < 0,001$) veränderte ist. *CDKN1C* (*p57^{Kip2}*) ist schon in früheren Studien als Tumorsuppressor im PCa der Maus diskutiert worden (95) und ist durch die Ergebnisse dieser Arbeit ein Kandidat für ein Tumorsuppressorgen im menschlichen PCa. Wie sich in der folgenden detaillierten Analyse und Diskussion zeigen wird, stehen viele der veränderten Gene aber in einem funktionellen Zusammenhang.



Comparison of Concept: "Signifikant veränderte Gene - My Concepts" Across 16 Analyses
Over-expression

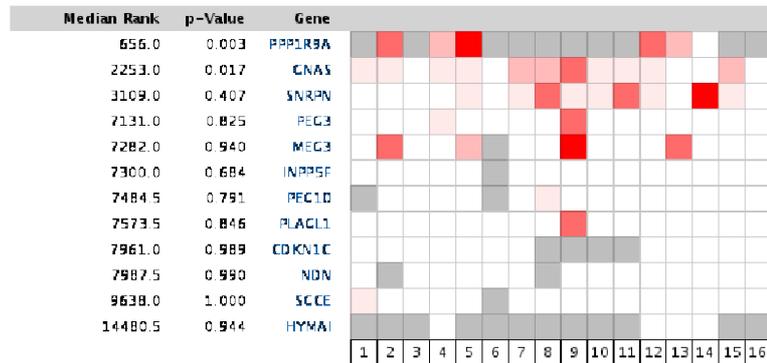


Abb. 1: Grafischer Vergleich der Überexpression 12 ausgewählter Gene im PCa



Comparison of Concept: "Signifikant veränderte Gene - My Concepts" Across 16 Analyses
Under-expression

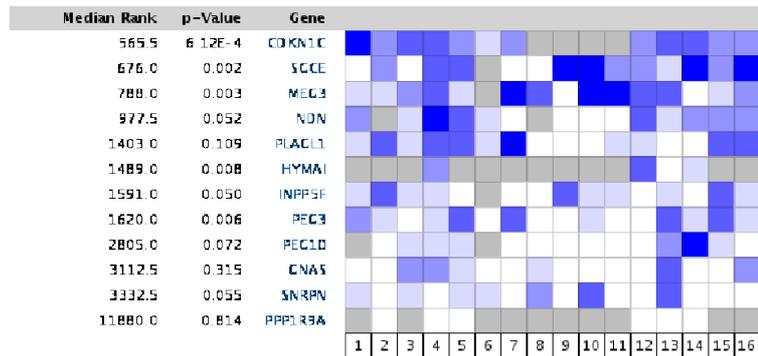
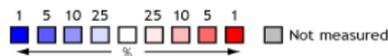


Abb. 2: Grafischer Vergleich der Unterexpression 12 ausgewählter Gene im PCa

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Prostate Carcinoma vs. Normal Holzbeierlein Prostate, Am J Pathol, 2004 2. Prostate Carcinoma vs. Normal Lapointe Prostate, Proc Natl Acad Sci USA, 2004 3. Prostate Carcinoma vs. Normal LaTulippe Prostate, Cancer Res, 2002 4. Prostate Carcinoma vs. Normal Liu Prostate, Cancer Res, 2006 5. Prostate Carcinoma vs. Normal Luo Prostate 2, Mol Carcinog, 2002 6. Prostate Carcinoma vs. Normal Magee Prostate, Cancer Res, 2001 7. Prostate Carcinoma vs. Normal Singh Prostate, Cancer Cell, 2002 8. Benign Prostatic Hyperplasia Epithelia vs. Normal Tomlins Prostate, Nat Genet, 2007 | <ol style="list-style-type: none"> 9. Benign Prostatic Hyperplasia Stroma vs. Normal Tomlins Prostate, Nat Genet, 2007 10. Prostate Carcinoma Epithelia vs. Normal Tomlins Prostate, Nat Genet, 2007 11. Prostatic Intraepithelial Neoplasia Epithelia vs. Normal Tomlins Prostate, Nat Genet, 2007 12. Prostate Adenocarcinoma vs. Normal Vanaja Prostate, Cancer Res, 2003 13. Prostate Carcinoma vs. Normal Varambally Prostate, Cancer Cell, 2005 14. Prostate Adenocarcinoma vs. Normal Wallace Prostate, Cancer Res, 2008 15. Prostate Carcinoma vs. Normal Welsh Prostate, Cancer Res, 2001 16. Prostate Carcinoma vs. Normal Yu Prostate, J Clin Oncol, 2004 |
|--|--|



The rank for a gene is the median rank for that gene across each of the analyses. The p-value for a gene is its p-value for the median-ranked analysis.

4.1.2. Nicht signifikant veränderte Genexpression

Von 62 untersuchten Genen waren 40 nicht signifikant verändert. (Tabelle 5) In manchen Fällen ergab die *in silico* Analyse in Oncomine®™ lediglich Hinweise auf eine veränderte Genexpression. Obwohl die Gene *IGF2* und *H19* als anerkannt herunterreguliert im PCa beschrieben sind, ist ihre Genexpression laut Oncomine® nicht signifikant verändert. (70) Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die Veränderungen der Expression von *IGF2* und *H19* organbezogen in der gesamten Prostata im Rahmen der Kanzerogenese auftreten und zu heterogen sind. (70, 96) Die in Oncomine® verfügbaren Datensätze mit den enthaltenen Proben repräsentieren diese Veränderung womöglich nicht. Auch ein Verlust der Heterozygotie (LOH) für den chromosomalen Bereich 11p15, der in der Literatur beschrieben ist (67), konnte in Oncomine®™ nicht nachvollzogen werden. Eine veränderte Genexpression von *IGF2* lässt sich somit nicht mit einer Veränderung der DNA-Kopienzahl erklären. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass bereits im Prostatanormalgewebe in den Organen mit einem Karzinom bzw. in einer frühen Form der Prostataveränderung *IGF2* in der Genexpression verändert sein könnte. Außerdem ist in den Studien in Oncomine® nicht einheitlich definiert, was als Prostatanormalgewebe verwendet wurde.

Gen	Lokalisation	Expression	Überexpression		Unterexpression		Gesamtanzahl der Studien
			P-Wert	Studienanzahl	P-Wert	Studienanzahl	
TP73	1p36.3	maternal	0,805	0	0,195	1	5
DIRAS3	1p31	paternal	0,458	1	0,268	6	14
NAP1L5	4q22.1	paternal	0,984	0	0,068	5	8
SLC22A2	6q26	maternal	0,584	2	0,261	0	9
SLC22A3	6q26-q27	maternal	0,298	5	0,480	2	14
DDC	7p12.2	Isoform Dependent	0,108	4	0,506	1	14
GRB10	7p12-p11.2	Isoform Dependent	0,189	5	0,785	2	15
TFPI2	7q22	maternal	0,629	4	0,429	3	15
DLX5	7q22	maternal	0,239	0	0,761	1	9
CPA4	7q32	maternal	0,201	0	0,542	2	9
MEST	7q32	paternal	0,462	4	0,549	2	12
DLCAP2	8p23	paternal	0,135	2	0,274	5	13
KCNK9	8q24.3	maternal	0,610	0	0,610	0	2
ABCA1	9q31.1	?	0,200	4	0,461	2	10
KCNQ10T1	11p15	paternal	0,481	1	0,522	1	8
H19	11p15.5	paternal	0,374	2	0,101	5	8
IGF2	11p15.5	paternal	0,387	3	0,134	9	16
IGF2AS	11p15.5	paternal	0,666	1	0,467	0	4
INS	11p15.5	paternal	0,812	0	0,398	4	4
KCNQ1	11p15.5	maternal	0,258	6	0,318	4	14
SLC22A18	11p15.5	maternal	0,636	1	0,106	4	13
PHLDA2	11p15.5	maternal	0,165	3	0,486	1	16
KCNQ1DN	11p15.4	maternal	0,903	0	0,11	0	4
OSBPL5	11p15.4	maternal	0,214	0	0,569	1	7
WT1	11p13	paternal	0,160	1	0,745	2	15
RBP5	12p13.31	maternal	0,986	1	0,277	3	7
DLK1	14q32	paternal	0,549	2	0,533	5	14
SNURF	15q12	paternal	0,193	2	0,805	1	4
MKRN3	15q11-q13	paternal	0,561	1	0,564	0	4
UBE3A	15q11-q13	maternal	0,177	5	0,306	7	16
MAGEL2	15q11-q12	paternal	0,734	1	0,336	0	4
ATP10A	15q11.2	maternal	0,770	0	0,284	1	10
ANKRD11	16q24.3	maternal	0,234	2	0,257	3	9
TCEB3	18q21.1	maternal	0,603	5	0,153	3	15
ZIM2	19q13.4	paternal	0,473	1	0,751	0	4
ZNF264	19q13.4	maternal	0,5	5	0,305	3	15
NESPAS	20q12.32	paternal	0,914	0	0,086	1	2
BLCAP	20q11.2-q12	Isoform Dependent	0,11	0	0,06	7	11
NNAT	20q11.2-q12	paternal	0,223	3	0,767	0	9
L3MBTL	20q13.32	paternal	0,99	1	0,445	5	9

Tabelle 5: Elterlich geprägte Gene, die sich in Oncomine®™ nicht unter dem Signifikanzniveau verändert darstellen

4.1.3. Nicht gelistete Gene in Oncomine®™

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Gene sind in Oncomine® nicht aufgeführt und konnten somit in der Analyse der Genexpression nicht berücksichtigt werden.

Gen	Lokalisation	Expression
COPG2IT1	7q32	paternal
MESTIT1	7q32	paternal
KLF14	7q32.3	maternal
SNORD107	15q11.2	paternal
SNORD108	15q11.2	paternal
SNORD109B	15q11.2	paternal
SNORD64	15q12	paternal
SNORD109A	15q11.2	paternal
SNORD115@	15q11.2	paternal
SNORD115-48	15q11.2	paternal

Tabelle 6: Gene, die nicht in der Datenbank Oncomine® gelistet sind

4.2. Genexpressionsanalysen aus Oncomine®™ vs. Taylor et al. (1)

Die nach den Genexpressionsanalysen in Oncomine® signifikant oder annähernd signifikant veränderten einzelnen Gene werden im Folgenden gesondert beschrieben. Dabei werden die Ergebnisse der Validierung im Datensatz von Taylor et al. einbezogen. (1)

4.2.1. *PLAGL1/ZAC1* und *HYMAI*

Das elterlich geprägte Gen Pleomorphic adenoma gene like 1 (*PLAGL1*, auch häufiger als *ZAC1* und gelegentlich als *LOT1* bezeichnet) ist auf dem Chromosom 6 (6q24-25) lokalisiert und wird als mögliches Tumorsuppressorgen angesehen. (97) Die hauptsächliche Promotorregion von *PLAGL1/ZAC1* liegt auf dem maternalen Chromosom methyliert und auf dem paternalen Chromosom unmethyliert vor, wobei die Expression ausschließlich vom paternalen Allel erfolgt. Spleißvarianten haben jeweils das gleiche 3'-Ende, unterscheiden sich jedoch in der Gesamtanzahl ihrer Exone und im Transkriptionsstart, der auch von einem weiter 5'-lokalisierten, nicht geprägten Promotor erfolgen kann. Das Protein *ZAC1* ist ein Transkriptionsfaktor mit sieben Zinkfingern und kann einen G1-Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren. (98) Eine verminderte Expression sowie einen Zusammenhang mit der Tumorgenese wurde in diversen Tumorentitäten nachgewiesen. (99-101) In dem im Mausmodell beschriebenen Netzwerk aus elterlich geprägten Genen soll *Plagl1/Zac1* eine zentrale

regulatorische Funktion einnehmen. (102) In dieser Arbeit wurde in Oncomine® eine leicht tendenziell signifikant verminderte *PLAGL1/ZAC* Expression im PCa-Gewebe gefunden. Diese Tendenz konnte in der Kontrollstudie von Taylor et al. (1) bestätigt werden. Das Gen *HYMAI* wird in gleicher Richtung transkribiert und liegt im Promotorbereich von *PLAGL1*; es erzeugt bei Transkription eine nicht kodierende RNA. In Oncomine®™ konnte zwar eine signifikante Unterexpression von *HYMAI* gefunden werden, welche sich jedoch in der Vergleichsstudie von Taylor

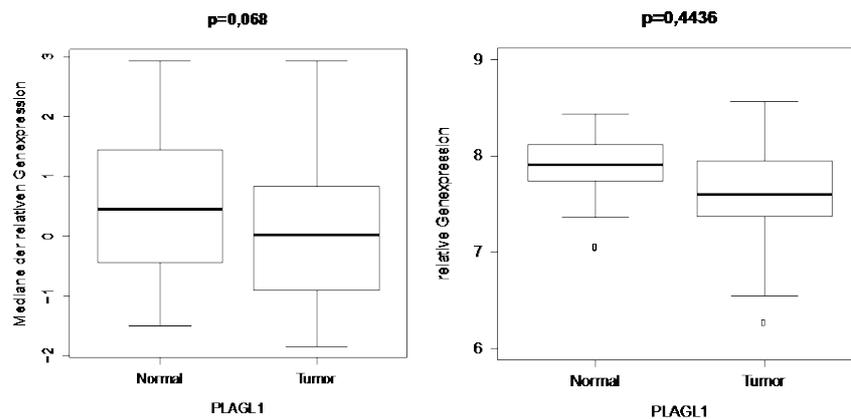


Abb. 3: Links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *PLAGL1*, rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *PLAGL1* aus Taylor et al. (1)

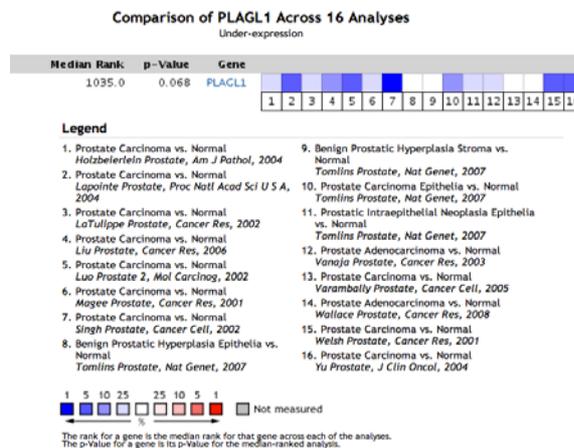


Abb. 4: Vergleich der verminderten Genexpression von *PLAGL1* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

et al. (1) nicht bestätigte. Da in Oncomine®™ lediglich vier von 16 Studien eine *HYMAI*-Expression und davon nur drei eine Unterexpression zeigen, kann dies die kontroversen Ergebnisse begründen. Außerdem konnte in einer Folgearbeit aus unserer

Forschungsgruppe gezeigt werden, dass die *HYMAI*-Expression im gesunden Gewebe bereits sehr niedrig ist. (94)

Klinisch kommt es bei Störungen des gemeinsamen Imprintings von

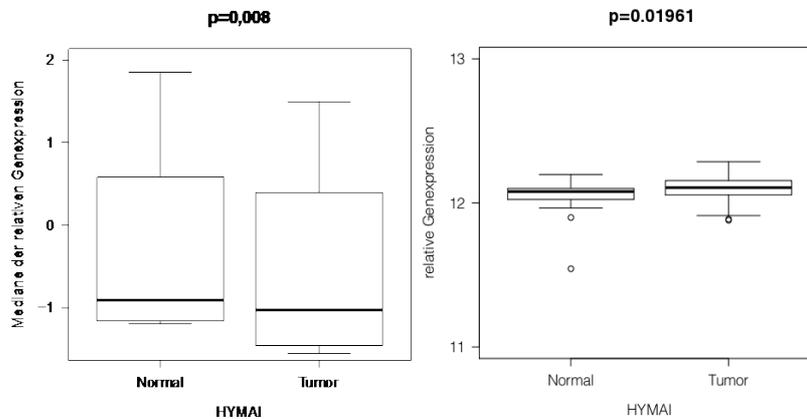


Abb. 5: Links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *HYMAI*, rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *HYMAI* aus Taylor et al. (1)

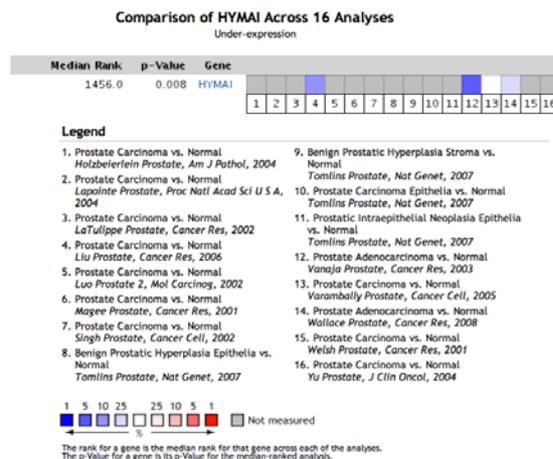


Abb. 6: Vergleich der verminderten Genexpression von *HYMAI* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

PLAGL1/ZAC1 und *HYMAI* zur Entstehung des transienten neonatalen Diabetes mellitus (TNDM).

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass ein Verlust oder eine verminderte Expression von *PLAGL1/ZAC1* die Tumorentstehung auch im PCa begünstigen könnte. Weiterhin kann diskutiert werden, ob auch beim menschlichen PCa ein Verlust der regulatorischen Funktion von *PLAGL1/ZAC1* zum Funktionsverlust oder sogar zum Zusammenbruch eines regulatorischen Netzwerkes von elterlich geprägten Genen führt.

Eine wichtige Auswirkung des Funktionsverlustes von *PLAGL1* könnte eine Herunterregulierung von *CDKN1C*, einem direkten Zielgen von *ZAC1*, darstellen. (103) Dieses Gen wird ferner wesentlich durch die nicht kodierende mRNA *LIT1* reguliert. Die Annahme, wonach *PLAGL1* ein wichtiger Regulator eines epigenetischen Netzwerkes ist, wurde in weiteren experimentellen Arbeiten unserer Forschungsgruppe überprüft und konnte auch belegt werden. (96)

4.2.2. SGCE, PEG10, PPP1R9A

Auf Chromosom 7q21 liegen die in einem Cluster organisierten elterlich geprägten Gene *SGCE*, *PEG10* und *PPP1R9A*. Die Expression der Gene *sarcoglycan epsilon* (*SGCE*), *paternally expressed 10* (*PEG10*) und *protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A* (*PPP1R9A*) stellt sich in Oncomine®™ in PCa-Geweben signifikant verändert dar. Hierbei sind die rein paternal exprimierten Gene *SGCE* signifikant mit $p=0,002$ und

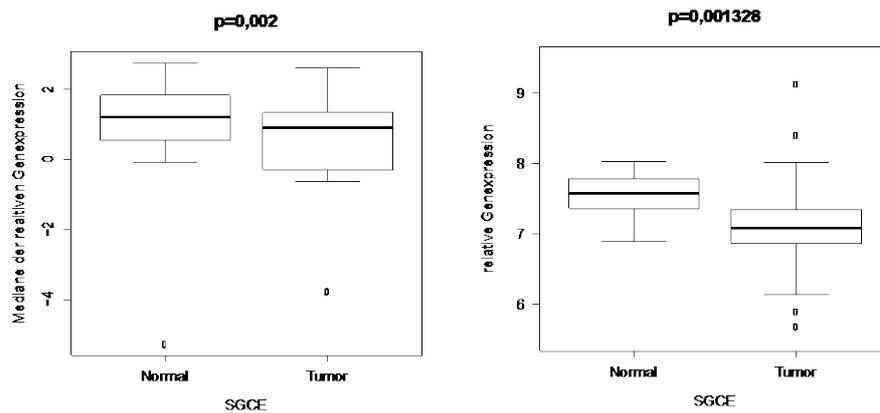


Abb. 6: links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *SGCE*, rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *SGCE* aus Taylor et al. (1)

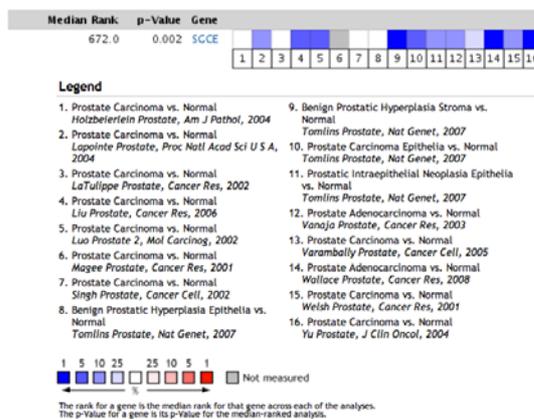


Abb. 7: Vergleich der verminderten Genexpression von *SGCE* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

PEG10 andeutungsweise mit $p=0,072$ herunterreguliert. Signifikant verminderte Expression konnte in der Vergleichsstudie von Taylor et al. bestätigt werden. (1)

Das *SGCE* Gen kodiert für das Protein Sarcoglykan ϵ , welches einen Teil des Dystrophin-Sarcoglycan-Komplexes darstellt. Dieser Komplex stabilisiert Muskelzellen und verknüpft ihr Zytoskelett funktionell mit der

Extrazellulärmatrix. (104) Mutationen im *SGCE* Gen führen in erster Linie zum klinischen Bild der myoklonischen Dystonie. Weiterhin sind intrauterine oder postnatale Wachstumsverzögerungen des Kindes bei Veränderungen im *SGCE* Gen beschrieben. (105) Über die Funktion von *SGCE* bei der Entstehung von Tumoren ist bislang wenig bekannt. Lediglich bei einer Untergruppe des kolorektalen Karzinoms wurde eine signifikante Herunterregulation von *SGCE* berichtet. Diese korreliert mit einer niedrigeren Invasivität des Tumors. (106) Eine Schlussfolgerung über die Funktion von *SGCE* im PCa kann zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden, da das aktuelle Verständnis der Funktion und Regulation von *SGCE* keine Anhaltspunkte für einen konkreten Zusammenhang zur Pathogenese des PCa liefert. Jedoch sollte *SGCE* in experimentellen Arbeiten auf den Einfluss in die Tumorgenese des PCa untersucht werden, da die Datenlage in Oncomine® wie auch in der Validierungsstudie Taylor et al. (1) für veränderte Expression von *SGCE* in der Kanzerogenese sprechen.

Bei dem rein paternal exprimierten Gen *PEG10*, welches das embryonale Wachstum begünstigt, wurde in verschiedenen Tumorentitäten eine Überexpression berichtet.

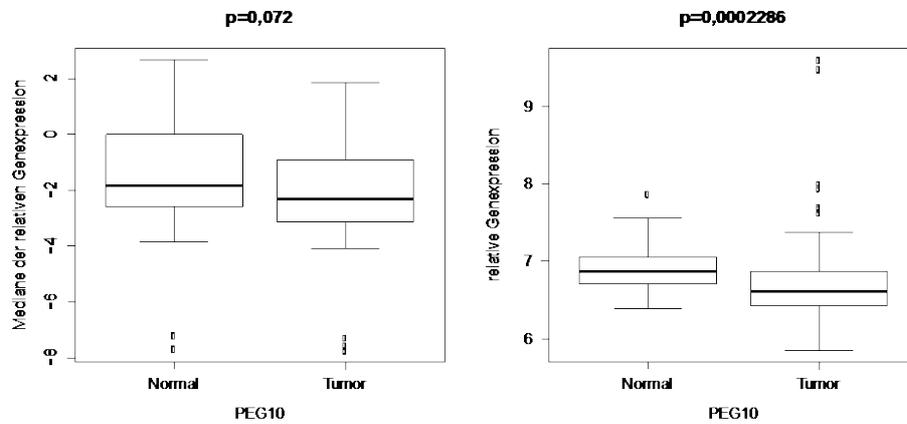


Abb. 8: links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *PEG10*, rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *PEG10* aus Taylor et al. (1)

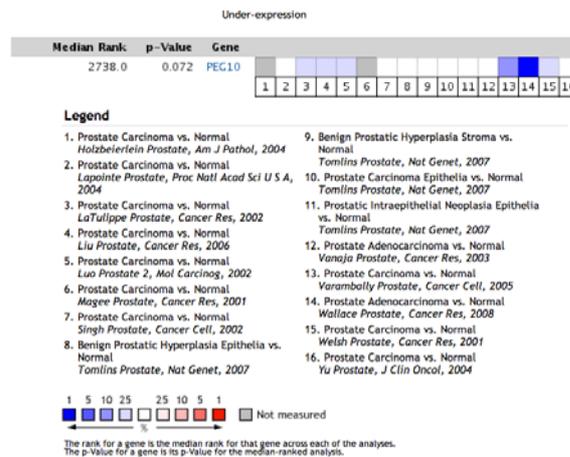


Abb. 9: Verminderte Genexpression von *PLAGL1* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

Eine Amplifikation der 7q21 Region, die mit einer Überexpression von *PEG10* und *SGCE* einhergeht, wurde vor allem im hepatozellulären Karzinom beobachtet. (107-109) *PEG10* kann zum einen die *SIAH1*-induzierte Apoptose hemmen, zum anderen ist eine Interaktion mit dem TGF β -Signalweg durch Hemmung der Activin-receptor-like-Kinasen ALK1 und ALK5 beschrieben. (110) Weiterhin ist *PEG10* ein Target-Gen von c-MYC. (111, 112)

Diese Beobachtungen sind nicht einfach mit der – wenn auch schwach ausgeprägten - Unterexpression von *PEG10* im PCa in Einklang zu bringen; eher wäre eine Überexpression plausibel. Welche Folgen Veränderungen der Expression von *PEG10* bei der Tumorentstehung in der Prostata haben, könnte eine Fragestellung nachfolgender experimenteller Arbeiten darstellen.

Das auf dem maternalen Allel exprimierte Gen *PPP1R9A* ist mit *GNAS* das einzige Gen, welches eine signifikante ($p=0,003$) Überexpression im PCa in Oncomine®™ zeigte. In der Studie von Taylor et al. (1) wird hier sogar eine hoch signifikante ($p<0,001$), noch deutlichere Überexpression gefunden (Abb. 10 & 11). *PPP1R9A* kodiert für die regulatorische Untereinheit 9a der Proteinphosphatase 1. Diese Untereinheit, auch Neurabin-1 genannt, bindet an F-Actin, katalytische Untereinheiten der

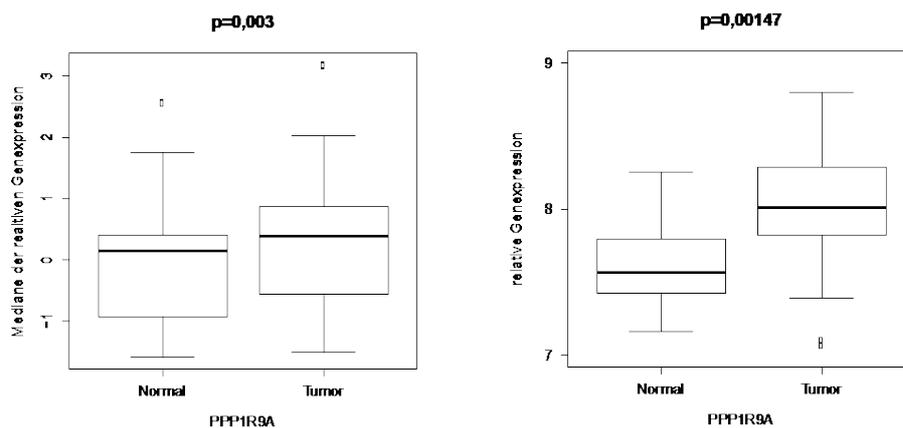


Abb. 10: links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *PPP1R9A*, rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *PPP1R9A* aus Taylor et al. (1)

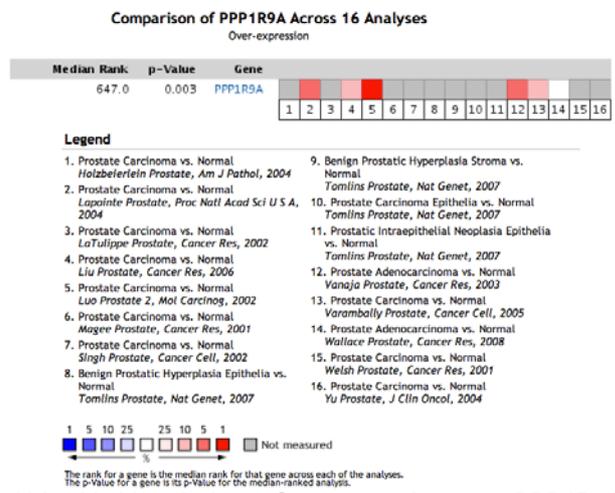


Abb. 11: Verminderte Genexpression von *PPP1R9A* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

Proteinphosphatase 1 sowie die p70 S6 Proteinkinase (p70^{S6K}). (113) In frühen Arbeiten wurde Neurabin wegen seiner regulatorischen Funktion in adhäsionsabhängigen Signalwegen als Tumorsuppressor eingeordnet. (114, 115) Die Datenlage der vorliegenden Arbeit gibt Grund zur Annahme, dass *PPP1R9A*, neben den aktuell bekannten, noch weitere Effekte ausübt. Zu untersuchen wäre beispielsweise, wieweit es in die Regulation des Gennetzwerks um *CDKN1C* und *ZAC1* eingreift.

Regulatorische Einflüsse auf die Zellproliferation sind überzeugender für das verwandte *PPP1R9B* nachgewiesen. *PPP1R9B* codiert für die homologe Untereinheit der Proteinphosphatase 1, Neurabin-2, auch bekannt als Spinophilin. Neurabin-2 kann zum einen über PI3K und mTOR indirekt und zum anderen in einem Komplex mit Tiam1 direkt die Proliferation von Zellen fördern. (116)

In einer experimentellen Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass Neurabin-1 einen hemmenden Einfluss auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ausübt.

Die Annahme, dass *PPP1R9A* als Protoonkogen im PCa in Erwägung gezogen werden sollte, wird durch ein statistisches Clustering mit bekannten PCa Markern untermauert.

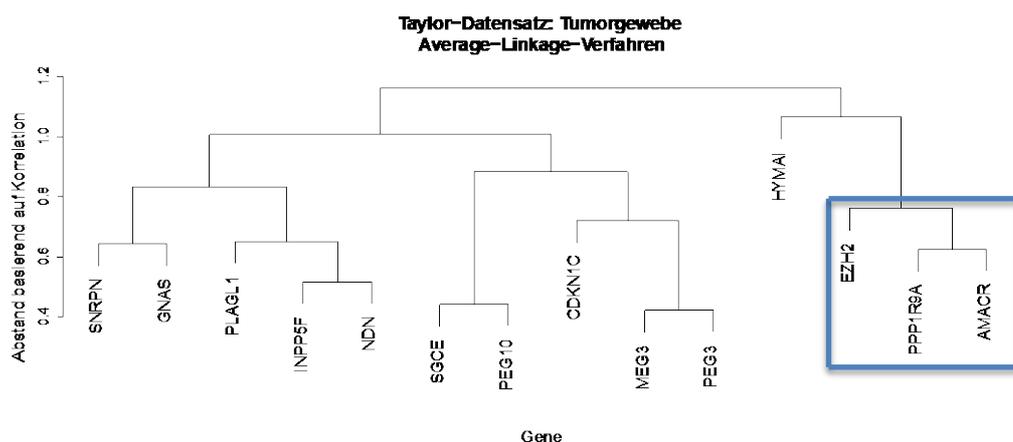


Abb. 12: Average-Linkage-Verfahren zum Clustering 14 veränderter Gene. Gene werden in einem Cluster zusammengeführt, die einen geringen Abstand der Korrelation der Genexpression zueinander aufweisen. Blau markiert ist der Cluster um *PPP1R9A* in dem zum einen der klinisch relevante Marker *AMACR* liegt und zum andern der epigenetische Regulator *EZH2*.

Abb. 12 zeigt, dass *PPP1R9A* mit dem klinisch verwendeten Biomarker *AMACR* sowie *EZH2* in einem Cluster überexprimierter Gene liegt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *PPP1R9A* im PCa ebenfalls einen Marker darstellen könnte. Im Bezug auf Funktion und Regulation von *PPP1R9A* kann die *in silico* Analyse die ungeklärten Fragen nicht lösen. In einer Masterarbeit unserer Forschergruppe (Fr. Droop) konnte in der Folge dieser Arbeit eine proliferationsfördernde Wirkung von Neurabin-1 in einzelnen Prostatakarzinomzelllinien gefunden werden. Konträr hierzu sah man jedoch in anderen PCa-Zelllinien eine hemmende Wirkung von Neurabin-1 auf die Migration der Zelllinien. Begründet wird dieser Unterschied möglicherweise durch verschiedene Expression der Neurabinisoformen. Weiterhin konnte in der Arbeit von Fr. Droop gezeigt werden, dass *PPP1R9A* in der Prostata und im PCa biallelisch exprimiert ist, und somit ein LOI nicht die Überexpression von *PPP1R9A* erklären kann.

Die genaue Funktion von Neurabin-1, insbesondere in Hinblick auf die Zellmigration im PCa-Gewebe, sollte Gegenstand weiterer experimenteller Arbeiten sein.

4.2.3. *INPP5F*

INPP5F codiert für eine Phosphatidyl-Inositol-Phosphatase, deren Hauptaufgabe die Regulation der Substratkonzentration von PI3-Kinase und Phospholipase C ist.

In der vorliegenden Arbeit war *INPP5F* signifikant in der *in silico* Analyse und hochsignifikant in der Kontrollstudie herunterreguliert. (Abb. 12 & 13) Im Herzen führt *INPP5F* durch Inhibition des PI3K-Signalweges zu einer Restriktion des Größenwachstums von Kardiomyocyten. (117) Somit ähnelt die Funktion von *INPP5F* der von *PTEN*, dessen Verlust ebenfalls zur kardialen Hypertrophie führt. (118) Im PCa wurde bereits eine Unterexpression der funktionell verwandten Inositolphosphatase *INPP4B* gefunden. Diese wird vom Androgenrezeptor induziert und vermindert den Phosphorylierungsgrad und die Aktivität der Proteinkinase AKT in PCa-Zellen. (46)

Zurzeit ist noch unbekannt, ob und wie die Transkripte von *INPP5F* in gleicher Weise reguliert werden. Bekannt ist jedoch, dass die Phosphatidylinositol-Phosphatasen hauptsächlich inhibierend auf die Signalweiterleitung von den Wachstumsfaktorrezeptoren IGFR1 und EGFR wirken. Die Phosphatidylinositol-Phosphatasen können zudem als Feedback-Inhibitoren in der Interaktion von PI3K/Akt- und Androgen-Signalwegen agieren. (94) *INPP5F* ist offensichtlich ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen im PCa.

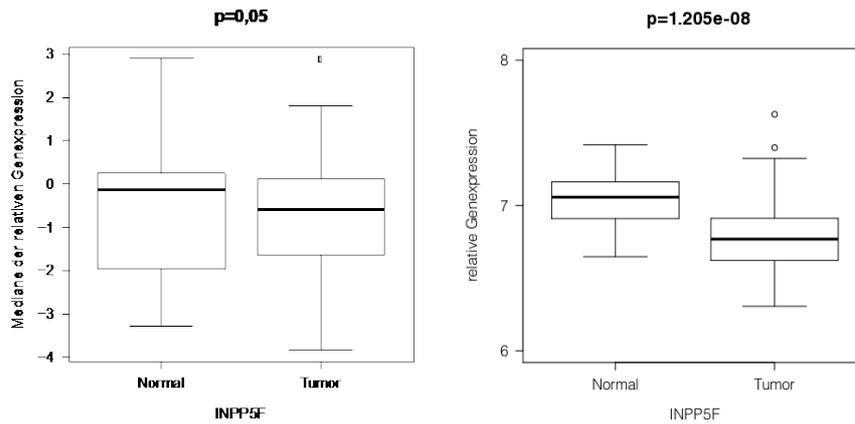


Abb. 12: links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *INPP5F* rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *INPP5F* aus Taylor et al. (1)

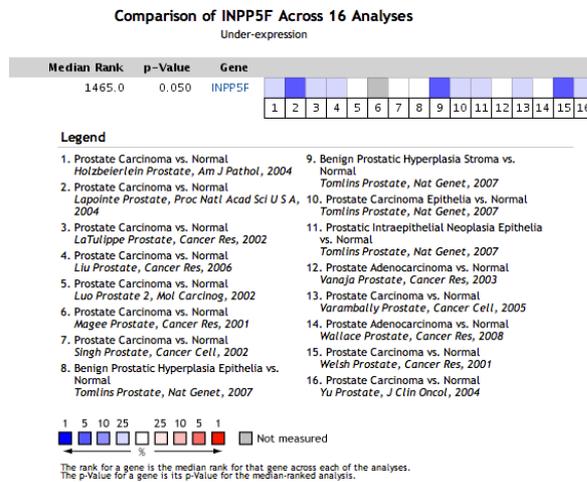


Abb. 13: Verminderte Genexpression von *INPP5F* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

4.2.4. *CDKN1C*

Das maternal exprimierte Gen *CDKN1C* liegt zusammen mit dem Gen *KCNQ* in einem elterlich geprägten Gencluster auf Chromosom 11p15.5. *CDKN1C* kodiert für den Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK), $p57^{KIP2}$. Je nach Konzentration und Bindungsart wirkt $p57^{KIP2}$ unterschiedlich. In niedriger Konzentration verstärkt es die Interaktion der CDK-Untereinheiten. In hoher Konzentration hemmt $p57^{KIP2}$ die Mehrzahl der CDKs und führt so zum Zellzyklusarrest. (119) Auf diese Weise reguliert das Protein den Zellzyklus und ist bei der Differenzierung verschiedenartigster Gewebe beteiligt. (120) Bei der Regulation des Zellzyklus interagiert $p57^{KIP2}$ mit Proteinen der RB-Familie, inaktiviert E2F Proteine, induziert den G1 Arrest und könnte speziell in der Etablierung der G0 Phase bei einer terminalen Zelldifferenzierung wesentlich sein.

Während der Embryogenese erreicht die Expression von $p57^{KIP2}$ einen Höhepunkt zum Zeitpunkt der Organdifferenzierung und fällt danach in der Regel wieder ab. Diese Beobachtungen werden als Hinweis auf eine wichtige Funktion von $p57^{KIP2}$ bei der Stammzelldifferenzierung interpretiert.

Vor allem wegen seiner wachstumsregulatorischen Funktionen ist *CDKN1C* in vielen menschlichen Krebsarten erforscht und gilt allgemein als Tumorsuppressor. (121) Erstaunlicherweise gibt es jedoch bisher im PCa wenige Untersuchungen zu diesem Gen und Protein. In einer der wenigen Arbeiten wurde das Genprodukt $p57^{KIP2}$ in normalen kultivierten Prostataepithelzellen mit der Etablierung des Seneszenzzustandes in Zusammenhang gebracht. Ein Verlust dieses Proteins führt zu einer Immortalisation der Prostatazellen. (122)

In einer weiteren Arbeit wurde *CDKN1C* als Ziel tumorspezifischer CpG-Hypermethylierungen in primären PCa-Geweben beschrieben. (123) Lodygin et al. berichteten von einer fokalen CpG-Methylierung von *CDKN1C* im Prostatakarzinom, die zu seiner Inaktivierung führen könnte. (124) In einer Arbeit unserer Forschungsgruppe wurden dagegen keine wesentlichen Veränderungen der DNA-Methylierung von *CDKN1C* beobachtet. (96) Dennoch unterstützen die bekannten Funktionen und

die in dieser Arbeit gezeigte starke Mindereexpression von *CDKN1C* im Tumorgewebe die Annahme, dass *CDKN1C* auch im PCa als Tumorsuppressor wirken könnte.

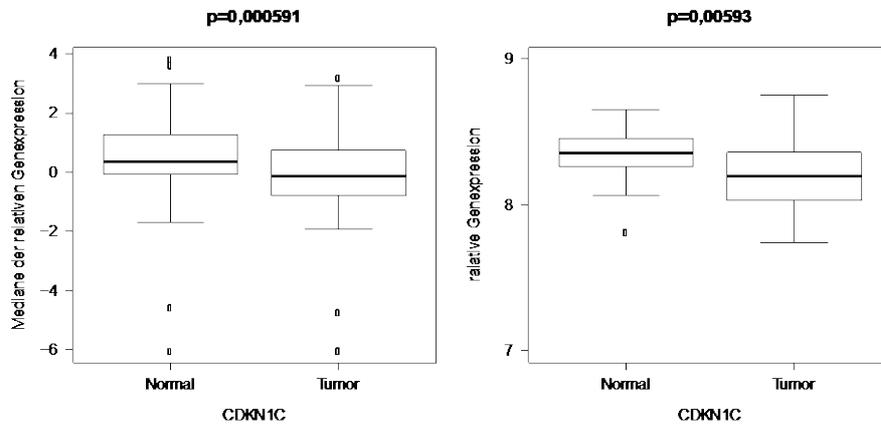


Abb. 14: links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *CDKN1C* rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *CDKN1C* aus Taylor et al. (1)

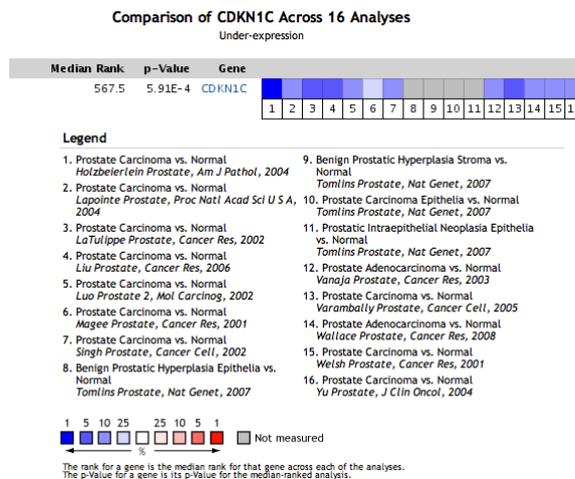


Abb. 15: Verminderte Genexpression von *CDKN1C* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

in Abb. 17 links zu sehen, im Prostata-Normalgewebe bereits sehr gering ist. (96)

Verminderte Expression von *MEG3/GTL2* ist in verschiedenen Tumorarten beschrieben, u.a. dem Urothelkarzinom (127). Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) wurde eine Korrelation der Genexpression der lncRNA mit der Tumorgroße und dem Grading nachgewiesen. (130) Neben direkten Einflüssen auf wichtige Gene und Regulatoren des Zellzykluses wirkt der *MEG3/DLK1* Cluster vor allem auf die Stammzelldifferenzierung regulatorisch und beeinflusst entscheidend Embryogenese und postnatales Wachstum. (131)

Ein Einfluss auf Tumorstammzellen könnten in dem epigenetischen Regulationsmechanismus des 14q32.2 Clusters, ähnlich des *IGF2/H19* Clusters auf Chromosom 11p15.5, begründet sein. (132) Durch einen solchen Mechanismus könnte das *MEG3* Cluster eventuell auch auf die Tumorgenese des PCa Einfluss nehmen. Schließlich wird *MEG3/GTL2* auch als wichtiger Regulatorbaustein in einem Netzwerk von elterlich geprägten Genen betrachtet.

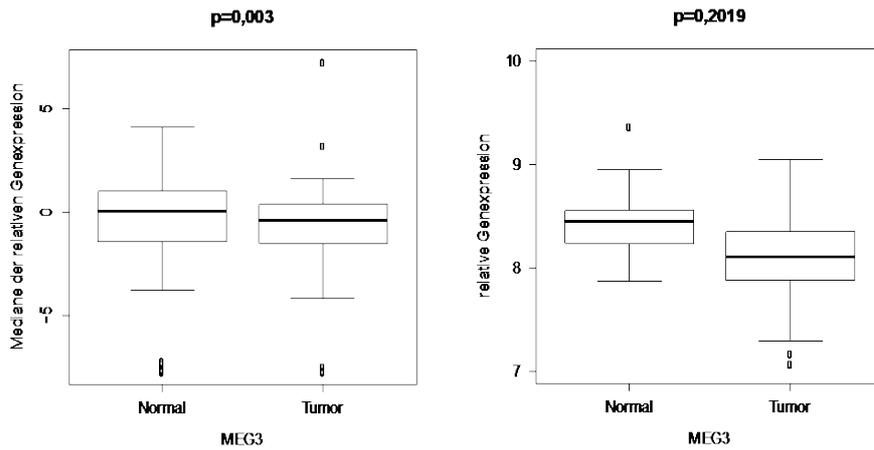


Abb. 17: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *MEG3* rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *MEG3* aus Taylor et al. (1)

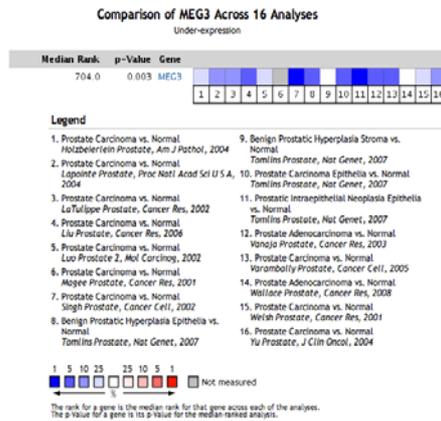


Abb. 18: Verminderte Genexpression von *MEG3* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

4.2.6. *NDN* und *SNRPN*

Für das paternal geprägte Gen *NDN*, welches für das Protein Necdin codiert, ist bislang nur wenig über seine Rolle bei der Entstehung des PCa bekannt. Eine verminderte Expression von *NDN* führt zu einer geistigen Retardierung, einem Hypogonadismus und Fettleibigkeit bei Kindern. Dieser Symptomkomplex wird als Prader-Willi-Syndrom bezeichnet. Es kann schon anhand dieser Symptome abgeleitet werden, dass Necdin eine entscheidende Rolle auf die Gewebsdifferenzierung ausübt; es nimmt jedoch auch Einfluss auf die Zellzykluskontrolle. (133, 134) Letzteres wird auf Interaktionen mit den Zellzyklusfaktoren *E2F1* und *E2F4* zurückgeführt, welche die Proliferation und die Differenzierung von Zellen hemmen. (135 - 137) Als Zielgen von p53 hemmt Necdin dessen proapoptotische Funktion, einmal durch direkte Hemmung der Transkriptionsaktivierung durch p53 und zusätzlich, indem es die Aktivität der Histon-Deacetylase SIRT1 fördert, welche die Deacetylierung von p53 verstärkt. Somit beeinflusst Necdin eine Checkpoint-Kontrolle im Zellzyklus. (138,139) Trotz des Antagonismus zu p53 gibt es acht Publikationen, die *NDN* als entscheidendes Tumorsuppressorgen in verschiedenen Tumorentitäten darstellen (z.B. (140)).

Ein Zusammenhang von *NDN* mit dem PCa ist bislang noch nicht belegt. Die vorliegenden Daten der Genexpression von *NDN* aus der globalen Datenbank Oncomine® und dem Vergleichsdatensatz Taylor et al. (1) zeigen einen Trend zur Verminderung der *NDN* Expression. Eine verminderte Genexpression von *NDN* konnte auch im primären Urothelkarzinom nachgewiesen werden. (140) Somit kann, angelehnt an die Daten von De Faveri et al. (140), postuliert werden, dass auch im PCa *NDN* einen potentiellen Tumorsuppressor darstellt.

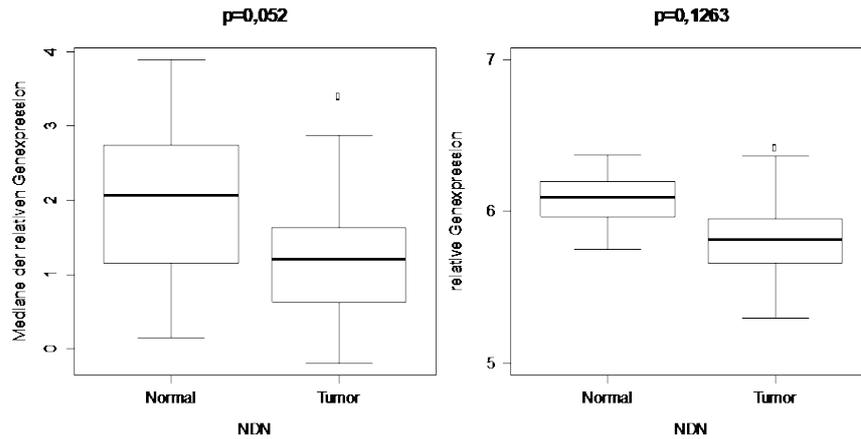


Abb. 19: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *NDN* rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit

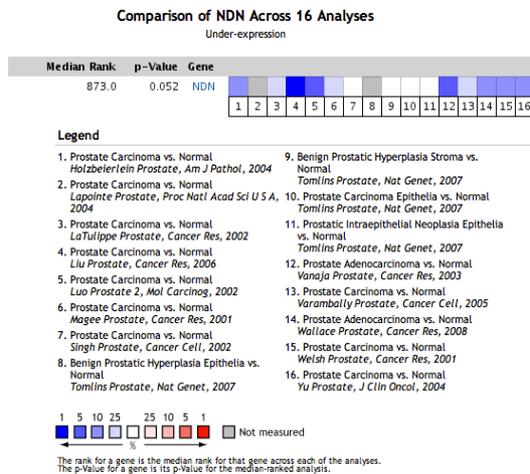


Abb. 20: Vergleich der verminderten Genexpression von *NDN* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®™

4.2.7. *PEG3*

Das paternal geprägte Gen *PEG3* codiert für ein Krüppel-Zinkfinger Protein und ist auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert. (141) In einigen Tumorentitäten konnte eine Ausschaltung der *PEG3* Expression durch eine DNA-Hypermethylierung, vor allem der normalerweise auf dem paternalen Chromosom im unmethylierten Zustand vorliegenden Imprinting-Kontrollregion, beobachtet werden. (142 - 144) *PEG3* kann durch Bindung an β -Catenin zu einer Inhibition des WNT-Signalweges führen und so tumorsuppressiv wirken. In menschlichen Glioblastomzellen konnte eine durch *PEG3* initiierte Inhibition der DNA-Synthese beobachtet werden. In diesen Zellen fördert *PEG3* weiterhin die Apoptose. (141) Die antiproliferative und proapoptotische Funktion von *PEG3* in menschlichen Glioblastomzellen ergibt eine wachstums-kontrollierende oder sogar wachstumssupprimierende Wirkung. (142) Anhand dieser Parallelen begründet die gefundene signifikante Unterexpression von *PEG3* in den PCa Geweben die Vermutung, dass *PEG3* auch im PCa wachstums-limitierend sein könnte. Auch *PEG3* wird als Mitglied oder sogar als Knotenpunkt eines regulatorischen Netzwerkes im Mausembryo eingeordnet. (94, 102)

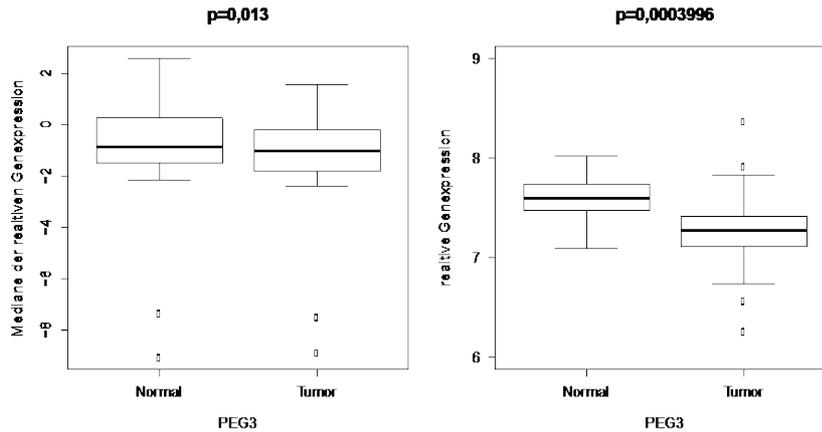


Abb. 21: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *PEG3* rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *PEG3* aus Taylor et al. (1)

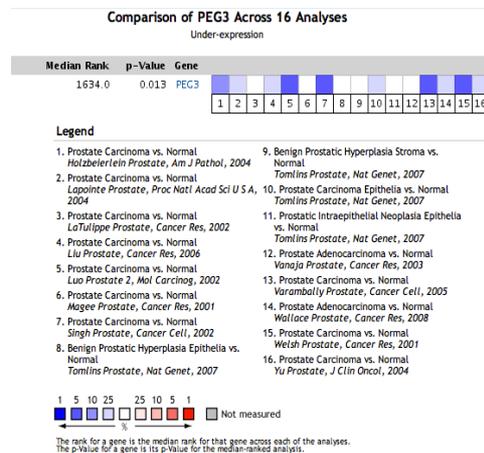


Abb. 22: Verminderte Genexpression von PEG3 über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

4.2.8. *GNAS*/*NESP55*

Das proteinkodierende elterlich geprägte Gen *GNAS*, auch *NESSP55* genannt, wird ausschließlich vom paternalen Chromosom abgelesen und liegt auf Chromosoms 20q13.1. *GNAS* kodiert für die α -Untereinheit eines G_s -Proteins und ist im Prostatakarzinom über den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg zur Aktivierung des Androgenrezeptors fähig. (145) In Oncomine® konnte eine deutlich signifikante Überexpression von *GNAS* gefunden werden ($p=0.026$), wobei 12 von 16 Studien eine Überexpression von *GNAS* darstellten. Eine Studie konnte kein Transkript von *GNAS* detektieren. Dies ist am ehesten damit zu begründen, dass in dieser Studie *GNAS* auf dem Array nicht repräsentiert wird. Möglicherweise ist aber auch der Cut-Off zur

Detektion der ohnehin geringen *GNAS* Expression in den in Oncomine verfügbaren Studien zu niedrig gewählt.

Trotz der deutlichen Überexpression in den Voranalysen konnte die Expression im Validierungsdatensatz von Taylor et al. (1) nicht bestätigt werden ($p=0,6568$). Eine wahrscheinliche Ursache dafür ist die Komplexität der *GNAS* Transkripte. (146) Der *GNAS* Locus beinhaltet durch alternatives Spleißen vier geprägte Transkripte, wobei drei rein paternal exprimiert werden und eins maternal geprägt ist. In Microarray-Studien sind diese Transkripte nicht ohne Weiteres voneinander zu unterscheiden. Dies könnte zu den hier aufgeführten kontroversen Ergebnissen führen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass *GNAS* Expression nur in einer Untergruppe von Prostatakarzinomen vermindert sein könnte (147), vergleichbar zum Colorektalen-Karzinom, bei welchem *GNAS* vor allem in spezifischen Untergruppen als Protoonkogen angesehen wird. (148) Einen weiteren wichtigen Faktor in diesem Gen stellt der T363C Polymorphismus dar. Hierbei wird durch den Austausch der Base Thymin gegen Cytosin im Codon 363 die pro-apoptotische Wirkung der Gas G-Protein-Untereinheit durch die veränderte Genexpression verstärkt. Es konnte im primären Magenkarzinom gezeigt werden, dass homozygote *GNAS1* 393T Patienten weniger weit fortgeschrittene Tumorstadien und bessere Überlebensraten als Träger eines C Allels hatten. (149)

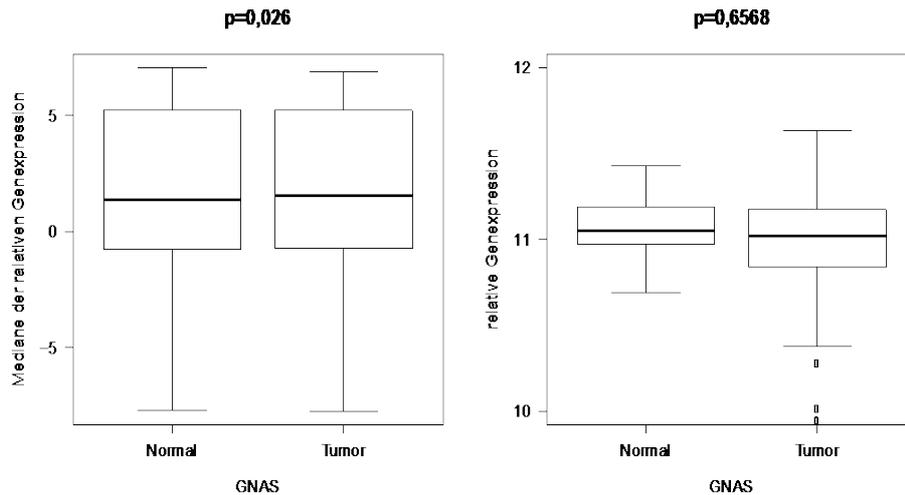


Abb. 23: links: Vergleich der Mediane der relativen Genexpression aus Oncomine® von Normalgewebe und Tumorgewebe des Gens *GNAS*, rechts: Vergleich der relativen Genexpression von Normalgewebe mit Tumorgewebe des Gens *GNAS* aus Taylor et al. (1)

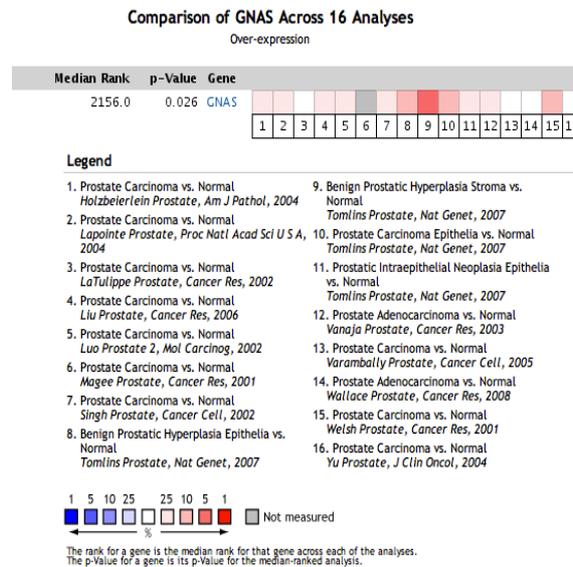


Abb. 24: Erhöhte Genexpression von *GNAS* über 16 Studien hinweg, Original-Auszug aus Oncomine®

4.3. Korrelationen mit der Genexpression von *EZH2*

Im Folgenden wird die relative Genexpression der 12 signifikant veränderten geprägten Gene in Bezug zu der Expression von *EZH2* genauer betrachtet. Zunächst stellt Tabelle 7 detailliert die Korrelationen der Genexpression mit *EZH2* in Oncomine® dem Validierungsdatensatz von Taylor et al. (1) gegenüber. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es insgesamt keine deutlich erkennbare Korrelation der Genexpression eines der 12 gefundenen Gene mit der

von *EZH2* im PCa gibt. Um dies mit einem Gegenbeispiel zu untermauern, wird in Abb. 25 die Pearson'sche Korrelation der Expression von *HOXB13* und *FOXA1* dargestellt. Diese Gene korrelieren in den Messungen in unserer Arbeitsgruppe exzellent, was sich daraus erklärt, dass sie sich direkt gegenseitig regulieren. (93) Hier sind auch im Taylor Datensatz deutliche lineare Zusammenhänge im Normalgewebe (links) und vor allem im PCa-Gewebe (rechts) zu erkennen. Ein solcher Zusammenhang deutet sich in dieser Arbeit lediglich für *MEG3* mit *EZH2* an. Im PCa wurde noch keine eindeutige Regulation von *MEG3* durch *EZH2* beschrieben, eine solche Interaktion ist jedoch durchaus denkbar. Sie besteht nach aktuellen Arbeiten beispielsweise für die lncRNA *H19* im Nasopharynxkarzinom. (150) In dieser Arbeit korreliert die Genexpression von *MEG3* andeutungsweise negativ mit der von *EZH2* auf Basis der Datenbank Oncomine® und deutlich signifikanter in der gleichen Richtung im Datensatz von Taylor et al. ($p < 0,001$). (1)

Zwar kann für die Genexpression von *PPP1R9A* eine signifikante lineare Korrelation mit der Expression von *EZH2* im Taylor-Datensatz gefunden werden ($p < 0,001$), leider stellten sich diese Ergebnisse jedoch in Oncomine® nicht signifikant dar. Die Tatsache, dass die Korrelationen ansonsten nicht signifikant sind oder gar widersprüchliche Ergebnisse zwischen den Oncomine® Datensätzen zu Taylor et al. vorliegen, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Datenlage in Oncomine® zu heterogen ist, um sichere Schlussfolgerungen über Korrelationen zu ziehen. Insbesondere ist die Methode einer Summierung der Mediane zum Schätzen einer Korrelation verglichen mit reinen Expressionswerten für eine fundierte exakte Korrelationsbestimmung offenbar zu ungenau.

Gen Symbol	Gen Produkt	Funktion	Chromosomale Lokalisation	Expression	Oncome™		Taylor 2005 et al.	
					r = EZH2-Korrelation	p-Wert	r = EZH2-Korrelation	p-Wert
<i>HYMAI</i>	Hydatidiform mole associated and imprinted	Non-coding RNA mit unbekannter Funktion	6q24.2	paternal	0,9948477	0,005152	-0,12790541	0,185
<i>PLAGL/ZAC1</i>	Zinc finger protein PLAGL1	Mögliches Tumorsuppressorgen, Induktor der Apoptose und des Zellzyklus Arrestes, Mögliches Schlüssel Protein eines regulatorischen Netzwerkes im Pca	6q24-q25	paternal	0,1278772	0,6772	-0,25664834	0,007063
<i>SGCE</i>	Epsilon-sarcoglycan	Transmembranprotein, Teil des Dystrophin Proteinkomplexes	7q21-q22	paternal	-1,708935	0,5954	-0,18983607	0,04803
<i>PEG10</i>	Paternally expressed gene 10	Protoonkogen, Hemmer der Apoptose, potentieller Inhibitor des TGFβ Signalweges	7q21	paternal	0,6806314	0,02115	-0,19428349	0,04294
<i>PPP1R9A</i>	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	Potentieller Tumorsuppressor, Protein Phosphatase, Regulator des adhesion-dependent signalling	7q21.3	maternal	0,2515545	0,5863	0,4977019	0,000037
<i>INPP5F</i>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase F	Inositol Polyphosphat Phosphatase, Regulator des PI3K und des PLC Signalweges	10q26.11	paternal	0,0647496	0,8415	-0,23571829	0,01361
<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Tumorsuppressorgen, Hemmer verschiedener CDK's, Promoter des Zellzyklusarrestes	11p15.5	maternal	-0,24877400	0,4124	-0,08260502	0,3931
<i>MEG3/GTL2</i>	Maternally expressed 3	Non-coding RNA, möglicher Regulator der p53- und Rb1-Aktivität	14q32	maternal	-0,43712590	0,1353	-0,42947483	0,003161
<i>NDN/PWCR</i>	Necdin	Hemmer der Zellproliferation, Transkriptionsfaktor, Activator des Wnt-Signalweges, Promoter der neuronalen Entwicklung, Hemmung der Adipozyten	15q11.2-q12	paternal	0,08573374	0,791	-0,31698244	0,000784
<i>SNRPN</i>	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	Regulator der pre-mRNA Prozessierung und gewebsspezifisches Splicing	15q11.2	paternal	-0,62115990 / 0,06474960	0,1337 / 0,841500	-0,00595212	0,951
<i>PEG3</i>	Paternally expressed gene 3	Tumorsuppressor, Proapoptische Funktionen, Hemmer des Wnt-Signalweges	19q13.4	paternal	0,6663254	0,009267	-0,41598925	0,000007
<i>GNAS complex locus</i>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1	Protoonkogene, α Untereinheit des G-Proteins, Regulator des cAMP Signalweges	20q13.32	paternal	0,4300366	0,1248	-0,02755762	0,776

Tabelle 7: Pearson'sche Korrelationen der 12 signifikant veränderten Gene jeweils mit der Genexpression von *EZH2*.

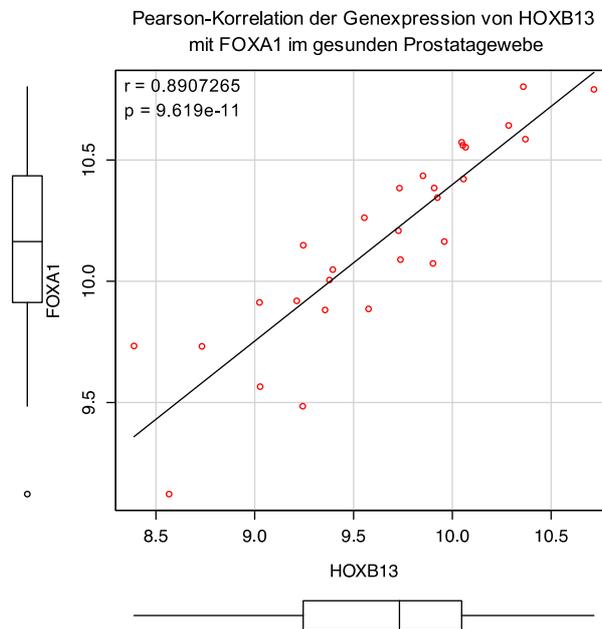


Abb. 25: Pearson'sche Korrelation der Genexpression von FOXA1 und HOXB13 im Prostata-Normalgewebe auf Grundlage des Datensatzes von Taylor et al. (1)

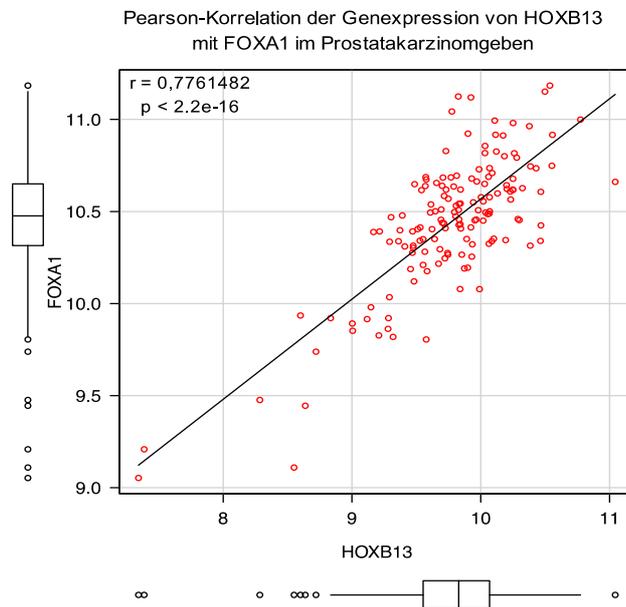


Abb. 26: Pearson'sche Korrelation der Genexpression von FOXA1 und HOXB13 in maligne veränderten Geweben des PCa auf Grundlage des Validierungs Datensatzes von Taylor et al. (1)

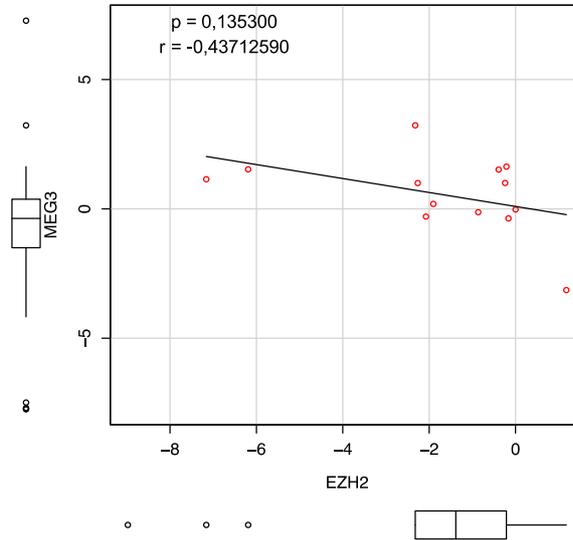


Abb. 27: Korrelation der Mediane der Genexpression von *MEG3* mit der von *EZH2* auf Grundlage der Datenbank Oncomine® ($r=-0,437$)

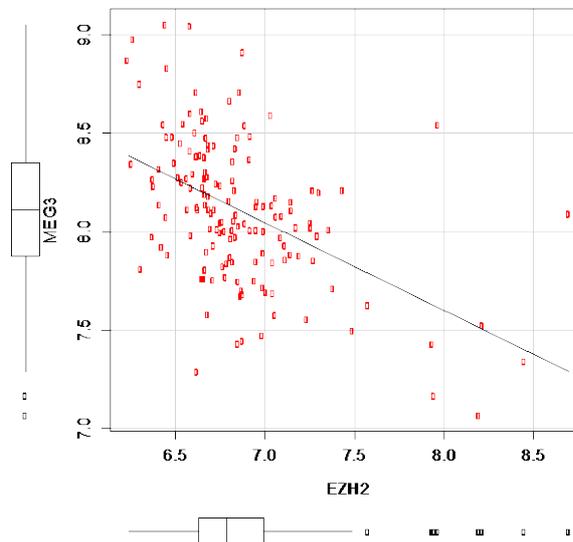


Abb. 28: Grafische Darstellung der Pearson'schen Korrelation der Genexpression von *MEG3* mit der von *EZH2* auf Grundlage des Datensatzes von Taylor et al. (1) ($r=0,429$)

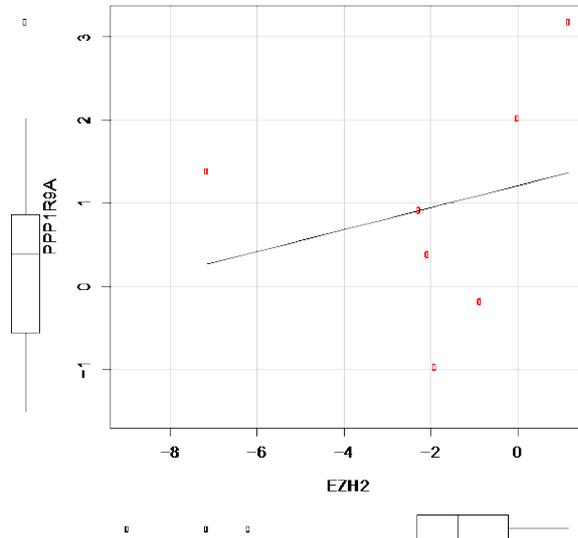


Abb. 29: Korrelation der Mediane der Genexpression von *PPP1R9A* mit der von *EZH2* auf Grundlage der Datenbank Oncomine® ($r=0,252$)

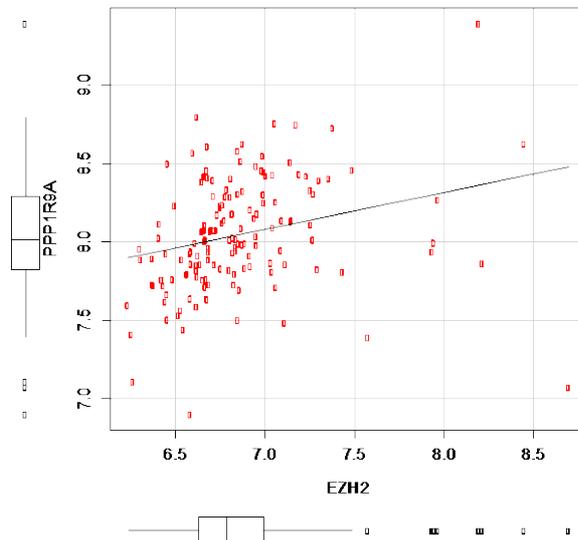


Abb. 30: Grafische Darstellung der Pearson'schen Korrelation der Genexpression von *PPP1R9A* mit der von *EZH2* auf Grundlage des Datensatzes von Taylor et al. (1) ($R=0,498$)

4.4 Clustering im Taylor Datensatz

Die Clusteranalyse des Datensatzes von Taylor et al. (1) mit dem im Abschnitt 3.13 beschriebenen Verfahren dient zur Untersuchung der Korrelation zwischen den 12 Genen aus 4.1 in ihrer Gesamtheit. In der Vergangenheit hat die Auswertung genomweiter Expressionsanalysen mit statistischen Methoden wie dem hierarchischen Clustern wesentliche neue Erkenntnisse über die Tumorgenese, aber auch über

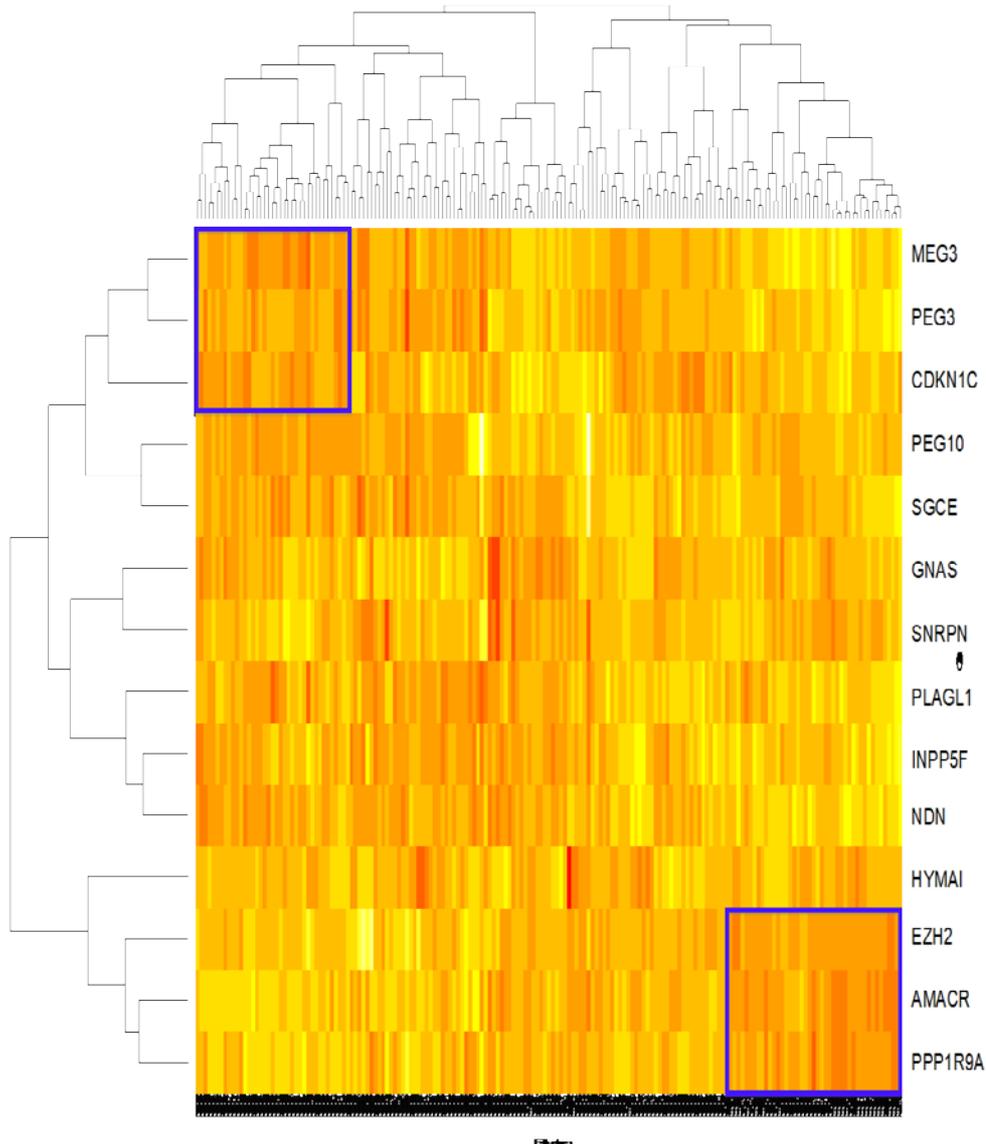


Abb. 31: Hierarchisches Cluster Dendrogramm der 14 im PCa Gewebe signifikant veränderter Gene. Die statistische Auswertung basiert auf den Daten von Taylor et al. (1) Blaue umrandet sind zwei statistisch signifikante Cluster.

Geninteraktionen im PCa erbracht. (151, 152)

In Abb. 31 werden auf der X-Achse die untersuchten Patientenproben dargestellt, wobei von links nach rechts zunächst gesunde

Prostatagewebe aufgetragen sind und maligne veränderte Gewebe folgen. Auf der Y-Achse werden die einzelnen Gene abgebildet. Beide Achsen sind in einem hierarchischen Clustersystem geordnet, sodass die in Abb. 31 erkennbare horizontale Anordnung der Gewebeproben, sowie die vertikale der Gene zustande kommt. Es konnten vor allem zwei signifikante Cluster dargestellt werden. *PPP1R9A* clustert mit den bekannten Markern des PCa *EZH2* und *AMACR*. Weiterhin bilden *MEG3*, *PEG3* und *CDKN1C* einen statistisch signifikanten Cluster. Um nur die Gene in einem Clusterdiagramm zu vergleichen, die auch in der in silico Analyse in Oncomine®™ statistisch signifikant verändert waren, wurde das in 3.13 beschriebene Average-linkage Verfahren auf den Validierungsdatensatz (1) angewandt, im ersten Schritt für Normalgewebe und im zweiten Schritt für malignes PCa Gewebe. Abb. 32 stellt die Ergebnisse dieses Verfahren dar. Hier ist eine deutliche Umverteilung der Cluster, aber auch eine Veränderung der einzelnen Cluster von Normalgewebe zu Tumorgewebe erkennbar. Lediglich der Cluster um *PPP1R9A*, *SNRPN*, *INPP5F* und *GNAS* bleibt annähernd bestehen, jedoch fällt das Phosphatidyl-Inositol-Phosphatase-Gen *INPP5F* heraus. Dies könnte ein möglicher Grund dafür sein, warum der Cluster insgesamt seine Position relativ zu den Nachbargenen im malignen Gewebe gegenüber dem Normalgewebe ändert. Man könnte spekulieren, ob hier ein funktioneller Zusammenhang sichtbar wird: Der Wegfall von *INPP5F* und somit die Dysregulation der Expression und Funktion von *PPP1R9A* könnte nämlich über eine Phosphorylierung von AKT und möglicherweise weiterer Enzyme im PI3K/Akt-Signalweg erklärt werden.

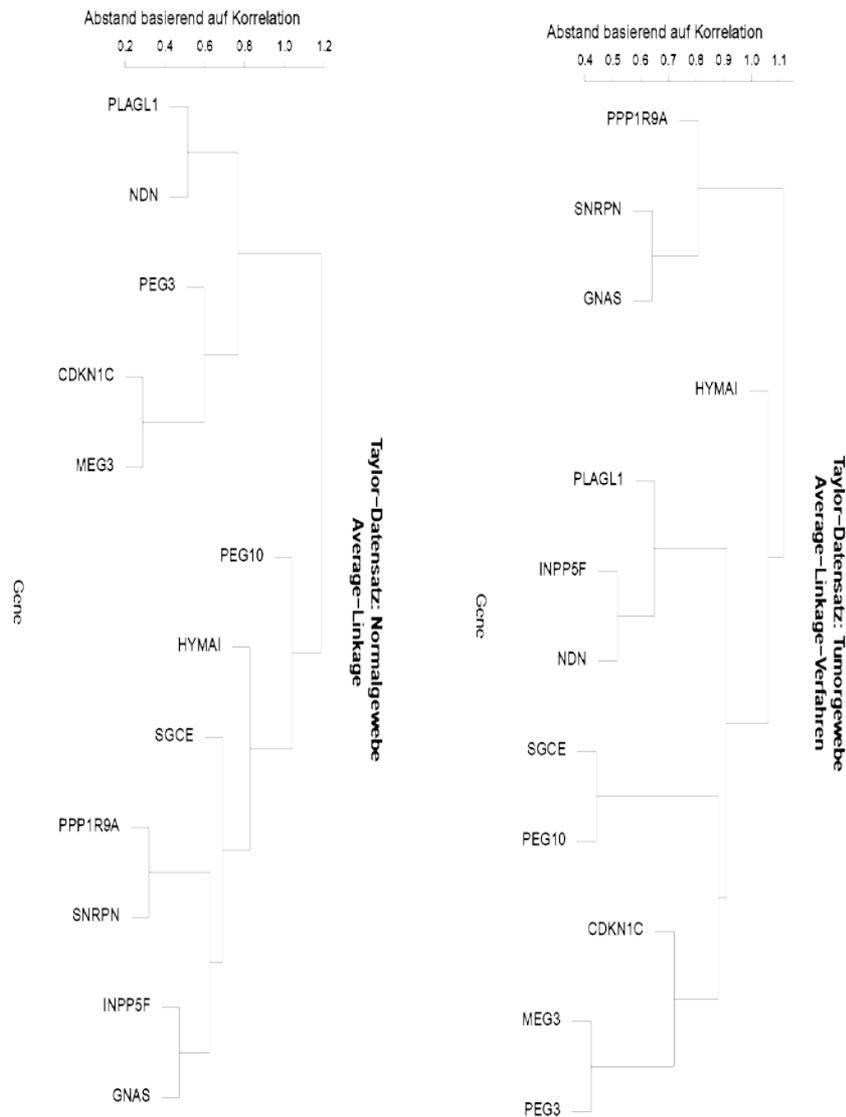


Abb. 32: Clustering über das Average-linkage Verfahren basierend auf dem Abstand der Korrelation. Links: 12 in Oncomine®™ signifikant veränderte Gene im Prostata-Normalgewebe, rechts: 12 in Oncomine®™ signifikant veränderte Gene im malignen PCa-Gewebe, beides basierend auf den Daten von Taylor et al. (1)

4.5. COPA Analyse in Oncomine®™

Lediglich die Chromosomenabschnitte 6q24, 7q und 10q zeigen signifikante Veränderungen der Genkopienzahlen in der COPA-Analyse. Eine Minderexpression von *PLAGL1* und *HYMAI* könnte durch den Verlust des Chromosomenabschnittes 6q24 erklärt werden. Die

Minderexpression von *PEG10* in der vorliegenden Arbeit könnte weiterhin auf dem Verlust des Chromosomenabschnittes 7q basieren. Das Gen *INPP5F* ist wie in Abschnitt 4.2.3. gezeigt minder exprimiert. Dies könnte durch einen Verlust des Chromosomenabschnittes 10q26 zumindest in manchen Fällen erklärt werden. Bei den Genen in allen übrigen Regionen kommen wahrscheinlich andere Mechanismen zum Tragen. Obwohl eine Übereinstimmung der Veränderungen der Region 20q13.32 zu beobachten ist, kann alleine anhand des COPA Mittels keine sichere Begründung der Genexpressionsveränderungen für *GNAS* postuliert werden. Auf Grund der Komplexität des *GNAS* Locus können die Veränderungen der Genkopienzahl nicht als Begründung der Genexpressionsveränderungen herangezogen werden. Die andeutungsweise Verminderung der Genkopienzahl von *NDN* im Bereich von 15q11.2-q12 zeigt lediglich ein COPA Mittel von -0,836 und ist somit zu gering um valide Schlussfolgerungen zu ziehen. Eine Analyse der Veränderungen der DNA-Dosis mit der COPA Methodik, wie in Abschnitt 3.9 beschrieben, macht wahrscheinlich, dass sich nur wenige Veränderungen der Genexpression bei den 12 Genen durch Veränderungen der Genkopienzahl erklären lassen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die COPA Analyse eine geeignete Methode ist, um Veränderungen der Genkopienzahl zu identifizieren.

Bei einigen Genen kommt es jedoch aufgrund der Komplexität oder der unzureichenden Datenmenge zu falsch negativen Ergebnissen. Zu berücksichtigen ist ferner die mangelnde Auflösung der verwendeten Daten. Beispielsweise haben genauere Analysen der chromosomalen Veränderungen mit Hochdurchsatz-sequenzierungstechniken die Deletionen auf 6q in einen gegenüber *PLAGL1* proximaleren Abschnitt lokalisiert. (153, 154)

Gen Produkt	Funktion	Expression	Chromosomale Lokalisation	Differenzierte Expression im PCA	DNA Dosis	COPA-Mittel
Hydatidiform mole associated and imprinted	Non-coding RNA mit unbekannter Funktion	paternal	6q24.2	↓	N.A.	0
Zinc finger protein PLAGL1	Mögliches Tumorsuppressorgen, Induktor der Apoptose und des Zellzyklus Arrestes, Mögliches Schlüssel Protein eines regulatorischen Netzwerkes im Pca	paternal	6q24-q25	↓	↓	-2,819
Epsilon-sarcoglycan	Transmembranprotein, Teil des Dystrophin Proteinkomplexes	paternal	7q21-q22	↓	↑	3,044
Paternally expressed gene 10	Protoonkogen, Hemmer der Apoptose, potentieller Inhibitor des TGFβ Signalweges	paternal	7q21	↓	↑	3,044
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	Potentieller Tumorsuppressor, Proteinphosphatase, Regulator des adhesion-dependent signalling	maternal	7q21.3	↑	↑	3,039
Inositol polyphosphate-5-phosphatase F	Inositol Polyphosphat Phosphatase, Regulator des PI3K und des PLC Signalweges	paternal	10q26.11	↓	↓	-2,02
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57,Kip2)	Tumorsuppressorgen, Hemmer verschiedener CDK's, Promoter des Zellzyklusarrestes	maternal	11p15.5	↓	↑	0,414
Maternally expressed 3	Non-coding RNA, möglicher Regulator der p53- und Rb1-Aktivität	maternal	14q32	↓	N.A.	0
Necdin	Hemmer der Zellproliferation, Transkriptionsfaktor, Activator des Wnt-Signalweges, Promoter der neuronalen Entwicklung, Hemmung der Adipozyten	paternal	15q11.2-q12	↓	↓	-0,836
Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	Regulator der pre-mRNA Prozessierung und gewebsspezifisches Splicing	paternal	15q11.2	↓ ↑	↓	-1,301
Paternally expressed gene 3	Tumorsuppressor, Proapoptische Funktionen, Hemmer des Wnt-Signalweges	paternal	19q13.4	↓	↑	0,319
Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1	Protoonkogene, α Untereinheit des G-Proteins, Regulator des cAMP Signalweges	paternal	20q13.32	↑	↑	1,016

Tabelle 8: Ergebnisse der COPA-Analyse der Oncomine® Datenbank anhand der DNA Kopienzahlen. Lediglich bei den Chromosomenabschnitte der blau markierten Bereiche könnte sich die veränderte Genexpression mit der Veränderung der DNA-Kopienzahl erklären lassen.

5. Schlussfolgerung

Durch die in den letzten 20 Jahren etablierte Methodik der Hochdurchsatz-Genexpressionsanalysen werden Datenmengen generiert die in ihrer Gänze nicht vollständig ausgewertet und nicht einmal ohne weiteres komplett verglichen werden können. Die Genexpressionsdatenbank Oncomine® stellt eine hilfreiche Plattform dar, in der mehrere komplexe Datensätze unkompliziert und zum Teil kostenfrei untereinander verglichen werden können. Dies erlaubt besonders Analysen unter anderen Gesichtspunkten als in den zu Grunde liegenden Originalpublikationen.

Solche Voranalysen sind schon längst in der kommerziell orientierten Biotechnologie und Pharmaforschung etabliert und werden vermehrt auch in der medizinischen und naturwissenschaftlichen akademischen Forschung genutzt.

In dieser Arbeit konnte auf diese Weise die Annahme, dass aufgrund der weitreichenden epigenetischen Dysregulation im PCa ein globales „Chaos“ der elterlichen Prägung vorherrscht, mit Hilfe der Datenbank Oncomine® sicher widerlegt werden. Man kann eher davon ausgehen, dass die Regulation und Funktion einer definierten Untergruppe von elterlich geprägten Genen im PCa gestört sind. Eine komplette Dysregulation kompletter epigenetischer Mechanismen an diesen Genen ist ebenfalls nicht anzunehmen, sondern eher eine Dysfunktion der epigenetischen Regulation einzelner Gene.

Interessanterweise wird gerade diesen Genen eine entscheidende Rolle in einem Netzwerk zugeschrieben, welches zur Zelldifferenzierung und zur Kontrolle des Zellzyklus beiträgt. Eine Beeinträchtigung dieses Netzwerkes durch Alterationen bestimmter Gene könnte demnach ebenfalls zur Entstehung und Progression von Prostatakarzinomen beitragen. (155) Die Veränderungen im Expressionsmuster deuten darauf hin, dass das Zusammenspiel der 12 Gene in diesem Netzwerk unzureichend funktioniert und somit die Kanzerogenese im Prostatakarzinom beeinflusst wird. (Abb. 33)

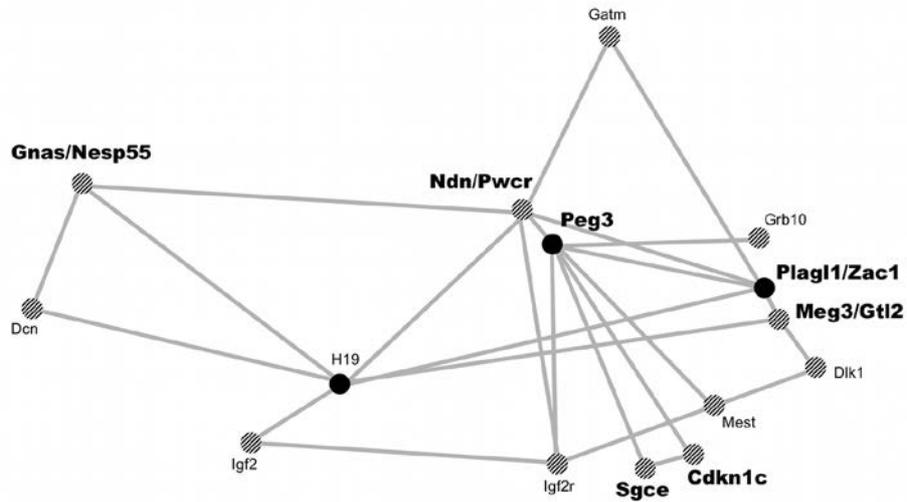
Außerdem wird postuliert, dass einige Gene, insbesondere *PLAGL1*, „Knotenpunkte“ in diesem Netzwerk sind und Funktionen weit entfernter Gene untereinander mit noch unbekanntem Mechanismen verknüpfen. (94, 95) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vereinbar mit Vorstellungen zu einem in der Maus identifizierten regulatorischen Netzwerk. (102, 156) Dies ist in Abb. 33 a und b illustriert.

Die primäre Ursache der beobachteten Störung des Netzwerks ist nicht bekannt. Eine Korrelation der einzelnen Gene mit anderen bekannten Regulatoren der Epigenetik wie der Histon-Methyltransferase *EZH2* war nicht erkennbar. Eine weitere mögliche Erklärung der Genexpressionsveränderungen wäre eine relevante DNA-Dosisveränderung der relevanten Genomabschnitte. Lediglich die Veränderungen in Genregionen 6q (*PLAGL1*), 7q (*PEG10*, *PPP1R9A*) und 10q (*INPP5F*) könnten sich zum Teil hierüber erklären lassen. In einer experimentellen Folgearbeit (96) wurde gezeigt, dass die Verminderung der *PLAGL1*-Expression als Mediator einiger Veränderungen wirken dürfte. Allerdings bleibt unklar, woher die Verringerung der *PLAGL1*-Expression selbst rührt.

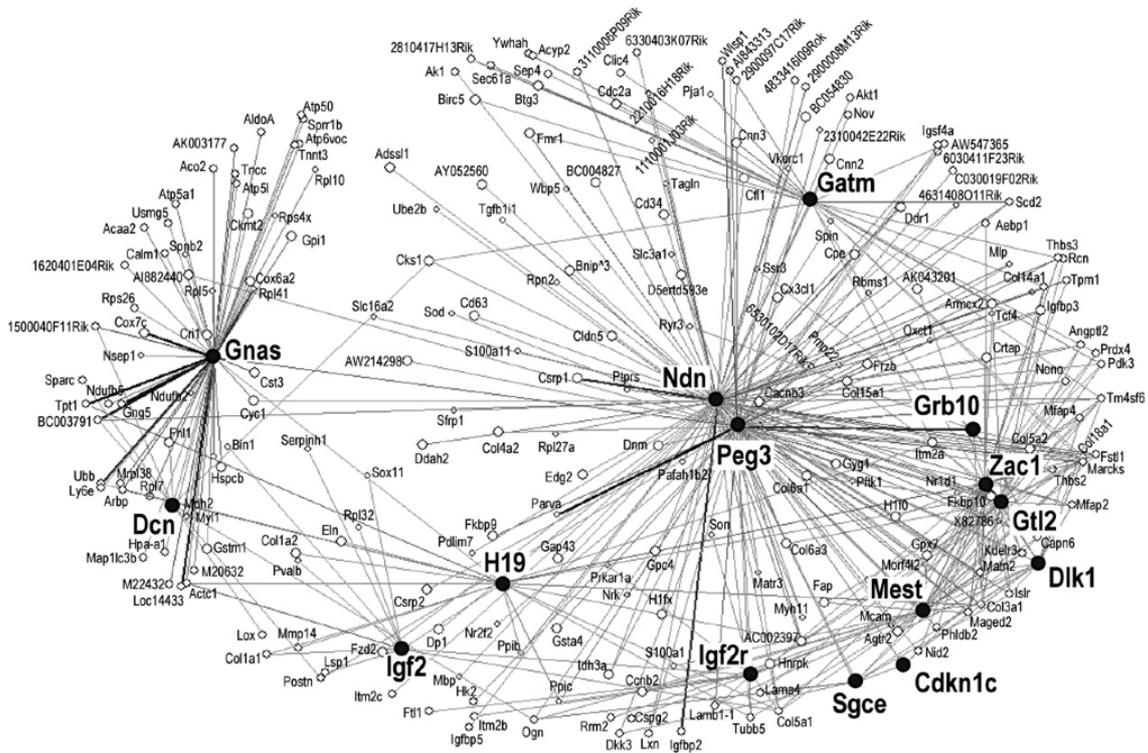
Überraschend fiel in der Analyse ein potentiell Markergen auf, nämlich *PPP1R9A*, welches vorher weder im PCa noch in anderen Tumorentitäten Gegenstand experimenteller Untersuchungen war. *PPP1R9A* korreliert mit einem anerkannten, auch klinisch verwertbaren Marker des PCa, *AMACR*. Des Weiteren kann eine Clusterbildung der Expression von *AMACR* mit *PPP1R9A* statistisch nachgewiesen werden. Untergruppierungen von Prostatakarzinomen konnten schon in vorherigen Studien gezeigt werden. (157) Auch in dieser *in silico* Analyse deutete sich eine Untergruppe von Prostatakarzinomen an, in der eine Deregulation eines Netzwerkes von epigenetisch geprägten Genen die Tumorgenese entscheidend beeinflussen könnte. Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass einige Gene dieses Netzwerkes den *PI3K/Akt*-Signalweg beeinflussen, der wiederum wechselseitig mit der Androgen-Antwort interagiert. Sie könnten über diesen Weg

entscheidend auf die Tumorprogression im Prostatakarzinom Einfluss nehmen. (94)

Schlussendlich belegt die Arbeit, dass *in silico* Analysen mit kommerziellen, aber auch frei verfügbaren Datenbanken durchaus sinnvoll für eine Voranalyse zu experimentellen Arbeiten sein können. Selbstverständlich sind die Ergebnisse dieser Analysen erst valide, wenn sie zum einem mit etablierten Datensätzen verglichen und zum anderen experimentell bestätigt sind. Dies konnte diese Arbeit leisten und viele Ergebnisse wurde von Frau Dr. rer. nat. Ribarska in ihrer anschließenden experimentellen Forschungsarbeit bestätigt.



A



B

Abb. 33: A) Original Grafik aus (94). Darstellung eines Netzwerkes bestimmter elterlich geprägter Gene, die sich untereinander in verschiedenster Weise auch im PCA zu regulieren scheinen. B) Netzwerk von elterlich geprägten Genen, welches im Mausembryo ko-reguliert ist. (102)

6. Literaturverzeichnis

1. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010;18:11-22.
2. Haun A, Hirscher M. Unternehmerische Ethik und Ökonomik: Widerspruch,(notwendige) Symbiose oder geschickte Strategie?. Kapitel 1-3. Innsbruck university press ; 2010.
3. Wirth M, Weißbach L, Ackermann R, et al. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Deutsche Gesellschaft für Urologie. 2009.
4. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004;101:2371-2490.
5. Reis ST, Viana NI, Leite KR, et al. Role of Genetic Polymorphisms in the Development and Prognosis of Sporadic and Familial Prostate Cancer. *PLoS One*. 2016;11:e0166380.
6. Epstein JI. An Update of the Gleason Grading System. *The Journal of Urology*. 2010;183:433-440.
7. Brachlow J, Kälin M, Randazzo M, et al. Das Prostatakarzinom: aktuelle Diagnostik und Therapiestandard. *Praxis, Schweizerische Rundschau für Medizin / Revue suisse de la médecine (Bern 1994)*. 2016;105:971-977.
8. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, et al. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res*. 1980;40:2428-2432.
9. Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 1987;317:909-916.
10. Nguyen-Nielsen M, Borre M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*. 2016;46:484-490.
11. Guess HA. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol Rev*. 2001;23:152-158.
12. Sandhu JS. Management of elevated prostate-specific antigen in men with nonbacterial chronic prostatitis. *Curr Urol Rep*. 2009;10:302-306.

13. Sartori DA, Chan DW. Biomarkers in prostate cancer: what's new? *Curr Opin Oncol*. 2014
14. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*. 2008;53:68-80.
15. Filella X, Foj L. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
16. Zhao L, Yu N, Guo T, et al. Tissue Biomarkers for Prognosis of prostate cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014.
17. Choi JH, Song YS, Yoon JS, et al. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS*. 2010;118:196-202.
18. Yang YA, Yu J. EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer. *Protein Cell*. 2013;4:331-341.
19. Donovan MJ, Cordon-Cardo C. Genomic analysis in active surveillance: predicting high-risk disease using tissue biomarkers. *Curr Opin Urol*. 2014.
20. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002;419:624-629.
21. Martinez-Garcia E, Licht JD. Deregulation of H3K27 methylation in cancer. *Nat Genet*. 2010;42:100-101.
22. Bohrer LR, Chen S, Hallstrom TC, Huang H. Androgens suppress EZH2 expression via retinoblastoma (RB) and p130-dependent pathways: a potential mechanism of androgen-refractory progression of prostate cancer. *Endocrinology*. 2010;151:5136-5145.
23. Ren G, Baritaki S, Marathe H, et al. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res*. 2012;72:3091-3104.
24. Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, et al. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals

pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res.* 2002;62:4427-4433.

25. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, et al. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 2002;287:1662-1670.

26. Saramäki OR, Porkka KP, Vessella RL, Visakorpi T. Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. *International Journal of Cancer.* 2006;119:1322-1329.

27. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007;67:8504-8510.

28. Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. *Prostate.* 2009;69:1091-1100.

29. Kindich R, Florl AR, Kamradt J, et al. Relationship of NKX3.1 and MYC gene copy number ratio and DNA hypomethylation to prostate carcinoma stage. *Eur Urol.* 2006;49:169-75; discussion 175.

30. Schlomm T. Chromosome 8p Deletions and 8q Gains are Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2010;16:56-64.

31. Varambally S, Yu J, Laxman B, et al. Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell.* 2005;8:393-406.

32. Sarker D, Reid AH, Yap TA, de Bono JS. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4799-4805.

33. Edwards J. Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:552.

34. Kristiansen G. FOXA1 Promotes Tumor Progression in Prostate Cancer and Represents a Novel Hallmark of Castration-Resistant Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology.* 2012;180:848-861.

35. João D. Cancer Prognosis Defined by the Combined Analysis of 8q, PTEN and ERG. *Translational Oncology*. 2016;9:575.
36. Serrati S. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:7355.
37. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science*. 2005;310:644.
38. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:882-888.
39. Shoag J. Clinical variability and molecular heterogeneity in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*. 2016;18:543.
40. Scheble VJ, Braun M, Beroukhim R, et al. ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Mod Pathol*. 2010;23:1061-1067.
41. Crea F, Clermont PL, Mai A, Helgason CD. Histone modifications, stem cells and prostate cancer. *Curr Pharm Des*. 2014;20:1687-1697.
42. Deb G, Thakur VS, Gupta S. Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis: epigenetics and beyond. *Epigenetics*. 2013;8:464-476.
43. Cunliffe VT. EZH2 promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells. *Prostate*. 2007;67:547-556.
44. Melling N, Thomsen E, Tsourlakis MC, et al. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis*. 2015;36:1333-1340.
45. Toren P, Zoubeidi A. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: challenges and opportunities (review). *Int J Oncol*. 2014;45:1793-1801.
46. Hodgson MC, Shao LJ, Frolov A, et al. Decreased expression and androgen regulation of the tumor suppressor gene INPP4B in prostate cancer. *Cancer Res*. 2011;71:572-582.

47. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod.* 2003;9:437-448.
48. Jones PA. Overview of cancer epigenetics. *Semin Hematol.* 2005;42:S3-S8.
49. Savio AJ, Bapat B. Beyond the island: epigenetic biomarkers of colorectal and prostate cancer. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:103-124.
50. Zelic R, Fiano V, Grasso C, et al. Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2015;18:1-12.
51. Damaschke NA, Yang B, Bhusari S, et al. Epigenetic susceptibility factors for prostate cancer with aging. *Prostate.* 2013;73:1721-1730.
52. Martignano F, Gurioli G, Salvi S, et al. GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Dis Markers.* 2016;2016:4358292.
53. Fitz Gerald LM, Naeem H, Makalic E, et al. Genome-Wide Measures of Peripheral Blood Dna Methylation and Prostate Cancer Risk in a Prospective Nested Case-Control Study. *Prostate.* 2017;77:471-478.
54. Schulz WA, Hatina J. Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med.* 2006;10:100-125.
55. Schulz WA, Hoffmann MJ. Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:172-180.
56. Yu J, Yu J, Rhodes DR, et al. A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res.* 2007;67:10657-10663.
57. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet.* 2008;40:741-750.
58. Schweiger MR. Genome-wide DNA Methylation Events in TMPRSS2–ERG Fusion-Negative Prostate Cancers Implicate an EZH2-Dependent Mechanism with miR-26a Hypermethylation. *Cancer Discovery.* 2012;2:1024-1035.

59. Sekhon K, Bucay N, Majid S, et al. MicroRNAs and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7:67597-67611.
60. Kgatle MM, Kalla AA, Islam MM, et al. Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy. *Prostate Cancer*. 2016;2016:5653862.
61. Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2010;17:F1-F17.
62. Gaudreau P-O. The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. *Biomarkers in Cancer*. 2016;8:15.
63. Gerhauser C. Role of lncRNAs in prostate cancer development and progression. *Biological Chemistry*. 2014;395:1275-1290.
64. Heubach J. The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells. *Molecular Cancer*. 2015;14.
65. Lin Y. Guided by RNAs: X-inactivation as a model for lncRNA function. *Journal of molecular biology*. 2013;425:3698.
66. Liu W, Chang B, Sauvageot J, et al. Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cancers using Affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:1018-1032.
67. Dahiya R, McCarville J, Lee C, et al. Deletion of chromosome 11p15, p12, q22, q23-24 loci in human prostate cancer. *Int J Cancer*. 1997;72:283-288.
68. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, et al. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res*. 2002;62:6442-6446.
69. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*. 2003;299:1753-1755.

70. Bhusari S, Yang B, Kueck J, et al. Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer. *Prostate*. 2011;71:1621-1630.
71. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006;7:21-33.
72. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004;6:1-6.
73. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, et al. Mining for regulatory programs in the cancer transcriptome. *Nat Genet*. 2005;37:579-583.
74. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*. 2007;9:166-180.
75. MacDonald JW, Ghosh D. COPA—cancer outlier profile analysis. *Bioinformatics*. 2006;22:2950-2951.
76. Wallace TA, Prueitt RL, Yi M, et al. Tumor immunobiological differences in prostate cancer between African-American and European-American men. *Cancer Res*. 2008;68:927-936.
77. Magee JA, Araki T, Patil S, et al. Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61:5692-5696.
78. Arcaro A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Front Pharmacol*. 2013;4:30.
79. Bender R, Lange S. Was ist der p-Wert? *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2001;126:T39-T40.
80. Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet*. 2007;39:41-51.
81. Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E, et al. Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol*. 2004;164:217-227.

82. Lapointe J, Li C, Higgins JP, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:811-816.
83. LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, et al. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res*. 2002;62:4499-4506.
84. Liu P, Ramachandran S, Ali Seyed M, et al. Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66:4011-4019.
85. Luo JH, Yu YP, Cieply K, et al. Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog*. 2002;33:25-35.
86. Singh D, Febbo PG, Ross K, et al. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell*. 2002;1:203-209.
87. Vanaja DK, Chevillat JC, Iturria SJ, Young CY. Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2003;63:3877-3882.
88. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, et al. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61:5974-5978.
89. Yu YP, Landsittel D, Jing L, et al. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol*. 2004;22:2790-2799.
90. Sørensen KD, Ørntoft TF. Discovery of prostate cancer biomarkers by microarray gene expression profiling. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10:49-64.
91. Luo J, Zha S, Gage WR, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res*. 2002;62:2220-2226.
92. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med*. 2012;366:141-149.

93. McMullin RP, Dobi A, Mutton LN, et al. A FOXA1-binding enhancer regulates Hoxb13 expression in the prostate gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:98-103.
94. Ribarska T, Bastian K-M, Koch A, Schulz WA. Specific changes in the expression of imprinted genes in prostate cancer—implications for cancer progression and epigenetic regulation. *Asian Journal of Andrology*. 2012;14:436.
95. Jin RJ, Lho Y, Wang Y, et al. Down-regulation of p57Kip2 induces prostate cancer in the mouse. *Cancer Res*. 2008;68:3601-3608.
96. Ribarska T, Goering W, Droop J, et al. Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer. *Epigenetics*. 2014;9:704.
97. Pagotto U, Arzberger T, Theodoropoulou M, et al. The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Res*. 2000;60:6794-6799.
98. Van Dyck F, Declercq J, Braem CV, Van de Ven WJ. PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: versatility in tumour development (review). *Int J Oncol*. 2007;30:765-774.
99. Jarmalaite S, Laurinaviciene A, Tverkuvienė J, et al. Tumor suppressor gene ZAC/PLAGL1: altered expression and loss of the nonimprinted allele in pheochromocytomas. *Cancer Genet*. 2011;204:398 - 404.
100. Valleley EM, Cordery SF, Carr IM, et al. Loss of expression of ZAC/PLAGL1 in diffuse large B-cell lymphoma is independent of promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49:480-486.
101. Murillo H, Schmidt LJ, Karter M, et al. Prostate cancer cells use genetic and epigenetic mechanisms for progression to androgen independence. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:702-716.
102. Varrault A, Gueydan C, Delalbre A, et al. Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell*. 2006;11:711-722.
103. Theodoropoulou M, Stalla GK, Spengler D. ZAC1 target genes and pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;326:60-65.

104. Bönnemann CG, McNally EM, Kunkel LM. Beyond dystrophin: current progress in the muscular dystrophies. *Curr Opin Pediatr.* 1996;8:569-582.
105. Ritz K, van Schaik BD, Jakobs ME, et al. SGCE isoform characterization and expression in human brain: implications for myoclonus-dystonia pathogenesis? *Eur J Hum Genet.* 2011;19:438-444.
106. Ortega P, Moran A, Fernandez-Marcelo T, et al. MMP-7 and SGCE as distinctive molecular factors in sporadic colorectal cancers from the mutator phenotype pathway. *Int J Oncol.* 2010;36:1209-1215.
107. Kainz B, Shehata M, Bilban M, et al. Overexpression of the paternally expressed gene 10 (PEG10) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2007;121:1984-1993.
108. Jie X, Lang C, Jian Q, et al. Androgen activates PEG10 to promote carcinogenesis in hepatic cancer cells. *Oncogene.* 2007;26:5741-5751.
109. Tsuji K, Yasui K, Gen Y, et al. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;198:118-125.
110. Lux A, Beil C, Majety M, et al. Human retroviral gag- and gag-pol-like proteins interact with the transforming growth factor-beta receptor activin receptor-like kinase 1. *J Biol Chem.* 2005;280:8482-8493.
111. Li CM, Margolin AA, Salas M, et al. PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66:665-672.
112. Ip W-K, Lai PB-S, Wong NL-Y, et al. Identification of PEG10 as a progression related biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2007;250:284 - 291.
113. Oliver CJ, Terry-Lorenzo RT, Elliott E, et al. Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol.* 2002;22:4690-4701.
114. Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, et al. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:8351-8356.

115. Duhadaway J, Rowe F, Elliott K, et al. Bau, a splice form of Neurabin-I that interacts with the tumor suppressor Bin1, inhibits malignant cell transformation. *Cell Adhes Commun.* 1999;7:99-110.
116. Sarrouilhe D, di Tommaso A, Méstayé T, Ladeveze V. Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie.* 2006;88:1099-1113.
117. Zhu W, Trivedi CM, Zhou D, et al. Inpp5f is a polyphosphoinositide phosphatase that regulates cardiac hypertrophic responsiveness. *Circ Res.* 2009;105:1240-1247.
118. Penninger JM. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovascular Research.* 2009;82:250-260.
119. Pateras IS, Apostolopoulou K, Niforou K, et al. p57KIP2: "Kip"ing the cell under control. *Mol Cancer Res.* 2009;7:1902-1919.
120. Andrews SC, Wood MD, Tunster SJ, Barton SC, Surani MA, John RM. Cdkn1c (p57Kip2) is the major regulator of embryonic growth within its imprinted domain on mouse distal chromosome 7. *BMC Developmental Biology.* 2007;7:53.
121. Kavanagh E, Joseph B. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816:50-56.
122. Schwarze SR, Shi Y, Fu VX, et al. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene.* 2001;20:8184-8192.
123. Cheng CY, Hwang CI, Corney DC, et al. miR-34 cooperates with p53 in suppression of prostate cancer by joint regulation of stem cell compartment. *Cell Rep.* 2014;6:1000-1007.
124. Lodygin D, Diebold J, Hermeking H. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3 σ expression. *Oncogene.* 2004;23:9034-9041.
125. Luo G, Wang M, Wu X, et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37:2209-2220.
126. Liu D, Yu X, Wang S, et al. The gain and loss of long noncoding RNA associated-competing endogenous RNAs in prostate cancer. *Oncotarget.* 2016.

127. Greife A, Knievel J, Ribarska T, et al. Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2014;6:29.
128. Lin S-P, Youngson N, Takada S, et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet*. 2003;35:97.
129. Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *International Journal of Cancer*. 2011;129:773-779.
130. Lu K-H, Li W, Liu X-H, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer*. 2013;13:461.
131. Julja B. DLK1-DIO3 Genomic Imprinted MicroRNA Cluster at 14q32.2 Defines a Stemlike Subtype of Hepatocellular Carcinoma Associated with Poor Survival. *J Biol Chem*. 2011;286:30706.
132. Masayo Kagami M. The IG-DMR and the MEG3-DMR at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers. *PLoS Genet*. 2010;6.
133. Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K. Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins. *J Neurosci*. 2006;26:5383-5392.
134. Jin DK. Systematic review of the clinical and genetic aspects of Prader-Willi syndrome. *Korean Journal of Pediatrics*. 2011;54:55.
135. Taniura H, Taniguchi N, Hara M, Yoshikawa K. Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem*. 1998;273:720-728.
136. Taniguchi N, Taniura H, Niinobe M, et al. The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem*. 2000;275:31674-31681.
137. Asai T, Liu Y, Nimer SD. Necdin, a p53 target gene, in normal and cancer stem cells. *Oncotarget*. 2013.

138. Jingjie Yi JL. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:1684.
139. Julie Lafontaine F. Necdin, a p53-Target Gene, Is an Inhibitor of p53-Mediated Growth Arrest. *PLoS One*. 2012;7.
140. De Faveri LE, Hurst CD, Platt FM, et al. Putative tumour suppressor gene necdin is hypermethylated and mutated in human cancer. *Br J Cancer*. 2013;108:1368-1377.
141. Jiang X, Yu Y, Yang HW, et al. The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth. *J Biol Chem*. 2010;285:8472-8480.
142. Otsuka S, Maegawa S, Takamura A, et al. Aberrant promoter methylation and expression of the imprinted PEG3 gene in glioma. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85:157-165.
143. Rezvani G, Lui JC, Barnes KM, Baron J. A set of imprinted genes required for normal body growth also promotes growth of rhabdomyosarcoma cells. *Pediatr Res*. 2012;71:32-38.
144. Nye MD, Hoyo C, Huang Z, et al. Associations between methylation of paternally expressed gene 3 (PEG3), cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *PLoS One*. 2013;8:e56325.
145. Kasbohm EA, Guo R, Yowell CW, et al. Androgen receptor activation by G(s) signaling in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2005;280:11583-11589.
146. Kelsey G. Imprinting the Gnas locus. *Cytogenet Genome Res*. 2006;113:178-187.
147. Watanabe M, Hirokawa Y, Tsuji M, et al. Lack of involvement of the GNAS1 T393C polymorphism in prostate cancer risk in a Japanese population. *Anticancer Res*. 2008;28:3711-3716.
148. James L. GNAS Mutations Identify a Set of Right-Sided, RAS Mutant, Villous Colon Cancers. *PLoS One*. 2014;9.
149. Hakan Alakus S. Association of the GNAS1 T393C polymorphism with tumor stage and survival in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2009;15:6061.

150. Li X, Lin Y, Yang X, et al. Long noncoding RNA H19 regulates EZH2 expression by interacting with miR-630 and promotes cell invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473:913-919.
151. Paulo P, Ribeiro FR, Santos J, et al. Molecular subtyping of primary prostate cancer reveals specific and shared target genes of different ETS rearrangements. *Neoplasia.* 2012;14:600-611.
152. Zhong W-D. Analysis of the specific pathways and networks of prostate cancer for gene expression profiles in the Chinese population. *Medical Oncology.* 2011;29:1972-1984.
153. Kluth M. Heterogeneity and chronology of 6q15 deletion and ERG-fusion in prostate cancer. *Oncotarget.* 2016;7:3897.
154. Williams JL, Greer PA, Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet.* 2014;207:474-488.
155. Ribarska T, Bastian K-M, Koch A, Schulz WA. Specific changes in the expression of imprinted genes in prostate cancer—implications for cancer progression and epigenetic regulation. *Asian Journal of Andrology.* 2012;14:436.
156. Al Adhami H, Evano B, Le Digarcher A, et al. A systems-level approach to parental genomic imprinting: the imprinted gene network includes extracellular matrix genes and regulates cell cycle exit and differentiation. *Genome Res.* 2015;25:353-367.
157. Gorlov IP, Byun J, Logothetis CJ. In silico functional profiling of individual prostate cancer tumors: many genes, few functions. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012;9:109-114.

7. Anhang

7.1. Formatierungen der Boxplots:

```
ylim=c(7, 9), yaxt="n")
axis(2, at=c(7, 8, 9))

lines(c(1, 1), c(bp$stat[1, 1], bp$stats[2, 1]), col="black")
lines(c(1, 1), c(bp$stat[4, 1], bp$stats[5, 1]), col="black")
lines(c(2, 2), c(bp$stat[1, 2], bp$stats[2, 2]), col="black")
lines(c(2, 2), c(bp$stat[4, 2], bp$stats[5, 2]), col="black")

pars=list(whisklty=1, whisklwd=1, whiskcol="black")
par(las=1)
```

7.2. Verwendete Konsolenbefehle in R/R64

```
> library(relimp, pos=4)

> showData(Datenmatrix, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'),
+ maxwidth=80, maxheight=30)

> showData(CDKN1C, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'),
+ maxwidth=80,
+ maxheight=30)

> boxplot(MedianederrelativenGenexpression~CDKN1C,
+ ylab="MedianederrelativenGenexpression", xlab="CDKN1C", data=CDKN1C)

> t.test(MedianederrelativenGenexpression~CDKN1C, alternative='two.sided',
+ conf.level=.95, var.equal=FALSE, data=CDKN1C)
```

Welch Two Sample t-test

```
data: MedianederrelativenGenexpression by CDKN1C
t = 1.4387, df = 83.731, p-value = 0.1540
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.2042515 1.2728562
sample estimates:
mean in group Normal mean in group Tumor
```

0.45906977 -0.07523256

```
> Datenmatrix_taylor <-
+ read.table("/Users/klaus-mariusbastian/Desktop/Dr.Arbeit/laufende
Arbeiten/formatiert fuÃr R64 rohdaten taylor incl normalgewebe.txt",
+ header=TRUE, sep="\t", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)

> showData(Datenmatrix_taylor, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'),
+ maxwidth=80, maxheight=30)

> t.test(Datenmatrix_taylor$AMACR, Datenmatrix_taylor$PCaAMACR,
+ alternative='two.sided', conf.level=.95, paired=TRUE)
```

Paired t-test

```
data: Datenmatrix_taylor$AMACR and Datenmatrix_taylor$PCaAMACR
t = -9.0688, df = 28, p-value = 7.954e-10
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-2.269874 -1.433402
sample estimates:
mean of the differences
-1.851638
```

```
> t.test(Datenmatrix_taylor$AMACR, Datenmatrix_taylor$PCaAMACR,
+ alternative='less', conf.level=.95, paired=TRUE)
```

Paired t-test

```
data: Datenmatrix_taylor$AMACR and Datenmatrix_taylor$PCaAMACR
t = -9.0688, df = 28, p-value = 3.977e-10
alternative hypothesis: true difference in means is less than 0
95 percent confidence interval:
-Inf -1.504307
sample estimates:
mean of the differences
-1.851638
```

```
> t.test(Datenmatrix_taylor$PLAGL1, Datenmatrix_taylor$PCaPLAGL1,
+ alternative='two.sided', conf.level=.95, paired=TRUE)
```

Paired t-test

```

data: Datenmatrix_taylor$PLAGL1 and Datenmatrix_taylor$PCaPLAGL1
t = 0.7772, df = 28, p-value = 0.4436
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.1307195 0.2905636
sample estimates:
mean of the differences
0.07992207

```

```

> t.test(Datenmatrix_taylor$CDKN1C, Datenmatrix_taylor$PCaCDKN1C,
+ alternative='two.sided', conf.level=.95, paired=TRUE)

```

Paired t-test

```

data: Datenmatrix_taylor$CDKN1C and Datenmatrix_taylor$PCaCDKN1C
t = 2.9781, df = 28, p-value = 0.00593
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.03665631 0.19818575
sample estimates:
mean of the differences
0.1174210

```

```
[R.app GUI 1.34 (5589) x86_64-apple-darwin9.8.0]
```

```

> library(Rcmdr)
Lade nötiges Paket: tcltk
Lade Tcl/Tk Interface ... fertig
Lade nötiges Paket: car
Lade nötiges Paket: MASS
Lade nötiges Paket: nnet
Lade nötiges Paket: survival
Lade nötiges Paket: splines

```

```
Rcmdr Version 1.6-0
```

Attache Paket: 'Rcmdr'

The following object(s) are masked from 'package:tcltk':

tclvalue

```
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative"Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR)
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR)
> par(las=1)
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR)
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR, pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"))
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR, pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"))
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR)
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR, pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"))
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR, main="p<0,01")
> boxplot(relativeGenexpression~AMACR, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="AMACR", data=AMACR, pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), main="p<0,01")
> boxplot(ralativeGenexpression~CDKN1C, ylab="ralative Genexpression",
+ xlab="CDKN1C", data=CDKN1C, main="p=0,00593", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(7, 8, 9)))
Fehler: Unerwartetes ')' in "axis(2, at=c(7, 8, 9)))"
> boxplot(ralativeGenexpression~CDKN1C, ylab="ralative Genexpression",
+ xlab="CDKN1C", data=CDKN1C, main="p=0,00593", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n"
+ axis(2, at=c(7, 8, 9)))
Fehler: Unerwartetes Symbol in:
" xlab="CDKN1C", data=CDKN1C, main="p=0,00593", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n"
axis"
```

```

> boxplot(relativeGenexpression~CDKN1C, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="CDKN1C", data=CDKN1C, main="p=0,00593", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n"
+ axis(2, at=c(7, 8, 9))
Fehler: Unerwartetes Symbol in:
" xlab="CDKN1C", data=CDKN1C, main="p=0,00593", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n"
axis"
> boxplot(relativeGenexpression~CDKN1C, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="CDKN1C", data=CDKN1C, main="p=0,00593", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~EZH2, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="EZH2", data=EZH2, pars=list(whisklty=1, whisklwd=1, whiskcol="black"),
ylim=c(6, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~EZH2, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="EZH2", data=EZH2, main="p=0,01301", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(6, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~GNAS, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="GNAS", data=GNAS, main="p=0,6568", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(10, 12), yaxt="n")
> axis(2, at=c(10, 11, 12))
> boxplot(relativeGenexpression~HYMAI, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="HYMAI", data=HYMAI, main="p=0,07255", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(10, 13), yaxt="n")
> axis(2, at=c(10, 11, 12, 13))
> boxplot(relativeGenexpression~HYMAI, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="HYMAI", data=HYMAI, main="p=0,07255", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(11, 13), yaxt="n")
> axis(2, at=c(11, 12, 13))
> boxplot(relativeGenexpression~INPP5F, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="INPP5F", data=INPP5F, main="p=0,003834", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(6, 8), yaxt="n")
> axis(2, at=c(6, 7, 8))
> boxplot(relativeGenexpression~MEG3, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="MEG3", data=MEG3, main="p=0,2019", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(7, 10), yaxt="n")
> axis(2, at=c(7, 8, 9, 10))
> boxplot(relativeGenexpression~NDN, ylab="relativeGenexpression", xlab="NDN",
+ data=NDN, main="p=0,1263", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(5, 7), yaxt="n")

```

```

> axis(2, at=c(5, 6, 7))
> boxplot(relativeGenexpression~NDN, ylab="relative Genexpression", xlab="NDN",
+ data=NDN, main="p=0,1263", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(5, 7), yaxt="n")
> axis(2, at=c(5, 6, 7))
> boxplot(realtiveGenexpression~PEG3, ylab="realtive Genexpression",
+ xlab="PEG3", data=PEG3, main="p=0,0003996", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(6, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~PEG10, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="PEG10", data=PEG10, main="p=0,0002286", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"))
> boxplot(relativeGenexpression~PLAGL1, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="PLAGL1", data=PLAGL1, main="p=0,4436", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(6, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~PPP1R9A, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="PPP1R9A", data=PPP1R9A, main="p=0,00147", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"), ylim=c(7, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~SGCE, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="SGCE", data=SGCE, main="p=0,001328", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(5, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(5, 6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~SGCE, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="SGCE", data=SGCE, main="p=0,001328", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(5.5, 9), yaxt="n")
> axis(2, at=c(5, 6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~SGCE, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="SGCE", data=SGCE, main="p=0,001328", pars=list(whisklty=1, whisklwd=1,
whiskcol="black"), ylim=c(5.5, 9.5), yaxt="n")
> axis(2, at=c(5, 6, 7, 8, 9))
> boxplot(relativeGenexpression~SNRPN, ylab="relative Genexpression",
+ xlab="SNRPN", data=SNRPN, main="p=0,2129", pars=list(whisklty=1,
whisklwd=1, whiskcol="black"))

> Datenmatrix1 <-
+ read.table("/Users/klaus-mariusbastian/Desktop/Dr.Arbeit/laufende Arbeiten/R64
EZH2 Expressionsvergleiche mit 12 genen ohne Tabst.txt",
+ header=TRUE, sep=" ", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)

> cor(Datenmatrix1[,c("CDKN1C", "EZH2")], use="complete.obs")

```

```

      CDKN1C   EZH2
CDKN1C 1.0000000 -0.2487740
EZH2   -0.2487740 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$CDKN1C, Datenmatrix1$EZH2, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$CDKN1C and Datenmatrix1$EZH2
t = -0.8519, df = 11, p-value = 0.4124
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.7033505 0.3502156
sample estimates:
      cor
-0.2487740

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","GNAS")], use="complete.obs")
      EZH2   GNAS
EZH2 1.0000000 0.4300366
GNAS 0.4300366 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$GNAS, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$GNAS
t = 1.6501, df = 12, p-value = 0.1248
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.1302653 0.7821533
sample estimates:
      cor
0.4300366

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","HYMAI")], use="complete.obs")
      EZH2   HYMAI
EZH2 1.0000000 0.9948477
HYMAI 0.9948477 1.0000000

```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$HYMAI, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```
data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$HYMAI
t = 13.8777, df = 2, p-value = 0.005152
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.7696546 0.9998975
sample estimates:
      cor
0.9948477
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "INPP5F")], use="complete.obs")
      EZH2  INPP5F
EZH2  1.0000000 0.0647496
INPP5F 0.0647496 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$INPP5F, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```
data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$INPP5F
t = 0.2052, df = 10, p-value = 0.8415
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.5288023 0.6157693
sample estimates:
      cor
0.0647496
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "MEG3")], use="complete.obs")
      EZH2  MEG3
EZH2  1.0000000 -0.4371259
MEG3 -0.4371259 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$MEG3, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$MEG3
t = -1.6119, df = 11, p-value = 0.1353
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.7963180 0.1499827
sample estimates:
cor
-0.4371259

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","NDN")], use="complete.obs")
      EZH2      NDN
EZH2 1.0000000 0.08573374
NDN 0.08573374 1.00000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$NDN, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$NDN
t = 0.2721, df = 10, p-value = 0.791
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.5134300 0.6287015
sample estimates:
cor
0.08573374

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PEG3")], use="complete.obs")
      EZH2      PEG3
EZH2 1.0000000 0.6663254
PEG3 0.6663254 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PEG3, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$PEG3
 t = 3.0955, df = 12, p-value = 0.009267
 alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
 95 percent confidence interval:
 0.2099830 0.8842784
 sample estimates:
 cor
 0.6663254

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PEG10")], use="complete.obs")
      EZH2  PEG10
EZH2 1.0000000 0.6806314
PEG10 0.6806314 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PEG10, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$PEG10
 t = 2.7871, df = 9, p-value = 0.02115
 alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
 95 percent confidence interval:
 0.1364806 0.9092609
 sample estimates:
 cor
 0.6806314

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PLAGL1")], use="complete.obs")
      EZH2  PLAGL1
EZH2 1.0000000 0.1278772
PLAGL1 0.1278772 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PLAGL1, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$PLAGL1
 t = 0.4276, df = 11, p-value = 0.6772
 alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.4551793 0.6341792

sample estimates:

cor

0.1278772

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PPP1R9A")], use="complete.obs")
```

```
      EZH2  PPP1R9A
```

```
EZH2  1.0000000 0.2515545
```

```
PPP1R9A 0.2515545 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PPP1R9A, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$PPP1R9A

t = 0.5812, df = 5, p-value = 0.5863

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.6187088 0.8446132

sample estimates:

cor

0.2515545

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","SGCE")], use="complete.obs")
```

```
      EZH2  SGCE
```

```
EZH2  1.0000000 -0.1708935
```

```
SGCE -0.1708935 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$SGCE, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$SGCE

t = -0.5485, df = 10, p-value = 0.5954

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.6782728 0.4468316

sample estimates:

```
cor
-0.1708935
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZHZ", "SNRPN.o.", "SNRPN.u.")], use="complete.obs")
```

```
      EZHZ  SNRPN.o.  SNRPN.u.
EZHZ    1.0000000 -0.6211599  0.0647496
SNRPN.o. -0.6211599  1.0000000 -0.4070402
SNRPN.u.  0.0647496 -0.4070402  1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZHZ, Datenmatrix1$SNRPN.o., alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZHZ and Datenmatrix1\$SNRPN.o.

t = -1.6087, df = 12, p-value = 0.1337

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.7779264 0.1408628

sample estimates:

```
cor
-0.4211965
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZHZ, Datenmatrix1$SNRPN.u., alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZHZ and Datenmatrix1\$SNRPN.u.

t = 0.2052, df = 10, p-value = 0.8415

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.5288023 0.6157693

sample estimates:

```
cor
0.0647496
```

```
> Datenmatrix1 <-
```

```
+ read.table("/Users/klaus-mariusbastian/Desktop/Dr.Arbeit/laufende Arbeiten/R64
EZHZ Expressionsvergleiche mit 12 genen ohne Tabst.txt",
```

```
+ header=TRUE, sep="", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)

> cor(Datenmatrix1[,c("CDKN1C","EZH2")], use="complete.obs")
      CDKN1C  EZH2
CDKN1C 1.0000000 -0.2487740
EZH2   -0.2487740 1.0000000

> cor.test(Datenmatrix1$CDKN1C, Datenmatrix1$EZH2, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```
data: Datenmatrix1$CDKN1C and Datenmatrix1$EZH2
t = -0.8519, df = 11, p-value = 0.4124
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.7033505 0.3502156
sample estimates:
cor
-0.2487740
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","GNAS")], use="complete.obs")
      EZH2  GNAS
EZH2 1.0000000 0.4300366
GNAS 0.4300366 1.0000000

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$GNAS, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```
data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$GNAS
t = 1.6501, df = 12, p-value = 0.1248
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.1302653 0.7821533
sample estimates:
cor
0.4300366
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","HYMAI")], use="complete.obs")
```

```

      EZH2  HYMAI
EZH2  1.0000000 0.9948477
HYMAI 0.9948477 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$HYMAI, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$HYMAI
t = 13.8777, df = 2, p-value = 0.005152
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.7696546 0.9998975
sample estimates:
      cor
0.9948477

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "INPP5F")], use="complete.obs")
      EZH2  INPP5F
EZH2  1.0000000 0.0647496
INPP5F 0.0647496 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$INPP5F, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$INPP5F
t = 0.2052, df = 10, p-value = 0.8415
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.5288023 0.6157693
sample estimates:
      cor
0.0647496

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "MEG3")], use="complete.obs")
      EZH2  MEG3
EZH2  1.0000000 -0.4371259
MEG3 -0.4371259 1.0000000

```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$MEG3, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```
data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$MEG3
t = -1.6119, df = 11, p-value = 0.1353
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.7963180 0.1499827
sample estimates:
cor
-0.4371259
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "NDN")], use="complete.obs")
      EZH2      NDN
EZH2 1.00000000 0.08573374
NDN 0.08573374 1.00000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$NDN, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```
data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$NDN
t = 0.2721, df = 10, p-value = 0.791
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.5134300 0.6287015
sample estimates:
cor
0.08573374
```

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "PEG3")], use="complete.obs")
      EZH2      PEG3
EZH2 1.00000000 0.6663254
PEG3 0.6663254 1.00000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PEG3, alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$PEG3
t = 3.0955, df = 12, p-value = 0.009267
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.2099830 0.8842784
sample estimates:
      cor
0.6663254

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PEG10")], use="complete.obs")
      EZH2  PEG10
EZH2 1.0000000 0.6806314
PEG10 0.6806314 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PEG10, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

```

data: Datenmatrix1$EZH2 and Datenmatrix1$PEG10
t = 2.7871, df = 9, p-value = 0.02115
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.1364806 0.9092609
sample estimates:
      cor
0.6806314

```

```

> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PLAGL1")], use="complete.obs")
      EZH2  PLAGL1
EZH2 1.0000000 0.1278772
PLAGL1 0.1278772 1.0000000

```

```

> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PLAGL1, alternative="two.sided",
+ method="pearson")

```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$PLAGL1

t = 0.4276, df = 11, p-value = 0.6772

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.4551793 0.6341792

sample estimates:

cor

0.1278772

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","PPP1R9A")], use="complete.obs")
```

```
      EZH2  PPP1R9A
```

```
EZH2  1.0000000 0.2515545
```

```
PPP1R9A 0.2515545 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$PPP1R9A, alternative="two.sided",
```

```
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$PPP1R9A

t = 0.5812, df = 5, p-value = 0.5863

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.6187088 0.8446132

sample estimates:

cor

0.2515545

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2","SGCE")], use="complete.obs")
```

```
      EZH2  SGCE
```

```
EZH2  1.0000000 -0.1708935
```

```
SGCE -0.1708935 1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$SGCE, alternative="two.sided",
```

```
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$SGCE

t = -0.5485, df = 10, p-value = 0.5954

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.6782728 0.4468316

sample estimates:

cor

-0.1708935

```
> cor(Datenmatrix1[,c("EZH2", "SNRPN.o.", "SNRPN.u.")], use="complete.obs")
```

```
      EZH2  SNRPN.o.  SNRPN.u.
```

```
EZH2      1.0000000 -0.6211599  0.0647496
```

```
SNRPN.o. -0.6211599  1.0000000 -0.4070402
```

```
SNRPN.u.  0.0647496 -0.4070402  1.0000000
```

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$SNRPN.o., alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$SNRPN.o.

t = -1.6087, df = 12, p-value = 0.1337

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.7779264 0.1408628

sample estimates:

cor

-0.4211965

```
> cor.test(Datenmatrix1$EZH2, Datenmatrix1$SNRPN.u., alternative="two.sided",
+ method="pearson")
```

Pearson's product-moment correlation

data: Datenmatrix1\$EZH2 and Datenmatrix1\$SNRPN.u.

t = 0.2052, df = 10, p-value = 0.8415

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.5288023 0.6157693

sample estimates:

cor

0.0647496

```

> Taylor12genes <-
+ read.table("/Users/klaus-mariusbastian/Desktop/Dr.Arbeit/laufende
Arbeiten/cBio Cancer Genomic Portal/Rohdaten Taylor 12 Gene incl EZH2 fu?r
R_R64.txt",
+ header=TRUE, sep="\t", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)

> library(relimp, pos=4)

> showData(Taylor12genes, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'),
+ maxwidth=80, maxheight=30)

> t.test(Taylor12genes$CDKN1C, alternative='two.sided', mu=0.0,
+ conf.level=.95)

```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$CDKN1C
t = -7.2329, df = 108, p-value = 7.176e-11
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.0476540 -0.5969504
sample estimates:
mean of x
-0.8223022

```

```

> t.test(Taylor12genes$EZH2, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)

```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$EZH2
t = 17.8239, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
2.439166 3.049560
sample estimates:
mean of x
2.744363

```

```

> t.test(Taylor12genes$GNAS, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)

```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$GNAS
t = -4.1797, df = 108, p-value = 5.948e-05
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.9529311 -0.3398472
sample estimates:
mean of x
-0.6463891

```

```
> t.test(Taylor12genes$HYMAI, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$HYMAI
t = 8.1564, df = 108, p-value = 6.788e-13
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.3744184 0.6148247
sample estimates:
mean of x
0.4946215

```

```
> t.test(Taylor12genes$INPP5F, alternative='two.sided', mu=0.0,
+ conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$INPP5F
t = -12.4782, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.729204 -1.255140
sample estimates:
mean of x
-1.492172

```

```
> t.test(Taylor12genes$MEG3, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$MEG3
t = -9.6685, df = 108, p-value = 2.648e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.1983449 -0.7905878
sample estimates:
mean of x
-0.9944663

```

```
> t.test(Taylor12genes$NDN, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$NDN
t = -12.859, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.861738 -1.364435
sample estimates:
mean of x
-1.613086

```

```
> t.test(Taylor12genes$PEG3, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$PEG3
t = -14.1496, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.617798 -1.220229
sample estimates:
mean of x
-1.419013

```

```
> t.test(Taylor12genes$PEG10, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$PEG10
t = -11.4578, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.2283408 -0.8660198
sample estimates:
mean of x
-1.047180

```

```

> t.test(Taylor12genes$PLAGL1, alternative='two.sided', mu=0.0,
+ conf.level=.95)

```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$PLAGL1
t = -6.4858, df = 108, p-value = 2.732e-09
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.8809353 -0.4685201
sample estimates:
mean of x
-0.6747277

```

```

> t.test(Taylor12genes$PPP1R9A, alternative='two.sided', mu=0.0,
+ conf.level=.95)

```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$PPP1R9A
t = 14.8057, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
1.526762 1.998754
sample estimates:
mean of x
1.762758

```

```

> t.test(Taylor12genes$SGCE, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)

```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$SGCE
t = -14.6657, df = 108, p-value < 2.2e-16
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-1.922790 -1.464918
sample estimates:
mean of x
-1.693854

```

```
> t.test(Taylor12genes$SNRPN, alternative='two.sided', mu=0.0, conf.level=.95)
```

One Sample t-test

```

data: Taylor12genes$SNRPN
t = -0.923, df = 108, p-value = 0.3581
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.3001591 0.1094320
sample estimates:
mean of x
-0.09536354

```

```

data: Datenmatrix$AMACR and Datenmatrix$PCaAMACR
t = -9.0688, df = 28, p-value = 7.954e-10
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-2.269874 -1.433402
sample estimates:
mean of the differences
-1.851638

```

8. Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz, der diese Arbeit vorbildlich betreute und mich in jeglicher Fragestellung kollegial und professionell unterstützte.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Theodora Ribarska für ihre Unterstützung und Einarbeitung in die Methodik.

Von Herzen möchte ich mich bei meiner Mutter Eva, meinem Vater Klaus und meinem Bruder Joshua bedanken. Sie gaben mir in jeder Lage meines Studiums und der Promotion Kraft und Halt, sodass ich diese Arbeit zu Ende führen konnte.

Ich bedanke mich auch bei meinen Studienfreunden und heutigen Kollegen, Herrn Dr. med. Thuns, Herrn K. Bodis und Herr R. Bogesits, sie waren tolle Wegbegleiter, die mich mit Spaß an der Medizin und der Forschung unterstützen.

Dank geht auch an meine Chefärztin, Frau PD. Dr. med. C. Ludwig, und an das Team der Thoraxchirurgie in Kaiserswerth.

Zuletzt möchte ich mich aus tiefsten Herzen bei meiner lieben Ehefrau Anna Lena und unserer kleinen Tochter Greta bedanken. Ihnen und meiner ganzen Familie widme ich diese Arbeit.