

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

# **EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN DURCH DNA- HYPERMETHYLIERUNG IM PROSTATAKARZINOM**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von  
Anna Vinarskaja

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz  
Zweitgutachter: PD Dr. Simon Santourlidis

**Für meine Eltern.**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

ID4 Is Frequently Downregulated and Partially Hypermethylated in Prostate Cancer. Vinarskaja, Anna; Goering, Wolfgang; Ingenwerth, Marc; Schulz, Wolfgang A. World Journal of Urology. 3. 319–325. 2012.

Association of PITX2 mRNA Down-Regulation in Prostate Cancer with Promoter Hypermethylation and Poor Prognosis. Vinarskaja, Anna; Schulz, Wolfgang A.; Ingenwerth, Marc; Hader, Christiane; Arsov, Christian. Urologic Oncology. 5. 622–627. 2013.

DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer. Vinarskaja, Anna; Yamana, Masanori; Ingenwerth, Marc; Schulz, Wolfgang A. Cancers. 4. 3714–3725. 2011.

# I. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die am häufigsten vorkommende Neoplasie beim Mann und stellt die zweithäufigste Krebs-bedingte Todesursache dar. Jedoch wird nicht jeder Erkrankungsfall für den Betroffenen relevant und behandlungsbedürftig. Für die Behandlung ist es daher bedeutsam, diejenigen, bei denen die Krebserkrankung progredient verläuft und somit einer belastenden Therapie bedürfen, von denen zu unterscheiden, die kaum oder keine Komplikationen durch das PCa zu erwarten haben. Die bisherige Diagnostik kann dies noch nicht ausreichend spezifizieren. Das PCa weist wie fast alle Krebsarten zahlreiche genetische Aberrationen auf, jedoch auch vielfältige epigenetische Veränderungen, darunter Hypermethylierungen von Promotoren mit CpG-Inseln und konsekutive Expressionsveränderungen. Hauptziele dieser Arbeit waren die Identifizierung von Genen, die im PCa Promotorhypermethylierungen und verändertes Expressionsverhalten aufweisen sowie deren Beziehung zu klinischer Relevanz und Prognoseeinschätzung. Darüber hinaus sollten die dazu verwendbaren Methoden kritisch verglichen werden. Untersucht wurden in Prostanormalzellen und -krebszelllinien, Prostanormal- und -karzinomgeweben die Transkriptionsfaktor-codierenden Gene *ID4* (kontrolliert Stammzellendifferenzierung, Zellzyklus und -migration), *PITX2* (beeinflusst die Entwicklung multippler Organe), *HOXC6* (reguliert Knochen- und Prostatamorphologie), sowie dessen Zielgene *WIF1*, *DKK3* (kodieren für Wnt-Antagonisten) und *CNTN1* (kodiert für ein Zelladhäsionsprotein). Wir bedienten uns zur DNA-Methylierungsanalyse der Goldstandardmethode der Bisulfitsequenzierung, der semiquantitativen Methylierungs-spezifischen PCR (MS-PCR), der quantitativen MethyLight-PCR und Pyrosequenzierung. Zur Expressionsanalyse wurde die *Real time*-PCR angewandt. Die *ID4*-Methylierung stellte sich in allen Zellen als heterogen und partiell heraus, wobei MS-PCR und Pyrosequenzierung teils zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Die *ID4*-Expression war in PCa-Zellen signifikant erniedrigt und ging mit fortgeschrittenem Tumorstadium und früherem Rezidiv einher – durch welchen Mechanismus genau ist bisher unklar. Es könnte in der Tumorigenese somit zuerst die Minderexpression und in Folge die Hypermethylierung entstehen. Da *ID4*-Hypermethylierung auch in Prostanormalgeweben nachgewiesen wurde, sind ein neoplastischer Feldeffekt, aber auch allgemeine Alterungsprozesse als Ursache zu diskutieren. Die *PITX2*-Expression im PCa korreliert hochsignifikant invers mit der Methylierung des Gens, der ERG-Expression sowie dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs. Auch die Expression stellt demnach einen sehr guten diagnostischen wie prognostischen Tumor-Biomarker für das PCa dar. *HOXC6* wird in PCa-Geweben überexprimiert, und geht mit einer schlechteren Prognose einher. Es beeinflusst im PCa sowohl Agonisten als auch Antagonisten der Tumorigenese. Dieses Paradoxon ließe sich durch epigenetische Inaktivierung der eher tumorhemmenden *HOXC6*-Zielgene in Karzinomen erklären. Diese Zielgene *WIF1*, *DKK3* und *CNTN1* waren tatsächlich minder exprimiert. Eine statistische Relevanz bezüglich einer schlechteren Prognose ergab sich nur für *WIF1*. Sämtliche untersuchten Gene könnten sich aufgrund ihrer funktionellen und experimentell beschriebenen Eigenschaften nicht nur als Biomarker, optimaler Weise in Form eines Gen-Panels, sondern auch als mögliche Therapieziele eignen.

## II. Summary

Prostate cancer (PCa) is the most common neoplasia in men and is the second most common cause of cancer death. However, not every case of illness becomes relevant for the person concerned and needs treatment. For the treatment it is therefore important to distinguish those in whom the cancer progresses and who thus require a stressful therapy, from those who have little or no complications to expect from the cancer. Current diagnostics cannot yet sufficiently specify either group of patients. Like almost all cancers, PCa has numerous genetic aberrations, but also a variety of epigenetic changes, including hypermethylation of promoters with CpG islands and consecutive expression changes. The main objectives of this work were the identification of genes affected by promotor hypermethylation and altered expression in PCa and their relation to clinical relevance and prognosis. In addition, the methods that can be used for methylation analyses were to be critically compared. In prostatic normal cells and cancer cell lines, prostate normal tissues and cancer tissues, the transcription factor coding genes *ID4* (controls stem cell differentiation, cell cycle and migration), *PITX2* (affects the development of multiple organs), *HOXC6* (regulates bone and prostate morphology), and its target genes *WIF1*, *DKK3* (encode Wnt antagonists) and *CNTN1* (encodes a cell adhesion protein) were investigated. We used the gold standard method of bisulfite sequencing for DNA methylation analysis, semiquantitative methylation-specific PCR (MS-PCR), quantitative MethyLight PCR, and pyrosequencing. Real-time PCR was used for expression analysis. *ID4* methylation was found to be heterogeneous and partial in all cells, with MS-PCR and pyrosequencing sometimes showing different results. The expression of *ID4* was significantly decreased in PCa cells and was associated with advanced tumor stage and earlier relapse - by which mechanism exactly remains unclear so far. Thus, in tumorigenesis, lower *ID4* expression could precede hypermethylation as a result. Since *ID4* hypermethylation was also detected in prostate normal tissues, a neoplastic field effect as well as general aging processes should be discussed as its cause. *PITX2* expression in PCa was highly significantly inversely correlated with methylation of the gene, ERG expression and the occurrence of biochemical recurrence. Thus, expression also represents a very good diagnostic and prognostic tumor biomarker for PCa. *HOXC6* is overexpressed in PCa tissues and is associated with a poorer prognosis. It affects both agonists and antagonists of tumorigenesis in PCa. This paradox could be explained by epigenetic inactivation of the rather tumor-inhibiting *HOXC6* target genes in carcinomas. These target genes, namely *WIF1*, *DKK3* and *CNTN1*, were indeed less expressed. A statistical relevance with respect to a worse prognosis was found only for *WIF1* among the three genes. Due to their functional and experimental attributes, all investigated genes could be suitable not only as biomarkers, optimally in the form of a gene panel, but also as possible therapeutic targets.

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b>AR</b>	Androgenrezeptor
<b>AS</b>	<i>Active Surveillance</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Aza</b>	Azacytidin
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenetic protein</i>
<b>BPH</b>	Benigne Prostatahyperplasie
<b>CCND</b>	<i>Cyclin D</i>
<b>CDKN</b>	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor</i>
<b>CHD</b>	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein</i>
<b>CLL</b>	<i>Chronisch-lymphatische Leukämie</i>
<b>CNTN</b>	<i>Contactin</i>
<b>CRPC</b>	Castration resistant prostate cancer (Deutsch: Kastrations-resistentes Prostatakarzinom)
<b>CT</b>	Chemotherapie
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>DKK</b>	<i>Dickkopf</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Deutsch: DNS / Deoxyribonukleinsäure)
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>ERG</b>	<i>ETS-related gene</i>
<b>ETS</b>	<i>Erythroblast transformation-specific</i>
<b>EZH</b>	<i>Enhancer of zeste homolog</i>
<b>FAM</b>	6-Carboxyfluorescein

<b>FGFR</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
<b>FOX</b>	<i>Forkhead Box</i>
<b>HDAC</b>	Histon-Deacetylase
<b>HGPIN</b>	Hochgradige prostatiche intraepitheliale Neoplasie
<b>HOX</b>	<i>Homeobox</i>
<b>HSPB</b>	<i>Heat shock protein family B</i>
<b>ADT</b>	Androgendeprivationstherapie
<b>ID</b>	<i>Inhibitor of Differentiation / DNA binding</i>
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MDS</b>	Myelodysplastisches Syndrom
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MS-PCR</b>	Methylierungs-spezifische PCR
<b>NFKBP</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
<b>PCa</b>	Prostatakarzinom
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PIN</b>	Prostatiche intraepitheliale Neoplasie
<b>PITX</b>	<i>Paired-like homeodomain</i>
<b>PrEC</b>	<i>Prostate epithelial cells</i>
<b>PSA</b>	Prostata-spezifisches Antigen
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>RB1</b>	Retinoblastom-Protein
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Deutsch: RNS / Ribonukleinsäure)
<b>RT</b>	Radiotherapie

<b>SAHA</b>	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
<b>SCNA</b>	<i>Somatic copy-number alterations</i>
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>SMAD</b>	<i>Small body size mothers against decapentaplegic protein</i>
<b>SPOP</b>	<i>Speckle-type POZ protein</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TIG</b>	<i>Tazarotene-induced gene</i>
<b>TMPRSS</b>	<i>Transmembrane protease, serine</i>
<b>TNM-Stadium</b>	<i>Tumor-/ Nodus-/ Metastasen-Stadium</i>
<b>VIC</b>	<i>4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein</i>
<b>WIF</b>	<i>Wnt inhibitory factor</i>
<b>WW</b>	<i>Watch &amp; Wait</i>

## IV. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Prostatakarzinom.....	1
1.2 Genetische und epigenetische Veränderungen im Prostata-karzinom.....	4
1.3 Untersuchte Zelllinien .....	8
1.4 Untersuchte Gene .....	9
1.4.1 <i>ID4 (Inhibitor of Differentiation / Inhibitor of DNA binding)</i> .....	9
1.4.2 <i>PITX2 (Paired-like Homeodomain 2)</i> .....	10
1.4.3 <i>HOXC6 (Homeobox C6)</i> .....	11
1.4.4 <i>WIF1 (Wnt Inhibitory Factor 1)</i> .....	11
1.4.5 <i>DKK3 (Dickkopf Homolog 3)</i> .....	12
1.4.6 <i>CNTN1 (Contactin 1)</i> .....	12
1.5 DNA- und RNA-Analysemethoden.....	13
1.5.1 Bisulfidsequenzierung .....	13
1.5.2 Die Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR) .....	13
1.5.3 Die MethyLight-PCR.....	14
1.5.4 Bisulfid-Pyrosequenzierung.....	15
1.5.5 <i>Real time</i> -PCR-gestützte Analysen .....	15
2. Ziele der Arbeit .....	16
3. Publierte Originalarbeiten.....	17
4. Diskussion .....	20
4.1 <i>ID4</i> .....	20
4.2 <i>PITX2</i> .....	24
4.3 <i>HOXC6</i> .....	26

4.4 Schlussfolgerungen über epigenetische Veränderungen im Prostatakarzinom und Ausblick .....	28
5. Literatur- und Quellenverzeichnis .....	34

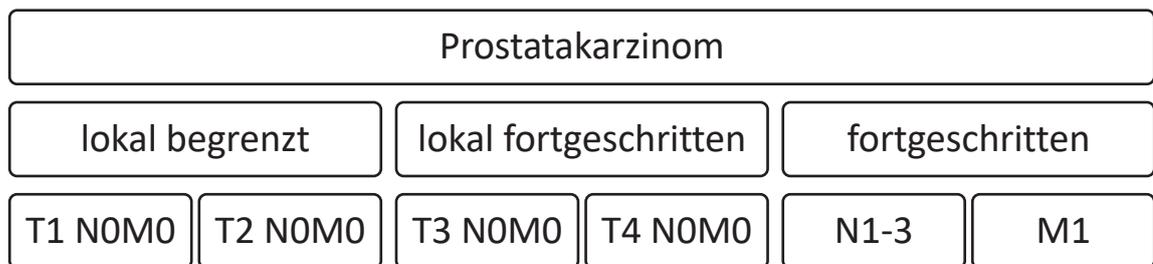
# 1. Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die am häufigsten vorkommende Krebsart des Mannes in Deutschland; gleichwohl steht es bei Männern unter den Neoplasien an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2017). Davon abzugrenzen ist die benigne Prostatahyperplasie (BPH), eine Proliferation von Epithel- und Stromazellen der Drüse ohne Zellatypien (Wei et al. 2005). Obgleich die Rate der Prostatakarzinomneuerkrankungen in den letzten drei Jahrzehnten stetig gestiegen ist, scheint in den 2000er Jahren ein Maximum erreicht worden zu sein. Die Mortalität sank seit dem Jahrtausendwechsel nur leicht. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt aktuell etwa 91 % (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2017). Das Prostatakarzinom tritt mit zunehmendem Alter häufiger auf; daher steigt mit der zunehmenden Lebenserwartung die Inzidenz. Prostatakarzinome lassen sich immer früher erkennen und effektiver behandeln, insbesondere seit Einführung des PSA-Screenings (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2017). Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) ist ein von der Prostata sezerniertes Kallikrein, das bei Volumenzunahme durch eine benigne Hyperplasie, bei Prostatitis und bei Prostatakarzinomen in erhöhter Konzentration im Serum nachweisbar ist. Bei einer Sensitivität von 90 % besitzt dieser Nachweis jedoch eine Spezifität von nur 10-31 % bei Verwendung eines Serum-PSA-Werts von 3 ng/ml (Hessels et al. 2004). Gesicherte Risikofaktoren für ein PCa sind Alter, Rasse, positive Familienanamnese, Ernährung und erhöhte IGF1-Konzentration; ausgeschlossene Risikofaktoren sind hingegen sportliche Aktivität, Vasektomie, Nikotin- und Alkoholkonsum (Grönberg 2003). Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms geschieht in Abhängigkeit von lokaler und globaler Ausbreitung wie in Abbildung 1 aufgeführt. Es metastasiert in Lymphknoten, Stamm-nahe Knochen (vor allem osteoblastisch), seltener Lunge, Leber und Gehirn (Hiddemann et al. 2010).

Zum histologischen *Grading* wird beim Prostatakarzinom überwiegend der Gleason-Score herangezogen, dessen Definition zuletzt 2014 aktualisiert wurde. Das Gleason-Muster beschreibt den Grad der Abweichung der Drüsenarchitektur vom Normalzustand in der mikroskopischen Darstellung der Prostata von 1 bis 5 entsprechend zunehmender Dysmorphie. Im Prostataresektat und transurethralen Biopsien addiert man die zwei häufigs-

ten Muster, in Feinnadelbiopsien das häufigste und das aggressivste Muster. Je höher der daraus berechnete Gleason-Grad, desto schlechter die Prognose. Vor 2014 entsprach der Gleason-Score den zwei am häufigsten auftretenden Gewebsmustern mit anderer Zahlenbedeutung (Epstein et al. 2016). Die vorliegende Arbeit und die in ihr zitierten Quellen bedienen sich noch fast ausschließlich der alten Skalierung.



**Abb. 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms** nach (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2018).

Nicht jedes Prostatakarzinom wird im Verlauf auch klinisch relevant und die Erkrankung kann Jahrzehnte indolent verlaufen, sodass der Betroffene an einer gänzlich anderen Ursache verstirbt (Johansson et al. 1989), (Bangma et al. 2007), (Albertsen 2012). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass nicht jeder Erkrankungsfall per se behandlungsbedürftig ist (Johansson et al. 1989). Diese Tatsache ist sowohl aus ethischer, klinischer wie auch ökonomischer Sicht relevant, da jegliche Therapie mit Komplikationen und Nebenwirkungen assoziiert sein kann; selbst Nachsorgeuntersuchungen können von Patienten bereits als Belastung empfunden werden. Darüber hinaus wird neuerdings öffentlich über ansteigende Gesundheitskosten und ihre volkswirtschaftliche Relevanz diskutiert. Aus diesen Gründen wird klinisch vermehrt die sogenannte *Active Surveillance* empfohlen. Diese beschreibt ein aktives Beobachten des PCa bis zum klinischen Progress ohne initiale kurative Therapie. Hiervon ist die Strategie des *Watch & Wait* abzugrenzen, bei der in einer palliativen Situation lediglich das Auftreten von Symptomen abgewartet wird, um diese dann zu behandeln. Die Therapieauswahl zwischen Radiotherapie, Operation, Hormon-, Chemotherapie, *Active Surveillance* und *Watch & Wait* wird je nach Erkrankungsstadium (Gleason-Score, PSA-Wert, TNM-Stadium), Gesundheitsstatus des Patienten und seinen Wünschen getroffen. Das klinische *Staging* stützt sich außer auf die PSA-Messung und digitalrektale Untersuchung auf Sonographie, Skelettszintigraphie, Computertomographie

und Positronenemissionstomographie (S3-Leitlinie Prostatakarzinoms, 2018). Die leitliniengerechten Therapieoptionen sind nach Erkrankungsstadium in Tabelle 1 aufgelistet.

<b>Lokal begrenztes PCa</b> (T1-2 N0 M0)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Operation</li> <li>➤ Radiotherapie</li> <li>➤ WW</li> <li>➤ eventuell AS bei Niedrig-/ Mittelrisiko-PCa</li> <li>➤ ADT bei Hochrisiko-PCa</li> </ul>
<b>Lokal fortgeschrittenes PCa</b> (T3-4 N0 M0)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Operation</li> <li>➤ Radiotherapie</li> <li>➤ ADT</li> <li>➤ WW</li> </ul>
<b>Lymphknoten-positives PCa</b> (Tx N1-3 M0)	
<b>Fernmetastasiertes PCs</b> (Tx Nx M1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ADT mit oder ohne Docetaxel / Abirateron</li> <li>➤ Symptomkontrolle (Bisphosphonate etc.)</li> </ul>
<b>CRPC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Docetaxel</li> <li>➤ Abirateron</li> <li>➤ Enzalutamid</li> </ul>

**Tabelle 1: Therapiemöglichkeiten des Prostatakarzinoms nach TNM-Stadium.**

Symptomkontrolle wie Analgesie und Frakturprophylaxe wird je nach Beschwerdebild in jedem Stadium betrieben.

Nach (S3-Leitlinie Prostatakarzinoms, 2018).

Legende: **PCa** Prostatakarzinom, **WW** *Watch & Wait*, **AS** *Active Surveillance*, **ADT** Androgendeprivationstherapie (chemisch / operativ), **CRPC** Kastrations-resistentes Prostatakarzinom

Wegen des unterschiedlichen Verlaufs von Prostatakarzinomen ist eine verlässliche Prognoseeinschätzung essentiell. Diese ist jedoch mittels Gleason-Score, klinischem *Staging* und PSA-Verlauf nur bedingt möglich, weshalb von den klinischen Prognoseparametern unabhängige molekulare Biomarker hilfreich wären. Eine weitere diagnostische Schwierigkeit liegt darin, dass in bis zu 15 % der PCa kein PSA-Anstieg auftritt und 10-30 % der negativen Prostatabiopsien falsch negativ sind (Møller et al. 2017). Das letztgenannte Problem könnte durch Hinzunahme MRT-unterstützter Prostatabiopsien teilweise behoben werden (Schimmöller et al. 2016).

Ein geeigneter Biomarker kennzeichnet sensitiv und spezifisch Karzinome mit schlechter Prognose und reeller Therapieindikation. Optimaler Weise korreliert er mit der Tumorlast, sodass auch eine Verlaufs- und Therapiekontrolle ermöglicht wird. Idealerweise sollte der Marker möglichst günstig und wenig invasiv aus Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin zu gewinnen sein. Biopsien stellen demgegenüber grundsätzlich ein invasives und somit risikobehaftetes Verfahren dar (Sharma 2009).

Frühere Untersuchungen haben in diesem Zusammenhang den Androgenrezeptor (AR) analysiert, einen wichtigen Faktor der PCa-Entwicklung, der in der normalen Prostata als Transkriptionsfaktor die Gewebshomöostase und -differenzierung regelt. Im manifesten Tumor wird seine Wirkungsweise umgeleitet in Richtung verstärkte Proliferation. Hierzu tragen verschiedene Mechanismen bei, darunter die Induktion von ETS-Transkriptionsfaktoren sowie die Beeinflussung von PI3K- und RAS-Signalwegen (Tan et al. 2015). Nach der antiandrogenen Standardtherapie (medikamentös oder operativ) kommt es regelmäßig nach progressionsfreien Jahren zu Rezidiven mit der Charakteristik des Kastrations-resistenten Prostatakrebs (CRPC) (Patel et al. 2014). Gleichzeitig steigt meistens der PSA-Spiegel im Serum. Verschiedene Mechanismen wie Akzeptanz anderer Agonisten anstelle von Testosteron, AR-Amplifikationen, veränderte Coaktivorenaktivität, unterschiedliche AR-Varianten oder adrenerge Androgenproduktion erlauben den Tumorzellen des CRPC die Reaktivierung sowie Aufrechterhaltung der Androgenrezeptoraktivität (Chandrasekar et al. 2015). Die folgende Standardtherapie ist aktuell das Chemotherapeutikum Docetaxel, das zunehmend durch neue antiandrogene Wirkstoffe ergänzt wird, zum Beispiel Abirateronacetat (inhibiert über das CYP450-System vor allem die adrenale Androgensynthese) oder Enzalutamid (interferiert an diversen Angriffspunkten mit der AR-Funktion) (S3-Leitlinie Prostatakarzinoms, 2018). Grundsätzlich gelten CRPC jedoch als nicht mehr heilbar (Chandrasekar et al. 2015).

## 1.2 Genetische und epigenetische Veränderungen im Prostatakarzinom

Im Prostatakarzinom sind - wie in anderen Krebsarten - zahlreiche genetische wie auch epigenetische Veränderungen mit ausgeprägter Heterogenität bekannt wie im Folgenden beschrieben (Barbieri et al. 2013). Somatische genetische Abweichungen beinhalten Genmutationen (Punkt-, Leseraster-Mutationen, Insertion, Deletion, Duplikation), numerische und - auffallend viele - strukturelle Chromosomenaberrationen. Sie können die Aktivierung von Onkogenen sowie Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge haben (Hiddemann et al. 2010). Viele Prostatakarzinome (25-70 %) weisen Veränderungen im Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg auf, die mit Metastasierungsneigung verstärkt auftreten (Barbieri et al. 2013). Das *PTEN*-Gen ist in zahlreichen Prostatakarzinomen mu-

tiert oder deletiert, wobei Letzteres mit einem schlechteren Krankheitsverlauf und eher fortgeschrittenen Karzinomen verknüpft ist (Yoshimoto et al. 2008). Ein Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors p53 mit konsekutivem Verlust von Apoptose- und DNA-Reparaturfähigkeiten ist in zahlreichen Krebsarten, auch hereditär beim Li-Fraumeni-Syndrom, bekannt. Deletionen liegen in 25-40 % und Punktmutationen in 5-40 % der PCa vor; wiederum deutlich häufiger in metastasierten Tumoren (Barbieri et al. 2013). Weiterhin wird angenommen, dass *RB1* häufig in CRPC inaktiviert ist und dies nicht nur die Zellzyklusregulation, sondern auch die Androgenwirkung verändert (Aparicio et al. 2011). In metastasierten CRPC wurden Punktmutationen und Genamplifikationen für den Androgenrezeptor mit konsekutiver Hyperaktivität gefunden. Da AR-Veränderungen für lokal begrenzte PCa untypisch sind, wird allgemein angenommen, dass sie weniger die Kanzenrogenese selbst bedingen, sondern erst im Laufe der Therapie entstehen und damit zur Therapieresistenz beitragen und den Progress unterstützen (Chandrasekar et al. 2015). Dagegen werden Mutationen von AR-Signalweg-Modulatoren wie *FOXA1* (Abeshouse et al. 2015) und *HOXB13* (Norris et al. 2009) sowohl im metastasierten als auch im lokalen PCa gefunden. Häufige und für das PCa typische Veränderungen betreffen die ETS-Proteinfamilie; am häufigsten ist eine Genfusion zwischen *TMPRSS2* und *ERG*. Während sich in bevölkerungsbasierten Studien unter *Active Surveillance* eine schlechtere Prognose bei ETS-Genfusionen herauskristallisiert hat, erbrachten retrospektive Studien nach radikaler Prostatektomie eher widersprüchliche Ergebnisse. Als ursächlich dafür kommen grundsätzliche Studiendesignunterschiede wie unterschiedliche Methoden der klinischen Nachbeobachtung infrage (Tomlins et al. 2009). Deletionen des Chromatinproteingens *CHD1* im PCa scheinen chromosomale Umlagerungen nach sich zu ziehen; Mutationen wurden in einem Subtyp von 5-10 % der PCa gefunden (Barbieri et al. 2018). Überexpression der Histonmethyltransferase EZH2 ist mit Metastasierung und Aggressivität des PCa verbunden; sie wirkt in diesem Zusammenhang unter anderem als Aktivator des Androgenrezeptors (Fong et al. 2017). Generell sind Genkopienzahlvariationen (SCNA) mit höherem Gleason-Score, Tumorstadium und schlechterer Prognose assoziiert. Bei diesen Veränderungen scheint die zeitliche Abfolge eine besondere Rolle zu spielen (Barbieri et al. 2013). So wurden *SPOP*-Mutationen und *ERG-Rearrangements* bereits in *high grade-PIN* (HG-PIN) gefunden, jedoch niemals gemeinsam in einem Tumor (Barbieri et al. 2018). Auch bei *NKX3.1*-Deletionen und *FOXA1*-Mutationen wird von einem frühen Auftreten

ausgegangen. Bei fortgeschrittenen Karzinomen sind vermehrt *RB1*, *AR*, *TP53*, *CHD1* und *CDKN1B* alteriert, ebenso ist dort eine vollständige *PTEN*-Inaktivierung häufiger (Barbieri et al. 2013).

Im Gegensatz zu den oben genannten genetischen Veränderungen erlauben epigenetische Mechanismen die stabile langfristige, jedoch prinzipiell reversible Einstellung von differenzierten Zellzuständen über Zellteilungen hinweg. Damit sind sie essentiell für die Entwicklung von Organismen, tragen jedoch auch zu ihrer Anpassungsfähigkeit bei, indem sie auf Umweltfaktoren wie lange Hungerperioden reagieren. Sie konvergieren auf der Ebene des Chromatins und haben letztlich quantitative oder qualitative Änderungen der Genexpression zur Folge (Allis 2015). Zu den epigenetischen Mechanismen zählen Histonmodifikationen wie Histonacetylierung, -phosphorylierung, und -methylierung, sowie die DNA-Methylierung an der 5'-Position des Cytosins in Cytidin-phosphatidyl-Guanosin-(CpG)-Dinukleotiden (Nelson et al. 2009). Speziell geht die verstärkte DNA-Methylierung im Promotorbereich in der Regel mit einer kompakteren Chromatinstruktur, erschwerterem Zugang von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen und verminderter Transkription einher. Dieser Zusammenhang ist besonders stark bei Promotoren ausgeprägt, die CpG-Inseln enthalten, also DNA-Abschnitte mit vergleichsweise hohem Anteil an G:C-Basenpaaren und CpG-Dinukleotiden (Antequera 2003).

Während in normalen Geweben die meisten CpG-Inseln unmethyliert vorliegen, werden in fast allen Tumorentitäten einige oder viele CpG-Inseln methyliert (Strichman-Almashanu et al. 2002). Das Hauptaugenmerk unserer Arbeiten lag auf diesem als Hypermethylierung bezeichneten Phänomen. Da die Hypermethylierung von CpG-Inseln im Wesentlichen nur in Tumoren vorkommt, eignet sie sich hervorragend für diagnostische Zwecke. Weitere Vorteile der Untersuchung von Hypermethylierungen liegen in der geringen Menge des benötigten Materials, der vergleichsweise hohen Stabilität von DNA als Molekül sowie der Stabilität von DNA-Methylierungen in Körperflüssigkeiten und bei Isolationsprozeduren (Laird 2003). Zudem nehmen die analytischen Möglichkeiten zur Untersuchung des Epigenoms quantitativ wie qualitativ stetig zu und erlauben mittlerweile frühe, vergleichsweise günstige und zahlreiche Untersuchungen.

Einige epigenetische Veränderungen treten bereits sehr früh während der Kanzerogenese auf, noch bevor morphologische Veränderungen mikroskopisch erkannt werden können (Damaschke et al. 2013). Beim Prostatakarzinom ist die Hypermethylierung des *GSTP1*-

Gens am besten untersucht (Florl et al. 2004), welches ein Enzym zur Inaktivierung elektrophiler endogener Metabolite oder Xenogene kodiert. Hypermethylierungen im CpG-reichen Promotor dieses Gens wurden bereits in der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) gefunden, was für eine frühe Veränderung spricht (Jeronimo et al. 2011). Die Hypermethylierung von *GSTP1* kommt in circa 90 % der Prostatakarzinome und 70 % der PIN vor und eignet sich daher prinzipiell als Biomarker für deren Detektion.

Analysen von mehreren hypermethylierten Genen in Kombination miteinander verbessern Sensitivität und Sensibilität. Beispielsweise war die Kombination hypermethylierter Gene bestehend aus *GSTP1*, *GRASP*, *TMP4*, *KCNC2*, *TBX1*, *ZDHHC1*, *CAPG*, *RARRES2*, *SAC3D1*, *NKX2-1*, *FAM107A*, *SCL13A3* und *FILIP1L* eher in aggressiveren CRPC als anderen PCa-Proben auffindbar (Lin et al. 2013). In einer anderen Studie war die *GSTP1*-Hypermethylierung ein besserer Marker für das Therapieansprechen von CRPC nach drei Monaten als PSA im Serum (Blute et al. 2015).

Hypermethylierungen lassen sich durch Inhibition der DNA-Methyltransferasen (DNMT) rückgängig machen. Dies wird experimentell genutzt, um ihre funktionelle Auswirkung auf die Transkription genau zu untersuchen (Tierling et al. 2011). Es ergeben sich daraus weiterhin Möglichkeiten einer epigenetisch modulierenden Therapie mittels DNMT-Inhibitoren (Graca et al. 2016). So ist beispielsweise Decitabine, ein Nukleosidanalogue zur Hemmung der DNA-Methylierung, im Jahre 2006 als Therapie für Patienten mit myelodysplastischem Syndrom zugelassen worden (Gore et al. 2006) und es sind noch weitere DNMT-Inhibitoren in Entwicklung beziehungsweise klinischer Testung (Pan et al. 2018). Im Speziellen gilt ein Prostatakarzinom im Stadium des CRPC als nicht mehr heilbar, sodass für diese Patienten eine besondere Dringlichkeit für neue Therapieformen erwächst. Eine Übersicht zu Epigenetik-modulierenden, potentiellen Medikamenten, wie beispielsweise Nukleosidanaloga, ist dem *Review* von Marques-Magalhães et al. (2018) zu entnehmen. Danach zeigen Therapien in niedrigerer Dosis und über längere Zeit bessere Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile bei urologischen Tumoren sowie in Kombination mit Chemotherapeutika oder ADT beim PCa im Besonderen (Marques-Magalhães et al. 2018).

DNA-Methylierungsänderungen korrelieren im Vergleich zu anderen genetischen Alterationen wie Punktmutationen oder numerischen Chromosomen-Aberrationen am stärksten mit der Krankheitsprognose (Fraser et al. 2017). So soll die Hypermethylierung be-

stimmter Gene wie die des Tumorsuppressors und Wnt-Signalwegregulators *APC* mit einer besonders schlechten PCa-Prognose assoziiert sein (Henrique et al. 2007). Ein besonders wichtiges Kandidatengen zur Prognoseabschätzung ist *PITX2* (s. Kapitel 1.3.2).

Mehrere kommerzielle Unternehmen arbeiten an der Entwicklung prognostischer Tests, die auf diesem Prinzip basieren. Da bisher kein Test klinisch implementiert worden ist, bleibt die Suche nach weiteren Kandidatengenen sinnvoll, um jene herauszufiltern, deren Hypermethylierung mit schlechterer Prognose in behandlungswürdigen Prostatakarzinomen einhergeht. Dementsprechend könnten sich spezifische Therapiepläne und zuverlässigere Prognosen erstellen lassen.

### 1.3 Untersuchte Zelllinien

LNCaP-Zellen wurden 1977 aus einer linksseitigen supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten PCa-Patienten gewonnen. Ihr Wachstum ist stark Androgen-abhängig (Horoszewicz et al. 1983). Die MDA-PCa-2b-Linie ist in geringerem Maße Androgen-sensibel. Sie entstammt einer Knochenmetastase eines 63-jährigen Mannes (Navone et al. 1997). Die Zelllinie 22Rv1 wurde aus dem CWR22 Xenograft herangezogen, bei dem primäre Prostatakarzinomzellen in Nacktmäuse transplantiert und diese später kastriert worden waren. Sie exprimiert PSA und reagiert moderat auf Androgenstimulation (Sramkoski et al. 1999).

Die epitheloide Linie Du145 wurde 1975 aus einer zentralnervösen PCa-Metastase eines 69-jährigen Patienten isoliert. Sie sezerniert kein PSA und spricht nicht auf Androgene an (Stone et al. 1978). Die epitheliale Zelllinie PC-3 verfügt ebenfalls über keine Androgensensibilität. Sie wurde *post mortem* aus einer Knochenmarkmetastase eines gering differenzierten Ade-nokarzinoms angelegt. Der 62 Jahre alte Patient war zuvor mit einer anti-androgenen Therapie behandelt worden (Kaighn et al. 1979).

Als Kontrolle für normale Prostataepithelzellen diente eine käuflich erworbene Primärkultur, die als PrEC (Prostate Epithelial Cells) bezeichnet wird (Sobel et al. 2006).

Als weitere Kontrolle wurde z. T. die gut charakterisierte Harnblasenkarzinomzelllinie HT1376 herangezogen. Sie wurde aus einem hochgradigen Urothelkarzinom einer 58-jährigen Patientin angelegt (Rasheed et al. 1977).

Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Verfahren zur Kultivierung und Behandlung der Zellen sind in den Methodenteilen der aufgeführten Publikationen beschrieben (Vinarskaja et al. 2011; Vinarskaja et al. 2012; Vinarskaja et al. 2013).

Ein positives Ethikvotum (Studiennr. 2114), am 13.01.2003 eingereicht von Prof. Wolfgang Schulz, liegt vor.

	Androgen-sensitivität	PSA-Expression	AR-Expression	Ursprung
<b>Du145</b>	Nein	Nein	Nein	ZNS-Metastase Weißer, 69 J., Prostata-Adeno-CA, LL
<b>PC-3</b>	Nein	Nein	Nein	LWS-Metastase Weißer, 62 J. nach anti-androgener Therapie
<b>LNCaP</b>	Ja	Ja	Ja	Lymphknoten (Feinnadelaspiration) Weißer, 50 J.
<b>MDA-PCA-2b</b>	Ja	Ja	Ja	Knochenmetastase Afroamerikaner, 63 J., Progress trotz hormoneller Kastration
<b>22Rv1</b>	Ja	Ja	Ja	CWR22-Xenograft aus ossär metastasiertem PCa, Gleason-Score 9
<b>PrEC</b>	Nein	Nein	Nein	Weißer, 14 J., ohne CA

**Tabelle 2: Charakterisierung und Ursprung der verwendeten Prostata-Zelllinien.**

Nach (Sobel, Sadar 2005a, 2005b; Sobel et al. 2006).

Legende: **AR** Androgenrezeptor, **CA** Karzinom, **LL** lymphatische Leukämie, **LWS** Lendenwirbelsäule, **J.** Jahre **PCa** Prostatakarzinom

## 1.4 Untersuchte Gene

### 1.4.1 ID4 (*Inhibitor of Differentiation / Inhibitor of DNA binding*)

Beim Menschen sind vier Mitglieder der ID-Familie identifiziert: ID1-4. Sie fungieren als Transkriptionsfaktoren ohne eigene DNA-Bindungsstelle, indem sie mit Helix-Loop-Helix-Proteinen dimerisieren und diese an der DNA-Bindung hindern (Carey et al. 2009). Dadurch kontrollieren sie unter anderem den Differenzierungszeitpunkt von Stammzellen, den Zellzyklus und die Zellmigration (Lasorella et al. 2001). Innerhalb der ID-Familie ist ID4 das bisher am wenigsten untersuchte Mitglied. Die meisten Tumorarten weisen

eine erhöhte Expression von einem oder mehreren ID-Proteinen auf, was besonders mit Invasivität, Differenzierungsstopp und Angiogenese einhergeht (Lasorella et al. 2001). Dieser Zusammenhang gilt für *ID4* bei vielen Karzinomen nicht oder gar umgekehrt; z.B. ist eine Verminderung der *ID4*-Expression im Kolonkarzinom mit einer schlechteren Prognose verbunden (Ruzinova et al. 2003).

Im Prostatakarzinom wurde zwar ein Zusammenhang zwischen *ID4*-Überexpression und Metastasierung beschrieben (Yuen et al. 2006). In der Prostatakarzinom-Zelllinie Du145 wird *ID4* jedoch kaum exprimiert und das Gen ist hypermethyliert. Seine Reexpression in Du145-Zellen führte zu Zellzyklusarrest und Apoptose. Dies legt eine Funktion als Tumorsuppressor nahe (Carey et al. 2009). Nach neuesten Daten wird *ID4* durch Promotormethylierung mit steigendem Tumorstadium immer weniger exprimiert. Es ist einer der zahlreichen bekannten Cofaktoren des Androgenrezeptors und fördert seine tumorhemmenden Eigenschaften. Ein *ID4*-Verlust verstärkt umgekehrt die tumorfördernden Eigenschaften des AR direkt wie auch indirekt über Beeinflussung von AR-Zielgenen wie z.B. Steigerung der Expression von *FKBP51*. Durch eine *ID4*-Überexpression konnte in normalerweise AR-negativen PC-3-Zellen die AR-Expression induziert werden und dies führte wiederum zu deutlich kleineren Tumormassen in Xenograft-Modellen (Komaragiri et al. 2016).

Wir haben bereits vor dieser funktionell orientierten Publikation die Expression von *ID4*-mRNA und seine Promotor-DNA-Methylierung sowie ihr Verhältnis zueinander in Prostatakarzinomgeweben und -zelllinien untersucht; auch die Assoziation zu Prognose und histopathologischen Parametern wurde betrachtet.

#### 1.4.2 *PITX2* (Paired-like Homeodomain 2)

*PITX2* kodiert einen Transkriptionsfaktor und gehört zu den *Homeobox*-Genen. Es beeinflusst die Entwicklung vieler Organsysteme wie Herz, Kreislauf, Augen, Muskeln und Hypophyse unter dem Einfluss und als Modulator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (Kioussi et al. 2002). *PITX2* reguliert unter anderem die AR- und IGF1-Rezeptoren (Blute et al. 2015). In einigen Karzinomen ist der *PITX2*-Promotor hypermethyliert, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Dies trifft neben dem Prostatakarzinom (Weiss et al. 2009) auch auf das Mammakarzinom (Harbeck et al. 2008) zu. Somit ergeben sich nicht nur für das Prostatakarzinom weitreichende prognostische Möglichkeiten.

### 1.4.3 *HOXC6 (Homeobox C6)*

*Homeobox*-Gene (*HOX*) gibt es in allen bilateralen Lebewesen; sie gliedern vor allem ihren Aufbau entlang der axialen Achse. Der Mensch besitzt 39 *HOX*-Gene, die jeweils in Gruppen (*Clustern*) als *HOX A, B, C* und *D* auf den Chromosomen 2, 7, 12 und 17 angeordnet sind (Ramachandran et al. 2005). Sie codieren für Transkriptionsfaktoren, die im Laufe von Zelldifferenzierung und Gewebeentwicklung wirken, indem sie spezifische Zielgene aktivieren oder reprimieren (Veraksa et al. 2000). In Tumoren sind *HOX*-Gene häufig fehl-exprimiert. So fiel *HOXC6* in einigen Karzinomarten von Prostata, Lunge, Darm, Brust und Blut auf.

In der normalen Prostata werden Gene der *HOX A*- und *B-Cluster* exprimiert, *HOX C* und *D* jedoch nur in kanzerösem Gewebe (Miller et al. 2003). *HOXC6* wird vor allem in Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen deutlich überexprimiert, so auch in der Zelllinie LNCaP. Die Expression korreliert mit einem höheren Gleason-Score (Bibikova et al. 2007). Physiologisch reguliert *HOXC6* direkt und indirekt die *Branching*-Morphogenese der Prostata sowie die Knochenentwicklung. Dies ist besonders bemerkenswert, da beim Prostatakarzinom Knochenmetastasen die häufigste Disseminationsart darstellen. Außerdem beeinflusst *HOXC6* indirekt Notch- und Wnt-Signalwege über die Induktion anderer Proteine wie BMP7 und FGFR2. Überraschenderweise sind jedoch etwa die Hälfte der von *HOXC6* in der normalen Prostataentwicklung hochregulierten Gene im Prostatakarzinom herabreguliert. Darunter fallen die von uns überprüften Zielgene *CNTN1*, *WIF1* und *DKK3* (McCabe et al. 2008). In LNCaP-Zellen konnte durch Verminderung der *HOXC6*-Expression mittels siRNA die Apoptose ausgelöst werden. Durch Wiederinduktion der *HOXC6*-Expression ließ sich dieser Effekt wieder rückgängig machen. Wir haben daher die These aufgestellt, dass *HOXC6* Onko- und Tumorsuppressorgene gleichermaßen beeinflusst, jedoch letztere insbesondere auf epigenetischer Ebene durch Hypermethylierung in Krebszellen außer Funktion gesetzt werden (Ramachandran et al. 2005).

### 1.4.4 *WIF1 (Wnt Inhibitory Factor 1)*

*Wnt*-Gene codieren für Wachstumsfaktoren, die besonders bei Stammzellen elementare Zellfunktionen wie Proliferation, Motilität und Apoptose regulieren. Störungen von Wnt-Signalwegen sind ein wesentlicher Faktor in der Karzinogenese verschiedener Gewebe (Willert et al. 2012). *WIF1* ist ein Wnt-Antagonist, der die Aktivierung von *Frizzled*-

Rezeptoren im Wnt-Signalweg verhindert (Cruciat et al. 2013). WIF1 agiert jedoch auch Androgen-abhängig in der embryonalen Prostataentwicklung (Schaeffer et al. 2008). Die WIF1-Expression ist in Mamma-, Prostata-, Lungen- und Harnblasenkarzinomen herabreguliert (Wissmann et al. 2003). Das Gen wird in vielen Prostatakarzinomgeweben und den meisten üblichen PCa-Zelllinien, mit Ausnahme von 22Rv1, minderexprimiert. Dies wird auf DNA-Hypermethylierung zurückgeführt, da die verminderte Expression durch Behandlung von PC-3-Zellen mit einem DNMT-Inhibitor aufgehoben werden konnte; im Xenograftmodell führte dies zur Abnahme von Invasivität, Migration und Tumorwachstum (Yee et al. 2010). Somit kommt WIF1 als Tumorsuppressor infrage.

#### 1.4.5 *DKK3 (Dickkopf Homolog 3)*

Die DKK-Glykoproteinfamilie gehört zu den am besten untersuchten Wnt-Antagonisten. Während DKK1, -2 und -4 den Wnt-Signalweg über Lipoprotein *Receptor-related Protein* (LPR) antagonisieren, agiert DKK3 über TGF- $\beta$  (Cruciat et al. 2013). In LNCaP- und PC-3-Zellen ist der Promotor von *DKK3* im Gegensatz zu Prostatanormalgewebe hypermethyliert (Lodygin et al. 2005). Die Expression in BPH-Zellen und höhergradigen Prostatatumoren ist reduziert beziehungsweise nur noch in deren Blutgefäßen vorhanden (Zenzmaier et al. 2008). *DKK3* wird ubiquitär in allen normalen Zellen exprimiert, jedoch signifikant geringer in diversen Krebszellen, darunter Prostatakarzinomzellen. Darüber hinaus wird eine indirekte Beeinflussung des Androgenrezeptor-Signalwegs diskutiert. Eine experimentelle Überexpression in PCa-Zellen führt zu vermehrter Apoptose (Ochiai et al. 2016). *DKK3* scheint insgesamt die Apoptose zu fördern und das Metastasierungspotential von Tumorzellen zu hemmen (Kawauchi et al. 2012).

#### 1.4.6 *CNTN1 (Contactin 1)*

Contactin 1 reguliert physiologisch Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsionen von Axonen und Gliazellen (Falk et al. 2002). Adhäsionsmoleküle sind oftmals bei der Tumormetastasierung bedeutsam. Ein *CNTN1-Knockdown* inhibiert die Metastasierungsfähigkeit von nicht-kleinzelligen Lungentumoren mit konsekutiver Lebensverlängerung in Mäusen (Su et al. 2006) sowie die E-Cadherin-Expression (Yan et al. 2013). Für das PCa ist eine Assoziation von *CNTN1*-Expression mit lymphogener und ossärer Metastasierung und damit einhergehender Prognoseverschlechterung kürzlich publiziert worden (Yan et al. 2016).

## 1.5 DNA- und RNA-Analysemethoden

Wir verwendeten verschiedene Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung und mRNA-Expression. Zur Etablierung und Plausibilitätsprüfung der Techniken zur Expressions- und DNA-Methylierungsmessung wurden in der Regel die in Tabelle 2 aufgeführten Prostatakarzinomzelllinien verwendet.

Alle verwendeten Techniken für die Analyse der DNA-Methylierung basieren auf einer Bisulfitbehandlung, der alle DNA-Proben unterzogen wurden. Dabei werden Cytosine zu Uracilen umgewandelt; Methylcytosin bleibt unverändert (Clark et al. 1994). Zur Analyse wird die behandelte DNA danach mit Primern amplifiziert, die unabhängig vom Methylierungsstatus (Bisulfit-, Pyrosequenzierung) respektive abhängig vom Methylierungsstatus (MethylLight-, Methylierungs-spezifische PCR) ein Produkt ergeben.

Methoden zur Probenvorbereitung und weiteren Analytik wurden in den Methodenteilen der veröffentlichten Arbeiten beschrieben (Vinarskaja et al. 2011; Vinarskaja et al. 2012; Vinarskaja et al. 2013).

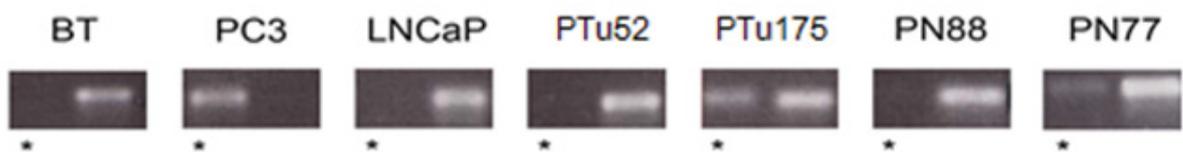
### 1.5.1 Bisulfitsequenzierung

Die Bisulfitsequenzierung bietet die Möglichkeit, in einem ausgewählten Bereich von bis zu mehreren hundert Basenpaaren die Methylierung jeder einzelnen CpG-Stelle nachzuweisen. Nach Amplifikation der Bisulfit-behandelten Gensequenz wird das Produkt in ein Plasmid ligiert und in *Escherichia coli*-Bakterien kloniert. Aus mehreren einzelnen Bakterienklonen werden Plasmide isoliert und per Restriktionsverdau und Gelelektrophorese auf erfolgreiche Klonierung überprüft. Dann wird die Sequenz des klonierten Amplifikats mit Standard-Sanger-Sequenzierung bestimmt. Durch die Auflistung einzelner Basen lassen sich so insbesondere heterogene Methylierungsmuster darstellen (Clark et al. 1994). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass auch mit geringen DNA-Mengen brauchbare Ergebnisse erzielt werden. Neben zeitlichem und logistischem Aufwand sind jedoch die Kosten erheblich, sodass nur eine begrenzte Probenanzahl untersucht werden kann (Clark et al. 2006).

### 1.5.2 Die Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR)

Die Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR) ist eine elegante und einfache Methode zur DNA-Methylierungsanalyse. Dabei wird Bisulfit-behandelte DNA mit zwei Paaren spezifi-

scher Primer für die zu untersuchende Sequenz verwendet. Es werden zwei Ansätze mit jeweils einem Primerpaar hergestellt, das spezifisch an die methylierte beziehungsweise unmethylierte Sequenz nach Bisulfitkonversion bindet (Herman et al. 1996). In der folgenden Gelelektrophorese wird je nach Methylierungszustand entweder das methylierte oder unmethylierte Produkt sichtbar wie in Abbildung 2 exemplarisch dargestellt. Diese semiquantitative Methode ist kosten- und zeiteffektiv und benötigt keine speziellen Geräte. Somit ist die Analyse vergleichsweise vieler Proben möglich. Auch bei geringer Probenmenge lässt sich eine zufriedenstellende Sensitivität erzielen. Bei inkompletter DNA-Bisulfitumwandlung kann sie jedoch zu falsch positiven Resultaten führen. Ebenso ist auf ein spezifisches Primerdesign zur Prävention von *Mispriming* besonders zu achten (Clark et al. 2006).



**Abb. 2:** Produkte nach Bisulfitbehandlung und MS-PCR des Gens *ID4* in Blut-Leukozyten (BT), PCa-Karzinomzelllinien PC-3 und LNCaP, PCa-Geweben (PTu) und Prostatanormalgewebe (PN). Der linke mit \* markierte Bereich entspricht methylierten, der rechte unmethylierten Sequenzen. Beispiel: In PTu175 ist die *ID4*-Methylierung moderat, in PN88 gar nicht vorhanden.

### 1.5.3 Die MethyLight-PCR

Die MethyLight-PCR ist eine quantitative Variante der MS-PCR. Die Primer setzen im Gegensatz zur MS-PCR außerhalb der zu untersuchenden CpG-Stellen an. Die Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter Sequenz wird durch verschieden fluoreszenzmarkierte Sonden (zum Beispiel FAM<sup>TM</sup>- und VIC<sup>®</sup>-markiert) getroffen. Abhängig von der Sequenz nach Bisulfitbehandlung bindet entweder ein FAM<sup>TM</sup>-markiertes Nukleotid an methylierte oder ein VIC<sup>®</sup>-markiertes Nukleotid an unmethylierte CpG-Stellen. Sobald die DNA-Polymerase während der Elongation auf die Zielsequenz trifft, werden die fluoreszierenden Nukleotide freigesetzt. Dies wird in der *Real time*-PCR quantitativ gemessen. Der Arbeitsaufwand ist trotz quantitativer Auswertung vergleichsweise gering. Alternativ können auch entsprechend markierte Primer eingesetzt werden, die nur bei methylierten CpG-Stellen binden und somit eine semiquantitative Analyse erlauben, da die Anzahl der unmethylierten Stellen ungewiss bleibt (Eads et al. 2000).

#### 1.5.4 Bisulfit-Pyrosequenzierung

Diese Form der Pyrosequenzierung bedient sich ebenfalls Bisulfit-behandelter DNA, die wie für eine Bisulfitsequenzierung amplifiziert wird. Jedoch werden dabei der Sequenzierreaktion sukzessiv Desoxynukleotidphosphate zugesetzt, welche der zu erwartenden Sequenz mit ihren Varianten entsprechen. Wird ein dNTP erfolgreich eingebaut, wird Pyrophosphat frei, das zu ATP umgewandelt wird und über das Enzym Luciferase ein Lichtsignal liefert. Nicht passende dNTPs liefern kein Signal und werden gewaschen. Auf diese Weise kann der Methylierungsgrad für eine kurze Sequenz mit bis zu hundert Basenpaaren quantitativ erfasst werden (Tost et al. 2007).

#### 1.5.5 *Real time*-PCR-gestützte Analysen

Hinweise auf DNA-Methylierung eines Promotors lassen sich auch durch Behandlung mit Methylierungsinhibitoren wie 5'-Aza-2'-Desoxycytidin (Medikamentenname: Decitabin) gewinnen. Durch 5'-Aza-2'-Desoxycytidin wird die Expressions-inhibierende Wirkung der Methylierung aufgehoben. Das Nucleosid wird an Stelle von Cytosin in die DNA eingebaut, bindet irreversibel an die DNA-Methyltransferase, hemmt sie und führt zu ihrer Degradation (Stresemann et al. 2008). Der HDAC-Inhibitor Suberanilohydroxaminsäure (SAHA, Medikamentenname: Vorinostat) kann die Wirkung von 5'-Aza-2'-Desoxycytidin auf die Expression durch Dekondensation von Histonen verstärken (Marks 2007). Nach Behandlung von Zellen mit diesen beiden Substanzen kann via *Real time*-PCR überprüft werden, ob die Expression eines Gens ansteigt. Ist dies der Fall, weist es auf funktionell relevante Promotormethylierungen beziehungsweise Histondeacetylierungen hin.

## 2. Ziele der Arbeit

Die drei Hauptziele der vorliegenden Arbeit waren folgende Untersuchungen: Erstens sollte überprüft werden, ob und wie häufig DNA-Methylierungsveränderungen der oben (Abschnitt 1.3) dargestellten Gene im Prostatakarzinom vorkommen. Zweitens sollte die Beziehung dieser Methylierungsänderungen zu klinischen Parametern untersucht werden, um ihre klinische Relevanz bzgl. Prognosevorhersagen, Therapieindikationen und –möglichkeiten zu evaluieren. Drittens sollte der Bezug dieser Methylierungsveränderungen zu anderen bereits in der eigenen Probenserie gemessenen Veränderungen der DNA-Methylierung und der Genexpression bestimmt werden. Dies geschah auch im Sinne einer Qualitätssicherung und Optimierung der eigenen Probenserie, Labormaterialien und –standards mittels regelmäßiger (Re-) Evaluation. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in drei Publikationen (s. Kapitel 3) zusammengefasst.

In der ersten Arbeit (Vinarskaja et al. 2012) untersuchten wir erstmals Expression (via RT-PCR) und Methylierungsstatus (mittels MS-PCR, *Pyrosequencing* und Bisulfit-Sequenzierung) des potentiellen Tumorsuppressorgens *ID4* im PCa mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen Methylierung und Transkription, deren klinischer Relevanz und Unterschiede zwischen Normal- und Krebsgeweben aufzuzeigen sowie die genannten Methoden miteinander zu vergleichen.

Die zweite Veröffentlichung (Vinarskaja et al. 2013) beschäftigte sich mit Korrelationen von *PITX2*-Hypermethylierung und dessen Minderepression, klinischer Prognoseverschlechterung und der Expression des Protoonkogens *ERG*. Hierzu bedienten wir uns der *qRT*-PCR zur Expressionsanalyse und der MS-PCR zur Methylierungsanalyse.

In der dritten Publikation (Vinarskaja et al. 2011) befassten wir uns mit den Zusammenhängen von *HOXC6* und seinen wahrscheinlich tumorsuppressiven Zielgenen *CNTN1*, *DKK3* und *WIF1* im PCa auf Methylierungs- und Transkriptionsebene. Damit sollte die Möglichkeit einer Regulation durch Hypermethylierung eruiert werden.

### 3. Publizierte Originalarbeiten

3.1 ID4 Is Frequently Downregulated and Partially Hypermethylated in Prostate Cancer. Vinarskaja, Anna; Goering, Wolfgang; Ingenwerth, Marc; Schulz, Wolfgang A. World Journal of Urology. 3. 319–325. 2012.

3.2 Association of PITX2 mRNA Down-Regulation in Prostate Cancer with Promoter Hypermethylation and Poor Prognosis. Vinarskaja, Anna; Schulz, Wolfgang A.; Ingenwerth, Marc; Hader, Christiane; Arsov, Christian. *Urologic Oncology*. 5. 622–627. 2013.

3.3 DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer.  
Vinarskaja, Anna; Yamanaka, Masanori; Ingenwerth, Marc; Schulz,  
Wolfgang A. *Cancers*. 4. 3714–3725. 2011.

## 4. Diskussion

### 4.1 *ID4*

Aus unseren Untersuchungen geht maßgeblich hervor, dass *ID4* in Prostatakarzinomgeweben im Vergleich zu Prostatanormalgeweben vermindert exprimiert wird. Verminderte *ID4*- mRNA-Expression war mit schlechterer klinischer Prognose, erhöhtem Gleason-Score (>7), tendenziell mit höherem pT-Stadium (>pT2), Lymphknotenmetastasierung sowie früherem und häufigerem biochemischen Rezidiv assoziiert (Vinarskaja et al. 2012). Yuen et al. (2006) konnten ebenfalls eine Assoziation von verminderter *ID4*-mRNA mit höherem Gleason-Score nachweisen (Yuen et al. 2006). Andere Autoren haben gezeigt, dass *ID4* neoplastische Eigenschaften von PCa-Zelllinien zu antagonisieren vermag (Carey et al. 2009). Die wenig differenzierten Prostatakarzinomzelllinien Du145 und PC-3 exprimierten *ID4* kaum oder nicht nachweisbar. Die Expression konnte jedoch durch Behandlung mit 5'-Aza-2'-Desoxycytidin wieder hergestellt werden. Einen ähnlichen, aber schwächer ausgeprägten Effekt hatte diese Behandlung bei den ohnehin stärker *ID4* exprimierenden Androgen-sensitiven Zelllinien LNCaP und 22Rv1 (Vinarskaja et al. 2012). Dies entspricht vorangegangenen Untersuchungen der *ID*-Gene (Asirvatham et al. 2006). Unsere MS-PCR-Analyse ergab starke Promotorhypermethylierungen in Du145 und PC-3 und schwächere in LNCaP. Mit dieser Methode wurden 38 % der Tumorgewebe als hypermethyliert bewertet; doch wiesen auch 50 % der Normalgewebe eine schwache Methylierung auf. Diese Ergebnisse deuteten auf eine ausgeprägte Heterogenität der DNA-Methylierung hin. Diese untersuchten wir daher mit weiteren, präziseren Techniken zunächst in ausgewählten Tumor- und Normalgeweben, Zelllinien sowie Leukozyten mittels Bisulfitsequenzierung. Die starke Heterogenität wurde dabei bestätigt. Daher wurde die Analyse der Proben zusätzlich mit Pyrosequenzierung wiederholt; der hierbei untersuchte Genabschnitt umfasste acht CpG-Stellen. Interessanterweise waren die ersten fünf CpG-Stellen davon in sämtlichen Proben schwächer methyliert als die letzten drei. Tumore zeigten im Durchschnitt 9 % (2,7-52 %) Methylierung und Normalgewebe 7,7 % (5,4-10 %). Die mRNA-Expression war bei besonders stark beziehungsweise schwach methylierten Proben besonders niedrig beziehungsweise hoch. Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Expression festgestellt werden (Vinarskaja et al. 2012). Verglichen mit den Normalgeweben sahen wir in den Tumoren häufiger eine

Minderexpression als eine Hypermethylierung. Die Hypermethylierung könnte demnach in der Tumorigenese der verminderten Expression folgen, im Einklang mit mechanistischen Vorstellungen zur Induktion von DNA-Hypermethylierung in Folge von Transkriptionsrepression durch Chromatinregulatoren wie *Polycomb*-Komplexen (McCabe et al. 2009).

Die Ursache der verminderten ID4-Expression im Prostatakarzinom ist unbekannt. Eine direkte *ID4*-Genmutation ist bisher noch nicht nachgewiesen worden, sodass die Veränderungen auf der regulatorischen Ebene stattfinden müssten. Beispielsweise beeinflussen der Wachstumsfaktor BMP4 und der *Polycomb*faktor EZH2 die ID4-Biosynthese (Patel et al. 2015). EZH2 kann an manchen Genen während der Tumorigenese die DNA-Methylierung durch DNMTs auslösen (Viré et al. 2006).

ID4 wird im Gegensatz zu ID1-3 gewebespezifischer exprimiert, das heißt lediglich in Gehirn-, Schilddrüsen-, Pankreas-, Brust-, Prostata-, Hoden-, Fettzellen und Osteoblasten und erfüllt eine Gewebs-, Krebs- und Stadien-abhängige Funktion (Patel et al. 2015) - zum Beispiel im Sinne einer Tumorpromotion in Mamma- und Ovarialkarzinomen über BRCA1-Inhibition (Welch et al. 2002). Bis zu 80 % von *ID4-Knockout*-Mäusen überleben nicht bis ins Erwachsenenalter, weisen Anomalien von Gehirn (Bedford et al. 2005), Osteoporose (Tokuzawa et al. 2010), kleinere Prostataadrüsen mit geringerem *Branching* und verminderter Zelldifferenzierung auf (Sharma et al. 2013). Ein gehäuftes Auftreten von PIN spricht für eine frühe Tumorinitiation. ID4 kann in normalen Zellen den Zellzyklus arretieren und fördert die Zelldifferenzierung, beeinflusst unter anderem die p38 MAPK- und Notch-Signalwege (Carey et al. 2009). Durch *ID4*-Einschleusung konnten in der AR-negativen Zelllinie Du145 Androgenrezeptor-Reexpression und PSA-Produktion induziert werden. Über Regulation Androgen-abhängiger Organentwicklung ohne direkte Kontrolle von Androgenrezeptorexpression oder –translokation bietet sich über diesen Zusammenhang eine mögliche Therapieoption Hormon-abhängiger Krebsarten an (Patel et al. 2015). ID4 reguliert den Androgenrezeptor offenbar indirekt über FKBP52. Ein *ID4-Knockdown* führt auf diesem Weg zu gesteigerter Tumorigenität *in vitro* und *in vivo* und stellt somit einen möglichen, vom Hormonmilieu unabhängigen Therapieansatz für das CRPC dar. Die genaue Wirkweise von ID4 auf AR und FKBP52 ist jedoch aktuell noch unklar (Joshi et al. 2016). Durch epigenetisches *ID4-Silencing* entsteht offenbar ein CRPC-ähnlicher Phänotyp, in dem steroidogene Enzyme wie *CYP17A1* überexprimiert werden. Bei *ID4*-

*Knockdown* kommt es entsprechend zur *de novo* Steroidsynthese innerhalb des Tumors und einer erhöhten PSA-Synthese (Patel et al. 2014). Für solche Tumore wird besonders ein Therapieansatz mit Abirateronacetat als geeignet angesehen. Dies ist ein Androgensynthese-Inhibitor, der sowohl das progressionsfreie als auch das Gesamtüberleben bei Chemotherapie-naivem, metastasierten CRPC nachweislich verlängert (Ryan et al. 2013). In diesem Sinne wäre die ID4-Expression als möglicher prädiktiver Biomarker zu diskutieren.

Der Verlust der ID4-Expression im PCa ist assoziiert mit Proliferationssteigerung (gemessen per Ki-67) und Differenzierungshemmung über das *Homeoboxgen NKX3.1* (Sharma et al. 2013). ID4 scheint über die *Homeobox*- und *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren die Prostataentwicklung in Abhängigkeit von Wnt-, BMP- und TGF $\beta$ -Signalmolekülen zu beeinflussen (Prins et al. 2008). NKX3.1 wird in Prostatazellen Androgen-abhängig und in *ID4-Knockout*-Mäusen gar nicht exprimiert, was zu Prostataepithelhyperplasien und -dysplasien sowie oft zu PIN führt. Interessanterweise ähneln diese Zellen solchen mit einem AR-*Knockout*-Phänotyp (Sharma et al. 2013). Ferner korreliert in unseren Untersuchungen die ID4-Expression invers mit der von HOXC6 (Vinarskaja et al. 2011), was die Frage aufwirft, ob *ID4* ein bislang unbekanntes Zielgen von HOXC6 darstellt.

Der Progress ins CRPC ist insgesamt mit vermehrter DNA-Hypermethylierung assoziiert, wobei insbesondere die AR-Methylierung häufiger als im Prostatanormalgewebe vorkommt. Die Akkumulation hypermethylierter Gene unter Androgendeprivation erhöht also die Wahrscheinlichkeit eines CRPC (Angulo et al. 2016). Die Arbeitsgruppe um Korang-Yeboah stellte *ID4*-negative LNCaP-Zellen mit AR-Aktivität und höherer Tumorigenität her, die CRPC-Zellen ähneln. Das Einbringen von rekombinantem *ID4* in „*nano-carriern*“ in diese Zellen führte zu Apoptose, Proliferations- und Koloniebildungshemmung sowie Hemmung des Tumorwachstums im Xenograft. Mögliche zugrundeliegende Mechanismen beinhalten epigenetische Veränderungen, AR-Koregulatoren und andere Signalwege (Korang-Yeboah et al. 2016). Die Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem und symptomatischen CRPC ist unter anderem Docetaxel-basiert (S3-Leitlinie Prostatakarzinoms, 2018), führt jedoch unweigerlich zu einer Resistenz im Verlauf, sodass optimierte Alternativtherapien nötig sind. ID4 steigert die Empfindlichkeit der Krebszellen gegenüber Docetaxel und Doxorubicin (Korang-Yeboah et al. 2016) und fördert die Seneszenz in

Du145-Zellen unabhängig von den üblichen Seneszenzfaktoren wie p16, p53 oder pRB1 (Carey et al. 2013).

In unseren Untersuchungen war die Heterogenität der *ID4*-Methylierung in malignen wie auch benignen Geweben ausgeprägt. Die Ergebnisse der MS-PCR entsprachen daher den Ergebnissen aus Pyro- und Bisulfitsequenzierung nur bei den jeweils besonders stark und schwach methylierten Proben (Vinarskaja et al. 2012). Nur wenige Arbeiten zur DNA-Hypermethylierung im Prostatakarzinom verwendeten derartige quantitative Verfahren, weswegen sich die Frage stellt, ob die Heterogenität für *ID4* spezifisch ist. Bei der CLL (chronisch lymphatische Leukämie) wurden zum Beispiel 40 % Promotormethylierungen mit heterogenem Muster gefunden (Chen et al. 2011). Da in unseren Pyrosequenzierungen die CpG-Stellen 1-5 schwächer methyliert waren als 6-8, ist offenbar sogar die Primerlokalisation für die Testergebnisse relevant und stellt eine mögliche Erklärung für die oben genannten heterogenen Ergebnisse dar (Vinarskaja et al. 2012). Ebenfalls diskordante und heterogene Methylierungsgrade für den *GSTP1*-Promotor im Mammakarzinom wurden 2015 beschrieben, wobei verschiedene Analysemethoden wie MethyLight und MS-PCR verglichen wurden (Alnaes et al. 2015). In jedem Fall scheint es empfehlenswert, für die Untersuchung der DNA-Methylierung von Genen wie *ID4* quantitative Methoden anzuwenden.

Da auch in benignen Prostatazellen *ID4*-Hypermethylierungen gefunden wurden (Vinarskaja et al. 2012), liegt die Annahme nahe, dass - wie bei verschiedenen Genen, die einem *Imprinting* unterliegen (Bhusari et al. 2011) - Feldeffekte in von Krebs befallenen Organen wirken. Morphologisch (noch) unauffällige Zellen können dabei bereits epigenetisch verändert sein, sei es durch ein Malignom selbst oder durch einen natürlichen Alterungsprozess (Nonn et al. 2009). Sollte Letzteres der Fall sein, ist eine Methylierungsbasierte Diagnostik heikel. Im ersten Fall ließe sich die *ID4*-Promotorhypermethylierung sogar noch besser zur Frühdiagnose nutzen, nämlich zu einem Zeitpunkt, zu dem Tumorgewebe morphologisch noch unauffällig erscheint. Dies ermöglicht das Schließen dieser diagnostischen Lücke. Die Studiengruppe um Jarrard beschäftigt sich bereits seit Jahrzehnten mit dieser Thematik (Blute et al. 2015). Damaschke et al. wiesen 2013 nach, dass viele der bekannt hypermethylierten Gene im PCa (*RARB2*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *NKX2-5*, *ESR1*, *APC*) auch in Prostatanormalgeweben gesunder älterer Männer hypermethyliert sind, sodass ein entsprechender Alterungseffekt zu diskutieren ist (Damaschke et al.

2013). Es wäre allerdings genauer zu klären, ob die Methylierungsänderungen in PN von PCa-Patienten im Detail die gleichen wie in Normalgeweben älterer Gesunder sind.

Nasif et al. (2018) fanden in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen häufiger *ID4*-Hypermethylierungen verbunden mit schlechterer Prognose im Vergleich zu Östrogen-negativen Karzinomen und normalem Brustgewebe und vor allem in Abhängigkeit vom Östrogen-Signalweg (Nasif et al. 2018). Eine ähnliche Wirkung auf *ID4* in Abhängigkeit unterschiedlicher intrazellulärer Hormonwirkungen ist auch im Prostatakarzinom anzunehmen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Expressionsveränderungen von *ID4* im Prostatakarzinom ausgeprägter sind als DNA-Methylierungsveränderungen. Dies könnte daran liegen, dass Letztere erst später im Erkrankungsverlauf auftreten und die Expressionsminderung zwar nicht verursachen, aber im Sinne eines epigenetischen Einrastmechanismus verstärken können (Lock et al. 1987). Partielle und heterogene Methylierungen wurden sowohl in Tumor- als auch Normalgeweben gefunden, was auf einem epigenetischen Feldeffekt innerhalb des kanzerösen Organs beruhen könnte. Unsere Arbeit belegt ferner die Limitationen der MS-PCR-Methodik und liefert Argumente für die Verwendung quantitativer Methoden wie der Pyrosequenzierung bei klinisch eingesetzten DNA-Methylierungs-Assays.

## 4.2 *PITX2*

*PITX2*-Promotorhypermethylierung ist ein prognostischer Biomarker zur Vorhersage eines biochemisches Rezidivs nach radikaler Prostatektomie (Weiss et al. 2009) (Bañez et al. 2010). Ähnliche Veränderungen, die ebenfalls mit schlechter Prognose einhergehen, wurden in Brustkrebsgeweben und -zelllinien nachgewiesen (Nimmrich et al. 2008).

Erstmals beschrieben wir den Zusammenhang zwischen *PITX2*-Promotorhypermethylierung und verminderter Expression des Gens sowie mit der onkogenen Expression von ERG. In den Androgen-unabhängigen Zelllinien PC-3 und Du145 konnte insbesondere durch die kombinierte Behandlung mit 5'-Aza-2'-Desoxycytidin und dem Histondeacetylasehemmer SAHA die Expression teilweise bis eindeutig wiederhergestellt werden. Somit liegt der Zusammenhang zwischen epigenetischer Veränderung und funktionellem Effekt nahe (Vinarskaja et al. 2013). In unserer Untersuchung war die *PITX2*-

Promotorhypermethylierung in Prostatakarzinomen tatsächlich mit höherem T-Stadium und früherem biochemischen Rezidiv sowie mit erhöhter ERG-Expression assoziiert. *PITX2*-Expression und -Methylierung korrelierten hochsignifikant invers miteinander, jedoch nur tendentiell mit der ERG-Überexpression. Auch die Verminderung der mRNA-Expression hing mit klinischen Parametern zusammen. Eine Expression über dem Median war signifikant mit seltenerem und späterem biochemischen Rezidiv assoziiert. In dieser Untersuchung wurde eine MethyLight-PCR verwendet, um die Vergleichbarkeit mit der Arbeit von Weiss et al. (2009) zu ermöglichen. Sie ergab für Normalgewebe einen medianen Methylierungsgrad von unter 0,001 %, für Tumorgewebe hingegen von 23,3 % (Vinarskaja et al. 2013).

Eine ERG-Überexpression findet sich bereits in einigen HGPIN und öfter in invasiven Prostatakarzinomen (Perner et al. 2007), was eine Beteiligung am Übergang zum invasiven Wachstum nahelegt. Die funktionelle Bedeutung der von uns beobachteten Korrelation mit der *PITX2*-Hypermethylierung wurde bisher nicht weitergehend untersucht. *PITX2* ist ferner ein induzierbares Ziel im Wnt-Signalweg (Kioussi et al. 2002). Es verstärkt in der Folge einerseits die Transkription bestimmter Zielgene des Wnt-Signalwegs, leitet aber andererseits negative Rückkopplungseffekte ein, die die Aktivität des Signalwegs limitieren (Schmidt 2014). Deshalb ist es besonders interessant, wie die *PITX2*-Expression reguliert wird, und welche Funktionen es in benignen und malignen Prostatazellen erfüllt. Einige funktionelle Aspekte konnten in einer weiteren Dissertation unserer Arbeitsgruppe erarbeitet werden. Es ergaben sich Hinweise auf eine Modulation von AR-, Wnt- und TGFβ/BMP-Signalwegen durch *PITX2*. Die Überexpression von *PITX2* verminderte die Aktivität und Menge des AR, verlangsamte die Proliferation und induzierte - in gewissem Umfang - Seneszenz der PCa-Zelllinien (Schmidt 2014).

*PITX2* scheint besonders im ossär metastasierten beziehungsweise progredienten PCa relevant; beim Prozess der Metastasierung könnte sich die Interaktion von *PITX2* mit verschiedenen Signalwegen jedoch anders auswirken als in vitro. *PITX2* unterstützt die Aktin-Myosin-Reorganisation und verändert damit die Migrationsfähigkeit von Zellen (Wei et al. 2002). Letztendlich könnte *PITX2* somit auch als mögliches Therapieziel interessant werden (Vela et al. 2014). Die Fragen, welche Funktion *PITX2* bei der Karzinogenese in der Prostata genau ausübt, ob es ein mögliches Tumorsuppressorgen darstellt und ob sich seine Funktion während der Tumorprogression verändert, sind also weiterhin offen.

Dagegen erscheint gesichert, dass *PITX2* auf Basis von Methylierungsanalysen als PCa-Tumormarker geeignet ist (Uhl et al. 2017). Kombinationen der Methylierung von *PITX2* mit der von weiteren Genen erscheinen sinnvoll. Ahmad et al. (2016) kombinierten die Methylierung von *PITX2*, *HSPB1*, *CCND2*, *TIG1*, *DPYS*, und *MAL* mit dem klinischen Risiko-Berechnungs-Score „CAPRA“ (PSA, Gleason-Score, T-Stadium) als Diagnostikinstrument von klinisch gering bis mittel aggressiv eingeschätzten Prostatakarzinomen. Eine Spezifität von 86 % und Sensitivität von 44 % konnten dabei jedoch nicht überschritten werden (Ahmad et al. 2016).

### 4.3 *HOXC6*

Die relative *HOXC6*-Expression ist in Prostatakarzinomgeweben signifikant höher als im Normalgewebe und ist assoziiert mit höherem T-, N-Stadium und Gleason-Score. In den untersuchten Geweben verhält sich der Proliferationsmarker Ki-67 konkordant. Je höher die *HOXC6*-Expression, desto kürzer ist das progressionsfreie Überleben (Lock et al. 1987; Lodygin et al. 2005). Es liegt nahe, dass *HOXC6* als Transkriptionsfaktor die Tumorigenese über die Regulation anderer Tumorsuppressoren und Onkogene beeinflusst. Nach Moreno (2010) beeinflusst *HOXC6* Signalwege über Wnt, Notch, BMP und FGF. Beispielsweise inhibiert *HOXC6* BMP7, welches wiederum die Ausbildung von Knochenmetastasen hemmt. *HOXC6* ist also sowohl diagnostisch (prognostischer Marker) als auch therapeutisch (Therapiestrategie via Zielgene) von möglicher Relevanz (Moreno 2010). Beispielsweise reduziert der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib den tumorfördernden Einfluss von *HOXC6* (McCabe et al. 2008). Paradox ist jedoch, dass *HOXC6* in vivo sowohl Agonisten als auch Antagonisten der Tumorigenese aktiviert (Moreno 2010). Zur Erklärung dieses Paradoxons haben wir vorgeschlagen, dass Antagonisten der Tumorigenese in Krebszellen hypermethyliert und dadurch dem Einfluss von *HOXC6* entzogen werden (Vinarskaja et al. 2011).

Die *HOXC6*-Zielgene *DKK3* und *WIF1* werden in Malignomzellen wiederum signifikant minderexprimiert, so auch in Prostatakarzinomen. *CNTN1* wurde von uns erstmals im PCa untersucht (Vinarskaja et al. 2011). In anderen Studien wurde für sein Genprodukt Contactin eine Funktion in der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion berichtet, was relevant für die Karzinominvasivität und Metastasierung ist (Eckerich et al. 2006) (Su et al.

2006). Wir zeigten erstmals den inversen Zusammenhang zwischen der Expression dieser Gene und *HOXC6*. Die *WIF1*-Minderexpression korrelierte mit frühem biochemischen Rückfall, höherem Lymphknotenstatus und Gleason-Score. Die restlichen Zielgene zeigten keine signifikante Assoziation mit klinischen Parametern (Vinarskaja et al. 2011). *DKK3* war in 17,4 % der malignen und überhaupt nicht in benignen Geweben methyliert. Besonders galt dies für lymphogen metastasierte Karzinome und weniger für Tumore mit niedrigem Gleason-Score. *WIF1* war in 33,7 % der bösartigen und 47,1 % der gutartigen Geweben methyliert (Vinarskaja et al. 2011). Dies spricht für seine Bedeutung besonders in der frühen Tumorigenese (Wissmann et al. 2003) im Prostatagewebe, welches morphologisch noch nicht als maligne erscheint. Hierbei war die Expression von *WIF1* und *DKK3* unabhängig vom Methylierungsgrad. In ausgewählten Prostatakarzinomzelllinien und –geweben zeigte sich eine geringe und stets heterogene Methylierung, außer in der LNCaP-Zelllinie (Vinarskaja et al. 2011). Dies steht im Gegensatz zu anderen, dicht methylierten Genen wie *GSTP1* (Florl et al. 2004). Während *WIF1* und *DKK3* in den von uns untersuchten Karzinomzellen häufig minderexprimiert werden, ist die Promotormethylierung eher schwach. Beide Eigenschaften scheinen größtenteils unabhängig voneinander zu sein. Dies stellt ein Paradoxon dar, welches jedoch durch andere epigenetische Mechanismen mit unterschiedlichen zeitlichen Abfolgen erklärt werden könnte (s. Kapitel 4.1). Somit ließe sich schlussfolgern, dass eine Promotormethylierung erst im Laufe der Kanzerogenese einer Minderexpression folgt oder diese sekundär unterstützt. Unsere Untersuchungen legen nahe, dass *HOXC6* selbst seine Zielgene reprimieren könnte, denn stärkste Expressionsminderung der Zielgene hing mit höchster *HOXC6*-Expression zusammen (Vinarskaja et al. 2011). Ein *Silencing* der Zielgene wird auch durch SMAD-Proteine beschrieben, die wiederum über BMP-Signalwege aktiviert werden (Li et al. 2006). Wir nehmen an, dass im veränderten Zellkernmilieu maligner Prostatazellen alternative Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren den Effekt von *HOXC6* auf seine Zielgene variieren. Exemplarisch sei dafür der durch *HOXB13* (Norris et al. 2009), *FOXA1* (Wang et al. 2011) und *ERG* (Yu et al. 2010) abgeänderte Signalweg des Androgenrezeptors genannt.

*DKK3* wurde bereits als therapeutisches Ziel für Prostatakarzinome im Mausmodell untersucht, indem es Mäusen mit subkutanen PC-3-Tumoren durch adenovirale Vektoren verabreicht wurde. Dabei konnte die Arbeitsgruppe eine relevante Toxizität weitestgehend ausschließen und Effektivität bei lokaler Anwendung nachweisen. Die Wirkung des Vek-

tors war Krebs-spezifisch und wurde unter anderem über Zytokine aus Leukozyten vermittelt (Kawauchi et al. 2012).

Neuerdings berichteten Leyten et al. (2015), dass die Kombination aus *HOXC6*, *TDRD1* und *DLX1* (Expression) im Urin eine verlässlichere Aussage über das Vorhandensein eines Gleason-Score  $\geq 7$  bei vorhandenem PCa treffen kann als das von der FDA zugelassene RNA-basierte Testverfahren „ProgenSA PCA3“ (Leyten et al. 2015). In neueren Untersuchungen imponiert *HOXC6* als am stärksten überexprimiertes *Homeobox*-Gen im PCa unabhängig von (anti-)androgenem Einfluss. Dadurch könnte seine Expression nicht nur als Diagnostikum, sondern auch als Verlaufsparemeter, unabhängig von antihormonellen Therapieregimen, genutzt werden (Hamid et al. 2015). Van Neste et al. (2016) kreierten einen neuen Risiko-Score zur Detektion klinisch relevanter PCa, bestehend aus *HOXC6*- und *DLX1*-Expression im Urin, PSA, PSA-Dichte (Serum-PSA/Prostataavolumen), Familienanamnese, Alter sowie rektalem Prostatatastbefund. Diese Kombination erwies sich als signifikantester Prädiktor in Anbetracht von rund einem Fünftel falsch negativer Ergebnisse transrektaler, Ultraschall-geführter Prostatabiopsien als bisheriger Goldstandard der PCa-Diagnose (van Neste et al. 2016).

Weitere Untersuchungen des *HOXC6*-Paradoxons empfehlen sich nicht nur aufgrund weiterer klinischer Erkenntnisse bezüglich des Prostatakarzinoms, sondern auch zur Aufklärung elementarer Zellwachstumsmechanismen in diesem Tumor.

#### 4.4 Schlussfolgerungen über epigenetische Veränderungen im Prostatakarzinom und Ausblick

Das Alter stellt einen Risikofaktor für das Prostatakarzinom an sich, aber auch für diverse alterungs-spezifische Epi-/Genomveränderungen dar. Eine definitive Unterscheidung zwischen Karzinom- und alterungsbedingten Alterationen erweist sich somit grundsätzlich als problematisch. Erschwerend kommt der sogenannte Feldeffekt zum Tragen, der in seiner Wirkung im Umkreis von Karzinomzellen - entweder als eine Reaktion auf sezernierte „Krebsfaktoren“ aus Krebszellen auf morphologisch normale Zellen oder als Konsequenz eines normalen Alterungsprozesses - diskutiert wird (Goering et al. 2012). Als Alterserscheinung könnte dieser Effekt eine Krebsdiagnostik auf Hypermethylierungsbasis erschweren, dagegen als Krebswirkung die Diagnostik deutlich erleichtern. Das Risiko falsch

negativer Befunde würde damit gesenkt werden. Diese Zusammenhänge und Interaktionen sind noch unzureichend differenziert, sodass hier enormer Untersuchungsbedarf besteht. Unsere Analysen von ID4 sind hierbei exemplarisch für DNA-Methylierungsveränderungen sowohl in Tumor- als auch Normalgeweben mit inter- und intraspezifischen Unterschieden (Vinarskaja et al. 2012). Ob die registrierten Hypermethylierungen in Normalgeweben auf Alterung im Allgemeinen oder Feldeffekten (*Imprinting*-, Expressions-, Methylierungsebene) durch bereits bestehende Krebszellen fußen, bleibt zu klären.

So wie DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Normal- und Krebsgeweben bestehen, ist das Prostatakarzinom auch für divergierende Methylierungsmuster verschiedener Karzinomproben bekannt. Es gibt nicht nur inter-, sondern auch intraindividuelle Unterschiede zwischen einzelnen Proben beziehungsweise Zellen (Wang et al. 2018). Die deutliche intratumorale Heterogenität der Methylierungs- und Expressionsveränderungen im Prostatakarzinom ist bemerkenswert und wurde auch in unseren eigenen Arbeiten ersichtlich. Lokalisierte PCa unterscheiden sich in ihrer Biologie von metastasierten Kastrationsresistenten PCa (Fraser et al. 2017). Bisherige Untersuchungen klassifizieren Prostatakarzinome bezüglich der Kriterien Histologie, Immunhistochemie (Inamura 2018), Hormonabhängigkeit, Gleason-Score, TNM-Stadium und Progressionsverhalten. Eine weitere Spezifizierung innerhalb der Studien abhängig vom Wachstumstyp, über die bestehenden Unterscheidungen von uni-/multiformem Adenokarzinom, Urothelkarzinom, neuroendokrinem oder kleinzelligem Karzinom hinaus, könnte hilfreich sein. Letztgenannte sind zwar Raritäten, könnten aber mit einer Erklärung für die vorhandene Diversität liefern. 2015 wurde in der Zeitschrift „Cell“ ein Vorschlag für eine molekulare Taxonomie des Prostatakrebses veröffentlicht (Abeshouse et al. 2015): 74 % der untersuchten Karzinome teilten sich in Klassen, abhängig von *ETS*-Fusionsgenen *ERG*, *FLI1*, *ETV1* und *ETV4* sowie Mutationen von *SPOP*, *FOXA1* und *IDH1*. Jede Klasse wird weiter nach epi-/genetischen und klinischen Unterschieden gegliedert. Besonders erwähnenswerte Heterogenitäten bestanden bei Promotorhypermethylierung und Androgenrezeptoraktivität. Die restlichen 26 % der Karzinome konnten keiner der oben genannten Veränderungen zugeordnet werden. Diese Arbeit ergänzt und unterstützt direkt unsere eigenen Untersuchungen und daraus folgenden Annahmen.

Anhand unserer Ergebnisse der *ID4*-Pyrosequenzierung wurde erkennbar, dass je weiter distal die CpG-Stellen lagen, umso höhere Methylierungsgrade auftraten. Dies deutet eine Abhängigkeit von der *Primer*-Position und eine simple biologische Erklärung für Unterschiede in den in der Literatur berichteten Methylierungsgraden an, die in weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden sollte. In dieser Arbeit wurde ersichtlich, dass mit zunehmender Heterogenität und Lücken im Methylierungsmuster die Aussagekraft qualitativer Methoden wie der MS-PCR sinkt, sodass für solche Fälle quantitative Techniken besser geeignet sind (Vinarskaja et al. 2012).

Mittels sogenannter „*high-throughput*“-Verfahren, das heißt Analysetechniken mit außerordentlich hoher Durchsatzmenge an Proben und Untersuchungszielen bei kostengünstigeren Bedingungen, können mittlerweile effizientere Untersuchungen eines PCa durchgeführt werden. *Assays* für Urin-, Blut- und Biopsatproben werden bereits kommerziell vertrieben. Eine ausführliche Auflistung ist 2016 von McGrath et al. veröffentlicht worden (McGrath et al. 2016). Als erschwerender Faktor muss genannt werden, dass von einer eingeschränkten Markerstabilität im Urin ausgegangen werden muss, da sie von Temperatur, pH und der unterschiedlichen Sedimentzusammensetzung abhängt. Adenokarzinome bleiben zudem häufig ohne Kontakt zur prostatistischen Urethra, was die Markerkonzentration ebenfalls beeinflusst. Hinzu kommt, dass viele DNA-Methylierungsanalysen ausschließlich mit Geweben PCa-Erkrankter und nicht im Vergleich zu Normalgeweben ausgeführt wurden. Dies widerspricht im Aufbau einem der eigentlichen Zwecke, nämlich der sicheren Erstellung einer Erstdiagnose (Blute et al. 2015).

Besonders eindruckliche Resultate wurden bei der Analyse des *PITX2*-Gens erzielt. Es zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen *PITX2*-Promotorhypermethylierung, Expressionsreduktion und schlechter Prognose. Zusätzlich wiesen wir einen Konnex mit ERG-Überexpression nach, sodass eine Interaktion zu diskutieren ist (Vinarskaja et al. 2013).

In jedem Falle erscheint es sinnvoll, sich eines DNA-Methylierungs-basierten Diagnostikums aus einer Kombination mehrerer Gene zu bedienen, da ein einzelnes verändertes Gen nicht die nötige Aussagekraft besitzt. Aus unseren eigenen Untersuchungen ist kein einzelnes Gen als adäquates Diagnostikum allein geeignet, da viele relevante Karzinome auf diese Weise nicht registriert worden wären (Florl et al. 2004). Bekanntermaßen

gibt es für die wenigsten Krebsarten eine einzige Genaberration, die die Tumorigenese alleine auslöst. Zusätzlich sind unterschiedliche Penetranzgrade und Umweltfaktoren zu berücksichtigen. Von daher muss vermutlich eine Kombination verschiedener genetischer und epigenetischer Veränderungen im Konvolut als Diagnostikum fungieren. Die Kombination aus mehreren Genaberrationen sichert bislang die höchste Spezifität und Sensitivität. Diese kann je nach Eignung zu Screening, Einteilung von Risikogruppen, Therapieentscheidungshilfe und Verlaufskontrolle eingesetzt werden. Viele Aberrationen sind bereits im Normalgewebe detektierbar, noch bevor histologische Krebsmerkmale auftreten. Geht man dabei vom Feldeffekt auf DNA-Methylierungs-, DNA-Mutations-, RNA-Expressions- und Proteinebene noch okkulten Karzinome aus, gelten Methylierungsänderungen als frühes und verlässliches Ereignis der Kanzerogenese (Møller et al. 2017).

Der Vorteil von DNA- gegenüber RNA-Tests ist die höhere Stabilität des Erbguts. Material kann aus Proben wie Prostatabiopsien inklusive Formalin-/Paraffinblöcken, Blut und Urin sogar *noninvasiv* gewonnen werden (Jeronimo et al. 2011), die ohnehin klinisch verwendet werden. DNA-Analysen sind kosteneffektiv und gut etabliert, wie zum Beispiel die MS-PCR. Mittlerweile wurden Methoden wie EpiTect MethyLight Assay® (Eads et al. 2000) oder EpiTyperMassArray (Suchiman et al. 2015) etabliert, die die Untersuchung sehr vieler Proben mit vergleichsweise wenig Aufwand ermöglichen. Insbesondere Methylierungsanalysen konzentrieren sich nur auf relevante Promotorregionen und benötigen nicht die Analyse des gesamten Genoms. Eine Ringstudie internationaler Arbeitsgruppen (Bock et al. 2016) verglich absolute und relative DNA-Methylierungsanalyse-Assays und kam zu dem Schluss, dass absolute Methoden wie AmpliconBS, Pyroseq und EpiTyper besonders für große Mengen und als Biomarker-Detektoren geeignet sind. Relative Methoden wie MethyLight und MS-PCR können aber auch bei guten Primer-/Protokoll-Designs kosteneffektiv genutzt werden. Lokus-spezifische wurden außerdem besser als globale Tests bewertet. Dies unterstützt auch die Ergebnisse unserer Methodenvergleiche. Aus eigener Erfahrung ist die Bisulfidsequenzierung als sehr zeit- und kostenaufwendig einzustufen, während *Real Time*- und MS-PCR einen höheren Probendurchsatz in geringerer Zeit erlauben. Letzteres gilt auch für das *Pyrosequencing*, welches sogar einen noch höheren Informationsgewinn gestattet. Abschließend kommt es auf folgende Eigenschaften guter Analyseverfahren an: Kosteneffektivität, simple Anwendung, gute Zugänglichkeit, Schnelligkeit und Verlässlichkeit.

Die fortschreitende Untersuchung genetischer Veränderungen führt zur Entwicklung neuer „*targeted therapies*“, wie sie bereits seit einigen Jahren bei diversen Krebsarten eingesetzt werden. Beispielsweise wird der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib beim Bronchialkarzinom nur in Fällen mit *EGFR*-Mutation angewandt (Shepherd et al. 2005). Basierend auf DNMT- und HDAC-Inhibition (s. Kapitel 1.5) werden zunehmend epigenetisch regulierende Krebstherapeutika entwickelt. So hat die *FDA* den HDAC-Inhibitor Vorinostat bei kutanem T-Zell-Lymphom (Mann et al. 2007) und das Aza-Nukleosid Decitabine beim myelodysplastischen Syndrom (Malik et al. 2014) zugelassen. Sämtliche von uns getesteten Gene besitzen eine Funktion, die die Tumorigenese direkt oder indirekt generiert, unterstützt, aufrechterhält oder eine Metastasierung begünstigt. *Per se* stellen sie somit einen potentiellen Therapieangriffspunkt dar. Unserer Hypothese folgend, dass *HOXC6* über noch unbekannte Cofaktoren seine tumorinhibierenden Zielgene reguliert (Vinarskaja et al. 2011), ist zu vermuten, dass noch etliche potentielle Therapieziele nicht aufgespürt sind.

Wie bereits erwähnt, sind Methylierungs- und Expressionsmuster im PCa sehr heterogen – und entsprechend wird auch in Zukunft die Therapie personalisiert erfolgen müssen. Neuere Angriffspunkte bilden aktuell das Immunsystem modulierende Medikamente (Wang et al. 2018). Bei steigender Relevanz onkologischer Erkrankungen besteht ein immenser Markt für entsprechende Medikamente. Beim Mammakarzinom werden unter bestimmten Bedingungen Therapie- und Nachsorgeentscheidungen in Abhängigkeit vom Gentest *Oncotype DX*<sup>®</sup> getroffen. In den meisten Fällen eines *HER2*-positiven Mammakarzinoms ist bereits jetzt ein monoklonaler Antikörper indiziert (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2017). Auch aufgrund immer verbesserter und neuer Analysemethoden bietet das Epigenom ein erhebliches Therapiepotential. Nichtsdestotrotz muss berücksichtigt werden, dass personalisierte Therapien oftmals einen größeren diagnostischen Aufwand erfordern und - bei manchmal nur mäßigen Verbesserungen von Lebensqualität und Überlebenszeit - zu erhöhten Kosten führen können. Demgegenüber lässt sich eine Kostensparnis durch spezifischere Patientenauswahl und insgesamt verringerter Therapieanwendungen, damit also weniger absolute Ausgaben, diskutieren. Auch ist der volkswirtschaftliche Nutzen geheilter und wieder rehabilitierter Patienten zu beachten (Allemani et al. 2018). Es bieten sich für den einzelnen Patienten Überlebensvorteile, aber auch eine

Intensivierung interdisziplinärer Zusammenarbeit in der Bemühung um neue Therapiestrategien.

Die beschriebenen Verbesserungen von Diagnose- und Therapieverfahren spiegeln den Fortschritt der medizinischen Versorgung weltweit wider. In Deutschland beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate der in den Jahren 2010-2014 diagnostizierten PCa-Patienten über 90 %. Dies ist jedoch nicht mit der tatsächlichen Effektivität der Therapie gleichzusetzen und bedeutet nicht eine *per se* verbesserte Überlebensrate. Die Krebsdiagnose wird durch das PSA-Screening früher gestellt, sodass der Patient schlichtweg mehr Jahre mit dem Karzinom lebt. Er überlebt das gleiche Erkrankungsstadium, aber nicht automatisch länger als früher (Allemani et al. 2018).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass auch angesichts der vorhergehend angeführten Problemstellungen, epigenetische Veränderungen in Karzinomen ein vielversprechendes Potential in den Bereichen Diagnostik, Prognosestellung und Therapie besitzen. Die weitere Erforschung dieses Feldes ist in Anbetracht der steigenden Krebsinzidenz und –mortalität sowie steigender Kosten im Gesundheitswesen unumgänglich.

## 5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1 Abeshouse, A.; Ahn, J.; Akbani, R.; Ally, A.; Amin, S.; Andry, C. et al. (2015): The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 163 (4), 1011–1025.
- 2 Ahmad, A.; Vasiljevic, N.; Carter, P.; Berney, D.; Moller, H.; Foster, C. et al. (2016): A Novel DNA Methylation Score Accurately Predicts Death from Prostate Cancer in Men with Low to Intermediate Clinical Risk Factors. *Oncotarget* 7 (44), 71833–71840.
- 3 Albertsen, P. (2012): What Is the Risk Posed by Prostate Cancer? *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2012 (45), 169–174.
- 4 Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Matz, M.; Nikšić, M. et al. (2018): Global Surveillance of Trends in Cancer Survival 2000–14 (CONCORD-3). *The Lancet* 391 (10125), 1023–1075.
- 5 Allis, C. David (2015): *Epigenetics*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 6 Alnaes, Grethe I Grenaker; Ronneberg, J.; Kristensen, V.; Tost, J. (2015): Heterogeneous DNA Methylation Patterns in the GSTP1 Promoter Lead to Discordant Results between Assay Technologies and Impede Its Implementation as Epigenetic Biomarkers in Breast Cancer. *Genes* 6 (3), 878–900.
- 7 Angulo, J.; Andrés, G.; Ashour, N.; Sánchez-Chapado, M.; López, J.; Ropero, S. (2016): Development of Castration Resistant Prostate Cancer Can Be Predicted by a DNA Hypermethylation Profile. *The Journal of Urology* 195 (3), 619–626.
- 8 Antequera, F. (2003): Structure, Function and Evolution of CpG Island Promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (8), 1647–1658.
- 9 Aparicio, A.; Den, R.; Knudsen, K. (2011): Time to Stratify? The Retinoblastoma Protein in Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Nature Reviews. Urology* 8 (10), 562–568.
- 10 Arora, K.; Barbieri, C. (2018): Molecular Subtypes of Prostate Cancer. *Current Oncology Reports* 20 (8), 58.

- 11 Asirvatham, A.; Schmidt, M.; Chaudhary, J. (2006): Non-Redundant Inhibitor of Differentiation (ID) Gene Expression and Function in Human Prostate Epithelial Cells. *The Prostate* 66 (9), 921–935.
- 12 Bañez, L.; Sun, L.; van Leenders, Geert J; Wheeler, T.; Bangma, C.; Freedland, S. et al. (2010): Multicenter Clinical Validation of PITX2 Methylation as a Prostate Specific Anti-gen Recurrence Predictor in Patients with Post-Radical Prostatectomy Prostate Cancer. *The Journal of Urology* 184 (1), 149–156.
- 13 Bangma, C.; Roemeling, S.; Schroder, F. (2007): Overdiagnosis and Overtreatment of Early Detected Prostate Cancer. *World Journal of Urology* 25 (1), 3–9.
- 14 Barbieri, C.; Bangma, C.; Bjartell, A.; Catto, James W F; Culig, Z.; Grönberg, H. et al. (2013): The Mutational Landscape of Prostate Cancer. *European Urology* 64 (4), 567–576.
- 15 Bedford, L.; Walker, R.; Kondo, T.; van Crüchten, I.; King, E.; Sablitzky, F. (2005): ID4 Is Required for the Correct Timing of Neural Differentiation. *Developmental Biology* 280 (2), 386–395.
- 16 Bhusari, S.; Yang, B.; Kueck, J.; Huang, W.; Jarrard, D. (2011): Insulin-Like Growth Factor-2 (IGF2) Loss of Imprinting Marks a Field Defect within Human Prostates Containing Cancer. *The Prostate* 71 (15), 1621–1630.
- 17 Bibikova, M.; Chudin, E.; Arsanjani, A.; Zhou, L.; Garcia, E.; Modder, J. et al. (2007): Expression Signatures that Correlated with Gleason Score and Relapse in Prostate Cancer. *Genomics* 89 (6), 666–672.
- 18 Bisoffi (2009): Differential Gene Expression in Tumor Adjacent Histologically Normal Prostatic Tissue Indicates Field Cancerization. *International Journal of Oncology* 35 (5).
- 19 Blute, M.; Damaschke, N.; Jarrard, D. (2015): The Epigenetics of Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis: Update on Clinical Applications. *Current Opinion in Urology* 25 (1), 83–88.
- 20 Carey, J.; Knowell, A.; Chinaranagari, S.; Chaudhary, J. (2013): ID4 Promotes Senescence and Sensitivity to Doxorubicin-induced Apoptosis in Du145 Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research* 33 (10), 4271–4278.

- 21 Carey, Jason P W; Asirvatham, A.; Galm, O.; Ghogomu, T.; Chaudhary, J. (2009): Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) Is a Potential Tumor Suppressor in Prostate Cancer. *BMC Cancer* 9, 173.
- 22 Chandrasekar, T.; Yang, J.; Gao, A.; Evans, C. (2015): Mechanisms of Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology* 4 (3), 365–380.
- 23 Chao, C.; Chi, M.; Preciado, M.; Black, M. (2013): Methylation Markers for Prostate Cancer Prognosis: A Systematic Review. *Cancer Causes & Control* 24 (9), 1615–1641.
- 24 Chen, S.-S.; Claus, R.; Lucas, D.; Yu, L.; Qian, J.; Ruppert, A. et al. (2011): Silencing of the Inhibitor of DNA Binding Protein 4 (ID4) Contributes to the Pathogenesis of Mouse and Human CLL. *Blood* 117 (3), 862–871.
- 25 Cheng, L.; Montironi, R.; Bostwick, D.; Lopez-Beltran, A.; Berney, D. (2012): Staging of Prostate Cancer. *Histopathology* 60 (1), 87–117.
- 26 Christoph Bock, Florian Halbritter, Francisco J Carmona, Sascha Tierling, Paul Datlinger, Yassen Assenov (2016): Quantitative Comparison of DNA Methylation Assays for Biomarker Development and Clinical Applications. *Nature Biotechnology* 34 (7), 726–737.
- 27 Clark, S.; Harrison, J.; Paul, C.; Frommer, M. (1994): High Sensitivity Mapping of Methylated Cytosines. *Nucleic Acids Research* 22 (15), 2990–2997.
- 28 Clark, S.; Statham, A.; Stirzaker, C.; Molloy, P.; Frommer, M. (2006): DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *Nature Protocols* 1 (5), 2353–2364.
- 29 Cox, C.; Espinoza, H.; McWilliams, B.; Chappell, K.; Morton, L.; Hjalt, T. et al. (2002): Differential Regulation of Gene Expression by PITX2 Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (28), 25001–25010.
- 30 Cruciat, C.-M.; Niehrs, C. (2013): Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (3), a015081.
- 31 Cuzick, J.; Thorat, M.; Andriole, G.; Brawley, O.; Brown, P.; Culig, Z. et al. (2014): Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. *The Lancet Oncology* 15 (11), e484-e492.

- 32 Damaschke, N.; Yang, B.; Bhusari, S.; Svaren, J.; Jarrard, D. (2013): Epigenetic Susceptibility Factors for Prostate Cancer with Aging. *Prostate* 73 (16), 1721–1730.
- 33 Eads, C.; Danenberg, K.; Kawakami, K.; Saltz, L.; Blake, C.; Shibata, D. et al. (2000): MethyLight. A High-Throughput Assay to Measure DNA Methylation. *Nucleic Acids Research* 28 (8), E32.
- 34 Eckerich, C.; Zapf, S.; Ulbricht, U.; Muller, S.; Fillbrandt, R.; Westphal, M.; Lamszus, K. (2006): Contactin Is Expressed in Human Astrocytic Gliomas and Mediates Repulsive Effects. *GLIA* 53 (1), 1–12.
- 35 Epstein, J.; Egevad, L.; Amin, M.; Delahunt, B.; Srigley, J.; Humphrey, P. (2016): The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American Journal of Surgical Pathology* 40 (2), 244–252.
- 36 Falk, J.; Bonnon, C.; Girault, J.-A.; Faivre-Sarrailh, C. (2002): F3/Contactin, a Neuronal Cell Adhesion Molecule Implicated in Axogenesis and Myelination. *Biology of the Cell* 94 (6), 327–334.
- 37 Florl, A.; Steinhoff, C.; Müller, M.; Seifert, H.-H.; Hader, C.; Engers, R. et al. (2004): Coordinate Hypermethylation at Specific Genes in Prostate Carcinoma Precedes LINE-1 Hypomethylation. *British Journal of Cancer* 91 (5), 985–994.
- 38 Fong, K.-W.; Zhao, J.; Kim, J.; Li, S.; Yang, Y.; Song, B. et al. (2017): Polycomb-Mediated Disruption of an Androgen Receptor Feedback Loop Drives Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Research* 77 (2), 412–422.
- 39 Fraser, M.; Sabelnykova, V.; Yamaguchi, T.; Heisler, L.; Livingstone, J.; Huang, V. et al. (2017): Genomic Hallmarks of Localized, Non-Indolent Prostate Cancer. *Nature* 541 (7637), 359–364.
- 40 Giovannucci, E.; Ogino, S. (2005): DNA Methylation, Field Effects, and Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 97 (18), 1317–1319.
- 41 Goering, W.; Kloth, M.; Schulz, W. (2012): DNA Methylation Changes in Prostate Cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 863, 47–66.

- 42 Gore, S.; Jones, C.; Kirkpatrick, P. (2006): Decitabine. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 891-892.
- 43 Graca, I.; Pereira-Silva, E.; Henrique, R.; Packham, G.; Crabb, S.; Jeronimo, C. (2016): Epigenetic Modulators as Therapeutic Targets in Prostate Cancer. *Clinical Epigenetics* 8, 98.
- 44 Grönberg, H. (2003): Prostate Cancer Epidemiology. *The Lancet* 361 (9360), 859–864.
- 45 Hamid, A.; Hoogland, A.; Smit, F.; Jannink, S.; van Rijt-van de Westerlo, Cindy; Jansen, C. et al. (2015): The Role of HOXC6 in Prostate Cancer Development. *The Prostate* 75 (16), 1868–1876.
- 46 Harbeck, N.; Nimmrich, I.; Hartmann, A.; Ross, J.; Cufer, T.; Grutzmann, R. et al. (2008): Multicenter Study Using Paraffin-Embedded Tumor Tissue Testing PITX2 DNA Methylation as a Marker for Outcome Prediction in Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology* 26 (31), 5036–5042.
- 47 Henrique, R.; Ribeiro, F.; Fonseca, D.; Hoque, M.; Carvalho, A.; Costa, V. et al. (2007): High Promoter Methylation Levels of APC Predict Poor Prognosis in Sextant Biopsies from Prostate Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 13 (20), 6122–6129.
- 48 Hessels, D.; Verhaegh, G.; Schalken, J.; Witjes, J. (2004): Applicability of Biomarkers in the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 4 (4), 513–526.
- 49 Hiddemann, W.; Bartram, C. (2010): *Die Onkologie*. 2., aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- 50 Horoszewicz, J.; Leong, S.; Kawinski, E.; Karr, J.; Rosenthal, H.; Chu, T. et al. (1983): LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research* 43 (4), 1809–1818.
- 51 Inamura, K. (2018): Prostatic Cancers. Understanding Their Molecular Pathology and the 2016 WHO Classification. *Oncotarget* 9 (18), 14723–14737.
- 52 James G. Herman, Jeremy R. Graff, Sanna Myöhänen, Barry D. Nelkin, B. Baylin (1996): Methylation-specific PCR: A Novel PCR Assay for Methylation Status of CpG Is-

lands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Vol. 93), 9821–9826.

53 Jeronimo, C.; Bastian, P.; Bjartell, A.; Carbone, G.; Catto, J.; Clark, S. et al. (2011): Epigenetics in Prostate Cancer: Biologic and Clinical Relevance. *European Urology* 60 (4), 753–766.

54 Johansson, J.-E.; Andersson, S.-O.; Brith Krusemo, U.; Adami, H.-O.; Bergström, R.; Kraaz, W. (1989): Natural History of Localised Prostatic Cancer. *The Lancet* 333 (8642), 799–803.

55 Joshi, J.; Patel, D.; Morton, D.; Sharma, P.; Zou, J.; Hewa Bostanthirige, D. et al. (2016): Inactivation of ID4 Promotes a CRPC Phenotype with Constitutive AR Activation through FKBP52. *Molecular Oncology* 11 (4), 337–357.

56 Julius S. Horoszewicz, Susan S. Leong, Elzbieta Kawinski, et al. (1983): LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research* (43), 1809–1818.

57 Kaighn, M.; Narayan, K.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.; Jones, L. (1979): Establishment and Characterization of a Human Prostatic Carcinoma Cell Line (PC-3). *Investigative Urology* 17 (1), 16–23.

58 Kawauchi, K.; Watanabe, M.; Kaku, H.; Huang, P.; Sasaki, K.; Sakaguchi, M. et al. (2012): Preclinical Safety and Efficacy of in situ REIC/DKK-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. *Acta Medica Okayama* 66 (1), 7–16.

59 Kioussi, C.; Briata, P.; Baek, S.; Rose, D.; Hamblet, N.; Herman, T. et al. (2002): Identification of a Wnt/Dvl/ $\beta$ -Catenin  $\rightarrow$  PITX2 Pathway Mediating Cell-Type-Specific Proliferation During Development. *Cell* 111 (5), 673–685.

60 Komaragiri, S.; Bostanthirige, D.; Morton, D.; Patel, D.; Joshi, J.; Upadhyay, S.; Chaudhary, J. (2016): ID4 Promotes AR Expression and Blocks Tumorigenicity of PC3 Prostate Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (1), 60–66.

61 Korang-Yeboah, M.; Patel, D.; Morton, D.; Sharma, P.; Gorantla, Y.; Joshi, J. et al. (2016): Intra-Tumoral Delivery of Functional ID4 Protein via PCL/Maltodextrin Nanoparticle Inhibits Prostate Cancer Growth. *Oncotarget* 7 (42), 68072–68085.

- 62 Kristensen, L.; Hansen, L. (2009): PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry* 55 (8), 1471–1483.
- 63 Laird, P. (2003): Early Detection: The Power and the Promise of DNA Methylation Markers. *Nature Reviews Cancer* 3 (4), 253–266.
- 64 Lasorella, A.; Uo, T.; Iavarone, A. (2001): ID Proteins at the Cross-Road of Development and Cancer. *Oncogene* 20 (58), 8326–8333.
- 65 Leyten, G.; Hessels, D.; Smit, F.; Jannink, S.; Jong, H. de; Melchers, W. et al. (2015): Identification of a Candidate Gene Panel for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* 21 (13), 3061–3070.
- 66 Li, X.; Nie, S.; Chang, C.; Qiu, T.; Cao, X. (2006): SMADs Oppose HOX Transcriptional Activities. *Experimental Cell Research* 312 (6), 854–864.
- 67 Licchesi, J D F; van Neste, L.; Tiwari, V.; Cope, L.; Lin, X.; Baylin, S.; Herman, J. (2010): Transcriptional Regulation of Wnt Inhibitory Factor-1 by Miz-1/c-Myc. *Oncogene* 29 (44), 5923–5934.
- 68 Lin, P.-C.; Giannopoulou, E.; Park, K.; Mosquera, J.; Sboner, A.; Tewari, A. et al. (2013): Epigenomic Alterations in Localized and Advanced Prostate Cancer. *Neoplasia* 15 (4), 373–383.
- 69 Lock, L.; Takagi, N.; Martin, G. (1987): Methylation of the Hprt Gene on the inactive X Occurs After Chromosome Inactivation. *Cell* 48 (1), 39–46.
- 70 Lodygin, D.; Epanchintsev, A.; Menssen, A.; Diebold, J.; Hermeking, H. (2005): Functional Epigenomics Identifies Genes Frequently Silenced in Prostate Cancer. *Cancer Research* 65 (10), 4218–4227.
- 71 Majumdar, S.; Buckles, E.; Estrada, J.; Koochekpour, S. (2011): Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer. *Current Genomics* 12 (7), 486–505.
- 72 Malik, P.; Cashen, A. (2014): Decitabine in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia in Elderly Patients. *Cancer Management and Research* 6, 53–61.

- 73 Mann, B.; Johnson, J.; Cohen, M.; Justice, R.; Pazdur, R. (2007): FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist* 12 (10), 1247–1252.
- 74 Marks, P. (2007): Discovery and Development of SAHA as an Anticancer Agent. *Oncogene* 26 (9), 1351–1356.
- 75 Marques-Magalhães, Â.; Graça, I.; Henrique, R.; Jerónimo, C. (2018): Targeting DNA Methyltransferases in Urological Tumors. *Frontiers in Pharmacology* 9, 366.
- 76 Martens, John W M; Nimmrich, I.; Koenig, T.; Look, M.; Harbeck, N.; Model, F. et al. (2005): Association of DNA Methylation of Phosphoserine Aminotransferase with Response to Endocrine Therapy in Patients with Recurrent Breast Cancer. *Cancer Research* 65 (10), 4101–4117.
- 77 McCabe, C.; Spyropoulos, D.; Martin, D.; Moreno, C. (2008): Genome-Wide Analysis of the Homeobox C6 Transcriptional Network in Prostate Cancer. *Cancer Research* 68 (6), 1988–1996.
- 78 McCabe, M.; Brandes, J.; Vertino, P. (2009): Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research* 15 (12), 3927–3937.
- 79 McGrath, S.; Christidis, D.; Perera, M.; Hong, S.; Manning, T.; Vela, I.; Lawrentschuk, N. (2016): Prostate Cancer Biomarkers: Are We Hitting the Mark? *Prostate International* 4 (4), 130–135.
- 80 Mikeska, T.; Candiloro, Ida L M; Dobrovic, A. (2010): The Implications of Heterogeneous DNA Methylation for the Accurate Quantification of Methylation. *Epigenomics* 2 (4), 561–573.
- 81 Miller, G.; Miller, H.; van Bokhoven, A.; Lambert, J.; Werahera, P.; Schirripa, O. et al. (2003): Aberrant HOXC Expression Accompanies the Malignant Phenotype in Human Prostate. *Cancer Research* 63 (18), 5879–5888.
- 82 Møller, M.; Strand, S.; Mundbjerg, K.; Liang, G.; Gill, I.; Haldrup, C. et al. (2017): Heterogeneous Patterns of DNA Methylation-Based Field Effects in Histologically Normal Prostate Tissue from Cancer Patients. *Scientific Reports* 7, 40636.

- 83 Moreno, C. (2010): The Sex-Determining Region Y-Box 4 and Homeobox C6 Transcriptional Networks in Prostate Cancer Progression: Crosstalk with the Wnt, Notch, and PI3K Pathways. *The American Journal of Pathology* 176 (2), 518–527.
- 84 Nasif, D.; Campoy, E.; Laurito, S.; Branham, R.; Urrutia, G.; Roqué, M.; Branham, M. (2018): Epigenetic Regulation of ID4 in Breast Cancer. Tumor Suppressor or Oncogene? *Clinical Epigenetics* 10 (1), 111.
- 85 Navone, N.; Olive, M.; Ozen, M.; Davis, R.; Troncoso, P.; Tu, S. et al. (1997): Establishment of Two Human Prostate Cancer Cell Lines Derived from a Single Bone Metastasis. *Clinical Cancer Research* 3 (12 Pt 1), 2493–2500.
- 86 Nelson, W.; Marzo, A. de; Yegnasubramanian, S. (2009): Epigenetic Alterations in Human Prostate Cancers. *Endocrinology* 150 (9), 3991–4002.
- 87 Nimmrich, I.; Sieuwerts, A.; Meijer-van Gelder, M.; Schwöpe, I.; Bolt-de Vries, J.; Harbeck, N. et al. (2008): DNA Hypermethylation of PITX2 Is a Marker of Poor Prognosis in Untreated Lymph Node-Negative Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 111 (3), 429–437.
- 88 Nonn, L.; Ananthanarayanan, V.; Gann, P. (2009): Evidence for Field Cancerization of the Prostate. *The Prostate* 69 (13), 1470–1479.
- 89 Norris, J.; Chang, C.-Y.; Wittmann, B.; Kunder, R.; Cui, H.; Fan, D. et al. (2009): The Homeodomain Protein HOXB13 Regulates the Cellular Response to Androgens. *Molecular Cell* 36 (3), 405–416.
- 90 Ochiai, K.; Morimatsu, M.; Kato, Y.; Ishiguro-Oonuma, T.; Udagawa, C.; Rungsuriyawiboon, O. et al. (2016): Tumor Suppressor REIC/DKK-3 and Co-Chaperone SGTA: Their Interaction and Roles in the Androgen Sensitivity. *Oncotarget* 7 (3), 3283–3296.
- 91 Pan, Y.; Liu, G.; Zhou, F.; Su, B.; Li, Y. (2018): DNA Methylation Profiles in Cancer Diagnosis and Therapeutics. *Clinical and Experimental Medicine* 18 (1), 1–14.
- 92 Patel, D.; Knowell, A.; Korang-Yeboah, M.; Sharma, P.; Joshi, J.; Glymph, S. et al. (2014): Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) Inactivation Promotes De Novo Steroidogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecular Endocrinology* 28 (8), 1239–1253.

- 93 Patel, D.; Morton, D.; Carey, J.; Havrda, M.; Chaudhary, J. (2015): Inhibitor of Differentiation 4 (ID4): From Development to Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1855 (1), 92–103.
- 94 Paziewska, A.; Dabrowska, M.; Goryca, K.; Antoniewicz, A.; Dobruch, J.; Mikula, M. et al. (2014): DNA Methylation Status is More Reliable than Gene Expression at Detecting Cancer in Prostate Biopsy. *British Journal of Cancer* 111 (4), 781–789.
- 95 Perner, S.; Mosquera, J.-M.; Demichelis, F.; Hofer, M.; Paris, P.; Simko, J. et al. (2007): TMPRSS2-ERG Fusion Prostate Cancer. An Early Molecular Event Associated with Invasion. *The American Journal of Surgical Pathology* 31 (6), 882–888.
- 96 Popiolek, M.; Rider, J.; Andren, O.; Andersson, S.-O.; Holmberg, L.; Adami, H.-O.; Johansson, J.-E. (2013): Natural History of Early, Localized Prostate Cancer: A Final Report from Three Decades of Follow-Up. *European Urology* 63 (3), 428–435.
- 97 Prins, G.; Putz, O. (2008): Molecular Signaling Pathways that Regulate Prostate Gland Development. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 76 (6), 641–659.
- 98 Ramachandran, S.; Liu, P.; Young, A.; Yin-Goen, Q.; Lim, S.; Laycock, N. et al. (2005): Loss of HOXC6 Expression Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Oncogene* 24 (1), 188–198.
- 99 Rasheed, S.; Gardner, M.; Rongey, R.; Nelson-Rees, W.; Arnstein, P. (1977): Human Bladder Carcinoma: Characterization of Two New Tumor Cell Lines and Search for Tumor Viruses. *Journal of the National Cancer Institute* 58 (4), 881–890.
- 100 Razmara, M.; Srinivasula, S.; Wang, L.; Poyet, J.-L.; Geddes, B.; DiStefano, P. et al. (2002): CARD-8 Protein, a New CARD Family Member that Regulates Caspase-1 Activation and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (16), 13952–13958.
- 101 Ruzinova, M.; Benezra, R. (2003): ID Proteins in Development, Cell Cycle and Cancer. *Trends in Cell Biology* 13 (8), 410–418.
- 102 Ryan, C.; Smith, M.; Bono, J. de; Molina, A.; Logothetis, C.; Souza, P. de et al. (2013): Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer Without Previous Chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* 368 (2), 138–148.

- 103 S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2017 entspricht: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Kurzversion 4.0, 2017, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 18.02.2018).
- 104 S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2018 entspricht: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 5.0, 2018, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogrammmonkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html> (abgerufen am: 29.09.2018).
- 105 Schaeffer, E.; Marchionni, L.; Huang, Z.; Simons, B.; Blackman, A.; Yu, W. et al. (2008): Androgen-Induced Programs for Prostate Epithelial Growth and Invasion Arise in Embryogenesis and Are Reactivated in Cancer. *Oncogene* 27 (57), 7180–7191.
- 106 Schimmöller, L.; Blondin, D.; Arsov, C.; Rabenalt, R.; Albers, P.; Antoch, G.; Quentin, M. (2016): MRI-Guided In-Bore Biopsy. Differences Between Prostate Cancer Detection and Localization in Primary and Secondary Biopsy Settings. *American Journal of Roentgenology* 206 (1), 92–99.
- 107 Schmidt, Jennifer (2014): Funktionelle Charakterisierung von PITX2 im Prostatakarzinom. Düsseldorf, Univ., Diss., 2014.
- 108 Sharma, P.; Chinaranagari, S.; Patel, D.; Carey, J.; Chaudhary, J. (2012): Epigenetic Inactivation of Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) Correlates With Prostate Cancer. *Cancer Medicine* 1 (2), 176–186.
- 109 Sharma, P.; Knowell, A.; Chinaranagari, S.; Komaragiri, S.; Nagappan, P.; Patel, D. et al. (2013): ID4 Deficiency Attenuates Prostate Development and Promotes PIN-Like Lesions by Regulating Androgen Receptor Activity and Expression of NKX3.1 and PTEN. *Molecular Cancer* 12, 67.
- 110 Sharma, S. (2009): Tumor Markers in Clinical Practice. General Principles and Guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology : Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology* 30 (1), 1–8.

- 111 Shepherd, F.; Rodrigues Pereira, J.; Ciuleanu, T.; Tan, E.; Hirsh, V.; Thongprasert, S. et al. (2005): Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 353 (2), 123–132.
- 112 Sobel, R.; Sadar, M. (2005a): Cell Lines Used in Prostate Cancer Research. A Compendium of Old and New Lines--Part 1. *The Journal of Urology* 173 (2), 342–359.
- 113 Sobel, R.; Sadar, M. (2005b): Cell Lines Used in Prostate Cancer Research. A Compendium of Old and New Lines--Part 2. *The Journal of Urology* 173 (2), 360–372.
- 114 Sobel, R.; Wang, Y.; Sadar, M. (2006): Molecular Analysis and Characterization of PrEC, Commercially Available Prostate Epithelial Cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 42 (1-2), 33–39.
- 115 Sramkoski, R.; Pretlow, T.; Giaconia, J.; Pretlow, T.; Schwartz, S.; Sy, M. et al. (1999): A New Human Prostate Carcinoma Cell Line, 22Rv1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 35 (7), 403–409.
- 116 Stone, K.; Mickey, D.; Wunderli, H.; Mickey, G.; Paulson, D. (1978): Isolation of a Human Prostate Carcinoma Cell Line (DU 145). *International Journal of Cancer* 21 (3), 274–281.
- 117 Strand, S.; Orntoft, T.; Sorensen, K. (2014): Prognostic DNA Methylation Markers for Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (9), 16544–16576.
- 118 Stresemann, C.; Lyko, F. (2008): Modes of Action of the DNA Methyltransferase Inhibitors Azacytidine and Decitabine. *International Journal of Cancer* 123 (1), 8–13.
- 119 Strichman-Almashanu, L.; Lee, R.; Onyango, P.; Perlman, E.; Flam, F.; Frieman, M.; Feinberg, A. (2002): A Genome-Wide Screen for Normally Methylated Human CpG Islands that can Identify Novel Imprinted Genes. *Genome Research* 12 (4), 543–554.
- 120 Su, J.-L.; Yang, C.-Y.; Shih, J.-Y.; Wei, L.-H.; Hsieh, C.-Y.; Jeng, Y.-M. et al. (2006): Knockdown of Contactin-1 Expression Suppresses Invasion and Metastasis of Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research* 66 (5), 2553–2561.
- 121 Suchiman, H.; Sliker, R.; Kremer, D.; Slagboom, P.; Heijmans, B.; Tobi, E. (2015): Design, Measurement and Processing of Region-Specific DNA Methylation Assays. The Mass Spectrometry-Based Method EpiTYPER. *Frontiers in Genetics* 6, 287.

- 122 Tan, M.; Li, J.; Xu, H.; Melcher, K.; Yong, E.-I. (2015): Androgen Receptor. Structure, Role in Prostate Cancer and Drug Discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 36 (1), 3–23.
- 123 Tierling, S.; Schumacher, D.; Walter, J. (2011): Entwicklung epigenetischer Diagnostik in soliden Tumoren. *Onkologie* 17 (6), 495–502.
- 124 Tokuzawa, Y.; Yagi, K.; Yamashita, Y.; Nakachi, Y.; Nikaido, I.; Bono, H. et al. (2010): ID4, a New Candidate Gene for Senile Osteoporosis, Acts as a Molecular Switch Promoting Osteoblast Differentiation. *PLoS genetics* 6 (7), e1001019.
- 125 Tomlins, S.; Bjartell, A.; Chinnaiyan, A.; Jenster, G.; Nam, R.; Rubin, M.; Schalken, J. (2009): ETS Gene Fusions in Prostate Cancer. From Discovery to Daily Clinical Practice. *European Urology* 56 (2), 275–286.
- 126 Tost, J.; Gut, I. (2007): DNA Methylation Analysis by Pyrosequencing. *Nature Protocols* 2 (9), 2265–2275.
- 127 Uhl, B.; Gevensleben, H.; Tolkach, Y.; Sailer, V.; Majores, M.; Jung, M. et al. (2017): PITX2 DNA Methylation as Biomarker for Individualized Risk Assessment of Prostate Cancer in Core Biopsies. *The Journal of Molecular Diagnostics* 19 (1), 107–114.
- 128 van Neste, L.; Hendriks, R.; Dijkstra, S.; Trooskens, G.; Cornel, E.; Jannink, S. et al. (2016): Detection of High-Grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *European Urology* 70 (5), 740–748.
- 129 van Neste, L.; Herman, J.; Otto, G.; Bigley, J.; Epstein, J.; van Criekinge, W. (2012): The Epigenetic Promise for Prostate Cancer Diagnosis. *Prostate* 72 (11), 1248–1261.
- 130 Vanaja, D.; Ehrich, M.; Van den Boom, Dirk; Cheville, J.; Karnes, R.; Tindall, D. et al. (2009): Hypermethylation of Genes for Diagnosis and Risk Stratification of Prostate Cancer. *Cancer Investigation* 27 (5), 549–560.
- 131 Vela, I.; Morrissey, C.; Zhang, X.; Chen, S.; Corey, E.; Stratton, G. et al. (2014): PITX2 and Non-Canonical Wnt Pathway Interaction in Metastatic Prostate Cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 31 (2), 199–211.
- 132 Veraksa, A.; Del Campo, M.; McGinnis, W. (2000): Developmental Patterning Genes and Their Conserved Functions: From Model Organisms to Humans. *Molecular Genetics and Metabolism* 69 (2), 85–100.

- 133 Vinarskaja, A.; Goering, W.; Ingenwerth, M.; Schulz, W. (2012): ID4 Is Frequently Downregulated and Partially Hypermethylated in Prostate Cancer. *World Journal of Urology* 30 (3), 319–325.
- 134 Vinarskaja, A.; Schulz, W.; Ingenwerth, M.; Hader, C.; Arsov, C. (2013): Association of PITX2 mRNA Down-Regulation in Prostate Cancer with Promoter Hypermethylation and Poor Prognosis. *Urologic Oncology* 31 (5), 622–627.
- 135 Vinarskaja, A.; Yamanaka, M.; Ingenwerth, M.; Schulz, W. (2011): DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer. *Cancers* 3 (4), 3714–3725.
- 136 Viré, E.; Brenner, C.; Deplus, R.; Blanchon, L.; Fraga, M.; Didelot, C. et al. (2006): The Polycomb Group Protein EZH2 Directly Controls DNA Methylation. *Nature* 439 (7078), 871–874.
- 137 Wang, D.; Garcia-Bassets, I.; Benner, C.; Li, W.; Su, X.; Zhou, Y. et al. (2011): Reprogramming Transcription by Distinct Classes of Enhancers Functionally Defined by eRNA. *Nature* 474 (7351), 390–394.
- 138 Wang, G.; Di Zhao; Spring, D.; DePinho, R. (2018): Genetics and Biology of Prostate Cancer. *Genes & Development* 32 (17-18), 1105–1140.
- 139 Wei, J.; Calhoun, E.; Jacobsen, S. (2005): Urologic Diseases in America Project. Benign Prostatic Hyperplasia. *The Journal of Urology* 173 (4), 1256–1261.
- 140 Wei, Q.; Adelstein, R. (2002): PITX2a Expression Alters Actin-Myosin Cytoskeleton and Migration of HeLa Cells Through Rho GTPase Signaling. *Molecular Biology of the Cell* 13 (2), 683–697.
- 141 Weiss, G.; Cottrell, S.; Distler, J.; Schatz, P.; Kristiansen, G.; Ittmann, M. et al. (2009): DNA Methylation of the PITX2 Gene Promoter Region is a Strong Independent Prognostic Marker of Biochemical Recurrence in Patients with Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. *The Journal of Urology* 181 (4), 1678–1685.
- 142 Welch, P.; Lee, M.; Gonzalez-Hernandez, R.; Black, D.; Mahadevappa, M.; Swisher, E. et al. (2002): BRCA1 Transcriptionally Regulates Genes Involved in Breast Tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11), 7560–7565.

- 143 Willert, K.; Nusse, R. (2012): Wnt Proteins. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4 (9), a007864.
- 144 Wissmann, C.; Wild, P.; Kaiser, S.; Roepcke, S.; Stoehr, R.; Woenckhaus, M. et al. (2003): WIF1, a Component of the Wnt Pathway, is Down-Regulated in Prostate, Breast, Lung, and Bladder Cancer. The Journal of Pathology 201 (2), 204–212.
- 145 Wittekind, Christian; Meyer, Hans-Joachim (Eds.) (2013): TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 7., Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.
- 146 Yan, J.; Ojo, D.; Kapoor, A.; Lin, X.; Pinthus, J.; Aziz, T. et al. (2016): Neural Cell Adhesion Protein CNTN1 Promotes the Metastatic Progression of Prostate Cancer. Cancer Research 76 (6), 1603–1614.
- 147 Yan, J.; Wong, N.; Hung, C.; Chen, W.; Tang, D. (2013): Contactin-1 Reduces E-Cadherin Expression via Activating AKT in Lung Cancer. PloS one 8 (5), e65463.
- 148 Yee, D.; Tang, Y.; Li, X.; Liu, Z.; Guo, Y.; Ghaffar, S. et al. (2010): The Wnt Inhibitory Factor 1 Restoration in Prostate Cancer Cells Was Associated with Reduced Tumor Growth, Decreased Capacity of Cell Migration and Invasion and a Reversal of Epithelial to Mesenchymal Transition. Molecular Cancer 9, 162.
- 149 Yoshimoto, M.; Joshua, A.; Cunha, I.; Coudry, R.; Fonseca, F.; Ludkovski, O. et al. (2008): Absence of TMPRSS2:ERG Fusions and PTEN Losses in Prostate Cancer is Associated with a Favorable Outcome. Modern Pathology 21 (12), 1451–1460.
- 150 Yu, J.; Yu, J.; Mani, R.-S.; Cao, Q.; Brenner, C.; Cao, X. et al. (2010): An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. Cancer Cell 17 (5), 443–454.
- 151 Yuen, H.-F.; Chua, C.-W.; Chan, Y.-P.; Wong, Y.-C.; Wang, X.; Chan, K.-W. (2006): ID Proteins Expression in Prostate Cancer: High-Level Expression of ID-4 in Primary Prostate Cancer is Associated with Development of Metastases. Modern Pathology 19 (7), 931–941.
- 152 Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (2017): Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten, verfügbare Diagnosejahre bis 2014. Version: Epi2016\_1 (abgerufen am: 21.02.2019).

153 Zenzmaier, C.; Untergasser, G.; Hermann, M.; Dirnhofer, S.; Sampson, N.; Berger, P. (2008): Dysregulation of DKK-3 Expression in Benign and Malignant Prostatic Tissue. *The Prostate* 68 (5), 540–547.

## **Danksagung**

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“  
Johann Wolfgang von Goethe

Doch ich versuche es trotzdem.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Professor Wolfgang Schulz – von ganzem Herzen! Er war jederzeit zur Stelle, half bei den kleinen wie auch großen Dingen und hat mich über all die Jahre mit Engelsgeduld außerordentlich unterstützt.

Ich danke auch allen Wegbereitern und Mitstreitern aus dem urologischen Forschungslabor für Engagement, Geduld, Rat und Tat. Besonders zu nennen sind Christiane Hader, Wolfgang Göring, Michèle Hoffmann, Teodora Ribarska, Anne Koch, Judith Knievel, Marc Ingenwerth, Günther Niegisch und Christian Arsov.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich sowohl fachlich wie auch persönlich gestützt haben. Auch ihre Motivation und Geduld waren außergewöhnlich und erstreckten sich weit über das Projekt Doktorarbeit hinaus.

Alexander Tischler bin ich für so viel positive Bestärkung und Unterstützung dankbar.

## **ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate cancer**

Anna Vinarskaja · Wolfgang Goering ·  
Marc Ingenwerth · Wolfgang A. Schulz

Received: 7 July 2011 / Accepted: 12 August 2011 / Published online: 1 September 2011  
© Springer-Verlag 2011

### **Abstract**

**Purpose** The candidate tumor suppressor ID4 is downregulated in various cancers by DNA hypermethylation. We have performed the first systematic analysis of ID4 expression and methylation in prostate cancer.

**Methods** ID4 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR in 47 carcinoma and 13 benign prostatic tissues obtained by prostatectomy. Methylation was analyzed in an extended series of samples by methylation-specific MS-PCR and pyrosequencing, controlled by bisulfite sequencing.

**Results** ID4 expression was significantly decreased in prostate cancers, especially in cases with adverse clinical and histopathological features and earlier recurrence. Hypermethylation in carcinomas was detected by MS-PCR and pyrosequencing, but the results of the two techniques were not fully concordant. The difference was created by generally partial and heterogeneous methylation. Weak methylation was also detected in benign prostatic tissue samples.

**Conclusions** ID4 downregulation may contribute to prostate cancer pathogenesis and is often accompanied by DNA hypermethylation. The case of ID4 illustrates

exemplarily the limits and pitfalls of techniques for the detection of methylation changes in prostate cancer tissues.

**Keywords** DNA methylation · Tumor suppressor · Methylation biomarkers · Prostate cancer prognosis

### **Introduction**

In many cancers, epigenetic alterations contribute to dysregulation of cell proliferation and differentiation. For instance, DNA hypermethylation at gene promoters is often associated with transcriptional silencing. Since it often affects CpG islands never methylated in normal tissues, this epigenetic alteration is particularly well suited as a biomarker [1].

Prostate cancers harbor multiple epigenetic changes in addition to point mutations, gene rearrangements and chromosomal aberrations [2]. Several genes, including *GSTP1*, *APC*, *RASSF1A* and *RARB2*, are regularly hypermethylated. Assays for hypermethylation at these genes can therefore detect prostate cancer cells in biopsies and body fluids with high sensitivity and specificity [3, 4]. Many other genes are aberrantly hypermethylated in subsets of the cases. Such methylation events, singly or in appropriate combinations, may provide prognostic or predictive markers.

A difficulty in DNA methylation diagnostics is heterogeneity of methylation at individual genes, with partial methylation varying between individual tumor cells [5]. Heterogeneous DNA methylation is best revealed by bisulfite sequencing of multiple individual alleles. Currently, this gold-standard technique is however too cumbersome and costly for multiple clinical samples. Most studies have therefore used cheaper and more convenient

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00345-011-0750-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

A. Vinarskaja · W. Goering · M. Ingenwerth ·  
W. A. Schulz (✉)  
Department of Urology, Heinrich Heine University,  
Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany  
e-mail: wolfgang.schulz@uni-duesseldorf.de

techniques, especially methylation-specific PCR. This ingenious technique employs primers designed to fit either methylated or unmethylated sequences after bisulfite treatment, which converts cytosine to uracil, whereas methylcytosine does not react. A recently emerged alternative is bisulfite pyrosequencing, which allows a quantitative estimate of methylation at each individual CpG site across a short stretch of DNA, averaging across all available alleles [6]. It is therefore more representative than traditional bisulfite sequencing but does not reveal the patterns in individual copies of the analyzed sequence.

We have investigated hypermethylation and expression of *ID4* in prostate cancer tissues and cell lines. *ID4* is one of four members of the inhibitor of differentiation family, which are small proteins capable of interacting with and blocking the activation function of various transcription factors. They modulate cell proliferation and differentiation during development and tissue homeostasis [7, 8]. In particular, ID proteins often form inactive dimers with transcription factors inducing terminal differentiation, thereby maintaining cells in a precursor state. Accordingly, overexpression of ID proteins in various human cancers promotes cell proliferation, invasiveness and angiogenesis and blocks differentiation [7, 8].

*ID4* deviates from this general pattern [9]. Although *ID4* is overexpressed in certain cancers, including urothelial carcinomas [10], the gene is downregulated and its promoter is often hypermethylated in other cancers, including leukemias, colorectal, esophageal, mammary and gastric carcinomas [11–16].

In prostate cancer, the best-studied family member *ID1* has been reported to be upregulated and to promote proliferation and survival of prostate cancer cells in vitro [17, 18] although in cancer tissues upregulation may predominantly occur in endothelial cells [19]. An immunohistochemical study reported upregulation of *ID1* and *ID2* but generally decreased expression of *ID4* protein [20]. Somewhat paradoxically, cancers retaining nuclear *ID4* staining were significantly more metastatic. The *ID4* gene promoter was found to be hypermethylated and the gene silenced in Du145 prostate cancer cells. Reexpression of *ID4* led to cell cycle arrest and apoptosis, presumably mediated by p21<sup>CIP1</sup> and p27<sup>KIP1</sup> [21]. While these data suggest that *ID4* functions as a tumor suppressor in prostate cancer, no comprehensive investigation into *ID4* mRNA expression and methylation in prostate cancer has been published to date.

Here, we report that *ID4* mRNA expression is commonly downregulated in prostate cancers. In addition, *ID4* promoter hypermethylation occurs quite frequently in prostate cancers, but it is invariably partial and heterogeneous.

## Materials and methods

### Patients and tissue samples

High-quality RNA was prepared from 13 normal prostate tissues from cancer-carrying prostates and 47 carcinomas from patients aged 59–74 years undergoing total prostatectomy as described [22]. According to the UICC 2007 TNM classification, tumors were staged as pT2 in 20, pT3 in 25 and pT4 in 2 cases. A Gleason score of 7 was detected in 28 tumors, <7 in 13 tumors and >7 in 8 tumors. None of the patients had distant metastases, but 11 tumors had spread to local lymph nodes. High-quality DNA was available from 93 cancer tissues encompassing the specimens used for RNA analysis. Of these, 44 were staged as pT2 and 49 as pT3 or pT4. Sixteen patients had lymph node metastases, but none distant metastases. Each of the 27 carcinomas was assigned a Gleason score >7 or <7 and 39 a score of 7. Median follow-up period was 98 months. The study was approved by the ethics committee of the Heinrich Heine University medical faculty.

### Cell lines

Prostate carcinoma cell lines Du145, PC-3, LNCaP and 22Rv1 were grown in RPMI-1640 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany) with 10% fetal calf serum and antibiotics. Treatment with 2 μM 5-aza-2'-deoxycytidine was performed by daily addition over 3 days. Normal prostate epithelial cells (PrEC) were cultured as recommended by the supplier (Lonza, Verviers, Belgium).

### RNA extraction and quantitative RT-PCR

mRNA was isolated from confluent cells using the RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Two micrograms of mRNA was reverse-transcribed using SuperscriptII (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) with oligo-dT primers according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR for *ID4* and the housekeeping gene *TBP* was performed using Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with 0.4 μM of each primer [13, 30] in a ABI Prism 7900HT instrument (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with the following conditions: activation at 95°C for 15 min followed by cycles of denaturation at 94°C for 15 s, amplification at 61°C for 30 s, elongation at 72°C for 30 s and measuring at 88°C for 15 s. The quality of the amplification was assured by a melting curve at 95, 60 and 99°C for 15 s each. Duplicate measurements gave <10% difference.

### DNA extraction and methylation analyses

High-quality DNA was extracted as described [30]. The EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA) was

used for bisulfite conversion. PCRs were performed in a 50- $\mu$ l reaction mixture consisting of 1 $\times$  buffer, 150  $\mu$ M dNTPs, 15 pmol of each primer, 1 U Hotstar Taq polymerase, water and 2  $\mu$ l bisulfite-converted DNA each. The following program was used: initial Taq activation at 94°C for 15 min, followed by denaturation at 95°C for 30 s, annealing for 30 s, elongation at 72°C for 45 s, with a final elongation for 10 min. For methylation-specific PCR, amplification was performed for 37 cycles with annealing at 58°C, for bisulfite sequencing, PCR was conducted for 37 cycles at 57°C annealing, and for pyrosequencing, with 45 cycles at 60°C annealing. PCR products were examined by agarose gel electrophoresis. For bisulfite sequencing, PCR products were cloned into the *E. coli* TOPO 10 vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Individual clones were sequenced using standard methods. Pyrosequencing for 8 CpG sites in the promoter region was performed on a PyroMark Q24 instrument (Qiagen) with a protocol

generated by the manufacturer's software. Primer sequences are compiled in supplementary table 1.

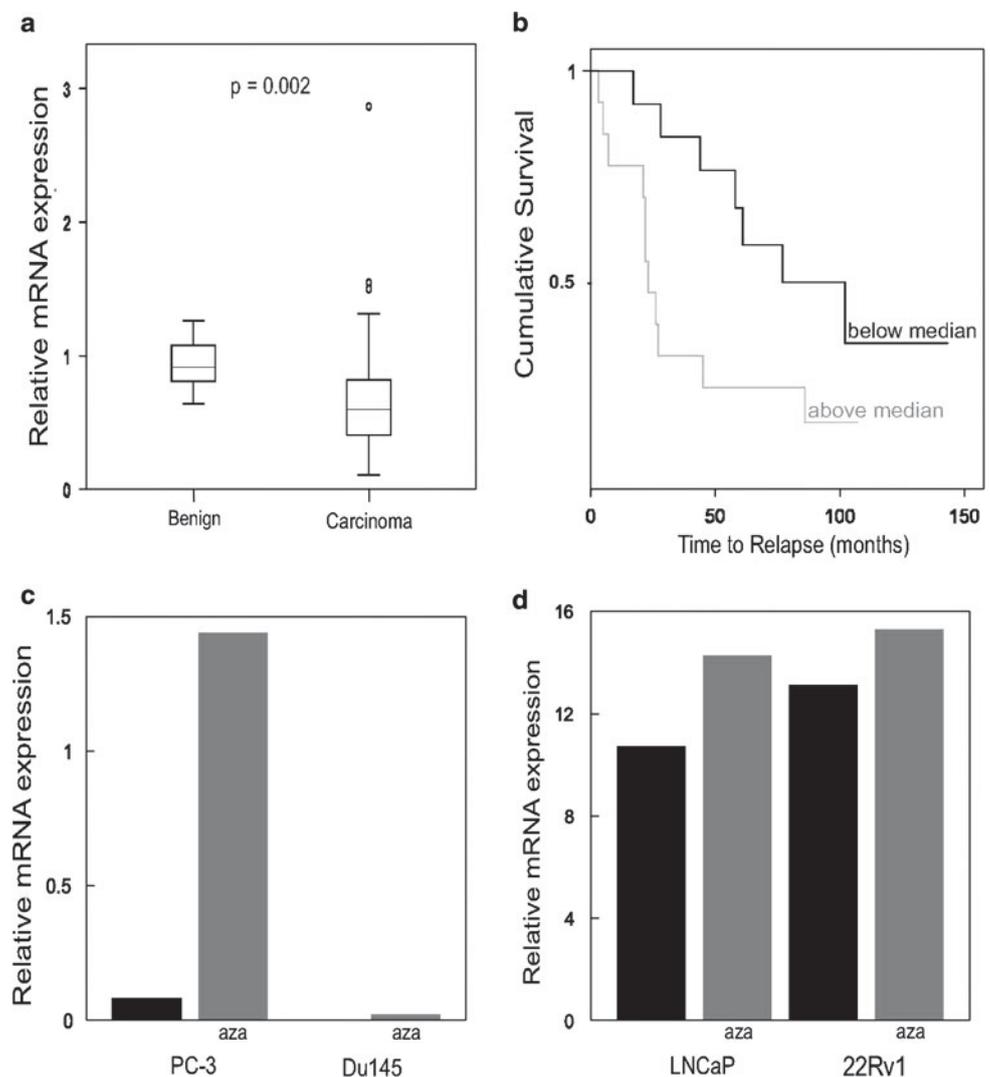
#### Statistical methods

Statistical calculations were performed using SPSS 19.0.

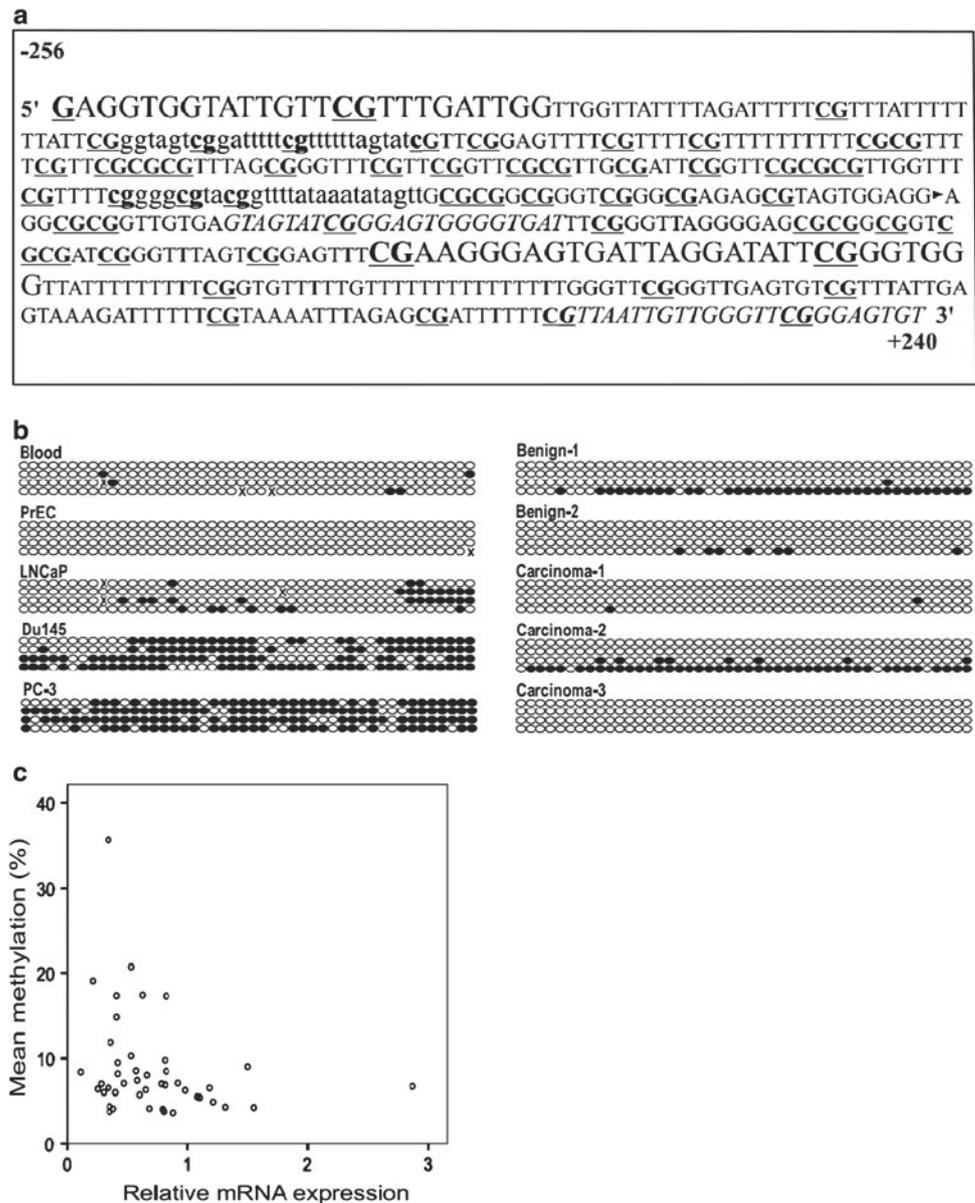
#### Results

A highly significant (Mann–Whitney U  $P = 0.002$ ) decrease in ID4 mRNA expression was observed by quantitative RT-PCR in prostate cancer tissues compared to benign tissues (Fig. 1a). Cases with Gleason grades <7 had significantly higher expression ( $P = 0.045$ ). Higher stage (>pT2) and lymph-node-positive cases tended toward lower expression, but the difference was not statistically significant. Biochemical recurrence occurred earlier in patients

**Fig. 1** ID4 expression in prostate cancer tissues and cell lines. **a** ID4 mRNA expression in tissue samples: ID4 expression measured by quantitative real-time PCR in relation to TBP in carcinoma tissues compared to benign tissues from prostatectomy specimens. The  $P$  value was derived by Mann–Whitney U test. **b** Relationship of ID4 expression to biochemical relapse in prostate cancer patients according to Kaplan–Meier analysis; *top curve*: above median expression; *bottom curve*: below median expression. log-rank  $P = 0.160$ . **c** Expression of ID4 mRNA in prostate cancer cell lines according to quantitative real-time PCR relative to TBP and effect of treatment with 2  $\mu$ M 5-aza-deoxycytidine (Aza) for 3 days. **d** Controls are indicated by *black bars*, Aza-treated cells by *gray bars*. Note the different scale in the *right panel*



**Fig. 2** Analysis of *ID4* promoter DNA methylation in prostate cancer tissues and cell lines. **a** Nucleotide sequence around the transcription start site (arrowhead) of the *ID4* gene. CpGs are *underlined*. Location of the primers used is coded as follows. *Large-font letters*: bisulfite sequencing primers, *lower-case letters*: MS-PCR primers, *italics*: pyrosequencing primers. **b** Bisulfite sequencing results from tissue samples and cell lines. Each *line* represents one cloned allele, each *circle* one CpG dinucleotide. *Open circles* symbolize unmethylated and *filled circles* methylated CpG sites. **c** Relation of *ID4* methylation according to pyrosequencing (mean values) and mRNA expression in prostate cancer tissues. Note low expression in samples with the highest methylation and vice versa



with below median *ID4* mRNA expression, although the difference did not become significant (Fig. 1b).

As reported previously [21], the prostate carcinoma cell line Du145 expressed almost undetectable levels of *ID4* mRNA (Fig. 1c). Likewise, the PC-3 carcinoma cell line displayed very low levels of *ID4* mRNA, whereas the two androgen-responsive cell lines LNCaP and 22Rv1 expressed the gene at comparable levels to the bladder cancer cell line HT1376, used as a positive control in all our experiments because of its well-characterized expression [13]. In the Du145 and PC-3 cell lines, *ID4* expression was reinduced by treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-deoxycytidine (Fig. 1c).

Methylation of *ID4* was initially analyzed in cell lines and tissues by methylation-specific PCR using normal

leukocytes and PC-3 cells as negative and positive controls, respectively. As expected, Du145 was strongly positive in MS-PCR, whereas LNCaP cells revealed a weak signal with primers for methylated DNA. Out of 93 prostate carcinoma tissues, 35 (38%) specimens displayed methylation. In addition, 10/20 benign tissues from cancer-carrying prostates analyzed by MS-PCR were weakly positive for *ID4* hypermethylation.

In order to more clearly define the methylation patterns in the *ID4* promoter region (Fig. 2a), selected samples were analyzed by bisulfite sequencing. This technique revealed intense, albeit incomplete hypermethylation in PC-3 as well as Du145 cells (Fig. 2b). Hypermethylation was also detectable in LNCaP cells despite the substantial expression of the gene. In contrast, DNA from blood and

normal urothelial cells was completely unmethylated. Benign and cancer tissues selected to represent positive and negative results in MS-PCR showed heterogeneous methylation patterns with many alleles entirely free of methylation as well as some alleles with partial or nearly complete methylation (Fig. 2b). The results of this investigation correlated poorly with those of the MS-PCR.

Next, we repeated the methylation analysis with a pyrosequencing assay quantifying methylation individually at 8 CpG sites in the promoter region (see Fig. 2a). Methylation at the individual sites correlated well with each other in individual samples. Typically, the sites 6–8 were more strongly methylated than sites 1–5 in cancerous as well as benign tissues. Methylation averaged across all sites was  $9.0 \pm 7.0\%$  (range 2.7–52.0%) in cancers and  $7.7 \pm 1.7\%$  (range 5.4–10.0%) in benign tissues. At each individual site too, mean methylation was slightly higher in tumor tissues than in benign tissues. While methylation across all samples was therefore not significantly different ( $P = 0.195$ ), it was clearly elevated in a subset of the cancer samples, but in none reached a dense pattern (maximum 52% methylation). The subset of cancers with elevated methylation did not differ significantly from the others with respect to clinical parameters, i.e. tumor stage, Gleason grading or recurrence.

The results obtained by pyrosequencing and MS-PCR were best concordant in the samples with the highest and the lowest methylation, but many discrepant results were obtained in samples with moderately increased methylation, as measured by pyrosequencing. As a consequence, median methylation by pyrosequencing was 11.6% in samples identified as hypermethylated by MS-PCR as compared to 7.4% in samples identified as unmethylated by MS-PCR ( $P < 0.05$ ).

Finally, we investigated the relationship between hypermethylation, as measured by pyrosequencing, and *ID4* expression in the carcinoma samples (Fig. 2c). While samples with the highest methylation levels displayed low expression and samples with the highest expression had low methylation, expression and methylation were not correlated in the bulk of the carcinoma specimens with low or moderate methylation levels.

## Discussion

We have performed the first study of mRNA expression and *ID4* hypermethylation in prostate cancer tissues. Our data on mRNA expression accord with the results from the earlier immunohistochemical study [20] in that *ID4* mRNA was decreased in a majority of prostate cancers compared to benign prostate tissues. In our study, downregulation tended to be more pronounced at higher stages and to be

associated with worse clinical course. A former study [20] reported increased nuclear expression of *ID4* in tumors with high Gleason grade. Obviously, our analysis at the RNA level would not detect such differences. Since in our hands commercially available antibodies to *ID4* detected prominent additional bands on Western blots (data not shown), we desisted from analyzing protein expression. In cell lines, expression was higher in androgen-dependent cell lines and silenced in the poorly differentiated PC-3 and Du145 cell lines, in keeping with a previous analysis of *ID* gene expression in prostate cancer cell lines [23]. Taken together, these studies might indicate that *ID4* downregulation is frequent in prostate cancer and associated with a more aggressive course of the disease. Moreover, previous studies in cell lines [21, 23] suggest a function of *ID4* in antagonizing prostate cancer progression.

We confirmed hypermethylation of the *ID4* promoter in the Du145 cell line [21] and detected hypermethylation in further carcinoma cell lines, especially PC-3. The functional relevance of hypermethylation in these cells was proven by reexpression of *ID4* following treatment with a DNA methylation inhibitor. We observed *ID4* hypermethylation in many prostate cancer tissues, too, although not to the degree seen in Du145 and PC-3. Limited hypermethylation most likely accounts for the lack of correlation between *ID4* mRNA expression and promoter hypermethylation in the tissues. Moreover, *ID4* downregulation was more frequent than hypermethylation in carcinomas, compared to levels in benign tissues. In keeping with current concepts of epigenetic gene inactivation in cancer [24], these observations suggest a vicious cycle in which *ID4* downregulation is followed by increased methylation, which in some cases causes further repression with eventual transcriptional silencing. These latter cases would be represented by cell lines like Du145 and PC-3.

Our study raises general issues on DNA hypermethylation relevant for the development of methylation-based biomarkers in prostate cancer. Firstly, our analysis by several techniques revealed that *ID4* hypermethylation in prostate cancers is invariably partial and heterogeneous. Such heterogeneity can confound qualitative techniques such as MS-PCR used in many older studies (including our own) [5, 6]. In our analysis, MS-PCR correctly indicated that *ID4* is hypermethylated in carcinomas and that some hypermethylation may be present in benign tissues. However, the results on individual samples were not concordant with those from bisulfite sequencing of cloned PCR products and pyrosequencing, except at the highest and lowest levels. Notably, only few previous studies on *ID4* hypermethylation in cancers have used quantitative methylation assays or ascertained the homogeneity of methylation. It is therefore difficult to decide whether heterogeneous methylation at *ID4* is specific to prostate cancer. A quantitative

study revealed *ID4* promoter methylation of around 40% in CLL with heterogeneity among individual CpG sites [12]. Given that additional example, quantitative techniques interrogating several CpG sites seem generally advisable for studying *ID4* hypermethylation.

Secondly, all three techniques used in our study identified weak *ID4* methylation in benign prostatic tissues. Most likely, this observation may reflect an epigenetic field effect changing methylation [25, 26], imprinting [27] and expression [28, 29] of certain genes in cancer-carrying prostates. This field change could reflect morphologically inconspicuous tumor cells, changes in normal cells elicited by factors emanating from the actual cancer or a preneoplastic stage pervading the aging organ [30]. If the field changes should reflect a generalized preneoplastic stage, it would complicate the clinical application of DNA methylation assays for distinguishing carcinomas. If it is secondary to the carcinoma, altered methylation in morphologically normal biopsies would be useful to indicate the presence of a cancer in the same organ. In the latter case, *ID4* methylation in benign tissues, detected by appropriate quantitative techniques, may still serve as a diagnostic marker.

**Acknowledgments** We thank our laboratory members Christiane Hader, Teodora Ribarska and Dr. Christian Arsov as well as Prof. Rainer Engers for histopathological evaluation. We gratefully acknowledge financial support by the Deutsche Krebshilfe and Deutsche Forschungsgemeinschaft.

**Conflict of interest** None of the authors has to declare a conflict of interest.

## References

- Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3:253–266
- Schulz WA, Hoffmann MJ (2009) Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 19:172–180
- Hoque MO (2009) DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn* 9:243–257
- Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, Model F, Day JK, Liebenberg V, Morotti A, Yamamura S, Lograsso J, Sledziewski A, Semjonow A (2009) DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate* 69:1257–1269
- Candiloro IL, Mikeska T, Dobrovic A (2011) Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation. *Epigenetics* 6:500–507
- Shames DS, Minna JD, Gazdar AF (2007) Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett* 251:187–198
- Lasorella A, Uo T, Iavarone A (2001) Id proteins at the crossroad of development and cancer. *Oncogene* 20:8326–8333
- Zebedee Z, Hara E (2001) Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* 20:8317–8325
- Dell’Orso S, Ganci F, Strano S, Blandino G, Fontemaggi G (2010) ID4: a new player in the cancer arena. *Oncotarget* 1:48–58
- Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA (2005) Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. *Mol Cancer* 4:16
- Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY (2003) Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 22:6946–6953
- Chen SS, Claus R, Lucas DM, Yu L, Qian J, Ruppert AS, West DA, Williams KE, Johnson AJ, Sablitzky F, Plass C, Byrd JC (2011) Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL. *Blood* 117:862–871
- Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E (2008) Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer* 8:154
- Smith E, De Young NJ, Pavey SJ, Hayward NK, Nancarrow DJ, Whiteman DC, Smithers BM, Ruzsiewicz AR, Clouston AD, Gotley DC, Devitt PG, Jamieson GG, Drew PA (2008) Similarity of aberrant DNA methylation in Barrett’s esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 7:75
- Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS (2004) Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* 10:7475–7483
- Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW (2010) ID4 methylation predicts high risk of leukemic transformation in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 34:598–604
- Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, Bennington JL, Desprez PY (2004) Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 10:2044–2051
- Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Xu K, Tsao SW, Wong YC (2003) Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* 22:4498–4508
- Perk J, Gil-Bazo I, Chin Y, de Candia P, Chen JJ, Zhao Y, Chao S, Cheong W, Ke Y, Al-Ahmadie H, Gerald WL, Brogi E, Benezra R (2006) Reassessment of ID1 protein expression in human mammary, prostate, and bladder cancers using a monospecific rabbit monoclonal anti-ID1 antibody. *Cancer Res* 66:10870–10877
- Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW (2006) Id proteins expression in prostate cancer: high-level expression of Id-4 in primary prostate cancer is associated with development of metastases. *Mod Pathol* 19:931–941
- Carey JP, Asirvatham AJ, Galm O, Ghogomu TA, Chaudhary J (2009) Inhibitor of differentiation 4 (Id4) is a potential tumor suppressor in prostate cancer. *BMC Cancer* 9:173
- Schulz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamana M, Fritzsche S, Wlazlinski A, Müller M, Lengauer T, Engers R, Florl AR, Wullich B, Rahnenführer J (2007) Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer* 6:14
- Asirvatham AJ, Schmidt MA, Chaudhary J (2006) Non-redundant inhibitor of differentiation (Id) gene expression and function in human prostate epithelial cells. *Prostate* 66:921–935
- McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM (2009) Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* 15:3927–3937
- Mehrotra J, Varde S, Wang H, Chiu H, Vargo J, Gray K, Nagle RB, Neri JR, Mazumder A (2008) Quantitative, spatial resolution

- of the epigenetic field effect in prostate cancer. *Prostate* 68: 152–160
26. Steiner I, Jung K, Schatz P, Horns T, Wittschieber D, Lein M, Dietel M, Erbersdobler A (2010) Gene promoter methylation and its potential relevance in early prostate cancer diagnosis. *Pathobiology* 77:260–266
  27. Bhusari S, Yang B, Kueck J, Huang W, Jarrard DF (2011) Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer. *Prostate* (in press)
  28. Haaland CM, Heaphy CM, Butler KS, Fischer EG, Griffith JK, Bisoffi M (2009) Differential gene expression in tumor adjacent histologically normal prostatic tissue indicates field cancerization. *Int J Oncol* 35:537–546
  29. Hornstein M, Hoffmann MJ, Alexa A, Yamanaka M, Müller M, Jung V, Rahnenführer J, Schulz WA (2008) Protein phosphatase and TRAIL receptor genes as new candidate tumor genes on chromosome 8p in prostate cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 5:123–136
  30. Nonn L, Ananthanarayanan V, Gann PH (2009) Evidence for field cancerization of the prostate. *Prostate* 69:1470–1479

Original article

# Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis<sup>☆</sup>

Anna Vinarskaja, Wolfgang A. Schulz, Ph.D.,  
Marc Ingenwerth, Christiane Hader, Christian Arsov, M.D.\*

Department of Urology, Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany

Received 25 January 2011; received in revised form 30 March 2011; accepted 24 April 2011

## Abstract

**Background:** Hypermethylation of the *PITX2* (paired-like homeodomain transcription factor 2) gene promoter is strongly associated with recurrence after radical prostatectomy. We hypothesized that *PITX2* hypermethylation leads to *PITX2* silencing and that decreased *PITX2* expression is likewise associated with poor prognosis in prostate cancers. Moreover, it is unknown so far how *PITX2* hypermethylation relates to other molecular changes in prostate cancer, such as *ERG* oncogenic activation in about half of all cases.

**Objective:** To investigate how *PITX2* expression and methylation are related, whether biochemical recurrence after radical prostatectomy can be predicted by *PITX2* mRNA levels, and how changes in *PITX2* relate to *ERG* overexpression.

**Material and methods:** We measured *PITX2* and *ERG* expression in 45 cancerous and 13 benign tissues from patients undergoing radical prostatectomy (age range: 59–74 years). Methylation of the *PITX2* gene was analyzed in an extended series of 93 cancers. Follow-up was performed for all patients for a 98-month median period. Additionally, expression and methylation changes of *PITX2* were investigated in prostate carcinoma cell lines. Gene expression and methylation were determined by quantitative RT-PCR and methylation-specific PCR, respectively. Biochemical recurrence defined as a total PSA of >0.2 ng/ml on 2 consecutive tests was considered as the surrogate endpoint for survival analysis.

**Results :** *PITX2* expression was significantly and strongly decreased in prostate cancer compared to benign tissues. Cases with decreased *PITX2* experienced significantly earlier biochemical recurrences. *PITX2* down-regulation was associated with *PITX2* promoter hypermethylation in tumor samples and cell lines. *PITX2* hypermethylation was more pronounced in cases with *ERG* overexpression.

**Conclusions :** *PITX2* down-regulation is associated with promoter hypermethylation and is a good predictor of clinical outcomes after radical prostatectomy. *PITX2* methylation might be influenced by oncogenic *ERG*. © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Prostate cancer; *PITX2* hypermethylation; *ERG*

## 1. Introduction

Since the introduction of PSA as a molecular biomarker, prostate cancers are becoming detected at earlier stages at which they can be cured by radical prostatectomy or irradiation [1]. The clinical course of prostate cancer is highly variable; a large fraction of cases would never result in symptomatic disease during the expected lifetime of the

typically elderly patients [2]. A combination of histopathologic parameters from biopsy samples, prominently Gleason grading, clinical staging, and PSA level can predict the likely course of the disease in general, but the prediction is insufficiently precise for individual patients. Given this background, there is an urgent requirement for molecular biomarkers that can be used on biopsy, blood, or urine samples to predict the natural course of the disease prior to therapeutic intervention.

Insights into the molecular pathogenesis of prostate cancer have provided a large range of candidate molecular biomarkers [3]. One major finding has been that many cases harbor chromosomal translocations that lead to the activation of oncogenic ETS family transcription factors, most commonly *ERG*. *ERG* translocations and overexpression

<sup>☆</sup> This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to W.A.S. and by a start-up grant from the Medical Faculty of the Heinrich Heine University to C.A.

\* Corresponding author. Tel.: +49 211/8108607; fax: +49 211/8118676.

E-mail address: christian.arsov@med.uni-duesseldorf.de (C. Arsov).

are found in about half of all prostate cancers and appear to portend a more aggressive course of disease in the majority of studies [4–6].

Another characteristic of prostate cancers is a high prevalence of alterations in DNA methylation. Hypermethylation of a specific set of genes, including *GSTP1*, *RARB2*, *APC*, and *RASSF1A*, is observed in almost all cases. Therefore, analysis of hypermethylation of these genes may help detecting and distinguishing prostate malignancies [7,8]. Other methylation changes, present in a smaller fraction of cases, may mark subsets with worse prognosis. For instance, hypermethylation of the *PITX2* (paired-like homeodomain transcription factor 2) promoter was reported to be associated with recurrence after radical prostatectomy and this association has been confirmed in multicenter studies [9,10]. Promoter hypermethylation usually goes in parallel with transcriptional silencing of the affected gene. Strangely, although *PITX2* hypermethylation in prostate cancer is a well-established phenomenon, it is so far unknown whether it concurs with down-regulation of gene expression and whether diminished gene expression might also be correlated to poor prognosis. Moreover, it is unknown how *PITX2* hypermethylation relates to other typical changes in prostate cancer, particularly *ERG* oncogenic activation.

With these questions in mind, we have investigated *PITX2* expression and hypermethylation in our small, but well-characterized set of prostate cancer specimens from radical prostatectomies and in prostate cancer cell lines.

## 2. Methods

### 2.1. Study population and tissue samples

High quality RNA was available from 13 benign prostate tissues and 45 cancer samples collected from patients undergoing radical prostatectomy for prostate carcinoma between 1997 and 2002 in our institution as described in a prior study [11]. TNM classification was performed according to the International Union against Cancer from 2002. Twenty cancers were staged as pT2 and 25 as pT3 and pT4. Twenty-six cancer specimens had a Gleason score of 7, 13 <7 and 6 >7. At the time of surgery, no distant metastases were detectable, but 11 patients had lymph node metastases. The patients' age ranged from 59 to 74 years. High quality DNA was available from 93 cancer tissues encompassing the specimens used for RNA analysis. Of these, 44 were staged as pT2, and 49 as pT3 or pT4. Sixteen patients had lymph node metastases, but no distant metastases were detected. Each 27 carcinomas were assigned a Gleason score >7 or <7 and 39 a score of 7. Follow-up data were available for all patients with a median follow-up time of 98 months. The study was approved by the ethics committee of the Heinrich Heine University medical faculty.

### 2.2. DNA and RNA extraction

DNA and RNA were extracted and quality-checked from identical powdered tissues as described previously [12,13]. High molecular weight genomic DNA was isolated using the blood and cell culture DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) following guanidinium/acid phenol/chloroform extraction (peqGOLD TriFast; peqLab, Erlangen, Germany). Quality of DNA and RNA was initially checked by

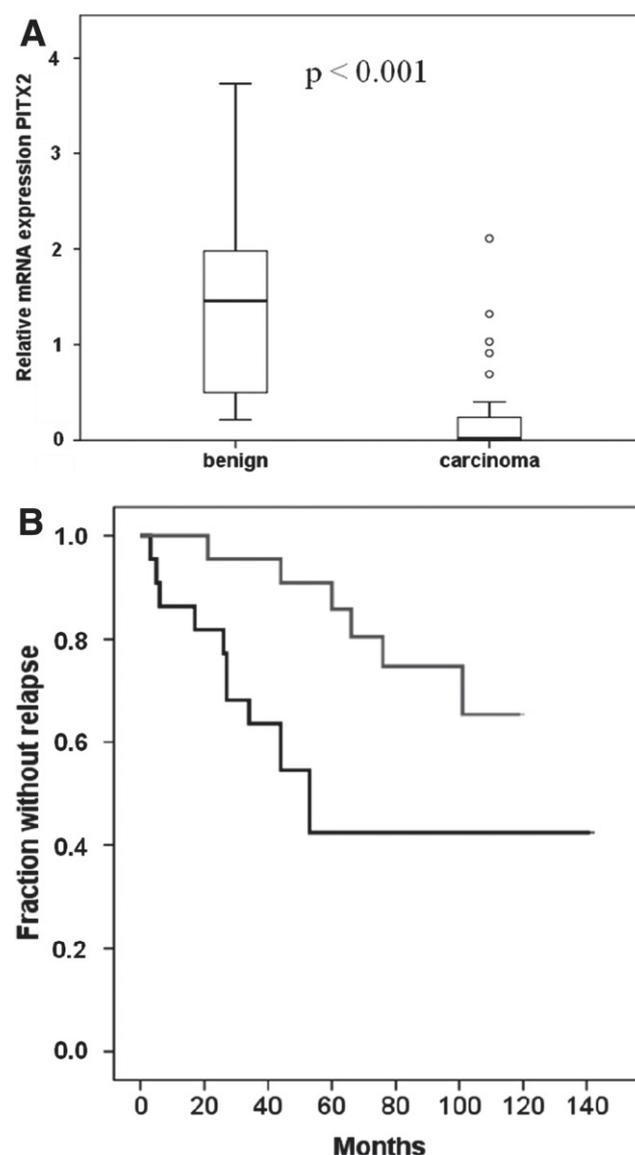


Fig. 1. Expression of *PITX2* in prostate cancer and benign tissues and its relation to clinical course of disease. (A) Expression of *PITX2* mRNA relative to TBP in benign and cancerous prostatic tissues from radical prostatectomies. Median values were 1.46 for benign tissues and 0.01 for cancer specimens. (B) Relation of *PITX2* expression to prostate cancer recurrence. The grey line represents patients with *PITX2* expression above median (0.01) showing less and later biochemical relapse than patients with expression below median embodied by the black line ( $P = 0.015$ ). Time to relapse is given in months.

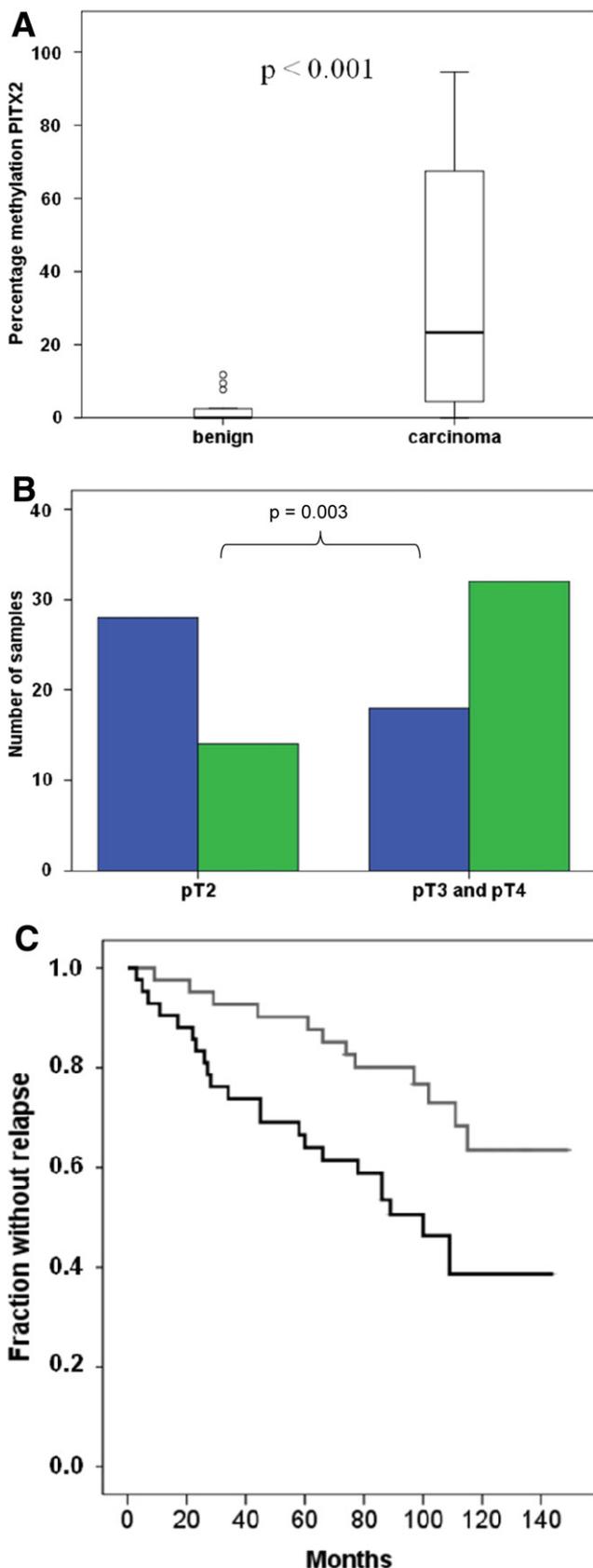


Fig. 2. Methylation of *PITX2* in prostate cancer and benign tissues and its relation to clinical course of disease. (A) Percentage methylation of *PITX2* in 93 prostate cancer and 13 benign tissues. Median values were  $<0.001\%$

spectrophotometry and subsequently by agarose gel or capillary electrophoresis, respectively. Only high quality DNA and RNA preparations were used in the present study.

### 2.3. Tumor cell lines

Prostate carcinoma cell lines 22Rv1, LNCaP, PC-3, and DU145 were cultured in RPMI-1640 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany), supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin/streptomycin. Normal human prostate epithelial cells (PrEC) were purchased from Lonza (Cologne, Germany) and were propagated in the recommended medium. The DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC; Sigma, München, Germany) was applied at a concentration of  $2 \mu\text{M}$  every 24 hours for 3 days, and  $2 \mu\text{M}$  suberoyl anilide hydroxamide (SAHA) was added for the last 2 days.

### 2.4. Quantitative RT-PCR

Following reverse transcription by SuperScript II (Invitrogen, Darmstadt, Germany), quantitative real-time RT-PCR was performed on an ABI 7900 instrument using commercially available primers and TaqMan probes specific for the respective mRNAs (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The assay for *ERG* was chosen to cover exons common to all oncogenic transcripts [14]. Each run was standardized using a dilution series of cDNA from a strongly expressing cell line or normal tissue. Experimental variation for each sample was below 10%. *TBP* was used as a reference gene.

### 2.5. DNA methylation analysis

DNA was bisulfite-treated using the EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, Freiburg, Germany). Quantitative *PITX2* methylation analysis was performed with an EpiTect MethyLight Assay (Qiagen, Germany) corresponding to the assay used by Weiss et al. [9].

### 2.6. Biochemical recurrence

The endpoint for survival analysis was defined as biochemical recurrence. Biochemical recurrence was defined as a total PSA  $> 0.2 \text{ ng/ml}$  on 2 consecutive tests.

for benign samples and 23.3% for prostate cancers. (B) Association of *PITX2* methylation with tumor stage. Blue boxes show samples with *PITX2* methylation below median (23.3%) and green boxes those with methylation above median.  $\chi^2$  analysis shows a statistically significant difference between the two groups ( $P = 0.003$ ). (C) Association between percentage *PITX2* methylation and recurrence. The grey line represents patients with *PITX2* methylation below median (23.3%) showing less and later biochemical relapse than patients with hypermethylation above median embodied by the black line ( $P = 0.007$ ). Time to relapse is given in months.

## 2.7. Statistical methods

All statistical calculations were performed with SPSS 18.0. For comparisons between groups Mann-Whitney U test was employed, correlations were evaluated by Spearman's  $\rho$ , nominal data were evaluated by  $\chi^2$  test and follow-up data by log-rank test.

## 3. Results

### 3.1. Expression of *PITX2* in prostate cancer tissues

According to qRT-PCR, *PITX2* expression was significantly and strongly decreased in prostate cancer tissues (Fig. 1A). Only 5 cancers out of 45 retained *PITX2* expression in the range of the benign tissues and expression was undetectable in many cancer specimens. Cases with loss of expression developed significantly more and earlier recurrences than those with still detectable *PITX2* expression (Fig. 1B). No significant association was observed with tumor stage or Gleason score (data not shown).

### 3.2. *PITX2* promoter hypermethylation in prostate cancer tissues

We employed the quantitative DNA methylation assay described by Weiss et al. [9] to determine the methylation status of *PITX2* in an extended tissues series. Benign samples exhibited relative methylation values between <1% and 11.7% with a median value of <0.001%. Cancer samples were significantly more strongly methylated, with a median value of 23.3% (Fig. 2A). Hypermethylation was more pronounced at higher stages (pT3 or pT4 vs. pT2) (Fig. 2B). Cases with stronger methylation developed significantly more and earlier recurrences than those with less *PITX2* methylation (Fig. 2C).

### 3.3. Association of *PITX2* mRNA expression with promoter hypermethylation

In the 45 cancer specimens analyzed for both *PITX2* expression and methylation, hypermethylation was highly significantly ( $P < 0.001$ ) associated with down-regulation of expression (Fig. 3A).

The prostate carcinoma cell lines PC3, DU145, and LNCaP showed no detectable expression of *PITX2*, while 22Rv1 displayed barely detectable expression (data not shown). Treatment of the cell lines PC3 and DU145 with the DNA methylation inhibitor 5-aza-dC led to a slight restoration of mRNA expression, which was enhanced by the combination with the histone deacetylase inhibitor SAHA (Fig. 3B).

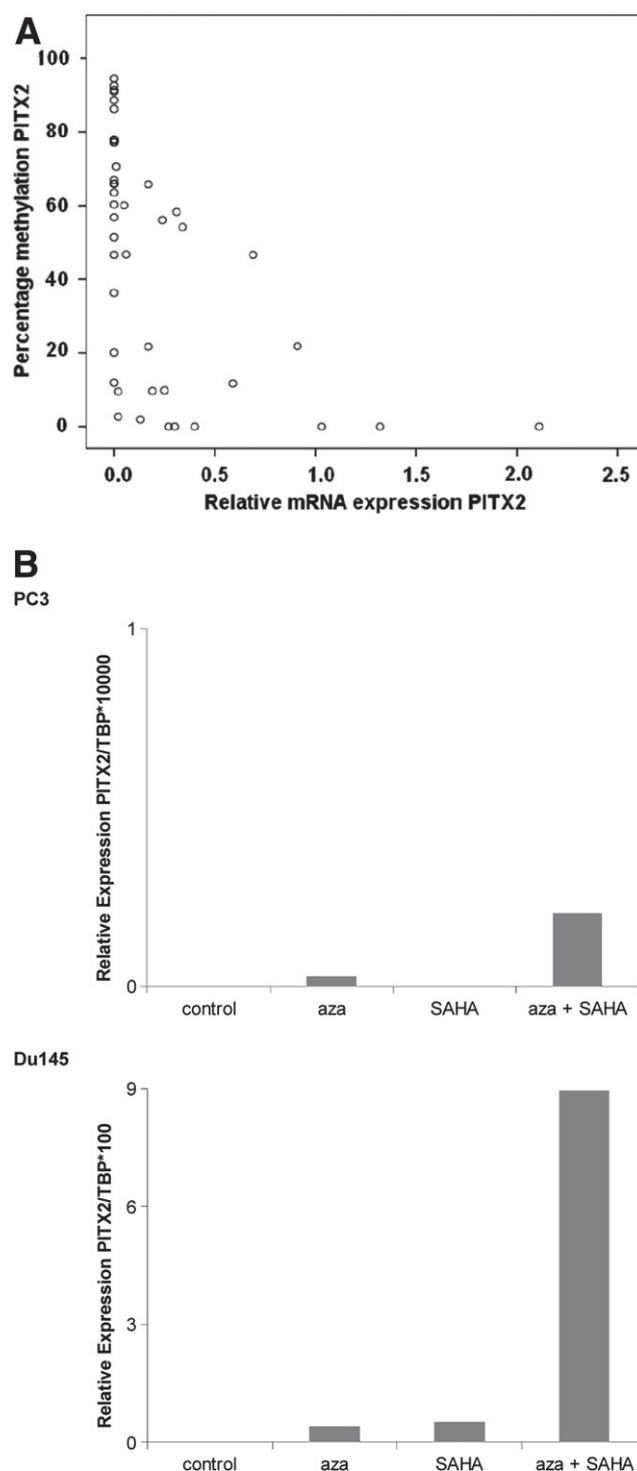


Fig. 3. Relation of *PITX2* methylation to expression. (A) Relationship of *PITX2* expression and methylation in prostate cancer tissues. (B) Effect of 5-aza-dC and SAHA on *PITX2* expression in prostate cancer cell lines PC3 and DU145.

### 3.4. *PITX2* mRNA expression and promoter hypermethylation in *ERG*-high and *ERG*-low prostate cancers

Overexpression of *ERG*, defined as more than 2-fold increase over the maximum of benign tissues, was present in

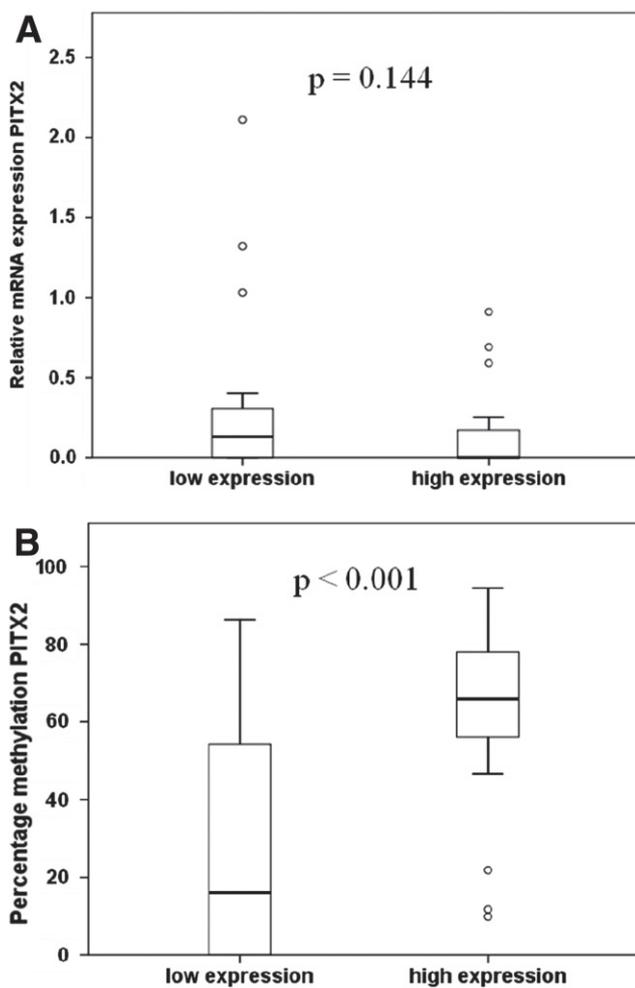


Fig. 4. *PITX2* expression and methylation in relation to *ERG* expression. Expression of *PITX2* mRNA (A) and *PITX2* methylation (B) in tumors with high or low *ERG* expression (22 vs. 23 cases, respectively). High *ERG* expression is defined as a level exceeding at least twice that of the maximum of benign tissues as described in a previous study [15]. Median values for *PITX2* mRNA expression were 0.13 for prostate cancers with low *ERG* expression and  $<0.001$  for prostate cancers with high *ERG* expression. Median values for *PITX2* percentage methylation were 17.7% and 65.9%, respectively.

22 of 45 carcinoma samples [15]. *PITX2* expression tended to be lower in the specimens with high *ERG* expression, but the relationship was not significant (Fig. 4A). Instead, *PITX2* hypermethylation was highly significantly associated with *ERG* overexpression. Only 3 tumors with high *ERG* expression had low *PITX2* methylation levels (Fig. 4B).

#### 4. Discussion

Our data are consistent with the conclusion of previous studies [9,10] that *PITX2* hypermethylation is a strong prognostic marker of biochemical recurrence after radical prostatectomy. We demonstrate here for the first time that *PITX2* expression likewise is frequently decreased in prostate can-

cers and that this decrease, too, forebodes a poor prognosis. Moreover, our data indicate that hypermethylation contributes to *PITX2* down-regulation. There was a significant association between expression and promoter hypermethylation in prostate cancer tissues. Furthermore, combined treatment with a DNA methyltransferase inhibitor and a histone deacetylase inhibitor partially restored *PITX2* expression in the PC3 and DU145 prostate cancer cell lines.

Corresponding changes in *PITX2* methylation and expression have already been observed in breast cancer tissues and cell lines [16–19], whereas the identification of *PITX2* hypermethylation as a negative predictive marker in prostate cancer followed from screening for aberrant DNA methylation in prostate cancers rather than functional analyses [20]. Our observation that *PITX2* down-regulation is common in prostate cancers and associated with worse prognosis now suggests that *PITX2* might function as an antagonist of cancer progression. In this respect, it is intriguing that we observed an excellent correlation between *PITX2* methylation and *ERG* overexpression. Notably, the frequency of *ERG* overexpression in our tumor series (49%) is consistent with the literature reporting *TMPRSS2-ERG* fusions in 30%–70% of cases [4]. *ERG* overexpression can be detected in some preneoplastic high grade PINs, but more consistently in invasive carcinomas [21], supporting a role of *ERG* overexpression in promoting prostate cancer invasion and progression. *ERG* may act by increasing proliferation, invasiveness, and motility of prostate cancer cells [14,22–24]. Interestingly, *PITX2* has been shown to oppose invasiveness of tumor cells by actin-myosin reorganization, increased cell spreading, suppression of cell migration, and strengthening of cell–cell adhesion [25]. Moreover, *ERG* overexpression may alter WNT signaling [26]. *PITX2* is well established as a downstream effector of canonical WNT signaling, modulating the expression of growth control genes like *CCDN1* and *CCDN2* [27]. Obviously, studies on the function of *PITX2* in prostatic cells and on its potential interaction with *ERG* are warranted in the future.

#### 5. Conclusions

We demonstrated the prognostic impact of *PITX2* expression silencing in patients undergoing radical prostatectomy. Moreover, *PITX2* silencing was associated with *ERG* overexpression. Our findings therefore call for a detailed investigation of *PITX2* expression and *PITX2* function in benign and malignant prostatic cells in future studies.

#### References

- [1] Farkas A, Schneider D, Perrotti M, et al. National trends in the epidemiology of prostate cancer, 1973 to 1994: Evidence for the effectiveness of prostate-specific antigen screening. *Urology* 1998; 52:444–8.

- [2] Johansson JE, Adami HO, Andersson SO, et al. Natural history of localized prostatic cancer. A population-based study in 223 untreated patients. *Lancet* 1989;1:799–803.
- [3] Bickers B, Aukim-Hastie C. New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer—the post PSA era. *Anti-cancer Res* 2009;29:3289–98.
- [4] Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310:644–8.
- [5] Wang J, Cai Y, Ren C, et al. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:8347–51.
- [6] Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007;26:4596–9.
- [7] Vanaja DK, Ehrlich M, Van den Boom D, et al. Hypermethylation of genes for diagnosis and risk stratification of prostate cancer. *Cancer Invest* 2009;27:549–60.
- [8] Henrique R, Ribeiro FR, Fonseca D, et al. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:6122–9.
- [9] Weiss G, Cottrell S, Distler J, et al. DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 2009;181:1678–85.
- [10] Bañez LL, Sun L, van Leenders GJ, et al. Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. *J Urol* 2010;184:149–56.
- [11] Schulz WA, Alexa A, Jung V, et al. Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer* 2007;6:1–14.
- [12] Florl AR, Steinhoff C, Müller M, et al. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* 2004;91:985–94.
- [13] Hoffmann MJ, Müller M, Engers R, et al. Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1577–88.
- [14] Wang J, Cai Y, Yu W, et al. Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res* 2008;68:8516–24.
- [15] Schulz WA, Ingenwerth M, Djuidje CE, et al. Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation. *BMC Cancer* 2010;10:505.
- [16] Hartmann O, Spyrtos F, Harbeck N, et al. DNA methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:315–23.
- [17] Harbeck N, Nimmrich I, Hartmann A, et al. Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2008;26:5036–42.
- [18] Nimmrich I, Sieuwerts AM, Meijer-van Gelder ME, et al. DNA hypermethylation of PITX2 is a marker of poor prognosis in untreated lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:429–37.
- [19] Maier S, Nimmrich I, Koenig T, et al. DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients—technical and clinical validation in a multi-center setting in collaboration with the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur J Cancer* 2007;43:1679–86.
- [20] Cottrell S, Jung K, Kristiansen G, et al. Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. *J Urol* 2007;177:1753–8.
- [21] 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;31:882–8.
- [22] Hermans KG, Bressers AA, van der Korput HA, et al. Two unique novel prostate-specific and androgen-regulated fusion partners of ETV4 in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:3094–8.
- [23] Carver BS, Tran J, Gopalan A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 2009;41:619–24.
- [24] King JC, Xu J, Wongvipat J, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 2009;41:524–6.
- [25] Wei Q, Adelstein RS. Pitx2a expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling. *Mol Biol Cell* 2002;13:683–97.
- [26] Ilijin K, Wolf M, Edgren H, et al. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 2006;66:10242–6.
- [27] Kioussi C, Briata P, Baek SH, et al. Identification of a Wnt/Dvl/ $\beta$ -Catenin  $\rightarrow$  Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 2002;111:673–85.

Article

## DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer

Anna Vinarskaja, Masanori Yamanaka, Marc Ingenwerth and Wolfgang A. Schulz \*

Department of Urology, Heinrich Heine University, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany;  
E-Mails: vifanna@t-online.de (A.V); chi016@ndmc.ac.jp (M.Y.);  
marc.ingenwerth@uni-duesseldorf.de (M.I.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: wolfgang.schulz@uni-duesseldorf.de;  
Tel.: +49-211-81-18966; Fax: +49-211-81-15846.

Received: 4 August 2011; in revised form: 8 September 2011 / Accepted: 22 September 2011 /  
Published: 27 September 2011

---

**Abstract:** Overexpression of the classical homeobox transcription factor HOXC6 is frequent in prostate cancers and correlates with adverse clinical parameters. Since surprisingly many HOXC6 target genes are downregulated in prostate cancer, it has been posited that oncogenic effects of HOXC6 in prostate cancer may be unmasked by concurrent epigenetic downregulation of target genes exerting tumor suppressive effects. To test this hypothesis, we have studied the expression of three HOXC6 target genes, *CNTN1* (encoding a cell adhesion protein), *DKK3* and *WIF1* (encoding WNT growth factor antagonists) as well as DNA methylation of *DKK3* and *WIF1*. HOXC6 upregulation and association with poor prognosis were confirmed in our tissue series. The three target genes were each significantly downregulated in cancer tissues and expression of each one correlated inversely with that of HOXC6. Cases with lower *WIF1* expression showed significantly earlier recurrence ( $p = 0.021$ ), whereas no statistical significance was reached for *CNTN1* and *DKK3*. Hypermethylation of *DKK3* or *WIF1* gene promoters was observed in a subset of cancers with downregulated expression, but was often weak. Our data support the hypothesis that HOXC6 target genes exerting tumor-suppressive effects are epigenetically downregulated in prostate cancer, but DNA methylation appears to follow or bolster rather than to cause their transcriptional inactivation.

**Keywords:** prostate cancer; epigenetic silencing; DNA methylation; homeobox transcription factors; WNT signaling

---

## 1. Introduction

Prostate cancer is distinguished by a profusion of epigenetic alterations, which include consistent hypermethylation of several genes, frequent hypermethylation of numerous others, genome-wide hypomethylation of repeat sequences, changes in histone modifications and altered expression of chromatin regulatory factors [1,2]. Some of these epigenetic changes, notably hypermethylation of genes like *GSTP1*, appear to be associated with earlier stages of tumor development, whereas others are rather associated with tumor progression. The latter changes include hypermethylation of additional genes, hypomethylation of retroelements and overexpression of the histone methyltransferase EZH2. Accordingly, there is considerable interest in exploiting epigenetic changes associated with early development for the detection of prostate cancer on the one hand and alterations associated with progression for classification, molecular staging and prognostic purposes on the other hand [3,4].

Among the prominent targets of epigenetic alterations in human cancers are classical HOX genes encoding transcription factors regulating cell fate and differentiation [5,6]. These genes are located in four clusters. Whereas normal prostate expresses predominantly posterior genes from the A and B clusters, genes from the C and D clusters become activated in cancer tissues [7-12]. Both the causes and consequences of cancer-associated changes in HOX gene expression are insufficiently understood. Nevertheless, it is now well established that individual classical HOX genes can act as oncogenes or tumor suppressors in various human cancers [6,13].

In the prostate, specifically, there is convincing evidence for an oncogenic function of HOXC6. Its mRNA and protein have been found to be strongly overexpressed in many prostate cancers compared to their low expression in benign tissues [7,10,14,15]. The degree of HOXC6 overexpression parallels several clinical parameters of tumor progression, including Gleason scores [10,14,16]. Analyses of genes affected by *HoxC6* knockout in murine prostates or by up- or downregulation of HOXC6 in human prostatic cells identified targets in the WNT and Notch signaling pathways as well as *BMP7*, *FGFR2* and *PDGFRA* [15]. These target genes are upregulated by HOXC6 and could plausibly mediate its effects on prostate cancer progression and metastasis. Curiously, however, about half of the genes positively regulated by HOXC6 in experimental models are actually downregulated in prostate cancers, including three genes encoding inhibitors of WNT signaling, *WIF1*, *DKK3* and *SFRP1* [15]. Moreno [17] has proposed an elegant explanation for this apparent discrepancy. According to this hypothesis, HOXC6 can activate both target genes promoting and preventing prostate cancer progression, but epigenetic inactivation of its tumor-suppressive targets would restrict its effect to cancer-promoting genes. Indeed, all three WNT inhibitor genes have been reported to be downregulated or hypermethylated in prostate cancer [18-26]. Therefore, DNA methylation of these genes may prevent their activation by HOXC6. However, this hypothesis has not been investigated explicitly by studying expression of HOXC6 together with methylation and expression of these target genes in prostatic tissue samples.

Here we report an expression analysis of *HOXC6* and three of its target genes in a well-characterized series of prostate cancer tissues. Our data confirm the reported correlation of *HOXC6* expression with clinical parameters of prostate cancer progression. As predicted, *WIF1* and *DKK3* downregulation was related to *HOXC6* overexpression. Both genes were hypermethylated in some prostate cancer samples, but their hypermethylation was not well correlated with downregulation.

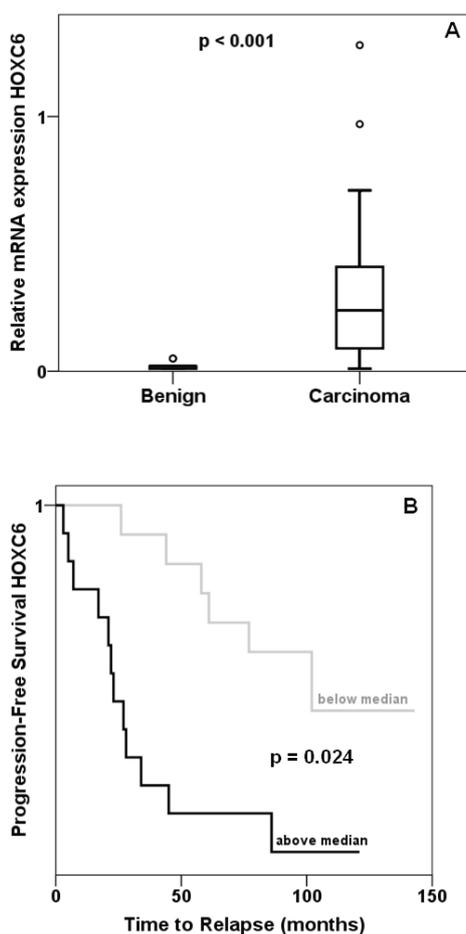
Likewise, a third *HOXC6* target gene, *CNTN1*, was concordantly downregulated. Taken together, our data suggest that downregulation of *HOXC6* target genes are often accompanied by DNA methylation but can occur independently of this epigenetic modification.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Expression of *HOXC6* in Prostate Cancer Tissues

Expression of *HOXC6* was determined by quantitative RT-PCR in 45 prostate cancer and 13 benign tissues collected from prostatectomies. The majority of cancer tissues displayed—often grossly—elevated levels of *HOXC6* mRNA resulting in an overall highly significant difference compared to benign tissues (Figure 1A). As reported by others, cancers with high *HOXC6* expression had significantly higher T stage, had more often spread to lymph nodes and were assigned higher Gleason scores. Expression of *MKI67* encoding the proliferation marker Ki67 was likewise enhanced in these cases (Mann-Whitney test:  $p = 0.004$ ). Cancers with above median *HOXC6* expression recurred significantly (log-rank  $p = 0.024$ ) earlier than cancers with below median expression (Figure 1B). These data confirm previous reports on frequent *HOXC6* overexpression in prostate cancer [7,10,14,15] and the association of increasing *HOXC6* overexpression with adverse clinical parameters.

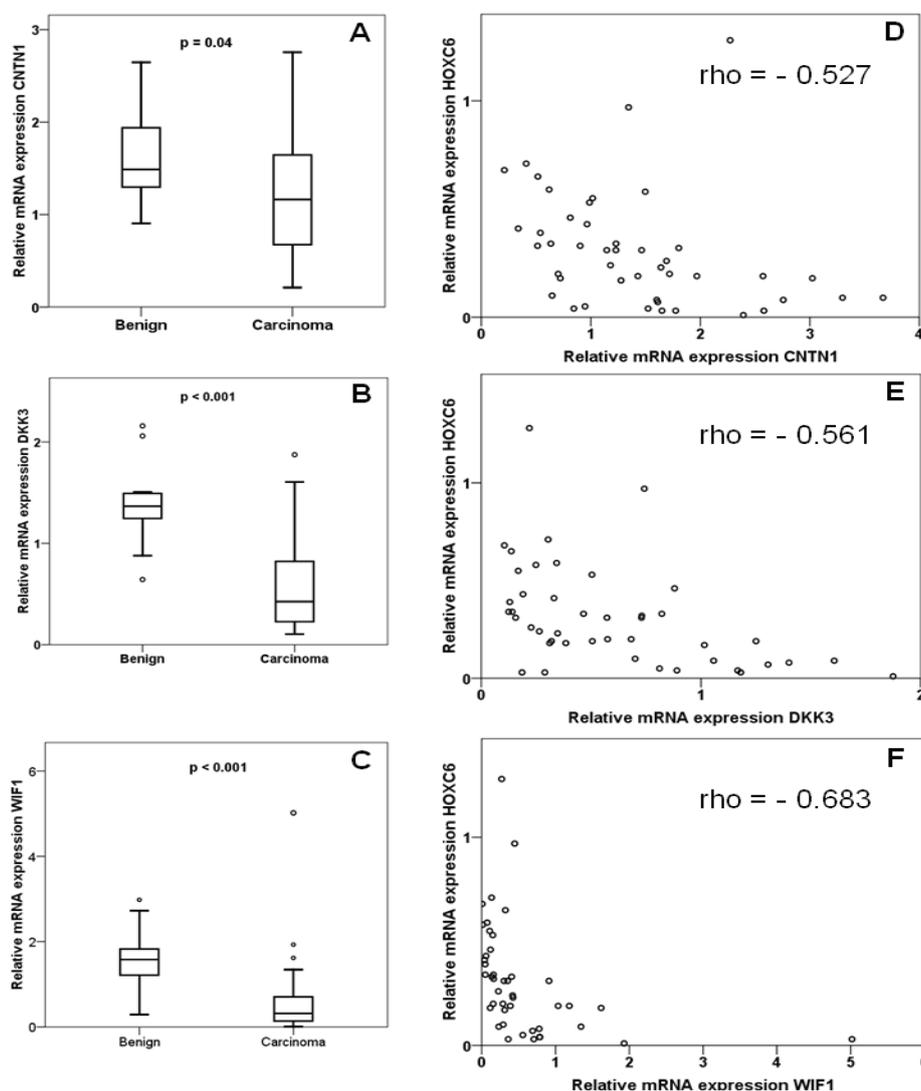
**Figure 1.** Expression of *HOXC6* in prostate cancer. (A) Expression of *HOXC6* mRNA as measured by quantitative RT-PCR in 45 prostate carcinoma and 13 benign prostate tissues; (B) Kaplan-Meier analysis of effect of *HOXC6* expression on biochemical recurrence.



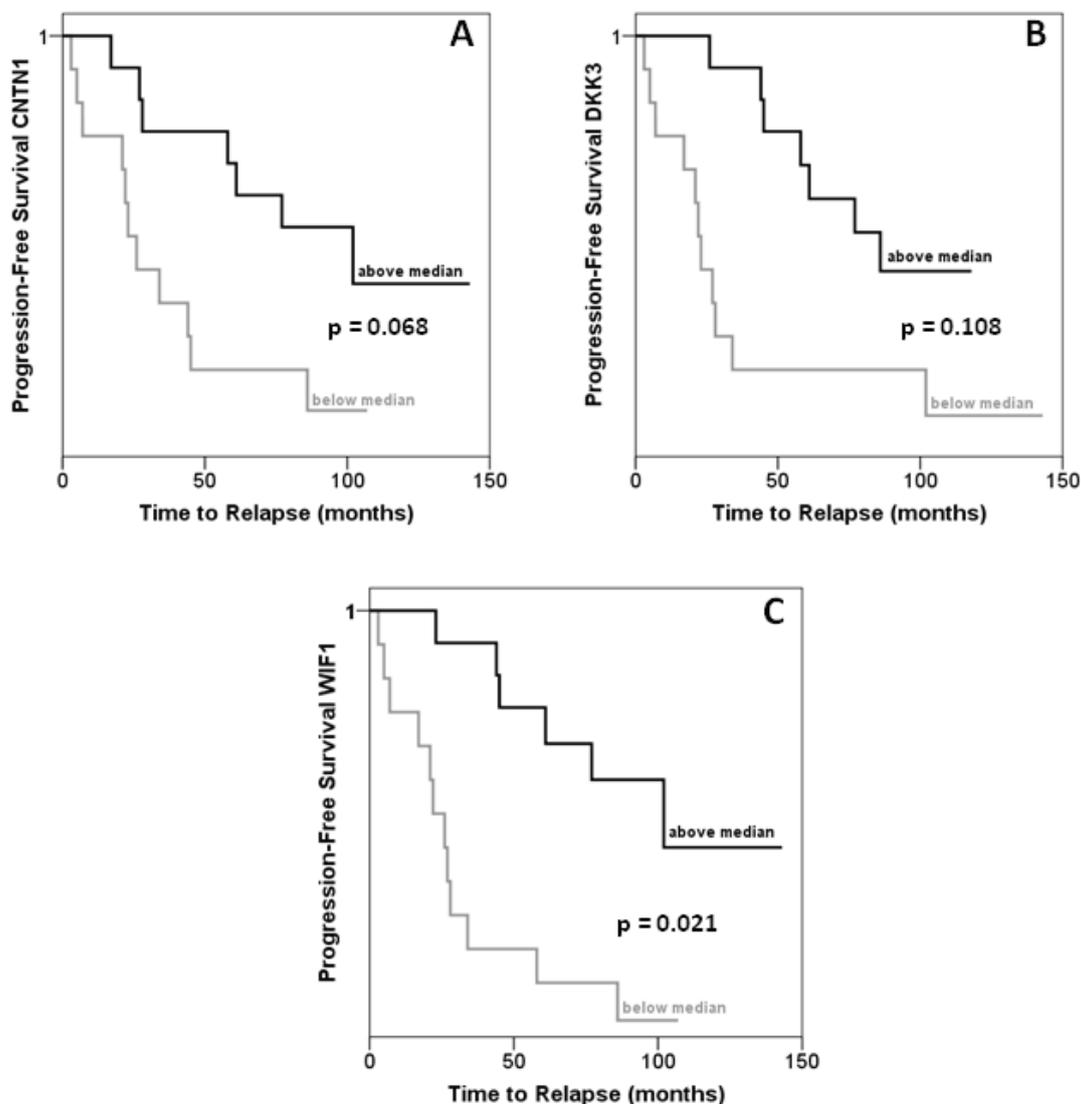
## 2.2. Expression of Presumed HOXC6 Target Genes in Prostate Cancer Tissues

In the same set of samples, expression of *DKK3*, *WIF1* and *CNTN1* was observed to be significantly decreased (Figures 2A–C). Expression of each gene correlated inversely with that of *HOXC6* in a statistically significant (each  $p < 0.001$ ) manner (Figures 2D–F). Accordingly, expression of each target gene correlated significantly positively with that of each other, with Spearman rho coefficients between 0.4 and 0.6. Cases with lower than median expression of each target gene, *CNTN1*, *DKK3* or *WIF1*, showed earlier recurrence, but the association was only significant at the  $p < 0.05$  level for *WIF1* (Figures 3A–C). In addition, low *WIF1* expression was significantly associated with lymph node involvement ( $p = 0.036$ ) and higher Gleason scores ( $p = 0.026$ ), but not with tumor stage (pT2 vs. pT3). Expression of *CNTN1* or *DKK3* was not significantly associated with any histopathological parameter in our series.

**Figure 2.** Expression of HOXC6 target genes in prostate cancer. (A) Expression of *CNTN1* mRNA as measured by quantitative RT-PCR in 45 prostate carcinoma and 13 benign prostate tissues; (B) Expression of *DKK3* mRNA in the same set of tissues; (C) Expression of *WIF1* mRNA in the same set of tissues; (D–F) Plots of *CNTN1*, *DKK3* and *WIF1* expression against *HOXC6* expression. In each case, there was a highly significant ( $p < 0.001$ ) inverse correlation.



**Figure 3.** Relation of HOXC6 target gene expression to prostate cancer recurrence. Kaplan-Meier analysis of relation of *CNTN1* (A), *DKK3* (B) and *WIF1* (C) expression to progression-free survival, measured as biochemical recurrence. Samples were stratified by median for each gene.

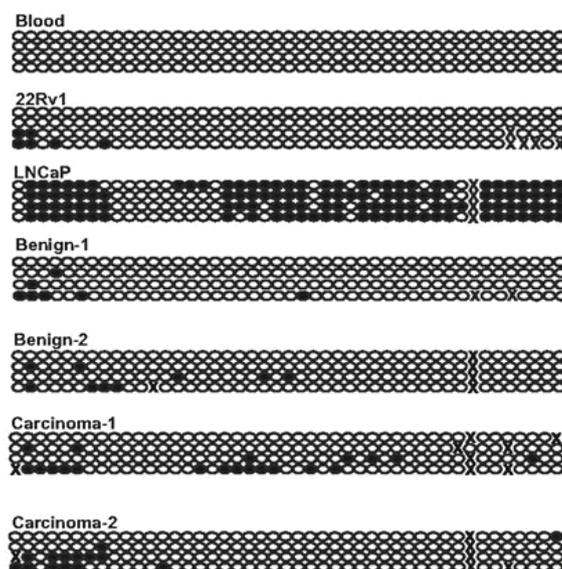


Our measurements confirm the reported downregulation of the WNT factor antagonists DKK3 and WIF1 in prostate cancer [18,21-23,25,26]. In addition, our data hint at an association of stronger WIF1 downregulation with worse prognosis. Most importantly, our study demonstrates for the first time explicitly that expression of certain target genes is inversely correlated with overexpression of HOXC6. This is also the first report on *CNTN1* in prostate cancer. The gene encodes a member of the contactin family which serves as a membrane receptor for chondroitin sulfate and regulates receptor tyrosine phosphatases. The function of contactin 1 has mainly been studied in neuronal and glial cells, where it regulates cell-cell and cell-substrate adhesion. Two studies in lung cancers and gliomas suggest that this function may also be relevant for cancer cell invasion and metastasis [27,28]. Investigations on the function of contactin 1 in prostate cancer and of the epigenetic regulation of its complex gene might therefore be rewarding.

### 2.3. Methylation of Presumed HOXC6 Target Genes in Prostate Cancer Tissues

Methylation of *DKK3* and *WIF1* promoter CpG-islands was analyzed by methylation-specific PCR as described in previous publications [21,29]. Methylation of *DKK3* was observed in 16 of the 92 carcinoma samples, but not in benign controls. It was significantly more frequent in cases with lymph node involvement and significantly less frequent in cases with Gleason score < 6 ( $\chi^2$  test,  $p < 0.05$ ). However, expression of *DKK3* was not significantly different between carcinoma samples with or without hypermethylation. *WIF1* methylation was more prevalent, being detectable in 31 of 92 carcinoma samples, but also in eight of 17 benign controls. The latter finding may relate to previous findings [18] suggesting that *WIF1* downregulation may commence at early stages of prostate cancer. As for *DKK3*, *WIF1* hypermethylation and the extent of downregulation of expression were not significantly related to each other. Because the bands obtained in the *WIF1* MS-PCR assay with the methylated-specific primers were often weak (except in LNCaP cells used as a positive control), bisulfite sequencing was conducted across the region interrogated by the assay in prostate tissue samples and controls (Figure 4). The analyzed part of the *WIF1* CpG-island was completely unmethylated in blood leukocytes, but was quite densely methylated in the prostate cancer cell line LNCaP which lacks *WIF1* expression. In contrast, only occasional sites were methylated in the expressing 22Rv1 line. In all benign and carcinoma tissues, only patchy and weak methylation was found, as suggested by the results of the MS-PCR assay. Of note, we have previously shown that in this set of prostate cancer tissues *GSTP1*, *EPB41L3* and several other genes are each hypermethylated at frequencies of 60%–80%, often displaying dense methylation [19,30]. Thus, *DKK3* and *WIF1* hypermethylation was much less widespread than downregulation and was often weak if it occurred.

**Figure 4.** *WIF1* methylation in prostate cancer. Bisulfite sequencing analysis of *WIF1* promoter methylation in blood leukocytes, prostate cancer cell lines with high (22Rv1) and low (LNCaP) expression, benign and carcinoma prostate tissues. Each line represents one cloned PCR product, each circle represents one CpG site. Dark circles indicate methylated and light circles unmethylated sites. Some sites at the 3'-end of the sequence were difficult to read and are labeled by x.



### 3. Experimental Section

#### 3.1. Patients and Tissue Samples

High quality RNA was prepared from 13 normal prostate tissues from cancer-carrying prostates and 45 carcinomas from patients aged 59–74 years undergoing total prostatectomy as described [19]. According to the IUAC 2007 TNM classification, tumors were staged as pT2 in 20, pT3 in 23 and pT4 in 2 cases. A Gleason score of 7 was detected in 26 tumors, < 7 in 13 tumors and > 7 in 6 tumors. None of the patients had distant metastases, but 11 cancers had spread to local lymph nodes. High quality DNA was available from 92 cancer tissues encompassing the specimens used for RNA analysis. Of these, 43 were staged as pT2 and 49 as pT3 or pT4. Sixteen patients had lymph node metastases, but none distant metastases. Each 27 carcinomas were assigned a Gleason score > 7 or < 7 and 38 a score of 7. The median follow-up period was 98 months. The study was approved by the ethics committee of the Heinrich Heine University medical faculty.

#### 3.2. RNA Extraction and Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from preconfluent cells using the RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Two µg RNA were reversed transcribed using SuperscriptII (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) with oligo-dT primers according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR for *CNTN1*, *DKK3*, *WIF1*, and the reference gene *TBP* was performed using SYBR-Green reaction mix (Qiagen) with 0.4 µM of each primer in an ABI Prism 7900HT instrument (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with the following conditions: activation at 95 °C for 15 minutes followed by 45 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, elongation at 72 °C for 30 s and measuring at 88 °C for 15 s. Amplification lasted 30 s with temperatures at 55 °C for *CNTN1*, 57 °C for *DKK3* and *WIF1*, 61 °C for *TBP*. The quality of the amplification was assured by a melting curve established by incubation at 95 °C, 60 °C and 99 °C for 15 s each. *HOXC6* expression was measured by Taqman assays Hs00171690 mL (Applied Biosystems). Duplicate measurements gave < 10% difference. For each gene, a standard curve was constructed using a reference cell line with high expression and expression in the samples was expressed relative to this standard. The same procedure was performed for the *TBP* control, to which the measurements were then adjusted.

#### 3.3. DNA Extraction and Methylation Analyses

High-quality DNA was extracted from tissues and prostate carcinoma cell lines as described [19]. The EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) was used for bisulfite conversion. PCRs were performed in a 50 µL reaction mixture consisting of 1 × buffer, 150 µM dNTPs, 15 pmol of each primer, 1 U Hotstar Taq polymerase, water and 2 µL bisulfite-converted DNA each. The following program was used: initial Taq activation at 94 °C for 15 min, followed denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 30 s, elongation at 72 °C for 45 s, with a final elongation for 10 min. MS-PCR amplification was performed for *DKK3* unmethylated/methylated for 36/38 cycles with annealing at 61/65 °C, for *WIF1* unmethylated/methylated MS-PCR amplification was performed for 34/36 cycles with annealing at 53 °C for both genes. Fully methylated and completely methylated controls were

carried in each reaction as described [19]. For *WIF1* bisulfite sequencing PCR was conducted for 35 cycles with annealing at 60 °C. PCR products were examined by agarose gel electrophoresis. For bisulfite sequencing PCR products were cloned into the *E. coli* TOPO 10 vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Four clones from each sample were sequenced using standard methods. Primer sequences are compiled in Table 1.

**Table 1.** Primers Used.

Primer names	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'	Product size (bp)	Reference
DKK3-MS-PCR (meth.)	GGG GCG GGC GGC GGG GC	ACA TCT CCG CTC TAC GCC CG	120	[29]
DKK3-MS-PCR (unmeth.)	TTA GGG GTG GGT GGT GGG GT	CTA CAT CTC CAC TCT ACA CCC A	125	[29]
DKK3-qRT-PCR	TTG CCA GCT TCC AGT ACA CC	TGC AGT GAC CCC AGA CAC A	105	self-designed
WIF1-MS-PCR (meth.)	CGT TTT ATT GGG CGT ATC GT	ACT AAC GCG AAC GAA ATA CGA	145	[29]
WIF1-MS-PCR (unmeth.)	GGG TGT TTT ATT GGG TGT ATT GT	AAA AAA ACT AAC ACA AAC AAA ATA CAA AC	154	[29]
WIF1-qRT-PCR	TAA TGG AGG GAC CTG TTT CTA CC	CCA TTT CGA CAG GGT TGT G	102	self-designed
WIF1-Bisulfite sequencing-PCR	GTT TTA GGG GTT TTT GAG TGT T	CAA CTC CCT CAA CCA AAA CTA	463	[31]

### 3.4. Statistical Methods

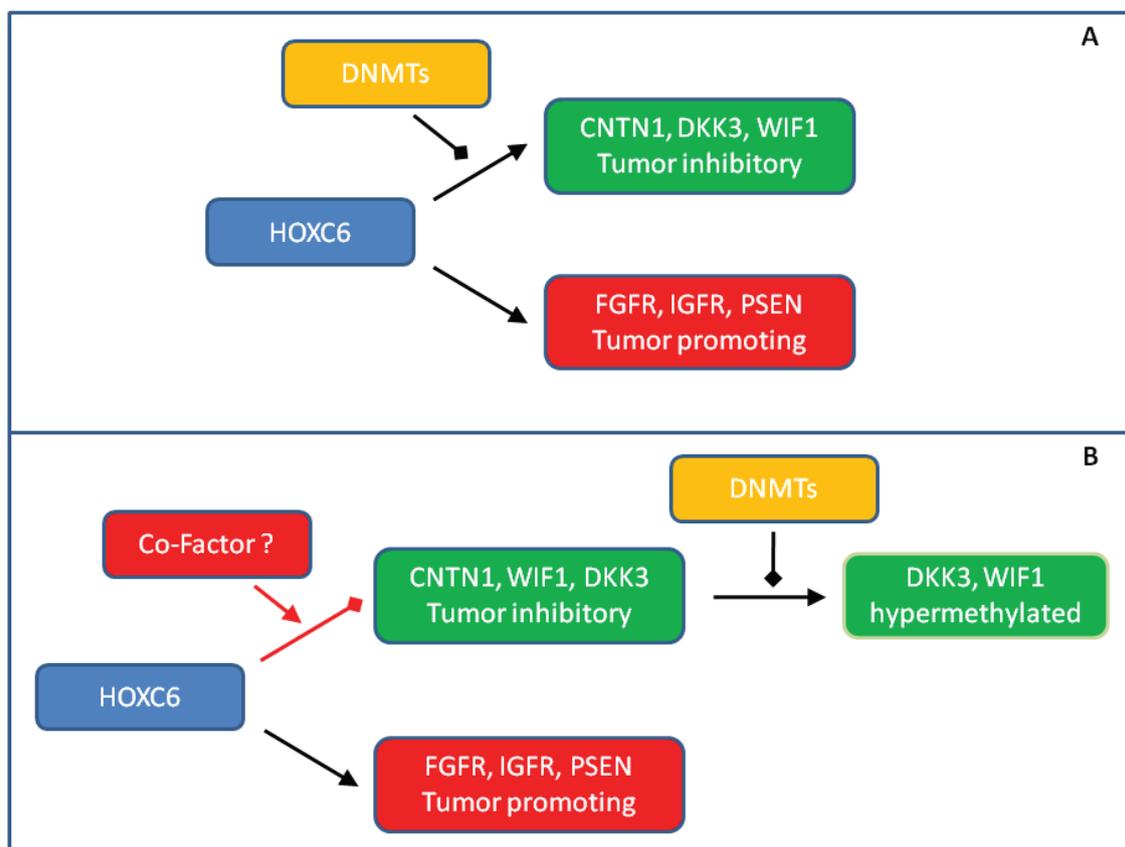
Statistical calculations were performed using SPSS 19.0.

## 4. Conclusions

We observed striking *HOXC6* overexpression in our small, but well-characterized prostate cancer tissue series. Our findings underscore that the previously described strong association of *HOXC6* overexpression with adverse clinical parameters [7,10,14,15] is robust and deserves to be explored for the purposes of developing prognostic and molecular staging biomarkers. Our confirmation of these relationships accentuates the question of how *HOXC6* contributes to oncogenesis and tumor progression in the prostate. Obviously, the answer is not trivial. Since *HOXC6* is well-established as a transcription activator, it is most likely to act by regulating gene expression. Indeed, a range of positively regulated target genes have been defined by various experimental approaches. As reviewed by Moreno [17], among them are plausible candidates for promoting oncogenesis in the prostate, e.g., through WNT, BMP, FGF and NOTCH signaling pathways. However, it seems paradoxical that several genes activated by *HOXC6* in experimental settings would be expected to counteract tumorigenesis *in vivo*, especially antagonists of WNT signaling like *DKK3* and *WIF1* [22,26,32]. These have indeed been reported to be downregulated or hypermethylated in prostate cancer in other studies [16,21,23]. One plausible explanation for the paradox is that genes antagonizing tumor

development become hypermethylated in prostate by independent mechanisms and are no longer accessible to transcriptional activation by HOXC6 (Figure 5A).

**Figure 5.** Hypotheses on the function of DNA methylation in inactivation of HOXC6 target genes in prostate cancer. (A) initial hypothesis based on ref. [14]; (B) hypothesis modified to explain the results of our study.



Several results from the present study argue against this hypothesis in its most simple form. First, although we observed *DKK3* and *WIF1* hypermethylation in some cases, it was relatively weak and transcriptional downregulation was more generalized. Of note, we have previously found that hypermethylation of another HOXC6 target, *SFRP1*, is also relatively rare in our tissue series, whereas around 80% of the cases harbor hypermethylated *GSTP1*, as expected [19]. According results have been published by others [25]. Second, hypermethylation was not well correlated with transcriptional downregulation and was also observed in many benign adjacent tissues in the case of *WIF1*. These findings argue that DNA methylation is not the primary cause of transcriptional silencing of these genes, but may rather follow and bolster their initial downregulation by other epigenetic mechanisms (Figure 5B).

Third, we found the strongest downregulation of *CNTN1*, *DKK3* and *WIF1* in cases with high *HOXC6* expression suggesting that transcriptional silencing of these HOXC6 target genes might be elicited by the factor itself. This idea seems unlikely at first glance, since classical HOX factors act predominantly as transcriptional activators. There are however exceptions to the rule. For instance, HOX target genes may become repressed upon interactions with SMAD proteins that are activated by BMP signaling [33]. In order to explain our findings, we would like to propose the idea that the

changed composition of transcription factors (and cofactors) in the nuclear milieu of prostate cancer cells may lead to a switch of HOXC6 function at some of its target genes (Figure 5B). An analogous case in prostate cancer is the altered target gene spectrum of the androgen receptor caused by changes in the expression of interacting transcription factors like HOXB13 and FOXA1 [34,35]. Accordingly, our data call for further detailed research on the HOXC6 paradox in prostate cancer which should yield important results for clinical application as well as insights into basic mechanisms of transcription.

### Acknowledgements

We thank our lab members Christiane Hader and Christian Arsov for help and support as well as Rainer Engers for histopathological evaluation of the tissue samples used. We gratefully acknowledge financial support by the Deutsche Krebshilfe and Deutsche Forschungsgemeinschaft.

### References and Notes

1. Nelson, W.G.; de Marzo, A.M.; Yegnasubramanian, S. Epigenetic alterations in human prostate cancers. *Endocrinology* **2009**, *150*, 3991-4002.
2. Schulz, W.A.; Hoffmann, M.J. Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 172-180.
3. Hoque, M.O. DNA methylation changes in prostate cancer: Current developments and future clinical implementation. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *9*, 243-257.
4. Perry, A.S.; Watson, R.W.; Lawler, M.; Hollywood, D. The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2010**, *7*, 668-680.
5. Pfeifer, G.P.; Rauch, T.A. DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 181-187.
6. Shah, N.; Sukumar, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 361-371.
7. Waltregny, D.; Alami, Y.; Clause, N.; de Leval, J.; Castronovo, V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *Prostate* **2002**, *50*, 162-169.
8. Economides, K.D.; Capecchi, M.R. Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development* **2003**, *130*, 2061-2069.
9. Hombria, J.C.; Lovegrove, B. Beyond homeosis—HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* **2003**, *71*, 461-476.
10. Miller, G.J.; Miller, H.L.; van Bokhoven, A.; Lambert, J.R.; Werahera, P.N.; Schirripa, O.; Lucia, M.S.; Nordeen, S.K. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5879-5888.
11. Huang, L.; Pu, Y.; Hepps, D.; Danielpour, D.; Prins, G.S. Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* **2007**, *148*, 1235-1245.
12. Ke, X.S.; Qu, Y.; Rostad, K.; Li, W.C.; Lin, B.; Halvorsen, O.J.; Haukaas, S.A.; Jonassen, I.; Petersen, K.; Goldfinger, N.; *et al.* Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. *PLoS One* **2009**, *4*, e4687.

13. Shen, M.M.; Abate-Shen, C. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1967-2000.
14. Ramachandran, S.; Liu, P.; Young, A.N.; Yin-Goen, Q.; Lim, S.D.; Laycock, N.; Amin, M.B.; Carney, J.K.; Marshall, F.F.; Petros, J.A.; Moreno, C.S. Loss of HOXC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* **2005**, *24*, 188-198.
15. McCabe, C.D.; Spyropoulos, D.D.; Martin, D.; Moreno, C.S. Genome-wide analysis of the homeobox C6 transcriptional network in prostate cancer. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1988-1996.
16. Bibikova, M.; Chudin, E.; Arsanjani, A.; Zhou, L.; Garcia, E.W.; Modder, J.; Kostelec, M.; Barker, D.; Downs, T.; Fan, J.B.; *et al.* Expression signatures that correlated with Gleason score and relapse in prostate cancer. *Genomics* **2007**, *89*, 666-672.
17. Moreno, C.S. The Sex-determining region Y-box 4 and homeobox C6 transcriptional networks in prostate cancer progression: Crosstalk with the Wnt, Notch, and PI3K pathways. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 518-527.
18. Wissmann, C.; Wild, P.J.; Kaiser, S.; Roepcke, S.; Stoehr, R.; Woenckhaus, M.; Kristiansen, G.; Hsieh, J.C.; Hofstaedter, F.; Hartmann, A.; *et al.* WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J. Pathol.* **2003**, *201*, 204-212.
19. Florl, A.R.; Steinhoff, C.; Müller, M.; Seifert, H.H.; Hader, C.; Engers, R.; Ackermann, R.; Schulz, W.A. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 985-994.
20. Joesting, M.S.; Perrin, S.; Elenbaas, B.; Fawell, S.E.; Rubin, J.S.; Franco, O.E.; Hayward, S.W.; Cunha, G.R.; Marker, P.C. Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10423-10430.
21. Lodygin, D.; Epanchintsev, A.; Menssen, A.; Diebold, J.; Hermeking, H. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4218-4227.
22. Kawano, Y.; Kitaoka, M.; Hamada, Y.; Walker, M.M.; Waxman, J.; Kypta, R.M. Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* **2006**, *25*, 6528-6537.
23. Zenzmaier, C.; Untergasser, G.; Hermann, M.; Dirnhofer, S.; Sampson, N.; Berger, P. Dysregulation of Dkk-3 expression in benign and malignant prostatic tissue. *Prostate* **2008**, *68*, 540-547.
24. Kawano, Y.; Diez, S.; Uysal-Onganer, P.; Darrington, R.S.; Waxman, J.; Kypta, R.M. Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br. J. Cancer.* **2009**, *100*, 1165-1174.
25. Costa, V.L.; Henrique, R.; Ribeiro, F.R.; Carvalho, J.R.; Oliveira, J.; Lobo, F.; Teixeira, M.R.; Jerónimo, C. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics* **2010**, *5*, 343-351.
26. Yee, D.S.; Tang, Y.; Li, X.; Liu, Z.; Guo, Y.; Ghaffar, S.; McQueen, P.; Atreya, D.; Xie, J.; Simoneau, A.R.; *et al.* The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 162.
27. Eckerich, C.; Zapf, S.; Ulbricht, U.; Müller, S.; Fillbrandt, R.; Westphal, M.; Lamszus, K. Contactin is expressed in human astrocytic gliomas and mediates repulsive effects. *GLIA* **2006**, *53*, 1-12.

28. Su, J.L.; Yang, C.Y.; Shih, J.Y.; Wei, L.H.; Hsieh, C.Y.; Jeng, Y.M.; Wang, M.Y.; Yang, P.C.; Kuo, M.L. Knockdown of contactin-1 expression suppresses invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2553-2561.
29. Veeck, J.; Wild, P.J.; Fuchs, T.; Schuffler, P.J.; Hartmann, A.; Knüchel, R.; Dahl, E. Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 217.
30. Schulz, W.A.; Alexa, A.; Jung, V.; Hader, C.; Hoffmann, M.J.; Yamanaka, M.; Fritzsche, S.; Wlazlinski, A.; Müller, M.; Lengauer, T.; *et al.* Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol. Cancer* **2007**, *6*, 14.
31. Chan, S.L.; Cui, Y.; van Hasselt, A.; Li, H.; Srivastava, G.; Jin, H.; Ng, K.M.; Wang, Y.; Lee, K.Y.; Tsao, G.S.; *et al.* The tumor suppressor Wnt inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas. *Lab. Invest.* **2007**, *87*, 644-650.
32. Marques, R.B.; Dits, N.F.; Erkens-Schulze, S.; van Weerden, W.M.; Jenster, G. Bypass mechanisms of the androgen receptor pathway in therapy-resistant prostate cancer cell models. *PLoS One* **2010**, *5*, e13500.
33. Li, X.; Nie, S.; Chang, C.; Qiu, T.; Cao, X. Smads oppose Hox transcriptional activities. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 854-864.
34. Norris, J.D.; Chang, C.Y.; Wittmann, B.M.; Kunder, R.S.; Cui, H.; Fan, D.; Joseph, J.D.; McDonnell, D.P. The homeodomain protein HOXB13 regulates the cellular response to androgens. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 405-416.
35. Wang, D.; Garcia-Bassets, I.; Benner, C.; Li, W.; Su, X.; Zhou, Y.; Qiu, J.; Liu, W.; Kaikkonen, M.U.; Ohgi, K.A.; *et al.* Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature* **2011**, *474*, 390-394.