

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

# **Epigenetische Analyse von Biomarkerkandidaten auf ihre Methylierungsmuster im Prostatakarzinom**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Jamal Ahmed Sheikh

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Simeon Santourlidis

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

*Meiner Mutter gewidmet*

*'The first gulp from the glass of natural sciences will make you an atheist, but at the bottom of the glass God is waiting for you.'*

*- Werner Heisenberg*

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

*Araújo-Bravo, M.J.; Erichsen, L.; Ott, P.; Beermann, A.; **Sheikh, J.**; Gerovska, D.; Thimm, C.; Bendhack, M.L.; Santourlidis, S. Consistent DNA Hypomethylations in Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 2023, 24, 386. <https://doi.org/10.3390/ijms2401038>*

# Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom stellt in den entwickelten Ländern den häufigsten und weltweit den zweithäufigsten Tumor des Mannes dar. Die Diagnostik umfasst u.a. die Bestimmung des PSA-Werts. Dieser ist jedoch vermindert sensitiv und wenig spezifisch für das Prostatakarzinom. Aus den genannten Tatsachen erwächst eine besondere Wichtigkeit für die gezielte Diagnostik, um eine Überdiagnostik und -therapie abzuwenden. Ein vielversprechender Ansatz stellt hierbei das Feld der Epigenetik dar. Epigenetik meint dabei alle Mechanismen, die die Genexpression beeinflussen, ohne dabei die Basenabfolge der DNA selbst zu verändern. Unter anderem ist die Methylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen ein Mechanismus, welcher diagnostisches Potenzial birgt. Es wurde bereits in methylierungsspezifischen Arrays beobachtet, dass bestimmte CpG-Inseln in pathologisch begutachteten gesunden Gewebeproben der Prostata eher hypermethyliert sind, während sie beim Prostatakarzinom hypomethyliert sind. Für die vorliegende Arbeit wurde je ein Genlocus des *XIST*-Gens (x inactivation specific transcript) und des *KIR2DL3*-Gens (transmembranäres Protein auf der Oberfläche von Natürlichen Killerzellen) auf ihren Methylierungsstatus in mehreren frei verkäuflichen, prostataassoziierten Zelllinien sowie in der DNA, isoliert aus insgesamt sechs Primärproben aus Prostatatumorgewebe, analysiert. Ziel war es, den Methylierungsstatus von Prostatatumorzellen und pathologischen nicht-malignen Zellen der Prostata graphisch abzubilden und zu quantifizieren.

Die wesentlichen Schritte umfassten dabei zunächst die Bisulfitkonvertierung der aus Zellkulturen isolierten Zelllinien-DNA. Die relevanten Abschnitte der genannten Genloci wurden in vitro amplifiziert und mittels TA-Klonierung in chemisch kompetenten *E. coli* eingeführt und vervielfältigt. Nach weiterer Vervielfältigung in Flüssigmedien wurden die Genloci sequenziert, um ein detailliertes Methylierungsprofil dieser Regionen zu erstellen. Ergebnis war, dass im *KIR2DL3*-Gen ein vorhandener Unterschied zwischen Tumor-DNA und Nicht-Tumor-DNA in sechs von elf Proben festgestellt werden konnte, während im *XIST*-Genlocus lediglich ein subtiler Unterschied nachweisbar war. Die genauen DNA-Methylierungsprofile dieser Regionen wurden erstmalig für das Prostatakarzinom erhoben. Diese Studie könnte einen ersten Schritt darstellen, um der Entwicklung eines potenten Biomarkers näherzukommen, jedoch sind hierfür weitere langfristig angelegte Studien notwendig. Ein vorhandener Unterschied in einer einzelnen CpG-Position könnte sich diagnostisch zunutze gemacht werden und wäre mittels Idiolokaler Normierung durch eine Methylierungsspezifische PCR (MSPCR) verlässlich und schnell nachweisbar.

# Abstract

Prostate cancer is the most common male tumour in developed countries and the second most common tumour worldwide. Diagnostics include the determination of PSA levels. However, this is reduced sensitive and not very specific for prostate cancer. These facts make targeted diagnostics particularly important in order to avoid overdiagnosis and overtreatment. The field of epigenetics represents a promising approach in this matter. Epigenetics refers to all mechanisms that influence gene expression without changing the base sequence of the DNA itself. Among other things, the methylation of CpG islands in promoter regions is a mechanism with diagnostic potential.

It has already been observed in methylation-specific arrays that certain CpG islands tend to be hypermethylated in pathologically reviewed non.-malignant prostate tissue samples, whereas they are rather hypomethylated in prostate carcinoma. For the present study, one gene locus each of the *XIST* gene (x inactivation specific transcript, important for X inactivation) and the *KIR2DL3* gene (transmembrane protein found on the surface of natural killer cells) were analyzed for their methylation status in several freely available prostate-associated cell lines and DNA isolated from a total of six primary samples of prostate tumor tissue. The aim was to graphically depict and quantify the methylation status of prostate tumour cells and non-malignant cells of the prostate.

The individual steps involved the bisulphite conversion of cell line DNA isolated from cell cultures. The relevant segments of these gene loci were amplified in vitro and amplified by TA cloning in chemically competent *E. coli*. After further amplification in liquid media, the gene loci were sequenced to generate a detailed methylation profile of these regions. The result was that a difference between tumour DNA and non-tumour DNA could be detected in six out of eleven DNA samples in the gene *KIR2DL3*, while a subtle difference was detectable in the *XIST* gene locus. The exact DNA methylation profiles of these regions were collected for the first time for prostate cancer. This study could be a first step towards the development of a potent biomarker, but further long-term studies are needed. An existing difference in a single CpG position could be used diagnostically and could be easily and quickly determined by means of idioloal normalization of Methylation Specific PCR.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>BPH</b>	Benigne Prostatahyperplasie
<b>CG-Dinukleotid</b>	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
<b>CGI</b>	CpG-Inseln
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DNMTs</b>	DNA-Methyltransferasen
<b>dNTP</b>	desoxyNukleosidTriPhosphat
<b>DRU</b>	Digital-rektale Untersuchung
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>HLA</b>	Humane Leukozyten-Antigene
<b>IDLN</b>	Idiolokale Normierung
<b>Kb</b>	Kilobasen
<b>lncRNA</b>	long non-coding RNA
<b>LRC</b>	Leukozyten-Repressor-Komplex
<b>MeDIP</b>	Methylated DNA immunoprecipitation
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>miRNA</b>	MicroRNAs
<b>MSP</b>	Methylierungsspezifische PCR
<b>PCa</b>	Prostatakarzinom
<b>pH</b>	potentia Hydrogenii
<b>PSA</b>	Prostata-spezifisches Antigen

<b>RT-PCR</b>	Real-Time Polymerase Chain Reaction
<b>SAM</b>	S-Adenosylmethionin
<b>Taq</b>	Thermus aquaticus
<b>TBE-Puffer</b>	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>XIST</b>	X-inactive specific transcript

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Prostatakarzinom

### 1.2 Epigenetik

#### 1.2.1 DNA-Methylierung

#### 1.2.2 Bedeutung aberranter Methylierungsmuster in Karzinomen

### 1.3 Kandidatengene im Prostatakarzinom

#### 1.3.1 *KIR2DL3*

#### 1.3.2 *XIST*

### 1.4 Ziele der Arbeit

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zellen und Zelllinien

#### 2.1.2 Molekularbiologische Kits

#### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

#### 2.1.5 Medien und Antibiotika

#### 2.1.6 Bakterienstämme und Vektoren

#### 2.1.7 Computerprogramme und Software

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Bisulfitkonversion

#### 2.2.2 PCR

#### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

#### 2.2.4 Gelaufreinigung

#### 2.2.5 TA-Klonierung

#### 2.2.6 Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*

#### 2.2.7 Plasmidpräparation

#### 2.2.8 Sanger-Sequenzierung

#### 2.2.9 Auswertung der erhobenen Daten

### 3. Ergebnisse

3.1 Analyse von *KIR2DL3*

3.2 Analyse von *XIST*

### 4. Diskussion

4.1. Stimmen die Ergebnisse mit den Daten aus den Microarrays überein?

4.2 Klinische Anwendung und Ausblick

4.4 Limitationen und Einschränkungen

4.4 Schlussfolgerungen

### 5. Literatur-/Quellenverzeichnis

### 6. Danksagung

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) ist ein maligner Tumor der Prostata und in der überwiegenden Anzahl der Fälle epithelialen Ursprungs. Er stellt in den entwickelten Ländern den häufigsten und weltweit den zweithäufigsten Tumor des Mannes dar (Siegel et al., 2021). Im Mittel lag 2018 das Erkrankungsalter bei 71 Jahren, womit das Prostatakarzinom eine Alterserkrankung darstellt. Aufgrund der demografischen Entwicklung ist zu erwarten, dass sowohl Prävalenz als auch Inzidenz des Prostatakarzinoms in der Zukunft zunehmen werden. In Deutschland lag 2018 der prozentuale Anteil des Prostatakarzinom hinsichtlich der Häufigkeit aller Krebsneuerkrankungen mit 24,8% auf Platz 1. Der prozentuale Anteil des Prostatakarzinoms an allen Krebssterbefällen lag mit 12% auf dem zweiten Platz nach dem Lungenkarzinom (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert – Koch - Institut 2017/2018).

Die Benigne Prostatahyperplasie (BPH), eine gutartige Vermehrung von Epithel- und Stromazellen der Prostata ohne Zellatypien (Madersbacher et al., 2019), muss vom Prostatakarzinom unterschieden werden. Die BPH tritt in der Regel im fortgeschrittenen Alter auf.

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms wird derzeit als multifaktorielles Geschehen betrachtet, das eine Kombination aus genetischen, hormonellen (Androgene fördern das Wachstum des Prostatakarzinoms) und ethnischen Einflüssen (insbesondere Afroamerikaner haben ein deutlich erhöhtes Risiko), sowie Umweltfaktoren umfasst.

Zu Lebzeiten bleibt die Erkrankung oft unentdeckt, zumal viele Prostatakarzinome aufgrund ihres langsamen Wachstums zunächst asymptomatisch verlaufen können. Das Risiko, im Laufe ihres Lebens ein Prostatakarzinom zu entwickeln, beläuft sich auf 40% in den westlichen Industrieländern, aber es werden nur etwa 10 % symptomatisch und nur 3 % von allen Betroffenen versterben daran (Bott et al., 2003). In weiter vorangeschrittenen Stadien kann es dann zu Symptomen wie Hämaturie, Blasenentleerungsstörungen oder Lymphödemen der unteren Extremitäten oder des äußeren Genitals kommen. Bei Bildung von Metastasen sind oft als erstes die Knochen betroffen, sodass Rückenschmerzen eine häufige Erstmanifestation in einem solchen

Fall darstellen können. Seltener metastasiert es in Lunge, Leber und Gehirn. Man unterscheidet aufgrund dieser Unterschiede verschiedene Formen des PCa: manifeste Prostatakarzinome (behandlungsbedürftig, symptomatisch), inzidentelle (zufällig im Rahmen einer Transurethralen Elektroresektion entdeckt), latente (nicht-behandlungsbedürftig, asymptomatisch) und okkulte (symptomatische Tumormetastasen bei unauffälligem Tastbefund der Prostata).

In Deutschland wird eine Krebsvorsorgeuntersuchung für Männer ab dem 45. Lebensjahr angeboten, um das Prostatakarzinom möglichst frühzeitig zu erkennen. Diese Untersuchung basiert auf der Krebsfrüherkennungsrichtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses. Neben einer digital-rektalen Untersuchung (DRU) wird häufig der PSA-Wert (Prostata-spezifisches Antigen) gemessen, um eine laborchemische Tumordiagnostik durchzuführen. Seit den 1990er Jahren ist der PSA-Wert der Standard in der Laborchemie und führte zu einem deutlichen Anstieg der diagnostizierten Prostatakarzinome, von denen jedoch viele nicht behandlungsbedürftig waren. Inzwischen ist dieser Trend rückläufig (Siegel et al., 2021).

Der PSA-Wert ist mit einer Spezifität von ca. 40% (Roobol et al., 2010) wenig spezifisch für das Prostatakarzinom selbst und wird von verschiedenen Parametern wie etwa mechanischer Irritation oder Entzündungsprozessen der Prostata beeinflusst. Ein weiteres Problem des PSA ist, dass es keinen Grenzwert gibt, der absolut definiert, ob ein Prostatakarzinom vorliegt oder nicht. Obwohl ein hoher PSA-Wert hinweisend für das Vorliegen eines PCa ist, hat ein hoher Anteil von Männern, bei denen kein Prostatakrebs vorliegt, auch einen erhöhten PSA-Level (Neal and Donovan, 2000). Bei 22% ist der PSA-Level nur leichtgradig erhöht (Henrique and Jerónimo, 2004). Das hat zur Folge, dass bei einem gewissen Anteil von Männern unnötigerweise weitere Diagnostik erfolgt, die zudem unangenehm für den Patienten sein kann, etwa transanale Biopsien der Prostata. Außerdem ist das Serum-PSA nicht in der Lage, zwischen indolenten Karzinomen und aggressiven behandlungsbedürftigen Karzinomen zu differenzieren, was vor allem im Falle älterer multimorbider Patienten, die beispielsweise ohnehin eine geringe Lebenserwartung hätten, eine schwierige klinische Entscheidung darstellt. Bei solchen stellt sich die Frage, ob diese Patienten von einer Therapie profitieren würden oder ob eine abwartende Strategie die bessere Option ist (Chiam et al., 2014). Das Serum-PSA muss im besten Fall mehrmals über einen gewissen Zeitraum bestimmt werden, damit der

behandelnde Arzt besser entscheiden kann, ob eine Therapie sich für den Patienten lohnt. Eine Metaanalyse bestehend aus sechs randomisierten kontrollierten Studien kam auch zu dem Ergebnis, dass ein PSA-Screening im Hinblick auf die Prostatakarzinom-Mortalität nicht sinnvoll ist (Djulgovic et al., 2010).

Diskutiert werden zwecks gezielterer Diagnostik alternativ etwa PSA-Derivate oder die PSA-Kinetik sowie PSA-Isoformen, welche jedoch bislang allesamt nicht in der Lage sind, die diagnostische Spezifität für das Prostatakarzinom zu erhöhen (Ayyıldız and Ayyıldız, 2014). Auch Bemühungen nach besseren Biomarkern, um die PSA-Messung selbst zu verbessern wie etwa die Bestimmung von freiem PSA oder PSA-Velocity (Anstiegsgeschwindigkeit) scheinen bisher keinen diagnostischen oder prognostischen Nutzen im Vergleich zu dem herkömmlichen Serum-PSA zu bringen (Bjartell et al., 2011; Roobol et al., 2011; Shariat et al., 2011).

Der Anteil an Prostata-DNA im Blut ist verschwindend gering und bei Pathologien der Prostata (wie dem Prostatakarzinom) erhöht. Es wurde bereits diskutiert, ob der alleinige Nachweis von Prostata-DNA im Blut oder im Urin ausreichen sein könnte, um Prostatakarzinome nachzuweisen. Allerdings ist auch hier die Spezifität zu gering, um eine Korrelation zwischen Höhe der nachweisbaren DNA und Schwere der Pathologie stellen zu können (Boddy et al., 2005; Ficarra et al., 2010)

Für ein histologisches Grading beim PCa wird der 1966 entwickelte und 2014 überarbeitete Gleason-Score verwendet (Phillips and Sinha, 2009). Er dient der Zuordnung zu einer Prognosegruppe und umfasst den strukturellen Gewebeaufbau und die glanduläre Differenzierung auf einer Skala von 1 (wenig maligne) bis 5 (stark entdifferenziert). Das Operationspräparat der radikalen Prostatektomie wird histologisch untersucht und es werden zwei Punktwerte vergeben. Der erste Wert entspricht der am häufigsten vorkommenden Drüsenformation in der Zellpopulation und der zweite Wert der am zweithäufigsten vorkommenden. Bei der Prostatastanzbiopsie entspricht der erste Wert der am häufigsten vorkommenden Zellpopulation und der zweite Wert der Zellpopulation mit der höchsten Malignität („the most and the worst“). Somit kann der Gleason-Score zwischen  $1+1=2$  und  $5+5=10$  betragen. Überwiegt der niedrigere Grad, so wird das im Score mit einem „a“ gekennzeichnet, „b“ hieße, dass der höhere Grad überwiegt. So würde ein Gleason-Score  $3+4 = \text{Gleason } 7$  bei Überwiegen des niedrigeren Grades als „Gleason 7a“ gekennzeichnet werden.

Für die klinische Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms ist die TNM-Klassifikation der Internationalen Union gegen Krebs (UICC) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) etabliert.

<b>Stadien des Prostatakarzinoms</b>	<b>Ausbreitung</b>	<b>Klinische Einteilung</b>
T1 NoMo	Klinisch nicht erkennbarer Tumor. Weder tast- noch sichtbar	Lokal begrenzt
T2 NoMo	Auf die Prostata begrenzter Tumor. Prostatakapsel intakt	
T3 NoMo	Die Organgrenzen überschreitender Tumor	Lokal fortgeschritten
T4 NoMo	Infiltration von Nachbarorganen (Harnblase, Rektum, Schließmuskel, Beckenwand)	
N1-3	Lymphknotenmetastasen	Fortgeschritten/metastasiert
M1	Fernmetastasen	

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2021)

Therapeutisch stehen verschiedene Strategien zur Verfügung: Active surveillance (Beobachten des PCa ohne kurative Therapie bis zum klinischen Fortschreiten), Watch and wait (in einem palliativen Setting wird gewartet, bis das PCa eventuell symptomatisch wird, und gegebenenfalls behandelt), Radiotherapie, Operation, Hormon- oder Chemotherapie. Die klinisch-therapeutische Strategie richtet sich nach Erkrankungsstadium (TNM, PSA, Gleason-Score), Gesundheitszustand und den

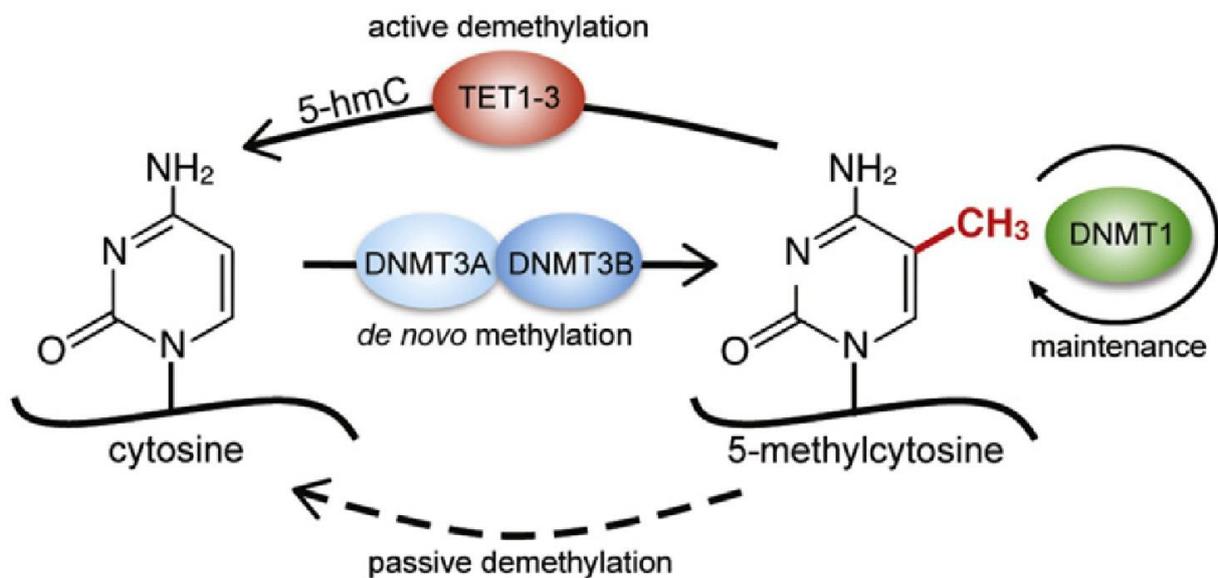
individuellen Patientenwünschen. In lokal begrenzten Stadien kommen kurative Methoden wie eine Radikale Prostatektomie oder eine Radiotherapie in Betracht, während beim metastasierten Tumor eine palliative Strategie verfolgt wird, wobei zwischen kastrationssensitiven und -refraktären Tumoren unterschieden wird. Die 5-Jahresüberlebensrate bei Adenokarzinomen der Prostata beträgt im Stadium T4 nur noch ca. 30% (Habbit et al., 2022).

Aus den genannten Tatsachen erwächst eine besondere Wichtigkeit für die gezielte Diagnostik, um eine Überdiagnostik mit nachfolgender Biopsie und Überbehandlung abzuwenden (Catalona, 2018). Somit könnte einer Überdiagnostik mit unangenehmen weiteren Untersuchungen wie einer ultraschallgestützten Biopsie und etwaiger Übertherapie vorgebeugt werden (Yegnasubramanian, 2016). Ein geeigneter Biomarker für die Diagnostik des PCa sollte sensitiv und spezifisch Prostatakarzinome mit einer schlechten Prognose und einer Therapieindikation von nicht-therapiebedürftigen Karzinomen unterscheiden können. Im besten Fall sollte ein solcher Biomarker mit der Tumorlast korrelieren und günstig und wenig invasiv aus zellfreier DNA (z.B. Blut oder Urin) bestimmbar sein.

## **1.2 Epigenetik**

Ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung eines Biomarkers stellt hierbei das Feld der Epigenetik dar (Costa-Pinheiro et al., 2015). Epigenetik (epi = altgriechisch für dazu, außerdem, obenauf) ist ein Teilgebiet der Biologie, das erstmals in den 1940-50er Jahren geprägt wurde (Wyatt, 1950). Es befasst sich dabei mit allen Mechanismen, die die Genexpression beeinflussen, ohne dabei die Basenabfolge der DNA selbst zu verändern (Tammen et al., 2013). Drei der am besten untersuchten Mechanismen schließen DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen und MicroRNAs (miRNAs) ein. Solche epigenetischen Modifikationen sind vererbbar und grundsätzlich dynamische biochemische Veränderungen (Wu and Zhang, 2010).

### 1.2.1 DNA-Methylierungen



**Abb. 1. (modifiziert nach Ambrosi et al., 2017): Mechanismus der DNA-Methylierung.**

Cytosin wird durch spezielle Enzyme, den sogenannten DNA-Methyltransferasen 3A und 3B (DNMT) modifiziert, indem an der 5'-Position eine Methylgruppe angelagert wird. Wie sie ihre Zielsequenzen auswählen, ist unbekannt. Ein Isoenzym (DNMT1) hält die Methylierung nach Replikationen aufrecht. Die Demethylierung auf der anderen Seite kann auf zwei Wegen erfolgen, entweder aktiv über TET-Proteine 1-3 (Ten-Eleven-Translocation), oder passiv in Abwesenheit von DNMT1 im Rahmen der Replikation.

Der mit Abstand am besten untersuchte Mechanismus stellt die DNA-Methylierung dar. Dabei wird eine Methylgruppe von einem Methyl-donator wie S-Adenosylmethionin (SAM) auf das 5'-Kohlenstoffatom des Cytosins übertragen. Diese Reaktion wird von einer bestimmten Enzymgruppe katalysiert, die bekannt ist als DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Dies geschieht in Cytosinen, welche sich in einem Cytosin-Guanin-Dinukleotid-Kontext (CpG) finden lassen (Perry et al., 2006). In menschlichen Körperzellen sind 70-80% aller CpG-Dinukleotide methyliert (Ehrlich et al., 1982). Auf der einen Seite gibt es hierbei sogenannte CpG-Inseln (CGI), welche im Durchschnitt 1000 Basenpaare (bp) lang sind und gehäuft eine Abwesenheit von DNA-Methylierungen aufweisen. Zudem wurde zwischen solchen CGIs und der Initiation der Transkription eine Korrelation festgestellt (Deaton and Bird, 2011). Etwa 70% aller Genpromotoren sind mit einer CGI assoziiert. Damit sind CGIs der geläufigste von allen Promotortypen im Wirbeltiergenom (Saxonov et al., 2006). Auf

der anderen Seite existieren im Gegensatz zu diesen überwiegend unmethylierten CGIs CpG-Dinukleotide, die zerstreut im Genom vorliegen. Außerdem können diese in repetitiven DNA-Abschnitten auftauchen und sind dann überwiegend methyliert.

Vermehrte DNA-Methylierungen in Promotor-assoziierten CpG-Positionen gehen mit einer verminderten Genaktivität einher, entweder durch direkten oder indirekten Einfluss auf die Chromatinstruktur, welcher schließlich zur Kondensation des Chromatins führt (Nakao, 2001; Salozhin et al., 2005). Verschiedene epigenetische Mechanismen spielen letztlich hierfür auf komplexe Weise zusammen, um bestimmte DNA-Abschnitte funktionell stillzulegen (Kouzarides, 2007; Sato et al., 2011).

### 1.2.2 Bedeutung aberranter Methylierungsmuster in Karzinomen

Aberrante Methylierungsmuster können in vielen Formen von Tumoren gefunden werden (Klutstein et al., 2016). In vergangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass DNA-Methylierungen auch eng mit der Karzinogenese assoziiert sind, und es gibt zunehmende Evidenz dafür, dass die meisten Methylierungen während des Alterungsprozesses stattfinden. Aberrante Methylierungsmuster können nämlich den Aktivitätszustand von Genen regulieren. Während eine Hypermethylierung im Promotorbereich in den meisten Fällen eher mit einer Inaktivierung einhergeht, geht eine Hypomethylierung meist mit einer vermehrten Aktivität des Gens einher (Wu et al., 2015). Wahrscheinlich trägt also ein aberrantes Methylierungsmuster in Tumoren dazu bei, dass die im Körper bereits differenzierten Zellen eine Dedifferenzierung durchlaufen, also ihre zellspezifischen Eigenschaften durch epigenetische Mechanismen verlieren bzw. nicht mehr erfüllen können.

Es kristallisiert sich zunehmend heraus, dass solche Aberrationen auch diagnostisch verwendet werden könnten. Diese könnten zum Beispiel für die Entwicklung von neuen präzisen Biomarkern genutzt werden, die in Zukunft das Potential haben, ältere Marker abzulösen (Costa-Pinheiro et al., 2015). Speziell bezogen auf das Prostatakarzinom konnte bereits in Voruntersuchungen gezeigt werden, dass es einen deutlichen Unterschied im Methylierungsstatus von Tumorzellen im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen im Prostatakarzinom gibt (Chiam et al., 2014). Es wurde beispielsweise beobachtet, dass solche CpG-Inseln in normalen Zellen der Prostata methyliert sein können, während sie in den entarteten Zellen des Prostatakarzinoms eher hypomethyliert sind (Laner et al., 2005). Auch in der AG Epigenetik der Uniklinik Düsseldorf konnte in jüngsten Untersuchungen in methylierungsspezifischen Assays



DNA und Nicht-Tumor-DNA. Hervorgehoben ist beispielhaft das in der vorliegenden Arbeit genauer untersuchte *KIR2DL3*-Gen.

Die Idee der Verwendung von epigenetischen Biomarkern zwecks Prostatakarzinomdiagnostik ist aufgrund mehrerer Gründe ansprechend: Die hohe Stabilität der DNA und die heutige Methodik erlauben, Biomarker aus zellfreier DNA wie Blut und Urin zu bestimmen, was für den Patienten wenig invasiv wäre. Weiterhin könnte eine epigenetisch basierte Diagnostik dazu beitragen, die Diagnosewahrscheinlichkeit in unklaren Fällen zu erhöhen.

### 1.3 Kandidatengene

Die zu untersuchenden Gene in dieser Arbeit sind das *KIR2DL3*-Gen und das *XIST*-Gen. Das *KIR2DL3*-Gen kodiert für ein Protein, das auf der Oberfläche von Natürlichen Killerzellen zu finden ist. Das *XIST*-Gen (x inactivation specific transcript) spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs und der Embryonalentwicklung. Bei letzterer ist es dafür verantwortlich, dass eines von zwei X-Chromosomen bei Frauen zur Gendosiskompensation inaktiviert wird, während es bei Männern inaktiv und hypermethyliert ist.

#### 1.3.1 *KIR2DL3*

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von viralen Infektionen und entarteten Zellen und sind daher ein wichtiger Bestandteil der natürlichen Immunität (Höglund et al., 1997). Ihre Funktionsweise basiert auf der Erkennung von MHC-Klasse-I-Rezeptoren. Wenn diese Rezeptoren intakt und körpereigen sind, entfalten die NK-Zellen keine zytolytische Wirkung. Sind die Rezeptoren jedoch verändert oder nicht vorhanden, erfolgt die Erkennung über spezifische *KIR*-Proteine (Killer cell immunoglobulin-like receptors). Diese *KIR*-Rezeptoren sind transmembranäre Proteine, die auf der Oberfläche der NK-Zellen zu finden sind. Sie sind in der Lage, Zielzellen zu kontaktieren und bei abweichender HLA-Klasse-I-Rezeptorkonstellation eine Zytolyse auszulösen (Algarra et al., 1997).

Die *KIR*-Gene befinden sich auf einem ca. 150kb langen genomischen Komplex im 1 Mb großen Leukozyten-Repressor-Komplex (LRC) auf dem Chromosom 19q13.4 (Uhrberg, 2005). Es handelt sich um eine Genfamilie, die polygen und polyallelisch

und in ihrer Zusammensetzung weitgehend homolog ist. Die Promotorregionen dieser Gene weisen einen Sequenzbereich von ca. 300-400 Basenpaaren auf, der um den Transkriptionsstart herum eine signifikante Anhäufung von CpG-Dinukleotiden aufweist. Diese Anordnung ist in nahezu allen *KIR*-Genpromotoren ähnlich. Trotzdem sind einige der *KIR*-Rezeptoren in der Lage, stimulatorische Signale zu vermitteln, während andere Rezeptoren derselben Genfamilie inhibitorische Signale auslösen (Moretta and Moretta, 2004). Es wird angenommen, dass eine Vielfalt an Haplotypen die Wirksamkeit der NK-Zellen erweitert (Le Luduec et al., 2018). In der Nomenklatur werden zwei oder drei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen unterschieden, die als "2D" bzw. "3D" bezeichnet werden (Van Bergen and Trowsdale, 2012). Weiterhin tragen diese lange zytoplasmatische Proteindomänen (L), die inhibierend wirken, oder kurze intrazelluläre Domänen (S), die eher aktivierende Signale vermitteln. So bedeutet „*KIR2DL3*“, dass dieser Rezeptor zwei extrazelluläre Domänen trägt und lange zytoplasmatische Proteindomänen trägt.

Nicht alle NK-Zellen exprimieren alle vorhandenen *KIR*-Gene, sondern es findet eine zufällige Auswahl der zu aktivierenden *KIR*-Gene statt. Dadurch entstehen hunderte verschiedener NK-Zellklone mit unterschiedlicher *KIR*-Rezeptor-Ausstattung (Chan et al., 2003). Die Expression der *KIR*-Gene wird selber auch durch epigenetische Mechanismen reguliert (Santourlidis et al., 2002; Chan et al., 2005). Diese Mechanismen, wie zum Beispiel die DNA-Methylierung, gewährleisten, dass die *KIR*-Gene hauptsächlich in NK-Zellen aktiv exprimiert werden, während sie in anderen Organsystemen herunterreguliert und weniger stark exprimiert werden (Liu et al., 2009).

### 1.3.2 XIST

Die meisten Körperzellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz, der aus 46 Chromosomen besteht. Dieser Satz besteht aus 22 Paaren von Autosomen und 2 Geschlechtschromosomen. Frauen haben den Chromosomensatz 46XX, während Männer den Chromosomensatz 46XY haben (Grodin and Lieberman, 2001). Nur Keimzellen, wie die Eizellen der Frau und die Spermienzellen des Mannes, besitzen nach der Meiose einen haploiden Chromosomensatz. Sie haben jeweils 22 Autosomen und 1 Geschlechtschromosom. Bei Frauen enthält das Geschlechtschromosom nur ein X-Chromosom, während Männer entweder ein X- oder ein Y-Chromosom haben. Nach

der Befruchtung verschmelzen eine Eizelle und eine Samenzelle, um den Embryo zu bilden. Dabei kommt es zur Vereinigung eines X-Chromosoms mit entweder einem weiteren X-Chromosom oder einem Y-Chromosom, was das Geschlecht bestimmt (Angelopoulou et al., 2008). Das X-Chromosom enthält etwa 1000 Gene (Ross et al., 2005) und ist nicht nur für das genetische Geschlecht verantwortlich, sondern auch für andere Merkmale wie Blutgerinnungsfaktoren, Farbsehen und die Produktion des Muskelproteins Dystrophin (Feener et al., 1989; Skuse, 2005).

Das X-Inaktivierungszentrum (Xq13) befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms beim Menschen. In dieser Region sind verschiedene Gene lokalisiert, wobei das *XIST*-Gen die wichtigste funktionelle Rolle spielt. *XIST* steht für "X-Inaktivierungsspezifisches Transkript" (Brockdorff et al., 1992) und kodiert für eine lange nicht-kodierende RNA (lncRNA). Das *XIST*-Gen erstreckt sich über eine Länge von insgesamt 17 Kilobasen (kb) und hat die Funktion, eine Dosiskompensation durch X-Chromosom-Inaktivierung (auch Lyonisierung genannt) zu ermöglichen (Engreitz et al., 2013). Da Frauen zwei X-Chromosomen besitzen, die verschiedene Allele derselben Gene tragen, wird eines der beiden X-Chromosomen in der frühen Embryonalentwicklung hauptsächlich inaktiviert, um die Ausprägung unterschiedlicher Merkmale im selben Individuum zu verhindern (Lucchesi et al., 2005). Die Entscheidung, welches der beiden X-Chromosomen inaktiviert wird, erfolgt zufällig.

Aufgrund der Tatsache, dass Männer nur ein X-Chromosom haben, muss dieses aktiv bleiben, da es wichtige Informationen enthält. Dies wird durch epigenetische Mechanismen erreicht, die den *XIST*-Bereich inaktivieren (Yue et al., 2016). Der genaue molekulare Mechanismus hinter der X-Inaktivierung ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass während der Transkription in der Zelle lange nicht-kodierende RNAs akkumulieren und an das X-Chromosom binden und es umhüllen (Brockdorff, 2019). Anschließend wird die DNA durch DNA-Hypermethylierung und eine erhöhte Methylierung der Histonschwänze inaktiviert (Fang et al., 2019). Diese Mechanismen führen letztendlich zur Kondensation der DNA. Die zusätzlich inaktivierten X-Chromosomen bleiben als heterochromatische und lichtmikroskopisch erkennbare Barr-Körper in der Zelle erhalten (Chadwick, 2003).

Es gibt verschiedene Konstellationen bei Pathologien, bei denen eine abnorme Anzahl von X-Chromosomen auftritt. Ein Mann mit dem Karyotyp 46,XY hat normalerweise

kein Barr-Körperchen. Im Gegensatz dazu besitzt ein Mann mit 47,XXY ein Barr-Körperchen. Frauen mit dem Karyotyp 45,X (Turner-Syndrom) haben kein Barr-Körperchen (Wolff et al., 2010), während eine Frau mit dem Karyotyp 47,XXX (Triple-X-Syndrom) zwei Barr-Körperchen hat (Otter et al., 2010). Ebenso haben Frauen mit dem Karyotyp 48,XXXX drei Barr-Körperchen. Eine Ausnahme von dieser Regel bildet die Tetraploidie (z.B. 92,XXXX), bei der zwei X-Chromosomen aktiv bleiben (Bothur-Nowacka et al., 2013). Daraus lässt sich schließen, dass die X-Inaktivierung zumindest teilweise von der Anzahl der Autosomen abhängt.

## 1.4 Ziele der Arbeit

1. Der Methylierungsstatus eines CpG-reichen Abschnittes im 5'-genregulatorischen Bereich je eines Genlocus der Gene *XIST* und *KIR2DL3* in Zelllinien aus der Prostata und Gewebeproben des Prostatakarzinoms soll analysiert werden, und ein detailliertes Methylierungsprofil der jeweiligen Regionen soll grafisch dargestellt werden.
2. In methylierungsspezifischen Arrays konnte die differentielle Methylierung von Prostatakarzinomen im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen bereits festgestellt werden. Die Ergebnisse aus diesen Arrays sollen mithilfe einer unabhängigen Methodik geprüft werden. Im Anschluss an die Erstellung der Methylierungsprofile der genannten Gene kann also eruiert werden, ob sich die Ergebnisse aus den methylierungsspezifischen Arrays verifizieren oder falsifizieren lassen.
3. Auf Grundlage der Ergebnisse soll die klinische Bedeutung des Methylierungsstatus der Genregionen für die langfristig angestrebte Anwendung von epigenetisch orientierter Diagnostik des Prostatakarzinoms und der klinische Nutzen für Patienten diskutiert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zellen- und Zelllinien-DNA und Ethikvotum

Die zum Einsatz gekommenen humanen Zelllinien sind allesamt prostataspezifisch und beinhalten PrEC, BPH1, DU145, LNCaP und PC3. Diese wurden freundlicherweise vonseiten des Urologischen Forschungslabors der Uniklinik Düsseldorf von PD Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann zur Verfügung gestellt. Die Informationen über die verwendeten Zelllinien wurden der Webseite der DSMZ Datenbank entnommen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen: <https://www.dsmz.de>) und sind im Folgenden detailliert aufgelistet.

<b>Zelllinien</b>	<b>Herkunft</b>
<b>BPH1</b>	Epithelzellen der Prostata eines 68-jährigen Mannes mit Benigner Prostatahyperplasie (Hayward et al., 2001)
<b>HPrEC</b>	Humane Prostata Epithelial Cells. Es handelt sich hierbei um Epithelzellen der humanen Prostata (Webber et al., 1997)
<b>DU145</b>	Prostatatumorgewebe einer Hirnmetastase bei einem 69-jährigen Mann mit Prostatakarzinom von 1975 (Stone et al., 1978)
<b>LNCaP</b>	Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Mannes mit Prostatakarzinom in 1977; die Zellen wurden in der Literatur als androgensensitiv beschrieben (Castanares et al., 2016; Thalmann et al., 1994)
<b>PC3</b>	Knochenmarksmetastase, die postmortal bei einem 62-jährigen Mann mit Grad 4 Prostatakarzinom isoliert wurde (es handelt sich um ein gering differenziertes Adenokarzinom nach Androgensuppressionstherapie) (Sobel and Sadar, 2005)

**Tabelle 2:** Verwendete prostata-assoziierte Zelllinien und deren Herkunft

## Primärproben

	<b>Tumorstadium</b>
<b>G072</b>	pT3c G6, 3+3
<b>G106</b>	pT4X G7, 3+4
<b>G110</b>	pT2b G6, 3 + 3
<b>G192</b>	pT4a, G7, 3+4
<b>Epo T</b>	pT4a, G6, 3+3
<b>Epo N</b>	Prostatanormalgewebe

**Table 3: Verwendete Prostata-Primärproben mit Tumorstadium**

Die genannten Prostata-Primärproben wurden nach Einverständnis der betroffenen Patienten durch Prof. Jenster durch die Abteilung für urologische Onkologie der Erasmus University Medical Center Rotterdam zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden im Zeitraum von 1984-2001 mittels Prostatektomie entnommen, mit Formalin fixiert und mit Paraffin eingebettet (FFPE) und histologisch nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung aufbereitet kryokonserviert.

Im Detail wurden die Proben von erfahrenen Pathologen als Tumorgewebe ( $\geq 90\%$  Krebszellen, mit angrenzendem gesundem Gewebe) oder als BPH identifiziert und aufbereitet, indem die Proben in 5  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten wurden. Sodann wurde das Gewebe mittels Mikrodissektion isoliert und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die FFPE-Proben wurden entparaffiniert mit Xylen, zweimal mit Ethanol gewaschen und für 10 Minuten getrocknet bei 37°C sowie resuspendiert in 200  $\mu\text{L}$  Inkubationspuffer, welches 2mg/mL Proteinase K enthielt. Die Proben wurden über Nacht bei 70°C inkubiert und mit 400  $\mu\text{L}$  Lysepuffer. Die Lysate der FFPE-Proben wurden in 30  $\mu\text{L}$  TRIS-Puffer eluiert bei einem pH von 8,0. Die Quantifizierung des DNA-Gehaltes geschah mit dem NANODROP-2000-UV-Vis-Spektrometer (Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, NC, USA). Der DNA-Gehalt reichte von 1 bis 8  $\mu\text{g}$  pro gewonnene Probe. Die DNAs wurden den Herstellerangaben entsprechend aus den FFPE-Proben isoliert mittels des Maxwell 16 FFPE-Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA, #AS1130).

Ethikvotum: Für die Arbeit mit den oben genannten Proben wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf ein positives Votum mit der Studien-Nr.: 2022-1982 vergeben. Es wurden keine ethischen oder rechtlichen Bedenken gegen die Arbeit geäußert. Für die Entnahme der Proben wurde durch die „Erasmus Medical Ethics Committee“ (Rotterdam) ein positives Ethikvotum nach „Medical Research Involving Human Subjects Act“ mit den Nummern MEC-2004-261 und MEC-2010-176 vergeben. Alle Methoden und Daten wurden nach Patienteneinverständnis und in Übereinstimmung mit den geltenden Herstellerbestimmungen durchgeführt und erhoben.

### 2.1.2 Molekularbiologische Kits

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Epitect Bisulfit Kit (48) Qiagen	Qiagen (Hilden, Deutschland)
MinElute® Gel Extraction Kit (50) Qiagen	Qiagen (Hilden, Deutschland)
The Original TA Cloning Kit Invitrogen™	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) Qiagen	Qiagen (Hilden, Deutschland)

**Tabelle 4:** Verwendete Molekularbiologische Kits und deren Hersteller

### 2.1.3 Geräte und Instrumente

<b>Gerät/Instrument</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophorese System	Perfect Blue Gel System	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Geldokumentation	Fusion FX	Vilber Lormat, Eberhardzell
Inkubator	CERTOMAT ® H/MO Bakterienschüttler  Brutschrank Binder	B. Braun  WTC

Spannungsquelle	PowerPac 300	Biorad
Spektralphotometer	NanoDrop	PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen
Thermoblock	HBT130	HLC
Thermocycler	StepOnePlus	Applied Biosystems
Vortex	VF2 Vortexer	Janke + Kunkel
Waagen	KERN 330-47 KERN GS	KERN
Zentrifuge	Centrifuge 542	Eppendorf AG, Hamburg

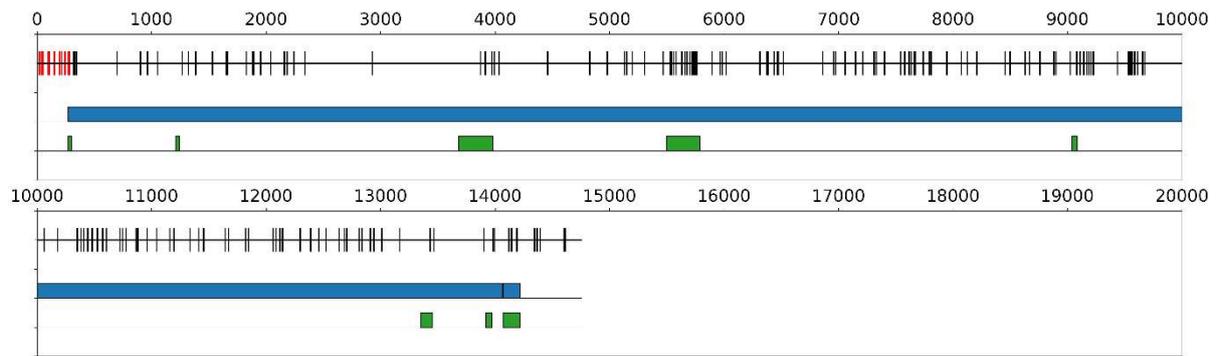
**Tabelle 5:** Verwendete Instrumente mit Modellnummern und Herstellern

#### 2.1.4 Chemikalien, Enzyme, Puffer und Lösungen

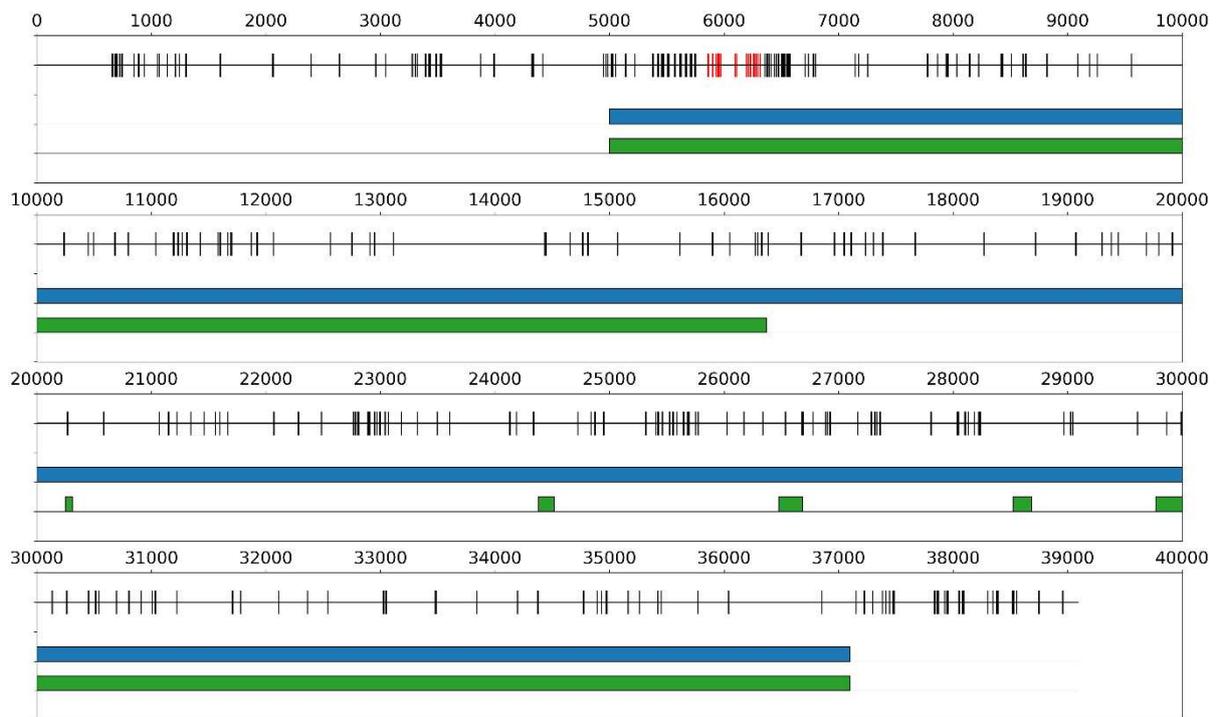
<b>Chemikalie/Enzym/Puffer/Lösung</b>	<b>Hersteller</b>
10x PCR-Puffer	Qiagen
10x TBE-Puffer	Roth
Ampicillin	Carl Roth
dNTP-Mix	Promegan
Ethanol	Roth
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs
HotStarTaq® Polymerase	Qiagen
LB Agar	Invitrogen™
LB Broth Base	Invitrogen™
pCR-Vektor 2.1, (3,9kb)	ThermoFisher Scientific
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab
Perfect™ 100bp Ladder	Invitrogen
X-Gal	Sigma-Aldrich

**Tabelle 6:** Verwendete Chemikalien, Enzyme, Puffer und Lösungen sowie deren jeweiliger Hersteller

### 2.1.5 Primer



**Abb. 3: *KIR2DL3*-Gen.** Dargestellt ist das gesamte humane *KIR2DL3*-Gen. Der blaue Balken zeigt das Gen an, die grünen Balken die Exons. Die Zahlen geben die Nummer der Basenpaare wieder. Die Markierungen geben alle CG-Positionen in dem Gen wieder. Der rot markierte Bereich stellt den untersuchten CpG-reichen Teil des Genlocus dar.



**Abb. 4: *XIST*-Gen.** Dargestellt ist das gesamte humane *XIST*-Gen. Der blaue Balken zeigt das Gen an, die grünen Balken die Exons. Die Zahlen geben die Nummer der Basenpaare wieder. Die Markierungen geben alle CG-Positionen in dem Gen wieder. Der rot markierte Bereich stellt den untersuchten CpG-reichen Abschnitt des Genlocus dar.

Name Temperatur, Konzentration	Sequenz
Äußere <i>KIR2DL3</i> -Primer 48°C, 10 µM	Sense-Primer (außen): GAAGAAGAGTTTGAATTTTAGA  Antisense-Primer (außen): CCTTCCAAAACCTCACCAAC
Innere <i>KIR2DL3</i> -Primer 48°C, 10 µM	Sense-Primer (innen): GTGTATGAGAGGTTGGATTTG  Antisense-Primer (innen): CCTATATCTCCAACCTCTAAACC
<b>Amplifikat <i>KIR2DL3</i> (452 bp)</b>	GAAGAAGAGTTTGAATTTTAGATAAAAATAAAAAT ATATTA AAAAATTTTAAATGTAAGTATAGAATTTAA TTATTT <b>CG</b> TGTATGAGAGGTTGGATTTGAGAC <b>CG</b> T TTTTTGAGTTTGGT <b>CG</b> TAGTGAAGGA <b>CG</b> TAAGGT GTTAATTTTAGTGAGAATAATTTT TAGGAAGTTAT GTTT <b>CG</b> TTTTTGAG <b>CG</b> AGTATTTATTGGGTTTTAT GTAAGGTAGAAAGAGTTTG <b>CG</b> TAC <b>CG</b> TTATTTTTT TATGATGTGGTTAATATGTAAATTGTATGGGTAG GG <b>CG</b> TTAAATAATATTTTGTG <b>CG</b> TTGTTGAGTTG AGTTGGGG <b>CGCG</b> GT <b>CG</b> TTTGTTTGTATAGATAGT ATTATGT <b>CG</b> TTTATGGT <b>CG</b> TTAGTATGGTGTGTG TTGGTGAGTTTTGGAAGGGTAT <b>CG</b> AGGGAGGGA GTG <b>CG</b> GGGATGGAGAT <b>CG</b> GGGTTTAGAGTTGGA GATATAGG
Äußere <i>XIST</i> -Primer 56°C, 10 µM	Sense-Primer (außen): GATTATTTGGTGGTGTGTGAG  Antisense-Primer (außen): CATACTAACCCTTAACAAAACC
Innere <i>XIST</i> -Primer 56°C, 10 µM	Sense-Primer (innen): ATTTGGTGGTGTGTGAGTGTA  Antisense-Primer (innen): GAGGTTTTGTAAAGTGGTTAGTAT
<b>Amplifikat <i>XIST</i> (509 bp)</b>	GATTATTTGGTGGTGTGTGAGTGTATTTAT <b>CG</b> TTT TGGTAGAGAATGATTTTGTAGTTAAGTTAAGGGC

	<p> <b>G</b>TGTTTAGATTGTGGAGGAAAAGTGGT<b>CG</b>TTATT  TTAGATTTGT<b>CG</b>TATAATT<b>CG</b>GTTTAGGGTTAGT<b>C</b>  <b>G</b>TTTGTGTTAAGTTAAATTAGGGAGGTAAGATGG  ATGATAGTAGGTTAGGTAGAGGAAGTTATGTGTA  TTGTATGAGTTAAATTTATTTGAATGAATTGATTT  GGGGTTTGTTAGGAGTTTTG<b>CG</b>TGATTGTTGTAT<b>C</b>  <b>G</b>GGAGGTAGTAAGAATTATTTTTTATTAGTATAAG  GGATTAGTTAAAAATGGAAGGTTAGGAAAGATTA  AGGTGTAGGGTTTAAAATGG<b>CG</b>ATTTTGATATTG  <b>CG</b>GTATTGTTTAGTATGG<b>CG</b>GGTTGTGTTTTGTTA  GGTTGTTTAAAATGG<b>CG</b>GATTTAGTTTTGT<b>CG</b>TAG  TGTTTAAGTGG<b>CG</b>GGAAGGTTATATTATGATGGG  <b>CG</b>AGGTTTTGTTAAGTGGTTAGTATG </p>
--	---

**Table 7:** Verwendete Primer für Nested PCR mit deren jeweiligen Sequenzen sowie Angabe der Amplifikatsequenz

### 2.1.6 Computerprogramme und Software

Software	Hersteller
ClustalW2	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
Reverse complement	<a href="https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation
Pubmed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Snapgene Viewer	<a href="https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/">https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/</a>

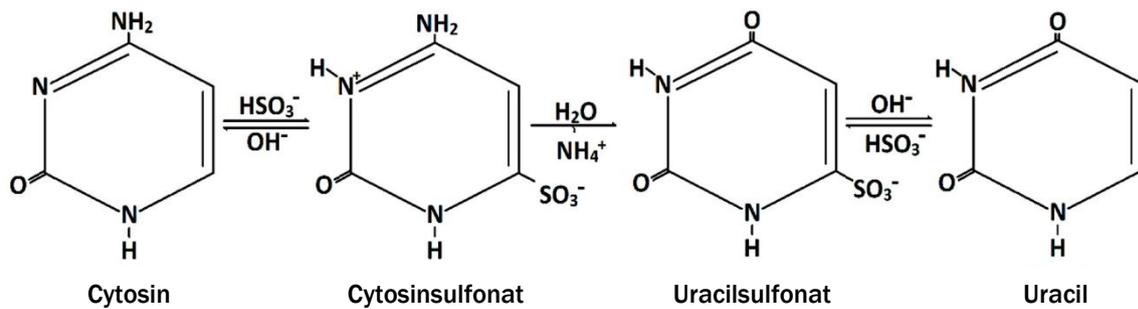
**Table 8:** Verwendete Computerprogramme und Softwares mit jeweiligem Hersteller

## 2.2 Methoden

Es wurden mehrere Zelllinien hinsichtlich des jeweiligen Methylierungsprofils ihrer DNA untersucht, um diese am Ende graphisch abzubilden. Aus den oben aufgeführten Zelllinien wurde je ein Genlocus des *KIR2DL3*-Gens und des *XIST*-Gens analysiert. Die dabei verwendete DNA wurde durch das Urologische Forschungslabor der UKD aus Zellkulturen isoliert. Die Methodik umfasste grob zunächst die Bisulfitkonversion der DNA, um die Methylierungen sichtbar zu machen. Es folgte eine Amplifikation der Genloci, welche danach auf Agarose-Gel aufgetragen wurden, um die DNA-Banden auf ihre Größe und Quantität hin zu beurteilen. Nach Aufreinigung des Gels wurde das DNA-Fragment in einen Vektor ligiert. Dieses Plasmid wurde in chemisch kompetenten *Escherichia coli* kloniert. Die dabei entstandenen Kolonien wurden von den Agarplatten gepickt und in jeweils zwanzig Falcons mit Flüssigmedium weiterhin vervielfältigt, um daraufhin die Plasmide wieder zu isolieren und zu sequenzieren. Nach Sequenzierung wurden die methylierten CG-Positionen in eine Grafik übernommen, in der schwarze Punkte die methylierten Cytosine anzeigen und weiße unmethylierte CG-Positionen. Die Methodik und die dabei durchgeführten Einzelschritte sollen im Folgenden im Detail erläutert werden:

### 2.2.1 Bisulfitkonversion

Zwecks Sichtbarmachen der Methylierungen der Cytosine wird die DNA mit einem entsprechenden Kit konvertiert. Dabei werden die unmethylierten Cytosine in einer chemischen Reaktion zu Uracilen umgewandelt, welche sich im Verlauf der PCR nicht mehr mit Guaninen, sondern mit Adeninen paaren. Diese Adenine paaren sich in der weiteren Amplifikation mit Thymin. An denjenigen Stellen, an denen also vorher ein CG-Dinukleotid zu finden war, lässt sich nach der Sequenzierung ein TG-Dimer finden. Methylierte Cytosine verbleiben dabei als solche und paaren sich weiterhin mit Guaninen, welche sich in der Amplifikation dann auch wieder mit Cytosinen paaren. Auf diese Weise kann nach einer Sequenzierung nachvollzogen werden, welche der Cytosine methyliert waren und welche unmethyliert. Das verwendete EpiTect Bisulfit Kit der Firma Qiagen gibt an, eine Konvertierungsrate von 99% zu erreichen.



**Abb. 5: Modifizierte Abbildung nach Grehl et al., 2018: Bisulfitkonvertierung.** Die Abbildung zeigt den chemischen Prozess der Bisulfitkonversion. Unmethyliertes Cytosin wird letztendlich zu Uracil umgewandelt. Es handelt sich um eine alkalische Desaminierung. Methyliertes Cytosin wird nicht chemisch verändert und verbleibt als solches.

Der Ansatz für die Bisulfitkonvertierung besteht aus folgenden Bestandteilen:

VDNA [500ng]	DNA
40 µl	RNAse free water
85 µl	Bisulfit mix
15 µl	DNA protection Buffer

Der beschriebene Ansatz wurde zwecks Konvertierung über Nacht in den Thermocycler inkubiert. Das Thermocycler-Programm für die Konvertierung umfasst konkret folgende Schritte:

Temperatur	Zeit	Funktion
95 °C	5 min	Denaturierung
60 °C	25 min	Inkubation
95°C	5 min	Denaturierung
60°C	85 min	Inkubation
95°C	5 min	Denaturierung
60°C	175 min	Inkubation
20 °C	∞	Storage

**Tabelle 9: Programm für den Thermocycler zur Bisulfitkonvertierung**

### 2.2.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik in der Molekularbiologie, die dazu dient, DNA in vitro zu vervielfältigen. Dabei werden wiederholte Temperaturzyklen verwendet, um eine spezifische DNA-Sequenz in Millionen von Kopien zu amplifizieren. Bei der PCR kommt eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) zum Einsatz, um den DNA-Strang zu synthetisieren, nachdem er durch Denaturierung bei hoher Temperatur in zwei Einzelstränge aufgeteilt wurde. Durch wiederholte Denaturierung, Annealing (Anlagerung von Primer an die Ziel-DNA) und Extension entstehen exponentiell viele Kopien der Ziel-DNA. Der allgemeine Reaktionsansatz für die durchgeführten Amplifikationen ist im Folgenden aufgelistet:

17 µl	H <sub>2</sub> O
2,5 µl	Buffer
2 µl	DNA
1 µl	dNTPs
1 µl	FW Primer
1 µl	RV Primer
0,5 µl	HotStar Taq DNA-Polymerase

---

=25 µl

Die PCR-Bedingungen wurden jeweils optimiert auf die jeweiligen Primer angewendet. Das Programm für den Thermocycler umfasste allgemein folgende Schritte:

95 °C	95 °C	Spezif.	72°C	72°C
13 min	1 min	50 sec.	25 sec.	3 min

Für den *KIR2DL3*-Locus wurde das Primer-Programm zwecks Optimierung wie folgt angepasst. In der ersten Runde wurden 34 Zyklen mit den äußeren Primern und 34 Zyklen mit den inneren Primern in der zweiten PCR-Runde durchgeführt

95 °C	95 °C	48°C	72°C	72°C
10 min	1:30 min	55 sec.	1 min	3 min

Für den *XIST*-Locus wurde das Primer-Programm zwecks Optimierung wie folgt angepasst. In der ersten Runde wurden 20 Zyklen mit den äußeren Primern und 37 Zyklen mit den inneren Primern in der zweiten PCR-Runde durchgeführt:

95 °C	95 °C	56°C	72°C	72°C
10 min	1 min	50 sec.	25 sec.	3 min

Zu den entstandenen PCR-Produkten wurde Purple Loading Dye dazugegeben. Nach Zugabe von diesem sollte die Menge 1/6 des neuen Volumens betragen, was bei 25 µl PCR-Produkt + 5 µl Loading Dye einem neuen Gesamtvolumen von 30 µl entspricht. Die Loading Dye hatte die Funktion, die Amplifikate auf die Agarose-Gelelektrophorese vorzubereiten, indem deren Dichte erhöht wird und diese farblich sichtbar gemacht werden. Sie enthält zwei unterschiedliche Farbstoffe (Bromphenolblau und Xylencyanol FF) für die Visualisierung der DNA während der Elektrophorese. Das Vorhandensein von Glycerin stellt sicher, dass die DNA in Leiter und Probe eine Schicht auf dem Boden der Geltasche bildet.

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurde zunächst einprozentiges Agarosegel hergestellt, indem 1 Gramm Agarose auf 100ml TBE-Puffer gelöst und danach in einer Mikrowelle so lange erwärmt wurde, bis sich die Agarose komplett im Puffer gelöst hat. Danach wurde der Puffer wieder unter

Schwenken gleichmäßig abgekühlt, um 1,5 µl hitzesensitives Ethidiumbromid dazuzugeben.

Letzteres interkaliert zwischen Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum vom Ethidiumbromid verändert. Die Fluoreszenz bei anschließender Anregung mit ultraviolettem Licht wird so erhöht, weil durch die Interkalation in Nukleinsäuren, das Absorptionsspektrum der DNA verändert wird. Im Agarosegel leuchten dann die Stellen, an denen sich Nukleinsäure befindet, hell, und Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel. Die Lichtintensität ist hierbei proportional zur DNA-Konzentration.

Nach Zugabe des Ethidiumbromids wurde die Gelkammer gegossen, entstandene Luftblasen ausgestochen und das Gel zum Abkühlen stehengelassen.

Daneben kamen 2,5 µl 100 bp Ladder zum Einsatz, die bei jeder durchgeführten Gelelektrophorese jeweils in die linke Kammer zwecks Beurteilung der entstehenden Banden dazugegeben wurde, da die Ladder einen Maßstab zur Identifikation der Amplifikatlänge darstellte.

Die Gelelektrophorese selbst wurde standardmäßig bei 160 Volt und einer Laufzeit von ungefähr einer Stunde in der Gelkammer laufen gelassen, welche selber in TBE-Puffer einlag. Die negativ geladene DNA wandert dabei in Richtung der Anode. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch das Gel als größere. Dies führt zu einer Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die entstandenen Banden unter ultravioletter Bestrahlung aufgenommen und hinsichtlich ihrer Intensität und Größe beurteilt.

#### 2.2.4 Gelaufreinigung

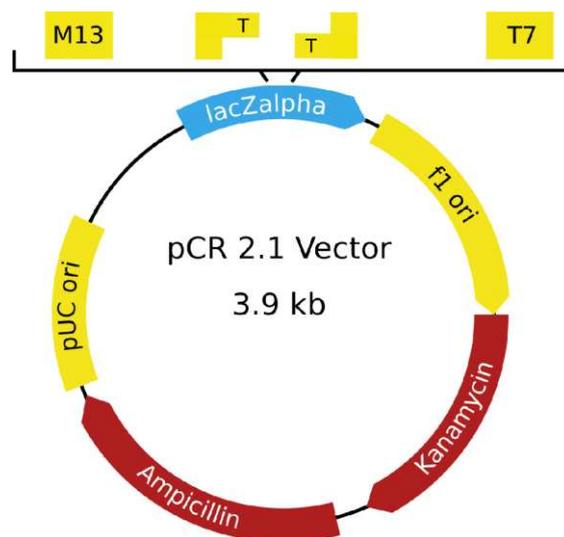
Die DNA wurde unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Die sichtbar gemachte DNA wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Danach wurde das Gel mit einem Kit aufgereinigt, um die DNA wieder vom Gel zu extrahieren. Konkret wurde hierfür das ausgeschnittene Gel zunächst in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 300 µl QG-Buffer dazugegeben, der einen pH-Indikator enthält. Bei 50°C wurde das Gel dann 10 Minuten inkubiert und alle 2-3 Minuten in einem Vortexmischer geschüttelt, bis sich das Gelstück aufgelöst hat. Die Lösung sollte in diesem Schritt gelb sein. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Isopropanol dazugegeben und die Mischung

in spin columns überführt. Das Isopropanol löst die Hydrathülle auf, damit die negativ geladene DNA besser in der Membran der spin columns binden kann, zumal die Hydrathülle die Bindung an diese verschlechtern würde. Die Lösung wurde zentrifugiert, damit die DNA an die dafür vorgesehene positiv geladene Membran innerhalb der spin columns binden konnte. Nach weiterer Zugabe von 500 µl QG-Puffer wurden die columns nochmal zentrifugiert. Schließlich wurden 750 µl PE-Puffer dazugegeben und die DNA 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, um die Reinheit der DNA zu erhöhen und eine verbesserte Auswaschung der Salze zu erzielen. Nach Zentrifugation wurde dieser letzte Schritt noch einmal wiederholt. Bei allen bisher beschriebenen Schritten wurde nach den jeweiligen Zentrifugationen der Durchfluss in den spin columns verworfen. Die spin columns wurden nochmal zentrifugiert und die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, um die DNA mit 35 µl EB-Puffer zu eluieren. Die DNA wurde zunächst für 5 Minuten mit dem EB-Puffer inkubiert, damit diese wieder hydratisieren kann. Es folgte nochmal eine Zentrifugation und der Durchfluss wurde erneut auf die Säule aufgetragen und erneut zentrifugiert, um so viel DNA wie möglich zu eluieren. Alle Zentrifugationsschritte umfassten dabei wie vom Hersteller empfohlen 1 Minute und wurden bei 17900 Umdrehungen durchgeführt. Nachdem die DNA vom Gel aufgereinigt wurde, wurde der DNA-Gehalt in ng/µl zwecks Kontrolle UV/VIS-spektroskopisch gemessen (Programm: NanoDrop).

Das Nanodrop-Photospektrometer ist ein Gerät, das zur Bestimmung und Charakterisierung von Nukleinsäuren und Proteinen verwendet wird. Es basiert auf dem Prinzip der Lichtabsorption: Eine Probe wird auf eine winzige Kapillare aufgetragen und Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen wird durch die Probe geschickt. Die Absorption des Lichts durch die Probe wird gemessen und anhand dieser Daten können die Konzentrationen und Reinheitsgrade der Nukleinsäuren oder Proteine berechnet werden. Das Nanodrop-Photospektrometer zeichnet sich durch seine hohe Empfindlichkeit aus, wodurch auch sehr kleine Probenmengen analysiert werden können.

### 2.2.5 TA Cloning

Der zu untersuchende Genabschnitt wurde in ein Plasmid ligiert, welches eine Ampicillin-Resistenz und die Information für eine Beta-Galactosidase enthält. Beide Eigenschaften wurden im Sinne von Selektionsmechanismen zunutze gemacht, welche weiter unten erläutert werden. Der Ligationsansatz umfasste dabei je 8µl des aufgereinigten DNA-Fragment, 1µl des Plasmids, 1µl eines Ligase-Puffers und 1µl einer T4-DNA-Ligase. Die Ligation geschah dabei über Nacht bei 14°C im Inkubator.



**Abb. 6: TA-Klonierungsvektor.** Modifizierte Darstellung des verwendeten Plasmids der Firma Thermofisher (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K202020>). Die Abbildung zeigt die 3'-Thymin-Überhänge, die sich zunutze gemacht werden, indem die Adeninschwänze der mit Taq-Polymerase synthetisierten PCR-Produkte daran binden können. Weiterhin ersichtlich ist eine inhärente Ampicillinresistenz des Plasmids. Die M13-Bindestelle dient als Startpunkt der Sequenzierungen.

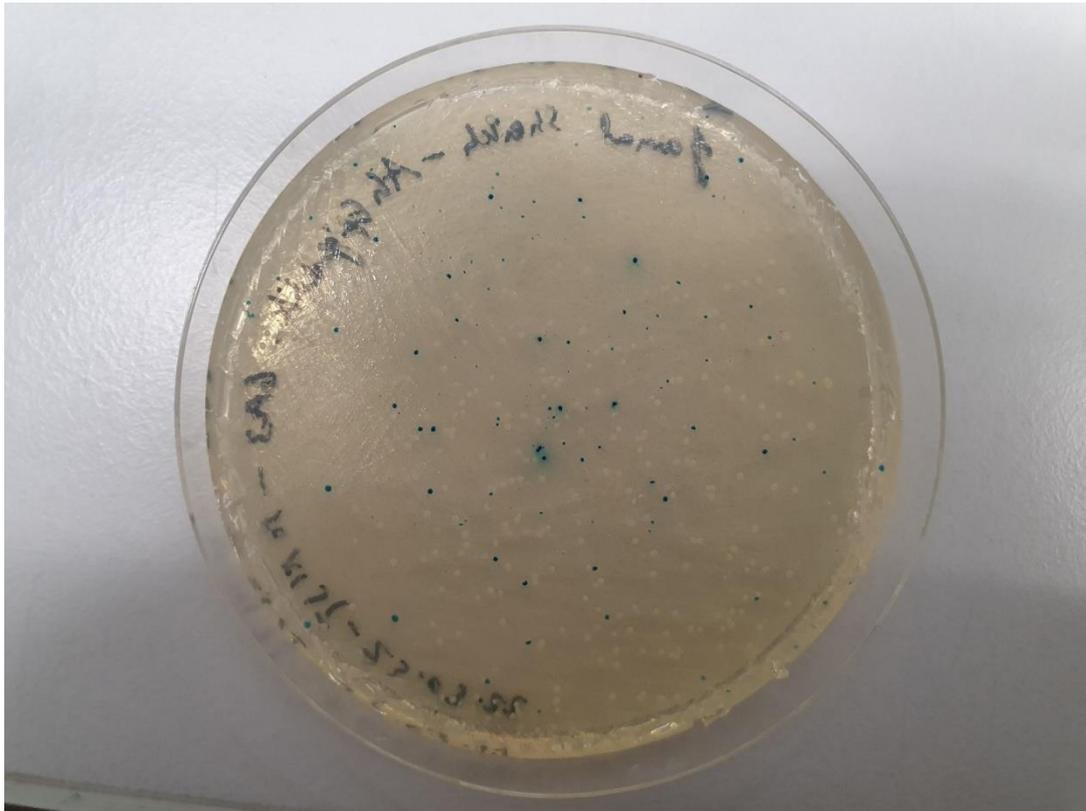
### 2.2.6 Transformation in chemisch kompetente Escherichia coli

Aliquots der verwendeten chemische kompetenten E. coli des Stammes DH5 alpha wurden von Pauline Ott M.Sc. hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Bakterien wurden zunächst 30 Minuten lang in einem Eis gefüllten Behälter aufgetaut, danach wurden 2-4 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Mittels eines Heatshocks wurde die

Aufnahme des Plasmids in die Bakterien erleichtert, indem der Ansatz für 30 Sekunden lang einer Temperatur von 42°C ausgesetzt wurden. Danach wurden 250 µl S.O.C (super optimal condition) Medium hinzugegeben und die Reaktionsgefäße eine Stunde lang in einem Schüttler geschüttelt.

Die Plasmide wurden nach dieser Transformation auf mit XGal (Substrat der  $\beta$ -Galactosidase) beschichteten Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Dabei kommen zwei Selektionsmechanismen zum Tragen: Es wachsen zum einen nur solche Kolonien mit Bakterien, die das Plasmid auch aufgenommen haben, da diese eine Ampicillin-Resistenz vermitteln und die Agarplatten mit Ampicillin versetzt wurden. Zum anderen waren am nächsten Tag von allen Kolonien blaue und weiße Kolonien auf den Platten sichtbar.



**Abb 7: Agarplatte mit *KIR2DL3*-Genlocus in PC3-DNA in Plasmiden, die in *E-coli* eingebracht wurden.** Beispielhaft ist hier eine solche über Nacht bebrütete Agarplatte dargestellt. Zu sehen sind blaue und weiße Kolonien. Die weißen Kolonien stellen solche dar, dessen Bakterien das Plasmid mit dem zu untersuchenden Genabschnitt aufgenommen haben, und somit den Farbstoff nicht mehr umsetzen können. Blaue Kolonien beinhalteten hierbei solche Bakterien, dessen Beta-Galaktosidase noch vollständig war und welche somit das X-Gal noch in einen blauen Farbstoff umsetzen können.

Die weißen Kolonien haben das Plasmid mit erfolgreich inseriertem Genlocus aufgenommen. Diese waren also für die weitere Analyse von Interesse. Von diesen wurden je zwanzig gepickt, in je 2ml Flüssigmedium (bestehend aus 8 mg Medium Broth Base und 250ml Wasser, für eine Stunde im Autoklaven behandelt) überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt, damit sie in diesem anwachsen können. Dabei stellte jede Kolonie ein Allel einer Zelle aus dem ursprünglichen Zellverband der Zellkultur dar. Durch die Auswahl von 20 Kolonien wird so ein Überblick über den Methylierungszustand des Gewebes geschaffen.

### 2.2.7 Plasmidpräparation

Die Plasmide wurden entsprechend der Herstelleranleitung wieder aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt, damit sie für die anschließende Sanger-Sequenzierung verwendet werden konnten. Dabei entstanden aus den gepickten Kolonien durchschnittlich 20 sogenannte „MiniPreps“. Dabei kam das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen zum Einsatz. Konkret geschah dies, indem je 2 ml der Flüssigmedien, in denen über Nacht Bakterien angewachsen waren, in entsprechende Reaktionsgefäße transferiert und die Bakterien bei 8000 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert, wobei die Bakterien sich in Form von Pellets auf dem Boden der Reaktionsgefäße absetzten. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit je 250 µl in P1-Puffer durch Schütteln aufgelöst. Hiernach wurden 250 µl des P2-Puffers dazugegeben, um die bakteriellen Zellen zu lysieren. Die Reaktion wurde dann mithilfe von 300 µl P3-Puffer wieder gestoppt. Zellfragmente, Organellen und bakterielle DNA wurden 10 Minuten lang bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Dabei entsteht ein Präzipitat, welches mit den alten Eppendorf-Reaktionsgefäßen verworfen wird. Die übriggebliebene Plasmid-DNA wurde in dafür vorgesehene spin columns transferiert und konnte in diesen an entsprechende Silikatmembranen binden. Verbliebene Bestandteile wurden mithilfe von zwei nachfolgenden Waschsritten entfernt, zunächst durch Zugabe von 500 µl PB Puffer und dann 750 µl PE-Puffer. Im Anschluss wurden die columns nochmal 1 Minute bei 13000 Umdrehungen leer zentrifugiert, um verbliebenen Puffer und Ethanol zu reduzieren. Schließlich wurden die Plasmidpräparationen mit 35 µl EB-Puffer eluiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die fertigen MiniPreps wurden erneut UV/VIS-spektroskopisch auf einen ausreichenden Nukleotidgehalt gemessen, da für die anschließende Sequenzierung mindestens je 30 ng/µl benötigt wurden.

### 2.2.8 Sanger-Sequenzierung

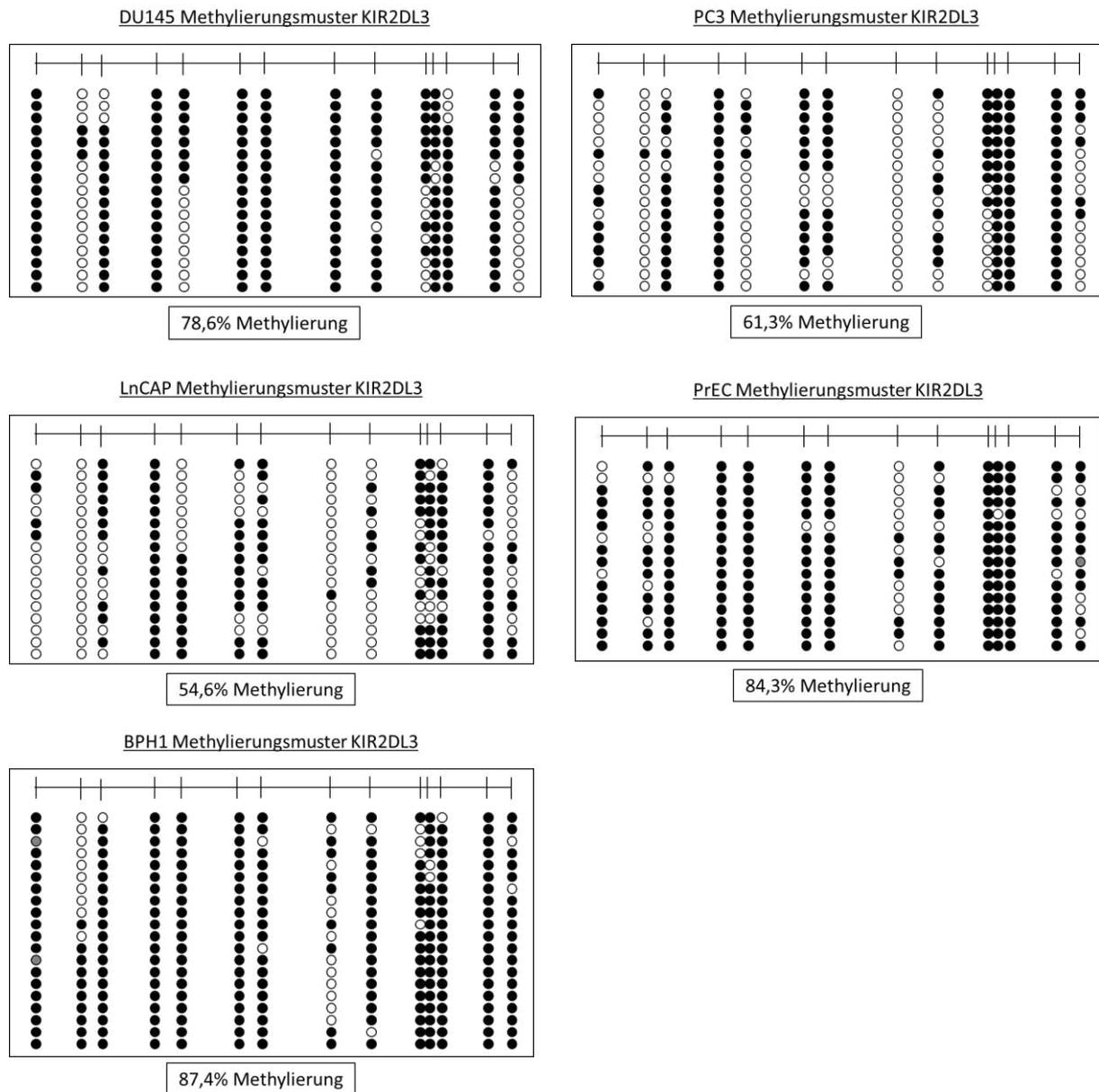
Die Sequenzierungen der Proben wurde durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der HHU Düsseldorf übernommen, welche die Plasmidisolationen mithilfe von Sanger-Sequenzierungen untersuchte. Das verwendete Plasmid (Abbildung Nr. 6) hat eine M13-Primerbindestelle, die als Ansatzpunkt für den Start der Sequenzierung fungierte. Diese hat die Sequenz 5´d[GTAAAACGACGGCCAG]3´.

### 2.2.9 Auswertung der erhobenen Daten

Die Sequenzen wurden auf Länge, Orientierung und vollständige Konvertierung geprüft. Dies geschah, indem die Sequenzen mit einer Referenzsequenz mittels der Online-Software Clustal W2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) verglichen wurden. Der Methylierungsstatus der CpG-Positionen wurde in jeweiligen Abbildungen übertragen, bei der ein schwarzer Punkt eine Methylierung an dem jeweiligen Cytosin darstellt und ein weißer Punkt unmethylierte Cytosine (s. Ergebnisse). Nach Erstellung der beschriebenen Grafiken wurde der Grad der Methylierung in den jeweiligen Zelllinien quantifiziert und als Prozentangabe dazugeschrieben.

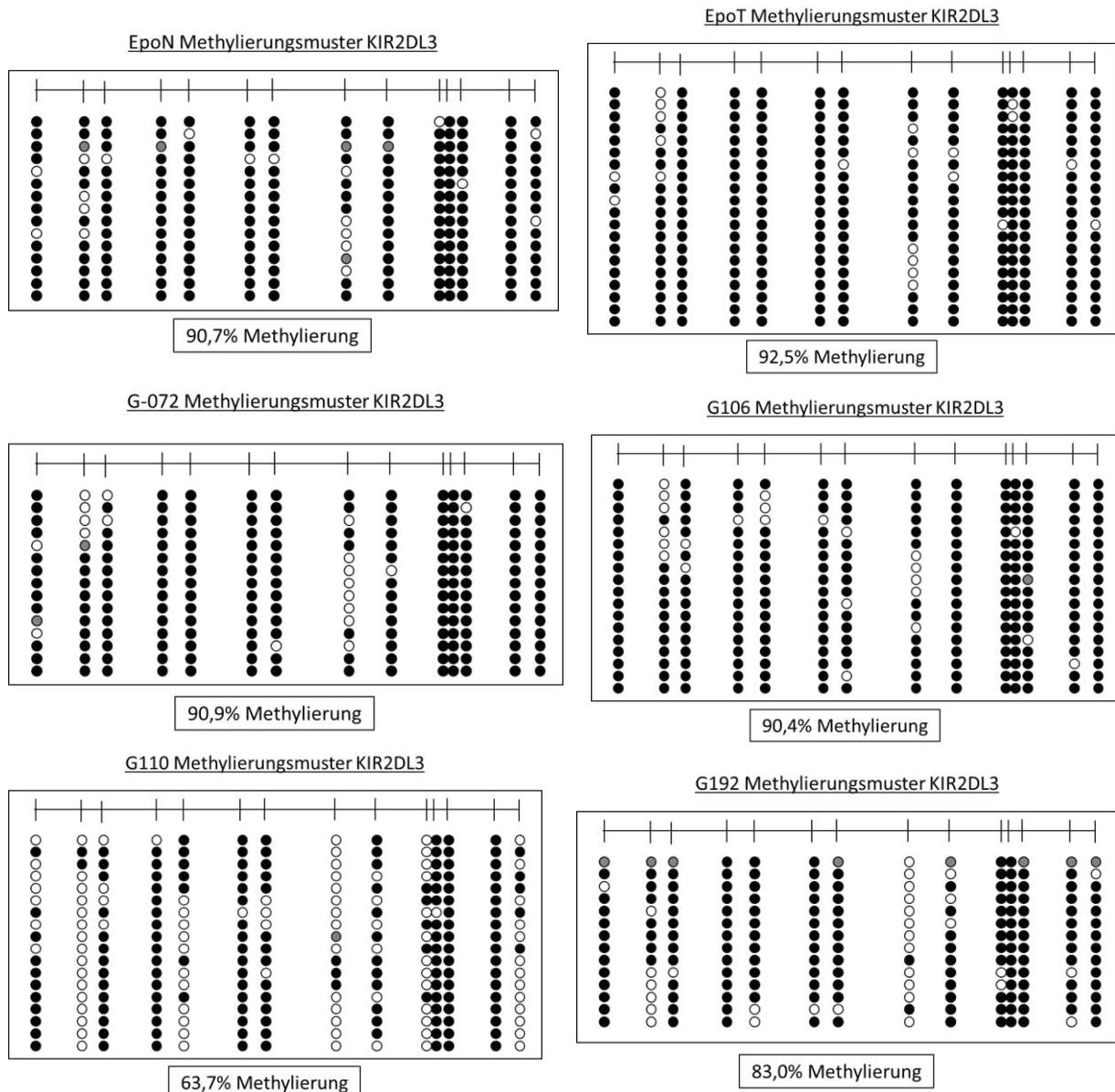
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Methylierungsstatus des CpG-reichen 5'-Genabschnittes des *KIR2DL3*-Gens

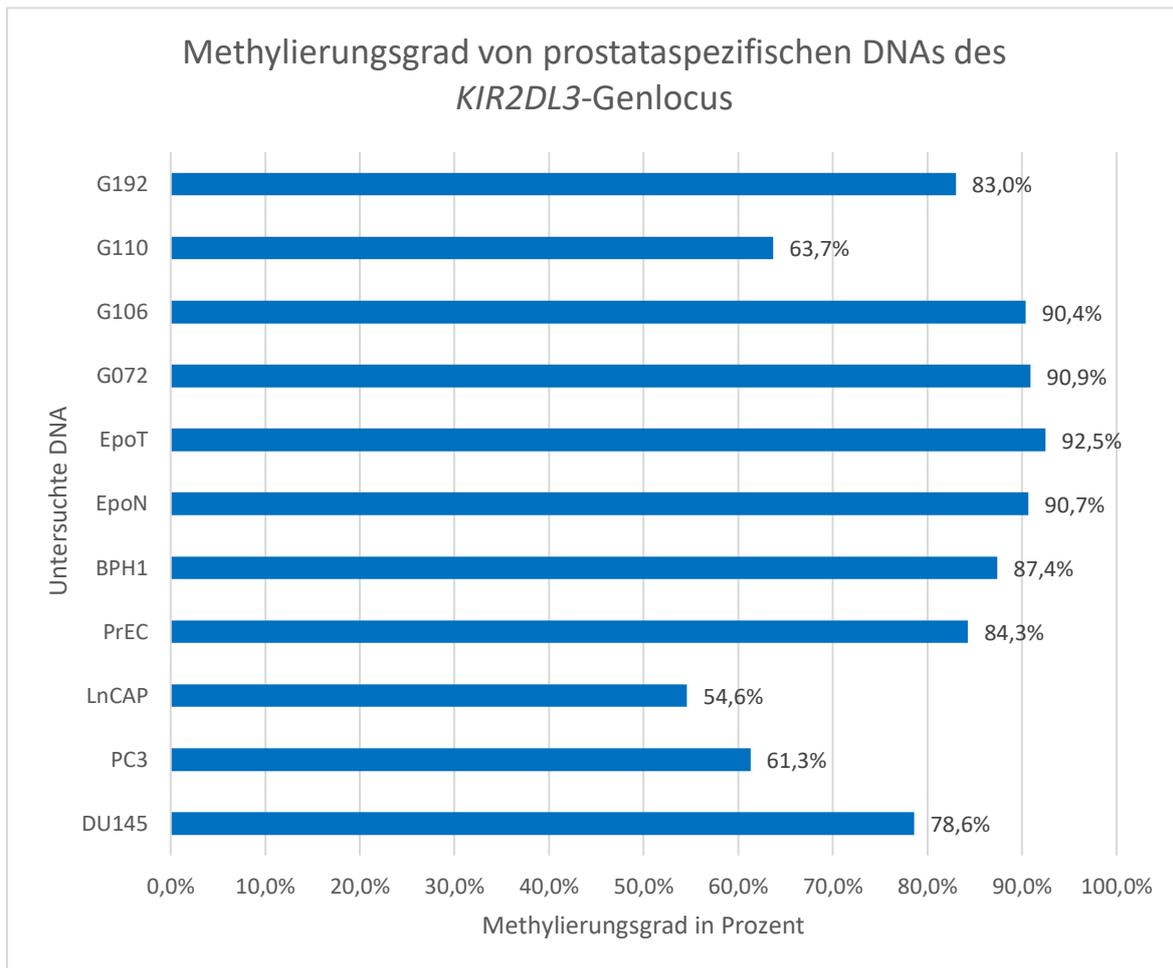


**Abb. 8:** Lollipop-Diagramme der prostata-assoziierten humanen Zelllinien DU145, PC3, LNCaP, PrEC und BPH1. Untersucht wurde ein besonders CpG-reicher Abschnitt des *KIR2DL3*-Gens in den angegebenen DNA-Proben. Die Lollipop-Diagramme stellen die Methylierungsmuster des genannten Genabschnittes dar. Die Linien oben zeigen die Position des Cytosin-Guanosin-Dinukleotids innerhalb des untersuchten Genabschnittes. Jeder schwarze Punkt steht hierbei repräsentativ für eine methylierte CpG-Position, während jeder weiße Punkt eine unmethylierte CpG-Position anzeigt. Nicht bestimmbare CpG-Stellen wurden grau markiert. Der Methylierungsgrad ist jeweils unten quantifiziert worden, indem die methylierten CpG-Positionen durch die Gesamtzahl aller CpG-Positionen geteilt

wurden, dabei wurden nicht-bestimmbare CpG-Positionen aus der Wertung genommen. Jede Zeile repräsentiert eine Sequenz.



**Abb. 9: Lollipop-Diagramme der humanen Prostataprimärproben des *KIR2DL3*-Genlocus.** Es handelt sich um Proben aus Prostatatumorgewebe unterschiedlichen Gradings. Untersucht wurde ein besonders CpG-reicher Abschnitt des *KIR2DL3*-Gens in den angegebenen DNA-Proben. Die Lollipop-Diagramme stellen die Methylierungsmuster des genannten Genabschnittes dar. Die Linien oben zeigen die Position des Cytosin-Guanosin-Dinukleotids innerhalb des untersuchten Genabschnittes. Jeder schwarze Punkt steht hierbei repräsentativ für eine methylierte CpG-Position, während jeder weiße Punkt eine unmethylierte CpG-Position anzeigt. Nicht bestimmbare CpG-Stellen wurden grau markiert. Der Methylierungsgrad ist jeweils unten quantifiziert worden, indem die methylierten CpG-Positionen durch die Gesamtzahl aller CpG-Positionen geteilt wurden, dabei wurden nicht-bestimmbare CpG-Positionen aus der Wertung genommen. Jede Zeile repräsentiert eine Sequenz.

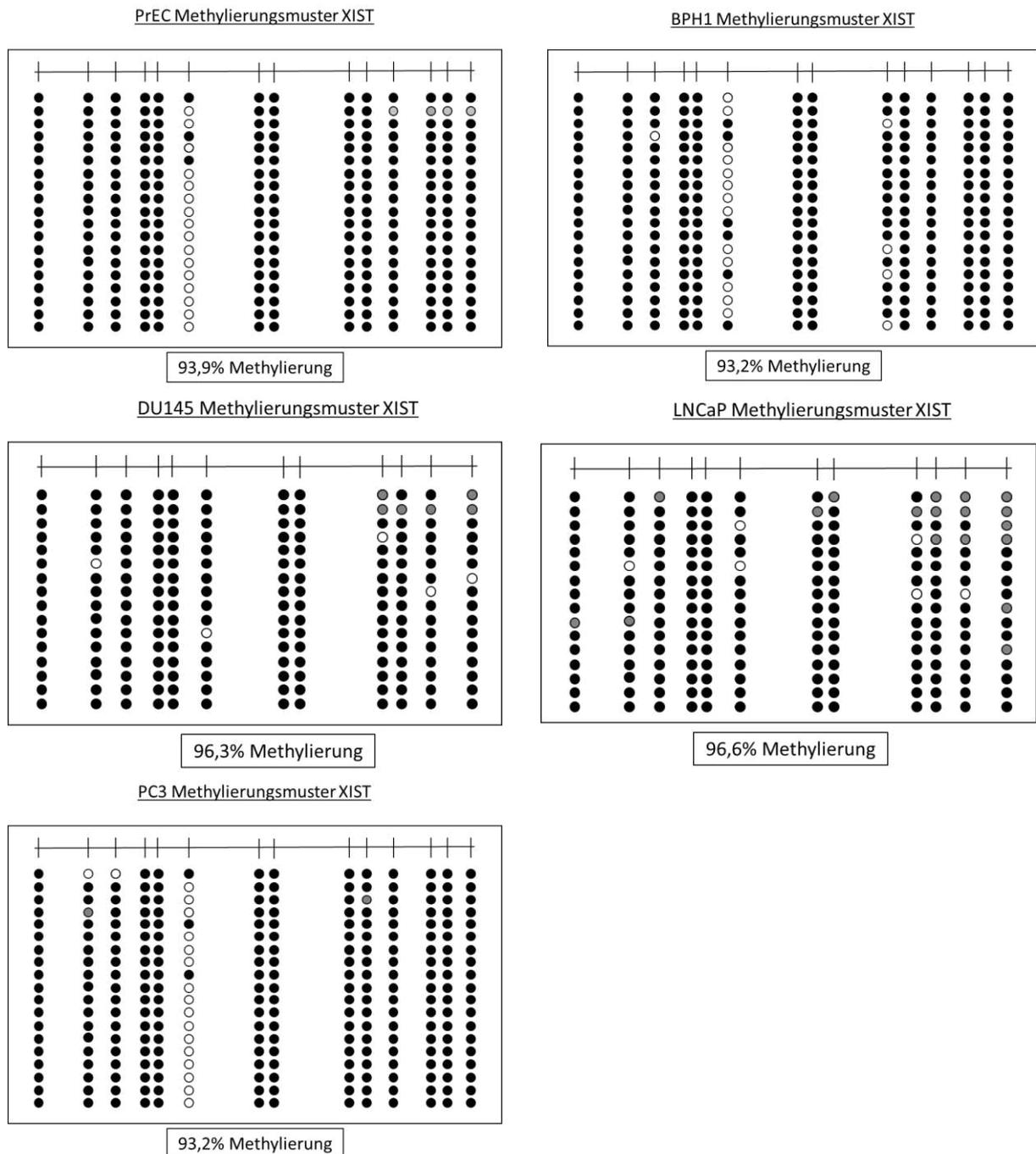


**Abb. 10: Übersicht Methylierungsgrad.** Der jeweilige Methylierungsgrad der untersuchten DNA-Proben ist hier dargestellt worden. Auf der y-Achse sind die jeweiligen DNAs aufgeführt und auf der x-Achse der Methylierungsgrad.

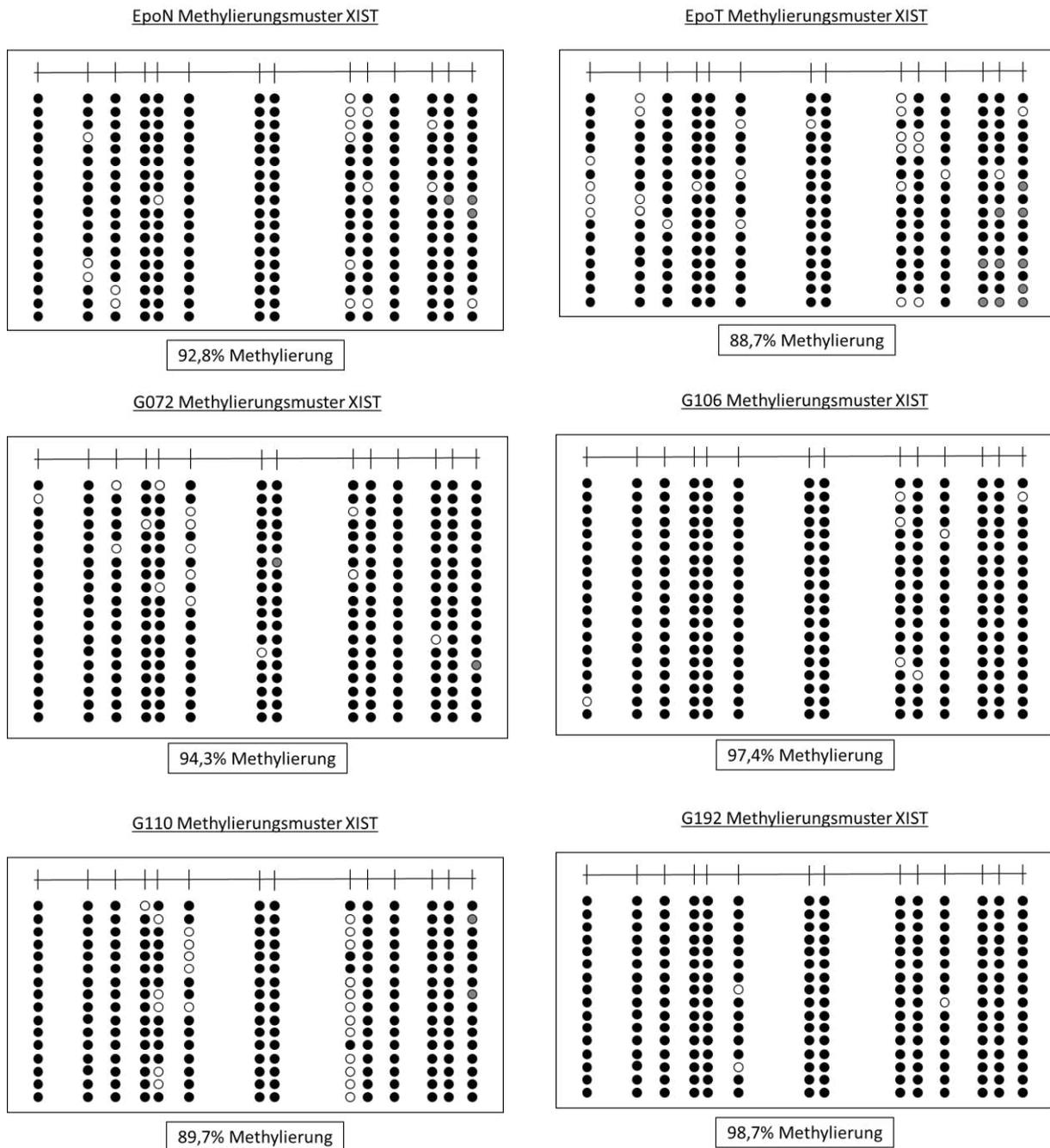
Ziel der Arbeit war es, ein detailliertes Methylierungsmuster zu erstellen und den Methylierungsgrad zu quantifizieren. Hierzu wurden die Sequenzen mithilfe der Sanger-Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung in besonders CpG-reichen Genloci des *KIR2DL3*-Gens in verschiedenen Zellproben untersucht. Danach wurden die Sequenzen mit einer Referenzsequenz verglichen, um zu schauen, ob die ursprünglichen CpG-Positionen methyliert oder unmethyliert sind. Untersucht wurden insgesamt 14 solcher CpG-Positionen im *KIR2DL3*-Genlocus. Die dabei verwendeten DNAs stammten dabei zum einen aus kommerziell erwerblichen Zelllinien (s. Abbildung 8), also immortalisierte Zellen aus Metastasen oder aus Prostatagewebe selber. Zum anderen handelte es sich um Prostataprimärproben (s. Abbildung 9), wobei die DNA aus den betroffenen Prostatatumorzellen isoliert wurde.

Beim *KIR2DL3*-Gen reicht die Methylierung von 54,6% bis 87,4% bei den humanen Zelllinien und bei den Primärproben von 63,7% bis 92,5%. Die durchschnittliche Methylierung des *KIR2DL3*-Genlocus beträgt ca. 73,3% bei den humanen Zelllinien und 85,2% bei den Primärproben. In diesem Zusammenhang ist die zweite CpG-Position und die achte CpG-Position in den meisten Proben im Vergleich hypomethylierter als die anderen Positionen. Genauso ist die fünfte CpG-Position in DU145, PC3 und G110 vergleichsweise hypomethyliert. Herausstechend bei den Prostataprimärproben ist die Probe G110, die unter allen Primärproben insgesamt hypomethylierter ist. Ebenso lässt sich eine Hypomethylierung vor allem in den Proben LnCAP und PC3 mit je 54,3% und 61,3% feststellen, während in allen anderen Proben die Methylierung über 80% (BPH1, PrEC, G192) oder sogar über 90% beträgt (EpoN, EpoT, G072, G106).

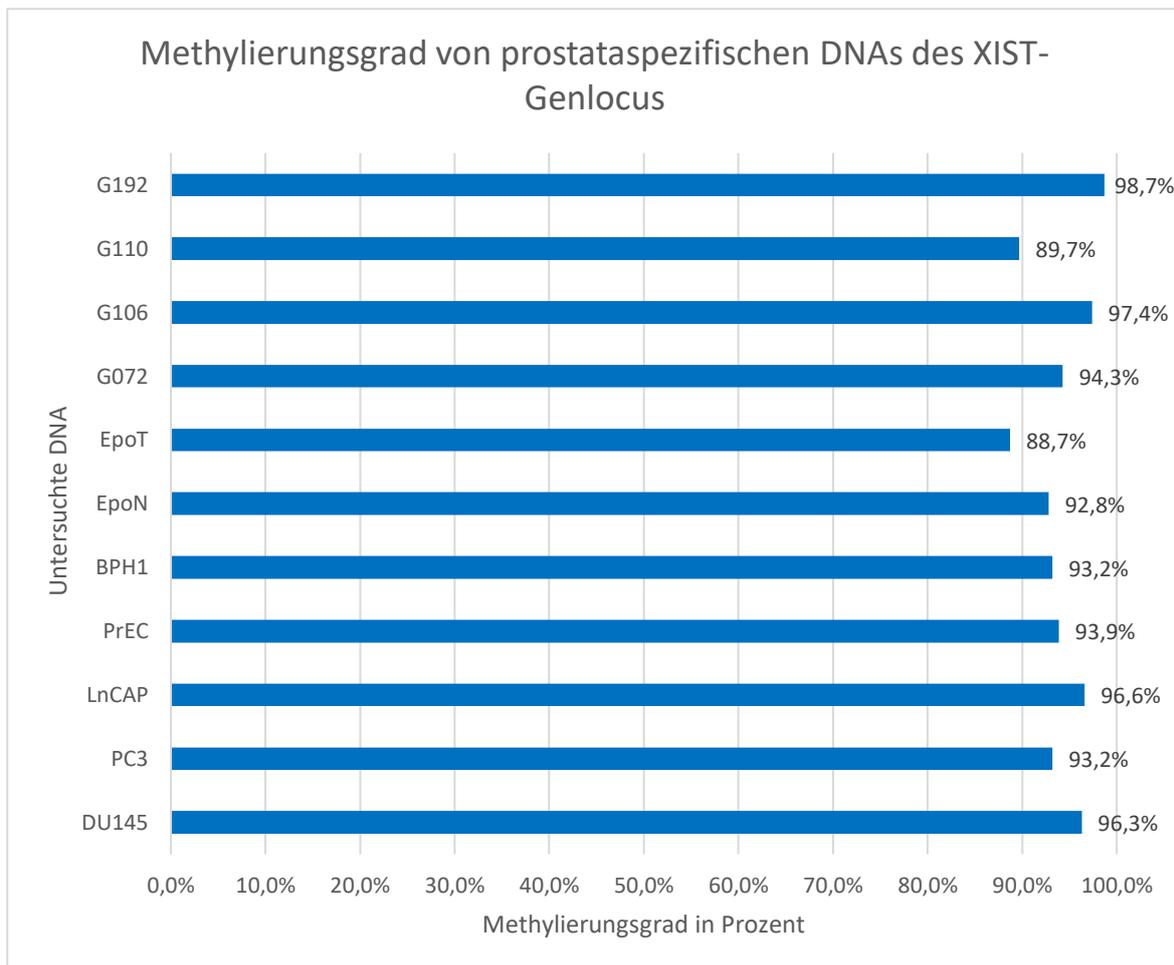
## 3.2 Methylierungsstatus des CpG-reichen 5'-Genabschnittes des *XIST*-Gens



**Abb. 11: Lollipop-Diagramme der prostata-assoziierten humanen Zelllinien DU145, PC3, LNCaP, PrEC und BPH1.** Untersucht wurde ein besonders CpG-reicher 5'-Abschnitt des *XIST*-Gens in den angegebenen DNA-Proben. Die Lollipop-Diagramme stellen die Methylierungsmuster des genannten Genabschnittes dar. Die Linien oben zeigen die Position des Cytosin-Guanosin-Dinukleotids innerhalb des untersuchten Genabschnittes. Jeder schwarze Punkt steht hierbei repräsentativ für eine methylierte CpG-Position, während jeder weiße Punkt eine unmethylierte CpG-Position anzeigt. Nicht bestimmbare CpG-Stellen wurden grau markiert. Der Methylierungsgrad ist jeweils unten quantifiziert worden, indem die methylierten CpG-Positionen durch die Gesamtzahl aller CpG-Positionen geteilt wurden, dabei wurden nicht-bestimmbare CpG-Positionen aus der Wertung genommen. Jede Zeile repräsentiert eine Sequenz.



**Abb. 12: Lollipop-Diagramme der humanen Prostataprimärproben im *XIST*-Genlocus.** Es handelt sich um Proben aus Prostatatumorgewebe unterschiedlichen Gradings. Untersucht wurde ein besonders CpG-reicher 5'genregulatorischer Abschnitt des *XIST*-Gens in den angegebenen DNA-Proben. Die Lollipop-Diagramme stellen die Methylierungsmuster des genannten Genabschnittes dar. Die Linien oben zeigen die Position des Cytosin-Guanosin-Dinukleotids innerhalb des untersuchten Genabschnittes. Jeder schwarze Punkt steht hierbei repräsentativ für eine methylierte CpG-Position, während jeder weiße Punkt eine unmethylierte CpG-Position anzeigt. Nicht bestimmbare CpG-Stellen wurden grau markiert. Der Methylierungsgrad ist jeweils unten quantifiziert worden, indem die methylierten CpG-Positionen durch die Gesamtzahl aller CpG-Positionen geteilt wurden, dabei wurden nicht-bestimmbare CpG-Positionen aus der Wertung genommen. Jede Zeile repräsentiert eine Sequenz.



**Abb. 13: Übersicht Methylierungsgrad im XIST-Genlocus.** Der jeweilige Methylierungsgrad der untersuchten DNA-Proben ist hier dargestellt worden. Auf der y-Achse sind die jeweiligen DNAs aufgeführt und auf der x-Achse der Methylierungsgrad.

Der untersuchte Genlocus im *XIST*-Gen umfasste ebenso wie beim *KIR2DL3*-Genlocus 14 CpG-Positionen. Die Methylierungsgrade reichten bei den humanen Zelllinien von 93,2% bis 96,6% und bei den Primärproben von 88,7% bis 98,7%. Durchschnittlich beträgt die Methylierung in den humanen Zelllinien ca. 94,6% und bei den Primärproben ca. 93,6%. Der *XIST*-Genlocus weist insofern im Vergleich zum *KIR2DL3*-Genlocus eine geringere Streubreite der Methylierungsgrade auf, als dass die Methylierungsgrade in allen DNA-Proben um 90% herum sind, während sie beim *KIR2DL3*-Genlocus von 54,6% bis 92,5% reichen.

Der *XIST*-Genlocus ist überwiegend hypermethyliert, während es im *KIR2DL3*-Genlocus einige umschriebene CpG-Positionen mit überwiegender Hypomethylierung gibt. Herausstechend ist die sechste CpG-Position in BPH1, PrEC und in PC3, weil diese Position in den genannten DNAs hypomethyliert ist. Genauso ist die neunte CpG-Position in G110 vergleichsweise hypomethyliert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Stimmen die Ergebnisse mit den Daten aus den Microarrays überein?

In den Microarraydaten (siehe Abb. 1) zeigt sich ein Unterschied in beiden untersuchten Genabschnitten, sowohl im *KIR2DL3*- als auch im *XIST*-Gen. Im *KIR2DL3*-Genlocus wurde durch Sangersequenzierung nach Bisulfitkonvertierung ein Unterschied in sechs von elf untersuchten DNA-Proben festgestellt, insbesondere zwischen G110, LnCAP, PC3, DU145 auf der einen Seite und PrEC und BPH auf der anderen Seite.

Im *XIST*-Genlocus wurde durch Sangersequenzierung nach Bisulfitkonvertierung eine deutliche Hypermethylierung in fast allen Positionen und Proben festgestellt, im Gegensatz zu den Microarray-Daten, die einen Unterschied zwischen Tumor-assoziiertes DNA und Nicht-Tumor-DNA zeigten. Obwohl konsistente Hypomethylierungen im Prostatakarzinom für das *XIST*-Gen in der Literatur bereits beschrieben sind (Laner et al., 2005), stehen die vorliegenden Daten den Feststellungen aus den Microarrays und der Literatur entgegen. Es gibt verschiedene mögliche Gründe für diese Abweichungen.

Eine mögliche Ursache könnte eine fehlerhafte Bisulfitkonvertierung sein, die zu einer unvollständigen Konvertierung des Genabschnitts geführt haben könnte. Die verwendete Methode beinhaltet jedoch eine interne Kontrolle, um die Konvertierung zu überprüfen. Daher wird die Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung aufgrund des geringen Fehlerpotenzials als Goldstandard zur Beurteilung des Methylierungsstatus eines Genabschnittes angesehen, unabhängig vom verwendeten Kit (Leontiou et al., 2015). Eine andere mögliche Ursache für die Unterschiede könnte sein, dass die entworfenen Primerpaare für den *KIR2DL3*-Genlocus und den *XIST*-Genlocus nicht den gewünschten Bereich amplifiziert haben, sondern stattdessen eine andere CpG-reiche Region bevorzugt wurde. Dieser Gedanke wird jedoch durch die Tatsache widerlegt, dass in der verwendeten etablierten Methodik nach jeder PCR-Amplifikation eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt wurde, um den zu untersuchenden Bereich hinsichtlich seiner Länge zu identifizieren. Außerdem stimmt

die Referenzsequenz aus der Genomdatenbank weitgehend mit den sequenzierten Sequenzen überein.

Möglicherweise liegt der Unterschied auf der anderen Seite in den Arrays. Dies erscheint aufgrund der geringen Fehlerwahrscheinlichkeit der Immunpräzipitation methylierter DNA (MeDIP) eher unwahrscheinlich (Thu et al., 2009). Es ist dennoch denkbar, dass der Bereich, der mithilfe der Mikroarray-Daten untersucht wurde, einen anderen CpG-reichen Genabschnitt bevorzugt hat als der Bereich, der mittels Bisulfitkonvertierung analysiert wurde. Dies liegt daran, dass die methylierte DNA zunächst fragmentiert und dann denaturiert wird, um unterschiedlich große und unterschiedlich stark methylierte DNA-Fragmente zu erzeugen, die dann von Methylcytosin-gerichteten Antikörpern gebunden werden (Zhou et al., 2018). Die Bindung der Antikörper an die DNA-Fragmente hängt von der Anzahl der Methylcytosine im Fragment ab (Meehan et al., 1992). Es zeigt sich, dass es um den untersuchten Genabschnitt herum weitere CpG-reiche Positionen gibt (s. Abb. 3 und 4), die möglicherweise in der MeDIP bevorzugt wurden und nicht den gleichen Genabschnitten entsprachen, die mittels Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung analysiert wurden.

Die Abweichungen könnten auch von den DNA-Proben herrühren. Es wurden kommerziell erhältliche humane Zelllinien untersucht, die zu einem bestimmten Zeitpunkt aus Metastasen immortalisiert wurden und daher nicht die exakte Realität widerspiegeln können, da sie nicht direkt aus dem Primarius oder dem Prostata tumor stammen. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass Zelllinien in Bezug auf ihr Methylierungsmuster eine andere epigenetische Ausstattung aufweisen als direkt von Patienten entnommene Primärproben, da die Zelllinien in denselben Genregionen eher hypermethyliert zu sein scheinen (Paz et al., 2003; Smiraglia et al., 2001). Es wurden jedoch neben Zelllinien-DNA auch Primärproben, isoliert aus Prostata tumor-DNA, analysiert. Diese Proben wurden sorgfältig extrahiert und alle Methoden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, um die Aussagekraft bezüglich der untersuchten Methylierungsmuster zu erhöhen. Bei den verwendeten Primärproben handelt es sich um hochwertiges Material, da diese alle mikrochirurgisch mittels Feinnadelpunktion entnommen wurden (Araújo-Bravo et al., 2023). Verunreinigungen der Proben sind sehr unwahrscheinlich, da dies die gängigste Methode zur Gewinnung von Prostata tumorgewebe darstellt (Debes and Tindall, 2004).

## 4.2 Klinische Anwendung und Ausblick:

Derzeit ist der gängige laborchemische Marker, der einen ersten Anhalt auf das Vorliegen eines Prostatakarzinoms geben kann, der sogenannte PSA-Wert (van der Burgt et al., 2020). Dieser Wert hat jedoch mehrere Nachteile. Erstens hat er nur eine geringe Spezifität für das Prostatakarzinom selber und ist auch bei Patienten mit Benigner Prostatahyperplasie erhöht (Logozzi et al., 2017). So kann ein PSA-Level zwischen 2.0 to 3.9 ng/ml nur ca. 14.3% aller Prostatatumoren detektieren (Raaijmakers et al., 2004). Zweitens kann er durch andere Faktoren wie Alter, Entzündungsprozesse oder auch mechanischen Druck beeinflusst werden (Lumbreras et al., 2023). Ausgang der vorliegenden Studie war, dass ein epigenetisch basierter Biomarker die Diagnosegenauigkeit bei pathologisch unklaren Fällen erhöhen könnte. Man geht mittlerweile nämlich davon aus, dass Urin und Blut die epigenetischen Veränderungen, die beim Prostatakarzinom auftreten, im Sinne einer Liquid biopsy einfach zugänglich machen und sensitiv widerspiegeln können (Silva et al., 2020).

Die Untersuchung von Methylierungsmustern könnte dazu beitragen, den epigenetischen Mechanismus von Prostatakrebs besser zu verstehen. Dies könnte zur Entwicklung neuer Modelle der Krebsentstehung und -progression beitragen. Es war wichtig, die spezifische Methylierungsstelle der Gene *XIST* und *KIR2DL3* zu identifizieren, die am engsten mit Prostatakrebs assoziiert sind. Hochauflösende Techniken wie die Bisulfit-Sequenzierung können dabei helfen, diese spezifischen Veränderungen zu identifizieren.

### Ansatz zur Entwicklung eines Biomarkers:

Vorteil der verwendeten Methode, respektive der Bisulftkonvertierung ist eine hohe Auflösung. Mithilfe dieser kann ein kleiner Genabschnitt genaustens auf seine Methylierungsmuster analysiert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine spezifische Analyse von DNA-Regionen hinsichtlich ihrer Methylierungsmuster an einzelnen CpG-Regionen verschiedene Gewebearten sicher voneinander differenzieren kann, zumal epigenetische Veränderungen während der zellulären Differenzierung weitgehend konsistent sind (Schmidt et al., 2020).

Nachdem das Methylierungsmuster durch die Bisulfitesequenzierung aufgeklärt wurde, können diese Erkenntnisse zur Entwicklung einer methylierungsspezifischen

PCR genutzt werden. Im Vergleich zur Sequenzierung kann dieser Test schneller und kostengünstiger durchgeführt werden und ist entsprechend besser für eine klinische Anwendung geeignet. Dieser Test kann kleine Veränderungen in der Methylierung erkennen (de Vos et al., 2017). Wenn eine einzelne CpG-Position beispielsweise in allen untersuchten Allelen methyliert wäre, während sie im Prostatakarzinom durchgehend nicht-methyliert ist, oder andersherum, so könnte man an diesen Stellen spezifische Primer erstellen, die genau diesen Unterschied einfangen könnten (Yu et al., 2015). Eine solche methylierungsspezifische PCR unterliegt mehreren Schritten (Kristensen and Hansen, 2009). Zunächst wird die zu untersuchende DNA mithilfe einer Bisulfitkonvertierung so verändert, dass methylierte Cytosine als solche verbleiben, während unmethylierte Cytosine zu Uracilen umgewandelt werden. Daraufhin werden zwei Primer erstellt, einer der die methylierte DNA bindet, der andere bindet die DNA unabhängig von der Methylierung und amplifiziert diese jeweils. Das Primerdesign wird so gewählt, dass für eine optimale Bindung mindestens drei CpG-Positionen von diesem Primer gebunden werden (Wojdacz et al., 2009), der als Startpunkt der Amplifikation der methylierten DNA dienen soll. Der methylierungsspezifische Primer kann dabei lediglich die methylierte DNA binden und nicht den unmethylierten Genlocus. Der nicht-methylierungsspezifische Primer bindet DNA unabhängig vom Methylierungsstatus. Bei dieser Methode vergleicht man die Messdaten anschließend mit einer Probe mit bekanntem Methylierungsstatus (gesunde Kontrolle etc). Es ist wichtig auszuschließen, dass die Messunterschiede daraus resultieren, dass man unterschiedlich viel DNA in die Reaktionen eingesetzt hat. In dem man die Messdaten mithilfe der nicht-methylierungsspezifischen Primer normiert kann man davon ausgehen, dass die Messunterschiede aus den Methylierungsunterschieden resultieren.

Eine erweiterte Methode der beschriebenen methylierungsspezifischen PCR stellt die von der AG Epigenetik erstmals beschriebene „Idiolokale Normierung“ (Santourlidis et al., 2016) dar. Genetische Abnormalitäten in DNA-Proben wie Aneuploidie oder unterschiedliche Kopiezahlen können zu inkorrekten Ergebnissen führen, da die Ziel- und Referenzsequenz (auf dessen Basis das Primerdesign erstellt wird) sich unterscheiden könnten. Bei der idiolokalen Normierung wird der Locus für die methylierungsunabhängige Amplifikation der gewünschten Sequenz nahe des methylierungsabhängigen Ziels gelegt. So wird sichergestellt, dass die Kopieanzahl der Ziel- und Referenzsequenz dieselbe ist. Dies führt zu einem genaueren Ergebnis bei

der Anwendung einer methylierungsspezifischen Real-Time-PCR (Mao and Chou, 2010). In einer methylierten DNA käme es hierbei zu einem Fluoreszenzsignal, was ein indirektes Zeichen wäre, dass der Genlocus methyliert ist. In unmethylierter DNA käme es zu keiner Amplifikation und somit keinem Fluoreszenzsignal. Dies wäre eine Möglichkeit, mithilfe einer PCR zielgenau diejenige CpG-Position zu analysieren, die in allen Prostatakarzinomen hypomethyliert ist, während sie in Normalgewebe hypermethyliert wäre, oder andersherum. Ein solcher Unterschied wäre beispielsweise an CpG-Position 2 und 8 im untersuchten *KIR2DL3*-Genlocus denkbar, da hier in prostatatumor-assoziierten DNAs eher eine konsistente Hypermethylierung zu beobachten ist, während in nicht-entarteter DNA eher eine Hypomethylierung in entsprechenden Positionen zu beobachten ist. Dieser Unterschied ist allerdings nicht konsistent und in jedem beobachteten Allel sichtbar, dass er als Biomarker fungieren könnte. Damit eine methylierungsspezifische PCR funktionieren kann, ist es notwendig, dass nahezu jedes Allel in dieser CpG-Position den Unterschied zwischen Prostatatumorzelle und Nicht-Tumorzelle widerspiegelt, damit eine verlässliche Aussage über den Malignitätszustand der Zelle gemacht werden kann. Es könnte interessant sein auf Basis der Daten zu untersuchen, warum es zu einer vermehrten Demethylierung dieser spezifischen Positionen kommt.

Ein potentieller Biomarker muss auf seine diagnostische Sensitivität (Fähigkeit, Krebsfälle zu erkennen) und Spezifität (Fähigkeit, gesunde Fälle zu erkennen) bewertet werden. Ein guter Biomarker sollte eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Dazu sollte er kostengünstig und schnell bestimmbar sein, damit er alltagstauglich in der klinischen Anwendung ist. Es ist insofern wichtig zu betonen, dass die Entwicklung von Biomarkern ein komplexer und mühsamer Prozess ist, der Zeit, Ressourcen und eine gründliche wissenschaftliche Grundlage erfordert. Es bedarf weiterer größerer und langfristig angelegter Studien, um einen epigenetischen Unterschied zwischen Prostatatumor- und Nicht-Tumor-DNA sicher vorhersagen zu können. Vorliegende Studie könnte einen ersten Schritt darstellen, der Entwicklung eines Biomarkers näherzukommen.

### 4.3 Limitationen und Einschränkungen:

Trotz der wertvollen Erkenntnisse, die diese Studie zu *XIST*- und *KIR2DL3*-Genmethylierungsmustern bei Prostatakrebs liefert, unterliegt die vorliegende Studie einigen wichtigen Limitationen und Einschränkungen, welche im Folgenden erwähnt werden sollen.

Erstens handelt es sich bei den verwendeten Primärproben selbst auch vom Pathologen als Tumor identifiziertes Material. Zwar kann ein Großteil der Prostatatumore von Pathologen allein mithilfe eines Lichtmikroskops als solche identifiziert werden (Warrick and Tomlins, 2018), allerdings gibt es auch einige Fälle, in denen weiterführende Methoden wie Immunhistochemie oder In-situ-Hybridisierung, nützlich sind. Diese können beispielsweise in der Unterscheidung von intraduktalen Karzinomen und intraepithelialen Neoplasien nützlich sein. Darüber hinaus kommen weiterführende Methoden auch in Betracht, um Prostatakarzinome von benignen Läsionen sicher voneinander zu differenzieren, da auch benigne Läsionen von Zeit zu Zeit maligne Erscheinungsmerkmale wie fehlende Basalzellen, vergrößerte Nucleoli oder adenomatöse Hyperplasie aufweisen (Magi-Galluzzi, 2018). Vor allem Basalzellhyperplasien stellen eine diagnostische Herausforderung dar, wenn lediglich ein Lichtmikroskop zur Diagnostik verwendet wird (Egevad et al., 2021). Bei den entnommenen Proben kann alles in allem mit relativ hoher Gewissheit davon ausgegangen werden, dass es sich auch um tatsächlich richtig identifiziertes Tumorgewebe handelte, da diese von einem erfahrenen Pathologen identifiziert wurden.

Zweitens ist die die Anzahl der untersuchten Zelllinien und Primärproben als begrenzt anzusehen, da insgesamt fünf kommerziell erwerbliche humane Zelllinien verwendet wurden und auf der anderen Seite sechs Primärproben, die direkt aus Prostatagewebe entstammten. Größere Probengrößen ermöglichen einen breiteren Überblick über exakte Methylierungsmuster und führen möglicherweise zu noch zuverlässigeren Ergebnissen.

Drittens kann der Einfluss von Umweltfaktoren wie z.B. Ernährung, Toxinbelastung und Lebensstil auch epigenetische Veränderungen hervorrufen (Tao et al., 2021). Diese können im Rahmen der Studie nicht berücksichtigt werden, weil für eine

Berücksichtigung eine Befragung der Personen hinsichtlich ihres Lebensstils und Umweltfaktoren erfolgen müsste. So konnte beispielsweise in anderen Studien gezeigt werden, dass der Alterungsprozess wie die Tumorentstehung mit einer genomweiten DNA-Hypomethylierung korreliert, die über eine Reaktivierung von pluripotenten Transkriptionsfaktoren und Retrotransposons innerhalb repetitiver DNA zur Genominstabilität führt (Ehrlich, 2002).

Letztlich konzentrierte sich unsere Studie hauptsächlich auf Experimente im Labor im Sinne einer Momentaufnahme der verwendeten prostata-assoziierten DNAs. Es kann von Interesse sein, Methylierungsmuster mit klinischen Daten wie Patientenüberleben und Krankheitsverlauf zu korrelieren, um die klinische Relevanz wichtiger Veränderungen zu bestimmen. So könnten weiterführende Arbeiten als Langzeitstudien ausgelegt werden, um etwaige Veränderungen im Methylierungsmuster aufzudecken.

Epigenetische Veränderungen unterliegen häufig einem komplexen Wechselspiel durch andere epigenetische Mechanismen wie Histonmodifikationen, Chromatinstruktur und nichtkodierende RNAs (Cedar and Bergman, 2009; Peschansky and Wahlestedt, 2014). Diese Wechselwirkungen können die Komplexität der beobachteten Methylierungsmuster erhöhen. Die genaue biologische Bedeutung der in *XIST* und *KIR2DL3* beobachteten Methylierungsveränderungen ist nicht vollends verstanden. Weitere experimentelle Forschung ist erforderlich, um zu eruieren, wie sich diese Veränderungen der untersuchten Genloci auf die Genexpression und die zugrundeliegenden zellulären Prozesse auswirken.

## 4.4 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Analyse der *KIR2DL3*- und *XIST*-Genmethylierungsmuster beim Prostatakarzinom, sowohl in verschiedenen kommerziell erwerblichen Zelllinien als auch in prostataassoziierten Primärproben von Patienten mit Prostatakrebs. Die Ergebnisse dieser Studie geben Aufschluss über die detaillierten DNA-Methylierungsprofile dieser Regionen im Prostatakarzinom

Von besonderem Interesse sind dabei die differenziellen Methylierungsmuster zwischen Prostatanormalgewebe und Prostatatumorzellen, die bereits in Genchips nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtungen können unterschiedliche biologische und klinische Auswirkungen haben. Erstens könnten diese Unterschiede auf die Modulation der Genexpression durch Methylierung hinweisen, die zur Entstehung und Progression von Prostatakrebs beiträgt. Methylierung kann die Transkriptionsaktivität von Genen beeinflussen und möglicherweise Signalwege und Netzwerke beeinflussen, die am Wachstum, der Metastasierung und der Therapieresistenz von Tumorzellen beteiligt sind (Romero-Garcia et al., 2020).

Die Tatsache, dass diese Unterschiede mithilfe der verwendeten unabhängigen Methodik, also der Sequenzierung nach Bisulfitkonvertierung, nur teilweise vorhanden sind, könnte ein Hinweis auf die starke Heterogenität des Prostatatumors sein. Krebszellen in Tumoren sind häufig genetisch und epigenetisch vielfältig, was zu einer unterschiedlichen Genexpression und damit zu unterschiedlichen Reaktionen auf Therapien führen kann. Dieser Unterschied kann auf genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und die individuelle Behandlungsgeschichte zurückzuführen sein (Martin and Fry, 2018). Hauptursache beim *XIST*-Gen war wahrscheinlich, dass nicht exakt der Bereich von der genomischen Sequenzierung erwischt wurde, der auf der Array-Ortung angegeben war. Dennoch liefert das Ergebnis vor allem in Probe G-110 ein fast durchgehend unmethyliertes CpG. An genau solchen differenziell methylierten Positionen können die Primer des MSPCR enden, um schnell, effizient und kostengünstig feststellen zu können, in welchen Proben exakt diese Veränderung vorkommt.

Die Verwendung verschiedener Zelllinien und Ausgangsproben in dieser Studie erhöht die Zuverlässigkeit der Ergebnisse und erhöht ihre Anwendbarkeit auf verschiedene klinische Situationen. Dies unterstreicht die klinische Relevanz der Methylierungsmuster, die bei vielen Arten von Prostatakrebs beobachtet werden. Obwohl Erkenntnisse gewonnen wurden, konnten einige Fragen nicht abschließend geklärt werden und können in zukünftigen Forschungsbemühungen behandelt werden. Die funktionelle Bedeutung der in *XIST* und *KIR2DL3* beobachteten Methylierungsmuster muss weiter untersucht werden.

Insgesamt liefert diese Studie wertvolle Einblicke in die epigenetischen Veränderungen, die bei Prostatakrebs auftreten. Diese Ergebnisse können als Grundlage für weitere Forschungen dienen, die zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze zur Verbesserung der Behandlung und Kontrolle von Prostatakrebs führen könnten. Die Ergebnisse könnten in Zukunft dazu beitragen, eine neue epigenetische Klassifikation des Prostatatumors durch Idioloale Normierung hervorzubringen, indem weitere CpG-Positionen auf ihren Methylierungsstatus untersucht werden.

## 5. Literatur-/Quellenverzeichnis

- Algarra, I., Collado, A., Garrido, F., 1997. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27, 95–102. <https://doi.org/10.1007/BF02912442>
- Ambrosi, C., Manzo, M., Baubec, T., 2017. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *J. Mol. Biol.* 429, 1459–1475. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.008>
- Angelopoulou, R., Lavranos, G., Manolakou, P., 2008. Regulatory RNAs and chromatin modification in dosage compensation: A continuous path from flies to humans? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-12>
- Araújo-Bravo, M.J., Erichsen, L., Ott, P., Beermann, A., Sheikh, J., Gerovska, D., Thimm, C., Bendhack, M.L., Santourlidis, S., 2023. Consistent DNA Hypomethylations in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 386. <https://doi.org/10.3390/ijms24010386>
- Ayyıldız, S.N., Ayyıldız, A., 2014. PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer. *Turk. J. Urol.* 40, 82–88. <https://doi.org/10.5152/tud.2014.94547>
- Bjartell, A., Montironi, R., Berney, D.M., Egevad, L., 2011. Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 50 Suppl 1, 76–84. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2010.531284>
- Boddy, J.L., Gal, S., Mallone, P.R., Harris, A.L., Wainscoat, J.S., 2005. Prospective Study of Quantitation of Plasma DNA Levels in the Diagnosis of Malignant versus Benign Prostate Disease | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research [WWW Document]. URL <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/11/4/1394/188858/Prospective-Study-of-Quantitation-of-Plasma-DNA> (accessed 12.26.23).
- Bothur-Nowacka, J., Jezela-Stanek, A., Zaniuk, K., Goryluk-Kozakiewicz, B., Krajewska-Walasek, M., Dobrzańska, A., 2013. Tetraploidy in the era of molecular karyotyping – What we need to remember. *Pediatr. Pol.* 88, 467–471. <https://doi.org/10.1016/j.pepo.2013.06.002>
- Bott, S.R.J., Birtle, A.J., Taylor, C.J., Kirby, R.S., 2003. Prostate cancer management: (1) an update on localised disease. *Postgrad. Med. J.* 79, 575–580. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.936.575>

- Brockdorff, N., 2019. Localized accumulation of Xist RNA in X chromosome inactivation. *Open Biol.* 9, 190213. <https://doi.org/10.1098/rsob.190213>
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S., Rastan, S., 1992. The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* 71, 515–526. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90519-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90519-I)
- Castanares, M.A., Copeland, B.T., Chowdhury, W.H., Liu, M.M., Rodriguez, R., Pomper, M.G., Lupold, S.E., Foss, C.A., 2016. Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin. *The Prostate* 76, 215–225. <https://doi.org/10.1002/pros.23115>
- Catalona, W.J., 2018. Prostate Cancer Screening. *Med. Clin. North Am.* 102, 199–214. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.11.001>
- Cedar, H., Bergman, Y., 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10, 295–304. <https://doi.org/10.1038/nrg2540>
- Chadwick, B.P., 2003. Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2167–2178. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg229>
- Chan, H.-W., Kurago, Z.B., Stewart, C.A., Wilson, M.J., Martin, M.P., Mace, B.E., Carrington, M., Trowsdale, J., Lutz, C.T., 2003. DNA Methylation Maintains Allele-specific KIR Gene Expression in Human Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 197, 245–255. <https://doi.org/10.1084/jem.20021127>
- Chan, H.-W., Miller, J.S., Moore, M.B., Lutz, C.T., 2005. Epigenetic Control of Highly Homologous Killer Ig-Like Receptor Gene Alleles<sup>1</sup>. *J. Immunol.* 175, 5966–5974. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5966>
- Chiam, K., Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T., 2014. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Lett.* 342, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.011>
- Costa-Pinheiro, P., Montezuma, D., Henrique, R., Jerónimo, C., 2015. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. *Epigenomics* 7, 1003–1015. <https://doi.org/10.2217/epi.15.56>

- de Vos, L., Gevensleben, H., Schröck, A., Franzen, A., Kristiansen, G., Bootz, F., Dietrich, D., 2017. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients. *Clin. Epigenetics* 9, 125. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0425-4>
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Djulbegovic, M., Beyth, R.J., Neuberger, M.M., Stoffs, T.L., Vieweg, J., Djulbegovic, B., Dahm, P., 2010. Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 341, c4543. <https://doi.org/10.1136/bmj.c4543>
- Egevad, L., Delahunt, B., Furusato, B., Tsuzuki, T., Yaxley, J., Samaratunga, H., 2021. Benign mimics of prostate cancer. *Pathology (Phila.)* 53, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.08.006>
- Ehrlich, M., 2002. DNA Hypomethylation, Cancer, the Immunodeficiency, Centromeric Region Instability, Facial Anomalies Syndrome and Chromosomal Rearrangements - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316622153976?via%3Dihub> (accessed 12.24.23).
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., Gehrke, C., 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10, 2709–2721. <https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>
- Engreitz, J.M., Pandya-Jones, A., McDonel, P., Shishkin, A., Sirokman, K., Surka, C., Kadri, S., Xing, J., Goren, A., Lander, E.S., Plath, K., Guttman, M., 2013. The Xist lncRNA Exploits Three-Dimensional Genome Architecture to Spread Across the X Chromosome. *Science* 341, 1237973. <https://doi.org/10.1126/science.1237973>
- Fang, H., Disteché, C.M., Berletch, J.B., 2019. X Inactivation and Escape: Epigenetic and Structural Features. *Front. Cell Dev. Biol.* 7.
- Feener, C.A., Koenig, M., Kunkel, L.M., 1989. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338, 509–511. <https://doi.org/10.1038/338509a0>
- Ficarra, V., Novara, G., Zattoni, F., 2010. The Role of the Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3) Test for the Diagnosis of Prostate Cancer in the Era of Opportunistic Prostate-Specific Antigen Screening. *Eur. Urol.* 58, 482–484. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.07.025>

- Grehl, C., Kuhlmann, M., Becker, C., Glaser, B., Grosse, I., 2018. How to Design a Whole-Genome Bisulfite Sequencing Experiment. *Epigenomes* 2, 21. <https://doi.org/10.3390/epigenomes2040021>
- Groden, J., Lieberman, M.A., 2001. Overview of Genetics for the Clinician. *Epilepsia* 42, 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2001.os001.x>
- Habbit, N.L., Anbiah, B., Suresh, J., Tian, Y., Anderson, L.S., Davies, M.L., Hassani, I., Ghosh, T.M., Prabhakarparandian, B., Arnold, R.D., Lipke, E.A., 2022. Abstract 3856: Elucidating the role of fibroblasts in CRPC and ADPC progression using 3D engineered prostate cancer tissues. *Cancer Res.* 82, 3856. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-3856>
- Hayward, S.W., Wang, Y., Cao, M., Hom, Y.K., Zhang, B., Grossfeld, G.D., Sudilovsky, D., Cunha, G.R., 2001. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res.* 61, 8135–8142.
- Henrique, R., Jerónimo, C., 2004. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *Eur. Urol.* 46, 660–669; discussion 669. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.06.014>
- Höglund, P., Sundbäck, J., Olsson-Alheim, M.Y., Johansson, M., Salcedo, M., Öhién, C., Ljunggren, H.-G., Sentman, C.L., Kärre, K., 1997. Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol. Rev.* 155, 11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1997.tb00936.x>
- Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., Cedar, H., 2016. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res.* 76, 3446–3450. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3278>
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kristensen, L.S., Hansen, L.L., 2009. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clin. Chem.* 55, 1471–1483. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.121962>
- Laner, T., Schulz, W., Engers, R., Müller, M., Florl, A., 2005. Hypomethylation of the XIST Gene Promoter in Prostate Cancer. *Oncol. Res.* 15, 257–64. <https://doi.org/10.3727/096504005776404607>

- Le Luduec, J.-B., Kudva, A., Boudreau, J.E., Hsu, K.C., 2018. Novel multiplex PCR-SSP method for centromeric KIR allele discrimination. *Sci. Rep.* 8, 14853. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33135-1>
- Liu, Y., Kuick, R., Hanash, S., Richardson, B., 2009. DNA methylation inhibition increases T cell KIR expression through effects on both promoter methylation and transcription factors. *Clin. Immunol.* 130, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.009>
- Logozzi, M., Angelini, D.F., Iessi, E., Mizzoni, D., Di Raimo, R., Federici, C., Lugini, L., Borsellino, G., Gentilucci, A., Pierella, F., Marzio, V., Sciarra, A., Battistini, L., Fais, S., 2017. Increased PSA expression on prostate cancer exosomes in in vitro condition and in cancer patients. *Cancer Lett.* 403, 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.036>
- Lucchesi, J.C., Kelly, W.G., Panning, B., 2005. Chromatin Remodeling in Dosage Compensation. *Annu. Rev. Genet.* 39, 615–651. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.094210>
- Lumbreras, B., Parker, L.A., Caballero-Romeu, J.P., Gómez-Pérez, L., Puig-García, M., López-Garrigós, M., García, N., Hernández-Aguado, I., 2023. Variables Associated with False-Positive PSA Results: A Cohort Study with Real-World Data. *Cancers* 15, 261. <https://doi.org/10.3390/cancers15010261>
- Magi-Galluzzi, C., 2018. Prostate cancer: diagnostic criteria and role of immunohistochemistry. *Mod. Pathol.* 31, 12–21. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.139>
- Mao, R., Chou, L.-S., 2010. Methylation Analysis by Restriction Endonuclease Digestion and Real-Time PCR. *Clin. Chem.* 56, 1050–1052. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.146654>
- Martin, E.M., Fry, R.C., 2018. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annu. Rev. Public Health* 39, 309–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040617-014629>
- Moretta, L., Moretta, A., 2004. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.07.010>
- Nakao, M., 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278, 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00721-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00721-1)
- Neal, D.E., Donovan, J.L., 2000. Prostate cancer: to screen or not to screen? *Lancet Oncol.* 1, 17–24. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00005-X)

- Otter, M., Schrandner-Stumpel, C.T., Curfs, L.M., 2010. Triple X syndrome: a review of the literature. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 265–271. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.109>
- Perry, A.S., Foley, R., Woodson, K., Lawler, M., 2006. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 357–377. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01184>
- Peschansky, V.J., Wahlestedt, C., 2014. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9, 3–12. <https://doi.org/10.4161/epi.27473>
- Phillips, J.L., Sinha, A.A., 2009. Patterns, Art, and Context: Donald Floyd Gleason and the Development of the Gleason Grading System. *Urology* 74, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.01.012>
- Raaijmakers, R., Blijenberg, B.G., Finlay, J.A., Rittenhouse, H.G., Wildhagen, M.F., Roobol, M.J., Schr, Ö.F.H., 2004. Prostate cancer detection in the prostate specific antigen range of 2.0 to 3.9 ng/ml: value of percent free prostate specific antigen on tumor detection and tumor aggressiveness. *J. Urol.* 171, 2245–2249. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000127731.56103.50>
- Romero-Garcia, S., Prado-Garcia, H., Carlos-Reyes, A., 2020. Role of DNA Methylation in the Resistance to Therapy in Solid Tumors. *Front. Oncol.* 10.
- Roobol, M.J., Haese, A., Bjartell, A., 2011. Tumour markers in prostate cancer III: biomarkers in urine. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 50 Suppl 1, 85–89. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2010.524935>
- Roobol, M.J., Schröder, F.H., van Leeuwen, P., Wolters, T., van den Bergh, R.C.N., van Leenders, G.J.L.H., Hessels, D., 2010. Performance of the Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3) Gene and Prostate-Specific Antigen in Prescreened Men: Exploring the Value of PCA3 for a First-line Diagnostic Test. *Eur. Urol.* 58, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.06.039>
- Ross, M.T., Grafham, D.V., Coffey, A.J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434, 325–337. <https://doi.org/10.1038/nature03440>
- Salozhin, S.V., Prokhorchuk, E.B., Georgiev, G.P., 2005. Methylation of DNA--one of the major epigenetic markers. *Biochem. Biokhimiia* 70, 525–532. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0146-8>

- Santourlidis, S., Ghanjati, F., Beermann, A., Hermanns, T., Poyet, C., 2016. IDLN-MSP: Idioloical normalization of real-time methylation-specific PCR for genetic imbalanced DNA specimens [WWW Document]. <https://doi.org/10.2144/000114379>
- Santourlidis, S., Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P., Uhrberg, M., 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 4253–4261. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4253>
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., Shimizu, K., 2011. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 278, 1598–1609. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x>
- Saxonov, S., Berg, P., Brutlag, D.L., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1412–1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Schmidt, M., Maié, T., Dahl, E., Costa, I.G., Wagner, W., 2020. Deconvolution of cellular subsets in human tissue based on targeted DNA methylation analysis at individual CpG sites. *BMC Biol.* 18, 178. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00910-4>
- Shariat, S.F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., Vickers, A.J., Bjartell, A., 2011. Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 50 Suppl 1, 61–75. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2010.542174>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Silva, R., Moran, B., Russell, N.M., Fahey, C., Vlajnic, T., Manecksha, R.P., Finn, S.P., Brennan, D.J., Gallagher, W.M., Perry, A.S., 2020. Evaluating liquid biopsies for methylomic profiling of prostate cancer. *Epigenetics* 15, 715–727. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1712876>
- Skuse, D.H., 2005. X-linked genes and mental functioning. *Hum. Mol. Genet.* 14, R27–R32. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi112>
- Sobel, R.E., Sadar, M.D., 2005. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J. Urol.* 173, 342–359. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000141580.30910.57>

- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F., 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* 21, 274–281. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910210305>
- Tammen, S.A., Friso, S., Choi, S.-W., 2013. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol. Aspects Med.* 34, 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.018>
- Tao, K., Sutton, J., Flanagan, J., 2021. Pan-cancer DNA methylation signature quantification of lifestyle exposures and cancer prognosis. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-199381/v1>
- Thalmann, G.N., Anezinis, P.E., Chang, S.M., Zhau, H.E., Kim, E.E., Hopwood, V.L., Pathak, S., von Eschenbach, A.C., Chung, L.W., 1994. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* 54, 2577–2581.
- Uhrberg, M., 2005. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur. J. Immunol.* 35, 10–15. <https://doi.org/10.1002/eji.200425743>
- Van Bergen, J., Trowsdale, J., 2012. Ligand specificity of Killer cell Immunoglobulin-like Receptors: a brief history of KIR. *Front. Immunol.* 3.
- van der Burgt, Y.E.M., Siliakus, K.M., Cobbaert, C.M., Ruhaak, L.R., 2020. HILIC–MRM–MS for Linkage-Specific Separation of Sialylated Glycopeptides to Quantify Prostate-Specific Antigen Proteoforms. *J. Proteome Res.* 19, 2708–2716. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00050>
- Warrick, J., Tomlins, S., 2018. Prostate Cancer Tissue Diagnosis 457–473. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64096-9\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64096-9_26)
- Webber, M.M., Bello, D., Quader, S., 1997. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part 2. Tumorigenic cell lines. *The Prostate* 30, 58–64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970101\)30:1<58::AID-PROS9>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970101)30:1<58::AID-PROS9>3.0.CO;2-H)
- Wojdacz, T.K., Borgbo, T., Hansen, L.L., 2009. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* 4, 231–234. <https://doi.org/10.4161/epi.9020>
- Wolff, D.J., Dyke, D.L.V., Powell, C.M., 2010. Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genet. Med.* 12, 52–55. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181c684b2>

- Wu, S.C., Zhang, Y., 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 607–620. <https://doi.org/10.1038/nrm2950>
- Wu, Y., Sarkissyan, M., Vadgama, J.V., 2015. Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1238, 425–466. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_23)
- Wyatt, G.R., 1950. Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature* 166, 237–238. <https://doi.org/10.1038/166237b0>
- Yegnasubramanian, S., 2016. Prostate cancer epigenetics and its clinical implications. *Asian J. Androl.* 18, 549–558. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.179859>
- Yu, H., Hahn, Y., Yang, I., 2015. Reference Materials for Calibration of Analytical Biases in Quantification of DNA Methylation. *PLOS ONE* 10, e0137006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137006>
- Yue, M., Charles Richard, J.L., Ogawa, Y., 2016. Dynamic interplay and function of multiple noncoding genes governing X chromosome inactivation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, SI: Clues to long noncoding RNA taxonomy 1859, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.07.015>

## 6. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Simon Santourlidis für die Überlassung des Themas, sein stets offenes Ohr und für seine Ratschläge und Rückmeldungen bedanken.

Weiterhin möchte ich Pauline Ott (M.Sc.) für die genaue Einarbeitung und Beantwortung jeder noch so kleinen Nachfrage bedanken. Sie war die beste Betreuung und Anleiterin, die man sich hätte wünschen können – persönlich, auf einer kollegialen als auch auf einer professionellen Ebene.

Ich möchte PD Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann aus dem Urologischen Forschungslabor für die Bereitstellung der humanen Prostatazelllinien Dank aussprechen.

Weiterhin verdanke ich der AG Epigenetik viele schöne Momente, Lab-Meetings und nette Gespräche.

Prof. Dr. med. Andreas Krieg gilt mein Dank für die Übernahme der Ko-Betreuung meiner Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die moralische Unterstützung danken.

Außerdem danken möchte ich Jedem, der zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.