

Aus der Urologischen Klinik
der Medizinischen Hochschule Hannover

Direktor: Prof. Dr. med. M. Kuczyk

**Subtypspezifische DNA-Methylierung
von *CDH3* (P-Cadherin)
in humanen Nierenzellkarzinomen**



Medizinische Hochschule
Hannover

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Inga Schimansky
aus Hannover

Hannover, 2011

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 15.01.2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Axel Merseburger

Referent: Prof. Dr. med. Brigitte Schlegelberger

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Lehmann-Mühlenhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2013

Promotionsausschussmitglieder: Prof. Dr. med. Michael Peter Manns

Prof. Dr. med. Michael Gebel

Prof. Dr. med. Anibh Das

Meiner Familie

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Nierenzellkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Klassifikation.....	2
1.1.3	Therapie.....	3
1.2	Genetik und Epigenetik.....	4
1.2.1	Genetische Alteration im Nierenzellkarzinom.....	4
1.2.2	Epigenetische Alteration im Nierenzellkarzinom.....	5
1.3	Cadherine.....	10
1.3.1	E-Cadherin.....	13
1.3.2	P-Cadherin.....	15
1.4	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Materialien.....	20
2.1.1	Enzyme, Chemikalien, Reagenzien.....	20
2.1.2	Lösungen und Puffer.....	23
2.1.3	DNA-Leiter.....	24
2.1.4	Geräte.....	24
2.1.5	Software.....	24
2.1.6	Patientenmaterial - Untersuchte DNA-Proben.....	25
2.1.7	Zelllinien.....	26
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	DNA-Extraktion aus humanen Nierenzellkarzinomen	29
2.2.2	Bisulfit-Konversion.....	29
2.2.3	Polymerasekettenreaktion.....	31
2.2.4	“Nested-PCR”.....	32
2.2.5	Primergenerierung.....	33
2.2.6	Optimierung der PCR-Bedingungen.....	34
2.2.6.1	COBRA.....	34
2.2.6.2	Pyrosequenzierung.....	36
2.2.7	DNA-Nachweis durch Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.8	COBRA.....	38
2.2.9	Pyrosequenzierung.....	40
2.3	Statistische Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten.....	46
2.4	Immunhistochemische Anfärbung von CDH3 in Nierengeweben	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	COBRA.....	48
3.1.1	Experimentelle Ermittlung der PCR-Bedingungen.....	48

3.1.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Restriktionsanalyse an Zelllinien.....	50
3.1.3 Ergebnisse der CDH3-CGI-Restriktionsanalyse an RCC-Gewebeproben	54
3.2 Pyrosequenzierung.....	55
3.2.1 Experimentelle Ermittlung der PCR-Bedingungen.....	56
3.2.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an Zelllinien.....	58
3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben....	61
3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CDH3 in Nierengeweben	69
4 Diskussion.....	71
5 Zusammenfassung.....	78
6 Literaturverzeichnis.....	81
II Abbildungsverzeichnis.....	89
III Tabellenverzeichnis.....	91
IV Abkürzungsverzeichnis.....	92
V Danksagung.....	95
VI Lebenslauf.....	96
VII Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 PromO.....	97

1 Einleitung

Diese Dissertation beinhaltet die weitere Erforschung des Pathomechanismus des Nierenzellkarzinoms. Der Einfluss der Genetik und der Epigenetik auf dieses Phänomen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Aufgrund dessen werden beide gesondert dargestellt.

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) ist mit 3% aller Tumore im Erwachsenenalter, nach dem Prostata- und dem Harnblasenkarzinom, die dritthäufigste maligne Veränderung im Urogenitaltrakt (Zantl et al., 2008). Bei einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 45-60% ist es im metastasierten Fall zudem der tödlichste aller Tumore mit Ursprung im Harntrakt (Zantl et al., 2008, Weihrauch et al., 2010).

Das Erkrankungsverhältnis beträgt Männer zu Frauen 3:2, mit einem Altersgipfel im sechsten und siebten Lebensjahrzehnt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lassen sich bei 25-30% der Patienten klinisch Metastasen nachweisen und nach zunächst kurativer Therapie des RCC metastasieren nochmals 20-40%, sodass letztlich 60% der Patienten Metastasen aufweisen (ebenda). Zu den Risikofaktoren zählen Rauchen und Übergewicht und als gesicherte Ursachen gelten die chronische Niereninsuffizienz, das von-Hippel-Lindau-Syndrom (s.u.) sowie eine positive Familienanamnese. Der Pathomechanismus des RCC ist noch immer weitgehend ungeklärt.

Im Zuge einer abdominalen Ultraschalluntersuchung oder einer Computer-

tomographie werden die meisten Nierenzellkarzinome diagnostiziert. Durch zunehmenden Einsatz dieser Untersuchungstechniken in den letzten Jahrzehnten werden die meisten Nierentumore heute in einem Frühstadium entdeckt. Dabei hängt die Prognose von der Tumorkategorie bzw. Tumorgroße ab (Leitlinien EAU 2010).

1.1.2 Klassifikation

Das Nierenzellkarzinom als Oberbegriff einer heterogenen Gruppe mehrerer Tumore wird unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Systeme klassifiziert. Die heute übliche Gliederung basiert zunächst auf der Beurteilung der Morphologie und damit auf der Identifizierung des histologischen Subtyps des Nierentumors. Sie erfolgt anhand der Heidelberger-Rochester-Klassifikation. Hierbei wird in das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC), welches mit 80% das häufigste Karzinom darstellt gefolgt vom papillären/chromophilen Nierenzellkarzinom (papRCC) mit 10% (Ellinger et al., 2011), in das chromophobe (5%), unklassifizierte und Sammelrohrkarzinom (Ductus-Bellini-Karzinom), sowie in die benignen Tumore papilläres Adenom und Onkozytom differenziert. Weitere nicht-epitheliale Nierentumore sind bekannt.

Der genaue zelluläre Ursprung des ccRCC und des papRCC ist noch nicht eindeutig geklärt. Im wissenschaftlichen Konsens entstehen beide aus dem Epithel des Nierentubulus. Darüber hinaus ist publiziert, dass die meisten (Zantl et al., 2008), zwei Drittel (Katagiri et al., 1995) bzw. alle (vom Dorp, 2007) ccRCC und papRCC ihren Ursprung im proximalen Tubulus haben. Das chromophobe RCC und das Sammelrohrkarzinom entwickeln sich aus dem Epithel des distalen Tubulus (Zantl et al., 2008, vom Dorp, 2007). Abweichungen von dieser Zuordnung sind möglich (Katagiri et al., 1995).

Eine weitere Klassifizierung erfolgt anhand des TNM-Systems der UICC und

der Anwendung biomolekularer Marker, wobei letztere noch keine gute Evidenz aufzeigen und somit die diagnostische Rolle noch nicht eindeutig geklärt ist (Zantl et al., 2008).

1.1.3 Therapie

Nach Diagnosesicherung eines RCC steht zunächst die Kuration durch chirurgische Sanierung (Resektion des Primärtumors und der Metastasen) im Vordergrund. 20 bis 30% der Patienten mit limitierter Metastasierung können dadurch geheilt werden (Stahler et al., 2010). Additiv dazu steht die systemische Therapie. Hier wurde jahrelang die Immuntherapie (Interferon, Interleukin 2 und 5-Fluorouracil) als Standardverfahren durchgeführt. Wegen zahlreicher Kontraindikationen, die bei den Patienten zumeist gegeben waren sowie neuerer Daten, die den Effekt der Therapie relativierten, hat dieser Therapieansatz allerdings seine Bedeutung vollkommen verloren (Stahler et al., 2010).

Derzeit fußt die systemische Therapie auf Angiogenesehemmern wie Sunitinib, Soratenib, Pazopanib, Everolimus und Temsirolimus sowie auf Kombination mit Bevacizumab und Interferon. Die Therapieabfolge richtet sich weniger nach einem strikten Therapieregime als mehr nach dem individuellen Krankheitsverlauf. Für die zur Erstlinientherapie zugelassenen Medikamente (Sunitinib, Bevacizumab und Interferon, Pazopanib) ist ein mit bis zu 11 Monaten signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben beobachtet worden (Leitlinien EAU 2010). Eine kontinuierliche Therapie ist notwendig, um die Erkrankung stabil zu halten, da partielle und komplette Remissionen des Nierenzellkarzinoms mit 2 bis 4% eher selten sind (Stahler et al., 2010).

1.2 Genetik und Epigenetik

1.2.1 Genetische Alteration im Nierenzellkarzinom

Im Zuge der Erforschung genetischer Alterationen im Nierenzellkarzinom wurden erste Ergebnisse bei Patienten mit einem von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom) erzielt. Diese familiäre, autosomal-dominante Erkrankung führt zu multiplen benignen und malignen Tumoren wie Pankreas- und Leberzysten, dem Retina-Angiom, Hämangioblastom, Phäochromozytom und ccRCC. Das Gen des VHL-Syndroms wurde 1993 auf Chromosom 3p25-p26 lokalisiert und als Tumor-Suppressor-Gen identifiziert (Latif et al., 1993). Neben der vererbten Mutation scheinen auch erworbene Defekte im VHL-Gen für ungefähr 60% der Fälle des sporadischen ccRCC verantwortlich zu sein (Zantl et al., 2008, Dorkin et al., 1997). Bei einem Defekt im VHL-Gen und damit Verlust des VHL-Proteins kommt es zu einer Überexpression, unter anderem von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *pro-transforming growth factor alpha* (TGF alpha) und *epidermal growth factor receptor* (EGFR), was in einer Proliferation epithelialer Zellen, Tumorwachstum und Metastasen mündet (ebenda).

Anfang 2011 wurde eine Studie publiziert, in der ca. 3500 Gene PCR-basiert auf Mutationen in ccRCC gescreent wurden. Es scheint, dass neben dem VHL-Gen das Gen PBRM1 (*SWI/SNF chromatin remodelling complex gene*) durch direkte Mutation in der Entstehung des primären ccRCC eine Rolle spielt. In der von Varela geführten Studie wurden in 41% der primären ccRCC genetische Alterationen im PBRM1 festgestellt (Varela et al., 2011). Weitere häufige genetische Mutationen konnten bei einer zuvor durchgeführten genomweiten Analyse nicht identifiziert werden (Dalgliesh et al., 2010). Den epigenetischen Alterationen hingegen wird eine substantielle Rolle in der Karzinogenese des RCC zugesprochen (Morris et al., 2010).

1.2.2 Epigenetische Alteration im Nierenzellkarzinom

Bereits 1939 ist von C.H. Waddington der Begriff der Epigenetik geprägt worden. Vormalig als "die kausalen Interaktionen von Genen und deren Produkten, die zur Ausbildung des Phänotyps führen" betitelt, etablierte sich rasch die Definition der vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht durch eine DNA-Alteration bedingt sind (reviewed in Esteller, 2008). Epigenetik stellt daher einen Sammelbegriff für verschiedene Mechanismen dar, wie die RNA-Interferenz, Histonmodifikation (Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung) und vor allem DNA-Methylierung (ebenda, Jones et al., 2007). Letztgenannte tritt in Cytosinen auf, denen ein Guanin folgt, den so genannten CpG-Stellen. In der DNA existieren sowohl CpG-reiche als auch -arme Regionen. CpG-reiche Regionen werden auch als CpG-Insel (CGI) bezeichnet, deren genauere Definition eine DNA-Region mit mindestens 200 bp ist, die einen Anteil von Guanin oder Cytosin von mehr als 50% und einer erwarteten CpG-Ratio von über 0,6 aufweist (Wu et al., 2010). Diese CGI sitzen häufig an regulatorischen Einheiten vieler Gene. In Tumoren ließ sich zunächst beobachten, dass CGI in repetitiven DNA-Sequenzen und kodierenden Regionen hypomethyliert oder gar demethyliert waren, was wiederum positiv mit Wachstum und Invasivität korrelierte. Neben der Hypomethylierung der DNA in Tumoren wurde sodann die Hypermethylierung in CGI in der Promoterregion von Tumor-Suppressor-Genen entdeckt (reviewed in Esteller, 2008). Eine Hypermethylierung und Inaktivierung ist für das Tumor-Suppressor-Gen VHL für RCC beschrieben (reviewed in Kim et al., 2004).

In einer weiteren Studie zeigte sich, dass der VHL-Gen-Status direkten Einfluss auf die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin hat (reviewed in Russell et al., 2007). Unabhängig von dem VHL-Gen wurden Untersuchungen an weiteren Zelladhäsionsmolekülen durchgeführt (Costa et al., 2007, Nojima et al., 2001, Shimazui et al., 1996). Denn wie auch in anderen Tumoren, scheinen Zelladhäsionsmoleküle die Entstehung, Invasivität und das Metastasierungs-

potential des RCC durch Zell-Zell-Interaktionen zu beeinflussen. Es wird davon ausgegangen, dass diese Interaktionen im Gesunden eine Homöostase der Proliferation und Differenzierung aufrecht erhalten können, die im Tumorgewebe einer Dysregulation unterliegt. Verschiedene Autoren berichteten bereits über Veränderungen der Expression von Zelladhäsionsmolekülen der extrazellulären Matrix beim RCC (ebenda).

Dennoch ist es bisher nicht gelungen eine gute prognostische Einschätzung anhand einzelner, unabhängiger Prognostikatoren zu erzielen. Ebenso wenig existieren Tumormarker, die für eine Verlaufskontrolle eingesetzt werden können. Biomolekulare Marker sind zwar postuliert, aber ihre Rolle in der Pathogenese ist nicht eindeutig geklärt (Merseburger et al., 2005). Eine Zusammenfassung publizierter Methylierungsdaten für das RCC ist in nachfolgender Tabelle aufgelistet (Tab. 1):

Gen	Publikationsjahr	Autor	Journal
ANK3	2011	M.R. Morris	Oncogene
APAF1	2006	F. Christoph	Clin Cancer Res
APC	2004	E. Dulaimi	Clin Cancer Res
ATP5G2	2011	M.R. Morris	Oncogene
BIK	2011	M.R. Morris	Oncogene
BNC1	2010	M.R. Morris	Oncogene
CASP8	2003	M.R. Morris	Oncogene
CCDC8	2011	M.R. Morris	Oncogene
CDH1	2001	D. Nojima	Mol. Carcinogenesis
CDH1	2004	E. Dulaimi	Clin Cancer Res
CDH1	2004	M.O. Hoque	Cancer Res
CDH1	2007	V.L. Costa	BMC Cancer
CDH1	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
CDKN2 (P16INK4)	2007	Y. Hori	J Pathol
CDKN2 (P16INK4)	2003	M.T. Sanz-Casla	Urol Res
CDKN2(P14ARF)	2003	M.R. Morris	Oncogene
CELSR3	2011	M.R. Morris	Oncogene
COL14A1	2010	M.R. Morris	Oncogene
COL15A1	2010	M.R. Morris	Oncogene
COL1A1	2006	I. de Caceres	BR J Cancer
CORO6	2011	M.R. Morris	Cancer Res
CST6	2010	M.R. Morris	Oncogene
CXCL16	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
DAL-1/4.1B	2006	D. Yamada	Int J Cancer
DAPK	2003	M.R. Morris	Oncogene
DAPK1	2006	F. Christoph	Clin Cancer Res

1.2.2 Epigenetische Alteration im Nierenzellkarzinom

DKK3	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res
DLC1	2007	Q. Zhang	Cancer Lett
EGR4	2011	M.R. Morris	Oncogene
EMX2	2010	M.R. Morris	Oncogene
FBN2	2011	M.R. Morris	Oncogene
GREM1 (iii)	2010	v. Vlodrop	AJP
GSTP1	2004	E. Dulaimi	Clin Cancer Res
GSTP1	2007	V.L. Costa	BMC Cancer
HMX1	2011	M.R. Morris	Oncogene
HOXB13	2006	H. Okuda	Oncogene
IGFBP1	2006	I. de Caceres	Cancer Res
IGFBP1	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
IGFBP3	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
IGFBP3	2006	I. de Caceres	Cancer Res
KLF4	2010	M.R. Morris	Oncogene
KLHL35	2011	M.R. Morris	Oncogene
KRT19	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
LRRC2	2011	M.R. Morris	Oncogene
LSAMP	2003	J. Chen	Cancer Cell
MT1G	2003	M.R. Morris	Oncogene
MT1G	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
NOG	2010	M.R. Morris	Oncogene
NORE1A	2003	M.R. Morris	Oncogene
P2RX5	2011	M.R. Morris	Oncogene
p16	2009	Onay H.	Urol Int.
PCDH8	2011	M.R. Morris	Oncogene
PDLIM4	2010	M.R. Morris	Oncogene
PLAU	2006	I. de Caceres	Cancer Res
PLAU	2008	M.R. Morris	BR J Cancer
PROM1	2011	M.R. Morris	Oncogene
PTGIS	2010	M.R. Morris	Oncogene
PTPLAD2	2011	M.R. Morris	Oncogene
QPCT	2011	M.R. Morris	Oncogene
RASSF1A	2001	K. Dreijerink	Proc Natl Acad Sci USA
RASSF1A	2003	C. Battagli	Cancer Res
RASSF1A	2004	E. Dulaimi	Clin Cancer Res
RASSF1A	2004	M.O. Hoque	Cancer Res
RASSF1A	2007	I. Peters	Mol Cancer
RASSF1A	2007	Y. Hori	J Pathol
RASSF1A	2003	M.R. Morris	Oncogene
RASSF1A	2009	Onay H.	Urol Int.
RASSF1A	2003	J. Chen	Cancer Cell
RPRM	2010	M.R. Morris	Oncogene
SCUBE3	2011	M.R. Morris	Oncogene
SFRP1	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res
SFRP1	2009	Onay H.	Urol Int.
SFRP1	2010	M.R. Morris	Oncogene
SFRP2	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res
SFRP4	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res
SFRP5	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res
SPINT 2	2008	M.R. Morris	BR J Cancer

TF	2011	M.R. Morris	Oncogene
TIMP3	2003	C. Battagli	Cancer Res
TIMP3	2004	E. Dulaimi	Clin Cancer Res
TIMP3	2004	M.O. Hoque	Cancer Res
TIMP3	2007	V.L. Costa	BMC Cancer
TLL1	2010	M.R. Morris	Oncogene
VHL	1994	J.G. Herman	Proc Natl Acad Sci USA
VHL	2003	C. Battagli	Cancer Res
VHL	2006	R.E. Banks	Cancer Res
VHL	2007	Y. Hori	J Pathol
WIF1	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res
XAF1	2006	M.G. Lee	Oncogene
XAF1	2007	C. Kempkensteffen	Cancer Lett
ZSCAN18	2011	M.R. Morris	Oncogene

Tabelle 1: Zusammenfassung von an RCC erhobener Methylierungsdaten.

In einer weiteren Tabelle (Tab. 2) sind die Gene aus Tabelle 1 aufgeführt, bei denen neben der Methylierungsanalyse auch klinisch-pathologische Parameter und Survival-Daten veröffentlicht sind. In Zukunft könnten weitere methylierungsabhängige Gene, die in der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms involviert sind, identifiziert werden.

Gen	Publikationsjahr	Autor	Journal	univariate statistische Analyse					Kaplan-Meier		multivariate statistische Analyse	
				T	N	M	G	Alter	RFÜ	Cox Regression (HR)		
APAF1	2006	F. Christoph	Clin Cancer Res	**	(*)	n.a.	(*)	(*)	RFÜ: p=***	Methyl.-T- und G-HR=4,18; p=**		
BNC1	2010	M.R. Morris	Oncogene			n.a.			RFÜ: p=*	Methyl. HR=4,9; Stage-HR=2,5; Size-HR=1,2		
COL14A1	2010	M.R. Morris	Oncogene			n.a.			RFÜ: p=**	Methyl. HR=6,6; Stage-HR=3,4		
COL1A1	2006	I. de Caceres	Cancer Res	T1?					n.a.	n.a.		
DAL-1/4.1B	2006	D. Yamada	Int J Cancer	n.s.	n.a.	n.a.	*	n.s.	RFÜ: p=**	Methyl. RR=10,5; Stage RR= 4,0; G RR=1,8		
DAPK1	2006	F. Christoph	Clin Cancer Res	n.s.	n.s.	n.a.	n.s.	n.s.	RFÜ: p=***	Methyl.-, T- und G-HR= 3,79; p=**		
DKK3	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res	**	(*)	(*)	***	n.a.	^	Methyl.-HR= 3,6		
GREM1 (iii)	2010	v. Violdrop	AJP	*	n.a.	n.a.	*	n.s.	RFÜ: p=**	Methyl.-Alter-, Geschlecht, G-, Stage-, T-HR=0,88		
HOXB13	2006	H. Okuda	Oncogene	*	n.a.	n.s.	**	n.s.	n.a.	Alter-OR= 1,6; G-OR=3,5; Size-OR=0,8; M-OR=0,09		
IGFBP1	2006	I. de Caceres	Cancer Res	T1?					n.a.	n.a.		
IGFBP3	2006	I. de Caceres	Cancer Res	T1?					n.a.	n.a.		
SCUBE3	2011	M.R. Morris	Oncogene			n.a.			RFÜ: p=**	n.a.		
SFRP1	2010	M.R. Morris	Oncogene			n.a.			RFÜ: p=**	n.a.		
SFRP1	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res	*	(*)	***	*	n.a.	^	Methyl. G, Stage, Size p=*** kein HR		
SFRP2	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res	(*)	(*)	(*)	(*)	n.a.	^	Methyl.-HR= 6,1		
SFRP4	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res	(*)	(*)	(*)	(*)	n.a.	^	Methyl.-HR= 19,8		
SFRP5	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res	(*)	(*)	(*)	(*)	n.a.	^	Methyl.-HR=1,1		
VHL	2006	R.E. Banks	Cancer Res	**	**	**	**	n.a.	RFÜ: p= n.s.	n.a.		
WIF1	2006	S. Urakami	Clin Cancer Res	(*)	(*)	*	(*)	n.a.	^	Methyl.-HR=2,0		
XAF1	2007	C. Kempkensteffen	Cancer Lett	n.s.	n.a.	n.s.	n.s.	n.s.	RFÜ(T1/T2); p=*, RFÜ(T3); p=**	Methyl.-HR=3,6; Stage/T2=8,0, G3=1,2, M1=12,4		

(*)= Trend 0,05-0,1

*=0,01 - 0,05

**=0,001 - 0,01

***=<0,001

RFÜ=Rekurrenzfreies Überleben

n.s.= nicht signifikant

^= nur in Kombination im M-Score mit den 5 anderen Genen, dann p=*

RR= relatives Risiko

OR= Odds ratio

Tabelle 2: publizierte, relevante Gene mit Methylierungsanalyse, klinisch-pathologische Parameter und Survival-Daten

1.3 Cadherine

Cadherine sind transmembrane Calciumabhängige Glykoproteine, die eine entscheidende Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion und -Interaktion einnehmen (reviewed in Takeichi, 1995). Zell-Adhäsionsmoleküle haben vielfältige Aufgaben, wie beispielsweise die Regulation der Assoziation mit Nachbarzellen. Hierbei haben sie auch Einfluss auf die exakte Bindungsstelle der zu bindenden Zellen. Cadherine sind weiterhin dazu befähigt, eine bereits eingegangene Adhäsion wieder zu lösen und neue Zell-Interaktionen zu steuern (reviewed in Nollet et al., 2000). Sie regulieren ebenso zytoskeletale Interaktionen und posttranslationale Modifikation wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Proteolyse (reviewed in Alattia et al., 1999).

Bis heute sind über 100 Cadherin- und Protocadherin-Typen in differenten Spezies charakterisiert, deren Expression gleichen evolutionären Vorgaben entspricht. Jeder Gewebe- und Zellart ist ein spezifisches Cadherin-Muster eigen (ebenda). Die Superfamilie der Cadherine wird in sechs Subfamilien untergliedert. Dazu gehören a) die klassischen oder Typ-1-Cadherine, zu deren Vertreter E-, N- und P-Cadherin zählen b) die atypischen oder Typ-2-Cadherine, mit VE-, K- und H-Cadherin c) Desmocolline d) Desmogleine e) Protocadherine und f) Flamingo Cadherine (Abb. 1). In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf dem humanen *CDH3* (P-Cadherin).

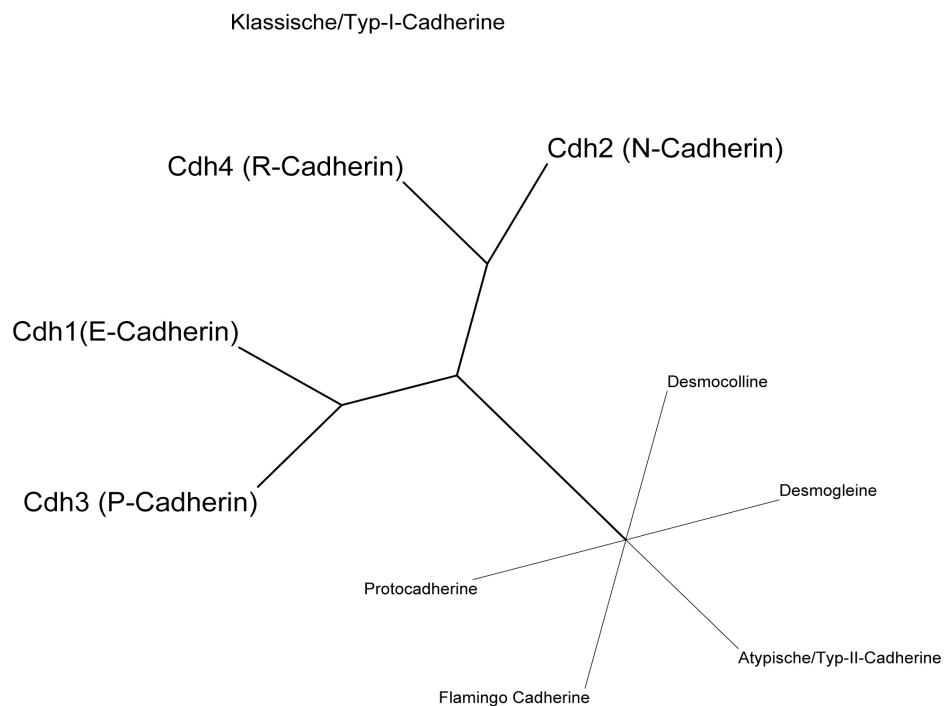


Abbildung 1: Darstellung der phylogenetischen Einteilung der Cadherin-Superfamilie auf Basis der EC1-Region; modifiziert nach Nollet et al. 2000

Generell lassen die Cadherine eine konservierte Struktur erkennen. Die Zuordnung zu den einzelnen Cadherin-Subfamilien wird unter anderem anhand der *repeats* der extrazellulären Domäne vorgenommen. Diese weisen je Subfamilie signifikante Unterschiede in Anzahl sowie Aminosäuresequenzen auf (Alattia et al., 1999).

Die klassischen/Typ-1-Cadherine, vor allem E-Cadherin, sind die am längsten untersuchten. In Abbildung 2 sind die Struktur und die Funktion von Typ-1-Cadherinen dargestellt. Es zeigt sich, dass ihre extrazelluläre Domäne aus fünf *repeats* (EC1-EC5) mit jeweils 110 Aminosäuren besteht, die durch drei Calciumionen gebunden werden (Alattia et al., 1999). Calcium ist ein, wenn nicht gar der, entscheidende Faktor für die Adhäsionsfunktion der transmembranen Glykoproteine (ebenda).

Über die EC1-Domäne, die sich am N-Terminus des Moleküls befindet, bilden zwei in derselben Membran nebeneinander liegende Cadherine ein Dimer. Dieser trägt erheblich zur Stabilität der Zelle selbst und der Zell-Zell-Kontakte bei. Um eine geeignete Zell-Zell-Adhäsion zu bewirken, interagiert im Interzellularraum nun dieses Dimer mit einem Dimer einer benachbarten Zelle zu einem so genannten Adhäsionsdimer (reviewed in Takeichi, 1995). So entsteht eine Art Reißverschlussstruktur.

Seit 1990 (Blaschuk et al.) besteht wissenschaftlicher Konsens darüber, dass die EC1-Region hauptsächlich dafür verantwortlich ist, dass die Interaktion zweier homotypisch gleicher Cadherin-Dimere benachbarter Zellen stattfindet. Im Falle der Typ-1-Cadherine ist die Aminosäureabfolge His-Ala-Val in der EC1-Region diesbezüglich entscheidend (ebenda).

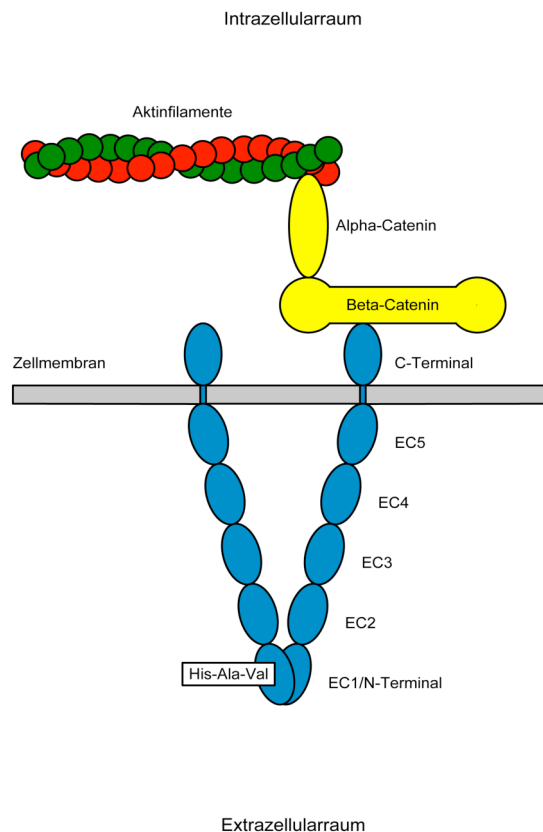


Abbildung 2: Schematische Übersicht des klassischen/Typ-1-Cadherin/Catenin/zytoskeletalen Komplexes an der Adhärenz junction der epithelialen Zelle; modifiziert nach Nollet et al. (2000) und Alattia et al. (1999)

Durch genauere phylogenetische Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass sich die Typ-1-Cadherine anhand der EC1-Region nochmals unterteilen lassen. P-Cadherin weist eine EC1-Übereinstimmung von 77-78% mit E-Cadherin auf, wohingegen dies bei N- und R-Cadherin lediglich in 68-71% der Fall ist (reviewed in Nollet et al., 2000). Zudem werden letztere vornehmlich in neuronalem Gewebe exprimiert, weswegen die Unterteilung in nicht-neuronale (E- und P-Cadherin) und neuronale (N- und R-) Cadherine ebenso gebräuchlich ist.

Die intrazelluläre Domäne der Cadherine ist an Aktinfilamente via alpha-, beta- und gamma-Catenin verlinkt. Diese Verlinkung ist essentiell für die Adhäsionsfunktion der Cadherine (reviewed in Barth et al., 1997). Es ist bekannt, dass Cadherine nicht nur Zell-Interaktionen steuern, sondern auch im erheblichen Maße dazu beitragen, dass Proliferation, Apoptose oder Zelldifferenzierung stattfindet (ebenda). Fehlregulationen führen daher häufig zu kanzerogenen Ereignissen (ebenda, Takeichi, 1995, Shimazui et al., 1996).

1.3.1 E-Cadherin

E-Cadherin (CDH1) ist eines der am längsten erforschten Cadherine. Zusammen mit P-Cadherin (s.u.) gehört es zu den einzigen nicht-neuronalen und zudem klassischen Cadherinen im Homo sapiens. Es wird vorwiegend in Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert. Erste Tumorstudien haben ergeben, dass CDH1 als Tumor-Suppressor fungiert, und sowohl bei Mutationen in invasiv lobulärem Mammakarzinom als auch in diffusem Magenkarzinom eine entscheidende Rolle spielt (reviewed in Nollet et al., 2000). Darüber hinaus wurde an Zellen von Ösophagus-, Colon-, Leber-, Lungen-, Schilddrüsen-, Prostata- und Harnblasenkarzinomen Hypermethylierung der CpG-Stellen im *CDH1*-Promoter und gleichzeitig Herunterregulierung der CDH1-Expression

gezeigt (Nojima et al., 2001, Katagiri et al., 1995, reviewed in Okegawa et al., 2002). Zudem wurde die Hypothese bestätigt, dass die Expression von CDH1 in den erwähnten Geweben mit Tumorgrad und -stadium sowie dessen Verlust mit dem Metastasierungspotential korreliert (ebenda).

Im Zusammenhang mit der Entstehung des Nierenzellkarzinoms ist die Studienlage bezüglich der Rolle des CDH1 nicht eindeutig geklärt und damit gleichfalls divergent. In 20% von 106 Nierenzellkarzinomen haben Katagiri et al. (1995) auf Expressionsebene eine positive Korrelation von herunterregulierter bzw. fehlender CDH1-Expression und steigendem Tumorgrad beobachtet. Des Weiteren spreche eine erhaltene CDH1-Expression für ein besseres Survival. Sie gehen davon aus, dass der häufigste Entstehungsort für das Nierenzellkarzinom der proximale Tubulus ist, es aber auch aus anderen Teilen des Nierentubulus und des Sammelrohrs hervorgehen kann.

Bei weiteren Untersuchungen an 34 gepaarten (peritumoralen versus tumorösen) primären klarzelligem Adenokarzinomen ist Gleiches über die Proteinexpression von CDH1 beschrieben (Nojima et al., 2001). Hier wurde zudem die Methylierung von *CDH1* untersucht, mit dem Ergebnis der vollständigen Methylierung in hochgradigen RCC und der partiellen Methylierung in niedriggradigen RCC.

Shimazui et al. (1996) beziehen sich auf die Studie von Katagiri (1995) und bemerken, dass CDH1 in normalen Nierengewebe ausschließlich in der Bowman-Kapsel und in allen tubulären Strukturen, mit Ausnahme des proximalen Konvolut, exprimiert wird. CDH1 könne daher per se keine Bedeutung in der Tumorgenese des Nierenzellkarzinoms aufweisen, da diese dem proximalen Tubulus zugeschrieben wird. Untermauert wird diese Aussage mit der unregelmäßigen bis hin zur fehlenden CDH1-Expression, die Katagiri et al. nachgewiesen hätten. Aus den Daten von Katagiri et al. folgern Shimazui et al., dass eine Verbindung von abfallender CDH1-Expression und steigendem Tumorgrad des Nierenzellkarzinoms nicht gegeben ist.

2007 haben Costa et al. die vier beschriebenen Tumorentitäten des Nierenzellkarzinoms separat untersucht. In 82,7% der 52 ccRCC und 69,2% der 13 papRCC wurde eine signifikante Hypermethylierung in der Promoterregion von *CDH1* gefunden. Gleichzeitig wurde eine negative Korrelation von CDH1-Expression und Tumorgrad beobachtet. Allerdings wurden die Ergebnisse dieser Studie als eingeschränkt beurteilbar deklariert, da das morphologisch normale Nierengewebe per se eine hohe Methylierungsrate aufzeigte und dadurch zum neoplastischen Nierengewebe keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwies.

1.3.2 P-Cadherin

P-Cadherin (CDH3) gehört wie CDH1 zu der Subfamilie der klassischen/Typ-1-Cadherine und ist ebenfalls ein nicht-neurales Cadherin. Auf der Internetseite des *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) können beide Cadherine in direkter Nachbarschaft auf dem Chromosom 16q22.1 (Abb. 3) lokalisiert werden.

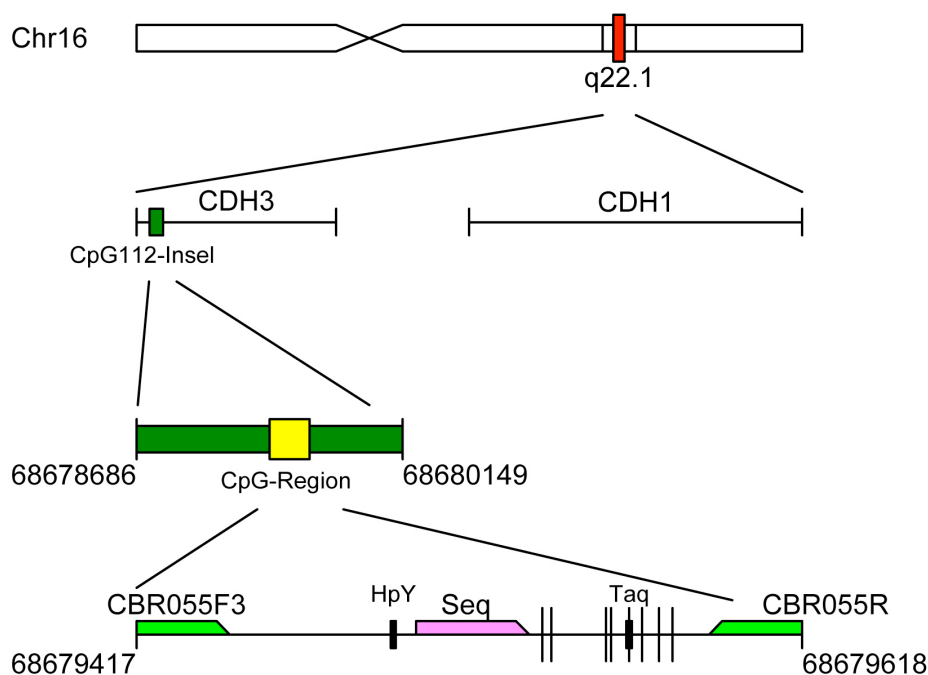


Abbildung 3: genaue Lokalisation von CDH3 und CDH1 auf Chromosom 16q22.1. Die untersuchte CGI befindet sich zwischen der 68678686 und der 68680149 Stelle in dem Chromosom. Die hier interessierende CpG-Region ist hervorgehoben und sowohl mit den COBRA-Primern (hellgrün) als auch dem Sequenzierungsprimer (rosa) versehen. Die Spalstellen für die Restriktionsenzyme HpYCH4IV und Taq^I als auch die acht CpG-Dinukleotide, die in der Pyrosequenzierung untersucht werden, sind hier aufgeführt.

Erstmals wurde CDH3 in Plazenta und Uterus der Maus identifiziert (reviewed in Nollet et al., 2000). Weitere Mausstudien haben eine permanente Expression von CDH3 in Epidermis, Mesothel und Korneaendothel ergeben. Die physiologische Expression von humanem CDH3 wurde später vorwiegend in epithelialen Strukturen, genauer in der Basalzellschicht von Epidermis, Ösophagus, myoepithelialen Zellen der Mamma, Bronchien, Harnblase und Prostata, nachgewiesen, wo es die Zellproliferation und Zellarchitektur reguliert (Riener et al., 2010, reviewed in Bryan et al., 2010, reviewed in Okegawa et al., 2002). Eine vermehrte CDH3-Expression ist für das Zervix-, Ovarial-, ductale Mamma- und oral squamöse Zellkarzinom beschrieben. Jüngst konnte eine CDH3-Expression in dysplastischem Gewebe von extrahepatischen Gallengängen festgestellt werden, welche im Gesunden kein CDH3 exprimieren

(Riener et al., 2010). Bei Knockoutmäusen wurde zudem Mammahyperplasie beobachtet (reviewed in Bryan et al., 2010).

Die aktuelle Studienlage hinsichtlich der Hypermethylierung sowie der Expression von CDH3 im Zusammenhang mit urologisch-onkologischen Ereignissen ist bisher rudimentär. Es gibt Studien zum Thema Prostatakarzinom, in denen eine physiologische Expression von CDH3 in der Prostata und eine Herunterregulierung bis Fehlen bei neoplastischen Ereignissen festgestellt wurde (Okegawa et al., 2002, Jarrard et al., 1997).

Ebenso wurde in mehreren Arbeiten eine physiologische Expression von CDH3 in Harnblasengewebe beschrieben, während für dortige Karzinome divergente Studienergebnisse publiziert sind. Einerseits wird berichtet, dass muskelinvasive Harnblasenkarzinome reduzierte CDH3-Level zeigen (Thykjaer et al., 2001), und andererseits ist beschrieben, dass die CDH3-Expression signifikant erhöht ist, je fortgeschrittener und höhergradiger der Tumor ist. Gleichzeitig wurde in diesen eine reduzierte CDH1- und beta-Catenin-Expression beobachtet (reviewed in Bryan et al., 2005 und 2008). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass das Harnblasengewebe mit zunehmendem Tumorgrad und -stadium des CDH3 in der Membran verlustig wird. Allerdings kommt es in invasiven Tumoren und tumorbenachbartem Gewebe zu einer zytoplasmatischen (Re)-Expression und Lokalisation von CDH3; in Korrelation mit einem schlechteren Survival (Mandeville et al., 2008).

Untersuchungen bezüglich einer CDH3-Expression bei renalen Zellkarzinomen zeigen, dass keine oder nur eine sehr geringe Anzahl der untersuchten Tumore CDH3 exprimieren (Shimazui et al., 1996). Methylierungsanalysen von *CDH3* in RCC sind bisher nicht bekannt.

In einer von Dr. Serth (Arbeitsgruppenleiter) durchgeführten genomweiten, internetbasierten Datenbankrecherche zur Identifizierung von Genen, die in RCC Expressionsverluste aufweisen und für die gleichzeitig die Präsenz von CGI beschrieben wurde, wurde *CDH3* als Kandidatengen identifiziert.

1.4 Zielsetzung

Bisher wurde dargestellt, dass das RCC eine besondere Entität von Tumoren darstellt, die sich klinisch oft erst in fortgeschrittenen Stadien der Metastasierung manifestieren und mit einer hohen Sterblichkeitsrate assoziiert sind. Die diagnostischen und prognostischen Möglichkeiten sind nach wie vor beschränkt. Im Sinne der Optimierung der Therapie und der Langzeitprognose werden molekulare Prognostikatoren zur Einschätzung der individuellen Prognose als notwendig angesehen. Auch besteht großes Interesse an der Identifizierung eines validen Tumormarkers, der für die Verlaufskontrolle eingesetzt werden könnte. Die bislang postulierten biomolekularen Marker sind dafür weniger geeignet (Zantl et al., 2008).

Ebenso unzureichend verstanden, sind die Mechanismen der Entstehung und Entwicklung des RCC. Da bislang vergleichsweise wenig Genmutationen identifiziert wurden, die in der Mehrzahl der RCC nachweisbar sind, besteht die Möglichkeit, dass zusätzlich epigenetische Veränderungen an der Tumorentwicklung bzw. Progression beteiligt sind. Vor diesem Hintergrund versucht man derzeit epigenetische Targets zu finden und deren Auswirkung auf das RCC zu erforschen. Wie oben beschrieben ist *CDH3* in einem insiliko-Ansatz als mögliches Kandidatengen diesbezüglich identifiziert worden. Vor dem Hintergrund der tumorbiologischen Bedeutung der Cadherine (s.o.) soll in dieser Arbeit folgenden zentralen Fragen nachgegangen werden:

1. Liegt eine statistisch signifikante (Signifikanzniveau $p < 0.05$) Erhöhung der mittleren relativen Methylierung (Hypermethylierung) im Vergleich von Tumoren und makroskopisch normalen tumorbenachbarten Gewebearealen in der *CDH3*-CGI für das Nierenzellkarzinom vor?
2. Gibt es eine Korrelation von Zunahme des Methylierungsstatus und der Malignität?

3. Lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen eine prognostische Wertung/Einschätzung erzielen?
4. Gibt es Hinweise auf die Expression von CDH3 im Nierenzellkarzinom?

Ziel dieser Studie ist es, mit der Analyse des Methylierungsstatus in Verbindung mit klinisch-pathologischen Daten, die mögliche epigenetische *CDH3*-Veränderung in der Entstehung und Entwicklung des Nierenzellkarzinom einschätzen zu können.

Die Vorgehensweise sei hier kurz erläutert: Die Analyse mit COBRA soll zunächst den generellen Nachweis von Methylierung in definierten Zelllinien und anschließend im Patientenmaterial erbringen. Die daran anschließende Untersuchung mittels der Pyrosequenzierung an exakt demselben Material gilt einer unabhängigen Verifizierung der COBRA-Resultate als auch der quantitativen Analyse des Materials und ihrem statistischen Abgleich der klinisch-pathologischen Daten des Survivals.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Enzyme, Chemikalien, Reagenzien

NaOH:	Roth
Hydrochinon:	Merck
Mineral Oil:	Sigma
MgCl ₂ :	Roth, Merck
NaHS ₂ O ₅ :	Merck
Na-Acetat:	Roth/Merck/Sigma
HPLC-Wasser:	Baker
Abs.Ethanol fluoreszenzfrei:	Uvasol
PEG1500 (Polyethylenglycol):	Merck
Tris-HCL (Trizma®-base):	Sigma
Borsäure:	Merck
EDTA:	Merck
Glycogen:	Sigma
 <i><u>Agarosegel:</u></i>	
Agarose:	Roth/Invitrogen/Biozym
Gel red nucleic acid stain:	Biotium

PCR:

Oligonukleotid-Primer: Eurofins MWG operon

Primer-Sequenzen:

CBR055F	5` - GGATTTTGAGGTGTGGGGAGTG -3`
CBR055F2	5` - GAGGTGTGGGGAGTGTAGGG -3`
CBR055F3	5` - GGGGTTGAGTTTTTTGGGGTTAAG -3`
CBR055R	5` - CCTCCCCCTCCAAAATCACTTCA -3`
PS055RUniv	5` - GGGACACCGCTGATCGTTTACCTCCCCCTCCAAAATCACTTCA -3`
PS055S1	5` - GGATTTAGTTTTTTTTATTTTTTGT -3`
Bio-Uni02_2008	5` - GGGACACCGCTGATCGTTTA -3`

HotStartTaq Polymerase 5U/µl: Qiagen

Q-Solution 5x: Qiagen

PCR-Buffer 10x: Qiagen

MgCL₂ 25mM: Qiagen

Exonucleasen:

Taq^oI 20 U/µl: New England BioLabs

NEBuffer 4 10x: New England BioLabs

BSA 100x: New England BioLabs

HpyCH4IV 10 U/µl: New England BioLabs

NEBuffer 1 10x: New England BioLabs

Pyrosequenzierung:

PyroMark™ Gold Q96 SQA Reagents (1x96): Qiagen

- PyroMark™ dGTP, dTTP, dCTP, dATPalphaS

- PyroMark™ Enzyme Mixture 620 µl

- PyroMark™ Substrate Mixture 620 µl

- PyroMark™ Binding Buffer

Streptavidin Sepharose™ Beads: GE Healthcare

Denaturation Solution: Qiagen

Washing Buffer: Qiagen

Annealing Buffer: Qiagen

Sequence to Analyse: Qiagen

- TTTYGGGYGTAGGTTTGTGGTTGTAGTGY
GYGGTTTTYGAGTYGTGTYGGGYGGTTTTTA
GGGAGGTTGAAGTGATT

Immunhistochemie:

Primärantikörper:

- Purified Mouse Anti-P-Cadherin #610227 BD Biosciences

Verdünnung: 1:100 + Tyramidverstärkung bei ABC DAB

Sekundärantikörper:

- Biotinilated anti-mouse IgG made in horse #BA 2000, Vector Laboratories

Verdünnung: 1:200

- Vectastain^(R) Elite^(R) ABC Kit Vector Laboratories

- DAB Substrat Kit für Peroxidase Vector Laboratories

2.1.2 Lösungen und Puffer

dNTP-Mix (2 μ M):	dATP 100mM/100 μ l dTTP 100mM/100 μ l dCTP 100mM/100 μ l dGTP 100mM/100 μ l, Fermentas
TBE-Puffer (pH 8,0, Stammlösung 10x):	108g Tris 54g Borsäure 7,4g EDTA ad 1l bidest
TBE-Puffer pH 8,0 1x aus Stammlösung:	100ml TBE 10x ad 900ml H ₂ O
TE-Puffer (Stammlösung 10x):	12,11g Tris 3,72g EDTA ad 1l bidest
Ladepuffer:	Formamid 100% Xylencyanol 0,25% Bromphenolblau 0,25%
Bisulfit-Reagenz:	2,5 M NaHS ₂ O ₅ (=5M Na- Bisulfit) 125 mM Hydrochinon 0,4 M NaOH (pH 5)
MgCl ₂ -Lösung 1M:	10,17 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 50ml H ₂ O

2.1.3 DNA-Leiter

- Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder 0,5µg/µl, 50µg, Fermentas

2.1.4 Geräte

- Thermocycler: Primus 96 Plus, MWG-Biotech AG
Primus 25 advanced, Peqlab Biotechnologie GmbH
Sensoquest LabCycler, Sensoquest
- Pyrosequenzierer: PyroMark™ Q24 mit Vacuum Prep Workstation, Qiagen
- Gel Dokumentation: Gel Imager, INTAS
- Heizblock: DRI-BLOCK DB 2A, Techne

Weitere verwendete Geräte wie Vortexer, Pipetten, Elektrophoresezubehör und Zentrifugen entsprechen den gängigen Laborstandards.

2.1.5 Software

- Bildbearbeitung: Image J
- Pyrosequenzierung: PyroMark™ Q24 1.0.10, Qiagen

2.1.6 Patientenmaterial - Untersuchte DNA-Proben

Die für die molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzten Tumorgewebe-
proben (TU) und die makroskopisch normalen tumorbenachbarten Gewebe-
areale (TbA) entstammen einem Kooperationsprojekt der Urologischen
Abteilung der Medizinischen Hochschule Hannover und der Eberhard Karls
Universität Tübingen. Die Proben wurden bei Nierenoperationen, die zwischen
2001 und 2005 verliefen, von Mitarbeitern der Eberhard Karls Universität
Tübingen gewonnen, asserviert und schockgefroren bei -80°C gelagert. Ein
Ethikvotum und Patienteneinverständniserklärungen lagen vor. Es erfolgte eine
unabhängige histopathologische Begutachtung der zu allen Gewebeproben
vorliegenden Kontrollschnitte durch zwei Pathologen. Das Tumorstadium wurde
entsprechend der TNM-Klassifikation der UICC von 2002 eingeteilt. Das
Grading erfolgte auf der Basis des Fuhrman-Grading-System.

Lokalisierte RCC wurden definiert als $pT \leq 2$, N0, M0 und G1-2 und
fortgeschrittene Tumoren als $pT \geq 3$ und/oder N+/M+ und G2-3. Für die "gepaarte
Gewebe-
proben"-Analyse wurde Tumorgewebe mit einer benignen Gewebe-
probe des gleichen Resektats (Entnahmeabstand 0,5 bis 2cm zum
Primärtumor) verglichen. Die klinischen und histopathologischen Eigenschaften
des untersuchten Kollektivs sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die Dauer des Follow-up wurde als der Zeitraum zwischen der Operation und
dem Nachweis des Todes des Patienten, eines Rezidivs, einer Metastase, einer
Tumorprogression oder die letzte Follow-up-Untersuchung definiert. Die
Erfassung des Follow-up endete im April 2010. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde
eine Erneuerung der Daten regelmäßig wenigstens alle sechs Monate
durchgeführt.

Die TU und die TbA für die immunhistochemische Untersuchung entstammen
Nierenoperationen die 1998 von Mitarbeitern der Medizinischen Hochschule
Hannover gewonnen, asserviert und schockgefroren bei -80°C gelagert wurden.

Die Auswertung erfolgte äquivalent zu den Auswertungen des obigen Kooperationsprojektes. Ein Ethikvotum liegt ebenso vor.

		Alle RCC*	ccRCC	papRCC
<u>Fälle</u>	N	101	74	21
<u>TNM-Klassifikation</u>	I	56	39	15
	II	7	5	2
	III	36	30	3
	IV	1	0	1
	Tx	1	0	0
	N0	91	68	17
	N1	10	6	4
	M0	80	56	18
	M1	21	18	3
<u>Gepaarte Gewebeproben**</u>	N	65	50	10
<u>Differenzierungsgrad</u>	G1	19	16	2
	G2	67	45	17
	G3	15	13	2
<u>Geschlecht</u>	Männlich	64	43	17
	Weiblich	37	31	4
<u>Status***</u>	lokalisierter Tumor	58	38	16
	fortgeschrittener Tumor	43	36	5
<u>Alter (Jahre)</u>	Min	35	35	36
	Mittelwert	63,4	62,1	65
	Max	91	90	91
<u>Follow-up-Fälle</u>	N	59	42	n.a.
	mittleres Alter (Jahre)	64,6	n.a.	n.a.
	Männlich	36	n.a.	n.a.
	Weiblich	23	n.a.	n.a.
* Einschließlich gemischte und unklassifizierte RCC-Histopathologien				
** Tumor (TU); Tumorbenachbartes normales Gewebeareal (TbA)				
***Lokalisiert wurde definiert als pT≤2, N0,M0 und G1-2; fortgeschrittene Tumoren als pT≥3 und/oder N+/M+ und G2-3 und/oder N+/M+ und G2-3				
n.a.: keine Angaben (data not available)				

Tabelle 3: klinische und histopathologische Eigenschaften des untersuchten Patientenmaterials

2.1.7 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden von der Firma Lonza und der Firma CLS Heidelberg bezogen (Tab. 4 und 5). Die Positivkontrolle QM ist eine *in vitro* komplett methylierte, bisulfitkonvertierte, humane Kontroll-DNA der Firma Qiagen.

Primärzellen	Herkunft	Subtyp
RPTEC	Niere	Proximaler Tubulus
PrEC	Prostata	Epithel

Tabelle 4: untersuchte Primärzellen (Firma Lonza)

Zelllinien	Herkunft	Subtyp	Differenzierungsgrad	Metastase	LK-Status	Geschlecht
ACHN	Niere	Adenokarzinom				m/22j.
A-498	Niere	Nierenkarzinom				w/52j.
786-O	Niere	Adenokarzinom				m/58j.
RCC-GS	Niere	klarzelliges RCC	G3	M1/Hirn	N0	m/56j.
RCC-HS	Niere	klarzelliges RCC	G1	Mx	N0	w/59j.
RCC-MF	Niere	klarzelliges RCC	G2-3	Mx/Lunge	N1	m/63j.
LNCaP	Prostata	Prostatakarzinom aus LK-Met				m/50j.
DU-145	Prostata	Prostatakarzinom aus Hirn-Met		M+		m/69j.
PC-3	Prostata	Adenokarzinom aus Knochen-Met	G4			m/62j.
RT-112	Harnblase	Epithelkarzinom				
CLS-439	Harnblase	Epithelkarzinom				m/61j.
HB-CLS-2	Harnblase	Epithelkarzinom	G3			m/50j.
EJ-28	Harnblase	Epithelkarzinom				
5637	Harnblase	Epithelkarzinom	G2			m/68j.
T24	Harnblase	Epithelkarzinom				w/81j.
HB-CLS-1	Harnblase	Epithelkarzinom	G3			m/62j.
RCC = Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma)						
LK = Lymphknoten						
Met = Metastase						

Tabelle 5: untersuchte Tumorzellen (Firma CLS Heidelberg)

2.2 Methoden

Für die Erfassung des Methylierungsstatus des *CDH3* in Nierengewebe waren mehrere Teilschritte erforderlich: zuerst wurde die DNA-Extraktion aus den Zelllinien sowie der Patientenproben vorgenommen und anschließend einer Bisulfit-Behandlung unterzogen, wodurch sich die extrahierte DNA in der weiterführenden Methylierungsanalyse verwenden ließ. An die Bisulfit-Behandlung schloss sich eine PCR-gestützte Amplifikation eines Abschnittes einer CGI (*UCSC Genome Browser CpG112*) im *CDH3* an. Das Produkt dieser ersten PCR wurde dann in zwei voneinander unabhängigen Methoden weiter verwendet:

- in der *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA) und
- der Pyrosequenzierung, für die weitere PCR-Schritte notwendig waren.

Einen Überblick darüber bietet Abbildung 4.

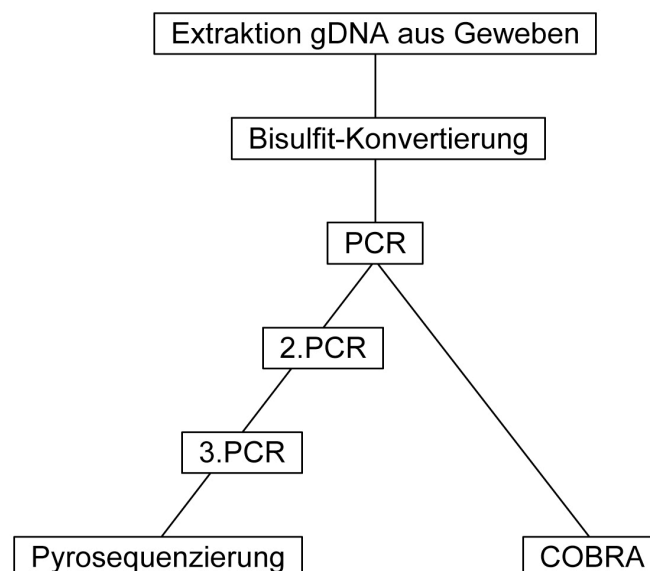


Abbildung 4: Übersicht der Vorgehensweise bei der Verarbeitung der Proben

2.2.1 DNA-Extraktion aus humanen Nierenzellkarzinomen

Die DNA-Extraktion aus humanen RCC wurde freundlicherweise von der medizinisch-technischen Assistentin Frau Christel Reese vorgenommen. Die Proben wurden der Gesamt-DNA-Extraktion mittels Proteinkinase K und der Standard-Phenol/Chloroform-Extraktionsmethode zugeführt. Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut. 1µl der extrahierten DNA war Ausgangsprodukt der Bisulfit-Konversion.

2.2.2 Bisulfit-Konversion

Es ist bekannt, dass 5-Methylcytosin in CpG-reichen Regionen der *recognition site* mit der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren interferieren und zu einer Beeinträchtigung der Transkription der DNA führen kann. Es resultiert eine reduzierte oder inaktivierte Genexpression, das sog. *genesilencing* (reviewed in Baylin, 2005). Eine bekannte Methode 5-Methylcytosin nachzuweisen, beruht auf dem Nachweis von Bisulfit (Warnecke et al., 2002). Durch die Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA wird Cytosin hydrolytisch zu Uracil desaminiert. 5-Methylcytosin hingegen geht aufgrund der Methylierung unverändert aus dieser Reaktion hervor. In der darauffolgenden PCR wird jedes Uracil und jedes Thyminid als Thyminid und jedes 5-Methylcytosin als Cytosin amplifiziert (Abb. 5).

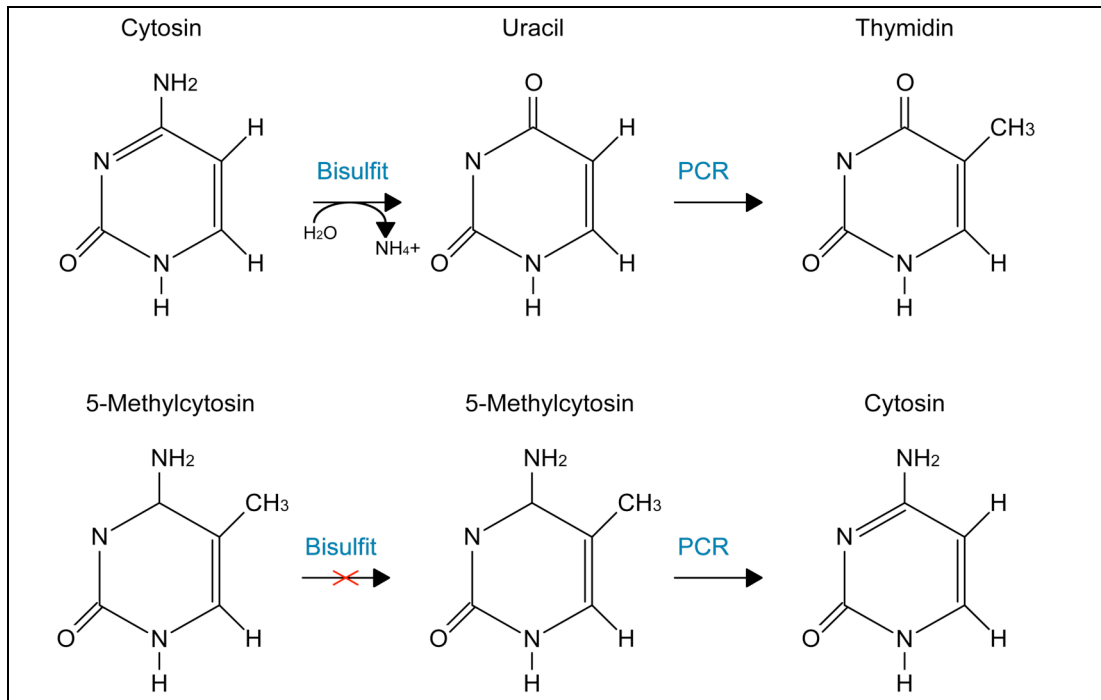


Abbildung 5: Bisulfit-Reaktion; Die Bisulfit-Behandlung katalysiert die Desaminierung von Cytosin zu Uracil; 5-Methylcytosin bleibt unverändert. In der PCR wird Uracil als Thymin und 5-Methylcytosin als Cytosin amplifiziert. modifiziert nach Tschentscher und Wagener 2006.

Bisulfit-Konversions-Protokoll

- DNA-Denaturierung:** 2µg isolierte DNA wurden in 30µl 0,2M NaOH aufgenommen und für 30 Minuten bei 42°C inkubiert.
- Bisulfit-Konversion:** 400µl Bisulfitreagenz bestehend aus 4,75g Natriumdisulfit (-20°C), 7ml H₂O, 0,137g Hydrochinon wurden mit H₂O auf 8ml aufgefüllt, anschließend 400µl 10M NaOH dazugegeben und mit H₂O auf 10ml aufgefüllt. Vor Gebrauch erfolgte die Erwärmung auf 37°C und die Übersichtungung mit 150µl Mineralöl bei anschließender o/n-Inkubation bei 50°C.
- DNA-Fällung:** Das Mineralöl wurde abgenommen und ein Mastermix aus 800µl H₂O, 4µl Glycogen (20mg/ml) und 20µl MgCl₂ (1M) angesetzt. Davon wurden 824µl auf die DNA-Probe pipettiert. Dieser Ansatz wurde

dann mit 800µl PEG 1500 (50%, w/w) versetzt und invertiert bis die Probe homogen war. Nachfolgend wurde die Probe für 60 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Zentrifugation für 20 Min. bei 13000 U und 4°C durchgeführt, um die Sedimentation der DNA zu sichern. Darauf folgend wurde der Überstand verworfen, mit 250 µl 70% Ethanol die DNA gewaschen und erneut 5 Min bei 13000 U und 4°C zentrifugiert. Nach der Waschung wurde der Überstand erneut verworfen und die DNA-Pellets luft- oder bei ca. 50°C 5 Min trocknen gelassen. Nachfolgend wurden 100µl 0,3M NaOH dazupipettiert, die Pellets vorsichtig heraus-suspendiert und 15 Min inkubiert. Anschließend wurde ein Mastermix aus 10µl 3M NaAcetat (pH 4,8) und 250µl 100% Ethanol der Probe beigemischt und bei 20°C über Nacht gelagert. Der letzte Schritt begann mit der Zentrifugation der Probe für 10 Min 13000 U und 4°C, der Zugabe von 250µl 70% Ethanol und endet mit der erneuten Zentrifugation für 5 Min. Zuletzt wurde das Pellet in 20µl 1xTE aufgenommen.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein *in vitro* Verfahren, welches der Amplifikation von Nukleinsäuretemplates von einer Größe bis zu 40 kbp dient. Voraussetzung ist das Vorhandensein eines DNA-Doppelstranges, dessen Sequenz bekannt ist, zwei Primern (jeweils Oligonukleotide definierter Länge, mit circa 20 Basen) die den Startpunkt der abzulesenden DNA markieren, als auch die temperaturstabile Taq-Polymerase. Der Verlauf einer PCR ist in drei Schritte gegliedert (Abb. 6). Zunächst erfolgt die Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C. Nachfolgender Schritt ist das Annealing, in dem sich die Primer spezifisch bei 45-65°C an die DNA anlagern (annealen), wodurch sich Hybridmoleküle zwischen jeweils einem Strang der zu amplifizierenden DNA und dem zu diesem Strang komple-

mentären Primer ausbilden. Es entstehen einzelsträngige Moleküle, die nur im Bereich des gebunden Primers doppelsträngig sind. Die abschließende Verlängerung (Elongation) des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes beginnt an diesem kurzen doppelsträngigen Bereich und erfolgt bei einer Temperatur von 72°C in Gegenwart von dNTPs und der Taq-Polymerase mit dem Ergebnis, einen neuen komplementären DNA-Strang synthetisiert zu haben. Der gesamte Vorgang wird bis zu 40 mal wiederholt, was zu einer exponentiellen, selektiven Zunahme (etwa 10^6 - 10^7 -fach) der Ausgangs-DNA führt (reviewed in Vosberg, 1989).

1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge	95°C
2. Anlagerung der Primer (Annealing)	45-65°C
3. DNA-Synthese (Elongation)	72°C

Abbildung 6: Übersicht: Ablauf einer PCR

Die exakte Annealing-Temperatur des Primers hängt von der Länge und Sequenz des Primers ab (s.u.). Des Weiteren ist die Elongationszeit abhängig von dem zu amplifizierenden DNA-Anschnitt und durch eine Variation von der $MgCl_2$ -Konzentration sowie anderer PCR-Additive kann die Amplifikation optimiert werden.

2.2.4 “Nested-PCR”

Die “nested PCR” ist eine Modifikation der PCR. Garson et al. haben 1990 bei der Untersuchung des Hepatitis C-Virus diese Methode etabliert. Sie ließen einer ersten PCR eine zweite folgen, in der das Template aus dem Produkt der ersten PCR bestand (Abb. 7). Dabei wird die DNA mit zwei „äußeren“ Primern versehen, die einen längeren komplementären Strang synthetisieren. Somit ist

zunächst die DNA-Sequenz amplifiziert, die Fokus des Interesses ist. Bei der anschließenden zweiten PCR werden nun zwei „innere“ Primer hinzugegeben, die in dem bereits synthetisierten Strang binden. Resultat dieser Methode ist ein kleineres, nebenproduktfreieres und, durch die zweite Amplifikation, vielfaches Amplikon. Durch die zweite PCR ist also ein höheres Maß an Sensitivität gegeben. Diese „semi-nested-PCR“ ist durch beliebig viele Durchläufe erweiterbar.

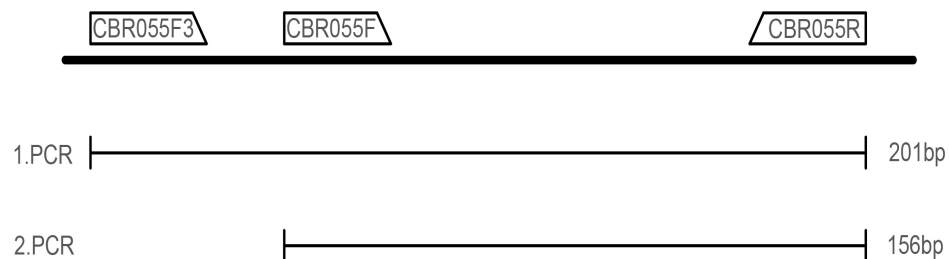


Abbildung 7: Schematische Darstellung der "semi-nested-PCR"

2.2.5 Primergenerierung

Das Designen der Primer wurde freundlicherweise von dem Arbeitsgruppenleiter Dr. J. Serth unter Verwendung der Software PyroMark™ Assay Design (Version 2.0.1.15) durchgeführt. Wichtigstes Auswahlkriterium war hierbei, dass die entsprechenden Primerpaare sowohl für die COBRA als auch für die Pyrosequenzierung verwendet werden konnten. Es kam dabei vor allem darauf an, dass in dem entsprechenden Amplifikat des *CDH3* ausreichend CG-Dinukleotide auftreten, die potentiell methyliert sein können, zudem mindestens eine Spaltstelle für das Restriktionsenzym *Taq^qI* und optional eine zusätzliche Spaltstelle für das Restriktionsenzym *HpyCH4IV* vorhanden ist.

Des Weiteren wurde die Auswahl der Primer dahingehend beeinflusst, dass der

Sequenzierungsprimer für die Pyrosequenzierung nach den drei zur Verfügung stehenden Vorwärtsprimern (CBR055F, CBR055F2 und CBR055F3) der COBRA in dem Amplikon binden muss (s.u.). Es waren folgende grundlegende Primereigenschaften vorausgesetzt:

- eine Annealing-Temperatur zwischen 55°C und 63°C
- eine Annealing-Temperatur der zusammengehörigen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die annähernd identisch ist
- Primerpaare, die möglichst wenig 3' und 5' Interaktionen untereinander aufweisen

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG operon bezogen und sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet (Tab. 6).

Primer	Systemprimer	Länge	Sequenz
CBR055F	F2	156bp	GGATTTTGAGGTGTGGGGAGTG
CBR055F2	F28	149bp	GAGGTGTGGGGAGTGTAGGG
CBR055F3	F1	201bp	GGGGTTGAGTTTTTTGGGGTTAAG
CBR055R	R1		CCTCCCCCTCCAAAATCACTTCA
PS055RUniv			GGGACACCGCTGATCGTTTACCTCC CCCCTCCAAAATCACTTCA
PS055S1			GGATTTAGTTTTTTTTATTTTTTGT
Bio-Uni02_2008			GGGACACCGCTGATCGTTTA

Tabelle 6: Übersicht über die zur Verfügung stehenden Primer

2.2.6 Optimierung der PCR-Bedingungen

2.2.6.1 COBRA

Ausgehend von einer theoretischen Annealing-Temperatur, die durch die Software PyroMark™ Q24 1.0.10 berechnet wurde und jedem A und T separat eine Schmelztemperatur (T_m) von 2°C und jedem G und C eine T_m von 4°C

zuschreibt, wurde mit Hilfe eines Gradientencyclers die tatsächliche, optimale Annealing-Temperatur experimentell ermittelt.

Hierfür wurden zwei Mastermixe mit einem Endvolumen von jeweils 20µl angefertigt. Die jeweiligen Endkonzentrationen der einzelnen Bestandteile beider Mastermixe pro Probe berechneten sich wie folgt: 0,02 U/µl Qiagen-Hotstart, 1x PCR buffer, 0,2mM dNTPs, 1mM Mg²⁺, 0,4 µM Primer F und 0,4µM Primer R. Dem zweiten Ansatz wurde zusätzlich Q-Solution in einer Endkonzentration von 1 hinzu pipettiert. Als Template-DNA wurden 10ng von 2-3 Zelllinien verwendet. Um eine optimale Primer-DNA-Bindung zu erzielen, wurde ein Temperaturgradient von 56,5°C bis 62°C festgelegt.

Vergleich verschiedener Amplikonoptionen

Für die Primeroptimierung standen drei unterschiedliche Vorwärtsprimer zur Verfügung (Tab. 6), bei deren Verwendung unterschiedliche Amplikons resultierten. Von diesen drei Möglichkeiten wurden zwei experimentell untersucht. Zunächst wurde dabei die Kombination aus CBR055F und CBR055R mit einer Amplikonlänge von 156 bp bei einer Temperaturspanne von 57 bis 63°C gewählt. Die zweite Kombinationsmöglichkeit aus CBR055F2/CBR055R wurde zurückgestellt, da die Amplikonlänge dieser Kombination mit 149 bp nur sieben Basenpaare und damit unverhältnismäßig kürzer als das Produkt aus CBR055F/CBR055R wäre, was ähnliche Ergebnisse vermuten ließ.

Die dritte Möglichkeit der Primerkonstellationen bestand aus CBR055F3 und CBR055R mit einer Länge von 201 bp. Beim Pipettieren wurde darauf geachtet, dass auf Eis gearbeitet wurde, um Primer-Interaktionen oder auch andere frühzeitige unspezifische Bindungen zu verhindern. Qiagen HotStartTaq Polymerase wurde erst unmittelbar vor dem Einsatz in den Thermocycler in den Ansatz hinzupipettiert.

PCR-Programm - Temperaturgradient

Die Amplifikationsreaktion wurde im Thermocycler Sensoquest LabCycler mit Temperaturgradient mit folgendem Programm durchgeführt (Abb. 8):

1. Aktivierungstemperatur und Denaturierung	95°C für 15 Min	
2. Gradiententemperatur (Annealing)	56,5°C 57,8°C 58,7°C 60,5°C 62°C	für 45 Sek
3. Elongation	72°C für 45 Sek	
4. Erneute Denaturierung	95°C für 45 Sek	
Wiederholung der Schritte ab Punkt 2 für 45 Zyklen		
5. Finale Elongation	72°C für 5 Min	

Abbildung 8: PCR-Protokoll für die Optimierung der Primer für die COBRA;
Rampengeschwindigkeit 2°C/Sek

Die Optimierung erfolgte mit einer Positiv-Kontrolle eines bereits optimierten Primerpaares (CBR047F/R).

2.2.6.2 Pyrosequenzierung

Die in 2.2.6.1 erwähnten allgemeinen Bedingungen für die Optimierung der Annealing-Temperatur gelten auch für die Pyrosequenzierung. Für jede Probe muss die am besten geeignete Annealing-Temperatur experimentell ermittelt werden. Bei der Durchführung der Methode der Pyrosequenzierung kommt das Verfahren der nested-PCR zu tragen. Um eine optimale Primer-DNA-Bindung in beiden PCRs zu erzielen, wurden zwei Temperaturgradienten-Programme etabliert. Die dabei getesteten Temperaturen (57,6°C bis 63,1°C) der ersten PCR wurden mit jeder Temperaturdifferenz (57,6°C bis 63,1°C) der zweiten PCR kombiniert.

Der Mastermix entsprach dem Mastermix für die COBRA. Auch hier hat sich die Hinzugabe von Q-Solution bewährt. Als Template-DNA der ersten PCR wurden 10ng von 2-3 Zelllinien verwendet.

Vergleich verschiedener Amplikonoptionen

Für die Pyrosequenzierung standen die selben Primer wie für die COBRA zur Verfügung (Tab. 6). Da zusätzlich die Primer PS055Runiv und Bio-Uni02_2008 hinzukamen, mussten die Primerpaare für die Pyrosequenzierung unabhängig von der COBRA optimiert werden. Die der Pyrosequenzierung zu Grunde liegende Methode der nested-PCR wurde hier mit CBR055F3 und CBR055F untersucht. Die vielfältigen Varianten der möglichen zu testenden Ansätze sind in 2.2.9 erläutert.

PCR-Programm - Temperaturgradient

Die Amplifikationsreaktion wurde im Thermocycler Sensoquest LabCycler mit Temperaturgradient mit folgendem Programm 2x durchgeführt (Abb. 9):

1. Aktivierungstemperatur und Denaturierung	95°C für 15 Min	
2. Gradiententemperatur (Annealing)	57,6°C 59,5°C 60,8°C 61,9°C 63,1°C	für 45 Sek
3. Elongation	72°C für 45 Sek	
4. Erneute Denaturierung	95°C für 45 Sek	
Wiederholung der Schritte ab Punkt 2 für 45 Zyklen		
5. Finale Elongation	72°C für 5 Min	

Abbildung 9: PCR-Protokoll für die Optimierung der Primer für die Pyrosequenzierung; Rampengeschwindigkeit 2°C/Sek

2.2.7 DNA-Nachweis durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dem schnellen Nachweis von PCR-Produkten. Für den Nachweis wurden 3%ige Agarosegele verwendet, die aus 6g Agarose und 200-250ml 1x TBE bestanden. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle erhitzt und, nach Abkühlen bei Raumtemperatur auf 50-60°C, 150µl Gelred-Gebrauchslösung hinzugegeben. Das Gel wurde danach in vorbereitete Gelkammern mit Kämmen gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde es in eine Kammer mit 1x TBE-Laufpuffer gegeben und darauf geachtet, dass das Gel vollständig mit Laufpuffer bedeckt ist. Nach Anzahl der Proben wurden je 2µl Bromphenolblau, welches dem Beschweren der DNA dient, auf einen Parafilmstreifen vorgelegt, 3,5µl isolierte DNA dazugegeben, in der Pipette gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Zuletzt wurde 1µl DNA-Leiter in die letzte Tasche pipettiert.

Dadurch, dass Nukleinsäuren aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind, lassen sie sich bei Gleichstrom und einer Spannung von 120V durch Wanderung von der Kathode zur Anode entsprechend ihrer Länge auftrennen. Dies geschieht umso langsamer, je größer die Fragmente sind. Abschließend wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet. Gelred, das sich in der DNA eingelagert hat, fluoresziert im ultravioletten Licht. Die sichtbaren Banden wurden fotografisch dokumentiert.

2.2.8 COBRA

Die COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*) ist eine Methode zur Erfassung der DNA-Methylierung an verschiedenen CGI, die auch semi-quantitativ ausgewertet werden kann (Peters et al., 2007). Restriktionsenzyme dienen hierbei der Erkennung methylierungsabhängiger Sequenzunterschiede bisulfitkonvertierter DNA. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme *Taq^I*

mit Schnittstelle 5'...T[▼]CGA...3' sowie *HpyCH4IV* mit Schnittstelle 5'...A[▼]CGT...3' zur Spaltung benutzt. Sofern die DNA an CGI methyliert ist, können *Taq^αI* und *HpyCH4IV* das PCR-Produkt in kleinere Fragmente schneiden. Ist dies nicht der Fall, sprich C ist zu T modifiziert worden, kann das Amplikon nicht gespalten werden, da keine Schnittstelle vorhanden, und liegt in voller Länge vor. Die Verwendung beider Enzyme dient dem Vergleich der Ergebnisse. Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm "ImageJ" benutzt.

PCR für die COBRA

Zur Durchführung der COBRA wurde ein Reaktionsansatz von 30µl gewählt. Der Mastermix wurde gemäß Protokoll hergestellt und entsprach den Konzentrationen wie in 2.2.6.1 aufgeführt. Die Verwendung von Q-Solution hat sich bewährt. Als Template-DNA dienten die 18 Zelllinien und QM, von denen jeweils 10ng verwendet wurde, sowie die generierten Patientenmaterialien, von denen jeweils 20ng verwendet wurden.

Restriktionsprotokoll der COBRA

Die Restriktionsverdau wurden nach folgenden Protokollen durchgeführt.

- *HpyCH4IV*: Pro Probe wurden 4,8µl PCR-Produkt mit 7,3µl Mastermix, bestehend aus: 6µl autoklaviertem H₂O, 1,2µl NEB 1 und 0,1µl *HpyCH4IV* angesetzt und für 6 bis 11 Stunden bei 37°C inkubiert.
- *Taq^αI*: Pro Probe wurden 4,8µl PCR-Produkt mit 7,42µl Mastermix, bestehend aus: 6µl autoklaviertem H₂O, 1,2µl NEB 4, 0,12µl BSA und 0,1µl *Taq^αI* angesetzt und für 6 Stunden bei 65°C inkubiert.

Aus den Reaktionsansätzen wurden anschließend, zusammen mit den

zugehörigen Leerkontrollen (PCR-Produkte ohne Zugabe von Restriktionsenzym), 7,5µl entnommen und nebeneinander auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.9 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine *real-time* Sequenzierungstechnik (*DNA-Sequencing-by-Synthesis*), die erstmals von Ronaghi et al. 1998 beschrieben wurde. Diese Methode basiert auf der Echtzeit-Detektion von unorganischem Pyrophosphat, welches während der DNA-Poylmerase-Reaktion frei wird. Im Detail heißt das, dass zu Beginn einem Reaktionsansatz, dem ein bestimmtes DNA-Fragment beigefügt wurde, die vier Trinukleotide aufeinander folgend zugegeben werden. Dabei verlängert die DNA-Polymerase den DNA-Strang mit dem komplementären dNTP. Jeder korrekte Einbau ist mit der Freisetzung einer äquimolaren Menge Pyrophosphats (PPi) verbunden (Abb. 10).

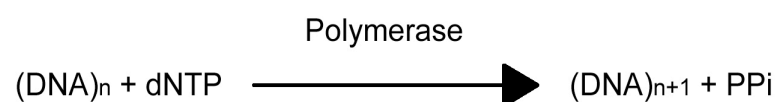


Abbildung 10: Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) nach Einbau eines Nukleotids (dNTP); nach Pyrosequencing™

Die ATP-Sulfurylase katalysiert im weiteren Verlauf die Konvertierung des freigewordenen Pyrophosphats (PPi) mit Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) zu ATP. Das ATP ermöglicht nun, die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin mittels Luciferase zu induzieren. In diesem Schritt wird detektierbares Licht freigesetzt.

Dieses Lichtsignal ist proportional zur Menge des ATPs und dadurch auch proportional zum Pyrophosphat und zur Anzahl der eingebauten dNTPs. Mit Hilfe der SQA Software (Pyrosequencing AB) wird das Ergebnis dieser Luciferase-Reaktion durch ein quantitatives PyrogrammTM visualisiert. Somit lässt sich die DNA-Synthese quantitativ verfolgen (Abb. 11).

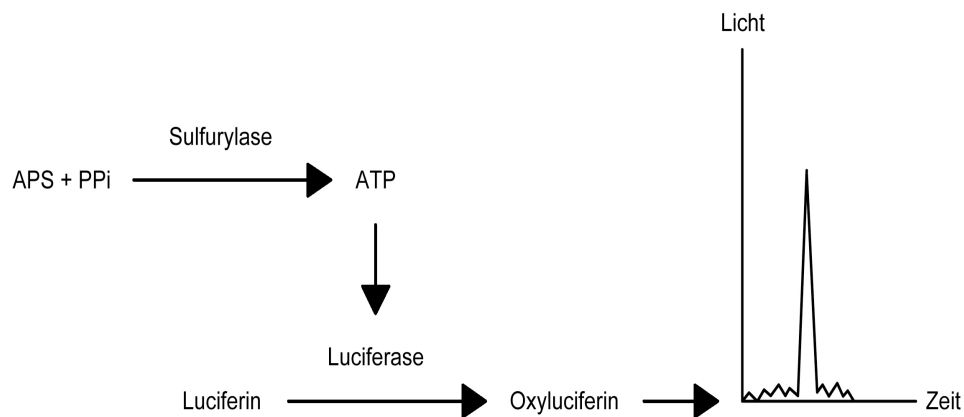


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Enzymkaskade bei der Pyrosequenzierung; nach PyrosequencingTM

Erwähnenswert ist, dass bei jeder dNTP-Zugabe, ob nun das komplementäre Nukleotid oder ein nicht-passendes, uneingebaute Nukleotide überschüssig sind. Dieser Überschuss an dNTPs wird von dem Enzym Apyrase abgebaut (Abb. 12). Erst wenn der Abbau vollständig erfolgt ist, wird das nächste dNTP hinzugegeben.



Abbildung 12: Abbauweg von überschüssigen dNTPs; nach PyrosequencingTM

Durch den Einsatz der Pyrosequenzierung in der epigenetischen Forschung gelang 2002 exemplarisch an einem einzelnen CpG-Dinukleotid der Nachweis des Methylierungsgrades des Cytosins (Uhlmann et al., 2002). In dieser Studie ermöglicht sie die quantitative Messung der Methylierung von 8 CpG-Stellen in einer CGI des *CDH3* (Abb. 3).

Um eine kostengünstige Variante der Pyrosequenzierung und einen möglichst hohen Durchlauf an Messungen methylspezifischer Level vielfältiger Gene zu ermöglichen, entwickelten Colella et al. (2003) einen Rückwärtsprimer, der zugleich mit einem biotinylierten Universalprimer kombiniert ist. Die Umsetzung dessen erfolgte in unserem Labor nach folgendem Schema (Abb.13):

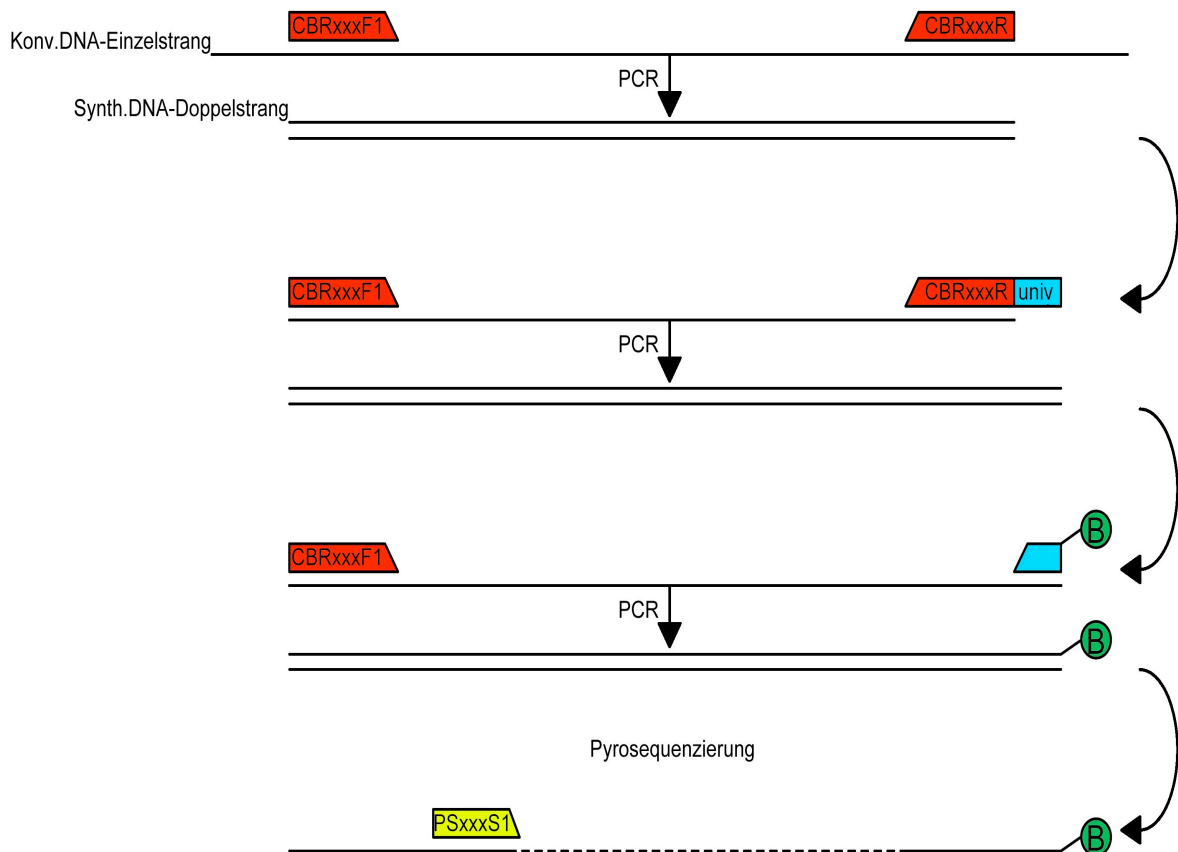


Abbildung 13: Übersicht über den Verlauf der Pyrosequenzierung mit dem Einsatz eines biotinylierten Universal-Rückwärtsprimers (nach Colella et al. (2003)). An einen konvertierten DNA-Einzelstrang wird in der PCR ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dieses Produkt dient als Template für eine weitere PCR mit einem anderen Primerpaar. Der Rückwärtsprimer ist hierbei gleich dem der ersten PCR mit dem Zusatz einer bekannten universellen Basenabfolge (20 Basen-hier als univ markiert). Daraus resultiert ein Produkt, das um die genannten 20 Basen länger ist. Dieses längere Produkt wird in einer dritten PCR mit einem dritten Primerpaar kombiniert. Der Rückwärtsprimer besteht jetzt nur noch aus den 20 Basen, ist biotinyliert und kann in diesem Schritt an jedes beliebige PCR-Produkt binden, welches die vorherigen Schritte durchlaufen hat. In der anschließenden Pyrosequenzierung werden die biotinylierten Stränge herausgefiltert und gemessen.

Getestete PCR-Optionen für die Pyrosequenzierung

Bei den Temperaturgradienten-PCRs, getestet mit CBR055F3/PSRuniv und CBR055F3/Bio-Uni02_2008, stellte sich heraus, dass in der ersten PCR die beste Primerbindung in dem Bereich von 61,5°C bis 63°C und in der zweiten PCR von 61°C bis 62°C stattfand. Um aber von allen 18 Zelllinien und den Tumorklinien optimale PCR-Produkte zu erlangen, mussten mehrere Ansätze und Primerkombinationen verfolgt werden.

Die erste Variante bestand in der Kombination aus den Primerpaaren CBR055F3/PS055Runiv und CBR055F3/Bio-Uni02_2008. Die erste PCR lief bei 62°C, mit einer Rampengeschwindigkeit von 2°C und 45 Zyklen im Sensoquest LabCycler. Die zweite PCR folgte mit 61°C, einer Rampengeschwindigkeit von 2°C bei 45 Zyklen im Primus 25 advanced. Als Template-DNA dienten 10ng aller 18 Zelllinien.

Die zweite Variante entsprach der Primerkombination von CBR055F und PS055Runiv in der ersten PCR bei 61°C, einer Rampengeschwindigkeit von 2°C und 45 Zyklen im Sensoquest LabCycler. Die zweite PCR war identisch zur ersten bis auf den Austausch der Primer in CBR055F/Bio-Uni02_2008. Als Template-DNA dienten 10ng aus dem PCR-Produkt der Primerkombination CBR055F3/PS055Runiv.

Ab der dritten Variante wurde die Zyklenanzahl reduziert. Das Primerpaar war CBR055F/PS055univ in der ersten PCR bei 61,5°C, einer Rampengeschwindigkeit von 2°C und 20 Zyklen im Sensoquest LabCycler mit einer Template-DNA aus dem PCR-Produkt von CBR055F3/PS055Runiv in einer Menge von 10ng. Die zweite PCR folgte mit CBR055F/Bio-Uni02_2008 bei 61,5°C, einer Rampengeschwindigkeit von 2°C und 20 Zyklen.

In der vierten Variante wurde CBR055F/PS055Runiv in der ersten PCR bei 61°C, einer Rampengeschwindigkeit von 2°C im Sensoquest LabCycler und 30 Zyklen mit einer Template-DNA aus dem PCR-Produkt von CBR055F3 und

PS055Runiv in einer Menge von 10ng verwendet. Und die zweite PCR folgte mit CBR055F/Bio-Uni02_2008, bei 61°C und einer Rampengeschwindigkeit von 2°C und 30 Zyklen.

In der fünften Variante wurde das Prinzip einer triplex-nested PCR verfolgt. Die erste PCR wurde mit CBR055F3/CBR055R bei 61,5°C, einer Rampengeschwindigkeit von 2°C im Sensoquest LabCycler und 45 Zyklen durchgeführt. Die zweite PCR folgte mit CBR055F/PS055Runiv bei 61,5°C mit 30 Zyklen im Primus 96 Plus und dritte PCR mit CBR055F/Bio-Uni02_2008, bei 61,5°C im Primus 96 Plus und erneuten 30 Zyklen.

Der Mastermix für die Pyrosequenzierung wurde gemäß Protokoll hergestellt, dabei hat sich stets die Verwendung von Q-Solution bewährt. Als Template-DNA dienten, sofern nicht anders erwähnt, die 18 Zelllinien und QM, jeweils 10ng. Mit der bewährten Methode wurde anschließend das Patientenmaterial untersucht.

Protokoll der Strangisolation für die Pyrosequenzierung

Nachdem das Amplikon aus der dritten PCR-Variante mittels Agarose-Gelelektrophorese (s.o.) nachgewiesen worden ist, schloss der Arbeitsschritt der Immobilisation der biotinylierten PCR-Produkte an. Die gesamte Durchführung ist gemäß den Herstellerangaben von Pyrosequencing™ durchgeführt worden. Demnach wird pro Probe ein Volumen von 80µl benötigt, das sich in diesem Fall aus 7µl des Ansatzes der dritten PCR, 40µl Binding buffer, 2µl Streptavidin Sepharose™ und 31µl dH₂O zusammensetzt. Der Ansatz wurde anschließend in eine 24-well-Platte pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten auf einem Plattenrüttler inkubiert. Die Streptavidin Sepharose™ Beads binden in dieser Zeit an den biotinylierten Anteil des Rückwärtsprimers. Somit ist es im nachfolgenden Schritt möglich, mittels eines Vakuum-Pumpkopfes mit 24 Filtersonden in 15 Sekunden, die immobilisierten PCR-

Produkte an den SepharoseBeads herauszufiltern. Die Separation der Einzelstränge erfolgt durch die nachfolgenden Reinigungsschritte: 5 Sekunden 70% Ethanol, 5 Sekunden Denaturation-Solution, 10 Sekunden WashingBuffer. Unter ständigem Vakuum-Pumpen bleiben die Beads am Pumpkopf haften.

Nach Abschluss dieses Vorgangs wird der Pumpkopf ausgeschaltet und in 25µl eines 0,3µM Sequenzierungsprimers, bestehend aus PS055S1 und AnnealingBuffer, in eine flache 24-well-Platte getaucht. Durch vorsichtiges Hin- und Herrütteln lösen sich die SepharoseBeads an denen die PCR-Stränge immobilisiert wurden, vom Pumpkopf. Diese Platte muss nun für 2 Minuten bei 80°C inkubieren und dann zur Primeranlagerung 5 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen.

Verfahren der Pyrosequenzierung

Voraussetzung zur Durchführung der Pyrosequenzierung ist die Kenntnis über die *Sequence to Analyse*, eine bekannte Basenabfolge im *CDH3*, die im Amplikon analysiert werden soll. Diese *Sequence to Analyse* mit der Basenabfolge TTTYGGGYGTAGGTTTGTGGTTGTAGTGYGYGGTTTTYAG TYGTGTYGGGYGGTTTTAGGGAGGTTGAAGTGATT wurde mit der Software PyroMark™ Q24 1.0.10 erstellt und gibt die Reihenfolge der hinzuzugebenden Desoxynukleotide vor, die dem Primer folgen. Die dNTPs werden in der Reihenfolge T, A, C, G in 55facher Wiederholung (gemäß der Anzahl der zu messenden Basen) dem Sequenzieransatz hinzugegeben. Die hier untersuchte *Sequence to Analyse* enthält acht CpG-Stellen, die methyliert sein können. Zur Kontrolle der Pyrosequenzierung ist ein nicht-methyliertes Kontroll-Cytosin eingefügt, das die korrekte Komplettierung der Konvertierung der DNA zu quantifizieren erlaubt, die in unseren Proben in der Regel >99% betrug. Um für einen Lauf der Pyrosequenzierung die exakte Menge der vier Nukleotide, sowie des Enzym- und Substrat-Mix in die vorgegebene Kartusche zu pipettieren,

lässt sich mit der gleichen Software ein dies beinhaltendes *Worksheet* erstellen. Nach der Durchführung der Pyrosequenzierung kann, wieder mit obig genannter Software, der exakte Methylierungsgrad jeder einzelnen CpG-Stelle ermittelt werden, was in einem PyrogrammTM (s.u.) dargestellt wird.

2.3 Statistische Auswertung der Pyrosequenzierungsdaten

Die statistische Auswertung wurde von Dr. Serth und Dr. Großhenning unter Verwendung des Programmpakets "R2.12" erstellt. Für die explorative statistische Analyse der Daten wurde die Verteilung der Messwerte sowie ihrer logarithmischen Transformation (dekadischer Logarithmus) nach Anfertigung von Box-Plots auf ihre Ähnlichkeit mit normalverteilten Werten hin beurteilt (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden für alle statistischen Analysen die logtransformierten Werte eingesetzt. Die grafischen Darstellungen der Methylierungsdaten wurden für eine bessere Verständlichkeit anhand der nicht-transformierten Daten erstellt. Die gepaarten Gewebeproben (Tumorproben (TU) versus tumorbenachbarte normale Gewebeareale (TbA) wurden im gepaarten t-Test miteinander verglichen, während der Vergleich der Tumorsubgruppen mit Hilfe der univariat logistischen Regression erstellt wurde. Des Weiteren wurden der Durchschnitt, die Standardabweichungen (SD), Odds ratios (OR), die entsprechenden 95% Konfidenzintervalle (CI) und zweiseitige p-Werte angegeben. Ein visueller Vergleich der univariaten Daten erfolgte mit dem bean plot Paket für R Statistik Software „bean plots“ als eine Kombination einer eindimensionalen Streuungs- und Dichtegrafik.

In allen Tests wurde $p < 0.05$ als signifikant definiert. Das rezidivfreie Überleben wurde mittels univariater Cox Regressionsanalyse ermittelt. Dabei galt das Überleben als der Zeitraum von der Operation bis zum Auftreten eines lokalen Rezidives, einer Fernmetastase oder eines irgendwie anders gearteten

Rezidives. Als Schwellenwerte der Methylierung für die Überlebenszeitanalyse wurden der Median bzw. der optimale Schwellenwert, der mit Hilfe des R-Pakets "Max-Rank" ermittelt wurde, eingesetzt.

2.4 Immunhistochemische Anfärbung von CDH3 in Nierengeweben

Es wurden 20 TU und TbA durch Margrit Hepke, medizinisch-technische Assistentin in der Arbeitsgruppe, durch indirekte Immunhistochemie angefärbt. Der Antigen-Antikörperkomplex aus CDH3, dem Primärantikörper "Purified Mouse Anti-P-Cadherin #610227" und dem Sekundärantikörper "Biotinilated anti-mouse IgG made in horse #BA 2000" wurde dabei mit Vectastain^(R) Elite^(R) ABC Kit und dem DAB Substrat Kit für Peroxidase behandelt. Die 20 TU und 20 TbA sind separate Proben, deren Material als eigenständiges Untersuchungskollektiv untersucht wurde; siehe auch 2.1.6.

3 Ergebnisse

3.1 COBRA

Die Verwendung der COBRA in dieser Untersuchung diente dem Screening auf *CDH3*-CGI-Methylierung. Das Prinzip und das Protokoll der COBRA sind in 2.2.8 beschrieben.

3.1.1 Experimentelle Ermittlung der PCR-Bedingungen

Für die Optimierung der PCR standen drei Primerkombinationen zur Auswahl CBR055F/CBR055R, CBR055F2/CBR055R und CBR055F3/CBR055R. Die Kombination aus CBR055F und CBR055R mit einer Amplikonlänge von 156 bp zeigte in der Temperaturgradienten-PCR bei einer Temperaturspanne von 57°C bis 63°C sowohl mit Q-Solution als auch ohne Q-Solution stets erhebliche Nebenprodukte. Auch die Halbierung der Primerkonzentration von 0,4µl auf 0,2µl ergab kein besseres Resultat. Letztendlich bestand der Mastermix aus:

	Endkonzentration
Q-Solution	1 x
Qiagen Hotstart	0,02 U/µl
PCR buffer	1 x
dNTPs	0,2 mM
Mg ²⁺	1 mM
Primer F	0,4 µM
Primer R	0,4 µM

Abbildung 14: Konzentrationen des Mastermix

Parallel zu der CBR055F/CBR055R-Kombination wurde die Primerkombination CBR055F3/CBR055R mit einer erwarteten Amplikonlänge von 201 bp untersucht. Die Überlegung hierbei war, dass aus den hier heraus resultierenden, eventuell unreinen Amplikons bei erneuter Amplifikation mittels einer nachfolgenden zweiten PCR (nested-PCR) mit den Primerpaaren CBR055F/CBR055R oder CBR055F2/CBR055R nebenproduktfreie Amplifikate entstehen (2.2.4).

Bei der Untersuchung der CBR055F3/CBR055R-Kombination zeigten sich jedoch bereits in der ersten PCR vollständig nebenproduktfreie Amplifikate, weshalb die nested-PCR hier nicht angewendet wurde. Nachfolgende Untersuchungen sind mit dieser Primerkombination getestet worden. Unter Zugabe der Q-Solution wurden die besseren Resultate erzielt. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer wurde bei 61,5°C festgestellt. Die optimalen PCR-Bedingungen für die COBRA sind in Abbildung 15 zusammengefasst (Abb.15).

Gerät: Primus 25 advanced	
Primer: CBR055F3/CBR055R	
1. Aktivierung und Denaturierung	95°C für 15 Min
2. Annealing	61,5°C für 45 Sek
3. Elongation	72°C für 45 Sek
4. Erneute Denaturierung	95°C für 45 Sek
Wiederholung der Schritte ab Punkt 2 für 45 Zyklen	
5. Finale Elongation	72°C für 5 Min

Abbildung 15: PCR-Protokoll der optimalen Bedingungen zur Durchführung der COBRA für CDH3

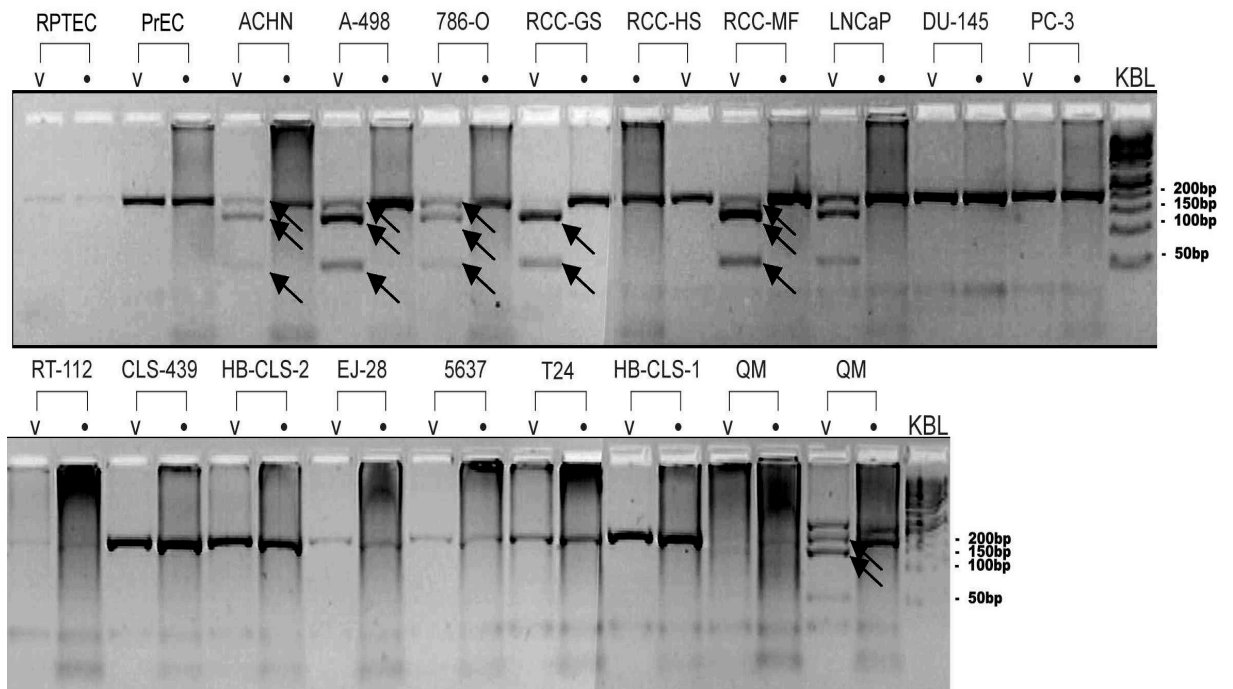
3.1.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Restriktionsanalyse an Zelllinien

In dieser Analyse wurde der Methylierungsgrad jeweils einer CpG-Stelle in einer CDH3-CGI in 18 unterschiedlichen Zelllinien des Urogenitaltrakts untersucht. Im Einzelnen waren dies RPTEC, PrEC, ACHN, A-498, 786-O, RCC-GS, RCC-HS, RCC-MF, LNCaP, DU-145, PC-3, RT-112, CLS-439, HB-CLS-2, EJ-28, 5637, T24, HB-CLS-1 sowie QM. Die Experimente wurden als 2-3fach Replikate durchgeführt und zeigten ein reproduzierbares Ergebnis. Als Restriktionsenzym wurde sowohl *Taq^I* mit Schnittstelle 5'...T[▼]CGA...3' als auch *HpyCH4IV* mit Schnittstelle 5'...A[▼]CGT...3' eingesetzt. Nach dem Auftragen der Reaktionsansätze zusammen mit deren Kontrollen auf ein 3%iges Agarosegel, ergaben sich sowohl für *Taq^I* als auch für *HpyCH4IV* folgende Ergebniskonstellationen:

1. Fand eine vollständige Methylierung in der 5'...T[▼]CGA...3'-Stelle statt, so sind bei *Taq^I* Banden von 146 bp und 55 bp sichtbar. Fand eine vollständige Methylierung in der 5'...A[▼]CGT...3'-Stelle statt, so sind bei *HpyCH4IV* Banden von 120 bp und 81 bp sichtbar.
2. Sind hingegen die CpG-Stellen nicht vollständig methyliert und in einer Probe existieren auch unmethylierte CpG-Dinukleotide, so wird dies bei *Taq^I* in einem Bandenmuster von 201 bp, 146 bp und 55 bp und bei *HpyCH4IV* in einem Bandenmuster von 201 bp, 120 bp und 81 bp deutlich (Pfeile in Abb. 16 bei z.B. ACHN und 786-O und Pfeile in Abb. 17 786-O und RCC-GS).
3. Liegt in der Probe keine Methylierung vor, d.h. war die Restriktion wegen der vorhergehenden C zu T-Modifikation nicht möglich, hat sie in beiden Restriktionsansätzen die gleiche Bandenlänge wie ihre Kontrolle, nämlich 201 bp.

Auf den folgenden Abbildungen (Abb. 16 und 17) sind die eben dargestellten Ergebnisse der COBRA aller 18 Zelllinien im *Taq^I*-Verdau und im *HPYCH4 IV*-Verdau zu sehen.

3.1.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Restriktionsanalyse an Zelllinien



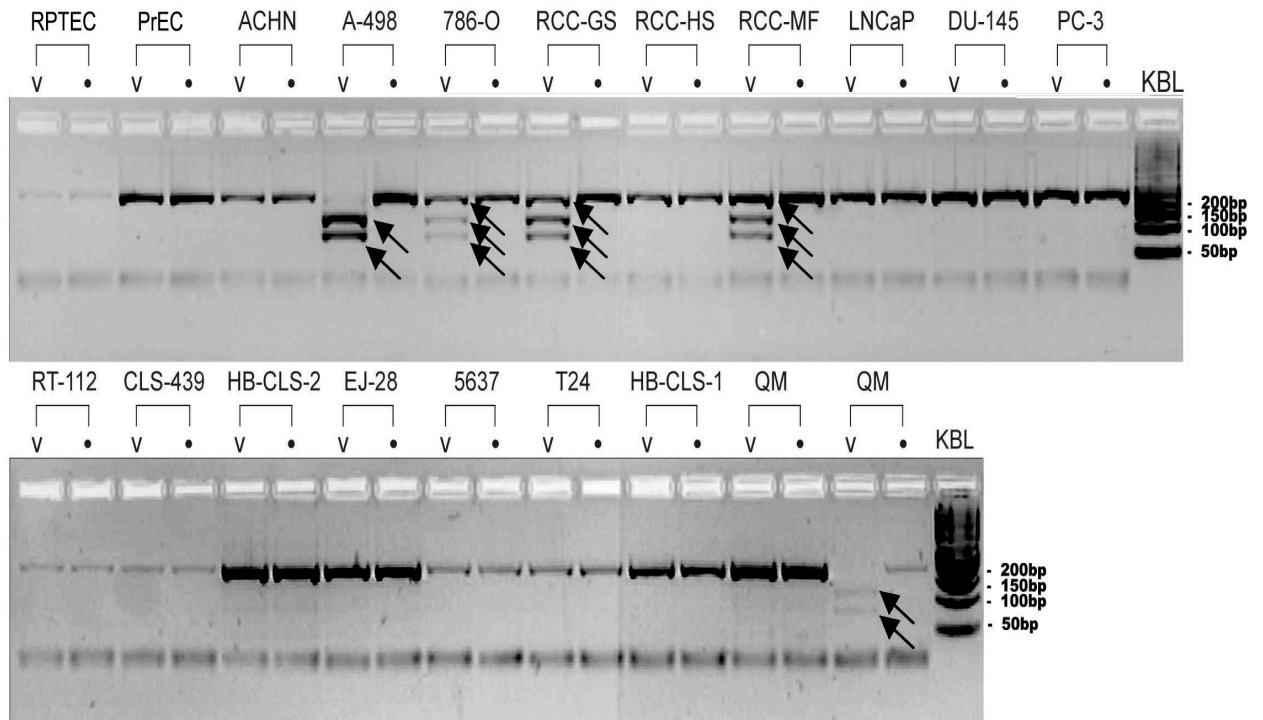
V = Verdau
• = Kontrolle

Abbildung 16: Zelllinien mit (v) und ohne (•) Restriktionsenzym *Taq*^I 1; 3% Agarosegel in 1x TBE-Puffer

Abbildung 16 zeigt den Verdau der 18 Zelllinien mit dem Restriktionsenzym *Taq*^I. Die Pfeile markieren Produkte der Restriktionsspaltung in den Nierenzelllinien (ACHN bis RCC-MF), die damit ein Methylierungsereignis anzeigen. Der Abbildung ist weiterhin zu entnehmen, dass in den Zelllinien ACHN, A-498, 786-O sowie in QM besagte Teilmethylierung vorliegt, was in den relativ homogenen Produktlängen von 201 bp, 146 bp und 55 bp sichtbar wird. Bei RCC-GS und RCC-MF liegt demnach eine nahezu vollständige Methylierung vor. Die diskrete Bande in RCC-MF bei 201 bp ist aufgrund der Produktintensität, die bei 146 bp ersichtlich ist, zu vernachlässigen. Von den Nierenzelllinien zeigt sich einzig RCC-HS unmethyliert. Sowohl der Restriktionsansatz als auch die Leerkontrolle zeigen ein 201 bp langes Produkt. Bei der Untersuchung der Prostata- und Harnblasengewebe zeigt ausschließlich die Prostatazelllinie LNCaP Methylierung. In den Harnblasengewebe sowie

3.1.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Restriktionsanalyse an Zelllinien

den beiden Negativkontrollen, den normalen Primärzellen RPTEC und PrEC, ist keine Methylierung nachweisbar.



V = Verdau
• = Kontrolle

Abbildung 17: Zelllinien mit (v) und ohne (•) Restriktionsenzym *HpyCH4IV*; 3% Agarosegel in 1x TBE-Puffer

Abbildung 17 zeigt den Verdau mit dem Restriktionsenzym *HpyCH4IV*. Obwohl hier weniger Methylierung detektiert wurde, ist die Signalausprägung stärker zu erkennen als bei *Taq^{qI}*. Im Vergleich zu der *Taq^{qI}*-COBRA kann ausschließlich in vier Nierenzelllinien Methylierung nachgewiesen werden. A-498 ist hier zu 100% methyliert (siehe Pfeile). Auch QM ist zu 100% methyliert. Die Proben 786-O, RCC-GS und RCC-MF zeigen wie bei *Taq^{qI}* Methylierung, allerdings in nur partieller Ausprägung. Im Unterschied zur *Taq^{qI}*-COBRA zeigt hier weder die Nierenzelllinie ACHN noch die Prostatazelllinie LNCaP Methylierung. In beiden Restriktionsansätzen identisch ist die Nicht-Methylierung der Nierenzelllinie RCC-HS. Die weiteren Ergebnisse stimmen in beiden

3.1.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Restriktionsanalyse an Zelllinien

Restriktionsansätzen überein. Weder die anderen Prostata- noch die Harnblasenzelllinien und die beiden Negativkontrollen RPTEC und PrEC zeigen einen Hinweis auf Methylierung.

Eine geldensiometrische Auswertung dieser Ergebnisse wurde mit dem Programm "ImageJ" durchgeführt. Dabei konnten die Signalstärken der einzelnen Fragmente ermittelt und zueinander in Bezug gesetzt werden. Aus den Abb. 16 und 17 lassen sich somit folgende Diagramme erstellen (Abb. 18 und 19):

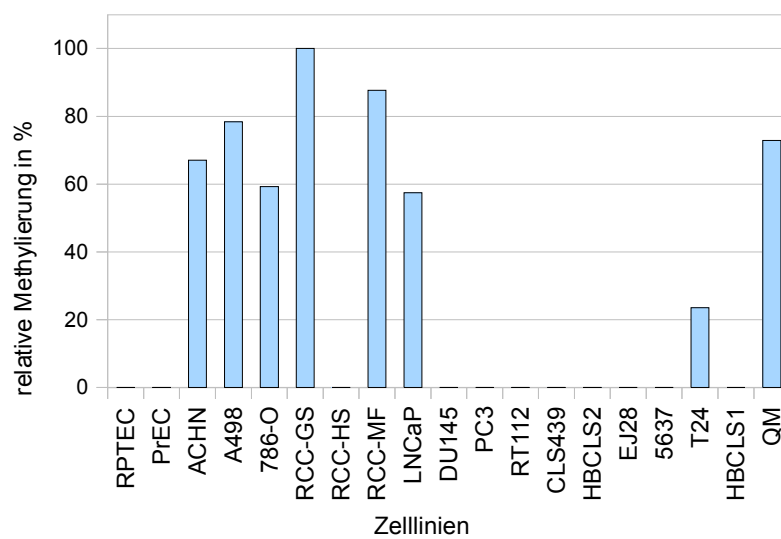


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der Zelllinien aus der COBRA mit Taq^I mit ImageJ

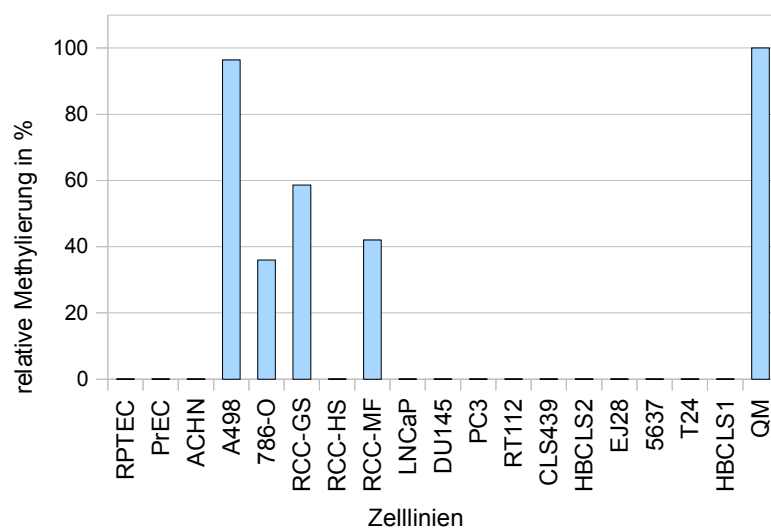
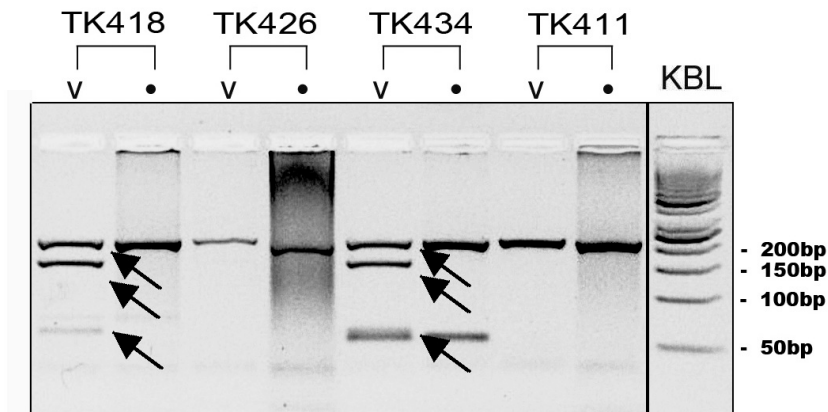


Abbildung 19: Quantitative Auswertung der Zelllinien aus der COBRA mit HpyCH4IV mit ImageJ

Die Auswertung mittels "ImageJ" hat in der *Taq^I*-COBRA für ACHN 67%, für A498 78%, für 786-O 59%, für RCC-GS 100%, für RCC-HS 0%, für RCC-MF 88% und für QM 73% Methylierung ergeben. In der *HpyCH4IV*-COBRA ist ACHN zu 0%, A498 zu 96%, 786-O zu 36%, RCC-GS zu 59%, RCC-HS zu 0%, RCC-MF zu 42% und QM zu 100% methyliert. Alle anderen Proben zeigten weder in der *Taq^I*- noch in der *HpyCH4IV*-COBRA messbare Methylierung.

3.1.3 Ergebnisse der CDH3-CGI-Restriktionsanalyse an RCC-Gewebeproben

Insgesamt wurden 237 Gewebeproben untersucht (TK 350-590). Zwei Ausfälle waren zu verzeichnen, sodass die COBRA blind an 235 Patientenproben durchgeführt worden ist. Klinisch auswertbar waren davon 201 Gewebeproben, wovon 134 klarzellige, 35 papilläre, 7 unklassifizierte, 5 gemischt papillär/klarzellige, 4 chromophobe, 11 keine und 5 andere Nierenzelltumore waren. Die TK-Nummern 350-401 sind sowohl mit *Taq^I* also auch mit *HpyCH4IV* verdaut worden. Aufgrund der vermutlich effizienteren Methylierungsnachweise mit der *Taq^I*-COBRA wurde auf die weitere Durchführung der *HpyCH4IV*-COBRA verzichtet. Die TK-Nummern 402-590 wurden ausschließlich mit *Taq^I* gespalten. Die Fotodokumentation erfolgte identisch zu der, der Zelllinien. Es erfolgte keine geldensimetrische Auswertung der Tumorklinen, da zu diesem Zeitpunkt die Pyrosequenzierung erfolgreich begonnen wurde. Dennoch erfolgte die visuelle Auswertung aller Gewebeproben unter Klassifikation in partiell methyliert (pm) und nicht methyliert (n). Die Einteilung ist hier exemplarisch an vier Patientenproben aufgeführt (Abb. 20).



V = Verdau
• = Kontrolle

Abbildung 20: Patientenproben (TK) mit (v) und ohne (•) Restriktionsenzym Taq^I; 3% Agarosegel in 1x TBE-Puffer. TK418 und TK434 wurden als partiell methyliert (pm) und TK426 und TK411 als nicht methyliert (n) deklariert. (Cave: Der Pfeil in TK434 gilt nicht der Bande, die auch in der Kontrolle sichtbar ist, sondern dem 55 bp-Fragment knapp darüber; vergleiche TK418).

Von 237 Proben waren nach der Gelelektrophorese und Videodokumentation 223 visuell auswertbar. Von 214 Proben lagen auswertbare COBRA- als auch Pyrosequenzierungs-Daten vor. Gute Übereinstimmungen im Methylierungsgrad wurden für 180 (84,1%) Gewebeproben beobachtet. Die späteren Auswertungen beschränken sich ausschließlich auf die Pyrosequenzierung.

3.2 Pyrosequenzierung

Die Methode der Pyrosequenzierung wurde über mehrere CpG-Stellen hinweg in einer *CDH3*-CGI angewandt, um eine detailliertere Methylierungsanalyse der Untersuchungskohorte erreichen zu können. Durch die hohe Sensitivität dieser Analysetechnik erlaubt sie weiterhin, exakte Aussagen zu sehr niedrig methylierten Proben zu machen, die mit der COBRA unter Umständen nur schwer oder gar nicht auszumachen sind. Die *Sequence to Analyse* für das *CDH3* beinhaltet insgesamt acht CpG-Stellen mit möglicher variabler Methylierung.

3.2.1 Experimentelle Ermittlung der PCR-Bedingungen

Für die Pyrosequenzierung in dieser Arbeit wurden mehrere Amplikons überprüft (2.2.9). Dabei erwies sich die Durchführung der „nested-PCR“ als effizient. Das optimierte Protokoll ist im Folgenden dargestellt.

Die erste PCR verlief identisch zur COBRA mit CBR055F3 und CBR055R (Abb. 21), die zweite mit CBR055F und PS055Runiv (Abb. 22) und die dritte Runde mit CBR055F und Bio-Uni02_2008 (Abb. 23). Der Mastermix war identisch zu dem der COBRA (Abb. 14). Als Template wurden 10ng der 18 Zelllinien sowie 20ng des Patientenmaterials genommen. Die Zyklenanzahl betrug 45.

Gerät: Primus 96 Plus	
Primer: CBR055F3/CBR055R	
1. Aktivierung und Denaturierung	95°C für 15 Min
2. Annealing	61,5°C für 45 Sek
3. Elongation	72°C für 45 Sek
4. Erneute Denaturierung	95°C für 45 Sek
Wiederholung der Schritte ab Punkt 2 für 45 Zyklen	
5. Finale Elongation	72°C für 5 Min

Abbildung 21: Protokoll der 1. PCR

Der Mastermix der zweiten PCR entsprach in den Konzentrationen dem der ersten PCR mit einem Endvolumen von 10µl. Die Primer waren CBR055F und PS055Runiv. Als Template diente hier 1µl unverdünnt aus dem Produkt der ersten PCR. Die Zyklenanzahl wurde auf 30 reduziert (Abb. 22).

Gerät: Primus 96 Plus	
Primer: CBR055F/PS055Runiv	
1. Aktivierung und Denaturierung	95°C für 15 Min
2. Annealing	61,5°C für 45 Sek
3. Elongation	72°C für 45 Sek
4. Erneute Denaturierung	95°C für 45 Sek
Wiederholung der Schritte ab Punkt 2 für 30 Zyklen	
5. Finale Elongation	72°C für 5 Min

Abbildung 22: Protokoll der 2. PCR

Für die dritte PCR wurde lediglich das Endvolumen auf 25µl erhöht. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile im Mastermix blieben identisch zu den vorherigen PCR. Als Primerpaar wurde CBR055F und Bio-Uni02_2008 verwendet. 1µl unverdünnt aus der zweiten PCR diente als Template. Die Zyklenanzahl betrug erneut 30 (Abb. 23).

Gerät: Primus 96 Plus	
Primer: CBR055F/Bio-Uni02_2008	
1. Aktivierung und Denaturierung	95°C für 15 Min
2. Annealing	61,5°C für 45 Sek
3. Elongation	72°C für 45 Sek
4. Erneute Denaturierung	95°C für 45 Sek
Wiederholung der Schritte ab Punkt 2 für 30 Zyklen	
5. Finale Elongation	72°C für 5 Min

Abbildung 23: Protokoll der 3. PCR

3.2.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an Zelllinien

Für die Durchführung der Pyrosequenzierung wurden oben genannte durch Optimierung erhaltene Bedingungen verwendet. Identisch zur COBRA wurde auch hier der relative Methylierungsgrad der CDH3-CGI in den 18 genannten Zelllinien des Urogenitaltrakts untersucht. Die Experimente wurden ebenfalls als Replikate durchgeführt. Nachfolgende Abbildungen (Abb. 24 und 25) zeigen die Pyrogramme™ der Sequenzierung der untersuchten CDH3-CGI am Beispiel der als Negativkontrolle eingesetzten Primärzelle RPTEC und einer Nierenkarzinomzelllinie A-498.

Die relative Höhe der Peaks ist dabei proportional zur Anzahl der eingebauten dNTPs. Zusätzlich ist jede einzelne CpG-Stelle blau hinterlegt und ihr Methylierungsgrad in Prozent ausgewiesen. Das nicht-methylierte Kontrollcytosin ist orange hervorgehoben und gelb hinterlegt.

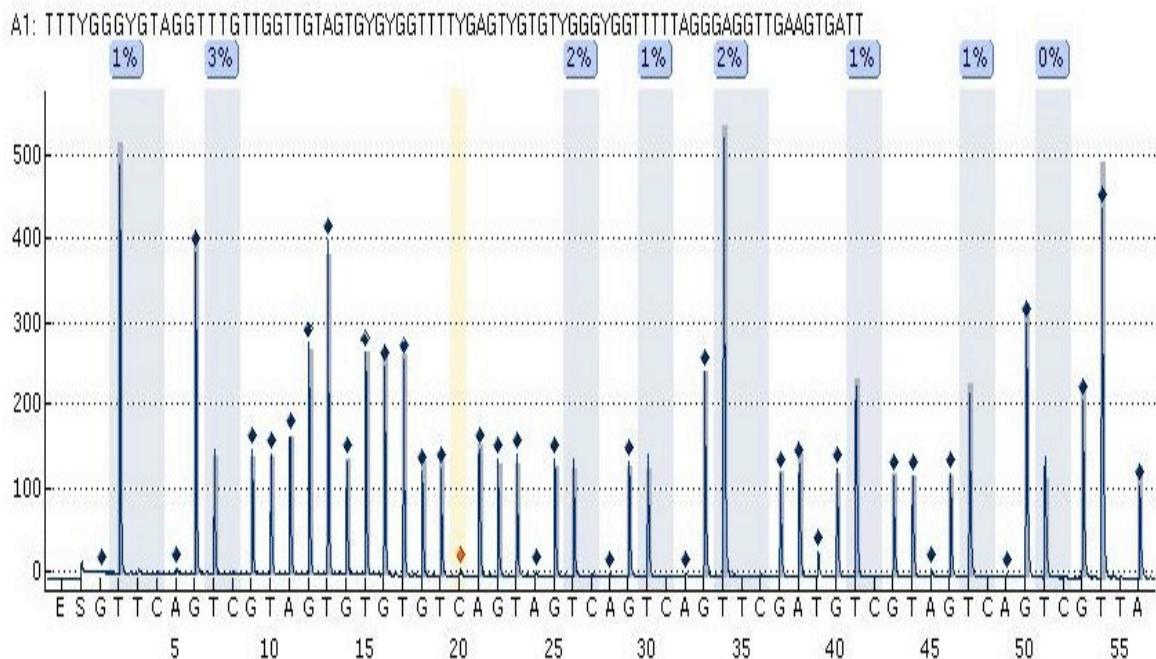


Abbildung 24: Pyrogramm von RPTEC (durchschnittlich 1% Methylierung)

3.2.2 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an Zelllinien

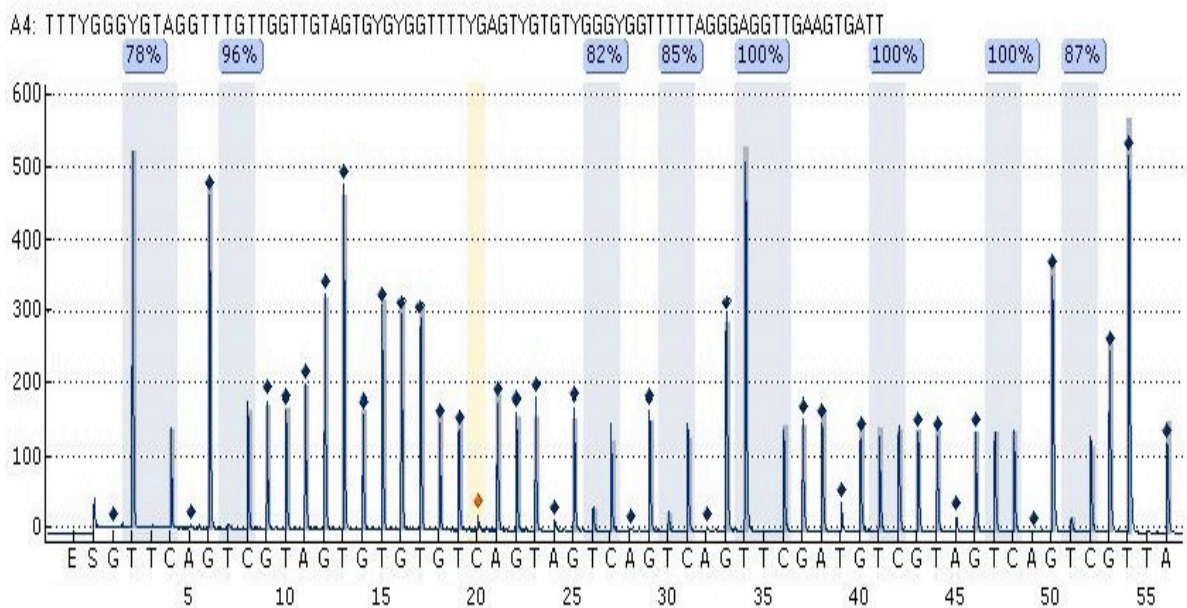


Abbildung 25: Pyrogramm von A-498 (durchschnittlich 91% Methylierung)

Das Ergebnis der Auswertung aller Pyrogramme der Zelllinien ist in folgender Grafik aufgeführt (Abb. 26). Dabei ist zu beachten, dass die der Grafik zu entnehmenden Prozente den Mittelwert der Methylierung über alle acht CpG-Stellen darstellen, mit zusätzlicher Angabe der Standardabweichung.

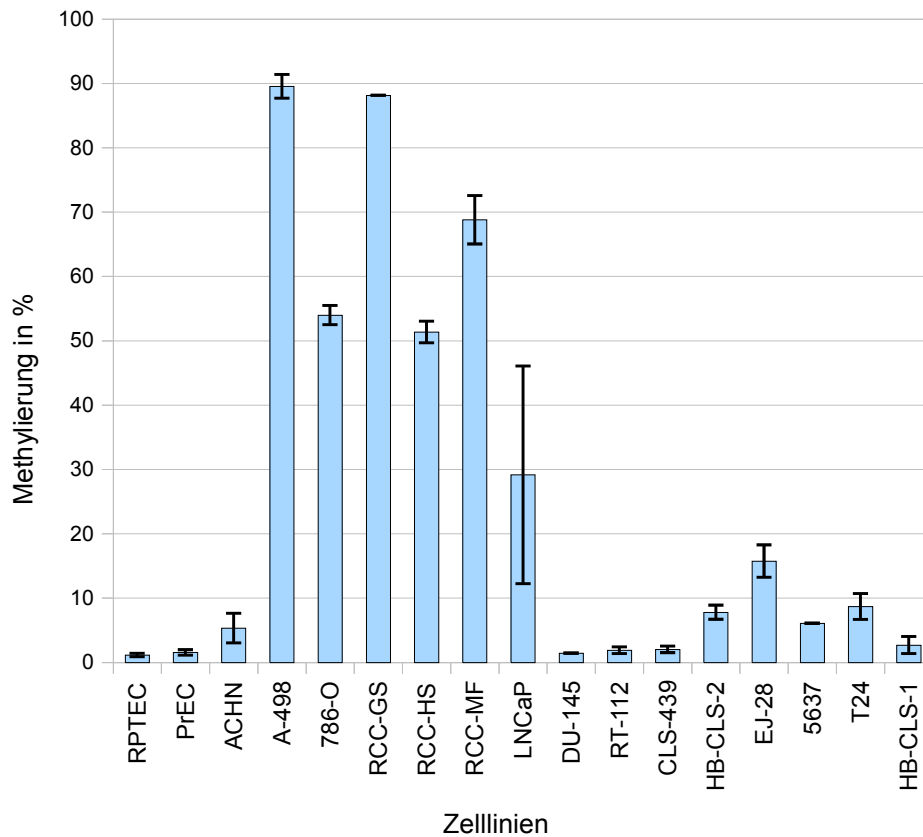


Abbildung 26: relative Methylierung der Zelllinien in der Pyrosequenzierung und Standardabweichung

Es zeigt sich, dass fünf der sechs Nierenkarzinomzelllinien, im Einzelnen A-498, 786-O, RCC-GS, RCC-HS und RCC-MF, eine signifikante Methylierung von 50-90% aufweisen. Die Nierenkarzinomzelllinie ACHN zeigte lediglich eine Methylierung von 2-7%.

Von den drei Prostatakarzinomzelllinien wurde nur in LNCaP eine deutliche Methylierung detektiert, für die allerdings eine relativ hohe Variabilität mit bislang unbekannter Ursache festgestellt wurde.

In den sieben Harnblasenkarzinomlinien (RT-112 bis HB-CLS-1) wurde in RT-112, CLS-439, HB-CLS-1 eine Hintergrundmethylierung von 1-3% registriert. Hingegen zeigten HB-CLS-2 (7,8%), EJ-28 (14,4%), 5637 (6,0%) und T24 8,7% leicht erhöhte Methylierungsgrade. Die Negativkontrollen, die Primärzellen

RPTEC und PrEC zeigten eine Methylierung von um 1% und QM war zu 50% methyliert. Aufgrund der vergleichsweise hohen Frequenzen und Intensitäten der Methylierung in den Nierenkarzinomzelllinien sowie der COBRA-Daten der Patienten wurde die Pyrosequenzierung nachfolgend auch am gesamten Patientenkollektiv durchgeführt.

3.2.3 Ergebnisse der *CDH3*-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

237 Gewebeproben wurden einer Methylierungsanalyse der *CDH3*-CGI unter Verwendung der Pyrosequenzierung unterzogen. Diese Untersuchung wurde ebenfalls blind durchgeführt. Exemplarisch für die Methylierungsergebnisse sind hier zwei Pyrogramme der Proben TK551 und TK567 aufgeführt (Abb. 27 und 28). Insgesamt standen zu 201 Gewebeproben sowohl die Methylierungsdaten aus der Pyrosequenzierung als auch klinische bzw. histopathologische Daten zur Verfügung.

3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

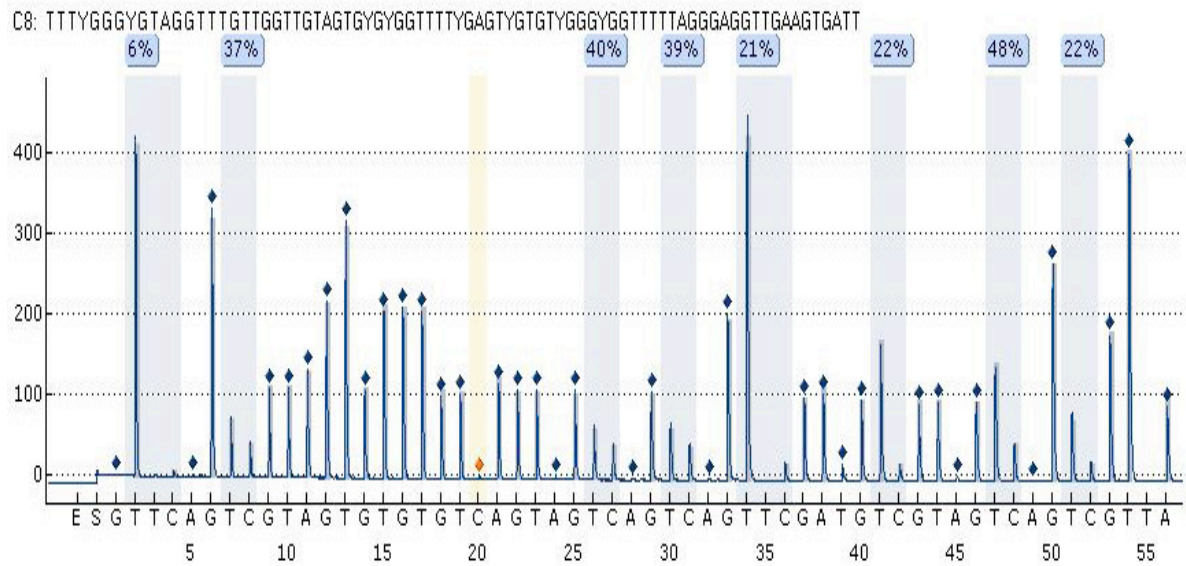


Abbildung 27: Pyrogramm von TK551 (durchschnittlich 29% Methylierung)

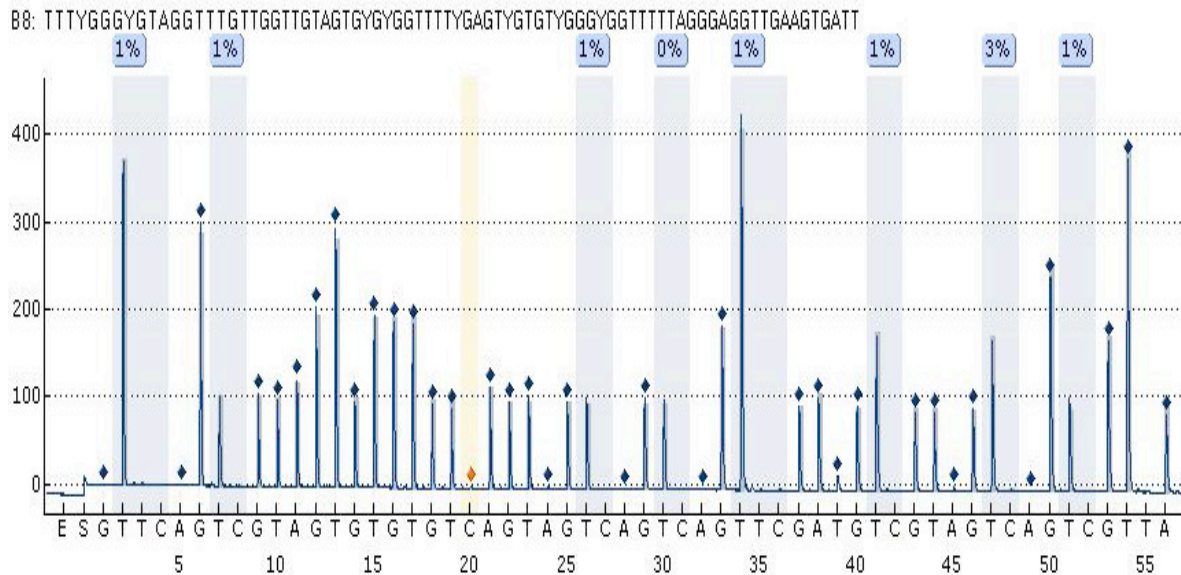


Abbildung 28: Pyrogramm von TK567 (durchschnittlich 1% Methylierung)

3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

Im Nachfolgenden sind die klinischen Daten (TNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad, Geschlecht, Status, Alter, Follow-ups und gepaarte Gewebeproben) für die Gruppe aller RCC sowie der Subgruppe der ccRCC dargestellt (Tab. 7). Die untersuchte Tumorgruppe umfasst insgesamt 74 klarzellige, 21 papilläre, 4 unklassifizierte und 2 gemischt klarzellig-papilläre RCC.

		Alle RCC*	ccRCC
<u>Fälle</u>	N	101	74
<u>TNM-Klassifikation</u>	I	56	39
	II	7	5
	III	36	30
	IV	1	0
	Tx	1	0
	N0	91	68
	N1	10	6
	M0	80	56
	M1	21	18
<u>Gepaarte Gewebeproben**</u>	N	65	50
<u>Differenzierungsgrad</u>	G1	19	16
	G2	67	45
	G3	15	13
<u>Geschlecht</u>	Männlich	64	43
	Weiblich	37	31
<u>Status***</u>	lokalisierter Tumor	58	38
	fortgeschrittener Tumor	43	36
<u>Alter (Jahre)</u>	Min	35	35
	Mittelwert	63,4	62,1
	Max	91	90
<u>Follow-up-Fälle</u>	N	59	42
	mittleres Alter (Jahre)	64,6	n.a.
	Männlich	36	n.a.
	Weiblich	23	n.a.
* Einschließlich gemischte und unklassifizierte RCC-Histopathologien			
** Tumor (TU); Tumorbenachbartes normales Gewebeareal (TbA)			
*** Lokalisiert wurde definiert als pT≤2, N0,M0 und G1-2; fortgeschrittene Tumoren als pT≥3 und/oder N+/M+ und G2-3 und/oder N+/M+ und G2-3			
n.a.: keine Angaben (data not available)			

Tabelle 7: Klinische Daten für die Subgruppe der klarzelligen Nierenzelltumore

Die mittels der Pyrosequenzierung bestimmte durchschnittliche relative Methylierung wurde anschließend mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten auf mögliche statistische Zusammenhänge hin überprüft.

3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

Bei dem Vergleich der gepaarten Gewebeprobe (TU versus TbA) zeigte sich im gepaarten t-Test für die Gruppe aller Nierenzellkarzinome (alle RCC) ein höchst signifikanter Unterschied mit $p=0,0002$ (Tab. 8 und Abb. 29).

Gepaarte Gewebeprobe TbA/TU*	mittlere rel. Methylierung in %		P-Wert** (P)
	TbA	TU	
-alle RCC	2,32	3,87	0,0002
-cc RCC	2,33	4,21	0,0002
-pap RCC	-	-	0,5738

* Tumorbenachbartes normales Gewebeareal (TbA); Tumor (TU)
** gepaarter t-Test

Tabelle 8: Vergleich der gepaarten Gewebeprobe

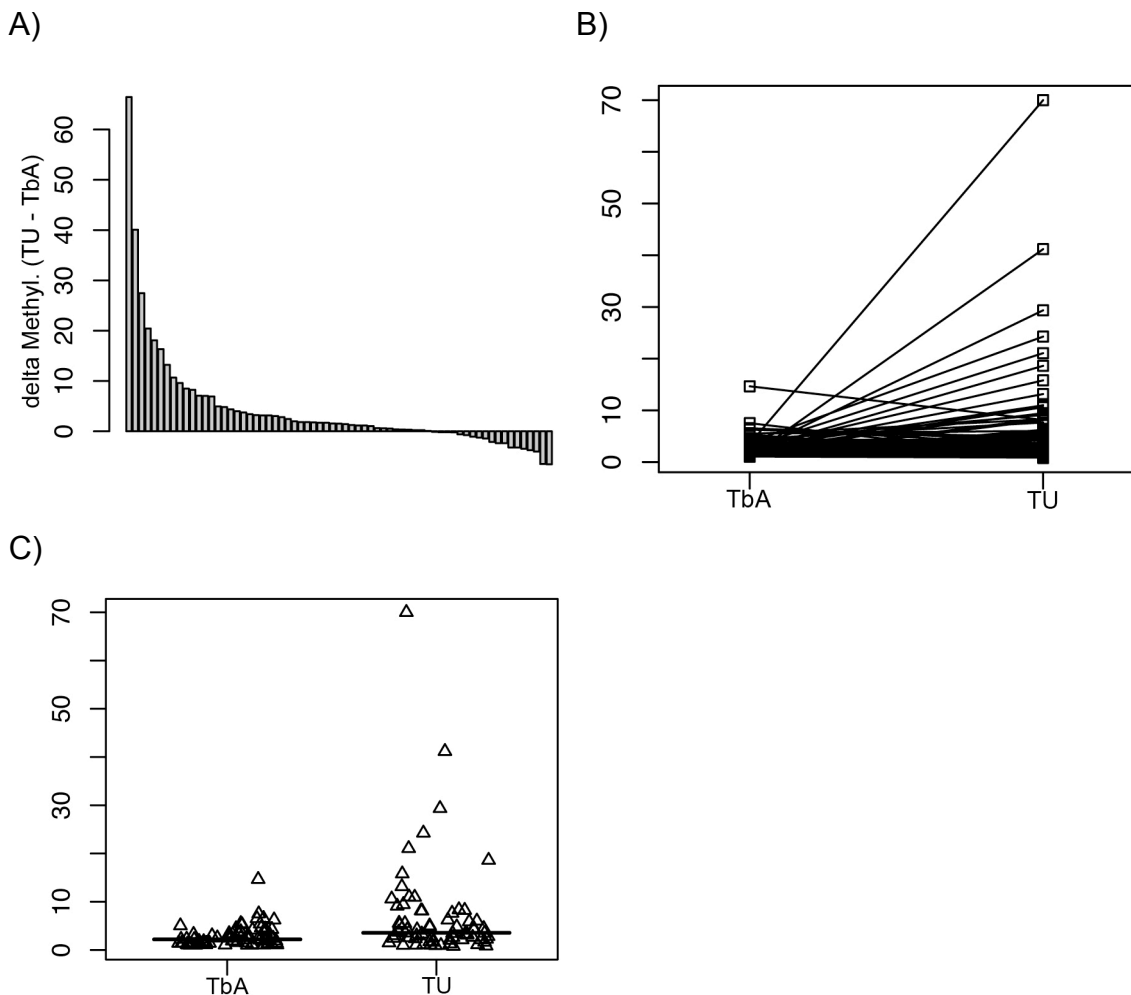


Abbildung 29: Methylierung in gepaarten Gewebeprobe von tumorbenachbarten normalen Gewebearealen (TbA) und Tumoren (TU) aller RCC. A) sortierter Differenzplot B) Liniengrafik C) Scatterplot

3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

Für die Subgruppe der ccRCC wurde ebenfalls ein Unterschied der relativen Methylierung festgestellt ($p=0,0002$) (Tab. 8 und Abb. 30).

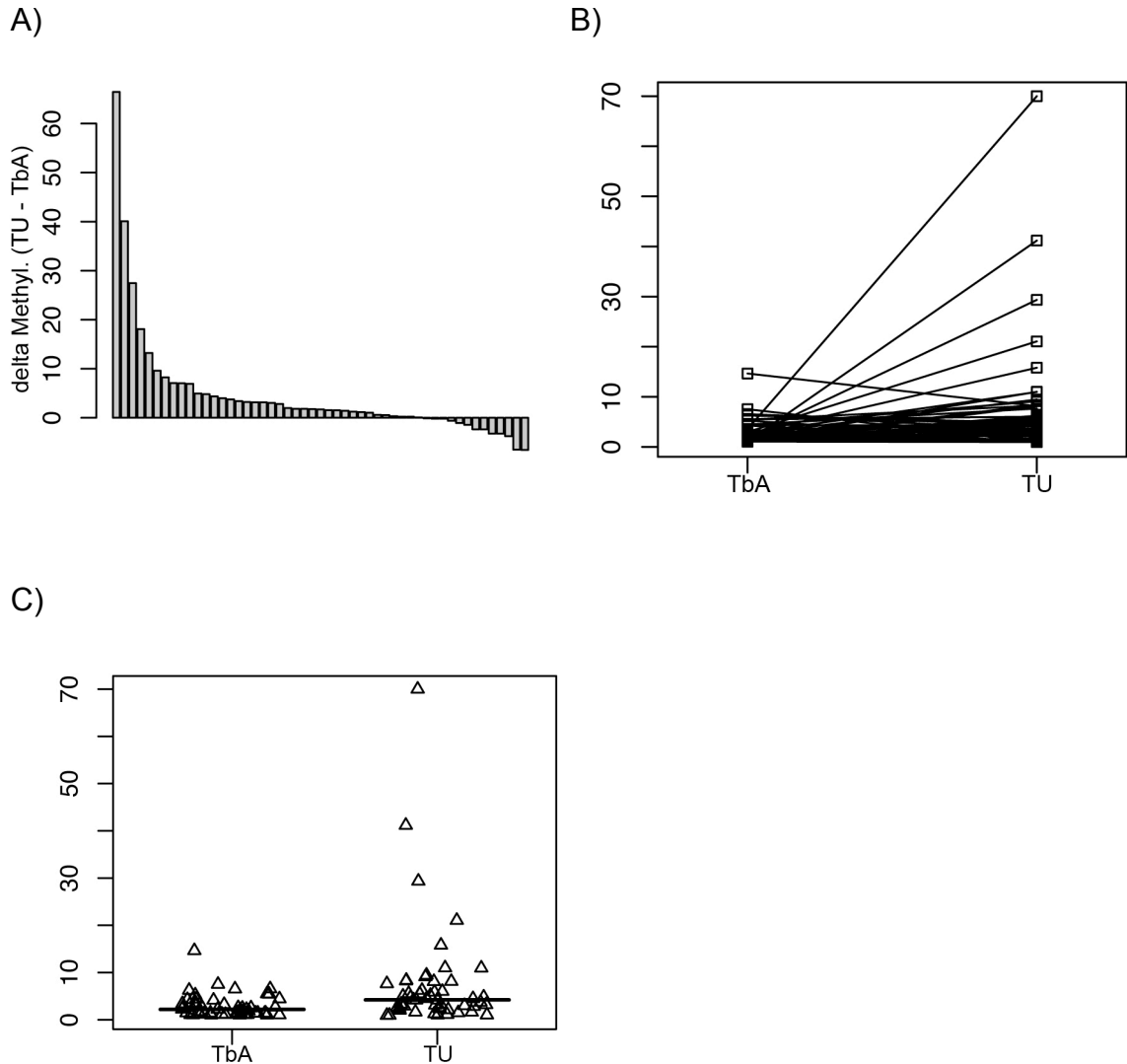


Abbildung 30: Methylierung in gepaarten Gewebeproben von tumorbenachbarten normalen Gewebearealen (TbA) und Tumoren (TU) aller ccRCC. A) sortierter Differenzplot B) Liniengrafik C) Scatterplot

3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

Hingegen konnte in der statistischen Auswertung kein Unterschied der Methylierung in der Subgruppe der papRCC registriert werden ($p=0,5738$) (Tab. 8 und Abb. 31).

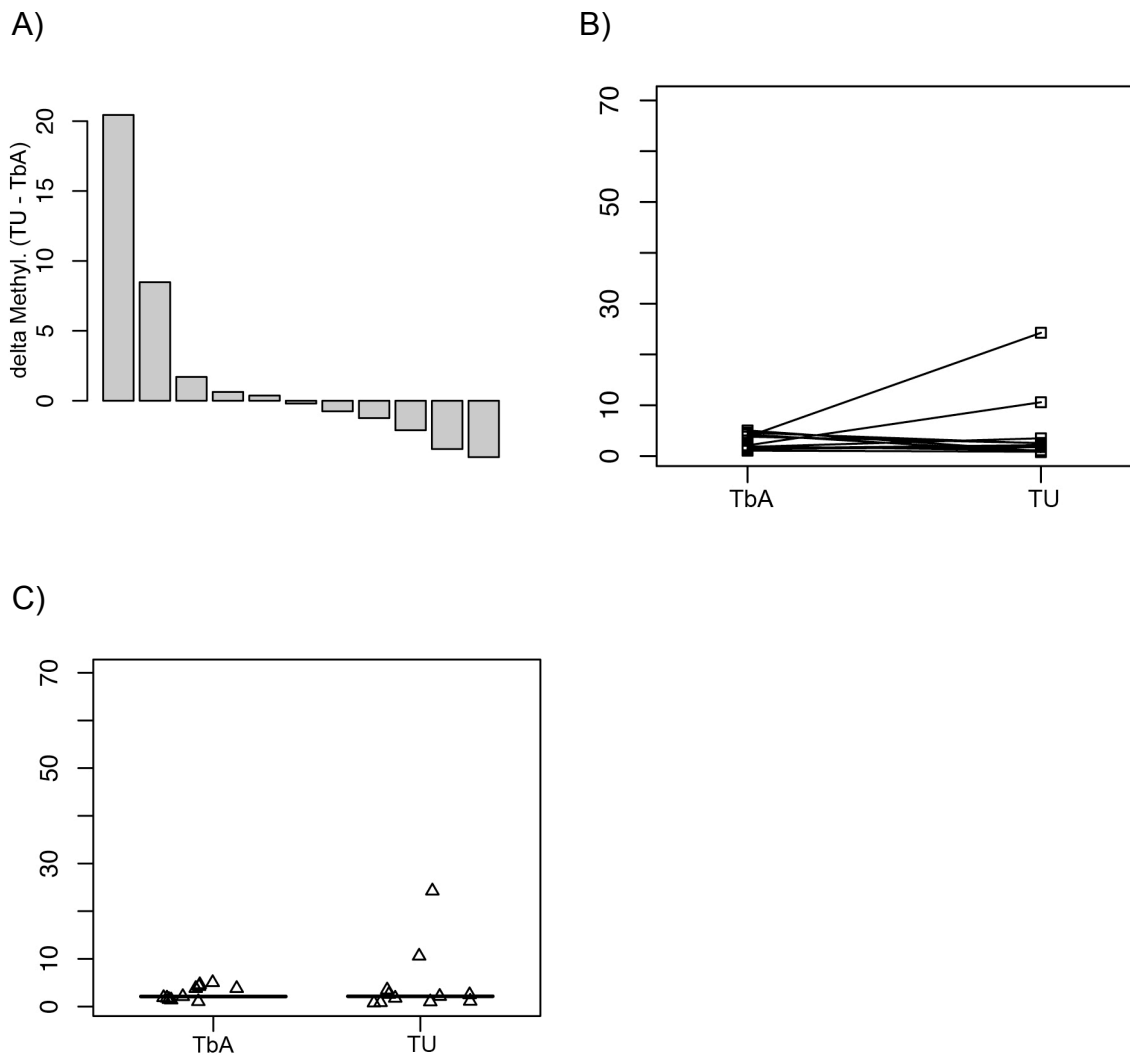


Abbildung 31: Methylierung in gepaarten Gewebeproben von tumorbenachbarten normalen Gewebearealen (TbA) und Tumoren (TU) aller papRCC. A) sortierter Differenzplot B) Liniengrafik C) Scatterplot

In Bezug auf die Histologie wurde festgestellt, dass eine relative Hypermethylierung in ccRCC im Vergleich zu den papRCC vorliegt ($p=0,0041$, $OR=11,6$, $CI=2,5-72,3$) (Tab. 9 und Abb. 32).

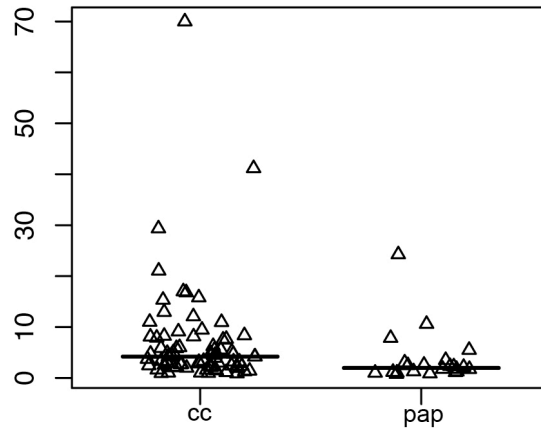


Abbildung 32: Vergleich der relativen Methylierung ccRCC versus papRCC im Scatterplot.

Für den Vergleich "lokalisierte versus fortgeschrittene RCC" wurde insgesamt eine höhere durchschnittliche Methylierung für alle fortgeschrittenen Tumore für die Gruppe aller RCC ($p=0,0013$, $OR=6,9$, $CI=2,3-24,4$) sowie für fortgeschrittene ccRCC ($p=0,032$, $OR=4,3$, $CI=1,2-17,9$) festgestellt (Tab. 9).

In Bezug auf den Differenzierungsgrad besteht ein Unterschied ($p=0,017$, $OR=5,6$, $CI=1,4-24,9$) in der relativen durchschnittlichen Methylierung aller RCC. G3-Tumore zeigen dabei eine höhere Methylierung an als G1-Tumore. In der Subgruppe der ccRCC ist ein Trend zu verzeichnen ($p=0,059$, $OR=4,7$, $CI=0,98-25,7$); auch hier zeigen die G3-Tumore eine durchschnittlich höhere Methylierung als die G1-Tumore.

Im Vergleich des Staging aller RCC wurde eine höhere relative durchschnittliche Methylierung in T3-Tumoren verzeichnet ($p=0,00255$, $OR=6,2$, $CI=1,99-21,6$). In der Subgruppe der ccRCC ist dagegen nur ein Trend ($p=0,061$, $OR=3,5$, $CI=0,98-13,9$) festzustellen.

Keinen signifikanten Unterschied von durchschnittlicher Methylierung und Metastasierungsstadium bzw. Lymphknotenbefall konnte weder für alle RCC

3.2.3 Ergebnisse der CDH3-CGI Methylierungsanalyse an RCC-Gewebeproben

noch für ccRCC festgehalten werden. Tabelle 9 fasst die Ergebnisse zusammen.

	mittlere rel. Methylierung in %		P-Wert (P)	Odds ratio (OR)	95% Konfidenzintervall (CI)
ccRCC/papRCC	2,10	4,11	0,0041**	11,64	2,47 – 72,30
Lokalisiert/Fortgeschritten*					
-alle RCC	2,81	5,2	0,0013**	6,94	2,26 – 24,41
-ccRCC	3,30	5,17	0,032*	4,31	1,20 – 17,94
Differenzierungsgrad niedrig/hoch**					
-alle RCC	3,32	6,25	0,017*	5,59	1,41 – 24,86
-ccRCC	3,75	6,34	0,059(*)	4,67	0,98 – 25,68
Staging niedrig/hoch					
-alle RCC	2,89	5,22	0,00255**	6,16	1,99 – 21,60
-ccRCC	3,5	5,21	0,061(*)	3,49	0,98 – 13,90
Metastasierung M0/M1					
-alle RCC	3,48	4,38	0,297	1,90	0,56 – 6,43
-ccRCC	4,11	4,12	0,995	1,004	0,24 – 4,04
Lymphknotenbefall N0/N1;2					
-alle RCC	3,63	3,78	0,893	1,12	0,19 – 5,60
-ccRCC	4,11	4,08	0,983	0,98	0,09 – 8,14
* Lokalisierter Tumor ist: pT≤2, N0, M0 und G1-2; fortgeschrittener Tumor ist: pT≥3 und/oder N+/M+ und G2-3 und/oder N+/M+ und G2-3					
** niedriggradiger/hochdifferenzierter Tumor (G1-2) Hochgradiger/entdifferenzierter Tumor (G2-3)					

Tabelle 9: Statistische Vergleiche unabhängiger Gewebegruppen mittels logistischer Regression

Aus den Daten der Pyrosequenzierung ist weiterhin die Rezidivierung der Probanden mittels einer univariaten Cox-Regression ermittelt worden (Tab. 10).

	alle RCC (59)	
Progressionsfreies Überleben	HR	P-Wert
Metastasierung	6,72	0,00033***
T1vsT3	3,69	0,099(*)
Lymphknotenbefall	3,05	0,14
Methylierung cutpoint 8,4% ⁽¹⁾	2,62	0,1(*)
Methylierung cutpoint median 3,3%	0,95	0,92
Differenzierungsgrad	10,06	2,8e^{-05***}

Tabelle 10: univariate Cox-Regression (M+ eingeschlossen in Rezidiv/Survival)
⁽¹⁾ statistisch optimaler Cutpoint (zur Berechnung siehe Kapitel 2.3)

3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CDH3 in Nierengeweben

Innerhalb der in der Arbeitsgruppe jeweils 20 angefärbten TU und TbA, zeigte sich eine CDH3-Expression in den TbA, deren stärkste Intensität den distalen Tubuli zugeordnet wurde. In den TU wurde in sieben von 20 Fällen ein weitgehender bis vollständiger Immunpositivitätsverlust beobachtet. Durch die Darstellung der Invasionszone (Übergang von TbA zu TU) wird dieser Verlust verdeutlicht. Exemplarisch ist dies in der nachfolgenden Darstellung der Immunpositivität gezeigt (Abb. 33):

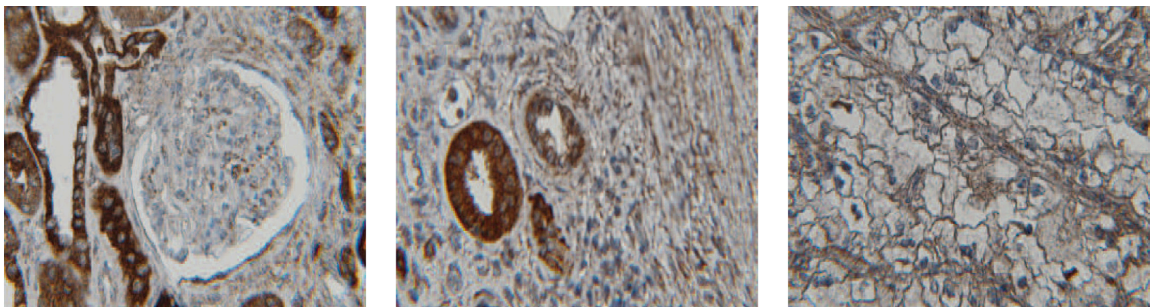


Abbildung 33: Exemplarische Darstellung einer (1) normalen Niere, (2) Invasionszone, (3) eines Tumors

Auf Proteinebene stehen auf der Internetseite www.proteinatlas.org weitere Expressionsanalysen von CDH3 in der Niere zur Verfügung. Drei makroskopisch normale Nieren und 12 Nierentumore wurden dort mit zwei unterschiedlichen Antikörpern (HPA001767 und CAB002487) angefärbt. Berücksichtigt wurde hier die Anfärbung mit CAB002487.

Die drei normalen Nierengewebe weisen alle eine zytoplasmatische und membranöse Expression von CDH3 in Epithelzellen von Tubulus- und Sammelrohre und nicht im Glomerulum auf. Bei genauerer Durchsicht der Präparate wurde die Anfärbung in den distalen Tubuli stärker als die in den proximalen Tubuli eingeschätzt. Exemplarisch sind hier zwei der drei Nieren abgebildet (Abb. 34):

3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CDH3 in Nierengeweben

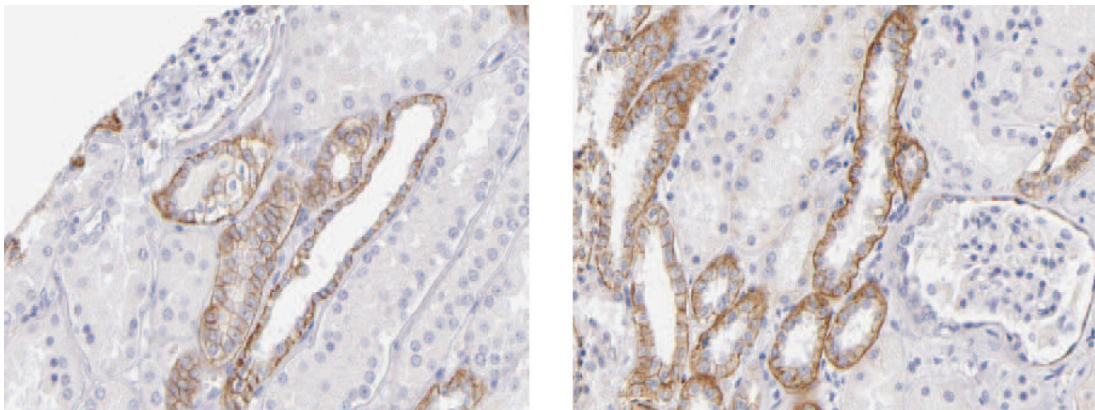


Abbildung 34: links: CDH3-immunpositive Probe einer 56-jährigen Frau; rechts: CDH3-immunpositive Probe eines 28-jährigen Mannes (beide Proteinatlas.org)

Von den 12 untersuchten Tumoren zeigte sich in 10 Tumoren keine CDH3-Immunpositivität (Abb. 35).

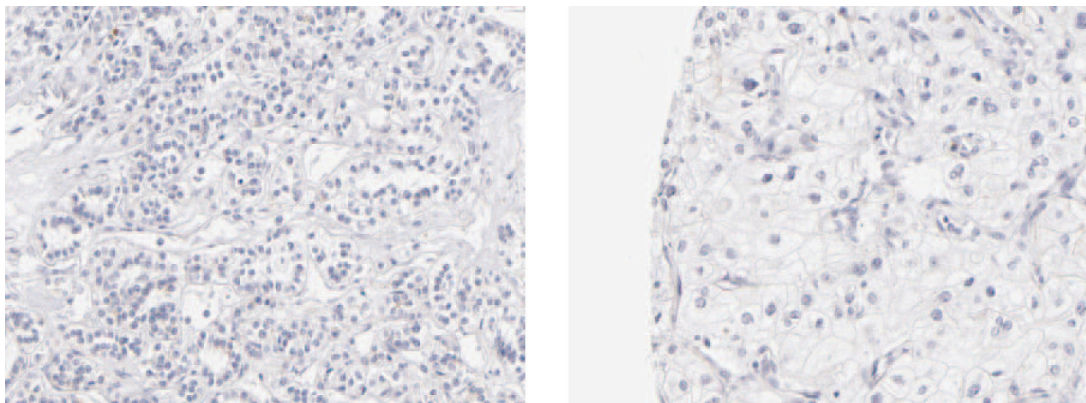


Abbildung 35: links: Probe eines Nierenzellkarzinoms einer 76-jährigen Frau; rechts: Probe eines Nierenzellkarzinoms eines 57-jährigen Mannes (beide Proteinatlas.org)

Unter Zusammenfassung der publizierten und selbst durchgeführten Färbungen sind in 53,1% Immunpositivitätsverluste von CDH3 zu beobachten.

4 Diskussion

Die Untersuchungen des Methylierungsstatus der *CDH3*-CGI ergaben für die überwiegende Anzahl der untersuchten Zelllinien des Urogenitaltraktes (15 von 18) gute Übereinstimmungen für die eingesetzten COBRA (*Taq^I*-COBRA, *HpyCH4IV*-COBRA) sowie der Pyrosequenzierung. In den sechs Nierenzelllinien (ACHN, A-498, 786-O, RCC-GS, RCC-HS und RCC-MF) wurden für COBRA und Pyrosequenzierung übereinstimmende vergleichsweise hohe Methylierungsgrade in der Mehrzahl der Nierenzelllinien beobachtet. Zugleich wurden sämtliche Negativ- (RPTEC und PrEC) und Positivkontrollen (QM) durch die Analyseverfahren richtig detektiert.

Die hier erstmals, in der Literatur bislang nicht beschriebene, beobachtete starke Hypermethylierung der Nierenzellkarzinomlinien führte zur Hypothese, dass *CDH3* an der Pathogenese des ccRCC beteiligt sein könnte, was anhand der Charakterisierung des Patientenkollektivs untersucht werden sollte.

Für die Niere sind bisher mindestens 134 verschiedene Gen-CGI in Tumoren als methyliert bzw. hypermethyliert beschrieben (Tab. 1). Von diesen Genen wurden bislang 20 Gene in klinisch-pathologischen Analysen im Zusammenhang mit dem RCC untersucht (Tab. 2), wobei keines dieser Gene derzeit funktionell in Zusammenhang mit der Zelladhäsion gebracht wird (genecards.org). Entsprechend liegen, auch unter Berücksichtigung des bekannten Zelladhäsionsgens *CDH1*, bislang keine klinisch-pathologischen Untersuchungen über den Zusammenhang einer CGI-Methylierung eines Zelladhäsionsgens und der Entstehung bzw. des Verlaufs des RCC vor. Somit ist diese Studie die erste, die sich mit der CGI-Methylierung im Zelladhäsionsgen *CDH3* und dem RCC auf klinisch-pathologischer Ebene beschäftigt.

Bisher ist *CDH3* physiologisch in der Basalzellschicht von Epidermis, Ösophagus, myoepithelialen Zellen der Mamma, Bronchien, Harnblase und

Prostata nachgewiesen (Riener et al., 2010, reviewed in Bryan et al., 2010, Okegawa et al., 2002). Die Rolle von CDH3 in Harnblasenkarzinomen ist noch nicht eindeutig geklärt (Thykjaer et al., 2001, reviewed in Bryan et al., 2005 und 2008, Mandeville et al., 2008). Für die Prostata ist eine Herunterregulierung bis Fehlen der Expression bei neoplastischen Ereignissen beschrieben (reviewed in Okegawa et al., 2002, Jarrard et al., 1997). Für gynäkologisch-onkologische Karzinome (Zervix-, Ovarial- und ductales Mammakarzinom) ist eine vermehrte Expression beschrieben (Riener et al., 2010). Ebenso konnte eine CDH3-Expression in dysplastischem Gewebe von extrahepatischen Gallengängen festgestellt werden, welche im Gesunden kein CDH3 exprimieren (ebenda). CDH3-Expressionsstudien zu Nierenzellkarzinomen zeigen, dass keine oder nur eine sehr geringe Anzahl der untersuchten Tumore CDH3 exprimieren (Shimazui et al., 1996).

Methylierungsanalysen von *CDH3* sind bislang rar. *CDH3*-CGI-Hypomethylierung wurde für das invasive Mammakarzinom (Paredes et al., 2005) sowie Magen- und kolorektales Karzinom (Hibi et al., 2009) beschrieben. Eine Hypermethylierung wurde hingegen für eine Subgruppe der Pankreaskarzinome beobachtet (Sato et al., 2003). Daten über eine *CDH3*-Hypermethylierung, die das RCC einschließen, sind bisher noch nicht veröffentlicht.

Da *CDH3* in enger chromosomaler Nachbarschaft zu *CDH1* liegt (Abb. 3), beide den klassischen/Typ-1-Cadherinen zugeordnet werden und ihre Funktion als Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsionsmoleküle ähnlich sind, scheint die Diskussion von Ergebnissen aus CDH1-Studien im RCC an dieser Stelle sinnvoll. *CDH1* ist als Tumor- bzw. Invasions-Suppressor in vielen anderen Karzinomen bekannt. Für das RCC wurde bereits 1995 von Katagiri et al. eine erste CDH1-Expressionsstudie veröffentlicht. CDH1 wird dort, identisch zu CDH3 in dieser Studie (s.u.), im distalen Tubulus und Sammelrohr in normalem Nierengewebe exprimiert. Gleichzeitig werden CDH1-Expressionsverluste bei zunehmender Gewebeentartung und fortschreitender Erkrankung (Staging und Differen-

zierungsgrad) beobachtet, was zudem mit einer Krankheitsprogression und schlechterem Überleben korreliert. Diese Daten wurden 2001 von Nojima et al. bestätigt und durch Methylierungsanalysen erweitert. Eine höhere *CDH1*-Methylierung konnte dabei mit starken *CDH1*-Immunpositivitätsverlusten im RCC assoziiert werden. Costa et al. (2007) erbrachten die genauere Zuordnung der *CDH1*-Hypermethylierung mit dem ccRCC. Obwohl bislang keine klinisch-pathologischen Studien zur *CDH1*-Hypermethylierung veröffentlicht sind, ist *CDH1* bereits in die Gruppe der biomolekularen Marker für die Prognose des RCC aufgenommen, wenngleich es in der klinischen Bedeutung bisher keine gute Evidenz als unabhängiger Prognosefaktor aufweist (Zantl et al., 2008). Dennoch zeigt diese Darstellung, dass große Übereinstimmungen generell in der Funktion von *CDH3* und *CDH1* existieren.

Die vorliegende Untersuchung der RCC-Patientenkohorte auf Methylierung der *CDH3*-CGI mittels der COBRA und der Pyrosequenzierung ergab in technischer Hinsicht sehr gut auswertbare Ergebnisse bei einer Übereinstimmung von 84,1%. Dabei zeigte sich die *CDH3*-CGI in den untersuchten Tumoren selten aber tumorspezifisch methyliert. Es ist momentan unklar, ob dieses Ergebnis tatsächlich auf eine selten vorliegende Methylierung oder auf die noch nicht ausreichend bekannte Methylierungsverteilung in der CGI, wie van Vlodrop et al. 2010/2011 an *GREM1* zeigten, zurückzuführen ist. Für *GREM1* wurde gezeigt, dass die heterogene Methylierung innerhalb einer CGI abhängig von der in der Analyse erfassten CpG-Stellen nicht nur in unterschiedlichen Methylierungswerten sondern auch in verschieden ausgeprägten statistischen Assoziationen mit klinisch-pathologischen sowie Überlebensparametern der Patienten resultieren kann. Da die meisten bisherigen Untersuchungsverfahren nicht die Erfassung der Methylierung über eine gesamte CGI in effizienter Weise ermöglichen, sind weitere ergänzende Untersuchungen notwendig, um etwaige Unsicherheiten ausschließen zu können. Zur Erklärung der hohen Frequenz von *CDH3*-Expressionsverlusten müssen abgesehen von der DNA-

Methylierung auch andere epigenetische Veränderungen, wie z.B. Veränderungen der Histonacetylierung und -methylierung sowie der MicroRNA-Expression, die Einfluss auf die Transkription und Translation üben, prinzipiell in Betracht gezogen werden. Solche Untersuchungen wurden allerdings in dieser Arbeit nicht durchgeführt und sollten daher Gegenstand weiterführender Analysen sein.

Es wurde hingegen in dieser Arbeit gezeigt, dass *CDH3* eine hochsignifikante tumorspezifische Hypermethylierung in ccRCC aufweist. So konnten im gepaarten t-Test TU gegenüber TbA für ccRCC signifikante Methylierungsunterschiede ($p=0,0002$) verzeichnet werden. Weiter zeigten ccRCC im Vergleich zu papRCC bezogen auf die Gruppenmittelwerte eine um 100% erhöhte Methylierung ($p=0,0041$, $OR=11,64$). Insgesamt bestätigen die Gewebeuntersuchungen die Vorergebnisse, die anhand der Nierenzelllinien (z.B. A-498) erhalten wurden.

Die Annahme, dass epigenetische Alterationen im *CDH3* in der Progression von ccRCC eine Rolle spielen könnten, wird durch weitere Ergebnisse untermauert. So zeigte der Vergleich der untersuchten lokalisierten und fortgeschrittenen Tumore eine signifikante Hypermethylierung der *CDH3*-CGI für die fortgeschrittenen Tumore ($p=0,032$, $OR=4,31$).

Die zu verzeichnenden Trends in Hinsicht auf eine statistische Assoziation mit Differenzierungsgrad und Staging ($p=0,059$, $OR=4,67$; $p=0,06$, $OR=3,49$) wiesen dieselbe Tendenz auf, nämlich ansteigende Methylierung mit zunehmender Entdifferenzierung. Werden hierbei die kleine Gruppengröße und die niedrige Methylierungsfrequenz von *CDH3* berücksichtigt, ist zu vermuten, dass in einer entsprechend vergrößerten Untersuchungskohorte, Effekte mit einer besseren statistischen Signifikanz erhalten werden können.

Der statistische Vergleich einer möglichen Methylierung in der *CDH3*-CGI der ccRCC im Zusammenhang mit Metastasierung und Lymphknotenbefall zeigte für die univariate logistische Regression keinerlei Einfluss ($p=0,995$, $OR=1,00$;

$p=0,98$, $OR=0,98$). Fraglich ist, wie repräsentativ diese Ergebnisse sind. Es muss davon ausgegangen werden, dass die untersuchten sechs Lymphknoten der ccRCC vermutlich eine zu kleine Anzahl aufwiesen, um valide Aussagen treffen zu können. Ein statistisch starker Zusammenhang hätte allerdings bei dem Vergleich von den 18 Patienten (M+) zu den 56 Patienten (M0) erkannt werden müssen. Daher wird ein möglicher Zusammenhang als eher unwahrscheinlich angesehen.

In der Überlebenszeitanalyse, die mit einer univariaten Cox-Regression durchgeführt wurde, konnte lediglich ein Trend ($HR=2,62$, $p=0,1$) für einen möglichen Zusammenhang der Hypermethylierung (optimaler statistischer Schwellenwert: 8,4%) und dem rezidivfreien Überleben festgehalten werden. Grund hierfür könnte sein, dass erstens bei wenigen Patienten ein Tumorrezidiv diagnostiziert wurde und zweitens generell die Hypermethylierung in der Kohorte niedrigfrequentiert war. Dies ließe sich mit einer Vergrößerung der Kohorte bzw. unter Einbeziehung weiterer Methylierungsloki in der *CDH3*-CGI weiter klären.

Erwartete Effekte zeigten der Metastasierungsstatus und Differenzierungsgrad auf das rezidivfreie Überleben. Für diese beiden Parameter wurde ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben beobachtet ($HR=6,72$; $p=0,00033$ und $HR=10,06$; $p=2,8e^{-05}$).

Anhand des statistischen Vergleichs der 10 gepaarten Gewebeproben der papRCC konnte kein signifikanter Unterschied für die Mittelwerte beider Gruppen gefunden werden ($p=0,57$). Andererseits deuten zwei stärker methylierte TU-Proben daraufhin, dass eine Subgruppe höher methylierter papRCC existieren könnte, was allerdings in nachfolgenden Untersuchungen anhand eines angepassten, geeigneten Untersuchungskollektivs nachzuweisen wäre.

Untersuchungen über die Proteinexpression von *CDH3* im Nierenkarzinomgewebe ergaben einen Expressionsverlust in vielen der Tumore. Sowohl die 20 in

dieser Studie untersuchten Tumore, die durch proteinatlas.org publizierten 12 Nierentumore als auch die 20 untersuchten RCC von Shimazui et al. (1996) zeigen übereinstimmend Immunpositivitätsverluste von CDH3 in RCC. Darüber hinaus zeigen die tumorbenachbarten Areale dieser Studie und die Gewebeproben normaler Nieren von proteinatlas.org eine deutliche Antikörperfärbung. Die Darstellung der Invasionszone in dieser Studie lässt keinen Zweifel daran, dass die CDH3-Immunpositivität mit zunehmender Gewebeentartung abnimmt (Abb. 33).

Auffällig ist die tubuläre Zuordnung der Immunpositivität in Epithelzellen der Nierentubuli. Sowohl die hier als auch die von proteinatlas.org erhobenen Daten, lassen aufgrund morphologischer Betrachtung auf eine Lokalisation von CDH3 im distalen Tubulus bis Sammelrohr schließen. Diese Beobachtung in Kombination mit den klinisch-pathologischen Daten dieser Studie führt zu der Annahme, dass ein Zusammenhang von *CDH3*-CGI-Hypermethylierung und CDH3-Expressionsverlusten in ccRCC in Form eines *gensilencing* bestehen könnte, was aber in geeigneten Untersuchungen überprüft werden müsste. Sollte ein solcher Nachweis geführt werden können, würde dies auch Untersuchungen stützen, die die bisherige Annahme der Entstehung des ccRCC aus Epithelzellen des proximalen Tubulus in Frage stellen (Mandriota et al., 2002, Motzer et al., 1996) und eine Tumorentstehung aus den distalen Anteilen der Niere nicht ausschließen. Beide Forschungsgruppen erachten eine derart konkrete Zuordnung der unterschiedlichen Nierenzellkarzinome zu Nephronabschnitten als wenig sinnvoll.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Expressionsverluste auf epigenetisches *silencing* zurückzuführen sein könnten, was aber in Reexpressionsexperimenten unter Verwendung des Methylaseinhibitors 5'-Aza-2'-Desoxy-Cytidin in Zellkulturmodellen zu klären wäre.

Nichtsdestotrotz stellt diese Arbeit den ersten Anhaltspunkt einer tumorspezifischen Hypermethylierung und die Identifizierung von *CDH3* als ein Gen,

welches mitverantwortlich für die Pathogenese des ccRCC sein könnte, dar. Weiteren Aufschluss dazu müssen geeignete funktionelle Analysen erbringen, die z.B. den Einfluss von CDH3 auf die zelluläre Adhärens, das Migrations- und Invasionspotential erfassen können.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass hier erstmals eine tumorspezifische Hypermethylierung in der *CDH3*-CGI in RCC beobachtet worden ist und Zusammenhänge von Hypermethylierung und der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms bestehen. Somit kann CDH3 zu der Gruppe der epigenetisch alterierten Gene im RCC zugeordnet werden. Die mögliche Relevanz der CDH3-Alteration für den klinischen Verlauf von RCC-Patienten unterstreicht die Notwendigkeit zukünftiger funktioneller Analysen dieser Epialteration.

5 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist mit 3% aller Tumore im Erwachsenenalter die dritthäufigste maligne Veränderung im Urogenitaltrakt. Da die Behandlungsoptionen des RCC gleich welchen Stadiums immer noch beschränkt sind, wird der molekularen Aufklärung der RCC-Pathogenese eine hohe Relevanz zugesprochen. Erhebliche Fortschritte wurden hierzu in der Aufklärung epigenetischer Vorgänge in der Tumorentwicklung in jüngerer Zeit erzielt. So wurden für eine Reihe von Genen epigenetische Modifikationen wie Promotermethylierung und ein damit verbundenes *genesilencing* für das RCC beschrieben.

Eine entscheidende regulatorische Rolle in der Proliferation und Architektur von Zellen epithelialen Ursprungs spielt das Adhäsionsmolekül CDH3, welches physiologisch u.a. in humanem Gewebe von Epidermis, Ösophagus, Harnblase und Prostata nachgewiesen wurde. Gerade aber im Zusammenhang mit dem RCC ist über das CDH3, bis auf qualitative Expressionsdaten einer Pilotgruppe, bis zu diesem Zeitpunkt wenig bekannt. Über seine Rolle in der renalen malignen Entartung ist bisher nichts beschrieben.

Bei internetbasierten Datenbankrecherchen wurde ein CDH3-Expressionsverlust für das RCC sowie die Anwesenheit von zwei CGI im *CDH3*-Gen festgestellt. Daher wurde die Arbeitshypothese formuliert, dass dieser Expressionsverlust möglicherweise auf eine DNA-Hypermethylierung in Bereichen der CGI zurückzuführen sein könnte. Gegenstand dieser Arbeit ist die DNA-Methylierungsanalyse einer CGI-Region im kodierenden Bereich des humanen *CDH3*-Gens in zwei Primärzelllinien der Niere und Prostata, in 16 Karzinomzelllinien der Niere, Prostata und Harnblase sowie in 235 humanen, renalen Gewebeproben. Die Analysedaten wurden anschließend im Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Verlaufsdaten und Follow-up-

Fällen statistisch ausgewertet. Zusätzlich wurde die CDH3-Proteinexpression mittels Immunhistochemie von jeweils 20 Proben von Tumoren und tumorbenachbarten normalen Gewebearealen untersucht.

Die durch Bisulfit konvertierte aus dem Probenmaterial extrahierte DNA wurde mit der *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA) und zusätzlich mittels der Pyrosequenzierung analysiert. Es konnte dabei nach unserem Kenntnisstand zum ersten Mal gezeigt werden, dass die untersuchte Region in der *CDH3*-CGI eine tumorspezifische Hypermethylierung für das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) aufweist. Die Gegenüberstellung gepaarter Tumor- und tumorbenachbarter normaler Gewebeproben zeigt für die ccRCC-Gruppe im Durchschnitt eine um 100% höhere Methylierung an ($p=0,0002$). Die univariate statistische Analyse über einen möglichen Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parametern Differenzierungsgrad und Staging deutet auf einen Trend hin, dass ein zunehmender Methylierungsgrad der *CDH3*-CGI mit einer Entdifferenzierung (G3) bzw. für die Subgruppe der ccRCC einem höheren Stadium (T3) assoziiert sein könnte (OR=4,67, $p=0,06$; OR=3,49, $p=0,06$). Der statistische Vergleich lokalisierter versus fortgeschrittener Tumore weist eine signifikante Hypermethylierung für die Subgruppe der klarzelligen Tumore nach (OR=4,31, $p=0,032$).

In einer univariaten statistischen Analyse mittels Cox-Regression konnte ein Trend einer *CDH3*-CGI-Hypermethylierung mit dem rezidivfreien Überleben (HR=2,62 und $p=0,1$) festgehalten werden. Der Metastasierungsstatus und der Differenzierungsgrad in der Gruppe aller RCC waren mit einem kürzeren Überleben assoziiert (HR=6,72; $p=0,0003$ und HR=10,06, $p=2,8e^{-05}$).

Auf Proteinexpressionsebene wurden in einer Pilotgruppe von 20 Nierentumoren die CDH3-Expression in Tumoren und tumorbenachbarten Gewebearealen verglichen und in 20 von 20 (100%) normalen Bereichen eine vorhandene CDH3-Immunpositivität und in 7 von 20 (35%) Tumorproben ein CDH3-Immunpositivitätsverlust detektiert.

Die vorliegende Studie weist auf eine mögliche Beteiligung der *CDH3*-Hypermethylierung an der Pathogenese des ccRCC hin. Ferner unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Charakterisierung epigenetischer Veränderungen von *CDH3* im RCC und ihrer funktionellen bzw. klinischen Konsequenzen für das humane Nierenzellkarzinom.

6 Literaturverzeichnis

- Alattia JR**, Kurokawa H, Ikura M (1999): *Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion*. Cell Mol Life Sci. 55(3):359-67. Review.
- Banks RE**, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D, Maher ER, Stanley AJ, Harnden P, Joyce A, Knowles M and Selby PJ (2006): *Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer*. Cancer research. 66(4): 2000-2011.
- Barth AI**, Näthke IS, Nelson WJ (1997): *Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways*. Curr Opin Cell Biol. 9(5):683-90. Review.
- Battagli C**, Uzzo RG, Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Krassenstein R, Al-Saleem T, Greenberg RE and Cairns P (2003): *Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients*. Cancer research. 63(24): 8695-8699.
- Baylin SB** (2005): *DNA methylation and gene silencing in cancer*. Nat Clin Pract Oncol. 2 Suppl 1:S4-11. Review.
- Blaschuk OW**, Sullivan R, David S, Pouliot Y (1990): *Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence*. Dev Biol. 139(1):227-9.
- Bryan RT**, Hussain SA, James ND, Jankowski JA, Wallace DM (2005): *Molecular pathways in bladder cancer: part 2*. BJU Int. 95(4):491-6. Review.
- Bryan RT**, Atherfold PA, Yeo Y, Jones LJ, Harrison RF, Wallace DM, Jankowski JA. (2008): *Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies*. J Pathol. 215(2):184-94.
- Bryan RT**, Tselepis C. (2010): *Cadherin switching and bladder cancer*. J Urol. 184(2):423-31. Review.
- Chen J**, Lui WO, Vos MD, Clark GJ, Takahashi M, Schoumans J, Khoo SK, Petillo D, Lavery T, Sugimura J, Astuti D, Zhang C, Kagawa S, Maher ER, Larsson C, Alberts AS, Kanayama HO and Teh BT (2003): *The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas*. Cancer cell. 4(5): 405-413.
- Christoph F**, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Kollermann J, Miller K and Schrader M (2006): *Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications*. Clinical cancer research. 12(17): 5040-5046.
- Colella S**, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R (2003): *Sensitive and quantitative universal*

Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. Biotechniques. 35(1):146-50.

Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, Pinto M, Oliveira J, Lobo F, Teixeira MR, Jerónimo C. (2007): *Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors*. BMC Cancer. 7:133.

Dagliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maguire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wondergem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR & Futreal PA (2010): *Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes*. Nature. 463(7279): 360-363.

Dorkin TJ, Robson CN, Neal DE (1997): *The molecular pathology of urological malignancies*. J Pathol. 183(4):380-7. Review.

Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G & Zabarovsky ER (2001): *The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98(13): 7504-7509.

Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, Babb JS, Grizzle WE and Cairns P (2004): *Promoter hypermethylation profile of kidney cancer*. Cancer Research. 10(12):3972-3979.

Ellinger J, Holl D, Nuhn P, Kahl P, Haseke N, Staehler M, Siegert S, Hauser S, Stief CG, Müller SC, Bastian PJ (2011): *DNA hypermethylation in papillary renal cell carcinoma*. BJU Int. 107(4):664-9.

Esteller M (2008): *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med. 358(11):1148-59. Review.

Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JA, Contreras M, Aloysius S (1990): *Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity*. Lancet. 335(8703):1419-22.

Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR and Linehan WM (1994): *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91(21): 9700-9704.

Hibi K, Kitamura YH, Mizukami H, Goto T, Sakuraba K, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. (2009): *Frequent CDH3 demethylation in advanced gastric*

carcinoma. *Anticancer Res.* 29(10):3945-7.

Hibi K, Goto T, Mizukami H, Kitamura YH, Sakuraba K, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y. (2009): *Demethylation of the CDH3 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer*. *Anticancer Res.* 29(6):2215-7.

Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, Califano JA and Sidransky D (2004): *Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer*. *Cancer research.* 64(15): 5511-5517.

Hori Y, Oda Y, Kiyoshima K, Yamada Y, Nakashima Y, Naito S and Tsuneyoshi M (2007): *Oxidative stress and DNA hypermethylation status in renal cell carcinoma arising in patients on dialysis*. *The Journal of pathology.* 212(2): 218-226.

Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG and Cairns P (2006a): *Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer*. *Cancer research.* 66(10): 5021-5028.

Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG and Cairns P (2006b): *Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer*. *Cancer research.* 66(10): 5021-5028.

Jarrard DF, Paul R, van Bokhoven A, Nguyen SH, Bova GS, Wheelock MJ, Johnson KR, Schalken J, Bussemakers M, Isaacs WB (1997): *P-Cadherin is a basal cell-specific epithelial marker that is not expressed in prostate cancer*. *Clin Cancer Res.* 3(11):2121-8.

Jones PA, Baylin SB (2007): *The epigenomics of cancer*. *Cell.* 128(4): 683-692.

Katagiri A, Watanabe R, Tomita Y (1995): *E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival*. *Br. J. Cancer* 71, 376-379.

Kempkensteffen C, Hinz S, Schrader M, Christoph F, Magheli A, Krause H, Schostak M, Miller K and Weikert S (2007): *Gene expression and promoter methylation of the XIAP-associated Factor 1 in renal cell carcinomas: correlations with pathology and outcome*. *Cancer letters.* 254(2): 227-235.

Kim WY, Kaelin WG (2004): *Role of VHL gene mutation in human cancer*. *J Clin Oncol.* 22(24):4991-5004. Review.

Latif F, Tory K, Gnarra, J, Yao M, Duh FM, Orcutt, ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L (1993): *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene*. *Science* (New York, N.Y.), vol. 260, no. 5112, pp. 1317-1320.

Lee MG, Huh JS, Chung SK, Lee JH, Byun DS, Ryu BK, Kang MJ, Chae KS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG and Chi SG (2006a): *Promoter CpG hypermethylation and downregulation*

of *XAF1* expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene*. 25(42): 5807-5822.

Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R and Young RA (2006b): *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. *Cell*. 125(2): 301-313.

Mandeville JA, Silva Neto B, Vanni AJ, Smith GL, Rieger-Christ KM, Zeheb R, Loda M, Libertino JA, Summerhayes IC (2008): *P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells*. *BJU Int*. 102(11):1707-14.

Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, Wykoff CC, Maher ER, Harris AL, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2002): *HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron*. *Cancer cell*, vol. 1, no. 5, pp. 459-468.

Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, Ohneseit PA, Kuehs U, Kruck S, Koch E, Vogel U, Stenzl A, Kuczyk MA (2005): *Cathepsin D expression in renal cell cancer-clinical implications*. *Eur Urol*. 48(3):519-26.

Morris MR, Hesson LB, Wagner KJ, Morgan NV, Astuti D, Lees RD, Cooper WN, Lee J, Gentle D, Macdonald F, Kishida T, Grundy R, Yao M, Latif F and Maher ER (2003): *Multigene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma*. *Oncogene*. 22,(43): 6794-6801.

Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Teh BT, Latif F and Maher ER (2008): *Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma*. *British journal of cancer*. 98(2): 496-501.

Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. (2010): *Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma*. *Oncogene*. 29(14):2104-17.

Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, McDonald F, Carli N, Khalili H, Brown M, Kishida T, Yao M, Banks RE, Clarke N, Latif F, Maher ER. (2011a): *Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma*. *Oncogene*, vol. 30(12):1390-401.

Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, McDonald F, Carli N, Khalili H, Brown M, Kishida T, Yao M, Banks RE, Clarke N, Latif F and Maher ER 2011b: *Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma*. *Oncogene*, vol. 30(12):1390-1401.

- Motzer RJ**, Bander NH, Nanus DM (1996): *Renal-cell carcinoma*. The New England journal of medicine. Vol. 335, no. 12, pp. 865-875.
- Nojima D**, Nakajima K, Li LC, Franks J, Ribeiro-Filho L, Ishii N, Dahiya R. (2001): *CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma*. Mol Carcinog. 32:19-27
- Nollet F**, Kools P, van Roy F (2000): *Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members*. J Mol Biol. 299(3):551-72. Review.
- Okegawa T**, Li Y, Pong RC, Hsieh JT. (2002): *Cell adhesion proteins as tumor suppressors*. J Urol. 167(4):1836-43. Review.
- Okuda H**, Toyota M, Ishida W, Furihata M, Tsuchiya M, Kamada M, Tokino T and Shuin T (2006): *Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma*. Oncogene. 25(12): 1733-1742.
- Onay H**, Pehlivan S, Koyuncuoglu M, Kirkali Z and Ozkinay F (2009): *Multigene methylation analysis of conventional renal cell carcinoma*. Urologia internationalis. 83(1): 107-112.
- Paredes J**, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt FC. (2005): *P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation*. Clin Cancer Res. 11(16):5869-77.
- Peters I**, Rehmet K, Wilke N, Kuczyk MA, Hennenlotter J, Eilers T, Machtens S, Jonas U and Serth J (2007a): *RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis*. Molecular cancer. 6: 49.
- Peters I**, Rehmet K, Wilke N, Kuczyk MA, Hennenlotter J, Eilers T, Machtens S, Jonas U and Serth J (2007b): *RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis*. Molecular cancer. 6: 49.
- Riener MO**, Vogetseder A, Pestalozzi BC, Clavien PA, Probst-Hensch N, Kristiansen G, Jochum W. (2010): *Cell adhesion molecules P-cadherin and CD24 are markers for carcinoma and dysplasia in the biliary tract*. Hum Pathol. 41(11):1558-65.
- Ronaghi, M.**, Uhlen, M., Nyren, P (1998): *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science. 281: 363-65.
- Russell RC**, Ohh M (2007): *The role of VHL in the regulation of E-cadherin: a new connection in an old pathway*. Cell Cycle. 6(1):56-9. Review.
- Sanz-Casla MT**, Maestro ML, del Barco V, Zanna I, Moreno J, Vidaurreta M, Almansa I, Fernandez C, Blanco J, Maestro C and Rese, L (2003): *Loss of heterozygosity and methylation of p16 in renal cell carcinoma*. Urological research. 31(3): 159-162.

- Sato N**, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. (2003): *Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays*. Cancer Res. 63(13):3735-42.
- Shimazui T**, Girolodi LA, Bringuier PP, Oosterwijk E, Schalken JA (1996): *Complex cadherin expression in renal cell carcinoma*. Clin. Cancer Res. 56, 3234-3237.
- Stahler M**, Tüllmann C, Nuhn P, Haseke N, Stief CG (2010): *Systemische Therapie beim Nierenzellkarzinom*. Urologe 49:1543-1552.
- Takeichi M** (1995): *Morphogenetic roles of classic cadherins*. Curr Opin Cell Biol. 7(5):619-27. Review.
- Thyjaer T**, Workman C, Kruhoffer M, Demtröder K, Wolf H, Andersen LD, Frederiksen CM, Knudsen S, Orntoft TF (2001): *Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer*. Cancer Res. 61(6):2492-9.
- Uhlmann K**, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nürnberg P (2002): *Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis*. Electrophoresis. 23(24):4072-9.
- Urakami S**, Shiina, H., Enokida, H., Hirata, H., Kawamoto, K., Kawakami, T., Kikuno, N., Tanaka, Y., Majid, S., Nakagawa, M., Igawa, M. & Dahiya, R. (2006): *Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA*. Clinical cancer research.12(23): 6989-6997.
- van Vlodrop IJ**, Baldewijns MM, Smits KM, Schouten LJ, van Neste L, van Criekinge W, van Poppel H, Lerut E, Schuebel KE, Ahuja N, Herman JG, de Bruine AP, van Engeland M. (2010): *Prognostic significance of Gremlin1 (GREM1) promoter CpG island hypermethylation in clear cell renal cell carcinoma*. The American journal of pathology. Vol. 176, no. 2, pp. 575-584.
- van Vlodrop IJ**, Niessen HE, Derks S, Baldewijns M, Van Criekinge W, Herman JG, van Engeland M (2011): *Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location!*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.
- Varela I**, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, Davies H, Jones D, Lin ML, Teague J, Bignell G, Butler A, Cho J, Dalglish GL, Galappaththige D, Greenman C, Hardy C, Jia M, Latimer C, Lau KW, Marshall J, McLaren S, Menzies A, Mudie L, Stebbings L, Largaespada DA, Wessels LF, Richard S, Kohnski RJ, Anema J, Tuveson DA, Perez-Mancera PA, Mustonen V, Fischer A, Adams DJ, Rust A, Chan-on W, Subimerb C, Dykema K, Furge K, Campbell PJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA (2011): *Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma*. Nature 469(7331):539-42.

- Vosberg HP** (1989): *The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids*. Hum Genet. 83(1):1-15. Review.
- Warnecke PM**, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ (2002): *Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing*. Methods. 27(2):101-7.
- Weihrauch TR** (Hrsg.) (2010): *Internistische Therapie 2010/2011* 18.Auflage, Elsevier GmbH, München.
- Wu H**, Caffo B, Jaffee HA, Irizarry RA, Feinberg AP (2010): *Redefining CpG islands using hidden Markov models*. Biostatistics (Oxford, England), vol. 11, no. 3, pp. 499-514.
- Yamada D**, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, Tomita K, Gutmann DH, Kakizoe T, Kitamura T, Kanai Y & Murakami Y (2006): *Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma*. International journal of cancer. 118(4): 916-923.
- Zantl N**, Staehler T, Maurer T et al. (2008): *Das Nierenzellkarzinom*. In: Treiber U, Zaak D (Bandhrsg.): Manual Urogenitale Tumoren 4.Auflage, Zuckschwerdt Verlag, München: 154-181.
- Zhang Q**, Ying J, Zhang K, Li H, Ng KM, Zhao Y, He Q, Yang X, Xin D, Liao SK, Tao Q and Jin J (2007): *Aberrant methylation of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 in renal cell carcinoma*. Cancer letters. 249(2): 220-226.
- Webseiten:**
- Cell Lines Service** (2011): <http://www.cell-lines-service.de/content/index_ger.html>
- Dorp vom** (2007): http://www.uk-essen.de/fileadmin/Urologie/PDF/Leitlinie_Nierenzellkarzinom.pdf
- EAU Guidelines** (2010): http://www.uroweb.org/gls/pdf/NEW09_Renal_Cell_Carcinoma_LR.pdf
- Epigenomics AG** (2011): <<http://www.epigenomics.com>>
- GeneCards** (2011): <<http://www.genecards.org/>>
- ImageJ** (o.A.): <<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>>
- Lonza** (o.A.): <<http://www.lonza.com/group/en.html>>

Proteinatlas (2011): The human proteinatlas. <<http://www.proteinatlas.org>>

Pyrosequenzierung (2011): <<http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454>>

UCSC Genome Browser (o.A.): *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly.*

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?insideX=118&revCmplDisp=0&hgsid=195181401&hgt_doJsCommand=&hgt.left1=+%3C+&position=chr16%3A68672945-68967694&hgtgroup_map_close=0&hgtgroup_phenDis_close=1&hgtgroup_genes_close=0&hgtgroup_rna_close=0&hgtgroup_expression_close=0&hgtgroup_regulation_close=0&hgtgroup_compGeno_close=0&hgtgroup_neandertal_close=1&hgtgroup_varRep_close=0>

http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?insideX=118&revCmplDisp=0&hgsid=195181401&hgt_doJsCommand=&hgt.left1=+%3C+&position=chr16%3A68672945-68967694&hgtgroup_map_close=0&hgtgroup_phenDis_close=1&hgtgroup_genes_close=0&hgtgroup_rna_close=0&hgtgroup_expression_close=0&hgtgroup_regulation_close=0&hgtgroup_compGeno_close=0&hgtgroup_neandertal_close=1&hgtgroup_varRep_close=0

Wagner C, Tschentscher P (2006): *Kolorektales Karzinom: Frühdiagnose durch Nachweis von Tumor-DNA im Stuhl. Grafik 3.* <<http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?src=suche&p=wagner+und+tschentscher+2006&id=50503>>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der phylogenetischen Einteilung der Cadherin-Superfamilie auf Basis der EC1-Region.....	11
Abbildung 2: Schematische Übersicht des klassischen/Typ-1- Cadherin/Catenin/zytoskeletalen Komplexes an der Adherens junction der epithelialen Zelle.....	12
Abbildung 3: genaue Lokalisation von CDH3 und CDH1 auf Chromosom 16q22.1.....	16
Abbildung 4: Übersicht der Vorgehensweise bei der Verarbeitung der Proben.....	28
Abbildung 5: Bisulfit-Reaktion.....	30
Abbildung 6: Übersicht: Ablauf einer PCR.....	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung der "semi-nested-PCR".....	33
Abbildung 8: PCR-Protokoll für die Optimierung der Primer für die COBRA.....	36
Abbildung 9: PCR-Protokoll für die Optimierung der Primer für die Pyrosequenzierung.....	37
Abbildung 10: Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) nach Einbau eines Nukleotids (dNTP).....	40
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Enzymkaskade bei der Pyrosequenzierung.....	41
Abbildung 12: Abbauweg von überschüssigen dNTPs.....	41
Abbildung 13: Übersicht über den Verlauf der Pyrosequenzierung mit dem Einsatz eines biotinylierten Universal-Rückwärtsprimers.....	42
Abbildung 14: Konzentrationen des Mastermix.....	48
Abbildung 15: PCR-Protokoll der optimalen Bedingungen zur Durchführung der COBRA für CDH3.....	49
Abbildung 16: Zelllinien mit (v) und ohne (•) Restriktionsenzym TaqI 1.....	51
Abbildung 17: Zelllinien mit (v) und ohne (•) Restriktionsenzym HpyCH4IV.....	52
Abbildung 18: Quantitative Auswertung der Zelllinien aus der COBRA mit TaqI mit ImageJ.....	53
Abbildung 19: Quantitative Auswertung der Zelllinien aus der COBRA mit HpyCH4IV mit ImageJ.....	53
Abbildung 20: Patientenproben (TK) mit (v) und ohne (•) Restriktionsenzym TaqI	55
Abbildung 21: Protokoll der 1. PCR	56
Abbildung 22: Protokoll der 2. PCR.....	57
Abbildung 23: Protokoll der 3. PCR.....	57
Abbildung 24: Pyrogramm von RPTEC (durchschnittlich 1% Methylierung).....	58
Abbildung 25: Pyrogramm von A-498 (durchschnittlich 91% Methylierung).....	59
Abbildung 26: relative Methylierung der Zelllinien in der Pyrosequenzierung und Standardabweichung....	60

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27: Pyrogramm von TK551 (durchschnittlich 29% Methylierung).....	62
Abbildung 28: Pyrogramm von TK567 (durchschnittlich 1% Methylierung).....	62
Abbildung 29: Methylierung in gepaarten Gewebeproben von tumorbenachbarten normalen Gewebearealen (TbA) und Tumoren (TU) aller RCC. A) sortierter Differenzplot B) Liniengrafik C) Scatterplot.....	64
Abbildung 30: Methylierung in gepaarten Gewebeproben von tumorbenachbarten normalen Gewebearealen (TbA) und Tumoren (TU) aller ccRCC. A) sortierter Differenzplot B) Liniengrafik C) Scatterplot.....	65
Abbildung 31: Methylierung in gepaarten Gewebeproben von tumorbenachbarten normalen Gewebearealen (TbA) und Tumoren (TU) aller papRCC. A) sortierter Differenzplot B) Liniengrafik C) Scatterplot.....	66
Abbildung 32: Vergleich der relativen Methylierung ccRCC versus papRCC im Scatterplot.....	67
Abbildung 33: Exemplarische Dartstellung einer (1) normalen Niere, (2) Invasionszone, (3) eines Tumors	69
Abbildung 34: links: CDH3-immunpositive Probe einer 56-jährigen Frau; rechts: CDH3-immunpositive Probe eines 28-jährigen Mannes.....	70
Abbildung 35: links: Probe eines Nierenzellkarzinoms einer 76-jährigen Frau; rechts: Probe eines Nierenzellkarzinoms eines 57-jährigen Mannes.....	70

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung von an RCC erhobener Methylierungsdaten.....	8
Tabelle 2: publizierte, relevante Gene mit Methylierungsanalyse, klinisch-pathologische Parameter und Survival-Daten.....	9
Tabelle 3: klinische und histopathologische Eigenschaften des untersuchten Patientenmaterials.....	26
Tabelle 4: untersuchte Primärzellen (Firma Lonza).....	26
Tabelle 5: untersuchte Tumorzellen (Firma CLS Heidelberg).....	27
Tabelle 6: Übersicht über die zur Verfügung stehenden Primer.....	34
Tabelle 7: Klinische Daten für die Subgruppe der klarzelligen Nierenzelltumore	63
Tabelle 8: Vergleich der gepaarten Gewebeproben.....	64
Tabelle 9: Statistische Vergleiche unabhängiger Gewebegruppen mittels logistischer Regression.....	68
Tabelle 10: univariate Cox-Regression (M+ eingeschlossen in Rezidiv/Survival).....	68

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
allRCC	alle Nierenzellkarzinome
APS	Adenosin-5`-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ccRCC	klarzellige/s Nierenzellkarzinom/e
CDH3	Cadherin-3/ P-Cadherin
COBRA	Kombinierte Bisulfit Restriktionsanalyse (<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>)
CGI	CpG-Insel/n
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dNDP	Desoxynukleotiddiphosphat
dNMP	Desoxynukleotidmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EAU	Europäische Gesellschaft für Urologie
G	Guanin
g	Gramm
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure

kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg ²⁺	Magnesium-Kationen
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
ng	Nanogramm
o/n	over night
papRCC	papilläre/s Nierenzellkarzinom/e
PEG	Polyethylenglycol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PPi	Pyrophosphat
QM	EpiTect® methylated human control DNA (bisulfite converted)
RCC	Nierenzellkarzinom/e
sek	Sekunden
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TbA	tumorbenachbartes normales Gewebeareal
TBE	Trishydroxymethylaminomethan Borsäure Ethylendiamintetraazetat
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TU	Nierenzellkarzinom
U	Units

U	Uracil
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem, und andere
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
vHL	von-Hippel-Lindau
ZL	Zelllinien
°C	Grad Celsius

V Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Markus A. Kuczyk, Ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie und Urologische Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover, sowie Herrn Dr. med. Axel S. Merseburger für die Ermöglichung dieser Arbeit danken.

Ganz besonderen Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Serth für die intensive Betreuung dieser Arbeit. Er hat mir nicht nur mit seinem Fachwissen und seiner konstruktiven Kritik zur Seite gestanden, sondern stand mir auch in jeglicher Hinsicht als permanenter Ansprechpartner zur Verfügung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Natalia Dubrowinskaja für die wertvollen Unterstützungen im Labor.

Zu guter Letzt danke ich meiner Schwester Anja für das Korrekturlesen und meinem Partner Wahik, der mich nicht nur bei meinem Vorhaben bestärkt, sondern mich stets aufgebaut und tatkräftig unterstützt hat.

VI Lebenslauf

Name: Inga M. Schimansky
Anschrift: Kornstraße 1
30167 Hannover
Telefon: 0176/81 06 44 55
Geburtsdatum und -ort: 18.02.1984 in Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verpartnert, einen Sohn

Schulische und akademische Ausbildung

07/2003 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife an der Integrierten
Gesamtschule Hannover-Mühlenberg
Abschluss: Abitur

10/2003 - 10/2004 Freischaffende Mitarbeiterin beim SWR in Baden-Baden

10/2004 - 10/2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
Abschluss: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2007 - 06/2012 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen
Hochschule Hannover
Abschluss: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06/2012 Erlangung der Approbation als Ärztin

Inga Schimansky

VII Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Subtypspezifische DNA-Methylierung
von *CDH3* (P-Cadherin)
in humanen Nierenzellkarzinomen**

in der **Klinik der Urologie und urologischen Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover**

unter Betreuung von **PD. Dr. A. S. Merseburger**

mit der Unterstützung durch **Dr. J. Serth**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden/werden in folgendem Publikationsorgan

veröffentlicht.

Hannover, den

Inga Schimansky