

Aus dem Charité Centrum 10 für  
Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin  
Klinik für Urologie  
Campus Benjamin Franklin  
Direktor: Prof. Dr. med. Kurt Miller

Habilitationsschrift

**Das Methylierungsmuster p53 abhängiger Tumorsuppressorgene in  
urologischen Tumorerkrankungen: Prognostische und  
therapeutische Aspekte**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
von  
Dr. med. Frank Christoph

Eingereicht :	Dezember 2006
Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag:	03.12.2007
Dekan :	Prof. Dr. med. Martin Paul
1. Gutachter :	Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl
2. Gutachter :	Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Methodische Grundlagen</b>	
2.1	DNA Bisulfitreaktion	17
2.2	Quantitative methylierungsspezifische real-time PCR	17
2.3	Quantitative real-time RT-PCR	19
2.4	Zellkulturexperimente mit demethylierenden Substanzen	20
<b>3.</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	
3.1	<i>Methylierungsmuster und prognostische Relevanz spezifischer Tumorsuppressorgene im Urothelkarzinom der Harnblase</i> <b>Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M.</b> Regularly methylated novel pro-apoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder. <i>International Journal of Cancer</i> 2006; 119: 1369-02.	21
3.2	<i>Methylierungsmuster und prognostische Relevanz spezifischer Tumorsuppressorgene im Nierenzellkarzinom</i> <b>Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Köllermann J, Miller K, Schrader M.</b> Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications. <i>Clinical Cancer Research</i> 2006; 12: 5040-46.	23
3.3	<i>Methylierungsmuster spezifischer Tumorsuppressorgene in Keimzelltumoren</i> <b>Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M.</b> Frequent epigenetic inactivation of p53 target genes in seminomatous and nonseminomatous germ cell tumors. <i>Cancer Letters</i> 2007; 247: 137-42. [Epub 2006 May 11]	25
3.4	<i>Wachstumshemmende Effekte demethylierender Substanzen im Urothel- und Nierenzellkarzinom</i> <b>Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Köllermann J, Krause H, Miller K, Schrader M.</b> Methylation of tumor suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer. <i>British Journal of Cancer</i> 2006; 95: 1701-07.	27
3.5	<i>Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad und der mRNA Expression spezifischer Gene im Urothelkarzinom der Harnblase</i> <b>Christoph F, Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, Krause H, Schostak M, Schrader M, Miller K.</b> A gene expression profile of tumor suppressor genes commonly methylated in bladder cancer. <i>Journal of Cancer Research and Clinical Oncology</i> 2007; 133: 343-09. [Epub 2006 Dec 8]	29

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Bedeutung der Methylierung des apoptotic-protein-activating factors-1 und des death-associated proteins-1 in urogenitalen Tumoren	31
4.2	Bedeutung der Methylierung des insulin-like-growth factor binding proteins-3, der Caspase-8 und des PML Gens in urogenitalen Tumoren	34
4.3	Effekt demethylierender Substanzen in der Therapie urologischer Tumorerkrankungen	37
4.4	Regulation der mRNA Expression durch DNA Methylierung	40
4.5	Limitierungen und Ausblick	42
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APAF-1	Apoptosis protease activating factor 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell leukemia/lymphoma-2 gene
bp	Basenpaare (als Längenangabe)
CASP-8	Caspase 8
CI	Confidence interval
CS	Clinical stage
DAPK-1	Death associated protein kinase 1
DNA	Desoxyribonucleic acid
DR4	Death receptor 4
DR5	Death receptor 5
EZH2	Enhancer of the Zeste Homologe 2
FDA	Food and drug administration
HDAC	Histondeacetylase
HR	Hazard ratio
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IGFBP-3	Insulin like growth factor binding protein 3
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
MGMT	O <sup>6</sup> Methylguanine DNA methyltransferase
MW	Mittelwert
MyoD	Myogenic differentiation gene 1
NIM	Normalized index of methylation
P16	Protein 16
P53	Protein 53
PBGD	Porphobilinogen-deaminase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PML	Promyelocytic leukemia gene
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RASSF1A	RAS association domain family protein 1
RGE	Relative Genexpressionseinheiten
RNA	Ribonucleic acid

RT-PCR	Reverse-transcription PCR
SD	Standard deviation
TCC	Transitional cell carcinoma
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
TNF	Tumor necrosis factor
TNM	Tumor, node and metastasis Tumorstadienklassifizierung
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
UV	Ultraviolett

## 1. Einleitung

Die Entstehung von Krebs ist auf eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren zurückzuführen. Neben Umweltfaktoren tragen hauptsächlich genetische Veränderungen zur malignen Transformation der Zelle und Tumorigenese bei. Die genetischen Veränderungen betreffen zunächst zwei unterschiedliche Gentyphen, die Onkogene und die Tumorsuppressorgene. In letzter Zeit wurde eine dritte Gruppe von Genen identifiziert, sogenannte Stabilitätsgene, welche chromosomale Instabilitäten oder Fehler während der nicht-tumorigenen DNA Replikation korrigieren (Vogelstein und Kinzler, 2004).

In Falle der malignen Zelltransformation führt die genetischen Veränderung zu einer irreversiblen Änderung des Genotyps der betroffenen Zelle. Diese Änderungen beinhalten Punktmutationen, Deletionen, chromosomale Translokationen oder Amplifikationen. In der Folge kommt es zu einem nicht-reversiblen Strukturverlust der DNA, welcher wiederum zur Aktivierung von Proto-onkogenen oder Inaktivierung der Tumorsuppressor- oder Stabilitätsgene führt (Blagosklonny, 2005).

Neben genetischen DNA Veränderungen, welche die DNA Basensequenz alterieren, besteht alternativ die Möglichkeit der epigenetischen DNA Modifikation, bei der die DNA Basensequenz unverändert bleibt. Hierbei kommt es zu einer räumlichen Konfigurationsänderung der DNA. Zu diesen zählen Änderungen der Chromatinstruktur, Histonmodifikationen und DNA Methylierung (Jones 1999, Jones und Baylin, 2002). Bei der DNA Methylierung wird durch ein Enzym, die DNA-Methyltransferase (DNMT), eine Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) an ein Cytosin, das sich auf dem DNA Strang vor einem Guanin befindet, angelagert. Diese Konfiguration eines Cytosins vor einer Guanin Base, in einem 500 bp umspannenden Abschnitt der DNA, mit einem Gehalt an C:G von über 55%, wird als CpG Island bezeichnet. Die Methylierung des Cytosins führt konsekutiv zur Bildung von 5-Methylcytosin, was die Konfigurationsänderung der DNA zur Folge hat (Takai and Jones, 2002). Befinden sich diese CpG Islands in der Promotorregion eines Gens, so führt die Konfigurationsänderung dazu, daß DNA- und RNA-Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren nicht mehr in der Lage sind, an die DNA zu binden und die notwendige Aktivierung bzw. Transkription des betroffenen Gens einzuleiten.

Abbildung 1 zeigt die beschriebene Konfigurationsänderung im Falle der Methylierung. Die CpG Islands der Promotoren sind durch Methylgruppen „blockiert“, die DNA bleibt eng um die Histone gewickelt. Histonacetylasen (HAC), welche in der Lage wären die DNA zu „entrollen“, können bei dieser Konfiguration nicht aktiv werden, eine Transkription ist nicht möglich. Anders die Situation im Falle eines Fehlens der Methylierung (unteres Bild). Die Promotorregion ist „frei“, zwischen den einzelnen Histonen ist ausreichend Platz für ein Zugriff durch die Histonacetylasen, die DNA kann sich entfalten und die Initiation der Transkription kann erfolgen.

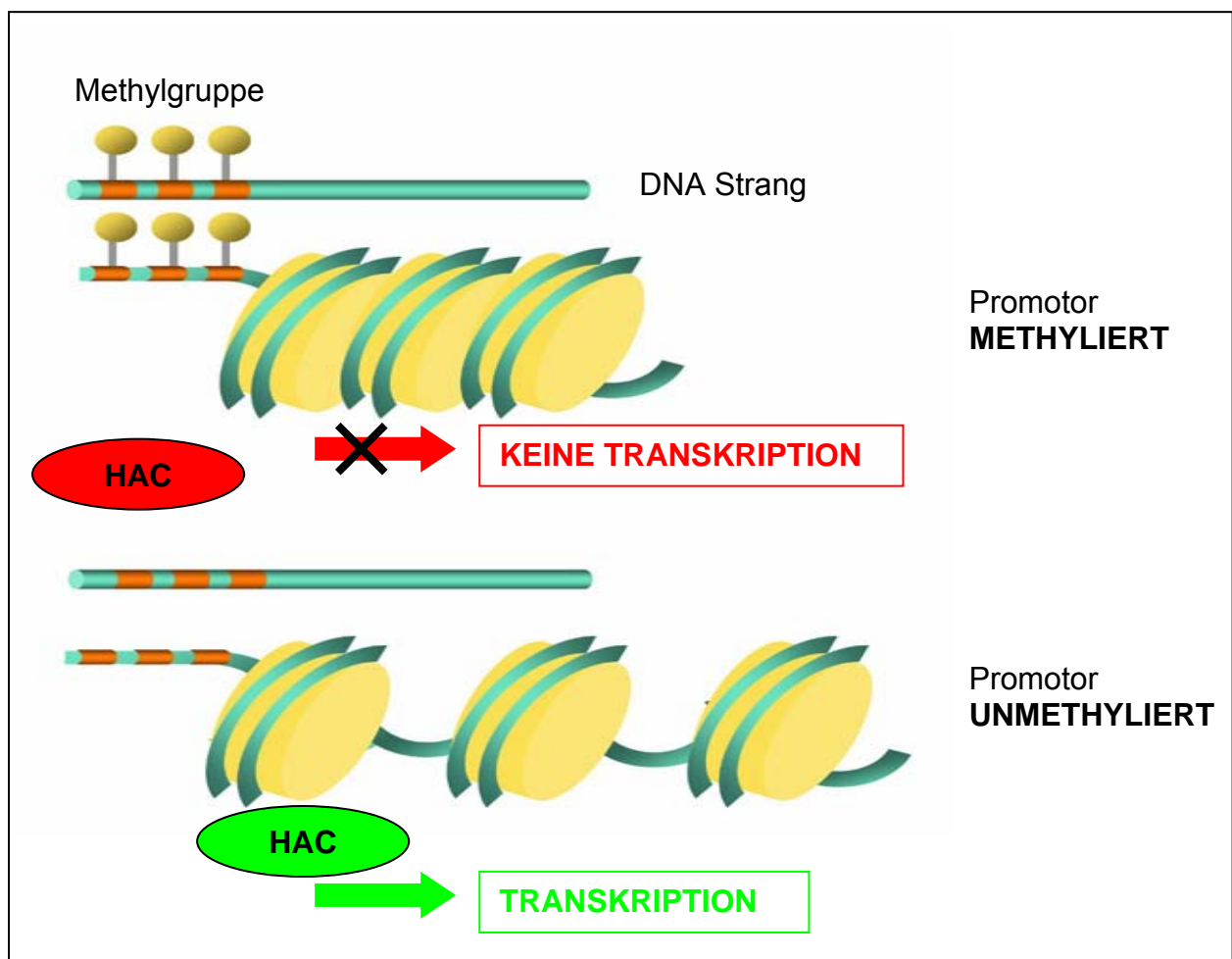
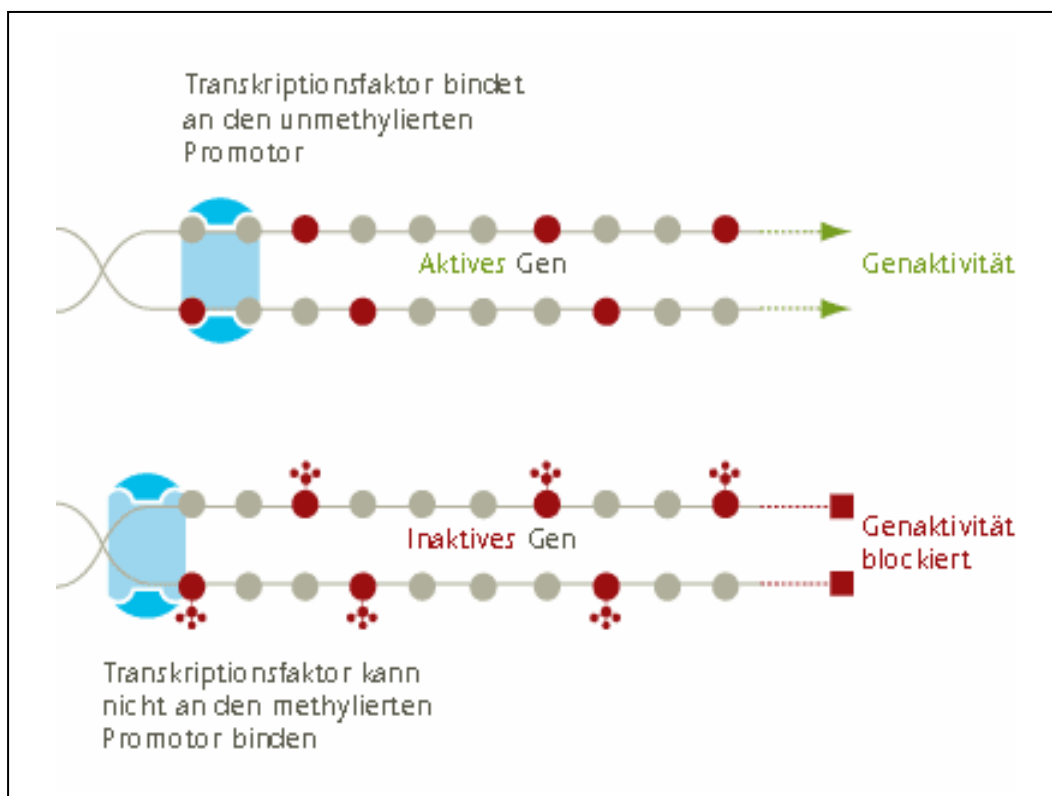


Abbildung 1. Oben - Anlagerung von Methylgruppen an die CpG Islands des Genpromotors (rot-grün). Die DNA bleibt eng um die Histone (gelb) gewunden, keine Transkription möglich. Unten - Fehlen der Methylgruppen und Möglichkeit der Anlagerung durch Histonacetylasen (grün), Transkription möglich.

Dieser Mechanismus der Geninaktivierung hat im Falle der Promotormethylierung eines Tumorsuppressor- oder Stabilitätsgens fatale Konsequenzen, da es zu einem Ungleichgewicht zwischen die Proliferation hemmenden Faktoren (Tumorsuppressorgen) sowie die Proliferation unterstützenden Faktoren kommt (Onkogen). Abbildung 2 zeigt grob schematisch die unmittelbaren Konsequenzen der DNA Methylierung für die Aktivierung eines betroffenen Gens durch Transkriptionsfaktoren.



**Abbildung 2. Transkriptionsfaktoren sind nicht in der Lage an den methylierten Promotor zu binden, das Gen bleibt inaktiv.**

In der Vergangenheit konnte für unterschiedlichste Tumorsuppressor- und Stabilitätsgene die Methylierung in deren Promotorregion nachgewiesen werden. Bei der Auswahl der betroffenen Gene zeigen sich jedoch tumortypspezifische Unterschiede. Generell findet sich ein abnormales Methylierungsmuster bei einer Vielzahl von funktionell unterschiedlichen Genen, die z.B. Zell Zyklus (*p16*, *p15*), DNA Reparatur (*hMLH1*, *MGMT*, *BRCA1*), Metastasierung (*CDH1*, *TIMP3*, *DAPK*), p53 Netzwerk (*p14*, *p73*) oder Zellmetabolismus (*GSTP-1*) kontrollieren (Corn et al., 1999, Esteller et al., 1999, Kissil et al., 1997, Lee et al., 1994, Salem et al., 2000). Hinsichtlich der Spezifität individueller Tumortypen zeigt sich z.B. die *p73*



Methylierung vornehmlich in hämatologischen Tumoren, während die *GSTP-1* Methylierung hauptsächlich im Prostatakarzinom anzutreffen ist (Esteller et al., 1998, Kawano et al., 1999).

Das *GSTP-1* Gen war eines der ersten Gene, welches in urogenitalen Tumoren untersucht wurde. Im Prostatakarzinom zeigt sich ein außergewöhnlich hohe Frequenz der Promotormethylierung. Etwa 85-95% aller Prostatakarzinome zeigen eine stadienunabhängige Methylierung in der *GSTP-1* Promotorregion. In benignem Prostatagewebe ist diese lediglich in 0-3% der Fälle nachweisbar (Henrique und Jeronimo, 2004, Jeronimo et al., 2004). Dieser hohe Anteil methylierter DNA im Promotorbereich des *GSTP-1* Gens ließ sich, in geringerer Frequenz, nur in einem weiteren hormonabhängigen Tumor, dem Mammakarzinom, reproduzieren (Esteller et al., 1998). In anderen Tumorentitäten scheint dieses Detoxifikationsgen eine eher nebensächliche Rolle innerhalb der Tumorigenese zu spielen (Esteller et al., 2001).

Aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit von Methylierung spezifischer Gene, d.h. unterschiedlicher Methylierungsfrequenz je nach Tumortyp, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen sogenannte Methylierungspanels erstellt. Hierbei wurden mehrere Gene untersucht und das so ermittelte Expressionsmuster innerhalb einer Tumorgruppe oder gruppenübergreifend verglichen (Esteller et al. 2001, Jeronimo et al., 2004). In der gruppenübergreifenden Untersuchung zeigten sich je nach Tumortyp ganz unterschiedliche Methylierungsmuster. Ein Gen welches jedoch ubiquitär in nahezu allen Tumorentitäten methyliert ist, ist das *p16* Gen, welches über Inaktivierung der zyklin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) den Eintritt in den Zellzyklus kontrolliert und somit direkten Einfluß auf die Regulation des Zellzyklus hat. Die Methylierung und Inaktivierung des *p16* Gens konnte insbesondere in urogenitalen Tumoren wie dem Urothelkarzinom und dem Nierenzellkarzinom (Kawamoto et al., 2006, Dulaimi et al., 2004), selten jedoch im Prostata- oder Hodenkarzinom nachgewiesen werden (Maruyama et al., 2002, Honorio et al., 2003).

Aufgrund vorangegangener Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, welche sich mit dem Nachweis der Methylierung des *GSTP-1* Gens im Prostatakarzinom beschäftigt hatten (Goessl et al., 2002), sollte im nachfolgend vorgestellten Forschungsprojekt zunächst der quantitative Methylierungsnachweis einer Auswahl bestimmter Zielgene erbracht werden. Zusätzlich sollte die Aussagekraft des Methylierungsstatus einer Probe bezüglich des späteren klinischen Verlaufs überprüft werden. Da durch demethylierende Substanzen die Methylierung aufgehoben und somit inaktive Gene erneut aktiviert werden können, sollte im Rahmen von in vitro Experimenten die Effektivität verschiedener demethylierender Agenzien im Hinblick auf Wachstumsinhibition von Blasen- und Nierenzellkarzinomzelllinien untersucht werden.

Das *p53*-Tumorsuppressorgen spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellzyklus, Zellproliferation und Apoptose. Mutationen und funktioneller Verlust des *p53* Proteins sind eng mit der Entstehung maligner Tumoren assoziiert. Es vermittelt seine Funktion hauptsächlich durch transkriptionelle Aktivierung *p53*-responsiver Gene. Folge der Aktivierung von *p53* ist das Verbleiben der Zelle in der G1- bzw G2-Phase des Zellzyklus und/oder die Induktion von Apoptose (Levine et al., 1991, Woods und Vousden, 2001). In über 50% aller soliden Tumore sind Mutationen des *p53* Gens mit nachfolgender Akkumulation von funktionslosem *p53* Protein nachzuweisen. Bei Tumoren des Urogenitaltraktes wird diese Inaktivierung vermehrt im Harnblasenkarzinom (Serth et al., 1995), selten jedoch im Nierenzell- (Stickle et al., 2005), Hoden- (Houldsworth et al., 1998) oder Prostatakarzinom (Osman et al., 1999) gefunden. Unter der Annahme, daß die Promotormethylierung *p53*-abhängiger Zielgene ein Mechanismus zur Deaktivierung des *p53* Tumorsuppressorgens ist, wurden ausschließlich Gene ausgesucht, welche über DNA-Bindungsstellen von dem *p53* Protein aktiviert werden können. Im Falle der Methylierung eines dieser Zielgene könnte das intakte *p53* Protein zwar an die entsprechende DNA Region anlagern, eine Aktivierung wäre jedoch aufgrund der Methylierung innerhalb der Promotorregion des Zielgens nicht mehr möglich und das betroffene Gen kann seine Funktion, z.B. die Einleitung der Apoptose nicht ausführen.

Das *APAF-1* Gen hat eine Schlüsselfunktion bei der Apoptoseeinleitung über den intrinsischen, mitochondrialen Pathway (Zou et al., 1997). Kommt es im Rahmen der Apoptoseinduktion zur Aktivierung des intrinsischen Pathways mit Cytochrom c

Freisetzung aus den Mitochondrien, so bildet APAF-1 mit Cytochrom c ein sogenanntes „Apoptosom“ welches Caspase-9 und nachfolgend die Caspasen-3 und -7 aktiviert (Zou et al., 1997, Schimmer et al., 2004). Die Inaktivierung des *APAF-1* Gens führt somit zur Unfähigkeit über den intrinsischen Weg die Apoptose zu aktivieren, was bisher in verschiedenen nicht-urologischen Tumoren und Leukämieformen gezeigt werden konnte (Soengas et al., 2001, Jia et al., 2001, Fu et al., 2003). Umgekehrt gelang in in vitro Versuchen die Reaktivierung des *APAF-1* Gens durch Gabe von demethylierenden Agenzien, nachdem die Promotormethylierung des *APAF-1* Gens im malignen Melanom nachgewiesen wurde (Soengas et al. 2001).

Während APAF-1 eine wichtige Aufgabe bei der Aktivierung des intrinsischen Apoptosepathways hat, aktiviert Caspase-8, eine Protease, nach Interaktion mit dem TRAIL-Liganden und den DR4 und DR5 Proteinen den extrinsischen Pathway (Bratton et al., 2000). Caspase-8 leitet somit die Apoptosekaskade ein. Ein mögliche Inaktivierung des *CASP-8* Gens durch Methylierung des Promotors wurde vermutet, konnte bisher jedoch nur in Tumoren neuroektodermalen Ursprungs nachgewiesen werden (Grotzer et al., 2000, Zuzak et al., 2002). Die Vermutung liegt nahe, daß auch in Tumoren des Urogenitaltraktes die Inaktivierung des extrinsischen Weges durch Methylierung des *CASP-8* Genes in seiner Promotorregion erfolgt.

Weder zur *APAF-1* noch zur *CASP-8* Gen Promotormethylierung liegen bisher Daten zur Untersuchung des Promotorstatus in urologischen Tumoren vor.

Eine weiteres in dieser Arbeit untersuchtes p53 Zielgen ist das *DAPK-1* Gen. Es handelt sich bei DAPK-1 um eine Serin/Threonin Kinase welche in der Lage ist, über derzeit noch nicht geklärte Wege unter Interferon- $\gamma$  Einfluß die Apoptose einzuleiten (Deiss et al., 1995). Arbeiten von Inbal et al. haben darüberhinaus eine Verbindung zwischen fehlender DAPK-1 Aktivität und aggressiverem Wachstums- und Metastasierungsmuster in Lungentumoren von Mäusen gezeigt (Inbal et al., 1997). Nachdem eine erniedrigte mRNA Expression vornehmlich in hämatopoetischen Tumoren des Menschen nachgewiesen werden konnte (Kissil et al., 1997), zeigten nachfolgende Arbeiten, daß die beobachtete erniedrigte Expression mit einer Methylierung des DAPK-1 Promotors im Zusammenhang steht (Katzenellenbogen et al., 1999, Esteller et al., 1999, Sanchez-Cespedes et al., 2000). Weitere nicht-quantitative Methylierungsuntersuchungen von Chan et al. zeigten eine relativ hohe Frequenz (58%) an *DAPK-1* Gen methylierten Tumorproben im Magenkarzinom

(Chan et al., 2005). Die Vermutung, daß eine *DAPK-1* Geninaktivierung mit einem aggressiveren Phenotyp einhergeht, fand sich zum Teil in Arbeiten von Tada et al. bestätigt, der mit ebenfalls nicht-quantitativer methylierungsspezifischer PCR (MSP) eine Korrelation zwischen *DAPK-1* Promotormethylierung und Rezidivhäufigkeit in einem Kollektiv von 55 oberflächlichen Harnblasenkarzinomen fand (Tada et al., 2002).

Die Insulin-like growth factors spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, Transformation und Apoptose. Insbesondere die IGF-Binding Proteine sind nicht nur in der Lage die Wirkung der Wachstumsfaktoren zu vermitteln, sondern können auch selbstständig regulatorisch agieren, indem sie die Apoptose einleiten (Rajah et al., 1997). Nachdem epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen höherem Krebsrisiko für u.a. Brust-, Lungen- und Prostatakrebs bei erhöhten IGF-1 und erniedrigten IGFBP-3 Serumspiegeln zeigen konnten (Hankinson et al., 1998, Yu et al., 1999, Chan et al., 1998), wurde die Promotorhypermethylierung als Ursache der erniedrigten IGFBP-3 Spiegel in Folge einer erniedrigten mRNA Expression vermutet und im kleinzelligen Bronchialkarzinom mit einer Methylierungsfrequenz von 61% nachgewiesen (Chang et al., 2002). Im Harnblasenkarzinom wurde eine Korrelation zwischen erniedrigten IGFBP-3 Plasmaspiegeln und höherem Risiko tumorpositiver Lymphknoten sowie signifikant schlechterem Überleben gezeigt (Shariat et al., 2003). Methylierungsspezifische Untersuchungen zum *IGFBP-3* Gen in urologischen Tumoren haben bisher noch nicht stattgefunden.

Das *PML* Gen ist ein weiteres Gen, welches durch p53 transkriptionell aktiviert werden kann. Der Mechanismus seiner Aktivierung ist noch unklar. Es ist in der Lage die Expression bestimmter Autoimmunantigene wie dem Sp100 zu regulieren und dadurch Transkriptions- und Reparaturprozesse innerhalb der Zelle zu steuern (Borden, 2002). *PML* partizipiert an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Differenzierung, Alterung und Apoptose (Salomoni und Pandolfi, 2002) und seine Inaktivierung wurde in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit promyelozytärer Leukämie gefunden (Gurrieri et al., 2004). Ähnlich wie das *DAPK-1* Gen kann das *PML* Gen über Interferon- $\gamma$  stimuliert werden (Chelbi-Alix et al., 1995). Spezifische Untersuchungen zur möglichen Methylierung seiner Promotorregion liegen nicht vor.

Die vorgestellten Gene eint die Tatsache, daß es sich um p53 abhängige Gene handelt, sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkweise im upstream (*DAKP-1*) oder downstream Bereich (*PML*) des *p53* Gens oder bezüglich ihrer Beteiligung innerhalb der Apoptosekaskade, ob im extrinsischen (*CASP-8*) oder intrinsischen (*APAF-1*) Pathway.

Mittels quantitativer methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion konnte erstmalig für die vorgestellten Gene ermittelt werden, ob und mit welchem prozentualen Anteil in den untersuchten Tumor- oder Normalgewebeproben die Promotorregion im methylierten Zustand vorhanden ist oder nicht. Dadurch konnte neben dem reinen Nachweis von Methylierung (Methylierungsfrequenz) zusätzlich eine Aussage bezüglich des Ausmaß der Promotormethylierung innerhalb der Probe gemacht werden (Methylierungsgrad). Dies erleichtert die Differenzierung zwischen Tumorproben unterschiedlichen Tumorstadiums und ermöglicht so die Unterscheidung unterschiedlicher Stadien und Differenzierungsgrade anhand eines molekularen Markers. Desweiteren erlaubt es anhand klarer Schwellenwerte die Risikostratifizierung der einzelnen Tumorentitäten. Dies gilt für das Blasenkarzinom insofern, als daß – ähnlich der Arbeit von Tada et al.– eine Korrelation zwischen erhöhtem Methylierungsgrad einer Probe und dem Eintreten eines Rezidivs ermittelt werden kann (Tada et al., 2002).

Da das oberflächliche Harnblasenkarzinom durch eine hohe Rezidivquote von 50 bis 70% charakterisiert ist (Haukaas et al., 1999), das Rezidivrisiko derzeit jedoch anhand rein histopathologischer Kriterien eingeschätzt wird, besteht zunehmend der Bedarf mittels molekularer – DNA oder RNA basierter – Marker die Risikostratifizierung zu optimieren, um dem Patienten individuell angepasste Nachsorgeschemata oder adjuvante Therapiestrategien anzubieten. Im Rahmen der nachfolgend vorgestellten Forschungsarbeit (Publikation 1) wurde daher der Zusammenhang zwischen einem hohen Grad an Methylierung eines untersuchten Zielgens sowie dem gehäuften Auftreten eines Rezidivs sowohl im oberflächlichen als auch im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom untersucht.

Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom besteht dringender Bedarf einer optimalen Risikoeinschätzung, da abgesehen von radikal chirurgischen Maßnahmen nur unzureichende systemisch wirksame Therapieschemata existieren, bei einer

Rezidivrate von 20 bis 40% nach stattgehabter Nephrektomie (Lam et al., 2005). Bei der Erstellung eines molekularen Profils mittels Benutzung von sogenannten Tissue Microarrays konnte die Expression von u.a. *PTEN* als unabhängigen Parameter zur Einschätzung des tumorspezifischen Überlebens identifiziert werden (Kim et al., 2005). Methylierungsanalysen nicht-quantitativer Art zeigten eine erhöhte Frequenz an Promotermethylierung für das *RASSF1A* Gen (45%) sowie für *γ-Catenin* (90%) (Dulaimi et al., 2004). Der Nachweis von Methylierung des *γ-Catenin* Gens war in einer Untersuchung von Breault et al. ein unabhängiger prognostischer Parameter für das progressionsfreie Überleben (Breault et al., 2005). In einer weiteren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurde die Bedeutung unterschiedlicher Methylierungsgrade der erwähnten Zielgene im klarzelligem Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit zu progressionsfreiem Leben und Gesamtüberleben untersucht (Publikation 2).

Molekulargenetische Studien von Keimzelltumoren konnten bisher hauptsächlich strukturelle Veränderungen wie Allelverlust auf multiplen Chromosomen oder Amplifikation auf Chromosom 12 nachweisen (Rothe et al., 1999, Rosenberg et al., 1999). Mutationen hingegen wurden bisher nur selten angetroffen, insbesondere das *p53* Gen scheint im Keimzelltumor nur selten mutiert bzw. inaktiviert zu sein. Die selten beobachtete Mutation des *p53* Genes scheint jedoch Einfluß auf die Effektivität cisplatinhaltiger Chemotherapie bei Keimzelltumoren zu haben (Houldsworth et al., 1998). Hinsichtlich epigenetischer Veränderungen sind in dieser Tumorform bisher wenige Tumorsuppressorgene untersucht worden. Häufig scheint das *RASSF1A* Tumorsuppressorgen methyliert zu sein, mit Methylierungsfrequenzen zwischen 40 und 83% im Seminom bzw. Nichtseminom (Honorio et al., 2003). Ebenfalls mit subtypspezifischem Unterschied (Seminom 24%; Nichtseminom 69%) scheint das Reperaturgen *MGMT* im Keimzelltumor methyliert zu sein (Smith-Sorensen et al., 2002). Eine quantitative Analyse zur Untersuchung des Methylierungsgrades bestimmter Zielgene ist bisher im Keimzelltumoren nicht durchgeführt worden, so daß keine Aussagen zur Abhängigkeit des Tumorstadiums bzw. klinischen Stadiums und dem Methylierungsgrad einer Probe gemacht werden konnten. Diese quantitative Untersuchung der bekannten Zielgene führten wir in einer weiteren Arbeit durch, wobei das Ausmaß der beobachteten Methylierung der einzelnen Zielgene mit dem klinischen Tumorstadium (Lugano Klassifikation) korreliert wurde (Publikation 3).

Aufgrund der potentiellen Reversibilität der epigenetischen Veränderung besteht die Möglichkeit mittels verschiedener Agenzien die Konfigurationsänderung der DNA, hervorgerufen durch die 5-Methylcytosinbildung, durch Hemmung der DNA Methyltransferasen aufzuheben. Die Hemmung der Methyltransferasenaktivität erfolgt nach Integration der demethylierenden Agenzien in die DNA im Rahmen der DNA Neusynthese. Das inkorporierte Agens bildet dann mit der Methyltransferase Komplexe, welche die enzymatische Funktion der Transferase blockieren (Bouchard und Momparler, 1983). Zu den am besten charakterisierten Hemmstoffen der Methyltransferasen zählen 5-Azacitidine (Azacitidine) und 5-Aza-2-Deoxycytidine (Decitabine), beide bereits als Medikamente zur Behandlung myelodysplastischer Erkrankungen zugelassen (Dowell und Minna, 2004). Aufgrund der hohen Toxizität sowie der rein intravenösen Applikationsmöglichkeit sind die Anwendungsmöglichkeiten dieser Medikamente beschränkt. Eine kürzlich von Kantarjian et al. publizierte Phase III Studie belegte die Effektivität hinsichtlich der Verlängerung der progressionsfreien Zeit und des Überlebens bei 170 Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (Kantarjian et al., 2006).

Ein deutlich günstigeres Applikationsmuster zeigt das oral verfügbare Cytidinanalogue Zebularine, welches ebenfalls mit der DNA Methyltransferase nach DNA Inkorporation komplexiert und dessen antitumorale Eigenschaften von Cheng et al. erstmals beschrieben wurden (Cheng et al., 2003). Bisher fehlen größere Studien, welche die Effektivität von Zebularine bestätigen, insbesondere die Fähigkeit zur Demethylierung ist 10-mal schwächer als bei 5-Aza-2-Deoxycytidine (Cheng et al., 2004). In einer weiteren Arbeit unsere Gruppe (Publikation 4) konnte die Effektivität der demethylierenden Agenzien 5-Aza-2-Deoxycytidine und Zebularine erstmalig in p53 nicht mutierten und mutierten Zelllinien des Harnblasen- und Nierenzellkarzinoms überprüft werden.

Neben dem Nachweis der Reversibilität der Methylierung spezifischer p53 abhängiger Gene konnte auch gezeigt werden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen Remethylierung und Re-expression der mRNA eines bestimmten Genes besteht. Um zu überprüfen, ob im Tumorgewebe ebenfalls ein Zusammenhang zwischen vermehrter Promotormethylierung und verminderter mRNA Expression besteht, wurden in einer preliminären Studie insgesamt 35 oberflächliche und muskelinvasive Harnblasenkarzinome hinsichtlich ihres Methylierungsgrades im Vergleich zur mRNA

Expression der am häufigsten methylierten Gene *APAF-1* und *DAPK-1* untersucht. Die Expressionswerte wurden zusätzlich mit dem Rezidivverhalten der Tumore verglichen um so einen möglichen Zusammenhang zwischen erniedrigter mRNA Expression und aggressivem Tumorverhalten zu finden (Publikation 5).



## **2. Methodische Grundlagen**

### **2.1 DNA Bisulfitreaktion**

Um methylierte Cytosine innerhalb des DNA Stranges nachweisen zu können, besteht neben der Bisulfitsequenzierung die Möglichkeit der methylierungsspezifischen PCR. Beiden Methoden voran geht der Schritt der DNA Bisulfitierung bei der alle in einer DNA-Sequenz vorhandenen unmethylierten Cytosine mittels Natriumbisulfit zu Uracil konvertiert werden. Für diese Umsetzung wurde ein kommerzielles Kit (Methyl Easy<sup>TM</sup>, Human Genetic Signatures, Australien) verwendet. Im Rahmen der Konvertierung werden zunächst Bisulfitionen an die 5-6 Doppelbindung von Cytosin angelagert, dann nach hydrolytischer Deaminierung ein Uracil-Bisulfit-Derivat gebildet und schließlich die Sulfonylgruppe bei alkalischen Reaktionsbedingungen unter Bildung von Uracil abgespalten. Voraussetzung ist die initiale Denaturierung der untersuchten DNA in Einzelstrang-DNA. Vormalig unmethylierte Cytosine sind am Ende der Reaktion in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosine unverändert geblieben sind. Aufgrund der multiplen Reaktionsschritte sowie der initialen Denaturierungsreaktion kommt es hierbei zu einer massiven Fragmentierung mit Verlust von DNA, so daß die resultierende geringe Menge an DNA für die Quantifizierung im Rahmen der nachfolgenden methylierungsspezifischen PCR gelegentlich problematisch sein kann.

### **2.2 Quantitative Methylierungsspezifische real-time PCR (MSP)**

Neben dem rein qualitativen Nachweis der Methylierung innerhalb einer DNA Probe, welche in der Vergangenheit mittels semiquantitativer methylierungsspezifischer PCR untersucht wurde, ermöglicht die Anwendung der Light-Cycler basierten real-time MSP eine exakte Quantifizierung, d.h. Bestimmung der genauen Zahl der methylierten Zellen in einer Probe. Untersuchungen haben gezeigt, daß mittels quantitativer MSP neben dem einfachen Nachweis methylierter Zellen zusätzliche Unterschiede im prozentualer Anteil der Methylierung einer Probe nachgewiesen werden können (Lo et al., 1999). Da zur Quantifizierung der PCR Reaktion ein Standard notwendig ist, wurde in der Anfangsphase der quantitativen MSP versucht, komplett methylierte DNA mittels der cytosin-spezifischen Methyltransferase SssI (New England Biolabs, USA) zu generieren. Da auch hier die Effektivität der Transferasereaktion sehr variabel war,

gelang erst nach Einführung kommerziell erhältlicher, komplett methylierter DNA (CpGenome™ Universal Methylated DNA, Chemicon, USA) die Quantifizierung der methylierten DNA auf akzeptablem Niveau. Im Gegensatz zur semiquantitativen MSP, welche durch konventionelle Visualisierung unter UV-Licht mittels Ethidiumbromidgelen lediglich einen groben Anhalt bezüglich des Vorhandenseins von Methylierung des Zielgens in der Probe gibt – zudem muß hierbei mit je einem Primerpaar für den unmethylierten und methylierten Zustand gearbeitet werden – kann die quantitative real-time MSP, nach Erstellung einer Eichkurve für das Zielgen, die genaue Anzahl der methylierten Zellen (minimal 10 bis 100 methylierte Zellen/ Probe) angeben. Auch hierbei wird ein Housekeeping Gen zur Relativierung der Kopienzahl benötigt.

Die Auswahl der Primerpaare erfolgt nach ähnlichen Kriterien wie bei der konventionellen PCR. Allerdings ist ein Gehalt von mindestens 1 bis 3 CpG Islands pro Primer notwendig, da das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein von Cytosin das Diskriminationskriterium zwischen methylierter und unmethylierter Zelle ist. Zusätzlich benötigt der zu amplifizierende DNA Abschnitt noch eine geeignete Bindungsstelle für die mit Fluoreszenz markierte Sonde. Weitere technische Details sind in der Arbeit von Lo et al. sowie Jeronimo et al. zu finden (Lo et al., 1999, Jeronimo et al., 2001): z.B. dürfen die Primerbindungsstellen des Housekeeping Gens keine CpG Islands enthalten. In unseren Arbeiten wurde das MyoD Gen als Housekeeping Gen verwendet (Jeronimo et al., 2001). Nach entsprechenden Vorversuchen wurde diese Methode bei allen untersuchten Zielgenen angewandt und ist in den einzelnen Publikationen hinsichtlich der PCR Konditionen und Primersequenzen genannt (Publikationen 1 bis 5).

Zur Vergleichbarkeit des Methylierungsgrades der einzelnen Proben wurde nach Ermittlung der Kopienzahlen der „normalized index of methylation“ (NIM) berechnet.

Der NIM berechnet sich wie folgt:

$$\text{(Kopienzahl des Zielgens/ Kopienzahl des Housekeeping Gens) x 100}$$

Kopienzahl d. Zielgens:

Anzahl methylierter Zellen

Kopienzahl d. Housekeeping Gens:

Gesamtzahl der Zellen

Der NIM gibt somit den prozentualen Anteil der Zellen einer Probe an, in welchen das Zielgen im methylierten Zustand vorliegt. Dieser wird nachfolgend als Methylierungsgrad bezeichnet werden.

### 2.3 Quantitative real-time RT-PCR

Zur Expressionsanalyse auf mRNA Ebene wurde eine quantitative Echtzeit (real-time) RT-PCR der beiden Gene, deren Promotorregion am häufigsten im methylierten Zustand vorlagen (APAF-1, DAPK-1) etabliert. Nach Durchführung einer qualitativen RT-PCR zur Optimierung der PCR Bedingungen und Wahl der idealen Primerpaare erfolgte die Generierung eines cDNA Standards. Bei dann optimierter Standardkurve konnte eine maximale Sensitivität von 1000 Kopien APAF-1 und DAPK-1 mRNA bestimmt werden.

In einer weiteren PCR Reaktion wurde zusätzlich die mRNA Kopienzahl des Housekeeping Gens Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) bestimmt (Light Cycler h-PBGD Housekeeping Gene Set, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und mithilfe einer kommerziell erhältlichen Software (Roche Diagnostics, Deutschland) der relative mRNA Expressionsgrad der Zielgene APAF-1 und DAPK-1. Als Fluoreszenzsonden wurden, im Gegensatz zur MSP, Hybridisierungssonden gemäß des Fluoreszenz Protokolls der LightCycler-Technologie verwendet. Weitere Daten hinsichtlich der Primersequenzen und Sequenzen der Hybridisierungssonden für APAF-1 und DAPK-1 mRNA sind den Publikation 4 und 5 zu entnehmen.

## 2.4 Zellkulturexperimente mit demethylierenden Substanzen

Für die *in vitro* Untersuchungen an Blasen- und Nierenzellkarzinomzelllinien wurden folgende Zelllinien verwendet:

Blase: RT4, T24

Niere: A498, ClearCa-5

Bei den Zelllinien RT4 und A498 handelt es sich um Zelllinien, bei denen das Tumorsuppressorgen *p53* im nicht-mutierten Zustand vorliegt, während bei den Zelllinien T24 und ClearCa-5 *p53* mutiert ist (Exon 5 und 8). Im Rahmen von Vorversuchen wurde zunächst die optimale Konzentration der zu applizierenden demethylierenden Agenzien 5-Aza-2-Deoxycytidine und Zebularine gefunden. Die Applikationsschemata entsprechen denen bereits publizierter Vorgaben (Cheng et al., 2003). Aufgrund der hohen Toxizität und Instabilität in wässrigen Lösungen wurde 5-Aza-2-Deoxycytidine am 1. und 2. Tag nach Zellaussaat zugegeben. Zebularine erfordert eine kontinuierliche Gabe, bei längerer Halbwertszeit waren die Applikationen am 1. und 3. Tag nach Zellaussaat. Die Zellernte und Zellzahlbestimmung erfolgte nach 72, 120 und 168 Stunden. Die DNA und RNA Isolation zur Bestimmung des Methylierungsgrades sowie der mRNA Expression der Zielgene APAF-1 und DAPK-1 geschah im Rahmen der Zellernte nach 168 Stunden, da nach dieser Zeit der größte demethylierende Effekt nebst transkriptioneller Aktivierung mit mRNA Re-expression zu erwarten ist (Cheng et al., 2003, Cheng et al., 2004). Die Effizienz der Wachstumshemmung durch die demethylierenden Substanzen wurde nach Umrechnung mit Einbeziehung der Zellverdopplungszeit bestimmt. Genauere Details zu Versuchsablauf und Berechnung der Zellverdopplungsrate sind Publikation 4 zu entnehmen.

### 3. Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 3.1 Methylierungsmuster und prognostische Relevanz spezifischer Tumorsuppressorgene im Urothelkarzinom der Harnblase

Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M.

Regularly methylated novel pro-apoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder.

International Journal of Cancer 2006; 119: 1369-02.

Nicht-quantitative Untersuchungen der Methylierung haben bisher die Methylierungsfrequenz als Vorliegen von methylierten Proben innerhalb der Gesamtzahl der untersuchten Proben beschrieben. Die Methylierungsfrequenz wurde auch in der von uns nachfolgend beschriebenen Studie angegeben. Insgesamt wurden 110 Patienten mit einem diagnostizierten Urothelkarzinom der Harnblase untersucht, davon 66 Patienten mit oberflächlichem pTa und pT1 sowie 40 Patienten mit muskelinvasivem  $\geq$ pT2 Tumor (Sobin und Wittekind, TNM Klassifikation 1997). Ebenfalls wurden 20 Gewebeproben von normaler Harnblasenschleimhaut untersucht um mögliche Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen Tumor- und Normalgewebe zu erkennen.

Methylierung des *APAF-1* Promotors zeigte sich in allen untersuchten Tumorproben, sowohl in den oberflächlichen als auch in den muskelinvasiven Tumoren, entsprechend einer Methylierungsfrequenz von 100%. Der *DAPK-1* Promotor fand sich methyliert in 86% der oberflächlichen und in 55% der muskelinvasiven Tumore. *IGFBP-3* war methyliert in 86% der oberflächlichen und 36% der muskelinvasiven Tumore. Der *CASP-8* Promotor zeigt sich nur selten methyliert, nämlich in 3% der oberflächlichen und 4.5% der muskelinvasiven Tumore. Der *PML* Promotor fand sich in keiner der Proben methyliert. Demgegenüber lag die Methylierungsfrequenz in den untersuchten Normalgewebeproben bei 15% (*APAF-1*), 0% (*CASP-8*), 20% (*DAPK-1*), 10% (*IGFBP-3*) und 0% (*PML*).

Da die Quantifizierung der Methylierung durch Verwendung des NIM die genaue Anzahl der methylierten Zellen innerhalb der untersuchten Probe zeigt, wurden im nächsten Schritt die medianen NIM Werte für die einzelnen Tumorgruppen, unterteilt nach Tumorstadium und Differenzierungsgrad, bestimmt. Es zeigten sich aufsteigend die niedrigsten NIM Werte für den *APAF-1* Promotor in oberflächlichen Tumoren

(Median 22.2%) und der höchste NIM Wert in den muskelinvasiven Tumoren (Median 96%). Auch hinsichtlich der Differenzierungsgrade war der NIM Wert bei den oberflächlichen, gut differenzierten Tumoren (G1/2) deutlich niedriger (44%) als bei den schlecht differenzierten (G3) Tumoren (65.8%).

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der ermittelte mediane Methylierungsgrad mit prognostischen Parametern, wie z.B. dem rezidivfreien Überleben im Zusammenhang stehen. Bei den oberflächlichen Tumoren war das Zielereignis das Auftreten eines Lokalrezidivs, während bei den muskelinvasiven Tumoren das Auftreten eines Lokalrezidivs bzw. das Auftreten von Fernmetastasen interessierte. Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum in der Gruppe der oberflächlichen Tumore lag bei 55 Monaten und bei 50 Monaten in der Gruppe der muskelinvasiven Tumore.

Innerhalb der einzelnen Tumorstadien zeigte sich bei Betrachtung der *IGFBP-3* Promotormethylierung eine starke Korrelation zwischen dem Eintreten eines Tumorrezidivs und höheren NIM Werten, sowohl in oberflächlichen als auch in muskelinvasiven Tumoren. Eine klare Unterscheidung gelang auch in den oberflächlichen Tumoren bei Vergleich der NIM Werte für die *APAF-1* Methylierung. Bei Betrachtung des NIM Wertes für das *DAPK-1* Gen zeigte sich lediglich in der Gruppe der pTa Tumore, ein Unterschied zwischen hohem NIM Wert und Vorliegen eines Lokalrezidivs.

Basierend auf diesen Daten wurde, sowohl durch Festlegung des mittleren Methylierungsgrades (Mittelwert) als auch nach Receiver-Operating-Curve (ROC) Analyse der einzelnen Zielgene, ein zielgen-spezifischer Schwellenwert für die nachfolgende Kaplan-Meier Analyse ermittelt. Es zeigte sich, daß der *APAF-1* und *IGFBP-3* NIM Methylierungsgrad in der Lage ist, Patienten mit höherem Risiko eines Lokalrezidives oder einer systemischen Metastasierung zu identifizieren. In einer multivariaten Analyse zeigte sich der mediane *APAF-1* und *IGFBP-3*, nicht jedoch *DAPK-1* NIM Wert als unabhängiger prognostische Parameter im Hinblick auf ein Tumorrezidiv im oberflächlichen Urothelkarzinom der Harnblase.

### 3.2 Methylierungsmuster und prognostische Relevanz spezifischer Tumorsuppressorgene im Nierenzellkarzinom

Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Köllermann J, Miller K, Schrader M.

Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications.

Clinical Cancer Research 2006; 12: 5040-46.

In der folgenden Arbeit wurde sowohl die Methylierungsfrequenz als auch der Grad an Methylierung innerhalb der einzelnen Probe (NIM) ermittelt. Nachfolgend wurden die NIM Werte stadienspezifisch in Abhängigkeit zu den Ereignissen Tumorrezidiv und Gesamtüberleben evaluiert. Insgesamt wurden 90 Proben untersucht. Vom untersuchten Patientenkollektiv entsprachen 44 (48%) pT1 Tumoren, 22 (24%) pT2 Tumoren und 24 (26%) pT3 Tumoren (Sobin und Wittekind, TNM Klassifikation 1997). Hinsichtlich der Methylierungsfrequenz zeigten sich für den *APAF-1* Promotor je nach Stadium 93 bis 100% aller Proben in einem methylierten Zustand. Der *DAPK-1* Promotor war in 57 bis 71% aller Fälle methyliert. Die Promotoren der Gene *IGFBP-3* und *PML* waren nur in 3% der untersuchten Proben methyliert, der *CASP-8* und *PML* Promotor fand sich in keiner der Proben methyliert. In den ebenfalls untersuchten 20 tumorfreien Gewebeproben fand sich in 3 Proben der *APAF-1* Promotor und in 4 Proben der *DAPK-1* Promotor methyliert.

Die Quantifizierung der methylierten Proben beinhaltete die Zielgene *APAF-1* und *DAPK-1*, da die übrigen Zielgene zu selten Methylierung zeigten. Während für die *APAF-1* Promotormethylierung ein Trend der medianen NIM Werte von 36% in pT1 G1/2 Tumore bis hin zu 66% in pT3 G3 Tumoren zu erkennen war, waren die medianen NIM Werte für *DAPK-1* sehr heterogen. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte nur beim Vergleich des *APAF-1* NIM Wertes der pT2 und pT3 Tumoren festgestellt werden. Der Differenzierungsgrad der Tumore spiegelte sich nicht in signifikant unterschiedlichen NIM Werten des *APAF-1* Genes wieder. Allerdings lag der mediane NIM für *DAPK-1* der untersuchten pT3 G1/2 Tumoren bei 0%, während er in den pT3 G3 Tumoren bei 14% lag.

Da sich die Tumorstadien kaum in den beobachteten NIM Werten differenzieren ließen, wurde als weiteres Kriterium die Tumorgroße (4 cm) sowie der Lymphknotenstatus herangezogen. Ebenfalls wurde eine Altersabhängigkeit überprüft, da der Methylierungsgrad für bestimmte Gene im Alter zunimmt (Wojdacz und

Hansen, 2006). Eine deutliche Korrelation zeigte sich zwischen Tumorgröße und den medianen NIM Werten für den *APAF-1* Promotor. Die NIM Werte des *DAPK-1* Promotors zeigten keine Korrelation mit den oben genannten Kriterien.

Um die Frage nach einer möglichen Assoziation zwischen Methylierungsgrad und klinischem Verlauf zu beantworten, wurde der mittlere NIM Wert und der NIM Wert mit der höchsten Trennschärfe nach ROC Analyse als Schwellenwert für die *APAF-1* und *DAPK-1* Methylierung verwendet. Für *APAF-1* ergab sich ein mittlerer NIM von 51% bzw. 56% nach ROC Analyse und für *DAPK-1* ein Wert von 2 bzw. 10%. Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum der 90 Patienten betrug 55 Monate. Die im Anschluß durchgeführte Kaplan-Meier Analyse der Ereignisse tumorfreies Überleben und Gesamtüberleben ergab für beide Zielgene hochsignifikante Korrelationen. Die gewählten NIM Werte waren in der Lage, Patienten mit hohem Rezidivrisiko sowie kürzerem Überleben von der Gruppe mit günstigerem klinischen Verlauf zu unterscheiden. Es zeigten sich bei 6 von 52 Patienten (11%) mit einem *APAF-1* NIM Wert unter 56% ein Tumorrezidiv, während 21 von 38 Patienten (55%) mit einem *APAF-1* NIM Wert über 56% ein Tumorrezidiv hatten. Wurde der *DAPK-1* NIM Wert von 10% als Grenzwert verwendet, zeigte sich bei 10 von 59 Patienten (16%) in der Gruppe mit niedrigerem *DAPK-1* NIM Wert ein Tumorrezidiv, gegenüber 17 von 31 (55%) Patienten mit einem medianen *DAPK-1* NIM Wert über 10%. In der Subgruppenanalyse der Patienten mit negativen Lymphknoten zeigte sich ebenfalls in der Gruppe mit niedrigerem NIM Wert eine statistisch signifikant höhere Zahl rezidivfreier Patienten.

Eine multivariate Analyse, welche Tumorstadium, Tumorgrad, Tumorgröße und die NIM Grenzwerte von *APAF-1* und *DAPK-1* beinhaltete, bestätigte die beiden Zielgene als unabhängige prognostische Parameter hinsichtlich des Eintretens eines Tumorrezidivs.



### 3.3 Methylierungsmuster spezifischer Tumorsuppressorgene in Keimzelltumoren

Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M.

Frequent epigenetic inactivation of p53 target genes in seminomatous and nonseminomatous germ cell tumors.

Cancer Letters 2007; 247: 137-42. [Epub 2006 May 11]

Zur Methylierungsanalyse aus Hodengewebe wurden 46 primäre Keimzelltumore untersucht, bestehend aus 26 seminomatösen und 20 nicht-seminomatösen Keimzelltumoren. Von den untersuchten Tumoren entsprachen 22 einem klinischen Stadium I und 20 einen Stadium II (nach Lugano Klassifikation, Cavalli et al., 1980). Zusätzlich wurden noch 15 normale Hodengewebsproben hinsichtlich ihres Methylierungsgrades untersucht.

Die Untersuchungen zur Methylierung der Zielgene *APAF-1*, *CASP-8*, *DAPK-1*, *IGFBP-3* und *PML* ergaben für das *APAF-1* Gen eine 100% Methylierungsfrequenz, d.h. alle untersuchten Tumorproben fanden sich im *APAF-1* Promotor methyliert. Allerdings zeigten 60% der normalen, nicht-malignen Gewebeproben eine Methylierung des *APAF-1* Promotors. Der *DAPK-1* Promotor zeigte sich in 50% aller Seminomproben und 20% aller Nichtseminomproben methyliert. Im Normalgewebe waren nur 6% aller Proben im *DAPK-1* Promotorbereich methyliert. Die Zielgene *CASP-8* und *IGFBP-3* zeigten sich deutlich seltener methyliert, 6% der Proben in der *CASP-8* Promotorregion und 11% der Proben in der *IGFBP-3* Promotorregion. Das *PML* Gen fand sich in keiner Probe methyliert. Für die drei letztgenannten Gene zeigte sich ebenfalls keine Methylierung im Normalgewebe.

Bei der Quantifizierungsanalyse der methylierten Proben zeigte sich, daß zwar 60% der Normalgewebe eine Methylierung im *APAF-1* Promotorbereich aufwiesen, der Anteil der methylierten Zellen innerhalb einer Normalgewebeprobe allerdings im Mittel bei 21% lag, während der Anteil an methylierten Zellen innerhalb einer Tumorprobe, zunächst unabhängig ob Seminom oder Nichtseminom, bei über 100% lag (NIM Werte >100% entstehen z.B. bei Vorliegen von Aneuploidien oder Genamplifikationen innerhalb der untersuchten Gensequenz). Ähnliche Unterschiede zeigten sich bei der *DAPK-1* Promotormethylierung, mit einem medianen NIM der Tumorproben von 52% im Seminom und 16% im Nichtseminom, während im Normalgewebe der mediane NIM 0% betrug. Anhand der NIM Werte für die einzelnen Zielgene war es möglich, die

einzelnen Tumorgruppen untereinander zu unterscheiden, oder die Tumorgruppe von der Normalgewebsgruppe zu trennen. Eine signifikante Korrelation zeigte sich zwischen medianem *APAF-1* NIM Wert der Tumorgruppe (105%) und der Normalgewebsgruppe (29.6%). Dies zeigte sich auch in den medianen NIM Werten der *DAPK-1* Promotormethylierung mit 36.8% (Tumorgruppe) versus 1.1% (Normalgewebe). Die medianen NIM Werte von *DAPK-1* erlaubten ebenfalls eine Unterscheidung zwischen Seminom (52.6%) und Nichtseminom (16.3%).

Ein Vergleich der subgruppenspezifischen medianen NIM Werte mit dem klinischen Verlauf, wie in der vorangegangenen Arbeiten beschrieben, erschien in Anbetracht der geringeren Probenanzahl nicht angebracht. Dennoch wurde anhand der klinischen Stadien zur Einteilung der Hodentumore überprüft, ob fortgeschrittenere, d.h. metastasierte Tumoren möglicherweise einen höheren Grad an Methylierung aufweisen. Die Gruppe der Tumore im klinischen Stadium  $\geq$ II zeigten signifikant höhere (75.9%) NIM Werte des *DAPK-1* Promotors als im lokal begrenzten (35.5%) Stadium I. Bei nicht-seminomatösen Tumoren war diese Unterscheidung ebenfalls möglich. Allerdings lag hier der mediane NIM Wert von *DAPK-1* in der Gruppe der CS I Tumore bei 0%, gegenüber 29.7% in der Gruppe der CS  $\geq$ II Tumore.

### 3.4 Wachstumsinhibierende Effekte demethylierender Substanzen im Urothel- und Nierenzellkarzinom

Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Köllermann J, Krause H, Miller K, Schrader M.

Methylation of tumor suppressor genes *APAF-1* and *DAPK-1* and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer.

British Journal of Cancer 2006 ; 95: 1701-07.

Zunächst wurden in 80 Patientenproben mit Urothelkarzinom oder klarzelligem Nierenzellkarzinom die Methylierungsfrequenz und der Methylierungsgrad der Gene *APAF-1* und *DAPK-1* ermittelt, um mögliche Unterschiede im Methylierungsmuster beider Gene in diesen unterschiedlichen Tumorentitäten zu detektieren. In beiden Tumorarten war die Methylierungsfrequenz beider Gene nahezu identisch. Bei Betrachtung des Methylierungsgrades zeigte sich in den lokal wenig fortgeschrittenen Urothelkarzinomen ein Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Methylierungsgrad. Dieser Zusammenhang war beim Nierenzellkarzinom nicht zu finden. Trotz ähnlichem Methylierungsmuster bei Evaluation der Methylierungsfrequenz zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Tumorarten bei Evaluation des Methylierungsgrades.

Demethylierende Substanzen sind in der Lage durch Hemmung der DNA Methyltransferasen die Methylierung der DNA zu verhindern. Durch ein Fehlen der Methylierung können somit epigenetisch in ihrer Expression blockierte Gene erneut reaktiviert werden und nach Transkription durch RNA Polymerasen erneut ihre mRNA bilden. Da in den von uns durchgeführten Untersuchungen überwiegend die Gene *APAF-1* und *DAPK-1* methyliert waren, richtete sich das Hauptaugenmerk auf die Re-expression dieser Gene nach Exposition mit den demethylierenden Substanzen 5-Aza-2-Deoxycytidine und Zebularine. Als Unterscheidungskriterium der einzelnen Zelllinien diente der *p53* Status. In den Zelllinien RT4 (Blase) und A498 (Niere) liegt das *p53* Gen im nicht mutierten Zustand vor. In den Zelllinien T24 (Blase) und ClearCa-5 (Niere) zeigen sich Mutationen der Exone 5 oder 8.

Die Messung der Wachstumsinhibition erfolgte über Berechnung der Zellverdopplungszeit, nachdem die Zellmengen an den Erntetagen, d.h. nach 72h, 120h, 168h bestimmt waren. Die Vergleichszelllinie wurde mit PBS behandelt.

Die Behandlung mit 5-Aza-2-Deoxycytidine beeinflusste nachweislich den Methylierungsgrad spezifischer Zielgene. Da das *APAF-1* Gen in allen untersuchten

Zelllinien in einem methylierten Zustand vorhanden war, wurde die Abnahme des Methylierungsgrades als Effekt der demethylierenden Substanz interpretiert. So erniedrigte sich der *APAF-1* Methylierungsgrad nach 5-Aza-2-Deoxycytidine (Zebularine) Gabe in RT4 von 144 auf 43% (73%) und von 138 auf 38% (37%) in der T24 Zelllinie. In den Nierenzellkarzinomzelllinien verminderte sich der Gehalt an methylierten Zellen des *APAF-1* Gens von 178 auf 45% (39%) in A498 und von 149 auf 37% (31%) in der ClearCa-5 Zelllinie nach Gabe von 5-Aza-2-Deoxycytidine bzw. Zebularine. Das *DAPK-1* Gen wurde interessanterweise in keiner der untersuchten Zelllinien als methyliert gefunden.

Unter Behandlung mit 5-Aza-2-Deoxycytidine zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung der Blasenkarzinomzelllinien bereits nach 120h. Diese Inhibition war in der *p53* mutierten Zelllinie T24 noch stärker ausgeprägt als in der wildtyp *p53* Zelllinie RT4. Unter Zebularine zeigte sich in der RT4 Zelllinie kein feststellbarer Effekt. In den Nierenzellkarzinomzelllinien zeigte sich, daß beide Medikamente in der Lage waren, das Wachstum sowohl von A498 als auch von ClearCa-5 effektiv zu inhibieren. Ähnlich wie bei den Blasenkarzinomzelllinien scheint jedoch die Wachstumshemmung in den fortgeschritteneren, d.h. *p53* Gen mutierten Tumorstadien wirksamer zu sein als in den Wildtyp Zelllinien.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die beobachtete Wachstumshemmung mit einer Re-expression der mRNA einhergeht. Es zeigten sich Unterschiede im Expressionsmuster in Abhängigkeit der gewählten demethylierenden Substanz und in Abhängigkeit sowohl des Zelltyps als auch des *p53* Genstatus.

### 3.5 Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad und der mRNA Expression spezifischer Gene im Urothelkarzinom der Harnblase

Christoph F, Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, Krause H, Schostak M, Schrader M, Miller K.

A gene expression profile of tumor suppressor genes commonly methylated in bladder cancer.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2007; 133: 343-09.

[Epub 2006 Dec 8]

Die Methylierung innerhalb der Promotorregion eines Genes führt nicht unbedingt zur Deaktivierung des betroffenen Genes. In der nachfolgend vorgestellten Arbeit wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad innerhalb einer Probe und der dazu korrespondierenden mRNA Expressionshöhe besteht. Es wurde weiterhin nach einem Zusammenhang zwischen erniedrigter mRNA Expression spezifischer, methylierter Tumorsuppressorgene und aggressivem Rezidivverhalten gesucht.

Zur untersuchten Patientengruppe gehörten 19 Patienten mit oberflächlichem und 15 Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase. Die Expression der mRNA war sowohl in dem untersuchten Tumorgewebe als auch Normalgewebe vorhanden (gemessen in relativen Genexpressionseinheiten, RGE). Hier zeigt sich ein Trend der erniedrigten Expression des *APAF-1* Gens im Tumorgewebe (5.2 versus 9.9 RGE) im Vergleich zu Normalgewebe. Die *DAPK-1* mRNA Expressionwerte unterschieden sich in den beiden Gruppen kaum (11.3 versus 15.3 RGE), eine signifikante Korrelation war nicht erkennbar. Eine stadien- oder gradabhängige mRNA Expression beider Gene war ebenfalls nicht nachweisbar.

Bei der Aufteilung der Tumorgruppen in Patienten mit Tumorrezidiv bzw. Rezidivfreiheit konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen mRNA Expressionshöhe von *APAF-1* und *DAPK-1* und dem Rezidivverhalten gefunden werden, unabhängig ob zugehörig zur Gruppe der oberflächlichen oder der muskelinvasiven Tumore. So zeigte sich z.B. in der Gruppe oberflächlicher Tumore eine mediane *APAF-1* mRNA Expression von 4.6 RGE in der Gruppe der nichtrezidierten Tumore gegenüber 4.8 RGE in der Gruppe der rezidierten Tumore. In der Gruppe der muskelinvasiven Tumore zeigte sich eine mediane mRNA Expression des *APAF-1* Gens von 7.2 RGE bei nicht rezidierten und 5.7 RGE bei rezidierten Tumoren.

Im paarweisen Vergleich zwischen dem mRNA Expressionsgrad und dem Methylierungsgrad der entsprechenden Probe konnte zunächst bei Betrachtung ohne Stadien- oder Gradspezifizierung keine signifikante Korrelation zwischen erhöhtem Methylierungsgrad und erniedrigter mRNA Expression gefunden werden. Nach Unterteilung in oberflächliche und muskelinvasive Tumore zeigte sich jedoch eine starke Korrelation zwischen erniedrigter mRNA Expression und erhöhtem Methylierungsgrad in der Gruppe der oberflächlichen Tumore für das *APAF-1* Gen, nicht jedoch für das *DAPK-1* Gen. Dieser Zusammenhang bestand in muskelinvasiven Tumoren nicht mehr.

## 4. Diskussion

Tumorzellen zeigen häufig epigenetische Veränderungen durch Methylierung der Promotorregion spezifischer Gene, welche durch diese Veränderung inaktiviert werden können. Betrifft diese Inaktivierung notwendige, den Zellzyklus regulierende Gene, so kann es dadurch in der Folge zur unkontrollierten Zellvermehrung kommen. Tumorsuppressorgenen und deren Regulation durch epigenetische Veränderungen kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

Da eines der Schlüsselgene der Zellzyklusregulation - das p53 Gen - nicht epigenetisch verändert zu sein scheint, ein p53 Effektorgen p21 jedoch in einer Vielzahl von Tumoren methyliert vorgefunden wird (Dominguez et al., 2003), waren weitere Zielgene des p53 Gens, als Mediatoren der Apoptose, Gegenstand der Methylierungsanalyse der hier vorgestellten Studien.

### 4.1 Bedeutung der Methylierung des apoptotic-protein-activating factors-1 und des death-associated proteins-1 in urogenitalen Tumoren

Das *APAF-1* Gen und dessen Methylierung in humanen Tumoren ist bisher im malignen Melanom und in verschiedenen Leukämieformen beschrieben worden (Soengas et al. 2001, Fu et al. 2003). Die bisherigen Methylierungsanalysen dieses Gens fanden über semiquantitative Methoden statt, bei denen zwar das Vorhandensein von Methylierung in der untersuchten Promotorregion des *APAF-1* Gens untersucht werden konnte, eine genaue Quantifizierung jedoch fehlte. Unsere Untersuchungen zeigen erstmalig quantitative Methylierungsanalysen des *APAF-1* Gens. Dabei war es möglich, im Harnblasenkarzinom eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium als auch dem Tumorgrad und dem Ausmaß der Methylierung des *APAF-1* Gens festzustellen. Weiter fortgeschrittenere, z.B. muskelinvasive Tumore weisen einen höheren Methylierungsgrad als weniger weit fortgeschrittene Tumore auf. Dieser Zusammenhang zwischen fortgeschrittener Tumorerkrankung und Methylierungsgrad konnte ebenfalls beim Nierenzellkarzinom festgestellt werden. Zwar zeigte sich keine streng stadienabhängige Korrelation, jedoch bestand ein Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad und Tumorgröße. Im Hodenkarzinom schien zunächst kein Zusammenhang zwischen den einzelnen Tumorstadien und dem Grad der *APAF-1* Methylierung zu bestehen. Auffallend war hier ein häufiges

Vorkommen (60%) von methylierten Zellen in normalem Hodengewebe bei jedoch niedrigem Methylierungsgrad im Vergleich zu Tumorgewebe (21% vs. 105%).

Da die grundlegende Funktion des *APAF-1* Gens die Aktivierung spezifischer Caspasen und schließlich Einleitung der Apoptose über den intrinschen Pathway ist (Srinivasula et al., 1998), könnte eine Inaktivierung dieses Gens durch die Promotormethylierung verhindern, daß die betroffene Zelle die Apoptose einleitet. In der Folge kommt es in diese Zellen zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Die davon betroffenen Zellen können sich durch den entstandenen Selektionsvorteil etablieren. Daß Zellen mit hohem *APAF-1* Methylierungsgrad ein aggressiveres Wachstumsverhalten besitzen, zeigen unsere Daten zum Nieren- und Harnblasenkarzinom. Es bleibt noch eine Vermutung, ob die in Publikation 4 beobachtete Re-expression von *APAF-1* mRNA nach erfolgreicher Demethylierung tatsächlich auf die Reaktivierung des methylierten *APAF-1* Promotors zurückzuführen ist. Weiterführende Transfektionsexperimente mit Teilkonstrukten des *APAF-1* Promotors und anschließender *APAF-1* mRNA- oder Proteindetektion stehen noch aus. Der Zusammenhang zwischen Demethylierung des *APAF-1* Promotors mit konsekutiver mRNA Re-expression ist bisher durch in vitro Studien beim malignen Melanom und in Leukämiezelllinien gezeigt worden (Soengas et al., 2001, Jia et al., 2001). Die Bestätigung durch ähnliche Experimente in Zelllinien anderer Tumorentitäten würden der Inaktivierung des *APAF-1* Gens und dessen Reaktivierung eine bedeutende Rolle in der Tumorentstehung zuschreiben, da es im aktiven Zustand die intrinsische Apoptosekaskade einleitet (Furukawa et al., 2005). Neben einem höheren Progressionsrisiko der *APAF-1* methylierten Tumoren könnten diese Tumoren zusätzlich noch eine höhere Resistenz gegenüber Chemo- oder Immuntherapeutika besitzen, da eben die Apoptose nicht effizient eingeleitet werden kann. In Melanomzelllinien konnte gezeigt werden, daß *APAF-1* methylierte Zelllinien resistent gegenüber Substanzen waren, welche normalerweise zur Einleitung der Apoptose führten. Die *APAF-1* Genreaktivierung nach Gabe von 5-Aza-2-Deoxycytidine gab den Zellen die Fähigkeit zur Apoptoseeinleitung zurück (Fu et al., 2003). Nicht alle Karzinomzellen zeigen jedoch dieses Methylierungsmuster. In der Harnblasenkarzinomzelllinie J82 konnte beispielsweise keine *APAF-1* Gen Methylierung gefunden werden, dennoch zeigte sich hier eine niedrige Proteinexpression, so daß in diesem Falle über einen posttranskriptionellen



Regulationsmechanismus spekuliert werden kann (Fu et al., 2003). Eine artifizielle Überexpression von *APAF-1* mRNA kann wiederum Apoptose einleiten, wie von Perkins et al. durch Transfektionsexperimente in myeloischen Leukämiezellen gezeigt (Perkins et al., 1998).

Während der Einfluß einer epigenetischen Veränderung des *APAF-1* Gens auf einen ungünstigeren Krankheitsverlauf im Harnblasenkarzinom und Nierenzellkarzinom durch unsere Untersuchungen aufgezeigt werden konnte, gibt es derzeit noch keine Daten, welche ein Versagen üblicher Therapieschemata im Blasen- oder Nierenzellkarzinom bei vorhandener *APAF-1* Methylierung zeigen.

Eine ebenfalls wichtige, jedoch noch völlig ungeklärte Funktion kommt dem *APAF-1* Gen in Keimzelltumoren zu. Die in Publikation 3 dargestellten Ergebnisse widerspiegeln die ersten veröffentlichten Untersuchungen zur Methylierung dieses Gens in Keimzelltumoren. Auch hier zeigte sich eine ubiquitäre Methylierung in allen Tumorproben. Methylierung zeigte sich allerdings – wenn auch auf signifikant niedrigerem Niveau – in Normalgewebe. Dies bestätigt, daß die Methylierung von Genen physiologischerweise im Rahmen einer passageren Aktivierung oder Inaktivierung von bestimmten Genen geschieht. Davon betroffene Zellen sind typischerweise Gene des inaktivierten X Chromosoms bei Frauen und keimzellspezifische Gene (Paz et al., 2002). Unter letztgenanntem Gesichtspunkt scheint es nicht verwunderlich, daß einzig im Normalgewebe des Hodens diese hohe Rate an *APAF-1* methylierten Proben zu finden war. Auf der anderen Seite war der Grad an *APAF-1* Methylierung im Tumorgewebe deutlich höher als im Normalgewebe und ermöglichte eine eindeutige Unterscheidung der Dignität der Probe anhand des Methylierungsgrades. Interessant wäre die Evaluation prämaligener Zellen des Hodens um auf dem Boden des Methylierungsgrades möglicherweise das Risiko der malignen Entartung abschätzen zu können.

Eine quantitative Analyse der Methylierung des *DAPK-1* Gens von Friedrich et al. hatte keinen Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad und Tumorstadium oder – grad im Harnblasenkarzinom zeigen können (Friedrich et al., 2004). Demgegenüber konnte Tada et al. in einer semiquantitativen Methylierungsuntersuchung in univariater Analyse eine Korrelation zwischen *DAPK-1* Methylierung und Auftreten eines Tumorrezidives im oberflächlichen Blasenkarzinom zeigen (Tada et al., 2002).

Letztgenanntes Ergebnis konnte durch unsere quantitativen Untersuchungen im Harnblasenkarzinom nicht bestätigt werden.

Im Nierenzellkarzinom zeigte sich der *DAPK-1* Methylierungsgrad hingegen als unabhängiger Parameter zur prognostischen Einschätzung eines Tumorrezidives. Patienten mit hohem *DAPK-1* Methylierungsgrad hatten ein deutlich erhöhtes Risiko ein Tumorrezidiv zu erleiden. In seminomatösen und nicht-seminomatösen Keimzelltumoren konnte der *DAPK-1* Methylierungsgrad Tumoren im nicht-metastasierten Stadium I von Stadium II Tumoren (nach Lugano Klassifikation) unterscheiden.

Die Inaktivierung von *DAPK-1* hat, wie von verschiedenen Gruppen gezeigt, eine deutliche Funktionsminderung des *p53* Gens und anschließender Einleitung der Apoptose zur Folge (Deiss et al., 1995, Raveh et al., 2001). Im Mausmodell des kleinzelligen Lungenkarzinoms bewirkte die Re-expression von *DAPK-1* eine Erniedrigung der Metastasierungsrate (Inbal et al., 1997). Die Inaktivierung der *DAPK-1* mRNA Expression durch Promotormethylierung könnte somit eine Metastasierung begünstigen. Der beobachtete erhöhte Methylierungsgrad bei den metastasierten Tumoren der Niere und des Hodens könnte jedoch auch nur ein Epiphänomen sein, funktionelle Untersuchungen zur Klärung des Zusammenhangs zwischen epigenetischer Inaktivierung und Metastasierungsrisiko in Nierenzell- oder Keimzelltumoren fehlen derzeit. Auch bleibt zu klären, ob Patienten mit erhöhtem *DAPK-1* Gen Methylierungsgrad schlechter auf eine Immunchemotherapie ansprechen, da in vitro Studien gezeigt haben, daß die *DAPK-1* Inaktivierung Zellen vor einer IFN- $\gamma$  induzierten Apoptose schützt (Deiss et al., 1995). Eine neuere Studie von Wethkamp et al. gab Anlaß zur Vermutung, daß die Regulation des *DAPK-1* Gens im Nierenzellkarzinom möglicherweise noch zusätzlichen, post-translationellen Mechanismen unterliegt. In Enzymaktivitätsmessungen des Dapk-1 Proteins war trotz ausreichender mRNA und Protein Expression die Enzymaktivität des Dapk-1 Proteins deutlich erniedrigt (Wethkamp et al., 2006).

#### **4.2 Bedeutung der Methylierung des insulin-like-growth factors binding proteins-3, der Caspase-8 und des *PML* Gens in urogenitalen Tumoren**

In den von uns untersuchten Tumorgruppen zeigten lediglich die Tumorproben des Harnblasenkarzinoms eine relevante Anzahl von Methylierung im *IGFBP-3* Promotor.

Während in dieser Gruppe 66% der Proben eine *IGFBP-3* Methylierung zeigten, waren die Methylierungsfrequenzen in Nierenzell- und Keimzelltumoren deutlich niedriger (3 und 11%). Im Harnblasenkarzinom bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen Rezidivrisiko und Methylierungsgrad des *IGFBP-3* Gens und zwar sowohl in oberflächlichen als auch muskelinvasiven Tumoren. Eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Grad sowie Methylierungsgrad konnte nicht nachgewiesen werden.

Insulin-like growth factor binding Proteine besitzen eine wichtige Rolle bei der Wachstumsregulation, Zellproliferation und Apoptosekontrolle. Im Prostata- und Ovarialzellkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen den Tumorstadien und dem Krankheitsprogress bei Bestimmung der Proteinexpression mittels immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden (Chan et al., 1998, Katsaros et al., 2001). Shariat et al. fand in einer kleinen Gruppe von 51 Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom bei Patienten mit präoperativ erniedrigten Plasmakonzentrationen von IGFBP-3 ein erhöhtes Risiko für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (Shariat et al., 2003). Ähnlich zu unseren Daten, konnte Chang et al. im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom eine Korrelation zwischen Methylierungsfrequenz und klinischem Verlauf, nicht jedoch mit Tumorstadium oder Tumorgrad feststellen. Patienten mit methyliertem *IGFBP-3* Promotor zeigten signifikant schlechtere krankheitsspezifische 5-Jahres Überlebensraten (Chang et al., 2002). Weitere Untersuchungen die einen Zusammenhang zwischen *IGFBP-3* Gen Methylierung und verminderter mRNA oder Protein Expression zeigen, liegen derzeit nicht vor. Die Beobachtung, daß signifikante Unterschiede bei erhöhtem *IGFBP-3* Methylierungsgrad hinsichtlich des Eintretens eines lokalen oder systemischen Rezidivs im Harnblasenkarzinom bestehen, stellt die Frage nach der Anwendung eines molekularen Stagings durch Nutzung eines genspezifischen Methylierungsgrades. Im Falle des Harnblasenkarzinoms könnte dies zur Entscheidungshilfe bei der Indikationsstellung einer intravesikalen Chemotherapie oder – bei muskelinvasiven Tumoren – einer adjuvanten Chemotherapie beitragen.

Epigenetische Veränderungen der Effektorcaspase *CASP-8* scheinen hingegen in urogenitalen Tumoren selten vorzuliegen. In unseren Untersuchungen zeigte sich lediglich in durchschnittlich 3% der untersuchten Proben eine Methylierung des *CASP-8* Promotors. Der Methylierungsgrad innerhalb der wenigen methylierten Proben lag dabei noch unter 5%. Veränderungen des *CASP-8* Promotors wurden bisher nur für

neuroektodermale Tumoren beschrieben (Ebinger et al., 2004) (Grotzer et al., 2000). Hierbei konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen Methylierung und verminderter CASP-8 mRNA Expression sowie Demethylierung nach 5-Aza-2-Deoxycytidine Behandlung und erneuter mRNA Expression gezeigt werden (Teitz et al., 2000). Dieser kausale Zusammenhang zeigte sich ebenfalls für den CASP-8 Methylierungsstatus beim kleinzelligen Lungenkarzinom (Hopkins-Donaldson et al., 2003). Da Caspase-8 die Exekutivcaspase des extrinsischen Pathways ist, hat die Inaktivierung dieses Gens erhebliche Folgen für die Kompetenz der Zelle die Apoptose einzuleiten. Ausgehend von der zytokingesteuerten TNF-Rezeptor Aktivierung finden sich verschiedene Signaltransduktoren wie z.B. Fas, DR4 und DR5 auf dem Weg zur Procaspase-8 Aktivierung durch die N-terminale Region von FADD (Nagata, 1997). Für einige dieser Transduktoren der TNF-Familie wie z.B. Fas/Apo1/CD95 im Prostatakarzinom, oder DR4 und DR5 im Zervixkarzinom konnte bereits eine Hypermethylierung der Promotorregion gezeigt werden (Santourlidis et al., 2001, Shivapurkar et al., 2004). Es bleibt unklar, warum der CASP-8 Promotor in den von uns untersuchten Tumorentitäten im nicht methylierten Zustand vorgefunden wurde. Die Promotorhypermethylierung weiterer Caspasen wurde bisher noch nicht untersucht.

Das ebenfalls von uns untersuchte *PML* Gen scheint hauptsächlich in Tumoren des hämatopoetischen Systems methyliert zu sein. Unsere Untersuchungen zeigten in nur 3% der Nierenzellkarzinomproben geringe Methylierung des *PML* Gens. Da das *PML* Gen über Interferon- $\gamma$  stimuliert wird, könnte die Inaktivierung des Promotors möglicherweise die Kompetenz der Zelle interferongesteuert die Apoptosekaskade einzuleiten, beeinträchtigen (Chelbi-Alix et al., 1995). Die Methylierung und weitere Untersuchungen zur Funktion und Regulation des *PML* Gens wurde bisher noch nicht in Tumoren außerhalb des hämatologischen Formenkreises untersucht. Jedoch scheint auch dort die Inaktivierung des *PML* Gens eher über eine Translokation und Fusion des Retinoic-Acid Rezeptors mit nachfolgender Inaktivierung beider Gene, als über eine Methylierung in der *PML* Genpromotorregion zu geschehen (Tabe et al., 2006).

### 4.3 Effekt demethylierender Substanzen in der Therapie urologischer Tumorerkrankungen

Seit Anfang der 80er Jahre ist es möglich, hypermethylierte Gene in vitro zu reaktivieren (Jones und Taylor, 1980). Das größte Problem ist allerdings die mangelnde Spezifität der demethylierenden Substanzen, da die verwendeten Medikamente eine globale, ungerichtete Hypomethylierung verursachen (Villar-Garea und Esteller, 2003). Dies ist wünschenswert bei der Demethylierung und Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen, allerdings ist unklar, ob nicht im Rahmen dieser globalen Demethylierung einige physiologisch notwendige Methylierungen aufgehoben und nachfolgende Reaktionsschritte unterbrochen werden. Außerdem besitzen einige der derzeit verwendeten demethylierenden Substanzen, insbesondere das am häufigsten verwendete 5-Aza-2-Deoxycytidine eine hohe Toxizität (Nieto et al., 2004). Neuere demethylierende Agenzien, wie Procainamid oder das oral applizierbare Zebularine besitzen zwar die gleiche Unspezifität hinsichtlich der globalen DNA Methylierung, sind aber weniger toxisch (Villar-Garea et al., 2003, Cheng et al., 2003).

Die demethylierende Wirkung von 5-Aza-2-Deoxycytidine wurde zunächst an Leukämiezelllinien getestet (Wilson et al., 1983). Bender et al. berichtete über die erste Applikation von 5-Aza-2-Deoxycytidine in der Blasenkarzinomzelllinie T24, welche unter anderem auch in den von uns durchgeführten Experimenten benutzt wurde (Bender et al., 1998). Auch in Nierenzellkarzinomzelllinien waren demethylierende Agenzien in der Lage, spezifische Gene wie z.B. das methylierte *RASSF1* Gen zu demethylieren und nachfolgend zu reaktivieren (Dreijerink et al., 2001).

Die von uns ausgesuchten Zelllinien wurden zunächst bezüglich des Methylierungsstatus im unbehandelten Zustand untersucht. Die Unterschiede hinsichtlich des Methylierungsstatus wurden anhand der quantitativen MSP ermittelt. Ein Rückgang der Anzahl der methylierten Zellen zeigte sich sowohl nach Behandlung mit 5-Aza-Deoxycytidine als auch nach Zebularine Gabe. Es zeigte sich weiterhin, daß beide demethylierenden Agenzien in der Lage waren, das Zellwachstum der Karzinomzellen effektiv zu inhibieren. In den Blasenkarzinomzelllinien war Zebularine in der Zelllinie mit intaktem *p53* Gen (RT4) weniger effektiv hinsichtlich der Wachstumsinhibition und Demethylierung als das vergleichsweise toxischere 5-Aza-2-

Deoxycytidine. Die Re-expression von APAF-1 und DAPK-1 mRNA war unter 5-Aza-2-Deoxycytidine nachzuweisen, nach Zebularine Gabe jedoch nur in der mutierten Zelllinie T24. Die aufgezeigten Unterschiede betreffen somit neben der Wachstumsinhibition auch die Demethylierungsrate beider Agenzien, deren Wirkung zusätzlich auch noch vom Zelltyp abhängt. Eine mögliche Folgerung wäre, daß Zebularine im Harnblasenkarzinom weniger effektiv in Zellen mit intaktem *p53* Gen ist. Allerdings muß die lange physiologische Zellverdopplungszeit von 80h von RT4 Beachtung finden. Wenn auch die Messung nach 168h war, so sind die Unterschiede möglicherweise erst nach mehreren Teilungszyklen sichtbar. Davon nicht betroffen ist jedoch die Rate der Demethylierung, die auch bei Zebularine nach etwa 5 bis 7 Tagen am effektivsten ist - ungeachtet der Zellteilungsrate (Cheng et al., 2003). Bezüglich der Demethylierungsrate zeigten sich bei Zebularine leichte Unterschiede zwischen der *p53* mutierten und nicht-mutierten Zelllinie. Ein weniger aggressiver Karzinomzelltyp scheint also weniger anfällig für die demethylierende und wachstumsinhibierende Wirkung von Zebularine zu sein. Möglicherweise wird in diesen Zellen Zebularine schlechter metabolisch durch die Citidyltransferase aktiviert. Andererseits könnte der Abbau des toxischen Zebularinemetaboliten Zebularinetriphosphat durch Phosphodiesterase I in den aggressiveren Tumorzellen verlangsamt sein, was zu einer Akkumulation von Zebularinetriphosphat innerhalb der betroffenen Zelle führt (Weiss, 1995). Aktiviertes Zebularine bindet sich normalerweise kovalent an die DNA Methyltransferasen (DNMT) und inhibiert dadurch die de novo Methylierung durch DNMT3b sowie Erhaltung bereits bestehender methylierter DNA durch DNMT1 (Cheng et al., 2003, Ben-Kasus et al., 2005). Unzureichende metabolische Aktivierung von Zebularine könnte dessen eingeschränkte Effektivität erklären.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen zur Wachstumsinhibition in Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen erstmalig, daß 5-Aza-2-Deoxycytidine und insbesondere Zebularine auch bei dieser Tumorentität effektiv in der Wachstumsinhibition sind (Publikation 4). Im Unterschied zu den Blasen-tumorzelllinien waren in den Nierenzellkarzinomzelllinien beide demethylierenden Agenzien in der *p53* wildtyp Zelllinie A498 weitaus weniger effektiv in der Wachstumsinhibition, als in der phänotypisch aggressiveren ClearCa-5 Zelllinie. Hier zeigte sich sogar eine etwas bessere Wachstumsinhibition durch Zebularine. Möglicherweise liegen in der weniger

aggressiveren Zelllinie weniger Tumorsuppressorgene in der methylierten, d.h. inaktivierten Form vor. Bei beiden Zelllinien zeigte sich eine *APAF-1* Gen Promotormethylierung, von einer Beeinträchtigung des intrinsischen Apoptosepathways kann also ausgegangen werden. Unklar ist jedoch die Rolle von Schlüsselenzymen des extrinsischen Pathways, da insbesondere die Exekutionscaspase *CASP-8* in unseren Untersuchungen an Zelllinien nicht methyliert war. Andere Untersuchungen zum Nierenzellkarzinom und Zebularine liegen derzeit nicht vor. Aus Microarray Experimenten - jedoch an Blasenkarzinomzelllinien - ist bekannt, daß es im Rahmen von globaler Demethylierung zu einer vermehrten Expression sogenannter Cancer-related Antigens kommt, was wiederum zu einer vermehrter Expression von Zelloberflächenantigenen führt (Cheng et al., 2004). Zusätzlich werden Schlüsselgene des Interferon-Signalweges durch demethylierende Agenzien wie 5-Aza-2-Deoxycytidine aktiviert (Karpf et al., 1999). Zur Re-expression dieser Gentyphen ist im Nierenzellkarzinom derzeit wenig bekannt. Denkbar wäre jedoch, daß die vermehrte Expression von Oberflächenantigenen die Immunantwort bei induktiver Therapie mit Interferonen verbessert. Eine Kombinationstherapie bestehend aus Interferon - wie im Rahmen üblicher Schemata für das Nierenzellkarzinom bereits standardisiert - mit demethylierenden Agenzien wäre dann eventuell in der Lage, die Immunkompetenz der Zelle zu verändern und die Therapieansprechrates zu verbessern. Eine kürzlich von Reu et al. erschienene Arbeit konnte nachweisen, daß die synchrone Behandlung von verschiedenen Nierenzellkarzinomzelllinien mit 5-Aza-2-Deoxycytidine und Interferon- $\beta$  die Apoptoseresistenz dieser Zellen aufhob und es zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate innerhalb der Zellen mit Kombinationsbehandlung kam (Reu et al., 2006). Der gleiche Autor konnte ebenfalls in Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen, daß eine Re-expression von *RASSF-1A* verantwortlich für die aufgehobene Apoptoseresistenz ist. Nach Re-expression von *RASSF-1A*, verursacht durch Demethylierung des methylierten *RASSF-1A* Promotors, kommt es zur Aktivierung von proapoptotischen Faktoren wie BCL-2 und BAX, welche wiederum den TRAIL Pathway aktivieren und dadurch die Zelle erneut in die Lage versetzen die Apoptose einzuleiten (Baksh et al., 2005, Reu et al., 2006). Klinische Studien stehen hierzu noch aus.

#### 4.4 Regulation der mRNA Expression durch DNA Methylierung

Wird die Initiation der mRNA Transkription durch Methylierung des zugehörigen Genpromotors blockiert, so kommt es zur transkriptionellen Inaktivierung des betroffenen Gens. Obwohl dieser Mechanismus für viele methylierte Gene postuliert wurde, konnte nur bei wenigen Genen ein funktioneller Zusammenhang zwischen Methylierung des Promotors und tatsächlichem Verlust der Genexpression gezeigt werden. Im Harnblasenkarzinom konnte dieser Zusammenhang bisher nur für die *Wnt* Antagonisten, das *Uroplakin Ib* und die Zellzyklusregulatoren *p14ARF* und *p16INK4a*, sowie *RASSF1A* und *DAPK-1* gezeigt werden (Urakami et al., 2006, Cowled et al. 2006, Chang et al., 2003, Lee et al., 2001, Tada et al. 2002). Im Nierenzellkarzinom ebenfalls für *RASSF1A* oder der XIAP assoziierte Faktor (*XAF1*), also Gene, welche eng mit dem Zellzyklus und der Apoptoseeinleitung verbunden sind (Reu et al., 2006, Lee et al. 2006).

Die Regulation eines Gens unterliegt jedoch unterschiedlichen Faktoren und neben posttranskriptionellen Mechanismen können Gene auch über posttranslationelle Mechanismen reguliert werden. So zeigt sich im Nierenzellkarzinom trotz Methylierung des *DAPK-1* Promotors persistierend eine mRNA Expression, das *DAPK-1* Protein ist jedoch inaktiv (Wethkamp et al., 2006). Die in unseren Versuchen im Harnblasenkarzinom gezeigte Korrelation zwischen *APAF-1* Promotermethylierung und erniedrigter mRNA Expression in oberflächlichen Tumoren legt die Vermutung nahe, daß die Methylierung in einem frühen Stadium die Genregulation beeinflussen kann. Zu einem späteren Zeitpunkt können zusätzliche Faktoren wie DNA Mutation oder Amplifikationen akkumulieren und die Korrelation zwischen Methylierung und daraus resultierend erniedrigter mRNA Expression geht verloren (Publikation 5).

Neben der Methylierung des Promotors ist auch die räumliche Orientierung der DNA - welche in Ruhe um die Histone gewunden ist - von Bedeutung hinsichtlich der Genregulation und Aktivierung. Die Windung der DNA um die Histone wird durch deren Grad an Methylierung und Acetylierung bestimmt. Das kürzlich entdeckte Polycomb Protein Enhancer of the Zeste Homolog 2 (EZH2) ist ein Protein, welches in der Lage ist, auf posttranslationalem Weg die Aktivität der Histonmethyltransferasen zu hemmen (Jacobs et al. 2002). Histonmethyltransferasen können durch Addition von Methylgruppen an das Histon deren räumliche Konformation ändern, dadurch wird die auch DNA strukturell verändert. Diese räumliche Strukturänderung kann dazu führen,



daß Transkriptionsfaktoren nicht mehr an der DNA binden können, bestimmte Gene können dadurch nicht mehr aktiviert werden. Dies gilt auch für die bereits in der Einleitung erwähnte Acetylierung der Histone. Die Acetylierung bzw. Methylierung der Histone geht oftmals der Methylierung der Genpromotoren voraus (Bachman et al., 2003). Nachdem zunächst nur eine Assoziation zwischen der Histonmethylierung und dem Polycomb Protein Komplex gezeigt werden konnte, identifizierten Czermin et al. das EZH2 Protein als das Regulationsprotein der Histonmethylierung (Kuzmichev et al., 2002, Czermin et al., 2002). Nachdem auch ein Zusammenhang zwischen DNA Methyltransferase Aktivität (DNMT1) und Histondeacetylase (HDAC) Aktivität gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob das EZH2 Protein nicht nur in der Lage ist, Histone zu acetylieren oder zu methylieren, sondern auch die DNA Methyltransferasen aktivieren kann um so als „Schaltstelle“ für DNA und Histonmethylierung zu fungieren (Fuks et al., 2000). Dies konnte durch die Arbeiten von Vire et al. bewiesen werden. Die Aktivität der DNMTs erfordert die Anwesenheit von EZH2, welches in der Lage ist, über spezifische Bindungsstellen die DNMT1, 3a und 3b zu aktivieren (Vire et al., 2006). EZH2 ist somit ein notwendiges Protein im Rahmen der Regulation bzw. Aktivierung von DNA Methyltransferasen. Die Tatsache, daß EZH2 in vielen Tumorentitäten deutlich vermehrt exprimiert wird, bestätigt dessen Bedeutung für die Regulation der Methylierung (Bracken et al., 2003, Weikert et al., 2005, Hinz et al. 2006). Eine wichtige Funktion besitzt hierbei das Tumorsuppressorgen *p53*, da es in der Lage ist, EZH2 zu supprimieren. Da gerade im Harnblasenkarzinom *p53* in fortgeschrittenen Stadien mutiert und inaktiv ist, kann der defekte Regulationsmechanismus zusätzlich zum Kontrollverlust über EZH2 führen, welches dessen Einfluß auf die DNA Methyltransferasen noch verstärken könnte (Tang et al., 2004).

Noch ist ungeklärt, zu welchem Zeitpunkt der Tumorigenese das EZH2 Protein vermehrt exprimiert wird. Möglicherweise ist es eines der zentralen Regulationsproteine im gesamten Kontext der epigenetischen Dysregulation und Transformation. Erste Untersuchungen zum therapeutischen Nutzen der EZH2 Blockierung u.a. im Prostatakarzinom wurden bereits initiiert (Kirmizis et al., 2003, Ogata et al., 2004).

## 4.5 Limitierungen und Ausblick

Trotz der Anzahl der untersuchten Fälle sowohl der Harnblasen- als auch der Nierenzellkarzinompatienten mit einem Follow-up von etwa fünf Jahren sind die hier vorgestellten Untersuchungen zunächst als rein deskriptiv zu betrachten. Die Methylierungsanalysen erfolgten an Tumorpräparaten mit der Fragestellung, ob der initiale Methylierungsstatus eines Tumors Rückschlüsse auf den klinischen Verlauf geben kann. Die Frage nach einem sinnvollen Nachsorgeparameter kann mit diesen retrospektiven Daten nicht beantwortet werden.

Die Klärung dieser Frage im Rahmen einer prospektiven Untersuchung wäre insbesondere in der Urinanalyse bei Patienten mit einem bereits therapierten Harnblasenkarzinom interessant, um etwaige Veränderungen im Sinne nachgewiesener Genmethylierung frühzeitig im Urin erkennen zu können. Neben der Exklusivität der Methylierung, die in Normalgewebe je nach untersuchtem Gen sehr selten vorkommt und dadurch eine hohe Spezifität garantiert, hat die Methylierungsanalyse auch technische Vorteile. Es handelt sich dabei um einen DNA basierten Marker, was hinsichtlich der Probenaufarbeitung und Reproduzierbarkeit gewisse Vorteile im Vergleich zu RNA basierten Tumormarkern (Stabilität, Haltbarkeit der Probe) hat. Erste Untersuchungen von Friederich et al. konnten methylierte Tumorzellen im Urin qualitativ nachweisen. Hierbei handelte es sich um die Gene *DAPK-1*, *BCL2*, und *TERT*, welche in 78% der Patienten mit einem Harnblasentumor nachweisbar, sprich methyliert, waren. Demgegenüber zeigte die DNA Untersuchung aus dem Urin gesunder Probanden keine Methylierung dieser Gene, so daß das Vorliegen von Methylierung durchaus als Trennungskriterium verwendet werden kann (Friedrich et al., 2004). Auch diese Daten sind als preliminär zu bezeichnen, da die untersuchte Patientengruppe aus lediglich 37 Patienten bestand.

Limitiert ist dieser Ansatz in seiner Anwendung beim Nierenzellkarzinom, da es derzeit keinen methylierungsabhängigen Marker gibt, welcher ausschließlich nierentumorspezifisch ist und dadurch die potentielle Kontamination durch alterierte DNA des Urothels aus oberem oder unterem Harntrakt immanent ist. Die Daten von Cairns et al., der eine Reihe von methylierten Genen im Urin von Patienten mit Nierenzellkarzinom präsentierte, sind mit Vorsicht zu interpretieren, da ein Großteil der

genannten Gene ebenfalls im Urothelkarzinom der Harnblase methyliert sind, wie z.B. *RASSF-1A*, *TIMP-3* und *p16* (Cairns et al., 2004).

Die Methylierungsanalyse aus Urinsediment bleibt daher eine Domäne der Tumornachsorge oder Vorsorge von Patienten mit Urothelkarzinom des unteren und oberen Harntraktes (Catto et al., 2005). In den Blickpunkt des Interesses rückt daher die quantitative Methylierungsanalyse im Urin der Gene *APAF-1*, *DAPK-1* und *IGFBP-3* bei Patienten mit oberflächlichem Harnblasenkarzinom. Hierbei wäre jedoch noch zu klären, ob diese Gene möglicherweise bei Patienten mit benignen, z.B. entzündlichen Erkrankungen der Harnblase oder Restharnbildung auf dem Boden einer Prostatahyperplasie in einem methylierten Zustand vorliegen.

Hinsichtlich funktioneller Rückschlüsse müssen die vorgestellten Ergebnisse zurückhaltend interpretiert werden. Aufgrund des globalen Effektes demethylierender Agenzien muß eine beobachtete Genreaktivierung nicht unbedingt durch die Demethylierung des Promotors und erneute mRNA Expression des Gens begründet werden. Die Untersuchungen von Wethkamp et al. haben gezeigt, daß sich nach Demethylierung des Promotors zwar die Gen- und Proteinexpression rekonstituiert (*DAPK-1*), das entstandene Protein jedoch in einem inaktiven Zustand verbleibt. Postranslationelle Mechanismen müssen bei der Reaktivierung von Genen ebenfalls berücksichtigt werden (Wethkamp et al., 2006).

Neben der Beantwortung prognostischer und funktioneller Fragen erlaubt die Modifikation der Methylierung auch ein direktes Eingreifen in die Therapie spezieller Tumoren. Nachdem die ersten in vitro Untersuchungen zu demethylierenden Substanzen an Tumoren der Hämatopoese stattfanden, konnte der Effekt dieser Agenzien auch in anderen Tumorentitäten wie z.B. Lungenkarzinom, Magenkarzinom oder Harnblasenkarzinom beobachtet werden (Otterson et al., 1995, Li et al., 1996, Bender et al., 1998).

Das am häufigsten untersuchte und angewandte Präparat 5-Aza-2-Deoxycytidine wurde im Jahre 2006 von der FDA zugelassen. Unter dem Namen Decitabine (Dacogen®) wurde es im Rahmen einer randomisierten Phase-3-Studie einer Gruppe von 170 Patienten mit myelodysplastischem Syndrom intravenös appliziert. Insgesamt zeigte sich ein Trend zu verlängertem Überleben in der Behandlungsgruppe (12.1 Monate vs. 7.8 Monate,  $p=0.16$ ), der sich in der Subgruppenanalyse deutlicher

herausstellte. Die Nebenwirkungen waren gering, insgesamt kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität während der Therapie (Kantarjian et al., 2006). Neben einem Effekt bei alleiniger Gabe zeigt die Arbeit von Reu et al., daß 5-Aza-2-Deoxycytidine auch in der Lage ist, gängige Chemo- bzw. Immuntherapeutika in ihrer Wirkung zu reaktivieren oder zu intensivieren. Nach 5-Aza-2-Deoxycytidine Behandlung zeigte sich eine verbesserte Wirksamkeit von IFN- $\beta$  in ausgewählten Nierenzellkarzinom- und Melanomzelllinien (Reu et al., 2006).

In urologischen Tumoren bieten sich hierzu mehrere Ansätze. So ist derzeit nicht bekannt, ob die intravesikale Gabe von 5-Aza-2-Deoxycytidine allein oder in Kombination mit gängigen Präparaten im Harnblasenkarzinom zur Rezidivprophylaxe wirksam ist. Auch die Kombination demethylierender Agenzien mit Multikinaseinhibitoren, welche derzeit im Nierenzellkarzinom breite Anwendung finden, wäre denkbar. Neben dem Nachweis der Effektivität genannter Substanzen, gilt es weitere Substanzen zu finden, welche unter Umständen auch oral gegeben werden können, wie z.B. Zebularine. Dieses relativ neue Präparat wurde bisher nur in vivo an Mäusen mit T-Zell Lymphom untersucht und zeigte dort eine gute Wirksamkeit bezüglich Tumormassenreduktion und minimaler Toxizität (Herranz et al., 2006).

Da nicht nur die Demethylierung der Promoterregion sondern auch die Änderung der Chromatinstruktur bei der Genexpression von Bedeutung ist, kommt den sogenannten Histondeacetylaseinhibitoren (HDAC Inhibitoren) eine wichtige Rolle im Zusammenspiel mit herkömmlichen demethylierenden Substanzen zu (Baylin und Ohm, 2006). Im Wechselspiel mit den Histonacetylasen können die Histondeacetylasen die Acetylierung der Histone wieder aufheben. Dadurch wird das Entwinden der um die Histone gepackten DNA unterbunden, aufgrund der resultierenden festen Chromatinstruktur ist eine Transkription und Genexpression nicht möglich (Villar-Garea und Esteller, 2003). Arbeiten von Blagosklonny et al. zeigten eine Reaktivierung des wichtigen Zellzyklus Regulators *p21* nach Gabe verschiedener HDAC Inhibitoren (Blagosklonny et al., 2002). Untersuchungen mit dem HDAC Inhibitor Depsipeptid aus einer Phase-1-Studie zeigte eine gute Verträglichkeit des Präparats bei gering kardiotoxischen Nebenwirkungen (Sandor et al., 2002). Die Wirkung der Kombination von Substanzen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus, wie Methyltransferaseinhibitoren (z.B. 5-Aza-2-Deoxycytidine oder Zebularine) mit HDAC Inhibitoren (z.B. Valproinsäure oder Procainamid) wurde kürzlich bei Patienten

mit akuter myeloischer Leukämie untersucht (Azacytidine und Phenylbutyrat) und belegte, daß die Kombination beider Wirksubstanzen in vivo möglich ist. Daten zum therapeutischen Effekt dieser Therapie fehlen allerdings noch (Gore et al., 2006).

Die Anzahl der durch Methylierung regulierten Tumorsuppressorgene wächst ständig, doch scheint hierbei die Wahl der betroffenen Gene abhängig vom Tumortyp zu sein (Esteller et al. 2001). Neben der Etablierung neuer, epigenetischer Therapieansätze wird die prognostische Bedeutung methylierungsabhängiger Marker der von uns untersuchten Zielgene weiter untersucht werden. Genomweite Screeningmethoden mittels Microarray Technik, welche derzeit von unserer Gruppe durchgeführt werden, helfen auf der Suche nach neuen methylierungsabhängigen Zielgenen in den verschiedenen Tumorentitäten des Urogenitaltraktes.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegenden Arbeiten beschreiben die Möglichkeiten, welche sich durch die Detektion epigenetischer Veränderungen in ausgewählten urologischen Tumorerkrankungen ergeben. Die beobachteten Methylierungsmuster zeigen sich nicht nur typischerweise in tumorös veränderten Zellen, sondern scheinen auch in Zusammenhang mit lokal fortgeschrittenen Tumoren oder Tumoren mit aggressivem Wachstumsmuster zu stehen. Hierbei ist die Quantifizierung der genotypischen Methylierung wichtig, da durch quantitative Detektionsmethoden Unterschiede innerhalb unterschiedlicher Tumorstadien und Differenzierungsgrade aufgezeigt werden können. Da die epigenetischen Veränderungen einer Promotormethylierung potentiell reversibel sind, besteht in der Modifikation der Methylierung durch demethylierende Substanzen die Möglichkeit, durch Methylierung inaktivierte Gene zu reaktivieren.

In den Untersuchungen zeigten sich für eine Gruppe ausgewählter Zielgene des Tumorsuppressorgens *p53* unterschiedliche Methylierungsmuster. Während im Urothelkarzinom der Harnblase die Methylierung der Gene *APAF-1*, *DAPK-1* und *IGFBP-3* als ungünstiger Prognosefaktor anzusehen ist, gilt dies im Nierenzellkarzinom für die beiden Gene *APAF-1* und *DAPK-1*. Auch im seminomatösen oder nichtseminomatösen Keimzelltumor ist die Methylierung letztgenannter Gene häufig, während die Promotormethylierung des *IGFBP-3* Gens selten nachzuweisen ist. Andere untersuchte *p53* Zielgene, wie das *PML* Gen oder das *CASP-8* Gen sind in urogenitalen Tumoren selten methyliert. Je nach Tumortyp zeigen sich somit unterschiedliche Methylierungsmuster spezifischer Gene, wobei Genen wie dem *APAF-1* oder *DAPK-1* Gen aufgrund der Häufigkeit ihrer epigenetischen Veränderung eine besondere Rolle zukommt. Anhand der Quantifizierung der Promotormethylierung dieser Gene besteht die Möglichkeit der Risikostratifizierung, wie in den Patientengruppen mit Tumoren der Harnblase und der Niere gezeigt werden konnte.

Die Demethylierung und somit potentielle Reaktivierung des *APAF-1* und *DAPK-1* Gens konnte durch in vitro Studien in ausgewählten Tumorzelllinien der Blase und der Niere gezeigt werden. Hierbei ergeben sich Unterschiede nicht nur in Abhängigkeit des Tumortyps sondern auch in Abhängigkeit des *p53* Status, d.h. nichtmutiertem oder mutiertem *p53* Gen. Die verwendeten demethylierenden Substanzen führten zu

einer deutlichen Wachstumsverzögerung der Tumorzellen. Neben dem häufig verwendeten 5-Aza-Deoxycytidine konnte die Effektivität von Zebularine als demethylierende und wachstumshemmende Substanz erstmals im Nierenzellkarzinom demonstriert werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen wird das diagnostische und prognostische Potential häufig methylierter Gene wie *APAF-1* und *DAPK-1* weiter untersucht werden. Die Genauigkeit der Untersuchungsmethode erlaubt möglicherweise die Detektion tumortypspezifischer Veränderungen fernab des Primärtumors oder bereits zu einem Zeitpunkt bevor sich die Erkrankung klinisch manifestiert. Demethylierende Substanzen wie 5-Aza-Deoxycytidine oder Zebularine besitzen möglicherweise in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika das Potential deren Wirkung zu verstärken um somit effektiv den Progress oder das Rezidiv einer Tumorerkrankung zu verhindern.

## 6. Literaturverzeichnis

- Bachman KE, Park BH, Rhee I, et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003; 3: 89-95.
- Baksh S, Tommasi S, Fenton S, et al. The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell* 2005; 18: 637-50.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-16.
- Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 95-101.
- Ben-Kasus T, Ben-Zvi Z, Marquez VE, et al. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 121-33.
- Blagosklonny MV. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 621-7.
- Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL, et al. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 937-41.
- Borden KL. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5259-69.
- Bouchard J, Momparler RL. Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 109-14.
- Bracken AP, Pasini D, Capra M, et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* 2003; 22: 5323-35.
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256: 27-33.
- Breault JE, Shiina H, Igawa M, et al. Methylation of the gamma-catenin gene is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 557-64.
- Cairns P. Detection of promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 40-3.



- Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2903-10.
- Cavalli F, Monfardini S, Pizzocaro G, et al. Report on the International Workshop on Staging and Treatment of Testicular Cancer. *Eur J Cancer* 1980; 16: 1367-72.
- Chan AW, Chan MW, Lee TL, et al. Promoter hypermethylation of Death-associated protein-kinase gene associated with advanced stage gastric cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 937-41.
- Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998; 279: 563-6.
- Chang LL, Yeh WT, Yang SY, et al. Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J Urol* 2003; 170: 595-600.
- Chang YS, Wang L, Liu D, et al. Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3669-75.
- Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, et al. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 1995; 9: 2027-33.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 399-409.
- Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, et al. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1270-8.
- Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 1999; 59: 3352-6.
- Cowled P, Kanter I, Leonardos L, et al. Uroplakin Ib gene transcription in urothelial tumor cells is regulated by CpG methylation. *Neoplasia* 2005; 7: 1091-103.
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, et al. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 2002; 111: 185-96.
- Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, et al. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995; 9: 15-30.

Dominguez G, Silva J, Garcia JM, et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res* 2003; 530: 9-17.

Dowell JE, Minna JD. Cancer chemotherapy targeted at reactivating the expression of epigenetically inactivated genes. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1353-5.

Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7504-9.

Dulaimi E, De C, II, Uzzo RG, et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3972-9.

Ebinger M, Senf L, Wachowski O, et al. Promoter methylation pattern of caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-cadherin in medulloblastoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 17-21.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-9.

Esteller M, Corn PG, Urena JM, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58: 4515-8.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999; 59: 793-7.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 67-70.

Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, et al. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7457-65.

Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, et al. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003; 22: 451-5.

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, et al. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000; 24: 88-91.

Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, et al. Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 325-34.

Goessl C, Muller M, Straub B, et al. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol* 2002; 41: 668-76.

- Gore SD, Baylin S, Sugar E, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006; 66: 6361-9.
- Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 2000; 19: 4604-10.
- Gurrieri C, Nafa K, Merghoub T, et al. Mutations of the PML tumor suppressor gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2004; 103: 2358-62.
- Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998; 351: 1393-6.
- Haukaas S, Daehlin L, Maartmann-Moe H, et al. The long-term outcome in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a single-institutional experience. *BJU Int* 1999; 83: 957-63.
- Henrique R, Jeronimo C. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *Eur Urol* 2004; 46: 660-9; discussion 669.
- Herranz M, Martin-Caballero J, Fraga MF, et al. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood* 2006; 107: 1174-7.
- Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, Schostak M, Schrader M, Miller K, Christoph F. EZH2 polycomb transcriptional repressor expression correlates with methylation of the APAF-1 gene in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Tumor Biology* 2006 (in Druck).
- Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene* 2003; 22: 461-6.
- Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, et al. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* 2003; 10: 356-64.
- Houldsworth J, Xiao H, Murty VV, et al. Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 1998; 16: 2345-9.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997; 390: 180-4.

- Jacobs JJ, van Lohuizen M. Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 151-61.
- Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8472-8.
- Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1747-52.
- Jia L, Srinivasula SM, Liu FT, et al. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 2001; 98: 414-21.
- Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 1999; 15: 34-7.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-28.
- Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; 20: 85-93.
- Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106: 1794-803.
- Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, et al. Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14007-12.
- Katsaros D, Yu H, Levesque MA, et al. IGFBP-3 in epithelial ovarian carcinoma and its association with clinico-pathological features and patient survival. *Eur J Cancer* 2001; 37: 478-85.
- Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* 1999; 93: 4347-53.
- Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, et al. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 790-6.
- Kawano S, Miller CW, Gombart AF, et al. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1999; 94: 1113-20.

- Kim HL, Seligson D, Liu X, et al. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 2005; 173: 1496-501.
- Kirmizis A, Bartley SM, Farnham PJ. Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 113-21.
- Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, et al. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 1997; 15: 403-7.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, et al. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 2002; 16: 2893-905.
- Lam JS, Leppert JT, Figlin RA, et al. Surveillance following radical or partial nephrectomy for renal cell carcinoma. *Curr Urol Rep* 2005; 6: 7-18.
- Lee MG, Kim HY, Byun DS, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6688-92.
- Lee MG, Huh JS, Chung SK, et al. Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene* 2006; 25: 5807-22.
- Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11733-7.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
- Li J, Yang Y, Fujie T, et al. Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1619-25.
- Lo YM, Wong IH, Zhang J, et al. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1999; 59: 3899-903.
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 514-9.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-65.

- Nieto M, Samper E, Fraga MF, et al. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* 2004; 23: 735-43.
- Ogata R, Matsueda S, Yao A, et al. Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate* 2004; 60: 273-81.
- Osman I, Drobnjak M, Fazzari M, et al. Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2082-8.
- Otterson GA, Khleif SN, Chen W, et al. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2'deoxycytidine. *Oncogene* 1995; 11: 1211-6.
- Paz MF, Avila S, Fraga MF, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 4519-24.
- Perkins C, Kim CN, Fang G, et al. Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4561-6.
- Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 12181-8.
- Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, et al. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1-7.
- Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, et al. Overcoming Resistance to Interferon-Induced Apoptosis of Renal Carcinoma and Melanoma Cells by DNA Demethylation. *J Clin Oncol* 2006.
- Reu FJ, Leaman DW, Maitra RR, et al. Expression of RASSF1A, an epigenetically silenced tumor suppressor, overcomes resistance to apoptosis induction by interferons. *Cancer Res* 2006; 66: 2785-93.
- Rosenberg C, Schut TB, Mostert M, et al. Chromosomal gains and losses in testicular germ cell tumors of adolescents and adults investigated by a modified comparative genomic hybridization approach. *Lab Invest* 1999; 79: 1447-51.
- Rothe M, Albers P, Wernert N. Loss of heterozygosity, differentiation, and clonality in microdissected male germ cell tumours. *J Pathol* 1999; 188: 389-94.

- Salem C, Liang G, Tsai YC, et al. Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2473-6.
- Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. *Cell* 2002; 108: 165-70.
- Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 892-5.
- Sandor V, Bakke S, Robey RW, et al. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 718-28.
- Santourlidis S, Warskulat U, Florl AR, et al. Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (APT1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma. *Mol Carcinog* 2001; 32: 36-43.
- Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; 64: 7183-90.
- Serth J, Kuczyk MA, Bokemeyer C, et al. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1995; 71: 201-5.
- Shariat SF, Kim J, Nguyen C, et al. Correlation of preoperative levels of IGF-I and IGFBP-3 with pathologic parameters and clinical outcome in patients with bladder cancer. *Urology* 2003; 61: 359-64.
- Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer* 2004; 109: 786-92.
- Smith-Sorensen B, Lind GE, Skotheim RI, et al. Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene* 2002; 21: 8878-84.
- Sobin L, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumors 5<sup>th</sup> Edition. International Union Against Cancer. New York, John Wiley and Sons Inc., 1997.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-11.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998; 1: 949-57.

- Stickel NH, Cheng LS, Watson IR, et al. Expression of p53 in renal carcinoma cells is independent of pVHL. *Mutat Res* 2005; 578: 23-32.
- Tabe Y, Konopleva M, Kondo Y, et al. PML-RARalpha and AML1-ETO translocations are rarely associated with methylation of the RARbeta2 promoter. *Ann Hematol* 2006.
- Tada Y, Wada M, Taguchi K, et al. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res* 2002; 62: 4048-53.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3740-5.
- Tang X, Milyavsky M, Shats I, et al. Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene* 2004; 23: 5759-69.
- Teitz T, Wei T, Valentine MB, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6: 529-35.
- Urakami S, Shiina H, Enokida H, et al. Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2109-16.
- Villar-Garea A, Esteller M. DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why? *Curr Drug Metab* 2003; 4: 11-31.
- Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, et al. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 4984-9.
- Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439: 871-74.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-99.
- Weikert S, Christoph F, Kollermann J, et al. Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int J Mol Med* 2005; 16: 349-53.
- Weiss GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci* 1995; 56: 637-60.



- Wethkamp N, Ramp U, Geddert H, et al. Expression of death-associated protein kinase during tumour progression of human renal cell carcinomas: hypermethylation-independent mechanisms of inactivation. *Eur J Cancer* 2006; 42: 264-74.
- Wilson VL, Jones PA, Momparler RL. Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* 1983; 43: 3493-6.
- Wojdacz TK, Hansen LL. Techniques used in studies of age-related DNA methylation changes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 479-87.
- Woods DB, Vousden KH. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 2001; 264: 56-66.
- Yu H, Spitz MR, Mistry J, et al. Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 151-6.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-13.
- Zuzak TJ, Steinhoff DF, Sutton LN, et al. Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma. *Eur J Cancer* 2002; 38: 83-91.

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Kurt Miller danke ich für die großzügige Unterstützung und Schaffung der Rahmenbedingungen, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Hans Krause für Engagement, anregende Diskussion sowie konstruktive Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz (Urologische Klinik der Universität Düsseldorf) für die wertvollen Hinweise im Rahmen der Einarbeitung zum Thema Methylierung urogenitaler Tumorerkrankungen.

Herrn PD Dr. med. Mark Schrader danke ich für die begleitenden Ratschläge und kollegialen Hinweise im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn PD Dr. med. Steffen Weikert, Herrn Dr. med. Carsten Kempkensteffen und Herrn Dr. med. Stefan Hinz für ständige Hilfsbereitschaft, Unterstützung und kritische Diskussion während der gesamten Phase der Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Petra von Kwiatkowski, Frau Antonia Maas und Frau Waltraud Jekabsons für die wertvolle Unterstützung im Urologischen Forschungslabor sowie Herrn PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka (Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf) für die Überlassung der Tumorzelllinie ClearCa-5 und seine Hinweise zur Zelltypisierung.

Mein größter Dank geht an meine Ehefrau Susana Castilla Pons, für ihren Rückhalt und Unterstützung während der gesamten Phase meiner klinischen und experimentellen Arbeit.

## **8. Eidesstattliche Versicherung gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 12.12.2006

Dr. med. Frank Christoph