Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

RECK-Methylierung im Nierenzellkarzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sascha Marcel Detlof

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt 6

I Einleitung

1. Das Nierenzellkarzinom
1.1 Epidemiologie 10
1.2 Ätiopathogenese 10
1.3 Klinik 11
1.4 Diagnostik 12
1.5 Einteilung 12
1.6 Therapie 13
1.7 Prognose 13
2. RECK
2.1 RECK-Gen 14
2.2 Kennzeichen der Malignität 14
2.3 RECK und Metalloproteinasen 15
2.4 Einfluss auf die embryonale Entwicklung 16
2.5 RECK-Expression in malignen Tumoren 17
2.6 RECK-Regulation 17
2.7 DNA-Methylierung 18
2.8 Hypermethylierung als prognostischer und therapeutischer Ansatzpunkt 20
2.9 Zusammenfassung 20
3. Ziel der Arbeit 20
4. Arbeitsablauf 21

II Materialien und Methoden

1. Patientenkollektiv 23
2. Reagenzien und Kits 26
3. Bearbeitung der Proben
3.1 Gewinnung des Probenmaterials 27
3.2 Isolierung genomischer DNA 27
3.3 Zellkultivierung 27
3.4 Konzentrationsbestimmung 28
4. Bisulfitierung
4.1 Grundlage der Bisulfitreaktion 29
4.2 Ausführung 30
5. DNA Quantifizierung
5.1 Real-Time PCR 31
5.2 Primer und Sonden für RECK 34
5.3 Durchführung der Real-Time PCR
5.3.1 RECK 38
5.3.2 ß-Actin 39
5.4 Erstellung der Standardkurve 40
5.5 Relative Quantifizierung der Genexpression 42

5.6 Herstellung des Kalibrators und der Lauf-zu-Lauf-Kontrolle 42
5.7 Detektionslimit 43
5.8 Methyltransferaseversuch 44
6. Datenverarbeitung und Statistik 46
6.1 Datenanalyse mit SPSS 46

III Ergebnisse

1. Qualitätssicherung
1.1 Überprüfung der Nano Drop Messung 48
1.2 Messung der verwendeten DNA-Proben am Nano-Drop Photometer 48
2. Standardkurve und Effizienz 50
3. DNA-Messung nach Bisulfitbehandlung 50
4. DNA-Abbau bei Lauf-zu-Lauf-Kontrolle und Kalibrator 52
5. Herstellung eines neuen Kalibrators und einer neuen Lauf-zu-Lauf-Kontrolle 53
6. Detektionslimit 55
7. Auswertung der Real-Time PCR-Messwerte 57
8. Test auf Normalverteilung 60
9. Promotormethylierung durch Methyltransferase 60
10. Methylierung von Normal- und Tumorgewebe 64
11. Kreuztabellen/Assoziationsanalyse 67
12. Korrelationsanalyse 69
13. Kaplan-Meier Analyse 71

IV Diskussion

1. Grundlage der Arbeit 74
2. Betrachtung der Ergebnisse 75
3. Qualitätssicherung
3.1 Methyltransferasebehandlung 76
3.2 Größe des Patientenkollektivs 77
3.3 Konstante DNA- Konzentration bei Kalibrator und Lauf-zu-Lauf-Kontrolle 77
4. Limitierungen der Überlebensanalyse 78
5. Aussichten
5.1 Vergleich mit Gewebe gesunder Organe 79
5.2 Medikamentöse Beeinflussung der Methylierung 79
5.3 RECK-Regulierung 80

V Anhang

1. Tabellen 81
2. Abbildungen 82

VI Referenzen

83

Abkürzungsverzeichnis

Nierenzellkarzinom	NZK
Gamma-Glutamyl-Transferase	yGT
Computertomographie	CT
Kernspintomographie	MRT
Union for Interntional Cancer	UICC
TNM Klassifikation of Maglinant Tumors	TNM Klassikation
World Health Organisation	WHO
reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs	RECK
RAS G-Protein	RAS
Matrix-Metalloproteinasen	MMPs
pathologisches Tumorstadium	pT
noduläre Metastasierung	N
Fernmetastasierung	M
Grading	G
Resektion	R
extrazelluläre Matrix	ECM
vascular endothelial groth factor	VEGF
tissue inhibitors of Matrix-Metalloproteinases	TIMPs
Cytosin-Guanin Dinukleotid	CpG
Tumor umgebendes, tumorfreies Nierengewebe	N-Gewebe
Tumorgewebe	T-Gewebe
American Type Culture Collection	ATCC
Prostatazelllinie	LNCaP
Desoxyribonukleinsäure	DNA
Real-Time Polymerasekettenreaktion	real-time PCR
Polymerasekettenreaktion	PCR
crossing point	CT
voll methylierte DNA; CpGenome	mDNA
Effizienz	E
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GaPDH
Lauf-zu-Lauf-Kontrolle	LzL-Kontrolle
Signifikanzwert	p-Wert
Promotorvollmethylierung	V
postoperative Überlebenszeit	t-Tod
postoperative rezidivfreie Zeit	t-Rez

Abstrakt:

Einleitung:

Das RECK-Gen (reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs) erfüllt Aufgaben in physiologischen (z.B. Neuralrohrentwicklung [11]) sowie pathophysiologischen Entwicklungsabläufen. Es fungiert als Inhibitor der Metalloproteinasen MMP-2,-9 und -14 [14]. Diese wirken in verschiedenen geweblichen Umwandlungsprozessen und haben eine entscheidende Bedeutung in der Tumorgenese.

Eine verminderte Expression von RECK wurde in verschiedenen Karzinomtypen nachgewiesen [27, 28, 29, 30] und eine Auswirkung auf das Karzinomwachstum konnte aufgezeigt werden.

Die Regulation von RECK scheint über verschiedene Wege beeinflusst zu werden, erfolgt aber vor allem über eine Bindung an die Sp1 Seite des RECK-Gen-Promotors [11].

Wie im Kolonkarzinom [31] sowie weiteren Karzinomtypen [28, 32, 33], nachgewiesen, führt auch eine Hypermethylierung im RECK-Gen-Promotorbereich zu einer verringerten Gen-Expression. Signifikante Zusammenhänge konnten zur lymphogenen Metastasierung [28], Tumorinvasionstiefe [33] sowie zum rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben [32] gefunden werden.

Der Einfluss einer Hypermethylierung des RECK-Gen-Promotors auf das Tumorwachstum im Nierenzellkarzinom (NZK) wird diskutiert. Das Ziel der folgenden Untersuchung war daher die Messung der RECK-Gen-Promotor-Methylierung.

Methoden:

Für die Versuche wurden 33 Proben von Nierenzellkarzinomgewebe und tumorfreiem Gewebe, welches den Tumor umgab, verwendet.

Durch eine Sodium Bisulfitreaktion wurden mögliche methylierte Cytosin-Reste im Gen-Promotor aufgedeckt. Die RECK-Promotor-Methylierung wurde mit methylierungs spezifischer PCR (MSP) mittels Real-Time PCR ((LightCycler) bestimmt. Mit der Verwendung von beta Actin (ACTB) als methylierungsunabhängiges Referenzgen wurden die einzelnen Methylierungsmesswerte relativiert.

Analyse:

Die RECK-Methylierung im Tumor-Gewebe sowie in gesundem Gewebe, welches den Tumor umgibt, wurde mit der Verwendung der GraphPad Prism® Software mittels Wilcoxon Tests analysiert.

Es wurde versucht eine Korrelation sowie Assoziation zwischen den einzelnen klinisch pathologischen patientenbezogenen (Alter, Geschlecht) sowie tumordefinierenden Daten (Tumorwachstumstiefe, Grading) und der Höhe der RECK-Methylierung darzustellen. Mit der Kaplan-Meier Analyse wurde ein Einfluss der RECK-Promotor-Methylierung auf das postoperative Überleben sowie die postoperative überlebensfreie Zeit untersucht.

Ergebnisse:

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Promotor-Methylierung im Tumor Gewebe sowie in tumorfreiem Gewebe, welches den Tumor umgab, nachgewiesen (pWert: 0,851). Eine signifikante Korrelation sowie Assoziation der Methylierung zu Tumor definierenden und patientenspezifischen Daten wurde in unseren 33 Proben ausgeschlossen. Kaplan-Meier zeigte, dass die Methylierung keinen Einfluss auf postoperatives Überleben sowie die postoperative überlebensfreie Zeit hatte.

Schlussfolgerung:

Mit unserem limitierten Datensatz konnten wir nicht zeigen, dass die RECK-Promotor-Methylierung einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung des Nierenzellkarzinoms hat. Andere Wege, die zu verminderter RECK-Expression führen sind bekannt und sollten in nachfolgenden Arbeiten auch im Nierenzellkarzinom untersucht werden.

Abstract:

Introdution:

The RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs) gene functions in physiological [11] and pathophysiological development as an inhibitor of metalloproteinases (MMP) 2,-9 and 14 [14]. The MMPs take part in tissue metamorphosis and play an important role in tumorigenesis. Reduced expression of RECK is described for different carcinomas [27, 28, 29, 30] and its influence on developmet of carcinoma is shown. Gene regulation of RECK itself is influenced on different ways among them SP1 for which a binding site is present in the promoter [11]. Hypermethylation of the RECK promotor leads to reduced gene expression, as shown for colon [31] and other carcinomas [28, 32, 33]. In addition, a significant correlation to lymphogenous metastasis [28], invasive tumour growth [33] and relapse-free survival and overall survival [32] was found. A possible contribution of hypermethylation of the RECK promotor in renal cell carcinomas (RCCs) to renal carcinogenesis is under discussion. We aimed to clarify this question by measurement of reck gene promotor methylation.

Methods:

Genomic DNA of 33 RCC tissues and tumor surounding tissue was used. A sodium bisulfite modification was carried out to uncover possible methylated cytosine residues. RECK promoter hypermethylation (PM) was assessed by methylation-specific PCR (MSP) using real-time PCR equipment (LightCycler). Using beta-actin (ACTB) as a methylation independent reference gene we were able to quantify for the ratio of methylated cells in the respective samples.

Analysis:

Original MSP data of tumor and tumor surrounding tissue were further analyzed using Wilcoxon test provided by GraphPad Prism® software. In addition we tried to establish a correlation and assoziation between the degree of methylation and tumour defining (invasive tumor growth, grading) and patient-specific data (age, gender). Kaplan-Meier analyses was used to estimate the influence of RECK-PM on relapse-free survival and overall survival.

Results:

There was no significant difference of methylation in tumor promotor dna and the surrounding tissue dna (p = 0,851).

No significant correlation or association of promotor methylation and tumour defining and patientspecific data was found in our limited data set of 33 patients. Kaplan-Meier analysis did not show any influence on relapse-free survival and overall survival.

Conclusion:

With our limited data set we were not able to show that RECK-promotor-methylation plays an important role in the etiology of RCCs.

Other means of downregulation of RECK (e.g. mutational events) may contribute the renal carcinogenesis and remain to be assessed by additional investigations.

I Einleitung

1. Das Nierenzellkarzinom

1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist mit einer Häufigkeit von 3 % aller Tumoren im Erwachsenenalter der dritthäufigste Tumor der Harnwege [1]. Es stellt mit einem Anteil von 85% die häufigste tumoröse Raumforderung der Niere dar. Der Erkrankungsgipfel liegt in der 6. und 7. Lebensdekade [2]. Das Verhältnis von erkrankten Männern zu Frauen beträgt 3:2 [3]. Die Mortalität liegt für Männer bei 3/100 000 und bei Frauen bei 8/100 000. Die Inzidenz liegt in Deutschland für Männer bei 22/100 000 und bei 10/100 000 für Frauen [4]. Als sichere Risikofaktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms gelten Bluthochdruck, Rauchen, Adipositas, eine positive Familienanamnese (das Risiko für erstgradige Verwandte ist etwa verdoppelt) und verschiedene genetische Syndrome, wie z.B. die von Hippel-Lindausche Erkrankung und eine tuberöse Sklerose [5]. Mit hoher Evidenz gelten auch verschiedene hormonelle Faktoren sowie chemische Substanzen und Metalle als belastende Faktoren [3].

1.2 Ätiopathogenese

Das Nierenzellkarzinom entspringt meist den proximalen Tubuluszellen. Der Tumor kann überall in der Niere lokalisiert sein. Mit voranschreitendem, expansivem Wachstum durchbricht er die Nierenkapsel und dringt in angrenzende Gewebe sowie die Lymphknoten ein. Auch kann es zur Bildung von Tumorthromben in der Vena cava inferior und der Vena renalis mit den Zeichen einer Nierenvenenthrombose kommen. Das Nierenzellkarzinom metastasiert vor allem in die Lunge, das Gehirn, das Skelettsystem, die Leber, die Nebenniere oder die kontralaterale Niere, wobei der Befall in 90% der Fälle einseitig bleibt [6].

Das Nierenzellkarzinom wird histologisch in 5 Haupttypen eingeteilt [5].

- klarzelliges Nierenzellkarzinom 70%

- papilläres (oder chromophiles) NZK 10-15%

- chromophobes NZK 5%

- Sammelrohrkarzinom und medulläres NZK < 1%

- unklassifiziertes NKZ 4-5%

1.3 Klinik

Die Klinik des Nierenzellkarzinoms ist sehr vielfältig, tritt aber in der Regel nur bei fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren auf. Die Mehrzahl der Nierentumoren wird heute zufällig (inzidentell) im Rahmen einer bildgebenden Diagnostik entdeckt. Im Folgenden sind mögliche Symptome aufgeführt.

- Symptomatische Trias bei ca. 5-10 % der Fälle:

  Macro- bzw. Microhämaturie als Zeichen des Einbruchs des Tumors in das Kelchsystem, Flankenschmerzen, palpable Tumormasse

- Paraneoplastische Symptome:

  Anämie oder Erythrozytose, Hypercalcämie durch ossäre Metastasierung, ektope Parathormonproduktion und Prostaglandinproduktion durch Tumorzellen, hohe Erythrozytensenkungsgeschwindigkeit, Hypertonie als Folge eines erhöhten Renin Spiegels, Symptome eines Cushing-Syndroms durch erhöhten ACTH-Ausstoß

- B-Symptomatik:

  Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß

- Stauffer-Syndrom (Syndrom hepatischer Dysfunktion)

- Laborchemische Veränderungen:

  Es können unter anderem die alkalische Phosphatase, das Bilirubin, die leberspezifischen Transaminasen, die Gamma-Glutamyl-Transferase (yGT) und das Prothrombin erhöht sein. Ebenfalls ist das Auftreten einer pathologischen Blutgerinnung möglich [6][7].

1.4 Diagnostik

Mittel der Wahl zur Unterscheidung von Tumoren und Zysten der Niere ist der Ultraschall. Des Weiteren werden Computertomographie (CT) sowie Kernspintomopraphie (MRT) zur Bestätigung der Diagnose und zum weiterem Tumorstaging eingesetzt. Wichtig ist eine Einschätzung einer möglichen Metastasierung in Lymphknoten, in andere Organe und eine Infiltration der Vena cava für die Abwägung der Therapieoptionen. Laborchemische Auffälligkeiten können vor allem Hinweise auf metastatische Prozesse liefern.

1.5 Einteilung

Das NZK wird den Bestimmungen der Union for Interntional Cancer (UICC) folgend nach aktuellem Stand durch die TNM Klassifikation of Maglinant Tumors (TNM Klassikation) von 2010 unterteilt (Tabelle 1). In deren Anlehnung werden TNM-Stadien differenziert [8]. Das Tumorgrading wird bestimmt durch die anaplastischen Veränderungen der Zelle (Tabelle 2).

Tabelle 1 TNM-Klassifikation nach WHO (2010)

T1 <7 cm , begrenzt auf Niere	**N0** keine Lymphknotenmetastasen
T2 >7 cm , begrenzt auf Niere	**N1** Lymphknotenmetastasen
T3a Infiltration Nierenvene/perirenales Fett	**M0** keine Fernmetastasen
T3b Infiltration Nierenvene/V. cava inferior	**M1** Fernmetastasen
T3c Infiltration V. cava oberhalb des Zwerchfells	
T4 Über Gerota-Faszie hinaus	

Tabelle 2 Nukleäres Grading des Nierenzellkarzinoms nach Thoenes (Thoenes u. Störkel 1991)[9]

G	Kerne	Nukleolen	Mitosen
1	regelmäßig, rund, in der Größe normaler Tubuluszellkerne	nicht vergrößert	fast keine
2	im Vergleich zu normalen Tubuluskernen vergrößert, mäßige Form- u. Größenunterschiede	vergrößert	gelegentlich
3	beträchtlich vergrößert, ausgeprägte Polymorphie und Hyperchromasie	zum Teil stark vergrößert, oft Riesenzellen	oft atypisch

1.6 Therapie

Therapeutisch ist die operative Entfernung des tumortragenden Gewebes bzw. die totale Nephrektomie die erste Option. Unter kurativem Aspekt, also in metastasenfreien Stadien, wird eine radikale Nephrektomie mit Adrenalektomie, der Mitnahme der Nierenfettkapsel, des proximalen Ureters, der Exzision der umgebenen Faszie sowie einer regionalen Lymphadenektomie durchgeführt [6]. Ist eine komplette Entfernung des Tumors technisch machbar sollte eine Teilresektion vor allem bei (funktionellen) Einzelnieren angestrebt werden. Ist der Patient in einem schlechten Allgemeinzustand, kann versucht werden den Tumor durch lokal ablative Verfahren zu behandeln.

Nierenzellkarzinome sind nicht chemo-, sowie strahlensensibel, weshalb diesen Verfahren nur ein palliativer Charakter zur Tumormassenreduktion und zur Schmerzlinderung bei Metastasen zukommt [6]. Bei Rezidiven sowie in metastasierten Stadien werden heute zielgerichtete molekulare bzw. immuntherapeutische Ansätze verfolgt [7].

1.7 Prognose

Die Prognose des Nierenzellkarzinoms orientiert sich weitgehend an der Tumorstadieneinteilung nach UICC. Eine stattgehabte Metastasierung hat den entscheidenden Einfluss auf die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Diagnose eines Nierenzellkarzinoms. In nicht fernmetastasierten Stadien ist vor allem der Lymphknotenstatus für die Prognose wichtig [8].

2. RECK

2.1 RECK-Gen

Das RECK-Gen (reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs) wurde erstmals als ein Suppressor-Gen für durch onkogenes RAS induzierte Transformation isoliert. Es wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 identifiziert, ein Genlokus in dessen Bereich sich potentielle Tumorsuppressorgene befinden [10].

RECK erfüllt Aufgaben in physiologischen sowie pathophysiologischen Entwicklungsprozessen. Eine wichtige Aufgabe ist der koordinierte Ablauf der ständig stattfindenden Umbauprozesse der extrazellulären Matrix durch Inhibierung von Metalloproteinasen [11]. Die Konstanz dieser Prozesse ist entscheidend während der Phase der Embryogenese [11]. Ein stabiles Wachstum vor allem der Gefäße, sowie der Neuralrohrentwicklung, wird unter anderem durch die Wirkung von RECK sichergestellt [11]. Weiterhin hat RECK einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung und Invasivität maligner Prozesse sowie auf die Metastasierung von Tumoren.

2.2 Kennzeichen der Malignität

Maligne Tumore sind durch sechs grundlegende Eigenschaften gekennzeichnet [12].

1. Unabhängigkeit gegenüber Wachstumsfaktoren

2. Unempfindlichkeit gegen Hemmfaktoren

3. Immunität gegen Apoptose

4. unkontrolliertes Zellwachstum und Zellteilung

5. fortgesetzte Angiogenese

6. Gewebeinfiltration und Metastasierung

Bezug nehmend auf genannte Gewebeinfiltration und Metastasierung benötigen maligne Zellen drei im Modell postulierte Fähigkeiten [13]:
Sie benötigen die Fähigkeit Proteine der extrazellulären Matrix zu degradieren, sich an entsprechende Proteine anzulagern und wieder zu lösen sowie sich durch Defekte in der Matrix zu bewegen. Die Basalmembran des Organgewebes muss durchbrochen werden um ins

Gefäßsystem einzudringen und an anderer Stelle erneut auszutreten. Dort müssen sich die Tumorzellen in fremdem Gewebe ansiedeln und um großflächig invasives Wachstum zu gewährleisten zur Vaskularisierung befähigt sein. Nachfolgend beschriebene Metalloproteinasen scheinen eine entscheidende Bedeutung in der Gewebeinfiltration und Metastasierung von Tumorzellen zu haben.

2.3 RECK und Metalloproteinasen

RECK fungiert als Inhibitor von extrazellulär sezernierten oder an die Zellmembran gebundenen Enzymen, den sogenannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [14].

MMPs sind substratspezifische Endopeptidasen, die z.B. durch Spaltung von Peptidbindungen in der Lage sind, verschiedene Strukturen der extrazellulären Matrix abzubauen. Eine Zuordnung zur Gruppe der MMPs erfolgt neben genannter Funktionsweise auf Grund eines strukturell ähnlichen Aufbaus.

Bisher konnten beim Menschen 23 Enzyme, die den MMPs zuzuordnen sind, identifiziert werden. Sie werden nach ihrer Substratspezifität in verschiedene Untergruppen unterteilt [15]. Man unterscheidet Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und Membran-Typ MMPs (MT-MMP). Daneben gibt es noch einige MMPs, die keiner der 4 Klassen zugeteilt werden können [15]. Die MMPs werden extrazellulär sezerniert oder wirken an die Zellmembran gebunden (MT-MMPs) [14]. Die Sezernierung erfolgt bei allen MMPs in Form von inaktiven Vorstufen. Die Proteine enthalten in ihrer inaktiven Form eine sogenannte Pro-Domäne, deren Abspaltung für die Aktivierung notwendig ist [15].

Die Metalloproteinasen wirken in verschiedenen geweblichen Umwandlungsprozessen. Sie spielen eine Rolle in physiologischen Vorgängen, wie z.B. in der embryonalen und fetalen Entwicklung [16][17], sowie bei Wundheilungsprozessen [18]. Auch an pathologischen Vorgängen, die Gewebeumbauten bedingen, sowie an entzündlichen Veränderungen, sind sie beteiligt. So sind sie z.B. in zirrhotisch verändertem Lebergewebe [19] und bei chronischer Arthritis nachweisbar [20][21]. Eine entscheidende Bedeutung haben sie in der Tumorgenese.

MMPs führen sowohl zu einem Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) als auch eines wichtigen Bestandteils der Basallamina, dem Kollagen IV [22]. Dieser reduzierende Prozess ist, wie eingangs beschrieben, entscheidend für das invasive Wachstum sowie die

Metastasierung maligner Zellen durch Zerstörung der physiologischen Barrieren. Weiterhin haben die MMPs Effekte auf die Beweglichkeit und Adhäsion von Tumorzellen [23] und auf die Modulation angiogeneseinduzierender Substanzen wie den vasculären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial groth factor; VEGF) [24].
Die MMPs unterliegen der Kontrolle physiologischer Antagonisten, den „Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases“ (TIMPs). Diese hemmen ihre Aktivität und koordinieren so die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix. Bisher sind 4 verschiedene MMP Inhibitoren bekannt, die der Gruppe der TIMPs zugeordnet werden (TIMP 1-4) [15].

Trotz ihrer MMP hemmenden Funktion zeigen RECK und die Gruppe der TIMPs keine Ähnlichkeit in ihrem strukturellen Aufbau und zeigen andere Wirkungsweisen und Lokalisationen [17], so dass RECK nicht der Gruppe der TIMPs zugeordnet wird.

Nach derzeitigem Stand inhibiert RECK die MMPs -2,9 und MT1-MMP (MMP-14) [14]. MMP-2 und 9 sind Gelatinasen. Sie werden daher auch als Gelatinase A und B bezeichnet [15]. Sie sind in der Lage Kollagen IV und eine Vielzahl weiterer Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagen I,V,VII,IX,X, Elastin, Fibronectin, Laminin und Vitronectin) zu degradieren [22].
MT1-MMP ist ein Membran gebundenes zum Teil endosomal vorkommendes Enzym. Es aktiviert latente MMPs wie MMP-2 und MMP-13 und besitzt proteolytische Aktivität, wobei es Kollagen I und III sowie Fibronectin und Laminin abbaut [25].
Die Aktivierungskaskade von MMP-2 aus seiner latenten Form (Pro-MMP-2) wird von RECK direkt beeinflusst. Pro-MMP-2 wird durch Anlagerung an MT1-MMP in seine inaktive Vorstufe überführt. Bereits aktiviertes MMP-2 bewirkt rückkoppelnd die Aktivierung der inaktiven Vorstufe. RECK inhibiert diese Kaskade, indem es die genannten proteolytischen Aktivierungsschritte unterdrückt [26]. Die Wirkung von RECK auf MMP-9 sowie der genaue Ansatzpunkt im Bildungsprozess zwischen Translation und Sekretion an dem RECK hemmend auf die MMP-9 Bildung wirkt ist nicht abschließend geklärt [26]. Bekannt ist eine schwache Aktivität von RECK an pro-MMP-9 zu binden [22].

2.4 Einfluss auf die embryonale Entwicklung

Eine entscheidende Aufgabe scheint RECK vor allem in der embryonalen Entwicklungsphase zu haben. In Tierversuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von RECK zu

intrauterinem Fruchttod mit verminderter Substanz der Blutgefäße, des mesenchymalen Gewebes, sowie des Neuralrohrs führt. Eine erhöhte Aktivität von MMP-2 konnte hier nachgewiesen werden, welche sich auch in der Reduktion von Kollagen Typ I widerspiegelte [26].

2.5 RECK-Expression in malignen Tumoren

Während RECK in normalem Gewebe relativ hoch exprimiert wird kommt es bei einigen Tumorentitäten zu einer geringeren Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden Gewebe.
So wurde eine verminderte RECK-Expression im Prostatakarzinom nachgewiesen. Ein geringerer RECK-Nachweis war mit einem höheren Gleason Score und einem höheren pathologischen Tumorstadium (pT) assoziiert [27]. Ähnliche Ergebnisse konnten beim Kolonkarzinom [28] sowie beim Mamakarzinom [29] gefunden werden.

Weiterhin wurde der Zusammenhang der RECK-Expression zur Tumorinvasivität und Tumorprognose beim duktalen Pankreaskarzinom untersucht [30]. Hier zeigte sich, dass Tumoren mit hoher RECK-Expression eine signifikante Verringerung des invasiven Wachstums im Vergleich zu Tumoren mit niedriger RECK-Expression hatten und ebenfalls eine signifikant bessere Prognose aufwiesen. Des Weiteren war eine hohe RECK-Expression negativ mit der Aktivität der Metalloproteinase-2 korreliert.

2.6 RECK-Regulation

Clark et al.[11] fassten die verminderte Expression von RECK durch Beeinflussung der SP 1 Region im RECK-Promotorbereich zusammen. Grundsätzlich wurde eine direkte Bindung an die Sp 1 Region z.B. durch LMP-1, ein Produkt des Epstein Barr Virus, angeführt. Auch eine indirekte Beeinflussung durch Erhöhung der Affinität von an die Sp1 Region bindenden und diese beeinflussenden Proteinen wurde beschrieben.

Ein weiterer Ansatzpunkt war die Untersuchung einer Hypermethylierung des RECK-Promotors. Es konnten Zusammenhänge der geringeren Expression zur Höhe der Methylierung im Promotorbereich gefunden [31] und Auswirkungen auf die Tumorprognose [32] und Tumorinvasionstiefe [33] aufgezeigt werden.

2.7 DNA-Methylierung

Malignes Wachstum kann z.B. durch eine direkte Veränderung des Erbguts, also eine Veränderung der auf der DNA-Basenfolge codierten Information (z.B. Punktmutationen, Deletion) entstehen. Daneben können auch epigenetische Veränderungen wie eine DNA-Methylierung in den geordneten Zellmechanismus eingreifen und so zur Entstehung bzw. zum Voranschreiten tumoröser Prozesse beitragen. Es gibt drei Hauptmechanismen, die eine DNA-Methylierung mit der Karzinomentstehung in Verbindung bringen.

1. Die unten beschriebene Hypermethylierung in der Promotorregion eines Gens mit Inhibierung der Genexpression.

2. Eine Hypomethylierung, welche zu gesteigerter Aktivität von Proto-Onkogenen führt sowie

3. eine genomweite Hypomethylierung, die eine DNA Instabilität bewirken und damit die Grundlage für die Entstehung von Mutationen sein kann [34].

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine chemische Modifikation. Diese vollzieht sich an der Base Cytosin an Cytosin-Guanin Dinukleotiden (CpGs) [35]. Es werden Methylgruppen durch Methyltransferasen auf das Kohlenstoffatom C'5 der Base Cytosin kovalent übertragen [36] (Abb.1).

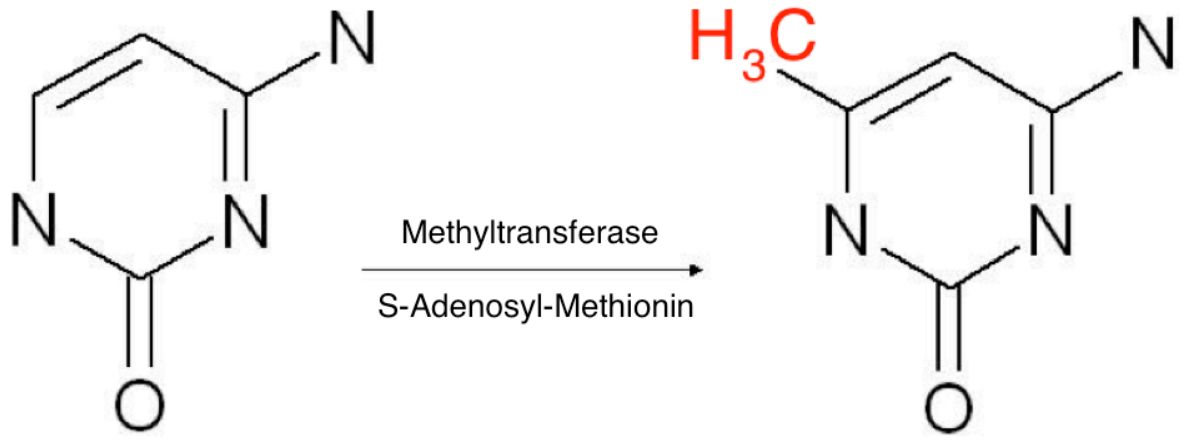

Abb. 1 Methylierung von Cytosin am 5 `C Atom und Bildung von Methylcytosin durch Methyltransferasen. S-Adenyl-Methionin dient als Methylgruppendonator.

CpGs finden sich über die gesamte DNA verteilt. Eine deutliche Häufung zeigen sie in sogenannten CpG Inseln, die aus ca. 0,5-5 kb bestehen [37] und vor allem in den Gen-Promotoren liegen. Physiologisch liegen ca. 70 % aller CpG Dinukleotide methyliert vor. Die meisten CpG Inseln sind jedoch nicht hypermethyliert. Die Gen-Methylierung ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrollierung der Expressionen eines Gens [38].

Kommt es zu einer gezielten Hypermethylierung der Dinukleotide in der Promotorregion des Gens kann die Transskription dessen gehemmt und damit die Funktion inhibiert werden (Abb.2). Dieser als „gene silencing“ bezeichnete Vorgang kommt nicht nur in onkogenen Prozessen, sondern auch physiologisch, z.B. bei der Inaktivierung des X Chromosoms bei Frauen vor [39].

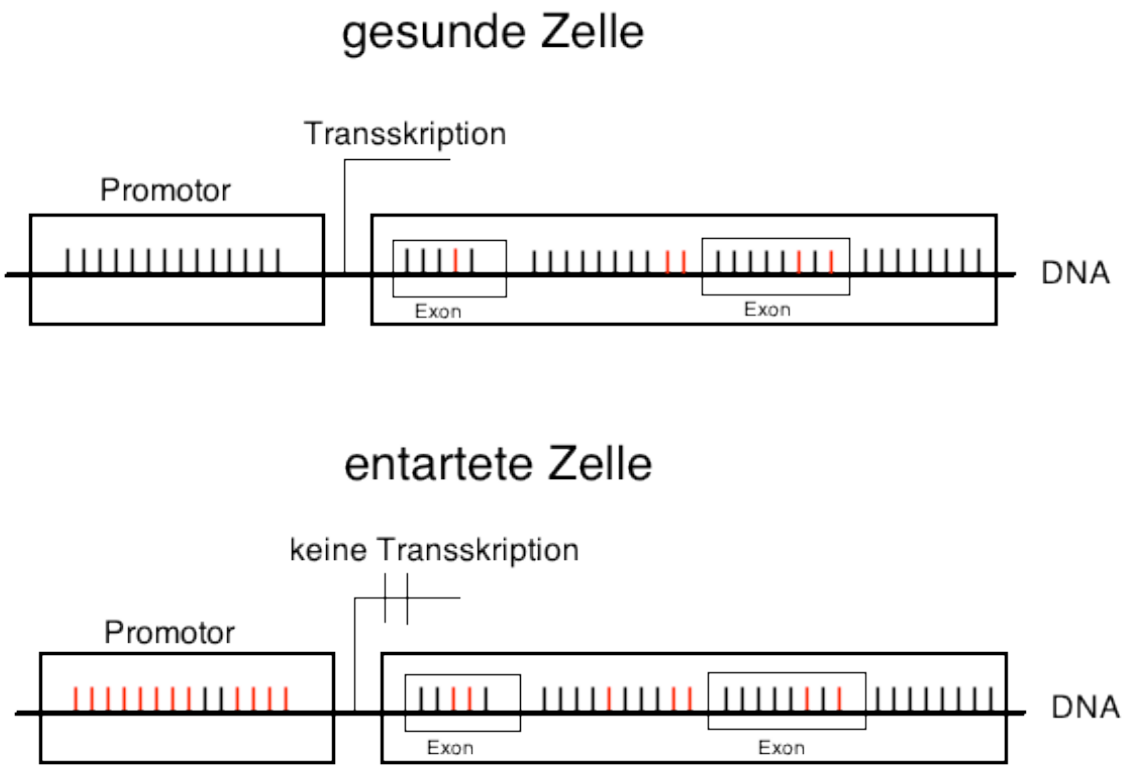

Abb. 2 Promotor-Methylierung eines Tumorsuppressorgens mit der Folge der Transskriptionshemmung: Die obere Abbildung zeigt eine gesunde Zelle. Hier liegen die CpGs vor allem in nicht methylierter Form (schwarz) vor. Methylierte CPGs (rot) finden sich überwiegend in nicht regulatorischen Bereichen und wirken stabilisierend. In der entarteten Zelle (untere Zelle) ist die Promotorregion hypermethyliert (CpGs rot). Die Transskription des Gens wird dadurch gehemmt oder verhindert.

2.8 Hypermethylierung als prognostischer und therapeutischer Ansatzpunkt

Der Nachweis einer DNA-Hypermethylierung in der Promotorregion von RECK könnte ein ergänzender diagnostischer sowie auch prognostischer Faktor sein, da anders als bei genetischen Mutationen die Hypermethylierung in definierten und damit leicht zu detektierenden Regionen abläuft. Auch eine Beeinflussung durch medikamentöse Regulierung der Methylierungsprozesse des RECK-Gens ist in vorangegangenen Studien untersucht worden und lieferte positive Ergebnisse [40]. Ziel muss es dabei sein eine Verringerung der Methylierung und damit eine Erhöhung der RECK-Expression zu erreichen.

2.9 Zusammenfassung

Das RECK-Gen codiert für ein Protein, das die Aktivierung der Metalloproteinasen MMP-2, -9 sowie MT1-MMP hemmt. Für RECK werden entscheidende Einflüsse sowohl auf die embryonale Entwicklung als auch auf das Wachstum, die Invasivität und die Metastasierung maligner Tumoren postuliert.

RECK wird bei verschiedenen Tumoren im Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden gesunden Gewebe geringer exprimiert [27, 28, 29, 30]. Diese Verminderung der RECK-Expression konnte teilweise in Zusammenhang mit einer Hypermethylierung des Gens in dessen Promotorregion als ursächlich in Verbindung gebracht werden [31]. Es zeigten sich signifikante Auswirkungen auf die Tumorprognose [32] und Tumorinvasionstiefe [34].

3. Ziel der Arbeit

In der Vergangenheit ist die Expression von RECK bei verschiedenen Tumorentitäten (z.B. im Prostata- , Colon- , Mamma- sowie Pankreaskarzinom) untersucht worden. Weiterhin wurde die Methylierung der Promotorregion untersucht (Kolon, Magen, orales Plattenzellkarzinom).

Zum derzeitigen Stand fehlen Studien die eine RECK-Methylierung sowie generell eine Expressionshemmung beim Nierenzellkarzinom darstellen.

Ziel dieser Arbeit ist es die Methylierung des RECK-Promotors im Nierenzellkarzinom zu quantifizieren, im Bezug zu klinisch pathologischen Parametern zu bewerten und mit Proben nicht tumorös verändertem Nierengewebe zu vergleichen.

Auf dieser Grundlage besteht die Aussicht einen potentieller Biomarker für Aggressivität und Voranschreiten der Karzinomerkrankung zu finden.

4. Arbeitsablauf

Folgende Arbeitsschritte wurden für die Messung der RECK-Methylierung beim Nierenzellkarzinom benötigt und sind nachfolgend dargestellt. Ergänzend zeigt Abbildung 3 die Schritte der Datenanalyse.

1. Gewinnung von Probenmaterial der Niere von Patient/in mit Nierenzellkarzinom (Normal-Gewebe N/ Tumor-Gewebe T)

2. Isolierung der genomischen DNA aus den gewonnenen Gewebeproben.

3. Behandlung der isolierten DNA mit Bisulfit.

4. Quantifizierung der Methylierung des RECK-Gen-Promotors bei Tumorgewebe und umliegendem Gewebe

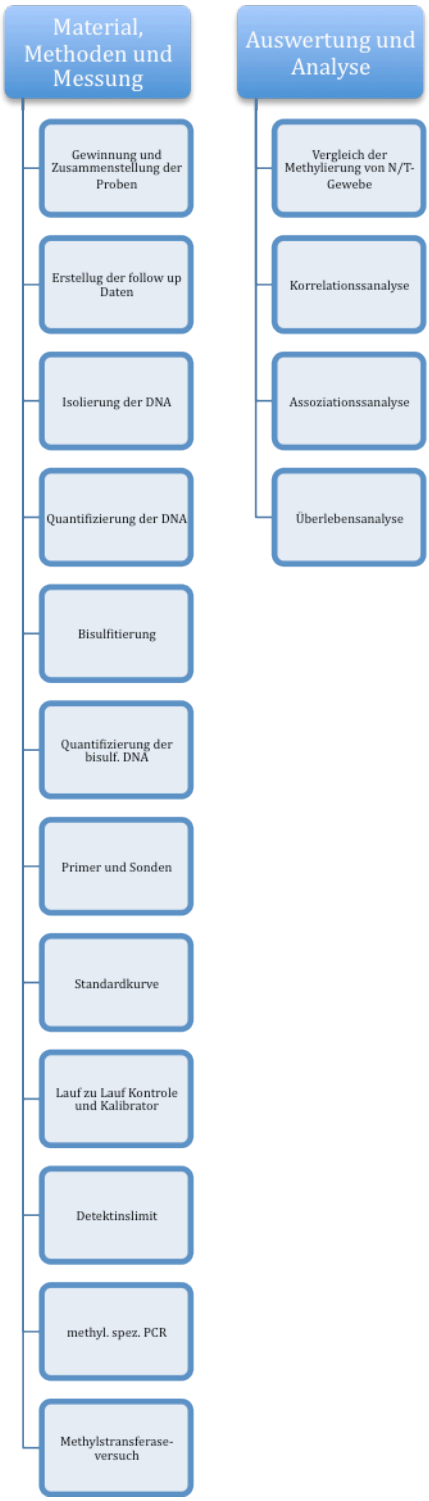

Abb. 3 Flussdiagramm; Arbeitsschritte zur Methlierungsmessung sowie Datenanalyse

II Materialien und Methoden

1. Patientenkollektiv

Das Kollektiv setzt sich aus 33 Patienten in einem OP-Alter zwischen 49 und 86 Jahren zusammen. Das mittlere Alter beträgt 65 Jahre bei einem Median von 64 Jahren. Es handelt sich um die Gewebeproben von 23 männlichen und 10 weiblichen Patienten. Die Patienten unterzogen sich bei stationärer Behandlung einer radikalen Nephrektomie in der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, im Zeitraum von 1995-2005. Die Patienten wurden nach stationärer Aufnahme entsprechend aufgeklärt und gaben ihre Zustimmung zu einer möglichen experimentellen Verwendung der Proben. Bei 32 Patienten handelte es sich um die Erstmanifestation eines Nierenzellkarzinoms. Eine Patientin war anamnestisch bereits auf Grund eines Nierenzellkarzinoms der anderen Niere nephrektomiert worden.

Die Tumore von 26 Patienten zeigten histologisch einen klarzelligen Typ. Sechs waren dem chromophilen und ein Karzinom dem sarkomatoiden Typ zuzuordnen. Bei 16 Patienten war der Tumor in der linken, bei 17 in der rechten Niere lokalisiert. Das Tumorvolumen wurde in cm^3 bestimmt. Es lag bei einem Mittelwert von 243,5 cm^3 zwischen 18,8 cm^3 und 923,8 cm^3. Bei fünf Patienten war zum OP-Zeitpunkt nebenbefundlich ein Karzinom welches auf ein anderes Ursprungsorgan zurückzuführen war vorhanden. Das Tumorstadium wurde nach den Richtlinien der Internationalen Union gegen Krebskrankheiten (UICC) auf histopathologischem Weg bestimmt und unterteilt. 11 Patienten zeigten ein pathologisches Tumorstadium (pT) I. Bei 10 Patientinnen lag das Stadium pT II vor. Eine weitere Unterteilung des pT-Stadiums III, dem 11 Patienten zugeordnet wurden, in jeweils a, b und c (wie in der WHO Klassifikation vorgenommen) wurde in der Auswertung auf Grund der geringen Anzahl der Fälle nicht berücksichtigt. Ein Patient hatte einen Tumor, der eine organübergreifende Ausbreitung (pT IV) zeigte. Zwei Tumore wurden histopathologisch als Grading (G) der Stufe I eingestuft. 22 Tumore zeigten anaplastische Veränderungen im Sinne von G II. Neun Tumore wurden als G III eingestuft. Vier Patienten zeigten zum OP-Zeitpunkt eine Fernmetastasierung. Bei zwei Patienten bestand der Verdacht auf eine pulmonale Metastasierung, die jedoch nicht sicher nachgewiesen und so in der Auswertung als metastasenfrei behandelt wurde. Eine noduläre Metastasierung wurde bei zwei Patienten nachgewiesen (Tab. 3).

Weiterhin wurden Daten zu möglichem postoperativen Versterben und postoperativer Überlebenszeit sowie dem Auftreten eines postoperativen Tumorrezidivs mit postoperativer Rezidivfreiheit erhoben. Für sechs Patientin konnten abschließend nicht alle genannten Daten erhoben werden.

Tabelle 3 verwendetes Patientenkollektiv

Anzahl der Patientenproben	33
Geschlecht	
männlich	23
weiblich	10
Mittleres Alter in Jahren	65
Median	64
Alterspanne in Jahren	49-86
pathologisches Tumorstadium:	
pT I	11
pT II	10
pT III	11
pT IV	1
Fernmetastasierung:	
M 0	29
M I	4
noduläre Metastasierung:	
N I	2
N 0	31
pathologisches Resektionsergebnis:	
R 0	33
R 1	0
Grading:	
G I	2
G II	22
G III	9

2. Reagenzien und Kits

Tabelle 4 zeigt die nachfolgend verwendeten Reagenzien und Kits.

Tabelle 4 Reagenzien und Kits

Name	**Hersteller**	**Katalog Nr.**	**Verwendungszweck**
QIAamp DNA Mini-Kit	Qiagen	51304	DNA Isolierung aus Gewebe
EpiTect Bisulfite	Qiagen	59104	Bisulfitierung
LightCycler Taqman Master	Roche	04535286001	Quantifizierung der methylierten DNA
CP-Genome Universal Methylated DNA Set	Chemicon	S 7821	Methyltransferaseversuch
CP-Genome Universal Unmethylated DNA Set	Chemicon	S 7822	Methyltransferaseversuch
Epitect PCR Control DNA Set	Qiagen	59695	Bestimmung des Detektionslimits

3. Bearbeitung der Proben

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Aus der operativ entnommenen Niere wurden unter makroskopischer Sicht geeignete tumoröse und nicht tumoröse Gewebestücke entnommen. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Gewebestücke bei -80 °C gelagert. Aus den gefrorenen Stücken wurden mit dem Frigocut 2800 E (Jung, Nussloch, Deutschland) jeweils ca. 30-40 25 µm breite Gefrierschnitte angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden zur genomischen DNA-Isolierung verwendet.

3.2 Isolierung genomischer DNA

Die DNA wurde entsprechend dem Protokoll des QIamp DNA Mini-Kits für Gewebeproben und Zellkulturzellen isoliert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.3 Zellkultivierung

Die Methylierungsmessung durch die methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion erfolgte auch an der Zelllinie LNCaP, welche humanem Prostatakarzinom entstammt. Diese wurde zur Opimierung bzw. als Kontrolle und Kalibrator in der PCR-Messung eingesetzt. Die Zelllinie LNCaP wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Es wurde die individuelle Empfehlung der American Type Culture Collection (ATCC) zur Zellkultivierung beachtet. Diese wurde durch die medizinisch technische Assistenz der urologischen Forschung der Charité-Berlin (Campus Mitte) durchgeführt und für nachfolgende Versuche zur Verfügung gestellt. Die gefroren gelagerten Zellen wurden aufgetaut und mit RPMI-1640 Medium (Gibco, Fa.Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchmischt. Das Pellet wurde mit 12 ml RPMI-1640-Medium mit 10% fetalem Kälberserum und Penicillin sowie Streptomycin resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (75 cm^2, Fa NUNC GmbH, Wiesbaden, Deutschland) überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 Gehalt der Luft kultiviert bis eine Konfluenz von ca. 80% erreicht wurde. Die adhärenten Zellkulturen wurden anschließend mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Tryptin/ 0,02% EDTA) abgelöst. Zur Unterscheidung zwischen vitalen und

toten Zellen wurden diese mit Tryptanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl lebender Zellen bestimmt [41].

3.4 Konzentrationsbestimmung

Quantitative Nukleinsäurebestimmung:

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA wurde nach Auftauen unter Raumtemperatur und Durchmischung der Probe mit dem NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer (Fa. Nanodrop Technologies, Willington, DE, USA) durchgeführt.

Die Bestimmung beruht auf dem Prinzip der photometrischen Messung. Es wurden nachfolgend 1,2 µl DNA jeder Probe pro Messung verwendet. Die DNA wurde in Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Anhand der ermittelten Extinktion wurde die Konzentration nach dem Verhältnis der Absorptionseinheit 1 OD bei A 260 nm = 50 µg doppelsträngiger (ds) DNA und dementsprechend:

C (µg DNA) / ml = A 260*50 µg errechnet.

Eine Kontamination der DNA durch Alkohol oder Proteine wurde anhand des Verhältnisses zwischen der Absorbtion für Proteine bei 280 nm und der gemessenen Wellenlänge bei 260 nm bestimmt.

260 nm / 280 nm

Ein Wert nahe 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung. Ein signifikant kleinerer Wert spricht für eine Verunreinigung.

Ein weiterer Indikator für Verunreinigungen ist das Verhältnis der Konzentrationswerte bei **230 nm / 260 nm,** welches bei 0,45 liegen sollte.
Anhand graphischer Darstellungen des Absorptionspektrums zwischen 220 nm und 350 nm lassen sich ebenfalls eventuelle Verunreinigungen erkennen.

4. Bisulfitierung

4.1 Grundlage der Bisulfitreaktion

Eine Methylierung findet im Rahmen einer epigenetischen Modifikation vor allem an der DNA-Base Cytosin (C) insbesondere in Cytosin-Guanin (CpG) Dinukleotiden statt. Um eine Methylierung der DNA-CpGs zu detektieren wurde die DNA mit Natriumbisulfit behandelt. Unmethyliertes Cytosin in CpG Abschnitten wurde hierbei in die Base Uracil umgewandelt. Falls der DNA-Abschnitt methyliert war, verhinderte die gebundene Methylgruppe die Umwandlung in Uracil und das Cytosin blieb bestehen (Tab. 5).

Die quantitative Messung der Methylierung erfolgte mittels der unten beschriebenen Real-Time PCR. Es fand eine anhand eines entsprechenden Primers definierte Messung der methylierten DNA-Abschnitte statt.

Tabelle 5 Bisulfitreaktion

	Orignal Sequenz	bisulfitierte DNA
Unmethylierte DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Methylierte DNA	N-**C-G**-N-**C-G**-N-**C-G**-N	N-**C-G**-N-**C-G**-N-**C-G**-N

In der Original Sequenz sind die CpGs rot dargestellt. Nach der Bisulfitreaktion bleiben die methylierten CpGs erhalten (fett schwarz). Die unmethylierten Cytosine werden durch die Reaktion mit Natriumbisulfit in die Base Uracil (grün) umgewandelt.

4.2 Ausführung

Die Bisulfitierung wurde entsprechend des Protokolls des oben aufgeführten Kits (EpiTect Bisulfit, Qiagen) durchgeführt. Die aufgeführten Komponenten und Lösungen entstammen dem Bisulfitkit.

1. Bisulfitierung

Die gefrorenen DNA-Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Bisulfitmix-Aliquots wurden jeweils durch 800µl RNase freies Wasser ergänzt und durch vortexen vollständig gelöst.

Die Bisulfitierung erfolgte in 0,2 ml PCR-Röhrchen und umfasste die in Tabelle 6 dargestellten Komponenten.

Tabelle 6 Reaktionskomponeten der Bisulfitreaktion

Komponente	**Volumen in µl**
Proben DNA 1 µg	variabel*
RNase freies Wasser	variabel*
Bisulfit Mix	85
DNA protect Puffer	35
Gesamtvolumen	**140**

*DNA und RNase freies Wasser mussten zusammen 20 µl ergeben. Es kamen jeweils 1 µg DNA zum Einsatz.

Die Bisulfitierung wurde mit einem Thermocycler (entsprechend in Tabelle 7 dargestellt) durchgeführt.

Tabelle 7 Bisulfitierung im light cycler®

Stufe	**Zeit in min**	**Temperatur in ° C**
Denaturierung	5	99
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	99
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	99
Inkubation	175	60

2. Lösen der DNA

Die bisulfitierten DNA-Proben wurden jeweils mit einer Pufferlösung (560 µl Puffer BL) sowie 5,6 µl Carrier RNA durch vortexen vermischt. Die Lösung wurde dann auf eine Membran in spezielle Epitect Säulen überführt. Durch den Puffer und die Carrier-RNA wurde die bisulfitierte DNA an der Membran der Säule fixiert und anschließend über mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte entsprechend dem oben genannten Protokoll gereinigt. Abweichend zum Protokoll kam es zu einer Modifikation nach dem letzten Waschschritt um einen höheren Ertrag an bisulfitierter DNA zu erreichen. Jede Probe wurde mit 500 µl 100 % Ethanol vermengt und für eine Minute auf voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen und die Säule erneut 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde bis zum vollständigen Trocknen für 5 Minuten bei 56°C inkubiert. Die auf der Membran fixierte DNA wurde durch Zugabe von 30 µl EB Puffer gelöst. Das erhaltene Eluat wurde, ebenfalls vom Protokoll abweichend für einen zweiten Elutionsschritt verwendet um einen höheren Ertrag an bisulfitierter DNA zu erreichen.

5. DNA-Quantifizierung

5.1 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR beruht auf der Grundlage der Polymerasekettenreaktion (PCR). Hierbei wird ein DNA-Abschnitt über Primer definiert in einer enzymatischen Rektion millionenfach vervielfältigt und danach das Produkt mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung dargestellt.

Bei der Real-Time PCR kommt es mit Hilfe von messbaren Fluoreszenzsignalen zu einer Quantifizierung des gewonnenen DNA-Produkts während des PCR-Laufes. Die Messung findet in der exponentiellen Phase der PCR statt. Diese umfasst nur wenige Zyklen. Abschließend kann anhand des CT-Wertes (engl.: cycle threshold), auch CP-Wert (engl.: crossing point), die Konzentration der eingesetzten Menge an zu amplifizierender DNA bestimmt werden. CT-Wert und Konzentration verhalten sich hierbei (über eine bekannte Konzentration an DNA als Vergleichswert ins Verhältnis zueinander gesetzt) umgekehrt proportional zueinander.

Bei der herkömmlichen PCR mit „end-point Datenanalyse“ ist keine Aussage über die genaue Quantität des Ausgangsproduktes möglich, es kann nur eine semiquantitave Aussage über das

Vorhandensein eines Ausgangsproduktes z.B. mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung getroffen werden.

Mittels der Real-Time PCR wird die Konzentration methylierter DNA (primerspezifisch markiert) in den Messproben bestimmt. Wie oben beschrieben diente die Bisulfitreaktion hierbei der Demaskierung der methylierten Abschnitte.

Eine PCR besteht aus verschiedenen Arbeitsschritten:

Zuerst kommt es in der Denaturierungsphase zu einem Erhitzen der DNA. Die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die komplementären DNA-Stränge verbinden, trennen sich auf. In der zweiten Phase lagern sich die Primer an die jeweiligen DNA-Abschnitte an. In der Elongationsphase (Amplifizierungsphase) füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden beginnend am angelagerten Primer auf. Die Phasen einer PCR werden als Zyklen bezeichnet und werden während eines PCR Laufes mehrfach wiederholt. In der letzten Phase wird der Reaktionsansatz wieder abgekühlt.

In der Real-Time PCR werden PCR-Produkte über Fluoreszenzsignale detektiert. Sequenzunspezifisch mittels SYBR Green, oder sequenzspezifisch über fluoreszenzmarkierte Sonden, sogenannte Taq Man Sonden [42]. Taq Man Sonden sind kurze DNA-Stücke, die sich an einen Bereich des zu bestimmenden primermarkierten DNA-Abschnitts anlagern. Sie bestehen aus einem Reporterfarbstoff sowie einem Quencheranteil. Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen [42].

Während der Quantifizierung durch die DNA-Polymerase wird die Sonde abgebaut, was dazu führt, dass der Quencher die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs nicht mehr unterdrücken kann und diese frei wird. Die Fluoreszenz kann nun ermittelt werden (Abb. 4). Sie steigt in einem proportionalen Verhältnis mit den zu quantifizierenden spezifischen DNA-Strängen an. Die Spezifität der Messung unter Gebrauch einer definierten Taq Man Sonde zeigt sich darin, dass die Fluoreszenz nur frei und messbar wird, wenn wirklich der definierte DNA-Strang verdoppelt wurde [42].

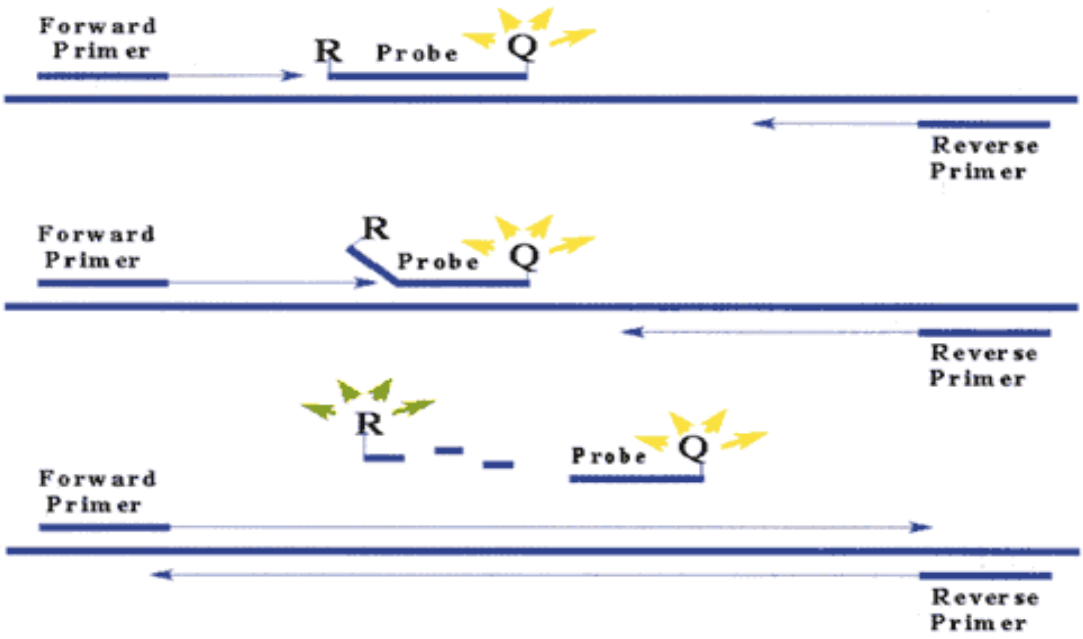

Abb. 4 (Roche©) Während der Synthetisierung kommt es durch die Taq-Polymerase zu einem Abbau der Taq Man Sonde. Dadurch wird die Reporterefloreszenz durch den Quencher nicht mehr unterdrückt und kann gemessen werden. [42]

Um die Real-Time PCR Daten quantitativ auswerten zu können legt man eine typische PCR Kinetik zu Grunde, bei der es ausschließlich in der exponentiellen Phase unter optimalen Bedingungen zu einer konstanten Verdopplung der Ausgangsmenge in jedem Zyklus kommt. Dies entspräche einer Effizienz von 100 %.

Folgende Gleichung beschreibt bei diesen Verhältnissen den Zusammenhang von eingesetzter Menge und Amplifikat:

$$\mathbf{P\ (Produktmenge)\ =\ A\ (Ausgangsmenge)\ x\ E\ (Effizienz)^{CT}}$$

Linearisieren und Umformung ergeben die Gleichung der Standardkurve:

$$\mathbf{CT = (1 / \log E) \times \log A + (\log P / \log E)}$$

Die Menge des zu bestimmenden DNA-Templates wird anhand des CT-Wertes bestimmt. Dieser beschreibt den Zyklus der PCR bei dem die Fluoreszenz erstmalig über die vorhandene Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert) steigt.
Er ist umso höher, je geringer die Ausgangskonzentration des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts in der Probe war, verhält sich also umgekehrt proportional zur eingesetzten

Ausgangskonzentration. Dementsprechend kann nach Umformen aus oben genannter Gleichung, anhand des CT Wertes, die Ausgangskonzentration bestimmt werden.

5.2 Primer und Sonden für RECK

Um die Methylierung der RECK-Promotorregion mittels PCR quantifizieren zu können, bedurfte es der Auswahl spezifischer Primer. Dahingehend wurde sich an Primern, welche bei der Untersuchung der Methylierung des RECK-Promotors im Kolonkarzinom zum Einsatz kamen, orientiert [31]. Bei deren Einsatz enthielt das zu replizierende DNA-Fragment des RECK-Promotorbereichs insgesamt 195 Basenpaare und beinhaltete darin 23 CpGs.

Weitere Primer wurden von Tib Molbiol (TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin, Deutschland) konzipiert.

Für die Durchführung der Real-Time PCR war weiterhin der Einsatz einer Taq Man Sonde nötig. Diese wurde ebenfalls von Tib Molbiol konzipiert und basierend auf der mit Bisulfit behandelten Sequenz des RECK-Promotorbereichs entworfen (Tab. 8).

Tabelle 8 Primer und Sonde für RECK

Primer[31]:	
RECK sense Primer 1	5`-AATAAAgAgTTTTggTACggggTAC-3`
RECK antisense Primer 2	5`-AAAACCgCgAAATACTCgAA-3`
Primer von Molbiol (TIB Molbiol,Berlin,Germany)**:**	
RECK sense Primer 3	5´-ggTACgTTTTCgTTTTgggA-3`
RECK antisense Primer 4	5´-TCgAACCCAACTTAACCgCA-3`
Taq Man Sonde	5´-FAM-TACCgCCgCTACCgCCgC-BBQ-3`

Tabelle 9 Primer und Sonde für ß-Actin

ß-Actin sense Primer ß-Actin antisense Primer	5` TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG 3` 5`AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA 3`
Taq Man Sonde	5`6FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACAXT--PH 3`

Zur Überprüfung der Spezifität der RECK-Primer wurde eine Temperatur-Gradienten-PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt bei Einsatz der Primer 1 und 2 (Tabelle 8) [31] wurde mit den von TIB Molbiol konzipierten Primerpaaren nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel verglichen (Abb. 5-6). Durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid (lagert sich interkalierend in die DNA ein) konnten Unterschiede in der Konzentration der PCR-Produkte bei Betrachtung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Entscheidungsparameter für das optimale Primerpaar waren:

- größtmögliche Methylierungsspezifität

- größtmögliche Menge an gewünschtem Produkt

- möglichst keine Nebenprodukte

Das PCR-Produkt der Primer 1 und 2 zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel die größte Spezifität für die gewünschte Amplifizierung.

Eine deutliche Produktbande in der elektophoretischen Auswertung der PCR zur Quantifizierung methylierter DNA unter Verwendung des Primerpaares 1 und 2 war erkennbar (Abb. 5). Die Primer lieferten kein Korrelat (keine Bande) nach PCR-Quantifizierung mit unmethylierter DNA (Abb. 6).

Diese Ergebnisse waren für die Verwendung entscheidend, da die Fragestellung auf die Quantifizierung der Methylierung des Promotors zielte und die Primer daher methylierungsspezifisch sein mussten. Die anderen getesteten Primerkombinationen waren, wie zu sehen ist, weniger spezifisch.

Ein weiterer Faktor, der auf das PCR-Produkt wirkt, ist die Reaktionstemperatur. Diese hat z.B. einen entscheidenden Einfluss auf die Effektivität der Primeranlagerung an die zu quantifizierende DNA. In genanntem Versuch lag die optimale Reaktionstemperatur bei 61,5°C.

Auch die Störung durch entstandene Nebenprodukte war bei genannter Primerkombination am geringsten.

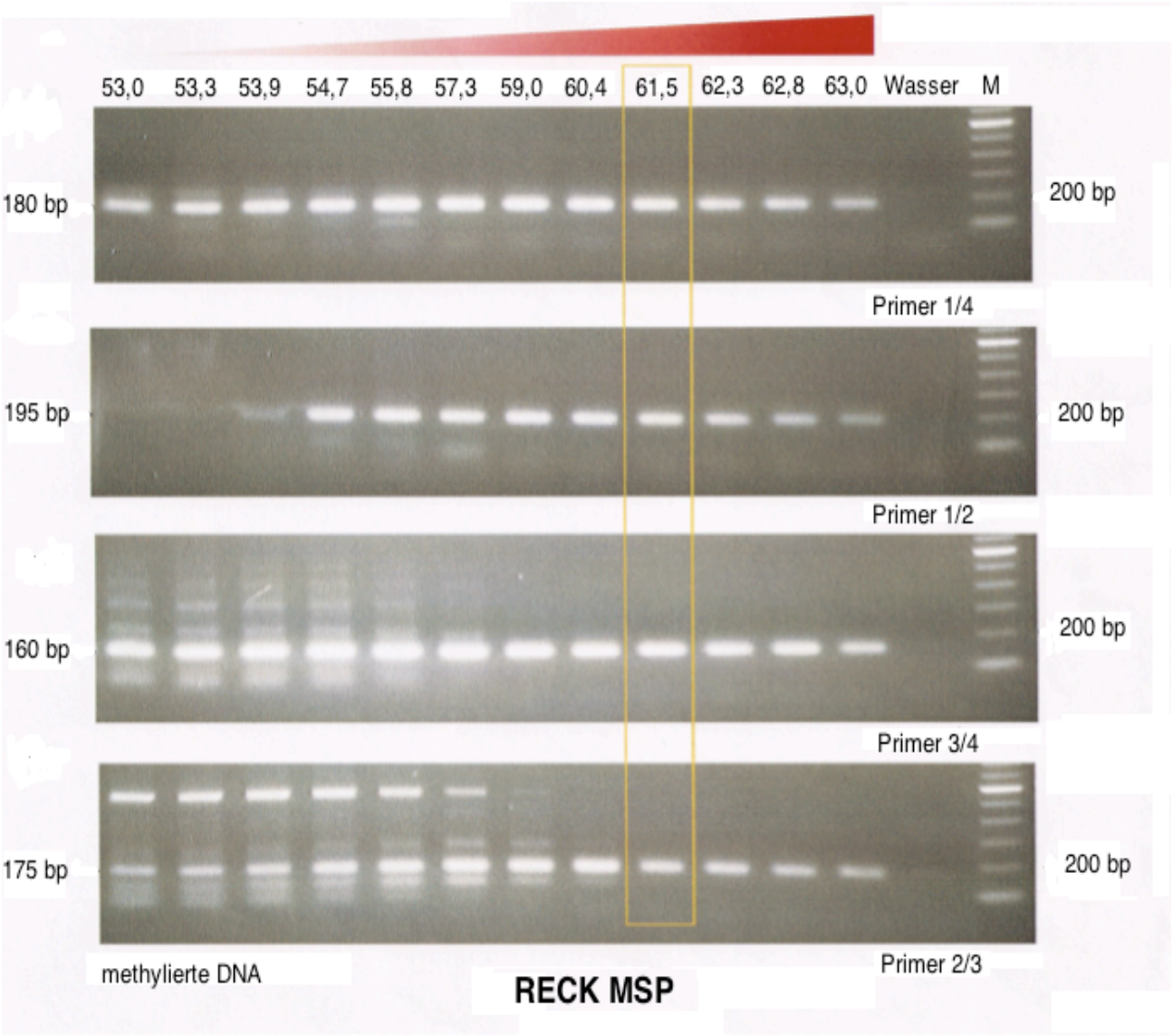

Abb. 5 Elektrophorese methylierter DNA: elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte verschiedener Primerkombinationen bei Quantifizierung methylierter DNA in einer methyl. spez. PCR. Zur Verwendung kam das Paar 1/2. Wasser lief als Negativkontrolle (enthält keine DNA) mit und durfte keine Bande geben; Optimierung der PCR Temperatur

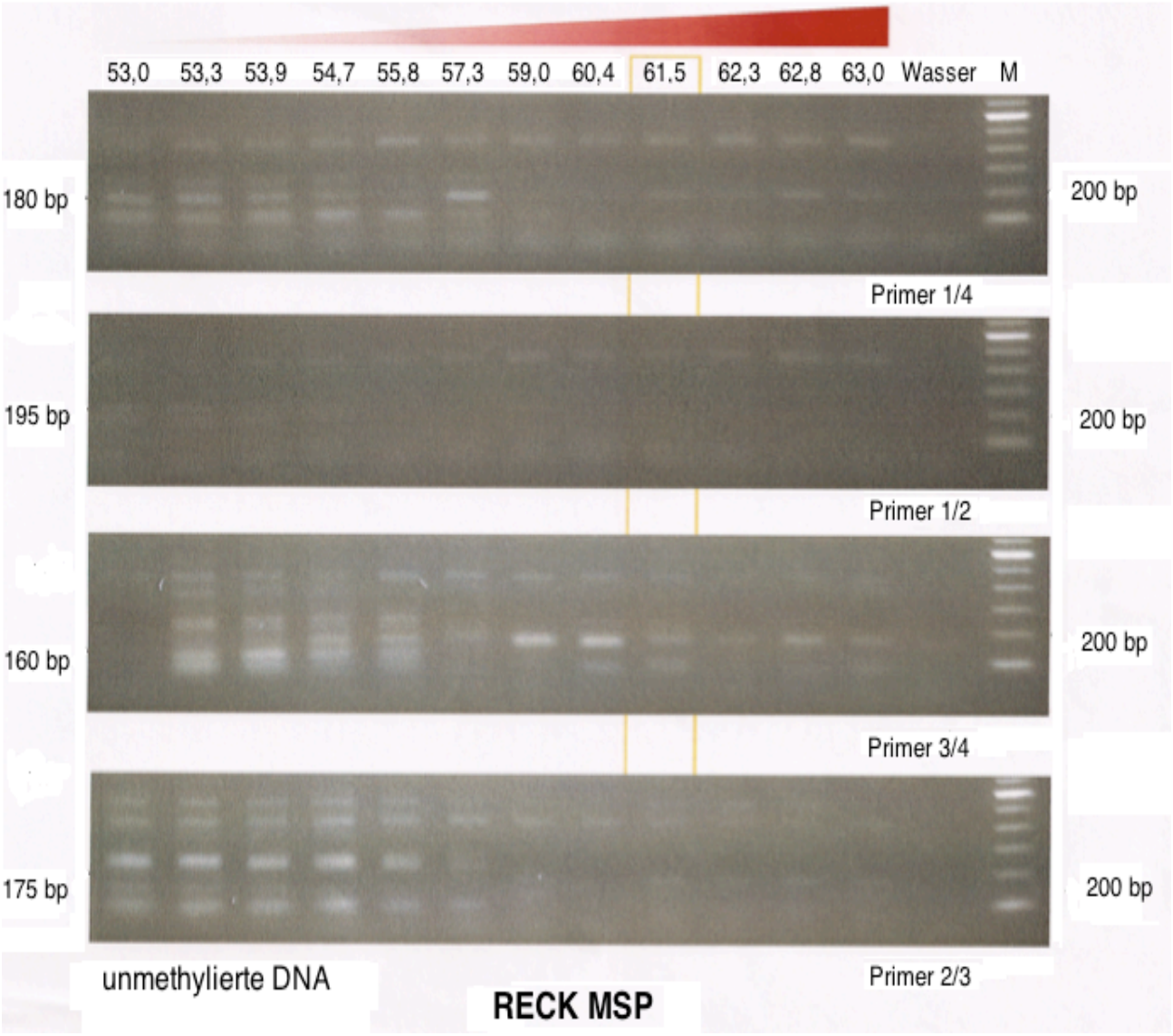

Abb. 6 Elektrophorese unmethylierter DNA: elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte verschiedener Primerkombinationen bei Quantifizierung unmethylierter DNA in einer methyl. spez. PCR. Zur Verwendung kam das Paar 1/2. H_2O lief als Negativkontrolle (enthält keine DNA) mit und durfte daher keine Bande geben; Optimierung der PCR Temperatur

5.3 Durchführung der Real-Time PCR

5.3.1 RECK

Tabelle 10 Programmeinstellungen der Real-Time PCR (RECK)

Programm	Segment Nummer	Temperatur in °C	Zyklen	Aqui. Mod	Slope In °C/sec	Zeit in sec
Aktivierung	1	95	1	-	20	600
	1	95		-	20	10
Amplifikation	2	61	45	-	20	30
	3	72		einfach	20	1
Abkühlung	1	40	1	-	20	30

Tabelle 11 Messansatz des Real-Time PCR Laufs (RECK)

einfacher Messansatz	
Mastermix RECK *	7,5 µl
Bisulfitierte DNA	2,5 µl

* **Mastermix RECK in einfachem Ansatz:** H_2O : 4,9 µl ; Taq Man Master Mix: 2 µl; sense Primer 10 µM: 0,25 µl; antisense Primer 10 µM: 0,25 µl (Tabelle 8, Primer 1+2); Sonde 10 µM: 0,1 µl (Tabelle 8)

5.3.2 ß-Actin

Tabelle 12 Programmeinstellungen der Real-Time PCR (ß-Actin)

Programm	Segment Nummer	Temperatur in °C	Zyklen	Aqui. Mod	Slope In °C/sec	Zeit in sec
Aktivierung	1	95	1	-	20	600
	1	95		-	20	10
Amplifikation	2	58	45	-	20	30
	3	72		einfach	20	1
Abkühlung	1	40	1	-	20	30

Tabelle 13 Messansatz des real-time PCR Laufs (ß-Actin)

einfacher Messansatz	
Mastermix ß-Actin*	7,5 µl
Bisulfitierte DNA	2,5 µl

***Mastermix ß-Actin in einfachem Ansatz:** H_20 : 4,5 µl; Taq Man Master Mix: 2 µl; sense Primer 10 µM: 0,45 µl; antisense Primer 10 µM: 0,45 µl (Tabelle 9, Primer 1+2); Sonde 10 µM: 0,1 µl (Tabelle 9)

Der Taq Man Master Mix wurde entsprechend des in Tabelle 4 genannten Protokolls (LightCycler Taqman Master, Roche) aufbereitet und verwendet. Er enthält die weiteren notwendigen PCR Komponenten (Taq Polymerase, Desoxyribonucleosid-triphosphat, $MgCl_2$, Reaktionspuffer).

5.4 Erstellung der Standardkurve

Die Effizienz einer PCR ist nicht grundlegend konstant. Aus diesem Grund muss sie vor der Messung von unbekannten Proben durch Messreihen ermittelt werden. Wie rechnerisch dargestellt ist sie entscheidend für die Bestimmung einer Konzentration.
Sie wird über die Erstellung einer Standardkurve bestimmt.

Die Standardkurve stellt einen linearen Zusammenhang zwischen CT-Wert und Konzentration der eingesetzten DNA her.
Zur Erstellung der Standardkurve wurde voll methylierte DNA (mDNA; CpGenome; siehe Tabelle 4) mit bekannter Ausgangskonzentration schrittweise verdünnt und primerspezifisch amplifiziert.
Im Fall von RECK wurde mDNA der Konzentration 20 ng/µl in den Stufen 1:2,1:5,1:10,1:100 und 1:1000 verdünnt. Die lineare Beziehung zwischen den PCR Messergebnissen bei verschiedenen Verdünnungsstufen der mDNA und den entsprechenden CT-Werten ergab eine Gerade, die als Regressionsgerade oder Standardkurve bezeichnet wird (Abb. 7).
Die Effizienz (E) der PCR wurde über die Steigung (slope) dieser Geraden bestimmt [41].
$E = 10^{-1/slope}$
Definitionsgemäß ist sie bei 100%, was einem Wert von 2,0 entspricht, wenn in jedem Zyklus der PCR die Amplifikate verdoppelt werden. Das heißt, dass bei jeder eingesetzten Konzentration eine konstante Amplifizierung stattfindet.
Um die Konzentration des methylierten RECK-Promotors in unbekannten Proben zu bestimmen wurden mit Hilfe der Standardkurve (Abb. 7) über mitgeführte Standardproben (Kalibratoren) die gemessenen CT-Werte in Beziehung zur gesuchten Ausgangskonzentration der Proben gesetzt.

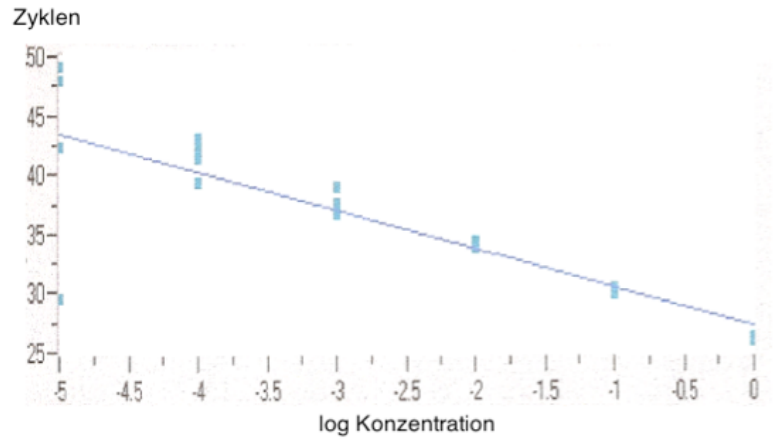

Abb. 7 Standardkurve einer Real-Time PCR: Ordinate: CT-Werte der verschiedenen mDNA-Verdünnungsstufen; Abszisse: log Konzentration

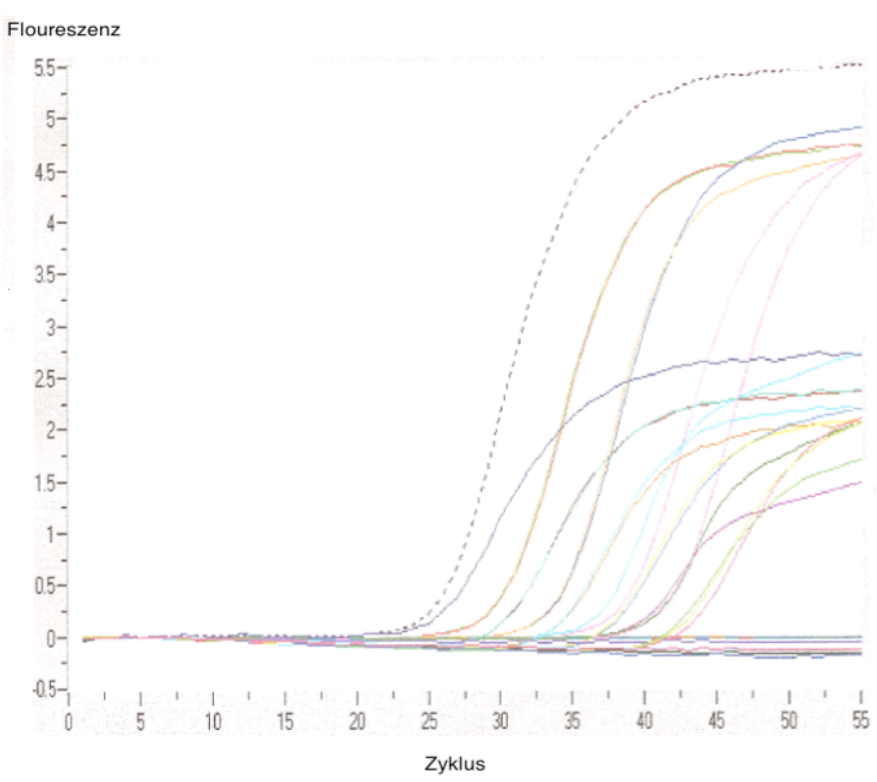

Abb. 8 Fluoreszenzanstieg während der Real-Time PCR Messung ; Ordinate: ansteigende Fluoreszenz der verschiedenen Verdünnungsstufen; Abszisse: Zyklenanzahl; dargestellt ist die Entwicklung des Amplifizierungssignals bei fortlaufenden PCR-Zyklen. Wasser läuft als interne Kontrolle mit und darf kein Amplifizierungssignal liefern (spricht für Verunreinigungen).

5.5 Relative Quantifizierung der Genexpression

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf ein in der gleichen Probe gemessenes Referenzgen bezogen (normalisiert).

Zielgen / Referenzgen = relative Genexpression *(Normalisierung des Ergebnisses)*

Als Referenzgen wird ein im Zellzyklus nicht reguliertes und damit homogen exprimiertes Gen gewählt. Durch die Normierung wird versucht Unterschiede der einzelnen Proben untereinander z.B. durch Gewebe oder Matrixeffekte zu verringern und sie damit vergleichbar zu machen. Konzentrationsunterschiede von in der Messung eingesetzter DNA werden somit ausgeglichen. GaPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon-Untereinheiten und ß-Actin sind häufig verwendete Referenzgene. Es wurde das Referenzgen ß-Actin verwendet.

Nachfolgend aufgeführte Konzentrationswerte sind als bereits normalisiert zu betrachten.

Beispiel:

0,048 (kalkulierte Konzentration RECK) / 0,955 (kalkulierte Konzentration ß-Actin) = 0,050 (normalisiert)

5.6 Herstellung des Kalibrators und der Lauf-zu-Lauf-Kontrolle

Um die verschiedenen Läufe einer PCR beim Messen unterschiedlicher Proben miteinander vergleichen zu können bedarf es der Herstellung einer Lauf-zu-Lauf-Kontrolle (LzL-Kontrolle) und eines Kalibrators.

Die LzL-Kontrolle macht die einzelnen PCR-Läufe miteinander vergleichbar. Wichtig ist ihre konstante Konzentration im Laufe verschiedener PCR Messungen. Sie dient der objektiven Kontrolle der Messungen. Systematische Fehler (z.B. die Zusammensetzung des Master Mix, falsche Geräteeinstellungen) sollen detektiert und vermieden werden.

Der Kalibrator eicht die PCR-Messung mittels Vorgabe dessen Konzentration. Die Berechnung der Konzentrationen unbekannter Proben wird möglich.

Für die Herstellung der LzL-Kontrolle wurde ein Pool der PCR Produkte der Proben, die für die Erstellung der Standardreihe verwendet wurden eingesetzt. Dieser Pool wurde nach oben

genanntem Protokoll von Qiagen gereinigt und die Konzentration der amplifizierten DNA am Nano Drop bestimmt.

Der Kalibrator wurde aus dem Pool mit einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl in einer Verdünnung von $1:1x10^{-7}$ (Kalibrator 1, CT-Wert: 32) verwendet. Für die LzL-Kontrolle wurde eine Verdünnung von $1:2x10^{-7}$ (LzL-Kontrolle 1, CT Wert: 34) verwendet. Die CT-Werte der PCR-Produkte dieser Verdünnungen lagen innerhalb des Messbereichs der Standardkurve und Nahe den Konzentrationswerten der Proben des Messkollektivs. Sie eigneten sich daher für die genannten Aufgaben. Wie im Ergebnisteil beschrieben kam es im Verlauf zu einem Abbau der DNA aus verwendetem Pool, sodass ein neuer Kalibrator sowie eine neue LzL-Kontrolle hergestellt werden mussten.

5.7 Detektionslimit

Um die Leistungsfähigkeit eines verwendeten Assays quantifizieren zu können, bedarf es der Bestimmung des Detektionslimits. Dieses zeigt an, in welchem Verhältnis methylierte DNA zu unmethylierter DNA vorliegen darf, um noch sicher bestimmt werden zu können. Die Kenntnis dessen ist entscheidend, da die zu detektierende methylierte DNA in Gewebeproben meist in sehr geringer Menge, im Vergleich zu vorhandener unmethylierter DNA vorliegt. Im Vergleich zum analytischen Detektionslimit auf das hier nicht näher eingegangen werden soll, wird vom relativen Detektionslimit gesprochen.

Zur Bestimmung wurde methylierte DNA in unterschiedlichen Verhältnissen mit unmethylierter DNA vermengt und die Methylierung durch Messung in der Real-Time PCR bestimmt (Epitect PCR control DNA Kit ; Tabelle 4).

Tabelle 14 Bestimmung des Detektionslimits

methylierte DNA c: 10 ng/µl	unmethylierte DNA c: 10 ng/ µl	Anteil methylierter DNA	Bestimmung in Real-Time PCR
1. 100%	0%		1-fach
2. 10%	90%	1:10	2-fach
3. 1,0%	99%	1:100	2-fach
4. 0,4%	99,6%	1:250	5-fach
5. 0,2%	99,8	1:500	3/5-fach
6. 0,1%	99,9	1:1000	3-fach

Mischverhältnis methylierter zu unmethylierter DNA für die Bestimmung des relativen Detektionslimits

1. PCR Lauf: Messung der Ansätze 1,2,3,5 und 6. Der Messbereich der PCR reichte bis zu einem CT-Wert von 41.

2. PCR Lauf: Messung der Ansätze 4 und 5 jeweils in 5-fach Bestimmung mit erweitertem Messbereich

Beide Messungen erfolgten wie unter 5.3 beschrieben.

5.8 Methyltransferaseversuch

Zur Bestimmung des Methylierungsmaximums der verwendeten Proben sowie einer Kontrolle der Probenqualität wurden zwei Proben des Messkollektivs (Normal- und Tumor-Gewebe) mit Methytransferase behandelt, wodurch eine komplette Methylierung der DNA erreicht werden sollte. Nach anschließender Bisufitierung wurde die Promotormethylierung in der Real-Time PCR bestimmt. Als Kontrolle wurde kommerziell erworbene unmethylierte DNA (CpGenome unmethyliert; Tabelle 4) methyliert und ebenso wie erworbene voll methylierte DNA (CpGenome methyliert; Tabelle 4) in der PCR gemessen.

Durchführung:

Der Ansatz für die Methylierung enthielt nukleasefreies Wasser, NE-Buffer 2 (enthält 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol), SAM (S-Adenosylmethionin), DNA sowie die Methyltransferase (M.SssI, BioLabs, New England). Zum Durchmischen des Ansatzes wurde dieser sechsmal auf und ab pipettiert. Zum Einsatz kamen jeweils 500 ng DNA (Tabelle 15).

Tabelle 15 Methylierungsansatz (Methyltransferaseversuch)

Menge	Einheit	Reagenz
x	µl	Nuklease-freies Wasser
2	µl	10 x NE-Buffer 2
2	µl	10 x SAM
x	µl	DNA
1	µl	Ssssl Methyltransferase
20	µl	gesamt

Tabelle 16 Proben (Methyltransferaseversuch)

Proben		DNA µl	H20 µl
1	Cp Genome unm.	5	10
2	Cp Genome unm. (kein Enzym)	5	10
3	Probe N (c:125,74 ng/µl)	4	11
4	Probe T (c:147,52 ng/µl)	3,4	10,6

die Proben enthalten jeweils 500 ng DNA

Die Proben wurden für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert (Probe 2 ohne Methyltransferase). Die Reaktion wurde durch Erhitzen aller Proben auf 65 °C für 20 Minuten gestoppt.

Nach erfolgter Methyltransferasebehandlung wurden die Proben nach oben genanntem Protokoll (siehe 4.2.) bisulfitiert. Wie unter 4.2 beschrieben wurde der letzte Waschschritt abweichend vom Protokoll modifiziert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der bisulfitierten Proben am Nano Drop Photometer bestimmt. Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte wie in 5.3 beschrieben jeweils für RECK sowie ß-Actin.

Es wurden jeweils in Doppelbestimmung in der Real-Time PCR gemessen:

1. Methyltransferase behandelte CpGenome (unmethyliert)
2. Unbehandelte CpGenome (unmethyliert)
3. CpGenome (methyliert)
4. Kollektivprobe N-Gewebe (Methyltransferase behandelt)
5. Kollektivprobe T-Gewebe (Methyltransferase behandelt)
6. Kollektivprobe N-Gewebe (unbehandelt)
7. Kollektivprobe T-Gewebe (unbehandelt)

6. Datenverarbeitung und Statistik

Der erste Schritt der Datenverarbeitung umfasste die deskriptive Statistik. Es wurden Patientendaten erhoben, die neben tumorspezifischen (pT, Grading, noduläre Metastasierung, Fernmetastasierung) auch Kennzeichen wie OP-Alter, Geschlecht, sowie postoperative Patientenentwicklung erfassten. Nachfolgend wurden Zusammenhänge zwischen den erhobenen klinischen sowie Tumor beschreibenden Parametern zu den Messwerten der Methylierungsanalyse untersucht.

Im zweiten Teil wurde ein Vergleich zwischen der Methylierung der Tumor- und Normalgewebeproben gezogen.

6.1 Datenanalyse mit SPSS

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 18 (SPSS inc, Chicago, Michigan, USA) analysiert.

Anhand des Kolmogorov-Smirnov Tests wurde überprüft ob vorliegende Daten normalverteilt waren um dementsprechend die notwendigen analytischen Tests zu verwenden.
Unter Verwendung des genannten Tests gilt eine Variable als normalverteilt wenn der Test einen deutlich nicht signifikanten p-Wert > 0,005 zeigt. Das bedeutet, dass die Variable nicht signifikant von der Normalverteilungsform abweicht.

Für den Datenvergleich der in der Real-Time PCR gemessenen Methylierung wurden die mit ß-Actin relativierten RECK-Werte verwendet.

Die Korrelationsanalyse wurde unter Verwendung der Korrelation nach Pearson sowie der Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Diese gibt Aussage darüber ob ein statistischer Zusammenhang zwischen zwei Variablen besteht bzw. über die Stärke und Richtung dessen. Der Einsatz des entsprechenden Tests richtete sich nach dem vorliegenden Skalenniveau sowie einer möglichen Normalverteilung der zu analysierenden Variablen.

Assoziationen wurden anhand von Kreuztabellen mittels Chi-Quadrat-Tests und Fishers exaktem Test analysiert.

Ein Einfluss der erhobenen Parameter sowie der Messwerte auf das Überleben und die Rezidivfreiheit wurde nach Kaplan-Meier untersucht. Bei dieser Methode kann das Messkollektiv nach einem dichotomen Faktor (z.B. Rezidiv ja/nein) unterteilt werden. Die Analyse beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Ereignis (z.B. Tod/Rezidiv) mit voranschreitender Zeit nicht auftritt.

Der Paarvergleich des malignen und normalen Gewebes wurde mit dem Statistikprogamm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) berechnet. Der Vergleich erfolgte mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Signed-Rank-Test für gepaarte Daten.

III Ergebnisse

1. Qualitätssicherung

Im Folgenden sind die Maßnahmen zur Qualitätssicherung der Methylierungsstudie dargestellt. Dazu gehörte eine ständige Wartung, Pflege und Überprüfung der technischen Geräte sowie der Pipetten.

1.1 Überprüfung der NanoDrop Messung

Die Präzision der Messungen mit dem verwendeten Photometer wurde in der Dissertation Ohl, F. [41] durch Vergleichsmessungen überprüft und weiterführend regelmäßig intern kontrolliert.

1.2 Messung der verwendeten DNA Proben am NanoDrop Photometer

Die 33 verwendeten DNA Proben wurden auf ihre Konzentration und Reinheit, basierend auf dem Absorptionsquotienten 260 nm zu 280 nm, untersucht. Bei den Proben aus Normalgewebe ergab sich ein Mittelwert der Quotienten von 1,89 mit einer Standardabweichung von ± 0,05. Das Tumorgewebe hatte einen gemittelten Quotienten von 1,85 ± 0,05. Die DNA Proben waren damit rein und zeigten keine Verunreinigungen durch Lösungsmittel sowie Proteine.

Ihre gemessene Konzentration lag bei einem Mittelwert von 107,6 ng/µl ± 29 ng/µl für das Normal-Gewebe und 119,9 ng/µl ± 33 ng/µl für das Tumor-Gewebe. Die eingesetzten Proben unterschieden sich damit untereinander in ihrer Ausgangskonzentration an isolierter DNA (Tabelle 17).

Tabelle 17 Konzentration isolierter DNA

Probe	N-Gewebe in ng/ul	T-Gewebe in ng/ul	260/280 N	260/280 T
1	96,6	144	1,96	1,85
2	218	115	1,93	1,95
3	86,3	117	1,87	1,89
4	95,3	127	1,84	1,87
5	79,3	137	1,88	1,85
6	125	147	1,9	1,92
7	81,1	86,75	1,83	1,85
8	79,6	93,3	1,83	1,81
9	87,5	120	1,88	1,91
10	102,5	116	1,84	1,85
11	147	85,9	1,83	1,86
12	102	75,5	1,91	1,83
13	93,4	115	1,89	2
14	137	116	1,95	1,83
15	92,8	104	1,94	1,86
16	132	215	1,98	1,82
17	151	143	1,92	1,81
18	96,9	90,8	1,9	1,83
19	124,9	105	1,9	1,92
20	100	95,1	1,92	1,75
21	75	80	1,92	1,84
22	84,9	86	1,89	1,83
23	86,7	85	1,89	1,84
24	86,8	89,7	1,93	1,84
25	128	93,1	1,95	1,89
26	79	151	1,83	1,82
27	122	199	1,89	1,78
28	119	146	1,91	1,78
29	86,5	139	1,87	1,86
30	100	121	1,77	1,83
31	109	186	1,9	1,87
32	115	133	1,93	1,79
33	130	100	1,9	1,8
Mittelwert	**107,6**	**119,9**	**1,89**	**1,85**
St. Abw.	**29**	**33**	**±0,05**	**±0,05**

Konzentration isolierter DNA sowie deren Absorptionsquotienten nach Messung am NanoDrop Photometer

2. Standardkurve und Effizienz

Wie unter 5.4 beschrieben war für die Konzentrationsmessung der Kollektivproben die Erstellung einer Standardkurve sowie die Berechnung der Effizienz der Real-Time PCR notwendig. Sie wurde im Messversuch für RECK mit E=1,97 ermittelt. Der Slope lag bei -3,392. Die Standardkurve für RECK repräsentierte einen Bereich bzw. ein CT-Wert Intervall von 29 bis 38 Zyklen.
Die Effizienz der ß-Actin PCR lag bei 2,0. Der Slope lag bei -3,305. Die Standardkurve umfasste einen CT-Bereich von 25,5 bis 35,5 Zyklen (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18 PCR Effizienz

	RECK	ß-Actin
Effizienz	1,97	2
Slope	-3,392	-3,305
Bereich Standardreihe (CT-Wert)	29-38	25,5-35,5

3. DNA-Messung nach Bisulfitbehandlung

Für die Bisulfitreaktion wurde jeweils 1 µg DNA eingesetzt. Nach erfolgter Reaktion wurde die DNA-Konzentration der einzelnen Proben am NanoDrop Photometer bestimmt. Hierbei lag der Mittelwert der gemessenen DNA Proben bei 14 ng/µl mit einer Standardabweichung von ± 7,3 ng/µl für die N-Gewebe-Proben und bei 12,3 ng/ µl ± 3,9 ng/µl für die T-Gewebe Proben.

Die Mindestmenge der für eine auswertbare Real-Time PCR-Messung benötigten DNA-Menge wurde in Anlehnung an vorangegangene laborintern durchgeführte Untersuchungen auf 7,0 ng/ µl festgelegt. Die verwendeten Proben erfüllten dieses Kriterium (Ausnahme Probe 23 mit T-Gewebe = 6,7 ng/µl nach Bisulfitreaktion).

Tabelle 19 DNA-Konzentration nach Bisulfitierung

Probe	N-Gewebe in ng/µl	T-Gewebe in ng/µl
1	17,00	11,00
2	17,50	15,60
3	17,63	6,70
4	23,90	15,60
5	17,45	18,58
6	14,27	11,64
7	20,86	16,11
8	25,25	16,89
9	17,71	9,21
10	23,77	15,00
11	23,87	11,32
12	11,71	8,53
13	13,70	15,50
14	11,89	16,77
15	7,93	13,36
16	7,50	18,40
17	9,60	7,90
18	10,9	10,06
19	12,1	11,00
20	8,82	7,59
21	7,16	11,80
22	10,54	12,03
23	8,68	6,65
24	8,21	13,40
25	8,65	7,34
26	18,90	12,10
27	14,80	14,20
28	8,21	13,40
29	13,24	10,44
30	23,73	18,64
31	10,40	8,10
32	9,28	8,60
33	7,88	12,29
Mittelwert	**14,0**	**12,3**
St. Abw.	**± 7,3**	**± 3,9**

4. DNA-Abbau bei Lauf-zu-Lauf-Kontrolle und Kalibrator

Die Lauf-zu-Lauf-Kotrolle und der Kalibrator (Materialien und Methoden, 5.6) zeigten zunehmend eine Abnahme der DNA-Konzentration. Wie in Tabelle 20 und 21 dargestellt nahmen die CT-Werte bei fortlaufenden Messungen stetig zu. Eine Zunahme des CT-Wertes von 3 Zyklen bedeutet eine Abnahme der Konzentration von ca. $1x10^{-1}$.

Es zeigte sich eine Zunahme des CT-Wertes von 32.01 während der ersten Messreihe bis auf 38.60 bei der letzten (Kalibrator). Damit kam es zu einer Abnahme der Konzentration durch Abbau der DNA von über $1x10^{-2}$. Da eine konstante Konzentration an DNA in der Probe erforderlich ist mussten ein neuer Kalibrator sowie eine neue LzL-Kontrolle verwendet werden, um die Richtigkeit der weiteren Messungen nicht zu gefährden.

Im Folgenden ist die Entwicklung der PCR-Läufe bezüglich der Konzentration des Kalibrators sowie der LzL dargestellt (Tabelle 20-21/ Abb. 8-9).

Tabelle 20 Abbau Kalibrator (RECK)

Lauf	Datum	CT-Wert
1	13.10.2009	32,01
2	23.10.2009	32,29
3	29.10.2009	32,80
4	06.11.2009	32,91
5	17.11.2009	38,31
6	17.11.2009	38,60

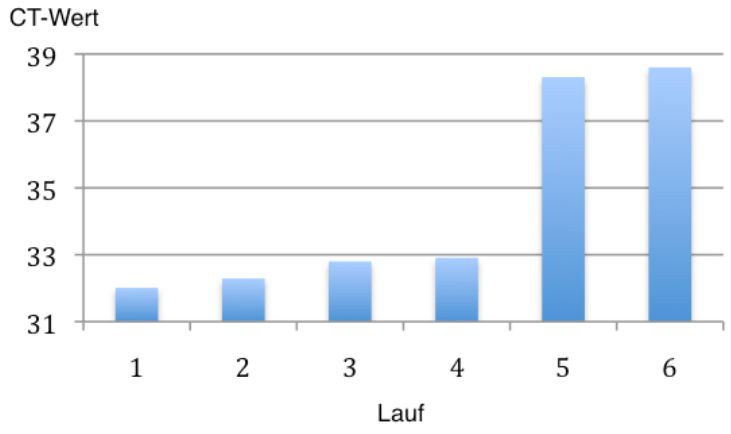

Abb. 9 Abbau der DNA des Kalibrators, verwendet in der Verdünnung 1:2 x 10^{-7} bei RECK
Ordinate**:** CT-Werte; Abszisse: Messläufe 1-6

Tabelle 21 Abbau LzL-Kontrolle (RECK)

Lauf	Datum	CT-Wert
1	13.10.2009	33,96
2	23.10.2009	35,19
3	17.11.2009	36,27
4	17.11.2009	36,78
5	26.11.2009	41,00

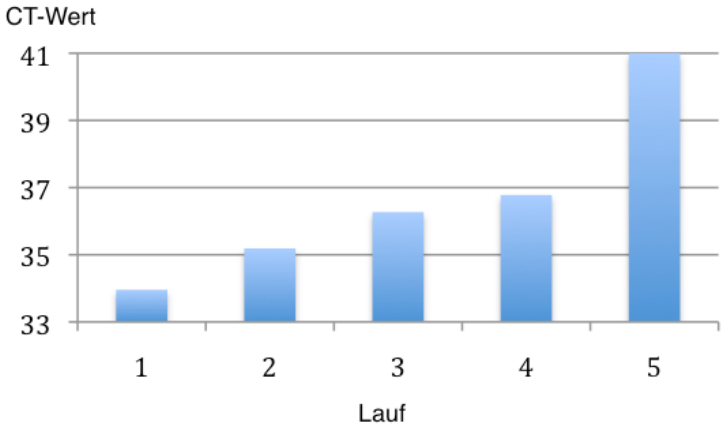

Abb. 10 Abbau der DNA der Lauf-zu-Lauf-Kontrolle, verwendet in der Verdünnung 1:2 x10 $^{-7}$ bei RECK
Ordinate**:** CT- Werte; Abszisse: Messläufe 1-5

5. Herstellung eines neuen Kalibrators und einer Lauf zu Lauf Kontrolle

Aufgrund oben beschriebener Probleme war die Herstellung eines neuen Kalibrators und einer neuen LzL-Kontrolle nötig.

Die Methylierung des RECK-Promotors in der Zelllinie LNCap sowie in universal GpGenome methylated DNA (siehe Tabelle 4) wurden in der Lightcycler-PCR in verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen. Es wurden die Verdünnungsstufen 1:5 und 1:10 der eingesetzten Zelllinie miteinander verglichen. Da der Anteil von methyliertem RECK-Promotor in LNCaP (Konzentration 20 ng/µl) zu gering war, lagen die Messwerte außerhalb des Messbereichs der Standardreihe. LNCaP wurde daher nicht für die Herstellung eines Kalibrators sowie einer LzL-Kontrolle genutzt. Es wurde zukünftig methylierte DNA (CpGenome der Konzentration 20 ng/µl) in einer Verdünnung von 1:5 als Kalibrator und in einer Verdünnung von 1:10 als Lauf-zu-Lauf-Kontrolle verwendet.

Tabelle 22 neuer Kalibrator und neue LzL-Kontrolle

Messgröße	**kalkulierte Konzentration**	**Ct-Wert**
mDNA (20 ng/µl) 1:10	7.1240E-02	32.85
CpGenome (20 ng/µl) 1:5	2.685E-01	30.89
CpGenome (20 ng/µl) 1:10	1.3678E-01	31.89
LnCap (20 ng/µl) 1:2	1.010E-03	38,48
LnCap (20 ng/µl) 1:5	1.224E-03	39.22

Bei der Etablierung der ß-Aktin-PCR kam es ebenfalls zu einem DNA-Abbau (Tabelle 23-24/ Abb.11-12). Entsprechend wurden ein neuer Kalibrator sowie eine neue LzL-Kontrolle hergestellt. LNCap wurde nachfolgend in der Konzentration 20 ng/µl in einer Verdünnung von 1:5 als Kalibrator (CT-Wert: 27,27 ; kalk. Konzentr.: $3{,}934x10^{-1}$) und bei 1:10 Verdünnung (CT-Wert: 28,25 ; kalk. Konzentr.: $1{,}96x10^{-1}$) als Lauf-zu-Lauf-Kontrolle verwendet.

Tabelle 23 Abbau Kalibrator (ß-Actin)

Lauf	Datum	CT-Wert
1	20.10.2009	23,94
2	23.10.2009	23,97
3	24.10.2009	25,03
4	24.11.2009	25,26

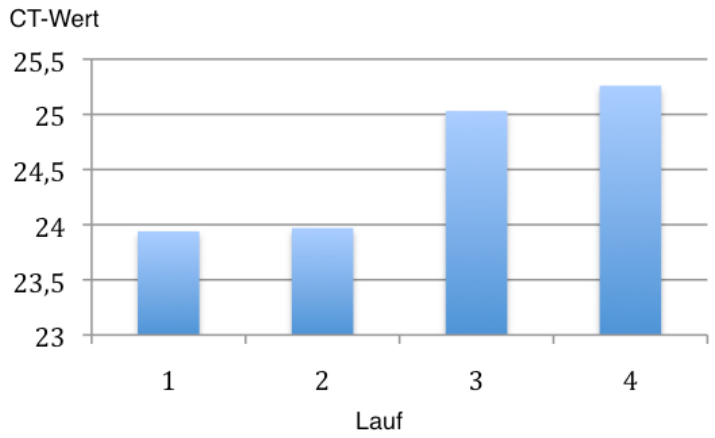

Abb. 11 Abbau der DNA des Kalibrators bei ß-Actin verwendet in der Verdünnung 1:10 $^{-7}$
Ordinate: CT-Werte; Abszisse: Messläufe 1-4

Tabelle 24 Abbau Lauf zu Lauf Kontrolle (ß-Actin)

Lauf	Datum	CT-Wert
1	20.10.2009	24,36
2	23.10.2009	26,14
3	24.10.2009	27,01
4	24.11.2009	28,44

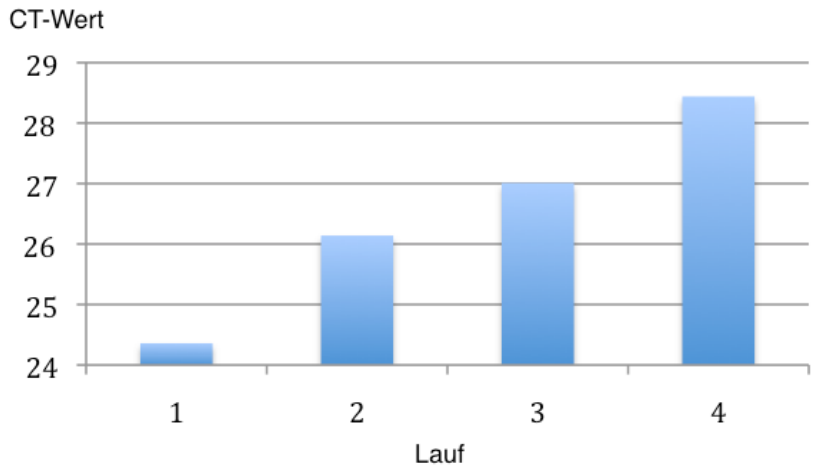

Abb. 12 Abbau der Lauf zu Lauf Kontrolle bei ß-Actin verwendet in der Verdünnung 1:2 x10^{-7}
Ordinate: CT-Werte; Abszisse: Messläufe 1-4

6. Detektionslimit

Zur Bestimmung des Detektionslimits wurden methylierte und unmethylierte DNA der Konzentration 10 ng/µl unter Gebrauch des Epitect Control DNA-Kits (Tabelle 4) in verschiedenen Verhältnissen vermengt und die Methylierung durch Messung in der Real-Time PCR bestimmt.

Die Messungen der beiden Verdünnungen 1:10 sowie 1:100 der voll methylierten DNA (industriell erzeugt, Epitect Control DNA-Kits;Tabelle 4) in Doppelbestimmung lieferten jeweils sichere Messwerte. Höher verdünnte Proben (1:500, 1:1000 in 3-fach Bestimmung) waren nicht sicher zu bestimmen, da sie außerhalb des programmierten PCR-Messbereiches mit einem CT-Wert von 41 lagen (Tabelle 25/Abb.13). Um zu bestimmen, ob das Detektionslimit höher als bei einer Verdünnung von 1:100 lag, wurde der PCR-Messbereich erweitert und eine weitere Verdünnungsstufe hinzugefügt.

Die anschließende Messung einer Probe mit dem Gehalt von 0,4% methylierter und 99,6% unmethylierter DNA (1:250) in 5-fach Bestimmung lieferte sichere Messwerte um einen mittleren CT-Wert von 40,71 (nach Erweiterung des Messbereiches). Bei der 5-fach Bestimmung der Verdünnung 1:500 lagen die Messwerte trotz der weiteren Verdünnung (weniger messbare DNA) ebenfalls um einen mittleren CT-Wert von 40,63, sodass in der PCR kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Verdünnungsstufen detektiert werden konnte (Tabelle 26/Abb.14).

Tabelle 25 1. Lauf

Verdünnung der mDNA	CT-Wert
unv.	30,70
1:10	34,96
Repli. of 1:10	34,46
1:100	38,05
Repli. of 1:100	38,61
1:500	>41
Repli. of 1:500	>41
Repli. of 1:500	>41
1:1000	>41
Repli. of 1:1000	>41

Tabelle 26 2. Lauf

Verdünnung der mDNA	CT-Wert
1:250	40,53
Repli. of 1:250	40,54
Repli. of 1:250	40,73
Repli. of 1:250	41,04
1:500	40,08
Repli. of 1:500	40,65
Repli. of 1:500	40,65
Repli. of 1:500	41,15

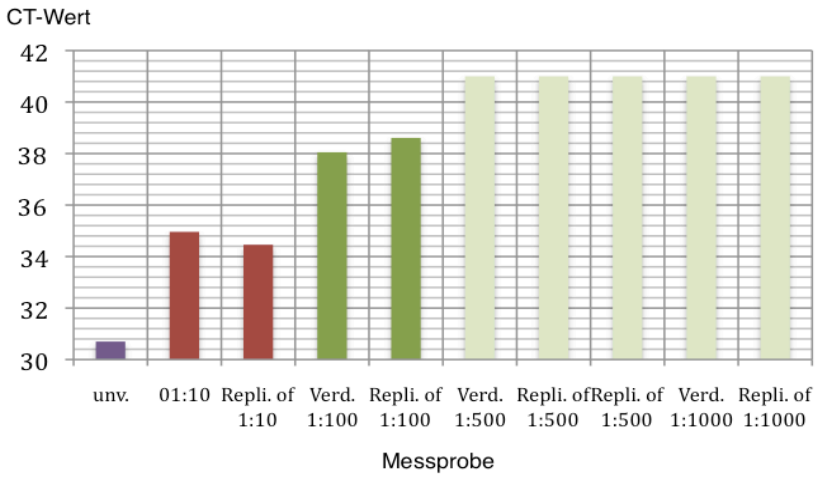

Abb. 13 Detektionslimit: 1. PCR Lauf: Abszisse: CT Werte; Ordinate: Verdünnungsstufen der mDNA in Mehrfachbestimmung. Die Verdünnungen von 1:500 sowie 1:1000 liegen außerhalb des Messebereichs der PCR und können nicht sicher bestimmt werden.

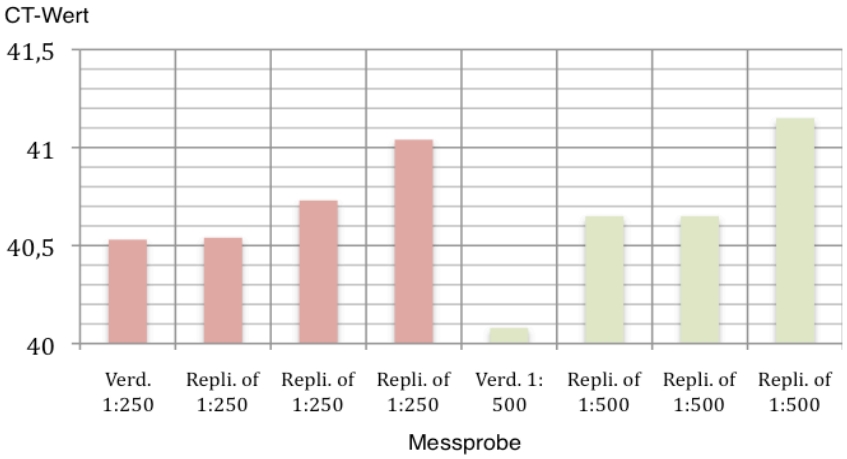

Abb. 14 Detektionslimit: 2. PCR Lauf: Nach Erweiterung des PCR Messbereichs; Abszisse: CT Werte; Ordinate: Verdünnungsstufen der mDNA in Mehrfachbestimmun. Trotz der weiteren Verdünnung von 1:250 auf 1:500 kann kein signifikanter Anstieg der CT-Werte gemessen werden.

Das Detektionslimit (sichere Nachweisgrenze) musste daher um diesen CT-Wert liegen und wurde wie folgt berechnet:

Detektionslimit:

Mittelwert der CT-Werte + 2 x Standardabweichung (bei der Verdünnung 1:250)

Es ergab sich für das Detektionslimit ein CT-Wert von **41,19**.

Messproben mit einem Anteil methylierter DNA um 0,4% waren mit der verwendeten Methode sicher zu messen und lagen unter einem CT-Wert von 41,19. Dieser stellte damit die sichere Nachweisgrenze dar. Lag weniger methylierte DNA in der Messprobe vor konnte der Assay kein genaues Messergebnis mehr liefern.

Proben des Probenkollektivs mit einem CT-Wert über 41,19 waren damit nicht auswertbar, da sie über der ermittelten sicheren Nachweisgrenze des verwendeten Assays lagen.

7. Auswertung der Real-Time PCR-Messwerte

Die Proben des untersuchten Kollektivs wurden in Doppelbestimmung gemessen und deren Mittelwert zur weiteren Auswertung verwendet.

Wie oben erwähnt wurden die PCR-Messwerte der RECK-Messungen zur Normierung auf die jeweiligen ß-Actin Werte bezogen. Nachfolgend aufgeführte Werte sind damit Relativwerte.

Tabelle 27 PCR Messergebnisse

Probe	RECK	ß-Actin	RECK/ß-Actin
1N	3,25E-02	9,87E-01	3,29E-02
1T	8,65E-03	2,58E+00	3,35E-03
2N	1,80E-02	9,02E-01	2,00E-02
2T	6,47E-03	1,40E+00	4,62E-03
3N	4,82E-02	9,55E-01	5,05E-02
3T	1,85E-02	3,71E-01	4,98E-02
4N	1,13E-01	1,74E+00	6,47E-02
4T	4,70E-02	1,16E+00	4,05E-02
5N	3,49E-02	1,33E+00	2,63E-02
5T	1,37E-02	1,33E+00	1,03E-02
6N	8,23E-02	1,22E+00	6,73E-02
6T	8,77E-02	8,73E-01	1,01E-01
7N	4,47E-02	1,27E+00	3,51E-02
7T	7,97E-02	1,40E+00	5,71E-02
8N	5,35E-02	2,06E+00	2,60E-02
8T	3,06E-02	1,48E+00	2,07E-02
9N	4,64E-02	1,15E+00	4,03E-02
9T	5,67E-02	5,75E-01	9,87E-02
10N	1,31E-02	1,28E+00	1,02E-02
10T	3,34E-02	1,24E+00	2,69E-02
11N	2,26E-02	1,04E+00	2,18E-02
11T	3,66E-02	6,99E-01	5,24E-02
12N	2,62E-02	7,76E-01	3,38E-02
12T	5,93E-02	9,76E-01	6,08E-02
13N	4,32E-03	4,75E-01	9,10E-03
13T	1,88E-02	4,73E-01	3,97E-02
14N	3,45E-02	8,07E-01	4,28E-02
14T	2,26E-02	2,60E+00	8,69E-03
15N	5,32E-02	5,84E-01	9,11E-02
15T	2,58E-01	1,23E+00	2,10E-01
16N	6,28E-03	5,72E-01	1,10E-02
16T	7,50E-03	2,04E+00	3,68E-03
17N	1,03E-01	7,61E-01	1,36E-01
17T	1,27E-02	5,68E-01	2,24E-02
18N	1,09E-01	1,09E+00	9,99E-02
18T	7,30E-02	9,13E-01	7,99E-02
19N	1,20E-02	1,97E+00	6,08E-03
19T	4,09E-03	1,66E+00	2,47E-03
20N	1,87E-02	7,55E-01	2,48E-02

Probe	RECK	ß-Actin	RECK/ß-Actin
20T	2,49E-02	6,18E-01	4,03E-02
21N	6,56E-03	4,10E-01	1,60E-02
21T	5,72E-02	8,84E-01	6,47E-02
22N	1,11E-02	7,19E-01	1,54E-02
22T	9,67E-03	1,28E+00	7,55E-03
23N	6,39E-03	7,04E-01	9,08E-03
23T	7,89E-03	6,37E-01	1,24E-02
24N	2,20E-02	5,72E-01	3,84E-02
24T	3,39E-02	9,11E-01	3,72E-02
25N	1,73E-02	7,51E-01	2,31E-02
25T	1,61E-02	4,79E-01	3,36E-02
26N	1,05E-02	3,34E+00	3,15E-03
26T	8,71E-03	1,60E+00	5,46E-03
27N	3,25E-02	2,35E+00	1,38E-02
27T	3,79E-03	1,11E+00	3,41E-03
28N	2,33E-02	6,10E-01	3,82E-02
28T	6,65E-03	7,77E-01	8,56E-03
29N	7,62E-02	1,06E+00	7,18E-02
29T	2,29E-02	7,95E-01	2,88E-02
30N	3,52E-02	2,05E+00	1,71E-02
30T	3,63E-03	1,40E+00	2,60E-03
31N	3,59E-03	1,34E+00	2,68E-03
31T	5,07E-03	6,51E-01	7,79E-03
32N	2,96E-01	1,24E+00	2,38E-01
32T	1,59E-02	8,19E-01	1,94E-02
33N	1,66E-02	2,24E+00	7,42E-03
33T	2,05E-02	1,84E+00	1,11E-02

Für das Normalgewebe wurden Werte an kalkulierter Konzentration methylierter RECK-DNA zwischen 0,0059 und 0,296 bei einem Mittelwert von 0,0434 gemessen. Für ß-Actin lagen die Werte zwischen 0,410 und 3,34 bei einem Mittelwert von 1,19. Die normierten Werte lagen zwischen 0,00268 und 0,238 bei einem Mittelwert von 0,0407. Der Median lag bei 0,026 (Tabelle 30).

Für das Tumorgewebe lagen die Werte bei RECK zwischen 0,0037 und 0,258 bei einem Mittelwert von 0,0345. Für ß-Actin bei 0,371 und 2,60 bei einem Mittelwert 1,12. Die normierten Werte lagen zwischen 0,210 und 0,00247 bei einem Mittelwert von 0,0368. Der Median lag bei 0,022 (Tabelle 28).

Tabelle 28 Messergebnisse Analyse

	Mittelwert N-Gewebe ng/µl	Median	Mittelwert T- Gewebe ng/µl	Median
RECK	0,0434	0,0262	0,0345	0,0188
ß-Actin	1,19	1,04	1,13	0,976
RECK/ß-Actin	**0,0408**	0,026	**0,0358**	0,0224

8. Test auf Normalverteilung

Die Methylierungswerte von Normal sowie Tumorgewebe wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung untersucht.
N-Gewebe: p = 0,044 es lag keine Normalverteilung vor
T-Gewebe: p = 0,102 die Werte waren normalverteilt
Nachfolgend wurden das Op-Alter (p = 0,977), das Tumorvolumen (p = 0,059), die rezidivfreie Zeit (p = 0,345) sowie die postoperative Überlebenszeit (p = 0,603) auf Normalverteilung untersucht. Alle genannten Variablen zeigten eine Normalverteilungsform auf.

9. Promotormethylierung durch Methyltransferase

Um die verwendete Real-Time PCR Messmethode zu überprüfen wurde ein in-vitro Methylierungsversuch durchgeführt. Dieser wurde nötig, da im verwendeten Probenmaterial nur sehr geringe Mengen an methyliertem RECK-Promotor zu detektieren waren. Der Methyltransferaseversuch sollte zeigen, dass die verwendete Real-Time PCR auch in der Lage war höhere Konzentrationen an methylierter DNA zu messen.

Im durchgeführten Versuch wurde eine gepaarte Probe des Messkollektivs (Normal- und Tumor-Gewebe; Probe 6) mit Methyltransferase behandelt, welche nur einen geringen Anteil an methylierter DNA aufwies. Durch die Behandlung sollte eine Vollmethylierung der DNA erreicht werden. Als Vergleichswerte wurde unmethylierte DNA (CpGenome DNA Kit; Materialien und Methoden 2.2) ebenfalls methyltranferasebehandelt sowie industriell voll methylierte DNA (CpG) verwendet. Nach Methyltransferasebehandlung wurden die Proben bisulfitiert und die DNA-Konzentration am NanoDrop Photometer bestimmt (Tabelle 29). Die

Methylierung der verschiedenen Proben wurde wie oben beschrieben (Materialien und Methoden 5.3) in der Real-Time PCR am light-Cycler gemessen und mit ß-Actin normiert (Tabelle 30).

Tabelle 29 NanoDrop Messwerte nach Bisulfitierung

Nr.	Proben	DNA-Konz. in ng/ µl
1	Kollektivprobe Normalgewebe unbehandelt (N U)	14,27
2	Kollektivprobe Normalgewebe Methyltransferase behandelt (N B)	5,7
3	Kollektivprobe Tumorgewebe unbehandelt (T U)	11,64
4	Kollektivprobe Tumorgewebe Methyltransferase behandelt (T B)	4,7
5	CpGenome unmethyliert unbehandelt (CpG U)	15
6	CpGenome unmethyliert Methyltranferase behandelt (CpG B)	8,3
7	CpGenome methyliert (CpG)	10,6

Tabelle 30 Real-Time PCR Messwerte

Nr.	Probe	RECK / ß-Actin
1	Kollektivprobe Normalgewebe unbehandelt (N U)	0,067
2	Kollektivprobe Normalgewebe Methyltranferase behandelt (N B)	**1,971**
3	Kollektivprobe Tumorgewebe unbehandelt (T U)	0,011
4	KollektivprobeTumorgewebe Methyltransferase behandelt (T B)	**1,893**
5	CpGenome unmethyliert unbehandelt (GpG U)	0,005
6	CpGenome unmethyliert Methyltranferase behandelt (CpG B)	**1,655**
7	CpGenome methyliert (CpG)	**2,029**

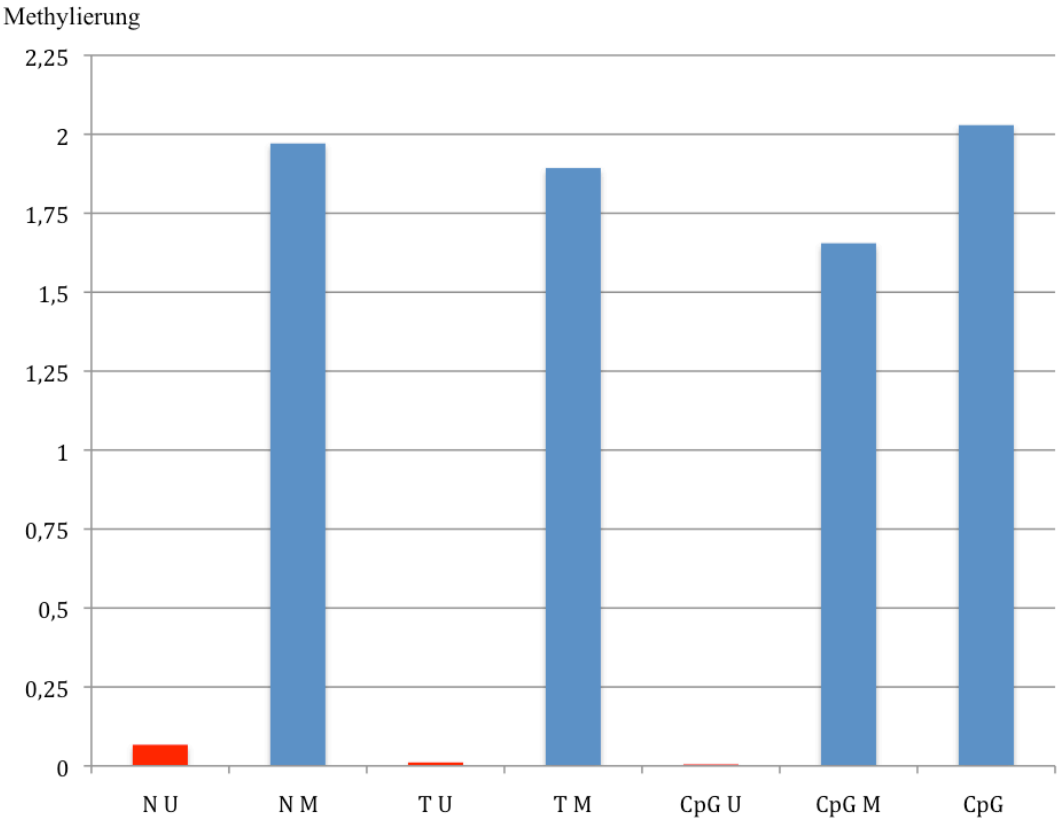

Abb. 15 Vergleich der Messwerte (Methyltransferaseversuch): Abszisse**:** Proben (Tabelle 30) rot unbehandelt, blau behandelt; Ordinate: kalkulierte Konzentration der methylierten DNA (Reck mit ß-Actin normiert)

Die mit Methyltransferase behandelten Proben zeigten eine ähnlich hohe Methylierung wie industriell voll methylierte DNA (Tabelle 30, Abb. 15).

Eine höhere Methylierung des RECK-Promotorbereiches in den verwendeten Proben war dementsprechend möglich. Die verwendete Real-Time PCR Messmethode war auch in der Lage eine Methylierung des Promotors in höherem Maß im Nierenzellkarzinomkollektiv zu detektieren. Wie angeführt war in den Proben nur eine geringe DNA-Methylierung nachweisbar.

Um einen Bezugswert für die in der PCR gemessenen Werte der kalkulierten Konzentration zu erhalten, wurde der im Methyltransferaseversuch erhaltene Konzentrationswert der künstlich erzeugten Vollmethylierung der verwandten Proben des Nierenzellkarzinomkollektivs (Normal und Tumorgewebe) verwendet. Es wurde zu Grunde gelegt, dass genannter Wert die maximal zu detektierende Methylierung des Promtorbereichs im Probematerial des Kollektivs darstellte. Die übrigen Messwerte wurden auf diesen Wert V der voll methylierten DNA prozentual bezogen. Die in der statistischen Auswertung verwendeten Daten waren damit prozentuale Bezugswerte

der normierten Messwerte von RECK auf den berechneten Wert der wie beschrieben erzeugten Vollmethylierung V.

Für den Wert der Vollmethylierung wurde der Mittelwert der normierten Messungen von Normal und Tumorgewebe (Tabelle 30) verwendet.

(**1,97** *N-Gewebe* + **1,89** *T-Gewebe*) / **2** = **1,93 (V)** entspricht 100 % Promotormethylierung

Die prozentualen Werte (Tabelle 31) des Messkollektivs lagen für das N-Gewebe zwischen 0,14 % und 12,32 % bei einem Mittelwert von 2,06 % ± 2,44. Der Median lag bei 1,28 %.
Für das T-Gewebe lagen die Werte zwischen 0,13 % und 10,88 bei einem Mittelwert von 1,85 % ± 2,16. Der Median lag bei 1,16 (Tabelle 32).

Tabelle 31 Promotormethylierug prozentual

Proben	N in % von V	T in % von V	Proben Nr.	N in % von V	T in % von V
1	0,1736	0,1736	**18**	5,1698	4,1382
2	1,0329	0,2389	**19**	0,3149	0,1278
3	2,6124	2,5772	**20**	1,2827	2,0842
4	3,3497	2,0965	**21**	0,8287	3,3505
5	1,3589	0,5339	**22**	0,6225	0,3158
6	3,4825	5,2021	**23**	0,4701	0,6412
7	1,8176	2,9551	**24**	1,9894	1,9238
8	1,3471	1,0722	**25**	1,1949	1,7394
9	2,0839	5,1062	**26**	0,1631	0,2826
10	0,5289	1,639	**27**	0,7138	0,1765
11	1,1294	2,7118	**28**	1,9761	0,443
12	1,7498	3,1466	**29**	3,7151	1,4899
13	0,4708	2,0561	**30**	0,8872	0,1347
14	2,2162	0,4499	**31**	0,1385	0,4032
15	4,7157	10,8757	**32**	12,3216	1,0025
16	7,0371	1,1585	**33**	0,3842	0,5756
17	0,5676	0,1905			

N-Gewebe (N), T-Gewebe (T)

Tabelle 32 Promotormethylierug prozentual (Analyse)

	N-Gewebe in % von V	T-Gewebe in % von V
Mittelwert	**2,06**	**1,85**
Median	1,28	1,16
Standardabweichung	2,44	2,16
Minimum	0,14	0,13
Maximum	12,32	10,89

Betrachtet man den Mittelwert sowie den Median wird deutlich, dass sich innerhalb des Normal- sowie Tumorgewebekollektivs Differenzen in der Methylierungshöhe ergaben.

10. Methylierung von Normal- und Tumorgewebe

Der Vergleich der Methylierungswerte wurde mit dem Analyseprogramm Graph Pad Prism (Graph Pad, Software, Inc, CA, USA) durchgeführt. Miteinander verglichen wurden gepaarte Proben von Tumor- und Normal-Gewebe. Da sich das Normalgewebe als nicht normalverteilt zeigte, erfolgte die Signifikanztestung mittels eines nichtparametrischen Tests nach Wilcoxon für gepaarte Stichproben.

Dieser zeigte, dass sich Tumor- und Normal-Gewebe nicht signifikant in der Höhe der Methylierung unterschieden (p: 0,851), (Tabelle 33/ Abb.16-17).

Nachfolgend wurde das Kollektiv nach pathologischem Tumorstadium (pT III und pT IV zusammengefasst) unterteilt. Ein erneuter Wilcoxon-Test sollte zeigen ob ein Vergleich der gepaarten Proben, nach genannter Unterteilung, signifikante Differenzierungen der Methylierung aufzeigte.

Der Vergleich zeigte, dass auch hier kein signifikanter Unterschied in der Methylierungshöhe in den einzelnen pT-Stadien bestand.

Weiterführend wurde ein Ausschluss einzelner Messwerte nach histologischer Tumorentität vorgenommen. Der Paarvergleich schloss nur Proben ein, die dem klarzelligen Typ zuzuordnen waren. 25 gepaarte Proben wurden hier miteinander verglichen.

Anhand des Wilcoxon-Tests konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Methylierung im Vergleich der beiden Gewebearten gefunden werden (p: 0,770) (Tabelle 33/ Abb.18-19).

Tabelle 33 Methylierungsvergleich (Graph Pad Prism)

analysierte Proben	Signifikanz p (Wilcoxon-Test)
gesamtes Kollektiv (33 Proben)	0,851
klarzelliger Typ (25 Proben)	0,770

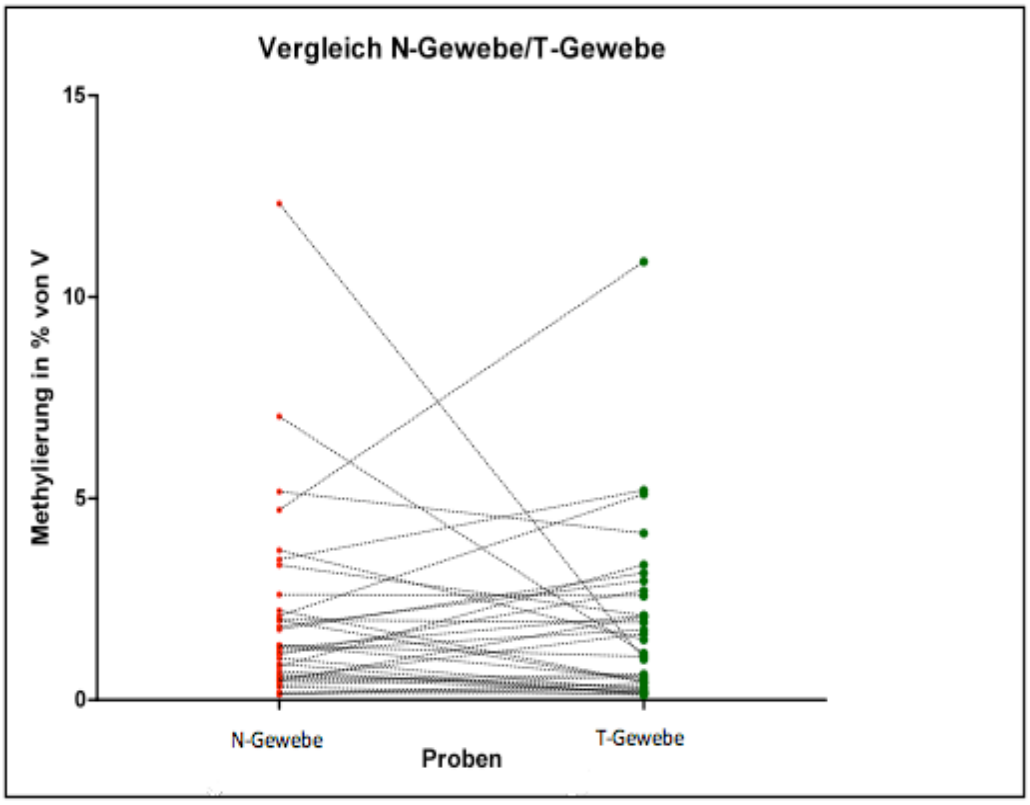

Abb. 16 Paarvergleich Tumor und Normalgewebe (N/T) der Promotormethylierung: Abszisse: normierter Methylierungsmesswert in % von V . Ordinate: Proben (Rot: N-Gewebe / Grün: T-Gewebe). Die gepaarten Proben sind jeweils durch eine Gerade miteinander verbunden

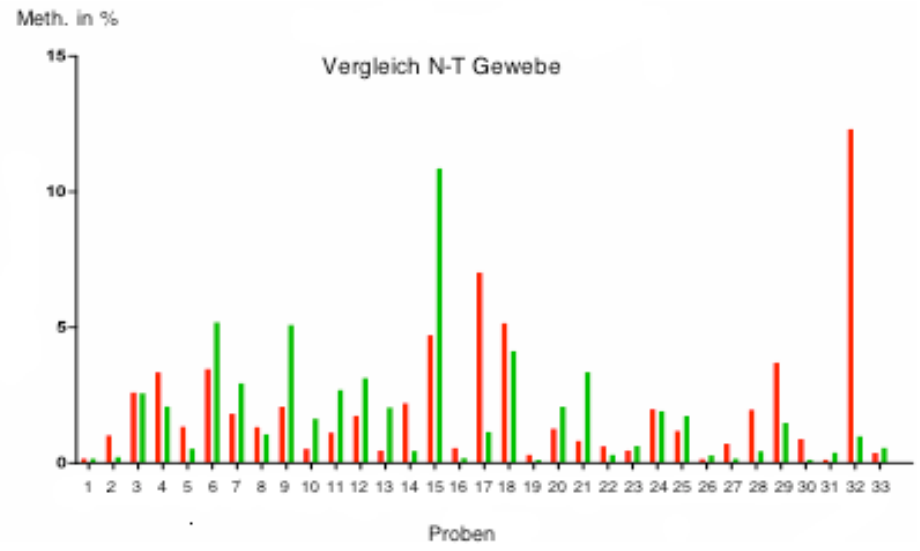

Abb. 17 Paarvergleich Tumor und Normalgewebe (N/T) der Promotormethylierung Abszisse: normierter Methylierungsmesswert in % von V; Ordinate: gepaarte Proben (Rot: N-Gewebe/ Grün: T-Gewebe)

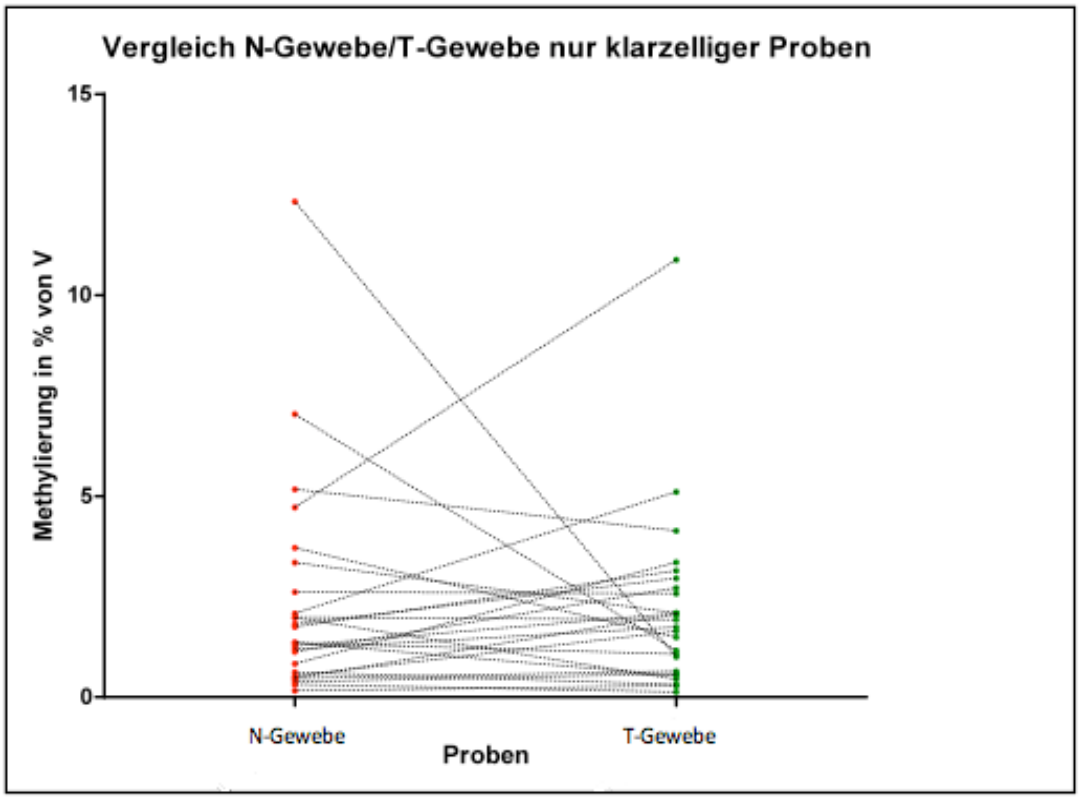

Abb.18 Paarvergleich Tumor und Normalgewebe (N/T) der Promotormethylierung nur klarzelliger Proben: Abszisse: normierter Methylierungsmesswert in % von V. Ordinate: gepaarte Proben (Rot: N-Gewebe / Grün: T-Gewebe). Die gepaarten Proben sind jeweils durch eine Gerade miteinander verbunden

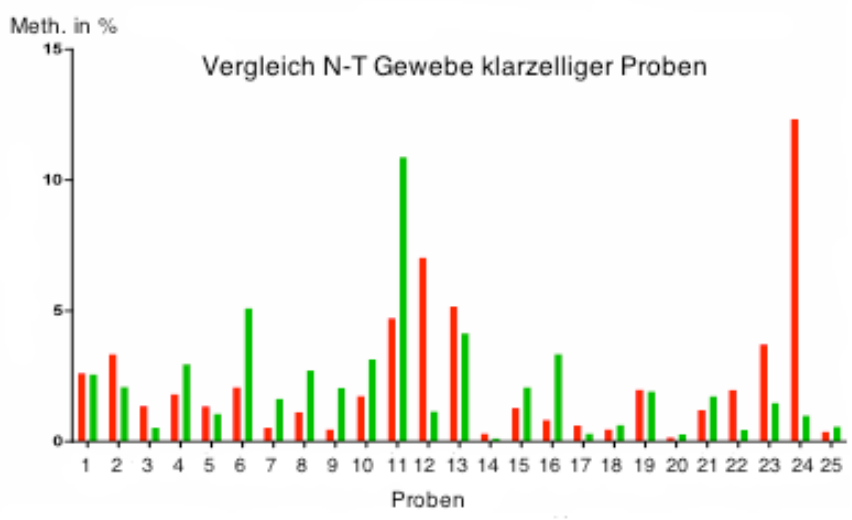

Abb. 19 Paarvergleich Tumor und Normalgewebe (N/T) der Promotormethylierung nur klarzelliger Proben: Abszisse: normierter Methylierungsmesswert in % von V; Ordinate: gepaarte Proben (in Rot: N-Gewebe / in Grün: T-Gewebe)

11. Kreuztabellen/Assoziationsanalyse

Ein statistischer Zusammenhang zwischen den einzelnen klinisch pathologischen patientenbezogenen sowie tumordefinierenden Daten und der Höhe der RECK-Methylierung wurde untersucht.

Hierfür wurden Kreuztabellen erstellt, die einzelne Zusammenhänge darstellen sollten. Eine Analyse mittels Kreuztabellen setzt nominal- oder ordinalskalierte Variablen voraus. Daher wurden die Ergebnisse der Methylierungsmessung (normierte Messwerte) sowie die Tumorgröße und das Patientenalter anhand des Medians in Gruppen hoher sowie niedriger Methylierung bzw. Alter und Größe unterteilt. Das pathologische Tumorstadium wurde ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt.

Ein Chi-Quadrat Test nach Pearson untersuchte die Signifikanz der Assoziation der einzelnen Variablen untereinander (Tabelle 34).

Tabelle 34 Assoziationsanalyse

Variable 1	Variable 2	p-Wert (Chi-Quadrat Test)
N-Gewebe	OP-Alter	0,037
T-Gewebe	OP-Alter	0,373
N-Gewebe	Größe	0,863
T-Gewebe	Größe	0,069
N Gewebe	pT	0,114
T Gewebe	pT	0,392

Assoziationsanalyse mittels Kreuztabelle und Chi-Quadrat Test; Konzentration der RECK-Methylierung in N/T Gewebe, Median N-Gewebe: 0,026; < = 0,026 = Gruppe I , > 0,026 = Gruppe II ; Median T-Gewebe: 0,022; < = 0,022 = Gruppe I , > 0,022 = Gruppe II ; Alter: Median 64 Jahre: < = 64 Jahre = Gruppe I , > 64 Jahre = Gruppe II; Größe: Median: 160,0 cm^3: < = 160 ,0 cm^3 = Gruppe I, > 160,00 cm^3 = Gruppe II, Tumorstadium: pT I-II = Gruppe I , pT III+IV = Gruppe II

Es zeigte sich, dass eine höhere Konzentration an methylierter DNA im Normalgewebe (Abb. 20) signifikant häufiger bei höherem OP-Alter auftrat. Eine Assoziation zwischen der Methylierungshöhe beider Gewebetypen und dem Versterben sowie einem Rezidivauftreten war anhand der Signifikanztestung nach Chi-Quadrat nicht zu überprüfen und war somit nicht nachweisbar. Eine signifikante Assoziation zu den weiteren genannten klinisch-pathologischen Parametern konnte ausgeschlossen werden.

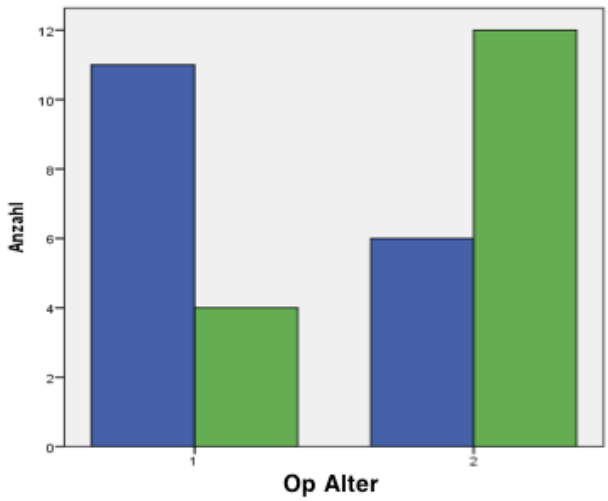

Abb. 20 Assoziationsanalyse: Ordinate: OP-Alter nach Median (64 Jahre) geteilt. 1: Alter <=64 Jahre; 2: Alter > 64 Jahre , Abszisse: Anzahl der Proben; blau dargestellt: Methylierung im Normalgewebe niedrig < = 0,026; grün dargestellt: Mehylierung im Normalgewebe hoch > 0,026.

12. Korrelationsanalyse

Es wurde die Korrelation der einzelnen klinisch pathologischen patientenbezogenen sowie tumordefinierenden Daten in Bezug zu den Ergebnissen der Methylierungsmessung untersucht.

Hierzu zählten neben Geschlecht und Patientenalter das Tumorvolumen in cm^3, das Grading sowie das pathologische Tumorstadium (pT). Eine Fern- bzw. Lymphknotenmetastasierung wurde ebenfalls mit einbezogen.

Das postoperative Befinden wurde anhand des Auftretens eines Rezidivs sowie der rezidivfreien Zeit gemessen. Dementsprechend wurden die postoperative Überlebenszeit bzw. das Versterben der Patienten erfasst und hier ebenfalls auf eine Korrelation zur RECK-Methylierung untersucht. Weiterführend wurde die Gruppe der Proben vom histologisch klarzelligen Typ gesondert untersucht.

Wie oben gezeigt waren die Methylierungswerte des Tumorgewebes, die Werte des Tumorvolumens, des Op-Alters, sowie die rezidivfreie Zeit und die postoperative Überlebenszeit normalverteilt. Bei Vorliegen intervallskalierter, normalverteilter Variablen wurde daher die Korrelation nach Pearson berechnet (Tabelle 36). Die weiteren Variablen waren nicht intervallskaliert und normalverteilt, weshalb hier die Rangkorrelation nach Spearman berechnet wurde (Tabelle 37).

In der Analyse der RECK-Methylierung des Normal- und Tumorgewebes in Bezug auf genannte klinisch pathologische patientenbezogene sowie tumordefinierende Daten konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden (Tabelle 35 und 36).

Die Korrelationsanalyse der histologischen Subgruppe nur klarzelliger Proben erbrachte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 35 Korrelation nach Pearson

		Normalgewebe	Tumorgewebe
Op Alter	Korrelationskoeffizient		0,082
	Signifikanz		0,652
	N1		33
tRez	Korrelationskoeffizient		0,247
	Signifikanz		0,215
	N1		27
tTod	Korrelationskoeffizient		0,274
	Signifikanz		0,167
	N1		27
Tumorvolumen	Korrelationskoeffizient		-0,289
	Signifikanz		0,103
	N1		33

Tabelle 36 Korrelation nach Spearman

		Normalgewebe	Tumorgewebe
pT	Korrelationskoeffizient	0,172	0,048
	Signifikanz	0,338	0,79
	N1	33	33
M	Korrelationskoeffizient	-0,137	0,127
	Signifikanz	0,499	0,482
	N1	33	33
G	Korrelationskoeffizient	-0,13	-0,093
	Signifikanz	0,471	0,606
	N1	33	33
N	Korrelationskoeffizient	-0,093	0,173
	Signifikanz	0,605	0,334
	N1	33	33
Geschlecht	Korrelationskoeffizient	0,135	0,048
	Signifikanz	0,454	0,789
	N1	33	33
Tod	Korrelationskoeffizient	0,074	0,034
	Signifikanz	0,714	0,864
	N1	27	27
Rez	Korrelationskoeffizient	0,255	0,313
	Signifikanz	0,199	0,113
	N1	27	27
tTod	Korrelationskoeffizient	0,173	
	Signifikanz	0,388	
	N1	27	
tRez	Korrelationskoeffizient	0,200	
	Signifikanz	0,317	
	N1	27	
Op Alter	Korrelationskoeffizient	-0,13	
	Signifikanz	0,471	
	N1	33	
Tumorvolumen	Korrelationskoeffizient	-0,093	
	Signifikanz	0,605	
	N1	33	

13. Kaplan-Meier Analyse

Die Kaplan-Meier Methode dient der Analyse sog. kumulativer Überlebenswahrscheinlichkeiten. Die Wahrscheinlichkeit mit voranschreitender postoperativer Zeit kein Tumorrezidiv entwickelt zu haben bzw. die Wahrscheinlichkeit zu Überleben wurde dargestellt.

Die Repräsentativität des Kollektivs wurde anhand der Kaplan-Meier Methode getestet. Der Einfluss des pT-Stadiums in Zweiteilung in Bezug auf die Rezidiventwicklung (Abb.21) sowie das Überleben (Abb. 22) wurde untersucht. Die Signifikanz wurde mit dem nichtparametrischen Test nach Wilcoxon berechnet und lag für die Rezidiventwicklung bei p = 0,002. Der Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte sich mit einem p-Wert von 0,01 ebenfalls signifikant. Es wurde somit von einem repräsentativen Kollektiv ausgegangen.

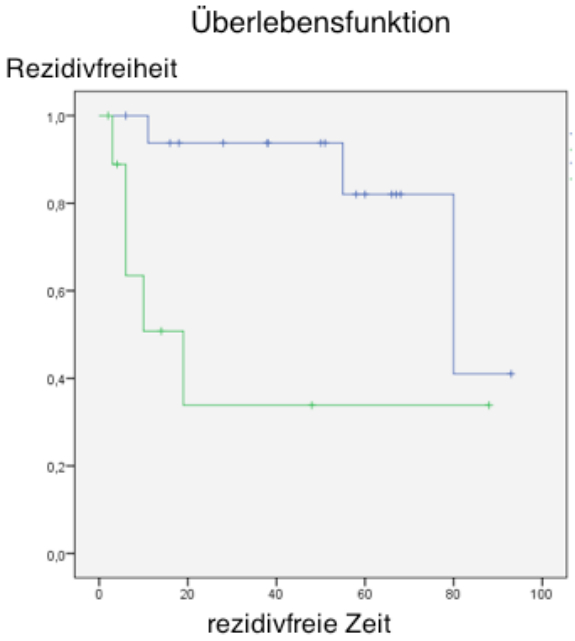

Abb. 21 Kaplan-Meier Analyse: kum. Rezidivwahrscheinlichkeit; Faktor: pT-Gewebe 1-4 (blau pT1+2; grün pT3+4), Ereignis: Rezidiv

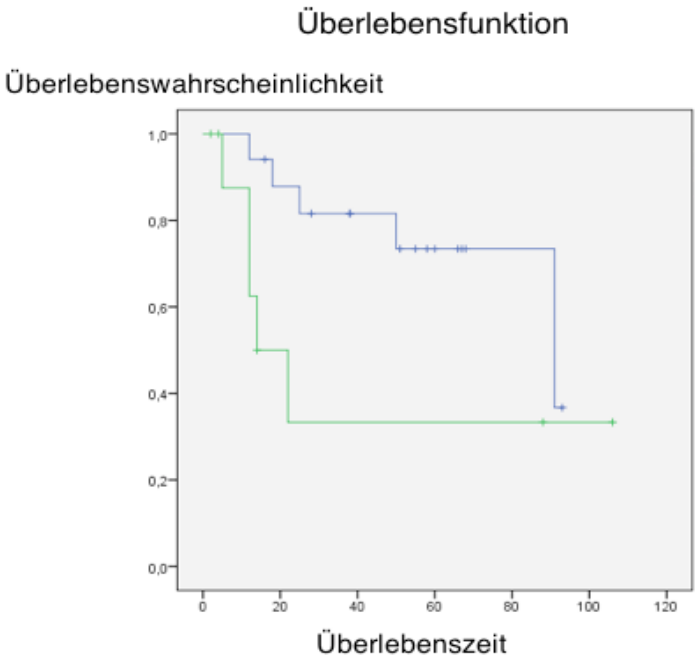

Abb. 22 Kaplan-Meier Analyse: kum. Überlebenswahrscheinlichkeit; Faktor: pT-Gewebe 1-4 (blau pT1+2; grün pT3+4), Ereignis: Tod

Anhand des Medians wurden die Methylierungswerte des Tumor-Gewebes (Median: 0,0224 ; Methylierung < = 0,0224 als 1; Methylierung > 0,0224 als 2) sowie des Normalgewebes (Median: 0,026 ; Methylierung < = 0,026 als 1 ; Methylierung > 0,0226 als 2) in zwei Gruppen geteilt. Es wurde der Einfluss der Methylierungshöhe auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Tumorrezidivs sowie des Überlebens der Patienten über die Zeit untersucht.

Durch die Kaplan Meier Analyse konnten keine signifikanten Zusammenhänge der Überlebens-, bzw. Rezidivwahrscheinlichkeiten hinsichtlich der Höhe der Methylierung in den Gewebeproben gefunden werden.

Bei Verwendung der Methylierung des Tumorgewebes (dichotomer Faktor) sowie des Normalgewebes als Einflussgröße auf die rezidivfreie Zeit (nichtparametrischer Test nach Wilcoxon: Tumor-Gewebe bei einem P-Wert von 0,213 sowie Normal-Gewebe mit p = 0,417) war jedoch graphisch eine tendenzielle Entwicklung sichtbar (Abb. 23-24). Diese zeigt eine höhere Wahrscheinlichkeit Rezidiv frei zu bleiben bei Gewebe mit niedriger Methylierung.

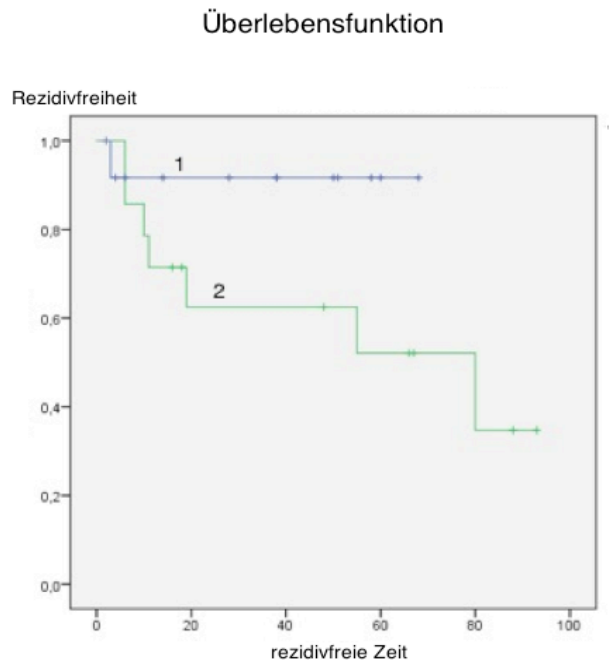

Abb. 23 Kaplan Meier-Analyse: Kum.Rezidivwahrscheinlichkeit; Faktor: 2 Teilung des **T-Gewebes** (1 blau: niedrige Methylierung 2 grün: hohe Methylierung); Ereignis: Rezidiv;

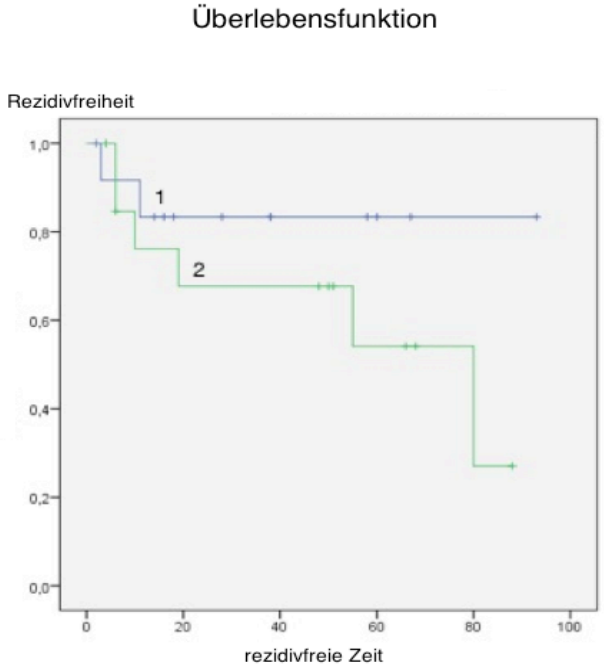

Abb. 24 Kaplan Meier-Analyse: Kum.Rezidivwahrscheinlichkeit; Faktor: 2 Teilung des **N-Gewebes** (1 blau: niedrige Methylierung; 2 grün: hohe Methylierung); Ereignis: Rezidiv;

IV Diskussion

1. Grundlage der Arbeit

Bei einer verringerten Expression von RECK können die Metalloproteinasen 2,-9 und -14 unkontrolliert wirken. Der hemmende Einfluss, welcher wichtige Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix in physiologischer Waage hält, fällt weg. Mögliche Folge ist eine Zerstörung entscheidender Matrixbestandteile sowie Anteile der Basalmembran. Die Zerstörung trägt zur Absiedlung von Krebszellen aus deren Zellverband bei und fördert die Intra- sowie Extravasation welche eine Grundlage des metastatischen Prozesses darstellt. Um Aussagen über die klinische Bedeutung einer RECK-Promotormethylierung als Ursache einer Expressionsverringerung treffen zu können, ist es nicht nur entscheidend diese in karzinomatösen Zellen nachzuweisen, sondern auch einen Vergleich zu gesundem Gewebe anzustellen. Bis heute gibt es keine Studien, die sich mit der Bedeutung des RECK-Gens im Nierenzellkarzinom beschäftigen. Die vorliegende Untersuchung ist die erste Bestimmung der Promotormethylierung von RECK beim Nierenzellkarzinom. Vorangegangene Studien [27, 28, 29, 30, 31, 32, 33], die eine Beeinflussung von RECK bei Karzinomen anderer Ursprungsorgane untersuchten, machten eine weitere Ausweitung der Erforschung von RECK auf das urologische Fachgebiet interessant und lieferten die Grundlage für die angeführte Arbeit.

In Anlehnung an vergleichende Untersuchungen der RECK-Promotor-Methylierung wurde eine Methylierungsmessung mittels einer quantitativen Real-Time PCR festgelegt. Anhand gemessener Werte sollte ein Vergleich der Methylierung im Nierenzellkarzinomgewebe und tumorfreiem Nierengewebe sowie eine Suche nach Zusammenhängen zu klinisch pathologischen Faktoren ermöglicht werden. Für die Durchführung der Versuche wurden Karzinomgewebeproben sowie Proben von Gewebe, welches den Tumor umgab, von nephrektomierten Patienten verwendet. Es wurde unter anderem die Möglichkeit für die Entwicklung neuer prognostischer Parameter untersucht.

2. Betrachtung der Ergebnisse

Die gewonnenen Daten zeigten auf, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der RECK-Promotor-Methylierung und den tumorassoziierten sowie patientenspezifischen Daten im Nierenzellkarzinom gab. Die Ergebnisse stehen damit in Widerspruch zu einer Anzahl von Studien, welche sich mit Tumoren anderer Ursprungsorgane beschäftigten und dahingehend der RECK-Promotor-Methylierung eine Karzinome beeinflussende Bedeutung zukommen ließen. So konnte eine Hypermethylierung bei Karzinomzellen im Vergleich zu umliegenden Zellen unter anderem beim oralen Plattenepithelkarzinom [32], beim Kolonkarzinom [31] sowie beim Magenkarzinom nachgewiesen werden [33].
Die Methylierung des RECK-Gens beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom war ebenfalls signifikant mit dessen geringerer Expression korreliert. [28].

In erfolgter Untersuchung wurde eine Methylierung des RECK-Gen-Promotors sowohl im Tumorgewebe als auch im den Tumor umgebendem Gewebe nachgewiesen. Bei beiden Gewebetypen war die Methylierung jedoch nur sehr gering messbar. Um einen Bezugswert für eine mögliche Vollmethylierung zu schaffen wurde der oben beschriebene Methyltransferaseversuch durchgeführt. Wie in Tabbelle 32 zu sehen, waren beim Normalgewebe gemittelt 2,05% und im Tumorgewebe nur 1,85 % des Promotors methyliert. Ein statistischer Paarvergleich der beiden Gewebearten erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der Methylierungshöhe.

Zur genauen Beurteilung und Einordnung der Methylierungshöhe fehlt jedoch eine Messung der Methylierung im RECK-Gen im Gewebe eines komplett tumorfreien Organs. Um eine signifikante Grenze zwischen einer möglicherweise vorliegenden physiologischen Methylierung im Promotorbereich bei gesundem Gewebe und einer pathologischen Hypermethylierung ziehen zu können hätte es dem Versuch vorangehend eine dahingehende Bestimmung geben sollen. Eine isolierte Aussage über eine Hypermethylierung in den Proben ist daher nicht möglich.

Bei Betrachtung vorangegangener Studien fand sich beim Magenkarzinom eine signifikante Korrelation hinsichtlich der RECK Methylierung mit der Tumorinvasiontiefe [33]. Tumorgrading, Lymphknotenstatus sowie Op-Alter zeigten sich nicht signifikant korreliert. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarziom konnte ergänzend eine positive Auswirkung der RECK-Methylierung zur lymphogenen Metastasierung dargestellt werden [28]. Nach Durchführung einer Assozationsanalyse sowie Korrelationsanalye konnten die Zusammenhänge zu Tumorinvasionstiefe (hier als pT aufgeführt) sowie zur lymphogenen Metastasierung im

Nierenzellkarzinom nicht bestätigt werden. Auch eine Auswirkung auf Tumorgrading, und Tumorgröße war nicht nachzuweisen. Es zeigte sich lediglich eine signifikante Korrelation zwischen dem Patientenalter und der Methylierung im Normalgewebe. Abschließend erfolgte die Analyse einer Auswirkung der Methylierungshöhe auf postoperatives Überleben sowie Rezidiventwicklung. Im Vergleich zum oralen Plattenepithelkarzinom [32] wo das rezidivfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben sich invers mit der Hypermethylierung korreliert zeigten, konnten im Nierenzellkarzinom keine signifikanten Zusammenhänge dargestellt werden.

Es zeigte sich also, dass eine geringe Methylierung im RECK-Gen-Promotor im Nierenzellzellkarzinom besteht. Diese unterscheidet sich allerdings nicht von einer Methylierung in gesundem Nierengewebe, welches den Tumor umgibt, und hat keinerlei Einfluss auf klinisch pathologische Daten.

3. Qualitätssicherung

3.1 Methyltransferasebehandlung

Ein wichtiger Schritt, welcher der Qualitätsicherung diente, war die Behandlung ausgewählter Gewebeproben mit Methyltransferase sowie der Vergleich der Methylierung mit industriell methylierten Proben.

Nach Auswertung der PCR-Messergebnisse war festzustellen, dass nur eine sehr geringe Promotormethylierung des RECK-Gens zu detektieren war. Diese war gleichermaßen im Tumor sowie im den Tumor umgebendem Gewebe nachzuweisen. Anhand eines Methyltransferaseversuchs wurde die Qualität der eingesetzten DNA-Proben zusätzlich überprüft. Wichtig war es zu zeigen, dass eine höhere Methylierung in den verwendeten Messproben möglich war und die Messung nicht durch eine geringe Qualität der Proben gestört wurde. Dies wurde durch den Vergleich der Methyltransferase behandelten Gewebeproben mit industriell voll methylierter DNA erreicht (Tabelle 30, Abb. 15).

Es wurde nach Methyltransferasebehandlung nahezu die gleiche Methylierung der Gewebe-DNA wie bei käuflich erworbener DNA gemessen. Damit wurde auch gezeigt, dass die Methylierung im verwendetem Probenkollektiv durch die verwendete PCR in ausreichendem Maße messbar war.

3.2 Größe des Patientenkollektivs

Das verwendete Probenkollektiv zeigte sich mit 33 Probenpaaren als relativ klein. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigungen sowie falsche Messwerte durch zu geringe Menge an bisulfitierter DNA zu vermeiden, war diese Dezimierung des vorhandenen Kollektivs jedoch grundlegend wichtig. Nachteile eines kleineren Probenkollektivs wurden damit zugunsten einer hohen Qualitätssicherung der erhaltenen Ergebnisse in Kauf genommen.

3.3 Konstante DNA-Konzentration bei Kalibrator und Lauf-zu-Lauf-Kontrolle

Als Kalibrator und Lauf-zu-Lauf-Kontrolle für die Real-Time PCR wurde zuerst ein Pool der PCR Produkte aus der Herstellung der Standardkurve verwendet. Entscheidend für den Kalibrator sowie die LzL-Kontrolle in der Verwendung während verschiedener Läufe ist deren konstante DNA-Konzentration. Ein konstanter Kalibrator ist unabdingbar, da er mit vorgegebener Konzentration die PCR-Messung eicht. Eine LzL-Kontrolle detektiert Fehler im Vergleich verschiedener PCR-Läufe. Fehler, die z.B. bei der Herstellung eines Master Mix auftreten, werden durch den Vergleich der einzelnen Messwerte einer LzL-Kontrolle bei unterschiedlichen PCR Läufen aufgezeigt und können damit kompensiert werden.

Der oben beschriebene Abbau der DNA beim Kalibrator (Tabelle 20-21, Abb. 9-10), welcher aus PCR-Produkten hergestellt wurde, verfälschte in den fortlaufenden PCR Messungen die Messergebnisse zunehmend. Weiterhin war der Vergleich der Läufe untereinander durch die LzL-Kontrolle nicht mehr aussagekräftig. Anhand gewonnener Daten hätte somit keine relevante Aussage getroffen werden können. Ein Umstieg auf neue Bezugswerte und erneute Messung der Proben war daher zur Qualitätssicherung unabdingbar wichtig und wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

4. Limitierungen der Überlebensanalyse

Grundlegende Schwierigkeiten ergaben sich bei der Analyse anhand der Kaplan-Meier Methode. Diese setzt eine möglichst große Fallzahl voraus, um in der Lage zu sein, signifikante Ergebnisse zu liefern, was bei der geringen Anzahl an Messproben nicht gegeben war.

Weitere Probleme entstanden dadurch, dass einzelne Proben des Kollektivs von Patienten stammten die bereits 1995 nephrektomiert wurden. Die Erhebung der Daten zur Beschreibung des postoperativen Verlaufs gestaltete sich daher als besonders schwierig. Teilweise musste auf Archivdaten zurückgegriffen werden, da Patienten bereits verstorben waren, bzw. nicht mehr für Auskünfte zur Verfügung standen. So war es nicht möglich eine einheitliche Entwicklung (Patientenbefragung jeweils nach einem definierten postoperativen Zeitraum) darzustellen. Es wurde versucht jeweils den größtmöglichen postoperativen Zeitraum abzudecken. Dieser variierte daher interindividuell.

Um aber genaue Aussagen auf die postoperative Entwicklung treffen zu können sollte nach erfolgter Nephrektomie ein genau festgelegtes Procedere zu definierten Nachuntersuchungszeiträumen festgelegt werden um Rezidiventwicklungen oder tumorbedingtes Versterben individuell zeitlich präzise zu erfassen.

In erfolgter Analyse scheint in der graphischen Darstellung nach Kaplan-Meier (Abb. 23-24) die Wahrscheinlichkeit rezidivfrei zu bleiben mit fortlaufender Zeit bei höherer Methylierung im Vergleich zur Gruppe mit niedriger Methylierung stärker zu sinken. Man könnte damit sagen, dass eine höhere Methylierung ein schnelleres Rezidivauftreten bedingt. Wie angeführt erhielten wir jedoch kein signifikantes Ergebnis, was schon durch das kleine Messkollektiv zu erklären wäre. Die Aussage sollte daher im Rahmen einer Studie mit größerem Messkollektiv überprüft werden.

Im Rahmen der Auswertung wurde grundsätzlich von einem Versterben der Patienten auf Grund des untersuchten Tumorgeschehens ausgegangen wenn keine andere Todesursache sicher zu eruieren war.

Aussagen, die in Zusammenhang mit einer postoperativen Patientenentwicklung stehen werden aus genannten Gründen als kritisch betrachtet und sollten in nachfolgenden Studien enger definiert sowie in größerer Fallzahl überprüft werden.

5. Aussichten

5.1 Vergleich mit Gewebe gesunder Organe

Interessant für nachfolgende Untersuchungen kann der Vergleich der Methylierung des RECK-Gewebes einer tumortragenden Niere mit Gewebe der nicht befallenen kontralateralen Niere sein. Möglicherweise besteht eine Veränderung der Methylierungshöhe im gesamten Gewebe der befallenen Niere. Dies würde erklären, warum in vorangegangener Untersuchung keine signifikante Differenz zu detektieren war. Da es auch während der Tumorentstehung zu einer Beeinflussung von RECK im gesamten Gewebe beider Nieren kommen könnte welches in der Folge zu einem Tumorwachstum führt, wäre auch ein interindividueller Vergleich von Gewebe Tumor tragender Patienten mit Gewebeproben gesunder Patienten denkbar. Die Grundlage für die Entwicklung von Screeningmethoden bei Risikopatienten wäre dadurch gegebenenfalls möglich. Da für die Durchführung dieser Ansätze Gewebeproben gesunder Organe benötigt würden, sollten diese von verstorbenen Spendern bezogen werden, da die Punktion gesunder Nieren bei nicht befallenen Probanden nicht zu rechtfertigen wäre.

5.2 Medikamentöse Beeinflussung der Methylierung

Zukünftig scheint eine medikamentöse Beeinflussung der RECK-Methylierung in der Tumortherapie denkbar. Ziel ist es eine verringerte Methylierung des RECK-Promotors und damit eine erhöhte Wirkungshemmung auf die beeinflussbaren Metalloproteinasen 2,-9 und-14 zu erreichen. Kato et al. [40] untersuchten den Effekt eines Polyphenols aus grünem Tee (epigallocatechin-3-gallate *EGCG*) auf den Methylierungsstatus des RECK-Promotors beim oralen Plattenzellkarzinom. Die Behandlung der Krebszellen mit EGCG verringerte die Hypermethylierung des RECK-Promotors und erhöhte damit die Expression von RECK-mRNA signifikant. Auch eine signifikante Verringerung der MMP-2 und MMP-9 Aktivität konnte nachgewiesen werden. Es kam zu einer Verringerung der nachweisbaren invasiven Foci sowie der tumorösen Invasionstiefe. Die Behandlung mit EGCG scheint somit ein Ansatzpunkt für die Beeinflussung der RECK-Methylierung zu sein und zeigte positiv zu wertende Auswirkungen auf das Tumorwachstum.

5.3 RECK-Regulierung

Kann eine Promotor-Methylierung als karzinogene Ursache weitreichend ausgeschlossen werden, würde jedoch eine Betrachtung des RECK-Gens auch weiterhin beim Nierenzellkarzinom sinnvoll erscheinen. Studien, welche sich mit einer veränderten Expression von RECK in verschiedensten Karzinomen beschäftigten, lieferten dahingehend signifkante Ergebnisse und konnten einen Einfluss von RECK auf eine Karzinomentwicklung nachweisen.

Grundlage weiterführender Studien sollte die generelle Untersuchung eines Einflusses der RECK-Gen-Expression auf das Nierenzellkarzinom sein. Findet sich hier ein signifikanter Zusammenhang scheinen weitere Überlegungen hinsichtlich der Regulationsmechanismen von RECK in Bezug auf eine Karzinomentstehung lohnend.

Wege auf denen RECK in Tumoren reguliert bzw. dessen Expression verringert wird scheinen multifaktorieller Genese zu sein. Neben der untersuchten Promotor-Methylierung werden verschiedene Wege der RECK-Regulation beschrieben. Ein häufig angeführter Angriffspunkt ist die sog. Sp1 Seite des RECK-Gen-Promotors. Durch Anlagerung an diese Promotorregion kommt es zu einer geringeren Expression des RECK-Gens. So führt z.B. das Ebbstein Bar Virus über Beeinflussung der Sp1 Seite zu einer verringerten RECK-Expression indem es „extracellular signal regulated Kinase“ (ERK) aktiviert [43]. Auch der Einfluß von Histon Deacetylasen auf die RECK-Epression wurde untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung von Trichostatin A, einem HDAC Inhibitor, zu erhöhter RECK-Expression führte. Man ging davon aus, dass Trichostatin A die Bindung von HDAC an die Sp1 Seite verringerte [44]. Auch auf der Ebene der micro-RNAs wurde eine Beeinflussug von RECK nachgewiesen. Xin et al. [45] konnten zeigen, dass eine inverse Korrelation zwischen der Expression von micro-RNA 15A und RECK im Neuroblastom besteht. Die RECK Expression war hier signifikant mit dem Tumorstadium korreliert. Ebenso zeigte sich, dass miR-182 im Brustkrebs zu erhöhter Tumorinvasivität durch eine RECK-Hemmung führt [46] .

Abschließend ist festzustellen, dass in Kenntnis der geringen Wirkung von Chemotherapeutika sowie der weitgehenden Strahlensensibilität des Nierenzellkarzinoms jeder Ansatzpunkt der eine neue Grundlage zur konservativen Therapie der Erkrankung liefern könnte von besonderem Interesse ist und weiter verfolgt werden sollte.

V Anhang

1. Tabellen

Nummer	Bezeichnung	Seite
1	TNM-Klassifikation	12
2	Nukleäres Grading des Nierenzellkarzinoms	13
3	verwendetes Patientenkollektiv	25
4	Reagenzien und Kits	26
5	Bisulfitreaktion	29
6	Reaktionskomponenten der Bisulfitreaktion	30
7	Bisulfitierung im light cycler	30
8	Primer und Sonde für RECK	34
9	Primer und Sonde für ß-Actin	35
10	Programmeinstellungen der Real-Time PCR (RECK)	38
11	Messansatz des Real-Time PCR Laufs (RECK)	38
12	Programmeinstellungen der Real-Time PCR (ß-Actin)	39
13	Messansatz des Real-Time PCR Laufs (ß-Actin)	39
14	Bestimmung des Detektionslimits	44
15	Methylierungsansatz (Methyltransferaseversuch)	45
16	Proben (Methyltransferaseversuch)	45
17	Konzentration isolierter DNA	49
18	PCR-Effizienz	50
19	DNA-Konzentration nach Bisulfitierung	51
20	Abbau Kalibrator (RECK)	52
21	Abbau LzL-Kontrolle (RECK)	53
22	neuer Kalibrator und neue LzL-Kontrolle	54
23	Abbau Kalibrator (ß-Actin)	54
24	Abbau Lzl-Kontrolle (ß-Actin)	55
25	Detektionslimit 1. Lauf	56
26	Detektionslimit 2. Lauf	56
27	PCR Messergebnisse	58
28	Messergebnisse Analyse	60
29	NanoDrop Messwerte nach Bisulfitierung (Methyltransferaseversuch)	61
30	Real-Time PCR Messwerte (Methyltransferaseversuch)	61
31	Promotormethylierung prozentual	63
32	Promotormethylierung prozentual (Analyse)	64
33	Methylierungsvergleich (Graph Pad Prism)	65
34	Assoziationsanalyse	68
35	Korrelation nach Pearson	70
36	Korrelation nach Spearman	70

2. Abbildungen

Nummer	Bezeichnung	Seite
1	DNA-Methylierung	18
2	Promotor-Methylierung	19
3	Flussdiagramm	22
4	Taq Polymerase (Roche©)	33
5	Elektrophorese methylierter DNA	36
6	Elektrophorese unmethylierter DNA	37
7	PCR Standardkurve	41
8	Anstieg der Fluoreszemz	41
9	Abbau DNA-Kalibrator RECK	52
10	Abbau LzL-Kontrolle RECK	53
11	Abbau DNA-Kalibrator ß-Actin	54
12	Abbau LzL-Kontrolle ß-Actin	55
13	Detektionslimit 1. Lauf	56
14	Detektionslimit 2. Lauf	57
15	Methyltransferaseversuch	62
16	Vergleich Tumor-Normalgewebe	65
17	Vergleich Tumor-Normalgewebe (Balkendiagramm)	66
18	Vergleich Tumor-Normalgewebe nur klarzellige Proben	66
19	Vergleich Tumor-Normalgewebe nur klarzellige Proben (Balkendiagramm)	67
20	Assoziationsanalyse	68
21	Kaplan-Maier (pT/Rezidiv)	71
22	Kaplan-Maier (pT/Überleben)	72
23	Kaplan-Maier (T-Gewebe/Rezidiv)	73
24	Kaplan-Maier (N-Gewebe/Rezidiv)	73

VI Referenzen

1. Chow, W.H., Devesa S.S., Warren, J.L., Fraumeni, J.F., *rising incidence of renal cell carcinoma in the united states* JAMA, 1999. **281**(17): p. 1628-1631.
2. Kirkkali Z, T.E., Mungan, MU, Tuzel, E., *Recent advances in kidney cancer and metastatic desease.* BJU int, 2001. **88**(8): p. 818-824.
3. Landis, S.H., Murray T., Bolden, S., Wingo, PA., *cancer statistis 1999.* CA Cancer J Clin, 1999. **49**(1): p. 8-31.
4. Ljundberg, B., Campbell,S.C., Choi, H.Y., Jacqmin, D., Lee, J.E., Weikert, S., Kiemeney, L.A., *the epidemiologogy of renal cell carcinoma.* Eur Urol, 2011. **60**(4): p. 615-621.
5. Pomer, S., Schubert, J., Schmitz-Dräger, B., Voges, G., *Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Nierenzellkarzinoms.* Urologe A, 1998. **37**(A): p. 327-341.
6. Hörl, W.H., *Das Nierenzellkarzinom, .* Georg-Thieme Verlag, 2001. Duale Reihe/Innere Medizin(Sonderausgabe): p. 719-721.
7. Huland, H., Heinzer, H. *Nierentumore/Nierenzellkarzinom.* Springer Verlag, 2006. Urologie 3. Auflage: p.187-197
8. Fischer, K., Oberneder, R., *das Nirenzellkarzinom.* deutsche Krebsgesellschaft, 2008. kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien F3: p. 103-112.
9. Thoenes, W., Störkel, S., *Pathology of benign and malignant renal cell tumors.* Urologe A., 1991.**30**(6):p.41-50
10. Kim, S.H., Ro, J.Y., Kemp, B.L., Lee, J.S., Kwon, T.J., Fong K.M., Sekido, Y., Minna, J.D., Hong, W.K., Mao, L., *identification oft three distinct tumor supressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer.* Cancer Research, 1997. **57**(3): p. 400-4003.
11. Clark, J.C., Thomas, D.M., Choong, P.F., Dass, C.R., *Reck-a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer.* Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 675-683.
12. Hanahan D, W.R., *the hallmark of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
13. Liotta LA, S., P., Stetler-Stevensson, W.G., *cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.* Cell, 1991. **64**(2): p. 327-336.
14. Cao, J., Sato, H., Takino, T., Seiki, M., *The C-terminal region of mebrane typematrix-metalloprteinase is a functional transmebrane domain required for progelatinase A activation.* J Biol Chem., 1995. **270**(2): p. 801-805.
15. Visse, R., Nagase, H., *Matrix metalloproteinases and tissue hnhibitors of metalloproteinases.* Circ Res., 2003. **92**(8): p. 827-839.
16. Johansson, N., Saarialho-Kere, U., Airola, K., Herva, R., Nissinen, L., Westermarck, J., Vuorio, E., Heino, J.,Kähäri, V.M., *Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development.* Developmental Dynamics, 1997. **208**(3): p. 387-397.
17. Marchenko GN, M.N., Strongin AY, *The structure and regulatin of human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein.* Biochem J., 2003. **372**(2): p. 503-515.
18. Kahari V.M., S.-K., U., *Matrix metalloproteinase in skin.* Exp. Dermatol., 1997. **6**(5): p. 199-213.
19. Lichtinghagen, R., Breitenstein, K. et al., *Comparison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver.* Virchows Arch. , 1998. **432**(2): p. 153-158.
20. Lindy, O., Kontinnen YT, Sorsa, T., Ding, Y., Santavirta, S., Ceponis, A., Lopez-Otin, C., *Matrix metalloproteinase 13 (colleagenase 3) in human rheumtoid synovium.* Arthritis Rheum., 1997. **40**(8): p. 1391-1399.
21. Keyszer, G., Lambiri, I., Keysser, M. , Keysser, C., Nagel, R., Burmester, G.R., Jung, K., *Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity.* Z. Rheumatol, 1998. **57**(6): p. 392-98.

22. Takahashi, C., Sheng, Z., Horan, T.P., Kitayama, H., Maki, M., Hitomi, K., Kitaura, Y., Takai, S., Sasahara, R.M., Horimoto, A., Ikawa, Y., Ratzkin, B.J., Arakawa, T., Noda, M., *Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK.* Proc Natl Acad Sci U S A 95 1998. **95**(22): p. 13221-6.
23. Ray JM, S.-S.W., *TIMP-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and motilit.* Ann. NY Acad. Sci, 1994. **732**: p. 233-247.
24. Zucker S., M.H., Conner CE, *Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells – conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation.* Internat. J. Cancer, 1998. **75**(5): p. 780-786.
25. D'Ortho MP, Will., H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpi, R., Zardi, L., Murphy, G., *Membrane-typematrix metalloproteinase 1 and 2 exhibit broad spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases.* European Journal of Biochemistry, 1997. **250**(3): p. 751-757.
26. Noda M., Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Kitayama, H., Takahashi, C., *RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling.* Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 167-175.
27. Rabien, A., Burkhardt, M., Jung, M., Tritsche, F., Ringsdorf, M., Schicktanz, H., Loening, S.A., Kristiansen, G., Jung, K., *Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy.* Eur Urol, 2007. **15**(5): p. 1259-1266.
28. Chang, H.C., Cho. C.Y., Hung, W.C., *Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer.* Cancer Sci, 2007. **98**(2): p. 169-173.
29. Span, P.N., Sweep, C.P., Manders, P., Beex, L.V., Leppert, D., Lindberg, R.L., *Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma.* Cancer, 2003. **97**(11): p. 2710-2715.
30. Masui, T., Doi, R., Koshiba, T., Fujimoto, K., Tsuji, S., Nakajima, S., Koizumi, M., Toyoda, E., Tulachan, S., Ito, D., Kami, K., Mori, T., Wada, M., Noda M., Imamura, M., *RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(5): p. 1779-1784.
31. Cho C.Y., Wang, J.H., Chang, H.C., Chang, C.K., Hung, W.C., *Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells.* J Cell Physiol., 2007. **213**(1): p. 65-69.
32. Long, N.K., Kato, K., Yamashita, T., Makita, H., Toida, M., Hatakeyama, D., Hara, A., Mori, H., Shibata, T., *Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas.* Oral Oncology 2008. **44**(11): p. 1052-1058.
33. Du, Y.Y., Dai, D.Q., Yang, Z., *Role of RECK methylation in gastric cancer and its clinical significance.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(7): p. 904-908.
34. Feinberg AP, Cui, H., Ohlsson, R., *DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms, .* Semin Cancer Biol., 2002. **12**(5): p. 389-398.
35. Herman JG, Baylin, S.B., *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.* N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-2054.
36. Jurgan, T., Epigenetic des Prostatakarzinoms, DNA-Methylierung relevanter Gene, *Epigenetic des Prostatakarzinoms, DNA-Methylierung relevanter Gene.* http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online, 2006: p. 19-20.
37. Bird, A., *DNA methylation and epigenetic memory.* Genes Dev., 2002. **16**(1): p. 6-21.
38. Klose RJ, B.A., *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.* Trends Biochem Sci., 2006. **31**(2): p. 89-97.
39. PA, J., *DNA methylation and cancer.* Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5358-5360.
40. Kato, K., Long, N.K., Makita, H., Toido, M., Yamashita, T., Hatakeyama, D., Hara, A., Mori, H., Shibata, T., *Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cell.* British Journal of Cancer 2008. **99**(4): p. 647-654.
41. Ohl, F., *Identifikation und Validierung von endogenen Referenzgenen für Expressionsanalysen des Prostata- und Harnblasenkarzinoms mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR.* http://www.diss.fu-berlin.de, 2005: p. 20-21.

42. roche©, K.M., K., Rupprecht, W., et al., *PCR: eine ausgezeichnete Methode; Quantitative Real-time PCR (qPCR);*. www.roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf p. 75-7645.
43. Liu, L.T., Peng, J. P., Chang, H.C., Hung, W.C., *RECK is a target of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1.* Oncogene, 2003. **22**(51): p. 8263–8270.
44. Chang, H.C., Liu, L.T., Hung, W. C. , *Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK.* Cellular Signalling, 2004. **16**(6): p. 675-679.
45. Xin, C., Buhe, B., Hongting, L., Chuanmin, Y., Xiwei, H., Hong, Z., Lulu, H., Qian, D., Renije, W., *MicroRNA-15a promotes neuroblastoma migration by targeting reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) and regulating matrix metalloproteinase-9 expression.* FEBS J, 2013. **280**(3): p. 855-866.
46. Chiang CH, Hou, M. F., Hung, W.C., *Up-regulation of miR-182 by β-catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(4): p. 3067-3076.

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sascha Detlof versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „RECK-Methylierung im Nierenzellkarzinom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 12.10.2013

Sascha Detlof