

Aus der Charité – Universitätsmedizin
Centrum 10 für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Klinik für Urologie
Direktor: Prof. Dr. med. Kurt Miller

Habilitationsschrift

Die Bedeutung der Polycomb-Proteine bei urologischen Tumorerkrankungen: Epigenetische Regulatoren und Tumormarker mit prognostischer Relevanz

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Stefan Hinz

Eingereicht : Januar 2010
Dekanin : Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter : Prof. Dr. J. Geschwend
2. Gutachter : Prof. Dr. M. Kuczyk

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 **Epigenetische Regulationsmechanismen unter besonderer Berücksichtigung der Polycomb-Group-Proteine** 6
- 1.2 **Stellenwert der Polycomb-Group-Proteine in der urologischen Forschung** 10

2. Methodische Grundlagen

- 2.1 **Quantitative Echtzeit RT-PCR** 14
- 2.2 **Quantitative methylierungsspezifische PCR (QMSP)** 14
- 2.3 **Immunhistochemie** 15
- 2.4 **Semidünnschnitt-Technik** 16

3. Ergebnisse

- 3.1 **Expression des Polycomb Group Proteins EZH2 und seine prognostische Relevanz für Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase** 17
Hinze S. et al. *Expression of the Polycomb group protein EZH2 and its relation to outcome in patients with urothelial carcinoma of the bladder.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2008; 134(3): 331-6
- 3.2 **EZH2: Ein epigenetischer Repressor dessen Expression mit der Promotormethylierung von APAF-1 in oberflächlichen Urothelkarzinomen der Harnblase korreliert** 25
Hinze S. et al. *EZH2 Polycomb Transcriptional Repressor Expression Correlates with Methylation of the APAF-1 Gene in Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder.* Tumor Biology 2007; 28(3): 151-7
- 3.3 **Expressionsparameter der Polycomb Group Proteine BMI1, SUZ12, RING1 und CBX7 im Urothelkarzinom der Harnblase und deren prognostische Relevanz** 34
Hinze S. et al. *Expression Parameters of the Polycomb Group Proteins BMI1, SUZ12, RING1 and CBX7 in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Their Prognostic Relevance.* Tumor Biology 2008; 134: 543-50
- 3.4 **Expressionsprofil des Polycomb Group Proteins Enhancer of Zeste Homolog 2 und seine prognostische Relevanz im Nierenzellkarzinom** 43
Hinze S. et al. *Expression Profile of the Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste Homologue 2 and its Prognostic Relevance in Renal Cell Carcinoma.* Journal of Urology 2009; 182(6): 2910-5

3.5	Deregulation von EZH2 in humanen Spermatogenesestörungen und testikulären Keimzelltumoren	51
	Hinz S.d et al. <i>Deregulation of EZH2 expression in human spermatogenic disorders and testicular germ cell tumors</i> . World Journal of Urology 2009; epub ahead of print:	
4.	Diskussion	
4.1	EZH2 – ein Tumormarker des Harnblasenkarzinoms mit funktioneller Relevanz?	58
4.2	Expressionsprofil von EZH2 im Nierenzellkarzinom	63
4.3	Expressionsprofil von EZH2 bei Spermatogenesestörungen und in Keimzelltumoren	65
5.	Limitierungen und Ausblick	68
6.	Zusammenfassung	71
7.	Literaturverzeichnis	73
8.	Danksagungen	85
9.	Eidesstattliche Erklärung	86

Abkürzungen

APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
BMI1	Polycomb Ring Finger Onkogen Protein 1
bp	Basenpaare als Längenangabe
CBX7	Polycomb Homolog Chromobox Protein 7
CpG	Cytosin-Guanosin Basenpaar
DAPK-1	Death-associated protein kinase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EED	Extra Sex Combs
EZH2	Enhancer of Zeste
H3	Histon 3
h-PBGD	humane Porphobilinogen-Deaminase
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein 3
IHC	Immunhistochemie
Ink4a/ARF	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
JS	Johnson Score
K9	Lysinrest 9
K27	Lysinrest 27
KempoHDAC	Histondeacetylase
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NIM	normalisierter Methylierungsindex
NZK	Nierenzellkarzinom
PcG	Polycomb Gruppe
PRC 1 + 2	Polycomb Repressive Complex
PRE	Polycomb Repressive Element
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
RB	Retinoblastoma
RING1	Ring Finger Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCOS	Sertoli-Cell-Only Syndrom
siRNA	Small inhibitory Ribonukleinsäure

SUZ12	Suppressor of Zeste 12
TNM	Tumorklassifikation der World Health Organization
QMSP	Quantitative methylierungsspezifische PCR
WHO	World Health Organization

Einleitung

1.1 Epigenetische Regulationsmechanismen unter besonderer Berücksichtigung der Polycomb Group Proteine

Die maligne Transformation einer Zelle und die Entstehung von Neoplasien wurden schon früh mit der Fehlregulation von Genen in Verbindung gebracht. Hierbei stehen zwei wesentliche Gengruppen im Vordergrund. Zum einen die Gruppe der zellulären Onkogene, deren Aktivierung zu einem malignen Zellwachstum führt und zum anderen die Gruppe der Tumorsuppressorgene, die im Gegensatz dazu im inaktivierten Zustand die Tumorigenese und Tumorprogression fördern [1]. Darüber hinaus existieren multiple weitere Gengruppen, deren Dysregulation mit der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren assoziiert ist, die aber funktionell weder den Onkogenen noch den Tumorsuppressorgenen zugeordnet werden können [2].

Vielfach resultiert die gestörte Expression eines Gens aus direkten Veränderungen in der DNA-Sequenz verursacht durch Punktmutationen, Deletionen, chromosomale Translokationen oder Amplifikationen [1;3]. Alternativ zu diesen direkten genetischen Veränderungen existieren epigenetische Regulationsmechanismen, welche die Transkription bei unveränderter DNA-Basensequenz steuern. Hierbei kommt es zu räumlichen Konfigurationsveränderungen der DNA bzw. des Chromatins, die eine spezifische Hemmung der Gentranskription zur Folge haben. Hauptmechanismen der epigenetischen Regulation sind neben der DNA-Methylierung kovalente Histonmodifikationen [4;5].

Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe (-CH₃) über eine DNA Methyltransferase (DNMT3A oder DNMT3B) an ein 5' Cytosin-Ende von CpG-Dinucleotiden gebunden. Ein weiteres Enzym, die DNMT1, gewährleistet die Aufrechterhaltung dieser Methylierung bei der Zellteilung.

Weist ein DNA-Abschnitt von 500 Basenpaaren überdurchschnittlich viele CpG Dinucleotide (>55 %) auf, wird diese Sequenz als CpG Island bezeichnet. Voraussetzung für eine methylierungsspezifische Genregulation ist das Vorhandensein von CpG Islands in oder vor der Promotorregion des entsprechenden Gens [6].

Mit Ausnahme der Promotorregion sind CpGs in der normalen Zelle überwiegend methyliert. Bei der malignen Transformation einer Zelle kommt es jedoch zu einer Verschiebung im Methylierungsmuster. Eine vielfach bestätigte Beobachtung ist die Promotor-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, wobei gleichzeitig das globale Genom einer malignen Zelle im Vergleich zu einer benignen Zelle eher hypomethyliert ist [7;8]. Die durch Hypermethylierung bedingte Formationsänderung der Promotorregionen führt dazu, dass RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können und somit die Transkription des betroffenen Gens verhindert wird. In der Vergangenheit konnte ein verändertes Methylierungsmuster bei einer Vielzahl funktionell unterschiedlicher Gene in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Dies betrifft oftmals Gene, die den Zellzyklus regulieren (p53, p16, p15), die für die DNA-Reparatur verantwortlich sind (hMLH1, MGMT, BRCA1), die mit einer Metastasierung assoziiert sind (CDH1, TIMP3, DAPK) oder auch Gene, die den Zellmetabolismus kontrollieren (GSTP1) [9-13]. Für viele Tumorerkrankungen konnten spezifische Methylierungsprofile nachgewiesen werden. Für das Prostatakarzinom sind beispielsweise mehr als 50 Gene als hypermethyliert beschrieben worden [14]. Anhand der Methylierungsfrequenz einzelner Gene können sowohl Rückschlüsse auf die Tumorentität als auch auf den Aggressivitätsgrad des Tumors gezogen werden [15]. So ist bei malignen hämatologischen Erkrankungen meist der Promotor des Gens p73 methyliert, während eine GSTP-1-Methylierung vornehmlich bei Prostatakarzinomen auftritt [16;17].

Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass die epigenetische Regulation weitaus komplexer ist. Es ist davon auszugehen, dass DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen ineinander greifen und somit nicht nur einzelne Gene sondern gleich ganze Gengruppen oder sogar Chromosomenabschnitte supprimiert werden [18].

Epigenetische Histonmodifikationen beinhalten die Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung von Histon-Enden im Nukleosom [19]. Insbesondere die Acetylierung und Methylierung von den Histonen H3 und H4 sind mit multiplen Tumorentitäten assoziiert. Ähnlich wie bei der DNA-Methylierung existieren auch für die Histonmodifikation spezifische Muster, durch die Tumor-Subtypen unterschieden und Aussagen über die Prognose getroffen werden können [20;21].

Die Methylierung der Histone erfolgt über Histon-Methyltransferasen, deren Funktion unter anderem durch die katalytischen Einheiten der Polycomb Group Proteine übernommen werden. Die Gruppe der Polycomb Proteine sind strukturell

unterschiedliche aber funktionell epistatische Proteine, deren wesentliche Funktion darin besteht, über entsprechende Histonmodifikationen die Transkription zu hemmen [22;23]. Der Begriff Polycomb wurde erstmals vor 50 Jahren von der Genetikerin Pamela Lewis verwendet. Sie beschrieb damals eine Drosophila-Mutation mit zusätzlichen "Sex-Kämmen" an den Hinterbeinen, eine Struktur, die üblicherweise nur an den Vorderbeinen der männlichen Drosophila-Fliege vorkommt und dazu dient, das Weibchen beim Geschlechtsakt festzuhalten [24]. In der Folge konnten multiple homeotische Gene identifiziert werden, die bei der frühen Embryonalentwicklung und vor allem bei der segmentalen Anordnung der einzelnen Organe und Körperteile eine wesentliche Rolle spielen und unter anderem für die von Lewis beschriebene Mutation verantwortlich sind. Diese Gene wurden unter dem Begriff der Polycomb-Group-Gene zusammengefasst [25]. Weiterführende molekularbiologische Studien konnten zeigen, dass die Polycomb-Proteine im wesentlichen zwei funktionelle Einheiten bilden, die als Polycomb Repressive Complex 1 und 2 (PRC1+2 Dargestellt in Tabelle 1) bezeichnet werden [26;27].

Tabelle 1: Kernkomponenten des Polycomb Repressive Complex 1 und 2

Polycomb Repressive Complex 1:	
Chromobox Homolog 1-8	Synonyme: CBX1--8
Erythroid Differentiation Regulator 1-3	Synonyme: Edr1-3
Ring Finger Protein 1	Synonyme: Ring1
Polycomb Ring Finger Onkogen Protein 1	Synonyme: BMI1
Nematode Specific Peptide family, Group c	Synonyme: NSPC-1
Polycomb Repressive Complex 2:	
Enhancer of Zeste Homolog 1+2	Synonyme: EZH1+2
Suppressor of Zeste 12	Synonyme: SUZ12
Extra Sex Combs	Synonyme: EED

Die PRC 1 + 2 sind zwei große Multiproteinkomplexe, deren spezifische Funktionen weiterhin nur unzureichend verstanden sind. Es existiert jedoch ein Arbeitsmodell, das die Funktionsmechanismen vereinfacht darstellt und im Folgenden kurz erläutert wird. Der PRC 1 scheint für die Aufrechterhaltung der polycombabhängigen Genregulation verantwortlich zu sein und besteht beim Säugetier aus den Ring-

Finger-Proteinen (RING), den Polycomb-Homolog-Chromobox-Proteinen (CBX), den Polycomb-Ring-Finger-Onkogen-Proteinen (BMI) neben einer Vielzahl von weiteren Proteinen. Die Initiierung der Genregulation erfolgt durch den PRC 2, der sich im Wesentlichen aus den Proteinen Enhancer of Zeste (EZH), Suppressor of Zeste (SUZ) und Extra Sex Combs (EED) zusammensetzt [23].

Ein Kennzeichen von transkriptionell aktiven Genen ist das Vorhandensein von acetylierten Histonen (H3) im Nucleosom. Im Gegensatz dazu sind die Histone (H3) von inaktivierten Genen überwiegend deacetyliert und an spezifischen Lysinresten (K9 oder K27) der Amino-Enden trimethyliert [28]. Es wird davon ausgegangen, dass sich der PRC 2 vornehmlich an sogenannte Polycomb repressive Elemente (RPE) der chromosomalen DNA anlagert [29]. Der PRC 2 führt dann über seine katalytischen Einheiten zu einer Deacetylierung von H3 und über die spezifischen Methyltransferasen zu einer Trimethylierung von H3 K27. Über diese Methylierung ist eine Bindungsstelle für den PRC1 geschaffen, der an die DNA bindet, die so entstandene Modifikation auch über die Zellteilung hinaus aufrecht erhält und als zelluläres Gedächtnis dient [30;31].

Die durch die Polycomb-Proteine verursachten Formationsänderungen in der Chromatin-Architektur führen zur Geninaktivierung. Ihr hemmender Einfluss auf die Transkription konnte bereits bei mehr als 1000 Genen nachgewiesen werden [32;33]. Von den betroffenen Genen ist ein Großteil an der Zellzyklusregulation, der Apoptose und der Zellidentität beteiligt, so dass den PcG-Proteinen eine erhebliche Beteiligung bei der embryonalen Entwicklung zugesprochen wird. Defekte der PcG-Proteine in transgenen Mäusen führen beispielsweise zu hämatopoetischen Anomalien oder zu schwerwiegenden Thymus- oder Milz-Hypoplasien [34-36].

Eine funktionelle Rolle der PcG-Proteine in der Karzinogenese ist naheliegend, aber weitestgehend ungeklärt. Aktuelle Studien belegen den Einfluss einzelner PcG Proteine in diversen malignen Tumoren [37]. Hervorzuheben ist hier das Protein Enhancer of Zeste 2 (EZH2), das die katalytische Einheit des PRC 2 darstellt und für die Trimethylierung von H3 K27 verantwortlich ist. Eine der häufigsten Beobachtungen ist die Überexpression von EZH2 in maligne entarteten Geweben im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. Zudem konnte in einigen Tumoren eine erhöhte EZH2-Expression mit einem fortgeschrittenem Stadium oder einer schlechteren Prognose der Erkrankung korreliert werden, so dass EZH2 schon frühzeitig als potentieller Biomarker für die Diagnostik und Prognose von

Krebserkrankungen sowie als viel versprechendes Ziel für neue Therapieansätze vorgeschlagen wurde [38-40]. Ähnliche Ergebnisse existieren auch zu anderen PcG-Proteinen wie CBX7, BMI1, RING1 und SUZ12. Auch hier fällt auf, dass eher eine Überexpression der PcG Gene mit den malignen Eigenschaften einer Zelle assoziiert zu sein scheint [41-44]. Diese Gene werden deshalb teilweise auch der Gruppe der Onkogene zugeordnet.

1.2 Stellenwert der Polycomb Group Proteine in urologischen Tumorerkrankungen

Das Prostatakarzinom ist die häufigste urologische Tumorerkrankung. An dieser Entität wurden auch die meisten Untersuchungen zur Expression und Funktion von PcG-Proteinen durchgeführt. In einer der ersten Studien zeigte sich EZH2 in metastasierten Tumoren signifikant stärker exprimiert als in organbegrenzten Tumoren [45]. Zudem konnte in vitro nachgewiesen werden, dass ein Verlust von EZH2 zu einer verminderten Zellteilungsrate in Prostatakarzinomzelllinien führt. Weitere Studien bestätigten diese Beobachtungen und unterstreichen die funktionelle Bedeutung für EZH2 bei der Entstehung und der Progression des Prostatakarzinoms (zusammengefasst in [46]).

Die PcG-Proteine BMI1, Ring1, SUZ12 und CBX7 wurden ebenfalls im Prostatakarzinom als überexprimiert beschrieben, wobei ihre Expression zum Teil mit dem klinischen Stadium und/oder mit dem Krankheitsverlauf assoziiert war [47;48]. Für CBX7 konnte eine direkte Hemmung der Transkription der Tumorsuppressorgene p16Ink4a und p14Arf nachgewiesen werden. Bei selektiver Hemmung von CBX7 mittels siRNA kommt es konsekutiv in Abhängigkeit der p16Ink4a/Rb und p14Arf/p53 Signalkaskade zu einem eingeschränkten Zellwachstum in malignen und benignen Prostatazellen [41]. Eine ähnliche Funktion konnte auch für BMI1 in B-Zell-Lymphomen demonstriert werden [41;49]. Die zahlreichen Studien zur Funktion der PcG-Proteine im Prostatakarzinom dienen als Grundlage für meine Arbeit an weiteren urologischen Tumorentitäten.

Das Urothelkarzinom, die zweithäufigste urologische Tumorerkrankung, ist vor allem durch eine sehr hohe Rezidivrate von bis zu 70 % gekennzeichnet. Etwa 20 bis 25% der Patienten mit initial oberflächlichen Tumoren entwickeln im Verlauf eine

Stadienprogression bis hin zu einem muskelinvasiven Tumor mit entsprechend erhöhter krankheitsspezifischer Mortalität [50]. Zum aktuellen Zeitpunkt basieren Behandlungs- und Nachsorgerichtlinien überwiegend auf der histopathologischen Klassifizierung des Tumors. Da sich Tumoren trotz gleichen Tumorstadiums und gleicher Differenzierung in ihrem Wachstumsverhalten und ihrer Rezidivwahrscheinlichkeit dennoch zum Teil deutlich unterscheiden, besteht ein Bedarf an zusätzlichen molekularen Markern zur Risikostratifizierung. Anhand solcher molekularer Prognosemarker wäre es möglich, Therapie- und Nachsorgeschemata individuell anzupassen. Patienten mit besonders aggressiven Tumorformen könnte beispielsweise eine radikalere Therapie oder ein zusätzliches adjuvantes Therapiekonzept empfohlen werden.

In einer vorangegangenen Studie konnte an einem kleinen Patientenkollektiv durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass histologisch schlecht differenzierte (high grade) und invasiv wachsende Tumoren (\geq pT1) eine höhere EZH2-m-RNA-Expression aufwiesen als gut differenzierte (low grade) und nicht invasive Tumoren ($<$ pT1) [51]. In zwei weiteren Studien konnte diese Beobachtung auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Untersuchungen bestätigt werden [52;53]. Bisher erfolgte jedoch aufgrund von geringen Fallzahlen und fehlender Nachsorgedaten keine Untersuchung zur prognostischen Bedeutung von EZH2 im Urothelkarzinom.

Im Rahmen der nachfolgend vorgestellten Forschungsarbeit (Publikation 1) wurden daher erstmalig potentielle Assoziationen zwischen der EZH2-Expression und der Rezidivhäufigkeit von Urothelkarzinomen untersucht [54].

Da in dieser Arbeit EZH2 als Gewebemarker für Tumorprogression im Urothelkarzinom bestätigt werden konnte, sollten weitere funktionelle Aspekte von EZH2 überprüft werden. In einer wegweisenden Arbeit konnten Vire et al. einen Zusammenhang zwischen den beiden essentiellen epigenetischen Regulationsmechanismen, der DNA-Methylierung und der Histonmodifikation durch die PcG-Proteine, nachweisen. Vire et al. zeigten, dass EZH2 im Zusammenhang mit dem PRC2 einen direkten Einfluss auf die Aktivität der DNA Methyltransferasen und somit auf die Promotormethylierung hat. Die Anwesenheit von EZH2 war ebenfalls für eine suffiziente Funktion der DNMTs in den Promotorregionen von EZH2 Zielgenen notwendig [55].

In einer weiteren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe (Publikation 2) wurde überprüft ob die die Frequenz und Stärke der Promotormethylierung von p53 assoziierten Genen (APAF-1; DAPK-1; IGFBP-3), die im Urothelkarzinom typischerweise vermehrt methyliert sind, mit dem Expressionsniveau von EZH2 in Zusammenhang steht [56].

Bisher existieren zum Urothelkarzinom keine Untersuchungen von weiteren PcG-Proteinen. Da EZH2 jedoch im Zusammenhang mit einer Vielzahl von PcG-Proteinen als PRC 1 und PRC 2 eine funktionelle Einheit bildet, ist es naheliegend, auch andere PcG-Proteine als Prognosemarker im Urothelkarzinom in Betracht zu ziehen. Auf dieser Basis untersuchten wir erstmalig die Expression von SUZ12, RING1, BMI1 und CBX7 im Urothelkarzinom, wobei mögliche Korrelationen der relativen Expression mit dem histopathologischen Staging und dem Verlauf der Erkrankung überprüft wurden (Publikation 3) [57].

Im Nierenzellkarzinom basieren Modelle zur Abschätzung der Prognose auf einer Reihe von anatomischen (z.B. TNM-Klassifikation), histologischen (z.B. Differenzierung, Tumor-Subtyp) klinischen (Karnofsky Index) und laborchemischen (Serum Calcium, Serum LDH, Hämoglobin) Faktoren [58]. Trotz radikal chirurgischer Therapie bei nicht metastasierter Erkrankung erfährt etwa ein Drittel der Patienten ein Tumorrezidiv [59]. Durch ein zunehmend besseres Verständnis der Tumorbio­logie des Nierenzellkarzinoms konnten gezielte Therapiestrategien entwickelt werden, die vornehmlich aus der Gruppe der Angiogeneseinhibitoren stammen. Die Einführung von Medikamenten wie Sunitinib, Sorafenib, Bevacizumab, Temsirolimus und Everolimus ermöglicht nun eine im Vergleich zu vorbestehenden Regimen deutlich verbesserte palliative Therapie dieser hochgradig Chemo- und Strahlentherapie resistenten Tumorentität [60]. Gerade im Hinblick auf diese neuen Therapieoptionen besteht ein großer Bedarf an zuverlässigen prognostischen Markern, um die Therapieplanung zu individualisieren und neue Therapieschemata beispielsweise im adjuvanten Setting effizient einsetzen zu können.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie lieferte erste Hinweise für eine funktionelle Bedeutung von EZH2 im Nierenzellkarzinom. In vitro konnte EZH2 mit einer erhöhten Proliferationsrate und einer gesteigerten Apoptoseresistenz in Verbindung gebracht werden [61]. In einer weiteren Untersuchung unserer Forschungsgruppe wurden potentielle Assoziationen der EZH2-Expression mit histopathologischen Parametern und mit der Prognose klarzelliger Nierenzellkarzinome untersucht (Publikation 4) [62].

Das humane Hodengewebe weist im Vergleich zu allen anderen benignen Gewebetypen eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate auf und eine stringente Zellzyklusregulation ist bei den meiotischen und mitotischen Zellteilungen der gesunden Spermatogenese von übergeordneter Bedeutung [63]. Somit scheint es naheliegend, dass im Hoden Gene exprimiert werden, die in normal differenziertem adulten Geweben abgeschaltet sind. Aufgrund dieser Ähnlichkeit zu Tumorgewebe wurde von Cheng et al. sogar eine Gruppe von Genen als Cancer-Testis-Antigene beschrieben, die durch eine vorrangige Expression in testikulären Keimzellen und malignen Tumoren charakterisiert ist [64]. Diesen Genen wird eine wichtige Rolle bei der Regulation der Spermatogenese nachgesagt. Entsprechend konnte eine Deregulation ihrer Expression mit dem Auftreten von Spermatogenesestörungen und mit der Entwicklung testikulärer Keimzelltumoren in Verbindung gebracht werden [65].

Für humanes Hodengewebe und Keimzelltumoren des Hodens sind bisher keine Daten zur quantitativen Expression von EZH2 oder anderen PcG-Proteinen publiziert worden.

Durch den regulativen Einfluss der PcG-Proteine auf eine Vielzahl von Genen bildet diese Gruppe jedoch ein interessantes Ziel zur Untersuchung am Hodengewebe. In einer quantitativen Analyse erstellten wir ein Expressionsprofil von EZH2 im normalen Hodengewebe, in histologisch definierten Spermatogenesestörungen und in malignen Keimzelltumoren (Publikation 5).

Nachfolgend werden neben den methodischen Grundlagen die wesentlichen Ergebnisse der einzelnen Arbeiten (Publikationen 1-5) dargestellt. Im Anschluss erfolgt deren Diskussion und kritische Bewertung vor dem Hintergrund der aktuellen Datenlage und im Hinblick auf zukünftige Forschungsoptionen.

2. Methodische Grundlagen

2.1 Quantitative Echtzeit RT-PCR

Die quantitativen m-RNA-Expressionsanalysen wurden mittels Echtzeit-RT-PCR durchgeführt. Nach RNA-Extraktion (RNeasy[®] Mini Kit: Quiagen, Hilden, Deutschland) der Gewebeproben wurde zunächst die Konzentration (Nano-Drop ND-100: PEQLAB; Biotechnology, Erlangen, Deutschland) und Integrität (Agilent Bioanalyzer 2100: Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) der RNA bestimmt. Proben mit mangelhafter RNA-Qualität wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die m-RNA-Expression von EZH2, CBX7, BMI1, SUZ12 und RING1 wurde nach Design und Optimierung der entsprechenden Primer- und Hybridisierungssonden mit dem LightCycler[®] System der Firma Roche (Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA) quantifiziert. Die Expression des jeweiligen Zielgens wurde dann auf die eines geeigneten Referenzgens, in unserer Arbeit die humane Porphobilinogen-Deaminase (h-PBGD), normalisiert. Detaillierte Beschreibungen der jeweiligen PCR-Bedingungen sowie der Sequenzen von Primern und Hybridisierungssonden sind dem jeweiligen Methodenteil der Publikationen 1-5 zu entnehmen.

2.2 Quantitative methylierungsspezifische PCR (QMSP)

Im Urothelkarzinom wurden mögliche Zusammenhänge zwischen der EZH2 m-RNA-Expression und der Methylierung der p53 assoziierten Gene APAF-1, DAPK-1 und IGFBP-3 überprüft. Die LightCycler[®] basierte, hochsensitive QMSP ermöglicht im Gegensatz zur rein qualitativen und semiquantitativen methylierungsspezifischen PCR eine Aussage über den Grad bzw. die Stärke der Methylierung eines Zielgens innerhalb einer Probe.

Nach DNA-Isolierung (BioRobot[®] EZ1: Qiagen, Hilden, Deutschland) aus der entsprechenden Gewebeprobe erfolgte eine Bisulfitierung der DNA (MethylEasy[™] DNA Bisulfite Modification Kit: Human Genetic Signatures Pty Ltd, Macquarie Park, Australien), bei der sämtliche nicht methylierte Cytosine innerhalb des DNA-Einzelstranges mittels Natriumbisulfit zu Uracil konvertiert wurden. Die methylierten Cytosine bleiben hingegen unverändert erhalten. Die weitere Analyse erfolgte mittels

fluoreszenzbasierter real time RT-PCR unter der Verwendung von TaqMan® Hybridisierungssonden. Die Primer der zu untersuchenden Gene wurden hierbei in die Promotor-Region gelegt und enthielten jeweils mindestens 2 CG-Motive, um eine Bindung an nicht voll methylierte DNA auszuschließen. Mit Hilfe kommerziell erhältlicher vollständig methylierter DNA (CpGenome™ Universal Methylated DNA: Chemicon International, Temecula CA, USA) wurden für jedes der untersuchten Gene Standards mit definierten DNA-Konzentrationen entwickelt, die neben den Negativ-Kontrollen in jeder Messung mitgeführt wurden und eine Quantifizierung der PCR-Produkte auf Basis der LightCycler® Software ermöglichten.

Parallel zum Zielgen wurde bei der QMSP ein internes Referenzgen (Housekeeping Gen) untersucht, wobei die Primer und TaqMan® Sonden in einer CpG-freien Sequenz des Referenzgens lokalisiert werden, sodass die Amplifikation unabhängig vom Methylierungsstatus war [66]. In unserer Arbeit diente MYOD1 als Referenzgen, welches bereits in Voruntersuchungen etabliert werden konnte [67].

Zur Vergleichbarkeit des Methylierungsgrades der einzelnen Proben und um Unterschiede im DNA-Input zwischen verschiedenen Proben korrigieren zu können, wurde in einem weiteren Schritt der normalisierte Methylierungsindex (NIM) bestimmt. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten von methylierten Zellen (Kopien Anzahl des methylierten Gens) und der Anzahl von Gesamtzellen in dem Präparat (Kopien Anzahl des Referenzgens MYOD1), multipliziert mit 100. Der NIM gibt somit den prozentualen Anteil der Zellen einer Probe an, in denen der Promotor des Zielgens im methylierten Zustand vorliegt.

2.3 Immunhistochemie

Zur intra- und extrazellulären Lokalisation des EZH2 Proteins diente die Immunhistochemie (IHC). Zudem konnte mit dieser Untersuchung überprüft werden, ob sich die im Rahmen der Echtzeit RT-PCR ermittelten Werte der relativen EZH2-Expression auf die Proteinebene übertragen lassen. IHC-Untersuchungen von EZH2 wurden in Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe der Niere, der Blase und des Hodens durchgeführt. Verwendet wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper (R&D Systems®, USA). Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert und nach Eliminierung der endogenen Peroxidase-Aktivität rehydriert. Die Schnitte wurden dann über Nacht mit dem EZH2 Antikörper in einer Verdünnung von 1:400

bei 4°C inkubiert. Nach einer zweiten Inkubation mit einem Biotin konjugiertem polyvalenten sekundären Antikörper wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz behandelt. Die Visualisierung der Reaktionsprodukte erfolgte mit Diaminobenzidin-Tetrachlorid. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Hämatoxylin gefärbt. Die Quantifizierung der IHC-Färbung beschränkte sich auf die Zellkerne da unspezifische Reaktionen im Zytoplasma nicht ausgeschlossen werden konnten. Die Intensität der nukleären Färbung wurde semiquantitativ in 12 Stufen unterteilt, wobei 0 gar keine Färbung und 12 die stärkste Färbung repräsentierte.

2.4 Semidünnschnitt-Technik

Um die histologische Beurteilung der Hodenbiopsien zu optimieren, verwendeten wir eine besonders schonende Aufarbeitungstechnik, mit der Sludge-Artefakte, für die der Hoden hochempfindlich ist, minimiert werden konnten. Die Fixierung und Aufarbeitung des Materials erfolgte nach den Regularien der Semidünnschnitt-Technik [68]. Hierbei wurde die entnommene Gewebeprobe für mindestens 3 Stunden und bei einer Temperatur von 4°C in einer Lösung aus Glutaraldehyd (5,5%) in 0,05M Phosphatpuffer fixiert. Anschließend wurde die Probe für 2,5 Stunden in eine Lösung von 1% Osmiumtetroxid in Saccharose-Phosphat-Puffer gegeben. Das Material wurde dann einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Daraufhin erfolgte eine Spülung mit Propylenoxid und schließlich die Einbettung in Epon 812. Anschließend wurden Semidünnschnitte von 1 µm Dicke hergestellt, die mit Toluidinblau/Pyronin gefärbt wurden.

Die Semidünnschnitte wurden auf einem konventionellen Mikroskop der Firma Zeiss beurteilt. Histologisch wurde für jedes Präparat ein modifizierter Johnson Score bestimmt, um eine weitere Differenzierung von Spermatogenesestörungen zu ermöglichen [69].

3. Ergebnisse

3.1 Expression des Polycomb Group Proteins EZH2 und seine prognostische Relevanz im Urothelkarzinom der Harnblase

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

Expression of the Polycomb group protein EZH2 and its relation to outcome in patients with urothelial carcinoma of the bladder.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2008; 134(3): 331-6

Insgesamt wurden in dieser Studie 100 Patienten mit einem Urothelkarzinom der Harnblase eingeschlossen, davon 34 mit nicht invasiven (pTa), 33 mit oberflächlich invasiven (pT1) und 33 Patienten mit muskelinvasiven Karzinomen (pT>2) (TNM Klassifikation: International Union Against Cancer 2002) [70]. Nach dem aktuellen WHO Grading waren 42 Tumoren gut (low grade) und 58 Tumoren schlecht differenziert (high grade) [71]. Für Analysen des progressionsfreien Überlebens existierte ein medianes Follow-Up von 44,2 Monaten bei 83 Patienten.

In 90 % der untersuchten Proben konnte eine EZH2-Expression detektiert werden. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede der relativen Expression zwischen den einzelnen histopathologischen Tumorstadien ($p=0,002$). Die EZH2-Expression stieg mit der Progression des Tumorstadiums von pTa zu pT1 und weiter zu pT2 kontinuierlich an ($p=0,0001$). Des Weiteren war die mediane EZH2 Expression mit 51,2 (Streubreite 0,0-335,6) in high grade Tumoren signifikant höher als in low grade Tumoren mit einer medianen Expression von nur 19,6 (Streubreite 0,0-137,5) ($p<0,0001$). Diese Daten belegen, dass eine hohe EZH2-Expression im Urothelkarzinom der Harnblase mit lokal fortgeschrittenen und aggressiveren Tumoren assoziiert ist.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die EZH2-Expression einen prognostischen Wert bezüglich des Krankheitsverlaufs hat. Von den 57 Patienten mit pTa und pT1 Tumoren entwickelten 47,4 % ein Tumorrezidiv nach transurethraler Resektion. Die mediane EZH2-Expression der Patienten mit Tumorrezidiv unterschied sich nicht signifikant von den Patienten die im Beobachtungszeitraum kein Rezidiv entwickelten ($p=0.90$). Eine Tumorprogression von pT1 zu pT2 Tumoren konnte aufgrund der geringen Fallzahl ($n=3$) statistisch nicht analysiert werden. Sämtliche Patienten mit

muskelinvasiver Erkrankung (pT2 und pT3) unterzogen sich einer radikalen Zystektomie. Von diesen entwickelten 79 % ein lokales Rezidiv oder Fernmetastasen und 55% verstarben im Beobachtungszeitraum.

Um den Zusammenhang zwischen EZH2-Expression und Krankheitsverlauf zu bewerten, wurden Kaplan-Meier-Analysen für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Dichotomisierung der Patienten über die mediane relative EZH2 Expression in Subgruppen mit hohem und niedrigem Expressionsniveau. Das krankheitsspezifische Überleben war für Patienten mit hoher EZH2-Expression signifikant verkürzt ($p=0,021$). In der Gruppe der muskulinvasiven Erkrankungen zeigten Patienten mit hoher EZH2-Expression ein signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit geringer EZH2-Expression ($p=0,028$). In der univariaten Cox-Regression für tumorspezifisches Überleben bestätigten sich diese Beobachtungen. Patienten mit hoher EZH2 Expression hatten ein 3,1-fach erhöhtes Risiko an der Erkrankung zu versterben ($p=0,029$). Als ein vom T-Stadium und Grading unabhängiger prognostischer Parameter konnte EZH2 hingegen nicht bestätigt werden ($p=0,178$).

3.2 EZH2: Ein epigenetischer Repressor, dessen Expression mit der Promotormethylierung von APAF-1 in oberflächlichen Urothelkarzinomen der Harnblase korreliert

Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, Schostak M, Schrader M, Killer K, Christoph F.

EZH2 Polycomb Transcriptional Repressor Expression Correlates with Methylation of the APAF-1 Gene in Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder.

Tumor Biology 2007; 28(3): 151-7

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die EZH2-Expression mit der Promotormethylierung einer Auswahl p53 assoziierter Gene (APAF-1, DAPK-1 und IGFBP-3) in Zusammenhang steht. Es wurden jeweils sowohl die Methylierungsfrequenz als auch der Grad der Methylierung dieser Gene (NIM) in 35 Urothelkarzinomen und 10 benignen Urothelbiopsien bestimmt. Von den untersuchten Karzinomen entsprachen 9 pTa Tumoren, 11 pT1 Tumoren und 15 pT2 Tumoren (TNM Klassifikation: International Union Against Cancer 2002) [70]. 11 Tumoren wurden histologisch als low grade und 24 Tumoren als high grade klassifiziert [71]. Die Expression von EZH2 war in malignem Gewebe signifikant höher als im benignen Urothel ($p=0,002$) und korrelierte mit dem histologischen Grading ($p=0,030$).

In normalem Urothel waren die Promotorregionen der Gene APAF-1, DAPK-1 und IGFBP-3 nicht methyliert. Im Urothelkarzinom hingegen korrelierte der Methylierungsgrad von APAF-1 mit dem pathologischen T-Stadium ($p<0,001$). Zudem waren schlecht differenzierte Tumoren (low grade) mit einem NIM von 103 signifikant stärker methyliert als gut differenzierte Tumoren (high grade) mit einem NIM von nur 39 ($p=0,004$). Für APAF-1 konnte darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad und der m-RNA-Expression hergestellt werden. Stark methylierte Proben zeigten eine signifikant niedrige APAF-1 m-RNA-Expression als gering methylierte Proben ($p=0,001$). Die Gene DAPK-1 und IGFBP-3 zeigten keine Assoziationen des NIM mit dem T-Stadium oder dem Differenzierungsgrad. Mittels Spearman-P-Test konnte in einer paarweisen Analyse eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten EZH2 m-RNA-Expression und einem hohen Methylierungsgrad von APAF-1 in oberflächlichen (pTa und pT1) und gut differenzierten Tumoren (low grade) nachgewiesen werden ($p=0,024$; $p=0,04$).

Der Vergleich von EZH2 m-RNA-Expression und DAPK-1 oder IGFBP-3 Methylierung erbrachte keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

Für alle Patienten existierten standardisierte Nachsorgeuntersuchungen mit einem medianen Beobachtungszeitraum von 51 Monaten. 35 % der Patienten mit pTa oder pT1 Tumoren entwickelten einen Rezidivtumor nach transurethraler Resektion (Median: 13 Monate) und 33 % der Patienten mit initial \geq pT2 Erkrankung wiesen im Median nach 16 Monaten Metastasen auf. Eine starke Methylierung von APAF-1 und IGFBP-3 waren in oberflächlichen Tumoren mit dem Auftreten eines Rezidivtumors assoziiert ($p=0,030$; $p=0,010$). Dies konnte bei muskelinvasiven Tumoren (\geq pT2) lediglich für IGFBP-3 bestätigt werden ($p=0,003$). Weder die EZH2-Expression noch der Methylierungsgrad von DAPK-1 zeigten im Urothelkarzinom eine prognostische Relevanz.

3.3 Expressionsparameter der Polycomb Group Proteine BMI1, SUZ12, RING1 und CBX7 im Urothelkarzinom der Harnblase und deren prognostische Relevanz

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

Expression Parameters of the Polycomb Group Proteins BMI1, SUZ12, RING1 and CBX7 in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Their Prognostic Relevance.

Tumor Biology 2008; 134: 543-50

In der nachfolgenden Arbeit wurde das Expressionsprofil der PcG-Familienmitglieder BMI1, SUZ12, RING1 und CBX7 im Urothelkarzinom untersucht. Von insgesamt 100 untersuchten Urothelkarzinomen waren 33 oberflächliche Tumoren (pTa), 33 infiltrierten das subepitheliale Gewebe (pT1) und weitere 33 die Lamina muscularis propria (\geq pT2) [70]. Der Tumor wurde bei 42 Patienten als hoch differenziert (low grade) und bei 58 Patienten als niedrig differenziert (high grade) beschrieben [71]. CBX7 wurde von 94 % der untersuchten Tumoren exprimiert. Die quantitative Analyse ergab dabei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen pathologischen T-Stadien ($p=0,008$). Der Jonckheere-Terpsta-Test bestätigte eine kontinuierliche Abnahme der CBX7 Expression mit Progression des T Stadiums ($p=0,001$). Niedrig differenzierte Tumoren (high grade) exprimierten im Vergleich zu hoch differenzierten Tumoren (low grade) signifikant weniger EZH2 ($p=0,040$).

Das Expressionsniveau der Gene BMI1, SUZ12 und RING1 korrelierte weder mit dem Tumorstadium noch mit der Tumordifferenzierung. Für 83 Patienten lagen Nachsorgedaten für einen medianen Beobachtungszeitraum von 44,2 Monaten vor. Der potentielle prognostische Stellenwert der einzelnen Expressionsprofile wurde in Subgruppen von Patienten mit oberflächlichen (pTa/pT1) und muskelinvasiven Tumoren (\geq pT2) jeweils getrennt analysiert. Dazu wurden die Patienten anhand ihrer medianen Zielgenexpression in Gruppen mit niedriger bzw. hoher Expression dichotomisiert. In der Kaplan Meier Überlebensanalyse zeigten Patienten mit oberflächlicher Erkrankung (pTa/pT1), deren Tumoren ein niedriges Expressionsniveau von CBX7 aufwiesen, einen Trend zu einem verkürzten rezidivfreien Überleben im Vergleich zu Patienten deren Tumoren ein hohes CBX7 Expressionsniveau aufwiesen ($p=0,072$). Dieser Trend fand sich bei den muskelinvasiven Tumoren nicht ($p=0,82$). Für die Genexpression von BMI1, SUZ12

und RING1 konnten keine Assoziationen mit der Prognose der Erkrankung nachgewiesen werden.

3.4 Expressionsprofil des Polycomb Group Proteins Enhancer of Zeste Homolog 2 und seine prognostische Relevanz im Nierenzellkarzinom

Hinz S, Weikert S, Magheli A, Hoffmann M, Engers R, Miller K, Kempkensteffen C.

Expression Profile of the Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste Homologue 2 and its Prognostic Relevance in Renal Cell Carcinoma.

Journal of Urology 2009; 182(6): 2910-5

Zur Analyse des Expressionsprofils von EZH2 im Nierenzellkarzinom wurden sowohl RT-PCR als auch immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die quantitative m-RNA-Expression von EZH2 wurde vergleichend an 119 korrespondierenden Proben von klarzelligem Nierenzellkarzinom und normalem Nierenparenchym untersucht. Die Expressionsfrequenz war in den Tumorproben mit 84% (100 von 119) deutlich höher als in den gepaarten Normalproben mit nur 34% (41 von 119). Entsprechend fand sich sowohl im globalen als auch im paarweisen Vergleich ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau von EZH2 im Tumorgewebe ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Selbst nach Ausschluss der Proben mit negativem EZH2-Nachweis ergab der paarweise Vergleich eine gegenüber den Normalproben signifikant erhöhte Expression von EZH2 im Tumorgewebe ($p = 0,001$).

In stichprobenartig ausgewählten Probenpaaren wurde zusätzlich die Proteinexpression von EZH2 immunhistochemisch überprüft. Im Normalgewebe war EZH2-Protein vor allem im Epithel der proximalen und distalen Tubuli und fokal auch in den Mesangiumzellen der Glomerula nachweisbar. Es fand sich sowohl in den Normal- als auch in den Tumorproben ein nukleäres Expressionsmuster. Unter quantitativen Aspekten zeigte sich eine gute Korrelation zwischen den EZH2 m-RNA- und Proteinexpressionsniveaus der jeweiligen Proben.

Das EZH2-Expressionsniveau stand weder im Zusammenhang mit Patientencharakteristika (Geschlecht, Alter) noch mit histopathologischen Parametern (Tumor Stadium, Differenzierungsgrad, Metastasierungsstatus). Nachsorgedaten mit einem medianen Beobachtungszeitraum von 55 Monaten standen für 95 % der eingeschlossenen Patienten zur Verfügung. In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte sich die EZH2-Expression im Tumorgewebe als prognostischer Marker für das Auftreten eines Tumorrezidivs. Patienten, die einen Tumor mit niedriger EZH2-Expression aufwiesen, entwickelten häufiger Rezidive als Patienten mit einem hohem Expressionsniveau ($p = 0,021$). In der Gruppe primär nicht

metastasierter Tumoren konnte EZH2 darüber hinaus als einen vom T-Stadium und Grading unabhängiger Prognoseparameter identifiziert werden ($p=0,037$).

3.5 Deregulation von EZH2 in Spermatogenesestörungen und testikulären Keimzelltumoren

Hinz S, Magheli A, Weikert S, Schulze W, Krause H, Schrader M, Miller K, Kempkensteffen C.

Deregulation of EZH2 expression in human spermatogenic disorders and testicular germ cell tumors.

World Journal of Urology 2009; epub ahead of print:

Im Rahmen der Untersuchungen zur EZH2-Expression in 100 malignen Keimzelltumoren (TGCT) und von 24 benignen Hodenparenchymproben mit normaler Spermatogenese (JS 8-10) konnte gezeigt werden, dass EZH2 in 99 % der Tumoren und 100 % der normalen Parenchymproben nachweisbar war. Das relative Expressionsniveau war im normalen Hodenparenchym signifikant höher als in Keimzelltumoren ($p < 0,001$). Das mediane Expressionsniveau der Proben mit einem Carcinoma in situ (CIS) lag zwischen dem Expressionsniveau der invasiven Tumore und dem Normalgewebe ($p = 0,001$). Der Jonckheere-Terpstra-Test ergab einen signifikanten Trend hin zu einer abnehmenden EZH2 Expression mit zunehmender maligner Transformation vom Normalgewebe zum CIS und weiter zu invasiven Keimzelltumoren ($p < 0,001$). Seminome und Nicht-Seminome unterschieden sich in ihrem EZH2 Expressionsniveau nicht signifikant ($p = 0,59$). Ebenso konnte keine Assoziation der Expression von EZH2 mit dem klinischen Tumorstadium (CS I-III) nachgewiesen werden.

Ein weiterer Teil unserer Untersuchungen am Hoden beschäftigte sich mit dem Expressionsprofil von EZH2 in definierten Spermatogenesestörungen. Insgesamt 64 benigne Hodenproben wurden histologisch mittels eines modifizierten Johnson-Scores (JS) klassifiziert. Eine normale Spermatogenese mit kompletter Ausreifung der reifen Spermatozoen fand sich in 24 Proben (JS 8-10). Jeweils 16 Proben zeigten prä-meiotische (JS 3-4) und post-meiotische (JS 5-7) Maturationsarreste. Weitere 24 Proben wurden bei fehlendem Nachweis von Keimzellen als Sertoli-Cell-Only Syndrome (SCOS) (JS 2) identifiziert. Alle Proben mit normaler Spermatogenese und postmeiotischem Arrest (JS 5-7) exprimierten EZH2, wobei lediglich 50 % der Proben mit prämeiotischem Arrest eine EZH2 Expression aufwiesen. In keiner der SCOS Proben konnte eine EZH2-Expression nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der relativen Expressionsniveaus der einzelnen Spermatogenesestörungen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,001$) mit einer graduellen

Abnahme der EZH2-Expression bei zunehmender Schwere der Spermatogenesestörung ($p < 0,001$).

4. Diskussion

4.1 EZH2 – ein Tumormarker des Urothelkarzinoms der Harnblase mit funktioneller Relevanz?

In basiswissenschaftlichen Untersuchungen konnte unsere Forschungsgruppe erstmals eine erhöhte m-RNA- und Proteinexpression von EZH2 in invasiven und schlecht differenzierten Urothelkarzinomen der Harnblase nachweisen [51-53]. Im Rahmen einer m-RNA Expressionsanalyse an 100 Patienten korrelierte die Zunahme der EZH2-Expression im Tumorgewebe mit einer Progression des Tumorstadiums und mit einer zunehmenden Entdifferenzierung. Diese Assoziationen lassen eine funktionelle Bedeutung von EZH2 in der Tumorbilogie des Urothelkarzinoms vermuten. Diese Annahme wird durch die Untersuchungsergebnisse von Bracken et al. unterstützt, die *in vitro* einen direkten Einfluss des pRB-E2F-Signalübertragungswegs auf die Expression von EZH2 beschrieben haben [72]. Die E2F-Gengruppe ist von essentieller Bedeutung für die Transkription multipler Gene, die wiederum wesentlich an der Zellzyklusregulation beteiligt sind und substantiell zur Kanzerogenese beitragen [1]. Insbesondere E2F3 repräsentiert ein Onkogen im Urothelkarzinom der Harnblase, dessen Überexpression ebenfalls mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert ist [73]. Auch wenn aus unseren deskriptiven Analysen keine funktionellen Schlussfolgerungen möglich sind, unterstützen sie die These dass eine Deregulation der pRB-E2F-EZH2 Achse an der Progression von Urothelkarzinomen beteiligt ist [74].

In Mamakarzinomen, Prostatakarzinomen und Melanomen wurde eine erhöhte EZH2 Expression bereits mit besonders aggressiven Tumorphänotypen sowie mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht [75-78]. Im Rahmen unserer Arbeiten konnten wir nun auch für das Urothelkarzinom der Harnblase erstmalig entsprechende Assoziationen nachweisen. Bei Patienten, deren Tumore eine hohe EZH2-Expression aufwiesen, verkürzte sich das krankheitsspezifische Überleben und in der Subgruppe von Patienten mit muskelinvasiver Erkrankung war die Zeit bis zum Auftreten eines Tumorrezidivs signifikant kürzer, wenn die EZH2 Expression erhöht war. EZH2 konnte jedoch in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden, welches am ehesten durch die starke Korrelation der EZH2 Expression mit dem Tumorstadium und dem

Differenzierungsgrad zu erklären ist. Des Weiteren hat die in dieser Arbeit durchgeführte multivariate Analyse aufgrund der relativ kleinen Kohorte von 100 Patienten eher explorativen Charakter. In Anbetracht der hier gezeigten Korrelationen und vor dem Hintergrund seiner funktionellen Eigenschaften scheinen weiterführende Untersuchungen zum diagnostischen und prognostischen Stellenwert von EZH2 im Urothelkarzinom der Harnblase aber vielversprechend.

Im Folgenden soll näher auf mögliche funktionelle Aspekte von EZH2 im Urothelkarzinom eingegangen werden. EZH2 wird eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung und Progression von multiplen Tumoren nachgesagt. Durch seine katalytische Funktion ist das PcG-Protein EZH2 in der Lage über die Methylierung von Histonen Konformationsänderungen des Nukleosoms hervorzurufen. Diese wiederum führen zu einer Hemmung der Transkription multipler zellzyklus-regulatorischer Gene.

Auch wenn Histonmethylierung und DNA-Methylierung bisher im Wesentlichen als unabhängige epigenetische Regulationsmechanismen angesehen wurden, geht die Acetylierung und Methylierung der Histone oftmals einer Promotormethylierung voraus [79]. Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit der Aktivität der DNA Methyltransferase 1 von der Histondeacetylase-Aktivität (HDCA) nachgewiesen werden [80]. Es häufen sich somit die Hinweise für einen Zusammenhang dieser beiden epigenetischen Regulationsmechanismen.

Ein mögliches Bindeglied zwischen DNA- und Histon-Methylierung stellt das EZH2-Protein dar. Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass die Funktion der DNA Methyltransferasen in Abhängigkeit der Anwesenheit von EZH2 steht. EZH2 ist in der Lage über spezifische Bindungsstellen die DNMT1, 3a und 3b zu aktivieren und stellt somit ein essentielles Protein zur Regulation der DNA-Methyltransferasen dar [55]. Umgekehrt ist die Anlagerung von EZH2 an Chromatin unabhängig von den DNA-Methyltransferasen. In der Zusammenschau deuten diese Erkenntnisse auf einen Signaltransduktionsweg, in dem EZH2 eine übergeordnete regulatorische Rolle bei der DNA Methylierung und der Transkriptionshemmung einnimmt. Dies scheint vor allem für die Initiierung der Promotormethylierung zuzutreffen, denn die Aufrechterhaltung der Methylierung im Rahmen der Zellteilung erfolgt von EZH2 unabhängig [81]. In einer Reihe von Studien konnte ebenfalls der Chromatinstatus mit der Promotormethylierung multipler EZH2 Zielgene korreliert werden, was

zusätzlich den funktionellen Zusammenhang zwischen EZH2 und DNA Methylierung belegt [82-84].

Im Urothelkarzinom wurde eine Promotormethylierung bisher für diverse Tumorsuppressorgene beschrieben. So wurde z.B. eine Methylierung des RASSF1-Promotors sowohl direkt im Tumorgewebe als auch im Urin von Patienten mit Urothelkarzinom nachgewiesen [85;86]. DAPK-1, ein weiteres pro-apoptotisches Tumorsuppressorgen, ist ebenfalls regelmäßig im Urothelkarzinom methyliert und die Methylierung dieses Gens wurde mit einer Progression der Erkrankung assoziiert [85;87]. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte auch eine Hypermethylierung von APAF-1 und IGFBP-3 im Urothelkarzinom nachgewiesen werden [88]. Beide sind an der Apoptoseregulation beteiligt, und es wird ihnen eine Tumorsuppressorfunktion zugesprochen.

Ziel unserer Analyse war es mögliche Zusammenhänge der EZH2-Expression mit der Methylierung von oben genannten Genen (DAPK-1, APAF-1 und IGFBP-3) zu überprüfen, die im Urothelkarzinom als regelmäßig hypermethyliert beschrieben wurden. Zur Untersuchung des Methylierungsstatus dieser Gene in den Urothelkarzinomproben etablierten wir spezifische und hochsensitive QMSPs. Zusätzlich wurde in jeder Tumorprobe mittels real-time RT-PCR die EZH2 m-RNA-Expression bestimmt.

In den oberflächlichen Tumoren (pTa und pT1) korrelierte eine erhöhte EZH2 Expression signifikant mit einer verstärkten Methylierung des APAF-1-Promotors. Es bestand kein Zusammenhang zwischen der EZH2-Expression und der Methylierung der Gene DAPK-1 und IGFBP-3. Unsere Untersuchungen unterstützen somit die Hypothese, dass die Promotormethylierung auch im Urothelkarzinom zumindest teilweise durch EZH2 kontrolliert wird. Zudem deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass APAF-1 möglicherweise ein Zielgen von EZH2 darstellt. APAF-1, ebenfalls ein Zielgen von P53, kommt eine Schlüsselrolle im Rahmen der intrinsischen Apoptosekaskade zu [89;90]. Eine Suppression der Genexpression von APAF-1 infolge einer aberranten Methylierung des APAF-1-Promotors könnte somit ein unkontrolliertes Zellwachstum begünstigen. In fortgeschrittenen Urothelkarzinomen war der Zusammenhang zwischen der Expression von EZH2 und der Methylierung von APAF-1 nicht mehr nachweisbar. Dies könnte durch die substantiellen molekularen Unterschiede zwischen invasiven und nicht invasiven Urothelkarzinomen erklärt werden [91]. Es könnte aber auch darauf hinweisen, dass

die APAF-1 Methylierung keine Rolle im Rahmen der Tumorprogression von oberflächlichen zu muskelinvasiven Urothelkarzinomen spielt. Durch weiterführende funktionelle Experimente und Untersuchungen in größeren Patientenkollektiven könnte dieser Zusammenhang geklärt werden.

In den oben genannten Untersuchungen konnte EZH2 im Urothelkarzinom als ein Progressions- und Prognosemarker identifiziert werden, dem wahrscheinlich eine Rolle in der Tumorbilogie dieser Tumorentität zukommt [54;56]. Weitere PcG-Proteine wurden im Urothelkarzinom bisher nicht untersucht. Die PcG-Proteine bilden jedoch im Rahmen von Multiproteinkomplexen funktionelle Einheiten. So ist beispielsweise die Histonmethyltransferase-Aktivität von EZH2 unmittelbar an die Anwesenheit von SUZ12 und EED gekoppelt. Diese zwei nichtkatalytisch wirkenden Partner bilden zusammen mit EZH2 den PRC2 [92-94]. Es ist somit naheliegend dass im Urothelkarzinom auch die Expression von weiterer PcG-Proteinen alteriert ist.

In der Vergangenheit konnte wiederholt die Bedeutung von multiplen PcG-Proteinen in anderen Tumorentitäten sowohl funktionell als auch auf Markerbasis bestätigt werden. SUZ12 wurde in Kolonkarzinomen hoch exprimiert nachgewiesen [43]. Die Expression von Ring1 und BMI1, Bestandteile des PRC 2, korrelierte mit dem Grading von Prostatakarzinomen [47], und CBX7 konnte in follikulären Lymphomen mit der Karzinogenese und der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden [95]. In einer weiteren Untersuchung analysierten wir das Expressionsprofil der vier oben genannten Gene (SUZ12, BMI1, Ring1 und CBX7) in insgesamt 100 Urothelkarzinomen.

Erstmalig konnte demonstriert werden, dass die PcG-Gene SUZ12, BMI1, Ring1 und CBX7 im Urothelkarzinom regelhaft exprimiert sind [57]. Die Expression von CBX7 korrelierte dabei invers mit zunehmendem Fortschreiten von pathologischem Tumorstadium und Differenzierungsgrad. Die Expressionsniveaus der weiteren untersuchten Gene standen mit diesen histopathologischen Parametern nicht in Zusammenhang. In der Überlebensanalyse konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen der Expression dieser PcGs mit dem rezidivfreien Überleben nachgewiesen werden. Für CBX7 zeigte sich jedoch ein Trend zu einem verkürzten rezidivfreien Überleben bei Patienten mit Tumoren, die eine niedrige CBX7-Expression aufwiesen. Auf den ersten Blick stehen unsere Beobachtungen einer

abnehmenden CBX7-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung und Invasionstiefe von Urothelkarzinomen in einem scheinbaren Widerspruch zu der bislang veröffentlichten Literatur. Gil et al. demonstrierten in unterschiedlichen humanen Zellen, dass CBX7 die Lebensspanne einer Zelle verlängert, und dass durch die Anwesenheit von CBX7 embryonale Mausfibroblasten immortalisiert werden, indem CBX7 den Ink4a/ARF Tumorsuppressor Lokus unterdrückt [41]. Über den gleichen Funktionsmechanismus konnte des Weiteren eine Rolle für CBX7 bei der Entstehung von Lymphomen nachgewiesen werden [95]. Während diese Daten eher auf eine onkogene Funktion von CBX7 hinweisen, deuten unsere Ergebnisse an, dass CBX7 im Urothelkarzinom eher Charakteristika eines Tumorsuppressors als die eines Onkogens aufweist. Auch anderen PcG Proteinen wie CBX4 und Mel-18 wurden in der Vergangenheit wiederholt Eigenschaften eines Tumorsuppressors zugesprochen [96;97]. Im Mammakarzinom beispielsweise konnte für Mel-18 ein deutlich vermindertes Expressionsniveau im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden [98]. Unsere Beobachtungen werden durch Untersuchungen von Suarez-Merino et al. unterstützt, im Rahmen derer in Ependymomen eine herabgesetzte CBX7-Expression im Vergleich zum normalen Hirngewebe nachgewiesen werden konnte [99]. Die verminderte Expression von CBX7 im Ependymom wurde durch den Verlust eines Allels auf Chromosom 22q erklärt, auf dem das CBX7-Gen lokalisiert ist. Interessanterweise wurde im Urothelkarzinom kürzlich ein instabiler Genbereich auf dem Chromosom 22q identifiziert. Die Frequenz dieser Instabilität stieg kontinuierlich mit zunehmendem Tumorstadium und könnte auch eine Erklärung für den Verlust von CBX7 mit fortschreitender Erkrankung sein [100].

Ob nun einer verminderten CBX7-Expression eine funktionelle Relevanz bei der Tumorprogression des Urothelkarzinoms zukommt oder ob die abnehmende CBX7-Expression ein Epiphänomen im Rahmen der zunehmenden Entdifferenzierung des Tumors darstellt, kann anhand unserer Daten nicht abschließend geklärt werden. In der Zusammenschau zeigen diese Ergebnisse jedoch, dass das Expressionsprofil von CBX7 zwischen verschiedenen Tumorentitäten stark variiert, und sie unterstützen die These, dass die zahlreichen Funktionen dieser und anderer PcG-Proteine offenbar vom jeweiligen Zelltyp abhängig sind [101].

Ungeachtet möglicher funktioneller Implikationen konnte in unserer Arbeit erstmalig die Assoziation einer niedrigen CBX7-Expression mit histopathologischen

Parametern eines aggressiven Tumorverhaltens von Urothelkarzinomen gezeigt werden. In wie weit CBX7 aber das Potential hat, von T- und G-Stadium unabhängige Informationen über die Tumoraggressivität zu liefern, müssen größere Studien künftig zeigen.

4.2 Expressionsprofil von EZH2 im Nierenzellkarzinom

In unserer Arbeit zur Expression von EZH2 im Nierenzellkarzinom konnten wir erstmalig zeigen, dass EZH2 im Tumorgewebe, verglichen mit dem korrespondierendem Normalgewebe, verstärkt exprimiert wird. Des Weiteren kamen wir zu dem Ergebnis, dass eine niedrige EZH2-Expression im Nierenzellkarzinom mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist. Der prognostische Effekt von EZH2 war hierbei unabhängig vom histopathologischen T- und G-Stadium des Tumors. Unsere Beobachtungen einer Überexpression von EZH2 im Nierenzellkarzinom stehen im Einklang mit der Mehrheit der hierzu bislang publizierten Literatur. Auch in anderen soliden Tumorentitäten wie im Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Urothelkarzinom und Melanom ist EZH2 mRNA vermehrt exprimiert [45;72;77;102;103].

Die zwei bis dato publizierten Studien zur Expression von EZH2 im Nierenzellkarzinom lieferten bisher allenfalls präliminäre Daten und widersprüchliche Ergebnisse. Bracken et al. analysierten 15 unterschiedliche Tumorentitäten mittels mRNA-in-situ-Hybridisierung und beschrieben zusammenfassend für alle untersuchten Tumorentitäten eine onkogene Funktion für EZH2 [72]. In den 8 untersuchten Nierenproben konnte EZH2 nicht vermehrt nachgewiesen werden. Es erfolgte jedoch kein Vergleich mit benachbartem Normalgewebe. Weitere Limitationen dieser Studie waren die geringe Anzahl an untersuchten Tumorproben und eine deutlich geringere Sensitivität der in-situ-Hybridisierung im Vergleich zur real time RT-PCR. So konnte diese Arbeitsgruppe auch im Prostatakarzinom keine gesteigerte Expression von EZH2 zeigen, was der extensiven Literatur zu diesem Thema widerspricht [45;75;104-107].

In Übereinstimmung mit unseren Daten zeigten Wagener et al. in 12 Nierenzellkarzinomen eine erhöhte EZH2-Expression verglichen mit gutartigem Nierenparenchym [61]. Hauptziel ihrer Arbeit war jedoch die Evaluation funktioneller Aspekte von EZH2 in Zelllinien von Nierenzellkarzinomen (NZK), so dass auf eine

ausführliche Expressionsanalyse verzichtet wurde. Nach Unterdrückung der Expression von EZH2 mittels siRNA gelang es, eine verminderte Zellteilungsrate und eine gesteigerte Apoptoserate in NZK-Zelllinien nachzuweisen. Diese Daten weisen somit auf eine onkogene Funktion von EZH2 im Nierenzellkarzinom hin. Dieses wird ebenfalls durch unsere Beobachtungen unterstützt, dass EZH2 in zwei Drittel der benignen Nierenproben nicht nachzuweisen war, während es in sämtlichen Karzinomgeweben vorkam.

Im Gegensatz zu Untersuchungen am Mammakarziom, Urothelkarzinom und Prostatakarzinom, in denen eine hohe EZH2-Expression mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht wurde, konnte in unseren Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten EZH2-Expression mit einem aggressiverem Tumorverhalten gezeigt werden [45;72;103]. Bemerkenswerterweise hatten Patienten mit einem hohen EZH2-Expressionsniveau im Tumorgewebe sogar ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben als die mit einer niedrigen Expression. Für diese unerwartete Assoziation gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze.

Bei Patienten mit einem Prostatakarzinom stellt EZH2 ein potentes Antigen dar, das in der Lage ist, eine spezifische humorale Immunantwort auszulösen. So konnten im Serum von bis zu 50 % der Prostatakarzinompatienten Anti-EZH2-Antikörper nachgewiesen werden [40]. Es ist somit denkbar, dass EZH2 auch bei Nierenzellkarzinompatienten eine Immunantwort zu induzieren vermag, die dann möglicherweise zu einer besseren Tumorkontrolle und Prognose beiträgt. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass EZH2 kürzlich als ein potentes Zielantigen immuntherapeutischer Therapiestrategien identifiziert werden konnte [39]. Im Nierenzellkarzinom ist der immuntherapeutische Ansatz von besonderer Relevanz, da diese Entität, neben den Melanomen, zu den hoch immunogenen Tumoren beim Menschen gehört [108].

Vergleichbar mit unseren Ergebnissen zu EZH2 im Nierenzellkarzinom wurde eine vermehrte BMI1-Expression mit einem günstigen klinischen Verlauf im Mammakarzinom in Verbindung gebracht [109]. Dabei war BMI1 bis zu diesem Zeitpunkt in multiplen Tumorentitäten mit den klassischen Eigenschaften eines Onkogens beschrieben worden [110-114]. Diese und unsere Beobachtungen zu CBX7 im Urothelkarzinom verdeutlichen einmal mehr, dass sowohl die Expression, aber auch die Funktion der PcG-Proteine zwischen den einzelnen Tumorentitäten

stark variieren kann. Somit sollten funktionelle Erkenntnisse für einzelne PcG-Proteine nicht auf unterschiedliche Zelltypen übertragen werden.

Eine funktionelle Bedeutung der unterdrückten EZH2-Expression bei der Tumorprogression des Nierenzellkarzinoms ist somit nicht auszuschließen ist, auch wenn die Ergebnisse der Analysen von Wagner et al. derzeit eher dagegen sprechen [97;115].

Zusammenfassend zeigt sich EZH2 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Basis im Nierenzellkarzinom als ein potenter Gewebemarker, um benignes und malignes Gewebe zu differenzieren. Zudem konnte EZH2 in dieser Tumorentität erstmals eine von histopathologischen Prognosefaktoren unabhängige prognostische Bedeutung für die Vorhersage des klinischen Krankheitsverlaufes zugeschrieben werden. Hierbei ist jedoch zu betonen, dass unsere Ergebnisse der prospektiven Validierung an einem größeren Kollektiv bedürfen, da unsere multivariate Analyse bei einer Fallzahl von 116 Patienten als explorative zu werten ist. Unabhängig von seinem Stellenwert als prognostischer Marker stellt EZH2 aufgrund seines Expressionsprofils möglicherweise ein attraktives Ziel innovativer Therapiestrategien dar.

4.3 Expressionsprofil von EZH2 bei Spermatogenesestörungen und in Keimzelltumoren

Die Spermatogenese ist eine hochgradig regulierte Sequenz von Prozessen, im Rahmen derer aus undifferenzierten Keimzellen reife Spermatozoen entstehen [116]. Im Wesentlichen ist die Spermatogenese in drei Hauptphasen zu unterteilen: Zum einen findet eine ständige Erneuerung der Stammzellen - oder genauer: der Spermatogonien - mittels mitotischer Zellteilungen statt. Im weiteren Verlauf kommt es dann über meiotische Zellteilungen zu einer Reduktion des diploiden Chromosomensatzes der Stammzellen. Abschließend erfolgt die Spermiogenese welche die Umwandlung von haploiden Keimzellen zu reifen Spermatozoen bezeichnet [117-119]. Eine Beteiligung von epigenetischen Regulationsprozessen an der zellulären Homöostase des Keimepithels konnte schon frühzeitig nachgewiesen werden, und es ist inzwischen möglich, den jeweiligen Phasen der Spermatogenese eine große Anzahl epigenetischer Ereignisse zuzuordnen [120;121]. Es konnte ein epigenetisches Muster beschrieben werden wobei unterschiedliche epigenetische Signaturen den einzelnen Spermatogenesephasen zugeordnet werden konnten.

Diese Signaturen unterliegen einer ausgeprägten Dynamik (zusammengefasst in [122;123]). Über die physiologische bzw. pathologische Bedeutung der epigenetischen Veränderungen ist bisher allerdings nur wenig bekannt. So wurde beispielsweise eine gestörte Modifikation von Histonen sowohl mit der Entwicklung von Spermatogenesestörungen und Infertilität als auch mit einer malignen Transformation des Hodengewebes in Zusammenhang gebracht [124-126].

Die bisherigen Untersuchungen zur Expression von EZH2 und zur Methylierung von des Histons H3K27 im Hodengewebe bzw. in testikulären Keimzelltumoren beschränken sich auf präliminäre Gewebsanalysen, in denen die Expression multipler Normalgewebe und Tumorgewebe verglichen wurden.

Im Rahmen der hier vorgestellten Forschungsarbeit untersuchten wir die Expression von EZH2 erstmals in einer größeren Anzahl von insgesamt 164 Hodenproben. In Biopsien mit normaler Spermatogenese fand sich eine hohe Expression von EZH2, die mit einer malignen Transformation zu CIS-Proben und einer weiteren Progression zu invasiven Keimzelltumoren kontinuierlich abnahm. Dabei war das mediane Expressionsniveau in den Tumorproben, verglichen mit normalem Hodengewebe, achtfach geringer. Assoziationen der EZH-Expression mit dem klinischen oder pathologischen Tumorstadium oder dem histologischen Tumorsubtyp bestanden nicht. Auch Bracken et al. konnten im Rahmen einer früheren Studie eine Expression von EZH2-Expression in testikulären Keimzelltumoren nachweisen, jedoch wurden in dieser Untersuchung keine quantitativen Analysen oder ein Vergleich mit normalem Hodengewebe durchgeführt [33]. Eine Studie von Gunster et al. ergab bereits erste Hinweise auf eine hohe Expression von EZH2 im normalen Hodengewebe verglichen mit anderen benignen adulten humanen Gewebetypen wobei hier wiederum keine Tumoren untersucht wurden [101].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen zahlreicher EZH2-Expressionsanalysen in anderen Tumorentitäten, konnte in unserer vergleichenden Untersuchung erstmalig die Assoziation einer abnehmenden EZH2 Expression im Hoden mit maligner Transformation und Tumorprogression beobachtet werden. Normales Hodenparenchym unterscheidet sich jedoch aufgrund seiner außergewöhnlich hohen Rate an mitotischen und meiotischen Zellteilungen erheblich von anderen humanen Normalgeweben und scheint im Hinblick auf die Expression bestimmter Gene malignem Gewebe zum Teil sogar ähnlich zu sein [127]. So wurden bereits diverse Gene identifiziert, die vorrangig von malignen Tumoren aber auch von normalen

Keimzellen des Hodens exprimiert werden. Diese Gene wurde zur Gruppe der, Cancer/Testis Antigene zusammengefasst [128-130]. Vergleichbare Ergebnisse wie die hier für EZH2 gezeigten konnten in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auch für den Apoptoseinhibitor Survivin demonstriert werden. Survivin, ein putatives Onkogen und wesentlicher Regulator der Zellproliferation und Differenzierung, wurde ebenfalls in vielen malignen Gewebetypen als überexprimiert beschrieben und zeigte, ähnlich wie EZH2, im normalen Hodengewebe eine deutlich stärkere Expression verglichen mit korrespondierenden Keimzelltumorproben [131]. Die zwar vorhandene aber ausgesprochen niedrige EZH2-Expression im Keimzelltumorgewebe und das Fehlen jeglicher Assoziationen der EZH2-Expression mit histopathologischen Eigenschaften der untersuchten Keimzelltumoren lassen die Rolle von EZH2 in der Pathogenese von Hodentumoren eher unwahrscheinlich erscheinen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass unsere mRNA-basierten, deskriptiven Analysen keine valide Aussage zur funktionellen Bedeutung von EZH2 in diesem Zusammenhang erlauben.

Um erstmalig die potentielle Bedeutung von EZH2 im Rahmen der Spermatogenese zu evaluieren, untersuchten wir seine Expression auch in Proben mit definierten Spermatogenesestörungen. Im Gegensatz zur hohen Expression von EZH2 in Proben mit ungestörter Spermatogenese zeigte sich eine signifikante Reduktion seines Expressionsniveaus in Proben mit postmeiotischem Spermatogenesearestart und nur noch eine minimale Expression in Proben mit prämeiotischem Arrest. Damit weist EZH2 erneut bemerkenswerte Übereinstimmungen mit dem Expressionsprofil des IAP-Familienmitglieds Survivin auf, dessen Expressionsniveau ebenfalls mit zunehmendem Schweregrad der Spermatogenesestörung abnahm [132]. In sämtlichen Biopsien mit einem Sertoli-Cell-Only-Syndrom war keine EZH2-Expression nachweisbar, was darauf hindeutet, dass EZH2 im Hoden überwiegend von Keimzellen exprimiert wird und somit möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der Spermatogenese spielt.

Obwohl unsere deskriptiven Analysen, wie bereits erwähnt, nur sehr bedingt funktionelle Rückschlüsse zulassen, wird diese Annahme auch durch das im Vergleich zu anderen Normalgeweben außerordentlich hohe Expressionsniveau im Hodengewebe und die kontinuierliche Abnahme der EZH2-Expression mit zunehmender Störung der spermatogenetischen Funktion des Keimepithels unterstützt. Darüber hinaus konnte eine wichtige physiologische Bedeutung von

EZH2 auch im Rahmen weiterer Prozesse mit hohen Zellteilungsraten belegt werden. So kommt EZH2 sowohl bei der Hämatopoese als auch bei der Entwicklung von embryonalen Stammzellen eine Schlüsselrolle im Hinblick auf die zelluläre Differenzierung zu. Umgekehrt führt die Suppression der Expression von EZH2 mittels siRNA zu einer manifesten Störung der Zellteilung bei diesen Prozessen [133;134].

Dennoch sind zur Klärung der Fragestellung, inwieweit die Reduktion der EZH2-Expression einen kausalen Faktor in der Pathogenese von Spermatogenesestörungen darstellt, funktionell orientierte Untersuchungen unabdingbar. So könnte die in unserer Arbeit gezeigte Korrelation einer Verminderung der EZH2-Expression mit einer Zunahme des Schweregrades der Spermatogenesestörung prinzipiell auch durch einen zunehmenden Verlust an Keimzellen bedingt sein. Dies erscheint jedoch aufgrund der von uns durchgeführten relativen Quantifizierung mittels parallel durchgeführter Expressionsanalyse eines "House-Keeping-Gens" eher unwahrscheinlich.

Unabhängig von seiner funktionellen Bedeutung bei der Pathogenese von Spermatogenesestörungen repräsentiert EZH2 einen attraktiven molekularen Parameter, um den Schweregrad eines Maturationsarrestes im Hodengewebe zu evaluieren. EZH2 könnte zudem durch sein spezifisches Expressionsprofil unter Umständen auch ein interessantes therapeutisches Target bei der molekularen Therapie von männlichen Fertilitätsstörungen darstellen.

5. Limitierungen und Ausblick

Um die hier beschriebenen Ergebnisse korrekt in den Kontext bisheriger Untersuchungen zu Polycomb-Proteinen einordnen zu können, soll im Folgenden nochmals explizit auf die wesentlichen Limitierungen unserer Arbeiten hingewiesen werden. Unsere Analysen beschreiben erstmalig die Expression von Polycomb-Proteinen in einem größeren Kollektiv von Patienten mit urologischen Tumorerkrankungen sowie von Patienten mit Störungen der Fertilität. Die Expressionsanalysen sind besonders im Rahmen von Erstuntersuchungen eine probate Methode, um den Stellenwert eines Zielgens in spezifischen Gewebetypen

zu evaluieren. Es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass sämtliche Analysen der m-RNA-Expression rein deskriptiv sind. Eine funktionelle Relevanz der Befunde kann damit allein nicht suffizient beurteilt werden.

Die Überprüfung einer Übertragung der von uns erhobenen Transkriptionsprofile auf Ebene der Proteinexpression stellt jedoch einen ersten wichtigen Schritt zur weiterführenden Evaluation der funktionellen Relevanz der untersuchten PcG-Familienmitglieder in den einzelnen Gewebetypen dar. Da in den Untersuchungen zum Nierenzellkarzinom sowohl m-RNA- als auch Proteinanalysen durchgeführt wurden, konnte im Nierenzellkarzinom erstmalig ein nukleäres Expressionsmuster von EZH2 beschrieben werden. Des Weiteren wurden relevante posttranskriptionelle Modifikationen der EZH2-Expression im Nierenzellkarzinom sowie im korrespondierenden Normalgewebe ausgeschlossen. Im Urothelkarzinom konnte durch die Untersuchungen von Raman et al. ebenfalls eine Korrelation zwischen m-RNA- und Protein-Expression nachgewiesen werden [52;53]. Im Hodengewebe stehen immunhistochemische Untersuchungen für EZH2 noch aus. Gerade hier könnte vor allem durch die Zuordnung der EZH2-Expression zu den einzelnen Keimzellpopulationen und zu den Stadien der Meiose eine funktionelle Bedeutung für EZH2 im Verlauf der Spermatogenese abgeleitet werden. Deshalb planen wir in Kooperation mit der pathologischen Abteilung der Universität Düsseldorf bereits immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von EZH2 sowohl in benignem als auch malignem Hodengewebe durchzuführen. Zudem sind weiterführende Proteinuntersuchungen an Nierenzellkarzinomen und Urothelkarzinomen in einer größeren Anzahl von Proben mittels Tissue-Microarray (TMA) in Arbeit.

Bezüglich der Evaluation des prognostischen Stellenwertes von EZH2 und CBX7 für Patienten mit Nierenzell- bzw. Urothelkarzinomen sei gesagt, dass insbesondere die multivariaten Analysen aufgrund einer limitierten Anzahl von Ereignissen als explorativ zu werten sind. Einen weiteren limitierenden Faktor stellt das retrospektive Design all unserer Analysen dar. Zur besseren Einschätzung der Wertigkeit unserer Ergebnisse für die potentielle klinische Anwendung ist deshalb ihre prospektive Validierung an größeren, klinisch und möglichst auch molekular noch besser charakterisierten Patientenkollektiven zu fordern [135;136]. Hierfür ist jedoch eine multiinstitutionelle Kooperation notwendig.

Aufgrund der Tatsache, dass Urothelkarzinome der Harnblase im Stadium pT1G3 nach transurethraler Resektion eine Rezidivrate von etwa 70 % und eine Progressionsrate von etwa 25 % aufweisen, wird von einigen Zentren als definitive Therapie die frühzeitige radikale Zystektomie empfohlen [50]. Die Etablierung zuverlässiger Parameter zur besseren Abschätzung des Rezidiv- und vor allem des Progressionsrisikos dieser Tumoren würde eine bessere Selektion von Patienten für adjuvante oder aggressivere Therapieformen ermöglichen und erscheint damit klinisch außerordentlich bedeutungsvoll.

Durch die begrenzte Anzahl an Patienten mit pT1G3 Tumoren in unseren Untersuchungen zur Expression von EZH2 und CBX7 im Urothelkarzinom war eine Evaluation dieser Parameter unter oben genannten Aspekten leider nicht möglich, sollte aber im Rahmen zukünftiger Projekte forciert werden.

Da die PcG-Proteine und hier insbesondere EZH2 über die epigenetischen Veränderungen einen regulativen Einfluss auf eine Vielzahl von Genen ausüben, stellen diese Gene interessante Ziele für molekulare Therapiestrategien dar. Hauptziel epigenetischer Therapieansätze wäre beispielsweise die pharmakologische Reaktivierung der Expression von Genen, deren aberrante epigenetische Suppression an der Entstehung, der Progression oder der Metastasierung maligner Tumore beteiligt sind. Dies wurde bisher über diverse Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und der Histondeacetylasen (HDACs) versucht [137-140]. Eine gleichzeitige Inhibition der DNMTs und HDACs zeigte vielversprechende Ergebnisse mit einer Reaktivierung von Tumor Suppressorgenen im Tiermodell (zusammengefasst in [141]). Darüber hinaus konnten mittels Applikation von DNMT-Inhibitoren therapeutische Effekte bei Patienten mit hämatologischen Tumorerkrankungen erzielt werden [142]. Eine direkte Methode zur Inhibition der EZH2-spezifischen Methyltransferase existiert bisher nicht. Es ist allerdings möglich, die Gesamtfunktion des PRC2-Komplexes mittels Deazaneplanocin zu blockieren, was in vitro zu einer vermehrten Apoptose führt [143]. In Mammakarzinom-Zelllinien konnte eine Blockierung des PRC2 über Deazaneplanocin sogar die Reaktivierung der Expression PRC2 supprimierter Gene induzieren [143]. An Nierenzellkarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Suppression der Expression von EZH2 mittels siRNA-Technologie zu einer Reduktion der Mitoserate bei gleichzeitiger Aktivierung der Apoptose führte [61]. Der klinische Einsatz solcher Therapiestrategien gestaltet sich jedoch nach wie

vor schwierig, da die Auswirkungen einer Methylierungsblockade, sowohl von Histonen als auch von DNA, auf andere physiologische Prozesse nicht abzusehen ist. Es ist daher prinzipiell zunächst erforderlich, mehr über die Interaktionen der einzelnen Polycomb-Proteine und deren physiologische Implikationen zu erfahren. Dennoch stellen beispielsweise Urothelkarzinome der Harnblase ein interessantes Modell zur Abschätzung der Wirksamkeit solcher epigenetischen Therapieversuche dar, weil diese einer Instillationstherapie zugänglich sind und somit das Risiko systemischer Nebenwirkungen wesentlich geringer erscheint als im Falle einer systemischen Applikation.

Durch das hier gezeigte Expressionsprofil von EZH2 in Urothel und Nierenzellkarzinomen, mit einer hohen Expression im Tumorgewebe und einer niedrigen Expression im Normalgewebe, wäre auch die Anreicherung antineoplastisch aktiver Wirkstoffe im Tumorgewebe durch ihre Kopplung an EZH2-Antikörper eine interessante Therapieoption. Darüber hinaus stellt EZH2 möglicherweise selbst ein potentiell Ziel für eine spezifische Immuntherapie dar, eine Therapieform, die aufgrund ihrer geringen Toxizität und Nebenwirkungsrate besonders im Nierenzellkarzinom weiterhin Gegenstand intensiver Forschung ist [144]. Aufgrund der hohen Expression von EZH2 im normalen Hoden müsste bei solchen Therapieansätzen jedoch mit einer erheblichen Gonadotoxizität gerechnet werden.

6. Zusammenfassung

Die durch Polycomb-Proteine induzierten Formationsänderungen in der Chromatin-Architektur führen zur Inaktivierung zahlreicher Gene, von denen ein Großteil Regulatorgene des Zellzyklus sowie der Apoptose darstellen. Passend dazu weisen verschiedene Studien darauf hin, dass einer gestörten Expression von Mitgliedern dieser Proteinfamilie eine Bedeutung im Rahmen der Entstehung und Progression maligner Tumoren zukommt.

Bisherige Untersuchungen zur Expression und biologischen Bedeutung von Polycomb-Proteinen in urologischen Tumorentitäten waren auf das Prostatakarzinom fokussiert. Die vorliegenden Arbeiten liefern neue Erkenntnisse über das Expressionsprofil ausgewählter PcG-Familienmitglieder, in Urothelkarzinomen der

Harnblase, klarzelligem Nierenzellkarzinomen und testikulären Keimzelltumoren. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Expression des Polycomb-Proteins EZH2 gelegt, die zusätzlich auch in Hodenbiopsien mit Spermatogenesestörungen untersucht wurde.

Im Urothelkarzinom der Harnblase korrelierte eine Zunahme der EZH2-Expression sowohl mit einer Progression des pathologischen Tumorstadiums als auch mit einer zunehmenden Entdifferenzierung. Weiterführende Untersuchungen gaben zudem erste Hinweise darauf, dass EZH2 sein „onkogenes“ Potential im Urothelkarzinom möglicherweise über die Regulation der Promotormethylierung des APAF-1-Gens ausübt. Für CBX7 fand sich hingegen eine inverse Korrelation der Expressionshöhe mit dem Fortschreiten des Tumorstadiums und des Differenzierungsgrades. Weder für EZH2 noch für CBX7 konnte ein unabhängiger prognostischer Stellenwert nachgewiesen werden. BMI1, SUZ12 und RING1 waren in Urothelkarzinomen ebenfalls regelmäßig exprimiert, die Höhe ihrer Expression zeigte jedoch keine Assoziationen mit histopathologischen Parametern oder der Patientenprognose.

In klarzelligem Nierenzellkarzinomen war EZH2 deutlich stärker exprimiert als in korrespondierenden Normalgeweben. Assoziationen zwischen der Expressionshöhe von EZH2 und pathologischen Tumorcharakteristika fanden sich nicht, jedoch konnte EZH2 als ein vom T- und G-Stadium unabhängiger prognostischer Parameter für das rezidivfreie Überleben identifiziert werden. Eine niedrige Expression von EZH2 war dabei mit einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko assoziiert.

In Keimzelltumoren des Hodens war EZH2 signifikant niedriger exprimiert als im normalen Hodenparenchym, wobei zwischen Seminomen und Nichtseminomen sowie zwischen den unterschiedlichen klinischen Tumorstadien keine signifikanten Expressionsunterschiede bestanden. Auch in Hodenbiopsien mit Störungen der Spermatogenese zeigte sich eine gegenüber normalem Hodenparenchym reduzierte EZH2-Expression. Darüber hinaus korrelierte die Abnahme der Expression von EZH2 mit einer Zunahme des Schweregrades der spermatogentischen Dysfunktion, so dass EZH2 möglicherweise einen attraktiven Marker zur molekularen Charakterisierung von Spermatogenesestörungen unterschiedlicher Ausprägung darstellt.

Die Ergebnisse der in dieser Habilitationsschrift integrierten Arbeiten liefern erstmals eine Übersicht über das Potential diverser PcG-Familienmitglieder als Progressions- und Prognosemarker in verschiedenen urologischen Tumorentitäten. Zudem deuten unsere Daten erstmals auf eine physiologische Schlüsselrolle von EZH2 im Rahmen der humanen Spermatogenese hin. Diese Erkenntnisse bilden somit eine wichtige Basis für weiterführende Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von PcGs in der Pathogenese dieser Erkrankungen und zeigen interessante Ansatzpunkte für die Entwicklung innovativer Therapiekonzepte auf.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 7-1-2000;100:57-70.
- [2] Vogelstein B, Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-799.
- [3] Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR: A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004;4:177-183.
- [4] Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 23-2-2007;128:683-692.
- [5] Laird PW: Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 15-4-2005;14 Spec No 1:R65-R76.
- [6] Takai D, Jones PA: Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 19-3-2002;99:3740-3745.
- [7] Lund AH, van LM: Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 1-10-2004;18:2315-2335.
- [8] Miremedi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C: Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet* 15-4-2007;16 Spec No 1:R28-R49.
- [9] Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG: Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 15-7-1999;59:3352-3356.
- [10] Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 15-2-1999;59:793-797.

- [11] Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME, Kimchi A: DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 24-7-1997;15:403-407.
- [12] Lee MG, Huh JS, Chung SK, Lee JH, Byun DS, Ryu BK, Kang MJ, Chae KS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG: Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene* 21-9-2006;25:5807-5822.
- [13] Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA: Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 1-5-2000;60:2473-2476.
- [14] Li LC, Okino ST, Dahiya R: DNA methylation in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 20-9-2004;1704:87-102.
- [15] Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, Oliveira J, Teixeira MR, Lopes C, Sidransky D: A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15-12-2004;10:8472-8478.
- [16] Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG: Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 15-10-1998;58:4515-4518.
- [17] Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP: Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1-8-1999;94:1113-1120.
- [18] Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ: Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 2006;38:540-549.
- [19] Peterson CL, Laniel MA: Histones and histone modifications. *Curr Biol* 27-7-2004;14:R546-R551.
- [20] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M: Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37:391-400.
- [21] Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK: Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 30-6-2005;435:1262-1266.
- [22] Otte AP, Kwaks TH: Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:448-454.
- [23] Gil J, Bernard D, Peters G: Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA Cell Biol* 2005;24:117-125.

- [24] Simon JA: Polycomb group proteins. *Curr Biol* 4-2-2003;13:R79-R80.
- [25] Francis NJ, Kingston RE: Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:409-421.
- [26] Lund AH, van LM: Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:239-246.
- [27] Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, Jones RS: Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* 4-6-2004;14:637-646.
- [28] Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 10-8-2001;293:1074-1080.
- [29] Ringrose L, Rehmsmeier M, Dura JM, Paro R: Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell* 2003;5:759-771.
- [30] Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SC, Pirrotta V: Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* 26-3-2004;13:887-893.
- [31] Min J, Zhang Y, Xu RM: Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* 1-8-2003;17:1823-1828.
- [32] Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA: Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 21-4-2006;125:301-313.
- [33] Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K: Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 1-5-2006;20:1123-1136.
- [34] Akasaka T, Kanno M, Balling R, Mieza MA, Taniguchi M, Koseki H: A role for *mel-18*, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanterior-posterior specification of the axial skeleton. *Development* 1996;122:1513-1522.
- [35] Lessard J, Schumacher A, Thorsteinsdottir U, van LM, Magnuson T, Sauvageau G: Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation. *Genes Dev* 15-10-1999;13:2691-2703.
- [36] van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van RM, Robanus-Maandag E, te RH, van d, V, Deschamps J, Sofroniew M, van LM, .: Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev* 1-4-1994;8:757-769.
- [37] Sanchez-Beato M, Sanchez E, Gonzalez-Carrero J, Morente M, Diez A, Sanchez-Verde L, Martin MC, Cigudosa JC, Vidal M, Piris MA: Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod Pathol* 2006;19:684-694.

- [38] Simon JA, Lange CA: Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 1-12-2008;647:21-29.
- [39] Komohara Y, Harada M, Arima Y, Suekane S, Noguchi M, Yamada A, Itoh K, Matsuoka K: Identification of target antigens in specific immunotherapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2007;177:1157-1162.
- [40] Ogata R, Matsueda S, Yao A, Noguchi M, Itoh K, Harada M: Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate* 1-9-2004;60:273-281.
- [41] Gil J, Bernard D, Martinez D, Beach D: Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol* 2004;6:67-72.
- [42] Raaphorst FM: Deregulated expression of Polycomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epithelial tumors. *Hum Mol Genet* 15-4-2005;14 Spec No 1:R93-R100.
- [43] Kirmizis A, Bartley SM, Farnham PJ: Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2003;2:113-121.
- [44] Satijn DP, Gunster MJ, van d, V, Hamer KM, Schul W, Alkema MJ, Saurin AJ, Freemont PS, van DR, Otte AP: RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1997;17:4105-4113.
- [45] Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 10-10-2002;419:624-629.
- [46] Schulz WA, Hoffmann MJ: Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 2009;19:172-180.
- [47] van Leenders GJ, Dukers D, Hessels D, van den Kieboom SW, Hulsbergen CA, Witjes JA, Otte AP, Meijer CJ, Raaphorst FM: Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. *Eur Urol* 2007;52:455-463.
- [48] Chen H, Tu SW, Hsieh JT: Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J Biol Chem* 10-6-2005;280:22437-22444.
- [49] Gil J, Peters G: Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:667-677.
- [50] Chopin DK, Gattegno B: Superficial bladder tumors. *Eur Urol* 2002;42:533-541.
- [51] Weikert S, Christoph F, Kollermann J, Muller M, Schrader M, Miller K, Krause H: Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int J Mol Med* 2005;16:349-353.

- [52] Arisan S, Buyuktuncer ED, Palavan-Unsal N, Caskurlu T, Cakir OO, Ergenekon E: Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. *Urol Int* 2005;75:252-257.
- [53] Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ: Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 15-12-2005;11:8570-8576.
- [54] Hinz S, Kempkensteffen C, Christoph F, Hoffmann M, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S: Expression of the polycomb group protein EZH2 and its relation to outcome in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:331-336.
- [55] Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van EA, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di CL, de LY, Fuks F: The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 16-2-2006;439:871-874.
- [56] Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, Schostak M, Schrader M, Miller K, Christoph F: EZH2 polycomb transcriptional repressor expression correlates with methylation of the APAF-1 gene in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Tumour Biol* 2007;28:151-157.
- [57] Hinz S, Kempkensteffen C, Christoph F, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S: Expression parameters of the polycomb group proteins BMI1, SUZ12, RING1 and CBX7 in urothelial carcinoma of the bladder and their prognostic relevance. *Tumour Biol* 2008;29:323-329.
- [58] Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS: Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* 2005;173:1853-1862.
- [59] Cohen HT, McGovern FJ: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 8-12-2005;353:2477-2490.
- [60] Ravaud A, Wallerand H, Culine S, Bernhard JC, Fergelot P, Bensalah K, Patard JJ: Update on the medical treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2008;54:315-325.
- [61] Wagener N, Holland D, Bulkescher J, Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler K, Zentgraf H, Pritsch M, Buse S, Pfitzenmaier J, Haferkamp A, Hohenfellner M, Hoppe-Seyler F: The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 1-10-2008;123:1545-1550.
- [62] Hinz S, Weikert S, Magheli A, Hoffmann M, Engers R, Miller K, Kempkensteffen C: Expression profile of the polycomb group protein enhancer of Zeste homologue 2 and its prognostic relevance in renal cell carcinoma. *J Urol* 2009;182:2920-2925.
- [63] Chaganti RS, Houldsworth J: Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res* 15-3-2000;60:1475-1482.

- [64] Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4-3-1997;94:1914-1918.
- [65] Kalejs M, Erenpreisa J: Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int* 16-2-2005;5:4.
- [66] Grote HJ, Schmiemann V, Kazimirek M, Bocking A: [Quantitative methylation-specific PCR for the diagnosis of lung cancer]. *Pathologe* 2007;28:377-383.
- [67] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 15-4-2000;28:E32.
- [68] Holstein AF, Wartenberg H, Wulfhekel U: [Cytomorphological studies on spermatogenesis in man]. *Verh Anat Ges* 1971;65:91-93.
- [69] Schulze W, Thoms F, Knuth UA: Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod* 1999;14 Suppl 1:82-96.
- [70] Sobin LH WC: TNM classification of malignant tumors., ed 6th ed. New York, John Wiley & Sons, 2002.
- [71] Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK: The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1435-1448.
- [72] Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K: EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 15-10-2003;22:5323-5335.
- [73] Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T, Kovacs G, Dennis N, Fisher C, Wooster R, Huddart R, Foster CS, Cooper CS: Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 26-2-2004;23:1627-1630.
- [74] Olsson AY, Feber A, Edwards S, Te PR, Giddings I, Merson S, Cooper CS: Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene* 14-8-2006.
- [75] Saramaki OR, Tammela TL, Martikainen PM, Vessella RL, Visakorpi T: The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:639-645.
- [76] Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA: Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 15-2-2006;12:1168-1174.

- [77] Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA: EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 10-1-2006;24:268-273.
- [78] Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM: EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30-9-2003;100:11606-11611.
- [79] Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B: Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 2003;3:89-95.
- [80] Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T: DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000;24:88-91.
- [81] McGarvey KM, Greene E, Fahrner JA, Jenuwein T, Baylin SB: DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res* 1-6-2007;67:5097-5102.
- [82] Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB: A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007;39:237-242.
- [83] Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H: Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 2007;39:232-236.
- [84] Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW: Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007;39:157-158.
- [85] Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC: Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1-5-2005;23:2903-2910.
- [86] Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G: Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 15-11-2004;10:7457-7465.
- [87] Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, Kuwano M: The association of death-associated protein kinase hypermethylation

with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res* 15-7-2002;62:4048-4053.

- [88] Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M: Regularly methylated novel pro-apoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 15-9-2006;119:1396-1402.
- [89] Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW: Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 11-1-2001;409:207-211.
- [90] Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949-957.
- [91] Schulz WA: Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways. *Int J Cancer* 1-10-2006;119:1513-1518.
- [92] Cao R, Zhang Y: SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 2-7-2004;15:57-67.
- [93] Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini DE, Helin K: Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J* 13-10-2004;23:4061-4071.
- [94] Nekrasov M, Wild B, Muller J: Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of *Drosophila* PRC2. *EMBO Rep* 2005;6:348-353.
- [95] Scott CL, Gil J, Hernando E, Teruya-Feldstein J, Narita M, Martinez D, Visakorpi T, Mu D, Cordon-Cardo C, Peters G, Beach D, Lowe SW: Role of the chromobox protein CBX7 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 27-3-2007;104:5389-5394.
- [96] Kanno M, Hasegawa M, Ishida A, Isono K, Taniguchi M: mel-18, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J* 15-11-1995;14:5672-5678.
- [97] Guo WJ, Zeng MS, Yadav A, Song LB, Guo BH, Band V, Dimri GP: Mel-18 acts as a tumor suppressor by repressing Bmi-1 expression and down-regulating Akt activity in breast cancer cells. *Cancer Res* 1-6-2007;67:5083-5089.
- [98] Matsuo F, Yano K, Saito H, Morotomi K, Kato M, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Miki Y: Mutation analysis of the mel-18 gene that shows decreased expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer* 2002;9:33-38.
- [99] Suarez-Merino B, Hubank M, Revesz T, Harkness W, Hayward R, Thompson D, Darling JL, Thomas DG, Warr TJ: Microarray analysis of pediatric ependymoma identifies a cluster of 112 candidate genes including four transcripts at 22q12.1-q13.3. *Neuro-oncol* 2005;7:20-31.
- [100] Koed K, Wiuf C, Christensen LL, Wikman FP, Zieger K, Moller K, von der MH, Orntoft TF: High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage

and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. *Cancer Res* 1-1-2005;65:34-45.

- [101] Gunster MJ, Raaphorst FM, Hamer KM, den Blaauwen JL, Fieret E, Meijer CJ, Otte AP: Differential expression of human Polycomb group proteins in various tissues and cell types. *J Cell Biochem* 2001;81:129-143.
- [102] Flaig TW, Nordeen SK, Lucia MS, Harrison GS, Glode LM: Conference report and review: current status of biomarkers potentially associated with prostate cancer outcomes. *J Urol* 2007;177:1229-1237.
- [103] Zeidler M, Varambally S, Cao Q, Chinnaiyan AM, Ferguson DO, Merajver SD, Klier CG: The Polycomb group protein EZH2 impairs DNA repair in breast epithelial cells. *Neoplasia* 2005;7:1011-1019.
- [104] Sellers WR, Loda M: The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2002;2:349-350.
- [105] Berezovska OP, Glinskii AB, Yang Z, Li XM, Hoffman RM, Glinsky GV: Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer. *Cell Cycle* 2006;5:1886-1901.
- [106] Hoffmann MJ, Engers R, Florl AR, Otte AP, Muller M, Schulz WA: Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1403-1412.
- [107] Yu J, Yu J, Rhodes DR, Tomlins SA, Cao X, Chen G, Mehra R, Wang X, Ghosh D, Shah RB, Varambally S, Pienta KJ, Chinnaiyan AM: A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 15-11-2007;67:10657-10663.
- [108] Gouttefangeas C, Stenzl A, Stevanovic S, Rammensee HG: Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:117-128.
- [109] Pietersen AM, Horlings HM, Hauptmann M, Langerod A, Ajouaou A, Cornelissen-Steijger P, Wessels LF, Jonkers J, Vijver MJ, van LM: EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer. *Breast Cancer Res* 19-12-2008;10:R109.
- [110] Abdouh M, Facchino S, Chatoo W, Balasingam V, Ferreira J, Bernier G: BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci* 15-7-2009;29:8884-8896.
- [111] Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O: Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:1304-1311.
- [112] Fan C, He L, Kapoor A, Gillis A, Rybak AP, Cutz JC, Tang D: Bmi1 promotes prostate tumorigenesis via inhibiting p16(INK4A) and p14(ARF) expression. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:642-648.

- [113] Hayry V, Tynninen O, Haapasalo HK, Wolfer J, Paulus W, Hasselblatt M, Sariola H, Paetau A, Sarna S, Niemela M, Wartiovaara K, Nupponen NN: Stem cell protein BMI-1 is an independent marker for poor prognosis in oligodendroglial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34:555-563.
- [114] Bachmann IM, Puntervoll HE, Otte AP, Akslen LA: Loss of BMI-1 expression is associated with clinical progress of malignant melanoma. *Mod Pathol* 2008;21:583-590.
- [115] Satijn DP, Olson DJ, van d, V, Hamer KM, Lambrechts C, Masselink H, Gunster MJ, Sewalt RG, van DR, Otte AP: Interference with the expression of a novel human polycomb protein, hPc2, results in cellular transformation and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:6076-6086.
- [116] Clermont Y: Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972;52:198-236.
- [117] Schulze W: Evidence of a wave of spermatogenesis in human testis. *Andrologia* 1982;14:200-207.
- [118] Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M: Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 1977;74:68-85.
- [119] Holstein AF, Schulze W, Davidoff M: Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 14-11-2003;1:107.
- [120] Khalil AM, Boyar FZ, Driscoll DJ: Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23-11-2004;101:16583-16587.
- [121] van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, Wansink DG, van d, V, Peters AH, de BP: Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* 2007;39:251-258.
- [122] Khalil AM, Wahlestedt C: Epigenetic mechanisms of gene regulation during mammalian spermatogenesis. *Epigenetics* 2008;3:21-28.
- [123] Zamudio NM, Chong S, O'Bryan MK: Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction* 2008;136:131-146.
- [124] Christensen ME, Rattner JB, Dixon GH: Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acids Res* 11-6-1984;12:4575-4592.
- [125] Oliva R, Mezquita C: Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res* 20-12-1982;10:8049-8059.
- [126] Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y: Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 1-11-2007;450:119-123.

- [127] Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN: A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2007;13:33-43.
- [128] Chen YT, Scanlan MJ, Venditti CA, Chua R, Theiler G, Stevenson BJ, Iseli C, Gure AO, Vasicek T, Strausberg RL, Jongeneel CV, Old LJ, Simpson AJ: Identification of cancer/testis-antigen genes by massively parallel signature sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 31-5-2005;102:7940-7945.
- [129] Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M: Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28-4-1998;95:5211-5216.
- [130] Kalejs M, Erenpreisa J: Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int* 16-2-2005;5:4.
- [131] Weikert S, Schrader M, Christoph F, Schulze W, Krause H, Muller M, Miller K: Quantification of survivin mRNA in testes of infertile patients and in testicular germ cell tumours: high levels of expression associated with normal spermatogenesis. *Int J Androl* 2005;28:224-229.
- [132] Weikert S, Schrader M, Muller M, Krause H, Miller K: Expression of the apoptosis inhibitor survivin in testicular tissue of infertile patients. *Int J Androl* 2004;27:161-165.
- [133] Lee ER, Murdoch FE, Fritsch MK: High histone acetylation and decreased polycomb repressive complex 2 member levels regulate gene specific transcriptional changes during early embryonic stem cell differentiation induced by retinoic acid. *Stem Cells* 2007;25:2191-2199.
- [134] Raaphorst FM, Otte AP, van Kemenade FJ, Blokzijl T, Fieret E, Hamer KM, Satijn DP, Meijer CJ: Distinct BMI-1 and EZH2 expression patterns in thymocytes and mature T cells suggest a role for Polycomb genes in human T cell differentiation. *J Immunol* 15-5-2001;166:5925-5934.
- [135] Rini BI: Current status and future directions of molecular markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2006;16:332-336.
- [136] Gelb AB: Renal cell carcinoma: current prognostic factors. *Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer* 1-9-1997;80:981-986.
- [137] Lyko F, Brown R: DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 19-10-2005;97:1498-1506.
- [138] Yoo CB, Jones PA: Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37-50.
- [139] Drummond DC, Marx C, Guo Z, Scott G, Noble C, Wang D, Pallavicini M, Kirpotin DB, Benz CC: Enhanced pharmacodynamic and antitumor properties of a histone deacetylase inhibitor encapsulated in liposomes or ErbB2-targeted immunoliposomes. *Clin Cancer Res* 1-5-2005;11:3392-3401.

- [140] Bhalla KN: Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 10-6-2005;23:3971-3993.
- [141] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 27-5-2004;429:457-463.
- [142] Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dausies T, Karp JE, Rudek MA, Zhao M, Smith BD, Manning J, Jiemjit A, Dover G, Mays A, Zwiebel J, Murgo A, Weng LJ, Herman JG: Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 15-6-2006;66:6361-6369.
- [143] Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q: Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 1-5-2007;21:1050-1063.
- [144] Van PH, Joniau S, Van Gool SW: Vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2009;55:1333-1342.

8. Danksagungen

Zu danken habe ich vornehmlich Herrn Prof. Dr. Kurt Miller, für die Möglichkeit zur Habilitation und die Freistellung vom klinischen Alltag während meiner Forschungsaktivitäten im urologischen Labor.

PD Dr. Steffen Weikert und Prof. Dr. Mark Schrader, für die langjährige freundschaftliche Betreuung meiner wissenschaftlichen Projekte und die vielen wertvollen Ratschläge.

Dr. Carsten Kempkensteffen für seine immerwährende Unterstützung und Freundschaft auf die ich mich stets verlassen konnte und für die vielen Diskussionen die besonders in schwierigen Phasen der Untersuchungen Wege aufzeigten, die Studie voranzubringen und fertig zu stellen.

Dr. Ahmed Magheli, für unsere Freundschaft und seine wahrhaft unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Dr. rer. nat. Hans Krause, für das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten und Denken sowie für seine geduldige Unterstützung beim Design der optimalen PCR-Primer. PD Dr. Frank Christoph, für die Einführung in den Forschungsbereich der Promotormethylierung und die konstruktive Zusammenarbeit.

Frau Waltraud Jekabsons und Frau Petra von Kwiatkowski, für die stets engagierte und zuverlässige medizinisch technische Assistenz im Rahmen aller praktischen Forschungsprojekte.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinem Vater, für seinen Rückhalt und die beharrliche Unterstützung während der gesamten Phase meiner klinischen und experimentellen Arbeit.

Danken möchte ich Claudia Lipp für das entgegengebrachte Verständnis, die Geduld und ihre stets optimistische und positive Grundeinstellung die es ermöglicht hat auf den einen und anderen Urlaub zu verzichten.

9. Eidesstattliche Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin,

Dr. med Stefan Hinz