

**Frei im Blutserum zirkulierende DNA als diagnostischer  
Marker beim Nierenzellkarzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Tobias Zahalka  
aus Worms

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. A. von Rücker

Tag der Mündlichen Prüfung: 26. April 2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung .....	8
1.1 Nierenzellkarzinom .....	8
1.1.1 Epidemiologie .....	8
1.1.2 Histologische und molekularbiologische Aspekte .....	9
1.1.3 Risikofaktoren.....	10
1.1.4 Symptome und Diagnostik.....	11
1.1.5 Prognostische Faktoren.....	13
1.1.6 Therapie und Nachsorge .....	16
1.2 Frei zirkulierende DNA im Blutserum des Menschen.....	17
1.2.1 Allgemeine Aspekte.....	17
1.2.2 Tumorspezifische Veränderungen der zirkulierenden DNA.....	19
1.2.2.1 Physiologische Aspekte der DNA-Methylierung.....	19
1.2.2.2 Pathologische Veränderungen der DNA-Methylierung.....	21
1.3 Promotorhypermethylierung beim Nierenzellkarzinom .....	23
1.4 Zielsetzung .....	26
2 Material und Methoden .....	28
2.1 Materialien .....	28
2.1.1 Geräte.....	28
2.1.2 Labormaterialien .....	29
2.1.3 Chemikalien.....	29
2.1.4 Kits.....	30
2.1.5 Enzyme.....	30
2.1.6 Primer .....	30
2.1.7 Software .....	32
2.1.8 Blutserum-Probenmaterial .....	32
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Aufreinigung des Blutserums und DNA-Isolation.....	35
2.2.2 Herstellung der Kontrollproben .....	36
2.2.3 Restriktionsenzymbehandlung.....	37
2.2.4 Primerdesign .....	39

2.2.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion .....	42
2.2.6	Gelelektrophorese .....	46
2.2.7	DNA-Quantifizierung und Methylierungsratio.....	48
2.2.8	Statistische Auswertung .....	49
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Quantifizierung freier DNA .....	51
3.2	DNA-Integrität .....	51
3.3	DNA-Methylierung und Methylierungsratio .....	53
3.3.1	ROC-Analysen für kleine und große Fragmente sowie DNA-Integrität.....	57
3.3.2	ROC-Analysen für die Methylierungsrationes der untersuchten Gene .....	59
3.3.3	Korrelation der DNA-Menge mit klinisch-pathologischen Merkmalen .....	62
3.3.4	Korrelation der Methylierungslevel mit klinisch-pathologischen Merkmalen .....	64
4	Diskussion.....	65
4.1	Quantifizierung freier DNA und DNA-Integrität .....	65
4.2	Analyse der Promotormethylierung.....	67
4.2.1	Methylierungsstatus von APC.....	67
4.2.2	Methylierungsstatus von GSTP1 .....	68
4.2.3	Methylierungsstatus von p14 .....	68
4.2.4	Methylierungsstatus von p16 .....	69
4.2.5	Methylierungsstatus von PTGS-2 .....	69
4.2.6	Methylierungsstatus von RAR- $\beta$ .....	70
4.2.7	Methylierungsstatus von RASSF1A.....	70
4.2.8	Methylierungsstatus von TIG1 .....	71
4.2.9	Methylierungsstatus von TIMP3 .....	71
4.3	Diagnostische Aussagen .....	72
4.3.1	Diagnose anhand der DNA-Menge und -Integrität.....	72
4.3.2	Diagnose anhand der Methylierungslevel.....	73
4.3.3	Bewertung .....	74
4.4	Hinweise auf die Herkunft der freien DNA .....	75
5	Zusammenfassung .....	76
6	Anhang .....	77

6.1	Tabellenverzeichnis .....	77
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	77
7	Literaturverzeichnis .....	78
8	Danksagung .....	93
9	Lebenslauf .....	94

## Abkürzungsverzeichnis

95%-KI	95%-Konfidenzintervall
$\beta$ -HCG	Humanes Chorion-Gonadotropin $\beta$
<i>ACTB</i>	Actin beta
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AgNOR	Argyrophile, den Nukleolus-organisierenden Regionen assoziierte Proteine
<i>APAF-1</i>	Apoptotic protease activating factor 1
<i>APC</i>	Adenomatosis polyposis coli
AUC	Area under the curve
Bisulf. Seq.	Bisulfit-gestützte Gensequenzierung
bp	Basenpaare
CDK	Zyclin-abhängige Proteinkinase
COX-2	Cyclooxygenase 2
CT	Computertomographie
CT-Wert	Cycle Threshold-Wert
DAPK-1	Death-associated protein kinase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
EAU	European Association of Urology
ECOG PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
<i>GSTP1</i>	Glutathion-S-Transferase Protein 1
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
<i>MDM2</i>	Murine double minute 2
MGMT	O-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
M.Sssl	CpG-Methyltransferase
MSP	Methylierungsspezifische PCR
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NCC	Nierenzellkarzinom
NPW	Negativer Prädiktiver Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPW	Positiver prädiktiver Wert
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin Endoperoxid Synthase 2
PTHrp	Parathyroid hormone-related peptide
qMSP	Quantitative methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
<i>RAR-β</i>	Retinoid Acid Receptor β
<i>RAS</i>	Rat Sarcoma
<i>RASSF1</i>	RAS-association domain family 1
ROC	Receiver Operator Curve
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
Sens.	Sensitivität
Spez.	Spezifität
Sssl-DNA	Mit M.Sssl behandelte DNA
TATI	Tumor-associated trypsin inhibitor
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
<i>TIG-1</i>	Tazarotene-induced gene 1
<i>TIMP-3</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
UICC	Union internationale contre le cancer
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Nierenzellkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Laut Robert-Koch-Institut (2008) erkranken in Deutschland jährlich etwa 17000 Menschen an Krebserkrankungen der Niere; die geschätzte Inzidenz von Nierentumoren in Deutschland in den Jahren 2002 und 2004 lag im weltweiten Vergleich hinter Tschechien auf Platz zwei. Das Nierenzellkarzinom (NCC) ist mit 80-85% der häufigste maligne Tumor der Niere (Motzer et al., 1996), wobei insgesamt nur etwa 2% aller Krebserkrankungen auf diesen Tumor entfallen (McLaughlin und Lipworth, 2000).

Die Inzidenz schwankt im geographischen Vergleich, die höchste Rate an Neuerkrankungen findet sich nach Motzer et al. (1996) in Nordamerika und Skandinavien. Murai und Oya (2004) berichten von allgemein höherer Inzidenz in westlichen Ländern verglichen mit Asien. Weltweit wird eine Zunahme der Inzidenz festgestellt, die wohl nur zum Teil auf eine verbesserte Diagnostik zurückzuführen ist (Murai und Oya, 2004; Chow et al. 1999). Die von Chow et al. (1999) publizierten Daten gehen von einer jährlichen Zunahme der Inzidenz für die USA zwischen 2,3 und 4,3% in den Jahren von 1975 bis 1995 aus, wobei innerhalb der schwarzen Bevölkerung die stärkste Zunahme zu verzeichnen war (3,9% bei Männern, 4,3% bei den Frauen).

Das mittlere Erkrankungsalter beträgt für Männer 67, für Frauen 71 Jahre, die höchste Inzidenz findet sich im Alter zwischen 75 und 80 Jahren; dabei sind Männer nahezu doppelt so häufig vom NCC betroffen wie Frauen (Motzer et al., 1996). Im Rahmen hereditärer Tumorerkrankungen können Nierentumoren jedoch auch bereits in deutlich jüngerem Alter auftreten, beispielsweise beim von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom), bei dem das mittlere Erkrankungsalter bei 39 Jahren liegt (Lonser et al., 2003).

Die 5-Jahres-Überlebensrate des NCC liegt in Deutschland im Durchschnitt bei 66% für Männer und bei 67% für Frauen, bei bereits zum Diagnosezeitpunkt eingetretener Metastasierung jedoch unter 10% (Robert Koch-Institut, 2008).

### **1.1.2 Histologische und molekularbiologische Aspekte**

Nierentumoren werden entsprechend den Empfehlungen der AJCC und UICC (Störkel et al. 1997) anhand histologischer Kriterien unterteilt in benigne und maligne Neoplasmen. Die benignen Tumoren sind weiter zu unterteilen in Nierenadenome und Onkozytome.

Bei den malignen Tumoren ist zu unterscheiden einerseits zwischen den aus dem Tubulusepithel hervorgehenden klarzelligen (hellzelligen), papillären und chromophoben Karzinomen sowie andererseits den Sammelrohr- und unklassifizierbaren Karzinomen. Die klarzelligen Karzinome können zu Teilen oder im Ganzen ein zystisches Wachstum („zystisches Nierenzellkarzinom“) aufweisen, die papillären Karzinome hinsichtlich des Zytoplasmas weiter in eosinophile und basophile Varianten unterteilt werden. Den häufigsten Subtyp machen mit über 80% die klarzelligen Nierenkarzinome aus, an zweiter Stelle stehen mit einer Häufigkeit von ca. 10% die papillären Karzinome, gefolgt von den chromophoben Karzinomen mit 5% und den unklassifizierbaren und Sammelrohrkarzinomen mit jeweils unter 1% (Böcker et al., 2004; Störkel et al., 1997).

Auf genetischer Ebene weisen Nierenzellkarzinome einige Charakteristika auf; bei klarzelligen Karzinomen finden sich meist Veränderungen auf dem kurzen Arm des Chromosom 3. Hier befindet sich das *von Hippel-Lindau (VHL)*-Gen, das bei 50% dieser Karzinome mutiert sowie bei weiteren 10-20% durch Promotor-Hypermethylierung inaktiviert ist. Papilläre Karzinome weisen häufig einen Verlust des Y-Chromosoms sowie Trisomien, chromophobe Karzinome hingegen Monosomien multipler Chromosomen auf. Ebenfalls bei chromophoben Karzinomen sowie bei den benignen Onkozytomen finden sich Veränderungen der mitochondrialen DNA (Störkel et al., 1997; Böcker et al., 2004).

Bei der histopathologischen Untersuchung der Nierenzellkarzinome erfolgt das Grading, d.h. die Zuweisung des Tumors zu einem bestimmten Malignitätsgrad aufgrund histologischer und zytologischer Kriterien (Böcker et al., 2004). Beim Nierenzellkarzinom wird das Grading nach Fuhrman durchgeführt (Kerngrad nach Fuhrman). Alternativ kommt das WHO-Grading zur Anwendung (Fuhrman et al., 1982; Patard et al., 2005; EAU, 2009).

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Es existieren derzeit nur wenige Risikofaktoren, die unumstritten sind (Dhote et al., 2000). Nachfolgend seien die wesentlichen Erkenntnisse hierzu skizziert.

An erster Stelle ist das Rauchen zu nennen (EAU, 2009). Zigarettenrauchen verdoppelte in einer Untersuchung von Yu et al. (1986) das Risiko für Männer, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken. McLaughlin et al. (1984) sehen bei 30% der bei Männern und 24% der bei Frauen diagnostizierten Nierenzellkarzinome in ihrer Untersuchung an insgesamt 495 Fällen die Ursache beim Rauchen.

Als ein weiterer Risikofaktor wird Übergewicht bzw. Adipositas angesehen. Verschiedene Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen Übergewicht und dem Auftreten von Nierenzellkarzinomen vor allem bei Frauen herausstellen, wobei in der Literatur weitgehende Einigkeit über diesen Zusammenhang besteht (Chiu et al., 2006). Bei Männern ist das Bild jedoch unklar; hier kommen verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. So fanden Chow et al. (2000), van Dijk et al. (2004) und Pan et al. (2006) Übergewicht bzw. Adipositas, repräsentiert durch den Body Mass Index, als Risikofaktor auch für Männer heraus, dies konnten Lindblad et al. (1994) sowie Chiu et al. (2006) jedoch nicht bestätigen. Pischon et al. (2006) zeigten, dass bei Männern das Fettverteilungsmuster hinsichtlich des Risikos eine Rolle spielt. Unklar ist, ob das Übergewicht selbst oder die assoziierten Faktoren, beispielsweise erhöhte Serumspiegel von IGF-1 oder Östrogen, für das erhöhte Risiko verantwortlich sind (Pan et al., 2006).

Als weiterer Risikofaktor gilt die arterielle Hypertonie (Chow et al., 2000; Weikert et al., 2008).

Die Einnahme von Phenacetin war in Studien mit einer erhöhten Inzidenz von Urothel- und Nierenzellkarzinomen vergesellschaftet; auch weitere Analgetika sowie Thiaziddiuretika werden von einigen Autoren als Risikofaktoren angesehen (Gago-Dominguez, 1999; Dhote et al., 2000).

Im Rahmen eines möglichen beruflichen Expositionsrisikos wurde ein erhöhtes Risiko insbesondere bei Arbeitern in der Eisen- und Stahlindustrie, wie auch bei beruflicher Exposition gegenüber Treibstoffen und Lösungsmitteln beschrieben (Dhote et al., 2000). Allgemein anerkannte Karzinogene konnten bisher jedoch nicht identifiziert werden (Murai et al., 2004).

Ernährungsgewohnheiten werden uneinheitlich bewertet; teils wird ein protektiver Effekt Gemüse- und Obst-reicher Ernährung postuliert, der allerdings von anderen Autoren nicht gefunden wird (Wolk et al., 1996; van Dijk et al., 2005; Weikert et al., 2006).

Der Einfluss der körperlichen Aktivität auf die Inzidenz konnte ebenso bisher nicht abschließend bewertet werden (Chiu et al., 2006; Pan et al., 2006).

Anamnestisch aufgetretene Infektionen des oberen und unteren Harntraktes sowie chronische Nierenerkrankungen und Nierensteine werden ebenfalls als Risikofaktoren beschrieben (Dhote et al., 2000; Parker et al., 2004).

Protektiv hingegen soll bei Frauen ein mäßiger Alkoholkonsum und die Einnahme oraler Kontrazeptiva wirken (Dhote et al., 2000).

Als endogener Risikofaktor gilt die familiäre Belastung, auch wenn hereditär auftretende Nierenzellkarzinome selten sind; das Risiko, selbst einen solchen Tumor zu entwickeln, ist für erstgradig Verwandte eines am Nierenzellkarzinom Erkrankten vierfach erhöht.

Das VHL-Syndrom, eine autosomal-dominant vererbte Phakomatose, beruht auf der Inaktivierung beider Allele des Tumorsuppressorgens *VHL*. Hierbei kommt es vor allem zum Auftreten zentralnervöser und retinaler Hämangioblastome, daneben treten bei 40% der Patienten Nierenzellkarzinome, weniger häufig multiple andere viszerale Tumoren auf (Motzer et al., 1996; Lonser et al., 2003). Eine weitere mit Nierenzellkarzinomen einhergehende Phakomatose ist die tuberöse Sklerose (Bjornsson et al., 1996).

#### **1.1.4 Symptome und Diagnostik**

In der Mehrzahl der Fälle erfolgt die Diagnose eines Nierenzellkarzinoms inzidentell; frühe klinische Symptome fehlen meist oder sind sehr unspezifisch.

Klassische Symptome, die oft erst im fortgeschrittenen Stadium auftreten, sind Hämaturie, Schmerzen in Abdomen und/oder Flanke und Auftreten eines palpablen Tumors. Als „Klassische Trias“ bezeichnet, treten diese Symptome in Kombination nur bei unter 10% der Patienten auf (Motzer et al., 1996) .

In bis zu einem Drittel der Fälle sind Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß sowie Fatigue die ersten Symptome (Palapattu et al., 2002).

Paraneoplastische Syndrome kommen häufig in Zusammenhang mit dem Nierenzellkarzinom vor und können zu einer Beteiligung fast aller Organsysteme führen.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind sie bei 20% aller Patienten zu finden (Bedke et al., 2007). Charakteristisch für die meisten paraneoplastischen Symptome ist ihre Rückbildung nach erfolgter Tumornephrektomie sowie ihre Rückkehr im Rahmen von Tumorrezidiven (Palapattu et al., 2002). Eine Hyperkalzämie tritt bei 13-20% der Patienten auf und kann als „echtes“ paraneoplastisches Syndrom verursacht sein durch die Sekretion eines Parathormon-ähnlichen Peptids (PTHrP = parathyroid hormone-related peptide) durch die Tumorzellen. Die erhöhte Kalziumfreisetzung aus den Knochen bei ossärer Metastasierung ist eine weitere Ursache (Palapattu et al., 2002). Eine arterielle Hypertonie, typischerweise bei Low-grade-Tumoren des klarzelligen Typs, kann häufig gefunden werden (Palapattu et al., 2002). Polyzythämie und Erythrozytose kommen bei gesteigerter Erythropoetin-Produktion vor; häufiger besteht jedoch eine Anämie (Palapattu et al., 2002). Paraneoplastisch bedingte Polyneuropathien, Polymyositiden und Myopathien, wie auch dermatologische Veränderungen im Sinne einer Dermatitis, Vaskulitis oder Hypertrichose treten auf. In 2-5% kommt es zu einer Amyloidose (Bedke et al., 2007). Endokrine Auffälligkeiten wie erhöhte Spiegel der Hormone  $\beta$ -HCG, Prolaktin und ACTH sind ebenfalls beschrieben (Palapattu et al., 2002).

Bei bis zu 20% der Patienten tritt ein sogenanntes Stauffer-Syndrom auf; dies ist durch die erhöhte Konzentration von Lebertransaminasen und eine verlängerte Prothrombinzeit infolge einer Protein-Synthesestörung der Leber charakterisiert. Das pathologische Korrelat ist in einer generalisierten Hepatitis und Degeneration der Hepatozyten ohne Gallengangsobstruktion oder das Vorliegen hepatischer Metastasen zu finden (Palapattu et al., 2002).

Symptome infolge von Tumormetastasen sind vor allem Knochenschmerzen und persistierender Husten (EAU, 2009). Das Nierenzellkarzinom metastasiert häufig in Lunge, Knochen und Leber, seltener in das ZNS. Häufig kommt es zur Metastasierung in ungewöhnliche Regionen wie Schilddrüse, Pankreas, Myokard oder Skelettmuskulatur (Motzer et al., 1996).

Wichtige Laborparameter sind der Hb-Wert, die Blutsenkungsgeschwindigkeit sowie die Serumkonzentrationen von Kalzium, der Transaminasen und der Alkalischen Phosphatase (EAU, 2009).

Bezüglich der Bildgebung stellt die Anfertigung eines kontrastmittelgestützten 3-Phasen-CT des Abdomen den Goldstandard dar; hier können alle wichtigen Aspekte wie Nodalstatus, die Frage nach einem Tumorthrombus und nach Filiae im Abdomen beleuchtet werden. Eine CT-Untersuchung oder alternativ eine konventionelle Röntgendarstellung des Thorax komplettieren die Diagnostik. Als Alternative kommt die MRT zur Anwendung. Knochenszintigraphie oder CT-/MRT-Untersuchungen des Kopfes sind bei asymptomatischen Patienten nicht indiziert (EAU, 2009).

### **1.1.5 Prognostische Faktoren**

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Prognose des Nierenzellkarzinoms; sie können eingeteilt werden in anatomische Faktoren, repräsentiert durch die TNM-Klassifikation, histologische Faktoren, klinische und molekulare Faktoren (EAU, 2009).

Der wichtigste prognostische Faktor ist die TNM-Klassifikation der UICC und AJCC aus dem Jahr 2002 (Delahunt et al., 2007). Es wird unterschieden zwischen der klinischen TNM-Klassifikation, die auf klinischen Untersuchungen inklusive bildgebender Verfahren oder chirurgischer Exploration beruht und als cTNM bezeichnet wird, und der pathologischen TNM-Klassifikation, die durch histologische Untersuchung am Resektat oder bei Autopsie erfolgt und als pTNM bezeichnet wird (Böcker et al., 2004). Die Guidelines on Renal Cell Carcinoma (EAU, 2009) empfehlen ihre Verwendung zu klinischen und wissenschaftlichen Zwecken. Die TNM-Klassifikation für Nierenzellkarzinome ist in Tabelle 1 dargestellt, die daraus resultierende Einteilung in die Stadien I bis IV zeigt Tabelle 2.

Histologische Faktoren betreffen zum einen das histologische Grading; der Kerngrad nach Fuhrman ist ein unabhängiger prognostischer Parameter (EAU, 2009; Lang et al., 2005). Ein weiterer histologischer Faktor ist die Einteilung in Tumor-Subtypen entsprechend den Empfehlungen der AJCC und UICC (Störkel et al., 1997). Klarzellige Karzinome scheinen im Allgemeinen eine schlechtere Prognose zu haben als papilläre und chromophobe Karzinome. Dennoch scheint die prognostische Aussage des histologischen Subtyps generell begrenzt zu sein im Vergleich zu TNM-Klassifikation und Kerngrad (Cheville et al., 2003; Patard et al., 2005). Das Vorhandensein von Tumornekrosen hat sich bei klarzelligen und chromophoben Karzinomen als prognostisch ungünstiger Faktor herausgestellt (Delahunt et al., 2007).

Zur klinischen Einschätzung der Prognose ist die Erhebung der Kriterien des Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC-Kriterien) üblich (Molina und Motzer, 2008). Weitere klinische Faktoren, die prognostisch relevant sind, sind zum einen Aktivitätsindizes wie der Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS), das Vorhandensein von Symptomen, Anämie und von Kachexie sowie die Thrombozytenzahl im Blut (EAU, 2009).

Bezüglich molekularer Faktoren ist auf Untersuchungen zur Genexpression bei Nierentumoren hinzuweisen. Auf diesem Weg konnte die Gruppe der papillären Nierenzellkarzinome weiter unterteilt werden in eine Subgruppe prognostisch sehr günstiger und prognostisch ungünstiger Karzinome (Yang et al., 2005). Zhao et al. (2006) konnten ebenfalls anhand bestimmter Genexpressionsmuster von Nierentumoren eine Einteilung in prognostische Gruppen vornehmen. In diesem Rahmen wurden 259 Gene identifiziert, mit deren Hilfe die Prognose unabhängig von klinischen Faktoren vorhergesagt werden konnte. Auch wurde die Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Moleküle in Zusammenhang mit der Prognose der jeweiligen Tumoren untersucht, wobei sich für einige dieser Proteine eine prognostische Relevanz herausstellte. Dies betrifft u.a. das Protein Ki-67 sowie  $p27^{Kip1}$ ,  $p21^{waf1/cip1}$  und AgNORs (Delahunt et al., 2007).

Potentielle Biomarker mit diagnostischer und prognostischer Funktion für das Nierenzellkarzinom konnten in Untersuchungen identifiziert werden; hierzu zählen unter anderem das Serum-Ferritin (Singh et al., 2005), die Serumkonzentration von VEGF (Schips et al., 2007) und TATI (tumour-associated trypsin inhibitor; Lukkonen et al., 1999). Bisher existiert jedoch kein etablierter Tumormarker (Tunuguntla und Jorda, 2008).

**T - Primärtumor**

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor auf die Niere begrenzt, $\leq 7$ cm in größter Ausdehnung
T1a	Tumor $\leq 4$ cm in größter Ausdehnung
T1b	Tumor $> 4$ cm, aber $\leq 7$ cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor auf die Niere begrenzt, $> 7$ cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert direkt die Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor breitet sich makroskopisch in die Nierenvene(n) oder ihre segmentalen Äste aus, oder in die V.cava (einschließlich Wandbefall) unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor breitet sich makroskopisch aus in die V.cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor wächst über die Gerota-Faszie hinaus

**N – Regionäre Lymphknoten**

NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

**M - Fernmetastasen**

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabella 1: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms (UICC/AJCC, 2002).

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
	jedes T	jedes N	M1

*Tabelle 2: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC.*

*Die Einteilung erfolgt in Abhängigkeit vom vorliegenden TNM-Stadium (UICC/AJCC, 2002).*

### **1.1.6 Therapie und Nachsorge**

Die einzige kurative Option ist die operative Entfernung des Tumors. Bis zu einem Tumordurchmesser von 4 cm ist hier die nierenerhaltende Resektion Standard, bei größeren Tumoren erfolgt die radikale Nephrektomie. Die Entfernung der Nebenniere wird dabei nicht routinemäßig empfohlen und sollte den Fällen vorbehalten bleiben, bei denen Anhaltspunkte für einen Befall der Nebenniere gegeben sind. Die Wertigkeit der Lymphadenektomie ist umstritten.

Als palliative Maßnahme kann auch die Tumorembolisation zur Anwendung kommen. Bildgebungsgesteuerte perkutane Maßnahmen wie die Radiofrequenzablation oder Kryoablation sind ebenfalls Alternativen für Patienten, die aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes nicht operiert werden können; sie haben derzeit noch experimentellen Status.

Adjuvante Therapiestrategien bei nicht vorhandenen Filiae sind derzeit außerhalb von klinischen Studien nicht indiziert.

Bei gutem Allgemeinzustand und resektablen Metastasen kann die Metastasektomie vorteilhaft sein, der Stellenwert der palliativen Nephrektomie ist derzeit unklar. Bei Metastasen in Gehirn und Knochen kann die Radiotherapie zum Einsatz kommen.

Systemische Therapiestrategien umfassen Immuntherapie mittels Interleukin-2 sowie die Therapie mit Angiogenese-Inhibitoren, die sogenannte „Targeted Therapy“.

Hierunter fallen die Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib, Sunitinib, der monoklonale Antikörper Bevacizumab und die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus.

Die Nachsorge sollte sich an der Einordnung der Patienten in verschiedene Risikogruppen bezüglich des Auftretens von Rezidiven oder Metastasen orientieren. Hierzu existieren unterschiedliche Nomogramme, die sich der oben dargestellten prognostischen Faktoren bedienen. Zentraler Punkt der Nachsorge ist neben Anamneseerhebung und klinischer Untersuchung die Bildgebung, wobei Sonographie und konventionelle Röntgendarstellung des Thorax geeignet sind für die Gruppe mit niedrigem Risiko. Bei allen übrigen Patienten sind computertomographische Untersuchungen in bestimmten Zeitintervallen indiziert (EAU, 2009).

## 1.2 Frei zirkulierende DNA im Blutserum des Menschen

### **1.2.1 Allgemeine Aspekte**

Nachdem bereits im Jahre 1948 das Vorkommen von Nukleinsäuren im menschlichen Blutplasma beschrieben worden war (Mandel und Métais, 1948), dauerte es bis in die 1960er Jahre hinein, bis dies in der publizierten wissenschaftlichen Literatur mit der Entdeckung von DNA im Serum von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes erneut aufgegriffen wurde (Tan et al., 1966; Anker et al., 1999). Es folgten Berichte über die Entdeckung solcher frei zirkulierender DNA im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Glomerulonephritis, Pankreatitis etc. sowie auch bei gesunden Probanden (Anker et al., 1999).

Wegweisend war eine Arbeit von Leon et al. (1977), die mit Hilfe eines Radioimmunoassays signifikant mehr freie DNA im Blutserum von Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden fanden: die mittlere DNA-Konzentration bei den Krebspatienten war mehr als zehn Mal so hoch wie die der gesunden Probanden. Interessanterweise stellten sich Unterschiede der DNA-Mengen zum einen zwischen verschiedenen Krebserkrankungen dar, mit besonders hohen Werten z.B. bei Brust-, Kopf-Hals-, Lungentumoren und Lymphomen gegenüber verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen bei Tumoren des Verdauungs- und Urogenitalsystems. Metastasierte Erkrankungen zeigten ebenfalls signifikant mehr freie DNA als nicht metastasierte. Zum anderen zeigte sich beim Vergleich entsprechender Werte vor und nach Durchführung einer Radiotherapie, dass bei

erfolgreicher Therapie die DNA-Konzentration im Serum abfiel, wohingegen sie bei nicht anschlagender Bestrahlung konstant blieb oder sich weiter erhöhte. Unter anderem diese Entdeckungen führten zu der Frage, inwieweit sich freie Serum-DNA als Marker für eine maligne Erkrankung bzw. für das Therapiemonitoring einer solchen einsetzen lässt.

In der Folgezeit durchgeführte Untersuchungen bestätigten die dargestellten Erkenntnisse, wobei für Tumorerkrankungen im Vergleich zu Erkrankungen anderer Genese deutlich mehr zirkulierende DNA gefunden wurde, die jeweils detektierten DNA-Konzentrationen auch in klinisch ähnlichen Situationen z.T. jedoch deutlich variierten (Shapiro et al., 1983; Jahr et al., 2001; Wu et al., 2002). Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten deuten darauf hin, dass die Bestimmung freier DNA im Serum zu diagnostischen Zwecken und auch zur Prognoseabschätzung genutzt werden kann (Ellinger et al., 2008b-d; Ellinger et al., 2009a).

Bis heute ist die Frage nach der genauen Herkunft der freien DNA und dem Mechanismus ihrer Freisetzung ins Blut jedoch in weiten Teilen ungeklärt; generell wird angenommen, dass ein gewisser Teil der DNA aus (eventuell infolge Erkrankung aktivierten) Lymphozyten und anderen zirkulierenden kernhaltigen Zellen stammt, und ein weiterer Teil aus Tumorzellen hervorgeht (Anker et al., 1999). Als Mechanismen für letzteres werden Apoptose und Nekrose postuliert. Den sich ausbreitenden Tumor umgebende Zellen werden als weitere Quelle der freien DNA vermutet, wobei die im Gewebe bei zunehmendem Wachstum des Tumors entstehende Hypoxie als Apoptose- bzw. Nekrose-induzierender Faktor angesehen wird (Jahr et al., 2001). Außerdem wird eine aktive Freisetzung von DNA durch Zellen diskutiert; das Vorhandensein dieses Mechanismus konnte bereits an Zellkulturen sowie im Tierversuch nachgewiesen werden (Anker et al., 1999).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die freie DNA im Blut dem Einfluss von Desoxyribonukleasen ausgesetzt ist, durch welche sie in Fragmente unterschiedlicher Länge gespalten wird. Aus Apoptose hervorgegangene Fragmente besitzen eine Länge von ca. 180 Basenpaaren oder ein Mehrfaches davon, wohingegen die Nekrose um einiges längere Fragmente (über 10000 Basenpaare lang) hervorbringt (Jahr et al., 2001).

An dieser Stelle ist der Begriff der DNA-Integrität von Bedeutung; bei malignen Erkrankungen zeigt sich eine veränderte Integrität der freien DNA im Vergleich zu Kontrollprobanden. Wang et al. (2003) beispielsweise beschreiben bei Krebspatienten größere Mengen weniger fragmentierter DNA, sodass bei diesen im Vergleich zu gesunden Probanden in erhöhtem Maße große DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnten, was vermutlich auf Tumornekrosen zurückzuführen ist. Wu et al. (2002) hingegen beschreiben gegenteilige Beobachtungen, nämlich eine stärker fragmentierte DNA und infolgedessen vermehrt kleine DNA-Fragmente im Vergleich zu gesunden Probanden; dies deutet entsprechend eher auf apoptotischen Ursprung der DNA hin. In Abschnitt 4.1 wird hierauf detaillierter eingegangen.

### **1.2.2 Tumorspezifische Veränderungen der zirkulierenden DNA**

Die bei Tumorpatienten extrahierte frei zirkulierende DNA zeigt oftmals spezifische Veränderungen, die mit entsprechenden Veränderungen im Tumorgewebe selbst korrespondieren und die mit Hilfe der PCR detektiert werden können. Hierzu zählen vor allem Mutationen und Hypermethylierungen bestimmter Gene sowie Mikrosatellitenveränderungen (Anker et al., 1999; Jahr et al., 2001). Als Beispiele seien Mutationen der Onkogene *K-RAS* und *N-RAS* genannt, die sowohl im neoplastischen Gewebe als auch im Blutserum der erkrankten Patienten nachgewiesen werden können, wobei der Nachweis im Serum abhängig ist vom Vorliegen der entsprechenden Mutation im Tumorgewebe. Gleiches gilt für den Nachweis von Hypermethylierungen bestimmter Gene (Anker et al., 1999).

Hinführend auf die Zielformulierung zur vorliegenden Arbeit soll im Folgenden näher auf den Mechanismus und die Funktion dieser Hypermethylierungen eingegangen werden, um im daran anschließenden Kapitel den Erkenntnisstand hierzu bezogen auf das Nierenzellkarzinom darzustellen.

#### **1.2.2.1 Physiologische Aspekte der DNA-Methylierung**

Neben DNA-Mutationen, die als genetische Veränderungen mit einer Änderung der Nukleotidsequenz des genetischen Materials einhergehen, kann der Mechanismus der DNA-Methylierung, eine epigenetische Veränderung, in seiner abnormen Form zur Entstehung maligner Erkrankungen beitragen; die Rolle der epigenetischen Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese wurde dabei lange Zeit zu Gunsten der

von Mutationen unterschätzt und fand erst ab Mitte der 1990er Jahre zunehmende Beachtung (Esteller, 2002).

Der Begriff der DNA-Methylierung meint das Einfügen einer Methylgruppe in 5-Position an die Base Cytosin des DNA-Stranges, wodurch 5-Cytosin entsteht; katalysiert wird diese Reaktion durch Methyltransferasen, von denen bisher drei unterschiedliche identifiziert wurden: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Sie existieren nebeneinander, wobei bisher noch nicht abschließend geklärt ist, worin im Detail sich ihre Aufgaben voneinander unterscheiden (Robertson und Wolffe, 2000). Wichtig ist, dass Methylierungen nur an Cytosinresten erfolgen können, denen in 3'-Richtung der Sequenz Guanin folgt; die Abfolge von Cytosin und Guanin wird als CpG-Dinukleotid bezeichnet.

Generell ist das CpG-Dinukleotid im menschlichen Genom unterrepräsentiert, d.h. es kommen weit weniger solcher Dinukleotide vor, als statistisch zu erwarten wäre. In einigen Bereichen, vor allem in Promotoren von ca. 50% der menschlichen Gene, häufen sie sich jedoch; solche CpG-reichen Regionen werden als CpG-Inseln bezeichnet. Sie sind im Normalfall nicht methyliert. Von den CpG-Inseln im Promotorbereich zu unterscheiden sind CpG-Dinukleotide, die vor allem in langen repetitiven DNA-Sequenzen nicht-kodierender DNA-Abschnitte und auch parasitären DNA-Bereichen wie insertierten Sequenzen viralen Ursprungs vorkommen und die im Normalfall methyliert sind.

Die Funktion von CpG-Methylierungen scheint in erster Linie die Regulation von Transkriptionsprozessen innerhalb des Genoms zu sein. So verursacht die Methylierung von Promotorregionen das „Abschalten“ des abhängigen Gens. Entsprechend scheint auch die Methylierung in den nicht-kodierenden Bereichen sowie in parasitär in die DNA eingeschleusten Bereichen notwendig zu sein, um deren Transkription und somit potentiell schädliche Einflüsse auf den Organismus zu unterdrücken (Herman und Baylin, 2003).

Die Mechanismen, die ausgehend von der Methylierung zur Unterdrückung der Transkription führen, sind vielfältig; u.a. erkennt das Methyl-CpG binding protein 2 (MECP2) methylierte DNA-Bereiche und führt über die Interaktion mit weiteren regulatorischen Proteinen zur Repression der Transkription (Robertson und Wolffe,

2000). Dies geschieht u.a. auch über Änderungen in der Struktur des Chromatins durch Histonacetylasen und -deacetylasen (Herman und Baylin, 2003).

DNA-Methylierung scheint weiterhin vor allem im perizentromerischen Bereich von Chromosomen essentiell für den Erhalt der Stabilität und einer geordneten Replikation der DNA zu sein.

Es bleibt festzuhalten, dass in der gesunden Zelle sowohl die vorhandene Methylierung bestimmter DNA-Bereiche als auch die Abwesenheit solcher Methylierung in anderen Bereichen wichtig für den Erhalt der normalen Funktionen ist. So sind 80% CpG-Bereiche außerhalb von Genpromotoren stark methyliert, wohingegen CpG-Inseln im Promotorbereich meist unmethyliert sind. Eine Ausnahme stellen die komplett methylierten CpG-Inseln im Bereich der abgeschalteten Gene auf dem inaktivierten weiblichen X-Chromosom dar, eine weitere die ebenfalls methylierten inaktivierten Allele im Rahmen des genomischen Imprintings (Herman und Baylin, 2003).

### **1.2.2.2 Pathologische Veränderungen der DNA-Methylierung**

Bei maligne entarteten Zellen ergibt sich in Bezug auf die Methylierung verschiedener DNA-Bereiche ein anderes Bild als bei der gesunden Zelle: einerseits besteht bei der Krebszelle ein Verlust von Methylierungen in den normalerweise stark methylierten Bereichen nichtkodierender DNA, andererseits eine abnorme Zunahme von Methylierungen im Bereich der Genpromotoren, d.h. Hypermethylierung. Die Konsequenzen sind zum einen die potentiell schädliche Expression repetitiver und viral eingeschleuster Genabschnitte, zum anderen eine Abnahme der Stabilität vor allem im perizentromerischen Bereich der Chromosomen sowie in erster Linie die Inaktivierung bestimmter Gene, vor allem der Tumor-Suppressor-Gene (Herman und Baylin, 2003). Somit kann die Promotorhypermethylierung ähnliche Folgen haben wie Mutationen im kodierenden Bereich der DNA, wobei entsprechend Knudsons 2-Treffer-Hypothese beide Allele eines Tumor-Suppressor-Gens von einem inaktivierenden Ereignis (Mutation, chromosomale Deletion, Hypermethylierung) betroffen sein müssen, um zur Entartung der Zelle beizutragen. Laut Jones und Baylin (2002) tritt die Geninaktivierung durch Hypermethylierung mindestens genauso häufig auf wie die Inaktivierung durch Mutationen im Rahmen der Karzinogenese und ist generell ein frühes Ereignis bei der malignen Entartung einer Zelle. Es wird angenommen, dass sich die Hypermethylierung beginnend bei wenigen CpG-Gruppen stufenweise im Rahmen der Karzinogenese auf

weitere CpG-Dinukleotide eines Promotors ausbreitet, wodurch die Transkription des Gens zunehmend gedrosselt wird. Im Gegensatz zur Mutation liegt hier also weniger ein abruptes Ereignis als vielmehr ein schrittweise ablaufender Prozess vor (Jones und Baylin, 2002).

Inwieweit die Detektion methylierter DNA-Abschnitte zur Diagnose maligner Erkrankungen herangezogen werden kann, ist derzeitiger Gegenstand der Forschung, dem sich auch die vorliegende Arbeit widmet. Die Bemühungen richten sich darauf aus, für definierte Krebserkrankungen spezifische Profile hypermethylierter Promotoren zu erstellen, um aus deren Nachweis in körpereigenem Material Rückschlüsse auf eventuell vorhandene Krebserkrankungen schließen zu können. Solche Profile wurden bereits für eine Reihe von Krebserkrankungen erstellt, bei denen solch veränderte DNA in Serum, Sputum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von Hypermethylierungen weist auch Vorteile gegenüber der Detektion anderer Marker auf: die untersuchten DNA-Fragmente sind verhältnismäßig stabiler als RNA oder bestimmte Proteine; außerdem sind die Hypermethylierungen im Gegensatz beispielsweise zu Mutationen immer an derselben Stelle eines Gens, eben im Promotor, lokalisiert, was die Suche erleichtert (Esteller et al., 2001b; Herman und Baylin, 2003).

Die Tatsache, dass die Hypermethylierung prinzipiell reversibel ist, gibt Anlass zu Bemühungen, an dieser Stelle der Karzinogenese therapeutisch einzuwirken. Die Substanzen 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin sind dazu imstande, die Methyltransferasen zu inhibieren und zur Reexpression zuvor blockierter Gene zu führen; sie werden zusammen mit weiteren Substanzen derzeit auf ihren therapeutischen Wert hin untersucht (Jones und Baylin, 2002; Issa et al., 2004; Winqvist et al., 2006; Plimack et al., 2007).

An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch primär nicht maligne Erkrankungen durch Störungen der DNA-Methylierung bedingt sein können. Beispiele sind das ICF-Syndrom, ein Symptomenkomplex aus Immundefizienz, Zentromeren-Instabilität und fazialen Anomalien, sowie Rett-Syndrom und das Fragile-X-Syndrom (Robertson und Wolffe, 2000).

### 1.3 Promotorhypermethylierung beim Nierenzellkarzinom

Verschiedene Tumorsuppressorgene wurden in Bezug auf ihren Methylierungsstatus bei einigen malignen Erkrankungen untersucht; hier ist zu unterscheiden zwischen Untersuchungen am Tumorgewebe selbst und Untersuchungen an anderem vom Patienten gewonnenen Material wie Serum/Plasma, Sputum etc. Speziell für das Nierenzellkarzinom gibt Tabelle 3 eine Übersicht über den Stand der wissenschaftlichen Untersuchungen zu den im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Genorten, das jeweils untersuchte Material sowie die Rate detektierter Methylierungen in Bezug auf die Fallzahl.

Genort	Publikation (Autor, Jahr)	Material	positiv		
			Fallzahl	(%)	Methode
<i>APC</i>	Battagli et al., 2003	Tumorgewebe	50	18	MSP
	Battagli et al., 2003	Urinsediment	50	16	MSP
	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	14	MSP
	Esteller et al., 2001b	Tumorgewebe	12	8	MSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	29	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	38	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	6	qMSP
<i>GSTP1</i>	Chung et al., 2001	Zelllinien	5	40	MSP
	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	12	MSP
	Esteller et al., 1998	Tumorgewebe	35	20	MSP
	Esteller et al., 1998	Zelllinien	11	27	MSP
	Esteller et al., 2001b	Tumorgewebe	35	20	MSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	12	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	15	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	6	qMSP
<i>p14</i>	Battagli et al., 2003	Tumorgewebe	50	18	MSP
	Battagli et al., 2003	Urinsediment	50	18	MSP
	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	17	MSP

	Esteller et al., 2001b	Tumorgewebe	38	13	MSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	24	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	31	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	6	qMSP
<i>p16</i>	Arai et al., 2006	Tumorgewebe	60	73	MSP
	Battagli et al., 2003	Tumorgewebe	50	10	MSP
	Battagli et al., 2003	Urinsediment	50	8	MSP
	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	10	MSP
	Esteller et al., 2001b	Tumorgewebe	25	23	MSP
	Herman et al., 1995	Zellinien	26	23	MSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	35	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	35	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	22	qMSP
	Kawakami et al., 2003	Zellinien	14	14	Bisulf. Seq.
	Morris et al., 2003	Tumorgewebe	17	0	MSP
<i>RAR-β</i>	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	12	MSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	53	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	31	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	6	qMSP
	Morris et al., 2003	Tumorgewebe	30	0	MSP
<i>RASSF1A</i>	Battagli et al., 2003	Tumorgewebe	50	52	MSP
	Battagli et al., 2003	Urinsediment	50	50	MSP
	Dreijerink et al., 2001	Tumorgewebe	43	91	MSP
	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	45	MSP
	Gonzalga et al., 2004	Tumorgewebe	38	74	qMSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	88	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	65	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	11	qMSP
	Morrissey et al., 2001	Tumorgewebe	211	28	MSP
	Yoon et al., 2001	Tumorgewebe	32	56	MSP

<i>TIMP3</i>	Bachman et al., 1999	Zelllinien	12	33	MSP
	Bachman et al., 1999	Tumorgewebe	36	78	MSP
	Battagli et al., 2003	Tumorgewebe	50	60	MSP
	Battagli et al., 2003	Urinsediment	50	52	MSP
	Dulaimi et al., 2004	Tumorgewebe	100	58	MSP
	Esteller et al., 2001b	Tumorgewebe	36	78	MSP
	Hoque et al., 2004	Tumorgewebe	17	71	qMSP
	Hoque et al., 2004	Urinsediment	26	46	qMSP
	Hoque et al., 2004	Serum	18	17	qMSP

*Tabelle 3: Methylierungsstatus der untersuchten Gene beim Nierenzellkarzinom.*

*Die Tabelle gibt eine Übersicht über frühere Arbeiten zum Methylierungsstatus der untersuchten Gene beim NCC. Aufgeführt ist jeweils das Material, das auf Methylierungen in den jeweiligen Genen untersucht wurde, die Gesamtzahl der untersuchten Fälle, der Anteil der methylierungspositiven Fälle (in %) sowie die verwendete Methode zur Detektion der Methylierungen.*

Bei den im Zuge dieser Arbeiten untersuchten gesunden Probanden waren die betrachteten Gene jeweils gar nicht oder nur wenig methyliert.

Weitere auf Hypermethylierung häufig untersuchte Genorte sind *VHL* (Battagli et al., 2003; Dulaimi et al., 2004) und *MGMT* (Dulaimi et al., 2004; Hoque et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit werden außerdem zwei Genorte betrachtet, die bezüglich des Nierenzellkarzinoms bisher nicht auf Hypermethylierung untersucht wurden: *PTGS2* und *TIG1*. Von beiden ist bekannt, dass sie bei unterschiedlichen Tumorarten hypermethyliert sind und somit vermutlich in deren Karzinogenese involviert sind (siehe 4.2.5 und 4.2.8).

Abgesehen von der Frage nach der diagnostischen Wertigkeit der hypermethylierten Gene wird derzeit rege untersucht, inwieweit diese auch zu prognostischen Aussagen über die jeweiligen Tumorerkrankungen herangezogen werden können. Für Gliome beispielsweise ist bekannt, dass Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors mit einem besseren Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika und einer konsekutiv besseren Prognose einhergeht (Esteller et al., 2000b). Ähnliches gilt für B-Zell-Lymphome (Ohno et al., 2006). Für das Blasenkarzinom beschrieben Ellinger et al. (2008a) eine ungünstige Prognose im Zusammenhang mit im Serum detektierbaren Promotorhypermethylierungen. Derartige Arbeiten sind für das Nierenzellkarzinom

bisher rar: Christoph et al. (2006) beschrieben eine prognostische Wertigkeit von Promotor-Methylierungen der Gene *APAF-1* und *DAPK-1*, Brauch et al. (2000) für Methylierungen des *VHL*-Promotors. Autoptische Untersuchungen ergaben außerdem eine Korrelation zwischen dem Risikofaktor Adipositas sowie dem Lebensalter und dem Grad der Promotormethylierung des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* (Peters et al., 2007).

#### 1.4 Zielsetzung

Noch immer wird der weitaus größte Teil von Nierentumoren wegen fehlender Symptomatik inzidentell diagnostiziert, also zufällig im Rahmen bildgebender Untersuchungen. Im Hinblick auf den Umfang der notwendigen therapeutischen Maßnahmen und die Prognose ist verständlicherweise eine frühestmögliche Diagnose wünschenswert. Dabei existiert derzeit kein für das Nierenzellkarzinom etablierter Tumormarker.

Im Rahmen dieser Arbeit soll im Blut zirkulierende zellfreie DNA auf ihren Nutzen in der Diagnostik des Nierenzellkarzinoms hin untersucht werden. Die Untersuchung soll an den Blutseren von 35 Patienten mit histologisch gesichertem Nierenzellkarzinom sowie von 54 gesunden Kontrollpatienten erfolgen. Auf der Grundlage der oben dargestellten Erkenntnisse bezüglich der freien DNA sollen hierbei zwei Punkte verfolgt werden:

- Die Konzentration der frei zirkulierenden DNA soll mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-PCR bestimmt werden. Dabei sollen bei jedem Patienten zum einen kleine DNA-Fragmente detektiert werden, zum anderen große Fragmente. Aus dem Verhältnis der ermittelten Konzentration beider Fragmente soll jeweils auf die Integrität der freien DNA und deren mögliche Herkunft geschlossen werden.
- Die zirkulierende DNA soll auf Hypermethylierung in den Promotoren verschiedener Gene untersucht werden. Hierzu erfolgt zunächst die Behandlung mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen und im Anschluss die Bestimmung des Methylierungsgrades der DNA ebenfalls per quantitativer Real-Time-PCR. Insgesamt sollen neun Gene untersucht werden: *APC*, *GSTP1*, *p14*, *p16*, *PTGS2*, *RAR-β*, *RASSF1A*, *TIG1*, *TIMP3*.

Die ermittelten Daten zu Konzentration, Integrität und Methylierung der DNA sollen hinsichtlich ihrer diagnostischen Eignung mit Hilfe von Receiver Operator Curve

Analysen untersucht werden. Weiterhin soll mit Hilfe statistischer Tests überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern und erhobenen klinisch-pathologischen Parametern besteht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

8-Kanal-Pipette (1-10 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Einkanal-Pipetten Research® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Absorptionsspektrometer Nanodrop ND1000®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Absauggerät miniport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg i. Br., Deutschland
Analysenwaage BP 2100 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gel Dokumentationsanlage mit Kamera Classic Uno	Intas, Göttingen, Deutschland
Horizontalelektrophoresekammer Sub-cell GT Basic	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Mikrozentrifuge Sigma 1-15	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac 100	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Thermocycler UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

### 2.1.2 Labormaterialien

Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1,5 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
S-Monovette Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermo-Fast <sup>®</sup> 384-Well-PCR Platten	ABGene, Epsom, UK
Latexhandschuhe DermaClean	Ansell LTD, Bangkok, Thailand
Monovette EDTA 9ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Monovette Gel 9ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und in Analysequalität erworben. Ihre Lagerung erfolgt nach Herstellervorschriften.

Deionisiertes Wasser aus Reinstwassersystemanlage Milli-Q biocel	Millipore, Molsheim, Frankreich
Dekontaminationsmittel RNase AWAY <sup>®</sup>	Molecular BioProducts, San Diego, USA
DEPC-Wasser	Ambicon, Austin, Texas, USA
DNA Längenstandard Track It 100 bp DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethylendinitrilotetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Fluka, Buchs, Schweiz
Phosphatpuffer PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PCR-Wasser	Sigma Chemical CO, Irvine, UK
Ultrapure 10xTBE-Buffer	Invitrogen, Paisley, England

#### 2.1.4 Kits

ChargeSwitch® gDNA 1ml Serum Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
QIAamp Ultra Sens Virus	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix	Invitrogen, Carlsbad, USA

#### 2.1.5 Enzyme

CpG Methyltransferase (M.Sssl)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Bsh1236I (FnuDII)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
HpaII	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Hin6I (HinP1I)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

#### 2.1.6 Primer

Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 4 dargestellt; sie wurden im Reinheitsgrad „Desalted“ von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, bezogen. Von dem im gefriergetrockneten Zustand gelieferten Material wurde eine Stocklösung der Konzentration 100 pmol/µl hergestellt, indem es in der jeweils entsprechenden Menge eines 1-fach konzentrierten Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) gelöst wurde. Die Stocklösung wurde bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Die Herstellung der

gebrauchsfertigen Lösung (Konzentration 10 pmol Primer/ $\mu$ l) erfolgte jeweils direkt vor Gebrauch, indem die entsprechende Menge der Stocklösung im Verhältnis 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt wurde.

Die Ableitung der Primersequenzen erfolgte aus den Ensembl Human Gene View-Einträgen und mit Hilfe des Programms Primer 3 (Rozen und Skaletsky, 2000).

**Angabe jeweils in Richtung 5' → 3'**

<b><i>ACTB-106</i></b>	<b>Forward</b>	TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG
	<b>Reverse</b>	GGC AGC TCG TAG CTC TTC TC
<b><i>ACTB-384</i></b>	<b>Forward</b>	GCT ATC CCT GTA CGC CTC TG
	<b>Reverse</b>	AGG AAG GAA GGC TGG AAG AG
<b><i>APC</i></b>	<b>Forward</b>	GGA GAG AGA AGC AGC TGT GTA AT
	<b>Reverse</b>	CAG CCA CAT GTC GGT CAC
<b><i>GSTP1</i></b>	<b>Forward</b>	GGG ACC CTC CAG AAG AGC
	<b>Reverse</b>	ACT CAC TGG TGG CGA AGA CT
<b><i>p14</i></b>	<b>Forward</b>	AGT TAA GGG GGC AGG AGT G
	<b>Reverse</b>	GGA GGG TCA CCA AGA ACC TG
<b><i>p16</i></b>	<b>Forward</b>	AGC ACC GGA GGA AGA AAG AG
	<b>Reverse</b>	CTG CCT GCT CTA CCC CTC TC
<b><i>PTGS2</i></b>	<b>Forward</b>	GGA GAG GAA GCC AAG TGT CC
	<b>Reverse</b>	GGT TTC CGC CAG ATG TCT TT
<b><i>RAR-<math>\beta</math></i></b>	<b>Forward</b>	ATG CGA GCT GTT TGA GGA CT
	<b>Reverse</b>	AAT GCG TTC CGG ATC CTA C

<b>RASSF1A</b>	<b>Forward</b>	GCT TGC TAG CGC CCA AAG
	<b>Reverse</b>	CAG CTC CCG CAG CTC AAT
<hr/>		
<b>TIG1</b>	<b>Forward</b>	ACG CGG TAC GAG GTA GCA C
	<b>Reverse</b>	CGG GCT TAG TGC TAG GAT GC
<hr/>		
<b>TIMP3</b>	<b>Forward</b>	GCA CGG CAA CTT TGG AGA G
	<b>Reverse</b>	GAG CCA AGG GGT CAT TGC

*Tabelle 4: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.*

### **2.1.7 Software**

MS Office 2000	Microsoft, Seattle, USA
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
SDS Software Version 2.2	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
SPSS Version 11.5	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

### **2.1.8 Blutserum-Probenmaterial**

Die Gewinnung der Proben erfolgte unter Berücksichtigung der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes aus dem Jahr 2000 sowie der geltenden gesetzlichen Vorgaben. Zuvor erteilte die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn die Genehmigung zur Durchführung der Untersuchung. Die in die Untersuchung eingeschleusten Patienten und gesunden Probanden gaben nach Aufklärung über Sinn und Zweck der Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

Die verwendeten Serumproben stammen von zwei Untersuchungskollektiven: zum einen 35 Patienten, die an einem histologisch gesicherten Nierenzellkarzinom leiden, zum anderen 54 gesunde Probanden, die als Kontrollkollektiv fungieren und aus Mitarbeitern des Universitätsklinikum Bonn bestehen. Die Nierentumorpatienten unterzogen sich im Zeitraum zwischen November 2006 und September 2007 einer operativen Therapie in der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikum

Bonn; 15 der insgesamt 35 Patienten unterzogen sich einer radikalen Nephrektomie, die übrigen 20 Patienten erhielten eine Nierenteilresektion.

Die verschiedenen histologischen Subtypen waren wie folgt vertreten: 29 Patienten mit hellzelligem, 4 Patienten mit papillärem sowie 2 Patienten mit chromophobem Nierenzellkarzinom. Tabelle 5 gibt einen Überblick Patienten, Probanden und ausgewählte klinisch-pathologische Parameter.

Die Blutabnahme erfolgte präoperativ nach stationärer Aufnahme des Patienten zur operativen Therapie mit Hilfe von Serum S-Monovetten mit Gel und Gerinnungsaktivator (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Das Blut wurde nach Abnahme 60 Minuten lang gekühlt gelagert; daran anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1800g über einen Zeitraum von 10 Minuten. Das dann vom Blutkuchen getrennte Blutserum wurde in Aufbewahrungsröhrchen überführt und in Aliquots zu je 1,5 ml bei -80°C gelagert.

Es wurden außerdem klinische Daten der Tumorpatienten sowie pathologische Merkmale der Tumoren erfasst: das Geschlecht, das Alter, die Symptomatik, das Tumorstadium nach TNM-System, der Differenzierungsgrad (Grading), eine eventuelle Tumordinfiltration der Nebenniere, sowie ein Tumorthrombus in der V.cava inferior.

	<b>RCC</b>	<b>Gesunde Kontrollen</b>
	<b>n=35 (%)</b>	<b>n=54 (%)</b>
<b>Alter (Jahre)</b>		
Median	66	28,5
Mittelwert	64,8	30,9
Spannweite	31-80	18-56
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	28 (80,0)	37 (68,5)
Weiblich	7 (20,0)	17 (31,5)
<b>Histologie</b>		
hellzellig	29 (82,6)	
papillär	4 (11,4)	
chromophob	2 (5,7)	
<b>T-Stadium</b>		
pT1	22 (62,9)	
pT2	1 (2,9)	
pT3	11 (31,4)	
k.A., weil Lokalrezidiv	1 (2,9)	
<b>Nodalstatus</b>		
NX	29 (82,9)	
N0	4 (11,4)	
N1	1 (2,9)	
N2	1 (2,9)	
<b>Metastasen</b>		
MX	32 (91,4)	
M1	3 (8,6)	
<b>NN-Infiltration</b>		
NN betroffen	2 (5,7)	
NN tumorfrei	33 (94,3)	
<b>Tumorthrombus</b>		
vorhanden	5 (14,3)	
nicht vorhanden	30 (85,7)	

*Tabelle 5: Klinisch-pathologische Daten.*

*Dargestellt sind ausgewählte klinisch-pathologische Daten der in die Untersuchung einbezogenen Patienten. Die Zahlen in Klammern sind jeweils Prozentangaben, bezogen auf die Gesamtzahl der Tumorpatienten bzw. gesunden Probanden.*

## 2.2 Methoden

### **2.2.1 Aufreinigung des Blutserums und DNA-Isolation**

Die Isolation der freien Serum-DNA erfolgte mit dem ChargeSwitch<sup>®</sup> gDNA 1ml Serum Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Funktioneller Bestandteil dieses Kits sind magnetische „Perlen“ von weniger als 1µm Größe, die je nach dem pH-Wert des umgebenden Mediums verschiedene Bindungseigenschaften für Nukleinsäuren besitzen. So ist die Oberfläche der Perlen bei niedrigem Umgebungs-pH positiv geladen und kann somit Nukleinsäuren über deren negative Ladungen binden. Bei Anhebung des pH-Wertes werden die Nukleinsäuren wiederum freigesetzt. Ihre magnetische Eigenschaft bietet den Vorteil, dass die Perlen mit anhaftender DNA leicht durch einen von außen aufgesetzten Magneten an einem Punkt des Reaktionsgefäßes konzentriert werden können, während die jeweilige Reaktionslösung ausgewechselt wird (Herstellerangaben zum Kit). Weitere Bestandteile des Kits sind verschiedene Puffer zur Variation des pH-Wertes je nach Arbeitsschritt (Lysispuffer, Aufreinigungspuffer, Waschpuffer, Elutionspuffer) sowie die Proteinase K zur Verdauung von verunreinigenden Proteinen und störenden Enzymen wie DNasen.

Zur DNA-Isolation wurde zunächst 1ml des aufgetauten Blutserums mit Lysispuffer und Proteinase K versetzt und 20 Minuten lang inkubiert. Es folgte die Zugabe der Magnetperlen und des Aufreinigungspuffers, der den pH-Wert auf unter 6,0 senkt und so die DNA-Bindung an die Magnetperlen ermöglicht. Es schloss sich die Beseitigung von Kontaminationen durch Wegnahme des Aufreinigungs- und zweimalige Zugabe und Wegnahme des Waschpuffers an; hiernach folgte die Freisetzung der DNA von den Perlen durch Zugabe des Elutionspuffers, der den pH-Wert auf 8,5 anhebt. Elutionspuffer und gelöste DNA wurden mit Hilfe eines Magneten von den Perlen getrennt, in ein separates Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

### **2.2.2 Herstellung der Kontrollproben**

Die Kontrollproben wurden aus der Blutprobe eines gesunden Freiwilligen hergestellt; ihm wurden 9 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen entnommen, die im Anschluss für 20 Minuten bei 1900g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert wurden. Die Leukozytenfraktion, der sog. „Buffy Coat“, wurde entnommen und die genomische DNA hieraus mit Hilfe des PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) isoliert. Die Leukozytenfraktion wurde dazu mit PBS, Lyse-/Bindepuffer, RNase A und Proteinase K versetzt und für 10 Minuten bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von Ethanol wurde die Lösung auf Aufreinigungssäulen aufgetragen und zentrifugiert. Nach der Entfernung kontaminierender Komponenten durch Zugabe zweier Waschpuffer wurde die an das Säulenmaterial gebundene DNA durch Zugabe eines Elutionspuffers von der Säule gelöst. Die Konzentration der gelösten DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm am Nanodrop bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Aus der so hergestellten Lösung erfolgte einerseits die Herstellung einer nicht methylierten DNA-Probe als Negativkontrolle für die methylierungssensitiven PCRs, andererseits einer universell an CpG-Sequenzen methylierten DNA (SssI-DNA) als Positivkontrolle.

Die Negativkontrolle wurde unter Verwendung des GenomiPhi Amplification Kit (Amersham Bioscience, Freiberg, Deutschland) produziert; dieses enthält unspezifische Primer und DNA-Polymerasen, jedoch weder Methyltransferasen noch Methylendonatoren. Nach der sich anschließenden PCR liegt somit komplett unmethylierte DNA vor.

Die Positivkontrolle wurde mit Hilfe des Enzyms CpG Methyltransferase (M.SssI) und des Methylendonators S-Adenosyl-Methionin (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA) gewonnen. Beide Substanzen wurden zusammen mit dem mitgelieferten Puffer und PCR-Wasser für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Methyltransferase erfolgte anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 20 Minuten.

Positiv- und Negativkontrolle wurden bei -20°C gelagert.

### **2.2.3 Restriktionsenzymbehandlung**

Die Restriktionsenzymbehandlung der Serumproben im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen stellt den entscheidenden Schritt zur Differenzierung zwischen methylierten und nicht methylierten DNA-Fragmenten dar.

Für die Entdeckung der mittlerweile aus den Biowissenschaften kaum mehr wegzudenkenden Restriktionsenzyme wurden die Wissenschaftler Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Smith 1978 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Restriktionsendonukleasen zerschneiden doppelsträngige DNA an jeweils spezifischen Basensequenzen; die Enzyme erkennen also einerseits ganz bestimmte für jedes Enzym spezifische Sequenzen innerhalb der DNA, und zerlegen diese daraufhin andererseits in Fragmente, die mit einer spezifischen Basenfolge enden (Koecke et al., 2000; Roberts 2005). Bei den in dieser Studie eingesetzten Restriktionsenzymen handelt es sich um methylierungssensitive Enzyme; sie zerlegen die DNA nur an Stellen, an denen vorhandene Cytosinreste nicht methyliert sind. Es handelt sich um die Endonukleasen Bsh1236I, Hin6I und HpaII; sie schneiden an den Sequenzen (Richtung 5'→3') CGCG (Bsh 1236I), GCGC (Hin6I) und CCGG (HpaII), sofern keine CpG-Methylierungen vorhanden sind.

Bei der Restriktionsenzymbehandlung der Serumproben wurde folgendermaßen vorgegangen: Dem aus einer Probe gewonnenen DNA-Eluat wurden 20µl entnommen, die in ein Reaktionsgefäß überführt und mit jeweils 2µl entsprechend 20 Einheiten der drei Restriktionsenzyme versetzt wurden. Zugegeben wurden außerdem 4,5µl 10x Tango-Puffer und 14,5µl Wasser. Die Reaktionslösung wurde durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig durchmischt und anschließend für 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden jeweils 0,5µl entsprechend 10 Einheiten der drei Enzyme sowie Tango-Puffer und Wasser hinzugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 50µl resultierte. Diese erneute Zugabe von Enzym sollte zur möglichst vollständigen Zerlegung der nicht-methylierten DNA-Sequenzen beitragen. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 12 Stunden bei 37°C inkubiert; im Anschluss erfolgte die Inaktivierung der Enzyme durch Erhitzen des Gemisches auf 65°C über 20 Minuten. Die Proben wurden anschließend zu Aliquots à 3,3µl getrennt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Mit den Proben der Positiv- und Negativkontrollen wurde entsprechend verfahren.

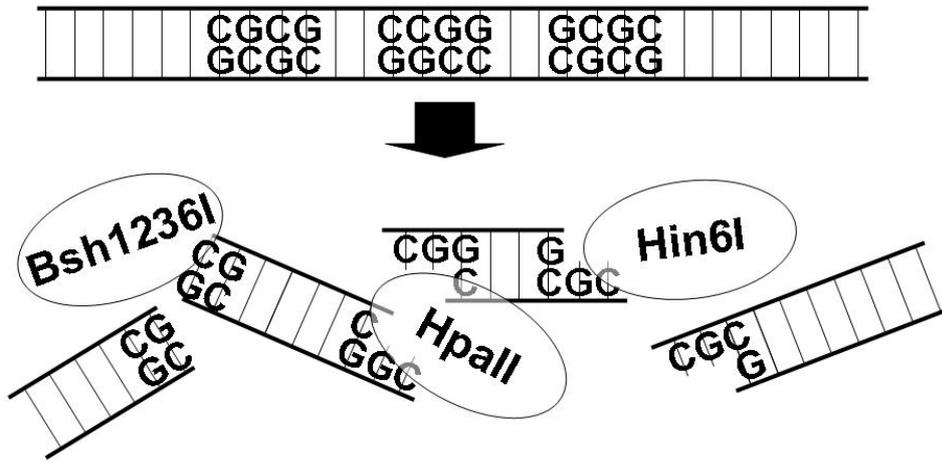


Abbildung 1: Funktionsweise der Restriktionsenzyme.

Es liegen keine CpG-Insel-Methylierungen vor, die methylierungssensitiven Enzyme spalten den DNA-Strang auf.

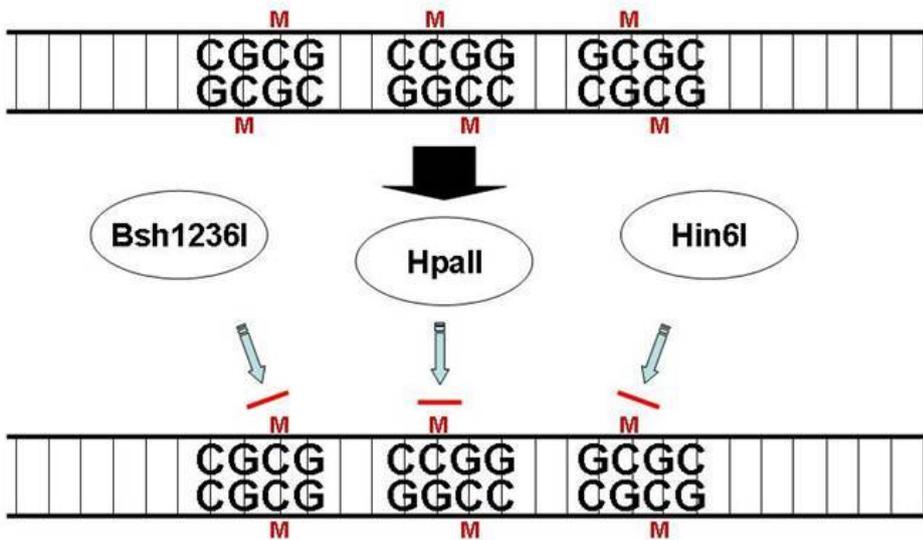


Abbildung 2: Hemmung der Restriktionsenzyme durch Methylierungen.

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind methylierungssensitiv, d.h. CpG-Insel-Methylierungen verhindern die enzymatische Aufspaltung des DNA-Stranges.

### 2.2.4 Primerdesign

Die Entwicklung von Primersequenzen für die zu untersuchenden Gene erfolgte mit Hilfe des Programms Primer 3 (s. Tabelle 4). Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit hatten die eingesetzten Primer unterschiedliche Funktionen:

- Zur Quantifizierung der zirkulierenden zellfreien DNA dient *ACTB-106*. Seine Produktgröße beträgt 106 Basenpaare, mit seiner Hilfe wurden die kleinen DNA-Fragmente bestimmt. Die Bestimmung der großen DNA-Fragmente erfolgte innerhalb desselben Gens mit Hilfe des Primerpaares *ACTB-384*; die Produktgröße beträgt hier 384 Basenpaare. *ACTB-106* ist Teil des großen Fragments *ACTB-384* (Abbildung 3). Aus dem Verhältnis der bei der qPCR ermittelten Produktkonzentrationen von *ACTB-384* und *ACTB-106* kann auf die DNA-Integrität geschlossen werden.
- Zur Detektion der CpG-Hypermethylierung wurden für die zu untersuchenden Gene Primer entwickelt, deren Produkte mindestens eine Erkennungssequenz der eingesetzten Restriktionsendonukleasen enthalten.

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Primerbindungsstellen, Erkennungsssequenzen und Schnittstellen der Restriktionsenzyme und die flankierenden Promotorsequenzen der untersuchten Gene.

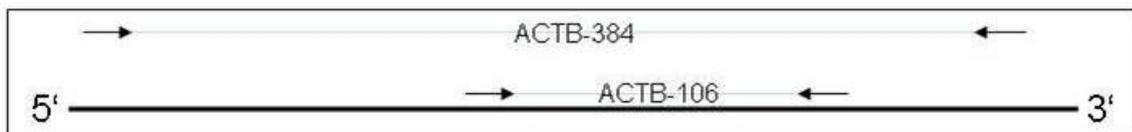


Abbildung 3: Lage von Groß- und Kleinfragment im ACTB-Gen.

Dargestellt sind die Lokalisation des kleinen (*ACTB-106*) und des großen DNA-Fragments (*ACTB-384*) in Beziehung zueinander. Beide gehen aus demselben Gen (*ACTB*) hervor. *ACTB-106* ist ein Teil des großen Fragments *ACTB-384*.





### 2.2.5 *Quantitative Polymerase-Kettenreaktion*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Mitte der 1980er Jahre von Kary Mullis u.M. entwickeltes Verfahren zur Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Für die Entwicklung der PCR erhielt Mullis im Jahre 1993 den Nobelpreis für Chemie (Kubista et al., 2006).

Zur Durchführung der PCR werden Primerpaare benötigt, d.h. Oligonukleotidsequenzen, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren; sie lagern sich komplementär zur entsprechenden Sequenz des zu kopierenden Stranges an und bilden den Startpunkt für das eingesetzte DNA-synthetisierende Enzym, die hitzestabile DNA-Polymerase. Weiterhin werden als Bausteine für die DNA-Synthese Desoxyribonukleotidtriphosphate benötigt.

Die Reaktion wird über zyklische Veränderungen der Reaktionstemperatur gesteuert. Zunächst erfolgt die Erhitzung auf 95°C zur Denaturierung des DNA-Doppelstranges, d.h. zur Aufschmelzung in die beiden Einzelstränge. Hiernach wird die Temperatur abgesenkt, um den Primern die Möglichkeit zu geben, komplementär an die entsprechenden Sequenzen der DNA-Mutterstränge zu binden (Annealing), und schließlich erfolgt die Einstellung nah am Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, um eine möglichst suffiziente Elongation des neuen DNA-Stranges zu gewährleisten. Die zum Annealing notwendige Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und sollte knapp darunter liegen, um eine stabile Bindung an die komplementären Sequenzen zu ermöglichen, jedoch unbeabsichtigte weniger stabile Bindungen an ähnliche Sequenzen zu verhindern.

Ist ein solcher Zyklus abgeschlossen, schließt sich der folgende direkt an mit dem gleichen Ablauf aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Im Optimalfall wird die im Reaktionsansatz vorhandene DNA-Menge binnen eines Zyklus jeweils verdoppelt, sodass sich die Menge amplifizierter DNA ( $D_1$ ) in Abhängigkeit von der ursprünglichen Menge ( $D_0$ ) und der Zahl durchlaufender Zyklen ( $Z$ ) ergibt als  $D_1 = D_0 \times 2^Z$ .

Die quantitative Real-Time PCR stellt eine von Higuchi et al. (1993) erarbeitete Weiterentwicklung der ursprünglichen PCR dar. Hierbei wird ein Farbstoff eingesetzt, der an doppelsträngige DNA bindet und in Abhängigkeit von dieser Bindung ein Fluoreszenzsignal aussendet, das detektiert wird. Auf diese Weise kann die vorliegende

DNA quantifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Farbstoff SYBR® GreenER™ verwendet.

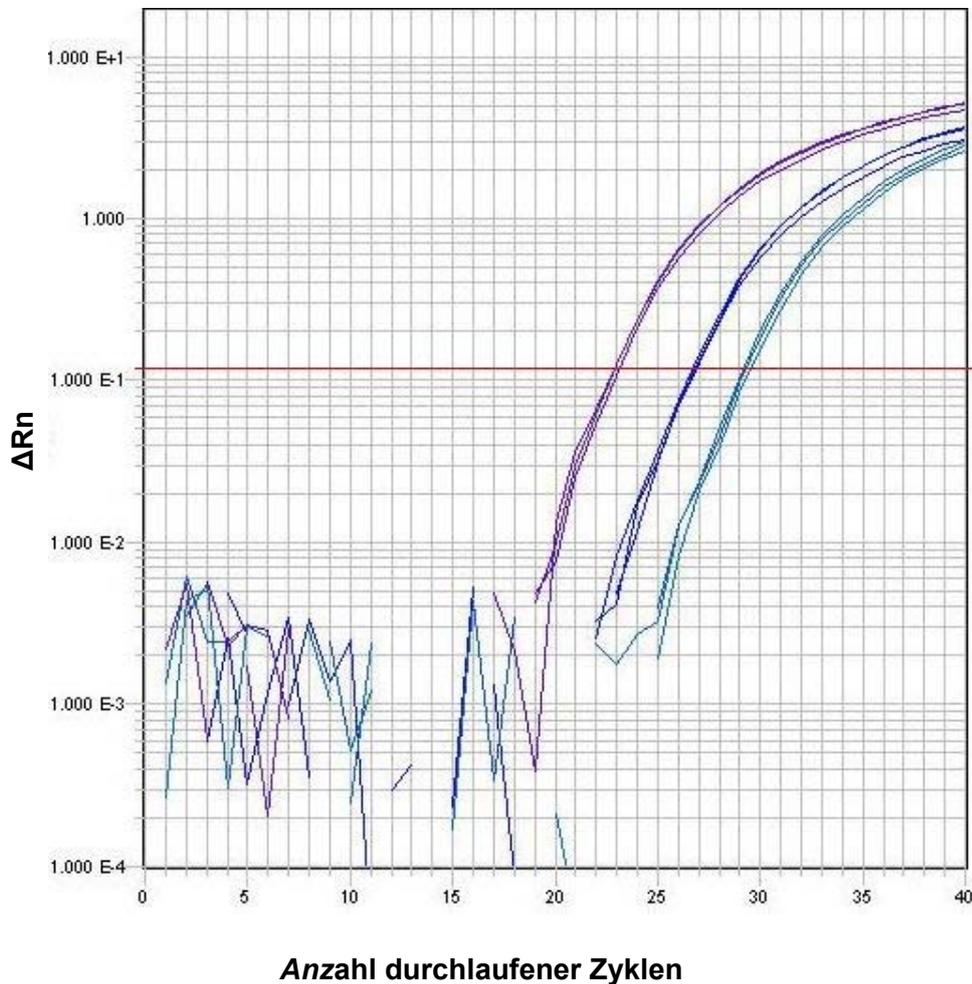


Abbildung 5: PCR.

Darstellung der PCR dreier unterschiedlicher Proben, jeweils mit Dreifachbestimmung; die rote Linie stellt den sog. Threshold dar, der das Signal von der Hintergrundfluoreszenz abgrenzt. Auf der Abszisse ist die Anzahl durchlaufener PCR-Zyklen aufgeführt, die Ordinate gibt die Höhe des detektierten Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) in logarithmischer Skalierung wieder.

Die Höhe des Fluoreszenzsignals korreliert jeweils mit der vorhandenen DNA-Menge; es wird nach jedem Zyklus der Reaktion registriert und in seinem Verlauf graphisch dargestellt. Der typische Ablauf ist in Abbildung 5 dargestellt: Während der ersten Zyklen zu Beginn der PCR ist das Signal noch schwach und kann nicht gegenüber dem unspezifischen „Hintergrund“ abgegrenzt werden; mit steigender Menge des Produkts überschreitet es jedoch einen gewissen Schwellenwert der Fluoreszenz und setzt sich

so von den störenden Hintergrundsignalen ab. Als CT-Wert (Cycle Threshold) wird die Zahl der Zyklen bezeichnet, die benötigt werden, bis das Signal erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Anfangs nimmt es exponentiell zu und repräsentiert damit den gleichzeitig exponentiell stattfindenden Zuwachs an DNA-Menge; später verlangsamt sich die Zunahme jedoch und sistiert zum Schluss, was auf den Verbrauch einer oder mehrerer Komponenten der Reaktion (Primer, Nukleotide etc.) zurückzuführen ist.

Eine Komplikation der PCR stellt die Bildung sogenannter Primer-Dimere dar, indem sich komplementäre Primerstücke aneinanderlagern. Die Dimere werden ebenfalls vom Fluoreszenzfarbstoff als doppelsträngige DNA erkannt und es resultiert somit ein Signal, das das Vorhandensein eines PCR-Produktes vortäuscht. Um diesen Effekt zu erkennen, erfolgt nach abgeschlossener PCR, d.h. nach einer definierten Anzahl von Zyklen, die Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkts. Hierzu wird die Temperatur im Reaktionsgemisch kontinuierlich erhöht und gleichzeitig das entstehende Fluoreszenzsignal registriert. Dieses nimmt mit zunehmender Temperatur aus physikalischen Gründen langsam kontinuierlich ab, bis der Punkt erreicht ist, an dem der DNA-Doppelstrang des Produkts in seine beiden Einzelstränge zerfällt. Die zugehörige Temperatur wird als Schmelztemperatur bezeichnet; sie ist spezifisch für einen bestimmten DNA-Strang in Abhängigkeit von dessen Länge und Basenzusammensetzung. Bei Überschreitung der Schmelztemperatur nimmt das Fluoreszenzsignal entsprechend der Freisetzung des Farbstoffes abrupt ab. Die Schmelztemperatur kann somit durch den Verlauf des Signals bestimmt werden. Abbildung 6 zeigt eine typische derartige Schmelzkurve. Primerdimere haben typischerweise aufgrund ihrer geringeren Länge als das gewünschte PCR-Produkt einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt als dieses und können damit erkannt werden.

Die Quantifizierung der in einer Probe vorhandenen DNA ist mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe möglich; eine Probe definierter DNA-Konzentration wird hierfür in festgelegten Schritten verdünnt und auf jeder Verdünnungsstufe erfolgt die Amplifikation per Real-Time PCR. Anschließend werden die resultierenden CT-Werte der Verdünnungen gegen die jeweils vorhandene Konzentration graphisch aufgetragen und per linearer Regression eine Standardgerade erstellt; mit Hilfe der

Geradengleichung kann dann anhand des CT-Wertes auf die DNA-Konzentration einer zu untersuchenden Probe geschlossen werden (siehe Abbildung 7).

Zur Durchführung der PCR wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein ABI prism 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde auf 384-Well-Platten mit einem Probenvolumen von 10 $\mu$ l je Well aufgetragen; für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung, d.h. je drei Wells erhielten Probenmaterial eines Probanden. Der Reaktionsansatz pro Well bestand aus 1 $\mu$ l der wie oben beschrieben hergestellten Probe, je 0,3 $\mu$ l der Lösung von Forward und Reverse Primer entsprechend 3,3 pmol jedes Primers, sowie 5 $\mu$ l qPCR SuperMix und 3,4 $\mu$ l PCR-Wasser.

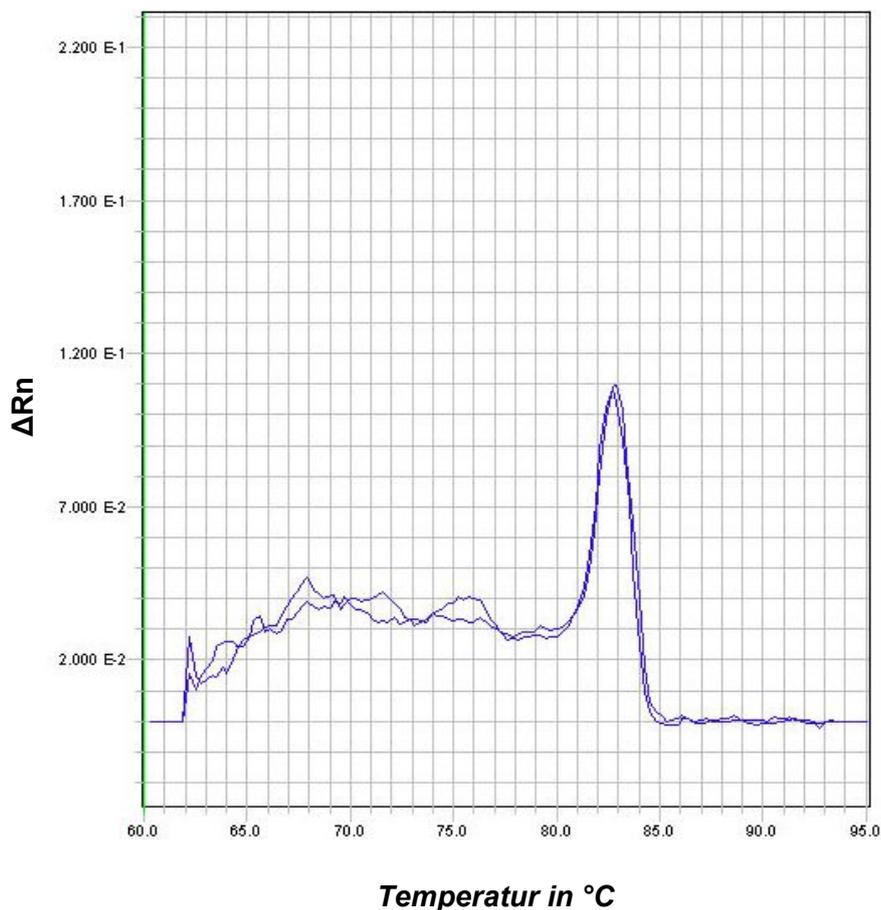


Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse.

Dargestellt sind die nahezu deckungsgleichen Schmelzkurven zweier getrennter Bestimmungen derselben Serumprobe.  $\Delta Rn$  repräsentiert die Höhe des detektierten Fluoreszenzsignals.

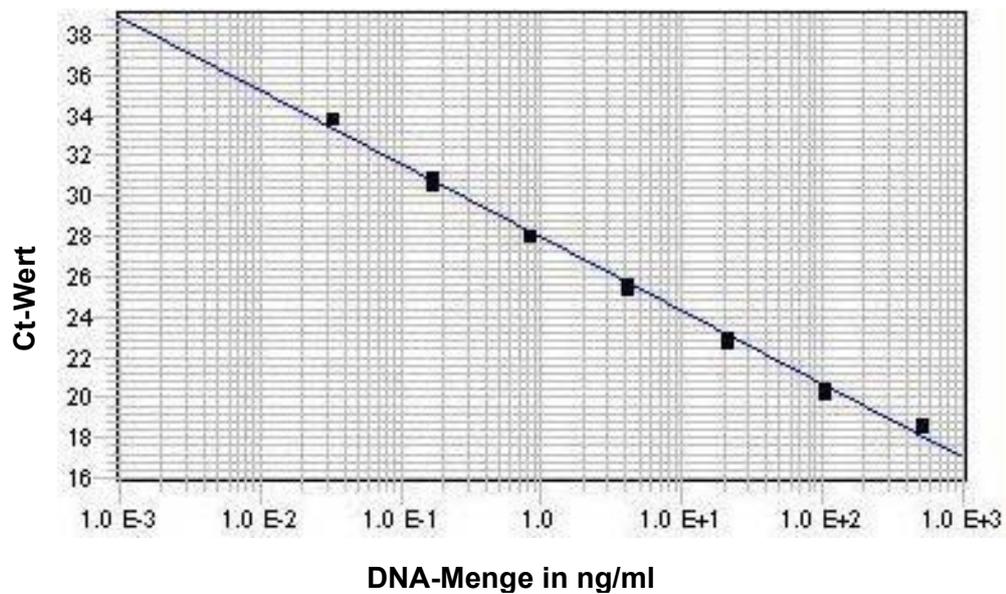


Abbildung 7: Standardgerade.

Dargestellt ist die Gerade, die mittels linearer Regression anhand von Proben definierter DNA-Konzentration erstellt wird. Sie wird bei Proben unbekannter DNA-Konzentration zur Ermittlung ebendieser anhand des CT-Wertes herangezogen.

Auf jede Platte wurden außer den eigentlichen Proben noch die definierten Verdünnungen zur Ermittlung der Standardgeraden sowie eine Positivkontrolle aus White Buffy Coat und eine Negativkontrolle aus PCR-Wasser aufgetragen. Außerdem wurde bei Durchführung der methylierungssensitiven PCR eine Positivkontrolle in Form der Restriktionsenzym-behandelten methylierten CpG-SssI-DNA und eine Negativkontrolle in Form einer Verdünnung Enzym-behandelter nicht methylierter DNA aufgetragen.

Der PCR-Automat wurde entsprechend des folgenden PCR-Protokolls programmiert:

- Hotstart zur Aktivierung der DNA-Polymerase: 95°C über 10 Minuten
- 40 Zyklen
  - 1.) Denaturierung bei 95°C über 15 Sekunden
  - 2.) Annealing + Elongation bei 60°C über 60 Sekunden
- Schmelzkurvenanalyse

### 2.2.6 Gelelektrophorese

Um die Primer auf ihre Eignung zur Amplifikation eines spezifischen Produktes hin zu untersuchen, wurden vor Beginn der eigentlichen Versuche exemplarisch

Amplifikationen an Verdünnungen des White Buffy Coat vorgenommen. Es wurde untersucht, ob die jeweiligen Produkte die zu erwartende Größe besitzen, was dann im positiven Falle auf das Vorliegen eines spezifischen Produktes schließen lässt. Dies geschah mit Hilfe der Gelelektrophorese; zur Herstellung des 1,7%igen Agarosegels wurden 200ml 1xTBE-Puffer mit 3,4 g Agarosepulver aufgekocht und in den Gelgießstand ausgegossen. 20µl der gelösten PCR-Produkte wurden mit 1µl des Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen<sup>®</sup> und 1µl Ladepuffer versehen und nach Erhärten des Gels in dessen Vertiefungen gegeben. Parallel wurde eine DNA-Leiter mit PicoGreen<sup>®</sup> und Ladepuffer zur Bestimmung der Fragmentgrößen und als Negativkontrolle PCR-Wasser mit denselben Substanzen aufgebracht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über 90 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt; die Produkte wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Sowohl die Schmelzkurvenanalyse als auch die Elektrophorese ergaben für die hier verwendeten Primer, dass es sich um die jeweils erwarteten Produkte handelt.

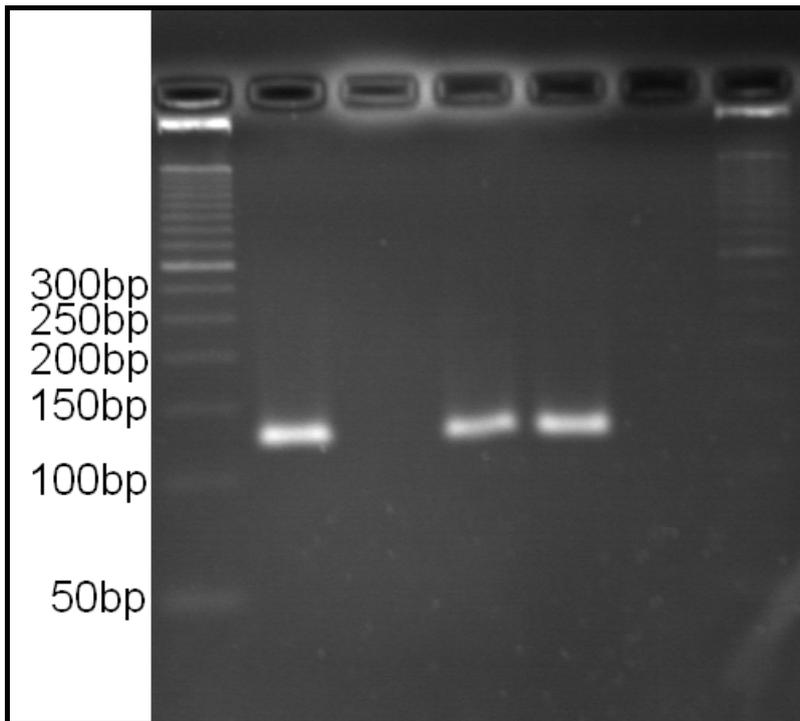


Abbildung 8: Gelelektrophorese.

Exemplarische Darstellung einer Gelelektrophorese, hier allerdings (anders als in 2.2.6 beschrieben) nach Behandlung der Proben mit Restriktionsenzymen und anschließender PCR mit dem Primer von GSTP1. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht. Die Geltaschen waren wie folgt gefüllt (von links nach rechts): Lösung der Standard-DNA-Leiter, Sssi-DNA, Leukozyten-DNA („Buffy Coat“), 2 Patientenproben, Negativkontrolle, Standard-DNA-Leiter. Die Sssi-DNA sowie die DNA beider Patientenproben wurden aufgrund vorhandener Methylierungen nicht enzymatisch verdaut und liefern daher ein Fluoreszenz-Signal. Die Größe des Produkts entspricht der erwarteten Größe des GSTP1-Fragments (134 bp).

### 2.2.7 DNA-Quantifizierung und Methylierungsratio

Die in den untersuchten Proben vorhandene DNA-Konzentration wurde entsprechend dem oben dargestellten Verfahren anhand der Verdünnungsreihe automatisch mit Hilfe der Software SDS 2.2 ermittelt.

Die DNA-Integrität der Proben wurde berechnet aus dem Verhältnis der ermittelten Konzentrationen von großen und kleinen DNA-Fragmenten (*ACTB-106*, *ACTB-384*).

Zur Berechnung des Methylierungsgrades muss verdeutlicht werden, dass die in den Restriktionsenzym-behandelten Proben detektierte DNA mengenmäßig der methylierten DNA entspricht, da unmethylierte DNA-Fragmente ja enzymatisch verdaut wurden; die in den unbehandelten Proben detektierte DNA entspricht der Gesamtmenge aus methylierter und unmethylierter zellfreier DNA. Weiterhin ist wichtig, dass zellfreie DNA-

Fragmente unterschiedlicher Genorte, die eine ähnliche Größe besitzen, im Blutserum in gleich großer Menge nachzuweisen sind, d.h. dass die Konzentration der kleinen DNA-Fragmente im Serum als Maß für die zellfreie DNA insgesamt herangezogen werden kann (Ellinger et al., 2008b). In diesem Fall dient das kleine DNA-Fragment *ACTB-106* als Maß für die zellfreie DNA; es wurde ebenfalls enzymatisch behandelt, weist aber keine Schnittstellen für die Restriktionsenzyme auf und repräsentiert somit methylierte wie auch unmethylierte freie DNA.

Für jede der Proben wurde für jeden untersuchten Genabschnitt die Methylierungsrate berechnet. Sie entspricht dem Mengenverhältnis der detektierten methylierten DNA zur Gesamt-DNA und gibt somit den Grad der Methylierung an; eine Methylierungsrate von 0,3 beispielsweise gibt an, dass 30% der vorhandenen Kopien eines Genabschnitts methyliert sind.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Zur Auswertung der Versuchsergebnisse wurde die Software SPSS Version 11.5 herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  definiert; alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Zum Vergleich der verschiedenen Probandengruppen hinsichtlich der experimentell erhobenen Daten wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt. Er diente der Feststellung signifikanter Übereinstimmungen bzw. Unterschiede zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden bezogen auf die Konzentration groß- und kleinfragmentärer DNA, den Apoptoseindex und die Methylierungsrate.

Weiterhin wurden die Tumorpatienten jeweils bezüglich eines der klinisch-pathologischen Merkmale in Gruppen eingeteilt und es wurde anhand des Kruskal-Wallis-, des Chi-Quadrat- und des Mann-Whitney-Tests überprüft, ob Korrelationen zwischen den klinisch-pathologischen Merkmalen und den gemessenen DNA-Werten bestehen.

Um die diagnostische Wertigkeit von gemessenen DNA-Werten und Methylierungsrationes zu erfassen und Cut-Off-Werte für die Unterscheidung zwischen gesunden und tumorkranken Patienten festzulegen, wurden Receiver-Operator-Curve-Analysen (ROC-Analysen) durchgeführt. Hierbei wurden für alle Messwerte jeweils die Spezifität und Sensitivität berechnet, die resultieren würde, wenn der jeweilige Wert als

Cut-Off-Wert benutzt würde. Grafisch resultiert aus diesen Analysen die sogenannte ROC-Kurve; die Fläche unter der ROC-Kurve wird als „Area under the curve“ (AUC) bezeichnet. Sie kann maximal den Wert 1,0 annehmen. Je größer die AUC, desto größer ist die Gesamtgenauigkeit eines diagnostischen Tests (Weiß, 2008). Aus den errechneten Werten für Sensitivität und Spezifität wurde jeweils die Summe gebildet, und es wurde derjenige Messwert als Cut-Off-Wert gewählt, bei dem diese Summe maximal war. Die Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit erfolgte anhand der AUC sowie der ermittelten maximalen Sensitivität und Spezifität.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Quantifizierung freier DNA

Zur DNA-Quantifizierung wurden die Konzentrationen kleiner und großer Fragmente mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt; hierzu dienten *ACTB-106* (106 bp) und *ACTB-384* (384 bp).

Beim Vergleich der beiden Untersuchungskollektive zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration der Fragmente von *ACTB-106* bei Tumorpatienten gegenüber gesunden Probanden ( $p=0,003$ ). Die mediane Konzentration lag bei 1,31 ng/ml Serum gegenüber 0,77 ng/ml. Auch *ACTB-384* war in signifikant größerer Menge bei Tumorpatienten vertreten als bei Gesunden ( $p=0,0003$ ); die Konzentrationen lagen hier im Median bei 1,77ng/ml bzw. 0,61 ng/ml (siehe Abbildung 9). Es zeigt sich somit, dass große und kleine DNA-Fragmente in dem jeweiligen Kollektiv mengenmäßig jeweils in ähnlicher Konzentration vorkamen.

Obwohl innerhalb der histologischen Subtypen das hellzellige Karzinom ( $n=29$ ) zahlenmäßig eindeutig dominierend war bei sehr geringer Zahl der übrigen Typen (papilläres Karzinom:  $n=4$ ; zystisches Karzinom:  $n=3$ ; chromophobes Karzinom:  $n=2$ ) und ein statistischer Vergleich der Subtypen untereinander insofern nur beschränkte Aussagekraft besitzt, wurden trotzdem diesbezüglich Tests durchgeführt; es fanden sich jedoch weder für große noch für kleine Fragmente mengenmäßig signifikante Unterschiede zwischen den histologischen Tumortypen.

### 3.2 DNA-Integrität

Die DNA-Integrität ist ein Maß für die Intaktheit der DNA und lässt – wie schon in der Einleitung dargestellt – Rückschlüsse auf die Herkunft der freien DNA zu. So gehen aus Apoptose vorwiegend stark fragmentierte Nukleinsäuren und somit kleine Fragmente hervor, aus der Nekrose hingegen eher größere Fragmente.

Die DNA-Integrität wird hier definiert als Verhältnis der detektierten Mengen von großfragmentärer zu kleinfragmentärer DNA. Je höher also die Integrität ist, desto weniger fragmentiert ist die freie DNA und desto eher lässt sich auf nekrotischen Ursprung schließen.

Es zeigte sich, dass die freie DNA der Nierentumorpatienten eine signifikant höhere Integrität aufwies als die der gesunden Probanden ( $p=0,04$ ); im Median lag sie bei den Tumorpatienten bei 1,07 im Vergleich zu 0,72 bei den Gesunden (siehe Abbildung 10). Der Test auf entsprechende Unterschiede, was histologische Subtypen angeht, erbrachte auch hier keine signifikanten Differenzen in der Integrität der DNA.

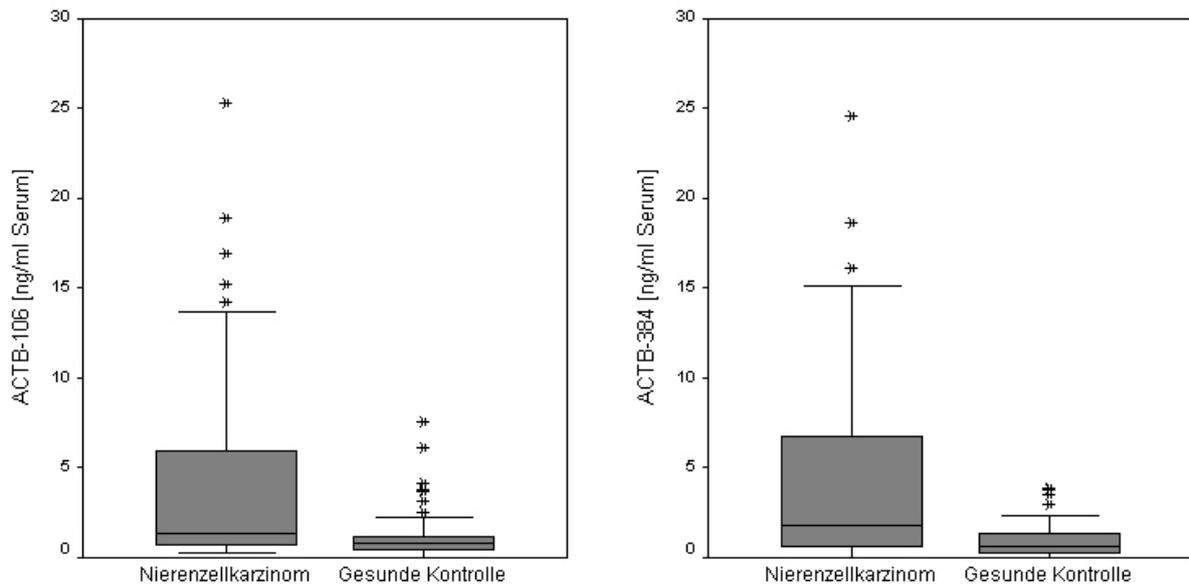


Abbildung 9: Konzentrationen der kleinen (ACTB-106) und großen (ACTB-384) DNA-Fragmente.

Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt und bezogen auf die beiden Untersuchungsgruppen jeweils einander gegenübergestellt.

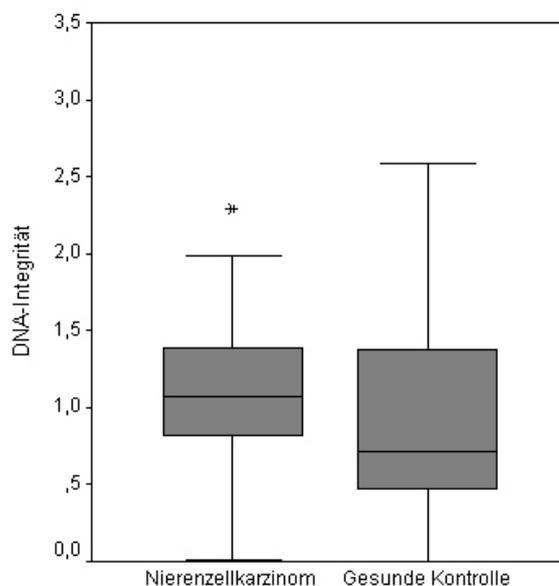


Abbildung 10: DNA-Integrität der beiden Untersuchungsgruppen.

Die Integrität entspricht dem Verhältnis der detektierten Mengen von großfragmentärer zu kleinfragmentärer DNA. Je höher die Integrität ist, desto weniger fragmentiert ist die freie DNA. Die Ergebnisse sind in Form von Box-Whisker-Plots dargestellt.

### 3.3 DNA-Methylierung und Methylierungsratio

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Promotorregionen folgender neun Gene der freien DNA auf Methylierungen in CpG-Insel-Bereichen untersucht: *APC*, *GSTP1*, *p14*, *p16*, *PTGS2*, *RAR-β*, *RASSF1A*, *TIG1*, *TIMP3*. Die Resultate finden sich in Abbildung 11 und Tabelle 6.

Bei 30 der untersuchten 35 Tumorpatienten konnten Methylierungen in jeweils unterschiedlicher Kombination und Häufigkeit nachgewiesen werden; hiervon waren insgesamt alle untersuchten Genorte – jedoch in unterschiedlicher Häufigkeit – betroffen. Am häufigsten fanden sich Methylierungen in den Promotoren von *TIMP3* (57,1%) und *APC* (54,3%).

Auch in der Gruppe der gesunden Probanden konnten in allen Genen bis auf *p14* Methylierungen nachgewiesen werden, jedoch in generell niedrigerer Frequenz als bei den Tumorpatienten. Am häufigsten war auch hier *TIMP3* (38,9%) betroffen, gefolgt von *RAR-β* und *TIG1* (jeweils 14,8 %). Die Abbildungen 10 und 11 sowie Tabelle 6 geben einen Überblick.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes konnte gezeigt werden, dass bei Tumorpatienten in den Promotoren von *APC*, *GSTP1*, *p14*, *PTGS2*, *RAR-β*, *RASSF1A* und *TIG1* Methylierungen signifikant häufiger vorkamen ( $p < 0,05$ ). Dies gilt jedoch nicht für *p16* ( $p = 0,299$ ) und *TIMP3* ( $p = 0,091$ ).

	Nierenzellkarzinom n=35		Gesunde Kontrollen n=54	
	Positiv	[%]	Positiv	[%]
<b><i>APC</i></b>	19	54,3	5	9,3
<b><i>GSTP1</i></b>	6	17,1	1	1,9
<b><i>p14</i></b>	5	14,3	0	0
<b><i>p16</i></b>	9	25,7	9	16,7
<b><i>PTGS2</i></b>	8	22,9	2	3,7
<b><i>RAR-β</i></b>	14	40	8	14,8
<b><i>RASSF1A</i></b>	8	22,9	1	1,9
<b><i>TIG1</i></b>	12	34,3	8	14,8
<b><i>TIMP3</i></b>	20	57,1	21	38,9

*Tabelle 6: Methylierungspositive Fälle.*

*Dargestellt sind für beide Patientengruppen die absolute und relative Häufigkeit von Fällen, bei denen Methylierungen detektiert wurden.*

	APC	GSTP1	P14	P16	PTGS2	RAR-beta	RASSF1A	TIG1	TIMP3
1								23	
2				11	4,6	3		5,6	4,2
3	0,8	1,6	0,5	1,3	0,9	1,2		0,3	0,6
4	6,8	3,9	5	9	3,1	3,2	2,6	3,1	3,9
5	0,7	1,7		2,8	1	1,4	0,9	1,2	0,9
6	3,3								
7						1,4		3,3	1,4
8	1	1,5		1,5		0,4	0,5		1
9	2,1		2,5	4,3	1,3	2	1,6		4,3
10									
11	48								
12	20								
13	22								
14									
15						42			
16	23	3,8			1,1		1	1,8	0,6
17						3,7		4,2	2
18						6,2			
19	26								
20									0,9
21	43		23	71	23	9,3	17	14	5,3
22	36								11
23	7,1								
24				4,6					7,2
25	1,8		1,3	3,5		1,8	0,3	3,3	2,1
26		2,3				0,5	0,2	0,7	1,4
27					1,9	1,3			3
28									
29	8,7								6,1
30	1,6							1,2	2,9
31									1,5
32	3,9								
33	14								1,5
34									
35									

	APC	GSTP1	P14	P16	PTGS2	RAR-beta	RASSF1A	TIG1	TIMP3
1					1,4	3,5			0,5
2									
3									5,2
4									
5									
6									
7	23								
8									
9				11		7			3
10									
11						2,3			0,7
12									6,4
13									2,6
14	7,4			8		4,6			
15									
16									
17									4,7
18									
19									
20									
21						2,3			1
22									
23	21								
24									
25									
26									
27									4,9
28									
29									
30		13			20	28			
31									
32								12	32
33				4,5					
34								12	
35				7,7		6,2			
36									
37									10
38									
39									8,7
40									18
41	27			8,1					
42									
43				5,1		6,5			
44				6,6				4,6	20
45								5,7	
46								11	
47									12
48									26
49									
50				3,5			2,3		9,3
51									9,7
52								9,7	11
53								11	9,7
54	4,6			8,9				5,7	29

Abbildung 11: Methylierungsstatus.

Die linke Tabelle zeigt die Tumorpatienten, die rechte Tabelle die gesunden Probanden. Die Zahlen geben die Methylierungsrate in Prozentwerten an. Farblicher Hintergrund entsprechend der Höhe der Methylierungsrate: **weiß** = keine Methylierungen; **grau** = <1%; **gelb** = 1-5%; **orange** = 5,1-10%; **grün** = 10,1-20%; **rot** = >20%.

Für jede der untersuchten Proben wurde die Methylierungsrate berechnet, indem die Konzentration von detektierter methylierter DNA eines Genabschnitts jeweils ins Verhältnis zur detektierten Konzentration des ähnlich großen Produkts von *ACTB-106* gesetzt wurde. Unter der bereits dargestellten Annahme, dass Fragmente ähnlicher Größe jeweils in ähnlicher Konzentration im Blutserum auftreten, repräsentiert somit *ACTB-106* die Gesamtmenge methylierter und unmethylierter DNA des jeweils betrachteten Genabschnitts, d.h. die Methylierungsrate gibt den Anteil methylierter DNA an der gesamten freien DNA für den betrachteten Abschnitt an. Die errechneten Methylierungsrationes sind im Detail in Tabelle 7 dargestellt.

	Nierenzellkarzinome n=35				Gesunde Kontrollen n=54			
	Mittelwert	Median	Min.	Max.	Mittelwert	Median	Min.	Max.
<b><i>APC</i></b>	7,11	0,84	0	48,13	1,54	0	0	26,95
<b><i>GSTP1</i></b>	0,42	0	0	3,95	0,23	0	0	12,50
<b><i>p14</i></b>	0,92	0	0	22,86	0	0	0	0
<b><i>p16</i></b>	4,30	0	0	70,48	1,18	0	0	11,16
<b><i>PTGS2</i></b>	1,04	0	0	22,45	0,39	0	0	19,74
<b><i>RAR-β</i></b>	2,22	0	0	42,14	1,12	0	0	28,23
<b><i>RASSF1A</i></b>	0,70	0	0	17,29	0,04	0	0	2,29
<b><i>TIG1</i></b>	1,76	0	0	23,02	1,30	0	0	11,63
<b><i>TIMP3</i></b>	0,02	0,01	0	0,11	4,15	0	0	32,12

Tabelle 7: Methylierungslevel.

Die Tabelle zeigt die für die jeweiligen Genorte ermittelten Methylierungsrationes in Prozentwerten.

Die statistische Auswertung ergab mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests, dass die DNA der Tumorpatienten an 6 der untersuchten Promotoren zu einem signifikant höheren Anteil methyliert war als die der Gesunden; dies sind *APC* ( $p < 0,001$ ), *GSTP1* ( $p = 0,011$ ), *p14* ( $p = 0,004$ ), *PTGS2* ( $p = 0,006$ ), *RAR-β* ( $p = 0,021$ ) und *RASSF1A* ( $p = 0,002$ ). Bei *TIG1* zeigte sich ein ähnlicher Trend, der das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte

( $p=0,079$ ). Der Anteil methylierter, bei den Tumorpatienten als tumorspezifisch zu wertender DNA an der Gesamt-DNA ist jedoch insgesamt sowohl bei den Gesunden als auch bei den Tumorpatienten gering.

Bei *p16* und *TIMP3* konnten weder signifikante Unterschiede noch Trends zwischen Erkrankten und Gesunden festgestellt werden. Prüfung auf diagnostische Wertigkeit

### **3.3.1 ROC-Analysen für kleine und große Fragmente sowie DNA-Integrität**

Die ROC-Analysen dienen der Ermittlung von Grenzwerten („Cut-Off-Werten“) zur Unterscheidung zwischen den Tumorpatienten und gesunden Probanden. Als Grenzwerte wurden diejenigen Werte gewählt, für die entsprechend der Analysen die Summe aus Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Entscheidung maximal war und die somit die bestmögliche Unterscheidung zwischen gesunden Kontrollpersonen und Tumorpatienten ermöglichen. Einen Überblick geben Abbildung 12 und Tabelle 8.

Für die Fragmente von *ACTB-106* lag der Cut-Off-Wert bei einer Konzentration von 1,03 ng/ml Serum. Mit Hilfe dieses Grenzwertes gelang eine Entscheidung mit einer Sensitivität von 68,6% und einer Spezifität von 70,4% bei einer Fläche unter der Kurve (Area under the Curve = AUC) von 0,69.

Der Cut-Off-Wert für die Fragmente von *ACTB-384* lag bei 1,7 ng/ml Serum; hier resultierte ebenfalls eine nur niedrige Sensitivität von 57,1% bei einer Spezifität von 81,5%. Die AUC nahm hier mit 0,73 den im Vergleich der drei Parameter höchsten Wert an. Hieraus lässt sich ableiten, dass *ACTB-384* die höchste Gesamtgenauigkeit bei der Unterscheidung zwischen Tumorpatienten und Gesunden bietet (Weiß, 2008).

Die DNA-Integrität schließlich erbrachte eine diagnostische Sensitivität von 74,3% bei einer Spezifität von 63%; die AUC lag hier bei 0,63, der Grenzwert bei einer Integrität von 0,84.

Zusammenfassend bot also die Betrachtung der Großfragmente die im Vergleich höchste AUC und somit höchste Testgenauigkeit sowie auch die höchste Spezifität in der Diagnose des Nierenzellkarzinoms. Die höchste Sensitivität wurde mit der Betrachtung der Integrität erreicht, bei allerdings vergleichsweise niedriger AUC von 0,63.

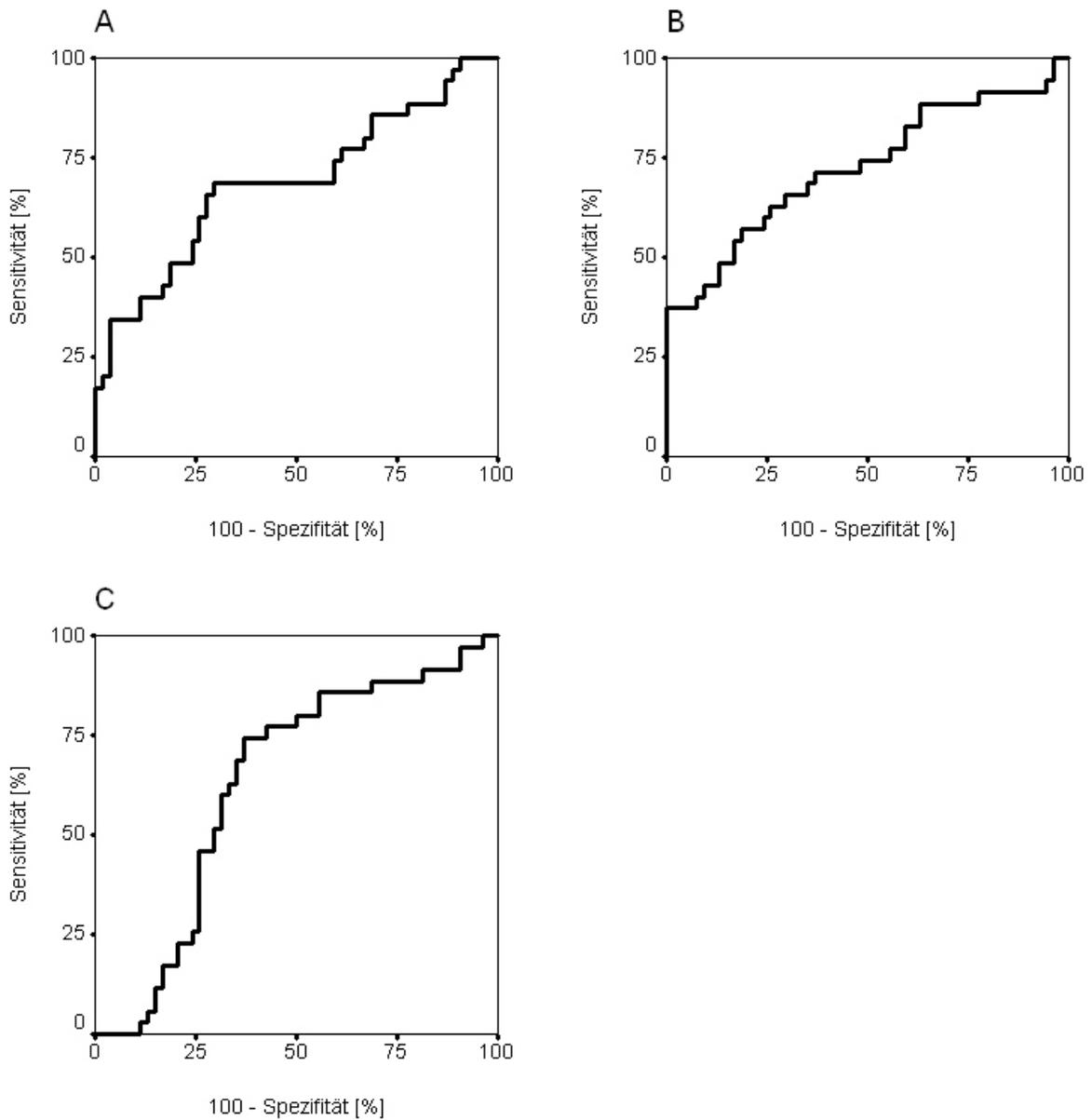


Abbildung 12: ROC-Kurven.

Anhand der bei Tumorkranken und Gesunden ermittelten Mengen groß- und kleinfragmentärer DNA sowie der hieraus für jeden Patienten bzw. Probanden berechneten DNA-Integrität wurden ROC-Analysen durchgeführt. Hier sind die bei den Berechnungen resultierenden ROC-Kurven dargestellt: **A** zeigt die entsprechende Kurve des kleinen Fragments ACTB-106, **B** die des großen Fragments ACTB-384 und **C** die der DNA-Integrität.

	<b>Cut-Off- Wert</b>	<b>Sens. [%]</b>	<b>Spez. [%]</b>	<b>AUC</b>	<b>95%-KI</b>
<b>ACTB-106</b>	1,03 ng/ml	68,6	70,4	0,69	0,57 – 0,81
<b>ACTB-384</b>	1,70 ng/ml	57,1	81,5	0,73	0,61 – 0,84
<b>Integrität</b>	0,84	74,3	63,0	0,63	0,51 – 0,75

*Tabelle 8: ROC-Analysen für ACTB-106, ACTB-384 und die DNA-Integrität.*

Werte zu den ROC-Analysen für kleinfragmentäre (ACTB-106) und großfragmentäre DNA (ACTB-384) sowie die DNA-Integrität.

### **3.3.2 ROC-Analysen für die Methylierungsrationes der untersuchten Gene**

Gleichsam wurden die ermittelten Methylierungslevel auf ihre diagnostische Wertigkeit untersucht; hiervon ausgenommen wurden die Genorte *p16*, *TIG1* und *TIMP3*, da hier – wie oben beschrieben – keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden und Tumorpatienten ermittelt wurden.

Es zeigte sich bei Betrachtung der einzelnen Genloki eine durchweg hohe bis sehr hohe Spezifität, was die Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Patienten anhand des Methylierungslevels angeht. Sie schwankte zwischen 85,2% für *RAR-β* und 100% für *p14*. Diese hohe Spezifität wurde jedoch auf Kosten der Sensitivität erreicht, die durchweg eher gering ausfiel; das Minimum lag hier bei 14,3% für *p14*, das Maximum bei 54,3% für *APC*. Dabei schwankte die Fläche unter der Kurve (AUC) zwischen 0,57 und 0,72. Einen Überblick über diese Daten geben Tabelle 9 sowie Abbildung 13.

	<b>Cut-Off- Wert [%]</b>	<b>Sens. [%]</b>	<b>Spez. [%]</b>	<b>AUC</b>	<b>95%-KI</b>
<b>APC</b>	0,37	54,3	90,7	0,72	0,60 – 0,83
<b>GSTP1</b>	0,75	17,1	98,1	0,57	0,45 – 0,70
<b>p14</b>	0,26	14,3	100	0,57	0,45 – 0,70
<b>PTGS2</b>	0,47	22,9	96,3	0,59	0,47 – 0,72
<b>RAR-β</b>	0,19	40,0	85,2	0,61	0,49 – 0,73
<b>RASSF1A</b>	0,09	22,9	98,2	0,60	0,48 – 0,73

*Tabelle 9: ROC-Analysen der Methylierungslevel*

*Dargestellt sind die Resultate von ROC-Analysen für die für jedes Gen errechnete Methylierungsratio.*

Bei dichotomer Verteilung (Methylierung vorhanden versus nicht vorhanden) ohne Berücksichtigung der Methylierungsratio wurde weiterhin untersucht, ob durch kombinierte Betrachtung im Sinne einer „oder“-Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene Sensitivität und Spezifität gesteigert werden konnten. Dies war möglich für die Zweier-Kombination von *APC* mit *GSTP1*, *PTGS2* und *RAR-β*, wo die Sensitivität bei weiterhin hoher Spezifität (77,8% bis 88,9%) auf Werte zwischen 60% und 74,3% erhöht werden konnte. Die Kombination der drei Gene *APC*, *PTGS2* und *GSTP1* führte zu einer Sensitivität von 62,9% und einer Spezifität von 87% (siehe Tabelle 10 sowie Abbildung 14). Alle übrigen Kombinationen führten zu keiner wesentlichen Zunahme der diagnostischen Wertigkeit.

	<b>Sens. [%]</b>	<b>Spez. [%]</b>	<b>AUC</b>	<b>95%-KI</b>
<b>APC oder GSTP1</b>	57,1	88,9	0,73	0,62 – 0,84
<b>APC oder PTGS2</b>	60	87	0,74	0,62 – 0,85
<b>APC oder RAR-β</b>	74,3	77,8	0,76	0,65 – 0,87
<b>APC oder PTGS2 oder GSTP1</b>	62,9	87	0,75	0,50 – 0,75

*Tabelle 10: ROC-Analysen bei kombinierter Betrachtung.*

*Die Tabelle zeigt die Ergebnisse von ROC-Analysen bei kombinierter Betrachtung mehrerer Gene unter „oder“-Verknüpfung hinsichtlich des Vorhandenseins von Methylierungen.*

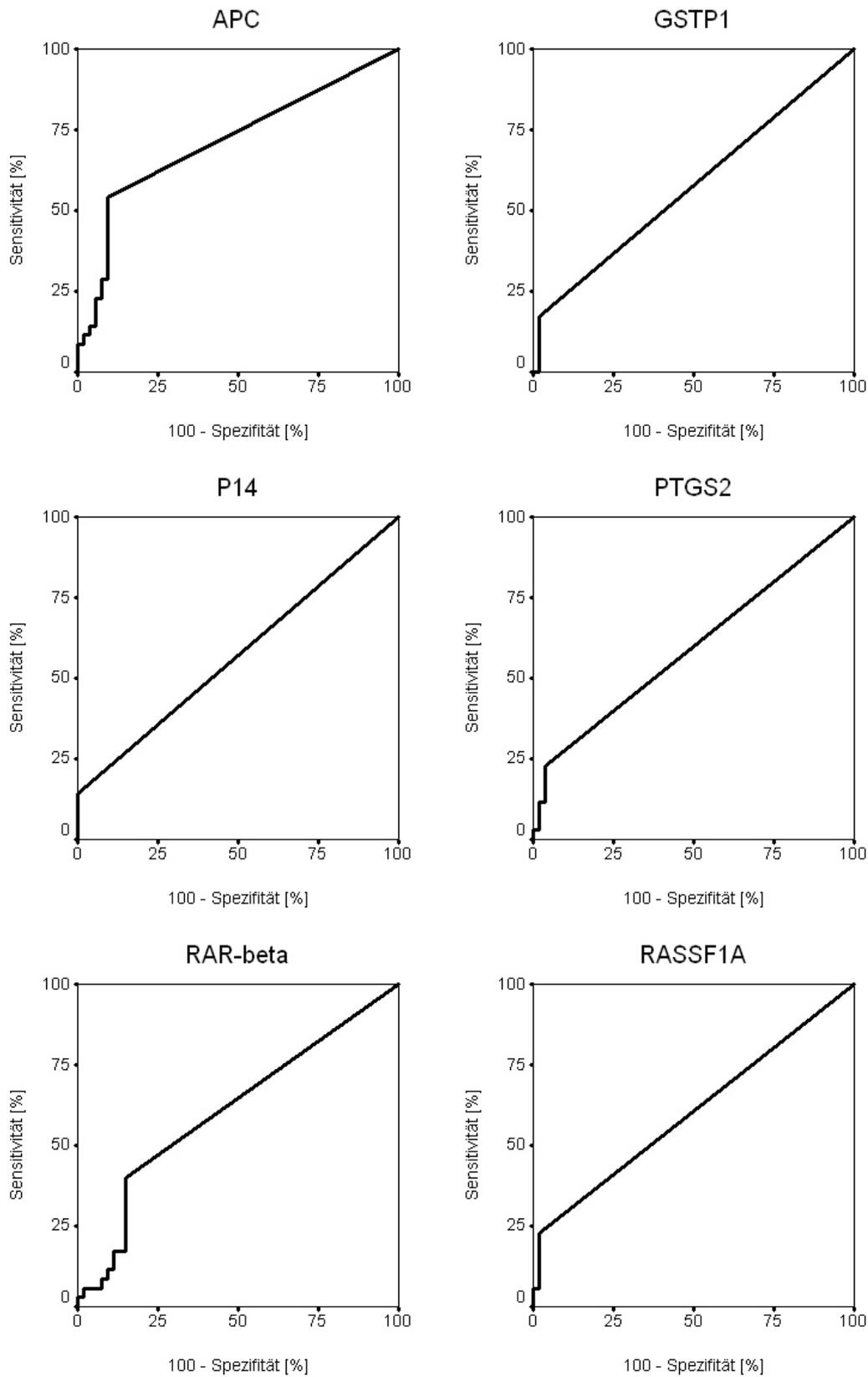


Abbildung 13: ROC-Kurven der Methylierungslevel. Die ermittelten Methylierungsrationes der untersuchten Gene wurden hier auf ihre diagnostische Wertigkeit untersucht.

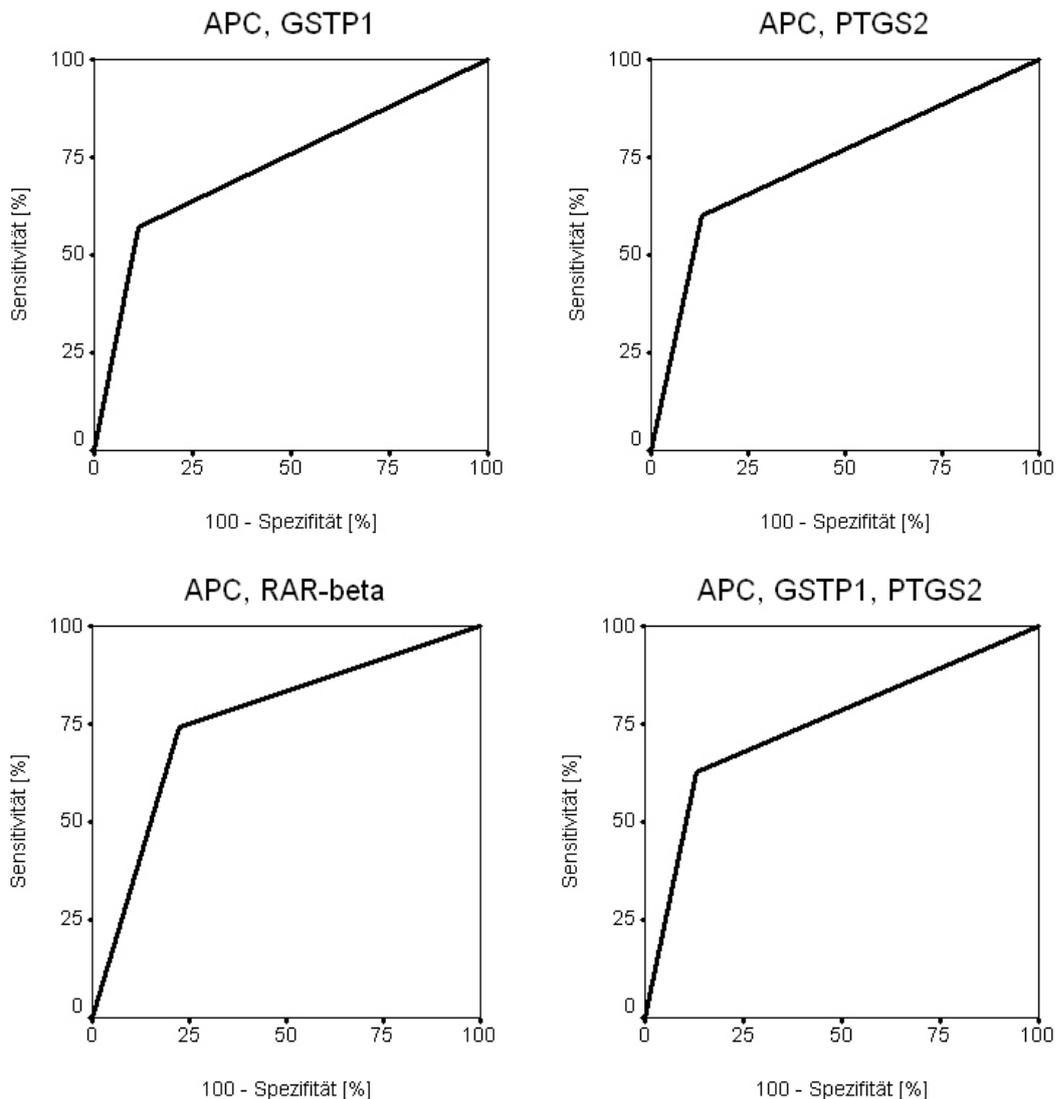


Abbildung 14: ROC-Kurven bei kombinierter Betrachtung.

Hier wurden zwei bzw. drei Gene unter „oder-Verknüpfung“ betrachtet hinsichtlich der Merkmalsausprägung „Methylierung vorhanden“.

### 3.3.3 Korrelation der DNA-Menge mit klinisch-pathologischen Merkmalen

Die in diese Untersuchung einbezogenen klinisch-pathologischen Parameter waren das Alter und Geschlecht der Probanden bzw. Patienten, die Frage nach der Symptomatik bei Tumorpatienten, die Tumorphistologie, das Tumorstadium nach TNM-System, der Differenzierungsgrad des Tumors, die Frage nach Tumordinfiltration der Nebenniere und nach dem Vorhandensein eines Tumorthrombus in der Vena cava inferior.

Zunächst wurde mit Hilfe der bereits dargelegten statistischen Tests untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Parametern und den detektierten DNA-Mengen bzw. der Integrität festzustellen war. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Lebensalter und detektierter DNA festgestellt werden; ebenso konnten keine Korrelationen zwischen möglicherweise vorhandener Symptomatik, dem histologischen Subtyp des Tumors sowie dem Tumorgrading und den DNA-Mengen bzw. der Integrität festgestellt werden (in allen Fällen  $p > 0,05$ ).

Beim Test auf signifikante Unterschiede der DNA-Menge zwischen den Geschlechtern zeigte sich, dass bei den gesunden Männern ( $n=37$ ) signifikant ( $p=0,036$ ) mehr kleinfragmentäre DNA als bei den gesunden Frauen ( $n=17$ ) isoliert werden konnte (Im Mittel 1,29 ng/ml gegenüber 1,13 ng/ml). In der Gruppe der Tumorpatienten fanden sich keine derartigen Unterschiede.

Die Betrachtung des TNM-Stadiums erfolgte getrennt für die drei Kategorien T (Primärtumor), N (Nodalstatus) und M (hämatogene Fernmetastasierung).

Aufgrund der Häufigkeitsverteilung ( $pT1: n=22$ ,  $pT2: n=1$ ,  $pT3: n=11$ , k.A.:  $n=1$ ) erschien bezüglich des T-Stadiums nur der Vergleich zwischen  $pT1$ - und  $pT3$ -klassifizierten Tumoren sinnvoll. Hierbei zeigte sich, dass bei Tumoren des Stadiums  $pT3$  die Integrität der freien DNA tendenziell niedriger war als bei  $pT1$ -Tumoren (im Mittel 0,86 bei  $pT3$  gegenüber 1,18 bei  $pT1$ ); mit  $p=0,056$  erreichte diese Tendenz jedoch nicht das Signifikanzniveau. Unterschiede oder Tendenzen bezüglich der absoluten Menge freier DNA waren nicht feststellbar.

Bezüglich des N- und M-Stadiums waren aufgrund der Häufigkeitsverteilung statistische Tests nur begrenzt sinnvoll. Lediglich vier Tumoren waren sicher mit  $N0$  klassifiziert, je ein Tumor mit  $N1$  und  $N2$ , dahingegen 29 Tumoren mit  $Nx$ . Auch waren nur drei Tumoren mit gesicherten Fernmetastasen ( $M1$ ) im Untersuchungskollektiv vorhanden gegenüber 32 Tumoren, die mit  $Mx$  klassifiziert waren. Bei den mit  $M1$  klassifizierten Tumoren konnte deutlich mehr DNA detektiert werden als bei  $Mx$ -Tumoren: im Mittel 15,5 ng/ml gegenüber 3,7 ng/ml kleinfragmentäre DNA und 13,9 ng/ml gegenüber 3,9 ng/ml großfragmentäre DNA. Der Unterschied erwies sich als statistisch signifikant für ACTB-106 ( $p=0,034$ ), für die großen Fragmente jedoch nicht ( $p=0,068$ ). Bezüglich der Integrität wurden keine Unterschiede festgestellt.

Fasste man die Patienten mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen zu einer Gruppe zusammen, so ließ sich bei diesen ebenfalls signifikant mehr kleinfragmentäre DNA ( $p=0,023$ ) detektieren und die Integrität war signifikant erniedrigt ( $p=0,036$ ) gegenüber den übrigen Patienten.

Die Frage nach Tumorinfiltration der Nebenniere war ein weiterer einbezogener Parameter. Im Untersuchungskollektiv waren nur zwei Tumoren mit Befall der ipsilateralen Nebenniere vorhanden, die aber im Mittel deutlich höhere Konzentrationen klein- und großfragmentärer DNA im Blutserum aufwiesen als dies für die übrigen Tumoren der Fall war: es fanden sich hier Konzentrationen von 21,1 ng/ml gegenüber 3,7 ng/ml für *ACTB-106* und 21,6 ng/ml gegenüber 3,7 ng/ml für *ACTB-384*. Die Unterschiede waren statistisch signifikant mit  $p=0,023$  für *ACTB-106* und  $p=0,019$  für *ACTB-384*. Keine Unterschiede fanden sich für die DNA-Integrität.

Bei 5 der 35 untersuchten Tumoren fanden sich Thromben in der Vena cava inferior, die vom Tumor ausgingen. Bei vorhandenen Tumorthromben war die DNA-Integrität signifikant erniedrigt gegenüber den Fällen ohne Thrombus ( $p=0,003$ ); die Integrität betrug im Mittel bei Venenbefall 0,49 und ohne Venenbefall 1,2.

### **3.3.4 Korrelation der Methylierungslevel mit klinisch-pathologischen Merkmalen**

Weiterhin wurde entsprechend dem Vorgehen in 3.4.3 untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und dem jeweils ermittelten Methylierungslevel der betrachteten Genorte besteht. Ein solcher konnte mit Ausnahme des pT-Stadiums für keines der betrachteten Merkmale festgestellt werden: Der Vergleich von pT1- mit pT3-klassifizierten Tumoren zeigte für die weiter fortgeschrittenen Tumoren einen signifikant höheren Methylierungsgrad (0,16 vs. 0,034) am Promotor von *APC* ( $p=0,035$ ). Die Hypermethylierung der übrigen Promotoren war jedoch nicht signifikant mit einem höheren Tumorstadium assoziiert.

Auffällig war weiterhin ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Gruppe der gesunden Probanden: die hier registrierten Methylierungen an den Promotoren von *p16* und *TIG1* wurden ausschließlich bei Männern gefunden, wodurch sich an dieser Stelle ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen ergab ( $p=0,028$  für *p16*,  $p=0,04$  für *TIG1*).

## 4 Diskussion

Bereits seit dem Ende der 1970er Jahre ist das Vorhandensein freier DNA in menschlichem Blutserum bzw. -plasma bekannt. Seitdem konnte in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden, dass die Konzentration dieser zellfreien DNA bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen - aber in geringerem Ausmaß auch bei einigen benignen Erkrankungen - im Vergleich zur Normalbevölkerung signifikant erhöht ist (Anker et al., 1999). Hinsichtlich der Vermutung, man könne die freie DNA als diagnostischen bzw. prognostischen Parameter bei Tumorerkrankungen nutzen, wurden in weitergehenden Untersuchungen genetische wie auch epigenetische Veränderungen von Abschnitten der zirkulierenden DNA bei verschiedenen Tumorerkrankungen erfasst. Eine derzeit im Fokus stehende Veränderung ist das Vorkommen von Promotorhypermethylierungen in den zirkulierenden Genabschnitten (siehe auch 1.2). Für das Nierenzellkarzinom besteht derzeit kein etablierter Biomarker zur Diagnose und Erfassung des Krankheitsverlaufs. Bisher existieren nur wenige wissenschaftliche Untersuchungen bezüglich des möglichen Nutzens der freien DNA in der Funktion eines solchen Tumormarkers beim NCC. Verschiedene seit Ende der 1990er Jahre publizierte Arbeiten zeigten das Vorkommen von Promotorhypermethylierungen ausgewählter Gene sowohl im Gewebe von Nierentumoren als auch in Blutserum und Urin der entsprechenden Tumorpatienten. Eine systematische Quantifizierung der freien DNA einschließlich Analyse des Methylierungsstatus und Evaluation der diagnostischen Potenz blieb in der international publizierten wissenschaftlichen Literatur bisher aus. Entsprechend war es die Zielsetzung dieser Arbeit, freie DNA bei Nierentumorpatienten in der Funktion als Biomarker zu evaluieren; einerseits durch Bestimmung absoluter Konzentrationen im Blutserum sowie Analyse der Fragmentgrößen (als Hinweis auf die mögliche Herkunft der DNA), andererseits durch die Untersuchung auf Hypermethylierungen in den Promotoren neun ausgewählter Gene.

### 4.1 Quantifizierung freier DNA und DNA-Integrität

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte per quantitativer Real-Time-PCR anhand des Nachweises zweier unterschiedlich großer DNA-Fragmente: *ACTB-106* und

*ACTB-384*. Dies geschah hinsichtlich der Tatsache, dass die Bestimmung der Fragmentgröße die Unterscheidung zwischen DNA überwiegend apoptotischen Ursprungs und DNA überwiegend nekrotischen Ursprungs erlaubt (Jahr et al., 2001).

Für beide untersuchten Fragmente konnte eine signifikant höhere Konzentration im Serum der Nierentumorpatienten verglichen mit den gesunden Kontrollen gezeigt werden ( $p=0,003$  für *ACTB-106*,  $p=0,0003$  für *ACTB-384*). Die registrierte Menge betrug für *ACTB-106* bei Tumorpatienten nahezu das Doppelte, für *ACTB-384* sogar nahezu das Dreifache der detektierten Menge bei Gesunden.

Entsprechendes, nämlich ein höherer Anstieg der großfragmentären DNA bei Tumorpatienten im Vergleich zur kleinfragmentären DNA, spiegelt sich auch in der Analyse der DNA-Integrität wider. Diese war in der vorliegenden Untersuchung bei den Tumorpatienten signifikant höher als bei den Gesunden ( $p=0,04$ ). Hieraus lässt sich ableiten, dass der Großteil der detektierten DNA nekrotischen Prozessen entstammt und nur ein kleinerer Anteil aus Apoptose hervorgeht. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen bei Tumorpatienten überein (Wang et al., 2003). Hierbei muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass sich daraus keineswegs die allgemeine Regel ableiten lässt, die freie DNA bei Tumorerkrankungen sei größtenteils großfragmentär und daher nekrotischen Ursprungs. Vielmehr scheint die DNA-Integrität von weiteren beeinflussenden Faktoren abhängig zu sein; verschiedene Autoren gelangen nämlich je nach untersuchter Tumorentität hier zu unterschiedlichen Ergebnissen. Wo einerseits wie auch in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Integrität bei Patienten mit Colon-, Mamma-, Ovarial-Karzinomen sowie Kopf-Hals-Tumoren festgestellt werden konnte (Umetani et al., 2006; Jiang et al., 2006, Wang et al., 2003), fanden andererseits Ellinger et al. (2008b, 2008d) beim invasiven Blasenkarzinom sowie beim Prostatakarzinom einen Anstieg vor allem der kleinen DNA-Fragmente als Hinweis auf vorwiegend apoptotische Prozesse, die zur DNA-Freisetzung führten. Dies impliziert, dass die Freisetzung der DNA auf unterschiedliche pathophysiologische Prozesse zurückzuführen sein muss, die in ihrer Ausprägung wiederum von weiteren Begleitfaktoren beeinflusst werden (Jahr et al., 2001; Ellinger et al., 2008d).

## 4.2 Analyse der Promotormethylierung

Die Analyse des zirkulierenden genetischen Materials auf Hypermethylierung in den Promotoren neun ausgewählter Gene ist der zweite Punkt, dem im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen werden sollte.

Der Promotorhypermethylierung als epigenetischer Veränderung und Mechanismus des „Gene Silencing“ wird bei der Betrachtung der Karzinogenese, aber auch bei der Suche nach Biomarkern maligner Erkrankungen zunehmende Beachtung geschenkt. Seit einigen Jahren werden Hypermethylierungsprofile publiziert, d.h. es werden – bezogen auf eine bestimmte Tumorentität – verschiedene Gene, die im Verdacht stehen, zur Karzinogenese des jeweiligen Tumors beizutragen, im Tumorgewebe und in Körperflüssigkeiten in Kombination auf Promotorhypermethylierung untersucht. Hieraus erhofft man sich auf dem Weg zur Etablierung von Biomarkern eine Steigerung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität (Laird 2003; Ellinger et al., 2009c).

Für das Nierenzellkarzinom existiert bisher, speziell bezogen auf Untersuchungen am Blutserum, eine nur geringe Zahl derartiger publizierter Arbeiten. Der aktuelle Stand der Literatur bezüglich der hier untersuchten Genpromotoren ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Methylierungsanalysen in den Zusammenhang eingeordnet und bewertet; die Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit erfolgt im daran anschließenden Kapitel gemeinsam für DNA-Menge, DNA-Integrität und Methylierungen.

### 4.2.1 Methylierungsstatus von APC

Das *APC (Adenomatosis Polyposis Coli)*-Gen stellt als Tumorsuppressorgen einen wichtigen Faktor bei der Entstehung des familiären, jedoch auch des sporadisch auftretenden Kolonkarzinoms dar. Im Falle einer Inaktivierung des Gens bzw. des zugehörigen Proteins durch Mutation oder Promotorhypermethylierung kommt es zu vermehrter Produktion von Transkriptionsfaktoren und Aktivierung wachstumsfördernder Gene, was zur Karzinogenese beiträgt (Esteller et al., 2000a).

Hypermethylierungen des *APC*-Promotors lassen sich weniger häufig auch nachweisen in Tumoren von Ösophagus, Magen, Pankreas, Leber sowie von Endometrium, Blase, Prostata und Brust (Esteller et al., 2000a; Bastian et al., 2005a; Banno et al., 2006). Untersuchungen für das NCC fanden Hypermethylierungen bei bis zu 29% aller

Patienten im Tumorgewebe und bis zu 38% im Urinsediment (Hoque et al., 2004); die bisher einzige Untersuchung am Serum von Nierentumorpatienten fand Hypermethylierungen in 6% der Fälle (Hoque et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit fanden sich Hypermethylierungen im *APC*-Promotor bei 54,3% der Tumorpatienten sowie bei 9,3% der gesunden Kontrollen, was einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen darstellt. Dies verhält sich ebenso für die Methylierungsrate des *APC*-Gens; die DNA ist bei den Tumorpatienten an dieser Stelle zu einem signifikant höheren Anteil methyliert.

#### **4.2.2 Methylierungsstatus von *GSTP1***

Das Gen *GSTP1* stellt ebenfalls ein Tumorsuppressorgen dar, das für das Protein GST $\pi$  kodiert. Dieses gehört zur Familie der Glutathion-S-Transferasen und katalysiert als solches Konjugationsprozesse, die zum Abbau oxidierender toxischer und karzinogener Stoffe beitragen. Eine Hypermethylierung des *GSTP1*-Promotors wurde in der Vergangenheit vor allem in Tumoren von Prostata, Brust und Niere beschrieben (Esteller et al., 1998; Dulaimi et al., 2004; Bastian et al., 2005a-b). Vorangegangene Untersuchungen am Nierenzellkarzinom fanden an Tumorgewebe in 12-20% der Fälle Hypermethylierungen (siehe Tabelle 3), Hoque et al. (2004) fanden in entsprechenden Serumproben in 6% der Fälle Hypermethylierungen. In der vorliegenden Arbeit wurden bei 17,1% aller Tumorpatienten und bei 1,9% der Gesunden Hypermethylierungen in diesem Bereich gefunden; diese Differenz erwies sich als statistisch signifikant, ebenso wie der Unterschied beider Gruppen hinsichtlich der Methylierungsrate, wobei auch hier die Tumorpatienten ein höheres Methylierungslevel aufweisen.

#### **4.2.3 Methylierungsstatus von *p14***

Die Zellzyklus-regulierenden Proteine p14<sup>ARF</sup> und p16<sup>INK4a</sup> werden gemeinsam vom Genlokus *INK4a/ARF* kodiert. p14<sup>ARF</sup> wirkt als Tumorsuppressor über das Protein MDM2 an der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors p53 mit. Hypermethylierungen des Promotors wurden in der Vergangenheit in erster Linie nachgewiesen bei kolorektalen Tumoren und Tumoren von Magen, Ösophagus, Endometrium, Niere sowie in Gliomen (Esteller et al., 2001a). In Untersuchungen an Nierentumoren fanden sich in 13-24% der Fälle Hypermethylierungen, an entsprechenden Serumproben fanden Hoque et al. (2004) Hypermethylierungen in 6% der Fälle. In der vorliegenden Arbeit

zeigten sich diese bei 14,3% der untersuchten Serumproben bei Nierentumoren. Bei den untersuchten gesunden Kontrollen fanden sich keine Hypermethylierungen. Die festgestellten Methylierungsfrequenzen und –rationes unterscheiden sich auch hier statistisch signifikant voneinander.

#### **4.2.4 Methylierungsstatus von p16**

Das auf dem gleichen Genlokus wie p14<sup>ARF</sup> kodierte Protein p16<sup>INK4a</sup> nimmt Einfluss auf den Zellzyklus durch Bindung und Inaktivierung der Zyklin-abhängigen Proteinkinasen 4 und 6 (CDK 4/6). Hieraus resultiert über weitere Reaktionsschritte schlussendlich eine Blockade des Zellzyklus am Restriktionspunkt G<sub>1</sub>/S. Inaktivierende Methylierungen des entsprechenden Promotors wurden bei einem breiten Spektrum maligner Tumoren nachgewiesen. Hierzu gehören u.a. Sarkome, Tumoren des Gastrointestinaltrakts, Bronchialkarzinome, Kopf-Hals-Tumoren, Blasen-tumoren und Lymphome (Rocco und Sidransky, 2001). Untersuchungen an Nierentumoren erbrachten vorhandene Methylierungen in 0 bis 73% der Fälle, Hoque et al. (2004) fanden diese an Serumproben in 22% der Fälle. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich Methylierungen bei 25,7% der Tumorpatienten und 16,7% der gesunden Kontrollen. Diese Differenz erwies sich als statistisch nicht signifikant, ebensowenig unterschieden sich die Methylierungslevel beider Gruppen signifikant.

#### **4.2.5 Methylierungsstatus von PTGS-2**

Das Gen *PTGS2* (*Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2*) kodiert für das gleichnamige bzw. synonym als Cyclooxygenase 2 (COX-2) bezeichnete Enzym, das Schlüsselenzym der Prostaglandin-Biosynthese. Es ist bekannt, dass die Expression der COX-2 u.a. methylierungsabhängig reguliert wird; die Überexpression wirkt Apoptose-inhibierend und begünstigt die Karzinogenese, beispielsweise kolorektaler Tumoren (Toyota et al., 2000). Andererseits wurde die Hypermethylierung des *PTGS2*-Promotors mit konsekutiv erniedrigter Expression bei Subgruppen gastrointestinaler Karzinome, des Mamma- sowie des Prostata-Karzinoms nachgewiesen (Bastian et al., 2007; Chow et al., 2005; Yu et al., 2003). Es gibt Hinweise dafür, dass sich der hypermethylierte *PTGS2*-Promotor gemeinsam mit weiteren Promotoren im Serum als Biomarker beim Prostatakarzinom eignen könnte (Costa et al., 2007; Ellinger et al., 2008b). Costa et al. (2007) fanden bei Nierentumoren ein signifikant höheres Methylierungslevel im *PTGS2*-

Promotor verglichen mit gesundem Gewebe; eine diesbezügliche Untersuchung an Serumproben Nierentumorkranker fand bisher nicht statt. In der vorliegenden Arbeit fanden sich bei 22,9% der Tumorpatienten entsprechende Methylierungen im Serum, demgegenüber ebenso bei 3,7% der Gesunden. Dies ist, wie auch die bei Tumorpatienten erhöhte Methylierungsrate gegenüber Gesunden, statistisch signifikant.

#### **4.2.6 Methylierungsstatus von RAR- $\beta$**

Das in dieser Arbeit untersuchte Gen *RAR- $\beta$*  (*Retinoid Acid Receptor  $\beta$* ) steht unter Verdacht, ein Tumorsuppressorgen zu sein; es kodiert für einen nukleären Retinsäure-Rezeptor, über den Retinoide Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Aus tierexperimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass Retinoide karzinogene Prozesse supprimieren können. Generell gibt es drei Subtypen der Retinsäure-Rezeptoren ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), wobei jedoch der Subtyp  $\beta$ , und von dessen drei Isoformen wiederum die Isoform  $\beta 2$  die von humanen Zellen in erster Linie exprimierte Form darstellt (Liu et al., 2005). Bei verschiedenen Tumorentitäten fand sich bisher eine verminderte Expression des Gens, so bei Tumoren von Lunge, Brust und Ösophagus. Untersuchungen an Nierentumoren fanden Hypermethylierungen in 0 bis 53% der Fälle, Hoque et al. (2004) fanden dies bei 6% der untersuchten entsprechenden Serumproben. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich bei 40% der Serumproben Tumorkranker und bei 14,8% der Proben Gesunder entsprechende Methylierungen. Diese Differenz erreichte das Signifikanzniveau, ebenso stellte sich anhand der Methylierungsrate heraus, dass der *RAR- $\beta$* -Promotor bei Tumorkranken zu einem signifikant höheren Anteil methyliert ist.

#### **4.2.7 Methylierungsstatus von RASSF1A**

Das auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 lokalisierte Tumorsuppressorgen *RASSF1* (*Ras-association domain family 1*) befindet sich in enger Nachbarschaft zu einer Reihe weiterer vermutlicher Tumorsuppressorgene in einer genetischen Region, die häufig bereits in sehr frühen Stadien verschiedener Tumorerkrankungen von Verlusten einzelner Allele oder homozygoten Deletionen betroffen ist (Hesson et al., 2007b). Das Gen führt über alternatives Splicing und Nutzung verschiedener Promotoren zu insgesamt sieben bekannten Transkripten (*RASSF1A-G*), von denen *RASSF1A* und *RASSF1C* die häufigsten sind. Bei einer großen Zahl von Tumorentitäten lässt sich eine durch CpG-Insel-Methylierung unterdrückte Expression von *RASSF1A* (nicht jedoch von

*RASSF1C*) nachweisen; dieses Gen ist nach bisherigen Beschreibungen eines der bei Krebs am häufigsten von Methylierungen betroffenen Gene. Beschrieben ist dies u.a. für klein- und großzellige Bronchialkarzinome, Tumoren von Mamma, Blase, Niere, Nasopharynx, Hoden, Medulloblastome, Neuroblastome und HCC (Hesson et al., 2007a; Horiguchi et al., 2003). Untersuchungen an Nierentumoren ergaben Methylierungen an dem entsprechenden Promotor in 28 bis 91% der Fälle, Hoque et al. (2004) fanden diese in 11% ihrer untersuchten Serumproben. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ergaben sich Methylierungen bei 22,9% der Patienten gegenüber 1,9% der Gesunden, was einem signifikanten Unterschied entspricht. Gleiches gilt auch für die Methylierungsrate, die bei Tumorkranken höher als bei Gesunden ist.

#### **4.2.8 Methylierungsstatus von *TIG1***

Das Gen *TIG1* (*Tazarotene-induced gene 1*) wurde ursprünglich nachgewiesen in Zellen der Haut, wo seine Expression durch das synthetische Retinoid Tazaroten induziert werden konnte (Nagpal et al., 1996). Seither gilt es als eines der Zielgene von Retinoiden, die vielfältige Einflüsse auf Zelldifferenzierung und Zellproliferation ausüben. Später konnte seine Rolle als wahrscheinliches Tumorsuppressorgen im Zusammenhang mit methylierungsbedingter verminderter Expression u.a. beim Prostata-, Bronchial-, Nasopharynxkarzinom sowie Kopf-Hals-Tumoren und aufgedeckt werden (Kwong et al., 2005; Lotan, 2002; Jing et al., 2002). Im Zusammenhang mit Nierentumoren erfolgte bisher keine Untersuchung von *TIG1* auf verminderte Expression bzw. Promotormethylierung. In der vorliegenden Arbeit konnten im Blutserum von 34,3% der Tumorkranken sowie im Serum von 14,8% der Gesunden methylierte Abschnitte des *TIG1*-Promotors nachgewiesen werden, was sich als statistisch signifikanter Unterschied herausstellte. Der Grad der Methylierung anhand der Methylierungsrate zeigte einen ähnlichen Trend, der jedoch mit  $p=0,079$  nicht das Signifikanzniveau erreichte.

#### **4.2.9 Methylierungsstatus von *TIMP3***

Die Familie der *TIMP* (*Tissue inhibitor of metalloproteinase*)-Gene besteht aus den Genen *TIMP1* bis *TIMP4*. Sie kodieren jeweils für Proteine, die inhibitorisch auf Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wirken. Im Rahmen der Progression von Tumoren kann häufig eine erhöhte Expression von Metalloproteinasen bei erniedrigter Expression der

*TIMP* nachgewiesen werden. Die damit erhöhte allgemeine proteolytische Aktivität soll zum Tumorwachstum sowie dessen Angiogenese, Invasion und Metastasierung beitragen. Umgekehrt ist zu beobachten, dass die Überexpression von *TIMP* diese Vorgänge supprimieren und Apoptose induzieren kann. Eine durch Promotormethylierung verminderte Expression von *TIMP3* konnte bisher in verschiedenen Tumoren bzw. deren Zelllinien nachgewiesen werden, u.a. von Lunge, Mamma, Kolon, Niere, Ösophagus und Magen (Liu et al., 2007; Bachman et al., 1999; Gu et al., 2008). In Untersuchungen an Nierentumoren fanden sich in 58 bis 78% der Fälle Methylierungen im *TIMP3*-Promotor, in Serumuntersuchungen von Hoque et al. (2004) in 17% der Fälle. In dieser Arbeit konnten an dieser Stelle bei 57,1% der Serumproben Kranker sowie 38,9% der Serumproben Gesunder Methylierungen nachgewiesen werden. Diese Differenz ist mit  $p=0,091$  als nicht signifikant zu beurteilen; gleiches gilt für das Methylierungslevel.

### 4.3 Diagnostische Aussagen

Es wurden ROC-Analysen durchgeführt, die der Ermittlung von Grenzwerten dienen, anhand derer die Unterscheidung zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden mit der maximal möglichen Sensitivität und Spezifität gelingt.

Weiterhin wurde untersucht, ob Menge, Größe und Methylierungsmuster der untersuchten DNA-Abschnitte eine Korrelation zu festgelegten klinisch-pathologischen Parametern (Alter, Geschlecht, Symptomatik, Histologie und Differenzierungsgrad, TNM-Stadium, Infiltration der Nebenniere, Tumorthrombus) aufweisen.

#### **4.3.1 Diagnose anhand der DNA-Menge und -Integrität**

Der Vergleich der Ergebnisse für die Fragmente *ACTB-106*, *ACTB-384* sowie die DNA-Integrität zeigt, dass die höchste diagnostische Spezifität (81,5%) mittels der Bestimmung von *ACTB-384* erreicht werden konnte. Hier war ebenfalls die Fläche unter der Kurve am größten, d.h. *ACTB-384* bot von den betrachteten drei Parametern die höchste Testgenauigkeit. Die Sensitivität war hier mit 57,1% gering, d.h. bei der Verwendung als diagnostischer Test resultiert eine große Zahl falsch-negativer Ergebnisse. Dennoch zeigt sich, dass *ACTB-384* von den untersuchten Parametern am besten zur Unterscheidung krank/gesund geeignet ist.

Die Betrachtung der DNA-Integrität lieferte mit 74,3% eine zwar höhere Sensitivität bei einer allerdings niedrigen Spezifität (63%) und einer AUC von nur 0,63; hiermit können entsprechend nur sehr eingeschränkt diagnostische Aussagen getroffen werden.

Die Betrachtung von *ACTB-106* schließlich nahm eine Zwischenstellung ein; sowohl Sensitivität (68,6%) als auch Spezifität (70,4%) waren mäßig bei einer AUC von 0,69.

In der Zusammenschau mit den hier betrachteten klinisch-pathologischen Parametern sind einige Auffälligkeiten hervorzuheben:

- Beim Vergleich der Geschlechter fand sich signifikant mehr kleinfragmentäre freie DNA (*ACTB-106*) bei gesunden Männern als bei gesunden Frauen. Ein solcher geschlechterspezifischer Unterschied ist in der internationalen Literatur bisher nicht publiziert (Zhong et al., 2007).
- Bei Patienten mit gesicherten Fernmetastasen (n=3) sowie bei Patienten mit Infiltration der Nebenniere (n=2) ließ sich signifikant mehr kleinfragmentäre, bei letzteren auch signifikant mehr großfragmentäre DNA im Serum nachweisen.
- Die DNA-Integrität war im Zusammenhang mit vorhandenen Tumorthromben in der V. cava inferior (n=5) signifikant erniedrigt gegenüber den Fällen ohne Thrombus.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl lassen sich aus den beiden zuletzt dargestellten Punkten keine verallgemeinernden Aussagen ableiten. Die Klärung der Frage, inwieweit den untersuchten Parametern über die diagnostische Bedeutung hinaus auch eine prognostische Bedeutung zukommen könnte, bleibt künftigen Untersuchungen vorbehalten.

#### **4.3.2 Diagnose anhand der Methylierungslevel**

ROC-Analysen wurden ebenfalls für die ermittelten Methylierungslevel der jeweiligen Promotoren durchgeführt. Davon ausgenommen wurden *p16*, *TIG1* und *TIMP3*, da sich bei diesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden ergaben. Es stellte sich heraus, dass die Betrachtung einzelner Genloki jeweils eine hohe bis sehr hohe Spezifität (85,2 bis 100%) bei allerdings niedriger Sensitivität (14,3 bis 54,3%) ergab. Die AUC war mit 0,72 bei *APC* am höchsten, am niedrigsten bei *GSTP1* und *p14* (jeweils 0,57). *APC* stellt in diesem Zusammenhang also den

geeignetsten diagnostischen Parameter dar; es ermöglicht die Diagnosestellung mit 90%iger Spezifität (siehe Tabelle 9).

Die kombinierte Betrachtung der Methylierung an zwei Genorten im Sinne einer „oder“-Verknüpfung ermöglichte die Steigerung der Sensitivität bis maximal 74,3% zuungunsten der Spezifität. Dies gelang für die Kombination von *APC* mit *GSTP1*, *PTGS2* und *RAR-β*. Die Kombination *APC/RAR-β* erbrachte hier die günstigsten Ergebnisse (Sensitivität 74,3%, Spezifität 77,8%, AUC 0,76).

Festzuhalten bleibt ferner, dass die in diese Untersuchung einbezogenen klinisch-pathologischen Parameter durchweg keine Korrelation zu den ermittelten Methylierungslevels zeigten. Die einzige Ausnahme bildet die Methylierung am *APC*-Promotor in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Bei Tumoren des Stadiums pT3 (n=11) ließ sich an dieser Stelle ein signifikant höherer Methylierungsgrad der freien DNA nachweisen als bei Tumoren des Stadium pT1 (n=22); dies entspricht einem höheren Anteil tumorspezifischer DNA im Serum bei pT3-Tumoren. Eine mögliche Erklärung ist die höhere Tumormasse bei diesen Patienten und die daraus folgende höhere DNA-Freisetzung aus dem Tumor. Insofern erscheint es möglich, dass der Frage nach Methylierung im *APC*-Gen eine prognostische Bedeutung zukommen könnte, was jedoch weiterer Klärung bedarf.

#### **4.3.3 Bewertung**

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann zusammenfassend geschlossen werden, dass die Quantifizierung der zellfreien Serum-DNA und die Analyse ihrer Methylierungsmuster Potential in der Diagnostik von Nierentumoren besitzt. Die Resultate zeigen, dass Nierentumorpatienten eine größere Menge freier Serum-DNA aufweisen, die außerdem an sechs der untersuchten neun Genorte zu einem höheren Anteil methyliert ist. Die ermittelten diagnostischen Parameter Sensitivität, Spezifität und AUC lassen es zwar ganz allgemein nicht zu, hier von einem „idealen“ Biomarker zu sprechen, nichtsdestotrotz sind die Ergebnisse in Anbetracht des Fehlens eines entsprechenden Tumormarkers beachtenswert.

Zur weiteren Klärung und Überprüfung weiterer Genorte auf ihre Eignung als Marker bedarf es jedoch künftiger Untersuchungen. Auch blieben in der vorliegenden Arbeit Patienten mit anderweitigen chronischen Erkrankungen ausgespart. In früheren

Untersuchungen zeigte sich, dass auch bei diesen erhöhte Mengen freier DNA nachgewiesen werden können; dies sollte in künftigen Untersuchungen Beachtung finden. Auch erscheint es sinnvoll, entsprechende Untersuchungen hinsichtlich möglicher prognostischer Aussagen durchzuführen, wie dies u.a. bei Tumoren von Blase und Prostata bereits geschehen ist (Ellinger et al., 2008a; Ellinger et al., 2008d).

#### 4.4 Hinweise auf die Herkunft der freien DNA

Es wurde bereits beschrieben, dass der Großteil der detektierten freien DNA bei den hier untersuchten Nierentumorpatienten aus nekrotischen Vorgängen hervorzugehen scheint. Plausibel kann dies erklärt werden beispielsweise durch den in schnell wachsenden Tumoren generell gesteigerten Zelluntergang (Jahr et al., 2001). Ergänzt werden muss aber, dass – wie anhand der Methylierungsratio zu erkennen ist – im Mittel nur ein sehr geringer Anteil der freien DNA (abhängig vom Genlokus zwischen 0,02 und 7,1 Prozent) methyliert und somit als tumorspezifisch zu werten ist. Hieraus muss der Schluss gezogen werden, dass die Nukleinsäuren nur zu einem geringen Teil aus den Tumorzellen selbst freigesetzt werden, der weitaus größte Anteil hingegen aus anderen Zellen. Hier ist vor allem an Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors zu denken, die infolge der durch Tumorstadium und -infiltration entstehenden Hypoxie geschädigt werden (Jahr et al., 2001). Als Erklärung für Fälle, in denen vorwiegend apoptotische DNA gefunden wird, werden unter anderem proapoptische Zytokine, die von den Krebszellen freigesetzt werden, diskutiert (Ellinger et al., 2008d). Wie bereits einleitend dargestellt (siehe 1.2.1), sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch weitestgehend unklar, sodass diesbezüglich vieles spekulativ bleiben muss.

Abschließend muss außerdem darauf hingewiesen werden, dass neben der in dieser Arbeit untersuchten DNA genomischen Ursprungs im Serum ebenfalls mitochondriale DNA detektiert werden kann, die derzeit auch auf ihre Eignung als Biomarker untersucht wird (Ellinger et al., 2008e; Ellinger et al., 2009b).

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde frei im Serum zirkulierende DNA auf ihre Eignung als Biomarker in der Diagnostik des Nierenzellkarzinoms untersucht.

Hierzu wurde die DNA aus den Serumproben von 35 Patienten mit histologisch gesichertem Nierenzellkarzinom sowie von 54 gesunden Probanden isoliert. Mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR wurden die Mengen zirkulierender kleiner (*ACTB-106*, 106 bp) sowie großer (*ACTB-384*, 384 bp) DNA-Fragmente bestimmt. Aus dem Verhältnis beider Größen wurde die Integrität der freien DNA ermittelt. Sowohl kleine ( $p=0,003$ ) als auch große Fragmente ( $p=0,0003$ ) wurden bei den Tumorpatienten in signifikant höherer Menge nachgewiesen als bei den gesunden Probanden. Die Integrität der DNA zeigte sich mit  $p=0,04$  bei Tumorpatienten ebenfalls signifikant erhöht, was als Hinweis auf einen vorwiegend nekrotischen Ursprung der freien DNA gewertet werden kann. Die Konzentration von *ACTB-384* unterschied mit einer Spezifität von 81,5% zwischen Tumor- und gesunden Patienten und erwies sich in ROC-Analysen gegenüber *ACTB-106* und der DNA-Integrität bei höchster AUC als genauester diagnostischer Parameter (Sensitivität 57,1%). Die Integrität zeigte eine höhere Sensitivität (74,3%) bei allerdings niedriger Spezifität und AUC.

Mit Hilfe methylierungssensitiver PCR wurde die freie DNA außerdem auf Hypermethylierungen in den Promotoren neun ausgewählter Gene untersucht. Es zeigte sich, dass die DNA bei Tumorpatienten an den Genorten *APC*, *GSTP1*, *p14*, *PTGS2*, *RAR- $\beta$* , *RASSF1A*, nicht jedoch bei *TIG1*, *p16* und *TIMP3* zu einem signifikant höheren Anteil methyliert war als bei den Gesunden. Die Betrachtung der Methylierungslevel an diesen Genorten ermöglichte jeweils eine spezifische Diagnose (85,2-100%) bei allerdings eingeschränkter Sensitivität (14,3-54,3%). Das Methylierungslevel an *APC* erwies sich in diesem Zusammenhang als geeignetster diagnostischer Parameter.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten zusammenfassend darauf hin, dass die zellfreie Serum-DNA Potential als Biomarker in der Diagnostik des Nierenzellkarzinoms besitzt. Zur weiteren Evaluation sind jedoch künftige Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven und insbesondere unter Berücksichtigung von Patienten, die an chronischen nicht-malignen Erkrankungen leiden, notwendig.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms (UICC/AJCC, 2002) .....	15
Tabelle 2: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC.....	16
Tabelle 3: Methylierungsstatus der untersuchten Gene beim Nierenzellkarzinom .....	25
Tabelle 4: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer .....	32
Tabelle 5: Klinisch-pathologische Daten .....	34
Tabelle 6: Methylierungspositive Fälle .....	54
Tabelle 7: Methylierungslevel.....	56
Tabelle 8: ROC-Analysen für ACTB-106, ACTB-384 und die DNA-Integrität.....	59
Tabelle 9: ROC-Analysen der Methylierungslevel.....	60
Tabelle 10: ROC-Analysen bei kombinierter Betrachtung.....	60

### 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise der Restriktionsenzyme .....	38
Abbildung 2: Hemmung der Restriktionsenzyme durch Methylierungen.....	38
Abbildung 3: Lage von Groß- und Kleinfragment im ACTB-Gen.....	39
Abbildung 4: Promotorregionen der untersuchten Gene.....	41
Abbildung 5: PCR.....	43
Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse.....	45
Abbildung 7: Standardgerade.....	46
Abbildung 8: Gelelektrophorese.....	48
Abbildung 9: Konzentrationen der kleinen ( <i>ACTB-106</i> ) und großen ( <i>ACTB-384</i> ) DNA-Fragmente.....	52
Abbildung 10: DNA-Integrität der beiden Untersuchungsgruppen.....	53
Abbildung 11: Methylierungsstatus.....	55
Abbildung 12: ROC-Kurven.....	58
Abbildung 13: ROC-Kurven der Methylierungslevel.....	61
Abbildung 14: ROC-Kurven bei kombinierter Betrachtung.....	62

## 7 Literaturverzeichnis

1. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 18: 65-73
2. Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int.J.Cancer* 2006; 119: 288-296
3. Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res.* 1999; 59: 798-802
4. Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Tsukazaki K, Aoki D. Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. *Oncol.Rep.* 2006; 16: 1189-1196
5. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Müller SC, von Ruecker A. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin.Cancer Res.* 2005a; 11: 4097-4106
6. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, Eisenberger MA, Partin AW, Nelson WG. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin.Cancer Res.* 2005b; 11: 4037-4043

7. Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC, Kahl P, Müller SC, von Rucker A. Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur.Urol.* 2007; 51: 665-674
8. Battagli C, Uzzo RG, Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Krassenstein R, Al Saleem T, Greenberg RE, Cairns P. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Res.* 2003; 63: 8695-8699
9. Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jager D, Hohenfellner M. [Paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma]. *Urologe A* 2007; 46: 45-48
10. Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, Henske EP. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am.J.Pathol.* 1996; 149: 1201-1208
11. Boecker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie.* München: Elsevier, 2004
12. Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rodl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakitstha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Storkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.* 2000; 60: 1942-1948
13. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.* 2003; 27: 612-624
14. Chiu BC, Gapstur SM, Chow WH, Kirby KA, Lynch CF, Cantor KP. Body mass index, physical activity, and risk of renal cell carcinoma. *Int.J.Obes.(Lond)* 2006; 30: 940-947

15. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999; 281: 1628-1631
16. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, Jarvholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N.Engl.J.Med.*2000; 343: 1305-1311
17. Chow LW, Zhu L, Loo WT, Lui EL. Aberrant methylation of cyclooxygenase-2 in breast cancer patients. *Biomed.Pharmacother.* 2005; 59 Suppl 2: S264-S267
18. Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Kollermann J, Miller K, Schrader M. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications. *Clin.Cancer Res.* 2006; 12: 5040-5046
19. Chung WB, Hong SH, Kim JA, Sohn YK, Kim BW, Kim JW. Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cancer cell lines. *J.Korean Med.Sci.* 2001; 16: 756-761
20. Costa VL, Henrique R, Jeronimo C. Epigenetic markers for molecular detection of prostate cancer. *Dis.Markers* 2007; 23: 31-41
21. Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN. Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. *Pathology* 2007; 39: 459-465
22. Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU.Int.* 2000; 86: 20-27
23. Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zbarovsky ER. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome

3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; 98: 7504-7509

24. Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, Al Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, Babb JS, Grizzle WE, Cairns P. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10: 3972-3979
25. Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, Matthews S, Cubukluoz F, Kahl P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J.Urol.* 2008a; 179: 346-352
26. Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R, Mueller SC, von Ruecker A. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int.J.Cancer* 2008b; 122: 138-143
27. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2008c; 68: 42-49
28. Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Buttner R, Müller SC, Ruecker AV. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity. *Cancer Lett.* 2008d; 264: 274-280
29. Ellinger J, Müller SC, Wernert N, von Ruecker A, Bastian PJ. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy. *BJU.Int.* 2008e; 102: 628-632
30. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, Perabo FG, Mueller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer. *J Urol.* 2009a; 181: 363-371

31. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU.Int.* 2009b; 104: 48-52
32. Ellinger J, Albers P, Perabo FG, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. CpG island hypermethylation of cell-free circulating serum DNA in patients with testicular cancer. *J Urol.* 2009c; 182: 324-329
33. 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.* 1998; 58: 4515-4518
34. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* 2000a; 60: 4366-4371
35. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N.Engl.J.Med.* 2000b; 343: 1350-1354
36. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-5440
37. Esteller M, Cordon-Cardo C, Corn PG, Meltzer SJ, Pohar KS, Watkins DN, Capella G, Peinado MA, Matias-Guiu X, Prat J, Baylin SB, Herman JG. p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res.* 2001a; 61: 2816-2821
38. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001b; 61: 3225-3229

39. European Association of Urology (EAU), 2009: Guidelines on Renal Cell Carcinoma. [http://www.uroweb.org/fileadmin/tx\\_eauguidelines/2009/Full/RCC.pdf](http://www.uroweb.org/fileadmin/tx_eauguidelines/2009/Full/RCC.pdf) (Zugriffsdatum: 27.06.2009)
40. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.* 1982; 6: 655-663
41. Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Ross RK, Yu MC. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* 1999; 81: 542-548
42. Gonzalga ML, Yegnasubramanian S, Yan G, Rogers CG, Nicol TL, Nelson WG, Pavlovich CP. Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis. *Clin.Cancer Res* 2004; 10: 7276-7283
43. Gu P, Xing X, Tanzer M, Rocken C, Weichert W, Ivanauskas A, Pross M, Peitz U, Malfertheiner P, Schmid RM, Ebert MP. Frequent loss of TIMP-3 expression in progression of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Neoplasia* 2008; 10: 563-572
44. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995; 55: 4525-4530
45. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N.Engl.J.Med.* 2003; 349: 2042-2054
46. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis.Markers* 2007a; 23: 73-87
47. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. *Oncogene* 2007b; 26: 7283-7301

48. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 1993; 11: 1026-1030
49. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, Califano JA, Sidransky D. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 5511-5517
50. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, Mori M, Saito N. Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 2003; 22: 7862-7865
51. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103: 1635-1640
52. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 1659-1665
53. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, Koch W, Sidransky D, Califano J. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int.J.Cancer* 2006; 119: 2673-2676
54. Jing C, El Ghany MA, Beesley C, Foster CS, Rudland PS, Smith P, Ke Y. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity. *J.Natl.Cancer Inst.* 2002; 94: 482-490

55. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat.Rev.Genet.* 2002; 3: 415-428
56. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, Okada Y. Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. *Urology* 2003; 61: 226-230
57. Koecke HU, Emschermann P, Haerle E. *Biologie*. Stuttgart: Schattauer, 2000
58. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med.* 2006; 27: 95-125
59. Kwong J, Lo KW, Chow LS, Chan FL, To KF, Huang DP. Silencing of the retinoid response gene TIG1 by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Int.J.Cancer* 2005; 113: 386-392
60. Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinie V, Letourneux H, Meyer N, Martin M, Jacqmin D. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. *Cancer* 2005; 103: 625-629
61. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat.Rev.Cancer* 2003; 3: 253-266
62. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37: 646-650
63. Lindblad P, Wolk A, Bergstrom R, Persson I, Adami HO. The role of obesity and weight fluctuations in the etiology of renal cell cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1994; 3: 631-639

64. Liu Z, Zhang L, Ding F, Li J, Guo M, Li W, Wang Y, Yu Z, Zhan Q, Wu M, Liu Z. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor-beta(2) demethylation and growth inhibition in esophageal squamous carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2005; 230: 271-283
65. Liu MC, Choong DY, Hooi CS, Williams LH, Campbell IG. Genetic and epigenetic analysis of the TIMP-3 gene in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2007; 247: 91-97
66. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003; 361: 2059-2067
67. Lotan R. Is TIG1 a new tumor suppressor in prostate cancer? *J.Natl.Cancer Inst.* 2002; 94: 469-470
68. Lukkonen A, Lintula S, von Boguslawski K, Carpen O, Ljungberg B, Landberg G, Stenman UH. Tumor-associated trypsin inhibitor in normal and malignant renal tissue and in serum of renal-cell carcinoma patients. *Int.J.Cancer* 1999; 83: 486-490
69. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.* 1948; 142: 241-243
70. McLaughlin JK, Mandel JS, Blot WJ, Schuman LM, Mehl ES, Fraumeni JF Jr. A population--based case--control study of renal cell carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 1984; 72: 275-284
71. McLaughlin JK, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 115-123
72. Molina AM, Motzer RJ. Current algorithms and prognostic factors in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Clin.Genitourin.Cancer* 2008; 6: s7-s13

73. Morris MR, Hesson LB, Wagner KJ, Morgan NV, Astuti D, Lees RD, Cooper WN, Lee J, Gentle D, Macdonald F, Kishida T, Grundy R, Yao M, Latif F, Maher E.R. Multigene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 6794-6801
74. Morrissey C, Martinez A, Zatyka M, Agathangelou A, Honorio S, Astuti D, Morgan NV, Moch H, Richards FM, Kishida T, Yao M, Schraml P, Latif F, Maher ER. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 7277-7281
75. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 1996; 335: 865-875
76. Murai M, Oya M. Renal cell carcinoma: etiology, incidence and epidemiology. *Curr.Opin.Urol.* 2004; 14: 229-233
77. Nagpal S, Patel S, Asano AT, Johnson AT, Duvic M, Chandraratna RA. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1), a novel retinoic acid receptor-responsive gene in skin. *J.Invest Dermatol.* 1996; 106: 269-274
78. Ohno T, Hiraga J, Ohashi H, Sugisaki C, Li E, Asano H, Ito T, Nagai H, Yamashita Y, Mori N, Kinoshita T, Naoe T. Loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression is a favorable prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma. *Int.J.Hematol.* 2006; 83: 341-347
79. Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J. Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. *Rev.Urol.* 2002; 4: 163-170
80. Pan SY, Desmeules M, Morrison H, Wen SW. Obesity, high energy intake, lack of physical activity, and the risk of kidney cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15: 2453-2460

81. Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF, Leibovich BC, Cantor KP. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am.J.Epidemiol.* 2004; 159: 42-48
82. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, De La,Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Guille F, Chopin DK, Mulders PF, Wood CG, Swanson DA, Figlin RA, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 2763-2771
83. Peters I, Vaske B, Albrecht K, Kuczyk MA, Jonas U, Serth J. Adiposity and age are statistically related to enhanced RASSF1A tumor suppressor gene promoter methylation in normal autopsy kidney tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16: 2526-2532
84. Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Tjonneland A, Halkjaer J, Overvad K, Klipstein-Grobusch K, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Benetou V, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Monninkhof E, Peeter PH, Bueno-de-Mesquita HB, Buchner FL, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, Gonzalez CA, Dorronsoro M, Gurrea AB, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Kaaks R, Norat T, Slimani N, Riboli E. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int.J.Cancer* 2006; 118: 728-738
85. Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk.Lymphoma* 2007; 48: 1472-1481
86. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin: Robert Koch-Institut, 2008

87. Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005; 102: 5905-5908
88. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat.Rev.Genet.* 2000; 1: 11-19
89. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp.Cell Res.* 2001; 264: 42-55
90. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol.Biol.* 2000; 132: 365-386
91. Schips L, Dalpiaz O, Lipsky K, Langner C, Rehak P, Puerstner P, Pummer K, Zigeuner R. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin in renal cell carcinoma patients compared to a control group. *Eur.Urol.* 2007; 51: 168-173
92. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-2120
93. Singh KJ, Singh SK, Suri A, Vijjan V, Goswami AK, Khullar M. Serum ferritin in renal cell carcinoma: effect of tumor size, volume grade, and stage. *Indian J.Cancer* 2005; 42: 197-200
94. Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80: 987-989

95. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J.Clin.Invest* 1966; 45: 1732-1740
96. Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res.* 2000; 60: 4044-4048
97. Tunuguntla HS, Jorda M. Diagnostic and prognostic molecular markers in renal cell carcinoma. *J.Urol.* 2008; 179: 2096-2102
98. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DS. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J.Clin.Oncol.* 2006; 24: 4270-4276
99. van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeneij LA, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study. *Am.J.Epidemiol.* 2004; 160: 1159-1167
100. van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeneij LA, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Vegetable and fruit consumption and risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands cohort study. *Int.J.Cancer* 2005; 117: 648-654
101. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW, Shih IeM. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003; 63: 3966-3968
102. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Lahmann PH, Arvaniti A, Kassapa C, Trichoupoulou A, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, van Gils CH, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Buchner FL, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, Wirfald E, Pera G, Dorronsoro

- M, Gurrea AB, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Allen N, Roddam A, Bingham S, Jenab M, Slimani N, Norat T, Riboli E. Fruits and vegetables and renal cell carcinoma: findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int.J.Cancer* 2006; 118: 3133-3139
103. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Trichopoulou A, Mountokalakis T, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Verschuren WM, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, Gonzalez CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Allen N, Roddam A, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Ferrari P, Norat T, Riboli E. Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am.J.Epidemiol.* 2008; 167: 438-446
104. Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik*. Berlin: Springer, 2008
105. Winqvist E, Knox J, Ayoub JP, Wood L, Wainman N, Reid GK, Pearce L, Shah A, Eisenhauer E. Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group investigational new drug study. *Invest New Drugs* 2006; 24: 159-167
106. Wolk A, Gridley G, Niwa S, Lindblad P, McCredie M, Møller A, Mandel JS, Wahrendorf J, McLaughlin JK, Adami HO. International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int.J.Cancer* 1996; 65: 67-73
107. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin.Chim.Acta* 2002; 321: 77-87
108. Yang XJ, Tan MH, Kim HL, Ditlev JA, Betten MW, Png CE, Kort EJ, Futami K, Furge KA, Takahashi M, Kanayama HO, Tan PH, Teh BS, Luan C, Wang K, Pins

- M, Tretiakova M, Anema J, Kahnoski R, Nicol T, Stadler W, Vogelzang NG, Amato R, Seligson D, Figlin R, Belldegrun A, Rogers CG, Teh BT. A molecular classification of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65: 5628-5637
109. Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int.J.Cancer* 2001; 94: 212-217
110. Yu MC, Mack TM, Hanisch R, Cicioni C, Henderson BE. Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 1986; 77: 351-356
111. Yu J, Leung WK, Lee TL, Tse PC, To KF, Sung JJ. Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 in gastric carcinoma. *Int.J.Oncol.* 2003; 22: 1025-1031
112. Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T, Tibshirani R, Brooks JD. Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS.Med.* 2006; 3: e13
113. Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann Hematol.* 2007; 86: 139-143

## 8 Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Müller danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Jörg Ellinger und Herrn Dr. med. Stefan Hauser für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die geduldige Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die jederzeitige Ansprechbarkeit und Hilfestellung bei Problemen.

Frau Doris Schmidt bin ich dankbar für die überaus nette Einarbeitung im Urologischen Labor, die allzeitige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit während des experimentellen Teils meiner Arbeit.

Herrn Dennis Otrebski und Frau Renate Hoven möchte ich als Außenstehenden für die Durchsicht der fertiggestellten Dissertation und ihre nützlichen Anregungen danken.

Meinen Eltern danke ich für die große Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit, ohne die der zügige Abschluss meines Studiums und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.