

Identifizierung und Charakterisierung neuer Biomarker für maligne Tumorerkrankungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Emily Eva van der Poel-Holmes

aus

Bonn

Bonn 2017

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1 Gutachter: Prof. Dr. Glen Kristiansen
2 Gutachter: Prof. Dr. Hubert Schorle
Tag der Promotion: 28.08.2017
Erscheinungsjahr: 2017

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Krebs im Allgemeinen.....	3
2.2. Prostatakrebs	4
2.2.1 Anatomie und Funktionen der Prostata.....	4
2.2.2 Histologie der Prostata und des Prostatakarzinoms.....	5
2.2.3 Molekularbiologie des Prostatakarzinoms.....	6
2.2.4 Diagnose und Behandlung des Prostatakarzinoms.....	7
2.3. Kopf- und Halstumore	10
2.3.1 Anatomie der Kopf- und Halstumoren.....	11
2.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren der Kopf- und Halstumore.....	12
2.3.3 Molekularbiologie der Kopf- und Halstumore	12
2.3.4 Diagnose und Behandlung der Kopf- und Halstumore	14
2.4. Biomarker	15
2.4.1 Immunohistochemische Biomarker	16
2.4.2 Epigenetische Biomarker & DNA-Methylierung	17
2.4.3 Methode der Bisulfit-Konversion	19
2.4.4 Nachweis epigenetischer Veränderungen mittels qRT-PCR	20
2.5. Untersuchte Gene	21
2.5.1 LIM-Homeobox 3 (LHX3)	21
2.5.2 Chemokin Rezeptor C-X-C Ligand 12 (CXCL12)	23
2.5.3 Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2)	24
2.5.4 <i>PITX2</i> adjacent noncoding RNA (<i>PANCR</i>)	25
2.5.5 Paired-like homeodomain transcription factor 3 (PITX3)	25
2.5.6 Programmed death-ligand 1 (PD-L1).....	26
2.6. Ziel der Arbeit.....	27
3. Material & Methoden	29
3.1. Material	29
3.1.1 Patientenmaterial und Kohorten	29
3.1.1.1 Fall-Kontroll-Studie Brustkrebs Patienten	29
3.1.1.2 Patientenkohorte Kopf- und Halstumoren.....	29
3.1.1.3 Patientenkohorten Prostatakarzinom	29
3.1.2 Materialien, Reagenzien, Geräte & Software	30
3.1.1 Bakterienstämme	30
3.1.2 Humane Zelllinien.....	30
3.1.3 Oligonukleotide	31
3.1.4 Plasmide	32
3.1.5 Antikörper und Enzyme.....	33
3.1.6 DNA und Protein Standards	33
3.1.7 Puffer	33
3.1.8 Kits	35
3.2. Methoden	35
3.2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	35

3.2.1.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E.coli</i> (TOP10F')	35
3.2.2	Arbeiten mit humanen Zellen	36
3.2.2.1	Kultivieren humaner Zelllinien	36
3.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	36
3.2.2.3	Einfrieren und Auftauen humaner Zelllinien	36
3.2.2.4	Androgenrezeptor Stimulation	37
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	37
3.2.3.1	Isolation von Plasmid-DNA	37
3.2.3.2	Isolation und Bisulfit Konversion von DNA	37
3.2.3.3	Isolation von RNA & cDNA Synthese	37
3.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	38
3.2.3.5	Blockcycler Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
3.2.3.6	Real-time PCR	39
3.2.3.7	Auswertung & Berechnung der DNA-Methylierung	41
3.2.3.8	Bestimmung der PCR-Effizienz und mRNA-Expression	42
3.2.3.9	Agarosegelelektrophorese	42
3.2.3.10	TA-Klonierung	43
3.2.3.11	Restriktionsverdau	43
3.2.3.12	Sequenzierung	43
3.2.4	Biochemische Methoden	43
3.2.4.1	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	43
3.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.2.4.3	Western Blot	44
3.2.4.4	Entfernen der Antikörper ("Strippen")	44
3.2.5	TMA Konstruktion und Analyse	45
3.2.5.1	<i>Tissue Microarray</i> (TMA) Konstruktion	45
3.2.5.2	Immunhistochemie Färbung und Auswertung	45
3.2.6	Statistische Methoden	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Assay Entwicklung und Validierung	47
4.1.1	Design des qRT-PCR Assays für den Kitvergleich	47
4.1.2	Design und Validierung der methylierungsspezifischen qRT-PCR Assays	48
4.1.3	Design und Validierung der mRNA qRT-PCR Assays	52
4.2.	Validierung der Bisulfit-Konversion	53
4.2.1	DNA-Ausbeute	54
4.2.2	Integrität, Stabilität und Reinheit der DNA	57
4.2.3	Effizienz und Spezifität der Konversion	59
4.2.4	Direkte Konversion	61
4.3.	Charakterisierung neuer Biomarker im Prostatakarzinom	63
4.3.1	Übersicht der Biomarker im Prostatakarzinom	63
4.3.2	<i>PITX3</i>	65
4.3.3	<i>CXCL12</i>	69
4.3.4	<i>PD-L1</i>	73
4.3.5	Kombination von <i>CXCL12</i> und <i>PD-L1</i>	80
4.4.	Charakterisierung neuer Biomarker in Kopf- & Halstumoren	81
4.4.1	Übersicht der Biomarker in Kopf- und Halstumoren	81

4.4.2	<i>CXCL12</i>	81
4.4.3	<i>PITX2, PITX3</i> und <i>PANCR</i>	83
5.	Diskussion	88
5.1.	Vergleich der Bisulfit-Konversion verschiedener Kits	88
5.2.	Neue Biomarker für Prostatakrebs	90
5.2.1	<i>PITX3</i>	91
5.2.2	<i>CXCL12</i>	92
5.2.3	<i>PD-L1</i>	95
5.2.4	Kombination von <i>CXCL12</i> und <i>PD-L1</i>	97
5.3.	Neue Biomarker für Kopf- und Halstumore	98
5.3.1	<i>CXCL12</i>	98
5.3.2	<i>PITX2, PITX3</i> und <i>PANCR</i>	100
6.	Ausblick	104
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Anhang	116
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	116
8.2.	Zusätzliche Daten	119
8.2.1	<i>LHX3, CXCL12</i> und <i>PITX3</i> in Brusttumoren	119
8.2.2	<i>LHX3</i> im Prostatakarzinom	120
8.2.3	<i>PITX3</i> im Prostatakarzinom	120
8.2.4	<i>CXCL12</i> im Prostatakarzinom	123
8.2.5	<i>PD-L1</i> im Prostatakarzinom	124
8.2.6	<i>CXCL12</i> in Kopf- und Halstumoren	126
8.2.7	<i>PITX2, PANCR</i> und <i>PITX3</i> in Kopf- und Halstumoren	128
9.	Danksagung	130
10.	Konferenzbeiträge & Publikationen	131
11.	Eidesstattliche Erklärung	133

Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab an folgenden Stellen veröffentlicht:

Sailer V, **Holmes EE**, Gevensleben H, Goltz D, Dröge F, Franzen A, Dietrich J, Kristiansen G, Bootz F, Schröck A, Dietrich D. *PITX3 DNA methylation is an independent predictor of overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Clinical Epigenetics, Clinical Epigenetics, 2017.

Gevensleben H*, **Holmes EE***, Goltz D*, Dietrich J, Sailer V, Ellinger J, Dietrich D, Kristiansen G. PD-L1 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients following radical prostatectomy. Oncotarget, 2016.

Sailer V*, **Holmes EE***, Gevensleben H, Goltz D, Dröge F, de Vos L, , Franzen A, Schröck F, Bootz F, Kristiansen G, Schröck A, Dietrich D. PITX2 and PANC2 DNA methylation predicts overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Oncotarget, 2016.

Holmes EE*, Goltz D*, Sailer V, Jung M, Meller S, Uhl B, Dietrich J, Röhler M, Ellinger J, Kristiansen G, Dietrich D. PITX3 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients after radical prostatectomy. Clinical Epigenetics, 2016.

Goltz D*, **Holmes EE***, Gevensleben H, Sailer V, Jung M, Röhler M, Meller S, Ellinger J, Kristiansen G, Dietrich D. CXCL12 promoter methylation and PD-L1 expression as prognostic biomarkers in prostate cancer patients. Oncotarget, 2016.

Holmes EE*, Jung M*, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, Mengdehl M, Garbe LA, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. PLoS One, 2014.

* geteilte Erstautorenschaft

1. Zusammenfassung

Die Therapieoptionen sowohl im Prostatakarzinom als auch in Tumoren des Kopf- und Halsbereichs sind limitiert und die Stratifizierung der Patienten in unterschiedliche Risiko- oder Therapiegruppen muss weiter verbessert werden. Daher wird die Identifikation und Charakterisierung neuer Biomarker dringend benötigt, um eine optimale Therapie für diese Patienten zu gewährleisten.

Zur Analyse von Methylierung-Biomarkern ist eine vorherige Bisulfitkonversion nötig. Um eine optimale Bisulfitkonversion zu gewährleisten, wurden neun kommerziell erhältliche Kits bezüglich ihrer Bisulfitkonversion getestet. Vor allem für den Einsatz von Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPET), der Hauptquelle für Patienten-DNA, mussten die Kits validiert werden. Die Kits wurden bezüglich ihrer Ausbeute, Degradierung und Reinheit der DNA, Effizienz der Konversion und Stabilität der konvertierten DNA bei verschiedenen Bedingungen verglichen. Dieser Vergleich gewährleistete eine optimale Konversion der DNA für die darauffolgenden Untersuchungen. Das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit (Analytik Jena) schnitt am besten ab, vor allem bei Einsatz von FFPET DNA, und wurde in allen weiteren Experimenten verwendet.

Im Folgenden wurden verschiedene Gene (*LHX3*, *CXCL12*, *PITX3*, *PITX2*, *PANCR* und *PD-L1*) ausgewählt und Methylierungs-spezifische qRT-PCR Assays entwickelt und validiert. Das Potential der DNA-Methylierung dieser Gene als Biomarker für Prostatakrebs und Tumore des Kopf- und Halsbereichs wurde in retrospektiven Kohortenstudien untersucht. Zudem wurde der Zusammenhang der Methylierung und der Expression untersucht, da diese Ergebnisse wichtige Informationen über das biologische Verständnis dieser Gene im Zusammenhang mit der Karzinogenese liefern können.

Die Ergebnisse zeigten, dass die *LHX3* DNA-Methylierung kein geeigneter Biomarker für Prostatakrebs und Tumore des Kopf- und Halsbereichs ist. Die anderen Gene (*CXCL12*, *PITX3*, *PITX2*, *PANCR* und *PD-L1*) zeigten alle einen prognostischen Wert. Diese Biomarker könnten somit für die Stratifizierung der Patienten nach der Operation verwendet werden, um beispielsweise zu entscheiden wie engmaschig die Verlaufskontrolle sein sollte oder ob bzw. wie aggressiv eine adjuvante Therapie gewählt werden sollte. Für die *CXCL12* DNA-Methylierung konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung auf Stanzbiopsien beim Prostatakarzinom möglich ist. Um die Biomarker weiter zu validieren wäre eine prospektive

Studie interessant, um zu klären ob diese Biomarker auch für eine Stratifizierung in unterschiedliche Therapiegruppen geeignet sind.

2. Einleitung

2.1. Krebs im Allgemeinen

Allgemein werden unter Krebs alle malignen (bösartigen) Neubildungen im Gewebe durch unkontrollierte Vermehrung von veränderten Zellen verstanden. Hierzu zählen nicht nur „klassische“ Karzinome epithelialer Herkunft, sondern auch Sarkome, Lymphome und Leukämien¹. Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Nach heutigem Stand werden im Laufe ihres Lebens rund 51 % der Männer und 43 % der Frauen an Krebs erkranken. Frauen haben hierbei eine niedrigere Inzidenzrate als Männer, sie erkranken jedoch im Schnitt früher. Etwa jede fünfte Frau und jeder vierte Mann wird an Krebs versterben. Zahlen aus dem Jahr 2012 zeigen, dass in Deutschland ca. 478.000 neue Krebserkrankungen diagnostiziert wurden. Rund die Hälfte der Diagnosen treten in folgenden Bereichen auf²: 70.200 Fälle in den Brustdrüsen, 63.700 Fälle in der Prostata, 62.200 Fälle im Darm und 52.200 Fälle in der Lunge.

In den letzten 15 Jahren ist die Anzahl der diagnostizierten Krebsfälle in Deutschland bei Männern und Frauen angestiegen. **Abbildung 2-1** zeigt die Häufigkeit der unterschiedlichen Krebserkrankungen in Deutschland. Im Gegensatz dazu ist die Sterberate, trotz steigender Inzidenz, gesunken. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, dass sich 30 % der Krebsfälle durch Vorbeugung verhindern ließen. Daher ist die weitere Forschung an Früherkennung, Vorsorge und personalisierter Therapie unerlässlich².

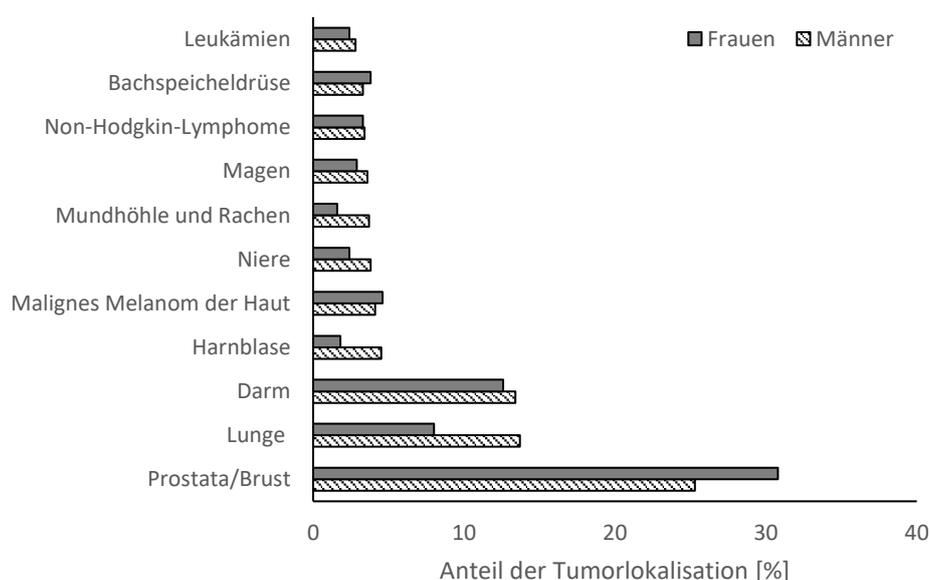


Abbildung 2-1: Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland² (modifiziert nach <http://www.krebsdaten.de/Krebs>).

Innerhalb dieser Arbeit wurden im besonderen Prostatakrebs und Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches untersucht. Daher wird auf diese beiden Entitäten im Weiteren noch einmal näher eingegangen.

2.2. Prostatakrebs

Das Prostatakarzinom ist in der westlichen Welt eine der häufigsten Todesursachen¹. In Deutschland ist es die häufigste Krebserkrankung allerdings nur die dritthäufigste Todesursache bei Männern². Die Erkrankung tritt in der Regel zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr auf³. Während in den letzten Jahren die Zahl der Neuerkrankungen gestiegen ist, ist die Sterberate leicht gesunken². Die relative 5-Jahre-Überlebensrate liegt bei 93 % und die Mehrzahl der Männer mit einem Prostatakarzinom werden nicht daran sterben². Im Folgenden wird auf die Anatomie, Histologie, Molekularbiologie sowie auf die Diagnose und Behandlung des Prostatakarzinoms näher eingegangen.

2.2.1 Anatomie und Funktionen der Prostata

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, gehört zu den Geschlechtsorganen des Mannes und ist eine in etwa kastaniengroße, exokrine Drüse innerhalb des männlichen Fortpflanzungsapparates. Eine gesunde Prostata eines erwachsenen Mannes wiegt zwischen 30 und 40 g. Sie liegt direkt unter der Harnblase und umschließt den oberen Teil der Harnröhre. In direkter Umgebung befinden sich zudem die Samenbläschen (**Abbildung 2-2**). Die Prostata wird in fünf Zonen eingeteilt^{4,5}:

- Die vordere Zone ist dünn, hat kaum Drüsen und besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und Muskulatur⁴.
- Die Umgebung der Harnröhre besteht nur aus wenig Gewebe, vor allem Muskulatur⁴.
- Die transitionale Zone (Übergangszone) ist der kleine Bereich vor und seitlich des Anfangsbereichs der Harnröhre⁴.
- Die zentrale Zone ist der Bereich rund um die beiden Spritzkanälchen⁴.
- Die periphere Zone ist der größte Teil der Prostata (in etwa 75 %). In diesem Bereich entstehen die meisten Prostatakarzinome (70-80 %)^{3,4}.

Die zentrale Funktion der Prostata ist die Bildung eines Sekrets, bestehend aus einer Vielzahl von Enzymen, wie beispielsweise die saure Prostata-Phosphatase oder das prostata-spezifische Antigen (PSA) und vielen weiteren Stoffen. Das Sekret bildet zusammen mit dem

Sekret der Samenbläschen das Ejakulat und dient hierbei der Verflüssigung des Spermas. Die Inhaltsstoffe des Sekrets haben jedoch noch weitere Funktionen, wie beispielsweise das Spermin, das die DNA der Spermien schützt. Zudem ist die Prostata am Hormonstoffwechsel des Mannes beteiligt, indem sie das männliche Geschlechtshormon Testosteron in seine aktive Form, das Dihydrotestosteron (DHT), umwandelt^{4,5}.

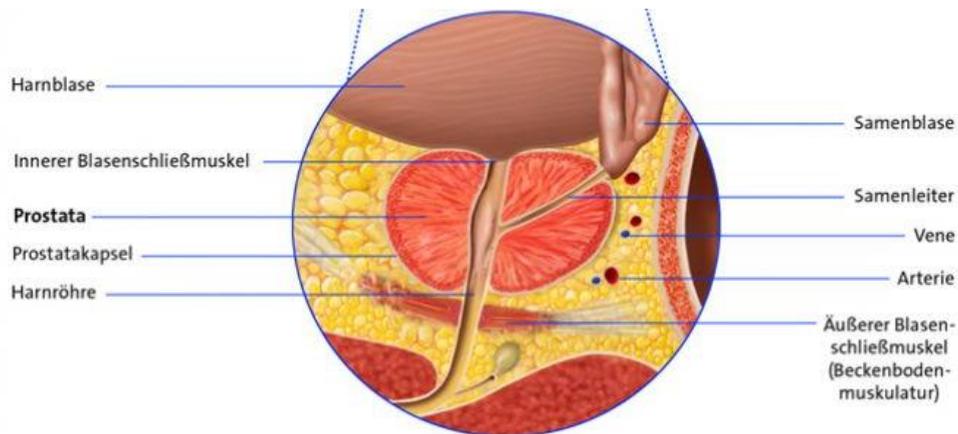


Abbildung 2-2: Die Anatomie der Prostata mit den umliegenden Organen. Die Lage der Prostata im Urogenitalbereich des Mannes mit den umliegenden Organen und die Prostata und ihre unmittelbare Umgebung im Detail (modifiziert nach „Prostatakrebs - eine Einführung“⁵).

2.2.2 Histologie der Prostata und des Prostatakarzinoms

Histologisch besteht die Prostata aus epithelialen und stromalen Teilen. Die Epithelzellen sind in tubuloalveolären Drüsen angeordnet. Jede Drüse besitzt ein luminales sekretorisches Epithel sowie eine äußere Basalzellschicht^{6,7}. Zudem finden sich locker eingestreut neuroendokrine Zellen⁸. 97 % aller Prostatakarzinome sind Adenokarzinome, hervorgegangen aus dem luminalen Epithel der Prostata-drüsen. Die Karzinomdrüsen zeigen typischerweise ein infiltrierendes Wachstum. Sie weisen zudem meist atypische, vergrößerte Kerne auf^{9,10}. Deutlich seltener sind kleinzellige Prostatakarzinomen, welche einen klinisch aggressiven Krankheitsverlauf zeigen und auf die Standardtherapie, Entzug der Androgene, nicht ansprechen, da sie Androgen Rezeptor (AR) negativ sind¹¹. Prostatakarzinome können klinisch in drei Stadien eingeteilt werden: lokal begrenzte, in die Lymphknoten metastasierte und fernmetastasierte Prostatakarzinome. Das lokal begrenzte Prostatakarzinom ist in den meisten Fällen heilbar. Patienten, bei denen sich das Prostatakarzinom in die Lymphbahnen und Lymphknoten ausgebreitet hat, tragen ein hohes Risiko für ein Erkrankungsrezidiv¹². Nicht mehr in kurativer Intention therapierbar sind Patienten, die Fernmetastasen eines

Prostatakarzinoms aufweisen. Prostatakarzinometastasen finden sich in erster Linie im Skelettsystem, seltener in anderen Organen wie der Lunge oder der Leber¹³.

2.2.3 Molekularbiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom kann einen sehr heterogenen Krankheitsverlauf zeigen. Die Mehrzahl der Patienten versterben nicht an ihrem Prostatakarzinom und bedürfen idealerweise keiner oder nur einer wenig invasiven Therapie. Ziel ist hier eine Überdiagnose und -therapie zu vermeiden. Eine Subgruppe von Patienten mit letalen Tumoren jedoch bedarf einer aggressiven Therapie. Die korrekte Identifizierung und Prognosestellung ist schwierig. Etablierte Parameter zur Therapiestratifizierung sind der Gleason Score (siehe unten) oder das Tumorstadium (TNM-Klassifikation).

Es treten eine Vielzahl an molekularen Veränderungen im Prostatakarzinom auf, obwohl das Prostatakarzinom, im Vergleich zu anderen Tumoren, wenige Mutationen besitzt. Zu den häufigsten und bekanntesten molekularen Veränderungen im Prostatakarzinom zählen¹⁴:

- Der Androgen Rezeptor Signalweg: Prostatakarzinome sind in ihrem Wachstum initial auf Androgene angewiesen. Veränderungen des Androgenrezeptors (AR) in Form von Amplifikationen, Deletionen oder Mutationen finden sich mit 60 %, jedoch meist im fortgeschrittenen, kastrationsresistenten Prostatakarzinomen (CRPC)^{14–16}.
- Der PI3K Signalweg: Eine Aktivierung des Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs kommt in etwa 50 % der Prostatakarzinome vor und wird meist durch einen *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) Verlust hervorgerufen. PTEN ist ein Tumorsuppressor, der den PI3K-Signalweg herunterreguliert. Andere Moleküle des PI3K-Signalwegs sind auch von Mutationen betroffen, wie beispielsweise PI3K selbst oder auch INPP4B oder PHLPP^{14,17}.
- Die Rearrangements von TMPRSS2 und Transkriptionsfaktoren aus der ETS Familie: Die häufigste (40–60 % aller Tumoren) molekulare Veränderung im Prostatakarzinom ist die prostataspezifische Fusion von TMPRSS2 mit einem Transkriptionsfaktor der ETS Familie, meistens ERG, resultierend aus einem inter- oder intrachromosomalen Rearrangement. Diese Fusionen sind frühe Ereignisse und kommen bereits in der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) vor. TMPRESS2-Fusionen aktivieren weitere transkriptionelle Programme und treiben so die Karzinogenese voran^{14,18,19}.

- Der Verlust des Tumorsuppressors NKX3.1: NKX3.1 ist ein Tumorsuppressorgen welches im lokalen Prostatakarzinom häufig durch einen Verlust von Heterozygotie (LOH) von Chromosom 8p21 vermindert exprimiert wird²⁰. Es ist ein Homeobox Protein, das durch AR reguliert wird und darüber hinaus ein Marker für Stammzellen der Prostata ist. Die NKX3.1 Mutationen kommen häufiger in CRPC als in lokal begrenzten Prostatakarzinomen vor. Bei Androgenentzug wird die NKX3.1 Expression schnell unterdrückt, welches in Zusammenhang mit der Kastrationsresistenz stehen könnte^{14,21}.
- SPOP Mutationen: Punktmutationen im Gen, das für das Speckle-Type POZ Protein (SPOP) kodiert, kommen sehr häufig im Prostatakarzinom vor. Es gibt jedoch einen beschriebenen Zusammenhang mit dem AR. Die genaue Bedeutung von SPOP ist im Prostatakarzinom jedoch noch nicht geklärt^{22,23}.

2.2.4 Diagnose und Behandlung des Prostatakarzinoms

Die Verdachtsdiagnose eines Prostatakarzinoms kann neben einer auffälligen digital-rektalen Tastuntersuchung über die Messung eines erhöhten (> 4 ng/ml) oder steigenden PSA-Werts im Blut gestellt werden. Die PSA-Testung kann zwar zu einer frühen Diagnosestellung beitragen, birgt allerdings auch das Risiko einer Überdiagnose und damit verbundenen Übertherapie der Patienten²⁴. Zwei große Studien haben das PSA-Screening untersucht und kamen zu kontroversen Ergebnissen: Die *European Randomized study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC)²⁵ und die amerikanische *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening* Studie (PLCO)²⁶. Die ERSPC Studie kam zum Schluss, dass ein PSA Screening die Mortalität um 20 % senkt. Die Studie des PLCO hingegen konnte keine signifikante Reduktion der Mortalität beim Prostatakarzinom nach PSA Screening belegen. Die PLCO Studie fiel allerdings durch starke methodische Mängel auf vor allem in Bezug auf das PSA Screening in der Kontrollgruppe²⁷. Hier wurden nicht bei allen Männern ein PSA-Bluttest durchgeführt und nur Männer mit einem PSA-Test nicht älter als 1 Jahr wurden als valide Messungen gewertet und in die Analysen mit einbezogen²⁷.

Die aktuellen S3-Leitlinien zur Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms sehen eine PSA-Testung nur dann vor, wenn ein Mann seinerseits den Wunsch danach äußert. Eine durch eine auffällige DRU und/oder einen erhöhten PSA-Wert gestellte Verdachtsdiagnose sollte dann durch die pathologische Untersuchung von 10-12 Prostatabiopsien unterschiedlicher Lokalisationen mit Schwerpunkt aus dem Bereich der peripheren Zone gesichert werden.

Gezielte MRT-gestützte Prostatabiopsien können hierbei die Trefferquote bei fraglichen Läsion deutlich erhöhen^{28,29}.

Neben einer Karzinomdiagnose erfolgt auch die Vergabe eines Gleason-Scores an der Stanzbiopsie durch den Pathologen. Hierbei wird die Drüsenmorphologie innerhalb der Stanze beschrieben. Dieses Grading erfolgt nach den Richtlinien der *International Society of Urological Pathology* (ISUP). Das ISUP Gleason Grading leitet sich vom Gleason Grading (**Abbildung 2-3A**) ab, welches erstmalig 1966 von Donald Gleason publiziert wurde³⁰. Das ursprüngliche Gleason Grading unterteilte sich in 5 Stufen mit abnehmendem Grad der Differenzierung. Es reichte von wohl umschriebenen kleinen Drüsen (Gleason Grade 1) bis hin zu undifferenzierten fast drüsenlosen Formationen und Einzelzellen (Gleason Grade 5). Der Gleason-Score bezeichnet die Summe der beiden am häufigsten vertretenen Zellpopulationen, wobei es Unterschiede in der Ermittlung des Gleason-Score zwischen Stanzbiopsien und Operationspräparaten gibt. Der Gleason-Score in der ursprünglichen Variante reichte von 2-10. In der heutigen Praxis sind Gleason-Scores < 6 selten^{30,31}.

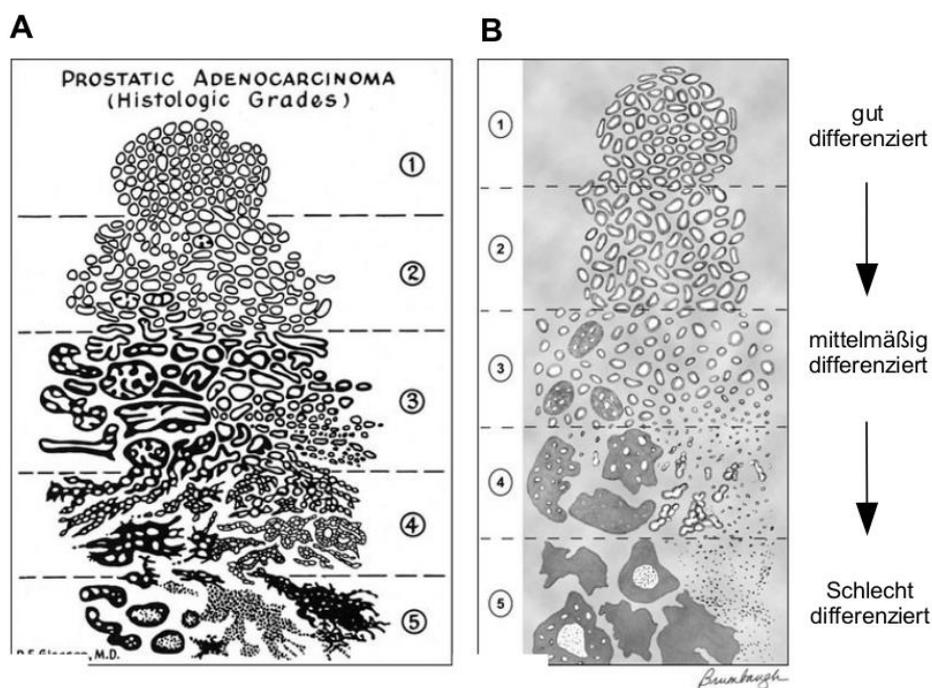


Abbildung 2-3: Das Grading des Prostatakarzinoms. Gleason-/ISUP-Grade von Grad 1-5. Grad 1 zeigt gleichmäßige Drüsen und gut differenzierte Zellen, bis hin zu Grad 5 mit schlecht differenzierten Zellen und keiner klar erkennbaren Drüsenstruktur mehr. **A:** Grading des Prostatakarzinoms nach Gleason aus dem Jahre 1966. **B:** Modifiziertes Gleason Grading nach der ISUP Konferenz 2005. Abbildung modifiziert nach Epstein *et al.*³².

In den Jahren 2004/2005 wurde das Gleason Grading grundlegend von der ISUP modifiziert (**Abbildung 2-3B**)³². In den folgenden Jahren 2010, 2012 und 2015 wurden weitere kleine

Änderungen am Grading durchgeführt. Im Jahr 2016 erfolgte eine erneute Modifikation mit Einführung von Gradierungsgruppen. Die grundlegenden Änderungen sind in **Abbildung 2-3** veranschaulicht, wobei die ISUP Gleason Grading Gruppen 1 und 2 zu den *low-grade* Karzinomen und die ISUP Gleason Grading Gruppen 3-5 zu den *high-grade* Karzinomen zählen³⁰. Zusätzlich zum PSA und dem Gleason-Score werden auch die klassische TNM-Klassifikation und der R-Status in die Diagnose mit einbezogen. Der TNM-Status bezieht sich auf die drei Faktoren Ausdehnung des Tumors (T), Lymphknotenbefall (N) und ob der Tumor bereits Metastasen (M) gebildet hat. Zudem wird bei Resektion des Tumors, der radikalen Prostatektomie, der Residualtumor (R) bestimmt. Auf die TNM-Klassifikation im Allgemeinen wird in **Kapitel 2.3.4** noch einmal näher eingegangen³⁰.

Tabelle 2-1: Übersicht über das Gleason Grading und die Modifikation zum ISUP-Grading^{30,33}.

Gleason-Score	ISUP-Grading	Anmerkung
≤ 6	1	Gleason 2-4 kommen in PCa nicht vor und werden nicht mehr diagnostiziert.
7a (3+4)	2	Die "intermediäre" Risikogruppe Gleason 7 wurde aufgeteilt.
7b (4+3)	3	Gleason 7b zählt nun zu den high-grade Karzinomen.
8	4	
9-10	5	

Bei der Therapieentscheidung werden verschiedene Faktoren einbezogen. Je nachdem welchen Gleason-Score der Tumor hat und wieviele Stanzbiopsien positiv waren. Zudem wird das Tumorstadium berücksichtigt und auch molekulare Veränderungen (wie oben beschrieben) finden immer mehr Berücksichtigung. Daher gibt es für die Therapie verschiedene Optionen³⁴:

- Active Surveillance: In die aktive Überwachung werden Patienten mit kleinen und lokal begrenzten Tumoren zusammengefasst, bei denen davon ausgegangen wird, dass mit großer Wahrscheinlichkeit keine Therapie nötig ist. Die Patienten müssen hierbei verschiedene Kriterien erfüllen, um für eine aktive Überwachung in Frage zu kommen³⁴:
 - PSA-Wert ≤ 10ng/ml

- Gleason ≤ 6
 - Positive Tumor Stenzen ≤ 2 bei 10-12 Stenzen gesamt
 - Weniger als 50% Tumor pro Stanze
- Watchful Waiting: Diese Art der Beobachtung wird bei Patienten angewendet, bei denen das Prostatakarzinom im Gesamtkontext des Patienten nicht zum Tragen kommt, wenn also andere Erkrankungen vorliegen oder der Patient beispielweise auf Grund seines sehr hohen Alters eine geringe Lebenserwartung hat. Hier wird erst zu einer Behandlung übergegangen, wenn der Patient Symptome der Krankheit aufweist³⁴.
 - Kurative Therapie: Bei Patienten mit kleinen und lokal begrenzten Tumoren jedoch klinisch signifikant wird eine kurative Therapie durch radikale Prostatektomie oder Strahlentherapie angestrebt³⁴.
 - Fokale Therapie: Diese Therapie beruht auf dem HIFU (hochintensivem fokussierten Ultraschall Verfahren) oder der Kryotherapie. Diese Therapie zielt auf eine Kontrolle des Tumors ohne vollständige Therapie ab. Es gibt jedoch noch keine Langzeitdaten und viele Experten halten sie für eine Untertherapie der signifikanten Tumoren und eine Übertherapie der insignifikanten Tumoren³⁴.
 - Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms: Sobald der Tumor metastasiert ist stellt die Hormonablationstherapie den derzeitigen Goldstandard dar. Kommt es trotz Anti-Androgen Therapie zu einem Fortschreiten der Krankheit spricht man von einem kastrations-resistenten Karzinom. Hier gibt es zwischen Chemotherapie, Zweitlinien Hormontherapie und palliativer Bestrahlung und Schmerztherapie, je nach Patient und Karzinom, verschiedene Optionen³⁴.

2.3. Kopf- und Halstumore

Bei Tumoren im Kopf- und Hals-Bereich handelt es sich bei mehr als 95% der Fälle um Plattenepithelkarzinome³⁵. Der Fokus dieser Arbeit liegt daher auf Plattenepithelkarzinomen. Verglichen mit allen Formen der Krebserkrankung sind Plattenepithelkarzinome die sechst häufigste Krebserkrankung. Jährlich werden weltweit ca. 633.000 neue Fälle und ca. 355.000 Todesfälle registriert^{35,36}. Die Überlebensrate der ersten 5 Jahre beträgt lediglich 40-50 %³⁶. Patienten mit einem metastasierten Plattenepithelkarzinom haben dagegen nur eine durchschnittliche Überlebenszeit von weniger als einem Jahr³⁷.

Im Folgenden werden die Anatomie, Ätiologie, Risikofaktoren, Molekularbiologie sowie Diagnose und Behandlung von Kopf- und Halstumoren näher dargestellt.

2.3.1 Anatomie der Kopf- und Halstumoren

Plattenepithelkarzinome treten in unterschiedlichen Regionen des Kopf- und Halsbereichs auf (**Abbildung 2-4**):

- Mundhöhle
- Nasenhöhle
- Pharynx: Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx
- Larynx: Supraglottis, Glottis, Subglottis

Je nach Bereich tritt das Karzinom mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Am Häufigsten betroffen ist die Mundhöhle inklusive Zunge und Lippe (46,3 %), es folgen Larynx (29,4 %), Pharynx (13,5%) und sonstige Bereiche (10,8 %) ³⁸. Die unterschiedlichen Lokalisationen sind auch mit verschiedenen Risikofaktoren assoziiert, worauf im Folgenden genauer eingegangen wird.

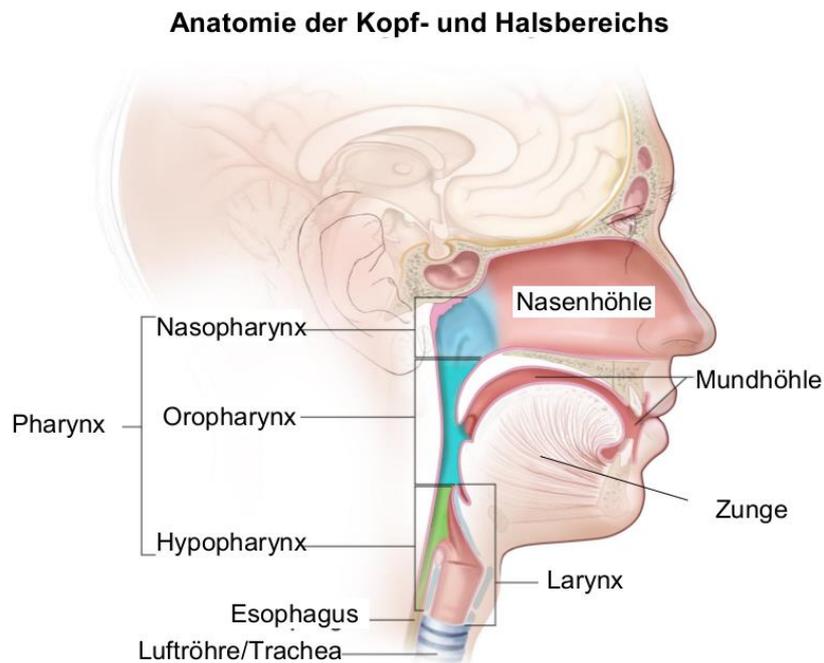


Abbildung 2-4: Die Anatomie der Kopf- und Halstumoren. Die verschiedenen Lokalisationen an denen Kopf- und Halstumoren entstehen (modifiziert nach „Head and Neck Cancer“ <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck>³⁹).

2.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren der Kopf- und Halstumore

Im Zusammenhang mit Tumoren des Kopf- und Halsbereiches sind mehrere Risikofaktoren bekannt. Wie bei den meisten Krebserkrankungen ist das Alter ein Risikofaktor. Daneben ist auch das Geschlecht ein Risikofaktor, sodass Männer ein höheres Erkrankungsrisiko haben. Der stärkste Risikofaktor während der Entstehung von Kopf- und Halstumoren ist das Rauchen. Etwa 80 % der Fälle werden mit dem Konsum von Tabak in Verbindung gebracht⁴⁰. Auch der übermäßige Genuss von Alkohol ist ein starker Risikofaktor, der gemeinsam mit dem Tabakkonsum das Risiko zu erkranken erhöht⁴⁰. Unabhängig von Alkohol- und Tabak-Konsum wird eine Subgruppe von Tumoren, vor allem im Oropharynx, mit einer Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV), vor allem mit der HPV-Variante 16, assoziiert. Hierbei haben HPV positive Patienten eine bessere Prognose im Vergleich zu HPV negativen Patienten⁴⁰.

In den letzten Jahren ist die Inzidenz der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gesunken. Dies hängt mit dem sinkenden Konsum von Tabak und Alkohol zusammen³⁵. Im Gegensatz dazu nimmt die Anzahl der mit HPV assoziierten Fälle zu⁴⁰. Etwa 60 % der Patienten in der westlichen Welt mit Plattenepithelkarzinomen im Oropharynx sind positiv für die HPV-Variante 16⁴¹ getestet.

2.3.3 Molekularbiologie der Kopf- und Halstumore

Kopf- und Halstumore entstehen, wie die meisten Tumore, durch eine Akkumulation von epigenetischen und genetischen Defekten⁴². Diese Veränderungen sind bei Kopf- und Halstumore sehr heterogen^{35,43}, sodass die Tumore in verschiedene Subgruppen, wie beispielsweise HPV-positiv und HPV-negative Tumore, unterteilt werden können. Die genaue Bedeutung der einzelnen Subgruppen ist bisher noch nicht vollständig erforscht. Die Subgruppe der HPV-positiven Tumore umfasst derzeit ca. 20 % der Tumore. Dabei haben HPV-positive Tumore eine bessere Prognose für den Patienten³⁵. **Abbildung 2-5** zeigt den Prozess der Karzinogenese der Kopf- und Halstumore vom normalen Epithel bis hin zum invasiven Karzinom⁴⁴. Hierbei spielt vor allem der LOH von verschiedenen Chromosomen eine wichtige Rolle. Im ersten Schritt spielt meist der LOH des Chromosoms 9p21 eine zentrale Rolle. Hier liegt der Locus des *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A). Er kodiert für p16 und p14ARF und eine Inaktivierung dieser Gene führt zu einer Hyperplasie. Im weiteren Progress kommen LOHs von 3p21 und 17p13 dazu und es kommt zu einer Dysplasie. Im Übergang zu *Carcinoma in situ* (CIS) kommt es zur p53(TP53)-Mutation und LOH der Chromosomen 11q13,

13q21 und 14q32. Im invasiven Karzinom können letztendlich eine Inaktivierung von PTEN und LOHs der Chromosomen 6p, 8p, 4q27 und 10q23 hinzukommen^{35,44–46}.

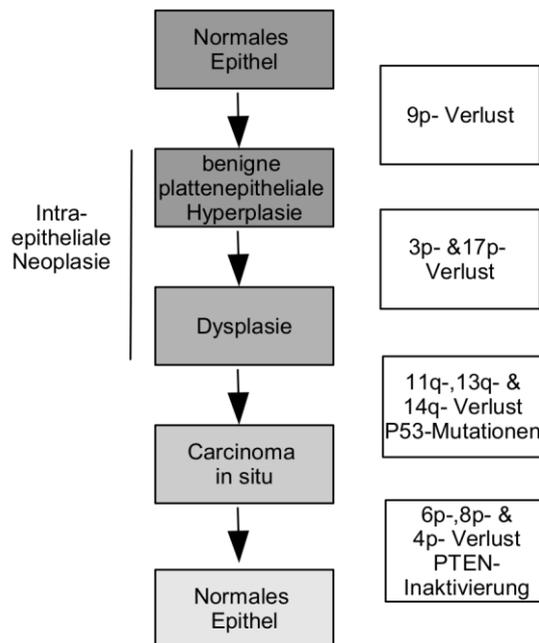


Abbildung 2-5: Prozess der molekularen Veränderungen während der Karzinogenese der Kopf- und Halstumoren (modifiziert nach „Die Onkologie“⁴⁴ und Leemans *et al.*³⁵).

Zusätzlich zu den bekanntesten molekularen Veränderungen gibt es eine Vielzahl weiterer Mutationen, wie beispielsweise eine NOTCH1 Mutation. NOTCH1 ist ein Tumorsuppressor in Kopf- und Halstumoren und eine Mutation führt in der Regel zu einem funktionslosen Protein und daher meist zu verstärktem Tumorwachstum⁴⁷. Der Gegenspieler von NOTCH1, TP63, ist hingegen häufig amplifiziert^{48,49}. TP63 wirkt inaktivierend auf NOTCH1 und führt so zu einer Inhibition des Tumorsuppressors NOTCH1. Beide Veränderungen führen zu einer Störung des Zellzyklus⁴³. Auch eine TP53-Mutation, die einen Eintritt in den Zellzyklus trotz beschädigter DNA ermöglicht, findet sich in etwa 2/3 der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals Bereich^{45,50}.

Wie zuvor bereits erwähnt bilden die HPV-positiven Kopf- und Halstumore eine eigene Subgruppe⁵¹. Sie haben eine bessere Prognose als HPV-negative Tumore und haben weniger Mutationen³⁵. Sie entstehen meist im Oropharynx. Hier ist TP53 oftmals durch die viralen Onkogene E6 und RB gehemmt, wodurch der Zellzyklus gestört und die Karzinogenese aktiviert wird⁵². Interessanterweise scheinen dieselben Signalwege, vor allem TP53 und CDKN2A/RB an der Tumorentstehung beteiligt zu sein. Die HP-Viren können neben den direkten Effekten durch virale Onkogene auch indirekte Effekte durch die Insertion der viralen

DNA hervorrufen. So können Tumorsuppressorgene durch Integration viraler DNA inaktiviert werden oder Onkogene durch Integration viraler Promotoren amplifiziert werden⁵³.

2.3.4 Diagnose und Behandlung der Kopf- und Halstumore

Die Diagnose von Kopf- und Halstumoren beruht in erster Linie auf der so genannten TNM-Klassifikation und dem Differenzierungsgrad des Tumors (G). Der Grad der Differenzierung wird unterteilt in G1 bis G3, wobei G1 gut differenziert, G2 mäßig differenziert und G3 schlecht/niedrig differenziertes⁵⁴ Gewebe darstellt. Tabelle 2-2 zeigt die TNM-Klassifikation bei Kopf- und Halstumoren. Das genaue Grading ist noch weiter unterteilt, beispielsweise in T1a und T1b. Es ist für die unterschiedlichen Lokalisationen nicht genau gleich. Bei der TNM-Klassifikation werden drei Parameter erhoben: die Tumorgröße und –invasivität (T), der Befall der umliegenden Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M)^{54,55}. Die Diagnose der meisten Patienten mit Kopf- und Halstumoren (ca. 60%) erfolgt erst in einem späten Stadium der Erkrankung. Dies kann verschiedene Gründe haben, wie zum Beispiel das Ausbleiben von Symptomen im frühen Stadium. Viele Patienten suchen auf Grund anderer Problematiken, wie beispielsweise hohem Alkoholkonsum, erst im späten Stadium der Krebserkrankung einen Arzt auf.

Tabelle 2-2: Allgemeine TNM-Klassifikation der Kopf- und Halstumore^{54,55}.

T = Tumor	
T1	Tumor ≤ 2cm
T2	Tumor > 2cm, aber ≤ 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
T4	Invasion benachbarter Strukturen, wie Knochen, Muskeln, Halsweichteile, Haut.
N = Lymphknoten (lat. Nodus = Knoten)	
N0	Kein Lymphknotenbefall
N1	solitärer ipsilateraler Lymphknoten ≤ 3 cm
N2a	solitärer ipsilateraler Lymphknoten > 3 bis ≤ 6 cm
N2b	multiple ipsilaterale Lymphknoten ≤ 6 cm
N2c	bilaterale Lymphknoten ≤ 6 cm
N3	Lymphknoten > 6 cm

M = Metastasen

M0	Keine Metastasen
M1	Metastasen

Die klassische Behandlung von Kopf- und Halstumoren beruht auf der operativen Entfernung des Tumors, Radiotherapie und/oder platinhaltiger Chemotherapie. Patienten, die in einem frühen Stadium diagnostiziert wurden, werden in der Regel entweder mit einer Operation oder einer Radiochemotherapie behandelt. Bei früher Diagnose haben die Patienten eine gute Prognose und eine hohe Chance keinen Rückfall zu erleiden⁵⁶. Im späten Stadium wird meist eine kombinierte Therapie aus Operation, adjuvante Radiotherapie oder Radiochemotherapie eingesetzt⁵⁷. Für Patienten mit rezidivierender oder metastasierter Erkrankung stehen neben einer palliativen Chemotherapie neuere Medikamente wie der Anti-EGFR Antikörper Cetuximab zur Verfügung. Für Tumore des Kopf und Halsbereichs gibt es neben den etablierten Parametern wie T- und N- Status noch keine Biomarker zur Therapiestratifizierung sowie kaum zielgerichtete Therapien. Da Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs zu den häufigsten Tumorentitäten gehören und eine geringe Überlebensrate besitzen, müssen dringend zuverlässige Biomarker und Therapietargets gefunden werden.

2.4. Biomarker

Ein Biomarker ist definiert als Merkmal, welches objektiv gemessen und bewertet werden kann³³. Ein Biomarker sollte dabei entweder auf einen normalen biologischen oder krankhaften Prozess im Körper oder auf das Ansprechen auf eine Therapie hinweisen⁵⁸. In der Ära der personalisierten Medizin gewinnen Biomarker immer mehr an Relevanz. Sie können grob in drei Klassen eingeteilt werden: Biomarker die geeignet sind für die (1) Diagnose, die (2) Prognose oder die (3) Prädiktion, beispielsweise das Ansprechen auf ein Medikament⁵⁹. Mithilfe von Biomarkern können also eine Anzahl ganz unterschiedlicher klinischer Fragen beantwortet werden⁵⁹:

- Screening: bei Patienten die bisher keine Symptome zeigen.
- Diagnose: Bestätigung der Diagnose bei Patienten die bereits Symptome aufweisen.
- Klassifikation und Grading: Unterscheidung verschiedener Entitäten.
- Prognose: Voraussage der Überlebenswahrscheinlichkeit, unabhängig von einer Therapieform.

- Prädiktion: Vorhersage auf das Ansprechen des Patienten auf eine spezielle Therapieform.
- Verlaufskontrolle: Frühzeitige Erkennung eines Rückfalls oder des Vorschreitens der Erkrankung nach einer Therapie oder bei Patienten ohne Therapie.

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Arten von Biomarkern, wie beispielsweise Proteine (Enzyme oder Rezeptoren), Nukleinsäuren (RNA oder DNA), Antikörper oder Peptide. Biomarker können auch eine Ansammlung beziehungsweise Kombination von verschiedenen Veränderungen sein, wie beispielsweise im Proteom oder Metabolom eines Patienten^{59,60}.

Der Nachweis von Biomarkern kann in unterschiedlichen Patientenproben erfolgen, wie Gewebeproben und Körperflüssigkeiten (z.B. Blut oder Urin). Biomarker, die in Körperflüssigkeiten gemessen werden können bieten den Vorteil, dass ihre Entnahme nicht-invasiv ist und daher für den Patienten leichter und weniger schmerzhaft. Des Weiteren gibt es die gewebebasierten Biomarker, die beispielsweise an einer Biopsie des Patienten oder erst nach operativer Entfernung des Tumors, an dem entnommenen Tumorgewebe, gemessen werden⁶⁰.

Tabelle 2-3 zeigt einige Beispiele für Biomarker und ihre Anwendung im Krebspatienten⁶⁰.

Tabelle 2-3: Verschiedenen Biomarker und ihre Anwendung⁶⁰.

Biomarker Verwendung	Beispiel
Risikoabschätzung der Krebsentstehung	BRCA1 Mutation bei Brust- und Ovarialkrebs
Verlaufskontrolle	Prostata spezifisches Antigen (PSA) bei Prostatakrebs
Prognose der Krankheit	KRAS Mutation und anti-EGFR Antikörper beim Kolonkarzinom HER2 Expression und anti-HER2 Therapie bei Brustkrebs Östrogenrezeptorexpression bei Brustkrebs
Überwachung für den Fall eines Rückfalls	CEA beim Kolonkarzinom AFD, LDH, β -HCG bei Keimzelltumoren

2.4.1 Immunohistochemische Biomarker

Die Methode der Immunhistochemie (IHC) ermöglicht die Detektion von Antigenen auf einem Gewebeschnitt und findet verstärkt Anwendung in der Diagnostik der Pathologie. Als

Referenzfärbung zur IHC wird die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung verwendet, sie ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung. Dabei stellt sie Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile farblich dar indem Hämatoxylin die "basophilen" Strukturen, wie beispielsweise die DNA des Kernchromatins oder die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums, blau färbt. Das Eosin hingegen färbt basische oder „acidophile“ Strukturen rot, hierzu zählen vor allem die Proteine des Zytoplasmas, sowie die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum.

Der Test der HER2-Expression gilt als der Prototyp der Anwendung einer IHC-Färbung zur Stratifizierung der Patienten mit Brustkrebs. Sie wurde erstmals im Jahr 1998 von der U.S. amerikanischen Behörde *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen⁶¹. Eine positive HER2 Färbung deutet darauf hin, dass die Patientin auf eine Therapie mit Trastuzumab (Herzeptin®) ansprechen wird. Eine Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab richtet sich gegen den Rezeptor HER2, auch ERBB2 genannt. Diese Therapie wirkt jedoch nur, wenn HER2 auf der Zellmembran der Krebszellen in der Patientin vermehrt lokalisiert ist, also eine verstärkte Expression stattfindet⁶¹. Die IHC ist eine wichtige Methode um eine differenzielle Diagnose am Patienten zu ermöglichen und weiter zu verbessern^{61,62}.

In der Pathologie kommen routinemäßig verschiedene IHC Färbungen zur Anwendung. Hierzu zählen beispielsweise Proliferationsmarker wie Ki67 oder der Östrogenrezeptorstatus im Mammakarzinom, Menge der Hormonrezeptoren für Östrogen im Karzinom. Jedoch zeigt diese Methode der IHC auch Schwächen, da die Quantifikation schwieriger und vom Pathologen abhängig ist. Dies macht auch eine Reproduktion der Ergebnisse schwieriger.⁶¹ Durch diese Schwächen wird die IHC heute vermehrt durch andere Methoden, wie beispielsweise Sequenzierung, PCR oder FISH unterstützt oder ganz ersetzt⁶².

2.4.2 Epigenetische Biomarker & DNA-Methylierung

Epigenetische Biomarker beziehen sich auf epigenetische Veränderungen, die charakteristisch für die jeweilige Erkrankung sind. Hierbei umfasst der Begriff der Epigenetik alle vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst codiert sind. Bisher sind verschiedene solcher Veränderungen bekannt: die DNA-Methylierung, die Histonmodifikation und die RNA-assoziierte Genregulation⁵⁹. Die meisten epigenetischen Biomarker, die bisher entdeckt wurden, beziehen sich auf Veränderungen der DNA-Methylierung³³. Wie bereits 1975 durch Holliday und Pugh beschrieben^{63,64} wird die C₅-Position der Cytosinbase durch DNA Methyltransferasen (DNMTs) methyliert, wodurch

5-Methylcytosin entsteht. Diese epigenetische Veränderung tritt meist innerhalb eines CpG Dinukleotids auf. CpGs sind unregelmäßig über das Genom verteilt und häufen sich in sogenannten CpG-Inseln. CpG-Inseln sind stark konserviert und diese CpG-Inseln sind in der Regel nicht oder nur gering methyliert. CpG-Inseln liegen häufig in den Promotorregionen auf und ihre Methylierung ist oftmals invers mit der Genexpression korreliert. Die DNA-Methylierung der Cytosine spielt auch außerhalb der Promotoren und regulatorischen Elemente eine Rolle. Es wird vermutet, dass sie hier mit anderen Funktionen in Zusammenhang gebracht, beispielsweise mit der Stabilität der genomischen DNA. Die DNA könnte durch die stärkere Methylierung stabilisiert werden³³.

Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen konnte gezeigt werden, dass eine veränderte *de novo* Methylierung charakteristisch ist. In Tumoren findet meist eine globale Hypomethylierung der DNA statt. Lokal kommt es häufig zu einer Hypermethylierung^{33,65}. Die DNA-Methylierung eignet sich sehr gut zur Messung in archivierten Patientenproben, welche der Pathologie routinemäßig zur Verfügung stehen. Die DNA ist vor allem im Vergleich zu RNA auch im FFPE Patientenmaterial sehr stabil⁶⁶.

Einige epigenetische Biomarker sind bereits in der klinischen Anwendung für verschiedene Bereiche, wie Screening, Prognose und Voraussage des Krankheitsverlaufs oder eines Therapieansprechens der Patienten. Ein bekanntes Beispiel ist die Promotor-Methylierung des Gens O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Die Methylierung des MGMT Promotors ermöglicht eine Voraussage darüber, ob ein Patient mit einem Glioblastom von einer Therapie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid profitieren wird^{33,59,67}. **Tabelle 2-4** gibt einen Überblick über einige kommerziell verfügbare Kits zur Bestimmung von epigenetischen Biomarkern. Hierzu zählt beispielsweise die Bestimmung von RASSF1, APC und GSTP1 in Biopsiestanzen des Prostatakarzinoms, um Patienten mit negativer Biopsie von Patienten mit okkultem Prostatakarzinom zu unterscheiden^{68,69}.

Tabelle 2-4: Kommerziell erhältliche Tests für epigenetische Biomarker in verschiedenen Krebserkrankungen³³.

Gen	Verwendung	Krebs	Test (Firma)
<i>VIM</i>	Diagnostisch	Kolon	Cologuard (Exact Sciences)
<i>SEPT9</i>	Diagnostisch	Kolon	Epi proColon (Epigenomics) ColoVantage (Quest Diagnostics) RealTime mS9 (Abbot)
<i>SHOX2</i>	Diagnostisch	Lunge	Epi proLung (Epigenomics)
<i>GSTP1/APC/RASSF1A</i>	Diagnostisch	Prostata	ConfirmMDx (MDx Health)
<i>MGMT</i>	Prognostisch	Glioblastom	PredictMDx Glioblastoma (MDx Health) SALSA MS-MLPA probemixME011Mismatch Repair Genes (MCR-Holland) PyroMark MGMT Kit (Qiagen)

2.4.3 Methode der Bisulfit-Konversion

Die Methode der Bisulfit-Konversion stellt eine Möglichkeit dar, die DNA-Methylierung von Cytosinen anhand einer sequenzspezifischen Technologie, wie der PCR, zu untersuchen. Methylierte und unmethylierte Cytosine verhalten sich bezüglich ihrer Basenpaarungseigenschaften gleich und sind daher durch konventionelle Methoden, die auf Hybridisierung beruhen, wie Microarrays und konventioneller PCR, nicht voneinander zu unterscheiden. Im Jahr 1992 publizierte Frommer *et al.*⁷⁰ ein Protokoll, das es erlaubte 5-Methylcytosin von unmethyliertem Cytosin zu unterscheiden. In diesem Protokoll wurde die DNA mit Hilfe von Natriumhydroxid (NaOH) denaturiert und anschließend für 16 Stunden in einer Lösung mit 3,1 M Natriumbisulfit und 0,5 M Hydrochinon inkubiert. Dies führte zu einer Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Bei dieser Reaktion wird das Cytosin im ersten Schritt mittels Natriumbisulfit an der C₅-Position oxidativ desaminiert. Hierbei wird an die C₆-Position eine Sulfon-Gruppe angelagert. Im nächsten Schritt erfolgt die alkalische Desulfonierung zu Uracil (**Abbildung 2-6 A**). Bei der Reaktion werden die methylierten Cytosine nicht desaminiert. Hierdurch wird die epigenetische Information der DNA in eine Sequenzinformation umgewandelt, die nun mittels PCR oder anderen Hybridisierungstechniken analysiert werden kann (**Abbildung 2-6 B**).

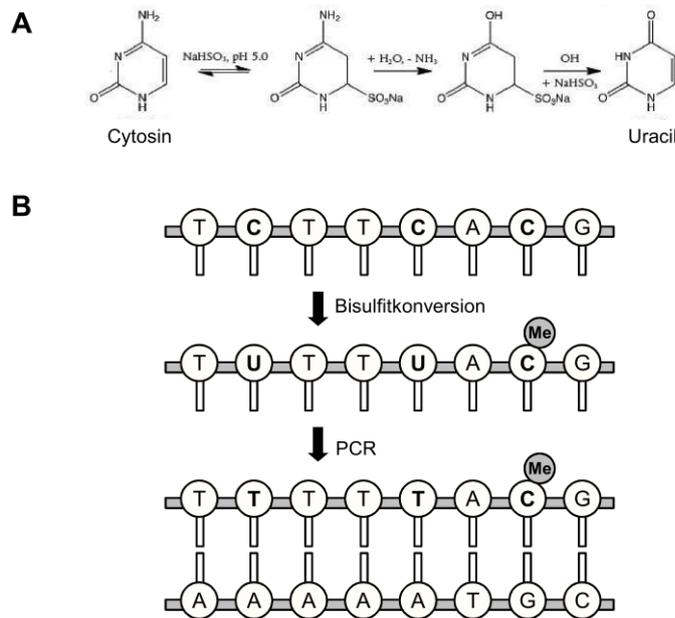


Abbildung 2-6: Die Bisulfitreaktion und anschließende PCR. A: Genaue Reaktion der Desaminierung von Cytosin zu Uracil während der Bisulfitkonversion⁷¹. B: Veränderung der Sequenz durch die Bisulfitkonversion und anschließende PCR Reaktion (modifiziert nach http://www.neb-online.de/wp-content/uploads/2015/04/NEB_epigenetik_bisulfit3.jpg⁷¹).

2.4.4 Nachweis epigenetischer Veränderungen mittels qRT-PCR

Um die DNA-Methylierung zu messen können unterschiedliche Methoden angewendet werden, wie beispielsweise auf quantitative real-time PCR (qRT-PCR) basierte Assays, Bisulfit-Sequenzierung oder Microarray Analysen. Bei den RT-PCR basierten Assays gibt es verschiedenen Möglichkeiten wie der Assay entwickelt werden kann (**Abbildung 2-7**). Auf diese Methoden wird im Folgenden kurz eingegangen:

Als erstes besteht die Möglichkeit einen Assay mit methylierungsspezifischen Oligonukleotiden (MSP) und einer methylierungsspezifischen Detektionssonde (Probe) zu verwenden. Das der Assay selbst nur die methylierte DNA bindet wird hierfür ein Assay für ein Referenzgen wie beispielsweise β -Actin zusätzlich gemessen werden, da sonst die Gesamtmenge an DNA nicht quantifiziert werden kann und somit auch nicht der Anteil der methylierten DNA.

Als eine weitere Methode kann ein quantitativer Assay (QM) verwendet werden. Dazu werden zwei verschiedene Detektionssonden benötigt. Eine Sonde bindet nur im methylierten und eine nur im unmethylierten Zustand der DNA-Sequenz. Die beiden Oligonukleotide sind nicht methylierungsspezifisch. Für den QM-Assay wird kein Referenzgen benötigt, da über die

beiden Detektionssonden hierbei sowohl der methylierte als auch der unmethylierte Zustand der DNA gemessen werden.

Als drittes besteht die Möglichkeit einen *heavy methylation* (HM) Assay zu verwenden. Bei diesem wird die Methylierung mittels zwei Oligonukleotiden und einer Oligoprobe gemessen. Um die Spezifität zu erhöhen wird ein sogenannter Blocker entwickelt, der von seiner Sequenz innerhalb des Assays liegt, jedoch nur an den unmethylierten Zustand der Sequenz bindet. Als Referenz dient ein methylierungs-unspezifischer Assay, idealerweise im selben Gen, um einen Bias zu vermeiden. Die Oligonukleotiden sind nicht methylierungsspezifisch. Die Spezifität wird durch die Probe generiert und durch den Blocker erhöht⁷².

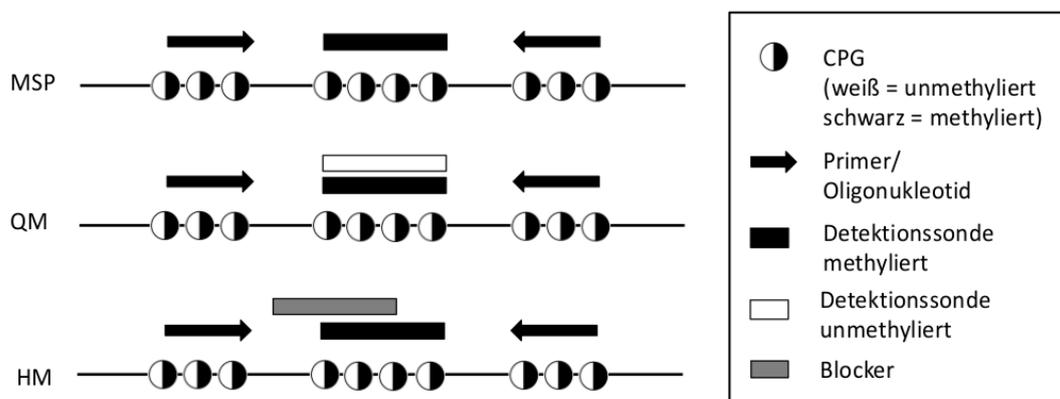


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten die DNA-Methylierung mittels einer qRT-PCR zu bestimmen. Dargestellt sind drei Möglichkeiten der methylierungsspezifischen RT-PCR. **MSP:** methylierungsspezifische Primer, hier wird DNA amplifiziert, die an den Bindungsstellen von Primer und Detektionssonde methylert ist. **QM:** quantitativer Methylierung, die Primer sind nicht methylierungsspezifisch und es gibt zwei Sonden, je eine für den methylierten und unmethylierten Zustand. **HM:** *Heavy* (Schwere) Methylierung, Amplifikation von DNA im Bereich der Detektionssonde.

2.5. Untersuchte Gene

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Gene in Bezug auf ihre bisher bekannten Funktionen im gesundem Gewebe und ihrer Rolle in der Krebsentstehung beschrieben.

2.5.1 LIM-Homeobox 3 (LHX3)

LIM Homeobox 3 (LHX3) gehört zur Familie der Proteine die eine sogenannte LIM Domäne tragen. Die LIM-Domäne ist eine Cystein-reiche Zink-bindende Domäne, die aus zwei Zinkfingern besteht, welche über einen hydrophoben Linker verbunden sind. Weitere

Mitglieder der LIM-Proteinfamilie sind LHX1, LHX2 und LHX4⁷³. **Abbildung 2-8** illustriert den Aufbau und die Domänen des LHX3 Proteins. Die Domänen eines LHX3 Proteins haben unterschiedliche Funktionen. Die LIM1/2 Domänen dienen beispielsweise der Protein/Protein Interaktionen, der DNA-Bindung und Transaktivierung. Die Homeodomänen sorgen unter anderem für die nukleare Lokalisation von LHX3. Die C1/2/3-Domänen sind ebenfalls für nukleare Lokalisation und Transrepression von LHX3 verantwortlich^{74,75}.

Von LHX3 sind derzeit zwei Isoformen des Gens, LHX3a und LHX3b, bekannt. LHX3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Entwicklung der Hypophyse und für die Spezifikationen der Motorneuronen eine wichtige Rolle spielt. Zusammen mit Isl1 bestimmt LHX3 ob aus den Motorneuronen Vorläuferzellen Motorneuronen (MN) oder Interneuronen (IN) entstehen⁷⁶.

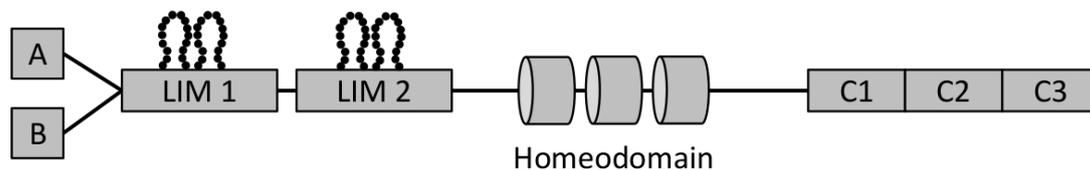


Abbildung 2-8: LHX3 Protein Struktur und Domänen. LIM1/2: Verantwortlich für Protein/Protein Interaktionen, DNA-Bindung und Transaktivierung. Homeodomäne: Verantwortlich für Protein/Protein Interaktionen, DNA-Bindung und Nukleare Lokalisation. C1/2/3: Verantwortlich für Nukleare Lokalisation und Transrepression⁷⁴. Abbildung modifiziert nach Mullen *et al.*⁷⁵ und <http://www.cisreg.ca>⁷⁴.

LHX3 wurde bereits mit verschiedenen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Beispielsweise spielen Mutationen innerhalb des LHX3 Gens eine Rolle bei hormonellen Mangelkrankungen, wie beispielsweise einem Mangel an Wachstumshormonen⁷⁷.

Über die Rolle von LHX3 in Krebserkrankungen ist bisher dagegen nur wenig bekannt. Bisher wurde eine Hochregulation von LHX3, auf Proteinebene mittels IHC und auf RNA Ebene über RT-PCR, im hochgradigen Oligodendrogliom beschrieben⁷⁸. Zudem konnte eine differentielle DNA-Methylierung des LHX3-Gens in Brustkrebs gezeigt werden, bei der LHX3 im Karzinom höher methyliert war als im Normalgewebe⁷⁹. Auch andere Gene der LIM-Proteinfamilie, wie LHX2, scheinen eine Rolle bei Krebserkrankungen wie z.B. dem duktalem Pankreasadenokarzinom zu spielen. Hier wurde nachgewiesen, dass LHX2 mRNA im Karzinom verglichen mit Normalgewebe überexprimiert ist und eine erhöhte LHX2 mRNA-Expression die Proliferation fördert⁷³.

2.5.2 Chemokin Rezeptor C-X-C Ligand 12 (CXCL12)

Chemokin Rezeptor C-X-C Ligand 12 (CXCL12), auch bekannt als stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), ist ein Chemokin. CXCL12 bindet an den Chemokin C-X-C Rezeptor 4 (CXCR4). Seine Hauptfunktion ist die Steuerung der Wanderung von Hematopoetischen und Mesenchymalen Stammzellen^{80,81}. Diese Stammzellen exprimieren den Rezeptor CXCR4 und wandern daher in Richtung des Ligand CXCL12, welcher unter anderem im Knochenmark hoch exprimiert ist. So hilft CXCL12 beispielsweise dabei die Stammzellen an ihrem späteren Speicherort (dem Knochenmark) zu verankern. Zudem spielt CXCL12 in der Embryonalentwicklung bei der Organogenese eine wichtige Rolle. Mäuse mit einem CXCL12 oder CXCR4 Knock-out sind nicht überlebensfähig, sie zeigen massive Defekte in ihrer Hämatopoese und in ihrem Nervensystem⁸². Im Menschen spielt CXCL12 auch nach der Geburt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, Endzündungsprozessen, Angiogenese und der Reparatur von Organen. CXCL12 kann die Leukozyten aktivieren und wird durch proinflammatorische Signale, wie Lipopolysaccharide, dem Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1) stimuliert^{80,81,83}.

Die Relevanz von CXCL12 und der CXCL12/CXCR4-Signalachse wurde bereits allgemein in Krebserkrankungen, unabhängig von der Herkunft des Tumors und der Metastasierung, gezeigt⁸⁴⁻⁹¹. Die Mehrzahl der Tumoren exprimiert die CXCL12-Rezeptoren CXCR7 oder CXCR4. Der Ligand CXCL12 zeigt eine chemotaktische Wirkung auf eine Vielzahl von Tumorzellen⁸⁰. Diese Chemotaxis zählt zu einer der Hauptursachen für die Bildung von Metastasen. Innerhalb des Tumors werden die Tumorzellen durch ein Netzwerk aus anderen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, dendritische Zellen (DCs) und tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) gestützt. Wird innerhalb des Tumors wenig CXCL12 gebildet oder CXCR4 höher exprimiert, dann fehlt dem exprimierten Rezeptor (CXCR4/7) der Bindungspartner und die Tumorzellen werden durch den chemotaktischen Gradienten zu anderen Lokalisationen „gelockt“, die eine höhere Expression von CXCL12 aufweisen. Zu diesen Lokalisationen zählen die typischen Organe der Metastasierung, wie Knochenmark, Leber, Lunge oder das Gehirn^{83,92}. Zudem rekrutieren Chemokine wie CXCL12, Endothelzellen in das Tumorgewebe und fördern so die Angiogenese und damit zugleich das Tumorwachstum⁹².

Im Zusammenhang mit Prostatakrebs zeigte eine aktuelle Publikation von Hsiao *et al.*⁹³, dass Androgen die die Mobilität der Tumorzellen in androgen-sensitiven Zellen beeinflusst. Dies geschieht über die CXCL12/CXCR4- und die CXCL12/CXCR7-Achse. In Kopf- und Halstumoren konnte bisher gezeigt werden, dass eine hohe Expression von CXCR4 ein negativer prognostischer Biomarker ist⁹⁴.

2.5.3 Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2)

Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2), auch bekannt als *pituitary homeobox 2*, ist ein Protein, das zur Familie der RIEG/PITX Homeobox Proteine gehört. PITX2 besitzt eine 60 Aminosäure lange DNA-Bindungsdomäne (Homeobox) und liegt auf Chromosom 4q25. PITX2 spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Segmentierung der Körperachse, der asymmetrischen Entwicklung diverser Organe, wie Herz, Lunge, Leber und Milz und während der Zelldifferenzierung^{95,96}. Von PITX2 sind drei Haupt-Isoformen bekannt, PITX2a, PITX2b und PITX2c⁹⁷. Diese Expression der Isoformen werden durch zwei alternative Promotoren, P1 und P2, reguliert. Dabei reguliert P1 die Transkription der Variante PITX2c, die wiederum über Mitglieder der TGF- β -Familie reguliert wird^{98,99}. Promotor P2 reguliert die Transkription der Varianten PITX2a und PITX2b und wird unter anderem über den WNT/ β -Catenin-Signalweg reguliert¹⁰⁰. PITX2 wirkt zudem als Effektor der WNT/ β -Catenin- und Nodal-Signalwege. PITX2 kann durch die Assoziation mit verschiedenen Ko-Faktoren, wie HADAC oder β -Catenin, sowohl als Repressor, als auch als Aktivator der Transkription wirken. Durch Rekrutierung verschiedener Ko-Aktivatoren aktiviert PITX2 verschiedene Gene, die für die Zellproliferation (MYC, CCND2, CCND1) oder die Zelldifferenzierung (MyoD) von Bedeutung sind^{100–103}.

Die *PITX2* DNA-Methylierung innerhalb des Promotors der für die beiden Varianten PITX2a und b codiert (*PITX2ab* Promotor) ist bereits in mehreren Studien als prognostischer Biomarker beschrieben worden. Hierzu zählen Studien an Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom¹⁰⁴, Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs^{105–108} und Prostatakrebs^{109–111}. An Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom wurde das prognostische Potential von *PITX2ab* Promotormethylierung zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs in einer Kohorte mit über 600 Fällen gezeigt¹⁰⁹. Zudem wurden die Daten in einer unabhängigen Kohorte mit über 500 Patienten mittels einer unabhängigen Technologie validiert^{111,112}. Außerdem zeigte die *PITX2ab* Promotormethylierung im Prostatakrebs eine besonders gute Stratifizierung innerhalb der Risikogruppe der Gleason 7 Patienten¹¹². Während in Brust- und Prostatakrebs eine hohe *PITX2ab* Promotormethylierung mit einer schlechten Prognose einhergeht, verhält sich dies in Lungenkrebs invers. In Lungenkrebs wurde eine hohe Methylierung von *PITX2ab* mit einer besseren Prognose assoziiert¹⁰⁴. Somit ist die Methylierung des Promotors der *PITX2ab* Varianten ein vielfach validierter Biomarker. Die Methylierung des Promotors von *PITX2c* wurde bisher nur in einer Studie mit Prostatakrebspatienten untersucht¹¹³.

Auch die PITX2 Expression wurde bereits in Karzinomen einiger Entitäten, unter anderem im Prostata-¹¹⁴, Brust-¹¹⁵, Pankreas-¹¹⁶ und Ovarkarzinom¹¹⁷ untersucht, jedoch wurde bei bisherigen Expressionsanalysen in der Regel nicht zwischen den verschiedenen PITX2-Isoformen (a, b, und c) unterschieden. Obwohl die Promotormethylierung von *PITX2ab* und auch die Proteinexpression als Biomarker bereits gut validiert wurden, ist seine genaue Rolle während der Karzinogene bisher noch nicht bekannt.

2.5.4 PITX2 adjacent noncoding RNA (PANCR)

PANCR ist eine lange, nicht-codierende RNA (lncRNA) die in etwa 2 kb in 3'-Richtung des *PITX2* Gens liegt und somit wie *PITX2* auf Chromosom 4q25 liegt. *PANCR* besitzt zwei bekannte Transkriptvarianten (448 bp und 493 bp), jedoch liegen bisher kaum Erkenntnisse über deren Funktion vor. In der Publikation von Gore-Panter *et al.*¹¹⁸ wurden die mRNAs der *PITX2*-Varianten und die lncRNA Expression von *PANCR* im Herzen untersucht. *PANCR* war ausschließlich im linken Atrium exprimiert und zeigte eine starke Korrelation mit *PITX2c*, somit könnte dies bedeuten, dass die *PITX2c*-Expression durch *PANCR* reguliert wird¹¹⁸.

2.5.5 Paired-like homeodomain transcription factor 3 (PITX3)

PITX3 (*paired-like homeodomain transcription factor 3* oder *pituitary homeobox 3*) ist ein Transkriptionsfaktor und gehört, zusammen mit *PITX1* und *PITX2*, zur Proteinfamilie der RIEG/PITX Homeobox Proteine¹¹⁹. Das *PITX3* Gen liegt auf Chromosom 10 und es sind zwei Transkriptvarianten bekannt, die jedoch beide zu demselben 302 Aminosäuren langen Protein führen. *PITX3* spielt hauptsächlich während der Embryonalentwicklung, unter anderem bei der Ausbildung der Linse im Auge, eine wichtige Rolle^{120,121}. Zudem wird *PITX3* während der Embryonalentwicklung und anschließend nach der Geburt vor allem im Mittelhirn exprimiert. Hier spielt es eine zentrale Rolle in der Entwicklung und der späteren Erhaltung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns (mDA) und wird hier selektiv exprimiert^{120,122,123}. In anderen dopaminergen Neuronen hingegen wird *PITX3* nicht exprimiert^{122,123}.

PITX3 wurde bereits mit diversen Krankheiten in Verbindung gebracht, unter anderem mit Parkinson^{121,124}, anteriorer segmentaler mesenchymaler Dysgenie (ASMD) oder der kongenitale Katarakt (angeborener Grauer Star)¹²⁵. Bei Parkinson haben die Patienten meist eine geringere Anzahl an *PITX3*-positiven mDA Neuronen¹²⁶⁻¹²⁸. ASMD wird durch eine Mutation im *PITX3* Gen hervorgerufen. Diese führt zu einer Fehlbildung der Augenlinse¹²⁵. Im Zusammenhang mit Krebs ist über *PITX3* noch wenig bekannt. *PITX3* DNA-Methylierung wurde

bisher in Brustkrebs beschrieben. Dort ist PITX3 im Vergleich zu normalen Drüsen und entzündlichen Gewebe hypermethyliert⁷⁹.

2.5.6 Programmed death-ligand 1 (PD-L1)

Programmed death-ligand 1 (PD-L1), auch bekannt als *cluster of differentiation 274* (CD274) oder *B7 Homolog 1* (B7-H1), gehört zur B7 Proteinfamilie und spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem. Proteine der B7 Familie sind sowohl für die Stimulation, als auch für die Inhibition der T-Zell Aktivierung von Bedeutung^{129,130}. PD-L1 ist einer der Liganden des *Programmed Death Receptor 1* (PD1). PD-L1 übernimmt eine zentrale Rolle bei der Unterdrückung des Immunsystems, beispielsweise während der Schwangerschaft aber auch während Autoimmunerkrankungen und anderen Krankheiten wie Hepatitis^{131,132}. Normalerweise reagiert der Körper auf fremde Antigene mit einer Proliferation der antigen-spezifischen T-Zellen. Die Bindung von PD-L1 an den Rezeptor PD-1 übermittelt der T-Zelle hingegen ein inhibitorisches Signal, dass die Proliferation der T-Zellen herunterreguliert. Hierbei kann PD-L1 auf einer Reihe verschiedener Zellen, Zellen des Immunsystems und auch Tumorzellen, exprimiert werden und die T-Zell Aktivierung beeinflussen¹³³.

PD-L1 und sein Rezeptor PD-1 sind bereits im Zusammenhang mit der Immuntherapie von verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben worden. Jüngste Daten weisen darauf hin, dass der PD-1/PD-L1 Signalweg dem Tumor hilft, durch Inhibition der T-Zell Aktivierung, das Immunsystem zu umgehen^{134,135}. Die Immuntherapie stellt zur Bekämpfung von Krebserkrankungen eine sehr wichtige Strategie dar, jedoch sind meist die Nebenwirkungen einer solchen Therapie sehr hoch. Topalian *et al.*¹³⁵ zeigten, dass die Blockierung von PD-L1 mittels eines anti-PD-L1 Antikörpers zu einer verlängerten Stabilisierung der Krankheit in Patienten mit verschiedenen malignen Krebserkrankungen führte, wie zum Beispiel im malignen Melanom, in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder im Nierenzellkarzinom. Die Ansprechraten lagen nur zwischen 6 und 17 %. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Ansprechen zumeist in PD-L1 positiven Tumoren erfolgt. Die Protein Expression von PD-L1 wurde bereits in einer Vielzahl von Tumoren, wie beispielsweise Brustkrebs, nachgewiesen¹³³. Es gibt bereits verschiedene Antikörper, die gegen die PD-L1/PD-1-Achse gerichtet sind. Hierbei gibt es zwei Strategien: Zum einen die Blockierung von PD-L1 (BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, MSB001718C). Zum anderen die Blockierung seines Rezeptors PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Pidilizumab). Diese Therapieform zeigte in den Publikationen von Hamid *et al.*¹³⁷ und Sznol *et al.*¹³⁸ bereits vielversprechende Ergebnisse im malignen Melanom, Kopf- und Halstumoren, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinomen oder

Nierenzellkarzinomen. In einigen Entitäten sind bereits klinische Studien im Gange, und die ersten Zulassungen der FDA erfolgten für Nivolumab und Pembrolizumab in malignen Melanomen. Hier zeigten sich Ansprechraten von 20-40 % und nur 10 % der Patienten zeigten Nebeneffekte der Stufe 3 oder 4. Somit hat diese Immuntherapie nur geringe Nebenwirkungen¹³³. Es sind seither bereits weitere Antikörper bereits zugelassen worden und es werden diverse Studien in Entitäten wie Melanomen, Brustkrebs oder kleinzelligem Lungenkarzinom durchgeführt¹³⁶.

2.6. Ziel der Arbeit

Die Therapieoptionen sowohl im Prostatakarzinom als auch in Kopf- und Halstumoren sind limitiert und die Stratifizierung der Patienten in unterschiedliche Risiko- und Therapiegruppen muss weiter verbessert werden. Daher werden neue Biomarker für die Erkrankungen dringend benötigt um eine optimale Therapie für diese Patienten zu finden, ohne Patienten dabei zu übertherapieren. Das Ziel der Arbeit war neue potentielle epigenetische Biomarker zu identifizieren und zu charakterisieren.

Im ersten Schritt der Arbeit wurden neun kommerziell erhältliche Kits für die Bisulfit-Konversion getestet. Dieser Vergleich gewährleistete eine optimale Konversion für die weitere Untersuchung epigenetischer Biomarker. Vor allem für den Einsatz von FFPE mussten die Kits validiert werden, da dies die Quelle für DNA in unseren Studien darstellte. Diese Kits wurden bezüglich ihrer Ausbeute, Degradierung und Reinheit der DNA, Effizienz der Konversion und Stabilität der konvertierten DNA bei verschiedenen Bedingungen verglichen.

Des Weiteren wurden die Gene *LHX3*, *PITX3*, *PITX2*, *PANCR*, *CXCL12* und *PD-L1* zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Hierzu wurden real-time PCR Assays entwickelt und validiert, um die DNA-Methylierung der ausgewählten Gene in Patientenproben zu messen. *LHX3*, *PITX3* und *CXCL12* wurden zuvor als potentielle Biomarker in Brustkrebs Patientinnen identifiziert^{82,144}. *PITX2* DNA-Methylierung wurde bereits im Prostatakarzinom^{109,111,112} und anderen Entitäten, als prognostischer Biomarker beschrieben. Daher wurde *PITX2* DNA-Methylierung und seine nicht-codierende RNA (*PANCR*) nur in Kopf- und Halstumoren untersucht. Des Weiteren wurde PD-L1 im Prostatakarzinom untersucht. Die ausgewählten Gene wurden als epigenetische Biomarker untersucht. Das Ergebnis gibt weitere Hinweise darauf, wie ein möglicher prognostischer oder prädiktiver Test von Nutzen sein könnte. Zudem wurde der Zusammenhang der Methylierung und der Expression dieser Gene untersucht, da diese Ergebnisse wichtige Information über das biologische Verständnis dieser Proteine im

Zusammenhang mit Krebserkrankungen liefern können. PD-L1 und CXCL12 werden bereits als Targets in der Immuntherapie verwendet und die Inhibition der jeweiligen Signalachsen in Krebspatienten wird bereits in diversen klinischen Studien getestet.

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1 Patientenmaterial und Kohorten

Die Untersuchungen wurden von dem Institutionellen Review Board (IRB) des Universitätsklinikums Bonn genehmigt.

3.1.1.1 Fall-Kontroll-Studie Brustkrebs Patienten

Es wurde eine Fall-Kontroll-Studie verwendet. Alle eingeschlossenen Patienten hatten Brustkrebs und wurden am Universitätsklinikum Bonn behandelt. Auf die genauen klinisch-pathologischen Daten der Fall-Kontroll-Studie wird im relevanten Kapitel eingegangen (siehe **Kapitel 4.3**).

3.1.1.2 Patientenkohorte Kopf- und Halstumoren

Es wurde eine Patientenkohorte verwendet. Alle eingeschlossenen Patienten hatten Plattenepithelzellkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs und wurden zwischen 1999 und 2014 am Universitätsklinikum Bonn behandelt. Auf die genauen klinisch-pathologischen Daten der Patientenkohorte wird im relevanten Kapitel eingegangen (siehe **Kapitel 4.4**).

3.1.1.3 Patientenkohorten Prostatakarzinom

Es wurden verschiedene Patientenkohorten und eine Fall-Kontroll-Studien verwendet. Alle eingeschlossenen Patienten von der UKB (UKB Fall-Kontroll-Studie und UKB Kohorte) hatten Prostatakarzinome, die durch radikale Prostatektomie behandelt wurden. Die Patienten Proben wurden zwischen 1998 und 2008 am Universitätsklinikum Bonn gesammelt. Auf die genauen klinisch-pathologischen Daten der Fall-Kontroll-Studie und der Patientenkohorte werden im relevanten Kapitel eingegangen (siehe **Kapitel 4.3**).

Des Weiteren wurde zur Validierung der erhobenen Daten eine Kohorte von TCGA (The Cancer Genome Atlas) verwendet¹³⁷. Die ERG Daten in der TCGA Kohorte beruhen auf ERG-Fusions Daten, entnommen aus einer Publikation des Cancer Genome Atlas Netzwerks¹³⁸.

3.1.2 Materialien, Reagenzien, Geräte & Software

Sofern nicht anderweitig vermerkt wurden alle verwendeten Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien von Labomedic (Bonn, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Biozym (Oldendorf, Deutschland) verwendet. Die Reagenzien und Standardchemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Abweichungen sind im Methodenteil im entsprechenden Kapitel angegeben.

Tabelle 3-1: Übersicht über die wichtigsten verwendeten Geräte und verwendete Software.

Gerät/Software	Firma
AB7500 Fast real-time PCR Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Blockcycler PTC-200	MJ Research, Waltham, MA, USA
Chemi Doc MP Imaging System	Biorad, Hercules, CA, USA
Medac Autostainer 480S	Medac, Wedel
Nanodrop1000	PeQLAB, Erlangen
SPSS Statistics 23	IBM, Chicago, IL, USA
VENTANA BenchMark Ultra	Roche, Mannheim
XCell Sure Lock™ Western Blot Kammer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.1.1 Bakterienstämme

Als Bakterienstamm zur Vermehrung von Plasmiden wurden der *Escherichia coli* Stamm TOP10F' verwendet. One Shot® TOP10F' Chemically Competent E. coli

Genotyp der *Escherichia coli* TOP10F': F' [lacIq Tn10 (TetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

3.1.2 Humane Zelllinien

Tabelle 3-2: Übersicht über die verwendeten humanen Zelllinien und entsprechenden Medien.

Zelllinie	Herkunft	Medium
HEK293	Niere	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)
MB468	Brust	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
MCF-7	Brust	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
DLD1	Colon	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
PC3	Prostata	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)

DU145	Prostata	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
LNCaP	Prostata	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
BPH1	Prostata	DMEM + 20 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml) + 20 ng/ml Testosteron + 1x ITS
VCap	Prostata	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
DUCap	Prostata	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
22RV1	Prostata	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
HN	HNO	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)
HSC-2	HNO	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 1x Pen/Strep (100 µg/ml)

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Biomers GmbH (Ulm) bestellt. Die Primer und Sonden Sequenzen wurden für verschiedene Anwendungen erstellt (siehe **Tabelle 3-3**).

Tabelle 3-3: Übersicht über die für die verschiedenen Assays verwendeten Primer- und Sondensequenzen.

Sequenzinformationen			Position im Genom	
Gen	Primer/Probe	Sequenz 5' - 3'	5'- Farbstoff	3'- Quencher
Primer für Methylierungsmessung				
PITX3	PITX3-F	CTCTCACAAACAACCTCCTATTC		
PITX3	PITX3-R	TTTAGGTTTAGATTTTTGGGGTT		
PITX3	PITX3-P-M	CGACCAAACGCACCCCG	FAM	BHQ1
PITX3	PITX3-P-U	ATACAACCAAACACACCCCAACTCC	VIC	BHQ1
LHX3	LHX3-F	CAAAAACCTACAACAATACA		
LHX3	LHX3-R	AGGTTGGTAGGAGTTAGAGGA		
LHX3	LHX3-P-M	CGCGCCCACTCCC GCC	FAM	BHQ1
LHX3	LHX3-P-U	CCTCACACCCACTCCCACCCA	VIC	BHQ1
CXCL12	CXCL12-F	ATTGGAGAGATTGAGGATTTTA		
CXCL12	CXCL12-R	AAACTAACTTATTTACTTTTCATTA		
CXCL12	CXCL12-P-M	CGCCATCGAAAAACCCCGT	FAM	BHQ1
CXCL12	CXCL12-P-U	CACCATCAAAAAACCCCATCCC	VIC	BHQ1
PD-L1	PD-L1-F	TCCCGCGCGACCCCAAT		
PD-L1	PD-L1-R	CGTGGGTATTCGCGGAGGAATAAC		
PD-L1	PD-L1-P	CGCACCAACCGCGCTTCTATCCGC	FAM	BHQ1
PD-L1	PD-L1-2-F	ATATAAAATAAATAATCATTCTTATACG		
PD-L1	PD-L1-2-R	CGTTTAGGGATTTTGGATTTGTTTAGC		
PD-L1	PD-L1-2-P	CACGAATCCAAATCCACCGCCAAC	FAM	BHQ1
β-Actin	β-Actin-F	GTGATGGAGGAGTTTAGTAAGTT		
β-Actin	β-Actin-R	CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA		
β-Actin	β-Actin-P	ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA	ATTO647N	BHQ1

Material & Methoden

PITX2	PITX2-F	GGAGGGAAGTAGATGTTA		
PITX2	PITX2-R	CCAAATCCCCTCTCCTTTC		
PITX2	PITX2-P	TCGGAGTCGGGAGAGC	FAM	DABCYL
PITX2	PITX2-B	CCTTTCACTCTCCCAACTCCAACCTCCCAA		Spacer-C ₃
PITX2	PITX2-Ref-F	TTGGTGATTAATTTAAAGGAGTTAT		
PITX2	PITX2-Ref -R	AATTACCTAAAAACCAAACCTAA		
PITX2	PITX2-Ref -P	TTAAAGAAATGGTGAGAGTTTGGTAT	R6G	BHQ1
PANCR	PANCR -F	TCCAATCCCTCATTTATCC		
PANCR	PANCR -R	AATTTTTTGGAGGTTATTTATT		
PANCR	PANCR -P-M	CGCTCCTACGACTAAACGA	FAM	BHQ1
PANCR	PANCR -P-U	CACTTCCTACAACCTAAACAATCCT	VIC	BHQ1

Primer für mRNA Expression

PITX3	PITX3-mRNA-F	TACAGGAGCTAGAGGCGACC		
PITX3	PITX3-mRNA-F	AGCTCGGCCTGCTGGCT		
PITX3	PITX3-mRNA-P	TTGAACCACACCCGCACGC	FAM	BHQ1
PSA	PSA-mRNA-F	CCAGTGGGTCCTCACAGC		
PSA	PSA-mRNA-R	TGACCTGAAATACCTGGC		
PSA	PSA-mRNA-P	CCCAGCAAGATCACGCTTTTGTT	FAM	BHQ1
PD-L1	PD-L1-mRNA-F	GGAGATTAGATCCTGAGGAA		
PD-L1	PD-L1-mRNA-R	TGGCTCCAGAATTACCAA		
PD-L1	PD-L1-mRNA-P	ATTGGTCATCCCAGAACTACCTCTG	FAM	BHQ1
ALAS	ALAS-F	TAATGACTACCTAGGAATGAGTCG		
ALAS	ALAS-R	CCATGTTGTTTCAAAGTGTC		
ALAS	ALAS-P	TAACTGCCCCACACCCCGT	FAM	BHQ1
HPRT	HPRT-F	TGACACTGGCAAAACAATGCA		
HPRT	HPRT-R	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT		
HPRT	HPRT-P	TGCTTTCCTTGGTCAGGCAGTAT	JOE	BHQ1
G6PD	G6PD-F	ATCTACCGCATCGACCAC		
G6PD	G6PD-R	AGATCCTGTTGGCAAATCTCA		
G6PD	G6PD-P	ACCATGAGGTTCTGCACCATCT	JOE	BHQ1
SDHA	SDHA-F	TCGCTCTTGGACCTGGT		
SDHA	SDHA-R	TGGAGGGACTTTATCTCCAG		
SDHA	SDHA-P	ATCGAAGAGTCATGCAGGCC	Cy5	BHQ1

Weitere Primer (für den Bisulfit Kit Vergleich)

CFF1	CFF1-F	TAAGAGTAATAATGGATGGATGATG		
CFF1	CFF1-R	CCTCCCATCTCCCTTCC		
CFF1	CFF1-P	ATGGATGAAGAAAGAAAGGATGAGT	FAM	BHQ1
CFP	CFP-204-F	TGGGTAAAGTGATTGAGTAA		
CFP	CFP-204-R	TATTCATCCTTCAACTTACCCT		
CFP	CFP-415-F	ATGGGTAAGGATATGAAGTTAAT		
CFP	CFP-415-R	TATCACTTAATCACCTCCTAAACTA		

3.1.4 Plasmide

Das Plasmid pCR[®] 2.1 wurde für die TA-Klonierung verwendet. Das *TA Cloning[®] Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde verwendet.

3.1.5 Antikörper und Enzyme

Tabelle 3-4: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Enzyme.

Antikörper	Anwendung	Firma
Primäre Antikörper		
β-Actin (ab151526)	WB (1:10000)	Abcam, Cambridge, UK
PD-L1 (ab174838)	WB (1:250) & IHC (1:75)	Abcam, Cambridge, UK
CXCL12 (bs-4938R)	IHC (1:600)	Bioss, Boston, MA, USA
AR (AR441)	IHC (1:400)	DAKO, Hamburg
PSA	WB (1:10000)	DAKO, Hamburg
ERG (EPR3864)	IHC (1:100)	Biologo, Kronshagen
p16 (CINtec® Histology Kit)	ICH (CINtec® Histology Kit)	Roche, Mannheim
Sekundäre Antikörper		
Goat pAb Anti-Rabbit IgG - HRP	Western Blot (1:1000)	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit pAb Anti-Mouse IgG - HRP	Western Blot (1:1000)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Enzyme		Firma
Fast Start Taq Polymerase		Roche, Mannheim
Superskript III Reverse Transkriptase		Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Restriktionsenzym XbaI		New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzym NotI		New England Biolabs, Frankfurt

3.1.6 DNA und Protein Standards

Als Standard für Agarosegele wurden, je nach Fragmentgröße, zwei unterschiedliche Marker verwendet, zum einen der Quick-Load® 1 kb DNA Ladder und der Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt). Als Standard für Protein Gele wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet.

3.1.7 Puffer

Tabelle 3-5: Übersicht über die verwendeten Puffer und ihre Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
1x PCR-Puffer 1	35 mM Tris (pH8,4) 49,5 mM KCl 6 mM MgCl ₂ 4% Glycerol Auffüllen mit dH ₂ O
1x PCR-Puffer 2	35 mM Tris (pH8,4) 24,75 mM KCl 3 mM MgCl ₂ 4% Glycerol

Material & Methoden

	Auffüllen mit dH ₂ O
10x Ladepuffer (für Agarosegele)	50x TAE Puffer 20 ml H ₂ O 20 ml Glycerin 20 mg Xylencyanol 20 mg Bromphenolblau
10x TBS	24,2g Tris-HCl 80g NaCl Auffüllen auf 1l mit dH ₂ O
5x LB Medium	50 g Pepton 25 g NaCl 25 g Hefeextrakt Auffüllen auf 1l mit dH ₂ O
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl 1 M Eisessig 50 mM EDTA Auffüllen mit dH ₂ O
LB-Agar	10 g Pepton 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 16 g Agar Auffüllen auf 1l mit dH ₂ O
RIPA-Lysepuffer (für Proteine)	1 % v/v IGEPAL® CA-630 0,5 % w/v Natriumdesoxychelate 0,1 % w/v SDS 2 mM EDTA Auffüllen mit PBS
Stripping-Puffer (für Western Blot)	1 M NaOH 2 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) DTT Auffüllen mit dH ₂ O

3.1.8 Kits

Tabelle 3-6: Eine Übersicht über alle verwendeten Kits.

Kit	Firma
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NucleoSpin® RNA	Machery & Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA XS	Machery & Nagel, Düren, Deutschland
EpiTect® Fast FFPE Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EpiTect® Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research, USA-Irvine, CA
EZ DNA Methylation-Direct™ Kit	Zymo Research, USA-Irvine, CA
innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
innuCONVERT Bisulfite Basic Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
UltraVIEW DAB Detection Kits	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA

3.2. Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E.coli* (TOP10F')

Escherichia coli (*E.coli*) Bakterienkulturen wurden in 30 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 250 rpm in einem Bakterenschüttler inkubiert. Für Bakterien, die mit einem Plasmid transformiert wurden, wurde das entsprechende Antibiotikum zur Selektion frisch hinzugegeben (50 µg/ml Ampicillin). Die Bakterienkultur wurde anschließend zur Plasmidextraktion (siehe **Kapitel 3.2.3.1**) verwendet und ein Teil der Bakterienkultur weggefroren.

Die transformierten *E.coli* Bakterienkulturen wurden bei -80 °C mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) weggefroren.

3.2.2 Arbeiten mit humanen Zellen

Alle verwendeten Zellkulturprodukte waren von der Firma Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA).

3.2.2.1 Kultivieren humaner Zelllinien

Die humanen Zelllinien wurden in entsprechendem Medium (siehe **Kapitel 3.2.2, Tabelle 3-2**), DMEM/F-12-Vollmedium von Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin Antibiotika kultiviert. Standardmäßig wurden die Zellen in T-75 Zellkulturflaschen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für Experimente wurden die Zellen entsprechend in 6-,12-,24- oder 96-well Platten kultiviert. In der Zellkultur wurde in einer sterilen Werkbank mit vertikalem laminarem Luftstrom gearbeitet.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA von dem Zellkulturgefäß abgelöst und zentrifugiert (1000 rpm, 3 min). Zum Zählen wurden die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Um die lebend Zellzahl zu bestimmen wurde die Zellsuspension 1:10 mit Türks-Lösung (Merck, Darmstadt) verdünnt und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Es wurden vier Quadranten ausgezählt und die Zellzahl pro ml mit folgender Formel bestimmt:

Zellzahl/ml = (gezählte Zellzahl/Anzahl der gezählten Quadrante)*Verdünnung*10⁴

3.2.2.3 Einfrieren und Auftauen humaner Zelllinien

Die Lagerung der humanen Zellen fand in einer Lösung mit 10 % DMSO bei -80 °C statt. Beim einfrieren wurden 1x10⁶ Zellen in DMEM/F-12-Voll-Medium mit 10 % DMSO und 20 % FCS in einem Kryotube zuerst 12 h bei -20 °C gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff gelagert.

Bei Auftauen wurden die Zellen möglichst schnell in Medium aufgenommen und mit 5 ml Medium in einem 15 ml Falcon zentrifugiert (1000 rpm, 3 min), um das DMSO zu entfernen. Dann wurden die Zellen in einer T75 Flasche mit 10 ml Medium kultiviert (siehe **Kapitel 3.2.2.1**).

3.2.2.4 Androgenrezeptor Stimulation

Verschiedene Prostatakrebs Zelllinien (22RV1 und LNCaP) wurden in 6-Well Platten ausgesät. Hierzu wurden die Zellen gezählt (siehe **Kapitel 3.2.2.2**) und 600.000 Zellen/Well ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht (10 Stunden) in DMEM-Medium mit reduziertem FCS (0,1 %) kultiviert, da einige Substanzen im FCS bereits den Androgensignalweg stimulieren können. Nach 12 h wurden die Zellen behandelt, hierzu wurde das Medium ausgetauscht, gegen DMEM-Medium mit verschiedenen Konzentrationen Dihydroxytestosterone (DHT, 10, 100 und 1000 nM) oder Bicalutamid, einem Androgen Rezeptor Blocker (10 und 20 µM). Die Proben Entnahme erfolge 24 h nach Behandlung, es wurden Proben für die Analyse der mRNA-Expression und der Proteinexpression entnommen. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von dem Zellkulturgefäß abgelöst und zentrifugiert (1000 rpm, 3 min). Anschließend wurden die Zellepellets mit 1x PSB gewaschen und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 3 min) und anschließend weiter prozessiert (siehe **Kapitel 3.2.3.3** und **Kapitel 3.2.4.3**).

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von pCR[®]2.1 Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop (PeQLAB, Erlangen) bestimmt (siehe **Kapitel 3.2.3.4**) und die aufgereinigte DNA bei -20 °C gelagert.

3.2.3.2 Isolation und Bisulfit Konversion von DNA

Für die Isolation und Bisulfit-Konversion von DNA aus FFPE Gewebestanden oder humanen Zelllinien wurden die in **Tabelle 3-6** (siehe **Kapitel 3.1.8**) aufgeführten Kits verwendet. Nach Vergleich der Kits wurde ausschließlich das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit (Analytik Jena, Jena) für alle weiteren Konversionen verwendet. Die Kits wurden nach den Anweisungen der Hersteller verwendet.

3.2.3.3 Isolation von RNA & cDNA Synthese

Für die Isolation von RNA aus humanen Zelllinien oder Gewebe wurde das NucleoSpin total RNA FFPE Kit (Machery & Nagel, Düren) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Je nachdem wie viel Material zur Verfügung stand wurden das NucleoSpin total RNA FFPE Kit oder das NucleoSpin total RNA FFPE XS Kit (bei weniger als 1×10^6 Zellen) verwendet. Die

Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop (PeQLAB, Erlangen) bestimmt (siehe **Kapitel 3.2.3.4**) und die aufgereinigte RNA bei -80 °C gelagert. Die anschließende cDNA Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers mit der SuperScript III Reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe). Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

3.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der DNA und RNA Konzentration erfolgte mittels Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop 1000 (PeQLAB, Erlangen). Das jeweilige Lösungsmittel der Probe wurde als Referenz gemessen. Zusätzlich wurde der Quotient von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ bestimmt um eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure zu bekommen. Ein optimaler Wert für RNA ist 2,0 und für DNA 1,8.

3.2.3.5 Blockcycler Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der PCR wurde zur Amplifikation von DNA Fragmenten im Blockcycler die FastStart Taq DNA Polymerase verwendet (Roche, Mannheim). Es wurden zwei verschiedene PCR Protokolle verwendet, die Standard PCR und die Kolonie PCR.

Standard PCR:

Die Standard PCR (Endpunkt-PCR) wurde in einem 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Das Temperaturprofil ist in **Tabelle 3-7** angegeben, hierbei wurde die Elongationszeit an die Länge des Amplikons angepasst. Die FastStart Taq DNA Polymerase amplifiziert ca. 1000 bp pro Minute. Die verwendeten Oligonukleotide sind in **Kapitel 3.1.3 (Tabelle 3-3)** aufgelistet. Die Reaktionsmischung war wie folgt zusammengesetzt:

Reaktionsmischung:

50 ng DNA (in 5 µl)

0,4 µM Oligonukleotid -F/-R

0,25 mM dNTP Mix

3 U Taq-Polymerase

1x PCR-Puffer 1

Auffüllen auf 20 µl Wasser

Tabelle 3-7: Die Bedingungen der PCR im Blockcycler.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min.	1
Denaturierung	95	30 sec.	30-45
Primerhybridisierung	70	30 sec.	
Elongation	72	30-90 sec	
Finale Elongation	72	10 min.	1

Kolonie PCR:

Die Kolonie PCR verläuft nach demselben Prinzip wie die Standard PCR, sie wird verwendet um die Bakterienklone zu identifizieren, die bei der Transformation das gewünschte Plasmid und nicht nur den Leervektor aufgenommen haben. Hier wurde jedoch keine aufgereinigte DNA zur Amplifikation verwendet, sondern Bakterienzellen als DNA Quelle zugegeben. Diese Zellen werden von der Agarplatte gepickt und in den Reaktionsmix gegeben. Die Ergebnisse der PCR wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe **Kapitel 3.2.3.9**).

3.2.3.6 Real-time PCR

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR), auch „Real-Time“-PCR genannt basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht zusätzlich die quantitative Analyse der DNA. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Detektionssonden (Probes) gemessen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des entstandenen PCR-Produktes zu. Alle Assays wurden im 96-Well-Plattenformat, *MicroAmp Fast Optical 96-well* (Applied Biosystems, Darmstadt), in technischen Triplikaten in dem AB7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Zum Verschließen der Platten wurden spezielle Folien verwendet, *MicoAmp Optical Adhesive Film PCR Compatible* (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Fluoreszenzintensität wurde in jedem Zyklus in der Annealing/Extension Phase detektiert und mit Hilfe der AB7500 Fast Real-Time PCR v2.0.6 Software (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgewertet. Die RT-PCR wurde zum einen zur Messung der Methylierung und zum anderen zur Messung des mRNA-Levels der einzelnen Gene verwendet. Für die Etablierung der Oligonukleotide ohne Detektionssonden wurde SYBR Green verwendet um eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Dies ist nötig um die Produktspezifität der PCR-Reaktion zu bestimmen¹³⁹. Zum Reaktionsmix wurde zusätzlich

0,125 x SYBR Green I (Lonza, Basel, Schweiz) hinzugefügt und im Anschluss an die PCR zusätzlich eine Schmelzkurven-Analyse angefügt: 15 sec bei 95 °C (100 % ramp rate), 60 sec bei 60 °C (1 % ramp rate) und 30 sec bei 95 °C (100 % ramp rate).

Methylierungsspezifische qRT-PCR:

Die methylierungsspezifischen Assays wurden in einem 10 µl (*LHX3*, *PITX3* und *CXCL12*) oder in einem 20 µl (*PD-L1*, *PITX2* und *PANCR*) Reaktionsansatz gemessen. Der Reaktionsmix und die PCR Bedingungen wurden wie folgt verwendet. Die ROX-Lösung wurde wie von Dietrich *et al*¹⁰⁴. beschrieben hergestellt.

Reaktionsmischung (<i>LHX3</i> , <i>PITX3</i> & <i>CXCL12</i>):	Reaktionsmischung (<i>PD-L1</i> , <i>PITX2</i> & <i>PANCR</i>):
50 ng DNA (in 5 µl)	50 ng DNA (in 10 µl)
0,4 µM Olionukleotid -F/-R	0,4 µM Olionukleotid -F/-R
0,3 µM Olioprobe	0,3 µM Olioprobe
0,25 mM dNTP Mix	0,25 mM dNTP Mix
1x PCR-Puffer 2	1x PCR-Puffer 1
0.006 µl ROX-Lösung	0.006 µl ROX-Lösung
3 U Taq-Polymerase	3 U Taq-Polymerase
Auffüllen auf 10 µl Wasser	Auffüllen auf 20 µl Wasser

Tabelle 3-8: Die Bedingungen der methylierungsspezifischen RT-PCR.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min.	1
Zyklen	62 [*] /60 [#]	2 sec.	50
	58 [*] /55 [#] /57 [•]	60 [#] /75 [•] sec.	
	95	15 sec.	

**PD-L1* Assays und [#]*CXCL12*, *LHX3* und *PITX3* Assays und [•]*PITX2* und *PANCR* Assays

RT-PCR zur Messung der mRNA:

Hier wurden Assays zur Detektion des mRNA-Levels für *PITX3*, *PD-L1* und *PSA* gemessen. Als Kontrolle wurden die vier Referenzgene *HPRT1*, *ALAS*, *G6PD* und *SDHA* verwendet, hierbei wurden *ALAS* und *HPRT1*, sowie *G6PD* und *SDHA* jeweils gemeinsam als Duplex gemessen. Der Reaktionsmix und die PCR Bedingungen wurden wie folgt verwendet.

Reaktionsmischung (*PITX3*, *PD-L1* & *PSA*):

- 50 ng DNA (in 5 µl)
- 0,4 µM Olionukleotid -F/-R
- 0,3 µM Olioprobe
- 0,25 mM dNTP Mix
- 1x PCR-Puffer 1
- 0.006 µl ROX-Lösung
- 4 U Taq-Polymerase
- Auffüllen auf 20 µl Wasser

Reaktionsmischung (*HPRT*, *ALAS*, *G6PD* & *SDHA*):

- 50 ng DNA (in 10 µl)
- 0,23 µM Olionukleotid -F/-R
- 0,3 µM Olioprobe
- 0,25 mM dNTP Mix
- 1x PCR-Puffer 1
- 0.006 µl ROX-Lösung
- 4 Taq-Polymerase
- Auffüllen auf 20 µl Wasser

Tabelle 3-9: Die Bedingungen der RT-PCR zur Messung der mRNA.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min.	1
Zyklen	62	2 sec.	50
	60	40 sec.	
	95	15 sec.	

3.2.3.7 Auswertung & Berechnung der DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung wurde nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, wie folgt, bestimmt¹⁴⁰:

$$\Delta\Delta CT_{\text{Probe}} = \Delta CT_{\text{Probe}} - \Delta CT_{\text{Kalibrator}}$$

$$\Delta CT_{\text{Probe}} = CT_{\text{methyliert}} - CT_{\text{unmethyliert}}$$

$$\Delta CT_{\text{Kalibrator}} = CT_{\text{methyliert}} - CT_{\text{unmethyliert}}$$

Die DNA-Methylierung wurde anschließend folgendermaßen berechnet:

$$\text{Methylierung MSP-Assay [\%]} = 100 \times 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (\text{PITX2ab und PD-L1})$$

$$\text{Methylierung QM-Assay [\%]} = 100 / (1 + 2^{\Delta\Delta CT}). \quad (\text{CXCL12, PITX3, PANCR und LHX3})$$

3.2.3.8 Bestimmung der PCR-Effizienz und mRNA-Expression

Die Effizienz E einer PCR kann mit Hilfe der Steigung m einer Regressionsgerade kalkuliert werden. Dazu wurde entweder eine cDNA-Verdünnungsreihe oder eine Plasmid-Verdünnungsreihe über 7 Log-Stufen verwendet. Die PCR Effizienz der etablierten PCRs wurde wie folgt bestimmt: $E = 10^{-1/m} - 1$

Die relative mRNA-Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode bestimmt¹⁴⁰. Als Referenz zur internen Normalisierung wurde der geometrische Mittelwert (GM) der vier Referenzgene (*ALAS1*, *HPRT1*, *G6PD*, *SDHA*) verwendet.

Die relative mRNA- wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgene (GM)}}$$

$$\text{Relative Expression} = 100 \times 2^{-\Delta CT}$$

3.2.3.9 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse von PCR-Produkten wurde die Methode der Agarosegelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer gelöst. Für ein Agarosegel wurden 150 ml 1-2 %ige Agaroselösung benötigt, denen 10 μ l Ethidiumbromid (0,5 μ g/ μ l) zugefügt wurden. Die DNA Proben wurden mit Ladepuffer (5x) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Kontrollen wurden entweder ein 100 bp oder ein 1 kb Marker als Größenstandard (siehe 3.1.6) verwendet. Um die DNA zu visualisieren wurde das Gel bei 302 nm UV-Licht beleuchtet und photographisch dokumentiert.

3.2.3.10 TA-Klonierung

Für die Herstellung neuer Plasmide wurde das TA Cloning[®] Kit von Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Anwendung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

3.2.3.11 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden die klonierten Plasmide mittels Doppelverdau mit NotI und XbaI geschnitten (37°C, 1-3 h). Der Ansatz erfolgte in 50 µl mit 10 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA und 1X Reaktionspuffer (NEBuffer 2.1, New England Biolabs GmbH). Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme (65 °C, 20 min).

3.2.3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten oder Plasmiden wurde vom Sequenzierservice Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom) durchgeführt. Hierzu wurden Plasmide (100 ng/µl) oder aufgereinigte PCR Produkte (15-35 ng/µl) und Sequenzierprimer (5 µM) zu Beckman Coulter geschickt.

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Pelletierte Zellen oder Gewebe wurden zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und je nach Zellzahl oder Größe des Gewebestücks in 50-200 µl RIPA-Puffer (mit Protease-Inhibitor cOmplete[™] von Roche) aufgenommen und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C und 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand, in dem die Proteine enthalten sind, wurde abgenommen und bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Messung der Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm am NanoDrop 1000 (PeQLAB, Erlangen). Das jeweilige Lösungsmittel oder Puffer der Probe wurde als Referenz gemessen.

3.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine auf Grund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das SDS-Polyacrylamid-Gel (Biorad Hercules, CA, USA) wurde in die Gelapparatur (Biorad Hercules, CA, USA) eingespannt und Laufpuffer in die innere und äußere Kammer gefüllt. Zur Probenvorbereitung wurden 30 µg Proteinlysate in Lämmli-Puffer

(5x) aufgenommen und 10 min. bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden auf das vorbereitete Gel geladen und je nach Protein das analysiert werden sollte, wurde das Gel 1-1,5 h bei 170 Volt laufen gelassen. Anschließend wurden die Proteine auf eine Western Blot Membran übertragen (siehe **Kapitel 3.2.4.3**)

3.2.4.3 Western Blot

Um die Zielproteine mit spezifischen Antikörpern nachweisen zu können wurden die zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-) Membran übertragen. Der Western-Blot wurde mit Hilfe einer Nassblot-Kammer (Biorad Hercules, CA, USA) durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer aktiviert, hierzu wurde sie für zwei Minuten in Methanol inkubiert und anschließend für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt und zwischen zwei in Transferpuffer getränkte Whatmann-Papiere sowie jeweils einem in Transferpuffer getränktem Schwamm platziert. Der Transfer wurde in Transferpuffer bei 30 V für 1,5 h durchgeführt. Daraufhin wurde die Membran für 5 min in PBS-T gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran 1 h bei RT in Blockierlösung (5 % Milchpulver in PBS-T) blockiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen Primärantikörper (verdünnt in Blockierlösung) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10.000 in Blockierlösung verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Abschließend erfolgten drei Waschschrte genau wie zuvor, bevor eine Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt wurde.

Die Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Die Chemolumineszenz-Reaktion wurde mit dem Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dazu wurde die Membran eine Minute in der Reaktionslösung inkubiert und anschließend mittels ChemiDoc MP Imaging System (Biorad, Hercules, CA, USA) entwickelt.

3.2.4.4 Entfernen der Antikörper ("Strippen")

Für die β -Actin Färbung beim Western Blot von PD-L1 musste die Membran nach der Detektion von PD-L1 einer weiteren Detektion unterzogen werden. Da β -Actin und PD-L1 ungefähr das gleiche Molekulargewicht besitzen wurde die Membran „gestrippt“ um eine erneute Färbung zu ermöglichen. Hierzu wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei 55°C mit Stripping-Puffer gewaschen, um die Reaktionslösung sowie Primär- und

Sekundärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBS-T gewaschen und konnte anschließend erneut geblockt und gefärbt werden.

3.2.5 TMA Konstruktion und Analyse

3.2.5.1 *Tissue Microarray (TMA) Konstruktion*

Die Gewebeproben, die für die TMAs verwendet wurden, wurden routinemäßig in der Pathologie fixiert und eingebettet. Die verwendeten TMAs (siehe **Kapitel 3.1.1**) der Prostata und der Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs wurden in der Pathologie der Universitätsklinik in Bonn erstellt. Es wurden 1 mm Stenzen pro Patient entnommen. Je nach Verfügbarkeit des Patientenmaterials wurden 1-5 Stenzen pro Patient genommen.

3.2.5.2 Immunhistochemie Färbung und Auswertung

Zur Analyse der verwendeten TMAs wurden 4 µm Schnitte der TMA-Blöcke angefertigt und gefärbt. Die Färbung wurde mit den beiden automatisierten Färbemaschinen Ventana BenchMark Ultra (Roche, Mannheim) oder Medac Autostainer 480S (Medac, Wedel) durchgeführt. Die zugehörigen Reagenzien wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Verdünnungen der Antikörper wurden, wie in **Tabelle 3-10** angegeben, verwendet. Die Visualisierung der Färbung erfolgte mittels des *UltraVIEW DAB Detektion* Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, USA) oder der Chemikalien vom Medac Autostainer 480S (Roche, Mannheim).

Die Auswertung der TMAs wurde von Pathologen durchgeführt (**Tabelle 3-10**). Die Färbungen wurden semiquantitativ ausgewertet und dazu in negative (0), schwache (1), mittlere (2) und starke (3) Färbung unterteilt. Falls es mehrere Stenzen zu einem Patienten gab wurde der Mittelwert verwendet. Bei kategorischen Färbungen, wie HPV bei Kopf- und Halstumoren, die nur in negativ und positiv eingeteilt wurden, entschied die Mehrzahl der Stenzen.

Tabelle 3-10: Eine Übersicht über die verwendeten TMAs und Antikörper in der Immunhistochemie und der Pathologen, die die Auswertung der Färbung durchgeführt haben.

TMA	Färbung	Verdünnung	Auswerter
Prostatakarzinom TMA	ERG	1:400	Verena Sailer
	AR	1:100	Verena Sailer
	PD-L1	1:100	Heidrun Gevensleben
	CXCL12	1:600	Diane Goltz
Kopf- und Halstumore TMA	p16 (HPV)	CINtec® Histology Kit	Diane Goltz

3.2.6 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Daten wurde SPSS Version 21 (IBM, Armonk, NY) verwendet. Das Verhältnis zwischen eingesetzter DNA Menge und berechneter DNA bei der Validierung der qRT-PCR Assays wurde mittels linearer Regression durchgeführt. Korrelationen zwischen zwei Variablen wurden mittels Spearman Rangkorrelation durchgeführt. Zum Vergleiche von verschiedenen Gruppen wurden bei unabhängigen Gruppen Kruskal-Walis-Test (2 Gruppen) und Man-Whitney-U-Test mit anschließendem Post-Hoc-Test (≥ 3 Gruppen) für nicht-parametrische Analysen verwendet. Bei gepaarten Proben wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Um die prädiktiven Eigenschaften eines Biomarkers zu untersuchen wurden Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Es wurden verschiedene Modelle verwendet. Zum einen die Kaplan-Meier Analyse¹⁴¹ (log-Rank Test) und zum anderen die Cox-Regressions-Analyse¹⁴². Die multivariate Cox-Regressions-Analyse wurde mit Rückwärtselimination nach Wald durchgeführt. Die Signifikanz (p-Wert) wurde ermittelt, bei einem p-Wert kleiner als 0,05 wurde von einer Signifikanz ausgegangen.

4. Ergebnisse

4.1. Assay Entwicklung und Validierung

Für die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Experimente wurden verschiedene real-time PCR Assays entwickelt und validiert worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

4.1.1 Design des qRT-PCR Assays für den Kitvergleich

Zur Validierung der Bisulfit-Konversion in **Kapitel 4.2** wurde zunächst ein qRT-PCR-Assay etabliert und verschiedene Bisulfitkits verglichen. Für den qRT-PCR-Assay wurden Oligonukleotide entwickelt, die in einer Cytosin-freien Region binden (CFF-Assay). Dies erlaubt es, die gesamte DNA-Ausbeute der Kits, unabhängig von der Konversionseffizienz, zu bestimmen. **Abbildung 4-1 A** zeigt, die Lage der Oligonukleotide für den CFF-Assay und die Amplifikation der DNA im ersten Zyklus der PCR. Hier wird deutlich, dass bei der bisulfitkonvertierten DNA im ersten Zyklus der PCR nur einer der beiden Stränge amplifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu können bei der nicht-konvertierten DNA beide DNA-Stränge amplifiziert werden. Der CFF-Assay wurde auf einer Mischungsreihe aus methylierter und unmethylierter DNA gemessen (100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 und 0 % methylierte DNA), um seine Leistungsfähigkeit zu validieren (**Abbildung 4-1 B**). Er bestimmt die Gesamtmenge der amplifizierbaren DNA, unabhängig von der Bisulfit-Konversion. Daher wurde zusätzlich die bereits in der Literatur als Methylierungsassay etablierte *SHOX2/SEPT9/ACTB*-Triplex^{143,144} gemessen, um die Ausbeute der amplifizierbaren, konvertierten DNA zu bestimmen. Auch die *SHOX2/SEPT9/ACTB*-Triplex wurde auf einer Mischungsreihe validiert (**Abbildung 4-1 C**). Die ACTB Oligonukleotide zeigen immer denselben CT-Wert, da die Oligonukleotide methylierungs-unspezifisch binden und als Referenz die Gesamtmenge bisulfitkonvertierter DNA messen. Alle Proben wurden in technischen Triplikaten gemessen und beide Assays zeigen eine hohe Messgenauigkeit. Dies wird sichtbar an der geringen Streuung der Triplikate.

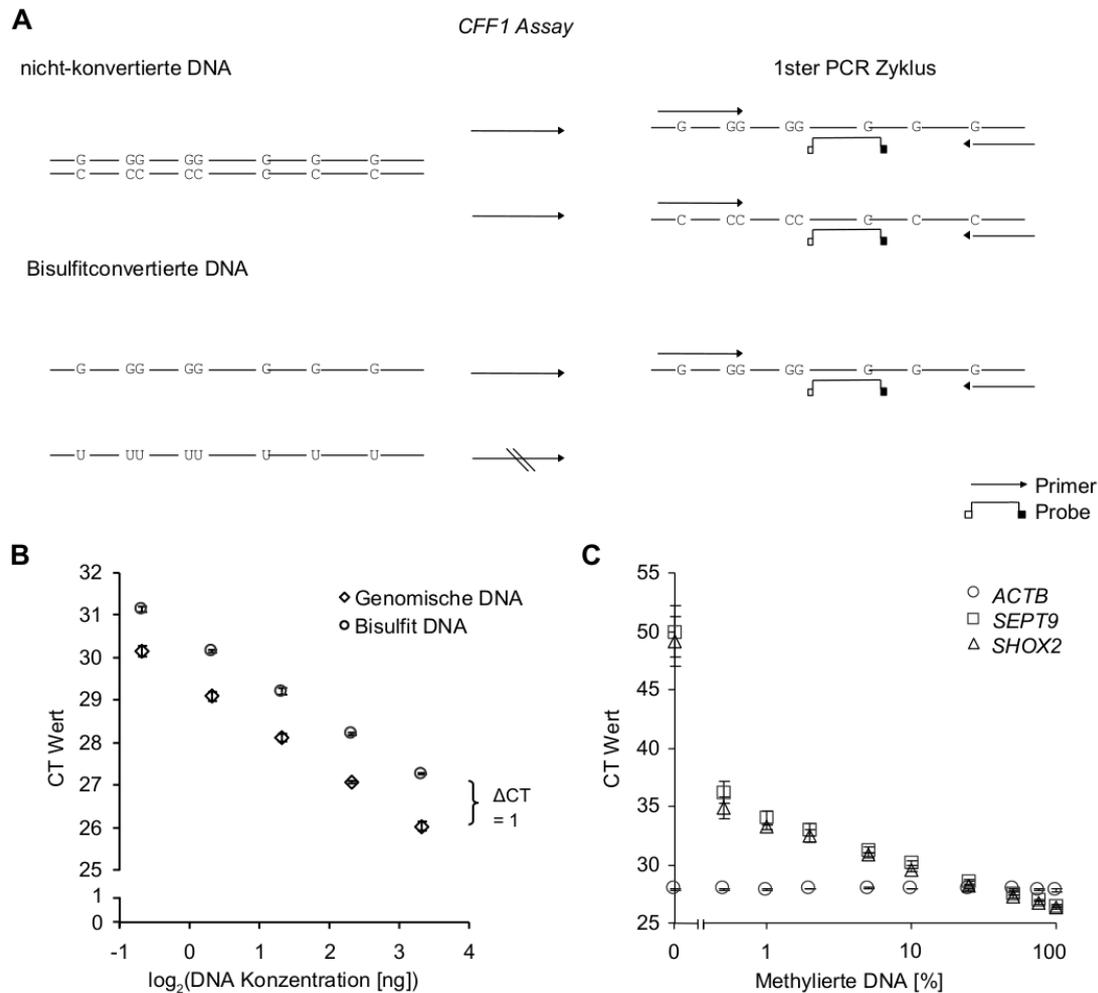


Abbildung 4-1: Validierung der Leistungsfähigkeit des CFF-Assay und der *SHOX2/SEPT9/ACTB*-Triplex. A: Primer des CFF-Assay und die Amplifikation der DNA im ersten PCR Zyklus auf konvertierter und nicht-konvertierter DNA **B:** Analytische Leistungsfähigkeit des CFF-Assay auf Verdünnungsreihen von genomischer DNA und bisulfitkonvertierter DNA (10; 5; 2,5; 1,25 und 0,625ng DNA pro PCR Reaktion) **C:** Analytische Leistungsfähigkeit der *SHOX2/SEPT9/ACTB*-Triplex auf einer Mischungsreihe aus unmethylierter und artifizell methylierter DNA (100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 und 0 % methylierte DNA). Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

4.1.2 Design und Validierung der methylierungsspezifischen qRT-PCR Assays

Um die DNA-Methylierung der zu untersuchenden Gene zu quantifizieren, war das erste Ziel der Arbeit, die Entwicklung methylierungsspezifischer Assays für die Gene LHX3, CXCL12, PITX3 und PD-L1. Hierzu wurden, wie in **Kapitel 2.4.4** beschrieben, zwei unterschiedliche qRT-PCR Methoden zur Quantifizierung der Methylierung verwendet: Zum einen methylierungsspezifische (MSP) Assays und zum anderen quantitative

Methylierungsmessungen (QM). Die MSP-Assays wurden jeweils als Duplex gemessen. Dies bedeutet, dass sie in Kombination mit β -Actin (ACTB) als Referenz für die Gesamtmenge an bisulfitkonvertierter DNA gemessen wurden. Beim QM-Assay wurde kein Referenzgen benötigt, da methylierte und unmethylierte DNA parallel über zwei Oligonukleotidproben quantifiziert werden.

Für *PD-L1* wurden zwei qRT-PCR-Assays entwickelt. Der erste wurde in der Mitte der kurzen CpG-Insel gelegt (cg02823866), während der zweite gerade außerhalb der CpG-Insel in der Lage der cg-Probe cg19724470 gelegt wurde (**Abbildung 4-2 A**).

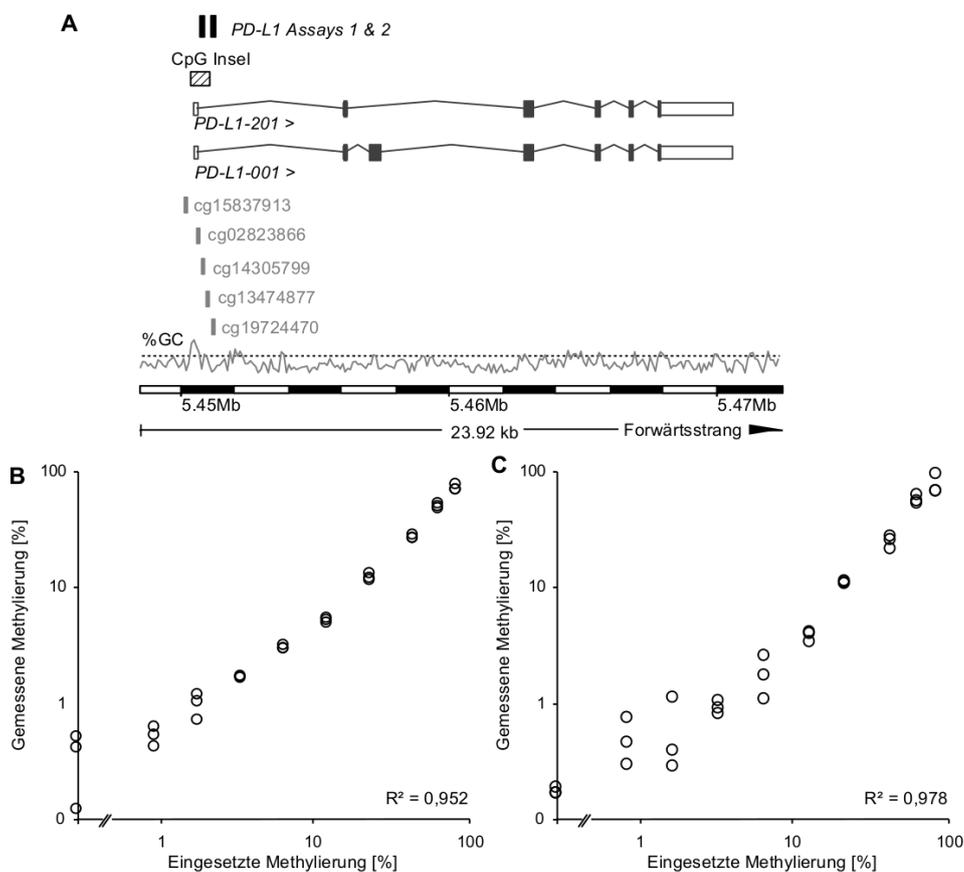


Abbildung 4-2: Überblick über das Gen *PD-L1* mit den beiden entwickelten Assays und der Validierung beider Assays. Die graue Linie zeigt den GC-Gehalt [%] und die gestrichelte Linie stellt dabei einen GC-Gehalt von 50 % dar. Die Abbildungsinformationen wurden der Datenbank Ensembl Homo sapiens Version 82.37 (GRCh37.p3) entnommen. **A:** Dargestellt sind beide Varianten von *PD-L1* (-201 und -001), die Lage der beiden *PD-L1* MSP-Assays 1 & 2 und die Lage der fünf cg-Proben vom Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip, die von den TCGA Daten verwendet wurden. **B:** Validierung von *PD-L1* Assay 1 und **C:** *PD-L1* Assay 2 auf einer Methylierungsmischungsreihe. Die Daten wurden teilweise publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶

Zur Messung der DNA-Methylierung von *CXCL12*, *PITX3* und *LHX3* wurden neue Assays entwickelt und anschließend validiert. Für *PITX3*, *CXCL12* und *LHX3* wurden die Assays an das Design vorheriger Assays von Dietrich *et al.*^{79,147} angelehnt (**Abbildung 4-3 A-1, B-1, C-1**).

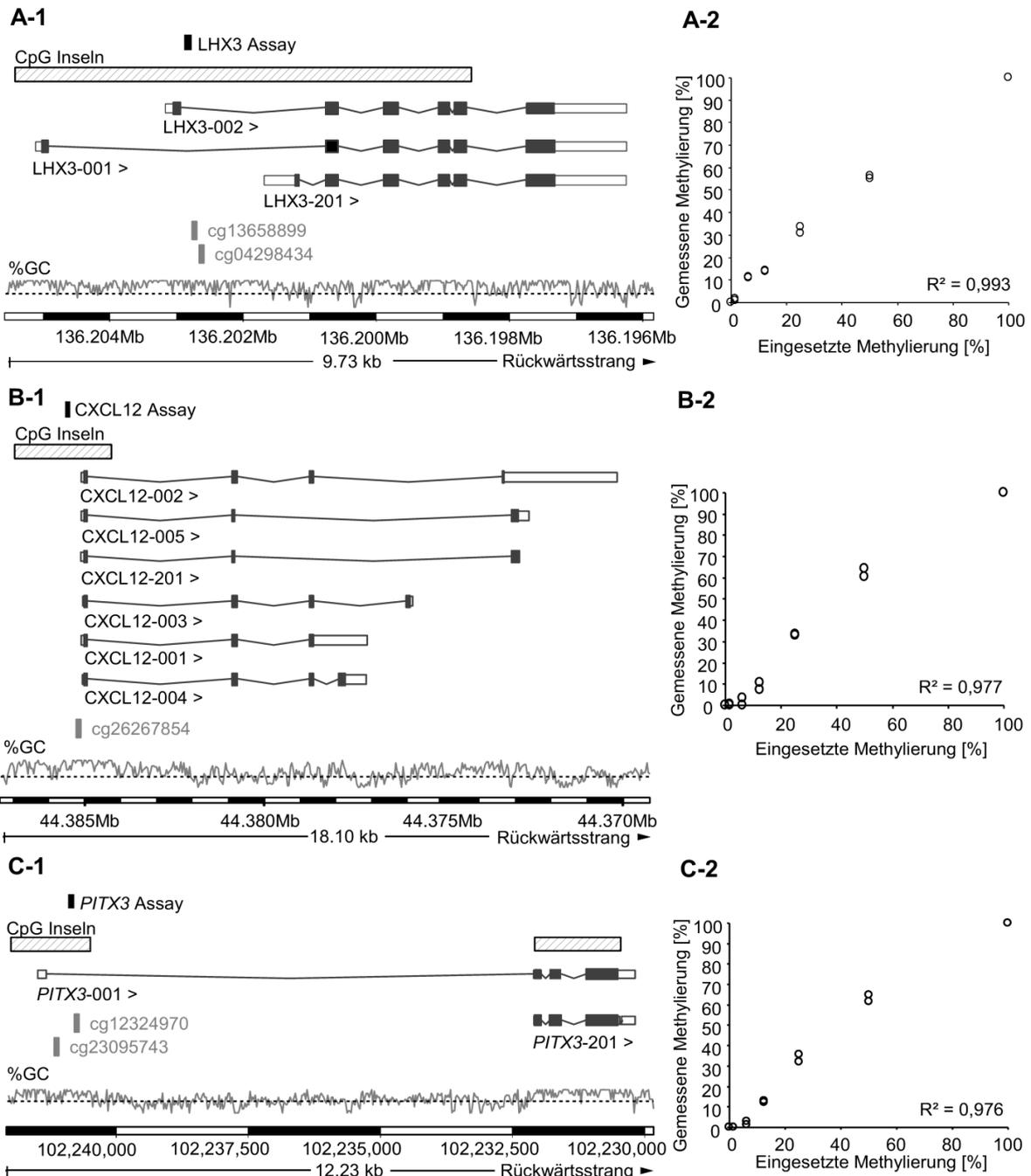


Abbildung 4-3: Überblick über die Gene *PITX3*, *LHX3* und *CXCL12* mit den entwickelten Assays und der Validierung der Assays. Die graue Linie zeigt den GC-Gehalt [%] und die gestrichelte Linie stellt dabei einen GC-Gehalt von 50 % dar. Die Abbildungsinformationen wurden der Datenbank Ensembl Homo sapiens Version 82.37 (GRCh37.p3) entnommen. Dargestellt sind jeweils die Lage der QM-Assays von **A-1: *LHX3*** **B-1: *CXCL12*** und **C-1: *PITX3*** und die Lage der verwendeten cg-Probes vom Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip, die von den TCGA Daten verwendet wurden. Validierung der Assays **A-2: *LHX3*** **B-2: *CXCL12*** und **C-2: *PITX3*** auf einer Methylierungsmischungsreihe (0; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 % methylierte DNA). Die Daten wurden teilweise publiziert in Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁸ und Goltz & Holmes *et al.*¹⁴⁹.

Zur Etablierung der methylierungs-spezifischen Assays wurden in einem ersten Schritt Oligonukleotide entwickelt, die in die annotierten Promotorregionen (laut Datenbank Ensembl Homo sapiens Version 82.37 (GRCh37.p3)) gelegt wurden. In einem nächsten Schritt wurden die verschiedenen Oligonukleotidpaare in einer qRT-PCR mit verschiedenen Einsatzmengen an DNA, vollständig methylierter und unmethylierter DNA, mit SYBRgreen getestet. Zur Kontrolle wurde eine NTC (*no template control*) mitgeführt. Anhand der Schmelzkurven und Amplifikationskurven konnten geeignete Kombination bestimmt und hierzu fluoreszenzmarkierte Oligoprobes bestellt werden, um die Spezifität der Assays zu erhöhen. Zudem wurden verschiedene Temperaturprofile getestet, um eine optimale Leistungsfähigkeit zu gewährleisten und einen Bias zu vermeiden. Für das Design von Oligonukleotiden und Oligoprobes war es wichtig gewisse Kriterien zu beachten:

- Die Schmelztemperatur der Probe sollte immer 5-10 °C höher sein, als die der Oligonukleotide.
- Bei einem QM-Assay sollten Oligoprobes für methylierte und unmethylierte DNA ähnliche Schmelztemperatur haben.
- Am 5'-Ende der Oligoprobes sollten keine Guanin-Basen vorhanden sein, da diese bereits als Quencher für den Farbstoff wirken können.
- Es ist sinnvoll möglichst wenige Guanin innerhalb der Sequenz zu haben, da diese teurer zu synthetisieren sind als Cytosine.
- Die Länge der Amplikons wurde so gewählt, dass sie möglichst kurz im Bereich von 80-110 bp lang sind, um die Messung auf FFPE Gewebe (FFPET) zu ermöglichen, da dieses wie vorher beschrieben stark fragmentiert ist.

Nach erfolgreicher Entwicklung wurden die Assays abschließend validiert. Hierzu wurden sie auf einer Mischungsreihe aus artifiziell methylierter und vollständig unmethylierter DNA (aus Sperma) getestet (0; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 % methylierte DNA). Die Assays zeigten alle eine sehr hohe Messgenauigkeit (**Abbildung 4-3 A-2, B-2, C-2 und Abbildung 4-2 B**). Es wurde deutlich, dass besonders die MSP-Assays (*PD-L1*) im Vergleich zu den QM-Assays (*LHX3, CXCL12, PITX3*) eine höhere Genauigkeit im sehr niedrigen Bereich der Mischungsreihe (1,56 und 3,13 % Methylierung) zeigen. Dennoch zeigten alle Assays eine sehr gute, für die weitere Verwendung ausreichende, Leistungsfähigkeit.

Für die Messung der DNA-Methylierung von *PITX2*¹¹⁰ und *PANCR* (*PITX2-lncRNA*) wurden bereits zuvor etablierte Assays verwendet. Die Lage der Assays innerhalb des jeweiligen Gens

sind in **Abbildung 4-4** dargestellt. Der *PITX2*-Assay liegt im Promotorbereich P2 der *PITX2ab*-Variante. Der *PANCR*-Assay liegt im intragenischen Bereich der *PANCR* Gens.

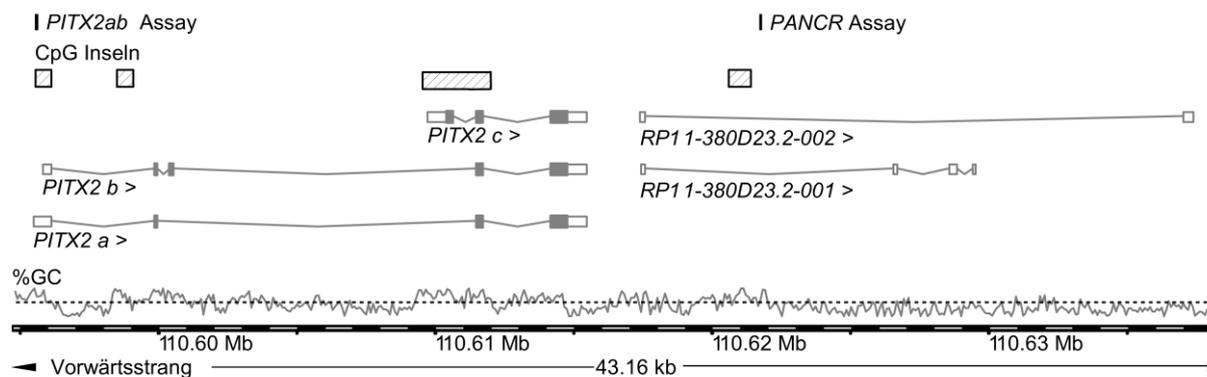


Abbildung 4-4: Überblick über die Gene *PITX2* und *PANCR* auf Chromosom 4. Dargestellt sind drei Isoformen von *PITX2* (a, b und c) und *PANCR*. Die graue Linie zeigt den GC-Gehalt [%] und die gestrichelte Linie stellt dabei einen GC-Gehalt von 50 % dar. Die Abbildungsinformationen wurden der Datenbank Ensembl Homo sapiens Version 82.37 (GRCh37.p3) entnommen. Die Daten wurden bereits publiziert in Sailer & Holmes *et al.*¹⁵⁰.

4.1.3 Design und Validierung der mRNA qRT-PCR Assays

Um den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression zu untersuchen wurden für die Gene *PITX3* und *PD-L1* Assays zur Messung der mRNA-Expression entwickelt. Zusätzlich wurde ein Assay zur Detektion der *PSA* mRNA Expression entwickelt. Dieser erlaubt es *PSA* als Kontrolle im Versuch zur Stimulation des Androgenrezeptors zu messen (siehe **Kapitel 4.3.4**).

Für die Assays zur Expression wurden mehrere Oligonukleotidpaare entwickelt die jeweils ein Intron überspannen, um die Amplifikation auf genomischer DNA zu verhindern. Die beiden Oligonukleotide wurden jeweils in einem der beiden Exons und die Sequenz der Fluoreszenzprobe wurde jeweils über die Splice Stelle gelegt (**Abbildung 4-5 A-1 & B-1**). Die Länge der Amplikons wurde möglichst kurz gehalten, um einen möglichen Einsatz auf RNA aus FFPE zu ermöglichen (*PD-L1*: 105 bp und *PITX3*: 163 bp). Auf zuvor klonierten und mit Restriktionsenzymen linearisierten Plasmiden wurden die Assays validiert und die PCR-Effizienz berechnet. Für die Plasmide wurden die beiden Gene *PITX3* und *PD-L1* aus cDNA amplifiziert und anschließend über TA-Klonierung in das pCR[®]2.1-Plasmid kloniert. Die erfolgreich klonierten Plasmide wurden über Sequenzierung identifiziert. Anschließend wurde die PCR-Effizienz auf einer Verdünnungsreihe (von 10 bis 0,00001 pg/rxn) der jeweiligen Plasmide gemessen (**Abbildung 4-5 A-2 & B-2**). Die PCR-Effizienz für den *PITX3*-cDNA-Assay betrug 113 % und die Effizienz für den *PD-L1*-cDNA-Assay betrug 100 %.

Für den Versuch der Androgenrezeptor Stimulation wurde ein PSA-Assay entwickelt. Hierzu wurden verschiedene Oligonukleotidpaare auf verschiedenen Zelllinien getestet, als Positivkontrolle dienten Prostatakrebszelllinien und als Negativkontrolle Brustkrebszelllinien.

Anschließend wurde die Oligoprobe wie in **Kapitel 4.1.2** beschrieben entwickelt.

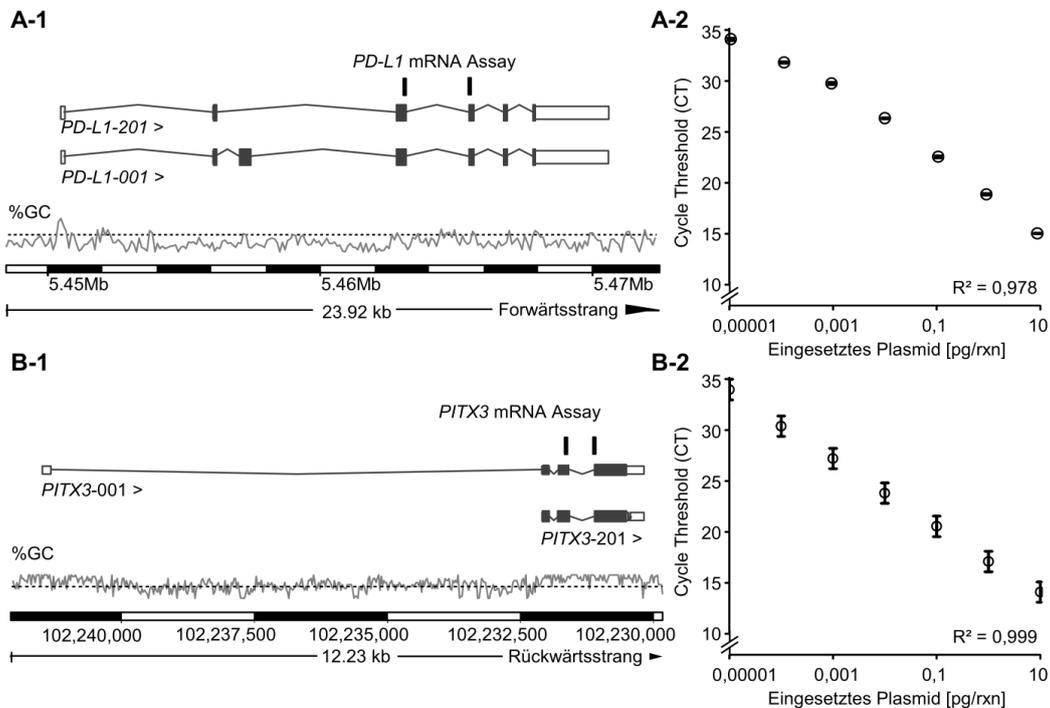


Abbildung 4-5: Überblick über das *PD-L1* und *PITX3* Gen. Dargestellt sind die Lage der mRNA RT-PCR Assays für **A:** *PD-L1* und **B:** *PITX3*. Beide Assays wurden über eine splice-site gelegt und die PCR-Effizienz wurde mittels eines klonierten Plasmids validiert. Die graue Linie zeigt den GC-Gehalt [%] und die gestrichelte Linie stellt dabei einen GC-Gehalt von 50 % dar. Die Informationen wurden der Datenbank Ensembl Homo sapiens Version 82.37 (GRCh37.p3) entnommen und die Abbildungen hiernach erstellt.

Für die durchgeführten Versuche wurde als Referenz auf mRNA-Ebene immer eine Kombination aus vier Referenzgenen (*ALAS*, *HPRT*, *G6PD* und *SDHA*) gemessen. Die Assays wurden zuvor von Barabra Uhl entwickelt und etabliert.

4.2. Validierung der Bisulfit-Konversion

Die Bisulfit-Konversion von neun verschiedenen kommerziell erhältlichen Kits wurde verglichen, um das beste Kit für die nachfolgenden Anwendungen zu identifizieren. Vor allem der Einsatz von FFPE Gewebe (FFPET) ist von zentraler Bedeutung, da FFPET das Gewebe ist, dass für retrospektive Kohorten Studien zur Verfügung steht. Die Konversion von FFPET stellt, durch die starke Fragmentierung der DNA, eine besondere Herausforderung dar. Die folgenden neun Kits wurden verglichen:

- EpiTect® Fast FFPE Bisulfite Kit (Qiagen)
- EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen)
- EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen)
- EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research)
- EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo Research)
- EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research)
- innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit (Analytik Jena)
- innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (Analytik Jena)
- innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit (Analytik Jena)

Die Bisulfit-Konversion der DNA wurde bezüglich der folgenden Charakteristika analysiert:

- DNA-Ausbeute
- Degradierung und Reinheit der DNA
- Effizienz der Konversion und
- Stabilität der konvertierten DNA bei verschiedenen Bedingungen

Vor allem die Konversion von FFPE Patientenproben wurde untersucht und mit der Konversion von hochmolekularer (HMW) DNA aus eingefrorenem Gewebe verglichen.

4.2.1 DNA-Ausbeute

Zuerst wurde die unterschiedliche Ausbeute der Kits, bei gleichem Einsatz an DNA, verglichen. Hierzu wurden die Proben mittels der Kits nach Angaben der Hersteller prozessiert und die Ausbeute mit Hilfe der UV-Spektrometrie und RT-PCR bestimmt. Zur Bestimmung der Ausbeute mittels RT-PCR wurden der CFF-Assay und die SHOX2/SEPT9/ACTB-Triplex verwendet (siehe **Kapitel 4.1.1, Abbildung 4-1**).

Alle Kits wurden bezüglich ihrer Ausbeute sowohl mit HMW DNA als auch mit FFPE DNA aus Placentagewebe getestet. Alle Kits zeigten hohe DNA-Ausbeuten zwischen 29 % und 92 %. Bei der Quantifizierung mittels UV-Spektrometrie zeigte das EpiTect® Fast FFPE die niedrigste Ausbeute (34,9 %; **Abbildung 4-6**). Die beste Ausbeute, sowohl mit HMW als auch mit FFPE DNA, zeigte die innuCONVERT Bisulfite Kit Familie (HMW: 69,8 % und FFPE: 48,0 %). Die Ergebnisse mittels CFF-Assay zeigten ähnliche Ergebnisse. Die niedrigste Ausbeute zeigte erneut das EpiTect® Fast FFPE Kit (HMW: 72,9 % und FFPE: 42,9 %). Bei HMW DNA zeigte das EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (91,6 %) die höchste Ausbeute, wohingegen bei FFPE DNA erneut die innuCONVERT Bisulfite Kit Familie (49,6 %) das beste Ergebnis erzielte.

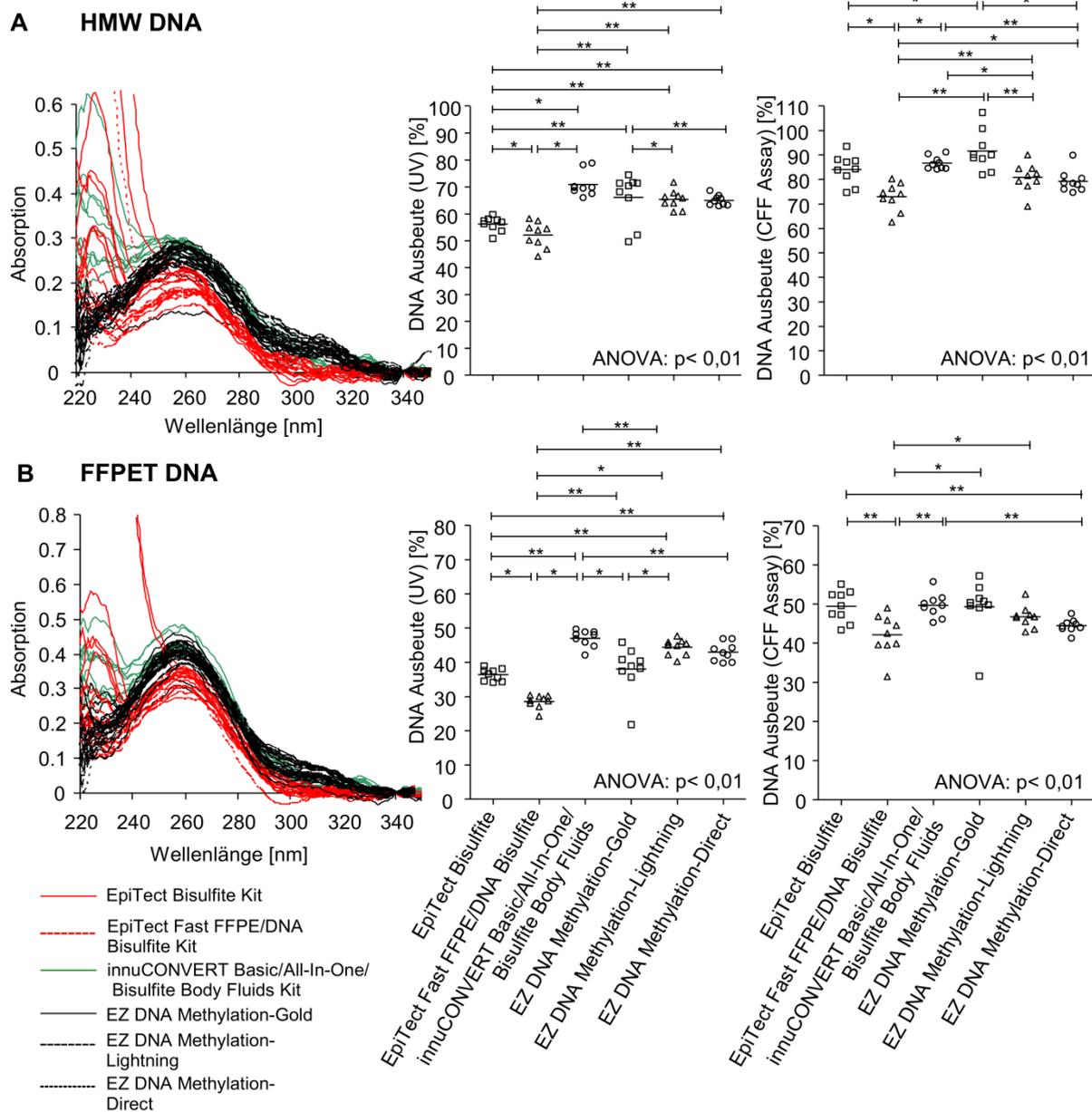


Abbildung 4-6: DNA-Ausbeute und Reinheit nach der Bisulfite-Konversion mit neun verschiedenen Kits. Jedes Kit wurde in neun Replikaten getestet **A:** Quantifizierung der Ausbeute mittels UV-Spektrometrie **B:** Quantifizierung mittels CFF-Assay. Die qRT-PCR wurde in technischen Replikaten durchgeführt und der Median ist hier dargestellt. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

Zusätzlich wurden die Proben mittels des gut etablierten qRT-PCR Assays, der *SHOX2/SEPT9/ACTB*-Triplex, getestet. Dies diente dazu die Leistungsfähigkeit der Kits noch weiter zu untersuchen, auch mit einem methylierungsspezifischen Assay, da der CFF-Assay die Gesamtausbeute unabhängig von der Konversion misst. Hierbei wurde die DNA-Methylierung von *SHOX2* und *SEPT9* bestimmt und *ACTB* diente als Referenz zur Quantifizierung der gesamten Menge an bisulfitekonvertierter DNA, unabhängig vom Methylierungsstatus. Auf

Messung auf HMW DNA aus Placenta **B**: Messung auf FFPE DNA aus Placenta. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

4.2.2 Integrität, Stabilität und Reinheit der DNA

Um die Integrität der konvertierten DNA zu bestimmen wurden die Proben vor der Konversion und nach der Konversion auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Ausgangsmaterial wurde einmal HMW und einmal FFPE DNA verwendet. Beim Einsatz von HMW DNA konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Kits festgestellt werden. Alle Proben waren nach der Konversion deutlich fragmentiert im Vergleich zu der Ausgangs DNA. Diejenigen Kits (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, EZ DNA Methylation-Direct™ Kit, und EpiTect® Bisulfite Kit) bei denen die Konversion eine lange Inkubationszeit benötigte führten zu einer höhere Fragmentierung der DNA. Die Kits (EpiTect® Fast FFPE Kit, EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit, und die InnuCONVERT Bisulfite Kit Familie) die auf einem schnellen Konversionsprotokoll beruhen zeigten die geringste DNA-Fragmentierung (**Abbildung 4-8**). Beim Einsatz von DNA aus FFPE war die DNA bereits vor der Konversion sehr stark fragmentiert. Nach der Konversion war die DNA nur geringfügig stärker fragmentiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kits festgestellt werden.

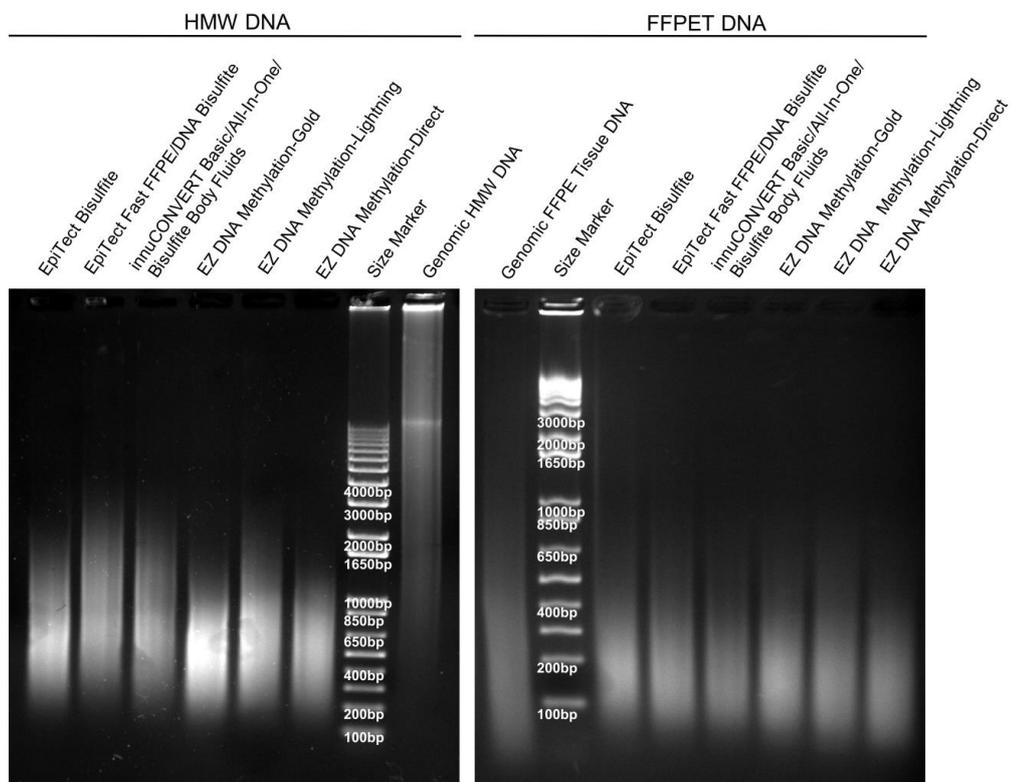


Abbildung 4-8: Integrität der DNA (HMW und FFPE) vor und nach der Bisulfit-Konversion. Die DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und für die bisulfitkonvertierten Proben wurden die neun Replikate gepoolt. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

Die Reinheit der DNA nach der Konversion, beziehungsweise der inhibitorische Effekt von Unreinheiten, wurde mittels qRT-PCR von *SHOX2*, *SEPT9* und *ACTB* geprüft. Hierzu wurde Wasser als Prozesskontrolle mittels der einzelnen Kits prozessiert. Verschiedene Volumina dieser Prozesskontrollen (0-10 µl) wurden in die qRT-PCR eingesetzt. In keinem der Kits kam es zu einer signifikanten Inhibition der PCR (**Abbildung 4-9 A**).

Bisulfitkonvertierte DNA liegt zum größten Teil einzelsträngig. Die harschen chemischen Bedingungen unter denen die Bisulfitkonversion erfolgt, führen dazu, dass die DNA bereits stark degradiert vorliegt. Die Lagerung der DNA könnte sich weiter auf ihre Integrität auswirken. Diese Auswirkung bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (-80 °C, -20 °C, 4 °C und 37 °C) wurde für HMW und FFPE DNA geprüft (**Abbildung 4-9 B, C**). Die Proben wurden bei den genannten Bedingungen für einen Monat gelagert. Die Menge an intakter, amplifizierbarer DNA wurde mittels CFF-Assay evaluiert. Die Stabilität der DNA war bei -80 °C, -20 °C und 4 °C bei allen Kits gleich gut. Bei einer Lagerung bei 37 °C war die DNA nach einem Monat deutlich degradiert. Hier gab es sichtbare Unterschiede zwischen den Kits. Die innuCONVERT Bisulfite Kit Familie zeigte hier die höchste Stabilität. Die DNA war jedoch auch hier deutlich degradiert, im Vergleich zu den anderen Lagerungsbedingungen.

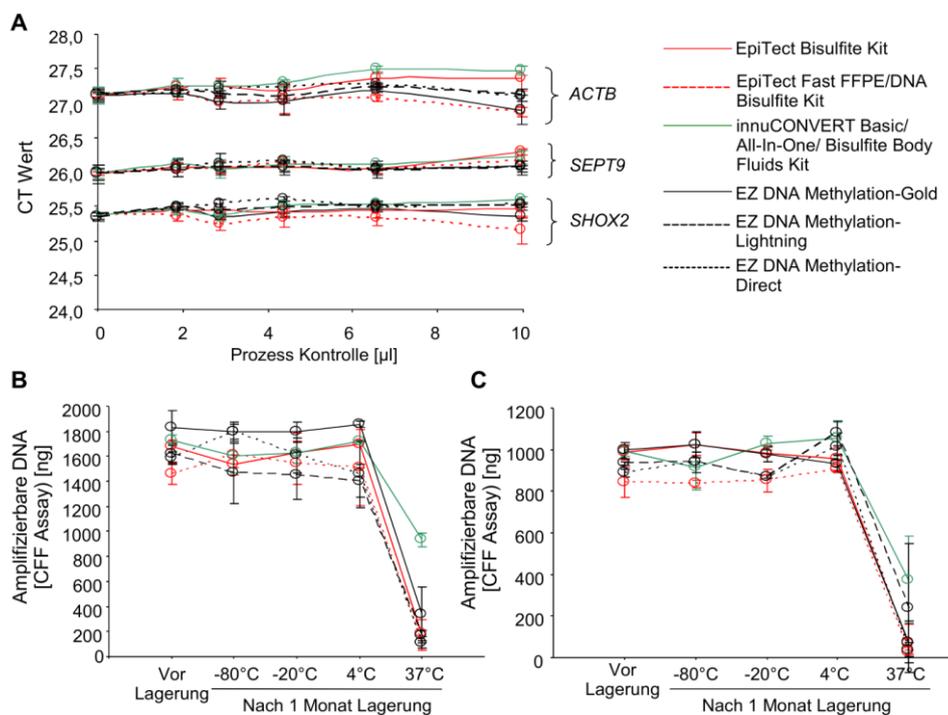


Abbildung 4-9: PCR Inhibition und Stabilität bei verschiedenen Lagerungsbedingungen nach Bisulfit-Konversion. **A:** Alle Kits wurden mit Wasser prozessiert und von dem entstandenen Eluat wurden verschiedene Volumina (0-10 µl) zur *SHOX2/SEPT9/ACTB*-Triplex qRT-PCR gegeben. **B, C:** Bisulfitkonvertierte DNA wurde aus frischem Gewebe (B) und FFPE Gewebe (C) gewonnen. Die Stabilität der DNA bei verschiedenen Lagerungsbedingungen (-80 °C, -20 °C, 4 °C und 37 °C) wurde untersucht. Die

amplifizierbare DNA wurde mittels CFF-Assay gemessen. Die qRT-PCR wurde in technischen Replikaten durchgeführt und Median und Standardabweichung dargestellt. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

4.2.3 Effizienz und Spezifität der Konversion

Im Folgenden wurden die Effizienz und die Spezifität der Konversionsreaktion untersucht. Hierfür wurden Oligonukleotide verwendet, die keine Cytosine in ihrer Sequenz enthalten (CFP-Oligonukleotide), um die Gesamtmenge an DNA zu amplifizieren. Zwei unterschiedliche PCR-Produkte (228 bp und 415 bp) auf Chromosom 2 wurden über Klonierung und anschließende Sequenzierung untersucht. **Abbildung 4-10 A** stellt die Methode der Amplifikation und eine Beispielsequenz im nicht-konvertierten bzw. konvertierten Zustand dar. Die erfolgreiche Amplifikation der PCR-Produkte sowohl auf nicht-konvertierten als auch auf Bisulfit-konvertierten DNA Proben. Diese wurde mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen (**Abbildung 4-10 B**). Alle Kits wurden mit 2 µg HMW DNA getestet und PCR-Produkte über TA-Klonierung in das pCR[®] 2.1 Plasmid kloniert, anschließend sequenziert und ausgewertet. Insgesamt wurden 421 Klone und 18900 Konversionsstellen ausgezählt und alle Kits wiesen eine hohe Konversionsrate über 98 % auf (**Abbildung 4-10 C**). Das EZ DNA Methylation-Direct[™] Kit zeigte die höchste Konversionsrate mit 99,9 % und das EpiTect[®] Bisulfite Kit zeigte die niedrigste Konversionsrate mit 98,7 %.

Ergebnisse

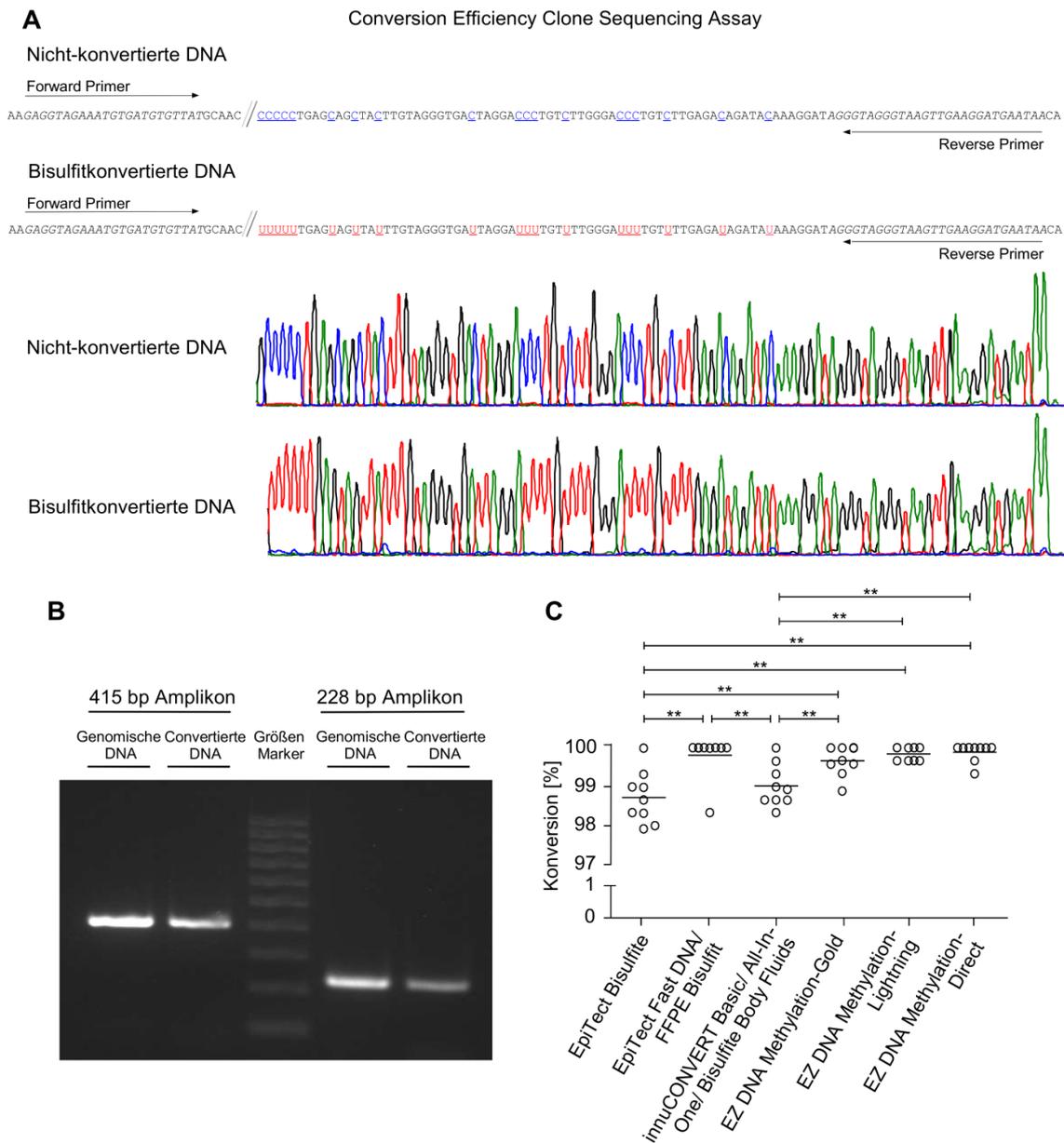


Abbildung 4-10: Methode und Ergebnisse des CFP Klonsequenzierungs-Assays. **A:** Prinzip der Klonsequenzierung mittels CFP-Oligonukleotiden. Amplifikation und Sequenzierung sowohl konvertierter als auch nicht-konvertierter DNA **B:** Agarosegel der zwei verwendeten Amplikons (228 und 415 bp) auf genomischer und konvertierter DNA **C:** Konversionseffizienz der einzelnen Kits. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

Bei der Bisulfit-Konversion sollte die Konversion von Cytosin zu Uracil im Idealfall 100 % betragen. Es kann jedoch zu einer Nebenreaktion kommen: die unerwünschte Konversion von methyliertem Cytosin zu Thymin. Diese unerwünschte Konversion sollte bei den Kits idealerweise gegen 0 % gehen. Hierzu wurden spezielle 11-mere Oligonukleotide bestellt, die in der Mitte ein methyliertes Cytosin enthalten (T₅MeCT₅). Diese Oligonukleotide wurden mittels der Kits prozessiert und die Ergebnisse mittels HPLC analysiert. Um die analytische

Leistungsfähigkeit der HPLC zu testen wurde eine Mischungsreihe aus zwei Oligonukleotiden getestet (T_5MeCT_5 und T_{11}). Diese zeigte in der HPLC ein Limit der Quantifizierung von unter 1 % (**Abbildung 4-11 A**). Die Kits zeigten eine unerwünschte Konversion zwischen 0,9 % (innuCONVERT Kit Familie) und 2,7 % (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit) (**Abbildung 4-11 B**).

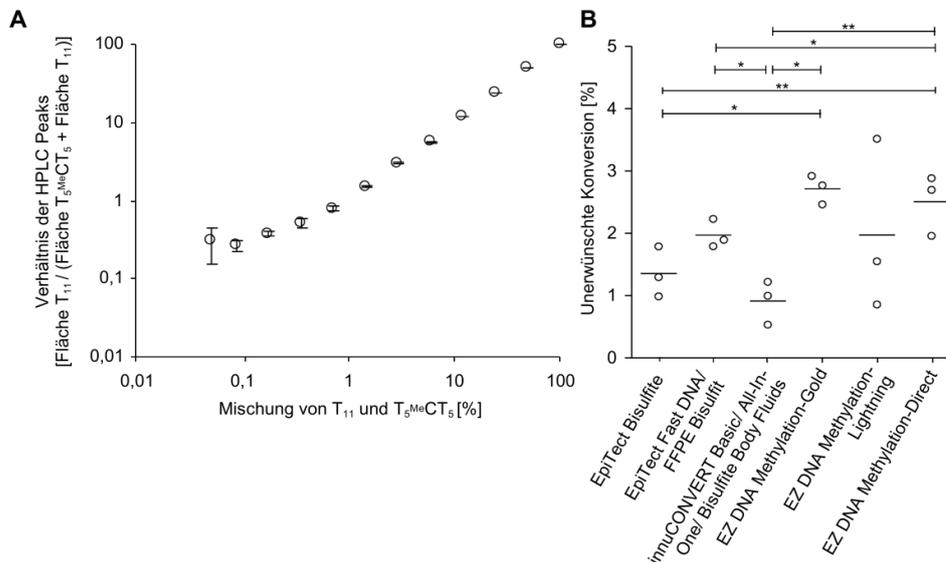


Abbildung 4-11: Analyse der unerwünschten Konversion von methyliertem Cytosin zu Thymin mittels HPLC. A: Messung einer Mischungsreihe T_{11} in T_5MeCT_5 zur Bestimmung der Quantifizierungsgrenze bei niedrigen T_{11} -Konzentrationen. **B:** Bestimmung der unerwünschten Konversion in den neun Kits. Jede Bisulfitreaktion wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

4.2.4 Direkte Konversion

Als Letztes wurden drei der neun Kits (EpiTect® Fast FFPE Bisulfite Kit, innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit und EZ DNA Methylation-Direct™ Kit) bezüglich der direkten Bisulfit-Konversion getestet. Dies bedeutet, dass die DNA nicht zuvor in einer separaten Aufreinigung extrahiert wird, sondern Konversion und DNA-Extraktion in einem Schritt ablaufen. Es konnten nur drei Kits verwendet werden, da nicht alle Kits für diese spezifische Anwendung geeignet sind. Hierzu wurden verschiedenen Gewebearten in die Kits eingesetzt, zum einen frisches Gewebe (0,1 mg und 1 mg), FFPET (ein 10 μ m Schnitt) und der humanen Zelllinie DLD1 (1×10^5). Die Ausbeute der bisulfitkonvertierten Proben wurde wie zuvor mittels UV-Spektrometrie und CFF-Assay quantifiziert (**Abbildung 4-12**). Es zeigte sich eine signifikant höhere Ausbeute bei der Anwendung des innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kits im Vergleich zu den anderen Kits.

Beim Einsatz der humanen Kolonzelllinie DLD1 zeigten alle drei Kits eine gute DNA-Ausbeute und die DNA konnte in beiden RT-PCR Assays amplifiziert werden. Das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit zeigte die höchste Ausbeute (1876 ng; **Abbildung 4-12 A**).

Für den Einsatz von frischem Gewebe wurden 0,1 mg und 1 mg Gewebe eingesetzt, wobei beim EZ DNA Methylation-Direct™ Kit ein Einsatz von 1mg vom Hersteller nicht vorgesehen war. Die Kits zeigten jeweils eine ähnliche Ausbeute an amplifizierbarer DNA. Das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit zeigte erneut die höchste Ausbeute (1512 ng; **Abbildung 4-12 B**).

Beim direkten Einsatz von FFPE Gewebeschnitten zeigte, dass innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit die höchste DNA-Ausbeute (1681 ng). Bei der CFF-PCR zeigte sich, dass nur das EpiTect® Fast FFPE Bisulfite Kit und das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit amplifizierbare DNA generieren. Die konvertierte DNA aus dem EZ DNA Methylation-Direct™ Kit konnte nicht in der PCR amplifiziert werden, obwohl mittels UV-Spektrometrie eine relativ hohe DNA-Ausbeute (> 800 ng) gemessen wurde (**Abbildung 4-12C**).

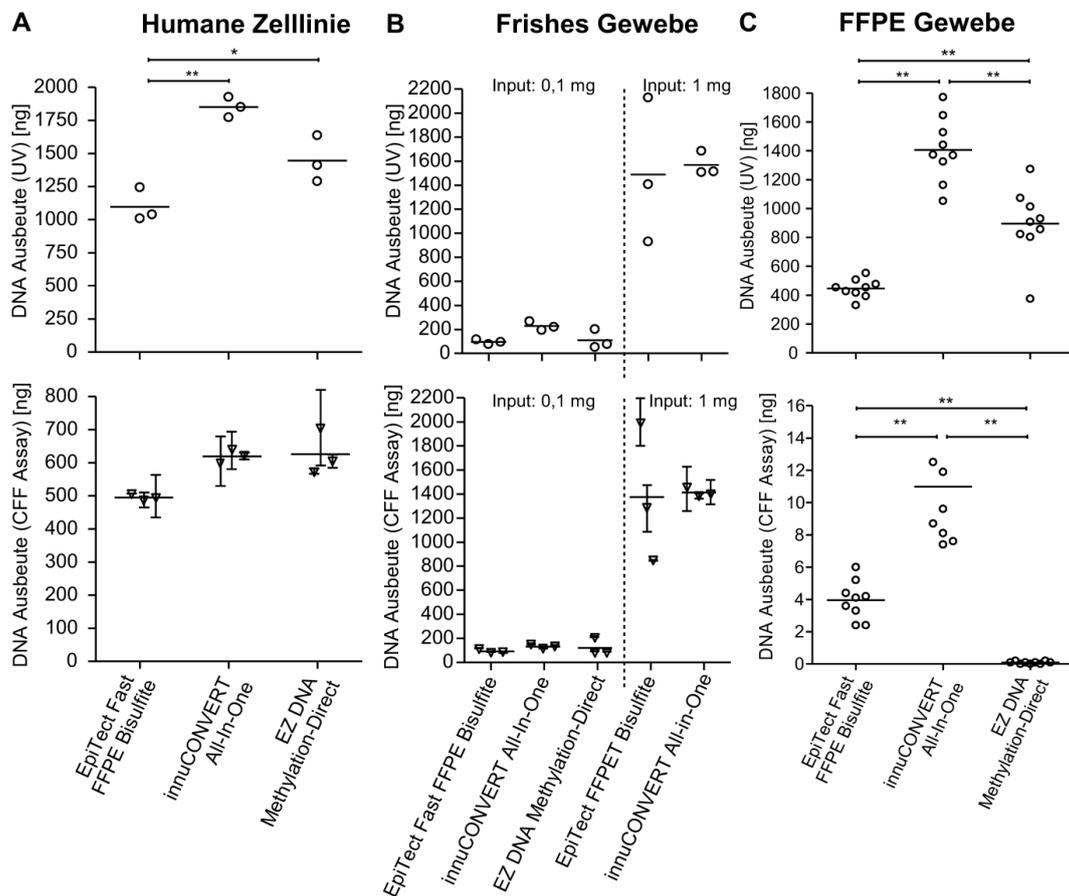


Abbildung 4-12: Direkter Input von Zelllinien, frischem Gewebe und FFPE Gewebeschnitten in drei der neun Kits (ohne vorherige DNA Extraktion) A: Humane Kolonzelllinie DLD1 (10^5 Zellen) **B:** frisches Gewebe der Placenta (0,1 und 1 mg) und **C:** FFPE Gewebe (ein 10 μ m Schnitt). Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Jung *et al.*¹⁴⁵.

4.3. Charakterisierung neuer Biomarker im Prostatakarzinom

4.3.1 Übersicht der Biomarker im Prostatakarzinom

In Prostatakarzinompatienten wurden vier verschiedene epigenetische Biomarker untersucht: *LHX3*, *PITX3*, *CXCL12* und *PD-L1*. Für *PITX3*, *CXCL12* und *LHX3* wurde gezeigt, dass diese Marker in Karzinomgewebe der Brust hypermethyliert sind^{79,147}. Diese Daten konnten wir in einer Fallkontrollstudie mit Brustkrebspatientinnen bestätigen (siehe Anhang **Kapitel 8.2.1, Abbildung 8-1**). Brust- und Prostatakrebs sind beide hormonabhängige Tumore. Daraufhin wurden diese Marker im Prostatakarzinom untersucht, da sich die Frage stellte, ob auch in Prostata Tumoren eine Hypermethylierung dieser Gene vorliegt. Hierzu wurden Patienten einer Fallkontrollstudie der Universitätsklinik Bonn (UKB) verwendet. Zur Validierung wurde der frei zugänglichen Datensatz der TCGA (The Cancer Genome Atlas) Datenbank¹³⁷ verwendet (**Abbildung 4-13**).

Um die TCGA Daten zu verwenden wurden bei jedem Gen die cg-Probes verwendet, die mit der Lokalisation der entwickelten Assay übereinstimmten, wie in **Kapitel 4.1.2** gezeigt. Die folgenden cg-Probes wurden verwendet:

- *LHX3*: cg13658899 und cg04298434
- *PITX3*: cg12324970 und cg23095749
- *CXCL12*: cg26267854
- *PD-L1* (Assay1): cg02823866
- *PD-L1* (Assay2): cg19724470

LHX3, *PITX3* und *CXCL12* zeigten, wie auch bei Brustkrebs, eine signifikante Hypermethylierung in Prostatakrebs im Vergleich zu normalem und entzündlichem Prostatagewebe (**Abbildung 4-13 A, B, C**). Bei *PD-L1* zeigte der Assay 1 eine niedrige Methylierung, die sich im Tumor- und Normalgewebe nicht unterschied. *PD-L1* Assay 2 hingegen wies bei den TCGA Daten eine signifikante Hypermethylierung im Tumorgewebe auf und zeigte in der Fallkontrollstudie einen visuellen Trend zur höheren Methylierung im Tumorgewebe (**Abbildung 4-13 D, E**).

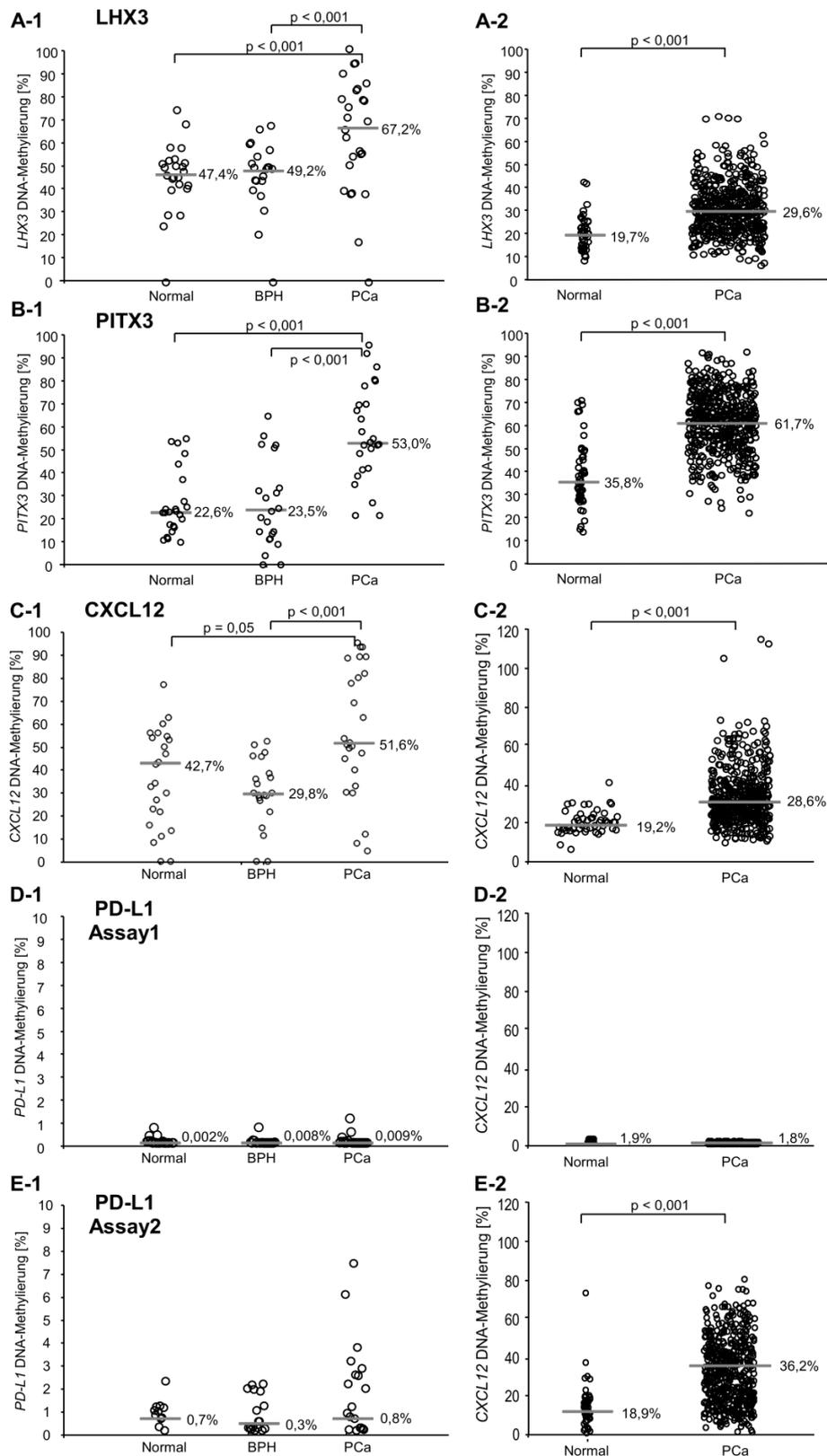


Abbildung 4-13: Methylierung in normalem, entzündlichem und karzinogenem Gewebe von Patienten mit Prostatakarzinom. Daten stammen von einer Fallkontrollstudie des UKB (1) und von TCGA (2). Der Median der Methylierung wird durch den grauen Balken angezeigt. **A:** *LHX3* **B:** *PITX3* **C:** *CXCL12* und **D, E:** *PD-L1*. Die Daten wurden zum Teil in Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁸, Goltz & Holmes *et al.*¹⁴⁹ und Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.* publiziert¹⁴⁶

Im Weiteren wurden die einzelnen Biomarker näher charakterisiert. Hierzu wurde die Prostatakarzinomkohorte des UKB verwendet und eine Validierungskohorte von TCGA. Der Zusammenhang der DNA-Methylierung mit der Expression wurde untersucht. *LHX3* zeigte als Biomarker, trotz differentieller Methylierung im Prostatakarzinom, kein großes Potential (siehe **Anhang Kapitel 8.2.2; Abbildung 4-13 A**). Es konnten zudem keine Korrelationen oder Assoziationen mit klinopathologischen Daten gefunden werden und die *LHX3* DNA-Methylierung zeigte keinen prognostischen Wert für das Patientenüberleben (siehe **Anhang Kapitel 8.2.2; Abbildung 8-2**), daher wird auf *LHX3* im Folgenden nicht weiter eingegangen.

4.3.2 *PITX3*

Um *PITX3* als Biomarker weiter zu untersuchen wurde im Folgenden seine Assoziation mit verschiedenen klinopathologischen Daten und dem Überleben der Patienten untersucht. Auch die mRNA-Expression in diversen Zelllinien und der TCGA Kohorte wurde analysiert.

In der UKB Kohorte zeigte die *PITX3* DNA-Methylierung eine Korrelation mit dem ISUP Gleason Grading ($r = 0,112$; $p = 0,012$) und dem prä-operativen PSA-Wert ($r = 0,134$; $p = 0,003$) und eine Assoziation mit dem pT-Status ($p < 0,001$) und dem Alter ($p = 0,011$). Dieselben Korrelationen wurden in der TCGA Kohorte gefunden. *PITX3* DNA-Methylierung korreliert mit ISUP Gleason Grading ($r = 0,193$; $p = 0,001$) und dem prä-operativem PSA-Wert ($r = 0,143$; $p = 0,017$) und zeigt eine Assoziation mit pT-Status ($p = 0,017$) und dem Alter ($p = 0,021$).

Um die *PITX3* DNA-Methylierung in Bezug auf seine prädiktive Eigenschaft zu untersuchen wurde die Methylierung dichotomisiert. Hierzu wurde ein optimierter Cutoff, mittels des „Cutoff Finders“ der Charité in Berlin, ermittelt¹⁵¹. In beiden Kohorten wurden optimierte Cutoffs separat ermittelt, da die Daten mit verschiedenen Methoden generiert wurden und daher der Cutoff nicht übertragen werden kann (UKB Kohorte: $PITX3_{\text{niedrig}} < 61,81 \% \leq PITX3_{\text{hoch}}$; TCGA Kohorte: $PITX3_{\text{niedrig}} < 68,18 \% \leq PITX3_{\text{hoch}}$).

In der UKB Kohorte zeigte die *PITX3* DNA-Methylierung einen signifikant prognostischen Wert in der univariaten Cox-Regressions-Analyse mit *PITX3* DNA-Methylierung als kontinuierlicher Variable (HR = 1,02 [95 % CI:1,00-1,03]; $p = 0,025$), sowie dichotomisiert (HR = 2,56 [95 % CI:1,44-4,54]; $p = 0,001$). Die Ergebnisse der Cox-Regressions-Analyse konnte mittels Kaplan-Meier Analyse bestätigt werden (**Abbildung 4-14 A, B**). In der TCGA Kohorte konnten die Ergebnisse der UKB Kohorte bestätigt werden. Die *PITX3* DNA-Methylierung zeigte einen signifikant prognostischen Wert in der univariaten Cox-Regressions-Analyse mit dichotomisierter *PITX3* DNA-Methylierung (HR = 1,83 [95 % CI:1,83-3,11]; $p = 0,027$). Die

Ergebnisse konnte mittels Kaplan-Meier Analyse bestätigt werden (**Abbildung 4-14 C, D**). Zudem liegt der Gedanke nahe *PITX3* in Kombination mit *PITX2* zu untersuchen. *PITX2* ist bereits im Prostatakarzinom validiert und die TCGA Daten zeigen eine gute Stratifizierung innerhalb der Promotorregion P2, die die *PITX2a* und *PITX2b* Isoformen codiert (**Abbildung 4-14 E**). Für die Analyse wurden drei Gruppen gebildet, *PITX2* und *PITX3* sind niedrig methyliert, *PITX2* oder *PITX3* sind hoch methyliert, *PITX2* und *PITX3* sind hoch methyliert. In der Kaplan-Meier Analyse zeigt sich eine signifikante Stratifizierung in diesen drei Subpopulationen. Patienten bei denen beide Gene hoch methyliert sind haben ein besonders kurzes Biochemisches Rezidiv-(BCR)-freies Überleben (**Abbildung 4-14 F**).

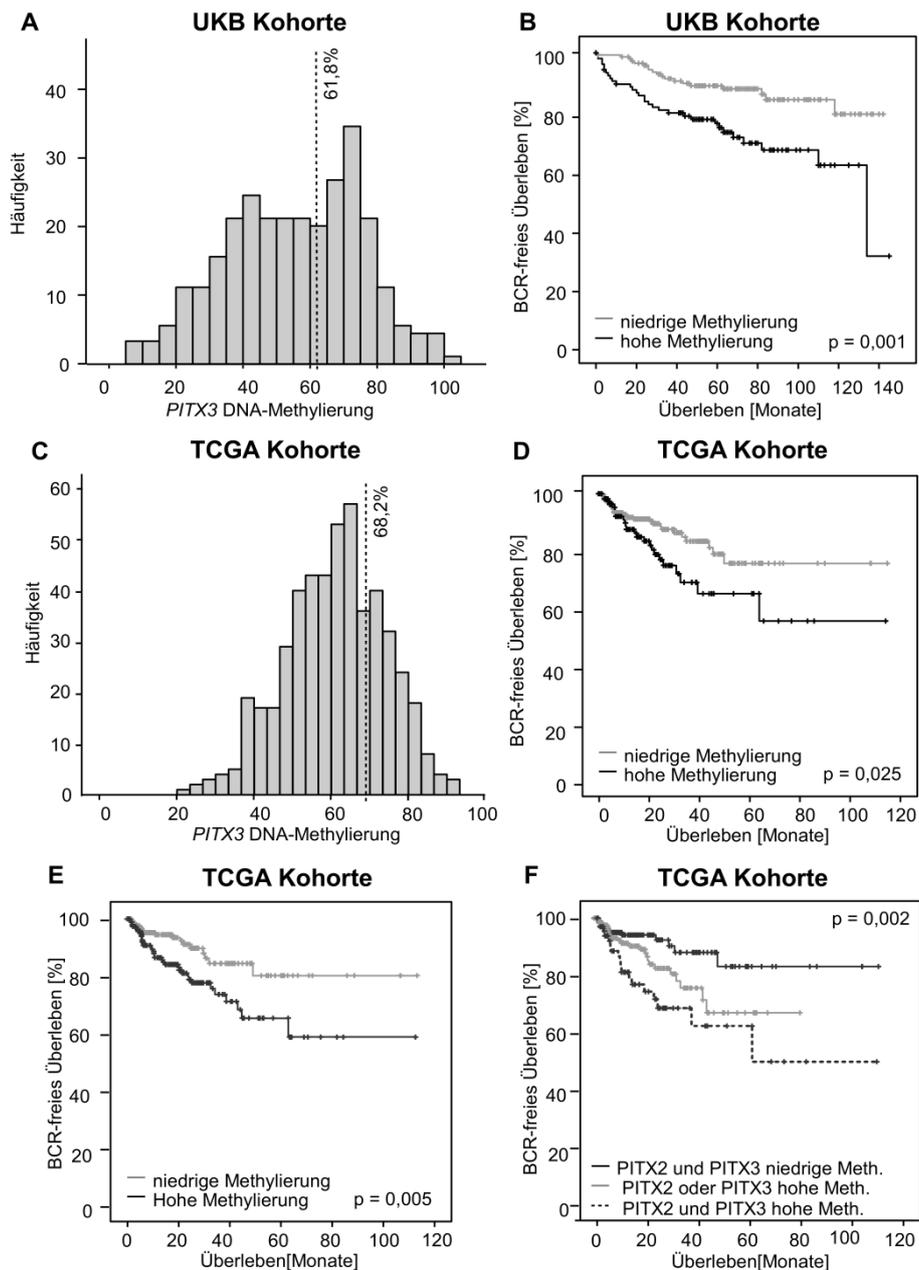


Abbildung 4-14: Kaplan-Meier Analyse des BCR-freien Überlebens von Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der DNA-Methylierung von *PITX3*. A, C: Histogramm der DNA-Methylierung in der UKB (A) und TCGA (C) Kohorte. Die DNA-Methylierung wurde in *PITX3*_{hoch} und *PITX3*_{niedrig} unterteilt mittels optimiertem Cutoff in der B: UKB Kohorte und D: in der TCGA Kohorte. E: *PITX2* DNA-Methylierung und F: *PITX2* und *PITX3* Kombination in der TCGA Kohorte. Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁸.

Letztendlich wurde *PITX3* DNA-Methylierung in einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse zusammen mit den wichtigsten klinopathologischen Faktoren, ISUP Gleason Grading Gruppe, Tumorgröße (pT), Resektionsrand (R), Alter und Lymphknotenstatus (N), untersucht. Hierzu wurden die Daten in eine Kohorte zusammengeführt und gemeinsam analysiert. Die Kombination der beiden Kohorten erfolgte nach Dichotomisierung mittels optimiertem

Cutoff. Die *PITX3* DNA-Methylierung zeigte hier einen unabhängigen prognostischen Wert zum ISUP Gleason Grade (HR = 2,08 [95 % CI:1,40-3,10]; $p < 0,001$; **Tabelle 4-1**).

Tabelle 4-1: Univariate und multivariate Cox-Regressions-Analysen des BCR-freien Überlebens gängiger klinopathologischer Daten im Prostatakarzinom und *PITX3* DNA-Methylierung in beiden unabhängigen Kohorten (TCGA Kohorte: $n = 410$; UKB Kohorte: $n = 260$). Die Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁸.

Klino-pathologische Daten/Biomarker	Univariate Cox-Regression-Analyse TCGA-Kohorte		Univariate Cox-Regression-Analyse UKB Kohorte		Multivariate Cox-Regression-Analyse TCGA & UKB Kohorte	
	Hazard ratio [95 % CI]	p-Wert	Hazard ratio [95 % CI]	p-Wert	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert
Tumour Stadium (pT3/pT4 vs. pT2/pT1)	4,25 [2,37-7,61]	<0,001	2,07 [1,30-3,30]	0,001	1,22 [0,73-2,03]	0,45
ISUP Gleason Grading Gruppe	1,69 [1,34-2,13]	<0,001	1,99 [1,63-2,42]	<0,001	1,30 [1,11-1,50]	0,001
Resektionsrand (R1 vs. R0)	1,49 [0,87-2,56]	0,15	1,00 [0,98-1,02]	0,70	1,00 [0,98-1,02]	0,84
Lymphknoten Status (pN1 vs. pN0)	1,84 [1,00-3,36]	0,048	1,09 [0,50-2,41]	0,82	1,03 [0,62-1,74]	0,90
Präoperatives PSA-Level	1,04 [1,02-1,05]	<0,001	1,01 [1,00-1,02]	0,11		
AR Expression (AR + vs. AR -)	0,74 [0,32-1,71]	0,49	0,82 [0,40-1,70]	0,60		
ERG (ERG + vs. ERG -)	0,80 [0,40-1,57]	0,51	0,78 [0,40-1,51]	0,46		
Alter	1,02 [0,98-1,06]	0,39	1,01 [0,96-1,06]	0,70	1,02 [0,99-1,05]	0,25
<i>PITX3</i>-Methylierung <i>PITX3</i> _{hoch} vs. <i>PITX3</i> _{niedrig}	1,83 [1,83-3,11]	0,027	2,56 [1,44-4,54]	0,001	2,08 [1,40-3,10]	<0,001

Des Weiteren wurde die *PITX3* mRNA-Expression untersucht, um einen Zusammenhang mit der DNA-Methylierung und mögliche Relevanz von *PITX3* in der Karzinogenese zu untersuchen. Mittels des zuvor etablierten *PITX3* mRNA qRT-PCR Assays (siehe **Kapitel 4.1.3**) wurden 11 verschiedene Zelllinien untersucht. Zu den Zelllinien zählten sieben Prostatazelllinien (BPH, 22RV1, DU145, DUCaP, LNCaP, VCaP und PC3), jedoch wurden auch weitere Zelllinien gemessen um einen genaueren Überblick über die mRNA-Expression von

PITX3 zu erhalten. Die DNA-Methylierung in der von uns gemessenen Region und die mRNA-Expression korrelierten nicht miteinander ($r = -0,296$; $p = 0,35$; **Abbildung 4-15 A, B**). Diese Daten wurden zudem durch den TCGA Datensatz bestätigt. DNA-Methylierung und mRNA-Expression korrelierten nicht miteinander ($r = -0,055$; $p = 0,22$;) und die mRNA-Expression zeigte keinen prognostischen Wert für das Rezidiv-freie Überleben der Patienten (**Abbildung 4-15 C**).

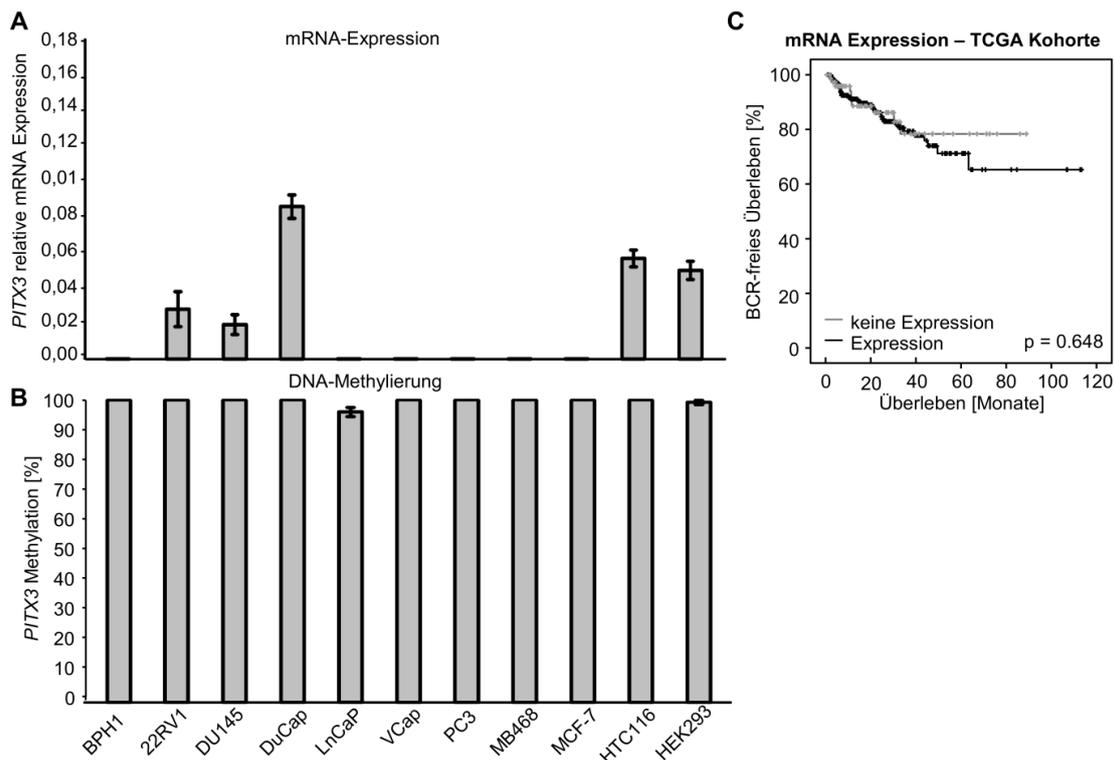


Abbildung 4-15: DNA-Methylierung und mRNA-Expression von *PITX3* in Zelllinien und der TCGA Kohorte. **A:** *PITX3* mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien **B:** DNA-Methylierung von *PITX3* in verschiedenen Zelllinien. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten und die Versuche in biologischen Replikaten durchgeführt. Der Standardfehler der biologischen Replikate ist eingezeichnet. **C:** Kaplan-Meier Analyse des BCR-freies Überlebens von Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der *PITX3* mRNA-Expression in der TCGA Kohorte.

4.3.3 *CXCL12*

Vor allem durch seine Rolle im Immunsystem und der Metastasierung sind *CXCL12* und seine Rezeptor *CXCR4* bereits wichtige Targets in der Immuntherapie. Hierzu wurden die *CXCL12* DNA-Methylierung und Expression in einer Kohorte der Universitätsklinik Bonn analysiert. Um diese Daten weiter zu validieren wurden der frei zugänglichen Datensatz der TCGA (The Cancer Genome Atlas) Datenbank¹³⁷ verwendet.

CXCL12 zeigt eine Hypermethylierung im Tumor im Vergleich zu tumornahem Normalgewebe und entzündlichen Gewebe. Die Streuung der Methylierung im Tumor war in der UKB Kohorte sehr hoch.

Eine hohe *CXCL12* DNA-Methylierung zeigte in der UKB Kohorte eine signifikante Assoziation mit einer hohen ISUP Gleason Grading Gruppe ($p < 0,001$) und einem positiven Lymphknoten-Status (p_{N1} ; $p = 0,038$). In der TCGA Kohorte korrelierte die *CXCL12* DNA-Methylierung mit dem Alter der Patienten ($p = 0,004$) und der ISUP Gleason Grading Gruppe ($p = 0,034$; siehe Anhang **Kapitel 8.2.4 ; Tabelle 8-2**)

Auf Grund der starken Streuung der *CXCL12* DNA-Methylierung um 50 % in den Tumorpatienten ergab sich die Frage ob eine mittlere Methylierung, um 50 %, vielleicht den Normalzustand darstellt. Daher wurden die Methylierungswerte trichotomisiert in *CXCL12*_{niedrig} (<30 %), *CXCL12*_{mittel} (30-70 %) und *CXCL12*_{hoch} (>70 %). Für die Cox-Regressions-Analyse wurden *CXCL12*_{niedrig} und *CXCL12*_{hoch} zu einer Gruppe zusammengefasst. In der UKB Kohorte ergab die Cox-Regressions-Analyse, dass die Patienten mit „deregulierter“ DNA-Methylierung ein signifikant kürzeres BCR-freies Überleben haben (HR = 1,92 [95%CI: 1,12-3,27], $p = 0,017$). In der TCGA Kohorte wurde dies bestätigt (HR = 2,11 [95%CI: 1,15-3,87]; $p = 0,016$). Die Kaplan-Meier Analysen bestätigen die Daten in beiden Kohorten (UKB: $p = 0,047$ und TCGA: $p = 0,049$; **Abbildung 4-16**).

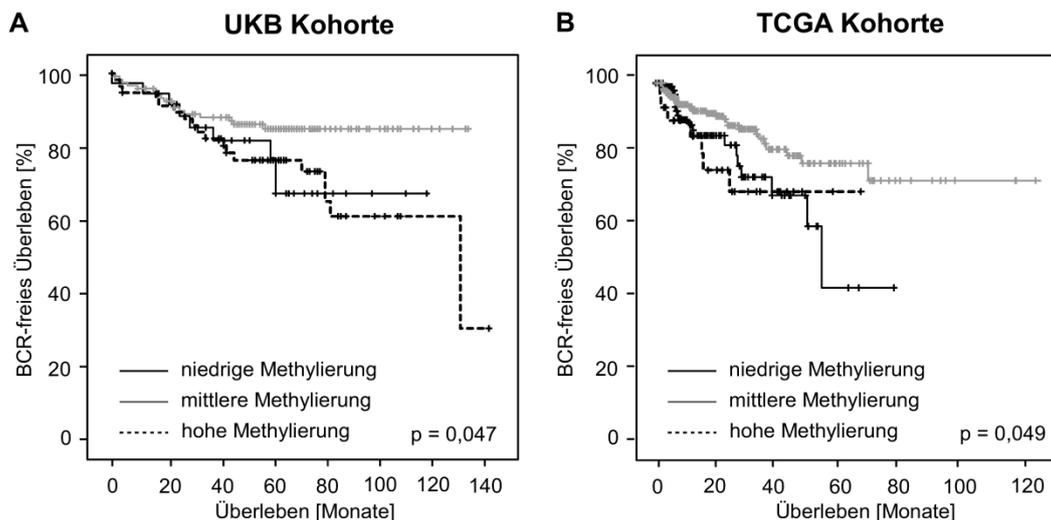


Abbildung 4-16: Kaplan-Meier Analyse des BCR-freien Überlebens von Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der DNA-Methylierung von *CXCL12*. Die DNA-Methylierung wurde in *CXCL12*_{hoch}, *CXCL12*_{mittel} und *CXCL12*_{niedrig} unterteilt, mit optimiertem Cutoff in der **A**: UKB Kohorte und **B**: TCGA Kohorte. Die Daten wurden bereits in Goltz & Holmes *et al.* publiziert ¹⁴⁹.

Tabelle 4-2 zeigt eine Zusammenfassung der univariaten und multivariaten Cox-Regressions-Analysen der *CXCL12* DNA-Methylierung (trichotomisiert) zusammen mit den wichtigsten klinopathologischen Parametern. *CXCL12* DNA-Methylierung zeigte in der UKB Kohorte in einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse einen unabhängigen zusätzlichen prognostischen Wert zu den wichtigsten klinopathologischen Parametern.

Tabelle 4-2: Univariate und multivariate Cox-Regressions-Analysen des BCR-freien Überlebens gängiger klinopathologischer Daten im Prostatakarzinom und *CXCL12* DNA-Methylierung in beiden unabhängigen Kohorten (TCGA Kohorte: n = 410; UKB Kohorte: n = 260). Die Daten wurden bereits publiziert in Goltz & Holmes *et al.*¹⁴⁹.

Klinopathologische Daten/ Biomarker	TCGA Kohorte				UKB Kohorte			
	Univariate Cox		Multivariate Cox		Univariate Cox		Multivariate Cox	
	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert
Tumorstadium (pT3 and pT4 vs. pT2)	2,84 [1,57-5,14]	0,001			5,37 [2,14-13,5]	0,001		
Tumor stage (pT3b and pT4/R1 vs. pT3a and pT2/R0)	3,47 [1,74-6,91]	<0,001	2,21 [1,04-4,72]	0,041	1,99 [1,13-3,49]	0,016	1,10 [0,57-2,12]	0,77
Resektionsrand (R1 vs. R0)	2,46 [1,35-4,51]	0,003			1,49 [0,87-2,56]	0,15		
ISUP Gleason Grading Gruppe	1,90 [1,54-2,34]	<0,001	1,73 [1,38-2,18]	<0,001	1,69 [1,34-2,13]	<0,001	1,62 [1,22-2,14]	0,001
Lymphknotenstatus (pN1 vs. pN0)	2,18 [0,86-5,55]	0,102			1,84 [1,00-3,35]	0,049	1,24 [0,65-2,36]	0,54
Präoperatives PSA-Level (<4 ng/ml vs. 4-10 ng/ml, vs. >10 ng/ml)	1,70 [0,99-2,92]	0,053			1,54 [0,98-2,43]	0,06		
<i>CXCL12</i> DNA-Methylierung (<i>CXCL12</i> _{niedrig} / hoch VS. <i>CXCL12</i> _{mittel})	2,11 [1,15-3,87]	0,016	1,48 [0,79-2,77]	0,22	1,92 [1,12-3,27]	0,017	1,76 [1,00-3,09]	0,049

Für eine potentielle Anwendung der *CXCL12* DNA-Methylierung als Biomarker ist die Übertragbarkeit auf Biopsiematerial der Patienten nötig, um einer Messung vor radikaler Ektomie zu ermöglichen. Hierzu wurde in einer Fall-Kontrollstudie von 10 Patienten eine Analyse von gepaarten Biopsie- und Ektomie-Proben vorgenommen. Biopsie und Ektomie der Patienten korrelierten signifikant ($r = 0,76$; $p = 0,019$; **Abbildung 4-17**).

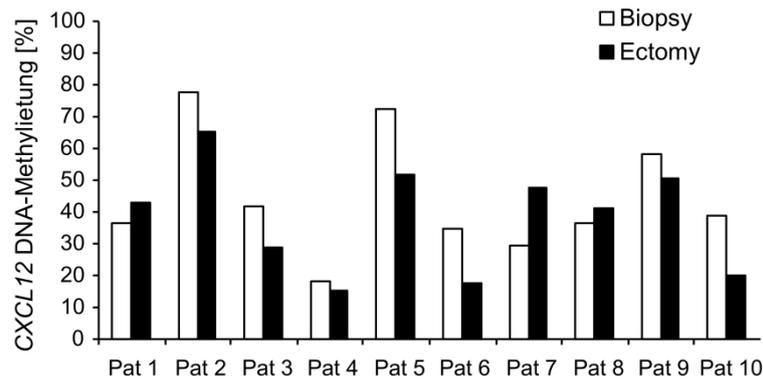


Abbildung 4-17: Messung der *CXCL12* DNA-Methylierung in gepaarten Biopsien und Ektomien von Prostatakrebspatienten. Die Daten wurden bereits publiziert in Goltz & Holmes *et al.*¹⁴⁹

Abschließend wurde die *CXCL12* Proteinexpression untersucht. Die Expression wurde in Werten zwischen 0 und 3 quantifiziert. **Abbildung 4-18** zeigt beispielhaft die Expression im Normalgewebe der Prostata (A) und eine niedrige (B) sowie hohe Expression (C) im Tumorgewebe. Es konnte in der UKB Kohorte keine lineare Korrelation mit der Expression gefunden werden. Eine signifikante Assoziation von Expression und Methylierung bei kategorialen Werten ($r = -0,21$; $p = 0,047$; $X^2 = 3,97$; $p = 0,046$) wurde jedoch gefunden. Eine Assoziation der Expression mit dem BCR-freien Überleben der Patienten wurde nicht gefunden (**Abbildung 4-18 D**). Auch in der TCGA Kohorte zeigte die mRNA-Expression keine signifikante Assoziation mit dem BCR-freien Überleben der Patienten (**Abbildung 4-18 E**). Zudem korrelierten auch hier mRNA-Expression und Methylierung nicht miteinander.

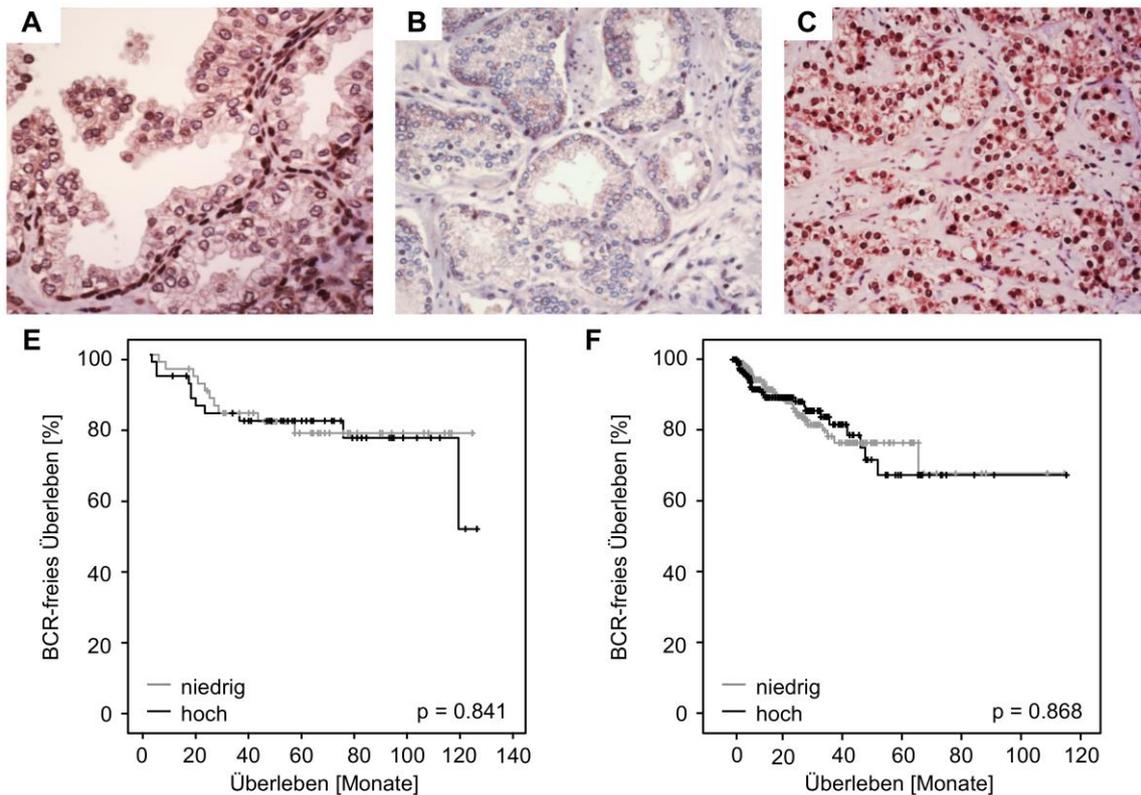


Abbildung 4-18: Kaplan-Meier Analyse des BCR-freien Überlebens von Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der CXCL12 Protein- und mRNA-Expression. A-C: CXCL12 Immunhistochemie der UKB Kohorte zeigt beispielhafte Färbungen. A: eine Färbung in Normalgewebe, B: einer schwachen und C: starken Färbung in Karzinomgewebe. Kaplan-Meier der D: CXCL12 Proteinexpression in der UKB Kohorte und E: der mRNA-Expression in der TCGA Kohorte. Die Daten wurden teilweise in Goltz & Holmes *et al.* publiziert¹⁴⁹.

4.3.4 PD-L1

PD-L1 wurde bezüglich seiner DNA-Methylierung, seiner RNA-Expression und seiner Proteinexpression untersucht. Hierzu wurden Daten aus Patientenmaterial und Zellkulturen der Pathologie der Universitätsklinik Bonn verwendet, sowie die frei zugänglichen Daten der TCGA Datenbank¹³⁷ verwendet um Ergebnisse der UKB Kohorte zu validieren.

Im ersten Schritt wurde die DNA-Methylierung von *PD-L1* in und um das CpG Island vor dem *PD-L1* Gen untersucht. Diese Region ist als Promotor annotiert. Hierzu wurden zwei methylierungsspezifische RT-PCRs designt. Zudem wurden die fünf cg-Probes, die in derselben Region liegen, aus dem TCGA Datensatz untersucht (siehe **Kapitel 4.1.1, Abbildung 4-2**). Die beiden RT-PCRs wurden wie in **Kapitel 4.1.1** beschrieben etabliert und auf Mischungsreihen validiert.

Als Erstes wurden die fünf cg-Probes der TCGA Daten in Bezug auf Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen Tumor und tumornahem Normalgewebe (NAT) untersucht. Hier

zeigten die drei Probes cg15837913, cg02823866 und cg19724470 einen signifikanten Unterschied zwischen Tumor und NAT (**Abbildung 4-19 A**). Vor allem die „Randproben“ cg15837913 und cg19724470 zeigten die stärkste differentielle Methylierung. Eine Korrelation mit der mRNA hingegen zeigte nur die Probe cg19724470 ($\rho = -0,160$; $p < 0,001$; **Abbildung 4-19B**).

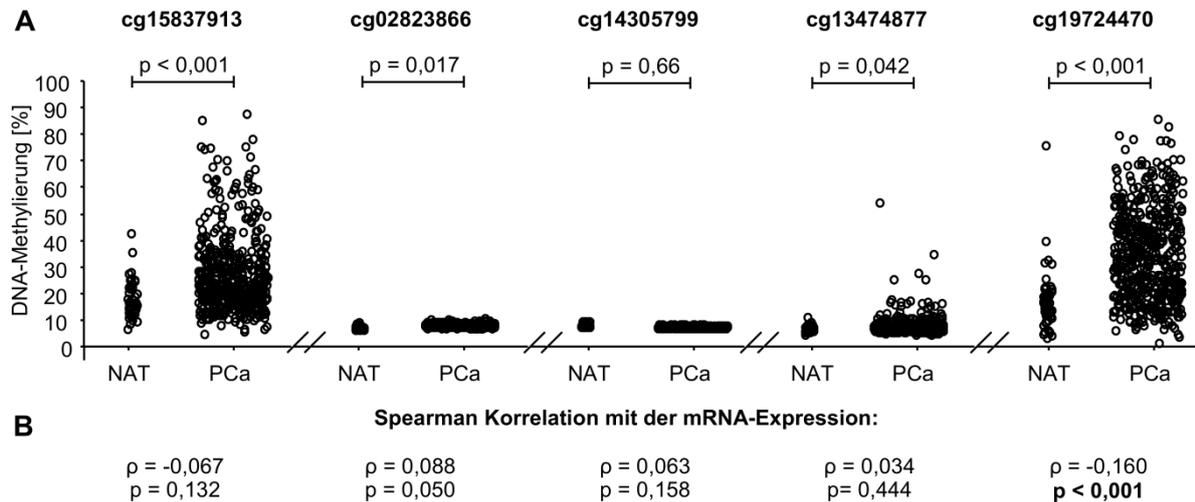


Abbildung 4-19: PD-L1 DNA-Methylierung in normalem und Karzinomgewebe von Prostatakrebspatienten. A: Vergleich der Methylierung der fünf cg-Probes von TCGA **B:** Spearman Korrelation der DNA-Methylierung jeder einzelnen Probe mit der mRNA-Expression von PD-L1. Die Daten wurden bereits publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶.

Anschließend wurden mittels Kaplan-Meier Analyse und Cox-Regressions-Analysen die Fähigkeit der *PD-L1* DNA-Methylierung zur Stratifizierung der Patienten nach rezidiv-freiem Überleben getestet. Hierzu wurden erneut alle fünf cg-Probes untersucht. Die Cox-Regressions-Analysen wurden mit *PD-L1* DNA-Methylierung als kontinuierlicher Variable untersucht. Hierbei konnten die Probes cg19724470 (HR = 1,03 [95 %CI: 1,01-1,05]; $p = 0,011$) signifikant stratifizieren. Für die weiteren Analysen wurde die Methylierung dichotomisiert nach einem optimierten Cutoff (cg15837913: 35,85 %; cg02823866: 3,68 %; cg40305799: 1,77 %; cg13474877: 4,59 %; cg19724470: 52,75 %) in *PD-L1*_{niedrig} und *PD-L1*_{hoch}. In der Kaplan-Meier Analyse zeigen zwei cg-Probes, cg15837913 ($p = 0,008$) und cg19724470 ($p < 0,001$), eine signifikante Stratifizierung (**Abbildung 4-20**). Die Cox-Regressions-Analysen bestätigen diese Daten.

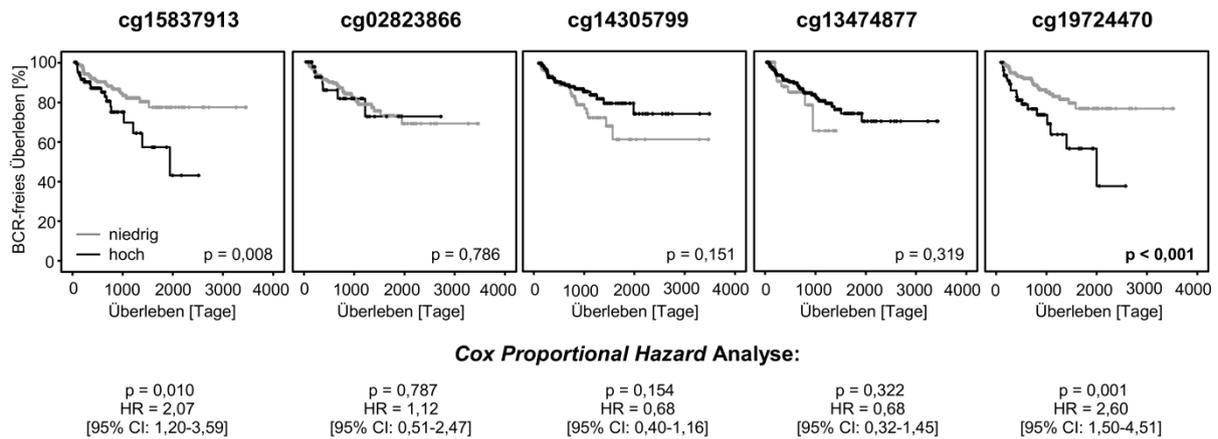


Abbildung 4-20: Kaplan-Meier Analyse und Cox-Regressions-Analyse in Prostatakarcinompatennten. Analyse der fünf cg-Probes des Illumina Infinium Human Methylation 450 Bead Chip von TCGA **A:** Dichotomisierung der Patienten in $PD-L1_{hoch}$ und $PD-L1_{niedrig}$ nach dem optimierten Cutoff. Die Daten wurden bereits publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶.

Des Weiteren wurden die zwei methylierungsspezifischen $PD-L1$ qRT-PCR-Assays gemessen um die TCGA Daten zu validieren. $PD-L1$ Assay 1 lag im Bereich der Probe cg02823866 und der $PD-L1$ Assay 2 lag im Bereich der Probe cg19724470 (siehe **Kapitel 4.1.2**). Beide Assays wurden zuerst auf der Fallkontrollstudie bestehend aus normalem, entzündlichem und Karzinomgewebe untersucht. Hier zeigte der $PD-L1$ Assay 1 durchweg eine sehr niedrige Methylierung, unterhalb von 1 %. Zudem zeigte sich hier keine differenzielle Methylierung zwischen normalem, entzündlichem und Karzinomgewebe (**Abbildung 4-21 A**). Beim $PD-L1$ Assay 2 lag die Methylierung unterhalb von 10 % in allen gemessenen Proben. Die Prostatakrebs Proben zeigen einen Trend zu einer höheren Methylierung ($p = 0,058$; **Abbildung 4-21 B**). Die Daten bestätigen die Ergebnisse der TCGA Kohorte.

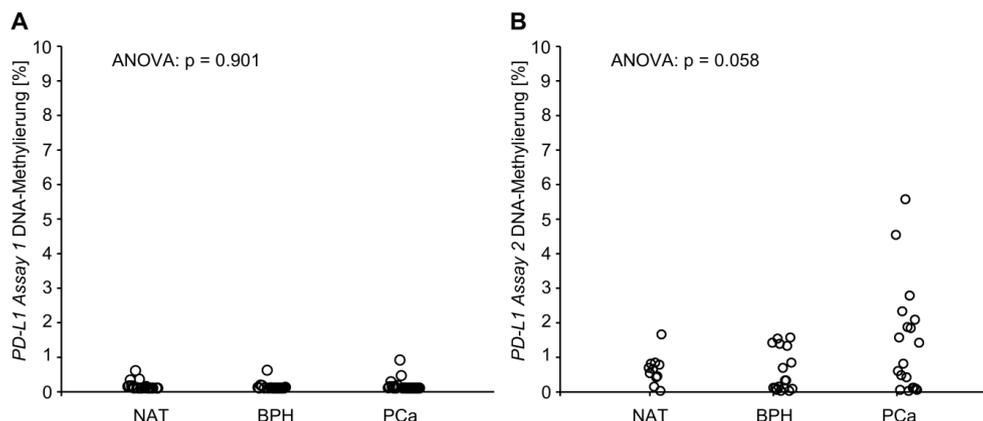


Abbildung 4-21: $PD-L1$ DNA-Methylierung in normalem, entzündlichem und Karzinomgewebe von Prostatakrebspatienten. **A:** $PD-L1$ Assay 1 **B:** $PD-L1$ Assay 2. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten durchgeführt. Die Daten wurden bereits publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶.

Da der *PD-L1* Assay 1 eine geringe Methylierung zeigte und dieser Locus auch in den TCGA Daten keine signifikanten Ergebnisse brachte wurde für die weiteren Analysen nur *PD-L1* Assay 2 verwendet. Dieser wurde auf der Prostatakohorte der Universitätsklinik Bonn gemessen. Hierzu wurden, wie zuvor, die Methylierung als kontinuierliche Variable in der Cox-Regressions-Analysen verwendet (HR = 1,27 [95 %CI: 1,11-1,45], $p < 0,001$). Anschließend wurde die *PD-L1* DNA-Methylierung erneut dichotomisiert, mit optimiertem Cutoff ($PD-L1_{\text{niedrig}} < 0,97 \% \leq PD-L1_{\text{hoch}}$). In der Cox-Regressions-Analyse zeigte die *PD-L1* DNA-Methylierung eine signifikante Stratifizierung der Patienten (HR = 3,36 [95 %CI: 1,16-9,72], $p = 0,026$). Die bestätigte sich in der Kaplan-Meier Analyse (**Abbildung 4-22**). Die *PD-L1* Methylierung von Assay 2 korrelierte nicht mit der PD-L1 Proteinexpression aus der Publikation von Gevensleben *et al.*¹⁵² ($\rho = 0,067$; $p = 0,34$).

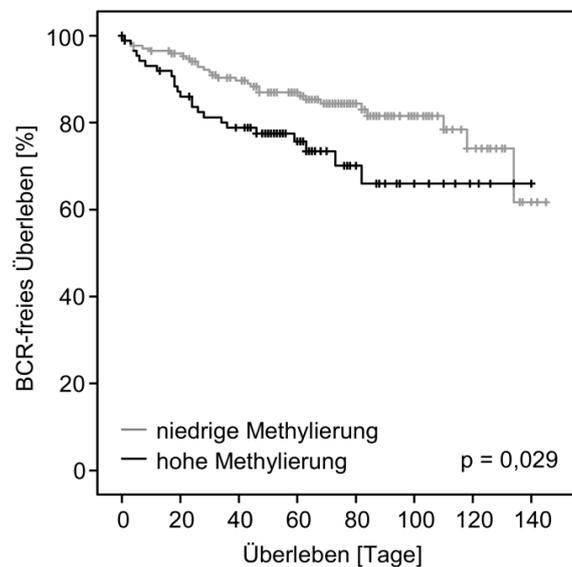


Abbildung 4-22: Kaplan-Meier Analyse des BCR-freien Überlebens in Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der *PD-L1* DNA-Methylierung. Analyse des *PD-L1* Assay 2 nach Dichotomisierung der Patienten in $PD-L1_{\text{hoch}}$ und $PD-L1_{\text{niedrig}}$ nach dem optimierten Cutoff. Die Daten wurden bereits publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶.

Zum Schluss wurde die *PD-L1* DNA-Methylierung von Assay 2 in einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse zusammen mit ISUP Gleason Grading Gruppe, Tumorgröße (pT), Resektionsrand (R), Alter, präoperativem PSA und Lymphknotenstatus (N) untersucht. Hierzu wurden die Daten der beiden Kohorten gemeinsam analysiert. Die *PD-L1* DNA-Methylierung zeigte hier einen zusätzlichen prognostischen Wert zum ISUP Gleason Grade (HR = 1,89 [95 % CI: 1,25-2,86]; $p = 0,003$; **Tabelle 4-3**)

Tabelle 4-3: Univariate und multivariate Cox-Regressions-Analyse des BCR-freien Überlebens in Prostatakrebspatienten. Es wurden beide Kohorten verwendet, die TCGA Kohorte (Probe cg19724470) und die UKB Kohorte (Assay 2). Für die Multivariate Analyse wurden die Kohorten zusammen gefügt und der optimierte Cutoff verwendet. Es wurden alle Patienten mit verfügbaren follow-up Daten in die Analysen eingeschlossen (TCGA Kohorte: n = 410; UKB Kohorte n = 260). Die Daten wurden bereits publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶.

Klinopathologische Parameter/ Biomarker	Univariate Cox TCGA Kohorte		Univariate Cox UKB Kohorte		Multivariate Cox TCGA & UKB Kohorte	
	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert	Hazard ratio [95% CI]	p-Wert
Tumorgroße (pT3/pT4 vs. pT2/pT1)	4,25 [2,37-7,61]	<0,001	2,07 [1,30-3,30]	0,001	1,18 [0,70-1,98]	0,54
ISUP Gleason Grading Gruppe	1,69 [1,34-2,13]	<0,001	1,99 [1,63-2,42]	<0,001	1,26 [1,08-1,46]	0,003
Resektionsrand (R1 vs. R0)	1,49 [0,87-2,56]	0,15	1,00 [0,98-1,02]	0,70	1,00 [0,97-1,03]	0,85
Lymphknotenstatus (pN1 vs. pN0)	1,84 [1,00-3,36]	0,048	1,09 [0,50-2,41]	0,82	0,97 [0,57-1,65]	0,91
Präoperatives PSA-Level	1,04 [1,02-1,05]	<0,001	1,01 [1,00-1,02]	0,11	1,01 [1,00-1,02]	0,028
AR-Expression (AR + vs. AR -)	0,74 [0,32-1,71]	0,49	0,82 [0,40-1,70]	0,60		
ERG-Expression (ERG + vs. ERG -)	0,80 [0,40-1,57]	0,51	0,78 [0,40-1,51]	0,46		
Alter	1,02 [0,98-1,06]	0,39	1,01 [0,96-1,06]	0,70	1,02 [0,99-1,05]	0,23
PD-L1 (Continuous)	1,02 [1,00-1,03]	0,024	1,23 [1,07-1,42]	0,004		
PD-L1 Methylierung (medianer Cutoff)	1,73 [1,00-3,00]	0,051	1,17 [0,68-2,03]	0,568		
PD-L1 Methylierung (optimierter Cutoff)	2,60 [1,50-4,51]	0,001	1,83 [1,06-3,17]	0,031	1,89 [1,25-2,86]	0,003

Die mRNA-Expression der TCGA Daten wurde bereits in **Abbildung 4-19** mit der *PD-L1* DNA-Methylierung der fünf TCGA cg-Probes korreliert. Hier zeigte die Methylierung der cg19724470-Probe eine signifikante Korrelation mit der mRNA-Expression. Die *PD-L1* mRNA-Expression der TCGA Kohorte zeigte jedoch keinen prognostischen Wert in der Cox-

Regressions-Analysen (HR = 0,98 [95%CI: 0,95-1,02]; p = 0,39) oder Kaplan-Meier Analyse (p = 0,029, **Abbildung 4-23 D**). Zudem wurden die mRNA und Proteinexpressionen in einigen humanen Zelllinien gemessen. Hierzu wurden nicht nur Prostatakrebs Zelllinien verwendet sondern auch einige andere humane Zelllinien gemessen, um einen weiteren Überblick über Expression und DNA-Methylierung zu bekommen. In den Zelllinien wurde auch die Methylierung der beiden *PD-L1* DNA-Methylierungsassays (1 & 2) gemessen. Hier zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der DNA-Methylierung und der mRNA-Expression. Assay 1 zeigte erneut eine sehr niedrige Methylierung, außer in DUCaP und HEK293. Assay 2 zeigte eine differenzielle Methylierung, es war jedoch keine Korrelation mit der mRNA-Expression zu erkennen (**Abbildung 4-23 A, B, C**).

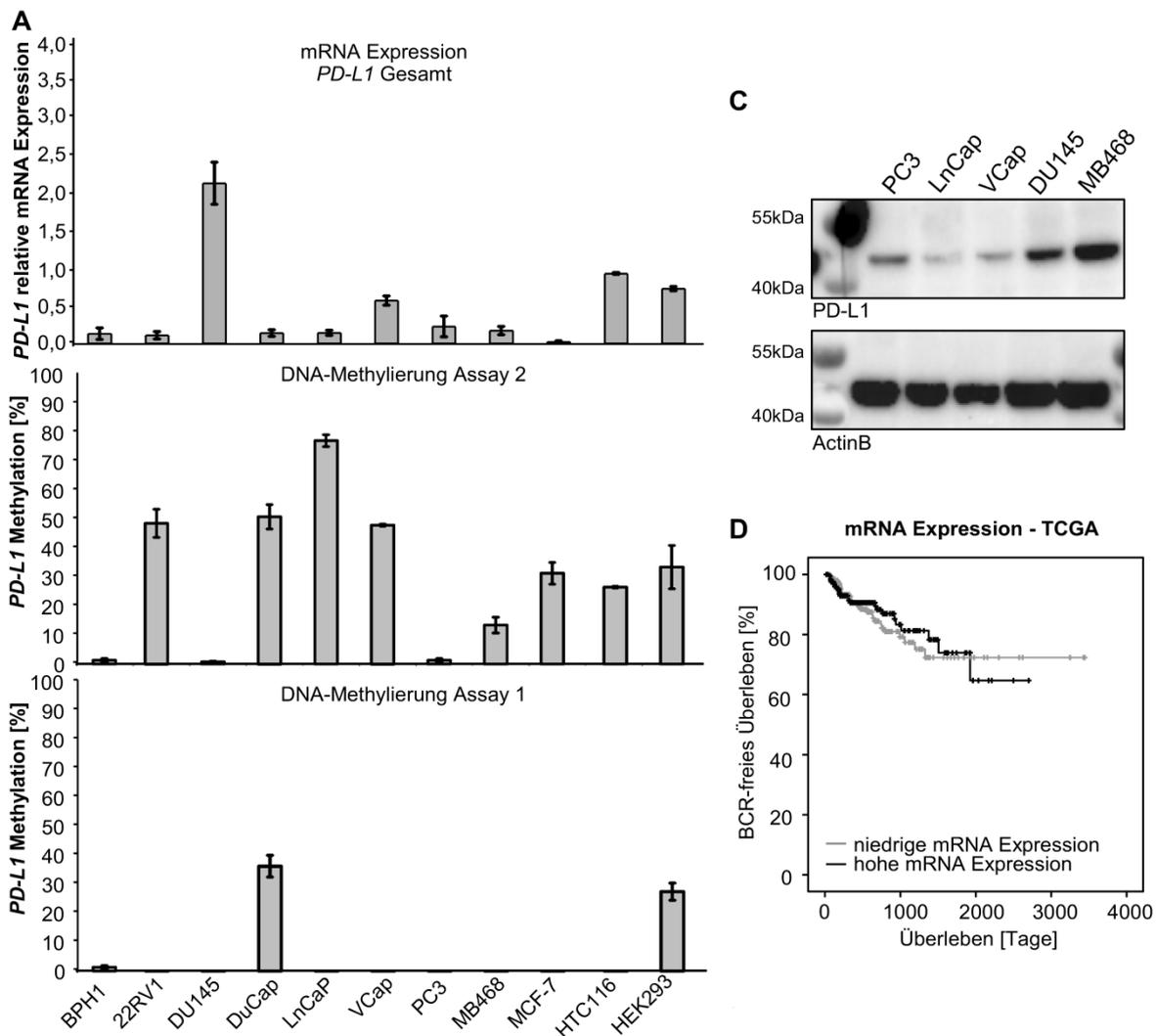


Abbildung 4-23: DNA-Methylierung, mRNA und Protein Expression von *PD-L1*. **A:** *PD-L1* mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien **B:** DNA-Methylierung von *PD-L1* Assay 1 und 2 in verschiedenen Zelllinien **C:** Western Blot der *PD-L1* Proteinexpression. Alle Messungen wurden in technischen Triplikaten und die Versuche in biologischen Triplikaten durchgeführt. Der Standardfehler der biologischen Replikate ist

dargestellt. und **D**: Kaplan-Meier des BCR-freien Überlebens in Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der *PD-L1* mRNA-Expression (hoch vs. niedrig) im TCGA Datensatz.

In der Publikation von Gevensleben *et al.*¹⁵² zeigte die PD-L1 Proteinexpression eine Korrelation mit der Androgenrezeptor (AR)-Expression. Um zu analysieren ob diese Korrelation auch *in vitro* besteht wurden einige androgenabhängige Prostatakrebs Zelllinien (22RV1 und LNCaP) mit verschiedenen Konzentrationen Dihydroxytestosterone (DHT) und Bicalutamid (AR Blocker) behandelt und nach 24 h anschließend die mRNA-Expression und die Proteinexpression bestimmt. Hier wurde als Kontrolle PSA gemessen, da das PSA Level zeigt, ob die Stimulation mit DHT funktioniert hat. Hierzu wurde auch für die Messung der mRNA eine PSA qRT-PCR entwickelt (siehe **Kapitel 4.1.3**). Die Daten zeigen, dass die Stimulation mit DHT funktioniert hat, da das PSA-Level jeweils signifikant, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ansteigt. PD-L1 zeigt keine signifikante Veränderung. (**Abbildung 4-24**).

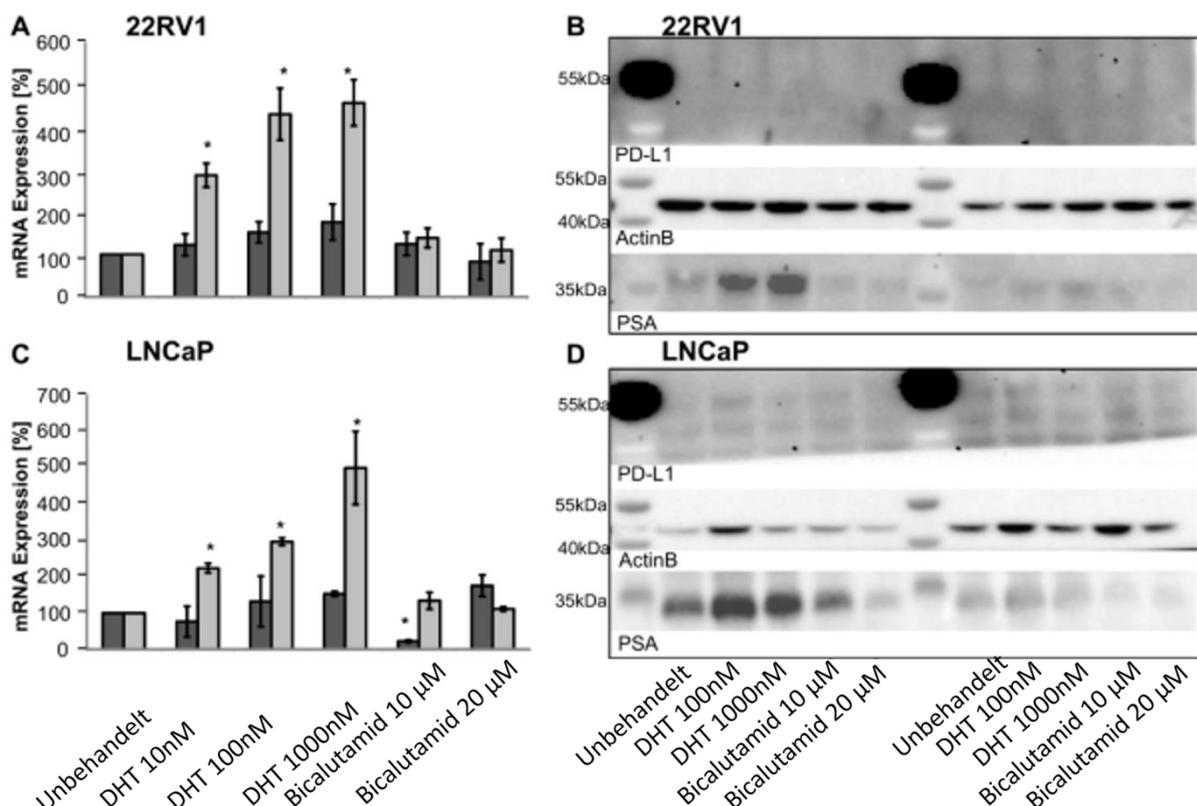


Abbildung 4-24: Stimulation von Prostatakrebszelllinien mittels Dihydroxytestosterone (DHT) und Blockierung des Signalwegs mittels Bicalutamid. **A** und **B**: Prostatakrebs Zelllinie 22RV1 **C** und **D**: Prostatakrebs Zelllinie LNCaP. Gemessen wurden die relative mRNA-Expression in drei biologischen Replikaten und die Proteinexpression mittels Western Blot. Als Kontrolle für die Stimulation wurde PSA gemessen. PD-L1 = dunkelgrau, PSA = hellgrau.

4.3.5 Kombination von *CXCL12* und PD-L1

Gevensleben *et al.*¹⁵² zeigte 2015, dass die PD-L1 Expression ein unabhängiger prognostischer Marker im Prostatakarzinom ist. Eine Korrelationsanalyse der *CXCL12* DNA-Methylierung mit der zuvor von Gevensleben *et al.*¹⁵² publizierten PD-L1 Proteinexpression zeigte, dass sich die Mediane der *CXCL12* DNA-Methylierung in den Gruppen PD-L1_{hoch} und PD-L1_{niedrig} nicht unterschieden. Es wurde jedoch ein Trend zu einer Assoziation der *CXCL12* DNA-Methylierung mit der PD-L1 Proteinexpression gefunden ($r = 0.132$, $p = 0.084$). 85 Patienten zeigten eine niedrige PD-L1 Proteinexpression (PD-L1_{niedrig}) und 87 eine hohe (PD-L1_{hoch}). Die PD-L1_{hoch} Patienten wurden bezüglich ihrer Methylierung in 3 weitere Gruppen unterteilt, *CXCL12*_{niedrig}, *CXCL12*_{mittel}, und *CXCL12*_{hoch}.

In einer Kaplan-Meier Analyse zeigten die Patienten mit einer niedrigen PD-L1 Proteinexpression (PD-L1_{niedrig}) das längste BCR-freie Überleben (112 Monate). Patienten mit einer hohen PD-L1 Proteinexpression (PD-L1_{hoch}) und einer „deregulierten“ *CXCL12* DNA-Methylierung (*CXCL12*_{niedrig} und *CXCL12*_{hoch}) zeigten ein deutlich kürzeres BCR-freies Überleben (52 Monate und 83 Monate; **Abbildung 4-25**).

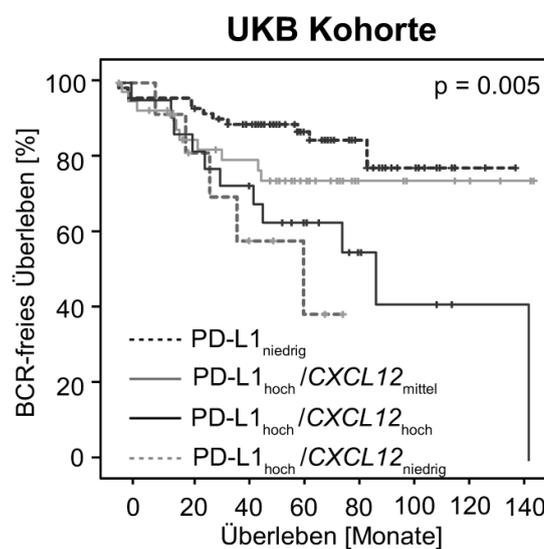


Abbildung 4-25: Kaplan-Meier Analyse des BCR-freien Überlebens von Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels Kombination der *CXCL12* DNA-Methylierung und der PD-L1 Protein Expression in der UKB Kohorte. Die Daten wurden bereits publiziert in Goltz & Holmes *et al.*¹⁴⁹.

4.4. Charakterisierung neuer Biomarker in Kopf- & Halstumoren

4.4.1 Übersicht der Biomarker in Kopf- und Halstumoren

In Kopf- und Halstumoren wurde die DNA-Methylierung verschiedener Gene (*CXCL12*, *PITX3*, *PITX2* und *PANCR*) als potentielle Biomarker untersucht. Die Biomarker wurden in einer Kohorte aus Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (n = 399) analysiert.

Im ersten Schritt wurden Tumor (n = 399) und NAT (n = 131) Proben verglichen, um zu prüfen, ob die untersuchten Gene in Kopf- und Halstumoren differentiell methyliert sind. Alle vier Biomarker zeigten eine signifikante Hypermethylierung im Tumorgewebe (**Abbildung 4-26**). Daraufhin wurden die einzelnen Biomarker näher charakterisiert.

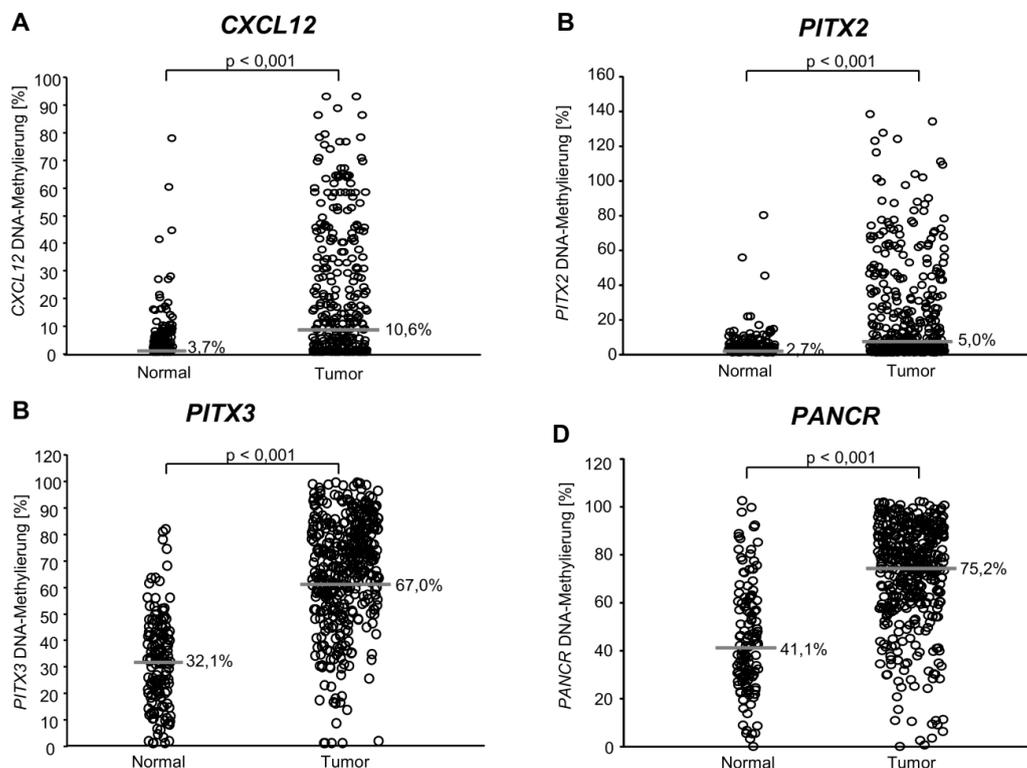


Abbildung 4-26: Methylierung in normalem (n = 131) und karzinogenem (n = 399) Gewebe von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs. Der Median der Methylierung wird durch den grauen Balken angezeigt. **A: CXCL12 B: PITX2 C: PITX3 und D: PANCR.** Die Daten wurden bereits publiziert in Sailer & Holmes *et al.*¹⁵⁰ und Sailer *et al.*¹⁵³

4.4.2 CXCL12

Es wurde keine Korrelation oder Assoziation der *CXCL12* DNA-Methylierung mit den wichtigsten klinopathologischen Daten gefunden (siehe **Anhang Kapitel 0, Tabelle 8-4**). Um

die *CXCL12* DNA-Methylierung in Bezug auf ihre prognostischen Eigenschaften zu untersuchen wurde die DNA-Methylierung mittels eines optimierten Cutoffs dichotomisiert (**Abbildung 4-27 A**). Die Kaplan-Meier Analyse zeigt, dass eine niedrige *CXCL12* DNA-Methylierung signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist ($p = 0,050$; **Abbildung 4-27 B**). Die mediane Überlebenszeit erhöht sich um 33 Monate in der Gruppe mit hoher *CXCL12* DNA-Methylierung (*CXCL12*_{niedrig}: 38 Monate und *CXCL12*_{hoch}: 71 Monate) Die Cox-Regressions-Analyse zeigt einen Trend zum besseren Überleben bei höherer DNA-Methylierung (HR = 0,65 [95 %CI: 0,42-1,00]; $p < 0,052$). **Tabelle 4-4** zeigt eine Zusammenfassung der uni- und multivariaten Cox-Regressions-Analyse der *CXCL12* DNA-Methylierung und wichtigsten klinopathologischen Daten. Die *CXCL12* DNA-Methylierung zeigte in einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse keinen zusätzlichen prognostischen Wert.

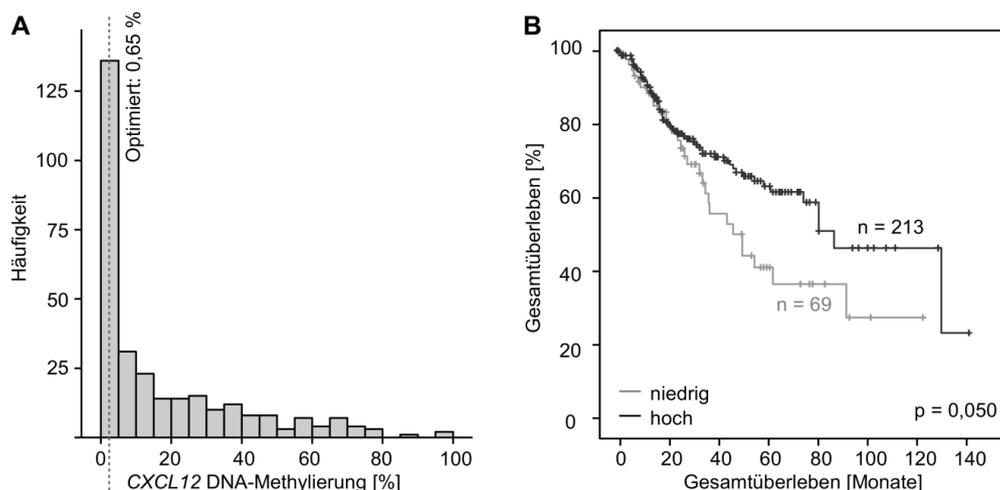


Abbildung 4-27: Histogramm und Kaplan-Meier Analyse der *CXCL12* DNA-Methylierung. A: Histogramm der Verteilung der Methylierung [%] mit medianem und optimiertem Cutoff und B: Kaplan-Meier Analyse der DNA-Methylierung mit optimiertem Cutoff.

Tabelle 4-4: Univariate und multivariate Cox-Regressions-Analyse des Überlebens für p16-Expression, Nodal Status (N), Tumor Größe (T-Stage), Gefäßinvasion (V), Lokalisation und *CXCL12* DNA-Methylierung.

Variable	Univariate Cox-Regressions-Analysen		Multivariate Cox-Regressions-Analysen	
	HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
<i>CXCL12</i> Methylierung (kontinuierlich)	1,00 (0,98-1,01)	0,34	n.b.	n.b.
<i>CXCL12</i> Methylierung (<i>CXCL12</i> _{hoch} vs. <i>CXCL12</i> _{niedrig})	0,65 (0,42-1,00)	0,052	0,67 (0,31-1,44)	0,31
p16 Expression (p16+ vs. P16-)	0,40 (0,20-0,81)	0,010*	0,41 (0,15-1,08)	0,07

N-Status (N1 vs. N0)	1,28 (1,07-1,53)	0,008*	1,30 (0,91-1,83)	0,15
T-Status (pT1/2 vs. pT3/4)	1,17 (0,81-1,70)	0,41	3,15 (1,51-6,55)	0,002*
Gefäßinvasion (V1 vs. V0)	3,51 (1,90-6,47)	<0,001*	6,36 (2,76-14,6)	<0,001*
Lokalisationen	0,86 (0,73-1,01)	0,073	0,69 (0,49-0,98)	0,036*

4.4.3 PITX2, PITX3 und PANCR

In 301 Patienten wurde die p16-Expression, die als Marker für eine HPV-Infektion verwendet wird, evaluiert. Hierbei wurden die Tumore in negative (n = 241) und positive Fälle (n = 60) unterteilt. Wie bereits in der Literatur beschrieben⁴¹ zeigen die p16-positiven Patienten ein signifikant längeres Überleben (p = 0,008; **Abbildung 4-29 C**). Dieses Ergebnis konnte in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse bestätigt werden (HR = 0,40 [95 %CI: 0,20-0,81]; p = 0,010).

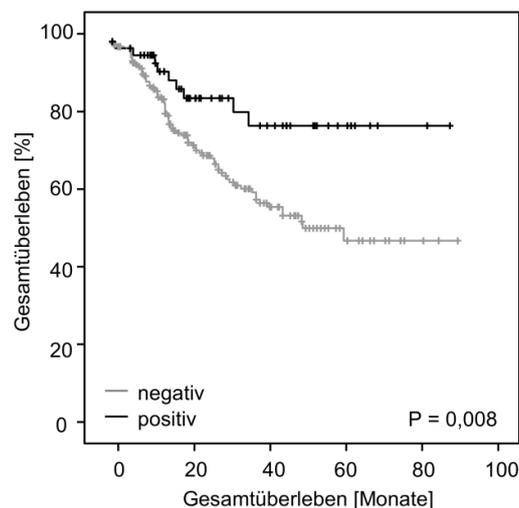


Abbildung 4-28: Kaplan-Meier Analysen des Überlebens stratifiziert nach der p16-Expression. P-Werte beziehen sich auf den Log-Rank Test. Die Daten wurden zum Teil bereits publiziert in Sailer & Holmes *et al.*¹⁵⁰ und Sailer *et al.*¹⁵³

Abbildung 4-29 A, C, E zeigt die Histogramme der Verteilung der DNA-Methylierung mit medianem und optimierten Cutoff. Der optimierte Cutoff wurde für die weiteren Analysen verwendet. Es wurden signifikante Assoziationen der DNA-Methylierung mit den wichtigsten klinopathologischen Daten gefunden (siehe **Anhang 8.2.7; Tabelle 8-5**). Es wurden signifikante Assoziation von *PITX2* mit dem Raucherstatus (p = 0,048), dem Alkoholkonsum (p < 0,001), der Lokalisation des Tumors (p = 0,002) und der p16-Expression (p < 0,001) gefunden. *PANCR* zeigt Assoziationen mit der Lokalisation des Tumors (p = 0,004), dem Lymphknotenstatus

($p = 0,014$) und der p16-Expression ($p = 0,004$). PITX3 zeigt nur mit dem Lymphknotenstatus ($p = 0,014$) und der p16-Expression ($p = 0,018$) eine signifikante Assoziation.

Die *PITX2*, *PANCR* und *PITX3* DNA-Methylierungen wurden in Bezug auf ihre prognostische Eigenschaft untersucht. Hierzu wurde mit optimiertem Cutoff dichotomisiert. Die Cox-Regressions-Analysen zeigen, dass *PITX2* (HR = 0,51 [95 %CI: 0,35-0,74]; $p < 0,001$), *PANCR* (HR = 1,64 [95 %CI: 1,12-2,39]; $p = 0,010$) und *PITX3* (HR = 1,56 [95 %CI: 1,04-2,34]; $p = 0,031$) signifikant stratifizieren. Diese Ergebnisse wurden in den Kaplan-Meier Analysen bestätigt (**Abbildung 4-29 B, D, F**). Während eine hohe *PITX2* DNA-Methylierung mit einem besseren Überleben korreliert, sieht es bei *PANCR* und *PITX3* genau umgekehrt aus.

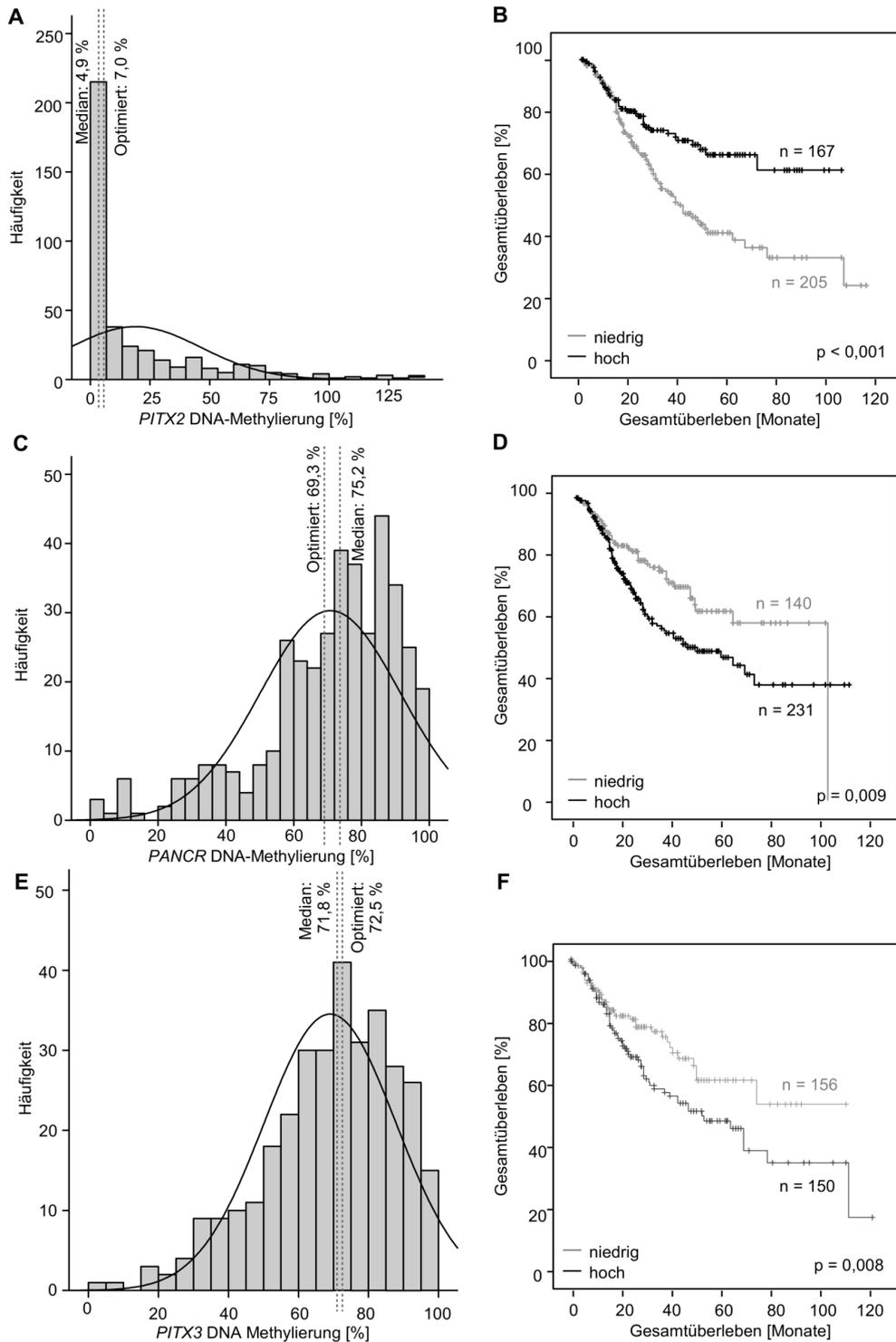


Abbildung 4-29: Histogramm und Kaplan-Meier Analysen des Überlebens stratifiziert nach der DNA-Methylierung. A,B: PITX2 C,D: PANCR und E,F: PITX3. Histogramme mit medianem und optimiertem Cutoff. P-Werte beziehen sich auf den Log-Rank Test. Die Daten wurden zum Teil bereits publiziert in Sailer & Holmes *et al.*¹⁵⁰ und Sailer *et al.*¹⁵³

In einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse zeigten die PITX3, PITX2 und PANCR DNA-Methylierungen jeweils einen unabhängigen, signifikant prognostischen Einfluss auf das

Überleben der Patienten. Beide Parameter wurden zusammen mit den wichtigsten prognostischen Parametern p16-Expression, Lymphknoten Status (N), Tumorgröße (T), Gefäßinvasion (V) und der Lokalisation untersucht (**Tabelle 4-5**).

Tabelle 4-5: Univariate (A) und multivariate (B) Cox-Regressions-Analyse des Überlebens für p16-Expression, Lymphknoten Status (N), Tumor Größe (T-Stage), Gefäßinvasion (V), Lokalisation, *PITX2* und *PANCR* DNA-Methylierung. *PITX2* und *PANCR* DNA-Methylierung wurden kontinuierlich und dichotomisiert mit optimiertem Cutoff analysiert. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die Daten wurden zum Teil bereits publiziert in Sailer & Holmes *et al.*¹⁵⁰

A						
Univariate Cox-Regressions-Analyse						
Variable	HR (95% CI)		p-Wert			
<i>PITX2</i> Methylierung (kontinuierlich)	0,99 (0,98-1,00)		0,005			
<i>PITX2</i> Methylierung (<i>PITX2_{hoch}</i> vs. <i>PITX2_{niedrig}</i>)	0,51 (0,35-0,74)		<0,001			
<i>PANCR</i> Methylierung (kontinuierlich)	1,01 (1,00-1,02)		0,025			
<i>PANCR</i> Methylierung (<i>PANCR_{hoch}</i> vs. <i>PANCR_{niedrig}</i>)	1,64 (1,12-2,39)		0,010			
<i>PITX3</i> Methylierung (kontinuierlich)	1,00 (0,99-1,02)		0,14			
<i>PITX3</i> Methylierung (<i>PITX3_{hoch}</i> vs. <i>PITX3_{niedrig}</i>)	1,56 (1,04-2,34)		0,031			
p16 Expression (p16+ vs. P16-)	0,40 (0,20-0,81)		0,010			
N-Status (N1 vs. N0)	1,28 (1,07-1,53)		0,008			
T-Status (pT1/2 vs. pT3/4)	1,14 (0,96-1,36)		0,14			
Gefäßinvasion (V1 vs. V0)	3,51 (1,90-6,47)		<0,001			
Lokalisationen	0,86 (0,73-1,01)		0,073			

B						
Multivariate Cox-Regressions-Analyse						
Variable	<i>PITX2</i>		<i>PANCR</i>		<i>PITX3</i>	
	HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
<i>PITX2</i> Methylierung (<i>PITX2_{hoch}</i> vs <i>PITX2_{niedrig}</i>)	0,35 (0,17-0,73)	0,005	x	x	x	x
<i>PANCR</i> Methylierung (<i>PANCR_{hoch}</i> vs <i>PANCR_{niedrig}</i>)	x	x	2,46 (0,19-5,07)	0,015	x	x
<i>PITX3</i> Methylierung (<i>PITX3_{hoch}</i> vs <i>PITX3_{niedrig}</i>)	x	x	x	x	3,03 (1,39-6,62)	0,005
p16 Expression (p16+ vs. P16-)	0,71 (0,28-1,80)	0,47	0,38 (0,16-0,87)	0,022	0,29 (0,12-0,78)	0,014
N-Status (N1 vs. N0)	1,20 (0,87-1,65)	0,28	1,15 (0,83-1,59)	0,41	1,28 (0,90-1,82)	0,17
T-Status (pT1/2 vs pT3/4)	2,33 (1,25-4,34)	0,008	2,67 (1,41-5,03)	0,002	4,11 (1,90-8,89)	<0,001
Gefäßinvasion (V1 vs V0)	6,29 (2,91-13,6)	<0,001	5,74 (2,67-12,4)	<0,001	8,21 (3,46-19,5)	<0,001

Ergebnisse

Lokalisationen	0,69 (0,50-0,94)	0,019	0,59 (0,42-0,81)	0,001	0,68 (0,48-0,97)	0,034
----------------	---------------------	--------------	---------------------	--------------	---------------------	--------------

5. Diskussion

5.1. Vergleich der Bisulfit-Konversion verschiedener Kits

Die Bisulfit-Konversion von neun verschiedenen kommerziell erhältlichen Kits wurde verglichen, um das beste Kit für die nachfolgenden PCR-Anwendungen zu identifizieren. Vor allem der Einsatz von FFPE war von zentraler Bedeutung, da FFPE das Gewebe ist, welches für retrospektive Kohorten Studien zur Verfügung steht.

Der Vergleich Bisulfit Kits zeigte, dass die Kits unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen und demnach die Wahl des zu verwenden Kits von großer Bedeutung für die Anwendbarkeit in weiterführenden Versuchen ist. Daher sollte die Auswahl an die biologische Fragestellung und die Anforderungen an das Kit, wie beispielsweise der Einsatz von FFPE, angepasst werden. Auch sollten Parameter wie *hands-on-time* und *time-to-result* nicht außer Acht gelassen werden, da die untersuchten Kits diesbezüglich starke Variationen zeigten. Auch weitere Parameter wie die DNA-Ausbeute oder fehlerhafte Bisulfit-Konversion^{154,155} sollten bei der Auswahl in Betracht gezogen werden.

Beim Einsatz von HMW DNA zeigen die einzelnen Kits zwar signifikante Unterschiede, jedoch zeigten alle Kits hohe Ausbeuten und reproduzierbare Ergebnisse in den weiterführenden Versuchen, wie beispielsweise PCR-Reaktionen. Die Unterschiede der Kits wurden beim Einsatz von DNA aus FFPE Proben deutlicher sichtbar. Die Ursache für die deutlich geringere DNA-Ausbeute (29-50 %) liegt darin, dass die Bindebedingungen auf der Säule für HMW DNA optimiert wurden. Durch die stärkere Fragmentierung der DNA auf FFPE ist der Verlust in der DNA-Ausbeute deutlich höher.

Die Bisulfit-Konversion ist eine harsche, chemische Reaktion die zur Fragmentierung der DNA führt¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Lange Inkubationszeiten führen zwar zu einer vollständigen Konversion, jedoch auch zu unerwünschten Nebenreaktionen, wie DNA Degradierung und unerwünschte Konversion von Methyl-Cytosin zu Thymin. Die optimalen Reaktionsbedingungen erlauben eine vollständige Konversion der unmethylierten Cytosine, bei gleichzeitiger Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen, wie beispielsweise der unerwünschten Konversion¹⁵⁴. Neben DNA-Degradierung und unerwünschter Konversion führt eine lange Inkubationszeit auch zu einer hohen *time-to-result* und macht die Protokolle so schwierig anwendbar für die Routinediagnostik, wo schnelle Ergebnisse nötig sind um klinische Entscheidungen zu treffen. Die Kits mit längeren Inkubationszeiten führten zu einer höheren DNA-Fragmentierung. Daher

kommt es zu einem Verlust der Leistungsfähigkeit bei der Analyse von längeren PCR-Fragmenten. Die ersten konventionellen Protokolle für die Bisulfit-Konversion benötigten mehrstündige Inkubationszeiten bei niedriger Molarität und niedrigem pH der Bisulfit-Lösung. Als Alternative wurden Protokolle mit hoher Molarität und hoher Temperatur von Hayatsu *et al.* entwickelt^{159–162}. Genereux *et al.*¹⁵⁴ verglichen die beiden Methoden in Bezug auf die beiden gängigsten Fehler während der Konversion. Zum einen die unvollständige Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil und zum anderen die unerwünschte Konversion von methyliertem Cytosin zu Thymin. Diese führen in weiterführenden Versuchen zu falsch positiven oder falsch negativen Methylierungssignalen. Genereux *et al.*¹⁵⁴ beschrieben, dass die Konversion mit hoher Molarität und hoher Temperatur zu einer homogeneren Konversion führt und somit verlässlichere Daten generiert. Sie schlagen vor, dass je nach Applikation eine Variation der Bedingungen sinnvoll ist um verschiedene Fragestellungen zu beantworten¹⁵⁴. Ein weiterer kritischer Parameter bezüglich der Konversionseffizienz ist die Stabilität der Bisulfitlösung. Ammoniumbisulfit ist ein starkes Reduktionsmittel und oxidiert, wenn es Sauerstoff ausgesetzt ist. Genereux *et al.*¹⁵⁴ sahen 22 Monate nach dem ersten Öffnen des verwendeten Ammoniumbisulfit nur geringe Einbußen in der Leistung der Konversion. Die Kits EpiTect® Fast FFPE und Fast DNA Bisulfite und die innuCONVERT Bisulfite Kits beugen diesem Problem vor, da sie mehrere Aliquots der Bisulfitlösung bereitstellen.

Alle Kits zeigten hochreine DNA, die keine Inhibition der PCR in nachfolgenden Versuchen zeigte. Die Effizienz der DNA Konversion rangierte von 98,7 % (EpiTect® Bisulfite Kit) bis 99,9 % (EZ DNA Methylation-Direct™ Kit). Gleichzeitig war die unerwünschte Konversion sehr niedrig und rangierte von 0,9 % (innuCONVERT Bisulfite Kits) bis zu maximal 2,7 % (EZ DNA Methylation-Direct™ Kit). Dies bestätigt eine vorherige Studie, bei der die unerwünschte Konversion zwischen 0,09 % und 6,1 % lag¹⁵⁴. Obwohl die Unterschiede in der spezifischen und unerwünschten Konversion der verschiedenen Kits statistisch signifikante Unterschiede aufweisen, sind diese Unterschiede nicht ausgeprägt genug um die nachfolgende Applikation der PCR zu inhibieren. Zudem zeigten alle Proben für mindestens vier Wochen hohe Stabilität bei einer Lagerung bei 4 bis -80 °C. Dies könnte den Bedingungen des Elutionspuffers zugewiesen werden. Daher sollte je nach Länge der Lagerung eine geeignete Temperatur gewählt werden.

Die Handhabung und die Nutzerfreundlichkeit der Kits zeigten deutliche Unterschiede. Die *time-to-result* lag zwischen 131 min (innuCONVERT Kits) und 402 min (EpiTect® Bisulfite Kit). Die *hands-on-time* lag zwischen 66 min (EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit) und 104 min

(EpiTect® Fast FFPE Bisulfite und EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit). Die Verfügbarkeit von Personal und die Notwendigkeit für eine Lieferung schneller Ergebnisse könnte also die Wahl eines geeigneten Kits beeinflussen.

Die deutlichsten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kits traten bei der direkten Konversion von FFPE Gewebeschnitten, ohne vorherige DNA Extraktion, auf. Die DNA Extraktion und Konversion verlaufen hier in einem Schritt. Es konnten für diesen Test nicht alle Kits verwendet werden, da nur drei Kits eine solche Anwendung zulassen. Die DNA-Ausbeute war bei allen getesteten Kits sehr gut. Die DNA-Ausbeute des EZ DNA Methylation-Direct™ Kit war jedoch nicht mittels PCR amplifizierbar. Die DNA aus dem EpiTect® Fast FFPE Bisulfite Kit und dem innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit waren mittels PCR amplifizierbar. Die drei Kits zeigten beim Einsatz von zuvor extrahierter DNA keine so hohe Varianz wie beim direkten Einsatz von FFPE Gewebeschnitten. Dementsprechend ist der starke Effekt in diesem Versuch vermutlich auf das Lyseprotokoll der einzelnen Kits zurückzuführen. Die vollständige Lyse ist sehr wichtig, um die nachfolgende Konversionsreaktion zu ermöglichen¹⁶³. Eine Lyse von mindestens 48 Stunden und eine erneute Zugabe von frischer Proteinase K Lösung während der Lyse erhöht die Ausbeute der DNA¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit zeigte die höchste Ausbeute an amplifizierbarer DNA. Zudem zeigte das innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit die beste Anwendbarkeit für kritische Proben wie FFPE Gewebe.

5.2. Neue Biomarker für Prostatakrebs

Prostatakrebs ist in der westlichen Welt eine der häufigsten Krebserkrankungen und die dritthäufigste Todesursache bei Männern². Dennoch verläuft die Krankheit bei der Mehrzahl der Männer klinisch insignifikant und ist meist heilbar, wenn das Karzinom lokal auf die Prostata begrenzt ist. Die relative 5-Jahre-Überlebensrate liegt bei 93 % und die Mehrzahl der Männer werden nicht an ihrem Prostatakarzinom sterben². Meist werden Patienten jedoch trotzdem radikal behandelt, da es auch beim lokal begrenzten Prostatakarzinom Fälle mit einer schlechten Prognose gibt^{168,169}. Besonders für diese Patienten wäre eine Verbesserung der Stratifizierung mit neuen Biomarkern wünschenswert, um einerseits eine Übertherapie zu vermeiden, jedoch Patienten andererseits nicht zu unterversorgen. Das fortgeschrittene Prostatakarzinom hat meist eine schlechte Prognose. Obwohl es zu Beginn der Therapie in der Regel gut auf eine Anti-Androgen Therapie anspricht wird es meist im Verlauf der Erkrankung Androgenresistent. Auch hier ist es nötig neue Biomarker zu identifizieren, die helfen die Patienten besser zu stratifizieren. Des Weiteren benötigen auch neue, personalisierte Therapien, wie Immuntherapien, neue Biomarker zur optimalen Stratifizierung der Patienten.

5.2.1 *PITX3*

PITX3 ist ein Transkriptionsfaktor und gehört, zusammen mit *PITX2* und *PITX1*, zur Proteinfamilie der RIEG/*PITX* Homeobox Proteine. Über seine Bedeutung in der Karzinogenese ist bisher sehr wenig bekannt.

In unserer Studie zeigte *PITX3* eine aberrante DNA-Methylierung in Karzinomgewebe im Vergleich zum tumornahen Normalgewebe der Prostata in zwei unabhängigen Kohorten. Prostata- und Brustkrebs sind beide hormonabhängige Tumore und unsere Daten stimmen mit den zuvor publizierten Daten in Brustkrebs Patientinnen überein⁷⁹. Dietrich *et al.*⁷⁹ zeigte, dass *PITX3* im Karzinomgewebe der Brust hypermethyliert ist. In beiden untersuchten Kohorten korrelierte die *PITX3* DNA-Methylierung mit etablierten klinopathologischen Merkmale, wie ISUP, pT-Status und präoperativer PSA. Eine Korrelation der *PITX3* DNA-Methylierung mit dem AR Status konnte nur in der TCGA Kohorte gezeigt werden. Dies könnte mit der höheren Fallzahl und einer höheren Anzahl von Patienten mit hoher Gleason Grading Gruppe zusammenhängen. Zwei kürzlich erschienene Publikationen zeigen ähnliche Ergebnisse für *PITX2*^{109,111}. Dies deutet darauf hin, dass beide Gene nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern eventuell auch im Prostatakarzinom eine Rolle spielen.

PITX3 DNA-Methylierung war in beiden Kohorten ein prognostischer Biomarker für das BCR-freie Überleben der Patienten. In beiden Kohorten zeigte die Kaplan-Meier Analyse, dass eine hohe *PITX3* DNA-Methylierung mit einer kürzeren Zeit bis zum BCR der Patienten assoziiert war. In der UKB Kohorte war *PITX3* DNA-Methylierung auch als kontinuierliche Variable ein signifikanter Marker für das BCR-freie Überleben. In einer zusammengeführten Kohorte zeigte *PITX3* DNA-Methylierung zudem einen unabhängigen, signifikant prognostischen Wert in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse zusammen mit den gängigen klinopathologischen Parametern (ISUP Gleason Grading Gruppe, pT-Status, pN-Status, präoperativem PSA und Resektionsrand). Daher könnte es für die Risiko- oder Therapiestratifizierung der Patienten von klinischem Nutzen sein. Es wäre auch denkbar eine Kombination der *PITX2* und *PITX3* DNA-Methylierung zu verwenden. In der TCGA-Kohorte zeigte die Kombination eine signifikante Stratifizierung in drei Gruppen, wobei Patienten, bei denen beide Gene hoch methyliert waren, ein besonders kurzes BCR-freies Überleben aufwiesen. Obwohl das PSA-Screening zu einer Reduktion des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms und einer niedrigeren Sterblichkeit geführt hat, führt es gleichzeitig zu einer Übertherapie von Patienten. Prostatakarzinome mit niedrigem Risiko verlaufen meist ohne stärkere Symptomatik und würden ohne Behandlung nicht zum Tod des Patienten führen. Trotzdem werden in den USA

die meisten Männer auch bei Prostatakarzinomen mit geringem Risiko mit einer Prostatektomie oder Radiotherapie behandelt¹⁷⁰. Daher führt eine frühe Diagnose dieser Karzinome häufig zu einer Überdiagnose und daraufhin zu einer Überbehandlung der Patienten, die einhergeht mit unnötigen Nebenwirkungen wie Harndysfunktion und/oder Impotenz^{171,172}. So wird die Lebensqualität dieser Patienten unnötig gemindert. Daher werden noch immer neue Marker benötigt. Die bisher analysierten Kohorten bestehen aus Patienten nach einer radikalen Prostatektomie. Daher wäre als nächster Schritt die Analyse von Patienten vor radikaler Prostatektomie mittels einer Biopsiekohorte sinnvoll, um das weitere Potential von *PITX3* DNA-Methylierung als Biomarker zu untersuchen.

Ein Zusammenhang der *PITX3* DNA-Methylierung, an der untersuchten Lokalisation des *PITX3* Assays, mit der mRNA-Expression des Gens wurde nicht gefunden. Die DNA-Methylierung und mRNA-Expression wurden in diversen Ziellinien gemessen, wobei keine Korrelation festgestellt werden konnte. Auch in der TCGA-Kohorte korrelierte die gemessene mRNA-Expression nicht mit der Methylierung. Zudem waren weder mRNA-Expression noch Proteinexpression prognostische Marker für das BCR-freie Überleben der Patienten. Ob die *PITX3*-Expression in Krebs allgemein, und speziell im Prostatakarzinom, von Bedeutung ist, bleibt daher noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchung.

Zusammenfassend ist die *PITX3* DNA-Methylierung ein vielversprechender unabhängiger prognostischer Marker für das BCR-freie Überleben von Patienten mit Prostatakarzinom, die in zwei unabhängigen Kohorten validiert werden konnte. Eine Kombination von *PITX2* und *PITX3* DNA-Methylierung wäre denkbar um die Stratifizierung noch weiter zu verbessern. Dies müsste in weiteren Analysen validiert werden.

5.2.2 CXCL12

CXCL12 ist ein Chemokin, das vermehrt im Knochenmark und in den Lymphknoten exprimiert wird⁸⁵ und zu einer Chemotaxis von Zellen führen kann. Die Chemotaxis wird erst bei Bindung an seinen Rezeptor CXCR4 und anschließender Internalisierung des Rezeptors beendet¹⁷³. Langfristig gesehen bewirkt eine konstante Expression von CXCL12 eine Desensibilisierung von CXCR4 und einen Ruhezustand sowohl bei hematopoetischen Stammzellen als auch bei Tumorzellen¹⁷⁴. Daher führt eine konstante Expression von CXCL12 in der Mikroumgebung des Tumors zu einer Unterdrückung der Metastasierung⁸⁰. Weitere Funktionen von CXCL12 sind Förderung der Angiogenese im Tumor, sowie der Tumorpheriferation¹⁷⁵. Eine hohe CXCL12 Expression wurde bereits in verschiedenen Entitäten mit einem besseren Überleben von

Krebspatienten assoziiert^{176,177}. Im Widerspruch dazu, wurden eine hohen CXCL12 Expression im Ovarialkarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert¹⁷⁸. Die schlechte Prognose könnte an den diversen Funktionen von CXCL12 liegen. Im Prostatakarzinom wurde der CXCR4/CXCL12 Signalweg im Zusammenhang mit der Metastasierung beschrieben^{179,180}.

In der UKB Kohorte zeigte die *CXCL12* DNA-Methylierung im Prostatakarzinom eine signifikant höhere Methylierung im Vergleich zu dem tumornahen Normalgewebe. Diese Daten bestätigen die zuvor von Dietrich *et al.*¹⁴⁷ beschriebene Hypermethylierung in Brustkrebs. Auch Suzuki *et al.*¹⁸¹ beschreiben eine erhöhte Methylierung im Tumorgewebe von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC). Die *CXCL12* DNA-Methylierung zeigte einen prognostischen Effekt, wenn sie in drei Gruppen trichotomisiert wurden. Die Gruppe mit einer mittleren Methylierung (um 50 %) war mit einer besseren Prognose für die Patienten assoziiert. Eine „abnormale“ Methylierung (unter 30 % oder über 70 %) zeigte eine signifikant schlechtere Prognose. Dieser Effekt konnte in beiden Kohorten bestätigt werden.

Es wurde bereits in verschiedenen Publikationen gezeigt, dass eine *CXCL12* Hypermethylierung innerhalb der Promotorregion mit einer reduzierten CXCL12 Expression in verschiedenen Tumoren assoziiert ist^{182–184}. Es wurde nur eine Assoziation und keine lineare Korrelation in der UKB Kohorte gefunden. In der TCGA Kohorte gab es in den untersuchen cg-Probes, benachbart zu der Lokalisation des *CXCL12* Assays, keine Korrelation mit der mRNA-Expression. Die mRNA-Expression und die Proteinexpression zeigten keinen prognostischen Effekt. Bei genauerer Untersuchung der 14 Probes innerhalb der annotierten *CXCL12* Promotorregion zeigte sich, dass 4 der 14 cg-Probes eine signifikante negative Korrelation mit der mRNA-Expression aufweisen (**Tabelle 5-1**). Die Probe cg26267854 zeigt hingegen keine signifikante Korrelation mit der mRNA-Expression. Diese Beobachtung steht auch im Einklang mit den Daten von Clatot *et al.*¹⁸⁴, der mittels Bisulfitsequenzierung zeigt, dass eine hohe Methylierung (>40 %) mit einer niedrigen Expression assoziiert ist. Die Bisulfitsequenzierung analysiert jedoch einen größeren Bereich im Vergleich zum entwickelten Assay. Eine Verlängerung der entwickelten Assays wäre nicht denkbar, da dies für den Einsatz auf fragmentierter DNA aus FFPE nicht möglich ist. Es wäre jedoch denkbar für weitere Untersuchungen der *CXCL12* DNA-Methylierung einen weiteren Assay zu entwickeln.

Tabelle 5-1: Übersicht der Korrelation der DNA-Methylierung und mRNA-Expression in der TCGA Kohorte. 14 cg-Probes innerhalb der Promotorregion wurden untersucht, die cg-Probes die mit unserer CXCL12 qRT-PCR übereinstimmen sind blau markiert.

TCGA cg-Probe Nummer	Korrelation	
	Signifikanz	Korrelationskoeffizient
cg25721625	n.s.	n.b.
cg06048524	n.s.	n.b.
cg17267805	n.s.	n.b.
cg23407507	n.s.	n.b.
cg26267854	n.s.	n.b.
cg00353773	***	$\rho = -0,158$
cg26718433	*	$\rho = -0,112$
cg10927719	n.s.	n.b.
cg18618334	n.s.	n.b.
cg00499822	***	$\rho = -0,197$
cg09348985	***	$\rho = -0,371$
cg11267527	n.s.	n.b.
cg00695712	n.s.	n.b.
cg16187804	n.s.	n.b.

*** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = $p \geq 0,05$ und n.b. = nicht bestimmt

Die UKB Kohorte schließt ausschließlich Patienten nach einer radikalen Prostatektomie ein. Dies ist eine wichtige Limitation der Studie. Eine Validierung der Ergebnisse auf einer Biopsiekohorte wäre wünschenswert, um zu sehen, ob CXCL12 bereits vor einer radikalen Ektomie der Prostata als Marker Verwendung finden könnte. Hierzu wurden in einer Fallkontrollstudie aus 10 Patienten die CXCL12 DNA-Methylierung in gepaarten Biopsie und Ektomie-Proben gemessen. Die Messungen korrelierten signifikant miteinander ($p = 0,019$). Eine Messung wäre demnach auf Biopsien übertragbar, da zum einen dank der deutlich geringeren DNA-Menge der Assay problemlos auf Biopsien angewendet werden kann und zum anderen sich die Ektomie und Biopsie Messungen gegenseitig bestätigen.

Zusammenfassend ist CXCL12 ein vielversprechender Biomarker im Prostatakarzinom, der einer weiteren Validierung der Assoziation mit der Expression und der Anwendung auf Biopsien im nächsten Schritt benötigt.

5.2.3 *PD-L1*

PD-L1 und sein Rezeptor PD-1 wurden in dieser Arbeit im Zusammenhang mit Immuntherapie von verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben. Jüngste Daten weisen darauf hin, dass der PD-1/PD-L1 Signalweg dem Tumor hilft durch Inhibition der T-Zell Aktivierung, das Immunsystem zu umgehen^{134,135}. Es wurden bereits verschiedene Antikörper zur Immuntherapie entdeckt, die speziell gegen PD-L1 oder PD-1 gerichtet sind. Solche Immuntherapien zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse in malignen Melanomen, Kopf- und Halstumoren, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen oder Nierenzellkarzinomen^{185,186}.

In dieser Arbeit wurde die *PD-L1* DNA-Methylierung in zwei unabhängigen Kohorten untersucht. Der PD-L1 Assay 1 überschneidet sich mit cg-Probe cg14035799 und beide zeigen keine differenzielle Methylierung. PD-L1 Assay 2 überschneidet sich mit cg-Probe cg19724470. Im TCGA Datensatz zeigte sich eine signifikante Hypermethylierung im Tumorgewebe im Vergleich zu tumornahem Normalgewebe. PD-L1 Assay 2 zeigte in der UKB Fallkontrollstudie einen visuellen Trend zur Hypermethylierung im Tumor. Dies könnte an der deutlich niedrigen Fallzahl liegen (TCGA: n = 498 Patienten vs. UKB: n = 25 Patienten). In der TCGA Kohorte zeigte cg14035799 (Übereinstimmung mit PD-L1 Assay 1) keinen prognostischen Wert, daher wurde PD-L1 Assay 1 in der Prostata UKB Kohorte nicht weiter analysiert. Die cg-Probe cg19724470 (Übereinstimmung mit PD-L1 Assay 2) zeigte einen signifikant prognostischen Wert in der Kaplan-Meier und Cox-Regressions-Analyse. Eine hohe DNA-Methylierung war mit einem kürzeren BCR-freie Überleben assoziiert.

Die DNA-Methylierung ist eine stabile Markierung, die in einer Vielzahl relevanter klinischer Proben akkurat und robust gemessen werden kann. Daher ist sie eine wichtige Quelle für Biomarker. Die DNA-Methylierung im Promotorbereich ist häufig mit der Expression des Gens assoziiert¹⁸⁷. In Normalgewebe sind rund 80% der CpGs methyliert und hauptsächlich CpGs innerhalb von CpG-Inseln in aktiven Genen hypomethyliert¹⁸⁸. In Krebs kommt es häufig zu einer Verschiebung dieser Methylierung und oftmals werden Promotorbereiche von Tumorsuppressorgenen dann hypermethyliert^{188,189} und in Onkogenen hypomethyliert. Dennoch zeigen aktuelle Publikationen, dass der Zusammenhang von DNA-Methylierung und Expression, vor allem im Krebs, deutlich komplexer ist. Um CpG-Inseln herum wurden

Bereiche entdeckt, die *CpG Shores* genannt werden. Diese Bereiche scheinen im Zusammenhang mit der Expression der Gene eine wichtige Rolle zu spielen¹⁹⁰. Pollard *et al.*¹⁹¹ beschreibt, dass die Methylierung von *CpG Shores* von funktioneller Relevanz im Prozess der zellulären Reprogrammierung ist. Irizarry *et al.*¹⁹² beschreibt, dass die *CpG Shores* Methylierung in Kolonkarzinom mit der Expression assoziiert ist, während die Methylierung im Promotor keine Assoziation mit der Expression zeigte. Dies stimmt mit den Daten der TCGA Kohorte überein. Die DNA-Methylierung (cg19724470) außerhalb der CpG-Insel korreliert mit der mRNA-Expression, während die Methylierung (cg02823866) in der CpG-Insel nicht mit der Expression korreliert und stark hypomethyliert war. Dennoch konnte die mRNA-Expression die Patienten nicht stratifizieren, obwohl die cg19724470 Probe einen signifikant prognostischen Wert zeigte. In der UKB Kohorte konnte der prognostische Wert an derselben Stelle (PD-L1 Assay 2) bestätigt werden. Es gab in der UKB Kohorte jedoch keine Korrelation der Proteinexpression mit der DNA-Methylierung. Auch in 11 Krebszelllinien korrelierte die mRNA-Expression nicht mit der DNA-Methylierung der beiden Assays. Die mRNA-Expression wurde in der UKB-Kohorte nicht erhoben, daher ist der direkte Vergleich mit den TCGA Daten schwierig. Eine Abweichung der mRNA basierten TCGA-Daten zu den Proteindaten könnte unterschiedliche Gründe haben. Zum einen wäre möglich, dass die Expression der *PD-L1* mRNA über die Methylierung reguliert wird, die Translation zum Protein jedoch noch einer zusätzlichen Regulation unterliegt. Zudem könnte es mit der Methodik zusammenhängen, mit der die Proben genommen wurden. Die Stenzen für die Kohorte der DNA-Methylierung und die Stenzen für den IHC TMA wurden bei den meisten Patienten aus unterschiedlichen Tumorblöcken entnommen. Auf Grund der Heterogenität von Prostatatumoren könnte dies auch eine Erklärung für die Diskrepanz und die fehlende Korrelation der Proteinexpression mit der DNA-Methylierung sein.

Die Theorie, dass die *PD-L1* DNA-Methylierung als Syrogatmarker für die Proteinexpression eingesetzt werden könnte, so wie dies bei O-6-methylguanine-DNA Methyltransferase (*MGMT*) der Fall ist^{189,193} konnten wir nur in der TCGA Kohorte bestätigen. Dann wäre ein Einsatz in der Immuntherapie denkbar. Da eine Korrelation mit der mRNA-Expression gegeben ist, jedoch keine Korrelation mit der Proteinexpression müsste dieser Zusammenhang noch weiter untersucht werden. Eine solche Untersuchung sollte im Idealfall mit einer Kohorte mit Daten zur mRNA- und Proteinexpression, sowie der DNA-Methylierung in denselben Patientenproben erfolgen.

In der Publikation von Gevensleben *et al.*¹⁵² zeigt die PD-L1 Proteinexpression eine Korrelation mit dem AR Rezeptor. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen wurden zwei Prostatakrebszelllinien (LNCaP und 22Rv1) mit DHT stimuliert und der Androgen-Signalweg mittels Bicalutamid blockiert. Für diesen Versuch konnten nur androgenabhängige Zelllinien verwendet werden. Diese Zelllinien zeigten allgemein eine geringe Expression von PD-L1. Die PD-L1-Expression zeigte keine signifikante Veränderung nach 24 Stunden Stimulation. Als Kontrolle, für die Effektivität der Stimulation wurde PSA gemessen. Hier zeigte sich eine signifikante Änderung.

Zusammenfassend müsste die Korrelation von Expression und Methylierung noch weiter untersucht werden, da die Datenlage keine finale Aussage zulässt. Die *PD-L1* DNA-Methylierung des PD-L1 Assay 2 konnte in zwei unabhängigen Kohorten validiert werden und ist ein vielversprechender unabhängiger prognostischer Marker für das BCR-freie Überleben in Patienten mit Prostatakarzinom. Hier wäre eine weitergehende Untersuchung beispielweise in einer Biopsiekohorte, die Patienten einschließt, die unterschiedlich therapiert wurden, für eine weitere Charakterisierung nötig.

5.2.4 Kombination von *CXCL12* und PD-L1

Die Immuntherapie ist ein Therapieansatz, der bereits in diversen Krebsarten vielversprechende Ergebnisse lieferte und es ermöglichte das Überleben der Patienten zu verlängern^{194–196}. Sowohl Antikörper gegen den *CXCL12*/*CXCR4* Signalweg, als auch gegen den PD1/PD-L1 Signalweg werden bereits als Immuntherapeutika in klinischen Studien getestet. Da meist kombinatorische Therapien am erfolgversprechendsten sind, haben wir uns die Frage gestellt, ob eine Stratifizierung der Patienten im Prostatakarzinom auch in Kombination der Marker möglich wäre. Gevensleben *et al.*¹⁵² zeigte eine Stratifizierung der Patienten mittels PD-L1 Immunhistochemie. Diese Daten wurden mit den *CXCL12* DNA-Methylierungsdaten in Kombination analysiert. Hier zeigte sich, dass Patienten mit hoher PD-L1 Expression und deregulierter *CXCL12* DNA-Methylierung eine besonders kurze BCR-freie Überlebenszeit aufweisen.

Aktuelle Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Blockierung von *CXCR4* und der Resistenz gegen die anti-PD-1/anti-PD-L1 Therapie^{197,198}. *In vitro* und *in vivo* Studien mit Mäusen zeigten, dass die *CXCR4* Blockierung mit dem Peptid ADM3100 die Sensitivität gegen PD-1 und CTLA-4 Immuncheckpoint Inhibitoren in resistenten Tumoren wieder erhöht^{80,198,199}.

Es sind bereits zwei klinische Studien in Planung, bei denen eine kombinatorische Therapie angewendet werden soll. In der ersten Studie wird eine Kombination aus Ulocuplumab (anti-CXCR4) und Nivolumab (anti-PD1) in Patienten mit metastasierten soliden Tumoren getestet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02472977)²⁰⁰. In der zweiten Studie wird die Kombination aus LY2510924 (anti-CXCR4) und Durvalumab (anti-PD-L1) in Patienten mit soliden Tumoren getestet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02737072)²⁰⁰. Vorläufige Ergebnisse liegen derzeit noch nicht vor.

Die Daten bezüglich einer Kombination aus *CXCL12* DNA-Methylierung und PD-L1 Proteinexpression sind vielversprechend, doch eine mögliche Anwendung dieser Kombination in Bezug auf die Stratifizierung zur Immuntherapie kann in der UKB Kohorte nicht geklärt werden. Hierzu wäre eine Kohorte, die unterschiedliche Therapieansätze einschließt nötig, um die Anwendung dieser Marker in Bezug auf eine Therapiestratifizierung zu validieren. Zudem müsste die unklare Korrelation der Expression und Methylierung bei dem entwickelten *CXCL12* qRT-PCR Assay erneut validiert werden.

5.3. Neue Biomarker für Kopf- und Halstumore

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs sind eine Tumorentität mit meist schlechter Prognose. In den letzten Jahren gab es sehr wenig Verbesserungen für das Überleben des Patienten²⁰¹. Trotz erster Ansätze mit zielgerichteter Therapie ist die operative Entfernung des Tumors und die Radiotherapie noch immer die meist angewendete Therapieform. Neue Biomarker, die zusätzlich zu den gängigen klinopathologischen Parametern für die Stratifizierung der Patienten in Bezug auf das Überleben oder eine Therapieentscheidung verwendet werden können, werden dringend benötigt. Die Patientencharakteristika der UKB Kohorte stimmen mit der bisher beschriebenen Verteilung der demographischen und klinischen Daten für Kopf- und Halstumorpatienten überein²⁰².

5.3.1 *CXCL12*

CXCL12 ist ein Chemokin, das vermehrt im Knochenmark und Lymphknoten exprimiert wird⁸⁵ und in der Mikroumgebung des Tumors zu einer Unterdrückung des Metastaseprozesses führen kann⁸⁰. Eine hohe Expression wurde bereits in Brustkrebs mit einem besseren Gesamtüberleben von Krebspatienten assoziiert¹⁷⁶. Leon *et al.*¹⁷⁷ zeigt dies auch für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs.

Die *CXCL12* DNA-Methylierung zeigte, in Tumoren des Kopf- und Halsbereichs eine signifikant höhere Methylierung in Tumorgewebe im Vergleich zu dem tumornahen Normalgewebe. In der Kaplan-Meier Analyse ist eine niedrige Methylierung mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert. Dies ließ sich in der Cox-Regressions-Analyse nur durch einen Trend bestätigen. Hier wurde die Signifikanz knapp verfehlt ($p = 0,052$). Bei *CXCL12* DNA-Methylierung als kontinuierlicher Variable gab es keine signifikante Assoziation mit dem Überleben. Es wurde bereits in verschiedenen Publikationen gezeigt, dass eine *CXCL12* Hypermethylierung innerhalb der Promotorregion mit einer reduzierten *CXCL12* Expression in verschiedenen Tumoren assoziiert ist¹⁸²⁻¹⁸⁴. In einer aktuellen Publikation zeigten Clatot *et al.*¹⁸⁴, dass eine hohe *CXCL12* Promotormethylierung mit einer geringen *CXCL12* Expression in HNSCC Patienten assoziiert ist. Die Methylierung wird in dieser Publikation über Bisulfitsequenzierung bestimmt, und zwar in einer überlappenden, jedoch deutlich größeren Region, verglichen mit unserem *CXCL12* QM-Assay (**Abbildung 5-1**).

Unsere ursprüngliche Hypothese, dass eine niedrige Methylierung eine bessere Prognose für den Patienten bedeutet und mit einer hohen Expression einhergeht, konnten wir nicht bestätigen. Clatot *et al.*¹⁸⁴ zeigten in derselben Region, in der unser Assay liegt mittels Bisulfitsequenzierung, dass eine hohe Methylierung (> 40 %) mit einer niedrigen Expression assoziiert ist (**Abbildung 5-1**). Zudem zeigten sie, dass *CXCL12* im Tumor höher methyliert ist (jedoch nur ein Trend) und eine signifikant niedrigere Expression im Tumor aufweist im Vergleich zum Stroma. Dieser Trend stimmt mit unseren Daten zur Hypermethylierung im Tumor überein. Unsere Daten können jedoch nicht mit dem bisherigen Wissen über die Rolle von *CXCL12* in der Metastasierung in Einklang gebracht werden. Wenn wir auf Grund der Clatot *et al.*¹⁸⁴ Publikation davon ausgehen, dass eine hohe *CXCL12* DNA-Methylierung mit einer niedrigen Expression einhergeht, widersprechen unsere Daten dem bisherigen Wissen, da bei uns eine hohe Methylierung (niedrige Expression) mit einer besseren Prognose einhergeht. Die Assoziation einer hohen *CXCL12* Expression mit einer schlechteren Prognose wurde jedoch bereits im Ovarialkarzinom beschrieben¹⁷⁸. Dies lässt sich durch die weiteren Funktionen von *CXCL12* erklären. Neben der Metastasierung ist *CXCL12* auch am Tumorwachstum, der Angiogenese und der Unterdrückung des Immunsystems im Tumor beteiligt. Diese Funktionen könnten mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein.

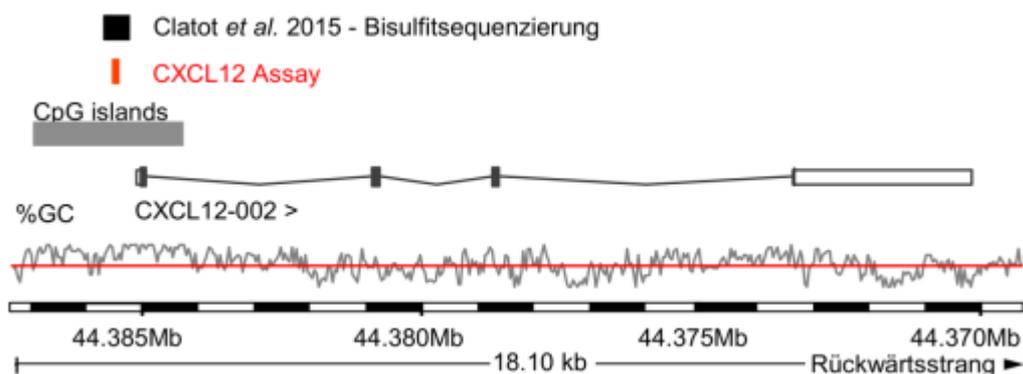


Abbildung 5-1: Überblick über unseren Assay und bereits publizierte Daten zur CXCL12 DNA-Methylierung in HNSCC Patienten. Die graue Linie zeigt den GC-Gehalt [%] und die gestrichelte Linie stellt einen CG-Gehalt von 50% dar. Die Abbildungsinformationen wurden der Datenbank Ensembl Homo sapiens Version 82.37 (GRCh37.p3) entnommen.

Zusammenfassend zeigt die *CXCL12* DNA-Methylierung in Kopf- und Halstumoren eine signifikante Stratifizierung der Tumorpatienten. Immuntherapie, durch Modulation der CXCR12/CXCR4 Signalachse, ist eine vielversprechende Therapieform für Krebspatienten⁸⁰. Ob ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Expression bei *CXCL12* besteht und somit eine Applikation in der zielgerichteten Immuntherapie bei Kopf- und Halstumoren möglich ist, muss durch weitere Experimente weiter untersucht werden. Hierzu sollten *CXCL12*-Expression und DNA-Methylierung in derselben Kohorte untersucht werden und die bisherigen Daten der DNA-Methylierung in einer unabhängigen Kohorte validiert werden.

5.3.2 *PITX2*, *PITX3* und *PANCR*

In der HNSCC Kohorte wurden *PITX2*, *PITX3* und *PANCR* DNA-Methylierung als potentielle Biomarker untersucht. *PITX3* DNA-Methylierung wurde bisher nur in Brustkrebs im Vergleich zu Normalgewebe als differentiell methyliert beschrieben⁷⁹. Des Weiteren ist über den Zusammenhang von *PITX3* und der Karzinogenese noch nichts bekannt. *PITX2* hingegen wurde bereits in diversen Entitäten untersucht, sowohl auf Expressions- als auch auf Methylierungsebene^{104–111,113,115,116}. Die lncRNA *PANCR* wurde bisher nur im Zusammenhang mit Vorhofflimmern beschrieben¹¹⁸.

In der HNSCC-Kohorte zeigten *PITX2*, *PANCR* und *PITX3* DNA-Methylierung eine signifikant höhere Methylierung im Tumorgewebe im Vergleich zum tumornahen Normalgewebe. Bei *PITX3* zeigt sich in Kopf- und Halstumoren dasselbe Ergebnis wie zuvor in Brustkrebs⁷⁹. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit einer niedrigen *PITX2* DNA-Methylierung ein signifikant

schlechteres Überleben zeigen. Bei *PANCR* und *PITX3* DNA-Methylierung hingegen korrelierte eine hohe DNA-Methylierung mit einem signifikant schlechteren Überleben der Patienten. Alle drei Gene zeigten eine Korrelation mit p16 und dem Alkoholkonsum, den typischen Risikofaktoren bei Kopf- und Halstumoren.

PITX2 ist an der Regulation des Zellzyklus über p21 beteiligt^{203–205}. Gallastegui *et al.*²⁰⁴ fand heraus, dass p27 die Expression von p21 über *PITX2* reguliert. Ist das p27-Level niedrig werden *PITX2* und p21 exprimiert. Unter der Annahme, dass *PITX2* DNA-Methylierung und Expression invers korrelieren, wäre eine hohe Expression mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Da Gallastegui *et al.*²⁰⁴ zufolge die Subpopulation mit hoher *PITX2* und niedriger p21-Expression ein schlechteres Gesamtüberleben aufweisen, würde dies mit unseren Daten übereinstimmen. Es wäre jedoch noch nötig die Expression in der Kopf- und Halstumor Kohorte zu analysieren. Hier wäre es optimal nur die Expression der beiden Isoformen *PITX2* A und B zu analysieren, da *PITX2* C eine abweichende Funktion haben könnte.

Eine hohe *PITX2* DNA-Methylierung zeigte zudem eine Korrelation mit der p16-Expression und der Lokalisation des Tumors. p16-positive Patienten (45,0 %) weisen eine höhere mittlere *PITX2* DNA-Methylierung auf als p16-negative (12,6 %). Die DNA-Methylierung wurde im Promotor P2 gemessen. Dieser reguliert die Transkription der Varianten *PITX2a* und *PITX2b* und wird unter anderem über den WNT-Signalweg reguliert¹⁰⁰. Dies könnte die Theorie bestärken, dass in der Tumorgenese von HPV-positiven Tumoren (hohe Methylierung, eventuell niedrige Expression) der Wnt/ β -Catenin Signalweg keine oder erst zu einem späterem Zeitpunkt eine besondere Rolle spielt. Im Gegensatz dazu wurden gezeigt, dass in Kolonkrebs eine hohe *PITX2* Expression vorliegt und hier der Wnt/ β -Catenin Signalweg, aktiviert durch APC Mutationen, eine zentrale Rolle spielt²⁰⁶. Die Korrelation von Expression und Methylierung müsste jedoch in unserer Kohorte noch gezeigt werden. Zudem wäre es wichtig die Hauptvarianten von *PITX2* (A, B und C) zu unterscheiden, da diese unterschiedliche Funktionen haben und in der Karzinogene vielleicht unterschiedliche Rollen übernehmen. Bisher wurde in vielen Publikationen nicht zwischen den Varianten unterschieden, was durchaus ein Problem darstellen könnte.

PITX3 gehört zu derselben Proteinfamilie wie *PITX2*. Zum Teil übernehmen diese Proteine ähnliche Funktionen in der Embryonalentwicklung. *PITX3* wurde bisher noch kaum im Karzinom untersucht und ob und wie das Protein in der Karzinogenese beteiligt ist, ist noch unklar. In der HNSCC-Kohorte zeigte *PITX3* einen signifikant prognostischen Wert, invers zu der *PITX2* DNA-Methylierung. Die inverse Assoziation mit *PITX2* und *PITX3* DNA-Methylierung

war unerwartet. Beide Assays liegen in den jeweiligen Promotorbereichen und die beiden Gene gehören zu derselben Proteinfamilie und zeigen eine hohe Homologie. In Prostatakrebs zeigten beide Gene dieselbe Assoziation. Hier war eine niedrige Methylierung in beiden Genen mit einem längeren BCR-freien Überleben der Patienten assoziiert. Diese Varianz könnte mit unterschiedlichen Funktionen von PITX2 in unterschiedlichen Krebsentitäten zusammenhängen. Eine hohe *PITX2* DNA-Methylierung wurde bereits mit einem schlechteren (Brust- und Prostatakrebs)^{105,109}, aber auch einem bessern (Lungenkrebs)¹⁰⁴ Überleben in Zusammenhang gebracht.

Lange nicht-kodierende RNAs (lncRNA) sind bereits als wichtige Regulatoren der Genexpression bekannt. Eine Fehlregulation von lncRNAs wurde mit diversen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht²⁰⁷. Die genauen Regulationsmechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. *PANCR*, die lncRNA *downstream* von PITX2 wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit Krebs untersucht. Gore-Panter *et al.*¹¹⁸ zeigten, dass die *PANCR* lncRNA im linken Atrium des Herzens exprimiert wird und hier eine starke Korrelation mit *PITX2c* aufweist. Die Methylierung des Promoters der *PITX2c*-Variante (P1) wurde in dieser Kohorte bisher nicht untersucht. In unserer Kohorte zeigte sich, dass eine hohe *PANCR* DNA-Methylierung mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert ist. Die Konsequenz der unterschiedlichen *PANCR* DNA-Methylierung auf die Transkription ist bisher nicht bekannt und die genaue Rolle von *PANCR* in Tumoren, und speziell Kopf- und Halstumoren, bisher noch unklar. Es ist nötig weitere Daten, wie beispielsweise Transkriptomdaten, zu erheben um die genaue Rolle von *PANCR* in der Tumorgenese zu entschlüsseln. *PANCR* verhält sich genau umgekehrt zu PITX2 in unserer Kohorte. Es konnte jedoch keine Korrelation der beiden gefunden werden. Es ist bekannt, dass die Methylierung in einer Promotorregion oftmals zu einer Repression der Transkription führt. Der *PANCR* Assay befindet sich innerhalb des Gens nicht in der Promotorregion. Es ist bekannt, dass eine hohe Methylierung im *gene body* oftmals positiv mit der Genexpression korreliert ist^{187,208}. Es könnte daher sein, dass eine hohe DNA-Methylierung von *PANCR* zur Transkription des gesamten Genlokus führt und so die Aktivierung von PITX2 bedingt. In der Publikation von Gore-Panter *et al.*¹¹⁸ zeigte die Expression der *PANCR* lncRNA eine Korrelation mit der *PITX2c*-Expression. Daher wäre eine Untersuchung der DNA-Methylierung des *PITX2c*-Promotors in der Kopf- und Halspatienten Kohorte von Interesse.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die DNA-Methylierung von *PITX2*, *PITX3* und *PANCR* in Tumoren des Kopf- und Halsbereichs prognostisch für das Gesamtüberleben ist. In der

multivariaten Analyse zeigten alle drei einen zusätzlichen unabhängigen prognostischen Wert zu den gängigen prognostischen Parametern. Diese Information könnte den Klinikern helfen zu entscheiden wie engmaschig ein Patient nach Behandlung überwacht werden sollte oder ob eine adjuvante Therapie nötig ist, um ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen. Um die Anwendung als Biomarker zur Therapiestratifizierung zu ermöglichen ist unsere Kohorte nicht geeignet, da die Patienten bereits operiert wurden. Hierzu wäre eine Validierung auf einer prospektiven Studie nötig. Ein Zusammenhang mit der Expression könnte weiteren Aufschluss auf die Funktion der Proteine und der lncRNA *PANCR* im Karzinom geben und wäre daher wünschenswert.

6. Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurden mehrere Gene als methylierungsspezifische Biomarker untersucht. Der Fokus lag auf dem Prostatakarzinom und Tumoren des Kopf- und Halsbereichs.

Es konnte gezeigt werden, dass das *innuCONVERT Bisulfite All-In-One* Kit am besten geeignet ist, vor allem für den Einsatz bei FFPE Proben. Da unsere Proben alle aus FFPE Gewebe gewonnen wurden, war die Validierung der Kits diesbezüglich besonders wichtig. Zudem wurden verschiedenen qRT-PCR Assays zur Quantifizierung der DNA-Methylierung und zur Messung der mRNA-Expression entwickelt und validiert. Die Amplikons wurden zwischen 90-110 bp designt, um einen Einsatz auf FFPE-DNA zu gewährleisten.

In Kopf- und Halstumoren konnten *CXCL12*, *PITX3*, *PITX2* und *PANCR* als Biomarker identifiziert werden. Auch hier zeigten alle 4 Gene eine DNA Hypermethylierung im Karzinom im Vergleich zu tumornahem Normalgewebe und einen prognostischen Wert bezüglich des Gesamtüberlebens. Hier wäre eine Validierung der Daten in einer zweiten Kohorte und eine Untersuchung der Expression im nächsten Schritt nötig.

Im Prostatakarzinom zeigten *CXCL12*, *PITX3* und *PD-L1* eine Hypermethylierung im Tumorgewebe und einen prognostischen Wert bezüglich des BCR-freien Überlebens der Patienten. Der Zusammenhang der Methylierung und der Expression zeigte zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Diese Ergebnisse müssten daher validiert werden.

Diese identifizierten Biomarker könnten für die Stratifizierung der Patienten nach der Operation verwendet werden, um zu entscheiden wie engmaschig die Verlaufskontrolle sein sollte, oder ob bzw. wie aggressiv eine adjuvante Therapie gewählt werden soll. Für die *CXCL12* DNA-Methylierung konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung auf Stanzbiopsien beim Prostatakarzinom möglich ist. Um die Biomarker weiter zu validieren wäre eine prospektive Studie interessant, um zu klären ob diese Biomarker auch für eine Stratifizierung in unterschiedliche Therapiegruppen geeignet sind. Dazu wäre es nötig die Marker auf einer prospektiven Studie mit unterschiedlichen Therapieformen zu untersuchen. Vor allem für *PD-L1* und *CXCL12* wäre dies in Hinblick auf einen Einsatz für die Immuntherapie sinnvoll.

7. Literaturverzeichnis

1. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer Statistics , 2012. **0**, 1–20 (2012).
2. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland. at <<http://www.krebsdaten.de/Krebs>>
3. Robbins, S. L. *Basic Pathology*. (Saunders, Elsevier Inc., 2013).
4. Huland, R. H. und H. *Urologie*. (Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006).
5. Deutsches Krebsforschungszentrum (dkfz). Prostatakrebs - eine Einführung. at <<https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/einfuehrung.php>>
6. McNeal, J. E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **12**, 619–33 (1988).
7. McNeal, J. E. Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. *Semin. Ultrasound. CT. MR* **9**, 329–34 (1988).
8. Parimi, V., Goyal, R., Poropatich, K. & Yang, X. J. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* **2**, 273–85 (2014).
9. Epstein, J. I. und G. J. N. *Biopsy interpretation of the prostate*. (Lippincott Williams & Wilkinsle, 2008).
10. Bostwick, D. G. & Qian, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod. Pathol.* **17**, 360–79 (2004).
11. Lucas, J. N. *Prostate Cancer*. (Nova Biomedical Books, 2004).
12. Créhange, G. *et al.* Management of prostate cancer patients with lymph node involvement: a rapidly evolving paradigm. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 956–67 (2012).
13. Bubendorf, L. *et al.* Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum. Pathol.* **31**, 578–83 (2000).
14. Shtivelman, E., Beer, T. M. & Evans, C. P. Molecular pathways and targets in prostate cancer. *Oncotarget* **5**, 7217–59 (2014).
15. Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–28 (2015).
16. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–43 (2012).
17. Chen, M. *et al.* Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. *Cancer Cell* **20**, 173–86 (2011).
18. Tomlins, S. A. *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**, 644–8 (2005).
19. Klezovitch, O. *et al.* A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2105–10 (2008).
20. Bowen, C., Zheng, T. & Gelmann, E. P. NKX3.1 Suppresses TMPRSS2-ERG Gene Rearrangement and Mediates Repair of Androgen Receptor-Induced DNA Damage. *Cancer Res.* **75**, 2686–98 (2015).
21. Abate-Shen, C., Shen, M. M. & Gelmann, E. Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation.* **76**, 717–27 (2008).
22. Geng, C. *et al.* Prostate cancer-associated mutations in speckle-type POZ protein (SPOP) regulate steroid receptor coactivator 3 protein turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6997–7002 (2013).
23. Barbieri, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12

- mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* **44**, 685–9 (2012).
24. Schröder, F. H. PSA screening - a review of recent studies. *Eur. J. Cancer* **45**, 402–404 (2009).
 25. Schröder, F. H. *et al.* Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study — NEJM. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1320–1328 (2009).
 26. Smith, J. A. Commentary on ‘prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: Mortality results after 13 years of follow-up’. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL III, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Isaacs. *Urol. Oncol.* **30**, 960–1
 27. Shoag, J. E., Mittal, S. & Hu, J. C. Reevaluating PSA Testing Rates in the PLCO Trial. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1795–6 (2016).
 28. Tyson, M., SS, A., Scarpato, K. & Barocas, D. Magnetic resonance-ultrasound fusion prostate biopsy in the diagnosis of prostate cancer. *Urol. Oncol.* (2016). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27083114>>
 29. Delongchamps, N. B. *et al.* Are MRI-TRUS-guided targeted biopsies non-inferior to TRUS-guided systematic biopsies for the detection of prostate cancer in patients with a single suspicious focus on multiparametric prostate MRI? Results of a multicentric controlled trial. *J. Urol.* (2016). doi:10.1016/j.juro.2016.04.003
 30. Kristiansen, A. H. R. K.-C. & G. in (Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2016).
 31. Helpap, B., Bubendorf, L. & Kristiansen, G. [Prostate cancer. Part 2: Review of the various tumor grading systems over the years 1966-2015 and future perspectives of the new grading of the International Society of Urological Pathology (ISUP)]. *Pathologe* **37**, 11–6 (2016).
 32. Epstein, Jonathan I. MD; Egevad, Lars MD, PhD; Amin, Mahul B. MD; Delahunt, Brett MD; Srigley, John R. MD; Humphrey, Peter A. MD, P. and the G. C. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 244–252 (2016).
 33. Mikeska, T. & Craig, J. M. DNA methylation biomarkers: Cancer and beyond. *Genes (Basel)*. **5**, 821–864 (2014).
 34. Brachlow, J. & John, H. Prostatakarzinom: Therapiestandard 2015. **22**, (2015).
 35. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 9–22 (2011).
 36. Belcher, R., Hayes, K., Fedewa, S. & Chen, A. Y. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J. Surg. Oncol.* **110**, 551–74 (2014).
 37. Price, K. A. R. & Cohen, E. E. Current treatment options for metastatic head and neck cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **13**, 35–46 (2012).
 38. Pulte, D. & Brenner, H. Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *Oncologist* **15**, 994–1001 (2010).
 39. National Cancer Institute. Head and Neck Cancer. at <<http://www.cancer.gov/types/head-and-neck>>
 40. Chai, R. C., Lambie, D., Verma, M. & Punyadeera, C. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Med.* **4**, 596–607 (2015).
 41. Marur, S., D’Souza, G., Westra, W. H. & Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* **11**, 781–789 (2010).
 42. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
 43. Mountzios, G., Rampias, T. & Psyrri, A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Ann.*

- Oncol.* **25**, 1889–900 (2014).
44. Bartram, W. H. und C. *Die Onkologie*. (Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2010).
 45. Califano, J. *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* **56**, 2488–92 (1996).
 46. Rothenberg, S. M. & Ellisen, L. W. Science in medicine The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Invest.* **122**, 1951–1957 (2012).
 47. Agrawal, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154–7 (2011).
 48. Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157–60 (2011).
 49. Pickering, C. R. *et al.* Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov.* **3**, 770–81 (2013).
 50. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–9 (2013).
 51. Gillison, M. L. *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 709–20 (2000).
 52. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342–50 (2002).
 53. Rusan, M., Li, Y. Y. & Hammerman, P. S. Genomic landscape of human papillomavirus-associated cancers. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2009–19 (2015).
 54. Onkologie 2016. Kopf- und Halstumore. at <<http://www.onkologie2016.de>>
 55. H.-J. Wittekind und C. Meyer. *TNM: Klassifikation Maligner Tumoren*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
 56. Vermorken, J. B. & Specenier, P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann. Oncol.* **21 Suppl 7**, vii252-61 (2010).
 57. Denaro, N., Russi, E. G., Adamo, V. & Merlano, M. C. State-of-the-art and emerging treatment options in the management of head and neck cancer: news from 2013. *Oncology* **86**, 212–29 (2014).
 58. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
 59. Dietrich, D. *et al.* Nucleic acid-based tissue biomarkers of urologic malignancies. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **51**, 173–99 (2014).
 60. Henry, N. L. & Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **6**, 140–146 (2012).
 61. Taylor, C. R. Predictive biomarkers and companion diagnostics. The future of immunohistochemistry: ‘in situ proteomics,’ or just a ‘stain’? *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **22**, 555–61 (2014).
 62. Dunstan, R. W., Wharton, K. a., Quigley, C. & Lowe, a. The Use of Immunohistochemistry for Biomarker Assessment--Can It Compete with Other Technologies? *Toxicol. Pathol.* **39**, 988–1002 (2011).
 63. Holliday, R. & Pugh, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226–32 (1975).
 64. Riggs, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**, 9–25 (1975).
 65. Ehrlich, M. DNA methylation and cancer-associated genetic instability. *Adv. Exp. Med. Biol.* **570**, 363–92 (2005).
 66. Ludyga, N. *et al.* Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* **460**, 131–40 (2012).
 67. Baylin, S. B. & Jones, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and

- translational implications. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 726–34 (2011).
68. Stewart, G. D. *et al.* Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: Results of the MATLOC study. *J. Urol.* **189**, 1110–1116 (2013).
 69. Haluskova, J., Lachvac, L. & Nagy, V. The investigation of GSTP1, APC and RASSF1 gene promoter hypermethylation in urine DNA of prostate-diseased patients. *Bratisl. lekárske List.* **116**, 79–82 (2015).
 70. Frommer, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1827–31 (1992).
 71. Epigenetik. at <http://www.neb-online.de/wp-content/uploads/2015/04/NEB_epigenetik_bisulfit3.jpg>
 72. Cottrell, S. E. *et al.* A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.* **32**, e10 (2004).
 73. Zhou, F. *et al.* Oncogenicity of LHX2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 8163–7 (2014).
 74. LHX3. at <<http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=515&tab=structure>>
 75. Mullen, R. D. *et al.* Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **265–266**, 190–195 (2007).
 76. Thaler, J. P., Lee, S.-K., Jurata, L. W., Gill, G. N. & Pfaff, S. L. LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* **110**, 237–49 (2002).
 77. Haim-Pinhas, H., Kauli, R., Lilos, P. & Laron, Z. Growth, development, puberty and adult height of patients with congenital multiple pituitary hormone deficiencies. *Growth Horm. IGF Res.* **27**, 46–52 (2016).
 78. Liu, H. *et al.* Lhx3 is required to maintain cancer cell development of high-grade oligodendroglioma. *Mol. Cell. Biochem.* **399**, 1–5 (2015).
 79. Dietrich, D. *et al.* Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **57**, 477–489 (2009).
 80. Scala, S. Molecular pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis-Untapped potential in the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4278–4285 (2015).
 81. Bilgin, Y. M. & de Greef, G. E. Plerixafor for stem cell mobilization: the current status. *Curr. Opin. Hematol.* **23**, 67–71 (2016).
 82. Ma, Q. *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9448–53 (1998).
 83. Raman, D., Sobolik-Delmaire, T. & Richmond, A. Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.* **317**, 575–589 (2011).
 84. Furusato, B., Mohamed, A., Uhlén, M. & Rhim, J. S. CXCR4 and cancer. *Pathol. Int.* **60**, 497–505 (2010).
 85. Müller, a *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
 86. Vandercappellen, J., Van Damme, J. & Struyf, S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 1–18 (2011).
 87. Balkwill, F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 171–9 (2004).

88. Darash-Yahana, M. *et al.* Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J.* **18**, 1240–1242 (2004).
89. Teicher, B. A. & Fricker, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2927–2931 (2010).
90. Zlotnik, A. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J. Pathol.* **215**, 211–3 (2008).
91. Domanska, U. M. *et al.* A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur. J. Cancer* **49**, 219–30 (2013).
92. O’Hayre, M., Salanga, C. L., Handel, T. M. & Allen, S. J. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem. J.* **409**, 635–649 (2008).
93. Hsiao, J. J. *et al.* Androgen receptor and chemokine receptors 4 and 7 form a signaling axis to regulate CXCL12-dependent cellular motility. *BMC Cancer* **15**, 204 (2015).
94. Rave-Fränk, M. *et al.* Prognostic value of CXCL12 and CXCR4 in inoperable head and neck squamous cell carcinoma. *Strahlentherapie und Onkol. Organ der Dtsch. Röntgengesellschaft ... [et al]* **192**, 47–54 (2016).
95. Lin, C. R. *et al.* Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401**, 279–282 (1999).
96. Kato, Y. The multiple roles of Notch signaling during left-right patterning. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2555–67 (2011).
97. Cox, C. J. *et al.* Differential Regulation of Gene Expression by PITX2 Isoforms *. **277**, 25001–25010 (2002).
98. Shiratori, H. *et al.* Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: Initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol. Cell* **7**, 137–149 (2001).
99. Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H. & Blum, M. Pitx2 isoforms: Involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech. Dev.* **90**, 41–51 (2000).
100. Kioussi, C. *et al.* Identification of a Wnt/Dvl/ β -catenin - Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* **111**, 673–685 (2002).
101. Huang, Y., Guigon, C. J., Fan, J., Cheng, S. Y. & Zhu, G. Z. Pituitary homeobox 2 (PITX2) promotes thyroid carcinogenesis by activation of cyclin D2. *Cell Cycle* **9**, 1333–1341 (2010).
102. Baek, S. H. *et al.* Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3245–50 (2003).
103. L’honoré, A., Ouimette, J.-F., Lavertu-Jolin, M. & Drouin, J. Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis. *Development* **137**, 3847–56 (2010).
104. Dietrich, D. *et al.* Methylation of the Homeobox Genes PITX2 and SHOX2 Predicts Outcome in Non-small-cell Lung Cancer Patients. *Diagn Mol Pathol* **21**, 93–104 (2012).
105. Maier, S. *et al.* DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients - Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration wi. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679–1686 (2007).
106. Nimmrich, I. *et al.* DNA hypermethylation of PITX2 is a marker of poor prognosis in untreated lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **111**, 429–437 (2008).
107. Harbeck, N. *et al.* Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated,

- node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036–5042 (2008).
108. Hartmann, O. *et al.* DNA methylation markers predict outcome in node-positive, Estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315–323 (2009).
 109. Weiss, G. *et al.* DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J. Urol.* **181**, 1678–1685 (2009).
 110. Schatz, P. *et al.* Development of a diagnostic microarray assay to assess the risk of recurrence of prostate cancer based on PITX2 DNA methylation. *J. Mol. Diagn.* **12**, 345–53 (2010).
 111. Banez, L. L. *et al.* Multicenter Clinical Validation of PITX2 Methylation as a Prostate Specific Antigen Recurrence Predictor in Patients With Post-Radical Prostatectomy Prostate Cancer. *J. Urol.* **184**, 149–156 (2010).
 112. Dietrich, D. *et al.* Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *J. Mol. Diagn.* **15**, 270–9 (2013).
 113. Litovkin, K. *et al.* Methylation of PITX2, HOXD3, RASSF1 and TDRD1 predicts biochemical recurrence in high-risk prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **140**, 1849–61 (2014).
 114. Vinarskaja, A., Schulz, W. A., Ingenwerth, M., Hader, C. & Arsov, C. Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis. *Urol. Oncol.* **31**, 622–7 (2013).
 115. Pillai, S. G. *et al.* Paired-like Homeodomain Transcription factor 2 expression by breast cancer bone marrow disseminated tumor cells is associated with early recurrent disease development. *Breast Cancer Res. Treat.* **153**, 507–17 (2015).
 116. Wang, Q. *et al.* Smad4-dependent suppressor pituitary homeobox 2 promotes PPP2R2A-mediated inhibition of Akt pathway in pancreatic cancer. *Oncotarget* **7**, 11208–22 (2016).
 117. Fung, F. K. C. *et al.* Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076 (2012).
 118. Gore-Panter, S. R. *et al.* PANCR, the PITX2 Adjacent Noncoding RNA, Is Expressed in Human Left Atria and Regulates PITX2c Expression. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **9**, (2016).
 119. Lamonerie, T. *et al.* Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev.* **10**, 1284–95 (1996).
 120. Smidt, M. P. *et al.* A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13305–10 (1997).
 121. Li, J., Dani, J. A. & Le, W. The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 855–9 (2009).
 122. Zhao, S. *et al.* Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1133–40 (2004).
 123. Maxwell, S. L., Ho, H.-Y., Kuehner, E., Zhao, S. & Li, M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev. Biol.* **282**, 467–79 (2005).
 124. Jiménez-Jiménez, F. J., García-Martín, E., Alonso-Navarro, H. & Agúndez, J. A. G. PITX3

- and risk for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Neurol.* **71**, 49–56 (2014).
125. Semina, E. V *et al.* A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat. Genet.* **19**, 167–70 (1998).
126. Haubenberger, D. *et al.* Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 302–7 (2011).
127. Guo, Y. *et al.* Systematic genetic analysis of the PITX3 gene in patients with Parkinson disease. *Mov. Disord.* **26**, 1729–32 (2011).
128. de Mena, L. *et al.* Analysis of the Micro-RNA-133 and PITX3 genes in Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **153B**, 1234–9 (2010).
129. Carreno, B. M. & Collins, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 29–53 (2002).
130. Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 445–80 (1989).
131. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **236**, 219–42 (2010).
132. Guleria, I. & Tripathi, S. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomed. J.* **38**, 25 (2015).
133. Nguyen, L. T. & Ohashi, P. S. Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 45–56 (2014).
134. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–65 (2012).
135. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–54 (2012).
136. US National Institutes of Health. Clinical Trials. at <<https://clinicaltrials.gov/>>
137. The Cancer Genome Atlas Network. The Cancer Genome Atlas. at <<http://cancergenome.nih.gov/>>
138. Abeshouse, A. *et al.* The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **163**, 1011–1025 (2015).
139. Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. & Wittwer, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **245**, 154–60 (1997).
140. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
141. Meier, E. L. K. und P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations on JSTOR. at <https://www.jstor.org/stable/2281868?seq=1#page_scan_tab_contents>
142. D. R. Cox. Regression Models and Life-Tables. *J. R. Stat. Soc.* **34**, (1972).
143. Jung, M. *et al.* Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant, and malignant ascites. *Clin. Epigenetics* **8**, 24 (2016).
144. Dietrich, D. *et al.* Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS One* **8**, e84225 (2013).
145. Holmes, E. E. *et al.* Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and

- urine. *PLoS One* **9**, e93933 (2014).
146. Gevensleben, H. *et al.* PD-L1 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.13161
 147. Dietrich, D. *et al.* CDO1 promoter methylation is a biomarker for outcome prediction of anthracycline treated, estrogen receptor-positive, lymph node-positive breast cancer patients. *BMC Cancer* **10**, 247 (2010).
 148. Holmes, E. E. *et al.* PITX3 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients after radical prostatectomy. *Clin. Epigenetics* **8**, 104 (2016).
 149. Goltz, D. *et al.* CXCL12 promoter methylation and PD-L1 expression as prognostic biomarkers in prostate cancer patients. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10786
 150. Sailer, V. *et al.* PITX2 and PANC1 DNA methylation predicts overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, (2016).
 151. Budczies, J. *et al.* Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* **7**, e51862 (2012).
 152. Gevensleben, H. *et al.* The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1–10 (2015).
 153. Sailer, V. *et al.* PITX3 DNA methylation is an independent predictor of overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Epigenetics* **9**, 12 (2017).
 154. Genreux, D. P., Johnson, W. C., Burden, A. F., Stöger, R. & Laird, C. D. Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Res.* **36**, e150 (2008).
 155. Warnecke, P. M. *et al.* Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* **27**, 101–7 (2002).
 156. Raizis, A. M., Schmitt, F. & Jost, J. P. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal. Biochem.* **226**, 161–6 (1995).
 157. Grunau, C., Clark, S. J. & Rosenthal, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* **29**, E65–5 (2001).
 158. Tanaka, K. & Okamoto, A. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 1912–5 (2007).
 159. Hayatsu, H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. *Mutat. Res.* **659**, 77–82
 160. Hayatsu, H., Negishi, K. & Shiraishi, M. DNA methylation analysis: speedup of bisulfite-mediated deamination of cytosine in the genomic sequencing procedure. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **80**, 189–194 (2004).
 161. Hayatsu, H., Shiraishi, M. & Negishi, K. Bisulfite modification for analysis of DNA methylation. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **Chapter 6**, Unit 6.10 (2008).
 162. Shiraishi, M. & Hayatsu, H. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation. *DNA Res.* **11**, 409–15 (2004).
 163. Jin, L., Wang, W., Hu, D. & Lü, J. The conversion of protonated cytosine-SO₃(-) to uracil-SO₃(-): insights into the novel induced hydrolytic deamination through bisulfite catalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 9034–42 (2013).
 164. Millar, D. S., Warnecke, P. M., Melki, J. R. & Clark, S. J. Methylation sequencing from limiting DNA: embryonic, fixed, and microdissected cells. *Methods* **27**, 108–13 (2002).

165. Niland, E. E., McGuire, A., Cox, M. H. & Sandusky, G. E. High quality DNA obtained with an automated DNA extraction method with 70+ year old formalin-fixed celloidin-embedded (FFCE) blocks from the indiana medical history museum. *Am. J. Transl. Res.* **4**, 198–205 (2012).
166. Mostegl, M. M., Richter, B., Dinhopf, N. & Weissenböck, H. Influence of prolonged formalin fixation of tissue samples on the sensitivity of chromogenic in situ hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**, 1212–6 (2011).
167. Bonin, S. *et al.* Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* **457**, 309–17 (2010).
168. William, N., Marzo, A. M. De & Isaacs, W. B. Prostate Cancer. 366–381 (2014). doi:10.1016/j.juro.2007.01.121
169. Cooperberg, M. R., Broering, J. M. & Carroll, P. R. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1117–23 (2010).
170. Hoffman, K. E. *et al.* Physician variation in management of low-risk prostate cancer: a population-based cohort study. *JAMA Intern. Med.* **174**, 1450–9 (2014).
171. Boniol, M., Boyle, P., Autier, P., Ruffion, A. & Perrin, P. Critical role of prostate biopsy mortality in the number of years of life gained and lost within a prostate cancer screening programme. *BJU Int.* **110**, 1648–52 (2012).
172. Loeb, S. *et al.* Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur. Urol.* **65**, 1046–55 (2014).
173. Roland, J. *et al.* Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1 – mediated signaling. *Blood* **101**, 399–406 (2003).
174. Marchese, A. Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **27**, 72–7 (2014).
175. Liekens, S., Schols, D. & Hatse, S. CXCL12-CXCR4 axis in Angiogenesis, Metastasis and Stem Cell Mobilization. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3903–3920 (2010).
176. Mirisola, V. *et al.* CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *Eur. J. Cancer* **45**, 2579–2587 (2009).
177. León, X. *et al.* Expression of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis predicts regional control in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* (2016). doi:10.1007/s00405-016-4144-9
178. Popple, a *et al.* The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **106**, 1306–1313 (2012).
179. Chen, Q. & Zhong, T. The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des Devel Ther* **9**, 5115–5122 (2015).
180. Delongchamps, N. B. *et al.* CXCR4 is highly expressed at the tumor front but not in the center of prostate cancers. *World J. Urol.* **33**, 281–287 (2014).
181. Suzuki, M. *et al.* Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. *Int J Oncol* **33**, 113–119 (2008).
182. Zhou, W. *et al.* Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of CXCL12 in human astrocytoma. *J. Neurosci. Res.* **86**, 3002–3010 (2008).
183. Zhi, Y. *et al.* Down-regulation of CXCL12 by DNA hypermethylation and its involvement in gastric cancer metastatic progression. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 650–9 (2012).
184. Clatot, F. *et al.* CXCL12 and CXCR4, but not CXCR7, are primarily expressed by the stroma in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology* **47**, 45–50 (2015).
185. Hamid, O. *et al.* Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in

- melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 134–44 (2013).
186. Sznol, M. & Chen, L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1021–34 (2013).
187. Jones, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–92 (2012).
188. Eckhardt, F. *et al.* DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **38**, 1378–1385 (2011).
189. Lee, S.-T. & Wiemels, J. L. Genome-wide CpG island methylation and intergenic demethylation propensities vary among different tumor sites. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1105–17 (2016).
190. Edgar, R., Tan, P. P. C., Portales-Casamar, E. & Pavlidis, P. Meta-analysis of human methylomes reveals stably methylated sequences surrounding CpG islands associated with high gene expression. *Epigenetics Chromatin* **7**, 28 (2014).
191. Pollard, S. M., Stricker, S. H. & Beck, S. A Shore Sign of Reprogramming. *Cell Stem Cell* **5**, 571–572 (2009).
192. Irizarry, R. A. *et al.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* **41**, 178–86 (2009).
193. Wick, W. *et al.* MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 372–85 (2014).
194. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
195. Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56–61 (2015).
196. Postow, M. A., Callahan, M. K. & Wolchok, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **33**, JCO.2014.59.4358- (2015).
197. Joyce, J. A. & Fearon, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **348**, 74–80 (2015).
198. Feig, C. *et al.* Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20212–7 (2013).
199. Fearon, D. T. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 187–93 (2014).
200. U.S. National Institutes of Health. Clinical Trials. at <<https://clinicaltrials.gov>>
201. Sun, W. & Califano, J. A. Sequencing the head and neck cancer genome: implications for therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1333**, 33–42 (2014).
202. Curado, M. P. & Hashibe, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **21**, 194–200 (2009).
203. Heldring, N., Joseph, B., Hermanson, O. & Kioussi, C. Pitx2 expression promotes p21 expression and cell cycle exit in neural stem cells. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **11**, 884–92 (2012).
204. Gallastegui, E. *et al.* p27(Kip1) represses the Pitx2-mediated expression of p21(Cip1) and regulates DNA replication during cell cycle progression. *Oncogene* 1–12 (2016). doi:10.1038/onc.2016.200
205. Wei, Q. & Adelstein, R. S. Pitx2a expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling. *Mol. Biol. Cell* **13**, 683–97 (2002).

206. Hirose, H. *et al.* The Significance of PITX2 Overexpression in Human Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 3005–3012 (2011).
207. Yan, K. *et al.* Structure prediction: New insights into decrypting long noncoding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
208. Kulis, M., Queirós, A. C., Beekman, R. & Martín-Subero, J. I. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1829**, 1161–1174 (2013).

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5' UTR	5' untranslatierte Region
5-meC	5-Methylcytosin
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
ACTB	<i>Actin beta</i>
APC	<i>Adenomatosis Polyposis Coli</i>
AR	Androgen Rezeptor
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>Area Under the Curve</i>)
B7-H1	B7 Homolog 1
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCR	Biochemischer Rückfall (<i>Biochemical Recurrence</i>)
BHQ-1	<i>Black Hole Quencher 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCND1	Cyclin D1
CCND2	Cyclin D2
CD274	<i>cluster of differentiation 274</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CFF	Cytosin freies Fragment
CFF	Cytosin-freien Region binden
CFP	Cytosin-freie Primer
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
cm	Zentimeter
CRPC	kastrationsresistenten Prostatakarzinomen
CT	Durchbruchzyklus (<i>Cycle Treshold</i>)
CXCR4	Chemokin C-X-C Rezeptor 4
CXCR7	Chemokin C-X-C Rezeptor 7
DC	dentritische Zellen
DC	dentritische Zellen
DCIS	Duktales Karzinom <i>in situ</i>
DHT	Dihydrotestosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferasen

DNMTs	DNA Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DRU	Digitale Rektale Untersuchung
dsDNA	doppelstrangige DNA (<i>Double Stranded DNA</i>)
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Östrogenrezeptor (<i>Estrogen Receptor</i>)
ERG	<i>ETS-related genes</i>
ERSPC	<i>European Randomized study of Screening for Prostate Cancer</i>
ERSPC	<i>European Randomized study of Screening for Prostate Cancer</i>
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FFPET	Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe (<i>Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissues</i>)
FGF4	<i>Fibroblast Growth Factor 4</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
G	Differenzierungsgrad der Tumors
g	Erdbeschleunigung
GM	geometrischen Mittelwert
GSTP1	Glutathione S-Transferase Pi 1
HADAC	Histon-Deacetylasen
HE	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, ERBB2
HIFU	<i>High-intensity focused ultrasound</i>
HMW DNA	hochmolekulare DNA (<i>high molecular weight DNA</i>)
HPV	Humanen Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
ICH	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
IRB	Institutionellen Review Board
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
kb	Kilobase
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LHX1	<i>LIM homeobox 1</i>
LHX2	<i>LIM homeobox 2</i>
LHX3	<i>LIM homeobox 3</i>
LHX4	<i>LIM homeobox 4</i>
LOH	Verlust der Heterozygotie
M	Molar

mg	Milligramm
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MSP	methylierungsspezifische PCR
MSP	methylierungsspezifische
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
NAT	tumornahem Normalgewebe
ng	Nanogramm
nm	Nanomol
nM	Nanomolar
NTC	<i>no template control</i>
PANCR	lange nicht-codierende RNA
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD1	<i>Programmed Death Receptor 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PITX1	<i>Paired-Like Homeodomain 1</i>
PITX2	<i>Paired-Like Homeodomain 2</i>
PITX3	<i>Paired-Like Homeodomain 3</i>
PLCO	<i>Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Studie</i>
PSA	prostata-spezifische Antigen
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
QM	quantitative Methylierung
QM	quantitative Methylierungsmessungen
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
R	Residualtumor
RASSF1	<i>Ras association domain-containing protein 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROX	5-Carboxy-X-rhodamine
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT PCR	Reverse Transkriptase PCR
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sPCR	Singleplex-PCR
SPOP	Speckle-Type POZ Protein
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>Single Stranded DNA</i>)
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TCGA	The Cancer Genome Atlas

TE	Tris-EDTA
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMA	Tissumicroarray
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Ausdehnung des Tumors (T), Lymphknotenbefall (N), Metastasierung (M)
UKB	Universitätsklinikum Bonn
VIM	Vimentin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site family member</i>
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

8.2. Zusätzliche Daten

8.2.1 *LHX3*, *CXCL12* und *PITX3* in Brusttumoren

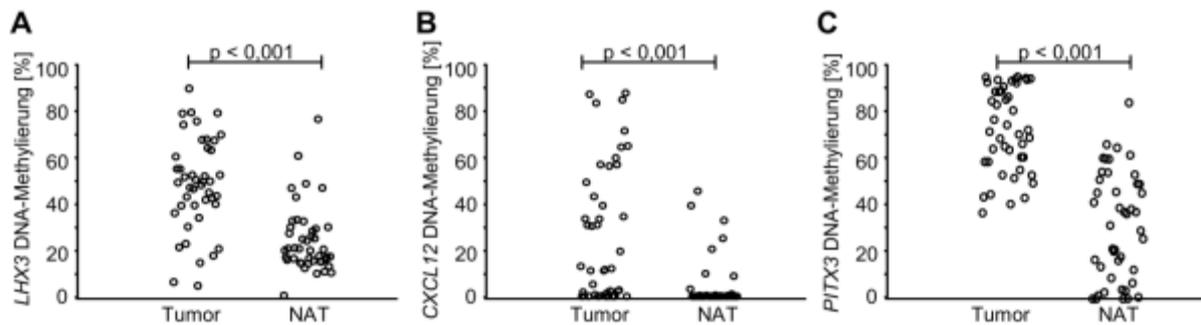


Abbildung 8-1: DNA-Methylierung von *LHX3*, *CXCL12* und *PITX3* in normalem und Karzinomgewebe von Brustkrebspatienten. A: *LHX3* B: *CXCL12* und C: *PITX3*.

8.2.2 *LHX3* im Prostatakarzinom

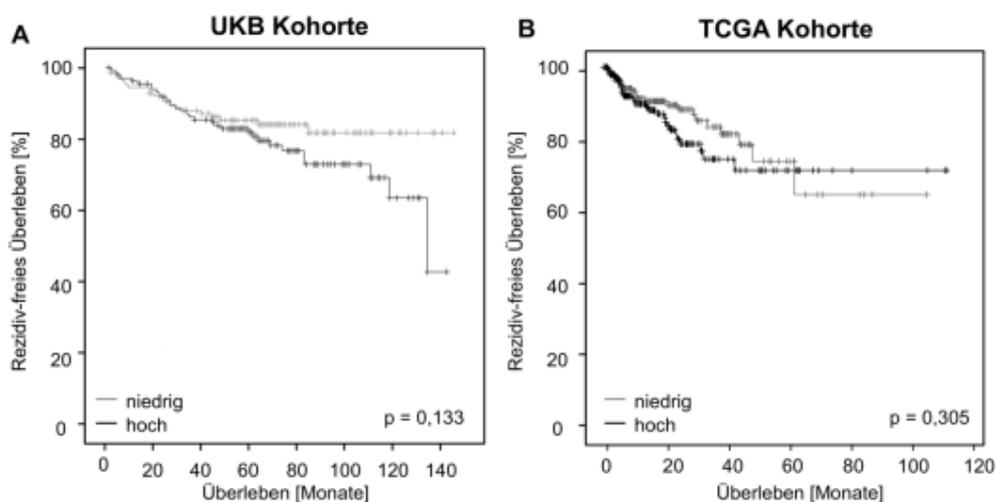


Abbildung 8-2: Kaplan-Meier Analyse des BCR-freien Überlebens von Prostatakrebspatienten stratifiziert mittels der DNA-Methylierung von *LHX3*. Die DNA-Methylierung wurde in *LHX3*_{hoch} und *LHX3*_{niedrig} unterteilt, nach einem optimierten Cutoff in der A: UKB Kohorte und B: TCGA Kohorte.

8.2.3 *PITX3* im Prostatakarzinom

Tabelle 8-1: Charakteristika und Korrelationen der *PITX3* DNA-Methylierung und klinopathologischen Daten in den beiden Prostatakohorten von UKB (n = 300) und TCGA (n = 498). *PITX3* DNA-Methylierung wurde anhand eines optimierten Cutoff in *PITX3*_{niedrig} und *PITX3*_{hoch} unterteilt. Daten wurden bereits publiziert in Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁸

	TCGA Kohorte				UKB Kohorte					
	Patienten [n]	Median <i>PITX3</i> [%]	<i>PITX3</i> _{niedrig}	<i>PITX3</i> _{hoch}	p-Wert	Patienten [n]	Median <i>PITX3</i> [%]	<i>PITX3</i> _{niedrig}	<i>PITX3</i> _{hoch}	p-Wert
Patienten [n]	498	62,0				300	57,9			
Mittelwert / Median Follow-up [Monate]	22/16					66/63				
Alter					0,021*					0,011*
≤60 [Jahre]	224 (45,0%)	60,2	166 (73,8%)	58 (25,8%)		71 (23,7%)	50,0	48 (64,0%)	23 (30,7%)	
>60 [Jahre]	274 (55,0%)	62,9	184 (66,9%)	90 (32,7%)		219 (73,0%)	61,0	115 (51,3%)	104 (46,4%)	

Anhang

	TCGA Kohorte					UKB Kohorte				
	Patienten [n]	Median PITX3 [%]	PITX3 _{niedrig}	PITX3 _{hoch}	p-Wert	Patienten [n]	Median PITX3 [%]	PITX3 _{niedrig}	PITX3 _{hoch}	p-Wert
fehlt	0 (0,0%)					10 (3,3%)				
Tumor- größe (pT)					0,017*					<0,001*
pT2	188 (37,8%)	59,6	147 (78,2%)	41 (21,8%)		198 (66,0%)	53,4	128 (62,4%)	70 (34,1%)	
pT3	293 (58,8%)	63,3	189 (64,1%)	104 (35,3%)		88 (29,3%)	69,0	32 (35,6%)	56 (62,2%)	
fehlt	17 (3,4%)					14 (4,7%)				
ISUP Gleason Grading					0,035[†]					0,029[†]
1 (<7)	45 (9,0%)	61,6	33 (73,3%)	12 (26,7%)		155 (51,7%)	53,1	99 (60,7%)	56 (34,4%)	
2 (3+4)	147 (29,5%)	59,5	118 (79,2%)	29 (19,5%)		53 (17,7%)	58,5	29 (54,7%)	24 (45,2%)	
3 (4+3)	101 (20,3%)	62,1	67 (66,3%)	34 (33,7%)		23 (7,7%)	69,0	10 (43,5%)	13 (56,5%)	
4 (=8)	64 (12,9%)	61,0	34 (67,2%)	21 (32,8%)		34 (11,3%)	61,1	17 (48,6%)	17 (48,6%)	
5 (>8)	141 (28,3%)	64,1	89 (63,1%)	52 (36,9%)		15 (5,0%)	66,4	3 (18,8%)	12 (75,0%)	
fehlt	0 (0,0%)					20 (6,7%)				
Resektions- -rand					0,187*					0,616*
R0	318 (63,9%)	60,2	227 (71,4%)	89 (28,0%)		198 (66,0%)	55,3	117 (49,1%)	74 (37,4%)	
R1	152 (30,5%)	63,5	103 (67,8%)	49 (32,2%)		96 (32,0%)	62,7	44 (45,8%)	50 (52,1%)	
fehlt	28 (5,6%)					6 (2,0%)				
Lymph- knoten- status (N)					0,751*					0,658*
pN0	349 (70,1%)	61,7	243 (69,8%)	103 (29,6%)		279 (93,0%)	57,5	152 (54,5%)	117 (41,9%)	

Anhang

	TCGA Kohorte					UKB Kohorte				
	Patienten [n]	Median PITX3 [%]	PITX3 _{niedrig}	PITX3 _{hoch}	p-Wert	Patienten [n]	Median PITX3 [%]	PITX3 _{niedrig}	PITX3 _{hoch}	p-Wert
pN1	79 (15,8%)	61,6	55 (69,6%)	24 (30,4%)		17 (5,7%)	61,7	9 (52,9%)	8 (47,1%)	
fehlt	70 (14,1%)					4 (1,3%)				
Prä- operativer PSA [ng/ml]					0,051[†]					0,089[†]
0-4	53 (10,6%)	60,0	39 (73,4%)	14 (26,4%)		24 (8,70%)	49,4	19 (70,4%)	5 (18,5%)	
4-10	286 (57,5%)	60,5	210 (73,4%)	76 (26,6%)		169 (56,3%)	58,3	95 (54,9%)	74 (42,8%)	
>10	156 (31,3%)	64,0	98 (62,0%)	58 (36,7%)		84 (28,0%)	61,0	43 (49,4%)	41 (47,1%)	
fehlt	3 (0,6%)					23 (7,7%)				
ERG- Expression					0,581*					0,147*
Negativ	178 (35,6%)	61,7	125 (70,2%)	53 (29,8%)		164 (54,7%)	68,9	65 (44,5%)	74 (50,7%)	
Positiv	152 (30,4%)	62,9	106 (69,7%)	46 (30,3%)		56 (18,7%)	65,7	27 (41,5%)	35 (53,8%)	
fehlt	170 (34,0%)					80 (26,7%)				
AR-Wert					0,351*					0,323*
Negativ	246 (49,2%)	61,4	124 (74,7%)	42 (25,3%)		83 (27,7%)	69,0	40 (48,2%)	40 (48,2%)	
Positiv	84 (16,8%)	64,5	109 (35,3%)	58 (34,7%)		81 (27,0%)	68,5	46 (56,8%)	34 (42,0%)	
fehlt	170 (34,0%)					136 (45,3%)				

* Mann-Whitney U Test (Wilcoxon Rank-sum Test); [†] Kruskal-Wallis-Test

8.2.4 CXCL12 im Prostatakarzinom

Tabelle 8-2: Charakteristika und Korrelationen der CXCL12 DNA-Methylierung und klinopathologischen Daten in den beiden Prostatakohorten von UKB (n = 300) und TCGA (n = 498). CXCL12 DNA-Methylierung wurde anhand eines optimierten Cutoff in CXCL12_{niedrig} und CXCL12_{hoch} unterteilt. Daten wurden bereits teilweise publiziert in Goltz & Holmes *et al.*¹⁴⁹

	UKB Kohorte					TCGA Kohorte						
	Alle Patienten	Median CXCL12 [%]	p-Wert	CXCL12 _{niedrig}	CXCL12 _{mittel}	CXCL12 _{hoch}	Alle Patienten	Median CXCL12 [%]	p-Wert	CXCL12 _{niedrig}	CXCL12 _{mittel}	CXCL12 _{hoch}
Patienten [n]	247 (100%)	55,8		45 (18,2%)	137 (55,5%)	65 (26,3%)	498 (100%)	7,8		156 (31,3%)	301 (60,4%)	41 (8,2%)
Patienten mit Follow-up	216 (87,4%)						430 (86,3%)					
Median follow-up [months]	62						16,2					
Alter												
Mittelwert [Jahre]	64,13						61					
Median [Jahre]	65						61					
≤ Median [n]	130 (52,6%)	56		26 (20%)	69 (53,1%)	35 (26,9%)	251 (50,4%)	6,7		91 (36,2%)	144 (57,4%)	16 (6,4%)
> Median [n]	117 (47,4%)	55,5	p = 0,223*	19 (16,2%)	68 (58,1%)	30 (25,6%)	247 (49,6%)	9	p = 0,004*	65 (26,3%)	157 (63,6%)	25 (10,1%)
pT-Status												
pT2	168 (68%)	54		29 (17,3%)	101 (60,1%)	38 (22,6%)	188 (37,8%)	8		61 (32,4%)	110 (58,5%)	17 (9%)
pT3 and pT4	79 (32%)	59,6	p = 0,041*	16 (20,3%)	36 (45,6%)	27 (34,2%)	303 (60,8%)	7,7	p = 0,64*	94 (31%)	186 (61,4%)	23 (7,6%)
Resektions-rand												
R1	86 (34,8)	56,9		12 (14%)	50 (58,1%)	24 (27,9%)	151 (30,3%)	6,4		36 (23,8%)	96 (63,6%)	19 (12,6%)
R0	156 (63,2%)	55,3	p = 0,40*	32 (20,5%)	84 (53,8%)	40 (25,6%)	316 (63,5%)	10,5	p < 0,001*	113 (35,8%)	185 (58,5%)	18 (5,7%)
fehlt	5 (2%)						30 (6%)					
Präoperativer PSA												
<4	23 (9,3%)	50,2		3 (13%)	16 (69,6%)	4 (17,4%)	53 (10,6%)	7,1		14 (23,4%)	37 (69,8%)	2 (3,8%)
4-10	150 (60,7%)	54,8		27 (18%)	88 (58,7%)	35 (23,3%)	288 (57,8%)	9,9		96 (33,3%)	164 (56,9%)	28 (9,7%)
>10	74 (30%)	59,6	p = 0,13 [†]	15 (20,3%)	33 (44,6%)	26 (35,1%)	154 (30,9%)	8,3	p = 0,84 [†]	154 (29,2%)	99 (64,3%)	10 (6,5%)
ISUP Gleason Grading Gruppe												
1 (<7)	133 (53,8%)	52		26 (19,5%)	79 (69,4%)	28 (21,1%)	45 (5,7%)	5,7		13 (28,6%)	29 (64,4%)	3 (6,7%)
2 (3+4)	46 (18,6%)	54,3		11 (23,9%)	23 (50%)	12 (26,1%)	147 (29,5%)	5,8		60 (40,8%)	79 (53,7%)	8 (5,4%)
3 (4+3)	18 (56,7%)	56,7		2 (11,1%)	12 (66,7%)	4 (22,2%)	101 (20,3%)	7		28 (27,7%)	69 (68,3%)	4 (4%)
4 (8)	30 (67,6%)	67,6		4 (13,3%)	12 (40%)	14 (46,7%)	64 (12,9%)	8,6		12 (18,8%)	46 (71,9%)	6 (9,4%)

Anhang

	UKB Kohorte						TCGA Kohorte					
	Alle Patienten	Median CXCL12 [%]	p-Wert	CXCL12 _{niedrig}	CXCL12 _{mittel}	CXCL12 _{hoch}	Alle Patienten	Median CXCL12 [%]	p-Wert	CXCL12 _{niedrig}	CXCL12 _{mittel}	CXCL12 _{hoch}
5 (>8)	14 (5,7%)	64	p < 0,001 [†]	2 (14,3%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)	141 (28,3%)	10,9	p = 0,034 [†]	43 (30,5%)	78 (55,3%)	20 (14,2%)
fehlt	6 (2,4%)											
Lymphknoten-Status												
pN0	230 (93,1%)	54,9		43 (18,7%)	130 (56,5%)	57 (24,8%)	346 (69,5%)	7,4		110 (31,8%)	211 (61%)	25 (7,2%)
pN1	14 (5,7%)	68,4	p = 0,038 [*]	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50%)	79 (15,9%)	8,6	p = 0,85 [*]	27 (24,2%)	44 (55,7%)	8 (10,1%)
fehlt	3 (1,2%)						73 (14,6%)					

* Wilcoxon-Mann-Whitney test, † Kruskal-Wallis test

8.2.5 PD-L1 im Prostatakarzinom

Tabelle 8-3: Charakteristika und Korrelationen der PD-L1 DNA-Methylierung und klinopathologischen Daten in den beiden Prostatakohorten von UKB (n = 300) und TCGA (n = 498). PD-L1 DNA-Methylierung wurde anhand eines optimierten Cutoff in PD-L1_{niedrig} und PD-L1_{hoch} unterteilt. Daten wurden bereits teilweise publiziert in Gevensleben, Holmes & Goltz *et al.*¹⁴⁶

	TCGA Kohorte				UKB Kohorte					
	Patienten	Median PD-L1 DNA-Methylierung [%]	PD-L1 _{niedrig}	PD-L1 _{hoch}	p-Wert	Patienten	Median PD-L1 DNA-Methylierung [%]	PD-L1 _{niedrig}	PD-L1 _{hoch}	p-Wert
Patienten [n]	498	62,0				300	57,9			
Mittelwert/Median	22/16					66/63				
Follow-up [Monate]										
Alter					0,028*					0,10*
≤60 [Jahre]	224 (45,0%)	33,4	184 (36,9%)	40 (8,0%)		75 (25,0%)	0,42	60 (20,1%)	15 (5,0%)	
>60 [Jahre]	274 (55,0%)	37,8	213 (42,8%)	61 (12,2%)		224 (74,7%)	0,54	136 (45,6%)	87 (29,2%)	
fehlt	0 (0,0%)					1 (0,3%)				
pT					<0,000*					0,010*

Anhang

	TCGA Kohorte					UKB Kohorte				
	Patienten	Median PD-L1 DNA-Methylierung [%]	PD-L1 _{iniedrig}	PD-L1 _{hoch}	p-Wert	Patienten	Median PD-L1 DNA-Methylierung [%]	PD-L1 _{iniedrig}	PD-L1 _{hoch}	p-Wert
pT1 & pT2	195 (39,2%)	32,0	169 (33,9%)	26 (5,2%)		205 (68,3%)	0,41	147 (49,0%)	85 (19,3%)	
pT3 & pT4	303 (60,8%)	40,5	228 (47,8%)	75 (15,1%)		94 (31,3%)	0,80	50 (16,7%)	44 (14,7%)	
fehlt	0 (0,0%)					1 (0,3%)				
ISUP Gleason Grading Gruppe					0,001[†]					0,001[†]
1 (<7)	45 (9%)	27,4	40 (8,0%)	5 (1,0%)		163 (54,3%)	0,34	121 (41,9%)	41 (14,2%)	
2 (3+4)	147 (29,5%)	33,4	127 (25,5%)	20 (4,0%)		53 (17,7%)	0,85	28 (9,7%)	25 (8,7%)	
3 (4+3)	101 (20,3%)	37,6	84 (16,9%)	17 (3,4%)		23 (7,7%)	0,35	17 (5,9%)	6 (2,1%)	
4 (=8)	64 (12,9%)	34,9	46 (9,2%)	18 (3,6%)		35 (11,7%)	0,71	20 (6,9%)	15 (5,2%)	
5 (>8)	141 (28,3%)	41,2	100 (20,1%)	41 (8,2%)		16 (5,3%)	1,51	5 (1,7%)	11 (3,8%)	
fehlt	0 (0,0%)					10 (3,3%)				
Resektionsrand					0,013*					0,32*
R0	318 (63,9%)	33,8	267 (53,6%)	49 (9,9%)		198 (66,0%)	0,47	132 (44,4%)	65 (21,9%)	
R1	152 (30,5%)	40,7	109 (21,9%)	43 (8,6%)		96 (32,0%)	0,62	59 (19,9%)	37 (12,5%)	
fehlt	30 (6,0%)					6 (2,0%)				
Lymphknotenstatus					0,23*					0,072
pN0	346 (69,5%)	36,5	274 (55,0%)	72 (14,5%)		279 (93,0%)	0,50	185 (62,1%)	93 (31,2%)	
pN1	79 (15,8%)	36,4	61 (12,2%)	18 (3,6%)		17 (5,7%)	1,00	8 (2,7%)	9 (3,0%)	
fehlt	73 (14,1%)					4 (1,3%)				
Präoperativer PSA [ng/ml]					0,12[†]					0,72[†]
0-4	53 (10,6%)	29,8	48 (9,7%)	5 (1,0%)		27 (9,0%)	0,77	16 (5,6%)	11 (3,8%)	
4-10	286 (57,5%)	35,2	229 (46,3%)	57 (11,5%)		173 (57,7%)	0,42	121 (42,3%)	52 (18,2%)	

Anhang

	TCGA Kohorte				UKB Kohorte					
	Patienten	Median PD-L1 DNA-Methylierung [%]	PD-L1 ^{iniedrig}	PD-L1 ^{hoch}	p-Wert	Patienten	Median PD-L1 DNA-Methylierung [%]	PD-L1 ^{iniedrig}	PD-L1 ^{hoch}	p-Wert
>10	156 (31,3%)	40,5	118 (23,8%)	38 (7,7%)		87 (29,0%)	0,61	52 (18,2%)	34 (11,9%)	
fehlt	3 (0,6%)					13 (4,3%)				
ERG-Expression					0,022*					0,19*
negative	178 (35,7%)	34,4	146 (29,3%)	32 (6,4%)		145 (48,3%)	0,57	94 (31,3%)	51 (17,0%)	
positive	152 (30,5%)	40,6	121 (24,3%)	31 (6,2%)		65 (21,7%)	0,88	35 (11,7%)	30 (10,0%)	
fehlt	168 (33,7%)					90 (30,0%)				
AR-Expression					0,79*					0,24*
negative	246 (49,4%)	36,6	202 (40,6%)	44 (8,8%)		83 (27,7%)	0,33	54 (32,9%)	29 (17,7%)	
positive	84 (16,9%)	37,7	65 (13,1%)	19 (3,8%)		81 (27,0%)	0,71	54 (32,9%)	27 (16,5%)	
fehlt	168 (33,7%)					136 (45,3%)				

* Mann-Whitney U Test (Wolcoxon Rank-sum Test) † Kruskal-Wallis-Test

8.2.6 CXCL12 in Kopf- und Halstumoren

Tabelle 8-4: Charakteristika und Korrelationen der CXCL12 DNA-Methylierung in der HNSCC Kohorte (n = 399).

Charakteristika	Nr. der Patienten [%]	Mittelwert CXCL12 Methylierung [%]	p-Wert
Alle Patienten	399 (100)	17,3 (±21,8)	
Geschlecht			0,24 *
Weiblich	93 (23,3)	13,7 (±21,4)	
Männlich	306 (76,7)	18,3 (±29,9)	
Alter [Jahre]			0,12 #
Mittelwert	62,4 (± 10,2)		
Median	62		
n ≤ Median	168 (42,0)	17,9 (±21,8)	
n > Median	155 (39,0)	15,3 (±19,6)	
unbekannt	76 (19,0)		
Raucher Status			0,87 *

Anhang

Charakteristika	Nr. der Patienten [%]	Mittelwert <i>CXCL12</i> Methylierung [%]	p-Wert
Nichtraucher	29 (7,0)		
Raucher	230 (58,0)		
unbekannt	140 (35,0)		
Packungsjahre			0,80 #
(≤ 40)	122 (30,6)	15,0 (±20,4)	
(> 40)	72 (18,0)	16,0 (±20,9)	
unbekannt	205 (51,4)		
Alkohol			0,25 ●
Nie	71 (17,8)	12,1 (±20,9)	
Selten	40 (10,0)	20,3 (±25,2)	
Alkoholiker	70 (20,0)	13,1 (±21,5)	
unbekannt	218 (54,6)		
Lokalisation			0,069 ●
Mundhöhle	68 (17,0)	15,6 (±20,3)	
Oropharynx	159 (39,8)	16,3 (±22,1)	
Hypopharynx	34 (8,5)	8,5 (±10,9)	
Larynx	117 (29,3)	22,0 (±22,5)	
unbekannt	21 (5,3)		
pT			0,85 ★
T1/T2	199 (49,9)	18,2 (±23,4)	
T3/T4	141 (35,4)	16,8 (±20,2)	
unbekannt	59(14,8)		
pN			0,55 ★
N0/1	224 (56,2)	18,2 (±23,4)	
N2/3	148 (37,1)	16,8 (±20,2)	
unbekannt	27 (6,8)		
p16-Expression			0,47 ★
Negativ	241 (60,4)	16,6 (±21,5)	
Positiv	60 (15,0)	21,3 (±24,3)	
unbekannt	98 (24,6)		
Tumorgrad			0,14 ★
1	7 (1,8)	19,1 (±20,7)	
2	199 (49,9)	19,5 (±21,7)	
3	107 (26,8)	13,2 (±19,5)	
unbekannt	86 (21,6)		
Resektionsrand			0,25 ★
Negativ	272 (68,2)	17,8 (±21,9)	
Positiv	44 (11,1)	18,5 (±22,3)	
unbekannt	83 (20,8)		

★ = Mann-Whitney-U Test, ● = One-Way Anova, # = Rang-Korrelation (Spearman) Correlation

8.2.7 PITX2, PANCER und PITX3 in Kopf- und Halstumoren

Tabelle 8-5: Charakteristika und Korrelationen der PITX2, PANCER und PITX3 DNA-Methylierung in der HNSCC Kohorte (n = 399). Diese Daten wurden bereits teilweise publiziert in Sailer & Holmes *et al.*¹⁵⁰

Charakteristika	Nr. der Patienten [%]	Mittelwert PITX2 Methylierung [%]	p-Wert	Mittelwert PANCER Methylierung [%]	p-Wert	Mittelwert PITX3 Methylierung [%]	p-Wert
Alle Patienten	399 (100)	18,8		70,8		69,0	
Geschlecht			0,24*		0,65*		0,45*
Weiblich	93 (23,3)	14,4 (±25,2)		68,3 (±21,7)		68,0 (± 18,0)	
Männlich	306 (76,7)	20,3 (±28,0)		71,6 (±20,4)		69,3 (± 19,1)	
Alter [Jahre]			0,75#		0,10#		0,35#
Mittelwert	62,4 (± 10,2)						
Median	62,0						
n ≤ Median	168 (42,0)	18,6 (±28,0)		69,5 (±21,7)		70,3 (± 17,4)	
n > Median	155 (39,0)	18,6 (±25,0)		73,2 (±19,2)		71,7 (± 18,2)	
unbekannt	76 (19,0)						
Raucher Status			0,048*		0,17*		0,58*
Nichtraucher	29 (7,0)						
Raucher	230 (58,0)						
unbekannt	140 (35,0)						
Packungsjahre			0,012#		0,14#		0,16#
(≤ 40)	122 (30,6)	20,8 (±29,2)		67,5 (±22,7)		71,0 (± 17,0)	
(> 40)	72 (18,0)	14,3 (±21,7)		73,8 (±20,3)		76,0 (± 14,0)	
unbekannt	205 (51,4)						
Alkohol			0,006●		0,062●		0,20●
Nie	71 (17,8)	21,3 (±27,0)		65,3 (±22,5)		69,9 (± 17,5)	
Selten	40 (10,0)	18,5 (±30,1)		69,3 (±24,0)		74,6 (± 14,0)	
Alkoholiker	70 (20,0)	13,6 (±23,0)		74,6 (±19,5)		74,9 (± 16,4)	
unbekannt	218 (54,6)						
Lokalisation			0,002●		0,004●		0,075●
Mundhöhle	68 (17,0)	8,7 (±18,7)		71,1 (±18,4)		68,9 (± 19,8)	
Oropharynx	159 (39,8)	22,9 (±29,6)		75,0 (±18,6)		71,9 (± 17,5)	
Hypopharynx	34 (8,5)	12,1 (±24,8)		73,0 (±22,7)		72,8 (± 17,6)	
Larynx	117 (29,3)	21,8 (±26,8)		66,6 (±21,5)		67,0 (± 17,4)	
unbekannt	21 (5,3)						
pT			0,75*		0,24*		1,0*
T1/T2	199 (49,9)	18,9 (±27,7)		70,3 (±20,9)		69,8 (± 17,4)	
T3/T4	141 (35,4)	18,7 (±26,3)		73,7 (±17,7)		69,2 (± 19,4)	
unbekannt	59(14,8)						
pN			0,69*		0,014*		0,014*
N0/1	224 (56,2)	18,7 (±27,2)		68,7 (±20,8)		67,4 (± 18,6)	
N2/3	148 (37,1)	19,4 (±27,0)		74,6 (±19,3)		72,9 (± 16,5)	
unbekannt	27 (6,8)						
p16-Expression			<0,001*		0,004*		0,018*

Anhang

Charakteristika	Nr. der Patienten [%]	Mittelwert <i>PITX2</i> Methylierung [%]	<i>p</i> -Wert	Mittelwert <i>PANCR</i> Methylierung [%]	<i>p</i> -Wert	Mittelwert <i>PITX3</i> Methylierung [%]	<i>p</i> -Wert
Negativ	241 (60,4)	12,6 (±20,7)		69,5 (±20,0)		66,2 (± 19,4)	
Positiv	60 (15,0)	45,0 (±38,6)		77,2 (±17,5)		73,7 (± 17,2)	
unbekannt	98 (24,6)						
Tumorgrad			0,62★		0,18★		0,51★
1	7 (1,8)	7,6 (±6,7)		68,2 (±15,3)		62,3 (± 15,1)	
2	199 (49,9)	17,2 (±24,8)		70,2 (±20,8)		70,1 (± 17,1)	
3	107 (26,8)	22 (±30,2)		74,5 (±17,9)		68,8 (± 17,6)	
unbekannt	86 (21,6)						
Resektionsrand			0,53★		0,22★		0,25★
Negativ	272 (68,2)	18,4 (±26,8)		70,8 (±19,8)		69,7 (± 17,7)	
Positiv	44 (11,1)	22,3 (±28,1)		74,3 (±15,7)		63,5 (± 18,6)	
unbekannt	83 (20,8)						

★= Mann-Whitney-U Test, ● = One-Way Anova, # = Rang-Korrelation (Spearman) Correlation

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Ich möchte mich ganz besonders bei Prof. Dr. Glen Kristiansen bedanken für die Bereitstellung eines Themas und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie für die Möglichkeit an diversen Konferenzen meine Forschungsergebnisse vorzustellen.

Prof. Dr. Hubert Schorle möchte ich ganz herzlich für seine Tätigkeit als Zweitgutachter danken. Ebenso danke ich auch meinen Dritt- und Viertgutachtern, Prof. Dr. Walter Witke und Prof. Dr. Julia Verne, für die Teilnahme an der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank gilt natürlich Dimo Dietrich für seine Unterstützung während meiner Promotion. Des Weiteren möchte ich Verena Sailer, Heidrun Gevensleben und Diane Goltz für ihre andauernde Unterstützung, vor allem in pathologischen Fragestellungen und bei der Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen danken.

Ich möchte mich vor allem bei meinen Kollegen und Freunden Sebastian, Maria, Barbara, Mareike, Anna, Carsten, Simone und Kerstin bedanken. Zum einen für viele gemeinsame Zeiten im Labor und gemeinsames Lachen. Und zum anderen für die vielen Gespräche und Diskussionen (egal ob arbeitsbezogen oder privat) aber auch für die vielen Anregungen bezüglich meiner Arbeit. Danke für das tolle Arbeitsklima und vor allem die vielen tollen Kuchentage!

Letztendlich gilt ein besonderer Dank meinen Freunden und meiner Familie, besonders meinem Ehemann Sander. Sie waren immer für mich da und haben mich während allen Höhen und Tiefen des Studiums bis hin zur Promotion immer unterstützt und bestärkt.

DANKE!

10. Konferenzbeiträge & Publikationen

KONFERENZBEITRÄGE - PRÄSENTATIONEN

Holmes EE, Schröck A, Bootz F, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D (2015). *DNA Methylierung von Homeobox Genen als prognostische Biomarker für Kopf- und Halskarzinom Patienten*. Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP), Frankfurt.

KONFERENZBEITRÄGE - POSTER

Holmes EE, Goltz D, Kristiansen G, Dietrich D (2016). *PITX3 DNA Methylierung als prognostischer Biomarker in Prostata Carcinom Patienten*, Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP), Berlin.

Holmes EE, Schröck A, Bootz F, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D (2015). *DNA Methylation of Homeobox Genes can predict Patients Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. 7th Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter.

Holmes EE, Schröck A, Bootz F, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D (2015). *Patients Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma can be predicted by DNA Methylation of Homeobox Genes*. Bonner Forum Biomedizin BFB Konferenz, Bad Honnef.

Holmes EE, Jung M, Meller S, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D (2014). *Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Various Sources (Extracted DNA, Tissues and Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Plasma, Serum, Urine)*. Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP), Berlin.

Holmes EE, Jung M, Meller S, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D (2014). *Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Various Sources (Extracted DNA, Tissues and Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Plasma, Serum, Urine)*. Bonner Forum Biomedizin (BFB) Konferenz, Hennef.

Holmes EE, Dietrich D, Kristiansen G (2013). *Clinical performance of a qPCR assay to predict recurrence in prostate cancer patients based on PITX2 DNA methylation*. Heidelberg Forum for Young Life Scientists, Heidelberg.

Publikationen

PUBLIKATIONEN

Sailer V*, **Holmes EE**, Gevensleben H, Goltz D, Dröge F, Franzen A, Dietrich J, Kristiansen G, Bootz F, Schröck A, Dietrich D. *PITX3 DNA methylation is an independent predictor of overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Clinical Epigenetics, Accepted & in Press.

Gevensleben H*, **Holmes EE***, Goltz D*, Dietrich J, Sailer V, Ellinger J, Dietrich D, Kristiansen G. *PD-L1 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients following radical prostatectomy*. Oncotarget, 2016.

Sailer V*, **Holmes EE***, Gevensleben H, Goltz D, Dröge F, de Vos L, Franzen A, Schröck F, Bootz F, Kristiansen G, Schröck A, Dietrich D. *PITX2 and PANCRA DNA methylation predicts overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2016.

Holmes EE*, Goltz D*, Sailer V, Jung M, Meller S, Uhl B, Dietrich J, Röhler M, Ellinger J, Kristiansen G, Dietrich D. *PITX3 promoter methylation is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients after radical prostatectomy*. Clinical Epigenetics, 2016.

Goltz D*, **Holmes EE***, Gevensleben H, Sailer V, Jung M, Röhler M, Meller S, Ellinger J, Kristiansen G, Dietrich D. *CXCL12 promoter methylation and PD-L1 expression as prognostic biomarkers in prostate cancer patients*. Oncotarget, 2016.

Holmes EE*, Jung M*, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, Mengdehl M, Garbe LA, Uhl B, Kristiansen G, Dietrich D. *Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine*. PLoS One, 2014.

Dietrich D, Jung M, Puetzer S, Leisse A, **Holmes EE**, Meller S, Uhl B, Schatz P, Ivascu C, Kristiansen G. *Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions*. PLoS One, 2013.

Dietrich D, Uhl B, Sailer V, **Holmes EE**, Jung M, Meller S, Kristiansen G. *Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition*. PLoS One, 2013.

* geteilte Erstautorenschaft

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum, Unterschrift