

Epigenetik des Prostatakarzinoms

DNA-Methylierung relevanter Gene

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

vorgelegt von: Thomas Jurgan

aus: Bremen

Erscheinungsjahr: 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
1.1 Das Prostatakarzinom.....	9
1.1.1. Die Prostata.....	9
1.1.2. Epidemiologie.....	9
1.1.3. Ätiologie.....	10
1.1.4. Diagnostik.....	11
1.1.5. Klassifikation.....	12
1.1.6. Staging.....	14
1.1.7. Grading.....	15
1.1.8. Therapie, Prognose und Nachsorge.....	16
1.1.9. Genetische Veränderungen.....	18
1.2. Epigenetische Veränderungen.....	18
1.2.1. DNA-Methylierung und kovalente Histonmodifikation.....	19
1.2.2. Methylierungsspezifische Veränderungen in Tumoren.....	21
1.2.3. Hypermethylierung als Tumormarker.....	22
1.3. CpG Insel Hypermethylierung beim Prostatakarzinom.....	22
1.4. Zielsetzung.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Materialien.....	27
2.1.1. Geräte.....	27
2.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3. Chemikalien.....	28
2.1.4. Lösungen.....	30
2.1.5. Kits.....	31
2.1.6. Software.....	31
2.1.7. Nukleotide, Enzyme und Primer.....	32
2.1.8. Probenmaterial.....	33
2.2. Methoden.....	36
2.2.1. Gewinnung von DNA aus paraffinierten Proben.....	36
2.2.2. Zellkultur.....	37
2.2.3. Kontrollproben.....	37
2.2.4. Bisulfitbehandlung.....	37
2.2.5. Primerdesign.....	39

2.2.6. Quantitative methylierungsspezifische PCR (Q-MS-PCR)	40
2.2.7. Gelelektrophorese	43
2.2.8. Berechnung der Kopienzahl	44
2.2.9. Statistische Auswertung	44
3. Ergebnisse.....	46
3.1. Probenmaterial.....	46
3.1.1. Methylierungsmuster der Prostatazelllinien	46
3.1.2. Methylierungsmuster des Prostatagewebes.....	47
3.1.3. Methylierungsmuster der Lymphknoten.....	52
3.2. Sensitivität und Spezifität der Methylierungsmarker.....	55
3.3. Prognostische Aussagekraft der Methylierungsmarker.....	60
4. Diskussion	65
4.1. Proben und Genmarker.....	65
4.1.1. Probenaufbereitung	65
4.2. Methylierungsstatus der Zelllinien.....	66
4.3. Methylierungsfrequenzen.....	66
4.3.1. <i>Annexin2</i>	66
4.3.2. <i>APC</i>	66
4.3.3. <i>GSTP1</i>	68
4.3.4. <i>PTGS2</i>	70
4.3.5. <i>MDR1</i>	70
4.3.6. <i>TIG1</i>	71
4.3.7. <i>EDNRB</i>	72
4.3.8. <i>RARbeta2</i>	72
4.3.9. <i>Reprimo</i>	73
4.4. Diagnostische Informationen.....	73
4.5. Methylierung und klinisch-pathologische Parameter	74
4.6. Hypermethylierung von Lymphknoten-DNA	77
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	80
7. Danksagung	97
8. Lebenslauf	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gleason Score	15
Abbildung 2: Cytosin-Methylierung	19
Abbildung 3: Promotorhypermethylierung und Transkriptionsabbruch	21
Abbildung 5: Methylierungsmuster bei Karzinomen unterschiedlicher Tumorentitäten	24
Abbildung 6: Methylierungsmuster bei urologischen Tumoren	24
Abbildung 7: Veränderungen bei methylierter und nicht-methylierter DNA durch die Bisulfitbehandlung	38
Abbildung 8: Ampifikationskurve einer Verdünnungsreihe; Abbildung 9: Standardkurve	40
Abbildung 10: Schmelzpunktanalyse	41
Abbildung 11: Photographie einer Gelelektrophorese	43
Abbildung 12: Graustufenskalierte Darstellung des NIM bei Zelllinien.....	47
Abbildung 13: Graustufenskalierte Darstellung der der BPH.....	49
Abbildung 14: Graustufenskalierte Darstellung der NIM von PCA und Lymphknoten	51
Abbildung 15: Methylierungsmuster von Primärtumor und dazugehöriger Lymphknotenmetastase	53
Abbildung 16: ROC-Kurve und Box-Plot des NIM bei PCA, BPH und Lymphknoten mit und ohne Metastasen	58
Abbildungen 17 und 18: Kaplan-Meier Tests zur Darstellung des Zusammenhangs klinisch pathologischer Parameter und dem Auftreten eines Rezidivs) und Abbildungen 19 und 20: Korrelation des Methylierungsstatus ausgewählter Gene mit einem biochemischen Rückfall	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Differenzierung des Prostatakarzinoms	13
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms.....	14
Tabelle 3: Grading nach WHO.....	16
Tabelle 4: Geräte	27
Tabelle 5: Labor und Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 6: Chemikalien	29
Tabelle 7: Lösungen	30
Tabelle 8: Kits.....	31
Tabelle 9: Software.....	31
Tabelle 10: Nukleotide.....	32
Tabelle 11: Primer	32
Tabelle 12: Zelllinien.....	33
Tabelle 13: Klinisch pathologische Parameter des Patientenkollektivs	35
Tabelle 14: PCR-Spezifikation der einzelnen Gene.....	42
Tabelle 15: Häufigkeiten der Methylierung im benignem und malignem Prostata- und Lymphknotengewebe	48
Tabelle 16: Anzahl methylierter Gene in einer Probe	48
Tabelle 17: Hypermethylierte Genmarker in Lymphknotenmetastasen	54
Tabelle 18: Hypermethylierung von Prostatakarzinomen bei Vorhandensein von histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen	54
Tabelle 19: Diagnostische Aussagekraft einzelner Genmarker	55
Tabelle 20: Diagnostische Aussagekraft ausgewählter Genkombinationen	59
Tabelle 22: Korrelation des Methylierungsstatus mehrerer Gene mit klinisch- pathologischen Parametern.....	64
Tabelle 23: Methylierungsfrequenzen von <i>APC</i> in anderen Studien.....	67
Tabelle 24: Methylierungsfrequenzen von <i>GSTP1</i> in anderen Studien	69
Tabelle 25: Methylierungsfrequenzen von <i>PTGS2</i> in anderen Studien	70
Tabelle 26: Methylierungsfrequenzen von <i>MDR1</i> in anderen Studien.....	71
Tabelle 27: Methylierungsfrequenzen von <i>TIG1</i> in anderen Studien	71
Tabelle 28: Methylierungsfrequenzen von <i>EDNRB</i> in anderen Studien	72
Tabelle 29: Methylierungsfrequenzen von <i>RARBeta2</i> in anderen Studien	73
Tabelle 30: Signifikante Korrelationen von Methylierung mit klinisch-pathologischen Parametern anderer Gruppen	76

Abkürzungsverzeichnis

<i>ACTB</i>	Actin beta
<i>APC</i>	Adenomatosis polyposis coli
AUC	Area under curve
Bp	Basenpaar
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CD44	Cluster of Differentiation 44
CpG	5'-Cytosin-Guanin-3'
Ct	Cycle Threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDNRB	Endothelin receptor beta
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
<i>GSTP1</i>	Glutathion-S-Transferase der π -Klasse 1
LINE-1	Long interspread element 1
<i>MDR1</i>	Multi-drug-resistance gene 1
MECP2	Methyl-CpG-Binding protein 2
MYOD1	Myogenic determination 1
NaOH	Natriumhydroxid
NIM	Normalized Index of Methylation
NPV	Negativer Vorhersagewert
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCA	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Perkin Elmer
Pen	Penicillin
PIA	Proliferative Inflammatorische Atrophie
PIN	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie
PPV	Positiver Vorhersagewert
PSA	Prostata spezifisches Antigen
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin Endoperoxid Synthase 2
Q-MS-PCR	Quantitative Methylierungsspezifische PCR
<i>RAR-beta 2</i>	Retinoic acid receptor beta 2
<i>RASSF1a</i>	Ras association domain family
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operator Curve
SAM	S-Adenosyl-Methionin

Strep	Streptomycin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<i>TIG1</i>	Tazarotene-induced gene 1
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen Klassifikation
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1. Die Prostata

Gemeinsam mit den Hoden und Nebenhoden bilden die Prostata und Samenblasen das innere Genital des Mannes. Sie werden auch als männliche Adnexe bezeichnet. Die Prostata, in Form und Größe etwa einer Esskastanie ähnlich, grenzt mit ihrer nach oben gerichteten Basis an den Boden der Harnblase. Kaudal verjüngt sie sich und erreicht mit ihrer Spitze das Diaphragma urogenitale. Ventral weist sie gegen die Symphyse, während sie dorsal gegen die Rektumampulle grenzt. Sie besteht aus 30 bis 50 tubuloalveolären Einzeldrüsen, die von Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgeben sind (Sökeland, 2001).

Die überwiegende Organmasse wird durch die Außendrüse gebildet. Diese umschließt die Innendrüse, die sich durch eine fibromuskuläre Zone nach außen abgegrenzt. Nach innen umgibt die schmale periurethrale Mantelzone die Harnröhre. Das Gesamtorgan ist von einer kapselartigen Muskel- und Bindegewebsschicht umgeben, in der Gefäß- und Nervenfasern verlaufen (Helpap, 1997).

Es wird diskutiert, dass sich die unter Androgen-Östrogen-Einfluß stehende Innendrüse von der nur durch Testosteron beeinflussten Außendrüse unterscheidet (Helpap, 1997).

Die Prostata wird auch als Vorsteherdrüse bezeichnet und erzeugt ein dünnflüssig, milchiges Sekret, das als Bestandteil des Spermas eine wichtige Rolle spielt.

1.1.2. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor des Mannes in den westlichen Industrienationen, der vor allem zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr auftritt. Dabei hat es nach dem Bronchialkarzinom bei Männern die zweithöchste Mortalität. In Deutschland hat es nach Angaben des Robert Koch Instituts mit ca. 40600 Erkrankungsfällen im Jahr 2000 einen Anteil von etwa 20 Prozent aller Krebserkrankungen. Es handelt sich dabei am häufigsten um ein Adenokarzinom,

das von den Epithelzellen der Prostata Drüsen ausgeht (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Beginnend mit dem 50. Lebensjahr wird es mit zunehmendem Alter häufiger. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren und damit 5 Jahre höher als bei dem Durchschnitt anderer Krebserkrankungen. Eine besonders hohe Inzidenz findet sich bei nordamerikanischen Farbigen. Seltener tritt das Prostatakarzinom bei asiatischen Völkern, insbesondere bei Japanern auf (Böcker et al., 2001).

1.1.3. Ätiologie

Bisher sind die Ursachen und deren Faktoren, die zur Entstehung des Prostatakarzinoms führen, weitgehend unbekannt. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass das Auftreten des Prostatakarzinoms abhängig von Umweltbedingungen und den Lebensverhältnissen ist. Dabei ist auffällig, dass Asiaten eine niedrigere Erkrankungsrate zeigen als Nordamerikaner, asiatische Immigranten in den USA jedoch eine ähnliche Inzidenz wie US-Amerikaner aufweisen (Hsing et al., 2000).

Studien deuten darauf hin, dass eine fettreiche Ernährung, insbesondere der Konsum von tierischen Fetten und rotem Fleisch die Krankheitsentstehung begünstigen (Giovannucci et al., 1993). Heterozyklische Amine und polyzyklische Kohlenwasserstoffe werden als Karzinogene vermutet (Shirai et al., 1997; Stuart et al., 2000).

Dagegen sollen Nahrungsbestandteile mit antioxidativen Wirkungen wie Lycopren (Gann et al., 1999), Sulforaphan (Cohen et al., 2000), Vitamin E (Hoque et al., 2001) und Selen (Clark et al., 1998; Hoque et al., 2001) einen protektiven Einfluß ausüben.

Auffällig ist die familiäre Häufung. Bei erstgradig Verwandten mit Prostatakrebs steigt die Wahrscheinlichkeit selbst von diesem Leiden betroffen zu sein nahezu exponentiell mit der Zahl der Erkrankten in der Familie (Ahlbom et al., 1997; Page et al., 1997; Steinberg et al., 1990).

Weitere Studien lieferten Hinweise darauf, dass eine androgene Stimulation bei Prostatakarzinomen eine Rolle spielt, da bei Eunuchen und Kastraten diese Erkrankung äußerst selten vorkommt und es bei Androgensuppression zu einer

Schrumpfung des Organs oder gar zu einer Rückbildung der Krebses kommt (Böcker et al., 2001).

Durch Untersuchungen wie Segregationsanalysen konnte gezeigt werden, dass besonders bei Patienten mit dem Early-Onset-Prostatakrebs (das Erkrankungsalter liegt unter 55 Jahre) wahrscheinlich autosomal dominante Veränderungen bei der Kanzerogenese eine wichtige Rolle spielen (Gronberg et al., 1997; Schaid et al., 1998). Beim familiären Prostatakarzinom konnten bislang sechs Suszeptibilitätsgene entdeckt werden (Nelson et al., 2003).

1.1.4. Diagnostik

Den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft zur Diagnose des Prostatakarzinoms von 2002 zu folge, werden die folgenden Maßnahmen getroffen um eine Erkrankung festzustellen:

1. digital-rektale Palpation
2. Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens im Serum
3. suprapubische/transrektale Sonographie
4. gegebenenfalls Stanzbiopsie

Die Indikationen für eine Stanzbiopsie sind ein auffälliger Tastbefund oder ein erhöhter PSA-Wert ($> 4\text{ng/ml}$) bei unauffälligem Tastbefund.

Um Metastasen auszuschließen, werden nach positiv befundeter Biopsie eine Sonographie des Abdomens und ein Röntgen-Thorax durchgeführt. Ist der PSA-Wert größer als 10 ng/ml soll eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden.

Die Prävalenz der Prostatakarzinome hat seit Einführung des PSA-Tests Mitte der achtziger Jahre stark zugenommen. Dabei befürchten viele Kliniker, dass häufig eine unnötige Behandlung bei Patienten mit positivem PSA-Test ($>4\text{ng/ml}$) durchgeführt wird. Unabhängig vom großen Nutzen des PSA-Wertes haben sich in Studien erhebliche Einschränkungen betreffend der Sensitivität und Spezifität dieses Diagnose-Parameters gezeigt. Es wurde vermehrt festgestellt, dass aufgrund der

erhöhten Sensitivität ein erheblicher Anteil von Patienten behandelt wurde, deren Lebenserwartung sowie Lebensqualität ohne Behandlung nicht schlechter gewesen wäre (Schroder and Kranse, 2003). In dem „Prostate Cancer Prevention Trial“ wurde des weiteren festgestellt, dass bei 15 Prozent der Untersuchten trotz nicht suspektem Befund durch die digital rektale Palpation und negativem PSA-Wert (PSA-Wert < 4 ng/ml), ein Prostatakarzinom bestand. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei 25 Prozent der niedrigdifferenzierten Prostatakarzinome (Gleason > 7), der PSA-Wert innerhalb der Referenz lag. Sogar bei Messwerten des PSA im Bereich von unter 1 ng/ml konnte bei 10% der Patienten ein niedrigdifferenziertes Karzinom festgestellt werden (Thompson et al., 2004).

1.1.5. Klassifikation

Prostatakarzinome werden unterschieden von den ab dem 70. Lebensjahr fast physiologisch auftretenden Prostatahyperplasien (im angelsächsischen benigne Prostatahyperplasie, BPH). Dabei handelt es sich um knotige Proliferationen von Drüsen und Stroma, die zu einer Vergrößerung der Prostata führen. Die Veränderungen entstehen aus primitivem subepithelialen Mesenchym und enthalten Fibroblasten, Myofibroblasten, Gefäße und kollagene Fasern (Böcker et al., 2001). Bei Prostatahyperplasien handelt es sich nicht um Präkanzerosen.

Als Präkanzerose wiederum müssen die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) und die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) betrachtet werden. Es handelt sich bei der PIN um ein intraduktal wachsendes, nichtinvasives Karzinom, das häufig in BPHs zu finden ist. Es unterscheidet sich vom Karzinom durch die noch erhaltene Basalmembran (Böcker et al., 2001).

Neuerdings wird auch die Proliferativ Inflammatorische Atrophie (PIA) als Vorläuferläsion diskutiert. In dem morphologisch atrophem Gewebe finden sich entzündliche und hyperproliferative Vorgänge (De Marzo et al., 1999).

Das Prostatakarzinom imponiert makroskopisch als derbe, graugelbe, recht scharf begrenzte Herdansammlung, die je nach Stadium in einem oder in beiden Lappen auftritt. Das Prostatakarzinom entsteht meist in der peripheren, androgenabhängigen Zone und wächst erst dann in das Zentrum des Organs und/oder durchbricht die

Kapsel und breitet sich im periprostatischen Fett- und Bindegewebe aus beziehungsweise infiltriert die anliegenden Samenblasen. Es handelt sich bis auf in wenigen Ausnahmen um azinäre Adenokarzinome. Nur selten können das muzinöse Adenokarzinom, das papillär-duktales Karzinom, das adenoid-zystische Karzinom, der Karzinoidtumor, die Urothel- und Plattenepithelkarzinome diagnostiziert werden (Böcker et al., 2001).

Histologisch finden sich im klassischen azinären Prostakarzinom z.T. erhebliche morphologische Unterschiede im Wachstumsmuster (siehe Tabelle 1) (Böcker et al., 2001).

Differenzierung	Morphologie
Hochdifferenziertes Adenokarzinom	Gestörte Drüsenarchitektur, ansonsten wie gesundes Prostatagewebe
Niedrigdifferenziertes Adenokarzinom	Bildet kleine Tubuli, polymorphes Epithel mit deutlichen Nukleolen und vereinzelt Mitosen
Kribriiformes Karzinom	Große Zellkomplexe mit kleinen siebartigen Lichtungen (sogenanntes Drüse-in-Drüse-Muster), große Nukleolen, Mitosen
Anaplastisches Karzinom	Sehr polymorphe, oft basophile Tumorzellen in soliden, komedoartigen Komplexen angeordnet

Tabelle 1: Differenzierung des Prostatakarzinoms

Es werden die Differenzierung des Prostatakarzinoms und die dazugehörige Morphologie einander gegenübergestellt.

Je größer ein Tumor ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit mehrerer dieser histologischen Muster nebeneinander anzutreffen. Man bezeichnet dies als pluriformes Karzinom. Durch diese Inhomogenität wird eine einheitliche, prognostisch orientierte Klassifizierung erschwert (Böcker et al., 2001).

1.1.6. Staging

Pathologisch-anatomisch wird das Prostatakarzinom nach der TNM-Klassifikation der „International Union against Cancer“ (Wittekind et al., 2003) klassifiziert. Dabei werden die Ausdehnung des Primärtumors und wenn vorhanden, Lymphknoten- und Fernmetastasen berücksichtigt.

	Primärtumor
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
pT1	Tumor ist weder tastbar noch sichtbar, inzidentes Prostatakarzinom
pT1a	Zufälliger histologischer Befund in <5% des resezierten Gewebes
pT1b	Zufälliger histologischer Befund in >5% des resezierten Gewebes
pT1c	Tumor bei Verdacht durch Nadelbiopsie entdeckt
pT2	Tumor beschränkt auf die Prostata
pT2a	Tumor infiltrierte die Hälfte eines Lappens oder weniger
pT2b	Tumor infiltrierte mehr als die Hälfte eines Lappens
pT2c	Tumor infiltrierte beide Lappen
pT3	Tumor mit Kapseldurchbruch
pT3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (uni- oder bilateral)
pT3b	Infiltration der Samenblase(n)
pT4	Tumor befällt andere benachbarte Strukturen als Samenblasen
	Metastasen
pN	Metastasen in regionären Lymphknoten
pNx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in regionären Lymphknoten
	Fernmetastasen
pM	
pMx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM1a	Vorliegen von nicht regionären Lymphknotenmetastasen
pM1b	Vorliegen von Knochenmetastasen
pM1c	Vorliegen von anderen Metastasen

Tabelle 2: TNM- Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation, 6. Aufl. UICC 2002

1.1.7. Grading

In den letzten Jahren hat sich das Grading nach Gleason (Bostwick, 1994; Gleason, 1988) international durchgesetzt. Dabei wird vom Pathologen der Malignitätsgrad anhand der histologischen Aufarbeitung des Biopsiematerials festgestellt. Beurteilt wird das Wachstumsmuster der Drüsen unter Berücksichtigung von Größe, Form, Abstand, Herdgrenzen und Stromainvasion. Diese werden mit Punkten von 1 bis 5 bewertet (siehe Abbildung 1). Um gegebenenfalls vorliegende Inhomogenitäten im befallenen Organ zu erfassen, werden das primär und das sekundär vorliegende Wachstumsmuster histologisch erfasst, numerisch bewertet und addiert. Dies ergibt Werte von 2 bis 10, die eine Aussage über die Differenzierung und Malignität des Tumors treffen. Dabei spricht ein hoher Gleason Score für eine niedrigere Differenzierung und einen zu erwartenden malignen Verlauf. Als ungünstig wird ein Gleason Score über 7 bewertet (Epstein et al., 1996; Green et al., 1998):

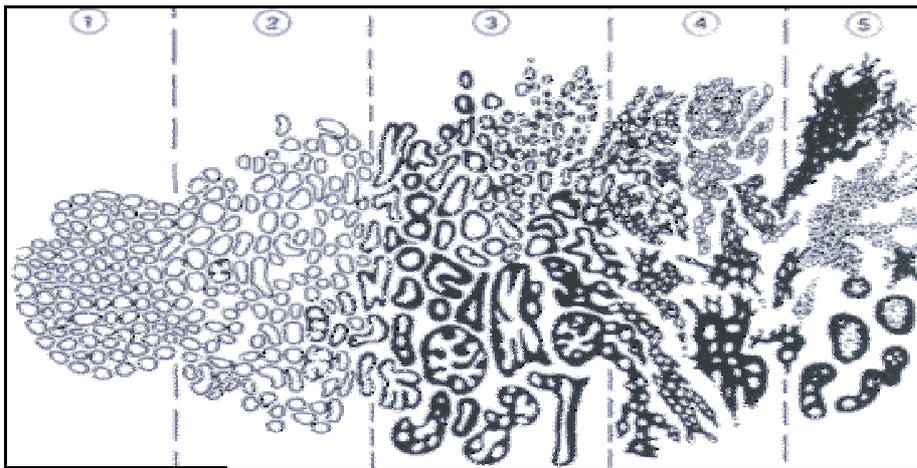


Abbildung 1: Gleason Score

1 hochdifferenziertes Prostatakarzinom; 2 gut differenziertes Prostatakarzinom; 3 mäßig differenziertes Prostatakarzinom; 4 gering differenziertes Prostatakarzinom; 5 weitgehend undifferenziertes Prostatakarzinom. Die beiden in dem untersuchten Prostatagewebe vorrangig gefunden Differenzierungstypen werden addiert.

Vor der Etablierung des Gleason Scores, wurde das histologische Grading des Prostatakarzinoms nach WHO und des pathologischen Arbeitskreises „Prostatakarzinom“ durchgeführt. (siehe Tabelle 3) (Remmle, 1997).

Grading	Beschreibung
1a	Hochdifferenziertes, glanduläres Karzinom mit sehr geringem Kernatypiegrad ohne prominente Nukleolen
1b	Wie 1a jedoch mit zytologisch mäßiggradigem Kernatypiegrad und gering gesteigerter Nukleolenfrequenz
2a	Wenig differenziertes, glanduläres Prostatakarzinom mit mäßiggradigen Kernatypien
2b	Glanduläres oder kribriiformes Muster mit teils mäßigen als auch schweren Kernatypien
3a	Überwiegend kribriiforme und solide trabekuläre Ausprägung des Karzinoms mit schweren Kernatypien
3b	Weitgehend undifferenzierter Tumor

Tabelle 3: Grading nach WHO

Einteilung der Prostatakarzinome nach ihrer mikroskopischen Morphologie

1.1.8. Therapie, Prognose und Nachsorge

Das Tumorstadium, der Differenzierungsgrad, der Allgemeinzustand sowie das Alter des Patienten entscheiden über die therapeutischen Maßnahmen. Das lokalisierte Prostatakarzinom (T1b-2) und eine weitere Lebenserwartung von zehn Jahren, sind die klassische Indikation für die radikale Prostatektomie. Langzeitstudien haben ergeben, dass bei 70% der Patienten nach zehn Jahren, der PSA-Wert unterhalb der Nachweisgrenze lag. 23% der Beobachteten ließen einen isolierten PSA-Anstieg erkennen, ohne dass bei ihnen ein neuer Tumor gefunden werden konnte. Nur in 7% der Fälle wurden ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen nachgewiesen (Walsh et al., 1994). Optional für die Behandlung des Prostatakarzinoms kommen auch die perkutane Strahlentherapie oder die Brachytherapie in Frage. Beide zeigen im Vergleich nach zehn Jahren in etwa 40% der Fälle ein PSA-Rezidiv und sonst ähnliche Therapieerfolge (Jani and Hellman, 2003).

Bei der Therapie des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms (>pT3a) ist der Wert der radikalen Prostatektomie umstritten. Diese Tumorstadien sind prognostisch als eher ungünstig anzusehen. Sind die Lymphknoten tumorfrei, so ist bei einer

derartigen Behandlung eine 10 Jahres-Überlebensrate von etwa 50-60% erreicht worden (Wirth, 2000). Bei tumorbefallenen Lymphknoten konnten keine eindeutigen Vorteile für die radikale Prostatektomie bewiesen werden (Messing et al., 1999; Wirth, 2000). Begleitend zum chirurgischen Eingriff können adjuvante oder neoadjuvante Therapien angewandt werden. Dabei lassen erste Studien vermuten, dass insbesondere Patienten mit schlechter Prognose (High grade disease, hoher PSA-Wert) von einer adjuvanten Hormonbehandlung profitieren könnten (D'Amico, 2002; Reese, 2000). Trotz höherer Diagnoseraten potentiell kurabler Prostatakarzinome und deren radikaler Prostatektomie gibt es Studien zufolge in zwischen 27 und 53% der Fälle nach zehn Jahren einen messbaren PSA-Wert (Kattan et al., 1999; Pound et al., 1999; Zincke et al., 1994). Die 10-Jahres-Überlebensraten der Patienten mit und ohne PSA-Rezidiv unterschieden sich jedoch nicht wesentlich (Jhaveri et al., 1999). Eine kurative Therapie ist bei Rezidiven bislang nicht möglich, während der Nutzen von Androgenablation und Strahlentherapie nicht bewiesen ist (Bottke et al., 2003).

Im Falle eines metastasierten Prostatakarzinoms ist seit Mitte der 1940er Jahre die Unterdrückung der Androgenwirkung auf die Tumorzelle praktiziert worden. Diesbezüglich werden die Orchiektomie und hormonelle Therapieformen (GnRH-Antagonisten, GnRH-Agonisten) eingesetzt. Bemerkenswert ist die Entwicklung einer Hormonresistenz seitens des Tumors, die im Mittel nach zwei Jahren einsetzt. (Bott et al., 2003). Um die folgenden Symptome des nun fortschreitenden Prostatakarzinoms (Lymphödeme der unteren Extremität, Knochenschmerzen, Harnstauungsniere und subvesikale Obstruktion) zu therapieren, können nur noch palliative Maßnahmen getroffen werden.

Prognostisch wird versucht die verschiedenen Therapieoptionen anhand von Nomogrammen zu bestimmen. Es sind diesbezüglich die verschiedensten Ansätze gemacht worden um anhand von diagnostischen Parametern wie zum Beispiel dem PSA-Wert, dem Gleason Score und dem pT-Stadium die durchschnittlichen Überlebenszeiten abzuschätzen (Ross et al., 2001). Verbreitet sind die Partin-Nomogramme (Di Blasio et al., 2003), die durch Betrachtung der chirurgischen Schnittränder, des PSA-Wertes, des Gleason Scores und des Lymphknoten- und Samenblasenbefalls die Rezidivwahrscheinlichkeit innerhalb eines Zeitraums von zwei, fünf und sieben Jahren abschätzen lassen.

Im Rahmen der Nachsorge von Prostatakarzinomen sind die Ermittlung des PSA-Werts und sonographische Kontrollen derzeit die Mittel der Wahl zur Überwachung der Patienten auf ein eventuell vorliegendes Rezidiv. In Einzelfällen muss die Nachsorge jedoch individuell und symptomorientiert erfolgen.

1.1.9. Genetische Veränderungen

Durch die vergleichende Erforschung des Auftretens von Prostatakrebs bei monozygoten und dizygoten Zwillingen wurden bislang die folgenden sechs Gene gefunden, die für ein Vorhandensein von autosomal dominant vererbten Ursachen des Prostatakarzinoms sprechen:

RNASEL codiert eine Endoribonuklease, die bei der Inaktivierung von viraler und zellulärer RNA über die Interferonaktivierung eine wichtige Rolle spielt (Wang et al., 2002). *MSR1* codiert Untereinheiten des Makrophagen-Scavenger-Rezeptors die unter anderem Liganden wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, HDL (High density lipoproteine) und LDL (Low density lipoproteine) binden. Diese Funktion der Makrophagen spielt bei Entzündungen innerhalb der Prostata eine wichtige Rolle (Xu et al., 2002). *AR* (Androgenrezeptor Gen) (Edwards et al., 1992), *CYP17* (Cytochrome P-450c17 Gen) (Latil et al., 2001). *SRD5A2* (Steroid-5- α -Reduktase Typ II Gen) (Makridakis et al., 1999) und *ELAC2* (Nelson et al., 2003) wurden durch epidemiologische Studien in Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten des Prostatakarzinoms gebracht, wobei die Funktion von *ELAC2* bislang nicht geklärt ist.

1.2. Epigenetische Veränderungen

Seit 1983 sind Veränderungen bekannt, die die Genexpression beeinflussen, ohne jedoch die DNA-Sequenz zu verändern (Feinberg and Vogelstein, 1983). Diese scheinen einen entscheidenden Einfluß auf die Entstehung und den Verlauf von Tumoren zu haben (Jones and Baylin, 2002). Am ausführlichsten davon untersucht ist die DNA-Hypermethylierung. Auch aberrante Hypomethylierung, Phosphorylierung und Histonmodifikationen wie die Acetylierung scheinen eine wichtige Rolle in der Onkogenese, insbesondere der der Prostatakarzinome zu spielen.

1.2.1. DNA-Methylierung und kovalente Histonmodifikation

Als Methylierung der DNA bezeichnet man die kovalente Bindung eines Methylrestes am 5'-C-Atom von Cytosin. Diese wird durch mindestens drei unterschiedliche DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) gesteuert, wobei S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonor fungiert. Dabei ist lediglich die von einer Guanin gefolgte Cytosinbase (CpG-Dinukleotid) von dieser Veränderung betroffen (siehe Abbildung 2).

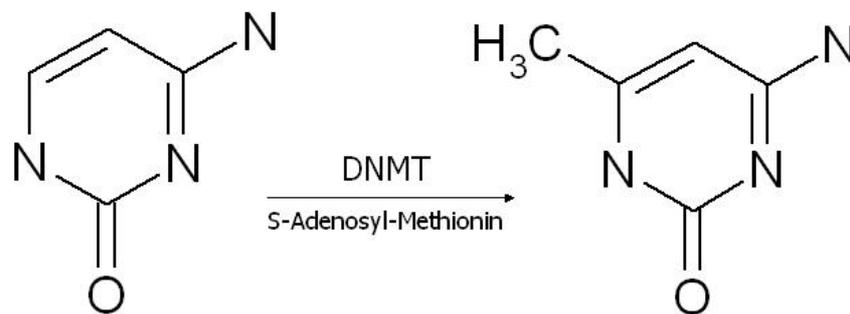


Abbildung 2: Cytosin-Methylierung

Bildung von 5-Methylcytosin durch Bindung eines Methylrestes an das 5'-C-Atom von Cytosin durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT). S-Adenosyl-Methionin fungiert dabei als Methylgruppendonor.

Die Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Dinukleotid in einer DNA-Sequenz anzutreffen liegt normalerweise bei etwa 6%. Durch die sogenannte CG-Suppression bei Vertebraten ist das Auftreten eines CpG-Dinukleotids erheblich seltener. Eine Ausnahme bilden die CpG-Inseln. Dabei handelt es sich um kurze DNA-Abschnitte (300-3000 Basenpaare) die besonders im Bereich von Genpromotoren und den ersten Exones angefundene werden. Diese CpG-reichen Abschnitte haben zum Teil eine normale oder gar deutlich erhöhte Frequenz an CpG-Dinukleotiden und repräsentieren etwa 1% des Genoms. Es existieren etwa 45000 solcher CpG-Inseln im menschlichen Erbgut (Jones, 2002; Li et al., 2005).

Unter normalen Bedingungen sind etwa 70% aller CpG-Dinukleotide im Säuger-Genom hypermethyliert. Dagegen sind die meisten CpG-Inseln zunächst nicht hypermethyliert. Ändert sich dies, wie dies physiologisch bei der Hypermethylierung des inaktiven X-Chromosoms geschieht, so kommt es zum sogenannten „gene silencing“ und das Gen wird in bezug auf seine Transkription und Expression ruhegestellt. Der Methylierungsstatus hat also Einfluß auf die Genaktivierung

(Hypomethylierung) als auch auf die Gen-Ruhigstellung (Hypermethylierung) (Jones, 2002).

Als weitere epigenetische Modifikation finden sich Veränderungen der Chromatinstruktur beziehungsweise der Histone. Die N-terminalen Fortsätze von Histonmolekülen sind unterschiedlichen, kovalenten Reaktionen durch chromatinspezifische Enzyme ausgesetzt, wie zum Beispiel der Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung. Diese Histonmodifikationen fungieren als zweite epigenetische Regulationsebene der Genexpression. Insbesondere der Acetylierungs- und Methylierungszustand von Histonen, der durch mehrere Histon-Acetyltransferasen (bedingen eine Genaktivierung), Histon-Deacetylasen (führen zur Gen-Ruhigstellung) und Histon-Methyltransferasen (sowohl Genaktivierung als auch -inaktivierung möglich) gesteuert wird, kann die Genexpression zum Beispiel von Transkriptionsfaktoren, entscheidend beeinflussen. Die DNA-Methylierung und die Histonmodifikationen sind eng miteinander verknüpft und es konnte gezeigt werden, dass zur erfolgreichen Genexpressionskontrolle das Zusammenwirken beider epigenetischen Regulationsmechanismen notwendig ist (Li et al., 2005).

Physiologisch dient die DNA-Methylierung im Säugetiergenom als Abwehrmechanismus zum Schutz vor repetitiver DNA und dem Erhalt der strukturellen Stabilität. Größtenteils liegen die CpGs innerhalb von parasitären DNA-Sequenzen und Retrotransposons. Die Rekombination von nicht-allelischen Wiederholungen führt zu einer Begünstigung von chromosomalen Rearrangements und Translokationen, die die Integrität des Genoms zerstören können (Li et al., 2005; Robertson and Wolffe, 2000). Viele dieser Retrotransposons sind starke Promotoren, die bei der Insertion in bestimmte Gene deren Funktionen stören oder gar ganz abstellen können. Diese Gene können Funktionen wie zum Beispiel die Tumorsuppression, hormonelle Steuerfunktionen, Tumordinvasion oder Tumorarchitektur, die Zellzykluskontrolle und DNA-Reparaturmechanismen beinhalten (Li et al., 2005). Des Weiteren ist die Stabilität der perizentromeren Region abhängig von einer ausreichenden Hypermethylierung, da methylierte DNA erheblich unanfälliger für Rekombinationen ist als unmethylierte DNA (Hsieh and Lieber, 1992).

1.2.2. Methylierungsspezifische Veränderungen in Tumoren

Eine genomweite Hypomethylierung wird als Ursache genetischer Instabilität bei Neoplasien betrachtet. Des weiteren wird die Expression physiologischerweise unterdrückter Gene wie zum Beispiel aus viraler DNA, repetitiven oder X-chromosomalen Sequenzen ermöglicht (Attwood et al., 2002). Die Hypermethylierung von regulatorischen Genabschnitten bewirkt eine Transkriptionshemmung (siehe Abbildung 3) und ist damit die mögliche Ursache einer Störung der Funktion eines Tumorsuppressorgens. Knudson definierte eine sogenannte „Two-Hit-Hypothese“ nach der zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens eine Inaktivierung beider Kopien des entsprechenden Genlokus benötigt wird (Knudson, 2001). Danach können chromosomale Deletion, Mutation und Promotorhypermethylierung synergistisch bei der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wirken.

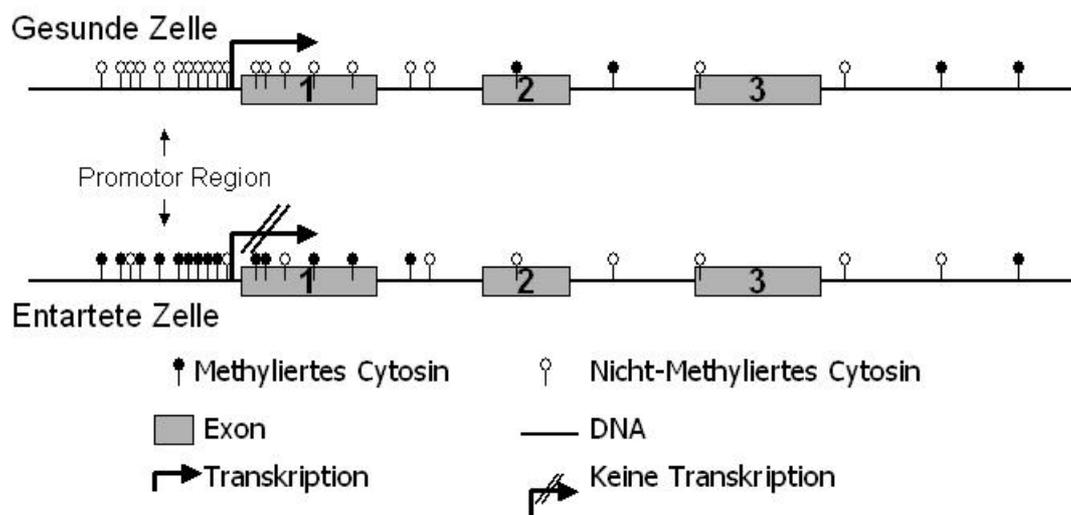


Abbildung 3: Promotorhypermethylierung und Transkriptionsabbruch

In der Abbildung werden die Transkription einer gesunden und einer entarteten Zelle gegenübergestellt. Der Transkriptionsabbruch der entarteten Zelle erfolgt nach Hypermethylierung im Promotorbereich.

Besondere Bedeutung haben epigenetische Veränderungen in therapeutischer Hinsicht, da sie prinzipiell reversibel sind. Versuche an hypermethylierten Krebszelllinien zeigten, daß demethylierend wirkende Substanzen allein als auch gemeinsam mit Histondeacetylasehemmstoffen zuvor inhibierte Gene reaktivieren konnten (Lin et al., 2001; Yamada et al., 2003).

1.2.3. Hypermethylierung als Tumormarker

Für die klinische Anwendung, muss ein idealer Tumormarker bei einer Untersuchung möglichst minimal invasiv gewonnen werden und dabei eine maximal sensitive und spezifische Aussage zum Gesundheitszustand des Patienten treffen können (Herman and Baylin, 2003; Ransohoff, 2003). Die DNA-Hypermethylierung scheint ein aussichtsreicher Diagnoseparameter zu sein. Anders als bei genetischen Mutationen erscheinen Hypermethylierungsmuster in definierten Regionen (CpG-Inseln) und können dort detektiert werden. Ferner kann man Hypermethylierungen mit nahezu jeder Krebsart in Verbindung bringen, wobei jeder Tumor sein eigenes Methylierungsmuster zu haben scheint. Besonders interessant ist, dass einige derartige Veränderungen schon in frühen Stadien der Krebsentstehung zu finden sind (Li et al., 2005). Auch Therapiemöglichkeiten mit demethylierenden Substanzen wie Azathioprin und Histondeactylasen wie Trichostatin A machen epigenetische Veränderungen für weiterführende Forschung besonders interessant.

1.3. CpG Insel Hypermethylierung beim Prostatakarzinom

Bislang wurden beim Prostatakarzinom über 45 Gene auf DNA-Hypermethylierung untersucht (siehe Abbildung 4) (Bastian et al., 2004b). Erstmals konnte dabei 1994 eine Hypermethylierung bei der Glutathion-S-Transferase der π -Klasse (*GSTP1*) (Lee et al., 1994) nachgewiesen werden. Bei den über 1000 Fällen die in der Literatur auf diese Veränderung untersucht wurden (siehe Abbildung 6) (Bastian et al., 2004b), wurde diese Veränderung in etwa 80% aller Prostata-Krebserkrankungen detektiert.

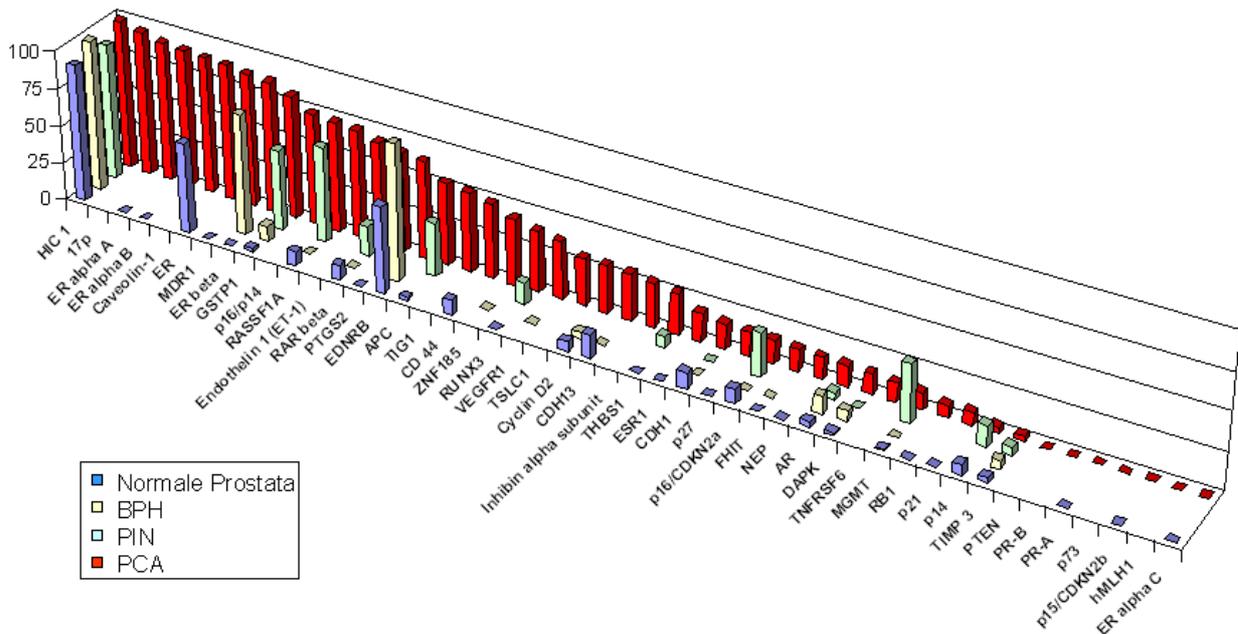


Abbildung 4: Überblick bisheriger untersuchter CpG-Inseln Hypermethylierung in der Promotorregion im Gewebe von Prostatakarzinom Patienten (aus (Bastian et al., 2004b))

Seit der Entdeckung des methylierten *GSTP1*-Gens bei Prostatakarzinom Patienten haben Forschungsgruppen genomweite Methylierungsanalysen bei den unterschiedlichsten Tumoren durchgeführt. Stellt man diese vergleichend in einen Zusammenhang, so waren etwa 600 der 45000 CpG-Inseln hypermethyliert. Außerdem wird deutlich, dass es charakteristische Unterschiede zwischen unterschiedlichen Tumoren (siehe Abbildung 5 aus (Yegnasubramanian et al., 2004)) gibt. Diese Unterschiede werden auch bei Tumoren des Urogenitalsystems deutlich (siehe Abbildung 6 (Bastian et al., 2004b)).

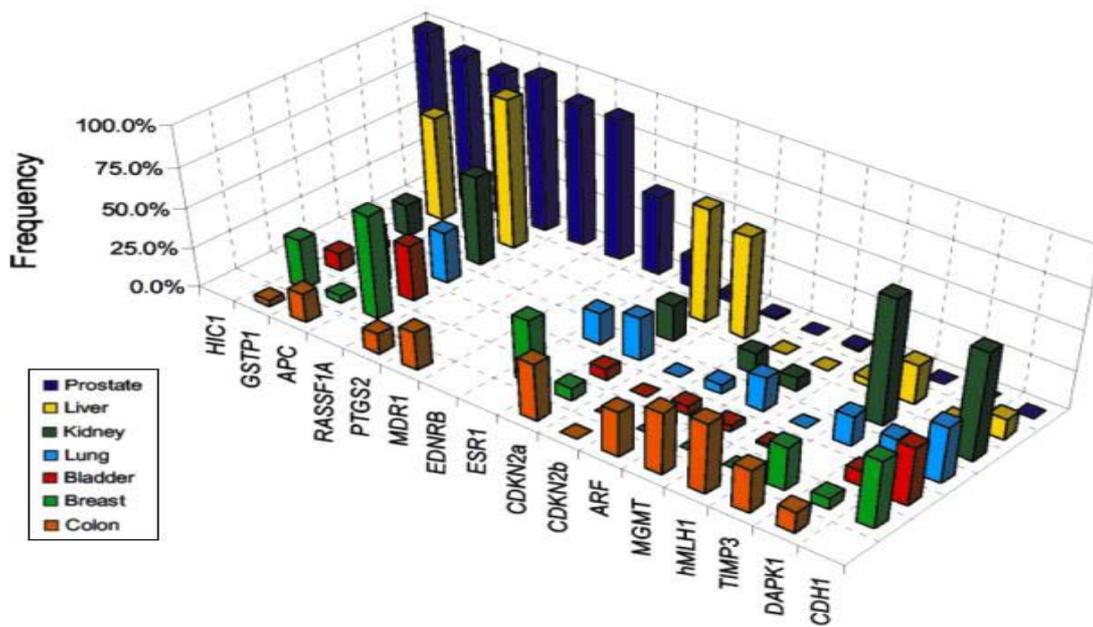


Abbildung 5: Methylierungsmuster unterschiedlicher Tumorentitäten (aus (Yegnasubramanian et al., 2004)). Dargestellt sind die prozentualen Methylierungsfrequenzen unterschiedlicher, ausgesuchter Genpromotoren.

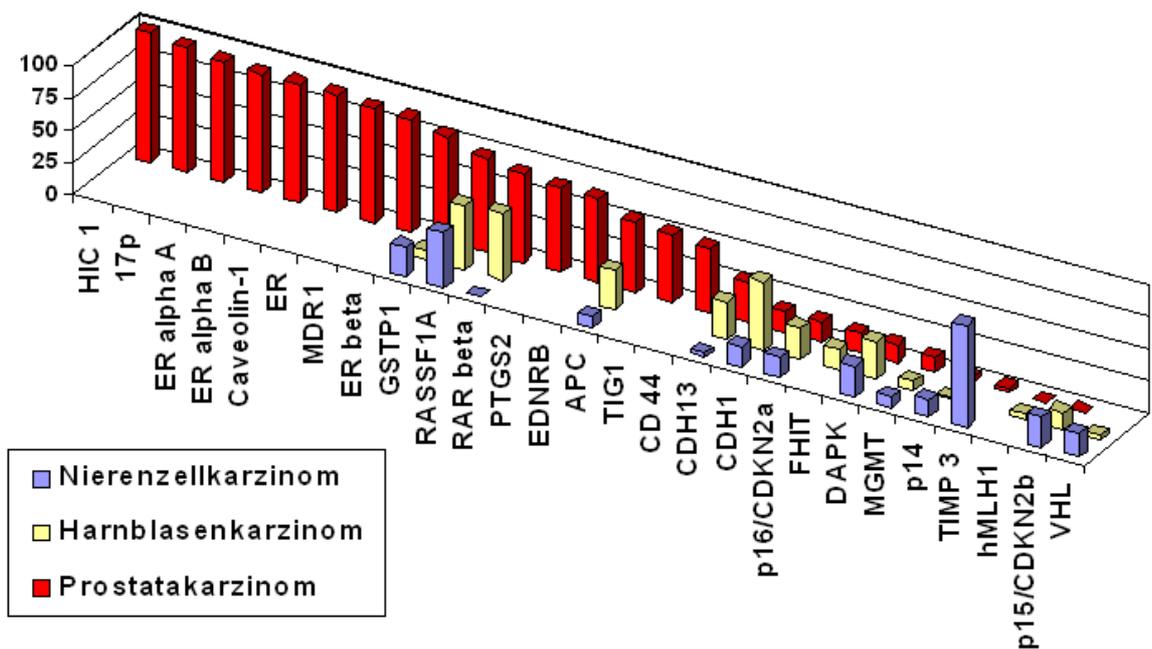


Abbildung 6: Methylierungsmuster ausgewählter Gensequenzen bei urologischen Tumoren (aus (Bastian et al., 2004b))

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Kombination von CpG-Insel Hypermethylierungen an unterschiedlichen Genen mit hoher Sensitivität und Spezifität zwischen normalem Prostatagewebe und dem Vorliegen eines Prostatakarzinoms unterscheiden kann (Yegnasubramanian et al., 2004).

Besonders interessant ist, dass es sowohl einzelne, aber auch Kombinationen von mehreren methylierten Genen gibt, die mit etablierten Prognosefaktoren wie z.B. dem PSA-Wert, dem Gleason-Score oder dem Status des chirurgischen Schnittrandes korrelieren (Bastian et al., 2005; Kang et al., 2004; Woodson et al., 2004c; Yegnasubramanian et al., 2004).

Bei der Untersuchung von Patientenmaterial wie Blut, Urin oder nach Prostatamassage gewonnenes Sekret, konnte in diesem in bis zu 46% auch eine Gen-Hypermethylierung festgestellt werden (Crocitto et al., 2004; Goessl et al., 2000; Gonzalgo et al., 2004). Diese Tumor-DNA kann zellgebunden (frei zirkulierende oder phagozytierte Tumorzellen) (Mao et al., 1996) und in freier Form (Esteller et al., 1999) vorliegen.

1.4. Zielsetzung

Aufbauend auf vorherigen Untersuchungen (Bastian et al., 2005), soll das Spektrum der betrachteten Genpromotoren in Hinblick auf deren diagnostische und prognostische Verwertbarkeit erweitert werden. Auch soll die ergänzende Kombination mehrerer, möglicherweise hypermethylierter Gene zu Gewinn von Aussagekraft durch unterschiedliche Verknüpfungen führen. Außerdem sollen diese untersuchten Gene mit Diagnose- und Verlaufsparemtern korreliert werden, um etwaige Zusammenhänge aufzudecken. Hierzu wird Gewebe aus Prostatakarzinomen und den dazugehörigen pelvinen Lymphknoten untersucht.

Die folgenden Gene sollen einer näheren Betrachtung unterzogen werden:

GSTP1 (Glutathion-S-Transferase der π -Klasse) ist der bislang am besten untersuchte Marker. Das Fehlen der *GSTP1*-Funktion fördert die Karzinogenese nicht durch eine Tumorsuppressorwirkung sondern eher durch Schutz des Genoms vor Karzinogenen oder reaktiven chemischen Verbindungen (Nelson et al., 2003).

APC (Adenomatosis Polyposis Coli) ist ein häufiger untersuchtes Tumorsuppressorgen, das sowohl bei der Entstehung von familiären Kolonkarzinomen als auch bei Prostatakarzinomen eine wichtige Rolle spielt (Esteller et al., 2000; Kang et al., 2004; Yegnasubramanian et al., 2004).

PTGS2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 oder Cyclooxygenase2) ist beteiligt an der Regulation von Entzündungen und der Apoptose in Prostatakarzinomzellen (Yegnasubramanian et al., 2004; Zha et al., 2001).

MDR1 (Multi-Drug-Resistance-1) spielt eine wesentliche Rolle bei der Resistenz gegen medikamentöse und hormonelle Therapien und ist wahrscheinlich an der Entstehung von hormonresistenten Prostatakarzinomen beteiligt (Kantharidis et al., 1997; Nakayama et al., 1998; Tada et al., 2002; Yegnasubramanian et al., 2004).

EDNRB (Endothelin Rezeptor Typ Beta) ist ein Gen, dass in zahlreichen Funktionen eine wichtige Rolle spielt. So ist es am Ablauf der Vasokonstriktion beteiligt. Auch ist auffällig, dass es bei Mutation zur Genese des Morbus Hirschsprung, einer Erkrankung, die sich durch die Ausbildung eines Megacolons auswirkt, beiträgt. Neuerliche Studien lassen vermuten, dass ein hypermethyliertes *EDNRB*-Gen einen Anteil an der Entstehung von Leukämien und Prostatakarzinomen hat (Jeronimo et al., 2003; Pao et al., 2001).

Annexin2 kodiert in der DNA ein calciumbindendes Protein, dessen Fehlen im Promotorbereichen von einigen Prostatakarzinomen nachgewiesen wurde (Chetcuti et al., 2001). Darum ist es interessant im hier näher untersuchtem Kollektiv einer näheren Betrachtung unterzogen zu werden.

RAR beta (Retinoic acid receptor beta) ist ein weiteres Tumorsuppressorgen, das bislang häufig auf epigenetische Promotorhypermethylierung untersucht wurde und seit dem mit dem Prostatakarzinom in Zusammenhang gebracht wurde (Jeronimo et al., 2004).

Reprimo ist ein Zellzyklusregulatorgen, das neuerdings mit der Entstehung von Prostatakarzinomen in Verbindung gebracht wird (Sato et al., 2003; Zhang et al., 2002).

Tig1 (Tazarotene-induced gene 1) ist ein Tumorsuppressorgen, dass bei Leukämien aber auch bei Prostatakarzinomen von Bedeutung ist (Tokumaru et al., 2004; Youssef et al., 2004).

Da auch in benignen Veränderungen der Prostata geringe Anteile an hypermethylierter DNA festgestellt werden konnten, wurde eine quantitative, methylierungsspezifische PCR (Q-MS-PCR) als Untersuchungsmethode ausgewählt. Als Referenzgen, dessen gesamtes PCR-Produkt nicht methylierungsspezifisch amplifiziert wird, wurde das *ACTB*-Gen quantifiziert und in ein Verhältnis zu dem dann untersuchten Gen gebracht.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Benutztes Gerät	Herstellerfirma
Analysenwaage BP 2100 S	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Gel-Dokumentationsanlage mit Kamera Classic UNO	Intas, Göttingen, Deutschland
Horizontalelektrophoresekammer Sub- Cell GT Basic	Biorad Laboratories, Hercules, California, USA
Mikroskop Olympus BX 41 TF	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrotom SM 2000R	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Mikrozentrifuge Sigma 4-K15	Sigma- Aldrich, Seelze, Deutschland
8- Kanal-Pipette (1-10 μ l)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Transferpipette digital (1-10 μ l, 2-20 μ l, 10- 100 μ l, 20- 200 μ l, 100-1000 μ l)	Brand, Wertheim, Deutschland
UV-Photometer Ultraspec 3000 mit Thermo Printer	Pharmacia Biotech, Cambridge, England Seiko Instruments Inc. Chiba, Japan
ABI-Prism 7900 HT	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Heiz-ThermoMixer HTML-133	HLC Haep Labor Consult, Bivenden, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

Mit Ausnahme des UV-Photometers erfolgte die Benutzung der oben genannten Geräte mit der freundlichen Genehmigung des Instituts für Pathologie, Universität Bonn. Das Erstgenannte wurde von der Arbeitsgruppe Bastian, Urologie, Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterialien

Benutztes Material	Herstellerfirma
Absolute QPCR-Seal	ABgene, Epsom, England
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Messpipetten (10 ml, 20ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Monovette-S EDTA 9 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermo-Fast 384-Well-PCR Platten	ABGene, Epsom, England

Tabelle 5: Labor und Verbrauchsmaterialien

2.1.3. Chemikalien

Alle der unten genannten Chemikalien wurden in Analysequalität und im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad erworben. Sie wurden nach den Herstellervorschriften gelagert.

Benutzte Chemikalien	Herstellerfirma
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Deionisiertes Wasser	Millipore, Molsheim, Frankreich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
DEPC-Wasser	Ambicon, Austin, Texas, USA
DNA-Längenstandard 10 bp	Invitrogen, Paisley, England
Entellan	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Deutschland
FKS hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Coelbe, Deutschland
Fluoreszenzfarbstoff GelStar	Biozym Scientific, Oldendorf,
Hydrochinon	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
ITS-Supplement	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Natriumbisulfit	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA
Pen-Strep	Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories, Coelbe, Deutschland
TRIS- Hydrochlorid (TRIS-HCL)	Fluka, Buchs, Schweiz
Xylol	VWR, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: Chemikalien

2.1.4. Lösungen

Benutzte Lösung	wie folgt angesetzt
1% DEPC-Wasser	1 ml DEPC in 1000 ml entionisierten Wasser gelöst,
10 M NaOH	10 M NaOH in DEPC-Wasser gelöst, frisch angesetzt
3 M NaOH	3 M NaOH in DEPC-Wasser gelöst, frisch angesetzt
1 mM Tris-HCl	1 mM Tris-HCl in DEPC gelöst
Ammoniumacetat	10 M Ammoniumacetat in DEPC-Wasser gelöst
Bisulfitlösung	600 µl NaOH (10 M) 750 µl 10 mM Hydrochinon 6,1 mg Natriumbisulfit in 12 ml DEPC-Wasser unter sanftem Schütteln gelöst, frisch angesetzt
Hydrochinonlösung	10 mM Hydrochinon in 10ml DEPC-Wasser gelöst, frisch angesetzt
TBE (10x)	1 M Tris-HCL 1M Borsäure 20 mM EDTA ph8 in 1000 ml entionisiertem Wasser

Tabelle 7: Lösungen

2.1.5. Kits

Die folgenden Kits wurden nach den entsprechenden Herstellervorschriften gelagert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Aliquots hergestellt.

Kit	Hersteller
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAex II Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	ABGene, Epsom, England

Tabelle 8: Kits

2.1.6. Software

Programm	Hersteller
SPSS 11.1	SPSS inc., Chicago, Illinois, USA
MethPrimer	http://www.ucsf.edu/urogene/methprimer (Li and Dahiya, 2002)
MS Office 2000	Microsoft, Seattle, USA
Primer Express 2.0	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Prostate Gene Database	http://www.ucsf.edu/pgdb (Li and Dahiya, 2002)
SDS Software 2.2	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

Tabelle 9: Software

2.1.7. Nukleotide, Enzyme und Primer

Material	Hersteller
SssI CpG Methylase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
tRNA aus Streptokokkus cerevisiae	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

Tabelle 10: Nukleotide

Gen	5`-Primersequenz-3`
<i>APC</i>	
M Fwd.	GAG GGT ATA TTT TCG AGG GGT AC
M Rev.	AAT AAA AAA CGC CCT AAT CCG
<i>GSTP1</i>	
M Fwd.	GTC GTG ATT TAG TAT TGG GGC
M Rev.	CTA ATA ACG AAA ACT ACG ACG ACG
<i>MDR1</i>	
M Fwd.	CGT TGT TAG ATT TTT AAT TTT GTT TTC
M Rev.	CCA ACT ACT CTA ACC GCG AT
<i>PTGS2</i>	
M Fwd.	TTT TTT TCG GTA TTT TAT TTA AGG C
M Rev.	AAA CGC ACA AAT TTC CGC
<i>Annexin2</i>	
M Fwd.	TTC GTT AGT TGG CGG TTT ATC
M Rev.	CGA CTC TAC TCA ACA TTT AAA AAC G
<i>Reprimo</i>	
M Fwd.	TTT AGG GAT TTT CGA AAG TAG AGC
M Rev.	GAA TCC GAA AAA TAA AAA AAC GAC
<i>EDNRB</i>	
M Fwd.	GGT TAC GCG GGG GAA GAA AAA TAG TTG
M Rev.	ATA CCG CCC GCA ACC TCT TCG
<i>TIG1</i>	
M Fwd.	GTA GTA CGG GCG GGT CGC
M Rev.	GAC ATC GCC TCC GCA ACG
<i>ACTB</i>	
M Fwd.	TGG TGA TGG AGG AGG TTT AGT AAG T
M Rev.	AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA
<i>RARbeta2</i>	
M Fwd.	CGA GAA CGC GAG CGA TTC
M Rev.	CAA ACT TAC TCG ACC AAT CCA ACC

Tabelle 11: Primer die bei dieser Studie untersucht wurden mit ihrer Nukleotidsequenz

Die Primer wurden von Genbank-Einträgen (*APC*: U02509; *GSTP1*: XO8058; *MDR1*: X58723; *PTGS2*: AF044206; *ACTB*: Y00474; *Annexin2* ;*Reprimo*) selbst mit Hilfe der Programme MethPrimer und Primer-Express abgeleitet; bzw. aus der Literatur übernommen (*RARBeta2*: AF167483 (Jeronimo et al., 2004); *TIG1*: (Tokumaru et al., 2004); *EDNRB*: AF114163 (Tsutsumi et al., 1999)).

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen, Paisley, England mit dem Reinheitsgrad „desalted“ bezogen. Die Primer wurden in 1 mM Tris-HCL gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Prostatakarzinomzelllinien PC3, BPH1, LNCAP und DU-145 wurden von der “Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur” (Braunschweig, Deutschland) bezogen. PrEC1 und PrEC2 stammen von der Firma Cambrex, Walkersville USA.

	Herkunft der Zelllinien
DU-145	ZNS-Metastase eines 69-jährigen
LNCaP	Supraklavikuläre Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen
PC3	Knochenmetastase eines 62-jährigen nach Androgendeprivation
BPH1	Epitheliale Prostatazellen eines 68-jährigen mit BPH, Zellen wurden mit „SV-40 large T-Antigen“ immortalisiert
PrEC1	Epitheliales Gewebe aus einem gesunden Prostatapräparat eines 19-jährigen Kaukasiers
PrEC2	Epitheliales Gewebe aus einem gesunden Prostatapräparat eines 28-jährigen Kaukasiers

Tabelle 12: Zelllinien, die zusammen mit den Proben der Prostatakarzinome und BPHs auf ihr Methylierungsmuster untersucht wurden und deren Herkunft.

2.1.8. Probenmaterial

Alle Karzinomproben wurden durch radikale Prostatektomien, die untersuchten BPH-Proben durch retropubische Prostatektomien nach Millin oder radikale Zystektomien

in den Jahren von 1994 bis 1999 gewonnen. Sämtliches Material ist aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Präparateblöcken der Urologischen Klinik und des Pathologischen Instituts der Universität Bonn entnommen worden. Die klinisch-pathologische Untersuchung und die Durchführung des Stagings (TNM) und des Gradings (WHO, Gleason) der Proben wurde vom Pathologischen Institut ausgeführt. Diese Parameter sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Die hier durchgeführten Studien wurden auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes von 1983, den entsprechenden gesetzlichen Regelungen und den Vorgaben der Universität Bonn durchgeführt. Jeder der Patienten, dessen Zellmaterial hier molekularbiologisch aufgearbeitet und untersucht wurde, hat hierzu sein schriftliches Einverständnis gegeben. Die zur Identifizierung der Patienten nötigen Daten wurden nach den Vorgaben der Ethikkommission anonymisiert.

		PCA-Patienten	BPH-Patienten
Alter	Mittelwert	62,71	66
	Spannweite	51-72	50-79
Präoperativer PSA- Wert (ng/ml)	Mittelwert	16,84	9,88
	Spannweite	1,74-80	2,8-21,62
TNM- Stadium	1	1 (1,25%)	
	2	36 (45%)	
	3	41 (51,25%)	
	4	2 (2,5%)	
Pathologisches Stadium	Organbechränkt	35 (43,75%)	
	Lymphknotenmetastase	11 (20%)	
	Samenblaseninfiltration	20 (25%)	
	infiltrierter Schnittrand	28 (35%)	
Grading WHO	1b	1 (1,25%)	
	2a	11 (13,75%)	
	2b	36 (45%)	
	3a	24 (30%)	
	3b	8 (10%)	
Gleason Score	3	2 (2,5%)	
	4	7 (8,75%)	
	5	7 (8,75%)	
	6	26 (32,5%)	
	7	15 (18,75%)	
	8	12 (15%)	
	9	7 (8,75%)	
	10	4(5%)	
Rezidiv	Anzahl der Beobachtungen	56	
	Beobachtungszeitraum (Tage)	0-2168	
	Vorhandensein eines PSA-Rezidivs	31 (55,31 %)	
	Tage bis zum Rezidiv	366,48	
	Spannweite (Tage)	18-1639	
	Mittlerer Zeitraum bis Rezidiv (Tage)	367	
	Median bis Rezidiv (Tage)	217	

Tabelle 13: Klinisch pathologische Parameter des Patientenkollektivs und deren prozentuale Verteilung

Zur Herstellung von Positiv-, Negativkontrollen und Verdünnungsreihen, wurde Leukozyten-DNA, aus dem Blut von freiwilligen, jungen erwachsenen Männern, benutzt.

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung von DNA aus paraffinierten Proben

Anhand von katalogisierten Schnitten der betroffenen Proben wurde der für diese Studie am besten geeignete Paraffinblock ausgewählt. Hierfür war besonders die Größe und die Morphologie der darin fixierten Karzinome entscheidend. Diese Blöcke wurden in einer Serie von 10 etwa 15 µm dicken Scheiben geschnitten. Zu Beginn und Ende einer Serie wurde ein 7,5 µm starker Schnitt angefertigt, auf Objektträgern fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Dazu wurde die Kernfärbung 5 Minuten lang mit Hämatoxylin durchgeführt, der überschüssige Farbstoff mit destilliertem Wasser entfernt und mit Eosin eine Gegenfärbung aufgebracht. Nach weiterem kurzen Spülen mit destilliertem Wasser wurde das Präparat in aufsteigender Ethanolreihe entwässert und zuletzt mit Xylol behandelt. Die Fixation erfolgte mit Entellan. Die restlichen Schnitte wurden ebenfalls auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 55°C getrocknet.

Von in der Diagnostik des Prostatakarzinoms erfahrenen Pathologen wurden auf den gefärbten Schnitten die Karzinom- oder BPH-haltigen Areale markiert, die dann als Matrize dienten. Die relevanten Gebiete wurden anschließend mit einem Skalpell von den 15 µm starken Schnitten abgehoben und in einem Safe-Lock Tube gesammelt. Durch dieses Procedere kann ein Reinheitsgrad an erwünschtem Zellmaterial von etwa 70% erreicht werden.

Um die so erhaltenen Fragmente zu entparaffinieren wurden diese zweimal für jeweils 10 Minuten mit Xylol und daraufhin zweimal für wiederum jeweils 10 Minuten mit 96% Ethanol gespült. Anschließend fand eine Spülung mit DEPC-Wasser statt.

Das entparaffinierte Prostatagewebe wurde mit dem Qiagen DNA Mini Kit entsprechend den Herstellervorschriften behandelt und die DNA aufgereinigt: Das Material wurde mit ATL-Puffer und Proteinase K versetzt und 18 Stunden lang auf einem Heiz-Thermo-Mixer bei 55 Grad lysiert. Nach Hinzufügen von AL-Puffer und 100% Ethanol, wurde die Lösung auf eine Silikonsäule gegeben und zentrifugiert. Proteine und RNA wurden durch den Einsatz von Waschpuffern (AW1- und AW2-Pufferlösungen) von der an die Säule gebundenen DNA entfernt. Nach Elution in AE-Puffer wurde ein Aliquot entnommen, das weiter zur photometrischen Reinheits- und

Konzentrationsbestimmung verwendet wurde. Die dabei eingesetzten Wellenlängen von 260 und 280 nm erlaubten, mit dem durch ihre 260/280-Ratio erlangten Wert, den Reinheitsgrad der isolierten DNA zu bestimmen. Nimmt dieses Verhältnis Werte zwischen 1,8 und 2,0 an, so ist das isolierte Material frei von durch Proteine und RNA hervorgerufene Verunreinigungen. Die Stammlösung wurde bei -20°C eingefroren und gelagert.

2.2.2. Zellkultur

Im urologischen Forschungslabor der Universität Bonn führte Frau Doris Schmidt die Zellkulturarbeiten durch. Dabei wurden die Zelllinien nach Herstellervorschrift in RPMI 1640, in 10% fetalem Kälberserum und 35 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zur weiteren DNA-Isolierung wurde das Material in PBS gelöst und mit dem DNA Mini Kit aufgereinigt. Anschließend wurde die gewonnene DNA bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Kontrollproben

Die Kontrollproben wurden aus dem Blut gesunder Freiwilliger erstellt. Dieses Blut wurde unter Zuhilfenahme von 9 ml EDTA Röhrchen entnommen. Daraufhin wurde der sogenannte Buffy-Coat unter Zentrifugation (1900g, 4°C) gewonnen. Dabei handelt es sich um die isolierte Leukozytenfraktion, deren DNA mit dem Qiagen DNA Mini Kit extrahiert wurde. Bei den weiteren Untersuchungen wurde komplett unmethylierte, wie auch vollständig methylierte DNA benötigt. Die DNA der gewonnenen Leukozyten bei Gesunden kann als Negativkontrolle herangezogen werden. Um eine methylierte Positivkontrolle zu erhalten, wurde eine SssI-CpG-Methylase verwendet, die von S-Adenosyl-Methionin eine Methylgruppe auf Cytosin in CpG-Dinukleotiden überträgt. Die so erhaltenen Negativ- und Positivkontrollen wurden nach Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert.

2.2.4. Bisulfitbehandlung

Im Gegensatz zur klassischen PCR, bei der methylierte und nicht-methylierte DNA gleichermaßen amplifiziert wird und so das Methylierungsmuster verloren geht, besteht die Möglichkeit, dieses bei der sogenannten methylierungsspezifischen PCR zu erhalten und zu beurteilen. Essentieller Bestandteil des letztgenannten Verfahrens ist die Bisulfitbehandlung. Dabei macht man sich das unterschiedliche

von so behandelter DNA, wurden die hier verwendeten Proben maximal 6 Wochen bei -20°C vor der Durchführung der PCR gelagert.

2.2.5. Primerdesign

Der Methylierungsstatus hypermethylierter Gene wurde in der Nähe der Transkriptionsstartstelle (-200 bis +50bp) untersucht. Dabei ist für das Primerdesign zu beachten, dass sämtliche nicht-methylierte Cytosine zu Uracil deaminieren, was die Komplexität des Genoms vermindert. Die Spezifität des Annealing ist reduziert und die PCR-Effizienz sinkt (Trinh et al., 2001). Des weiteren wird ein großer Teil der DNA (84-96%) durch die Bisulfitbehandlung zerstört (Grunau et al., 2001; Raizis et al., 1995). Außerdem ist die hier verwendete DNA durch die Fixierung in Formalin und die Einbettung in Paraffin im Mittel auf Stücke von 200-500 Basenpaaren bereits stark fragmentiert.

Die Primer einer methylierungsspezifischen PCR sollten eine Länge von 20 bis 25 bp nicht überschreiten. Die Sequenz sollte mindestens zwei CpGs aufweisen, eine davon in den letzten drei am 3'Ende gelegenen Basen, da dies die Spezifität der Primer erhöht. Das PCR-Produkt sollte dabei nicht mehr als 150 Basenpaare umfassen, da sich gezeigt hat, dass mit zunehmender Sequenzlänge die PCR-Effizienz insbesondere durch die DNA-Fragmentierung während der Bisulfitbehandlung sinkt. Die in dieser Studie verwendeten Primer, die diese Rahmenbedingungen erfüllen, wurden mit dem Computerprogramm Methprimer (Li and Dahiya, 2002) konstruiert und deren Sekundärstrukturen mit Hilfe des Programms PrimerExpress auf Fehler überprüft.

Ergänzend zu den zu untersuchenden Genen wurde mit der quantitativen methylierungsspezifischen PCR (Q-MS-PCR) ein weiteres Gen amplifiziert, das als Referenzgen (*ACTB*) in Bezug zu den anderen Genen betrachtet werden sollte. Die Primersequenz von *ACTB* enthält keine CpGs und somit wird jede Probe unabhängig von ihrem Methylierungsmuster amplifiziert. Dies ermöglicht die Bestimmung der in der PCR eingesetzten DNA-Menge (Eads et al., 2000; Jeronimo et al., 2001; Zhou et al., 2004).

2.2.6. Quantitative methylierungsspezifische PCR (Q-MS-PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird DNA amplifiziert. Dazu wird die eingesetzte DNA (Template) zyklisch denaturiert, Forward- und Reverse-Primer lagern sich an (Annealing) und durch eine Polymerase erfolgt eine Verlängerung in 5'- nach 3'-Richtung (Elongation). Bei 40 maliger Wiederholung dieses Prozesses wird bei jedem der einzelnen Zyklen jeweils die DNA-Menge verdoppelt.

Die Q-MS-PCR unterscheidet sich von der klassischen PCR durch die Messung eines Fluoreszenzsignals während der PCR-Zyklen. In dieser Studie wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser Farbstoff lagert sich an doppelsträngige DNA und es entsteht ein starkes Fluoreszenzsignal. Dieses ist proportional zur DNA-Konzentration und somit ist die Quantifizierung der DNA-Menge möglich (siehe Abbildung 8 und 9).

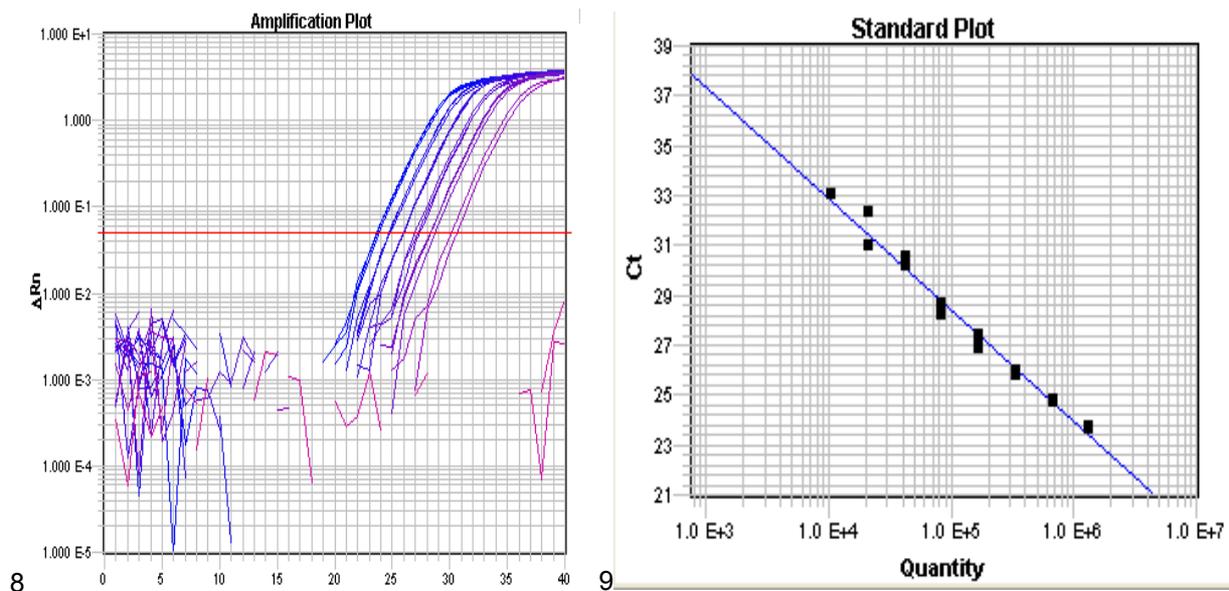


Abbildung 8: Amplifikationskurve einer Verdünnungsreihe; Abbildung 9: Standardkurve

Zu 8: die horizontale Linie ist der Messpunkt an dem die Zunahme der Fluoreszenz im linearen Bereich liegt. Der Schnittpunkt einer Amplifikationskurve mit dieser Geraden wird als Ct-Wert bezeichnet.

Zu 9: Die Kopienzahl wird gegen den Ct-Wert aufgetragen. Die diagonale Gerade zeigt eine aus Produkten mit bekannter Kopienzahl berechnete Standardkurve. Mit Hilfe dieser Kurve ist es möglich, jeder Probe mit unbekannter Kopienzahl einen quantitativen Wert zuzuordnen.

Des weiteren ermöglicht der Farbstoff SYBR Green I die Schmelzpunktanalyse. Dieser Parameter gibt an, bei welchen Temperaturen die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen aufschmelzen und somit die Fluoreszenz von SYBR Green I sinkt.

Jedes Produkt hat abhängig von seiner Größe und seiner Sequenz einen charakteristischen Schmelzpunkt. Primer-Dimere, die in der Regel etwa 40-50 Basenpaare enthalten, schmelzen bei niedrigeren Temperaturen und in einem oft größeren Temperaturintervall als die gewünschten PCR-Produkte. Man versucht die PCR so zu optimieren, dass kein Peak bei Dimeren und ein hoher Peak bei Produkten festgestellt wird (siehe Abbildung 10).

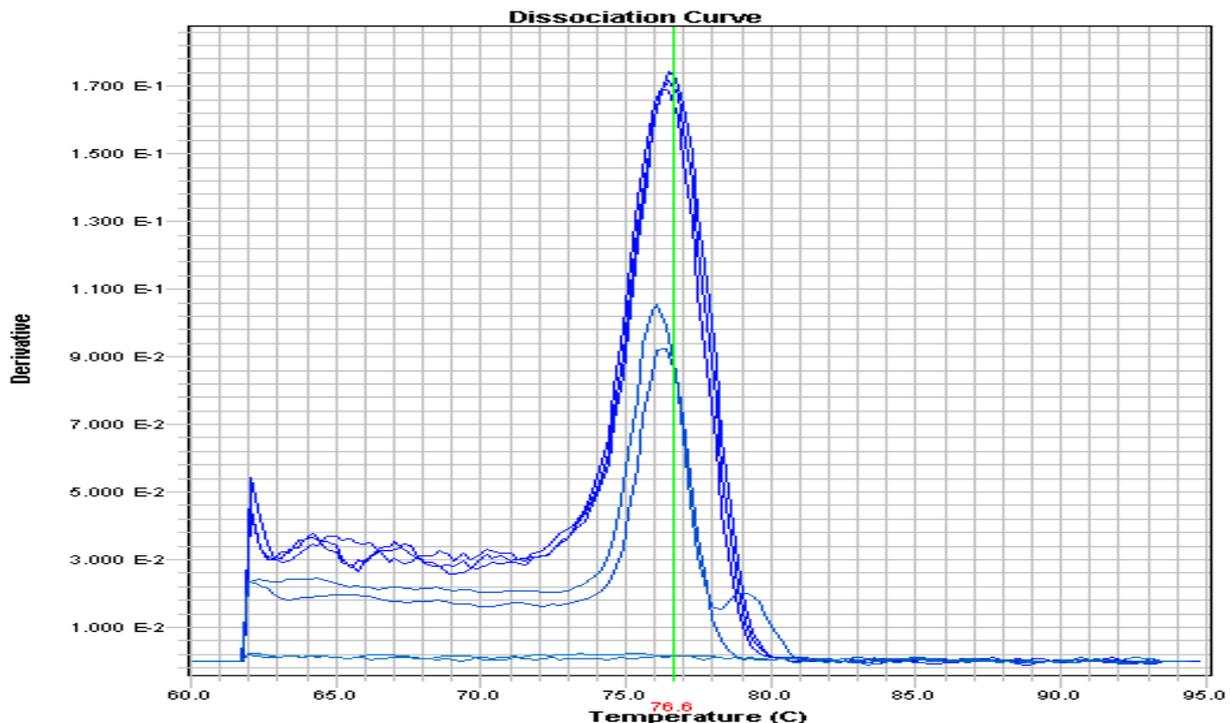


Abbildung 10: Schmelzpunktanalyse

In dieser Abbildung ist die Intensität der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Der größte Peak zeigt an, dass bei 76,5°C der Schmelzpunkt der untersuchten PCR-Produkte liegt. Der kleinere Peak bei 75,9°C zeigt das Vorhandensein kleiner Mengen an Primer-Dimeren an. Die flache Linie ohne jegliche Peaks zeigt den Verlauf einer Probe ohne Produkt an.

Die Durchführung der PCR fand mittels eines ABI Prism 7900HT statt. Zur Untersuchung der Proben auf einer 384-Well-Platte, wurde die mit Bisulfit behandelte DNA mit Aene SYBR Green Master Mix und Forward und Reverse Primer auf 10 µl versetzt (siehe Tabelle 14). Die PCR erfolgte für jede Probe in einer Dreifachbestimmung, deren Ergebnisse in der Auswertung gemittelt wurden. Zur Berechnung einer Standardkurve, mussten in jedem Experiment zusätzlich zu Positiv- und Negativ-Kontrolle auch acht Standardproben mit vordefinierter Kopienzahl amplifiziert werden. Zur Kontaminationskontrolle wurden Proben ohne DNA (No-Template-Control) mituntersucht.

Gen	Mischung	PCR-Profil
<i>ACTB</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3,5µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 64°C 45 s
<i>Annexin2</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 66°C 45 s 4. Kettenverlängerung: 75°C 10 s
<i>APC</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 62°C 45 s
<i>EDNRB</i>	1µl Bisulfit DNA 1,25pmol Reverse Primer 1,25pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3,5µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 66°C 45 s
<i>GSTP2</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 62°C 45 s 4. Kettenverlängerung: 75,5°C 10 s
<i>MDR1</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 62°C 45 s
<i>PTGS1</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 62°C 45 s
<i>RARbeta</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 66°C 45 s
<i>Reprimo</i>	1µl Bisulfit DNA 2,5 pmol Reverse Primer 2,5 pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 61°C 45 s
<i>TIG1</i>	1µl Bisulfit DNA 1,25pmol Reverse Primer 1,25pmol Forward Primer 5µl SYBR-Green Master Mix 3,5µl DEPC-Wasser	1. Enzymaktivierung: 95°C 15 min 2. Denaturierung: 95°C 10 s 3. Primeranheftung: 64°C 45 s

Tabelle 14: PCR-Spezifikation der einzelnen Gene. Es sind die Primer mit ihren dazugehörigen Master Mix Mischungsverhältnissen und den für die PCR optimierten Thermoprofilen dargestellt.

Die Schritte 2 bis 3 (siehe Tabelle 14) wurden 40 mal wiederholt. Um die Spezifität der Produkte zu überprüfen und das Vorhandensein von Primer-Dimeren auszuschließen, wurden im Anschluss Schmelzkurvenanalysen durchgeführt.

2.2.7. Gelelektrophorese

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Spezifität der PCR ist die Durchführung einer Gelelektrophorese. Um DNA-Fragmente aufzutrennen wurden diese auf einem 3%igen Agarosegel aufgebracht und mit Gelstar, einem Fluoreszenzfarbstoff, sichtbar gemacht. Die Agarose wurde in TBE aufgekocht und dann in eine Form gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden in die vorgeformten Vertiefungen die Proben mit 2 µl DNA-Ladepuffer und 1x Gelstar zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und nach 20 Minuten wurde das Gel unter einer UV-Lampe photographiert (siehe Abbildung 11).

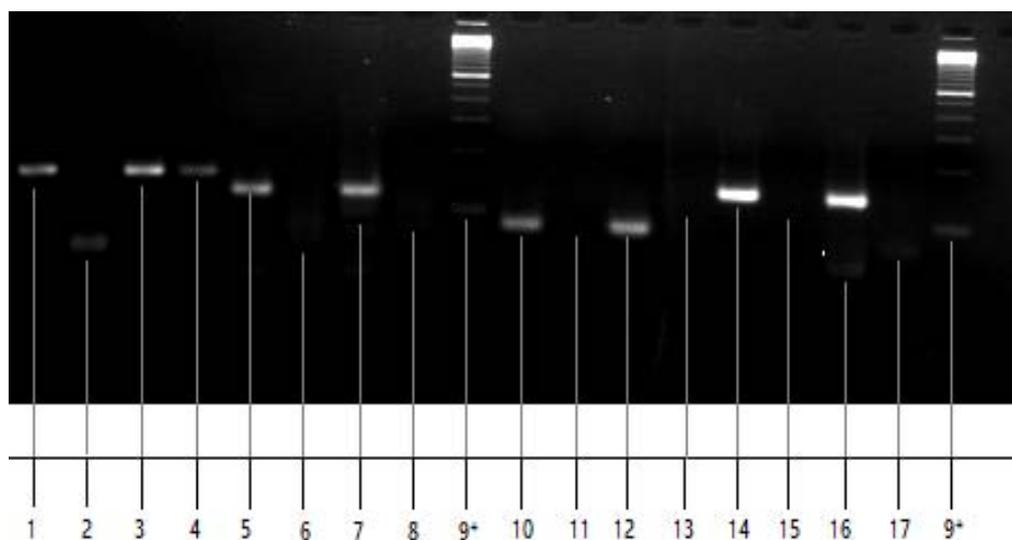


Abbildung 11: Photographie einer Gelelektrophorese

Auf der Abbildung sind die in der PCR bei 62° Annealingtemperatur amplifizierten Gene gegen eine sogenannte „Basen-Leiter“ (9*) aufgetragen. Die erste und die darauf folgende Bande sind jeweils einem Gen zugehörig. Dabei ist der ersten Bande ein Produkt zugeordnet (in diesem Fall SSSI), während in der zweiten Bande eine No template control als Kontrolle lief. Findet sich in der zweiten Bande ein Produkt, so handelt es sich dabei um Primer-Dimere und die PCR muss für dieses Gen weiter optimiert werden, 1+2 *TIG1*; 3+4 *Annexin2*; 4+5 *EDNRB*; 5+6 *RARbeta2*; 7+8 *GSTP1*; 16+17 *Reprimo* (alle nicht optimiert) 10+11 *APC*; 12+13 *PTGS2*; 14+15 *MDR1* (alle optimiert)

2.2.8. Berechnung der Kopienzahl

Die Kopienzahl unbekannter Proben kann mit der SDS 2.2 Software automatisch bestimmt werden. Um die so erhaltenen Resultate weiter bearbeiten zu können, wurden diese in ein MS-Excel-Arbeitsblatt exportiert. Es wurde der sogenannte „Normalized Index of Methylation“ (NIM) bestimmt. Dieser wird als das Verhältnis der Kopienzahl des Zielgens zu der Kopienzahl eines Referenzgens, in dieser Studie *ACTB* (Zhou et al., 2004) definiert:

$$\text{NIM} = \frac{\text{Zielgen Probe} / \text{Zielgen Kalibrator}}{\text{ACTB Probe} / \text{ACTB Kalibrator}}$$

Ein NIM von 0 bedeutet dabei, dass bei dem untersuchten Gen keine Methylierung nachgewiesen werden konnte. Nimmt er jedoch Werte an, die größer als 0,99 sind, so ist das Zielgen vollständig methyliert. Der NIM kann Werte annehmen die größer als 1 sind. Das Referenzgen *ACTB* ist dann relativ zum Zielgen deletiert (Yegnasubramanian et al., 2004). Die in dieser Studie erhaltenen Messwerte wurden mit Hilfe eines Microsoft Visual Basic Macros in Graustufen kodiert und so zur Darstellung gebracht.

2.2.9. Statistische Auswertung

Die gewonnen Daten und die aus den Patientenakten entnommenen klinischen Parameter wurden mit dem Programm SPSS 11.5 statistisch ausgewertet. Dazu zählen das Alter der Patienten, das Vorhandensein von Samenblaseninfiltration und Lymphknotenmetastasen, der Status der Organkapsel und des chirurgischen Schnittrandes, das Grading nach Gleason, das TNM-Staging und Grading und das Vorhandensein eines PSA-Rezidivs und der Zeitraum in dem dieses aufgetreten ist. Um feststellen zu können, ob mit einem Cut-Off-Wert eine bessere Unterscheidung von PCA- und BPH-Proben möglich ist, wurden sogenannte „Receiver Operator Curve“ (ROC) Analysen durchgeführt. Jeder Messwert wird dabei als Cut-Off Punkt mit seiner Sensitivität und Spezifität berechnet. Ist die Summe dieser Werte am größten, so ist dies der Cut-Off-Punkt, an dem die Fläche unter der Kurve (AUC) maximal ist. Sollte dieser Wert größer sein als der Cut-Off-Wert, so sind die geprüften Proben in diesem Fall methyliert. Des weiteren wurden die Gene in UND-beziehungsweise ODER-Verknüpfungen auf ihre diagnostische Aussagekraft

untersucht. Anhand der NIM-Werte konnte eine Überprüfung auf Korrelationen mit den klinisch-pathologischen Parametern durchgeführt werden. Dazu wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mediantest verwendet. Mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests wurden das pT-Stadium, die Kapselperforation, ein organbeschränktes Wachstum, der Samenblasen- und der Lymphknotenbefall sowie das Vorhandensein eines Rezidivs auf eine Korrelation mit Genhypermethylierung geprüft. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve wurden die Proben auf signifikante Zusammenhänge zwischen Zeitraum des PSA-Rezidiv-freien Überlebens und Genhypermethylierungen beziehungsweise klinisch-pathologischer Parameter überprüft.

Das Alter der Patienten und der präoperative PSA-Wert wurden mit dem Spearman-Korrelationstest auf statistische Zusammenhänge erforscht. Jedes einzelne Gen aber auch Genkombinationen wurden mit den klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Dazu wurden der Fisher Exact Test als auch der Chi-Quadrat Test benutzt.

3. Ergebnisse

3.1. Probenmaterial

In dieser Studie wurde das Zellmaterial von 121 Patienten mit Prostatakarzinomen und den dazugehörigen pelvinen Lymphknoten vergleichend zu 27 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie untersucht. Die DNA konnte bei 90 der diagnostizierten Karzinome und allen Probanden mit einer BPH isoliert und bei -20°C gelagert werden. Bei den für die Q-MS-PCR vorbereitenden Schritte wurde die DNA von 10 der untersuchten Prostatakarzinom Präparate und bei einer der BPH-Proben nicht ausreichend oder nur in mangelhafter Qualität aufgearbeitet. Insgesamt standen Proben von 80 Prostatakarzinomen, 52 dazugehörigen Lymphknotenpräparaten aus den regionalen Lymphabflussgebieten der Prostata und 26 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie zur Untersuchung des Methylierungsstatus zur Verfügung.

3.1.1. Methylierungsmuster der Prostatazelllinien

In der DNA von nicht malignen Zelllinien, in diesem Fall BPH, PrEC1 und PrEC2 fanden sich nur Spuren von Methylierung, die unter Berücksichtigung des Cut-Off-Werts als unmethyliert betrachtet werden dürfen. Die Zelllinien PC3 und DU-145 sind in sechs von neun Fällen als methyliert anzusehen. Dabei sind bei PC3 lediglich die Promotoren von *Annexin2*, *Reprimo* und *TIG1* als unmethyliert detektiert worden. Bei DU-145 sind *Annexin2*, *APC* und *Reprimo* nicht methyliert, während bei LNCAP zwei der untersuchten Gene, *EDNRB* und *RARBeta2*, für das Merkmal der Methylierung als negativ beobachtet wurden (siehe Abbildung 12).

	Fälle (n)	Annexin2		APC		EDNRB		GSTP1		MDR1		PTGS2		RARbeta2		Reprimo		TIG1	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
BPH	26	0	0	13	50	23	88	4	15	8	31	4	15	9	35	5	19	3	12
PCA	80	3	4	64	80	80	100	74	93	64	80	54	68	76	95	47	59	77	96
Lymphknoten	52	2	3	0	0	52	100	6	9	4	8	15	28	5	10	47	90	11	21
- mit Metastasen	12	0	0	0	0	12	100	3	25	1	8	3	25	3	25	12	100	3	25
- ohne Metastasen	40	2	5	0	0	40	100	3	7	3	7	12	29	2	5	35	88	8	20

Tabelle 15: Häufigkeiten der Methylierung im benignem und malignem Prostata- und Lymphknotengewebe. Die einzelnen Gene sind mit der absoluten und relativen Häufigkeit des positiven Merkmals der Methylierungs bei BPH, PCA und Lymphknotenpräparaten aufgeführt.

Die durchschnittlichen Methylierungsquotienten (NIM) sind bei PCA-Proben höher als die, die in den dazugehörigen Lymphknotenmetastasen erreicht werden. Auch das BPH-Gewebe zeigt diesbezüglich eine weniger starke Ausprägung.

Weiterhin fällt auf, dass die Anzahl methylierter Genpromotoren der einzelnen Proben im Vergleich der Karzinome zu den BPHs deutlich erhöht ist (siehe Tabelle 16). Bei der Betrachtung der Tabelle ist insbesondere bei dem Promotor *EDNRB* zu bedenken, dass der graphischen Darstellung bei der Benutzung von sehr niedrigen Cut-Off-Werten Grenzen gesetzt sind, und Methylierung in diesem Fall nur unzureichend darstellbar ist.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Fallzahl (n)
PCA				1	2	7	20	29	19	2	80
BPH	1	6	5	5	7	2					26
Lymphknoten		1	28	17	7	1	1				55

Tabelle 16: Anzahl methylierter Gene in einer Probe: Aus der Tabelle wird deutlich, dass das Auftreten hypermethylierter Gene bei maligne entartetem Prostatagewebe häufiger ist als bei benignem Prostatagewebe (BPH).

Fall	Alter	praeoperativer PSA [ng/ml]	Annexin2	APC	EDNRB	GSTP1	MDR1	PTGS2	RARBeta	Reprimo	TIG1
bp1	64	n.v.			*						
bp2	60	n.v.			*						
bp3	60	n.v.			*						
bp5	78	n.v.			*						
bp49	50	n.v.			*						
bp59	61	n.v.			*						
bp60	72	5,96			*						
bp61	74	21,62			*						
bp62	54	n.v.			*						
bp63	51	14,40			*						
bp72	62	n.v.			*						
bp73	54	n.v.			*						
bp74	57	11,30			*						
bp75	63	n.v.			*						
bp77	79	9,31			*						
bp78	71	n.v.			*						
bp79	63	15,20			*						
bp81	78	4,70			*						
bp83	71	n.v.			*						
bp111	75	n.v.			*						
bp112	63	n.v.			*						
bp113	68	n.v.			*						
bp114	63	n.v.			*						
bp115	69	n.v.			*						
bp116	72	n.v.			*						
bp117	58	n.v.			*						



Abbildung 13: Graustufenskalierte Darstellung der BPHs; *=EDNRB ist rechnerisch positiv aber graphisch durch den niedrigen Cut-off-Wert nicht darstellbar. Je dunkler das zugeordnete Feld ist, desto stärker ist das Merkmal der Methylierung für die entsprechende BPH-Probe ausgeprägt.

Fall	Klinisch pathologische Parameter						Prostatakarzinom							Lymphknoten										
	Alter	pT-Stadium	Lymphknotenbefall	Organbeschränkt	Gleason Score	Präoperativer PSA [ng/ml]	Annexin2	APC	EDNRB	GSTP1	MDR1	PTGS2	RARBeta2	Reprimo	TIG1	Annexin2	APC	EDNRB	GSTP1	MDR1	PTGS2	RARBeta2	Reprimo	TIG1
pca65	70	2	nein	nein	7	12,3		*																
pca66	63	2	nein	ja	6	16,3		*																
pca67	74	3	nein	nein	7	15,8		*																
pca68	69	2	nein	ja	5	17,5		*																
pca69	66	2	nein	ja	5	3		*																
pca70	71	2	nein	ja	5	17,7		*																
pca72	70	3	nein	nein	9	116		*																
pca74	59	4	nein	nein	9	15,3		*																
pca76	62	2	nein	ja	6	3,2		*																
pca77	59	3	ja	nein	6	3,4		*																
pca79	62	2	nein	ja	6	39,8		*																
pca80	71	2	nein	ja	6	61,1		*																n.v.
pca81	56	3	nein	nein	6	2,7		*																n.v.
pca83	66	3	nein	nein	9	n.v.		*																
pca86	63	2	nein	ja	6	7,3		*																
pca87	52	3	nein	nein	6	15,8		*																
pca89	64	3	ja	nein	7	18		*																
pca90	55	3	ja	nein	10	2,7		*																
pca92	60	3	ja	nein	9	14,9		*																
pca93	66	3	nein	nein	6	25,5		*																n.v.
pca95	61	2	nein	ja	6	24,5		*																
pca99	66	2	nein	ja	6	10,2		*																
pca100	59	2	ja	ja	6	21		*																
pca101	67	3	ja	nein	9	93		*																
pca102	59	3	nein	nein	6	2,9		*																
pca103	65	2	nein	ja	5	7		*																n.v.
pca104	67	2	nein	ja	7	n.v.		*																
pca106	72	3	ja	nein	6	0,6		*																
pca112	63	1	nein	ja	6	13,4		*																
pca113	68	2	nein	ja	6	11,9		*																n.v.
pca114	64	4	nein	nein	7	24,8		*																n.v.
pca116	57	3	nein	nein	7	7,8		*																n.v.
pca117	70	3	nein	nein	7	1,5		*																
pca118	58	3	ja	nein	8	31,7		*																n.v.
pca119	67	2	nein	ja	8	6,9		*																
pca121	53	2	nein	ja	8	n.v.		*																n.v.



Abbildung 14: Graustufenskalierte Darstellung der NIM von PCA und Lymphknoten; *=EDNRB ist rechnerisch positiv aber graphisch durch den niedrigen Cut-off-Wert nicht darstellbar. Je dunkler das zugeordnete Feld ist, desto stärker ist das Merkmal der Methylierung für die entsprechende Karzinom-Probe ausgeprägt.

3.1.3. Methylierungsmuster der Lymphknoten

Obturatorische und iliakale Lymphknoten wurden bei allen radikalen Prostektomien entnommen. Bei der Aufbereitung wurde aus dem links- sowie dem rechtsseitigen Lymphabflussgebiet das vorhandene Material berücksichtigt und dann gemeinsam auf Methylierung untersucht. Zu 52 der Karzinompatienten konnte das dazugehörige Lymphknotengewebe isoliert werden (siehe Abbildung 14). Zu den restlichen 38 Fällen war entweder nicht ausreichend lymphatisches Gewebe zur Aufbereitung verfügbar oder dieses ist während der Bisulfit-Behandlung zu stark fragmentiert worden. Bei 19 dieser Lymphknoten konnten histologisch Metastasen nachgewiesen werden und es war möglich bei 12 davon mit Hilfe der Q-MS-PCR deren Methylierungsstatus festzustellen. In Abbildung 15 erkennt man eine Ähnlichkeit der Methylierungsmuster von dem Primärtumor und dem dazugehörigen lymphatischen Gewebe.

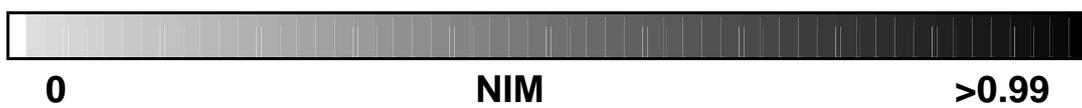
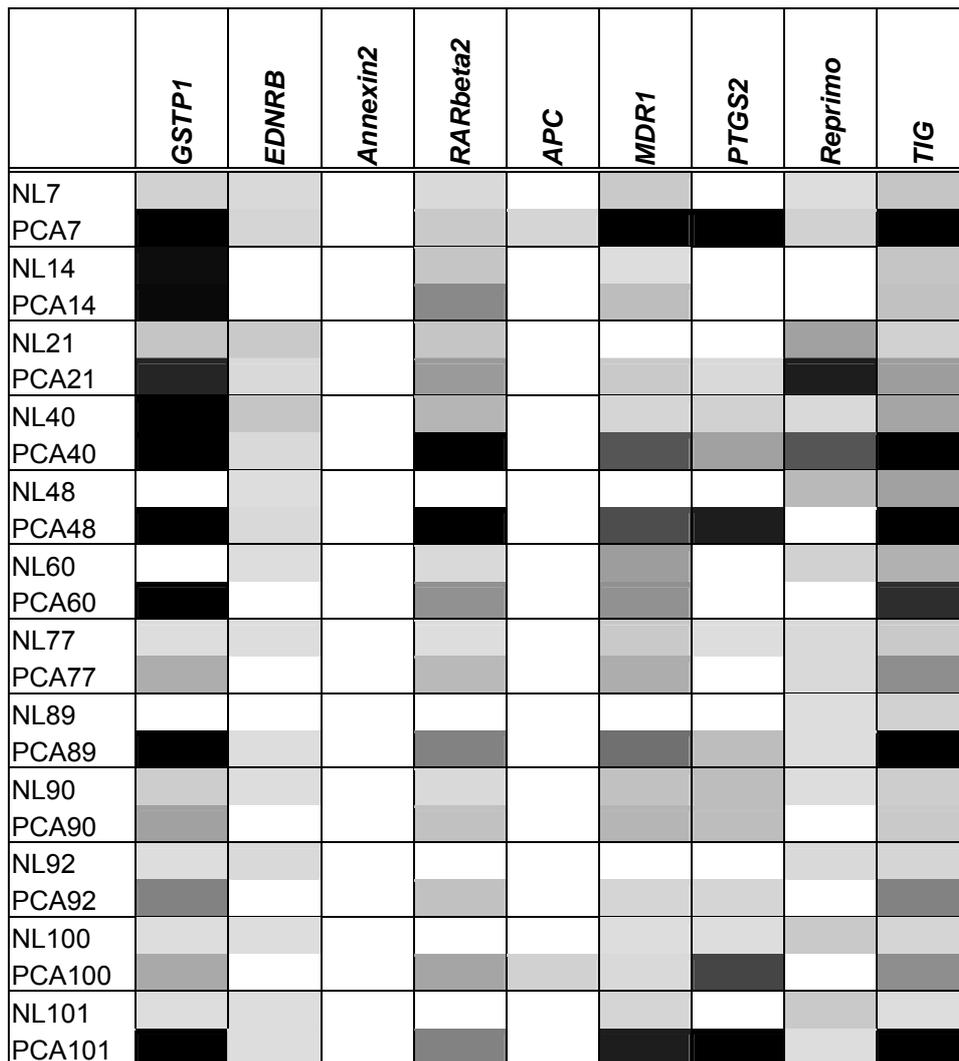


Abbildung 15: Methylierungsmuster von Primärtumor und dazugehöriger Lymphknotenmetastase. Dabei ist ersichtlich, dass Primärtumor und Lymphknotenmetastase häufig Ähnlichkeiten zeigen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Methylierungsmuster der Lymphknoten Unterschiede zwischen Lymphknotengewebe mit und ohne Metastasen deutlich machen kann. Die signifikanten Korrelationen sind in Tabelle 17 zusammengetragen.

	n	RARbeta2		GSTP1+ Reprimo		RARbeta2+ Reprimo		EDNRB+ RARbeta2		GSTP1+ RARbeta2+ Reprimo		Annexin/ RARbeta2		RARbeta2/ APC	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
NL-Metastase	13	3	27,27	2	18,18	3	27,27	3	27,27	2	18,18	3	27,27	3	27,27
keine NL-Met.	42	2	4,55	0	0	0	0	2	4,55	0	0	2	4,55	2	4,55
p-Wert		0,033		0,007		0,001		0,033		0,007		0,033		0,033	

Tabelle 17: Hypermethylierte Genmarker in Lymphknotenmetastasen. Dargestellt ist die Möglichkeit zwischen Lymphknotengewebe mit oder ohne Metastasen durch den Einsatz von Methylierungsmarkern zu unterscheiden.

Auch wurde untersucht, ob es einen signifikanten Zusammenhang vom Methylierungsstatus des Primärtumors und dem Vorhandensein von histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen gibt. Auch hier wurden die einzelnen Gene und alle mit ihnen möglichen Kombinationen auf Signifikanz getestet, wie es für ausgewählte Kombinationen in Tabelle 18 dargestellt ist.

Histologisch gesicherte NL-Metastasen	Fallzahl n	GSTP1+ APC		RARbeta2+ APC	
		n	%	n	%
Primär-PCA Methylierungsstatus: keine Metastase	61	19	31,15	17	27,87
Primär-PCA Methylierungsstatus: Metastase vorhanden	19	18	94,74	18	94,74
p-Wert		0,023		0,039	

Tabelle 18: Hypermethylierung von Prostatakarzinomen bei Vorhandensein von histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen. Es wird deutlich, dass bei GSTP1+APC sowie bei RARbeta2+APC ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus des Primärtumors und dem der Lymphknotenmetastase besteht.

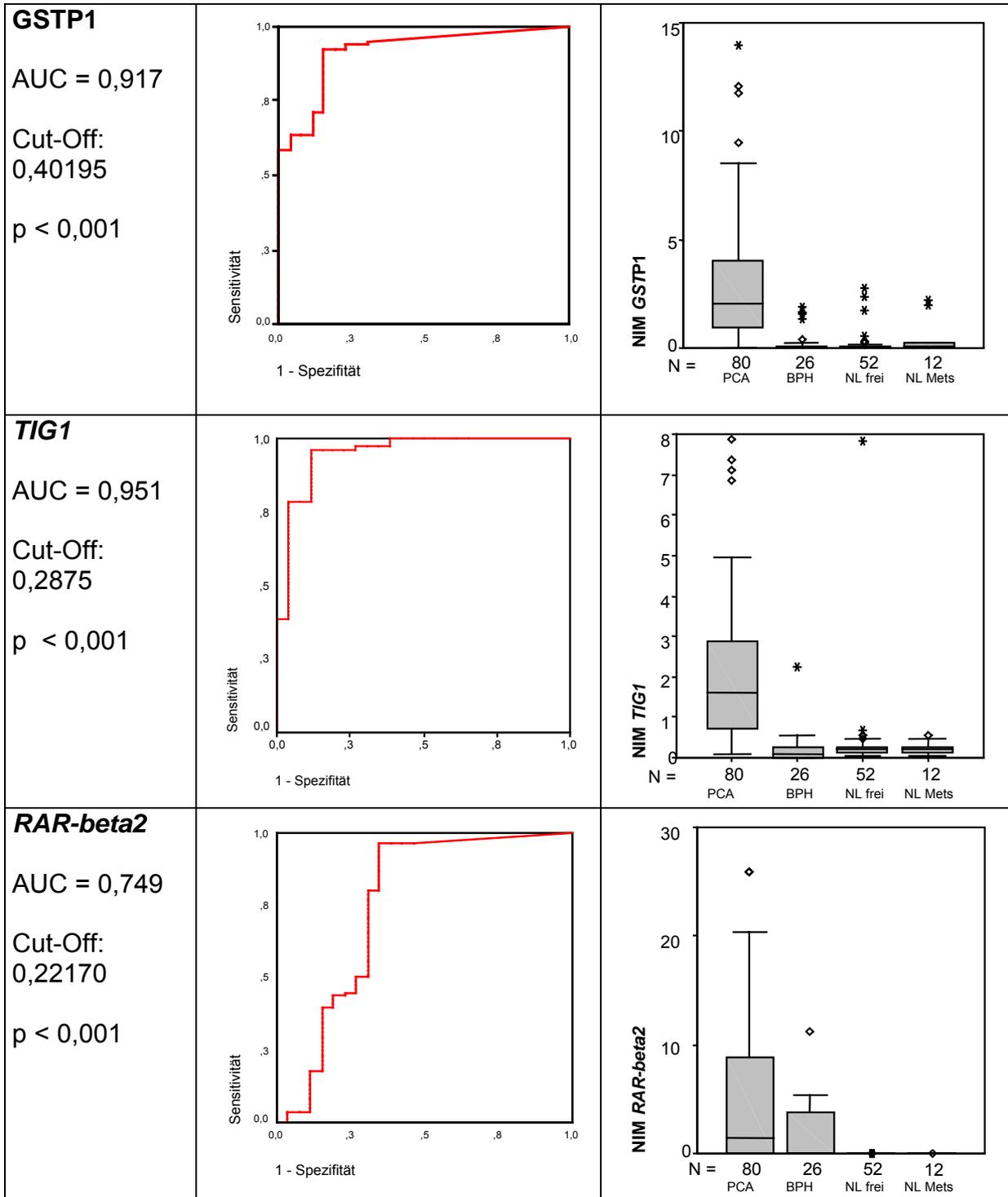
Bei Kombinationen von GSTP1 beziehungsweise RARbeta2 und APC findet sich Methylierung häufiger bei Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (siehe Tabelle 18). Hinsichtlich ihrer Sensitivität ist ihr diagnostischer Wert eher eingeschränkt.

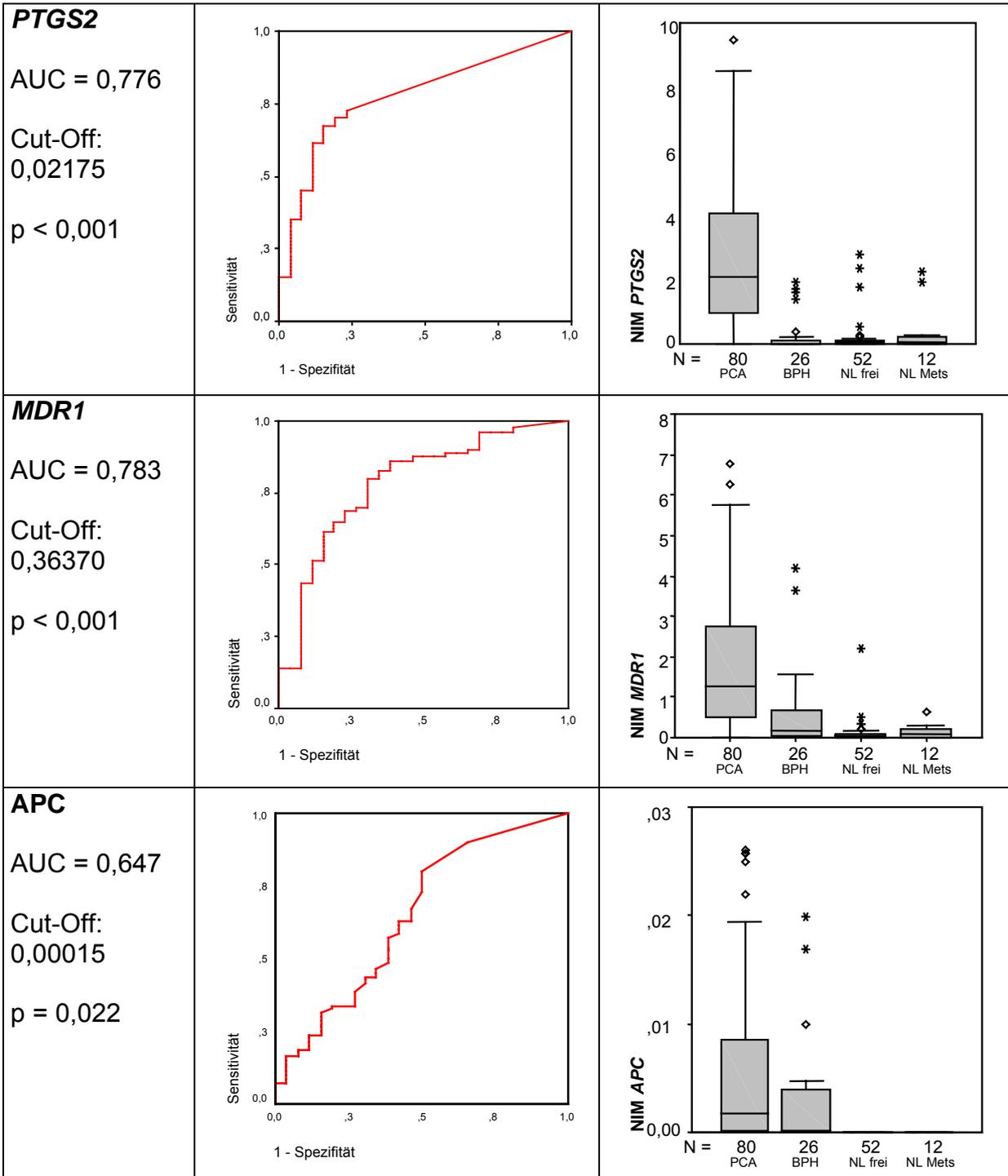
3.2. Sensitivität und Spezifität der Methylierungsmarker

Der NIM von methylierter DNA in Karzinomen, BPHs und Lymphknoten unterscheidet sich zum Teil erheblich. So ist dieser Parameter in den Karzinomen deutlich höher, als es dies bei den BPHs der Fall ist. Um festlegen zu können ab welchem Wert eine Probe als positiv und damit als hypermethyliert anzusehen ist, bedient man sich des Cut-Off Werts, der durch sogenannte ROC-Analysen (Receiver Operator Curve) bestimmt wird (siehe Abbildung 16). Außerdem werden die Spezifität, die Sensitivität sowie der positive (PPV) als auch der negative (NPV) Vorhersagewert berechnet (siehe Tabelle 19). Die Sensitivität gibt den Anteil der richtigerweise als positiv bewerteten von allen an einem Karzinom erkrankten Patienten an. Als Spezifität wird der Anteil der zu Recht als unmethyliert bewerteten Proben bezeichnet. Mit Hilfe des positiven Vorhersagewerts wird der Teil der richtigerweise als methyliert eingestuftene Gene an allen für dieses Gen als positiv eingestuftene Proben bestimmt. Der Anteil der zu Recht als negativ Befundeten an allen negativen Befunden, wird als negativer Vorhersagewert angegeben.

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
<i>TIG1</i>	96,3	88,5	96,3	88,5
<i>GSTP1</i>	92,5	84,6	94,9	78,6
<i>RAR-beta2</i>	95	65,4	89,4	81,0
<i>MDR1</i>	80	69,2	88,9	52,9
<i>APC</i>	80	50	87,7	44,8
<i>PTGS2</i>	67,5	84,6	93,1	45,8
<i>Reprimo</i>	58,8	80,8	90,4	38,9
<i>EDNRB</i>	100	11,5	77,7	100
<i>Annexin2</i>	3,8	100	100	25,2

Tabelle 19: Diagnostische Aussagekraft einzelner Genmarker. Zu jedem der in dieser Studie untersuchten Gene wurden Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV bestimmt.





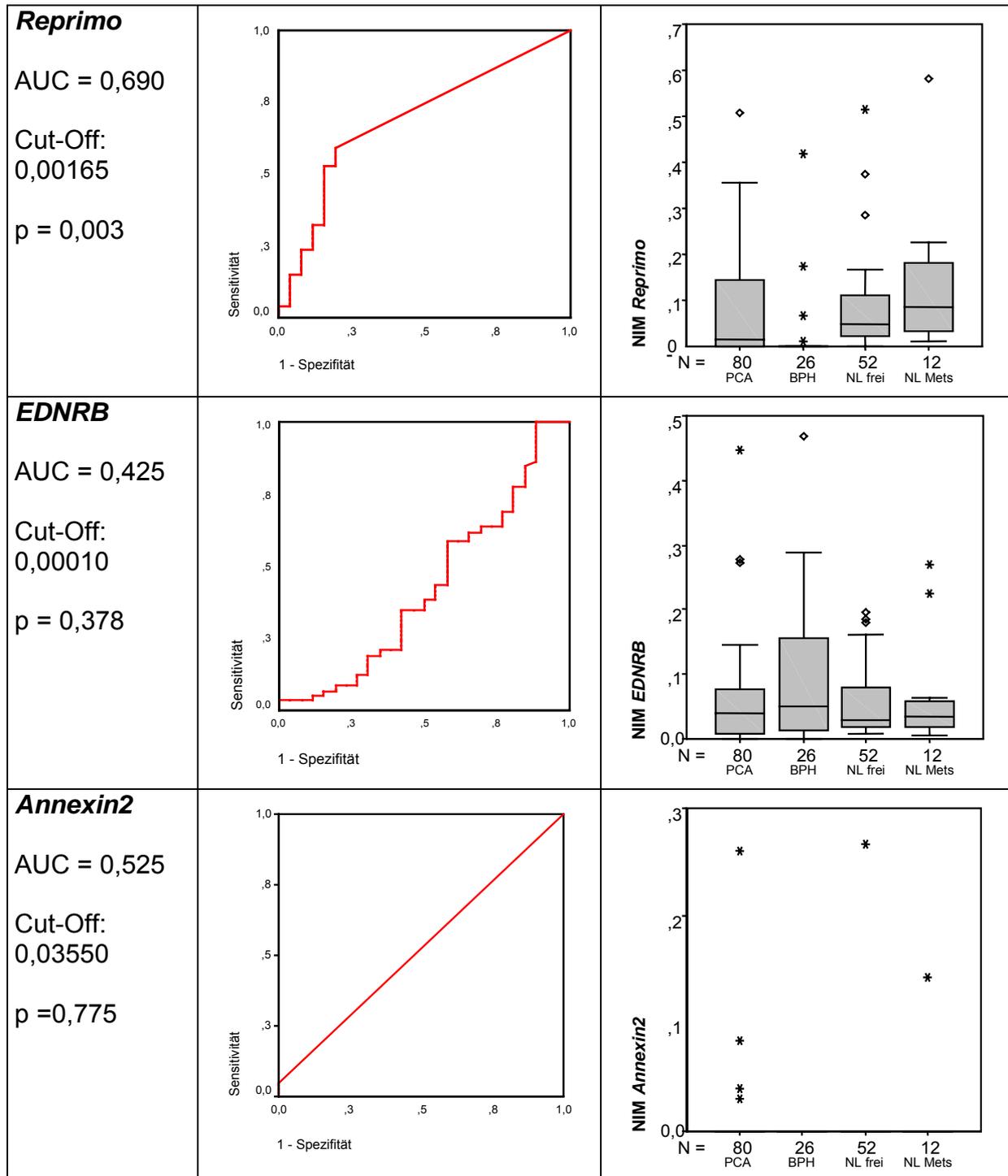


Abbildung 16: ROC-Kurve und Box-Plot des NIM bei PCA, BPH und Lymphknoten mit und ohne Metastasen, links in der Abbildung sind die ROC-Kurven, rechts die Box-Plots dargestellt.

AUC= Area under Curve; p-Werte mit Mann-Whitney-U Test berechnet

Box-Plots: o: Ausreißer; *:Extremwerte

Anhand der ROC-Analyse wird deutlich, dass der Bereich unter der Kurve (AUC) bei den Genen *GSTP1* und *TIG1* größer als 0,9 ist und damit der Methylierungsstatus von PCA und BPH besonders gut unterschieden wird (siehe Abbildung 16). Daher erreicht dieser Test eine hohe Sensitivität (92,5 und 96,3%) und Spezifität (84,6 und

88,5%). Auch die positiven (94,9 und 96,3%) und negativen (78,6 und 88,5) Vorhersagewerte erreichten bei diesen Genen hohe Werte (siehe Tabelle 19).

Durch die Verwendung geeigneter Kombinationen von Methylierungsmarkern konnte die Aussagekraft der Untersuchungen gesteigert werden. So wurden für die verschiedenen UND-Verknüpfungen zumeist Steigerungen der Spezifität bis hin zu einem Wert von 100% erreicht. Die Sensitivität nahm dabei in der Regel etwas ab. Bei ODER-Verknüpfungen konnte eine gesteigerte Sensitivität bei verringerter Spezifität beobachtet werden. Die Kombination mit der insgesamt höchsten, diagnostischen Aussagekraft, bestand in einer UND-Verknüpfung von *EDNRB* und *TIG1* (Sensitivität 96,3%, Spezifität 92,3%) (siehe Tabelle 20).

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
<i>EDNRB+TIG1</i>	96,3	92,3	97,5	88,9
<i>Annexin2/TIG1</i>	96,3	88,5	96,3	88,5
<i>GSTP1+TIG1</i>	88,8	96,2	98,6	73,5
<i>RARb2+TIG1</i>	91,3	92,3	97,3	77,4
<i>GSTP1+RARbeta2</i>	88,8	92,3	97,3	77,4
<i>GSTP1+EDNRB</i>	92,5	88,5	96,1	79,3
<i>APC+TIG1</i>	77,5	100,0	100	59,1
<i>GSTP1/TIG1</i>	100,0	76,9	93	100
<i>RARb2+MDR1+PTGS2</i>	75,0	100,0	100	56,5
<i>GSTP1+RARb2+MDR1</i>	73,8	100,0	100	55,3
<i>PTGS1/TIG1</i>	98,8	76,9	92,9	95,2
<i>GSTP1+MDR1</i>	75,0	96,2	98,4	55,5
<i>GSTP1+PTGS2</i>	63,8	92,3	96,2	45,3
<i>RARb2+PTGS2</i>	65,0	92,3	96,3	46,2
<i>EDNRB+RARbeta2</i>	95,0	69,2	90,4	81,8
<i>GSTP1/Annexin2</i>	92,5	84,6	94,9	78,6
<i>GSTP1/PTGS2</i>	96,3	76,9	92,8	87
<i>GSTP1/REprimo</i>	97,5	65,4	89,7	89,5
<i>RARb2+MDR1</i>	77,5	92,3	96,9	57,1
<i>GSTP1+APC</i>	75,0	88,5	95,2	53,5

Tabelle 20: Diagnostische Aussagekraft ausgewählter Genkombinationen. Es wurde für alle möglichen Kombinationen von Genen die diagnostische Aussagekraft bestimmt. Hier sind diejenigen dargestellt, die am besten zwischen PCA und BPH unterscheiden können.

/:ODER-Verknüpfung; +:UND-Verknüpfung

PPV: Positiver Vorhersagewert; NPV: Negativer Vorhersagewert

3.3. Prognostische Aussagekraft der Methylierungsmarker

Um die Korrelation von klinisch-pathologischen Parametern mit dem Methylierungsstatus auswerten zu können, wurde für die Messwerte der einzelnen Proben ein Cut-Off Wert bestimmt der durch die Verwendung des NIM die Unterscheidung in methyliert und nicht-methyliert ermöglicht. Jede der klinisch-pathologischen Aussagen wurde mit dem NIM der Genmarker direkt und mit jeder möglichen Kombination mehrerer Gene korreliert.

Bei der Untersuchung der einzelnen Gene ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge ($p > 0,05$) mit den klinischen-pathologischen Parametern (siehe Tabelle 21).

Durch die Kombination der Gene in UND- und ODER- Verknüpfungen fanden sich folgende Korrelationen (siehe auch Tabelle 22):

- „*APC* UND *MDR1*“ ($p=0,04$) und „*GSTP1* UND *APC*“ ($p=0,03$) mit dem Status des chirurgischen Schnittrandes
- „*GSTP1* ODER *PTGS2*“ ($p=0,026$) und „*APC* ODER *MDR1*“ ($p=0,02$) mit der Infiltration der Kapsel
- „*APC* UND *PTGS2*“ ($p=0,033$) mit dem Gleason Score
- „*GSTP1* ODER *PTGS2*“ ($p=0,045$) und „*APC* ODER *MDR1*“ ($p=0,042$) mit der extraprostatatischen Ausbreitung
- „*MDR1* UND *TIG1*“ ($p=0,026$) und „*MDR1* ODER *Reprimo*“ ($p=0,04$) mit dem Alter
- „*RARbeta2* ODER *APC*“ ($p=0,011$), „*RARbeta2* ODER *MDR1*“ ($p=0,011$) und „*MDR1* ODER *Reprimo*“ ($p=0,039$) mit dem PSA- Wert.

Insgesamt lagen zu 56 der 80 Prostatakarzinompatienten „Follow-up“ Daten vor. Bei 31 dieser Fälle wurde ein biochemisches Rezidiv ($PSA > 0,4$ ng/ml) im Zeitraum zwischen einem Monat und sechs Jahren festgestellt.

Es ließ sich für 10 Patienten mit Lymphknotenmetastasen ein „Follow-up“ erheben. Davon wurde in 8 Fällen ein Rezidiv festgestellt. Die beiden Patienten, bei denen in

dem Zeitraum für den die Langzeitdaten zur Verfügung stehen, waren wie die 25 Fälle ohne Lymphknotenmetastasen, ohne einen feststellbaren Rückfall.

23 Patienten hatten ohne vorher histologisch gesicherte Metastasierung ein Rezidiv.

Anhand des Kaplan-Meier Tests konnte das Auftreten eines biochemischen Rückfalls mit dem Status der klinisch-pathologischen Parameter errechnet und dargestellt werden. So ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Samenblaseninfiltration und einem Rezidiv nach Prostatektomie (siehe Abbildung 17). Selbiges gilt für ein extraprostatitisches Wachstumsmuster (siehe Abbildung 18).

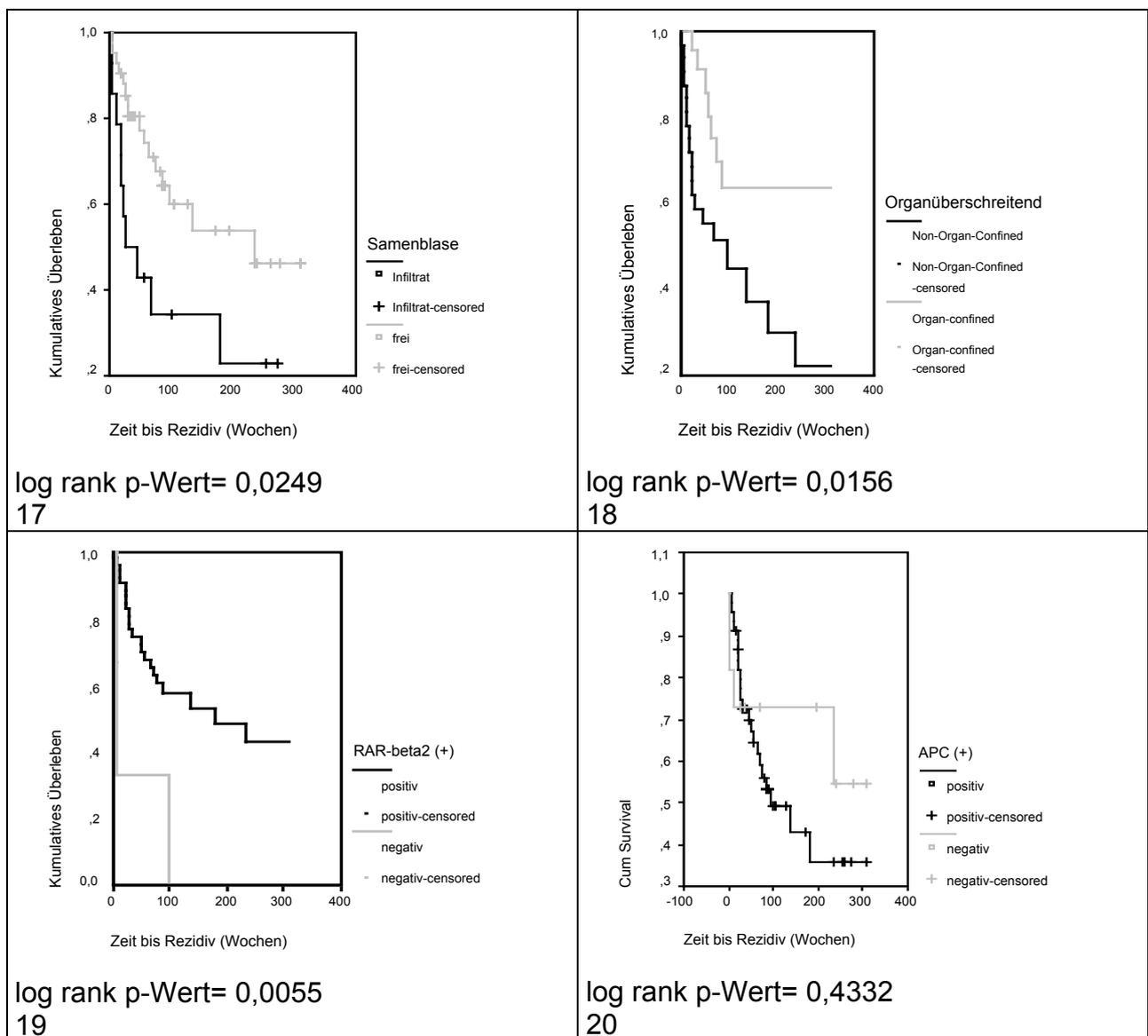


Abbildung 17: Kaplan-Meier Test zur Darstellung des Zusammenhangs klinisch pathologischer Parameter und dem Auftreten eines Rezidivs (17 und 18) und Zusammenhang des Methylierungsstatus ausgewählter Gene mit einem biochemischen Rückfall (19 und 20)

In Abbildung 19 erkennt man, dass im Fall einer Methylierung des *RAR-beta2*-Merkmals anscheinend ein protektiver Einfluß bezüglich des Auftretens eines Rezidivs vorliegt (log rank $p < 0,0055$). Allerdings bestand die Gruppe der *RAR-beta2*-nicht-methylierten Prostatakarzinome nur aus drei Patienten, was letztlich die Aussagekraft dieses Tests mindert.

Weitere Analysen die sich mit dem Langzeitverhalten von den hier untersuchten klinischen und genetischen Parametern beschäftigten, konnten keine weiteren statistischen Zusammenhänge darstellen, jedoch Anhaltspunkte für Vermutungen zum negativen Verlauf bei Vorhandensein von Genhypermethylierung besonders bei dem *APC*-Gen geben (siehe Abbildung 20 (log rank $p > 0,05$)).

Fallzahl	n	%	Annexin2	n	%	EDMRB	n	%	GSTP1	n	%	RARbeta2	n	%	AFC	n	%	MDR1	n	%
Schnitttrand	52	3,85	2	52	100,00	46	88,46	50	96,15	39	75,00	40	76,92							
frei	28	3,57	1	28	100,00	28	100,00	28	92,86	25	89,29	24	85,71							
infiltriert																				
p-Wert ¹		0,95				1	0,062		0,519		0,128		0,348							
Kapsel	31	3,23	1	31	100,00	27	87,10	30	96,77	22	70,97	22	70,97							
frei	48	4,08	2	48	100,00	47	96,92	46	93,88	42	85,71	42	85,71							
infiltriert																				
p-Wert ¹		0,844				1	0,144		0,562		0,108		0,108							
Samenblase	60	5,00	3	60	100,00	55	91,67	58	96,67	47	78,33	47	78,33							
nicht inf.	20	0,00	0	20	100,00	19	95,00	18	90,00	3	15,00	17	85,00							
inf.																				
p-Wert ¹		0,308				1	0,642		0,236		0,519		0,519							
T-Stadium	1	0,00	0	1	100,00	1	100,00	1	100,00	1	100,00	1	100,00							
1a	10	10,00	1	10	100,00	8	80,00	10	100,00	5	50,00	8	80,00							
2a	4	0,00	0	4	100,00	4	100,00	4	100,00	4	100,00	2	50,00							
2b	22	4,55	1	22	100,00	20	90,90	21	95,45	17	77,27	16	72,72							
2c	26	3,85	1	26	100,00	25	96,15	24	92,31	22	84,62	22	84,62							
3a	15	0,00	0	15	100,00	14	93,33	14	93,33	13	86,67	13	86,67							
3b	2	0,00	0	2	100,00	2	100,00	2	100,00	2	100,00	2	100,00							
4																				
p-Wert ²		0,890		1,000		0,727	0,805		0,421		0,678		0,678							
Gleason Score	2	0,00	0	2	100,00	2	100,00	2	100,00	1	50,00	2	100,00							
2-3	40	5,00	2	40	100,00	36	90,00	37	92,50	30	75,00	32	80,00							
4-6	38	2,63	1	38	100,00	36	94,74	37	97,37	33	86,84	30	78,95							
7-10																				
p-Wert ²		0,826				1	0,671		0,583		0,239		0,769							
Organes chränkt	35	5,71	2	35	100,00	31	88,57	34	97,14	25	71,43	26	74,29							
OC	45	97,78	1	45	100,00	43	95,56	42	93,33	39	86,67	38	84,44							
NOC																				
p-Wert ¹		0,415				1	0,239		0,438		0,091		0,26							
Alter	27	0,00	0	27	100,00	26	96,30	26	96,30	23	85,19	19	70,37							
<=60	53	5,66	3	53	100,00	48	90,57	50	94,34	41	77,36	45	84,91							
> 60																				
p-Wert ¹		0,208				1	0,358		0,704		0,408		0,124							
PSA-Gruppe	14	0,00	0	14	100,00	13	92,86	12	85,71	9	64,29	9	64,29							
< 4ng/dl	18	5,56	1	18	100,00	16	88,89	18	100,00	15	83,33	16	88,89							
4-10ng/dl	43	2,33	1	43	100,00	40	93,02	41	95,35	35	81,40	35	81,40							
> 10ng/dl																				
p-Wert ²		0,612				1	0,856		0,194		0,341		0,212							

Tabelle 21: Korrelation des Methylierungsstatus einzelner Gene mit klinisch-pathologischen Parametern. Es konnten keine statistischen Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen von Hypermethylierung und klinisch pathologischen Parametern nachgewiesen werden.

Fallzahl	n	APC+TIG1 %	n	APC+MDR1 %	n	APC+PTGS2 %	n	GSSTP1+APC %	n	MDR1+TIG1 %	n	GSSTP1/PTGS2 %
Schnitttrand	52	73,08	31	59,62	27	51,92	36	67,31	39	75,00	49	94,23
frei	28	85,71	23	82,14	17	60,71	25	89,29	23	82,14	28	100,00
infiltriert			0,04		0,451		0,03		0,466		0,195	
p-Wert ¹		0,197										
Kapsel	31	70,97	18	58,06	13	41,94	20	64,52	22	70,97	28	90,32
frei	49	81,63	36	73,47	31	63,27	40	81,63	40	81,63	49	100,00
infiltriert			0,152		0,062		0,085		0,266		0,026	
p-Wert ¹		0,266										
Samenblase	60	76,67	39	65,00	32	53,33	44	73,33	46	76,67	57	95,00
nicht inf	20	80,00	15	75,00	12	60,00	16	80,00	16	80,00	20	100,00
inf.			0,408		0,604		0,551		0,757		0,308	
p-Wert ¹		0,757										
T-Stadium	1	100,00	1	100,00	1	100,00	1	100,00	1	100,00	1	100,00
1a	10	80,00	5	50,00	2	20,00	4	40,00	8	80,00	9	90,00
2a	4	50,00	2	50,00	3	75,00	4	100,00	2	50,00	4	100,00
2b	22	72,73	14	63,64	12	54,55	16	72,73	16	72,73	20	90,91
2c	26	80,77	19	73,08	15	57,69	21	80,77	21	80,77	26	100,00
3a	15	80,00	11	73,33	9	60,00	12	80,00	12	80,00	15	100,00
3b	2	100,00	2	100,00	2	100,00	2	100,00	2	100,00	2	100,00
4			0,663		0,225		0,149		0,796		0,592	
p-Wert ²		0,369										
Gleason Score	2	50,00	1	50,00	0	0,00	1	50,00	2	100,00	2	100,00
2-3	40	72,50	26	65,00	18	45,00	27	67,50	31	77,50	37	92,50
4-6	38	84,21	27	71,05	26	68,42	32	84,21	29	76,32	38	100,00
7-10			0,736		0,033		0,166		0,737		0,21	
p-Wert ²		0,298										
Organbeschränkt	35	71,43	21	60,00	15	42,86	23	65,71	26	74,29	32	91,43
OC	45	82,22	33	73,33	29	64,44	37	82,22	36	80,00	45	100,00
NOC			0,207		0,054		0,091		0,544		0,045	
p-Wert ²		0,251										
Alter	27	77,78	17	62,96	18	66,67	22	0,00	17	62,96	27	100,00
<=60	53	77,36	37	69,81	26	49,06	38	0,00	45	84,91	50	94,34
> 60			0,536		0,134		0,339		0,026		0,208	
p-Wert ¹		0,966										
PSA-Gruppe	14	57,14	7	50,00	5	35,71	8	57,14	8	57,14	14	100,00
<4ng/dl	18	83,33	14	77,78	9	50,00	14	77,78	16	88,89	17	94,44
4-10ng/dl	43	79,07	29	67,44	27	62,79	33	76,74	34	79,07	41	95,35
>10ng/dl			0,251		0,189		0,314		0,095		0,689	
p-Wert ²		0,175										

Tabelle 22: Korrelation des Methylierungsstatus von Genkombinationen mit klinisch-pathologischen Parametern. Die fett gedruckten Werte stellen das Vorhandensein eines statistischen Zusammenhangs von der betroffenen Genkombination und dem klinisch-pathologischen Parameter dar (p-Wert<0,05).

4. Diskussion

4.1. Proben und Genmarker

Vor Beginn dieser Arbeit war der Methylierungsstatus von *GSTP1*, *PTGS2*, *APC*, *MDR1*, *RARBeta2*, *EDNRB* und *TIG1* bereits in unterschiedlichem Ausmaß bei Prostatakarzinom-Patienten untersucht worden (Bastian et al., 2004a; Bastian et al., 2005). Die Gene *Reprimo* (Ohki et al., 2000) und *Anexin2* (Chetcuti et al., 2001; Ohki et al., 2000), wurden bislang nicht bei Prostatakarzinomen auf Methylierung geprüft, wiesen aber bei anderen Krebserkrankungen Hypermethylierungen auf.

Des Weiteren waren sämtliche Studien bislang begrenzt auf aktuelle Patientenkollektive und nur eine weitere Studie beschäftigte sich mit dem „Follow-up“ (Yegnasubramanian et al., 2004). Die hier untersuchten Proben stammen aus den Jahren 1994 bis 1999, bei denen zu einem hohen Teil „Follow-up“ Daten vorlagen, in denen unter anderem das etwaige Auftreten eines Rezidivs angegeben wird.

4.1.1. Probenaufbereitung

Insgesamt konnte die DNA aus 90 von 121 Karzinomblöcken in ausreichender Menge und Qualität isoliert werden. Für die 31 unzureichenden Proben können mehrere Ursachen als Erklärung herangezogen werden. So kann die vorangegangene Formalinfixierung der Präparate und die darauf folgende bis zu 11 Jahre dauernde Lagerung zur Fragmentierung des Erbguts geführt haben (Godfrey et al., 2000). Auch ist es möglich, dass die Proben vor der Fixierung zu lange gelagert wurden und dadurch an Qualität einbüßten (Lehmann and Kreipe, 2004). Die Gründe für das Ausscheiden dieser Proben lassen sich jedoch retrospektiv nicht mehr nachvollziehen.

Bei der Durchführung der Q-MS-PCR sind 10 weitere Proben, als den qualitativen Ansprüchen ungenügend heraussortiert worden. Ursächlich hierfür ist wohl eine grenzwertige Qualität des Probenmaterials, das wahrscheinlich durch den weiteren fragmentierenden Einfluß des Bisulfits für die Q-MS-PCR unbrauchbar gemacht wurde. Auch hier ist im Nachhinein eine weitere Abklärung zur genaueren Ursachenfindung nicht möglich.

4.2. Methylierungsstatus der Zelllinien

Die Zelllinie PC3 zeigte bis auf bei *Annexin2*, *Reprimo* und *TIG1* eine Hypermethylierung, während bei DU-145 die Gene *Annexin2*, *APC* und *Reprimo* nicht als methyliert angesehen werden konnten. Bei LNCAP konnte keine Hypermethylierung bei *EDNRB* und *RARbeta2* festgestellt werden. Die Zelllinien die aus gesundem epithelialen Prostatagewebe gewonnen wurden, PrEC1 und PrEC2 sowie jene aus BPH-Gewebe zeigten keine Hypermethylierungen. Die festgestellten Methylierungsmuster stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen (Bastian et al., 2005; Singal et al., 2004; Woodson et al., 2004b; Yegnasubramanian et al., 2004) überein. *Reprimo* und *Annexin2* wurden bislang nicht an den Zelllinien untersucht.

4.3. Methylierungsfrequenzen

4.3.1. *Annexin2*

Annexin2 kodiert das Protein p36. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Endozytose, der Exozytose und bei Membrantransporten. Es gehört zu der Familie der Kalzium- und Lipidbindenden Proteine und ist ein Substrat für Rezeptor und Nichtrezeptor-Proteinkinasen (Raynal et al., 1997; Waisman, 1995). Es wurde bislang erst in einer Studie mit Hilfe von Real-Time PCR und Southern-Blot-Analysen eine methylierungsspezifische Suppression des *Annexin2*-Gens untersucht und nachgewiesen (Chetcuti et al., 2001). Erstmals wurde hier dieses Gen in bezug auf das Prostatakarzinom mit der Q-MS-PCR untersucht.

Es wurde bei 3,8% der Patienten mit einem Prostatakarzinom, 5% der Lymphknoten ohne Metastasen, 0% der Lymphknoten mit Metastasen und 0% der Untersuchten mit einer BPH nachgewiesen. Die Bedeutung der Methylierung von *Annexin2* für die Diagnostik eines Prostatakarzinoms ist somit gering.

4.3.2. *APC*

Das *APC* (Adenomatosis Polyposis Coli) Gen ist ein bislang häufiger im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom untersuchtes Tumorsuppressorgen. Es

spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von familiären Darmkrebs (Esteller et al., 2000; Kang et al., 2004; Yegnasubramanian et al., 2004).

In dieser Studie ergab sich eine Hypermethylierung bei 80% der Karzinompatienten, 0% der Lymphknotenpräparate und bei 50% der Patienten mit einer benignen Prostata Hyperplasie. Bislang wurde ein derartig erhöhter Anteil methylierter DNA bei BPHs nur in Ausnahmefällen gefunden (Florl et al., 2004). Der hohe Anteil methylierter Promotoren bei PCAs wurde in mehreren Studien nachgewiesen (siehe Tabelle 23).

	PCA	BPH
MS-PCR		
(Maruyama et al., 2002)	27%	6%
(Kang et al., 2004)	57%	1%
(Florl et al., 2004)	78%	36%
Q-MS-PCR		
(Yegnasubramanian et al., 2004)	90%	7%
(Tokumaru et al., 2004)	79%	0%
(Bastian et al., 2005)	83%	7%
(Enokida et al., 2005a)	64%	9%

Tabelle 23: Methylierungsfrequenzen von APC in anderen Studien

4.3.3. GSTP1

Die Glutathion-S-Transferase der π -Klasse ist der bezüglich des Prostatakarzinoms bislang am besten untersuchte Genmarker. Das Genprodukt hat eine Schutzfunktion vor Karzinogenen auf das Genom (Nelson et al., 2003). In dieser Arbeit fand sich eine Promotorhypermethylierung in Karzinomen von 93%, in Lymphknoten von 9% (davon trat 7% bei Lymphknoten ohne und 25% bei Lymphknoten mit Metastasen auf) und in BPHs von 15%. Der Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen (siehe Tabelle 24) zeigt auf, dass bei der Q-MS-PCR in keiner der anderen Arbeitsgruppen eine Methylierung der benignen Prostatahyperplasien gefunden wurde. Lediglich in der herkömmlichen MS-PCR wurde dieses Merkmal bei bis zu 25% der Proben festgestellt. Eine Begründung für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegt in der Verwendung unterschiedlicher Primer. Auch ist die Verwendung der Taqman-Technik spezifischer als die anderer methylierungs spezifischer PCRs.

	PCA	BPH
MS-PCR		
(Florl et al., 2004)	79%	19%
(Singal et al., 2004)	72%	5%
(Kang et al., 2004)	87%	0%
(Yamanaka et al., 2003)	88%	3%
(Enokida et al., 2005b)	66%	25%
(Enokida et al., 2005a)	54%	6%
Q-MS-PCR		
(Woodson et al., 2003)	83%	0%
(Woodson et al., 2004b)	88%	0%
(Woodson et al., 2004a)	83%	0%
(Yegnasubramanian et al., 2004)	93%	0%
(Bastian et al., 2005)	75%	0%
(Tokumar et al., 2004)	91%	0%

Tabelle 24: Methylierungsfrequenzen von *GSTP1* in anderen Studien

Entsprechend den in der Tabelle 24 aufgeführten Untersuchungen erwies sich die Hypermethylierung von *GSTP1* auch in dieser Untersuchung als eine der in Prostatakarzinomen am häufigsten vorkommenden epigenetischen Veränderungen. Mit einer Sensitivität von 92,5% und einer Spezifität von 84,6% hat *GSTP1* gute Voraussetzungen um als Marker des Prostatakarzinom verwendet zu werden.

4.3.4. *PTGS2*

Die Prostatglandin-Endoperoxide Synthase2 (*PTGS2*) ist an der Regulation von Entzündungen und an der Apoptose in Prostatakarzinomzellen beteiligt. In dieser Studie wurden 68% der Prostatakarzinome, 28% der Lymphknoten (29% der Lymphknoten ohne bekannte Metastasen und 25% der Lymphknoten mit Metastasen) und 15% der BPHs als positiv methyliert getestet. Bislang wurde dieser Marker relativ selten auf Promotormethylierung untersucht (siehe Tabelle 25). Der in dieser Arbeit ermittelte Wert für die Sensitivität und Spezifität von *PTGS2* als Genmarker des Prostatakarzinoms, lässt im Gegensatz zu den bisherigen Studien nur eine bedingte Eignung als Marker des Prostatakarzinoms erkennen.

	PCA	BPH
Q-MS-PCR		
(Bastian et al., 2005)	72%	0%
(Yegnasubramanian et al., 2004)	88%	8%

Tabelle 25: Methylierungsfrequenzen von *PTGS2* in anderen Studien

4.3.5. *MDR1*

Das Multi-Drug-Resistance 1 Gen ist beteiligt an der Resistenz gegen medikamentöse und hormonelle Einflüsse auf den menschlichen Körper. Wahrscheinlich hat es einen Einfluß auf die Entstehung von hormonresistenten Prostatakarzinomen (Kantharidis et al., 1997; Nakayama et al., 1998; Tada et al., 2002; Yegnasubramanian et al., 2004). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen fand sich eine Hypermethylierung bei 80% (PCA), 8% (NL) (dabei 7% ohne und 8% mit bekannten Metastasen) und 30% (BPH). Bisherige Studien zeigten eine unterschiedliche Eignung von *MDR1* als Tumormarker (siehe Tabelle 26).

	PCA	BPH
Q-MS-PCR		
(Bastian et al., 2005)	100%	71%
(Yegnasubramanian et al., 2004)	88%	0%
(Enokida et al., 2004)	54,8%	11,6%
(Enokida et al., 2005a)	54,8%	11,6%

Tabelle 26: Methylierungsfrequenzen von *MDR1* in anderen Studien

4.3.6. *TIG1*

Das *TIG1*-Gen (Tazarotene induced gene 1) ist allem Anschein nach ein Tumorsuppressorgen, dass bislang insbesondere mit Leukämien in Verbindung gebracht wurde (Tokumaru et al., 2004; Youssef et al., 2004).

Auch bei der Untersuchung von Prostatakarzinomen wurden hier hypermethylierte Promotorenbereiche gefunden (siehe Tabelle 27). In dieser Studie zeigte der *TIG1*-Promotor eine sehr spezifische Unterscheidung zwischen dem Vorhandensein eines Prostatakarzinoms (96%) und einer BPH (12%). Die zu den Karzinomen gehörigen Lymphknoten waren in 21% der Fälle, dabei in 20% der Lymphknoten ohne und in 25% der Lymphknoten mit Metastasen, als methyliert festgestellt worden.

	PCA	BPH
Q-MS-PCR		
(Tokumaru et al., 2004)	70%	0%

Tabelle 27: Methylierungsfrequenzen von *TIG1* in anderen Studien

4.3.7. EDNRB

Das *EDNRB*-Gen (Endothelin Rezeptor Typ Beta), ist ein vielseitiges Gen. Bei einer bestimmten Mutation wird es mit der Entsehung eines Megacolons beim Morbus Hirschsprung in Verbindung gebracht. Des weiteren spielt es bei den Abläufen die zu einer Vasokonstiktion führen eine Rolle. Auch bei der Entstehung von Leukämien und Prostatakarzinomen soll es eine Rolle spielen (Pao et al., 2001). In dieser Studie zeigte es sich in 100% der Prostatakarzinome und deren Lymphknoten als hypermethyliert. Bei 88% der benignen Prostatahyperplasien wurde es ebenfalls als positiv bewertet. Eine spezifische Unterscheidung von Karzinom und benignem Gewebe scheint damit für dieses Gen nur bedingt möglich zu sein und der Wert als Marker für ein Karzinom ist in frage zu stellen.

	PCA	BPH
Q-MS-PCR		
(Singal et al., 2004)	72%	62%
(Yegnasubramanian et al., 2004)	49%	0%

Tabelle 28: Methylierungsfrequenzen von *EDNRB* in anderen Studien

4.3.8. RARbeta2

RARbeta2 (Retinoic acid receptor beta) ist ein Tumorsuppressorgen, dass häufig auf epigenetische Veränderungen untersucht wurde. In dieser Studie wurde eine Methylierung in 95% der PCA-Proben, in 10% der dazugehörigen Lymphknoten (dabei 5% der Lymphknoten ohne Metastasen und 25% der Lymphknoten mit Metastasen) und in 35% der BPHs gefunden. Damit ist es eine der häufigsten epigenetischen Veränderungen in Prostatakarzinomen, jedoch müssen Einschränkungen bezüglich der Spezifität gemacht werden. Andere Studien stützen den Eindruck eines gut geeigneten Markers. In Abbildung 19 konnte mit Hilfe eines Kaplan-Meier-Tests dargestellt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der

Methylierung von *RARBeta2* und dem Langzeitüberleben gibt. Erstaunlicherweise scheint bei Vorliegen dieser Veränderung ein Auftreten von Rezidiven als unwahrscheinlicher. Dieses Ergebnis sollte in anderen Studien weiter untersucht werden.

	PCA	BPH
Q-MS-PCR		
(Tokumaru et al., 2004)	89%	0%
(Jeronimo et al., 2004)	98%	23%

Tabelle 29: Methylierungsfrequenzen von *RARBeta2* in anderen Studien

4.3.9. Reprimo

Bei *Reprimo* handelt es sich um ein den Zellzyklus steuerndes Gen, das neuerdings mit der Onkogenese des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht wird (Takahashi et al., 2005; Zhang et al., 2002). Methylierung wurde in 59% der PCAs, 90% der Lymphknotenpräparate (dabei 88% der Lymphknoten ohne und 100% der Lymphknoten mit Metastasen) und 35% der BPHs detektiert. Interessant ist dabei die große Häufigkeit des Auftretens dieser Veränderung in den zu den Karzinomen gehörigen Lymphknoten, da nur zu einem geringen Anteil dort histologisch Metastasen nachgewiesen werden konnten. Untersuchungen von weiterem gesundem lymphatischem Gewebe sollten zum Vergleich durchgeführt werden.

4.4. Diagnostische Informationen

Durch den Einsatz von ROC-Analysen konnte für das Merkmal der Hypermethylierung ein für die Unterscheidung von benignem (BPH) und malignem (PCA) Prostatagewebe optimaler Cut-Off Wert ermittelt werden. Die Sensitivität von *TIG1*, *GSTP1*, *RARBeta2*, *MDR1*, und *PTGS2* lag dabei zwischen 67,5 und 96,3%.

Die Spezifität dieser Genmarker lag in einem Bereich von 65,4 bis 88,5%. Die Untersuchung von *EDNRB* ergab für die Sensitivität 100%, für die Spezifität jedoch nur 11,5%, und von *APC* eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 50%. Beide Gene werden also häufig in Prostatagewebe methyliert vorgefunden, ohne jedoch eine Unterscheidung zwischen benignem und malignem Gewebe treffen zu können. Dazu kam im Gegensatz bei der Untersuchung von *Reprimo* eine Sensitivität von 3,8% bei einer Spezifität von 100% bei dieser Untersuchung heraus. Durch die geringe Anzahl methylierter Proben ist jedoch eine Aussage über die Zuverlässigkeit dieses Gens als diagnostischer Parameter erst nach weiteren Untersuchungen möglich.

Durch die Kombination der einzelnen Genmarker war es möglich die Aussagekraft des Tests zu steigern. In dieser Studie erreichte eine Verbindung von „*EDNRB* und *TIG1*“ eine Sensitivität von 96,3% bei einer Spezifität von 92,3%. Auch andere Kombinationen wie die von „*RARBeta2* und *TIG1*“ und „*Annexin2* oder *TIG1*“ erreichten hohe Werte bezüglich der Unterscheidung der Methylierungsmuster von Prostatakarzinomen und benignem Prostata Gewebe.

In anderen Arbeiten konnte ebenfalls eine gesteigerte Aussagekraft durch Kombination geeigneter Gene erreicht werden („*GSTP1* oder *PTGS2*“: (Bastian et al., 2005); „*GSTP1* oder *MDR1*“: (Yegnasubramanian et al., 2004) „*APC*, *GSTP1*, *RARBeta2* oder *TIG1*“: (Tokumar et al., 2004).

4.5. Methylierung und klinisch-pathologische Parameter

Durch die Korrelation jedes Gens einzeln und in Kombination mehrerer Gene mit klinisch-pathologischen Parametern konnten statistische Zusammenhänge von Methylierungsstatus und den für die Diagnostik und Verlauf wichtigen Aussagen gefunden werden.

Keines der untersuchten Gene konnte allein betrachtet einen Zusammenhang zu diesen Parametern herstellen. Folgende signifikante Korrelationen wurden für die unterschiedlichen Kombinationen gefunden:

- „*APC* oder *MDR1*“ beziehungsweise „*GSTP1* oder *PTGS2*“ mit der Infiltration der Kapsel
- „*APC* und *PTGS2*“ mit dem Gleason-Score
- „*GSTP1* oder *PTGS2*“ beziehungsweise „*APC* oder *MDR1*“ mit der extraprostatischen Ausbreitung
- „*MDR1* und *TIG1*“ beziehungsweise „*MDR1* oder *Reprimo*“ mit dem Alter der Patienten
- „*RARbeta2* oder *APC*“ beziehungsweise „*RARbeta2* oder *MDR1*“ mit dem Gleason Score
- „*MDR1* und *APC*“ beziehungsweise „*GSTP1* und *APC*“ mit dem Zustand des chirurgischen Schnitttrands

Andere Arbeitsgruppen konnten bislang die in Tabelle 30 folgenden statistische Zusammenhänge feststellen:

	Gen	Autor
pT-Stadium	<i>RARBeta2</i> , <i>CD44</i> , <i>E-Cadherin</i> <i>MDR1</i> <i>APC</i> , <i>RUNX1</i> , <i>RASSF1</i> <i>EDNRB</i> „ <i>GSTP1</i> und <i>PTGS2</i> “, „ <i>GSTP1</i> und <i>APC</i> und <i>PTGS2</i> “ <i>LINE1</i> - Hypomethylierung	(Woodson et al., 2003) (Enokida et al., 2004) (Kang et al., 2004) (Yegnasubramanian et al., 2004) (Bastian et al., 2005) (Florl et al., 2004)
Gleason Score	<i>EDNRB</i> „ <i>GSTP</i> oder <i>APC</i> “	(Woodson et al., 2004a) (Bastian et al., 2005)
Extraprostatische Ausbreitung	„ <i>GSTP1</i> und <i>APC</i> “, „ <i>GSTP1</i> und <i>APC</i> und <i>PTGS2</i> “	(Bastian et al., 2005)

Tabelle 30: Signifikante Korrelationen von Methylierung mit klinisch-pathologischen Parametern anderer Gruppen

Durch das Vorliegen eines langen Nachbehandlungszeitraums in dieser Studie, konnten die klinisch-pathologischen Parameter und der Methylierungsstatus der einzelnen Gene mit dem Vorliegen eines Rezidivs korreliert und erfasst werden. Dabei war eine schlechtere Prognose mit dem Vorliegen einer Samenblaseninfiltration und einem extraprostatischen Wachstum verbunden.

Für die Methylierung konnten keine signifikanten Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern mit prognostischer Bedeutung gefunden werden. Jedoch wie aus Kaplan-Meier-Kurven hervorgeht, gibt es eine näherungsweise aber nicht statistisch belegte prognostisch ungünstige Tendenz bei Patienten, die ein positives Methylierungsmerkmal für die Gene *APC* oder *Reprimo* aufwiesen. Die einzige andere Arbeitsgruppe, die sich bislang mit Proben mit langem Follow-up befasste (Yegnasubramanian et al., 2004) konnte eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv bei erhöhtem NIM von *PTGS* nachweisen.

4.6. Hypermethylierung von Lymphknoten-DNA

Es konnte von insgesamt 52 Lymphknotenpräparaten DNA aufgereinigt werden. Bei 12 dieser Proben konnten histologisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Sowohl histologisch gesunde als auch metastasierte Lymphknoten wiesen bei der Untersuchung auf Methylierung ein positives Muster auf. Letztere ähnelten in der Verteilung des Methylierungsmusters vage dem des Primärtumors. Scheinbar ist die Methylierung von Lymphknoten nicht von dem Ursprungskarzinom abhängig. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppen an Lymphknoten- und Fernmetastasen zeigten, dass das Methylierungsmuster der Metastasen dem der Primärtumoren ähnelte und dabei nicht abhängig vom Metastasierungsort war. Die Methylierungsquotienten (NIM) waren in den Metastasen höher als im primären Tumor (Yegnasubramanian et al., 2004).

Da in sämtlichen der untersuchten Lymphknoten Methylierung nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob ein Methylierungsmuster eine besondere Gefahr zur Rezidivbildung beinhaltet. 24 der 33 Patienten ohne gesicherte Metastasen hatten ein Rezidiv. Statistische Besonderheiten in Zusammenhang mit der Methylierung ergaben sich nicht.

Die Aussage einer Arbeitsgruppe (Kollermann et al., 2003), dass 90% der Patienten mit histologisch unauffälligen Lymphknoten aber mit Methylierung ein frühzeitiges biochemisches Rezidiv erlitten, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Methylierungsstatus der Promotoren von *Annexin2*, *RARBeta2*, *Reprimo*, *APC*, *MDR1*, *PTGS2*, *GSTP1*, *TIG1* und *EDNRB* untersucht und als diagnostischer und prognostischer Marker erprobt. Das untersuchte Material stammte aus sechs Prostatakarzinomzelllinien, 80 Prostatakarzinomen und 52 Lymphknotenpräparaten, die mit Hilfe einer quantitativen, methylierungsspezifischen PCR auf ihr Methylierungsmuster untersucht wurden. Die Promotoren von *APC*, *EDNRB*, *GSTP1*, *MDR1*, *RARBeta2* und *TIG1* waren in über 80% der Prostatakarzinom-Fälle methyliert. *PTGS2*- (68%), *Reprimo*- (59%) und *Annexin2*-Methylierung (3,8%) konnten seltener nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Lymphknoten ergaben sich für die unterschiedlichen Gene *EDNRB* (100%), *Reprimo* (91%), *PTGS2* (23%), *TIG1* (19%), *GSTP1*, *RARBeta2*, *MDR1*, *Annexin2*, und *APC* (alle unter 10%) die verschiedensten Methylierungsfrequenzen. Es zeigte sich weiterhin kein Unterschied zwischen Lymphknotenmetastasen und normalen Lymphknoten. Bei der Betrachtung der BPH-Proben ergaben sich Methylierungshäufigkeiten von 88% (bei *EDNRB*) bis 0 % (*Annexin2*). Die restlichen Gene waren in einem Bereich von 10 bis 50% im Falle der BPHs positiv für Methylierung. Eine signifikante Unterscheidung zwischen malignem von benignem Prostatagewebe war für *GSTP1*, *RARBeta2*, *MDR1*, *PTGS2*, *TIG1* (alle $p < 0,001$), *Reprimo* ($p = 0,002$) und *APC* ($p = 0,024$) möglich.

Durch ROC-Analysen konnte gezeigt werden, dass *GSTP1*-, *TIG1*- und *RARBeta2*-Methylierung mit hoher Sensitivität (92,5-96,3%) und Spezifität (65,4-88,5%) zwischen benignem und malignem Gewebe unterscheiden können. Diese Aussagekraft wurde gesteigert durch die Verknüpfung mehrerer Gene, so dass bei „*EDNRB* und *TIG1*“ eine Sensitivität von 96,3% bei gleichzeitiger Spezifität von 92,3% erreicht wurde.

Durch Korrelation des Methylierungsstatus mit den klinisch-pathologischen Parametern konnten Zusammenhänge verschiedener Genkombinationen hergestellt werden: So fanden sich bei Verknüpfungen von „*APC* oder *MDR1*“ beziehungsweise von „*GSTP1* oder *PTGS2*“ Korrelationen mit der Kapselinfiltration und der extraprostatatischen Ausbreitung. Ein hoher Gleason Score korrelierte mit „*APC* und *PTGS2*“. Zudem waren die Kombinationen „*MDR1* und *TIG1*“ und „*MDR1* oder

Reprimo“ mit einem höheren Alter vergesellschaftet. Letztlich lässt sich durch den Methylierungsstatus von „MDR1 und APC“ beziehungsweise „GSTP1 und APC“ ein Zusammenhang mit dem Zustand des chirurgischen Schnittrandes herstellen.

Die hier vorliegenden Daten legen nahe, dass die Untersuchung des Methylierungsstatus von *APC*, *GSTP1*, *PTGS2*, *RARBeta2*, *MDR1* und *TIG1* weitere Aufschlüsse in bezug auf Diagnostik und Prognostik liefern können.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahlbom A, Lichtenstein P, Malmstrom H, Feychting M, Hemminki K and Pedersen NL, Cancer in twins: genetic and nongenetic familial risk factors. *J Natl Cancer Inst* 1997 89: 287-293.
2. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 4. Auflage, 63-10. 2004. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland.
Ref Type: Report
3. Attwood JT, Yung RL and Richardson BC, DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 2002 59: 241-257.
4. Bastian PJ, Ellinger J, Schmidt D, Wernert N, Wellmann A, Muller SC and von Rucker A, GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostatic cancer: is there a correlation with clinical stage, Gleason grade, PSA value or age? *Eur J Med Res* 2004a 9: 523-527.
5. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Muller SC and von Ruecker A, Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* 2005 11: 4097-4106.
6. Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM and Nelson WG, Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *Eur Urol* 2004b 46: 698-708.
7. Böcker W, Denk H and Heitz PhU (2001) Prostata. Pathologie, pp 834-838.

8. Bostwick DG, Grading prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 1994 102: S38-S56.
9. Bott SR, Birtle AJ, Taylor CJ and Kirby RS, Prostate cancer management: 2. An update on locally advanced and metastatic disease. *Postgrad Med J* 2003 79: 643-645.
10. Bottke D, Wiegel T, Hocht S, Muller M, Schostak M and Hinkelbein W, Salvage radiotherapy in patients with persisting prostate-specific antigen after radical prostatectomy for prostate cancer. *Oncology* 2003 65 Suppl 1: 18-23.
11. Chetcuti A, Margan SH, Russell P, Mann S, Millar DS, Clark SJ, Rogers J, Handelsman DJ and Dong Q, Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors. *Cancer Res* 2001 61: 6331-6334.
12. Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, Combs GF, Jr., Turnbull BW, Slate EH, Witherington R, Herlong JH, Janosko E, Carpenter D, Borosso C, Falk S and Rounder J, Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 1998 81: 730-734.
13. Cohen JH, Kristal AR and Stanford JL, Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000 92: 61-68.
14. Crocitto LE, Korn D, Kretzner L, Shevchuk T, Blair SL, Wilson TG, Ramin SA, Kawachi MH and Smith SS, Prostate cancer molecular markers GSTP1 and hTERT in expressed prostatic secretions as predictors of biopsy results. *Urology* 2004 64: 821-825.
15. D'Amico AV, Radiation and hormonal therapy for locally advanced and clinically localized prostate cancer. *Urology* 2002 60: 32-37.

16. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI and Nelson WG, Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999 155: 1985-1992.
17. Di Blasio CJ, Rhee AC, Cho D, Scardino PT and Kattan MW, Predicting clinical end points: treatment nomograms in prostate cancer. *Semin Oncol* 2003 **30**: 567-586.
18. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV and Laird PW, MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000 28: E32.
19. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT and Chakraborty R, Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups
117. *Genomics* 1992 12: 241-253.
20. Enokida H, Shiina H, Igawa M, Ogishima T, Kawakami T, Bassett WW, Anast JW, Li LC, Urakami S, Terashima M, Verma M, Kawahara M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR and Dahiya R, CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Res* 2004 64: 5956-5962.
21. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li LC, Kawahara M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR and Dahiya R, Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005a 11: 6582-6588.

22. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Pookot D, Li LC, Tabatabai ZL, Kawahara M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR and Dahiya R, Ethnic group-related differences in CpG hypermethylation of the GSTP1 gene promoter among African-American, Caucasian and Asian patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 2005b.
23. Epstein JI, Walsh PC and Sanfilippo F, Clinical and cost impact of second-opinion pathology. Review of prostate biopsies prior to radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 1996 20: 851-857.
24. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB and Herman JG, Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999 59: 67-70.
25. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB and Herman JG, Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000 60: 4366-4371.
26. Feinberg AP and Vogelstein B, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983 301: 89-92.
27. Florl AR, Steinhoff C, Muller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, Ackermann R and Schulz WA, Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* 2004 91: 985-994.
28. Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH and Stampfer MJ, Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma

- lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 1999 59: 1225-1230.
29. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC and Willett WC, A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993 85: 1571-1579.
 30. Gleason DF, Histologic grade, clinical stage, and patient age in prostate cancer. *NCI Monogr* 1988 15-18.
 31. Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW and Jensen RH, Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2000 2: 84-91.
 32. Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J and Miller K, Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000 60: 5941-5945.
 33. Gonzalzo ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM and Nelson WG, Detection of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. *Urology* 2004 63: 414-418.
 34. Green GA, Hanlon AL, Al Saleem T and Hanks GE, A Gleason score of 7 predicts a worse outcome for prostate carcinoma patients treated with radiotherapy. *Cancer* 1998 83: 971-976.

35. Gronberg H, Damber L, Damber JE and Iselius L, Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am J Epidemiol* 1997 146: 552-557.
36. Grunau C, Clark SJ and Rosenthal A, Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001 29: E65.
37. Helpap B (1997) 68. In: Remmele W (ed) *Pathologie 5*, pp 68-93. Springer.
38. Herman JG and Baylin SB, Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 349: 2042-2054.
39. Hoque A, Albanes D, Lippman SM, Spitz MR, Taylor PR, Klein EA, Thompson IM, Goodman P, Stanford JL, Crowley JJ, Coltman CA and Santella RM, Molecular epidemiologic studies within the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Cancer Causes Control* 2001 12: 627-633.
40. Hsieh CL and Lieber MR, CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication. *EMBO J* 1992 11: 315-325.
41. Hsing AW, Tsao L and Devesa SS, International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2000 85: 60-67.
42. Jani AB and Hellman S, Early prostate cancer: clinical decision-making. *Lancet* 2003 361: 1045-1053.

43. Jeronimo C, Henrique R, Campos PF, Oliveira J, Caballero OL, Lopes C and Sidransky D, Endothelin B receptor gene hypermethylation in prostate adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2003 56: 52-55.
44. Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Ribeiro FR, Oliveira J, Fonseca D, Teixeira MR, Lopes C and Sidransky D, Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res* 2004 10: 4010-4014.
45. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG and Sidransky D, Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001 93: 1747-1752.
46. Jhaveri FM, Klein EA, Kupelian PA, Zippe C and Levin HS, Declining rates of extracapsular extension after radical prostatectomy: evidence for continued stage migration. *J Clin Oncol* 1999 17: 3167-3172.
47. Jones PA, DNA methylation and cancer. *Oncogene* 2002 21: 5358-5360.
48. Jones PA and Baylin SB, The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 3: 415-428.
49. Kang GH, Lee S, Lee HJ and Hwang KS, Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004 202: 233-240.
50. Kantharidis P, El Osta A, deSilva M, Wall DM, Hu XF, Slater A, Nadalin G, Parkin JD and Zalcborg JR, Altered methylation of the human MDR1 promoter

is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res* 1997 3: 2025-2032.

51. Kattan MW, Wheeler TM and Scardino PT, Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 1999 17: 1499-1507.
52. Knudson AG, Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 1: 157-162.
53. Kollermann J, Muller M, Goessl C, Krause H, Helpap B, Pantel K and Miller K, Methylation-specific PCR for DNA-based detection of occult tumor cells in lymph nodes of prostate cancer patients. *Eur Urol* 2003 44: 533-538.
54. Latil AG, Azzouzi R, Cancel GS, Guillaume EC, Cochran-Priollet B, Berthon PL and Cussenot O, Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. *Cancer* 2001 92: 1130-1137.
55. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB and Nelson WG, Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 91: 11733-11737.
56. Lehmann U and Kreipe H, Real-time PCR-based assay for quantitative determination of methylation status. *Methods Mol Biol* 2004 287: 207-218.
57. Li LC, Carroll PR and Dahiya R, Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005 97: 103-115.

58. Li LC and Dahiya R, MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002 18: 1427-1431.
59. Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar A, Piantadosi S, Deweese TL, De Marzo AM and Nelson WG, Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res* 2001 61: 8611-8616.
60. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, Henderson BE and Reichardt JK, Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* 1999 354: 975-978.
61. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D and Sidransky D, Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996 271: 659-662.
62. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP and Gazdar AF, Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002 8: 514-519.
63. Messing EM, Manola J, Sarosdy M, Wilding G, Crawford ED and Trump D, Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *N Engl J Med* 1999 341: 1781-1788.

64. Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, Kusaba H, Ohshima K, Kozuru M, Komatsu H, Ueda R and Kuwano M, Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 1998 92: 4296-4307.
65. Nelson WG, De Marzo AM and Isaacs WB, Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003 349: 366-381.
66. Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N and Taniguchi T, Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem* 2000 275: 22627-22630.
67. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N and Walsh P, Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate* 1997 33: 240-245.
68. Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA and Jones PA, The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 2001 10: 903-910.
69. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD and Walsh PC, Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999 281: 1591-1597.
70. Raizis AM, Schmitt F and Jost JP, A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal Biochem* 1995 226: 161-166.

71. Ransohoff DF, Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer. *Science* 2003 299: 1679-1680.
72. Raynal P, Pollard HB and Srivastava M, Cell cycle and post-transcriptional regulation of annexin expression in IMR-90 human fibroblasts. *Biochem J* 1997 322 (Pt 2): 365-371.
73. Reese DM, Choice of hormonal therapy for prostate cancer. *The Lancet* 2000 355: 1474-1475.
74. Remmle (1997) *Prostata. Pathologie 5*, Springer.
75. Robertson KD and Wolffe AP, DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000 1: 11-19.
76. Ross PL, Scardino PT and Kattan MW, A catalog of prostate cancer nomograms. *J Urol* 2001 165: 1562-1568.
77. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH and Goggins M, Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003 63: 3735-3742.
78. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML and Thibodeau SN, Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998 62: 1425-1438.
79. Schroder FH and Kranse R, Verification bias and the prostate-specific antigen test--is there a case for a lower threshold for biopsy? *N Engl J Med* 2003 349: 393-395.

80. Shirai T, Sano M, Tamano S, Takahashi S, Hirose M, Futakuchi M, Hasegawa R, Imaida K, Matsumoto K, Wakabayashi K, Sugimura T and Ito N, The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res* 1997 57: 195-198.
81. Singal R, Ferdinand L, Reis IM and Schlesselman JJ, Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. *Oncol Rep* 2004 12: 631-637.
82. Sökeland J (2001) *Anatomie und Physiologie des Urogenitalsystems. Urologie Verstehen- Lernen- Anwenden*, pp 31. Thieme.
83. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B and Walsh PC, Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990 17: 337-347.
84. Stuart GR, Holcroft J, de Boer JG and Glickman BW, Prostate mutations in rats induced by the suspected human carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* 2000 60: 266-268.
85. Tada Y, Wada M, Migita T, Nagayama J, Hinoshita E, Mochida Y, Maehara Y, Tsuneyoshi M, Kuwano M and Naito S, Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int J Cancer* 2002 98: 630-635.
86. Takahashi T, Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, Echebiri C, Nomura M, Stastny V, Augustus M, Wu CW, Wistuba II, Meltzer SJ and Gazdar AF, Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies. *Int J Cancer* 2005.
87. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ and Coltman

- CA, Jr., Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004 350: 2239-2246.
88. Tokumaru Y, Harden SV, Sun DI, Yamashita K, Epstein JI and Sidransky D, Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004 10: 5518-5522.
89. Trinh BN, Long TI and Laird PW, DNA methylation analysis by MethyLight technology. *Methods* 2001 25: 456-462.
90. Tsutsumi M, Liang G and Jones PA, Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene* 1999 228: 43-49.
91. Waisman DM, Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 1995 149-150: 301-322.
92. Walsh PC, Partin AW and Epstein JI, Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 1994 152: 1831-1836.
93. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks AF, Cunningham JM, Peterson BJ, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ and Thibodeau SN, Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer
69. *Am J Hum Genet* 2002 71: 116-123.
94. Wirth M (2000) Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. In: Rübben (ed) *Uroonkologie*, pp 233-277. Springer, Berlin.

95. Wittekind C, Bootz F, Meyer HJ, TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer Verlag Berlin 2002: 172-173.
96. Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Phillips JM, Linehan WM and Tangrea JA, Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate* 2004a 60: 25-31.
97. Woodson K, Hanson J and Tangrea J, A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men. *Cancer Lett* 2004b 205: 181-188.
98. Woodson K, Hanson J and Tangrea J, A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men
5. *Cancer Lett* 2004c 205: 181-188.
99. Woodson K, Hayes R, Wideroff L, Villaruz L and Tangrea J, Hypermethylation of GSTP1, CD44, and E-cadherin genes in prostate cancer among US Blacks and Whites. *Prostate* 2003 55: 199-205.
100. Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Hu JJ, Sterling D, Lange EM, Hawkins GA, Turner A, Ewing CM, Faith DA, Johnson JR, Suzuki H, Bujnovszky P, Wiley KE, DeMarzo AM, Bova GS, Chang B, Hall MC, McCullough DL, Partin AW, Kassabian VS, Carpten JD, Bailey-Wilson JE, Trent JM, Ohar J, Bleecker ER, Walsh PC, Isaacs WB and Meyers DA, Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk
116. *Nat Genet* 2002 32: 321-325.

101. Yamada Y, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R and Shiraishi T, Aberrant methylation of the vascular endothelial growth factor receptor-1 gene in prostate cancer. *Cancer Sci* 2003 94: 536-539.
102. Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A, Murata T, Takahashi H, Suzuki H, Ito H, Tsukino H, Kato T, Sugimura Y and Shiraishi T, Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003 106: 382-387.
103. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB and Nelson WG, Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004 64: 1975-1986.
104. Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, Kondo Y, Garcia-Manero G, Lotan R and Issa JP, Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. *Cancer Res* 2004 64: 2411-2417.
105. Zha S, Gage WR, Sauvageot J, Saria EA, Putzi MJ, Ewing CM, Faith DA, Nelson WG, De Marzo AM and Isaacs WB, Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. *Cancer Res* 2001 61: 8617-8623.
106. Zhang Z, Li J, Lantry LE, Wang Y, Wiseman RW, Lubet RA and You M, p53 transgenic mice are highly susceptible to 1, 2-dimethylhydrazine-induced uterine sarcomas. *Cancer Res* 2002 62: 3024-3029.

107. Zhou M, Tokumaru Y, Sidransky D and Epstein JI, Quantitative GSTP1 methylation levels correlate with Gleason grade and tumor volume in prostate needle biopsies. *J Urol* 2004 171: 2195-2198.
108. Zincke H, Bergstralh EJ, Blute ML, Myers RP, Barrett DM, Lieber MM, Martin SK and Oesterling JE, Radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: long-term results of 1,143 patients from a single institution. *J Clin Oncol* 1994 12: 2254-2263.

7. Danksagung

Ich danke all denen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben. Dabei sind besonders zu nennen:

- Prof. Dr. Dr. Alexander von Rücker für die freundliche Überlassung dieser Arbeit und die stets konstruktive Kritik.
- Jörg Ellinger dem ich nicht genug für seine ständige Bereitschaft mir äußerst kompetent unter die Arme zu greifen, danken kann. Ohne ihn und seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.
- Dr. Patrick J. Bastian für die freundliche Betreuung und die Bereitstellung von Mitteln.
- Dr. Katharina Biermann, Dr. Lukas Heukamp und Dr. Phillip Kahl die bei der Bestimmung des Gleason Scores, der Markierung der Karzinomareale und auch darüber hinaus immer gerne dazu bereit waren mir zu helfen.
- Alexandra Breuer und Doris Schmidt die stets freundlich halfen alle organisatorischen und technischen Probleme aus dem Weg zu räumen.
- Ingeborg Heim für die engagierte Erstellung der Schnitte.
- Lydia Kriegl für das äußerst kritische Korrekturlesen.
- Meinen Eltern die mich finanziell unterstützt und ständig motiviert haben.
- Nadja El Kassem die meine fast täglichen Anrufe ertragen hat.