

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Die Rolle epigenetisch regulierter Gene im Wilms-Tumor

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ferdinand Andreas Rosenkranz, geb. Zitzmann
aus
Neuburg an der Donau
2018

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders Prof. Dr. med. Hans Arnholdt
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Jochen Hubertus
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	19.07.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Wilms-Tumor	2
1.2	Grundlagen der Epigenetik.....	5
1.3	Genomische Prägung.....	7
1.4	Der CCCTC Binding Factor (CTCF)	10
2	Aufgabenstellung	12
3	Materialien.....	13
3.1	Primer	13
3.2	Reagenzien und Chemikalien.....	16
3.3	Puffer	16
3.4	Kits.....	17
3.5	Verbrauchsmaterialien	17
3.6	Geräte.....	17
3.7	Enzyme.....	18
3.8	Tumorkollektiv	18
4	Methoden	19
4.1	Epigenetische Methoden.....	19
4.1.1	Bisulfit-Konvertierung	19
4.1.2	Quantitative Bisulfitsequenzierung via Pyrosequencing.....	20
4.2	Molekularbiologische Methoden	26
4.2.1	RNA-Isolation aus Gewebe	26
4.2.2	RNA-Aufreinigung und DNase-Verdau	26
4.2.3	cDNA-Synthese.....	27
4.2.4	Quantitative Real-Time PCR	28
4.2.5	DNA-Isolation aus Gewebe	29
4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
4.2.7	Analyse von Splicevarianten via Pyrosequencing.....	30
4.3	Statistik	31
5	Ergebnisse	32

5.1	Auswahl der zu untersuchenden Gene.....	32
5.2	Auffinden potentieller CTCF-Bindungsstellen.....	33
5.3	Die nicht geprägten Gene <i>RASSF1A</i> , <i>LHX1</i> und <i>GDF7</i>	34
5.4	Das geprägte Gen <i>MEST</i>	36
5.5	Der <i>IGF2/H19</i> -Locus	37
5.6	Der <i>DLK1/MEG3/RTL1</i> -Locus.....	40
5.7	Der <i>NNAT/BLCAP</i> -Locus	43
5.8	Das <i>WT1</i> -Gen	49
5.9	Übersicht.....	52
6	Diskussion.....	54
6.1	Keine relevante Promotormethylierung der untersuchten nicht geprägten Gene	54
6.2	Fehlregulation geprägter Gene durch eine verringerte Promotor-methylierung.....	55
6.3	Der LOI von <i>IGF2</i> , eine wichtige Komponente der Tumorgenese im WT.....	57
6.4	Aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen im WT: Eine Rolle über den <i>IGF2/H19</i> -Locus hinaus	58
6.4.1	Fehlregulation von <i>NNAT</i> und <i>WT1</i> durch aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen im WT.....	58
6.4.2	Änderung der Chromatinorganisation durch aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen.....	59
6.4.3	Veränderung der DNA-Methylierung durch die Bindung von CTCF.....	63
6.5	Kein Hinweis für eine Rolle des <i>MEG3/DLK1/RTL1</i> -Locus in der Tumorgenese des WT.....	64
6.6	Allgemeine Limitationen der vorliegenden Studie	65
7	Zusammenfassung.....	67
8	Literaturverzeichnis	68
9	Wissenschaftliche Beiträge	76
9.1	Tagungsbeiträge	76
9.2	Publikationen.....	76
10	Danksagung	77

1 Einleitung

Die Behandlung vieler kindlicher Malignome gilt als eine Erfolgsgeschichte der modernen Medizin. In den 1930er Jahren wurde auf einer Osteosarkom-Konferenz zusammengefasst: „Gentlemen if you operate they die, if you do not operate they die just the same; this meeting should be concluded with prayers.“ [1]. Ähnlich stellte sich die Lage für den Wilms-Tumor (WT), auch Nephroblastom genannt, dar. So lag die 2-Jahresüberlebensrate bei Erstdiagnose um 1940 unter 10 % [2]. Erst in den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnte, vor allem durch die Einführung erster Zytostatika, eine deutliche Prognoseverbesserung erreicht werden. Seitdem wurde durch zahlreiche weitere Innovationen im Bereich der Diagnostik sowie der Chemo-, Strahlen- und operativen Therapie die Prognose der Patienten weiter stark verbessert. An spezialisierten Zentren in Deutschland beträgt das durchschnittliche Langzeitüberleben heute über 90 % [2], [3].

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Wissen über die biologischen Abläufe bei der Entstehung des WT ähnlich rasant entwickelt. So konnten Mutationen in mehreren Genen im WT identifiziert und deren Einfluss auf die Tumorgenese nachgewiesen werden [4]–[6]. Dennoch ist die Pathogenese dieser Erkrankung längst nicht abschließend geklärt und es ist anzunehmen, dass weitere, bisher noch nicht identifizierte Veränderungen im WT existieren, die zur Tumorgenese beitragen [7].

Derzeit werden epigenetische Veränderungen als frühe Ereignisse in der Krebsentstehung diskutiert [8]. Auch im WT ist es mit *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)/H19* bereits gelungen einen Locus zu identifizieren, der durch epigenetische Fehlregulationen die Tumorgenese vorantreibt [9]–[11]. Insbesondere in embryonalen Tumoren wie dem WT, deren Pathogenese eng mit der embryonalen Entwicklung verknüpft ist [12], könnten epigenetische Veränderungen eine große Rolle spielen, da viele Vorgänge der embryonalen Entwicklung epigenetisch reguliert werden [13]. Es stellt sich also die Frage, ob weitere, bisher nicht identifizierte, epigenetische Veränderungen im WT existieren, die zur Fehlregulation wichtiger Gene führen und so zur Tumorentstehung beitragen.

Von einer genauen Kenntnis der Tumorbiologie erhofft man sich neue Ansätze, um den WT in Zukunft gezielter therapieren zu können. So könnten Verfahren entwickelt werden, die nebenwirkungsärmer und effektiver sind als heutige Therapeutika. Letztlich könnte so die Prognose der betroffenen Patienten weiter verbessert werden. Dies gilt vor allem für die

Patienten, die unter der aktuellen Therapie noch eine relativ schlechte Prognose haben. Dazu zählen insbesondere die Patienten mit Tumoren im Stadium 4 und 5 [3].

1.1 Der Wilms-Tumor

Nahezu sechs Prozent der Malignome im Kindes- und Jugendalter sind Nierentumoren. Mit über 95 % stellt der WT den mit Abstand häufigsten malignen Nierentumor in diesem Lebensabschnitt dar [14]. Die Inzidenz liegt bei ca. zehn Neuerkrankungen pro Jahr, bezogen auf eine Million Kinder [3]. Fünfundneunzig Prozent aller Patienten erkranken vor der Vollendung ihres zehnten Lebensjahres, wobei die meisten Diagnosen zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahr gestellt werden [15], [16]. Eine Erkrankung im Erwachsenenalter ist möglich, aber extrem selten [17]. In ca. 95% der Fälle betrifft die Erkrankung nur eine Niere. Patienten mit bilateralen Tumoren erkranken statistisch gesehen etwa 12 Monate früher als Patienten mit einem unilateralen Befall [15].

Es sind mehrere verschiedene Syndrome bekannt, die mit einem erhöhten Risiko eines WT einhergehen. Dies sind z.B. das WAGR-Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, Genitale Fehlbildungen und Retardierung) [18], das Denys-Drash-Syndrom [19] und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom [20]. Die große Mehrzahl der Erkrankungen tritt jedoch sporadisch, ohne Assoziation zu einem solchen Syndrom, auf [21]. Durch zytogenetische Untersuchungen an Patienten mit WAGR-Syndrom konnten schon früh Rückschlüsse auf die Pathogenese des WT gezogen werden. So gelang bereits 1978 der Nachweis von Deletionen der chromosomalen Region 11p13 im Genom von Patienten mit WAGR-Syndrom [22]. In dieser chromosomalen Region gelang später auch die Isolierung und Charakterisierung eines Gens, das Mutationen in einem Anteil der sporadischen WT aufweist und folglich *Wilms tumor 1* (*WT1*) genannt wurde [4], [15], [23]. Nach der Identifizierung dieses ersten Wilms-Tumor-Gens wurde mit der Untersuchung seiner Funktion begonnen, um zu verstehen, wie *WT1* zur Tumorgenese beiträgt. Da die im WT gefundenen Mutationen zum Verlust der Proteinfunktion führen, schien die Rolle von *WT1* bei der Entstehung des WT der eines Tumorsuppressorgenes (TSG) zu entsprechen. Inzwischen hat sich durch weiteren Kenntnisgewinn ein differenzierteres Bild der (patho-)physiologischen Prozesse, in die *WT1* involviert ist, gebildet [15].

WT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der über vier Zinkfinger-Domänen an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) binden kann. Vier Isoformen von *WT1* können durch alternatives Splicing an zwei verschiedenen Positionen gebildet werden. Einerseits kann das

fünfte Exon übersprungen werden, was zum Verlust von 17 Aminosäuren führt. Andererseits können am Ende von Exon 9 drei zusätzliche Aminosäuren, Lysin, Threonin und Serin (KTS), eingebaut werden [5], [15]. Durch den Einbau dieser drei Aminosäuren wird die Fähigkeit von WT1, an DNA zu binden, beeinflusst [24]. Dadurch können die jeweiligen Varianten unterschiedliche Aufgaben, z.B. in der Nierenentwicklung, ausführen [25]. Abweichungen im Verhältnis der Isoformen untereinander spielen möglicherweise eine Rolle bei der Tumorentstehung. So ist bekannt, dass die Variante von WT1, welche die drei Aminosäuren am Ende von Exon neun beinhaltet, WT1-KTS⁺, eher Charakteristika eines Onkogens zeigt, wohingegen die KTS-negative Variante, WT1-KTS⁻, Eigenschaften eines TSG zeigt [26]. Zusätzlich wurde eine starke Überexpression von WT1 in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen. Dies war teils assoziiert mit einer schlechteren Prognose. Aus diesen Gründen scheint die Rolle von WT1 bei der Krebsentstehung variabel und kann, abhängig vom Kontext, sowohl der eines TSG als auch der eines Onkogens entsprechen [15], [27], [28].

Eine andere häufig vorkommende Alteration im WT ist die Überexpression des als Wachstumsfaktor fungierenden geprägten Gens *IGF2* [7], [9], [29]. Als Prägung bezeichnet man gemeinhin die Expression eines Gens von nur einem Allel, entweder dem vom Vater oder dem von der Mutter vererbten. *IGF2* wird unter physiologischen Verhältnissen nur vom väterlichen Allel transkribiert. Im WT wurden zwei unterschiedliche Phänomene, die zur Expression von *IGF2* auf beiden Allelen führen, beobachtet.

Der Verlust der Heterozygotie oder *loss of heterozygosity* (LOH) bezeichnet die Deletion einer chromosomalen Region des normalerweise diploiden Chromosomensatzes des Menschen. Dadurch steht in der betroffenen Region nur noch entweder eine maternale oder eine paternale Kopie des Erbguts zur Verfügung. Im WT wurde unter anderem der LOH der chromosomalen Region 11p15 beobachtet, die *IGF2* beinhaltet. Im WT ist fast ausschließlich ein Verlust des maternalen Allels, auf dem *IGF2* inaktiv ist, anzutreffen. Dieser Verlust ist vergesellschaftet mit der Duplikation des paternalen Allels [29]–[31]. *IGF2* ist in diesem Fall auf beiden Allelen aktiv. Dieser Zustand wird auch als paternale uniparentale Disomie (pUPD) bezeichnet.

Auch Veränderungen an der DNA-Methylierung, die eine Modifikation der Grundstruktur einzelner Basen der DNA durch Hinzufügen einer Methylgruppe erzeugt, spielen im WT in Bezug auf *IGF2* eine wichtige Rolle. So kann die Methylierung einer normalerweise unmethylierten Kontrollregion nahe des benachbarten und ebenfalls geprägten Genes *H19*

eine Expression von *IGF2* auf dem maternalen Allel zur Folge haben [32]–[34]. Diese epigenetische Fehlregulation von *IGF2* wird als *loss of imprinting* (LOI) bezeichnet. Auf die zugrunde liegenden Mechanismen wird weiter unten eingegangen.

Weitere Veränderungen, die mit der Entstehung des WT in Zusammenhang gebracht werden, sind bekannt. So konnten z.B. Mutationen in einem X-chromosomal gelegenen Gen nachgewiesen werden, das folglich die Bezeichnung *Wilms Tumor Gene on the X chromosome* (*WTX*) erhielt [35]. Daneben zeigt auch das Gen, das für das Protein β -Catenin kodiert (*CTNNB1*), in einem gewissen Prozentsatz von Tumoren Mutationen. Einen Überblick über die wichtigsten Veränderungen und deren Häufigkeit in einer großen Kohorte von spontanen WT gibt Abbildung 1.

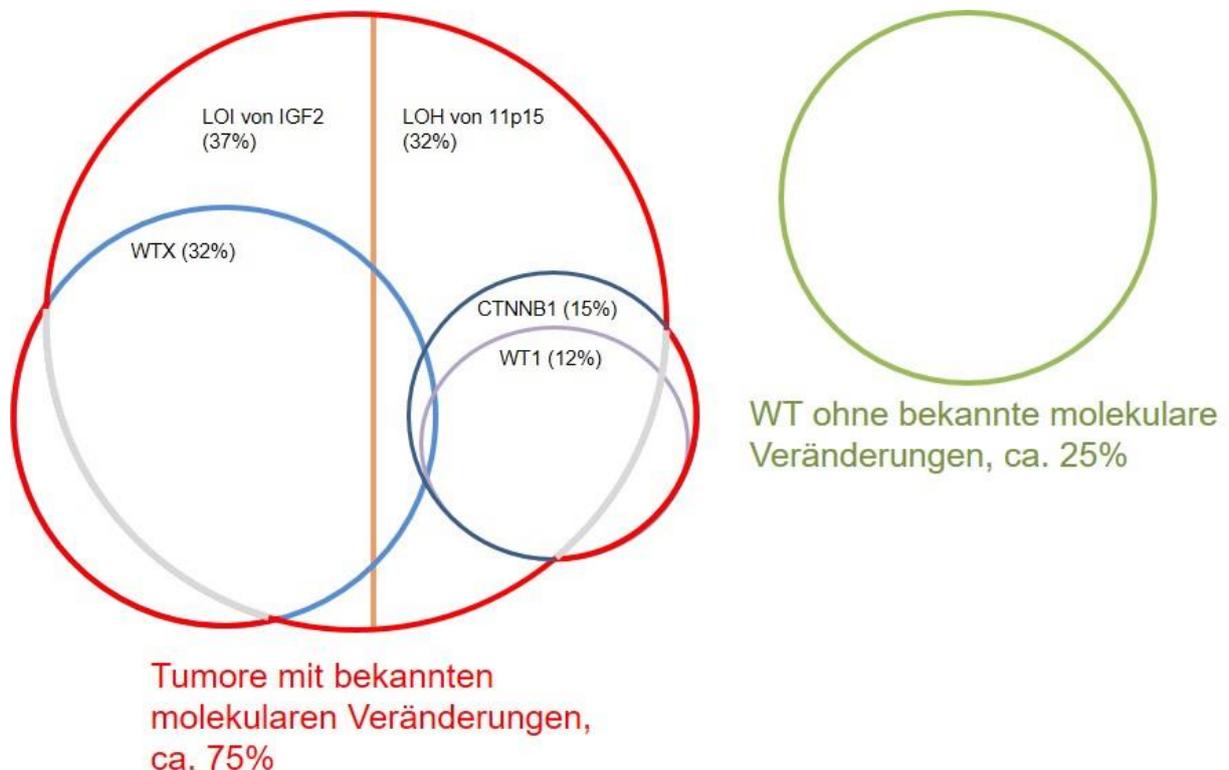


Abb. 1: Übersicht über die wichtigsten bekannten Veränderungen im WT mit Häufigkeit und Überschneidungen (Abb. modifiziert nach [7])

WTs, die einen LOI von *IGF2* aufweisen, tragen häufig auch eine Mutation in *WTX*. Dagegen treten Mutationen von *WT1* und *CTNNB1* vor allem zusammen mit einem LOH von 11p15 auf. Der Gruppe von WTs mit bekannten molekularen Veränderungen (rot) steht eine Gruppe von polynegativen WTs gegenüber (grün).

Abschließend geklärt ist die Pathogenese des WT damit aber noch nicht. Zu welchem Zeitpunkt während der Entwicklung der Niere welche Kombinationen von Läsionen zur

Tumorentstehung führen, ist noch unklar. Mutationen von *WT1*, *WTX* oder *CTNNB1* finden sich jeweils nur in einem relativ geringen prozentualen Anteil der Tumoren und überschneiden sich teilweise stark [7], [36]. Veränderungen an 11p15 sind häufig, aber LOH von 11p15 tritt auch in einer geringen Zahl von Normalgeweben auf, sodass wahrscheinlich weitere Alterationen zur Tumorförmation benötigt werden [37]. Etwa 25 % der Tumoren sind für alle oben genannten Alterationen negativ (Abb. 1) [7]. Es ist also davon auszugehen, dass längst nicht alle Faktoren, die zur Tumorgenese beitragen, identifiziert sind.

1.2 Grundlagen der Epigenetik

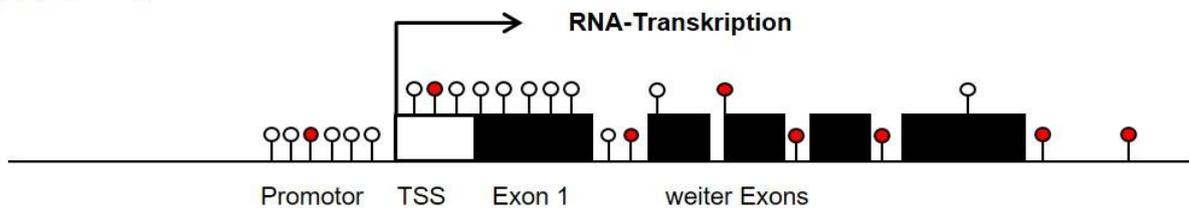
Der Begriff Epigenetik wurde früher verwendet, um Phänomene zu beschreiben, die mit den klassischen Regeln der Vererbung nicht vereinbar waren [38]. Heute beschreibt Epigenetik „Veränderungen der Genexpression, die unabhängig von Änderungen der primären DNA-Sequenz auftreten“ [39]. Durch die Summe der epigenetischen Modifikationen, dem Epigenom, kann in vielzelligen Organismen bei gleicher primärer DNA-Sequenz eine Fülle von unterschiedlich differenzierten Zellen entstehen. Erreicht wird dies durch die Regulation der Verfügbarkeit genetischer Informationen für den Apparat der Proteinbiosynthese. Zwei Mechanismen der Regulation schreibt man eine tragende Rolle zu. Dies ist zum einen die DNA-Methylierung, die eine Modifikation an der DNA-Grundstruktur darstellt, die die Bindungseigenschaften von regulatorischen Proteinen verändert. Zum anderen sind es Modifikationen an Proteinen, die für die „Verpackung“ der DNA verantwortlich sind.

Im eukaryontischen Zellkern liegt die DNA kondensiert auf Proteinen, den Histonen, vor und wird so im Kern „verpackt“. Die Gesamtheit von DNA und Verpackungsapparat wird als Chromatin bezeichnet. Man unterscheidet zwei Zustände des Chromatins. Das Heterochromatin ist dicht gepackte, hauptsächlich inaktive DNA, das Euchromatin ist locker gepackt und steht der Proteinbiosynthese zur Verfügung [40]. Das Zusammenspiel verschiedener chemischer Modifikationen der Histon-Komplexe wie z.B. Acetylierung, Ubiquitinierung oder Phosphorylierung bestimmt den Konformationszustand des Chromatins und entscheidet damit über die transkriptionale Regulation [39]–[41].

Bei der DNA-Methylierung wird von dem Molekül S-Adenosylmethionin (SAM) eine Methylgruppe an das C-5-Atom des Riboserings eines Cytosins übertragen. Dies passiert ausschließlich, wenn das Cytosin Teil eines Cytosin-Guanin-Dinukleotids (CpG) ist [41]. Während die große Mehrheit dieser Dinukleotide verstreut in repetitiven Sequenzen oder nahe der Zentromere in nicht codierenden Sequenzen verteilt ist, konzentriert sich ein kleiner Teil

der CpGs in kurzen Abschnitten, die als CpG-Inseln bezeichnet werden. Diese CpG-Inseln sind häufig mit Promotoren und anderen regulatorischen Abschnitten assoziiert und in der Sequenz von etwa 60% aller Gene vorhanden [42], [43]. Verteilt im Genom liegende CpGs sind zu einem großen Anteil methyliert, mit Genen assoziierte CpG-Inseln sind in der Regel unmethyliert [43], [44]. Beispiele für physiologisch auftretende CpG-Insel-Methylierungen sind geprägte Gene und die X-chromosomale Inaktivierung. Hier erfolgt die Methylierung während der Entwicklung zur langfristigen Stilllegung der Gene [45]. Die Repression der Genaktivität geschieht dabei durch Blockierung der Bindungsstellen des Transkriptionsapparats und von Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion der betroffenen Gene durch die Methylgruppen sowie durch Beeinflussung der Chromatin-Konformation durch verschiedene Mechanismen [46]–[50].

(a) physiologischer Zustand



(b) Zustand in einer Tumorzelle

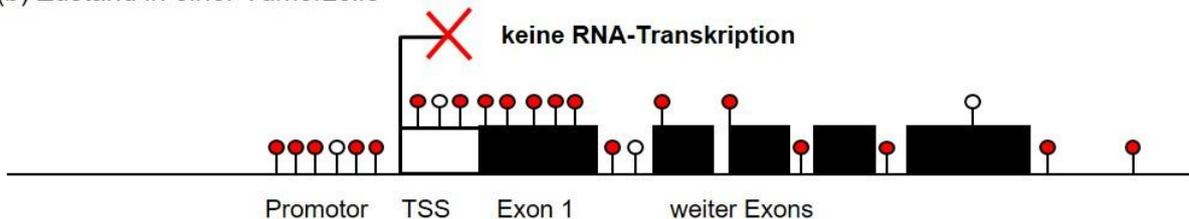


Abb. 2: Schematische Darstellung der Stilllegung eines Gens durch Promotormethylierung (Abb. modifiziert nach [50])

(a) Die weitgehend unmethylierte CpG-Insel im Promotorbereich lässt eine Transkription des Gens zu. (b) Die weitgehend methylierte CpG-Insel im Promotorbereich führt zu einer Unterdrückung der Transkription. Methylierte CpG-Dinukleotide sind durch einen rot gefüllten Kopf gekennzeichnet. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind weiß gefüllt. Proteincodierende Bereiche des Gens sind schwarz gefüllt, nicht proteincodierende Bereich weiß gefüllt dargestellt. TSS steht für *transcriptional start site*.

Veränderungen der DNA-Methylierung werden in Zusammenhang mit mehreren zur Carcinogenese beitragenden Effekten gebracht. Man geht davon aus, dass eine globale Hypomethylierung die strukturelle Integrität des Genoms schwächt. Daraus resultieren höhere Mutationsraten, LOH-Raten und vermehrte Tumorentstehung [51]–[53]. Zusätzlich konnte eine

Reaktivierung von Genen, die wichtige Funktionen für Entwicklung und Wachstum erfüllen und die nach abgeschlossener Differenzierung durch Methylierung reprimiert werden, in verschiedenen Malignomen nachgewiesen werden. Dazu zählen unter anderem auch die geprägten Gene [43].

Neben dem Auftreten von Hypomethylierung in Krebszellen ist die Stilllegung von TSG durch Hypermethylierung von spezifischen, promotorassoziierten CpG-Inseln beschrieben (vgl. Abb. 2). Dadurch trägt die Promotormethylierung eines TSG in ähnlicher Weise zur Entstehung oder zum Voranschreiten eines Tumors bei, wie es auch eine Mutation mit Verlust der Proteinfunktion des entsprechenden Gens tun würde [54]. Beispiele für TSGs, die durch Promotorhypermethylierung deaktiviert werden, sind zahlreich. Unter anderem sind hier die Gene *O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)*, ein wichtiges DNA-Reparaturgen, *Ras association domain-containing protein 1 A (RASSF1A)*, das im Zusammenhang mit dem *Rat sarcoma (RAS)*-Onkogen steht oder das Brustkrebs-Gen *Breast Cancer 1 (BRCA1)* zu nennen [55]–[57]. Im Wilms-Tumor standen bisher klar die Veränderungen am *IGF2/H19*-Locus im Fokus der epigenetischen Forschung.

1.3 Genomische Prägung

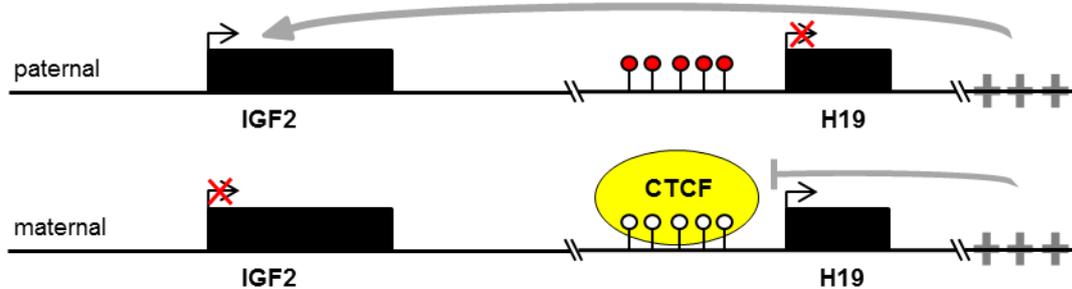
Der Fortpflanzungsprozess bei Säugetieren ermöglicht die Vererbung von jeweils einer väterlichen und einer mütterlichen Kopie eines jeden Chromosoms. Für die überwiegende Mehrzahl der von diesen Chromosomen beherbergten Gene gilt, dass sie von beiden Allelen transkribiert werden und die väterlichen und mütterlichen Kopien funktional gleichwertig sind. Ausgenommen davon ist eine kleine Gruppe von Genen, die lediglich eine monoallelische Expression zeigen. Es sind sowohl Gene, die überwiegend vom mütterlichen, als auch Gene, die überwiegend vom väterlichen Allel exprimiert werden, bekannt. Da die Stilllegung aber oftmals nur partiell erfolgt, wäre es sinnvoller, zum Beispiel von maternal reprimierten anstelle von paternal exprimierten Genen zu sprechen [58]. Wegen der weiten Verbreitung in der Literatur werden in der vorliegenden Arbeit jedoch weiterhin die gängigen Begriffe verwendet. Momentan sind fast 80 humane geprägte Gene bekannt [58], [59]. Überwiegend übernehmen diese Aufgaben bei der Gewebedifferenzierung und Organogenese, der Regulierung von embryonalem und plazentarem Wachstum sowie im adulten Metabolismus [58], [60], [61]. Geprägte Gene verteilen sich nicht gleichmäßig übers Genom, sondern treten in Clustern auf bestimmten Chromosomen auf (z.B. Chromosom 7, 11 und 14). Von den wenigen einzeln vorliegenden geprägten Genen wird vermutet, dass sie im Laufe der Evolution durch Transposition oder Translokation im Genom verteilt wurden [62].

Generell wird die Prägung maßgeblich durch DNA-Methylierung etabliert [63]. Innerhalb vieler Clusters konnten CG-reiche Regionen identifiziert werden, die nur auf einem der beiden Allele eine DNA-Methylierung aufweisen. Solche Regionen werden als *differentially methylated regions* (DMR) bezeichnet. DMRs, die regulatorische Elemente enthalten, welche die monoallelische Expression mehrerer Gene im Cluster teils über weite Entfernungen hinweg kontrollieren, werden auch als *imprinted control region* (ICR) oder *imprinting center* (IC) bezeichnet [63]–[65].

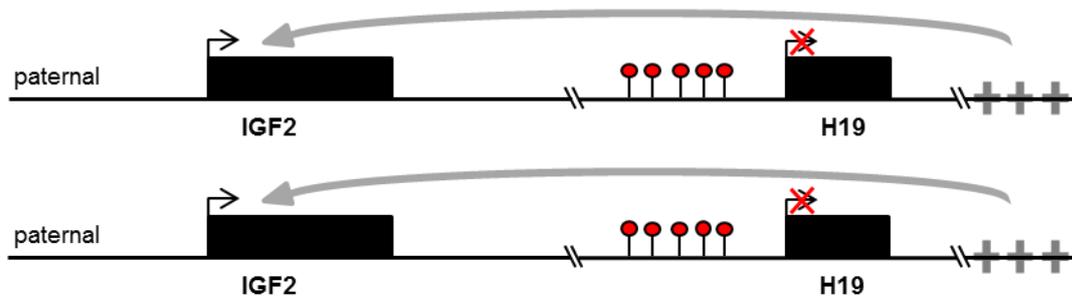
Die Mechanismen, die die Prägung kontrollieren, können unterschiedlich sein. Liegt das geprägte Gen nicht in einem Cluster vor, kann es durch differentielle Methylierung im Promotorbereich zur Stilllegung des methylierten Allels kommen [66], [67]. Auch nicht kodierende mRNAs können zur Regulation geprägter Gene beitragen [68]. Ein gut untersuchtes Beispiel dafür, wie DNA-Methylierung die Transkription geprägter Gene beeinflussen kann, ist der geprägte Locus *IGF2/H19* der chromosomalen Region 11p15. *IGF2*, paternal geprägt, und *H19*, maternal geprägt, sind benachbarte Gene und bilden zusammen einen Cluster. *IGF2* besitzt vier Promotoren und transkribiert ein Protein, das wichtig für die Stimulation embryonalen Wachstums ist. Das Gen *H19* kodiert kein Protein. Die Funktionen der nicht kodierenden RNA des *H19*-Gens sind wenig geklärt. Eventuell ist *H19* nur Teil des regulatorischen Apparats von *IGF2*, es wurden aber auch wachstumsunterdrückende Eigenschaften beobachtet [61], [69]. Der Cluster weist mehrere DMRs in der Region von *IGF2* auf [65], [70], wird aber wesentlich durch eine ca. 2.000 Basenpaare (bp) *upstream* von *H19* liegende ICR, auch ICR1 oder *H19*-DMR genannt, kontrolliert (vgl. Abb. 3 und 14). Diese Kontrollregion ist physiologischerweise auf dem paternalen Allel methyliert und beinhaltet mehrere Bindungsstellen für ein Protein, das nur an das unmethylierte, maternale Allel binden kann [34]. Dieses Protein, das *CCCTC binding factor* oder CTCF genannt wird, ist in der Lage, *IGF2* von der Wirkung eines gemeinschaftlich mit *H19* genutzten Transkriptionsverstärkers, eines sogenannten Enhancers, abzuschirmen. So kommt es auf dem maternalen Allel zur Expression von *H19*, während die Methylierung der paternalen ICR die Bindung von CTCF verhindert und so *IGF2* durch den Enhancer aktiviert wird [11], [34], [71]. Kommt es zum Verlust der Bindung von CTCF an der ICR des maternalen Allels, kann CTCF seine Wirkung als isolierender Faktor nicht wahrnehmen und es kommt auch auf dem mütterlichen Allel zur Expression von *IGF2*. In Modellversuchen konnte gezeigt werden, dass die Deletion oder Mutation der CTCF-Bindungsstellen zur biallelischen Expression führt [72]–[74]. Wie weiter oben bereits ausgeführt, scheinen im Wilms-Tumor aber neben der Duplikation des paternalen

Allels vor allem das Auftreten von DNA-Methylierung an der ICR des maternalen Allels für die biallelische Expression von *IGF2* verantwortlich zu sein [75]. Inzwischen wurde LOI von *IGF2/H19* auf Grund von epigenetischer Fehlregulation auch in diversen anderen Tumoren beobachtet, so z.B. bei Rektum-, Blasen-, Ösophagus- und Mammakarzinomen [76]–[79].

(a) physiologischer Zustand (ROI)



(b) Loss of heterozygosity (LOH)



(c) Loss of imprinting (LOI)

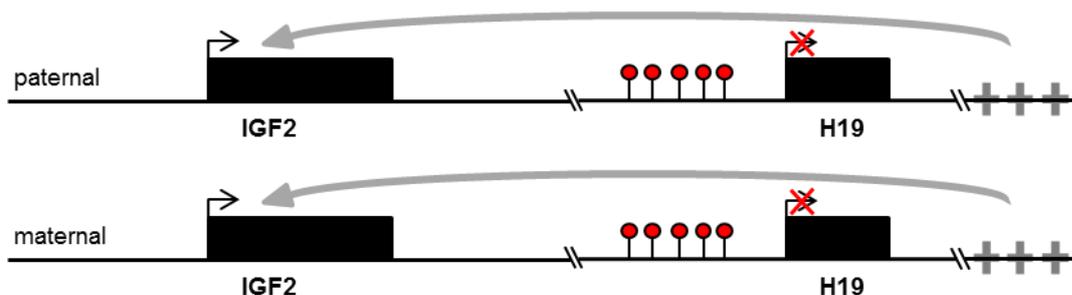


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Verhältnisse am *IGF2/H19*-Locus (Abb. modifiziert nach [33])

(a) *Retention of imprinting* bezeichnet den physiologischen Zustand am *IGF2/H19*-Locus mit reziproker Expression. Das unmethylierte Vorliegen der maternalen ICR1/*H19*-DMR (weiß gefüllte Kreise) ermöglicht die Bindung von CTCF und dadurch die Isolation von *IGF2* von den *downstream* gelegenen Transkriptionsverstärkern (Pluszeichen). Am paternalen Allel findet die Bindung von CTCF auf Grund der DNA-Methylierung der ICR1/*H19*-DMR (rot gefüllte Kreise) nicht statt und *IGF2* bleibt aktiv. (b) *Loss of heterozygosity*: Durch Verlust des maternalen und Duplikation des paternalen Allels kommt es zu einer Expression von *IGF2* auf beiden Allelen. (c) *Loss of imprinting*: Durch Methylierung der maternalen ICR (rot gefüllte Kreise) kommt es zu einer Expression von *IGF2* auf beiden Allelen.

Auch der Verlust der Prägung anderer geprägter Gene ist im Zusammenhang mit der Tumorentstehung bekannt. So verliert z.B. *mesoderm-specific transcript homolog (MEST)* seine Prägung häufig in Lungenkarzinomen oder *tumor protein p73 (TP73)* im Magenkarzinom [80]–[82]. Auch ohne Nachweis von LOI findet man Assoziationen zwischen Malignomen und geprägten Genen. Zum Beispiel codiert *delta-like 1 homolog (DLK1)* für einen potentiellen Serummarker des Hepatoblastoms, eines kindlichen Lebertumors. Ein anderes Beispiel ist das *Neuronatin-Gen (NNAT)*, dessen Promotor in Hypophysenadenomen eine Hypermethylierung aufweist [83]. Eine epigenetische Fehlregulation eines Vertreters dieser Gruppe von Genen, die wohl auch in der Niere an der Organdifferenzierung beteiligt sind [84], könnte ähnlich wie *IGF2* zur Pathogenese einer Krebserkrankung wie dem WT beitragen, bei der es aufgrund von fehlerhaften Entwicklungsvorgängen zu einem Differenzierungsarrest kommt [85]–[87].

1.4 Der CCCTC Binding Factor (CTCF)

Die Aufgaben von CTCF sind sehr vielfältig. Wurde bei der ursprünglichen Identifizierung von einer Rolle als transkriptionellem Repressor am *c-myc*-Gen ausgegangen, ist heute klar, dass CTCF eine globale Rolle in der Regulation der Genaktivität von Wirbeltieren einnimmt [88]–[90]. CTCF ist ein Protein, das über elf Zink-Finger-Domänen an die DNA binden kann. Diese Domänen sind in höheren Eukaryonten hoch konserviert und zeigen in ihrer Struktur von der Maus über das Huhn hin zum Menschen so gut wie keine Abweichungen [91]. Im menschlichen Organismus ist CTCF ubiquitär exprimiert [90]. Versuche im Mausmodell mit vollständiger oder partieller Deaktivierung von CTCF führen zum Tod der Embryonen bzw. zur Fehlregulation hunderter Gene und einer Entwicklungsverzögerung [92].

Genomweit konnten, je nach Studie, zwischen 13.000 und 27.000 CTCF-Bindungen an der DNA festgestellt werden, wobei die Zahlen abhängig von untersuchtem Zelltyp und methodischem Herangehen sind [90]. Durch die Analyse der Sequenzen, an denen die Bindungen beobachtet wurden, konnte ein Kernbindungsmotiv bzw. eine *Core-Sequenz* ermittelt werden, die hohe Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Studien aufweist [90], [93], [94]. Die isolierende Funktion erfüllt CTCF durch die Dimerisierung mit anderen DNA-gebundenen CTCF-Proteinen, was zur Ausbildung von Chromatinschleifen führen kann [95], [96].

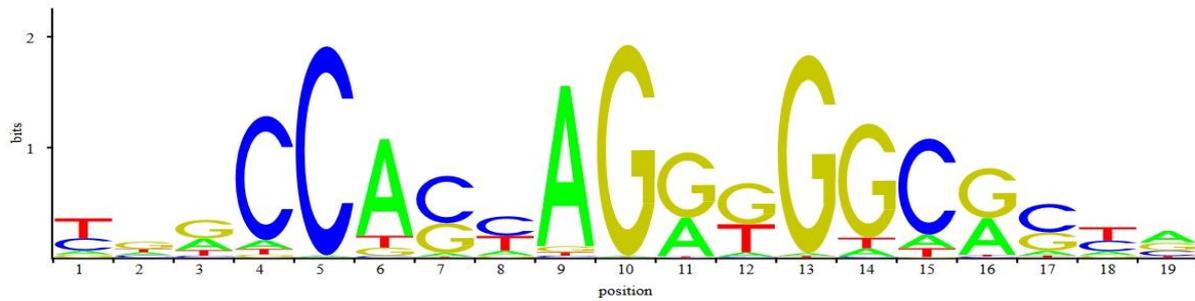


Abb. 4: Sequenz-Logo der CTCF-Core-Sequenz

Dargestellt ist das Kernbindungsmotiv von CTCF, entnommen aus der frei zugänglichen Datenbank für Kernbindungsmotive von Transkriptionsfaktoren JASPAR [94]. Die X-Achse gibt die Position der einzelnen Base des 19 Basen umfassenden Motives an. In der Y-Achse gibt die Gesamthöhe einer Position Aufschluss über die Relevanz dieser Position für die Bindung des Transkriptionsfaktors. Die Höhe der einzelnen Buchstaben einer Position gibt die Frequenz an, in welcher die entsprechende Base an dieser Position vorkommt.

Im Falle von *IGF2* dimerisiert das an die maternale ICR gebundene CTCF mit weiteren CTCF-Proteinen, die an generell unmethylierte CTCF-Bindungsstellen in der Nähe der *IGF2*-Promotoren binden. Die hierdurch ausgebildete Chromatinschleife stellt eine physische Barriere für die weiter *downstream* gelegenen verstärkenden Elemente dar. So wird eine Abschirmung von *IGF2* und damit seine Stilllegung erreicht. Durch die Methylierung der paternalen ICR kann hier keine Bindung von CTCF erfolgen, sodass es nicht zur Schleifenbildung und Isolierung kommt und *IGF2* aktiv bleibt [73], [97]. Die Funktion als schleifenbildendes Element macht den Einfluss von CTCF auf die Genaktivität sehr variabel. Abhängig von der umgebenden Sequenz kann durch die Ausbildung einer Schleife eine Chromatin-Konformation geschaffen werden, die dem Ablesen eines Gens zuträglich ist, oder, wie im Fall von *IGF2*, die durch Abschirmung verstärkender Elemente zu einer Stilllegung des Gens führt [90].

Die vielfältigen Funktionen von CTCF und die Tatsache, dass eine Bindung an DNA abhängig von deren Methylierung stattfindet, machen CTCF-Bindungsstellen zu interessanten Zielen für die Erforschung der epigenetischen Regulation von Genen.

2 Aufgabenstellung

Das Verständnis der Pathogenese des WT hat sich im Laufe der letzten vier Dekaden fundamental verbessert. Verschiedene Mutationen, insbesondere der Gene *WT1*, *WTX* und *CTNNB1*, konnten identifiziert werden. Dennoch sind diese Veränderungen längst nicht in jedem WT zu finden [7], [36]. Neben Alterationen in der primären DNA-Sequenz von Tumoren wird epigenetischen Veränderungen vor allem in der frühen Phase der Krebsentstehung eine zunehmende Bedeutung beigemessen [8].

Mit dem LOI von *IGF2*, der durch abweichende DNA-Methylierung einer Kontrollregion verursacht wird, wurde bereits eine wichtige epigenetische Alteration im WT identifiziert [9], [11], [98]. Gerade epigenetische Prozesse könnten aufgrund der weitreichenden Aufgaben bei Zell- und Gewebsdifferenzierung für embryonale Tumoren von großer Bedeutung sein [38]. Das Ziel der Arbeit war daher, Gene zu identifizieren, die aufgrund von bisher unbekanntem epigenetischen Alterationen im WT fehlreguliert werden. Hierzu sollte in einem ersten Schritt an einer Sammlung aus 45 Wilms-Tumoren und elf Nierengewebe aus histologisch gesichert nicht befallenen Anteilen der Tumornephrektomie-Präparate die mRNA-Expression einer Reihe von Genen bestimmt werden. Diejenigen Gene, die auffällige Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgewebe aufweisen, sollten weiter auf epigenetische Veränderungen hin untersucht werden. Dafür sollte in der Umgebung der Gene nach Sequenzen gesucht werden, die einen Einfluss auf deren Regulation haben könnten. Zu solchen Sequenzen zählen im Speziellen CpG-Inseln innerhalb der Promotorregion, DMRs in geprägten Loci sowie CTCF-Bindungsstellen. Nach der Identifikation solcher regulatorischer Elemente sollte der Grad der DNA-Methylierung mittels quantitativer Bisulfit-Pyrosequenzierung sowohl im Tumorkollektiv als auch im Normalgewebe bestimmt werden. Hierdurch sollte ein besseres Verständnis der veränderten DNA-Methylierung im WT und deren Zusammenhang mit der Genexpression entstehen.

3 Materialien

3.1 Primer

Die in den Tabellen aufgeführten Primer wurden von Eurofin MWG Operon, Ebersberg, erworben. Zur cDNA-Synthese wurden Primer mit zufälliger Sequenz (Random Hexamers) von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, verwendet.

Tabelle 1: Primer zur Bestimmung der Genexpression mittels quantitativer *real-time* PCR

Bez	FW-Seq	RV-Seq	PL
<i>BCAP</i>	AACGGAAGCCTTGACAATT	ATCGGAGCAGTGGTACAGGAA	101
<i>BLCAP V1a</i>	GTGGCGAGCTGAGGTGGA	ATCGGAGCAGTGGTACAGGAA	64
<i>BLCAP V2a</i>	TTTTCTGCTGGACAGGTCGTT,	TGCTCTCTGGCTGTCAGCC	102
<i>DLK1</i>	GCAACCCCCAAAATGGATTC	GAGGTCACGCACTGGTCACA	91
<i>GDF7</i>	ACAGACCAGGCGACCCAAG	CCACCTCGTCTGCGTCGT	91
<i>H19</i>	CTCACCCACCGCAATTCATT	CGTGCCGGAGCTGCC	51
<i>IGF2</i>	CCTCCGACCGTGCTTCC	GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	81
<i>LHX1</i>	ATGCAACCTGACCGAGAAGTG	GCCTGCGCATTGGTACC	91
<i>MEG3</i>	CCTCTCCATGCTGAGCTGCT	TGTTGGTGGGATCCAGGAAA	91
<i>MEST</i>	TCCCCTGCCCTTCACTCAT	CAACCACACCCACAGAGTCTTG	91
<i>NNAT</i>	CGGCTGGTACATCTTCCGC	TGTCCCTGGAGGATTTGAAA	91
<i>RASSF1A</i>	GGCGTCGTGCGCAA	GATCTTCTGCTCAATCTCAGCTTG	91
<i>RL1T</i>	GCATTGCCCTAGAGAGGCAC	GCTTCCTTCGGTTAAACACG	91
<i>TBP</i>	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	72
<i>WT1</i>	CGAGAGCCAGCCCGCTA	TCGAAGGTGACCGTGCTGTA	51

Angegeben sind die Bezeichnungen der untersuchten Gene (Bez), die Sequenz der *forward primer* (FW-Seq) in 5'-3'-Richtung, die Sequenz der *reverse primer* (RV-Seq) in 5'-3'-Richtung und die Länge des PCR-Produkts in Basenpaaren (PL).

Tabelle 2: Primer zur Bisulfitequenzierung mittels Pyrosequencing

Bez	Seq.	GRCh37/PL/SL/CpGs
<i>BLCAP</i> -Promoter:		GRCh37: Chr20:36156534-36156726
FW:	AGTTTTTGAGTTTTGGTTGTATGATGAA	
RV:	AATCCCCTCATACATATAACAACAA	PL: 193
Seq:	GGGGTGGATTTTGAGTTA	SL: 99 CpGs: 11
<i>GDF7</i> -Prom:		GRCh37: Chr2: 20866370-20866566
FW1:	TTTTTGGGGTTTGTGGTTGAG	
RV1/2:	CCCCCTCCCTACCCTAATTC	PL: 197
Seq1:	TTGTGGTTGAGTGGG	SL: 73 CpGs: 11
Seq2:	TTGTGGTTGAGTGGG	SL: 47 CpGs: 9
<i>GDF7</i> -Prom2:		GRCh37: Chr2: 20866101-20866566
FW2:	AGAAGGAGGGTGAAGGT	
RV1/2:	CCCCCTCCCTACCCTAATTC	PL:466
Seq3:	GTTAGTTGGAAGTATAGTTAAA	SL: 60 CpGs: 7
<i>H19</i> -DMR-CTCF6:		GRCh37: Chr11: 2021071-2021322
FW:	GTATAGAGTTAGGGGTTTTTGTATAGTA	
RV:	CTCCATAAATATCCTATTCCCAAATA	PL:252
Seq:	GGTTTTATAGTTTGGATGGT	SL: 47 CpGs: 6
<i>LHX1</i> -Prom:		GRCh37: Chr17: 35293970-35294421
FW:	GGGTAGGGGGATGTAGAATGG	
RV:	TCCTTTTCCTTTCCCTTCTT	PL: 452
Seq1:	GGGATGTAGAATGGTTTATA	SL: 69 CpGs: 10
Seq2:	GGGGAGGGTTAGTAATAA	SL: 75 CpGs: 15
<i>MEG3</i> -IG-DMR:		GRCh37: Chr14: 101275684-101275775
FW:	ATTTGGTATTTGTAGTTTTATGTTAAGATG	
RV:	ATCAAAACAACCTCAAATCCTTTATAAC	PL: 92
Seq:	AATTGGGTTTGTAGTAG	SL: 33 CpGs: 5
<i>MEST</i> -Prom:		GRCh37: Chr7: 130132207-130132355
FW:	TGTGGTTGGAGTTTTGGGATTAG	
RV:	AAAATAACACCCCTCCTCAAATAA	PL:149
Seq:	GGTTTTGGGATTAGGG	SL: 63 CpGs 5

<i>NNAT</i> -CTCF:		GRCh37: Chr20: 36148051-36148213
FW:	TGTTTGGGTTTTGTTTAGTAGAGAT	
RV:	AATACTAAATACAAAACCCTATCCTTAC	PL: 163
Seq:	GGTTTTGTTTAGTAGAGATTAT	SL: 107 CpGs: 5

<i>NNAT</i> -CTCF2:		GRCh37: Chr20: 36147864-36148095
FW:	TTTGGGAAAATGGATTATGGTTAATAATAG	
RV:	ACCCCAAAAAACCATACATAATCTCTACT	PL: 232
Seq:	AAACCAACCCACTATAT	SL: 107 CpGs: 5

<i>NNAT</i> -Promoter:		GRCh37: Chr20: 36149497-36149823
FW:	GGGGTAGGTATGGAAAGAGTAGA	
RV:	AAACCCCTCAAACCTACCTACAAC	PL: 327
Seq:	GGTGGAGGGAGGGTATTTAA	SL: 67 CpGs:10

<i>WT1</i> -CTCF:		GRCh37: Chr11: 32395751-32396079
FW:	GAAAGGTTATTAGGTATTGTGTTAAGG	
RV:	ATACCACTAAATATCCTCACATATACAC	PL: 329
Seq:	AAAGTATTTGTTTTTATATTGAG	SL: 57 CpGs: 6

Angegeben sind: Bezeichnungen der untersuchten Regionen (Bez), die Sequenz der Vorwärts- (FW), Rückwärts- (RV) und Sequencing-Primer (Seq) in 5'-3'-Richtung. Zusätzlich sind die Koordinaten der jeweiligen Region im humanen Referenzgenom des Genom-Referenz-Konsortiums in der Version 37 (GRCh37 - Ensembl-Datenbank Version 75), die Länge des PCR-Produkts (PL), die Länge des sequenzierten Teilstücks (SL) und die Anzahl der sequenzierten CpGs (CpGs) angegeben.

Tabelle 3: Primer zur Analyse von Splicevarianten via Pyrosequencing

Bez	Seq.	PL
<i>WT1</i> -KTS:		
FW:	TCCGACCACCTGAAGACC	81 (KTS ⁺), 72 (KTS ⁻)
RV:	ACAACCTGGCCACCGACAG	
Seq:	ACACCAGGACTCATACAG	

Angegeben sind: Bezeichnungen der untersuchten Regionen (Bez), die Sequenz der Vorwärts- (FW), Rückwärts- (RV) und Sequencing-Primer (Seq) in 5'-3'-Richtung und die Länge des PCR-Produkts in Basenpaaren (PL).

3.2 Reagenzien und Chemikalien

6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PyroMark™ Annealing Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark™ Binding Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark™ Denaturation Solution	QIAGEN GmbH, Hilden
Streptavidin Sepharose™ High Performance	Ge-Healthcare Bio-Sciences AB SE, Uppsala, Schweden
TRI Reagent® RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (ddH ₂ O)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.3 Puffer

STE-Puffer:	0,1 M NaCl
	10 mM TRIS, pH: 8,0
	1 mM EDTA
	1% SDS

TBE-Puffer: 89 mM TRIS, pH: 8,0
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

TE-Puffer: 10 mM TRIS, pH: 8,0
1 mM EDTA

3.4 Kits

EpiTect Bisulfite Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark™ Gold Q24 Reagents	QIAGEN GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

3.5 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml PCR Tube Strips	Eppendorf AG, Hamburg
14 ml BD Falcon™ Round-Bottom Tubes	BD, Heidelberg
Biosphere® Filterspitzen, 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere® Filterspitzen, 10-100 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere® Filterspitzen, 1-10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Safe-Lock Tubes, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Quarzküvette QS 10 mm	Hellma, Mühlheim
Standard 96-Well PCR-Plates	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PyroMark Q24 PCR-Plate	QIAGEN GmbH, Hilden

3.6 Geräte

Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt
Gel Jet Imager	Intas Science Imaging GmbH, Göttingen
Homogenisator Micra	ART Labortechnik, Mühlheim
Mastercycler ep <i>realplex</i> ² S	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
MD-01N Dry Bath Incubator	Major Science, Saratoga, CA, USA

Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Mini®-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MS2 S8 Minishaker	IKA® Works Inc., Wilmington, NC, USA
Pipette Research® 100–1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research® 10–100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research® 1–10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
PowerPac Basic™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PyroMark Q24 MDx System	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	QIAGEN GmbH, Hilden
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage Vic-1501	Acculab, Edgewood, NY, USA

3.7 Enzyme

DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
iTaq SYBR Green® Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Maxima Hot Start Taq	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.8 Tumorkollektiv

Fünfundvierzig Tumorproben von 40 Patienten wurden aus der Tumorbank des Dr. von Haunerschen Kinderspitals für diese Studie herangezogen. Davon waren 16 (40 %) Patienten weiblich und 24 (60 %) männlich. Bei 11 (27,5 %) der 40 Patienten wurden bilaterale Tumoren diagnostiziert. Bei drei (7,5 %) Patienten wurden bei bilateralem Tumor jeweils Proben aus dem linken wie rechten Tumor asserviert. Von zwei (5 %) Patienten wurde aufgrund eines Rezidives eine weitere Probe asserviert. Das mediane Alter bei Ersteingriff lag bei 34 Monaten, das mittlere Alter bei 44 Monaten. Die Standardabweichung (SD) betrug 42 Monate mit einem minimalen Alter von 2 Monaten bis zu einem maximalen Alter von 16 Jahren bei Ersteingriff. Vierunddreißig (85 %) von 40 Patienten wurden mit einer neoadjuvanten Chemotherapie nach SIOP-Protokoll behandelt [99]. Syndrome mit definierter genetischer Ursache, wie das WAGR-, Denys-Drash-, Fraiser- oder Beckwith-Wiedemann-Syndrom, wurden bei keinem

Patienten festgestellt. Bei zwei (5 %) der Patienten fielen urogenitale Fehlbildungen im Sinne einer Hypospadie und einer Retentio testis auf. Bei zwei (5 %) weiteren Patienten wurde eine Hemihypertrophie beobachtet.

Eine histologische Klassifikation als Wilms-Tumor erfolgte für alle Tumorproben durch Herrn Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker, Institut für Pathologie der LMU München. Hierzu erfolgte eine histologische Bestimmung aus dem zu analysierenden Gewebeschnitt, um so der Heterogenität dieses Tumors Rechnung zu tragen. Die elf als Kontrollgruppe dienenden Gewebeproben wurden histologisch als tumorfrei befundet. Die Proben stammten von acht männlichen und drei weiblichen Patienten. In dieser Gruppe lag das mediane Alter zum Zeitpunkt der Operation bei 39 Monaten (Mittelwert: 34 Monate), mit einer Spannweite von zwei bis 61 Monaten.

Die Studien wurden von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München unter den Aktenzeichen 250-05 (10.11.2005) und 431-11 (19.10.2011) genehmigt. Die schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an den Studien sowie zur Sicherung genetischer Daten wurde von allen Erziehungsberechtigten eingeholt.

4 Methoden

4.1 Epigenetische Methoden

4.1.1 Bisulfit-Konvertierung

Die Behandlung von DNA mit Bisulfit-Salzen wie z.B. Natrium-Bisulfit (NaHSO_3) führt zu einer Desaminierung nicht methylierter Cytosin-Reste. Durch diese Desaminierung werden die betroffenen Cytosin-Reste zu Uracil umgewandelt [100], [101]. Methylierte Cytosin-Reste, also 5-Methylcytosine, sind von dieser Reaktion jedoch nicht betroffen. Erfolgt die Vervielfältigung der so behandelten DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden Uracil-Reste in der nachgebildeten DNA durch Thymin-Reste ersetzt. Von der Konvertierung nicht betroffene methylierte Cytosine bleiben auch nach der Vervielfältigung als Cytosine bestehen. Der so entstandene Unterschied in der Sequenz zwischen methylierter und nicht methylierter DNA kann mittels verschiedener Methoden detektiert werden. Hierdurch werden Rückschlüsse auf die Methylierung der DNA möglich.

Die Bisulfit-Konvertierung erfolgte mit Hilfe des Qiagen EpiTect® Bisulfite Kits. Die Konvertierung wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung folgender Modifikationen durchgeführt:

- Einsetzen von 3 µg DNA anstelle der vom Hersteller empfohlenen 2 µg.
- Die Elution der konvertierten DNA in 20 µl EB-Puffer wurde zweimal nacheinander durchgeführt, wodurch sich ein Volumen von 40 µl konvertierter DNA ergab.

Nach Beendigung des Protokolls wurden die Proben umgehend weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.1.2 Quantitative Bisulfitsequenzierung via Pyrosequencing

Pyrosequencing ist eine Methode, die die Bestimmung der Basensequenz eines DNA-Moleküls während der Synthese vom Einzelstrang zum Doppelstrang ermöglicht. Diese so genannte *Sequencing-by-synthesis*-Methode wurde erstmals von Ronaghi et al. [102] beschrieben und verdankt ihren Namen der Freisetzung eines Diphosphats oder Pyrophosphats (PP_i) bei der Inkorporation eines Desoxyribonukleosidtriphosphates (dNTP) durch die Polymerase in den länger werdenden Doppelstrang. Das entstandene PP_i wird über mehrere enzymatische Reaktionen (Abb. 4) in ein Lichtsignal umgewandelt, dessen Stärke proportional zur Anzahl der entstandenen PP_i ist. Enthält die Sequenz, die in einem Schritt synthetisiert wird, beispielsweise zwei gleiche Nukleotide hintereinander, würde man ein doppelt so starkes Lichtsignal wie bei einem einfachen Einbau eines dNTPs erwarten. Da eine Elongation nur vom 3'-Ende eines doppelsträngigen DNA-Moleküls ausgehen kann, benötigt man vor der zu sequenzierenden Region einen Primer, den so genannten Sequencing-Primer. Wichtige Voraussetzung zur Sequenzierung ist, dass immer nur eine Art von dNTP zur selben Zeit in der Reaktionskammer anwesend ist, sodass auf die synthetisierte Sequenz rückgeschlossen werden kann.

Bei der quantitativen Bisulfitsequenzierung via Pyrosequencing wird nun zuerst aus der vorher bisulfitkonvertierten genomischen DNA mittels PCR eine Ziel-Region vervielfältigt. Nun kann das PCR-Produkt nach vorheriger Denaturierung und Hinzufügen des Sequencing-Primers im Pyrosequencer durch den oben beschriebenen Mechanismus analysiert werden. Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z.B. der genomischen Bisulfitsequenzierung, wird dabei nicht ein einzelnes Amplifikat, sondern im optimalen Fall alle der im PCR-Produkt enthaltenen Amplifikate untersucht. Wird nun bei der Synthese des Stranges ein Cytosin eines CpGs erreicht, entspricht das Verhältnis der eingebauten dCTP zu den eingebauten dTTP dem Verhältnis von methylierter DNA zu nicht methylierter DNA der untersuchten Probe [103], [104]. Dieser Rückschluss ermöglicht eine genaue quantitative Bestimmung des Anteils

methylierter DNA für das jeweilige CpG der Probe. Die Verteilung der Methylierung innerhalb der untersuchten Regionen ist mit dieser Methode nicht abzubilden. So könnte eine gemessene Methylierung von 50 % an mehreren aufeinander folgenden CpGs durch eine Mischung von zu gleichen Teilen vollständig methylierten und vollständig unmethylierten Amplifikaten entstehen. Ein solches Methylierungsmuster wäre in einer DMR zu erwarten. Es könnte sich aber auch um eine heterogen verteilte Methylierung aller Amplifikate handeln, die in der Summe für die untersuchten CpGs jeweils eine Methylierung von 50 % ergibt (Abb. 5) [105].

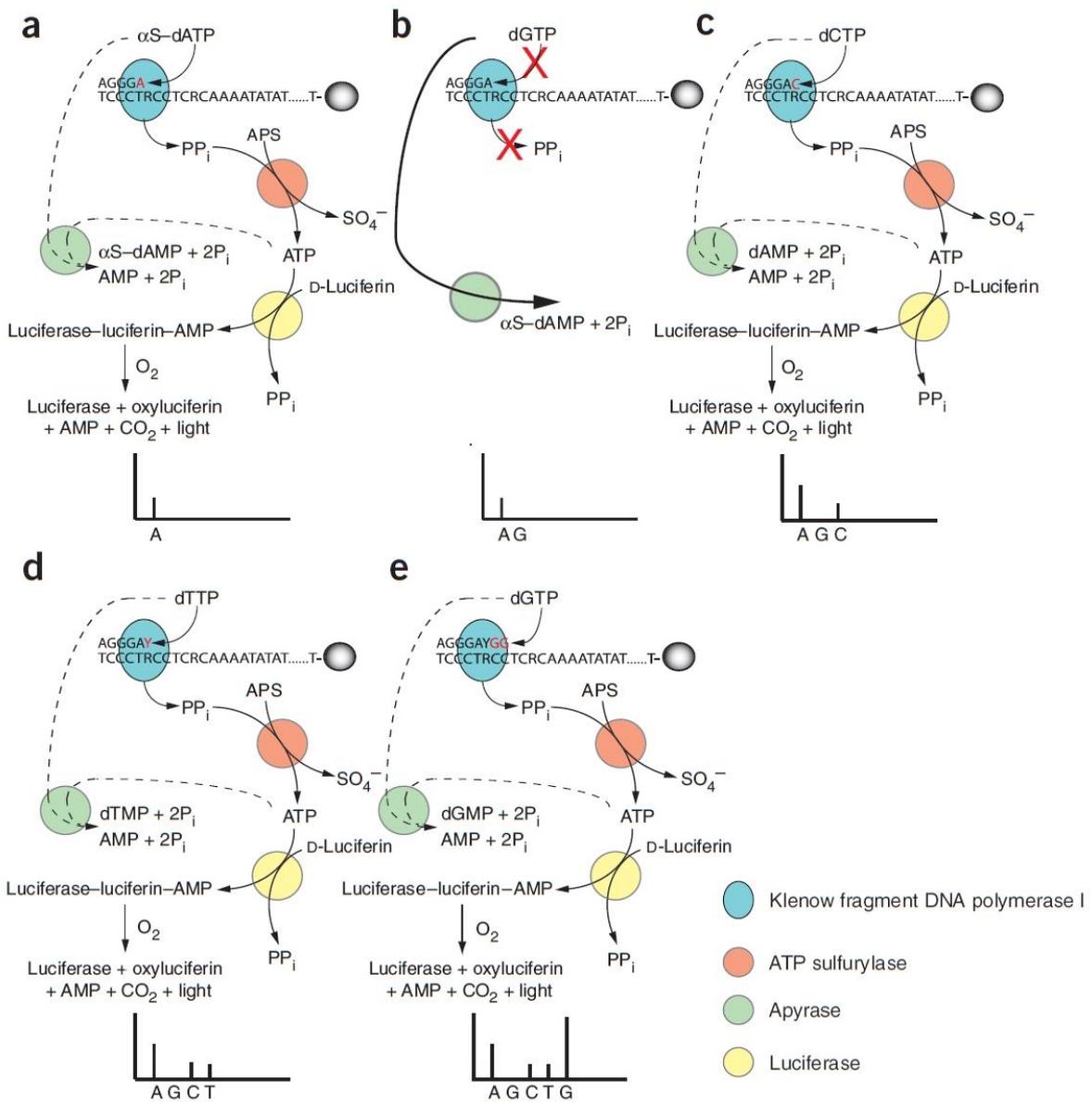


Abb. 5: Pyrosequencing-Reaktion (Abb. aus [104])

(a) Der Einbau eines dATP durch die Polymerase (blau) setzt ein PP_i frei. Dieses wird von dem Enzym ATP-Sulfurylase (rot) verwendet, um Adenosinphosphosulfat (APS) in ATP und SO_4^{2-} umzuwandeln. ATP wird von dem Enzym Luciferase (gelb) benötigt, um mit D-Luciferin einen instabilen Komplex zu bilden. Dieser Komplex zerfällt unter Anwesenheit von Sauerstoff (O_2) und ein Lichtsignal entsteht, dessen Stärke proportional zur Anzahl der verfügbaren ATP ist. Das Signal wird von einem Sensor detektiert. Anmerkung: Hier wird das Basenanalogon αS -dATP anstelle von dATP verwendet, da dieses ein Substrat für die Luciferase ist. (b) Das zugefügte dGTP ist nicht komplementär zur Template-Sequenz, kann von der Polymerase nicht eingebaut werden und kein PP_i entsteht. (c,d) Das „R“ des Template-Strangs signalisiert eine Methylierungs-variable Stelle (C für methylierte Cytosinreste vor der Bisulfit-Konvertierung und T für unmethylierte Cytosinreste vor der Bisulfit-Konvertierung) auf dem komplementären Strang. Die Signalstärke des eingebauten dCTP im Verhältnis zur Signalstärke des eingebauten dTTP beschreibt den Grad der Methylierung an diesem CpG. Im Beispiel ist dieses Verhältnis in etwa 50 %. (e) Der Einbau von zwei dGTP hintereinander führt zur doppelten Menge an PP_i und zu einem entsprechend stärkeren Signal.

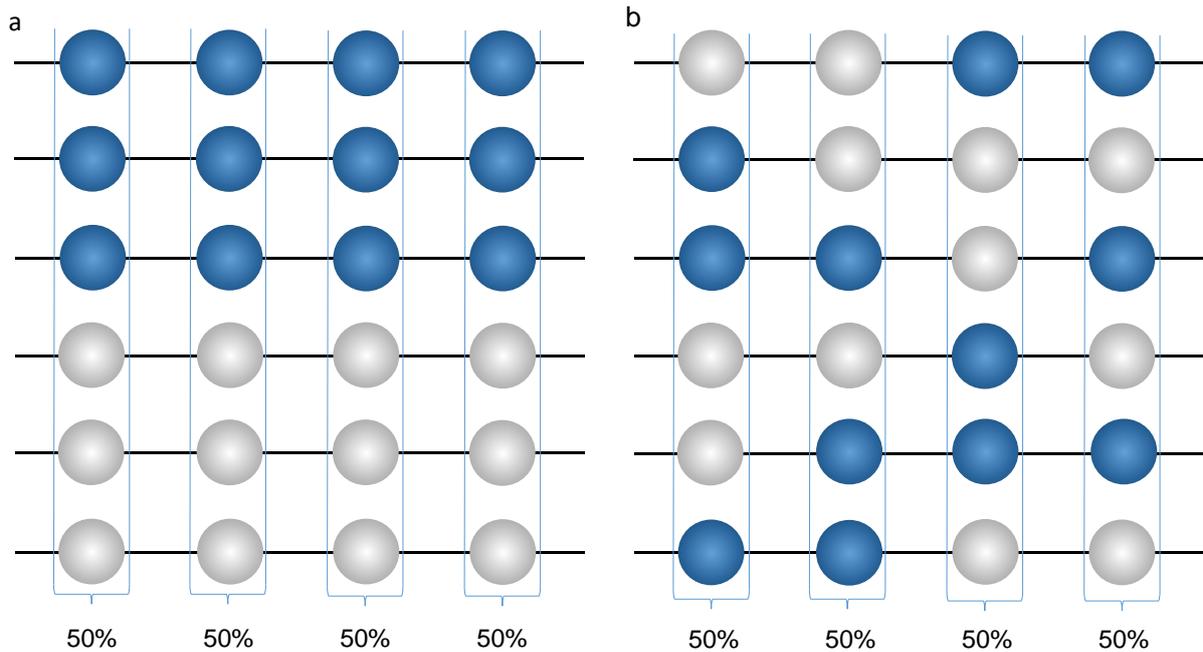


Abb. 6: Verschiedene, durch quantitative Bisulfitequenzierung nicht zu unterscheidende Arten von Methylierung (Abb. modifiziert nach [105])

Jede horizontale Linie stellt ein DNA-Molekül der Probe dar. Die untersuchte Region enthält 4 CpGs. Blaue und graue Kreise stellen methylierte und unmethylierte CpGs dar. (a) Methylierte und unmethylierte DNA-Moleküle im gleichen Verhältnis. Ein Methylierungsmuster, wie man es innerhalb einer DMR erwarten würde. Durch quantitative Bisulfitequenzierung, bei der das Verhältnis von methylierter zu unmethylierter DNA für jedes CpG einzeln bestimmt wird, würde eine Methylierung von 50 % ermittelt werden. (b) DNA-Moleküle mit verschiedenartigen Methylierungsmustern, nicht der Methylierung in einer DMR entsprechend. Dennoch würde man auch in diesem Fall durch quantitative Bisulfitequenzierung eine Methylierung von 50 % für jedes der abgebildeten CpGs ermitteln.

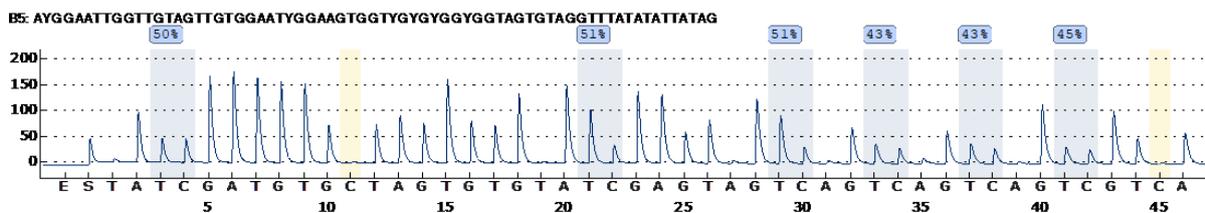


Abb. 7: Exemplarisches Pyrogramm des Assays aus dem *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus erstellt mit der PyroMark™ Q24 Software

Anhand des Verhältnisses der Signalstärke von T (dTTP) zu C (dCTP) kann der Grad der Methylierung der sechs CpGs des Assays ermittelt werden (blau hinterlegt, Ergebnis in „%“ in blauem Rechteck). An Cytosin-Resten der ursprünglichen Sequenz, welche nicht Teil eines CpGs sind, kann eine Kontrolle der Bisulfite-Konvertierung erfolgen (gelb hinterlegt). Ist an so einer Position noch ein Cytosin-Signal nachweisbar, muss von einer nicht vollständigen Bisulfite-Konvertierung ausgegangen werden. Diese würde auch die Messung der Methylierung verfälschen. In der vorliegenden Probe ist kein relevantes Signal an den entsprechenden Stellen zu sehen. Weitere Merkmale einer qualitativ zufriedenstellenden Bisulfitequenzierung sind eine hohe Signalstärke sowie eine konstante Grundlinie ohne relevantes Hintergrundsignal.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle entsprechenden Experimente mit Hilfe eines Qiagen PyroMark™ Q24 Systems durchgeführt. Die benötigten Assays wurden mit der zugehörigen PyroMark™ Assay Design Software in der Version 2.0 erstellt. Die Auswertung und Kontrolle der Läufe erfolgte mit der PyroMark™ Q24 Software.

Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts wurde eine PCR mit Bisulfit-konvertierter DNA durchgeführt. Da für die spätere Pyrosequenzierung benötigt, wurde je nach Vorschlag der Assay Design Software jeweils der *forward*- oder der *reverse*-Primer mit einem Biotin am 5'-Ende modifiziert. Für die PCR wurden folgende Ansätze à 20 µl vorbereitet:

Je Probe:	ddH ₂ O	13,2	µl
	Hot Start Buffer (10x)	2	µl
	MgCl ₂ (25 mM)	1,2	µl
	dNTPs (10 mM)	0,4	µl
	Hot Start Taq (5 U/µl)	0,2	µl
	Primer forward (10 mM)	1	µl
	Primer reverse (10 mM)	1	µl
	Bisulfit-konvertierte DNA	1	µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung:	4 Min.	95 °C
45 Zyklen:		
Denaturierung:	20 Sek.	95 °C
Annealing:	20 Sek.	58,3 °C
Elongation:	35 Sek.	72 °C
Hold:		4 °C

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurden 3 µl des 20 µl Ansatzes per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter Zuhilfenahme von UV-Licht in einem Gel-Jet-Imager detektiert. War keine Bande oder nur eine unzureichende Bande sichtbar, wurde die Probe verworfen. Das verbliebene Amplifikat wurde umgehend weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

Vor der Inbetriebnahme des Protokolls wurde für jeden einzelnen Assay eine Gradienten-PCR durchgeführt. Das Protokoll dieser PCR war bis auf die Annealing-Temperatur identisch mit der oben aufgeführten. Diese wurde zur Ermittlung optimaler Bedingungen für den jeweiligen Assay in 12 Ansätzen von 54 °C bis 64 °C variiert. Eine Temperatur von 58,3 °C erwies sich in der Agarose-Gelelektrophorese der gesamten 20 µl-Ansätze und Detektion mit UV-Licht für alle Assays als optimal.

Nach Herstellerangaben wurden die folgenden Schritte durchgeführt, um die Proben für die Pyrosequenzierung vorzubereiten:

- Je Probe wird folgender Ansatz in einer 24-well PCR-Platte erzeugt:

Binding Buffer	40	µl
Streptavidin-coated Sepharose beads	2	µl
ddH ₂ O	21	µl
- 17 µl PCR-Produkt wird hinzugefügt und die 24-well PCR-Platte auf einer Rüttelplatte positioniert. Mit deren Hilfe werden die Ansätze für 5 - 10 Min. bei Raumtemperatur mit 1.400 rpm vermischt.
- Der Sequencing-Primer wird mit PyroMark™ Annealing Buffer auf eine Konzentration von 0,3 µM verdünnt, in eine PyroMark™ Q24-Platte vorgelegt und diese auf der PyroMark™ Q24-Arbeitsstation positioniert.
- Die Arbeitsstation wird nach Angaben des Herstellers mit 70 % Ethanol, *denaturation solution*, *wash buffer* und ddH₂O befüllt. Die PCR-Platte wird auf der Arbeitsstation positioniert und die Proben unter Zuhilfenahme des *vacuum tool* nach Herstellerangaben durch die Arbeitsstation in die PyroMark™ Q24-Platte überführt.
- Um dem Sequencing-Primer die Anlagerung zu ermöglichen, wird die Q24-Platte in der dafür vorgesehenen Halterung auf einer Hitzeplatte für 2 Min. auf 80 °C erhitzt.
- Die Q24-Platte wird mindestens 5 Min. bei Raumtemperatur gekühlt. Währenddessen wird die PyroMark™ Q24-Cartridge nach Vorgaben der Software mit den im PyroMark™ Gold Q24 Reagents-Kit enthaltenen Reagenzien, Enzym-Mix, Substrat-Mix, αS-dATP, dGTP, dCTP und dTTP befüllt und im PyroMark™ Q24 positioniert.
- Die PyroMark™ Q24-Platte wird in den PyroMark™ Q24 positioniert und der Lauf gestartet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Zur Gewinnung von RNA wurde ein Stück des zu untersuchenden Gewebes (ca. 0,5 cm³) mit dem Skalpell abgetrennt, in ein mit 2 ml Tri-Reagenz gefülltes 14 ml-Tube eingebracht und mittels eines Homogenisators zerkleinert. Das Lysat einer Probe wurde in jeweils zwei 2 ml-Tubes überführt und die Ansätze bei Raumtemperatur fünf Minuten inkubiert. Pro Tube wurden 0,4 ml Chloroform zugeführt und durch den Gebrauch eines Vortexers für 15 Sekunden mit dem Lysat gemischt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurde eine Phasentrennung in einer auf 4 °C gekühlten Mikrozentrifuge bei 12.000 rpm für 15 Minuten erreicht. Die obere Phase wurde in ein neues 2 ml-Tube überführt und ca. ein Volumen Isopropanol zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde durch erneute Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten ein Pellet erzeugt. Dieses wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (7.500 rpm, 4 °C, 5 Min.). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet bei 55 °C in 50 µl ddH₂O gelöst. Zur Überprüfung der erfolgreichen Isolation wurde eine Messung der RNA-Konzentration im BioPhotometer in einer Verdünnung von 2 µl RNA zu 98 µl Aqua dest. vorgenommen. Falls der DNase-Verdau nicht direkt im Anschluss erfolgte oder nicht die gesamte Menge an isolierter RNA für den Verdau benötigt wurde, wurde diese unverzüglich bei -80 °C gelagert.

4.2.2 RNA-Aufreinigung und DNase-Verdau

Die Aufreinigung der RNA und der DNase-Verdau wurden mittels RNeasy mini Kit und RNase-Free DNase Kit durchgeführt. Ein DNase-Verdau ist nötig, um eventuelle Residuen an DNA zu entfernen. Eine weitere Aufreinigung erfolgt durch die Bindung von intakten RNA-Molekülen mit einer Länge von über 200 bps an einer Silica-Gel-Membran. Hierdurch werden Verunreinigungen und kleinere RNA-Moleküle wie z.B. tRNA entfernt. Dies führt zu einer Anreicherung von mRNA. Nach Angaben des Herstellers wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

- Max. 100 µg totale RNA mit ddH₂O auf 100 µl auffüllen.
- Zugabe von 350 µl RTL-Puffer, welcher im Voraus in einem Verhältnis von 100:1 mit β-Mercaptoethanol versetzt worden ist.
- Zugabe von 250 µl 100 % Ethanol.
- Überführung des Ansatzes in die RNeasy-Minisäule und anschließendes Zentrifugieren für 15 Sek. bei 8.000 rpm.

- Verwerfen des Durchflusses, Zuführen von 350 µl RW1-Puffer und erneutes Zentrifugieren (15 Sek., 8.000 rpm).
- Vorsichtiges Mischen von 10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer. Anschließendes Auftragen der Mischung auf die Silica-Gel-Membran der RNeasy-Minisäule und Inkubation für 15 Min. bei Raumtemperatur.
- 350 µl RW1-Puffer hinzugeben, zentrifugieren (15 Sek., 8.000 rpm) und Durchfluss verwerfen.
- Zweimal hintereinander folgenden Schritt ausführen: 500 µl RPE-Puffer hinzugeben, zentrifugieren (15 Sek., 8.000 rpm), Durchfluss verwerfen.
- 1 Min. zentrifugieren bei 12.000 rpm, Säule auf ein 1,5 ml-Tube setzen und 30 µl ddH₂O direkt auf die Silica-Gel-Membran geben. RNA eine Minute lösen lassen und Ansatz für 1 Min. bei 8.000 rpm zentrifugieren.

Nach Abschluss des Protokolls erfolgte eine Messung der RNA-Konzentration im BioPhotometer in einer Verdünnung von 2 µl RNA zu 98 µl Aqua dest. Die aufgereinigte RNA wurde unverzüglich bei -80 °C gelagert.

4.2.3 cDNA-Synthese

Die aufgereinigte und DNase-verdaute RNA wurde mittels SuperScript® II Reverse Transcriptase, Invitrogen (Karlsruhe), in cDNA umgeschrieben. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

- 2 µg aufgereinigte RNA werden mit ddH₂O auf ein Volumen von insgesamt 7 µl aufgefüllt.
- Zugabe von 5 µl *random*-Primer, Roche Diagnostics, die Hexaoligonukleotide mit zufälliger Sequenz beinhalten und als Primer an komplementären Stellen der mRNA fungieren. Inkubation für 10 Min. bei 70 °C.
- Zugabe von 4 µl 5x 1st Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur.
- Inkubation für 2 Min. bei 42 °C und Zugabe von 1 µl *SuperScript® II*.
- Inkubation bei 42 °C für 60 Min. und Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C für 10 Minuten.
- Zugabe von 1 µl RNase H zum Verdau der verbliebenen RNA und Inkubation für 20 Min. bei 37 °C.
- Hinzufügen von 79 µl ddH₂O zum Einstellen der Endkonzentration auf 20 ng/µl.

Wurde die cDNA im Anschluss nicht direkt für weitere Experimente verwendet, wurde sie umgehend bei -20 °C gelagert.

4.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist ein Verfahren zum Vergleich der Expression spezifischer Gene auf Ebene der mRNA. Die Methode basiert auf einer Polymerase-Kettenreaktion, bei der Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung des gewonnenen DNA-Produkts während oder zwischen den Zyklen ermöglichen. Bei der in diesem Fall verwendeten Technik wird dies durch die Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes (*SYBR Green®*) in das entstehende doppelsträngige Produkt erreicht. Bei Messung der Fluoreszenz am Ende der Elongationsphase ist diese somit proportional zur Menge des entstandenen Produkts. Alle Messungen wurden als Dubletten durchgeführt. Zusätzlich wurde für jedes Gewebe zur Normalisierung der Werte die Expression des Haushaltsgens *TATA-box-binding protein* (TBP) ermittelt. Die relative Expression der Kandidatengene wurde gemäß folgender Gleichung nach Pfaffl et al. [106] berechnet:

$$\text{Expression relativ zum Referenzgen} = 2^{-[\text{Ct zu untersuchendes Gen} - \text{Ct Referenzgen}]}$$

Pro Ansatz wurde in ein Well einer 96-Well PCR-Platte je 2 µl cDNA (20 ng/µl) vorgelegt und folgende Komponenten hinzugefügt:

- 10 µl 2x iTaq *SYBR Green®* Supermix
- 1 µl *forward* Primer (10 mM) des zu untersuchenden Gens
- 1 µl *reverse* Primer (10 mM) des zu untersuchenden Gens
- 6 µl ddH₂O

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung:	2 Min.	95 °C
40 Zyklen bestehend aus:		
Denaturierung:	15 Sek.	95 °C
Hybridisierung:	15 Sek.	55 °C
Elongation:	20 Sek.	68 °C
Schmelzkurve:	15 Sek.	95 °C
	20 Min.	55 – 95 °C
	15 Sek.	95 °C
Hold:		4 °C

Eine Schmelzkurvenanalyse wurde durchgeführt, um die Produktspezifität der Primer zu überprüfen. Durch das langsame Erhöhen der Temperatur erfolgt die Denaturierung an einem für das Produkt spezifischen Punkt. Die Freisetzung von *SYBR Green®* bedingt eine Änderung der Fluoreszenz. Somit können neben dem Hauptprodukt eventuell unerwünschte Produkte oder Primerdimere detektiert werden.

4.2.5 DNA-Isolation aus Gewebe

Zur Gewinnung von DNA wurde ein Stück des zu untersuchenden Gewebes (ca. 0,5 cm³) mit dem Skalpell abgetrennt. Folgende Schritte wurden anschließend durchgeführt:

- Das Gewebestück in ein 2 ml-Tube mit vorgelegtem 1 ml STE-Puffer und 50 µl Proteinase K einbringen. Der Ansatz wird über Nacht bei 55 °C inkubiert.
- Ein Volumen Phenol zugeben und 5 Min. per Hand vermischen. Anschließend den Ansatz für 10 Min. bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Den Überstand vorsichtig abpipettieren und in ein neues 2 ml-Tube überführen. Ein Vol. Chloroform zugeben und 5 Min. per Hand vermischen. Ansatz für 10 Min. bei 3.000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abnehmen und in ein 14 ml-Tube überführen. 2,5 Vol. 100 % Ethanol zugeben und vorsichtig mischen. DNA für 5 Min. bei Raumtemperatur ausfällen lassen.
- Durch leichtes Schwenken des Tubes eine Durchmischung des Ansatzes erreichen, bis die DNA als Knäuel sichtbar wird.
- 500 µl 70 % Ethanol in einem 1,5 ml-Tube vorlegen. DNA-Knäuel vorsichtig mit 100 µl Pipette ansaugen und in 1,5 ml-Tube überführen. Anschließend Ansatz für 10 Min. bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Erneutes Zugabe von 500 µl 70 % Ethanol, mischen und zentrifugieren (10 Min., 12.000 rpm, 4 °C).
- Ethanol vorsichtig abgießen und Pellet lufttrocknen lassen. Danach DNA in 50 µl ddH₂O oder TE-Puffer bei 60 °C für 10 Minuten lösen.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Isolation erfolgte eine Messung der Konzentration mit dem BioPhotometer in einer Verdünnung von 2 zu 98 µl. Die DNA wurde umgehend weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 0,8 %-Agarose-TBE-Gel hergestellt und mit 0,25 µl/ml Ethidiumbromid versetzt. Den Proben wurde die entsprechende Menge 6x DNA

Loading Dye Solution zugegeben und der Ansatz auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein 100 bp DNA Ladder Größenstandard verwendet. Die Auftrennung erfolgte horizontal in TBE-Puffer bei einer konstant anliegenden Spannung von 90 V für 20–40 Min. Die Detektion erfolgte anschließend mittels UV-Licht in einem Gel-Jet-Imager.

4.2.7 Analyse von Splicevarianten via Pyrosequencing

Durch ungleiche Prozessierung von prä-mRNA können aus einer prä-mRNA unterschiedliche mRNA-Varianten entstehen. Diese können eine unterschiedliche Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins zur Folge haben. Die Erfassung verschiedener mRNA-Varianten wurde gemäß Méreau et al. durchgeführt [107]. Ein die Zielregion flankierendes Primerpaar wurde hierzu unter Zuhilfenahme der PyroMark™ Assay Design Software erstellt und das entsprechende PCR-Produkt mittels Pyrosequencing sequenziert. An Stellen, an denen sich die Splicevarianten und damit die PCR-Produkte in ihrer Basensequenz unterscheiden, kann das Verhältnis der Signalstärken der sich unterscheidenden Basen zur Berechnung des Verhältnisses der Splicevarianten zueinander herangezogen werden.

Es wurden folgende Schritte durchgeführt:

Zur Amplifikation des gewünschten mRNA-Abschnitts wurde eine PCR mit cDNA durchgeführt. Da für die spätere Pyrosequenzierung benötigt, wurde je nach Vorschlag der Assay Design Software jeweils der *forward*- oder der *reverse*-Primer mit einem Biotin am 5'-Ende modifiziert. Für die PCR wurden folgende 20 µl-Ansätze vorbereitet:

Je Probe:	ddH ₂ O	13,2 µl
	Hot Start Buffer (10x)	2 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
	dNTPs (10 mM)	0,4 µl
	Hot Start Taq (5 U/µl)	0,2 µl
	Primer forward (10 mM)	1 µl
	Primer reverse (10 mM)	1 µl
	cDNA	1 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung:	4 Min.	94 °C
30 Zyklen:		
Denaturierung:	90 Sek.	94 °C
Annealing:	30 Sek.	58 °C
Elongation:	30 Sek.	72 °C
Hold:		4 °C

Die Vorbereitung und Pyrosequenzierung der Proben wurde nach Herstellerangaben analog zu 4.1.2 durchgeführt.

4.3 Statistik

Gruppenvergleiche wurden für normalverteilte Daten mit dem t-Test, für nicht normalverteilte Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Das Ausmaß der Korrelation zwischen zwei Variablen wurde mittels Spearmans Rangkorrelation berechnet und mit Hilfe von Streudiagrammen grafisch dargestellt. Diese Abbildungen werden durch eine mittels linearer Regression berechneten Gerade (rot) ergänzt, die angegebene Signifikanz und der Korrelationskoeffizient beziehen sich auf das Ergebnis der Rangkorrelation.

Ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen sowie ein signifikanter Zusammenhang zwischen zwei Größen wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 angenommen. In der deskriptiven Statistik werden Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) angegeben, Mediane mit Spannweite.

Bei der quantitativen Bisulfitsequenzierung via Pyrosequencing wurde eine Tumorprobe als hypermethyliert bzw. hypomethyliert gewertet, wenn diese eine Methylierung größer bzw. kleiner als der Median der Normalgewebe plus bzw. minus zwei Standardabweichungen der Normalgewebe zeigte.

Bei der quantitativen Real-Time PCR wurde eine Tumorprobe als überexprimiert bzw. reprimiert definiert, wenn diese eine zehnfach größere bzw. zehnfach kleinere Expression als der Mittelwert der Normalgewebe aufwies.

Alle Analysen wurden mit GraphPad Prism ® Version 5 durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Auswahl der zu untersuchenden Gene

Neben *IGF2* und *H19* wurden insbesondere geprägte Gene berücksichtigt, bei denen bereits eine gesteigerte Expression im WT nachgewiesen werden konnte [108]. Zu dieser Gruppe gehören die Gene *DLK1*, *Maternally expressed 3 (MEG3)*, *Retrotransposon-Like 1 (RTL1)*, *MEST* und *NNAT*. *NNAT* ist, für ein geprägtes Gen untypisch, alleinstehend im Intron des *Bladder Cancer Associated Protein*-Gens (*BLCAP*) lokalisiert. Da *BLCAP* als TSG bekannt ist und einige *BLCAP*-Transkripte eine gewebsspezifische Prägung aufweisen, wurde auch *BLCAP* und die Transkripte *BLCAP V1a* und *BLCAP V2a* auf ihre mRNA-Expression hin untersucht [109]–[111].

Neben dieser Gruppe von geprägten Genen oder mit geprägten Genen assoziierten Genen wurden weitere, nicht geprägte Gene eingeschlossen. Hierunter fällt das als TSG bekannte *RASSF1A*, das unter anderem im Neuroblastom und Medulloblastom häufig durch Promotormethylierung stillgelegt ist [112], [113]. Zudem wurden die beiden Gene *LIM Homeobox 1 (LHX1)* und *Growth Differentiation Factor 7 (GDF7)* ausgesucht. Diese kamen aufgrund ihrer bivalenten Histonmodifikation im WT [86] und ihrem hohem C/G-Gehalt in der Promotorregion als durch Promotormethylierung stillgelegte Gene im WT in Frage. Aufgrund der Relevanz für die Tumorgenese des WT und seiner gewebsspezifischen Prägung wurde auch die transkriptionelle Aktivität von *WT1* ermittelt.

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die chromosomalen Regionen mit den untersuchten Genen und deren Prägung und zeigt, welche Sequenzelemente auf DNA-Methylierung hin untersucht wurden.

Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Gene, deren Prägung und über die auf eine veränderte Methylierung untersuchten DNA-Elemente

Locus	Gen	Prägung	Untersuchtes Element
Chr. 2p24	<i>GDF7</i>	keine	Promotor
Chr. 3p21.3	<i>RASSF1A</i>	keine	-
Chr. 7q32	<i>MEST</i>	paternal	Promotor innerhalb einer DMR
Chr. 11p13	<i>WT1</i>	gewebsspez. pat./mat.	CTCF-Bindungsstellen
Chr. 11p15	<i>H19</i>	maternal	CTCF-Bindungsstelle der ICR (<i>H19</i> -DMR)
	<i>IGF2</i>	paternal	
Chr. 14q32	<i>DLK1</i>	paternal	ICR (IG-DMR)
	<i>MEG3</i>	maternal	
	<i>RTL1</i>	paternal	
Chr. 17q12	<i>LHX1</i>	keine	Promotor
Chr. 20q11	<i>BLCAP</i>	keine	CTCF-Bindungsstellen sowie Promotor innerhalb einer DMR
	<i>BLACP V1a</i>	gewebsspez. mat.	
	<i>BLCAP V2a</i>	gewebsspez. pat.	
	<i>NNAT</i>	paternal	

5.2 Auffinden potentieller CTCF-Bindungsstellen

Neben den Promotoren wurden im Rahmen dieser Arbeit vor allem CTCF-Bindungsstellen untersucht, die durch aberrante DNA-Methylierung Einfluss auf die Expression umgebender Gene nehmen können. CTCF-Bindungsstellen, die lediglich anhand der Übereinstimmung mit dem Kernbindungsmotiv von CTCF identifiziert werden, weisen eine hohe Sensitivität, jedoch nur eine geringe Spezifität hinsichtlich einer tatsächlichen Bindung von CTCF *in vivo* auf [94]. Um die Auswahl auf wahrscheinlich funktionell relevante CTCF-Bindungsstellen einzugrenzen, wurden folgende zwei Kriterien angewendet:

1. Eine Übereinstimmung der DNA-Sequenz von mindestens 70 % mit dem Kernbindungsmotiv von CTCF. Diese wurde mit der JASPAR-Datenbank ermittelt, die Werkzeuge zur Auffindung und Bewertung von Bindungsstellenmotiven in DNA-Sequenzen zur Verfügung stellt [94].

2. Der Nachweis einer Bindung von CTCF an die DNA in der unmittelbaren Umgebung von ca. 100 Basenpaaren der mittels JASPAR ermittelten Bindungsstelle mit Hilfe der Ensembl-Datenbank (Version 75) [114]. Diese enthält Datensätze genomweiter funktioneller Analysen,

z.B. mittels „*CHIP-Seq*“-Technik, in denen verschiedene humane Zelllinien auf Kontakte zwischen CTCF und der DNA hin untersucht wurden.

5.3 Die nicht geprägten Gene *RASSF1A*, *LHX1* und *GDF7*

Um die drei nicht geprägten Gene *RASSF1A*, *LHX1* und *GDF7* auf eine mögliche Stilllegung durch Promotormethylierung hin zu untersuchen, wurde die Genexpression im Tumor- und Kontrollgewebe bestimmt. *LHX1* und *GDF7* zeigten eine signifikant geringere Expression im Tumor. Für *RASSF1A* war kein Unterschied feststellbar (vgl. Abb. 8 und Tab. 5).

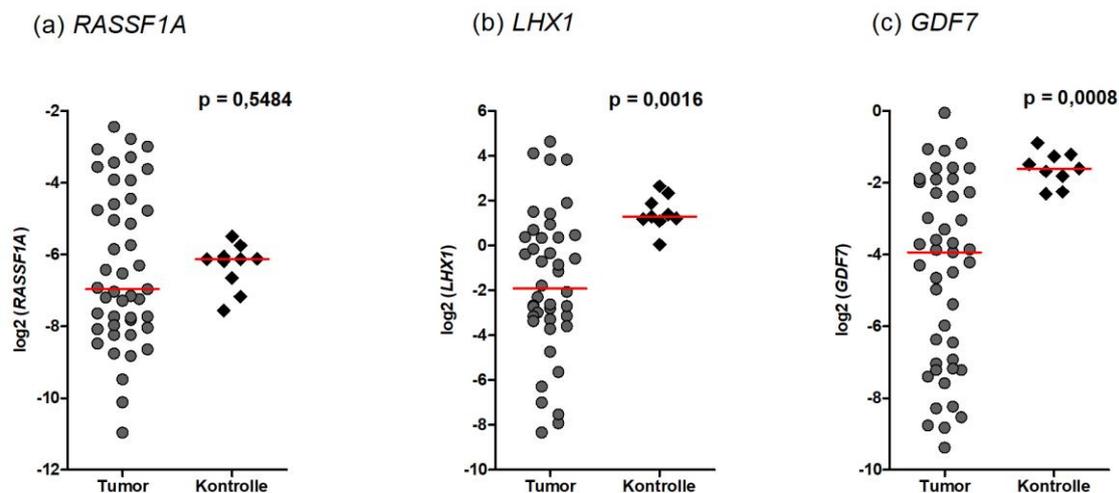


Abb. 8: Relative mRNA-Expression der Gene *RASSF1A* (a), *LHX1* (b) und *GDF7* (c)

Alle Ergebnisse sind relativ zum Haushaltsgen *TBP* und auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. Der Median der jeweiligen Säule ist durch einen roten Balken markiert.

Für die beiden Gene mit erniedrigter Expression im WT, *GDF7* und *LHX1*, wurde eine Analyse der Promotormethylierung angestrebt. Hierfür wurden mit drei verschiedenen Sequencing-Primern (S1–S3) insgesamt 27 CpGs des *GDF7*-Promotors überprüft (Abb. 9). Diese liegen im Bereich von -304 bis +90 bp in Bezug auf den transkriptionellen Startpunkt (TSS) von *GDF7*. Auch für den *LHX1*-Promotor sollten mit 2 verschiedenen Sequencing-Primern insgesamt 25 CpGs überprüft werden. Bei den zwei für *LHX1* erstellten Assays gelang es auch nach mehrfacher Wiederholung der Experimente und Modifikation der Experimentbedingungen nicht, Signale in ausreichender Stärke und Qualität (bei starker Grundlinienverschiebung und starkem Hintergrundsignal) zu erzeugen. Daher konnten hier keine aussagekräftigen Daten generiert werden.

Bei *GDF7* zeigte sich in allen drei Assays ein weitgehend unmethylierter Promotor. Dies wurde an einer Stichprobe gemessen und anschließend nicht auf das gesamte Tumorkollektiv

ausgedehnt. Bei der Stichprobe wurden aus beiden Kollektiven sowohl Proben mit hoher als auch mit niedriger mRNA-Expression von *GDF7* verwendet. Ein Unterschied in der Methylierung fiel nicht auf (vgl. Abb. 10 und Tab. 6).

(a) Übersicht über den *GDF7*-Locus



(b) *GDF7*-Promotor-Assays (S1-S3)

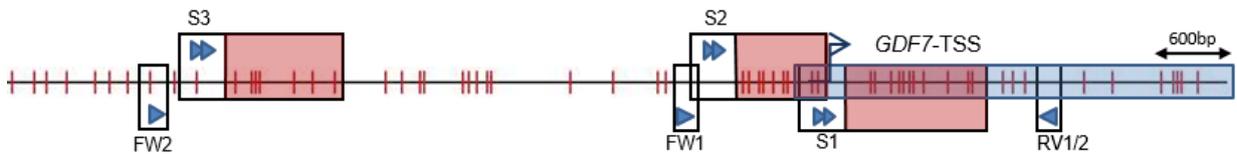


Abb. 9: Übersicht über den *GDF7*-Locus

(a) Schematische Darstellung von *GDF7*. Translatierte Regionen der Gene sind als schwarz gefüllte, transkribierte, aber nicht translatierte Regionen als schwarz umrandete Rechtecke dargestellt. Die Regionen, in denen die Assays etabliert wurden, sind als rot umrandete Rechtecke zu erkennen. (b) Darstellung der Assays mit Position der FW-Primer (FW), RV-Primer (RV) und Sequencing-Primer (S). Alle CpGs sind als rote Striche zu erkennen. Der bisulfitequenzierte Bereich ist rot hinterlegt.

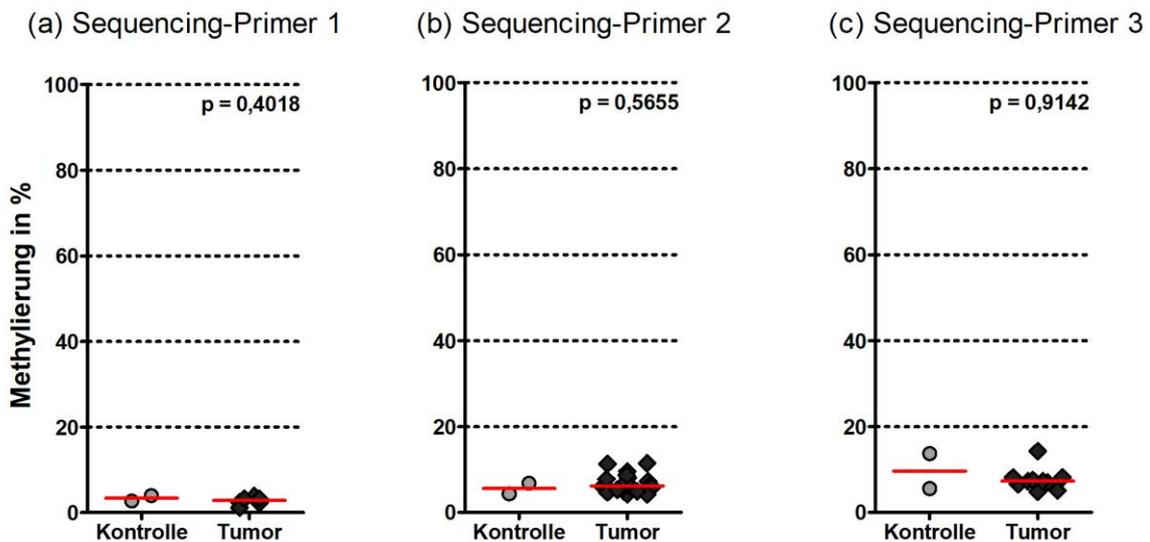


Abb. 10: Mittlere Methylierung des *GDF7*-Promotors

Mittlere Methylierung aller untersuchten CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe. Der Median wird durch einen roten Balken in der Mitte der Säulen markiert. (a) zeigt die Ergebnisse für die vom Sequencing-Primer 1 erfassten CpGs ($n_{\text{Kontrolle}}= 2$, $n_{\text{Tumor}}= 6$), (b) diejenigen des Sequencing-Primers 2 ($n_{\text{Kontrolle}}= 2$, $n_{\text{Tumor}}= 22$) und (c) die des Sequencing-Primers 3 ($n_{\text{Kontrolle}}= 2$, $n_{\text{Tumor}}= 10$).

5.4 Das geprägte Gen *MEST*

MEST verfügt über eine auf dem maternalen Allel methylierte DMR, die den Promotor beinhaltet, und wird daher physiologischerweise nur vom paternalen Allel exprimiert (Abb. 11a). *MEST* war im Tumor signifikant überexprimiert (vgl. Abb 12a und Tab. 5), sodass die Messung der Promotormethylierung angestrebt wurde.

In dem Bereich der DMR, die vor dem ersten Exon von *MEST* liegt, konnte von der verwendeten Software kein Assay in befriedigender Qualität ermittelt werden. Daher wurde ein Assay im ersten Intron von *MEST*, aber innerhalb der beschriebenen DMR, etabliert. Dieser wurde ca. 70 bp *downstream* des Beginns der proteincodierenden Sequenz positioniert und erfasst fünf CpGs (Abb. 11b).

(a) Übersicht über den *MEST*-Locus



(b) *MEST*-Promotor-Assay

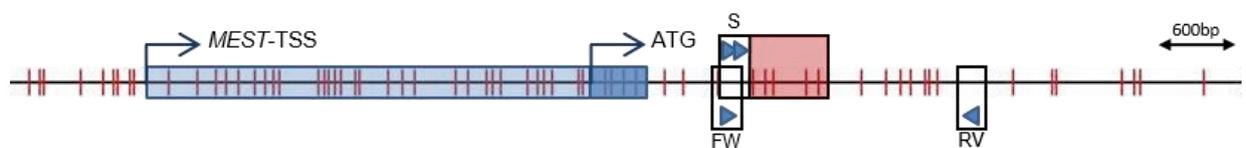


Abb. 11: Übersicht über den *MEST*-Locus

Schematische Darstellung des *MEST*-Locus mit Darstellung der bekannten DMRs. Die Region, in der der Assay etabliert wurde, ist als rotes Rechteck markiert (Abb.modifiziert nach [115]). Transkribierte Regionen des Gens sind als schwarz gefüllte, transkribierte, aber nicht translatierte Regionen als schwarz umrandete Rechtecke dargestellt. (b) Darstellung des Assays mit Position des FW-Primers (FW), RV-Primers (RV) und Sequencing-Primers (S). Alle CpGs sind als rote Striche dargestellt. Der bisulfitequenzierte Bereich ist rot hinterlegt. Die transkribierten bzw. translatierten Sequenzen sind hell- bzw. dunkelblau hinterlegt und der jeweilige Startpunkt durch einen Pfeil markiert.

Die Analyse der Methylierung der fünf promotornah gelegenen CpGs innerhalb der *MEST*-DMR ergab eine signifikant geringere Methylierung im Tumor mit einem Median von 64,4 % verglichen mit einem Median von 72,6 % in der Kontrolle (vgl. Tab. 6). 16 von 45 Tumoren (35,6 %) waren hypomethyliert (vgl. Abb. 12b). Bei Betrachtung der einzelnen CpGs zeigte sich eine signifikant erniedrigte Methylierung der CpGs 2, 4 und 5 im Tumor. Für die CpGs 1 und 3 war kein Unterschied nachweisbar. Die mittlere Methylierung jedes der fünf CpGs im Tumor lag jedoch unterhalb der mittleren Methylierung im Kontrollgewebe (vgl. Abb. 12c). Bei Betrachtung ausschließlich jener Tumoren, die *MEST* überexprimierten, zeigte sich eine

signifikante Hypomethylierung aller CpGs verglichen mit dem Normalgewebe (Abb. 12d). Eine Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression konnte nicht nachgewiesen werden ($r = -0,226$; $p = 0,0948$; Abb. 12e).

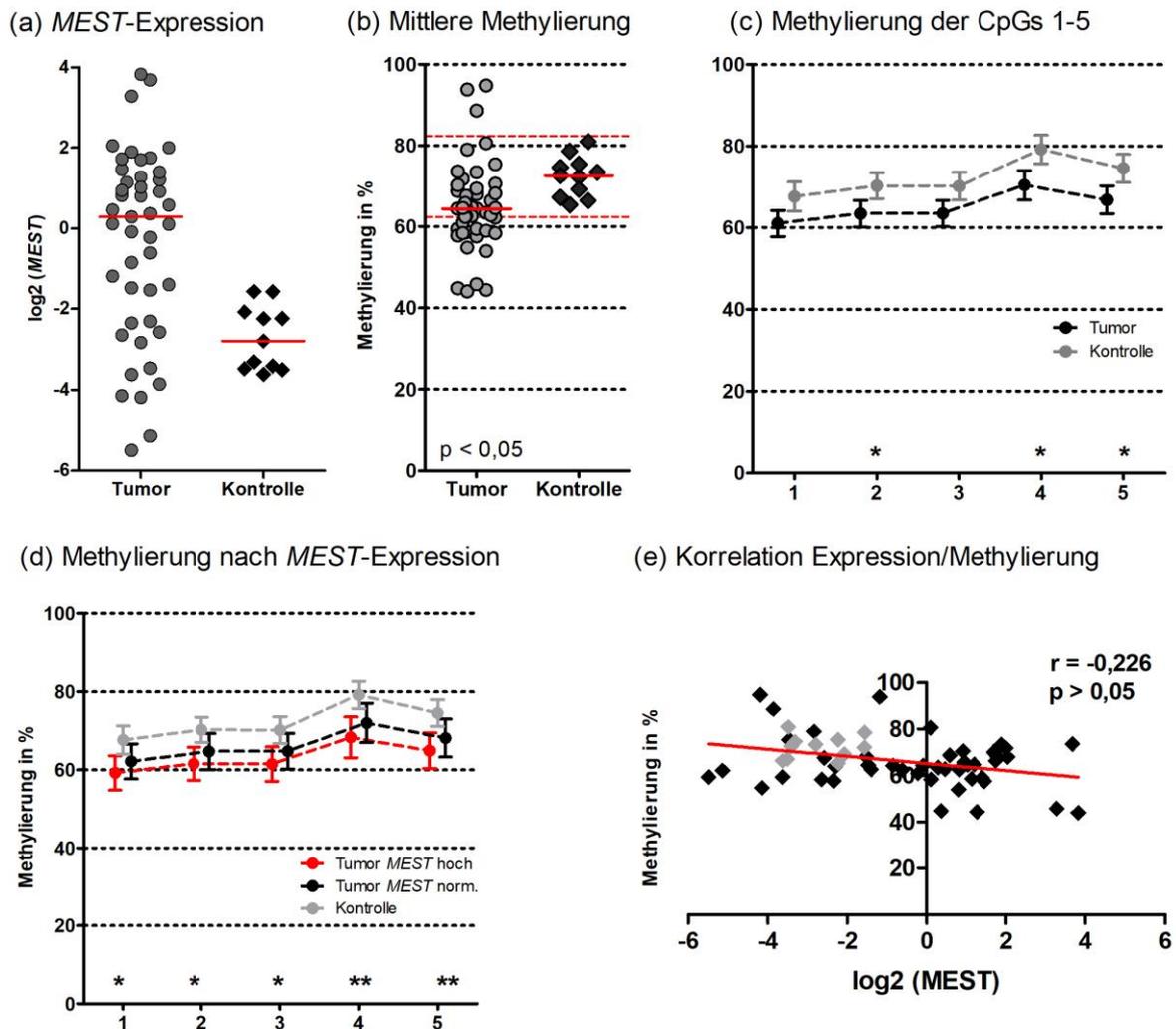


Abb. 12: *MEST*-Expression und Methylierung der *MEST*-DMR

(a) Relative *MEST*-mRNA-Expression. Die Ergebnisse sind relativ zum Haushaltsgen TBP und auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. Der Median der jeweiligen Säule ist durch einen roten Balken markiert. (b) Mittlere Methylierung über alle fünf CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe. Der Median ist als roter Balken in der Mitte der Säulen, der Bereich von 2 SD im Normalgewebe als gestrichelte rote Linie dargestellt. (c), (d) Betrachtung der CpGs im Einzelnen. (c) Mittel der Kontrollen und Tumoren. (d) Normalgewebe (grau), Tumoren, die *MEST* überexprimieren ($n = 19$, rot), und Tumoren mit normaler *MEST*-Expression ($n = 26$, schwarz). Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar. Signifikante ($p < 0,05$) bzw. hoch signifikante ($p < 0,005$) Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe (c) sowie zwischen überexprimierenden Tumoren und Normalgewebe (d) sind durch ein „*“ bzw. „**“ über dem jeweiligem CpG markiert. (e) Korrelation zwischen Methylierung der *MEST*-DMR und *MEST*-Expression. Tumorproben sind in Schwarz, Normalgewebe in Grau dargestellt.

5.5 Der *IGF2/H19*-Locus

Im geprägten *IGF2/H19*-Locus kann es durch *de novo* Methylierung der *H19*-DMR des maternalen Allels zum Verlust der Bindungsfähigkeit von CTCF an den entsprechenden

Bindungsstellen kommen. Hierdurch kommt es zur biallelischen Expression von *IGF2* (LOI) und zu einer Stilllegung von *H19*.

Die Bestimmung der Aktivität dieser beiden Gene ergab eine ausgeprägte, hoch signifikante Überexpression von *IGF2* im Tumorgewebe. Der Median der *H19*-mRNA-Expression im Tumor lag unterhalb des Medians des Normalgewebes. Dies war nicht signifikant (vgl. Abb. 13 und Tab. 5). Die Aktivität beider Gene korrelierte negativ ($r = -0,475$; $p = 0,0003$).

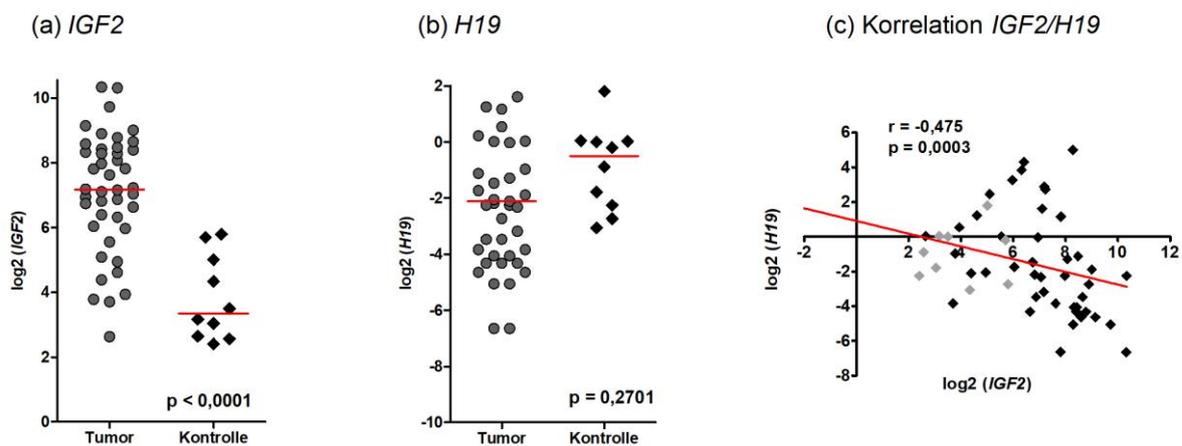
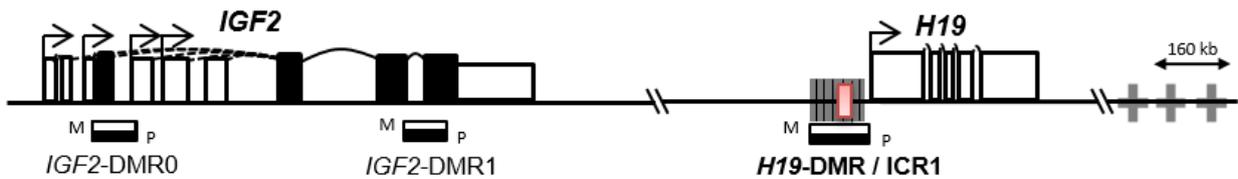


Abb. 13: Relative Expression der Gene *IGF2* (a) und *H19* (b) sowie Korrelation zwischen der Expression von *IGF2* und *H19* im Tumor- und Kontrollgewebe (c)

Alle Ergebnisse sind relativ zum Haushaltsgen *TBP* und auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. In (a) und (b) ist der Median der jeweiligen Säule durch einen roten Balken markiert. (c) zeigt Tumorgewebeproben als schwarze, Kontrollgewebe als graue Diamanten.

In der Folge wurde die Methylierung einer vorbeschriebenen [116] CTCF-Bindungsstelle innerhalb der *H19*-DMR bestimmt (vgl. Abb. 14). Hierbei ergab sich eine mediane Methylierung von 50,17 % im Normal- und 61,08 % im Tumorgewebe. Ein signifikanter Unterschied lag nicht vor (vgl. Tab. 6). Neun von 45 Tumoren (20 %) waren hypermethyliert (> 71,8 % Methylierung) und wurden daher als biallelisch methyliert eingestuft. Zudem fielen vier (8,9 %) hypomethylierte Tumore auf (Abb. 15a). In der Methylierung der einzelnen CpGs des Assays gab es keinen Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe (Abb. 15b). *IGF2*-überexprimierende Tumoren ($n = 20$) zeigten eine signifikant höhere Methylierung der CpGs 1–3 und 6 im Vergleich zum Normalgewebe (Abb. 15c). Es bestand eine positive Korrelation zwischen der *IGF2*-Expression und der Methylierung der *H19*-DMR ($r = 0,345$; $p = 0,0123$) sowie eine negative Korrelation zwischen *H19*-Expression und der Methylierung der *H19*-DMR ($r = -0,499$; $p = 0,0002$; Abb. 16).

(a) Übersicht über den *IGF2/H19*-Locus



(b) Assay zur Bestimmung der *H19*-DMR-Methylierung

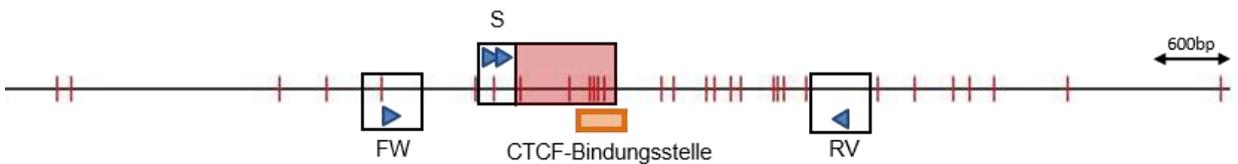


Abb. 14: Übersicht über den *IGF2/H19*-Locus

(a) Schematische Darstellung des *IGF2/H19*-Locus. Darstellung der bekannten DMRs, der CTCF-Bindungsstellen in der *H19*-DMR als graues, rechteckiges Element mit schwarzen Strichen, *downstream* gelegene Transkriptionsverstärker (Enhancer) als graue Pluszeichen, sowie Darstellung der Region, in der der Assay etabliert wurde, als rot umrandetes Rechteck (Abb. modifiziert nach [70]). Translatierte Regionen der Gene sind als schwarz umrandete Rechtecke dargestellt. (b) Darstellung des Assays mit Position des FW-Primers (FW), RV-Primers (RV) und Sequencing-Primers (S). Alle CpGs der 600 bp langen Sequenz sind als rote Striche dargestellt. Der bisulfitesequenzierte Bereich ist rot hinterlegt. Die Position der Coresequenz der CTCF-Bindungsstelle wird als oranges Rechteck gezeigt.

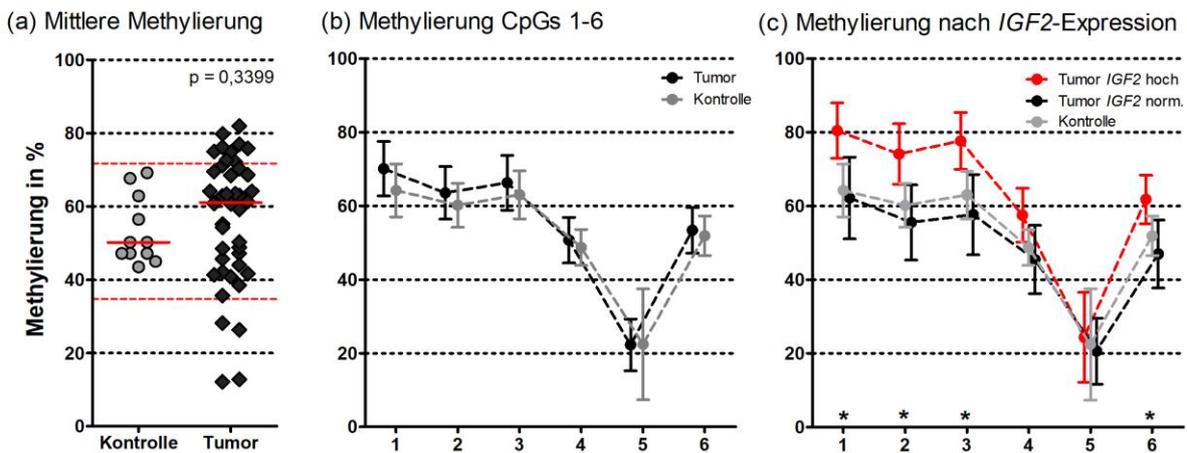
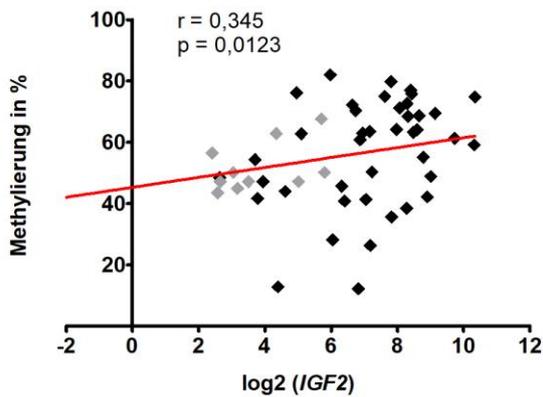


Abb. 15: Methylierung der *H19*-DMR des *IGF2/H19*-Locus

(a) Mittlere Methylierung der sechs CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe. Der Median ist als roter Balken, der Bereich von 2 SD im Normalgewebe als rote Linie dargestellt. (b) Betrachtung der CpGs im Einzelnen. Gezeigt wird der Mittelwert der Kontrollen und Tumoren. Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar. (c) Getrennte Betrachtung der Methylierung von Tumoren, die *IGF2* erhöht ($n = 19$, rot) und normal ($n = 25$, schwarz) exprimieren. Das Normalgewebe ist weiterhin grau dargestellt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen überexprimierenden Tumoren und dem Normalgewebe sind durch ein „*“ über dem jeweiligem CpG markiert.

(a) *IGF2*-Expression/*H19*-DMR-Methylierung



(b) *H19*-Expression/*H19*-DMR-Methylierung

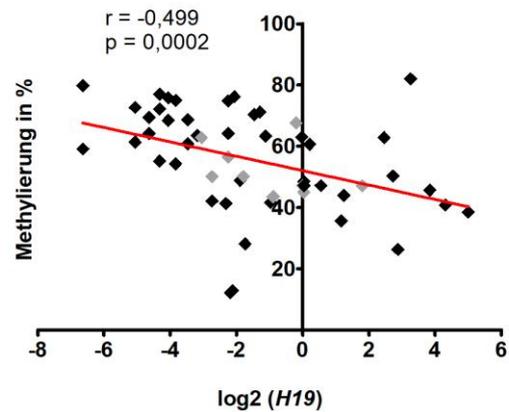


Abb. 16: Korrelation *H19*-DMR-Methylierung mit Genexpression von *IGF2* (a) und *H19* (b)

Die Werte wurden zur besseren Darstellbarkeit zur Basis 2 logarithmiert. Tumorproben sind in Schwarz, Normalgewebe in Grau dargestellt.

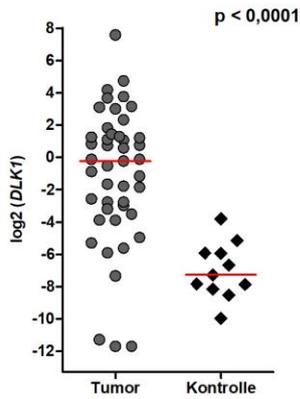
5.6 Der *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus

Mit *DLK1* und *MEG3* stehen sich wie bei *IGF2* und *H19* ein paternal geprägtes, proteinkodierendes, und ein maternal geprägtes, nicht proteinkodierendes Gen gegenüber (vgl. Abb. 18). Der ähnliche Aufbau beider Loci legt das Vorhandensein ähnlicher regulatorischer Mechanismen nahe. Tatsächlich kommt es nach Deletion einer zwischen *DLK1* und *MEG3* gelegenen DMR, der *intergenic* DMR (IG-DMR), zum LOI der paternal geprägten Gene. Zu diesen gehört neben *DLK1* auch das ebenfalls untersuchte *RTL1* [117]. Die IG-DMR fungiert also im *MEG3/DLK1/RTL1*-Locus als ICR, ähnlich wie die *H19*-DMR im *IGF2/H19*-Locus.

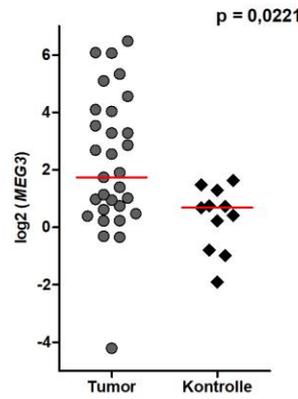
Die Expressionsanalyse zeigte sowohl für *DLK1* als auch für *MEG3* eine signifikant erhöhte Expression im Tumor. Für *RTL1* konnte kein Unterschied zwischen den Kollektiven ermittelt werden (vgl. Abb. 17 und Tab. 5). Im Gegensatz zur negativen Korrelation im *IGF2/H19*-Locus korrelierte eine hohe *DLK1*-Aktivität sowohl mit einer hohen *MEG3*-Expression ($r = 0,469$; $p = 0,0003$) als auch mit einer hohen *RTL1*-Expression ($r = 0,510$; $p < 0,0001$). Noch deutlicher fiel die Korrelation zwischen *MEG3* und *RTL1* aus ($r = 0,887$; $p < 0,0001$).

Anders als in der *H19*-DMR des *IGF2/H19*-Locus konnte in der IG-DMR des *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus keine CTCF-Bindungsstelle identifiziert werden. Die Methylierungsanalyse erfolgte daher an 5 CpGs an einem für die gewählte Methode gut geeigneten Ort innerhalb der IG-DMR (vgl. Abb. 18).

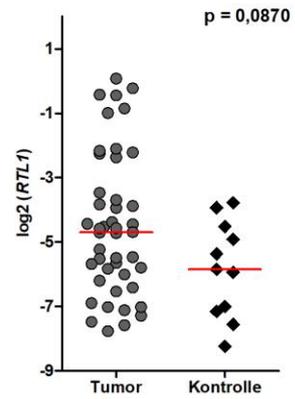
(a) *DLK1*



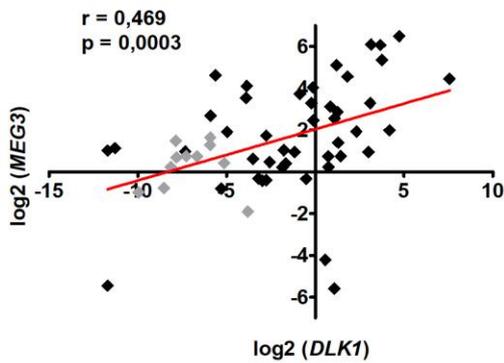
(b) *MEG3*



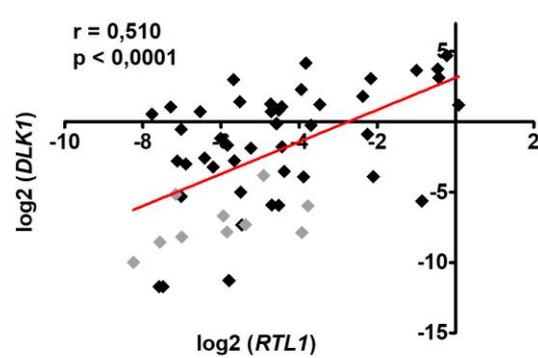
(c) *RTL1*



(d) Korrelation *MEG3/DLK1*



(e) Korrelation *DLK1/RTL1*



(f) Korrelation *MEG3/RTL1*

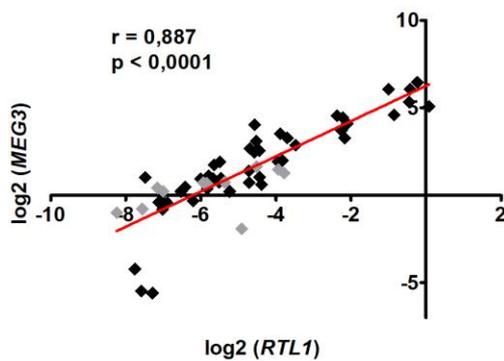
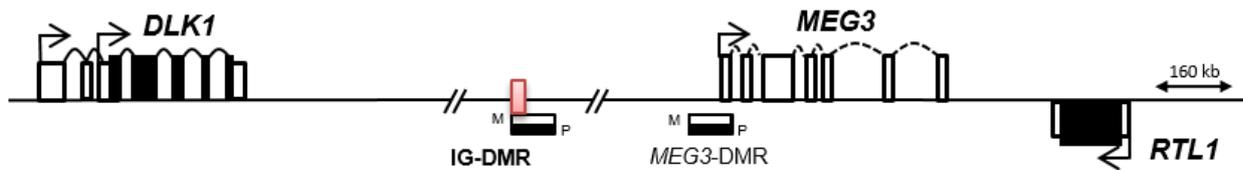


Abb. 17: Relative Expression der Gene *DLK1* (a), *MEG3* (b) und *RTL1* (c), sowie Korrelation zwischen der Genexpression von *MEG3* und *DLK1* (d), *DLK1* und *RTL1* (e) und *MEG3* und *RTL1* (f) im Tumor- und Kontrollgewebe

Alle Ergebnisse sind relativ zum Haushaltsgen *TBP* und auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. In (a)–(c) ist der Median der jeweiligen Säule durch einen roten Balken markiert. (d)–(f) zeigt Tumorproben als schwarze, Kontrollgewebe als graue Diamanten.

(a) Übersicht über den *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus



(b) Assay zur Bestimmung der IG-DMR-Methylierung

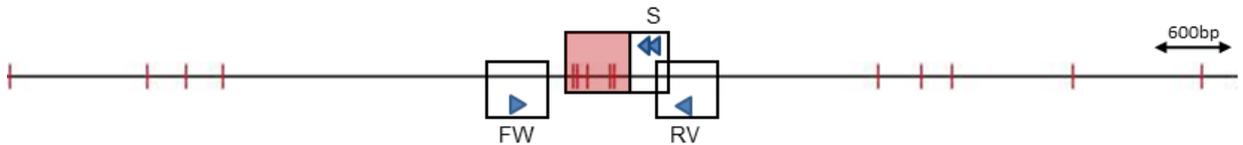


Abb. 18: Übersicht über den *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus

(a) Schematische Darstellung des *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus mit Darstellung der bekannten DMRs sowie der Region, in der der Assay etabliert wurde, als rot umrandetes Rechteck (Abb. modifiziert nach [118]). Translatierte Regionen der Gene sind als schwarz gefüllte, transkribierte, aber nicht translatierte Regionen als schwarz umrandete Rechtecke dargestellt. (b) Darstellung des Assays mit Position des FW-Primers (FW), RV-Primers (RV) und Sequencing-Primers (S). Alle CpGs der 600 bp langen Sequenz sind als rote Striche dargestellt. Der bisulfitequenzierte Bereich ist rot hinterlegt.

Die mediane Methylierung der IG-DMR lag im Normalgewebe bei 65,9 % und unterschied sich nicht von der des Tumorgewebes (66,4 %). Dennoch lag ein großer Teil der Tumoren hypo- (13 von 45) oder hypermethyliert (20 von 45) vor. Während die Normalgewebe eine Methylierung zwischen 64,0–68,2 % aufwiesen, erstreckte sich die Spannweite im Tumor von 45,8–86,6 % (vgl. Abb. 19 und Tab. 6). Bei Betrachtung der einzelnen CpGs des Assays ergab sich weder ein Unterschied zwischen Tumor- und Kontrollgewebe noch zwischen Tumoren mit erhöhter *DLK1*-Expression und Kontrollgewebe. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung der IG-DMR und der mRNA-Expression von *DLK1*, *MEG3* oder *RTL1* (*DLK1*: $r = 0,223$; $p = 0,0984$; *MEG3*: $r = -0,107$; $p = 0,4474$; *RTL1*: $r = -0,816$; $p = 0,5500$).

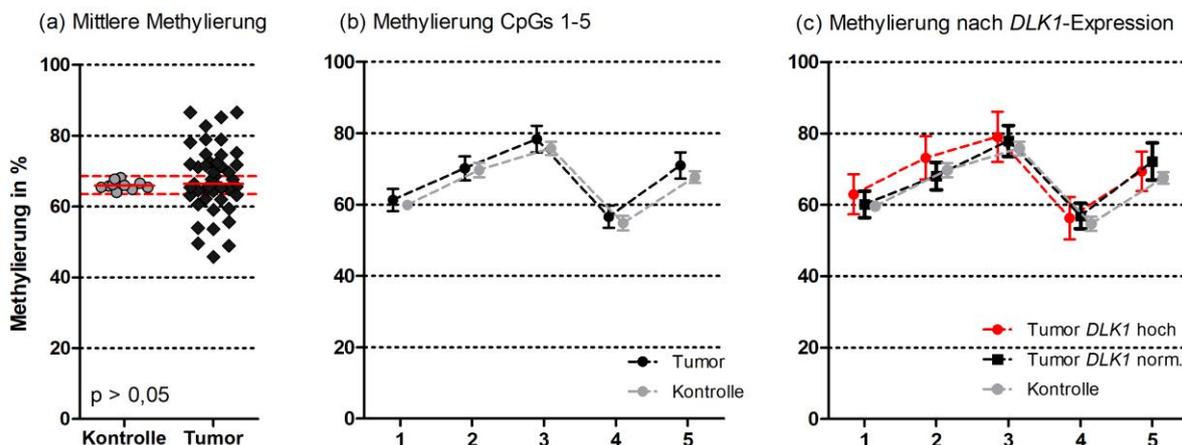


Abb. 19: Methylierung der IG-DMR des *DLK1/MEG3/RTL1*-Locus

(a) Mittlere Methylierung aller sechs CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe. Der Median ist als roter Balken in der Mitte der Säulen, der Bereich von zwei SD im Normalgewebe als gestrichelte rote Linie dargestellt. (b) Betrachtung der CpGs im Einzelnen. Gezeigt wird das Mittel der Kontrollen und Tumoren je CpG. Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar. (c) Getrennte Betrachtung der Methylierung von Tumoren, die *DLK1* über- (n = 30, rot) und normal (n = 15, schwarz) exprimieren. Das Normalgewebe ist grau dargestellt.

5.7 Der *NNAT/BLCAP*-Locus

Das paternal geprägte Gen *NNAT* liegt nicht in einem Cluster zusammen mit weiteren geprägten Genen, sondern ist isoliert im Intron des TSG *BLCAP* lokalisiert. *BLCAP* weist zudem zwei Transkripte auf (*BLCAP V1a* und *BLCAP V2a*), die im zentralen Nervensystem geprägt exprimiert werden [111].

Während *NNAT* im Tumor eine signifikant gesteigerte transkriptionelle Aktivität zeigte, fiel *BLCAP* durch eine signifikant verringerte Expression auf. Von den beiden gewebspezifisch geprägten *BLCAP*-Transkripten zeigte sich *BLCAP V2a* im WT signifikant stärker exprimiert als im Normalgewebe. Die Expression von *BLCAP V1a* unterschied sich zwischen beiden Kollektiven nicht (vgl. Abb. 20 und Tab. 5). Die *NNAT*-Expression korrelierte mit der *BLCAP-V2a*-Expression ($r = 0,377$; $p = 0,0045$). Eine Korrelation der Expression von *NNAT* und *BLCAP* ($r = 0,042$; $p = 0,7710$) respektive *BLCAP V1a* ($r = 0,195$; $p = 0,1619$) war nicht nachweisbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mehrere Assays zur Methylierungsanalyse innerhalb des Locus etabliert. Wegen der verringerten *BLCAP*-Expression im WT wurde dessen C/G-reicher Promotor auf Hypermethylierung hin untersucht. Auch die Methylierung des *NNAT*-Promotors, der Teil der *NNAT*-DMR ist, wurde untersucht. Über die Ensembl-Datenbank konnte eine Bindung von CTCF an einer Stelle innerhalb des *BLCAP*-Introns in mehreren humanen Zellkulturen bestätigt werden. In der direkten Umgebung dieses CTCF-DNA-Kontaktes

befinden sich multiple Übereinstimmungen mit dem CTCF-Kernbindungsmotiv, die in der Folge als putative CTCF-Bindungsstellen geführt werden. Der dritte Assay, der im *NNAT/BLCAP*-Locus etabliert wurde, diente der Analyse dieser Bindungsstellen (vgl. Abb. 21).

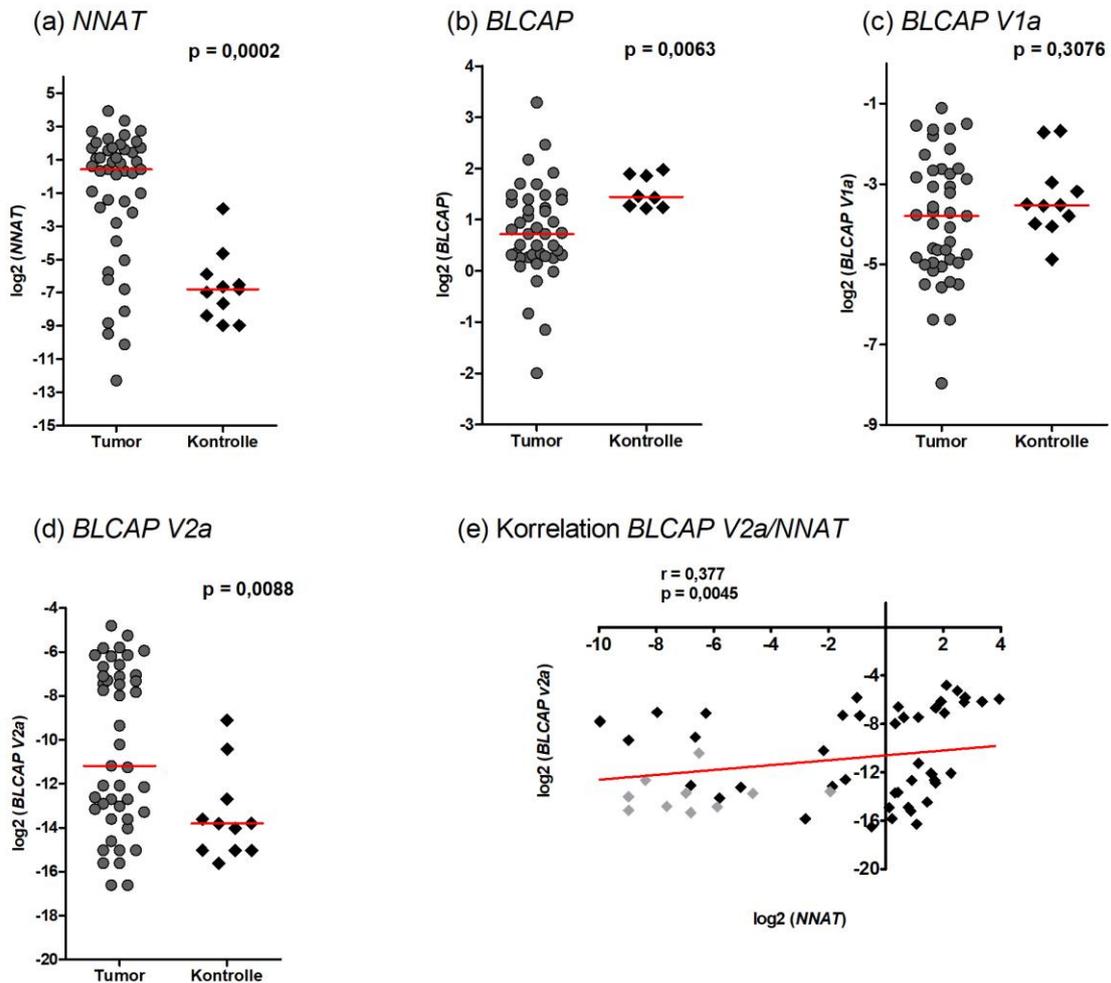
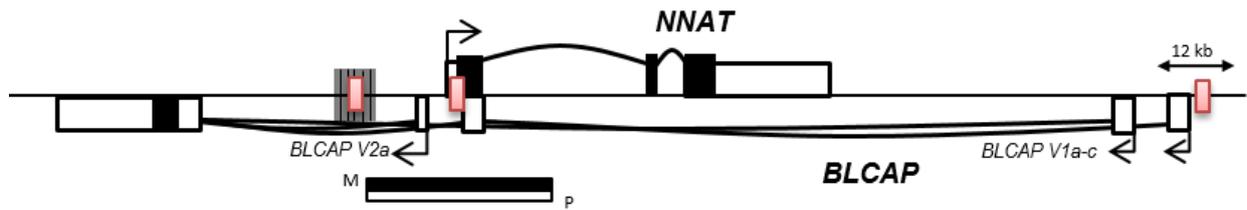


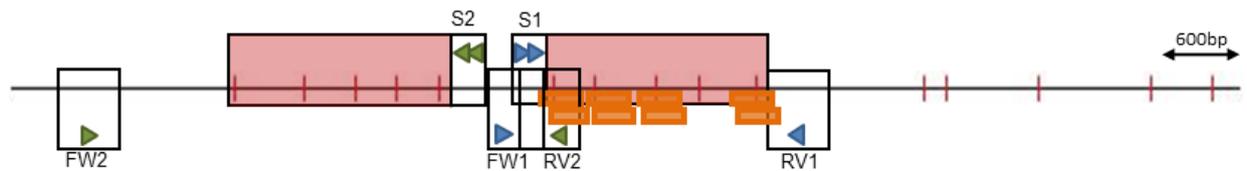
Abb. 20: Relative Expression der Gene *NNAT* (a), *BLCAP* (b) und der Transkripte *BLCAP V1a* (c) und *BLCAP V2a* (d), sowie Korrelation zwischen der Genexpression von *BLCAP V2a* und *NNAT* (e) im Tumor- und Kontrollgewebe

Alle Ergebnisse sind relativ zum Haushaltsgen *TBP* und auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. In (a)–(d) ist der Median der jeweiligen Säule durch einen roten Balken markiert. (e) zeigt Tumorproben als schwarze, Kontrollgewebe als graue Diamanten.

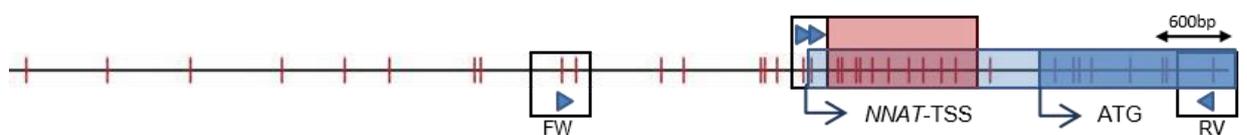
(a) Übersicht über den *NNAT/BLCAP*-Locus



(b) Assay der CTCF-Bindungsstellen



(c) *NNAT*-Promotor-Assay



(d) *BLCAP*-Promotor-Assay

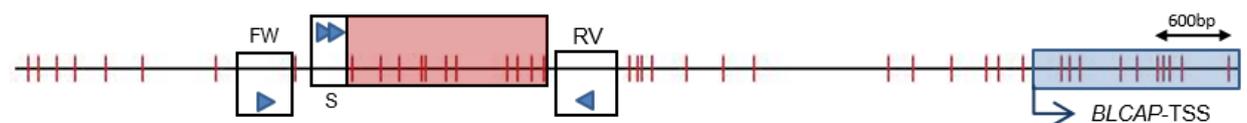


Abb. 21: Übersicht über den *NNAT/BLCAP*-Locus

(a) Schematische Darstellung des *NNAT/BLCAP*-Locus mit Darstellung der bekannten DMRs sowie der CTCF-Bindungsstellen als graues, rechteckiges Element mit schwarzen Strichen sowie der Region, in der die Assays etabliert wurden, als rot umrandetes Rechteck (Abb. modifiziert nach [111], [119]). Translatierte Regionen der Gene sind als schwarz gefüllte, transkribierte, aber nicht translatierte Regionen als schwarz umrandete Rechtecke dargestellt. (b) Darstellung der beiden Assays zur Erfassung von zehn aufeinander folgenden CpGs, die mehrere potentielle CTCF-Bindungsstellen abdecken (orange Kästchen). (c) Darstellung des Assays zur Erfassung von zehn CpGs im *NNAT*-Promotor. (d) Darstellung des Assays zur Erfassung von elf CpGs im *BLCAP*-Promotor. Eingezeichnet sind jeweils die CpGs in der Region (rote Striche), Positionen des FW-Primers (FW), RV-Primers (RV) und Sequencing-Primers (S), der bisulfitequenzierte Bereich (rot hinterlegt), die transkribierten (hellblau hinterlegt) und translatierten (dunkelblau hinterlegt) Sequenzen sowie deren Startpunkte (Pfeile).

Die Methylierung des *BLCAP*-Promotors lag sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorkollektiv über alle elf untersuchten CpGs hinweg auf einem sehr niedrigen Niveau von < 6,50 % (Abb. 22 und Tab. 6). Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Kollektiven festgestellt werden, auch nicht im Hinblick auf die einzelnen CpGs.

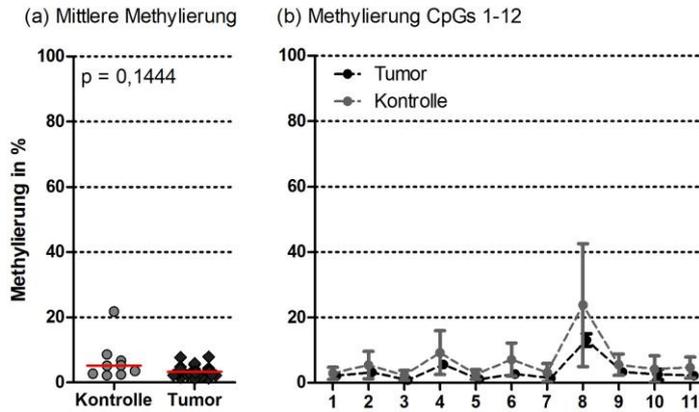


Abb. 22: Methylierung des *BLCAP*-Promotors

(a) Mittlere Methylierung aller untersuchten CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe. Der Median ist als roter Balken, der Bereich von zwei SD im Normalgewebe als gestrichelte rote Linie dargestellt. (b) Separate Betrachtung aller untersuchten CpGs für den *BLCAP*-Promotor. Gezeigt wird das Mittel der Kontrollen und Tumoren je CpG. Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar.

Im Vergleich zum Normalgewebe wurde im WT ein signifikanter Verlust der Methylierung des *NNAT*-Promotors festgestellt (vgl. Abb. 23a und Tab. 6). Zweiunddreißig (71,1 %) Tumoren waren hypomethyliert. Bei Betrachtung der einzelnen CpGs des *NNAT*-Promotor-Assays zeigte sich eine durchgehende mittlere Hypomethylierung des Tumorkollektivs. Die Tumoren mit *NNAT*-Überexpression ($n = 33$) waren über alle CpGs hinweg hypomethyliert. Die 13 Tumoren, die *NNAT* in normalem Maße exprimierten, zeigten hingegen keinen Unterschied in der Methylierung zum Kontrollgewebe.

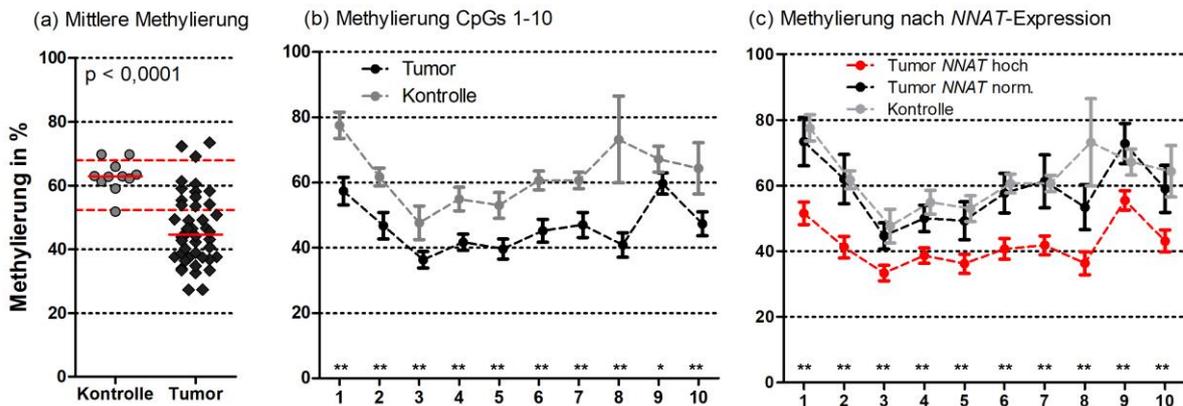


Abb. 23: Methylierung des *NNAT*-Promotors

(a) Mittlere Methylierung aller CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe des *NNAT*-Promotors. Der Median ist als roter Balken, der Bereich von zwei SD im Normalgewebe als gestrichelte rote Linie dargestellt. (b) Separate Betrachtung aller untersuchten CpGs des *NNAT*-Promotors. Gezeigt wird das Mittel der Kontrollen und Tumoren je CpG. Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar. (c) Getrennte Betrachtung von Tumoren, die *NNAT* überexprimieren ($n = 33$, rot), und Tumoren mit normaler *NNAT*-Expression ($n = 12$, schwarz). Das Normalgewebe ist grau dargestellt. In (b) und (c) sind signifikante ($p < 0,05$) bzw. hoch signifikante ($p < 0,005$) Unterschiede zwischen hoch exprimierendem Tumor- und Normalgewebe durch ein „*“ bzw. „***“ über dem jeweiligem CpG markiert.

Auch an den zehn aufeinanderfolgenden CpGs, die die CTCF-Bindungsstellen erfassen, war eine signifikante Hypomethylierung im Tumorgewebe auffällig (vgl. Abb. 24a und Tab. 6). 57,8 % der Tumoren waren hypomethyliert. Bei Betrachtung der CpGs im Einzelnen zeigte sich eine ausgeprägte Methylierung des Normalgewebes an den CpGs 6–8, während die restlichen CpGs einen deutlich niedrigeren Grad an Methylierung aufwiesen. Nur für diesen stark methylierten Bereich konnte ein signifikanter Unterschied mit deutlich erniedrigter Methylierung im Tumor nachgewiesen werden (Abb. 24b). Sechs der acht ermittelten putativen CTCF-Bindungsstellen liegen in diesem Bereich (vgl. Abb. 21b). Damit zeigte sich hier ein deutlich anderes Methylierungsmuster als in dem über alle untersuchten CpGs hinweg hypomethylierten Promotor.

Bei der gesonderten Betrachtung der 33 *NNAT*-überexprimierenden Tumoren zeigte sich im Bereich von CpG 6–8 eine nochmals deutlichere Hypomethylierung im Vergleich zum Normalgewebe (Abb. 24c). Zudem war in dieser Gruppe auch eine signifikant erniedrigte Methylierung für die CpGs 4 sowie 9 und 10 nachweisbar. Im Bereich der CpGs 9 und 10 liegen die Core-Sequenzen der zwei weiteren CTCF-Bindungsstellen des Assays. Die Gruppe von 13 Tumoren, die *NNAT* in normalem Maß exprimierten, zeigte hier, vergleichbar mit dem Promotor-Assay, eine ähnliche Methylierung wie das Kontrollgewebe.

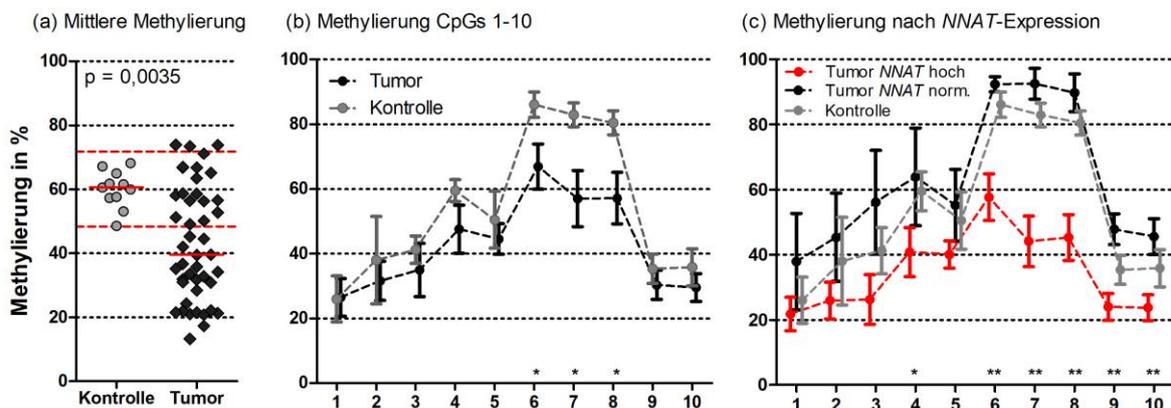


Abb. 24: Methylierung der *NNAT*-CTCF-Bindungsstellen

(a) Mittlere Methylierung aller CpGs im Tumor- und Kontrollgewebe des *NNAT*-Promotors. Der Median ist als roter Balken, der Bereich von zwei SD im Normalgewebe als rote Linie dargestellt. (b) Separate Betrachtung aller untersuchten CpGs. Gezeigt wird das Mittel der Kontrollen und Tumoren je CpG. Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar. (c) Getrennte Betrachtung von Tumoren, die *NNAT* überexprimieren (n = 33, rot), und Tumoren mit normaler *NNAT*-Expression (n = 12, schwarz). Das Normalgewebe ist grau dargestellt. In (b) und (c) sind signifikante ($p < 0,05$) bzw. hoch signifikante ($p < 0,005$) Unterschiede zwischen hoch exprimierendem Tumor- und Normalgewebe durch ein „*“ bzw. „**“ über dem jeweiligem CpG markiert.

Trotz der genannten Unterschiede im Methylierungsmuster zeigte sich eine deutliche Korrelation der mittleren Methylierung von Promotor und CTCF-Bindungsstellen ($r = 0,7234$; $p < 0,0001$; Abb. 25).

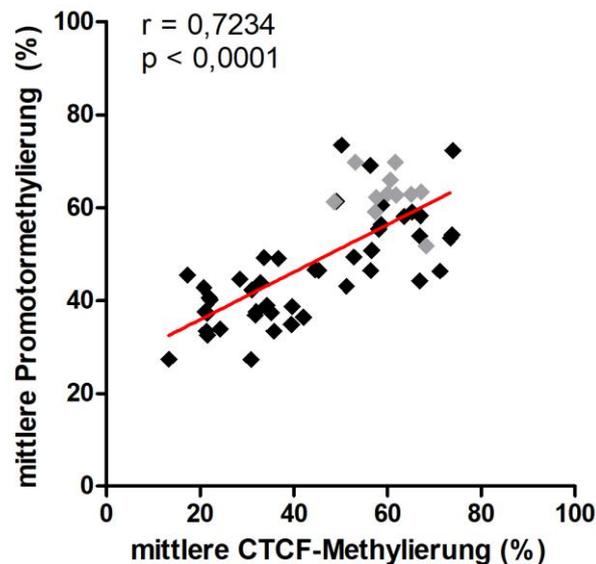
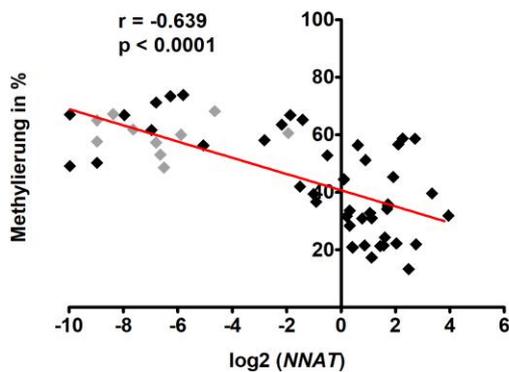


Abb. 25: Korrelation zwischen der mittleren Methylierung des *NNAT*-Promotors und der mittleren Methylierung der *NNAT*-CTCF-Bindungsstellen

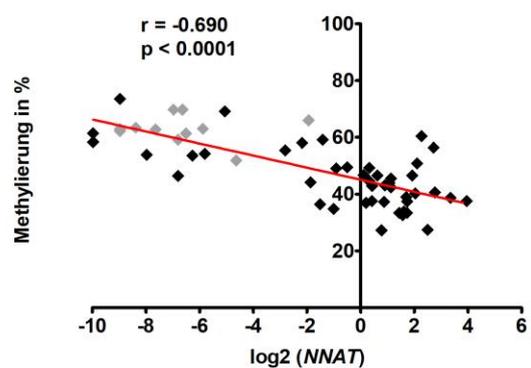
Gezeigt werden Tumorzellen als schwarze, Kontrollgewebe als graue Diamanten.

Eine hohe *NNAT*-Expression korrelierte stark negativ und hochsignifikant sowohl mit der Methylierung der CTCF-Bindungsstellen ($r = -0,639$; $p < 0,0001$) als auch mit der Methylierung des *NNAT*-Promotors ($r = -0,690$; $p < 0,0001$; Abb. 26). Trotz der engen räumlichen Beziehung zwischen *NNAT* und *BLCAP* konnte eine Korrelation zur Expression von *BLCAP* weder für den Methylierungsstatus der CTCF-Bindungsstellen ($p = 0,1628$) noch für den des *NNAT*-Promotors ($p = 0,1892$) nachgewiesen werden. Auch für das *BLCAP-V1a*-Transkript konnte eine solche Korrelation weder für die Methylierung der CTCF-Bindungsstelle ($p = 0,3124$) noch für die Methylierung des *NNAT*-Promotors ($p = 0,8032$) nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Methylierung der CTCF-Bindungsstellen und der Expression des *BLCAP-V2a*-Transkripts ($r = -0,273$; $p = 0,0481$), dessen TSS nur wenige hundert Basenpaare *upstream* der CTCF-Bindungsstellen liegt (Abb. 22a). Die Methylierung des *NNAT*-Promotors korrelierte nicht signifikant mit der *BLCAP-V2a*-Expression ($r = -0,262$, $p = 0,0580$).

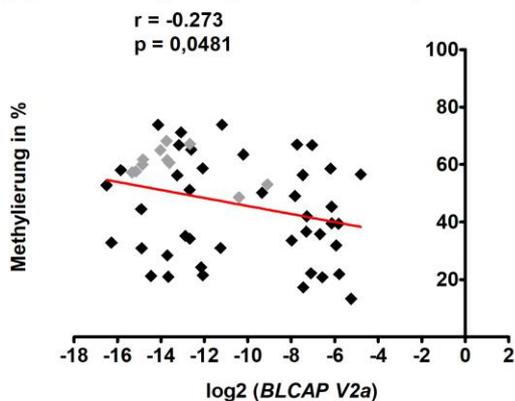
(a) CTCF-Methylierung/*NNAT*-Expression



(b) *NNAT*-Promotormethylierung/*NNAT*-Expression



(c) CTCF-Methylierung/*BLCAP-V2a*-Expression



(d) *NNAT*-Promotormethylierung/*BLCAP-V2a*-Expression

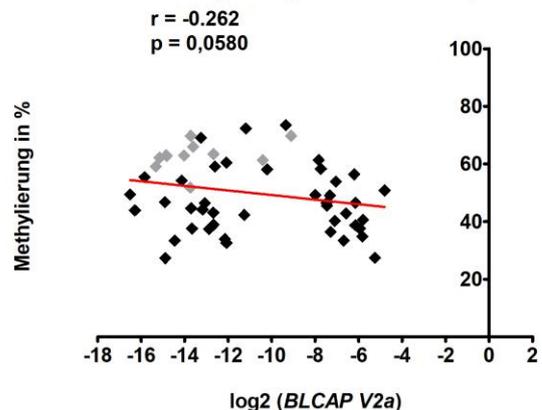


Abb. 26: Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression am *NNAT/BLCAP*-Locus

(a) Korrelation zwischen der mittleren Methylierung der CTCF-Bindungsstellen und der *NNAT*-mRNA-Expression. (b) Korrelation zwischen der mittleren Methylierung des *NNAT*-Promotors und der *NNAT*-mRNA-Expression. (c) Korrelation zwischen der mittleren Methylierung der CTCF-Bindungsstellen und der *BLCAP-V2a*-mRNA-Expression. (d) Korrelation zwischen der mittleren Methylierung des *NNAT*-Promotors und der *BLCAP-V2a*-mRNA-Expression. Die Expressionswerte wurden zur besseren Darstellbarkeit zur Basis 2 logarithmiert. Tumorproben sind in Schwarz, Normalgewebe in Grau dargestellt.

5.8 Das *WT1*-Gen

WT1 weist in den meisten humanen Geweben, unter anderem den Nieren, keine Prägung auf. In der unmittelbaren Umgebung von *WT1* befinden sich aber geprägte Transkripte wie z.B. *WT1 Antisense RNA (WT1-AS)*. Eine gewebsspezifische Prägung von *WT1*, z.B. in fetalem Hirn, ist bekannt [120]. Daher scheint das Vorhandensein ähnlicher epigenetischer Mechanismen wie in manchen geprägten Loci möglich.

In der Expressionsanalyse von *WT1* konnte keine signifikante Überexpression im WT festgestellt werden (vgl. Abb. 28 und Tab. 5). Dennoch wurde die Umgebung von *WT1* auf Sequenzen untersucht, die potentiell durch aberrante Methylierung die Expression von *WT1* im WT beeinflussen könnten.

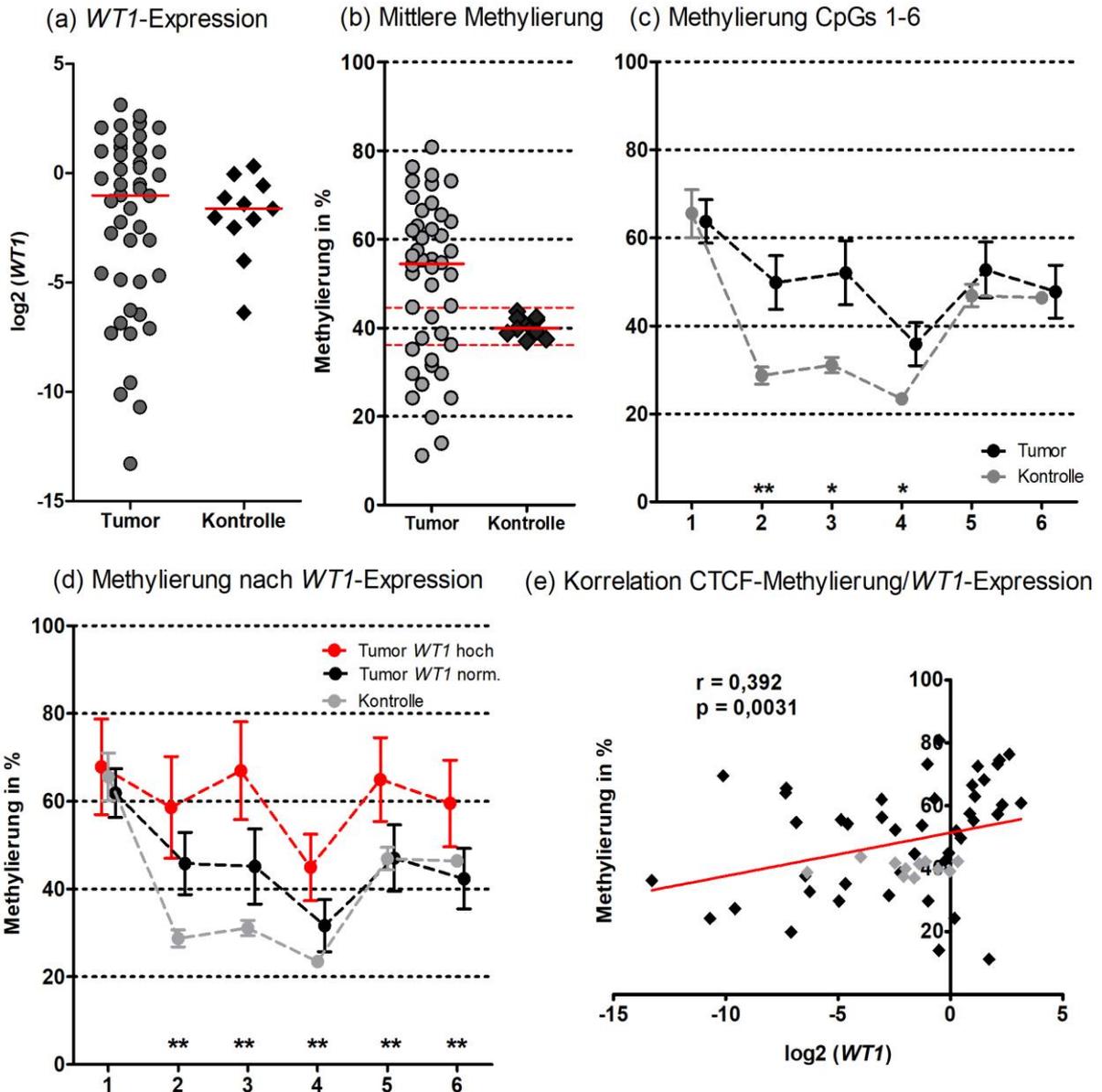


Abb. 28: *WT1*-Expression sowie Methylierung der CTCF-Bindungsstellen des *WT1*-Locus, Korrelation zwischen Methylierung der CTCF-Bindungsstellen und der *WT1*-Expression

(a) Die *WT1*-Expression ist relativ zum Haushaltsgen *TBP* und auf einer zur Basis 2 logarithmierten Skala dargestellt. Der Median der jeweiligen Säule ist durch einen roten Balken markiert. (b) Mittlere Methylierung über alle 6 CpGs des Assays im Tumor- und Kontrollgewebe. Der Median ist als roter Balken in der Mitte der Säulen, der Bereich von zwei SD im Normalgewebe als gestrichelte rote Linie dargestellt. (c), (d) Betrachtung der CpGs im Einzelnen. Gezeigt wird in (c) das Mittel der Kontrollen und Tumoren sowie in (d) Normalgewebe (grau), Tumoren, die *WT1* überexprimieren ($n = 4$, rot), und Tumoren mit normaler *WT1*-Expression ($n = 40$, schwarz). Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall dar. Signifikante ($p < 0,05$) bzw. hoch signifikante ($p < 0,005$) Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe (c) sowie zwischen überexprimierenden Tumoren und Normalgewebe (d) sind durch ein „**“ bzw. „***“ über dem jeweiligen CpG markiert. (e) Korrelation zwischen Methylierung der CTCF-Bindungsstellen und der *WT1*-Expression. Tumorproben sind in Schwarz, Normalgewebe in Grau dargestellt.

Tabelle 5: Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR

Gen	Mediane Exp.		Spannweite		SD		FC	Sig.
	Kontrolle	Tumor	Kontrolle	Tumor	Kontrolle	Tumor		
<i>GDF7</i>	0,328	0,065	0,20–0,54	0,002–0,96	0,19	0,11	0,2	= 0,0008
<i>RASSF1A</i>	0,014	0,008	0,005–0,02	0,001–0,18	0,005	0,04	0,6	= 0,5484
<i>MEST</i>	0,144	1,220	0,08–0,34	0,02–14,22	0,10	3,05	8,5	= 0,0024
<i>WT1</i>	0,325	0,495	0,01–1,25	1x10 ⁻⁴ –8,75	0,39	1,95	1,5	= 0,6510
<i>H19</i>	0,705	0,230	0,12–3,49	0,01–19,84	0,10	4,06	0,3	= 0,2701
<i>IGF2</i>	10,160	144,300	5,30–55,72	0,09–1296,13	19,39	291,30	14,2	< 0,0001
<i>DLK1</i>	0,006	0,853	0,001–0,07	3x10 ⁻⁴ –189,36	0,02	28,30	133,2	< 0,0001
<i>MEG3</i>	1,602	3,329	0,26–3,12	0,02–89,26	0,10	22,63	2,1	= 0,0221
<i>RTL1</i>	0,017	0,037	0,003–0,07	0,005–1,057	0,02	0,25	2,2	= 0,0870
<i>LHX1</i>	2,437	0,264	1,03–6,26	0,003–24,85	1,64	5,29	0,1	= 0,0016
<i>BLCAP</i>	2,720	1,650	2,33–3,93	0,25–9,75	0,67	1,60	0,6	= 0,0063
<i>BLACP V1a</i>	0,0870	0,072	0,03–0,31	0,004–0,47	0,10	0,11	0,8	= 0,3076
<i>BLCAP V2a</i>	7x10 ⁻⁵	4,3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁵ –0,002	1x10 ⁻⁵ –0,04	5x10 ⁻⁴	0,007	6,1	= 0,0088
<i>NNAT</i>	0,009	1,343	0,002–0,26	2x10 ⁻⁴ –15,46	0,08	2,99	149,2	= 0,0002

Angegeben werden die mediane Expression relativ zum Haushaltsgen *TBP*, Spannweite, SD, *fold change* (FC) zwischen Kontroll- und Tumorgewebe sowie Signifikanz (Sig.) des Unterschiedes zwischen beiden Kollektiven.

Tabelle 6: Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen via Pyrosequencing

Assay	Mediane Meth.		Spannweite		SD		Sig.
	Kontrolle	Tumor	Kontrolle	Tumor	Kontrolle	Tumor	
<i>BLCAP</i> -Prom.	5,18	3,36	2,2–21,8	1,2–7,9	6,13	1,48	= 0,1444
<i>GDF7</i> -Prom. S1	3,36	2,86	2,7–4,0	1,2–3,9	0,90	0,99	= 0,4018
<i>GDF7</i> -Prom. S2	5,56	6,17	4,3–6,8	4,2–11,4	1,73	2,02	= 0,5655
<i>GDF7</i> -Prom. S3	9,64	7,29	5,5–13,7	4,9–14,3	5,76	2,59	= 0,9142
<i>H19</i> -DMR-CTCF	50,17	61,08	43,5–69,1	12,2–82,0	9,25	17,50	= 0,3399
<i>MEG3</i> -IG-DMR	65,90	66,40	64,0–68,2	45,8–86,6	1,28	9,47	= 0,6546
<i>MEST</i> -Prom.	72,60	64,40	65,4–81,0	44,0–94,8	4,99	11,06	= 0,0035
<i>NNAT</i> -CTCF	60,60	39,60	48,6–68,2	13,3–73,9	5,84	17,90	= 0,0047
<i>NNAT</i> -Prom.	62,90	44,60	51,8–69,8	27,3–73,5	4,95	11,15	< 0,0001
<i>WT1</i> -CTCF	40,00	54,45	37,0–43,7	11,2–80,8	2,13	18,05	= 0,0569

Angegeben werden die mediane Methylierung über alle CpGs des jeweiligen Assays hinweg, Spannweite und SD im Tumor- und Kontrollgewebe sowie Signifikanz (Sig.) des Unterschiedes zwischen den Kollektiven.

6 Diskussion

In der Tumorgenese des WT gehören Veränderungen, die die Prägung des *IGF2/H19*-Locus betreffen, zu den häufigsten Ereignissen [7]. Neben dem Verlust des maternalen Allels (LOH) führt die *de novo* Methylierung der epigenetischen Kontrollregion des Locus, der *H19*-DMR, zum Verlust der Prägung (LOI) [9], [10]. Der LOI von *IGF2* im WT, der durch den Verlust der Bindungsfähigkeit von CTCF an die entsprechenden Bindungsstellen der *H19*-DMR ausgelöst wird [11], deutet auf den hohen Stellenwert der Epigenetik in der Entstehung des WT hin.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass weitere regulatorisch bedeutsame DNA-Elemente im WT von einer veränderten Methylierung betroffen sind. Neben Promotoren einiger der untersuchten Gene zeigten vor allem die untersuchten Regionen, die CTCF-Bindungsstellen enthalten, deutliche Auffälligkeiten. Die Korrelation der Methylierung dieser Regionen mit der Expression der assoziierten Gene könnte auf deren regulatorische Relevanz hinweisen.

6.1 Keine relevante Promotormethylierung der untersuchten nicht geprägten Gene

Eine aberrante Methylierung der Promotorregion kann zur verringerten Expression des betroffenen Gens führen. Eine auf diese Weise vermittelte Stilllegung eines TSG ist ein häufiges epigenetisches Phänomen in der Krebsentstehung [50]. Neben dem als TSG klassifizierten *BLCAP* zeigten sich *LHX1* und *GDF7* im Tumorgewebe signifikant weniger exprimiert. *LHX1* ist direkt an der Entwicklung der Niere beteiligt [122]. *GDF7* gehört zur Familie der *bone morphogenetic proteins*, welche zum Teil während der Nierenentwicklung durch WT1 reguliert werden [122]. Eine Fehlregulation solcher Gene während der Organentwicklung könnte potentiell zu einem Entwicklungsarrest, wie er im WT vorliegt, beitragen.

Eine aussagekräftige Analyse der Methylierung des Promotors von *LHX1* war technisch nicht möglich. In beiden anderen Genen zeigte sich im Tumor- sowie im Kontrollgewebe keine nennenswerte Promotormethylierung. Damit kann diese als Ursache für die verringerte Expression von *BLCAP* und *GDF7* im Tumor weitgehend eliminiert werden.

Dennoch ist die promotorassoziierte Stilllegung von TSG auch im WT ein relevanter Faktor, der durch epigenetische Veränderungen die Tumorgenese vorantreibt. Eine abnormale Promotormethylierung von wichtigen TSG wie z.B. der *O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)* ist im WT bekannt [123]. In einem genomweiten Ansatz konnten

vor Kurzem weitere im WT durch Hypermethylierung stillgelegte Gene identifiziert werden [124]. Unter anderem enthielt diese Gruppe von Genen prominente TSG wie das *Retinoblastoma 1-Gen (RB1)*.

6.2 Fehlregulation geprägter Gene durch eine verringerte Promotor-methylierung

Bei geprägten Genen wird die Stilllegung des inaktiven Allels oft durch eine vollständige Promotormethylierung vermittelt, während der Promotor des aktiven Allels unmethyliert vorliegt [63]. Dementsprechend könnte eine Veränderung der Promotormethylierung die Aktivität des geprägten Gens beeinflussen oder sogar einen LOI zur Folge haben. Auch für die beiden untersuchten Gene *NNAT* und *MEST* wird angenommen, dass die Prägung über die Methylierung des Promotors etabliert wird [115], [119].

Bei beiden Genen konnte eine Überexpression sowie eine Hypomethylierung des jeweiligen Promotors nachgewiesen werden. Die *MEST*-Expression korrelierte jedoch nicht mit der Hypomethylierung des Promotors. Ein anderer Erklärungsansatz ergibt sich aus der Beobachtung, dass in der Maus große Unterschiede in der Methylierung des proximalen und des distalen *MEST*-Promotors bestehen [125]. Die Autoren vermuten daher, es könne ein isolierendes Element innerhalb des *MEST*-Promotors existieren, welches zu einer ungleichmäßigen Methylierung des Promotors führt. In der vorliegenden Arbeit wurde der *MEST*-Promotor lediglich proximal, im ersten Intron, untersucht. Ein Grund für den fehlenden Zusammenhang zwischen der *MEST*-Expression und der Methylierung könnte also in einer abweichenden Methylierung des nicht untersuchten distalen Promotors liegen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen am *MEST*-Locus zeigte sich eine ausgeprägte negative Korrelation zwischen der Methylierung des *NNAT*-Promotors und der *NNAT*-Expression. Auch da bereits mehrfach in funktionellen Experimenten eine Kausalität zwischen der Methylierung im *NNAT/BLCAP*-Locus und der *NNAT*-Expression nachgewiesen werden konnte, deuten diese Daten eindrucksvoll auf eine epigenetische Fehlregulation des geprägten Gens *NNAT* in einem großen Teil der WT hin [83], [126], [127]. Darüber hinaus legen die Ergebnisse der Untersuchung der CTCF-Bindungsstellen des *NNAT/BLCAP*-Locus in der vorliegenden Arbeit nahe, dass der Promotor nicht das einzige epigenetisch fehlregulierte Element innerhalb dieses Locus ist. Auf diese Ergebnisse wird weiter unten gesondert eingegangen.

Zur Relevanz der epigenetischen Fehlregulation von *NNAT* für die Genese und den Progress des WT existieren bislang keine Daten. In einem weiteren embryonalen Tumor, dem Medulloblastom, ist die Überexpression von *NNAT* ebenfalls ein häufiges Phänomen und geht dort mit einer verstärkten Tumorpheriferation einher [128]. Als ein Mechanismus der cancerogenen Eigenschaften von *NNAT* konnte eine calciumvermittelte Aktivierung des *Mitogen-Activated Protein Kinase*-Signalwegs (*MAPK*) und des *Phosphoinositid-3-Kinase*-Signalwegs (*PI3K*) identifiziert werden, die letztlich zur Aktivierung bekannter Onkogene wie *Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene (H-RAS)* und *Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1)* führt [128], [129]. Auch bei der Entstehung verschiedener nicht-embryonaler maligner Erkrankungen scheint eine Fehlregulation von *NNAT* eine Rolle zu spielen. Hierzu gehören unter anderem das Prostatacarcinom, nicht-kleinzellige Lungencarcinome sowie das Glioblastom. Auch bei diesen Tumoren wurde die erhöhte Expression von *NNAT* mit einer erhöhten Zellproliferation oder mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [130]–[132].

Zusammenfassend zeigen diese Daten auf, wie *NNAT* in die Tumorgenese verschiedener maligner, insbesondere auch anderer embryonaler Tumoren, involviert ist. Es ist wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit gezeigte epigenetische Fehlregulation von *NNAT* über ähnliche Signalkaskaden die Genese und Progression des WT vorantreibt. Funktionelle Experimente, z.B. an einer WT-Zellkultur, welche die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen von *NNAT* aufweist, könnten die Relevanz dieser Veränderungen für die Genese und Progression des WT weiter beleuchten. So könnten nach einem *knockdown* von *NNAT* z.B. über das Einbringen einer entsprechenden siRNA Auswirkungen auf Apoptose und Proliferation der Zellen beobachtet werden.

Der Verlust der Prägung eines geprägten Genes (LOI) gilt als unabhängiger Faktor für die Entstehung von Krebs [32], [133]. Unsere Daten deuten darauf hin, dass zumindest manche Tumoren einen LOI von *NNAT* zeigen. Es wird angenommen, dass *NNAT* seine Prägung über die Methylierung des maternalen Promotors, oder zumindest generell durch Methylierung des maternalen Allels innerhalb des Locus, aufrechterhält [119]. Mehrere untersuchte Tumoren zeigten sowohl am *NNAT*-Promotor als auch an den CTCF-Bindungsstellen eine Methylierung deutlich unterhalb von 50 %. Daher muss es zur Demethylierung des maternalen Allels gekommen sein, was eine Reexpression von *NNAT* von diesem Allel zur Folge haben könnte. Ein LOI von *NNAT* im WT wurde bereits von anderen Autoren vermutet. Aiden et al. fanden im Bereich des *NNAT*-Promotors ausgeprägte aktivierende H3K4me3-Histonmodifikationen im

WT. In ähnlichem Umfang und ähnlicher Intensität waren diese an geprägten Genen lediglich im Bereich des *IGF2*-Promotors festzustellen. Dies wurde von den Autoren als ein Hinweis auf einen LOI von *NNAT* im WT gewertet [86]. Der Nachweis eines LOI von *NNAT* würde die Relevanz für die Tumorgenese der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Veränderungen weiter hervorheben. Eine allelspezifische Expressionsanalyse setzt das Vorhandensein eines heterozygoten und damit informativen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) innerhalb der transkribierten *NNAT*-Sequenz der zu analysierenden Probe voraus, woran eine weitere Analyse innerhalb dieser Arbeit scheiterte.

6.3 Der LOI von *IGF2*, eine wichtige Komponente der Tumorgenese im WT

Die wichtigste und am besten untersuchte epigenetische Veränderung im WT ist der LOI von *IGF2*. Dieser entsteht durch die *de novo* Methylierung der CTCF-Bindungsstellen der *H19*-DMR. Die zuvor in der Literatur beschriebene Überexpression von *IGF2* im WT verglichen mit Nierengewebe [84], [108] konnte in unseren Experimenten bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass mit zunehmender Expression von *IGF2* die Expression von *H19* abnimmt. Von funktioneller Bedeutung ist die Korrelation zwischen der Methylierung der untersuchten CTCF-Bindungsstelle der *H19*-DMR und der Expression von *IGF2* und *H19*. Wie erwartet zeigten hier hypermethylierte Tumoren eine erhöhte *IGF2*-Expression und eine erniedrigte *H19*-Expression. Bemerkenswert ist, dass eine Hypermethylierung der untersuchten CTCF-Bindungsstelle stärker mit einem Verlust der *H19*-Expression als mit einer Überexpression von *IGF2* korreliert. Auch Steenman et al. beobachteten in einer der ersten Veröffentlichungen über den LOI von *IGF2* im WT eine variable Überexpression von *IGF2* und einen deutlich signifikanteren Verlust der *H19*-Expression in Tumoren mit LOI von *IGF2* [10].

Zwanzig Prozent der untersuchten Tumoren wiesen eine eindeutige Hypermethylierung der *H19*-DMR verglichen mit dem Normalgewebe auf und zeigen somit einen LOI oder einen LOH. Welche der beiden Veränderungen vorliegt, kann methodenbedingt hier nicht unterschieden werden. In der Literatur wird die Frequenz beider Veränderungen zusammen mit 50–70 % deutlich höher angegeben [7], [9], [31]. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass einige Proben in der Vergleichsgruppe selbst eine deutlich höhere Methylierung als die erwarteten ca. 50 % aufwiesen. Drei der elf untersuchten Kontrollgewebe zeigten eine Methylierung oberhalb des Medians des Tumorgewebes (61,08 %). Dies wiederum legt die Vermutung nahe, dass eine Hypermethylierung der *H19*-DMR in diesen Kontrollgeweben bereits stattgefunden hatte, obwohl diese sich histologisch unauffällig zeigten. Tatsächlich konnten andere Autoren in Nierengeweben, die an WTs mit bestätigtem LOI angrenzten,

ebenfalls ein LOI nachweisen [134], [135]. Die Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass es sich beim LOI von *IGF2* um ein frühes Ereignis in der Genese des WT handelt [134]. Ebenfalls ist bekannt, dass im an den Tumor angrenzenden Nierengewebe auch ein LOH, wenn auch seltener, auftreten kann [37]. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass es auch im untersuchten Tumorkollektiv zur Hypermethylierung der *H19*-DMR kommt und dies zu den bekannten Veränderungen in der Expression der abhängigen Gene *IGF2* und *H19* führt.

6.4 Aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen im WT: Eine Rolle über den *IGF2/H19*-Locus hinaus

Es ist bekannt, dass die Dimerisierung zweier an die DNA gebundener CTCF-Proteine mit Hilfe einer Reihe von Cofaktoren wie z.B. Cohesin zur Ausbildung von intrachromosomalen Chromatinschleifen, sogenannten „*Loops*“, führen kann. Durch solche Loops ist das Erbgut von höheren Eukaryoten in Bereiche organisiert, innerhalb derer es häufig zur Interaktion verschiedener DNA-Elemente wie Promotoren und Enhancern kommt. Hingegen sind Kontakte über die Grenzen solcher Bereiche, die auch *topologically associating domains* (TADs) genannt werden, selten. Gene und Enhancer, welche nicht innerhalb einer TAD liegen, sind so voneinander isoliert [136]–[138]. Neben dieser isolierenden Funktion ist eine weitere wichtige Aufgabe von CTCF, innerhalb der bis zu mehreren Megabasen großen TADs durch die Ausbildung von kleineren Loops interagierende DNA-Elemente in räumliche Nähe zu bringen und damit deren Interaktion zu vereinfachen [137], [139].

6.4.1 Fehlregulation von *NNAT* und *WT1* durch aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen im WT

Neben einer CTCF-Bindungsstelle in der *H19*-DMR des *IGF2/H19*-Locus wurden noch zwei weitere Sequenzen, die CTCF-Bindungsstellen enthalten, auf ihre Methylierung hin untersucht. Auch in diesen beiden Bereichen zeigten sich deutliche Abweichungen zwischen Tumor- und Kontrollgewebe. Im *NNAT*-Locus zeigte eine Gruppe von drei CpGs, die Teil der Sequenz von sechs der acht CTCF-Bindungsstellen der näheren Umgebung sind, eine signifikante Hypomethylierung. Im *WT1*-Locus ergab sich hingegen eine deutliche Hypermethylierung dreier CpGs in der direkten Umgebung einer CTCF-Bindungsstelle im Tumorkollektiv. Gemeinsam ist beiden untersuchten Bereichen, dass der Grad der Methylierung mit der Genexpression von *WT1* bzw. *NNAT* korreliert.

Es konnte mehrfach experimentell nachgewiesen werden, dass die Bindung von CTCF an eine entsprechende Bindungsstelle methylierungsabhängig erfolgt [34], [140], [141]. Selbst

methylierte CpGs in der direkten Umgebung der Bindungsstelle können zu verringerter Affinität von CTCF zur Bindungsstelle führen [142]. Die Korrelation der Genexpression mit der Methylierung der untersuchten CTCF-Bindungsstellen könnte auf ein verändertes Bindungsverhalten von CTCF an den untersuchten Bindungsstellen und auf eine daraus resultierende Fehlregulation von *NNAT* und *WT1* im WT hinweisen. Eine aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen ist also im WT nicht auf den *IGF2/H19*-Locus begrenzt und könnte zudem von regulatorischer Relevanz für die Gene *NNAT* und *WT1* sein.

6.4.2 Änderung der Chromatinorganisation durch aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen

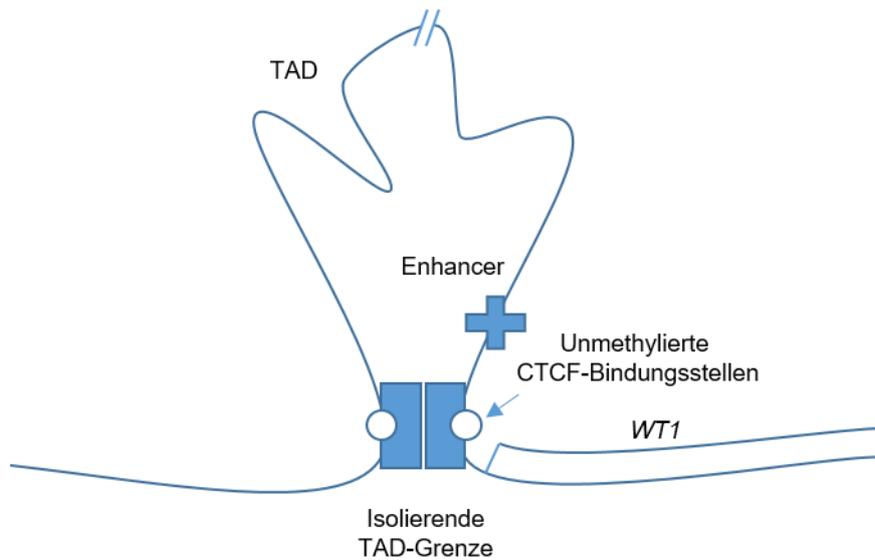
Aktuell werden Störungen in der Chromatinorganisation durch TADs als Faktor in der Krebsentstehung und -progression diskutiert [138], [139], [143], [144]. CTCF ist hier durch die Ausbildung der Chromatinschleifen zur Organisation des Chromatins in TADs maßgeblich involviert [143]. Auch epigenetische Veränderungen können die Chromatinorganisation stören. Beispielsweise kann die Hypermethylierung einer CTCF-Bindungsstelle die Ausbildung einer TAD verhindern. Ebenso kann durch Demethylierung der CTCF-Bindungsstelle die TAD wieder etabliert werden [141], [145]. Letztlich beruht auch der LOI des *IGF2/H19*-Locus auf der Unterbindung der Loop-Bildung zwischen einem an der *H19*-DMR gebundenen CTCF und einem anderen DNA-gebundenen CTCF durch die Methylierung der CTCF-Bindungsstellen der *H19*-DMR [146].

Analog hierzu könnte auch im *WT1*-Locus durch die Hypermethylierung der CTCF-Bindungsstelle im Tumor die Ausbildung eines Chromatinloops verhindert werden. Auf diese Weise könnte *WT1*, wie *IGF2* im Falle eines LOI, Zugriff auf einen, vorher durch den Loop isolierten, Enhancer bekommen und folglich stärker exprimiert werden. Eine ähnliche Konstellation konnte vor Kurzem in Gliomen experimentell nachgewiesen werden. Durch DNA-Methylierung wurde die Bindung von CTCF an einer entsprechenden Bindungsstelle verhindert. In der Folge kam es zur fehlenden Isolierung zwischen zwei benachbarten TADs und dadurch zur aberranten Interaktion zwischen einem Enhancer und einem bekannten Onkogen [145].

Anders als bei *WT1* könnte es sich bei den im *NNAT/BLCAP*-Locus untersuchten Bindungsstellen um eine Subgruppe handeln, die eine Interaktion zwischen einem Promotor und einem Enhancer innerhalb einer TAD vereinfachen. Dementsprechend würde, wie beobachtet, eine Hypomethylierung der CTCF-Bindungsstellen mit einer erhöhten *NNAT*-

Expression einhergehen. Die Rekrutierung eines Enhancers zur Steigerung der *NNAT*-Transkription könnte ein physiologischer Mechanismus in Geweben wie z.B. dem fetalen Gehirn sein, in welchen eine hohe *NNAT*-Aktivität benötigt wird. In anderen Geweben könnte *NNAT* durch Methylierung der CTCF-Bindungsstelle reprimiert werden. So lagen im Kontrollgewebe die drei CpGs, die Teil der Sequenz von sechs der acht CTCF-Bindungsstellen der untersuchten Region sind, hoch methyliert vor (vgl. Abb. 24c). Dass es im Verlauf der Differenzierung zu erheblichen linienspezifischen Veränderungen der DNA-Methylierung kommt, ist bekannt [147]. Eine Modellvorstellung der Mechanismen, welche zur Fehlregulation von *WT1* und *NNAT* führen könnten, zeigen Abb. 30 und 31.

(a) Unmethylierte CTCF-Bindungsstellen im *WT1*-Locus



(b) Methylierte CTCF-Bindungsstellen im *WT1*-Locus

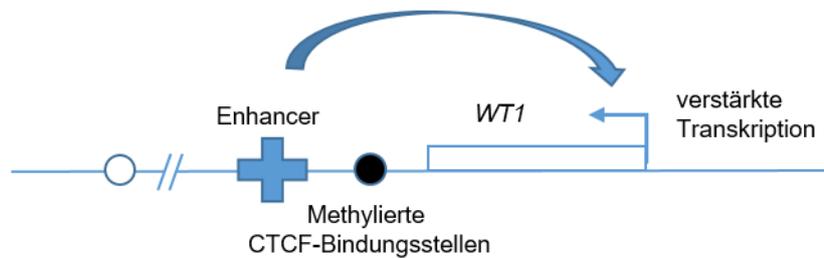
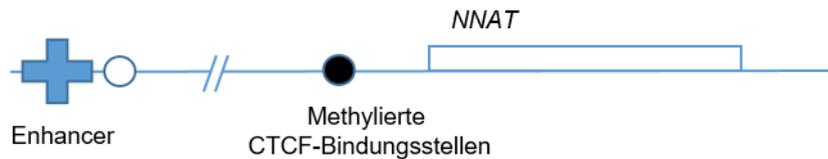


Abb. 30: Modellvorstellung des Mechanismus, wie die Hypermethylierung der CTCF-Bindungsstellen im *WT1*-Locus zur Aktivierung von *WT1* führen könnte

(a) Liegen die CTCF-Bindungsstellen im *WT1*-Locus unmethyliert vor (weißer Kreis), kommt es durch die Dimerisierung von CTCF mit einem anderen DNA-gebundenen CTCF (blau gefüllte Rechtecke) zur Ausbildung einer TAD. Hierdurch wird *WT1* vom Einfluss eines Enhancers (blaues Pluszeichen) isoliert. (b) Liegt die CTCF-Bindungsstelle im *WT1*-Locus methyliert vor (schwarzer Kreis), kann die Bildung der TAD nicht erfolgen. Aufgrund der fehlenden Isolierung wird die *WT1*-Expression durch das Enhancer-Element verstärkt.

(a) Methylierte CTCF-Bindungsstellen im *NNAT/BLCAP*-Locus



(b) Unmethylierte CTCF-Bindungsstellen im *NNAT/BLCAP*-Locus

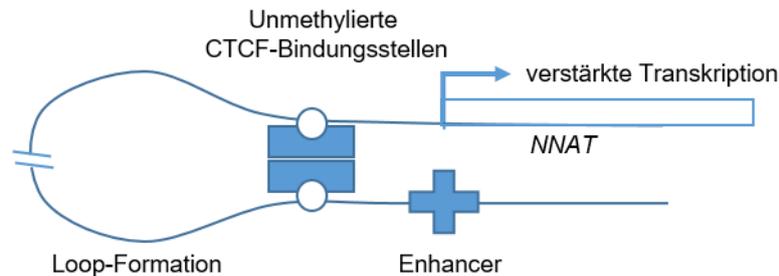


Abb. 31: Modellvorstellung des Mechanismus, wie die Demethylierung der CTCF-Bindungsstellen im *NNAT/BLCAP*-Locus zur Aktivierung von *NNAT* führen könnte

(a) Liegt die CTCF-Bindungsstelle im *NNAT/BLCAP*-Locus methyliert vor (schwarzer Kreis), kann die Ausbildung eines Chromatin-Loops nicht erfolgen. Ein Enhancer-Element (blaues Pluszeichen) liegt daher weit entfernt von *NNAT* und die *NNAT*-Expression ist gering. (b) Liegt die CTCF-Bindungsstelle im *NNAT/BLCAP*-Locus unmethyliert vor (weißer Kreis), kann durch Dimerisierung von CTCF mit einem anderen DNA-gebundenen CTCF (blaue Rechtecke) die Ausbildung eines Chromatinloops erfolgen. Dieser bringt ein Enhancer-Element in die räumliche Nähe von *NNAT*. Es kommt zur verstärkten *NNAT*-Expression.

Anhand der erhobenen Daten kann auf den Einfluss, den die Promotordemethylierung oder die Demethylierung der CTCF-Bindungsstellen auf die *NNAT*-Expression haben, nicht rückgeschlossen werden. Aufschluss könnten Experimente bringen, die z.B. durch das Einbringen einer Mutation die Bindung von CTCF an den untersuchten Bindungsstellen verhindern. Seit Kurzem sind Techniken bekannt, mit denen eine gezielte Methylierung bestimmter DNA-Sequenzen ermöglicht wird. Sowohl Promotoren als auch CTCF-Bindungsstellen konnten so schon erfolgreich methyliert werden [141]. Auch die gezielte Veränderung der Methylierung entweder des Promotors oder der CTCF-Bindungsstellen könnte die Frage nach dem Einfluss der verschiedenen regulatorischen Elemente im Locus auf die *NNAT*-Expression beantworten.

Es stellt sich zudem die Frage, ob die hypomethylierten CTCF-Bindungsstellen und die Hypomethylierung des *NNAT*-Promotors im Tumor einen embryonalen Zustand widerspiegeln, der durch einen Differenzierungsarrest konserviert wird, oder ob es im Verlauf der Tumorgenese zu einer Demethylierung kommt. Anders als z.B. im fetalen Gehirn ist keine

wesentliche Expression von *NNAT* in der fetalen Niere vorhanden. Die *NNAT*-Promotorregion der fetalen Niere weist eine differenzielle Methylierung mit einem gleichen Verhältnis zwischen methylierten und unmethylierten CpGs auf [119]. Dies spricht für eine Demethylierung der regulatorischen Elemente im Verlauf der Tumorgenese.

6.4.3 Veränderung der DNA-Methylierung durch die Bindung von CTCF

Unsere Daten weisen darauf hin, dass es zusätzlich zum *IGF2/H19*-Locus in zwei weiteren untersuchten Regionen durch aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen zur Fehlregulation wichtiger Gene kommt. Dies wirft die Frage auf, ob eine aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen ein generelles Phänomen im WT ist, ähnlich wie es z.B. bei einer Subgruppe von kolorektalen Karzinomen genomweit zur Akkumulation von Punktmutationen in CTCF-Bindungsstellen kommt [148]. In beiden der im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersuchten Regionen, die CTCF-Bindungsstellen enthalten, zeigten sich die ausgeprägtesten Unterschiede in der Methylierung in einem Bereich von ca. 50 bp über drei CpGs hinweg. Dieser Betonung eines bestimmten Bereiches steht ein konstanter Unterschied in der Methylierung, wie er z.B. im *NNAT*-Promotor oder im *MEST*-Promotor erfasst werden konnte, gegenüber. Dies könnte auf sequenzspezifische Vorgänge hinweisen, die zu einer alterierten Methylierung bestimmter CTCF-Bindungsstellen im WT führen.

Über Prozesse, die in malignen Tumoren sequenzspezifisch zur Veränderung der DNA-Methylierung führen, ist wenig bekannt. Jedoch weiß man, dass nicht nur die Bindungsfähigkeit von CTCF durch DNA-Methylierung beeinflusst wird, sondern auch umgekehrt die Bindung von CTCF eine Änderung der DNA-Methylierung bewirken kann. Zum einen kann es nach Bindung von CTCF an die DNA zur Rekrutierung von Enzymen aus der Familie der *Ten-eleven translocation proteins* (TETs) kommen, was eine aktive Demethylierung der DNA zur Folge hat [149], [150]. Zum anderen kann die Bindung von CTCF Schutz vor *de novo* Methylierung während der Zellteilung bieten [151], [152]. Unter welchen Bedingungen es zu Veränderungen der Methylierung durch die Bindung von CTCF kommt, ist bisher weitgehend unklar. Eine Fehlregulation dieser Prozesse könnte zu einer lokalen Hypermethylierung einer physiologisch wenig methylierten CTCF-Bindungsstelle, wie sie im WT am *WT1*-Locus aufgefallen ist, führen. Ebenso ist eine lokale Hypomethylierung von physiologischerweise weitgehend methylierten Bindungsstellen, wie im WT am *NNAT*-Locus beobachtet, vorstellbar.

Zur weiteren Klärung der Frage, inwieweit eine veränderte Methylierung von CTCF-Bindungsstellen zu Störungen der Chromatinorganisation im WT führt, stehen heute eine

Reihe von Methoden auf der Basis von 3C zur Verfügung. So stellt z.B. *Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing* (ChIA-PET) eine Methode dar, mit der genomweit alle Chromatininteraktionen, die von einem bestimmten Protein vermittelt werden, gefunden werden können [153]. Eine solche Analyse bezüglich CTCF-vermittelter Chromatinkontakte könnte Einblicke in die Chromatinorganisation des WT gewähren. Als Kontrollgruppe könnten bereits existierende Daten humaner Zellkulturen [154] oder idealerweise fetales Nierengewebe herangezogen werden. Auf diese Art ließen sich CTCF-Bindungsstellen identifizieren, die in ihrem Verhalten bezüglich der Ausbildung von Chromatinkontakten bzw. Chromatinloops von der Kontrollgruppe abweichen. Mit Hilfe einer quantitativen Methylierungsanalyse könnte dann untersucht werden, ob eine veränderte Methylierung dem abweichenden Bindungsverhalten von CTCF zugrunde liegt.

Zusammengefasst zeigen unsere Daten, dass es neben dem *IGF2/H19*-Locus noch in zwei weiteren Loci zu einer aberranten Methylierung von CTCF-Bindungsstellen im WT kommt. Die Korrelation der Methylierung dieser Regionen mit der Expression von *WT1* und *NNAT* könnte darauf hindeuten, dass dies regulatorische Relevanz hat. Denkbar ist ein verändertes Bindungsverhalten von CTCF an den aberrant methylierten Bindungsstellen, was zu einer Änderung der Chromatin-Konformation führt. Dadurch kann der Kontakt der betroffenen Gene zu Enhancer-Elementen eingeschränkt oder erleichtert werden. Ebendiese Änderungen der CTCF-vermittelten Organisation des Chromatins wurden zuletzt vermehrt in Zusammenhang mit der Entstehung maligner Tumoren gebracht. Möglicherweise handelt es sich bei der aberranten Methylierung von CTCF-Bindungsstellen um ein generelles Phänomen im WT. Das Methylierungsmuster der beiden in dieser Arbeit erstmalig untersuchten Regionen, die CTCF-Bindungsstellen beinhalten, deutet auf eine spezifische Veränderung der Methylierung im Bereich potentieller CTCF-Bindungsstellen hin. Da CTCF Einfluss auf die Methylierung der DNA im Bereich der Bindungsstelle nehmen kann, scheint eine generelle Störung dieser Einflussnahme von CTCF auf die DNA-Methylierung im WT möglich. Die Methylierungsanalyse weiterer CTCF-Bindungsstellen könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit der WT hier generell von alterierter Methylierung betroffen ist.

6.5 Kein Hinweis für eine Rolle des *MEG3/DLK1/RTL1*-Locus in der Tumorgenese des WT

Zwar besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem *IGF2/H19*-Locus und dem *MEG3/DLK1/RTL1*-Locus, jedoch unterscheiden sich die Expressionsmuster beider Loci deutlich voneinander. Während die *H19*-Expression mit zunehmender *IGF2*-Expression im WT

abnimmt, korreliert die Expression von *MEG3*, *DLK1* und *RTL1* stark positiv miteinander. Im Mausmodell kommt es bei einem LOI von *DLK1*, analog zum *IGF2/H19*-Locus, zur *DLK1*-Überexpression und zur Stilllegung der maternal geprägten Gene des Locus, dessen wichtigster Vertreter *MEG3* ist [117]. Die deutlich erhöhte Aktivität von *MEG3* im WT spricht daher gegen einen LOI von *DLK1* im WT. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Astuti et al., die einen LOI von *DLK1* in einem Kollektiv von Neuroblastomen und WT nicht nachweisen konnten [155].

In anderen Tumorentitäten wie z.B. dem Neuroblastom, dem Osteoklastom oder dem Urothelcarcinom konnte eine Hypermethylierung der IG-DMR in Zusammenhang gebracht werden mit einer stark reduzierten Aktivität oder einer Stilllegung von *MEG3* [155]–[157]. Die Analyse der Methylierung der IG-DMR in dieser Arbeit konnte zwar sowohl eine Gruppe von hypermethylierten als auch eine Gruppe von hypomethylierten Tumoren identifizieren, keine dieser Auffälligkeiten korrelierte jedoch mit der Expression der Gene dieses Locus im WT. Es scheinen also andere Mechanismen als die Methylierung der IG-DMR im WT für die erhöhte Aktivität der Gene *DLK1* und *MEG3* verantwortlich zu sein.

Der Verlust der *MEG3*-Expression ist ein häufiges Phänomen in einer Vielzahl maligner Erkrankungen und ist oft mit einer schlechten Prognose assoziiert [158]–[162]. Generell steht in diesem Locus also nicht wie bei *IGF2/H19* der LOI eines geprägten Genes im Vordergrund, sondern der Verlust der Expression des Tumorsuppressors *MEG3*. Dass ein solcher Verlust im WT nicht vorliegt, spricht gegen eine relevante Rolle dieses Locus in der Genese des WT.

Zusammenfassend bietet sich – trotz in manchen Tumoren abweichender Methylierung der IG-DMR – kein Anhalt für eine epigenetische Fehlregulation des *MEG3/DLK1/RTL1*-Locus. Insbesondere ist auch der Tumorsuppressor *MEG3* im WT nicht supprimiert, sodass sich kein Hinweis für eine Relevanz dieses Locus in der Genese des WT ergibt.

6.6 Allgemeine Limitationen der Studie

Als Limitationen der vorliegenden Studie sind insbesondere das monozentrische Design ohne Validierung durch eine externe Kohorte, die begrenzte Größe des Tumorkollektivs sowie die deskriptive Natur der verwendeten Methoden zu nennen. Aufgrund der geringen Inzidenz des Wilms-Tumors stand nur eine begrenzte Anzahl an Tumoren zur Analyse zur Verfügung. Eine Validierung der Ergebnisse an einer unabhängigen Kohorte war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Wegen der Seltenheit der Erkrankung wäre eine solche Validierung im Rahmen

nationaler bzw. internationaler, multizentrischer Tumorstudien wie der SIOP / GPOH-Studie wünschenswert.

In dieser Arbeit konnte in vielen Fällen ein Zusammenhang zwischen verschiedenen untersuchten Größen, wie z.B. der Expression eines untersuchten Gens mit der Methylierung des zugehörigen Promotors, nachgewiesen werden. Aufgrund der rein deskriptiven Natur der durchgeführten Analysen kann aus den Ergebnissen keine Kausalität abgeleitet werden, auch wenn es sich wie im genannten Beispiel einer Promotormethylierung um einen plausiblen und generell akzeptierten Mechanismus handelt. Weitere funktionelle Analysen wären nötig, um eine Kausalität nachzuweisen. Auf spezielle methodische Limitationen, welche insbesondere durch die quantitative Bisulfitsequenzierung via Pyrosequencing bestehen, wird bereits unter Methoden sowie in der Diskussion eingegangen, sofern diese für die Interpretation der Ergebnisse relevant sind.

7 Zusammenfassung

Der Wilms-Tumor (WT) ist der häufigste primäre Nierentumor des Kindesalters. Neben genetischen spielen epigenetische Veränderungen im WT eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. So kommt es durch *de novo* DNA-Methylierung mehrerer CTCF-Bindungsstellen einer *differentially methylated region* (DMR) zur biallelischen Expression des geprägten Genes *IGF2*, dem sogenannten *Loss of imprinting* (LOI). Diese Arbeit hatte zum Ziel, weitere durch veränderte DNA-Methylierung fehlregulierte Gene zu identifizieren, die zur Tumorgenese des WT beitragen könnten.

Es wurden DNA und RNA aus 45 WT eines Tumorkollektivs des Dr. von Haunerschen Kinderspitals isoliert und mittels RT-PCR die mRNA-Expression verschiedener geprägter, gewebsspezifisch geprägter und nicht geprägter Gene untersucht. Bei Genen, die eine auffällige Expression im WT zeigten, wurden weitere Untersuchungen mittels quantitativer Bisulfitsequenzierung via Pyrosequencing angeschlossen.

Auf diese Weise konnte bei 20 % aller Tumoren eine Hypermethylierung einer CTCF-Bindungsstelle im *IGF2/H19*-Locus festgestellt werden. Diese wurden als Tumoren mit LOI oder *Loss of heterozygosity* (LOH) von *IGF2* klassifiziert. Es wurden weitere CTCF-Bindungsstellen identifiziert, deren Methylierung in einer großen Zahl der Tumoren von der des Kontrollgewebes abwich und mit der Expression der entsprechenden Gene *NNAT* und *WT1* korrelierte. Darüber hinaus konnte eine Hypomethylierung der Promotoren der geprägten Gene *MEST* und *NNAT* nachgewiesen werden. Bei *NNAT* korrelierte die Promotormethylierung negativ mit der *NNAT*-Genexpression.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte das geprägte Gen *NNAT* in einem Großteil der WT als epigenetisch fehlreguliert identifiziert werden. Des Weiteren zeigen die Daten, dass eine aberrante Methylierung von CTCF-Bindungsstellen im WT weiter verbreitet ist als bisher angenommen. Die Korrelation der Methylierung dieser Bindungsstellen mit der Expression der entsprechenden Gene legt nahe, dass es wie im *IGF2/H19*-Locus auch hier zur Fehlregulation durch ein verändertes Bindungsverhalten von CTCF an der DNA kommt.

Die in dieser Arbeit neu entdeckten epigenetischen Veränderungen leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis der Vorgänge, die zur Entstehung und zum Progress des WT führen. Es ist zu hoffen, dass in Zukunft durch die weitere Aufklärung dieser Vorgänge Fortschritte in der Diagnose und Therapie dieser kindlichen Krebserkrankung erzielt werden können.

8 Literaturverzeichnis

- [1] N. Jaffe, A. Puri, H. Gelderblom, N. Jaffe, A. Puri, and H. Gelderblom, "Osteosarcoma: Evolution of Treatment Paradigms, Osteosarcoma: Evolution of Treatment Paradigms," *Sarcoma, Sarcoma*, vol. 2013, 2013, p. e203531, May 2013.
- [2] U. Göbel, R. Fischer, and G. Henze, "Von der Therapiestudie zur Qualitätssicherung in der Pädiatrischen Onkologie," *Klinische Pädiatrie*, vol. 209, no. 04, pp. 145–146, Jul. 1997.
- [3] P. Kaatsch and C. Spix, "German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012)." Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, 2013.
- [4] D. A. Haber *et al.*, "An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor," *Cell*, vol. 61, no. 7, pp. 1257–1269, Jun. 1990.
- [5] J. S. Dome and M. J. Coppes, "Recent advances in Wilms tumor genetics," *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 14, no. 1, pp. 5–11, Feb. 2002.
- [6] N. J. Sebire and G. M. Vujanic, "Paediatric renal tumours: recent developments, new entities and pathological features," *Histopathology*, vol. 54, no. 5, pp. 516–528, Apr. 2009.
- [7] R. H. Scott *et al.*, "Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis," *Oncotarget*, vol. 0, no. 3, Mar. 2012.
- [8] A. P. Feinberg, R. Ohlsson, and S. Henikoff, "The epigenetic progenitor origin of human cancer," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 1, pp. 21–33, Jan. 2006.
- [9] S. Rainier, L. A. Johnson, C. J. Dobry, A. J. Ping, P. E. Grundy, and A. P. Feinberg, "Relaxation of imprinted genes in human cancer," *Nature*, vol. 362, no. 6422, pp. 747–749, Apr. 1993.
- [10] M. J. Steenman, S. Rainier, C. J. Dobry, P. Grundy, I. L. Horon, and A. P. Feinberg, "Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour," *Nat. Genet.*, vol. 7, no. 3, pp. 433–439, Jul. 1994.
- [11] A. C. Bell and G. Felsenfeld, "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene," *Nature*, vol. 405, no. 6785, pp. 482–485, May 2000.
- [12] M. N. Rivera and D. A. Haber, "Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 9, pp. 699–712, Sep. 2005.
- [13] E. R. Lawlor and C. J. Thiele, "Epigenetic Changes in Pediatric Solid Tumors: Promising New Targets," *Clin Cancer Res*, vol. 18, no. 10, pp. 2768–2779, May 2012.
- [14] P. Kaatsch, "Epidemiology of childhood cancer," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 36, no. 4, pp. 277–285, Jun. 2010.
- [15] V. Huff, "Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 111–121, Feb. 2011.
- [16] R. Furtwängler *et al.*, "Nephroblastom — Wilms-Tumor," *Der Onkologe*, vol. 11, no. 10, pp. 1077–1089, Oct. 2005.
- [17] M. U. Hentrich, P. Meister, N. G. Brack, L. L. Lutz, and R. C. Hartenstein, "Adult Wilms' tumor. Report of two cases and review of the literature," *Cancer*, vol. 75, no. 2, pp. 545–551, 1995.
- [18] N. E. Breslow *et al.*, "Characteristics and Outcomes of Children With the Wilms Tumor-Aniridia Syndrome: A Report From the National Wilms Tumor Study Group," *JCO*, vol. 21, no. 24, pp. 4579–4585, Dec. 2003.
- [19] A. Drash, F. Sherman, W. H. Hartmann, and R. M. Blizzard, "A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease," *The Journal of Pediatrics*, vol. 76, no. 4, pp. 585–593, Apr. 1970.
- [20] A. Koufos *et al.*, "Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5.," *Am J Hum Genet*, vol. 44, no. 5, pp. 711–719, May 1989.

- [21] R. H. Scott, C. A. Stiller, L. Walker, and N. Rahman, "Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour," *J Med Genet*, vol. 43, no. 9, pp. 705–715, Sep. 2006.
- [22] V. M. Riccardi, E. Sujansky, A. C. Smith, and U. Francke, "Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion," *Pediatrics*, vol. 61, no. 4, pp. 604–610, Apr. 1978.
- [23] K. M. Call *et al.*, "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus," *Cell*, vol. 60, no. 3, pp. 509–520.
- [24] R. Stoll *et al.*, "Structure of the Wilms Tumor Suppressor Protein Zinc Finger Domain Bound to DNA," *Journal of Molecular Biology*, vol. 372, no. 5, pp. 1227–1245, Oktober 2007.
- [25] A. Hammes *et al.*, "Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation," *Cell*, vol. 106, no. 3, pp. 319–329, Aug. 2001.
- [26] E. A. Burwell, G. P. McCarty, L. A. Simpson, K. A. Thompson, and D. M. Loeb, "Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells," *Oncogene*, vol. 26, no. 23, pp. 3423–3430, 2007.
- [27] L. Yang, Y. Han, F. S. Saiz, and M. D. Minden, "A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story," *Leukemia*, vol. 21, no. 5, pp. 868–876, Mar. 2007.
- [28] P. Hohenstein and N. D. Hastie, "The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. suppl 2, pp. R196–R201, Oct. 2006.
- [29] V. Huff, "Wilms tumor genetics," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 79, no. 4, pp. 260–267, 1998.
- [30] A. E. Reeve, S. A. Sih, A. M. Raizis, and A. P. Feinberg, "Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells.," *Mol Cell Biol*, vol. 9, no. 4, pp. 1799–1803, Apr. 1989.
- [31] K. W. Brown, F. Power, B. Moore, A. K. Charles, and K. T. A. Malik, "Frequency and timing of loss of imprinting at 11p13 and 11p15 in Wilms' tumor development," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 7, pp. 1114–1123, Jul. 2008.
- [32] M. B. Leick, C. J. Shoff, and E. C. Wang, "Loss of imprinting of IGF2 and the epigenetic progenitor model of cancer," *Am J Stem Cell*, vol. 1, no. 1, pp. 59–74, Aug. 2012.
- [33] P. Jelinic and P. Shaw, "Loss of imprinting and cancer," *The Journal of Pathology*, vol. 211, no. 3, pp. 261–268, 2007.
- [34] A. T. Hark, C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. Levorse, and S. M. Tilghman, "CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus," *Nature*, vol. 405, no. 6785, pp. 486–489, May 2000.
- [35] M. N. Rivera *et al.*, "An X Chromosome Gene, WTX, Is Commonly Inactivated in Wilms Tumor," *Science*, vol. 315, no. 5812, pp. 642–645, Feb. 2007.
- [36] E. C. Ruteshouser, S. M. Robinson, and V. Huff, "Wilms tumor genetics: Mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors," *Genes Chromosom. Cancer*, vol. 47, no. 6, pp. 461–470, 2008.
- [37] L.-Y. Chao, V. Huff, G. Tomlinson, V. M. Riccardi, L. C. Strong, and G. F. Saunders, "Genetic mosaicism in normal tissues of Wilms' tumour patients," *Nat Genet*, vol. 3, no. 2, pp. 127–131, Feb. 1993.
- [38] A. D. Goldberg, C. D. Allis, and E. Bernstein, "Epigenetics : A landscape takes shape," *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 635–638.
- [39] S. Sharma, T. K. Kelly, and P. A. Jones, "Epigenetics in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2010.
- [40] A. U. Khan, "Histone modifications as key regulators of transcription," *Frontiers in Bioscience*, vol. 10, no. 1–3, p. 866, 2005.
- [41] C. A. Iacobuzio-Donahue, "Epigenetic Changes in Cancer," *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 4, no. 1, pp. 229–249, 2009.

- [42] Y. Wang and F. C. C. Leung, "An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers," *Bioinformatics*, vol. 20, no. 7, pp. 1170–1177, May 2004.
- [43] A. S. Wilson, B. E. Power, and P. L. Molloy, "DNA hypomethylation and human diseases," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1775, no. 1, pp. 138–162, Jan. 2007.
- [44] M. Ehrlich *et al.*, "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.," *Nucleic Acids Res*, vol. 10, no. 8, pp. 2709–2721, Apr. 1982.
- [45] A. Bird, "DNA methylation patterns and epigenetic memory," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 1, pp. 6–21, Jan. 2002.
- [46] G. Prendergast and E. Ziff, "Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region," *Science*, vol. 251, no. 4990, pp. 186–189, Jan. 1991.
- [47] F. Watt and P. L. Molloy, "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter.," *Genes Dev.*, vol. 2, no. 9, pp. 1136–1143, Sep. 1988.
- [48] H. Cedar and Y. Bergman, "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms," *Nat Rev Genet*, vol. 10, no. 5, pp. 295–304, Mai 2009.
- [49] K. Malik and K. Brown, "Epigenetic gene deregulation in cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 83, no. 12, 2000.
- [50] M. Esteller, "CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, pp. 5427–5440, Aug. 2002.
- [51] A. Eden, F. Gaudet, A. Waghmare, and R. Jaenisch, "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation," *Science*, vol. 300, no. 5618, p. 455, Apr. 2003.
- [52] R. Z. Chen, U. Pettersson, C. Beard, L. Jackson-Grusby, and R. Jaenisch, "DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates," *Nature*, vol. 395, no. 6697, pp. 89–93, Sep. 1998.
- [53] F. Gaudet *et al.*, "Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation," *Science*, vol. 300, no. 5618, pp. 489–492, Apr. 2003.
- [54] P. A. Jones and S. B. Baylin, "The fundamental role of epigenetic events in cancer," *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, no. 6, pp. 415–428, Jun. 2002.
- [55] D. G. Burbee *et al.*, "Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, no. 9, pp. 691–699, May 2001.
- [56] M. Esteller *et al.*, "Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 92, no. 7, pp. 564–569, Apr. 2000.
- [57] M. Esteller *et al.*, "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 9, pp. 2368–2371, May 2000.
- [58] I. M. Morison, J. P. Ramsay, and H. G. Spencer, "A census of mammalian imprinting," *Trends in Genetics*, vol. 21, no. 8, pp. 457–465, Aug. 2005.
- [59] "Catalogue of Imprinted Genes and Parent-of-origin Effects in Humans and Animals." [Online]. Available: <http://igc.otago.ac.nz/home.html>. [Accessed: 11-Aug-2016].
- [60] F. M. Smith, A. S. Garfield, and A. Ward, "Regulation of growth and metabolism by imprinted genes," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 113, no. 1–4, pp. 279–291, 2006.
- [61] B. Tycko and I. M. Morison, "Physiological functions of imprinted genes," *J. Cell. Physiol.*, vol. 192, no. 3, pp. 245–258, Sep. 2002.
- [62] J. Walter and M. Paulsen, "The potential role of gene duplications in the evolution of imprinting mechanisms," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, no. suppl 2, pp. R215–R220, Aug. 2003.
- [63] W. Reik and J. Walter, "Genomic imprinting: parental influence on the genome," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 2, no. 1, pp. 21–32, Jan. 2001.

- [64] P. Arnaud, "Genomic imprinting in germ cells: imprints are under control," *Reproduction*, vol. 140, no. 3, pp. 411–423, Sep. 2010.
- [65] R. M. John and L. Lefebvre, "Developmental regulation of somatic imprints," *Differentiation*, vol. 81, no. 5, pp. 270–280, Jun. 2011.
- [66] N. Kikyo *et al.*, "Genetic and functional analysis of neuronatin in mice with maternal or paternal duplication of distal Chr 2," *Dev. Biol.*, vol. 190, no. 1, pp. 66–77, Oct. 1997.
- [67] J. D. Choi *et al.*, "A novel variant of *Inpp5f* is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 13, pp. 5514–5522, Jul. 2005.
- [68] F. Sleutels, R. Zwart, and D. P. Barlow, "The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes," *Nature*, vol. 415, no. 6873, pp. 810–813, Feb. 2002.
- [69] Y. Hao, T. Crenshaw, T. Moulton, E. Newcomb, and B. Tycko, "Tumour-suppressor activity of H19 RNA," *Nature*, vol. 365, no. 6448, pp. 764–767, Oct. 1993.
- [70] C. C. Boissonnas *et al.*, "Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men," *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 18, no. 1, pp. 73–80, Jan. 2010.
- [71] C. Holmgren *et al.*, "CpG methylation regulates the *Igf2/H19* insulator," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 14, pp. 1128–1130, Jul. 2001.
- [72] C. J. Schoenherr, J. M. LeVorse, and S. M. Tilghman, "CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus," *Nat. Genet.*, vol. 33, no. 1, pp. 66–69, Jan. 2003.
- [73] H. Zhang *et al.*, "Interruption of intrachromosomal looping by CCCTC binding factor decoy proteins abrogates genomic imprinting of human insulin-like growth factor II," *J. Cell Biol.*, vol. 193, no. 3, pp. 475–487, May 2011.
- [74] J. L. Thorvaldsen, K. L. Duran, and M. S. Bartolomei, "Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Igf2*," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 23, pp. 3693–3702, Dec. 1998.
- [75] H. Cui *et al.*, "Loss of Imprinting of Insulin-like Growth Factor-II in Wilms' Tumor Commonly Involves Altered Methylation but not Mutations of CTCF or Its Binding Site," *Cancer Res*, vol. 61, no. 13, pp. 4947–4950, Jul. 2001.
- [76] H. Nakagawa, R. B. Chadwick, P. Peltomäki, C. Plass, Y. Nakamura, and A. de la Chapelle, "Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer," *PNAS*, vol. 98, no. 2, pp. 591–596, Jan. 2001.
- [77] P. J. Shetty *et al.*, "Regulation of IGF2 transcript and protein expression by altered methylation in breast cancer," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 137, no. 2, pp. 339–345, Feb. 2011.
- [78] H.-M. Byun, H.-L. Wong, E. A. Birnstein, E. M. Wolff, G. Liang, and A. S. Yang, "Examination of IGF2 and H19 Loss of Imprinting in Bladder Cancer," *Cancer Res*, vol. 67, no. 22, pp. 10753–10758, Nov. 2007.
- [79] S. Douc-Rasy *et al.*, "High incidence of loss of heterozygosity and abnormal imprinting of H19 and IGF2 genes in invasive cervical carcinomas. Uncoupling of H19 and IGF2 expression and biallelic hypomethylation of H19," *Oncogene*, vol. 12, no. 2, pp. 423–430, Jan. 1996.
- [80] M. Kohda *et al.*, "Frequent loss of imprinting of IGF2 and MEST in lung adenocarcinoma," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 31, no. 4, pp. 184–191, 2001.
- [81] I. S. Pedersen *et al.*, "Promoter switch: a novel mechanism causing biallelic PEG1/MEST expression in invasive breast cancer," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, no. 12, pp. 1449–1453, Jun. 2002.
- [82] M.-J. Kang *et al.*, "Loss of Imprinting and Elevated Expression of Wild-Type p73 in Human Gastric Adenocarcinoma," *Clin Cancer Res*, vol. 6, no. 5, pp. 1767–1771, May 2000.
- [83] K. Revill, K. J. Dudley, R. N. Clayton, A. M. McNicol, and W. E. Farrell, "Loss of neuronatin expression is associated with promoter hypermethylation in pituitary adenoma," *Endocr Relat Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 537–548, Jun. 2009.

- [84] B. Dekel *et al.*, "Multiple Imprinted and Stemness Genes Provide a Link between Normal and Tumor Progenitor Cells of the Developing Human Kidney," *Cancer Res*, vol. 66, no. 12, pp. 6040–6049, Jun. 2006.
- [85] J. M. Maris and C. T. Denny, "Focus on embryonal malignancies," *Cancer Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 447–450, Dec. 2002.
- [86] A. P. Aiden *et al.*, "Wilms Tumor Chromatin Profiles Highlight Stem Cell Properties and a Renal Developmental Network," *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 591–602, Jun. 2010.
- [87] C.-M. Li *et al.*, "Gene Expression in Wilms' Tumor Mimics the Earliest Committed Stage in the Metanephric Mesenchymal-Epithelial Transition," *The American Journal of Pathology*, vol. 160, no. 6, p. 2181, Jun. 2002.
- [88] E. M. Klenova *et al.*, "CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 7612–7624, Dec. 1993.
- [89] V. V. Lobanenko *et al.*, "A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene," *Oncogene*, vol. 5, no. 12, pp. 1743–1753, Dec. 1990.
- [90] J. E. Phillips and V. G. Corces, "CTCF: Master Weaver of the Genome," *Cell*, vol. 137, no. 7, pp. 1194–1211, Jun. 2009.
- [91] R. Ohlsson, R. Renkawitz, and V. Lobanenko, "CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease," *Trends Genet.*, vol. 17, no. 9, pp. 520–527, Sep. 2001.
- [92] L.-B. Wan *et al.*, "Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development," *Development*, vol. 135, no. 16, pp. 2729–2738, Aug. 2008.
- [93] T. H. Kim *et al.*, "Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF binding sites in the human genome," *Cell*, vol. 128, no. 6, pp. 1231–1245, Mar. 2007.
- [94] A. Mathelier *et al.*, "JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles," *Nucl. Acids Res.*, p. gkt997, Nov. 2013.
- [95] T. M. Yusufzai, H. Tagami, Y. Nakatani, and G. Felsenfeld, "CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species," *Mol. Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 291–298, Jan. 2004.
- [96] C. Hou, H. Zhao, K. Tanimoto, and A. Dean, "CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, no. 51, pp. 20398–20403, Dec. 2008.
- [97] T. Li *et al.*, "CTCF regulates allelic expression of Igf2 by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 20, pp. 6473–6482, Oct. 2008.
- [98] T. Moulton *et al.*, "Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients," *Nat. Genet.*, vol. 7, no. 3, pp. 440–447, Jul. 1994.
- [99] J. de Kraker *et al.*, "Reduction of postoperative chemotherapy in children with stage I intermediate-risk and anaplastic Wilms' tumour (SIOP 93-01 trial): a randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 364, no. 9441, pp. 1229–1235, 2.
- [100] M. Frommer *et al.*, "A Genomic Sequencing Protocol That Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands," *PNAS*, vol. 89, no. 5, pp. 1827–1831, Mar. 1992.
- [101] S. J. Clark, J. Harrison, C. L. Paul, and M. Frommer, "High sensitivity mapping of methylated cytosines," *Nucleic Acids Res*, vol. 22, no. 15, pp. 2990–2997, Aug. 1994.
- [102] M. Ronaghi, M. Uhlén, and P. Nyérén, "A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate," *Science*, vol. 281, no. 5375, pp. 363–365, Jul. 1998.
- [103] J.-M. Dupont, J. Tost, H. Jammes, and I. G. Gut, "De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology," *Analytical Biochemistry*, vol. 333, no. 1, pp. 119–127, Oktober 2004.

- [104]J. Tost and I. G. Gut, "DNA methylation analysis by pyrosequencing," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 9, pp. 2265–2275, 2007.
- [105]T. Mikeska, I. L. Candiloro, and A. Dobrovic, "The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation," *Epigenomics*, vol. 2, no. 4, pp. 561–573, Aug. 2010.
- [106]M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR," *Nucl. Acids Res.*, vol. 29, no. 9, pp. e45–e45, May 2001.
- [107]A. Méreau *et al.*, "Analysis of splicing patterns by pyrosequencing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 19, p. e126, Oct. 2009.
- [108]Hubertus, "Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors," *Oncology Reports*, vol. 25, no. 3, Mar. 2011.
- [109]I. Gromova, P. Gromov, and J. E. Celis, "Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure," *ELECTROPHORESIS*, vol. 20, no. 2, pp. 241–248, 1999.
- [110]Z. Zuo, M. Zhao, J. Liu, G. Gao, and X. Wu, "Functional Analysis of Bladder Cancer-Related Protein Gene: A Putative Cervical Cancer Tumor Suppressor Gene in Cervical Carcinoma," *Tumor Biology*, vol. 27, no. 4, pp. 221–226, 2006.
- [111]R. Schulz *et al.*, "Transcript- and tissue-specific imprinting of a tumour suppressor gene," *Hum Mol Genet*, vol. 18, no. 1, pp. 118–127, Jan. 2009.
- [112]D. Astuti *et al.*, "RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours," *Oncogene*, vol. 20, no. 51, pp. 7573–7577, Nov. 2001.
- [113]K. Horiguchi *et al.*, "Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors," *Oncogene*, vol. 22, no. 49, pp. 7862–7865, 2003.
- [114]P. Flicek *et al.*, "Ensembl 2014," *Nucleic Acids Research*, vol. 42, no. D1, pp. D749–D755, Jan. 2014.
- [115]L. Lefebvre, S. Viville, S. C. Barton, F. Ishino, and M. A. Surani, "Genomic Structure and Parent-of-Origin-Specific Methylation of Peg1," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 6, no. 11, pp. 1907–1915, Oct. 1997.
- [116]D. Takai, F. A. Gonzales, Y. C. Tsai, M. J. Thayer, and P. A. Jones, "Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 10, no. 23, pp. 2619–2626, Nov. 2001.
- [117]S.-P. Lin *et al.*, "Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12," *Nature Genetics*, vol. 35, no. 1, pp. 97–102, Aug. 2003.
- [118]M. Kagami *et al.*, "The IG-DMR and the MEG3-DMR at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers," *PLoS Genet*, vol. 6, no. 6, Jun. 2010.
- [119]H. K. Evans, A. A. Wylie, S. K. Murphy, and R. L. Jirtle, "The neuronatin gene resides in a 'micro-imprinted' domain on human chromosome 20q11.2," *Genomics*, vol. 77, no. 1–2, pp. 99–104, Sep. 2001.
- [120]Y. Jinno *et al.*, "Mosaic and polymorphic imprinting of the WT1 gene in humans," *Nat. Genet.*, vol. 6, no. 3, pp. 305–309, Mar. 1994.
- [121]B. Klamt *et al.*, "Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 7, no. 4, pp. 709–714, Apr. 1998.
- [122]K. J. Reidy and N. D. Rosenblum, "Cell and Molecular Biology of Kidney Development," *Seminars in Nephrology*, vol. 29, no. 4, pp. 321–337, Jul. 2009.
- [123]P. Hohenstein, K. Pritchard-Jones, and J. Charlton, "The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors," *ResearchGate*, vol. 29, no. 5, pp. 467–482, Mar. 2015.

- [124]J. Charlton *et al.*, “Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour,” *Genome Medicine*, vol. 7, p. 11, 2015.
- [125]R. Riclet *et al.*, “Disruption of the Interaction between Transcriptional Intermediary Factor 1 β and Heterochromatin Protein 1 Leads to a Switch from DNA Hyper- to Hypomethylation and H3K9 to H3K27 Trimethylation on the MEST Promoter Correlating with Gene Reactivation,” *Mol Biol Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 296–305, Jan. 2009.
- [126]M. Higashi *et al.*, “High Expressions of Neuronatin Isoforms in Favorable Neuroblastoma:,” *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, vol. 29, no. 8, pp. 551–556, Aug. 2007.
- [127]S. J. Kuerbitz, J. Pahys, A. Wilson, N. Compitello, and T. A. Gray, “Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia,” *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 4, pp. 559–564, Apr. 2002.
- [128]I.-M. Siu *et al.*, “Coexpression of neuronatin splice forms promotes medulloblastoma growth,” *Neuro Oncol*, vol. 10, no. 5, pp. 716–724, Oct. 2008.
- [129]P. M. Pitale, W. Howse, and M. Gorbatyuk, “Neuronatin Protein in Health and Disease,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, no. 3, pp. 477–481, März 2017.
- [130]J. Yang *et al.*, “Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer,” *Oncogenesis*, vol. 4, p. e158, Jun. 2015.
- [131]T. Uchihara *et al.*, “Neuronatin Expression and Its Clinicopathological Significance in Pulmonary Non-small Cell Carcinoma:,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 2, no. 9, pp. 796–801, Sep. 2007.
- [132]D. S. Xu *et al.*, “Neuronatin in a Subset of Glioblastoma Multiforme Tumor Progenitor Cells Is Associated with Increased Cell Proliferation and Shorter Patient Survival,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, p. e37811, Mai 2012.
- [133]T. M. Holm, L. Jackson-Grusby, T. Brambrink, Y. Yamada, W. M. Rideout, and R. Jaenisch, “Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice,” *Cancer Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 275–285, Oct. 2005.
- [134]K. Okamoto, I. M. Morison, T. Taniguchi, and A. E. Reeve, “Epigenetic changes at the insulin-like growth factor II/H19 locus in developing kidney is an early event in Wilms tumorigenesis,” *PNAS*, vol. 94, no. 10, pp. 5367–5371, May 1997.
- [135]M. A. E. Frevel, S. J. Sowerby, G. B. Petersen, and A. E. Reeve, “Methylation Sequencing Analysis Refines the Region of H19 Epimutation in Wilms Tumor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 41, pp. 29331–29340, Oct. 1999.
- [136]M. J. Rowley and V. G. Corces, “The three-dimensional genome: principles and roles of long-distance interactions,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 40, pp. 8–14, Jun. 2016.
- [137]C.-T. Ong and V. G. Corces, “CTCF: An Architectural Protein Bridging Genome Topology and Function,” *Nat Rev Genet*, vol. 15, no. 4, pp. 234–246, Apr. 2014.
- [138]D. Hnisz, D. S. Day, and R. A. Young, “Insulated Neighborhoods: Structural and Functional Units of Mammalian Gene Control,” *Cell*, vol. 167, no. 5, pp. 1188–1200, Nov. 2016.
- [139]S. Zhou, A. E. Treloar, and M. Lupien, “Emergence of The Noncoding Cancer Genome: A Target of Genetic and Epigenetic Alterations,” *ResearchGate*, vol. 6, no. 11, pp. 1215–1229, Nov. 2016.
- [140]M. Renda *et al.*, “Critical DNA Binding Interactions of the Insulator Protein CTCF A SMALL NUMBER OF ZINC FINGERS MEDIATE STRONG BINDING, AND A SINGLE FINGER-DNA INTERACTION CONTROLS BINDING AT IMPRINTED LOCI,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 46, pp. 33336–33345, Nov. 2007.
- [141]X. S. Liu *et al.*, “Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome,” *Cell*, vol. 167, no. 1, p. 233–247.e17, Sep. 2016.
- [142]J. Xu *et al.*, “CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 120, no. 3, pp. 593–601, Apr. 2010.

- [143]M. R. Corces and V. G. Corces, "The three-dimensional cancer genome," *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 36, pp. 1–7, Feb. 2016.
- [144]A. Kazanets, T. Shorstova, K. Hilmi, M. Marques, and M. Witcher, "Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1865, no. 2, pp. 275–288, Apr. 2016.
- [145]W. A. Flavahan *et al.*, "Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas," *Nature*, vol. 529, no. 7584, pp. 110–114, Jan. 2016.
- [146]M. M. Franco, A. R. Prickett, and R. J. Oakey, "The Role of CCCTC-Binding Factor (CTCF) in Genomic Imprinting, Development, and Reproduction," *Biol Reprod*, vol. 91, no. 5, p. 125, Nov. 2014.
- [147]Roadmap Epigenomics Consortium *et al.*, "Integrative analysis of 111 reference human epigenomes," *Nature*, vol. 518, no. 7539, pp. 317–330, Feb. 2015.
- [148]R. Katainen *et al.*, "CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer," *Nat Genet*, vol. 47, no. 7, pp. 818–821, Jul. 2015.
- [149]H. Zhu, G. Wang, and J. Qian, "Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation," *Nat Rev Genet*, vol. 17, no. 9, pp. 551–565, Sep. 2016.
- [150]M. B. Stadler *et al.*, "DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions," *Nature*, vol. 480, no. 7378, pp. 490–495, Dezember 2011.
- [151]A. M. Fedoriw, P. Stein, P. Svoboda, R. M. Schultz, and M. S. Bartolomei, "Transgenic RNAi Reveals Essential Function for CTCF in H19 Gene Imprinting," *Science*, vol. 303, no. 5655, pp. 238–240, Jan. 2004.
- [152]E. Rand, I. Ben-Porath, I. Keshet, and H. Cedar, "CTCF elements direct allele-specific undermethylation at the imprinted H19 locus," *Curr. Biol.*, vol. 14, no. 11, pp. 1007–1012, Jun. 2004.
- [153]M. J. Fullwood and Y. Ruan, "ChIP-based methods for the identification of long-range chromatin interactions," *J Cell Biochem*, vol. 107, no. 1, pp. 30–39, May 2009.
- [154]Z. Tang *et al.*, "CTCF-Mediated Human 3D Genome Architecture Reveals Chromatin Topology for Transcription," *Cell*, vol. 163, no. 7, pp. 1611–1627, Dec. 2015.
- [155]D. Astuti *et al.*, "Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour," *Br J Cancer*, vol. 92, no. 8, pp. 1574–1580, März 2005.
- [156]B. Lehner, P. Kunz, H. Saehr, and J. Fellenberg, "Epigenetic silencing of genes and microRNAs within the imprinted Dlk1-Dio3 region at human chromosome 14.32 in giant cell tumor of bone," *BMC Cancer*, vol. 14, p. 495, 2014.
- [157]A. Greife, J. Knievel, T. Ribarska, G. Niegisch, and W. A. Schulz, "Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma," *Clinical Epigenetics*, vol. 6, p. 29, 2014.
- [158]L. Benetatos, G. Vartholomatos, and E. Hatzimichael, "MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis," *Int. J. Cancer*, vol. 129, no. 4, pp. 773–779, 2011.
- [159]Y. Zhou, X. Zhang, and A. Klibanski, "MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor," *J Mol Endocrinol*, vol. 48, no. 3, pp. R45–R53, Jun. 2012.
- [160]Y. Gao and X. Lu, "Decreased expression of MEG3 contributes to retinoblastoma progression and affects retinoblastoma cell growth by regulating the activity of Wnt/ β -catenin pathway," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 2, pp. 1461–1469, Feb. 2016.
- [161]W. Peng *et al.*, "Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate gastric cancer progression," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 34, p. 79, 2015.
- [162]J. Liu *et al.*, "The Long Noncoding RNA MEG3 Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung Adenocarcinoma," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0114586, May 2015.

9 Wissenschaftliche Beiträge

9.1 Tagungsbeiträge

- Vortrag im Rahmen der XXIV. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede, Lüneburger Heide, Juni 2011.
F. Zitzmann, D. von Schweinitz, J. Müller-Höcker, R. Kappler, and J. Hubertus (2011) The role of DNA methylation at CTCF binding sites in the regulation of WT1 and NNAT in Wilms tumor, *Klin. Päd.*, vol. 223, no. 3, p. 198

9.2 Publikationen

- J. Hubertus, F. Zitzmann, F. Trippel, J. Müller-Höcker, M. Stehr, D. von Schweinitz, and R. Kappler (2013) Selective Methylation of CpGs at Regulatory Binding Sites Controls NNAT Expression in Wilms Tumors, *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, p. e67605
- F. Zitzmann, D. Mayr, M. Berger, M. Stehr, D. von Schweinitz, R. Kappler, and J. Hubertus (2014) Frequent hypermethylation of a CTCF binding site influences Wilms tumor 1 expression in Wilms tumors, *Oncol. Rep.*, vol. 31, no. 4, pp. 1871–1876

10 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Hauner'schen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in den kinderchirurgischen Forschungslaboratorien durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Kappler und bei meinem Betreuer PD Dr. med. Jochen Hubertus bedanken, die mir jederzeit und mit großer fachlicher Kompetenz zur Seite standen. Insbesondere die große Geduld, die mir von allen Seiten entgegengebracht wurde, trug letztlich zum erfolgreichen Abschluss meiner Promotion bei. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker, Institut für Pathologie der LMU München, für die histologische Klassifikation der Tumorproben. Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen Shiva Promoli, Nicole Standler und Anett Domokos bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung in jeder Lebenssituation. Abschließend gilt mein Dank ganz besonders meiner Verlobten Dr. med. Esther Rosenkranz für all die klugen Ratschläge, die mir halfen, diese Arbeit in diese endgültige Form zu bringen.

Eidesstattliche Versicherung

Rosenkranz, geb. Zitzmann, Ferdinand Andreas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle epigenetisch regulierter Gene im Wilms-Tumor

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 20.07.2018

Ort, Datum

Ferdinand Andreas Rosenkranz

Unterschrift Doktorandin/Doktorand