

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Marx)

Differentielle Expression und epigenetische Regulation des
Insulinähnlichen Wachstumsfaktors 2 (IGF2) im humanen
Prostatakarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Tobias Gutting

aus
Bad Dürkheim

2018

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr Prof. Dr. med. Alexander Marx

Für Elisabeth.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Das Prostatakarzinom	4
1.1.1 Epidemiologie und Screening	4
1.1.2 Ätiologie und Pathologie	5
1.1.3 Klinische und Histopathologische Einteilung	6
1.1.4 Die Therapie	9
1.2 Funktionen und Mechanismen der Epigenetik.....	10
1.2.1 Einführendes zur Epigenetik.....	10
1.2.2 DNA-Methylierung	11
1.2.3 Imprinting – Vorkommen und Funktion	13
1.2.4 Epigenetik und Krankheit.....	13
1.3 Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 2 (IGF2)	14
1.3.1 Regulation	15
1.3.2 Die Bedeutung und Wirkung von IGF2	18
1.3.3 Transduktion und intrazelluläre Signalwege	19
1.3.4 IGF2 und Krebs	20
1.4 microRNA	20
1.4.1 microRNA und Krankheit	21
1.4.2 microRNA--675.....	22
1.5 Das Zinkfinger-Protein CTCF	22
1.6 Das Retinoblastom-Protein.....	23
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Geräte.....	25

2.1.2	Einzelne Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.3	Kits.....	28
2.1.4	Patientenproben und Zelllinien	28
2.1.5	Die Primersequenzen	30
2.1.6	Datenbanken	35
2.2	Methoden	35
2.2.1	Die Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	35
2.2.2	Die Bestimmung des Imprintings von <i>IGF2</i>	37
2.2.3	Die Genexpressionsanalyse mit quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR	39
2.2.4	Die Bestimmung der microRNA miR-675	41
2.2.5	Die Bestimmung der Promotoraktivität von <i>IGF2</i>	43
2.2.6	Bestimmung von Proteinkonzentrationen und IGF2-ELISA	44
2.2.7	Die Methylierungsanalyse.....	46
2.2.8	Statistische Methoden	55
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Screening auf Apa1-SNP und Imprinting.....	57
3.1.1	Verteilung des SNP	57
3.1.2	Verteilung von LOI und ROI.....	57
3.1.3	Korrelation des Imprinting-Status mit klinischen Parametern	59
3.2	Genexpressionsanalysen und miRNA-Expression	59
3.2.1	Die <i>IGF2</i> -Expression und Korrelation zu klinischen Daten	59
3.2.2	Die Expression von <i>IGF2</i> in Abhängigkeit von Imprinting und Dignität..	63
3.2.3	<i>CTCF</i> -Expression	65
3.2.4	Korrelation zwischen <i>IGF2</i> und <i>CTCF</i>	67
3.2.5	miR-675-Expression	68
3.2.6	<i>RB</i> -Expression.....	69
3.3	Aktivität der einzelnen Promotoren und deren Korrelation zur Genexpression	70
3.3.1	Vergleich der Aktivität der einzelnen Promotoren untereinander	71
3.3.2	Promotor 1	73
3.3.3	Promotor 2.....	74
3.3.4	Promotor 3.....	75
3.3.5	Promotor 4.....	75

3.3.6	Korrelation der <i>IGF2</i> -Expression zur Promotoraktivität.....	76
3.4	Proteinkonzentrationen im Gewebe.....	79
3.5	Promotormethylierung	81
3.5.1	Semiquantitative Auswertung per Methylierungsspezifischer PCR (MSP)	81
3.5.2	Quantifizierung mit Pyrosequenzierung	88
3.5.3	Vergleich der Promotormethylierung untereinander und Korrelation zur Promotoraktivität und <i>IGF2</i> -Expression.....	98
3.6	Methylierung der CTCF-Bindungsstelle 6 (CTCF BS6)	104
3.6.1	Vergleich LOI mit ROI.....	105
3.6.2	Vergleich Tumor- gegen Normalgewebe	106
4	DISKUSSION	108
4.1	Die Expression und Regulation von <i>IGF2</i> und die Korrelation zu Expression von CTCF, miR-675 und <i>RB</i>	108
4.1.1	Die Expression von <i>IGF2</i> und dessen Kontrolle durch Promotormethylierung	108
4.1.2	Die Kontrolle der Expression durch Imprinting.....	110
4.1.3	Die epigenetisch unabhängigen Transkriptionseinflüsse	111
4.1.4	CTCF – Expression und Korrelation zu <i>IGF2</i>	112
4.1.5	miR-675 – Expression und Korrelation zu <i>IGF2</i> und <i>RB</i>	112
4.1.6	<i>RB</i> – Expression und Korrelation zu miR-675	113
4.2	Die Bedeutung von LOI	114
4.3	Das <i>IGF2 Enhancer-Competitor</i> -Modell und Kontrolle des Imprintings	115
4.4	Klinische Implikationen, Schlussfolgerungen und Ausblicke	117
4.5	Limitationen der Studie.....	120
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	122
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	124
7	ANHANG	137
8	LEBENS LAUF	138

9 DANKSAGUNG..... 140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BS	Bindungsstelle (<i>engl.: Binding site</i>)
C	Cytosin
CBS6	CTCF-Bindungsstelle 6 (<i>engl.: binding site 6</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.: complementary DNA</i>)
CI-MPR	<i>engl.: Cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
Ct	Zyklus-Schwellenwert (<i>engl.: cycle threshold</i>)
DMR	Differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: Deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
ELISA	<i>engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
for	Vorwärtsgerichtet (<i>engl.: forward</i>)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
G	Guanosin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSTP1	Glutathion-S-Transferase P
H ₂ O	Wasser
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
ICR	Imprinting-Kontrollregion (<i>engl.: Imprinting control region</i>)
IGF1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (<i>engl.: Insulin-like growth factor</i>)
IGF2	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2 (<i>engl.: Insulin-like growth factor</i>)
IGF-1R	IGF-Rezeptor 1

IGF-2R	IGF-Rezeptor 2
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
INSR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
ISUP	Internationale Gesellschaft für urologische Pathologie (<i>engl.: International Society of Urological Pathology</i>)
kDNA	konvertierte DNA
KRK	Kolorektales Karzinom
LOH	Verlust der Heterozygotie (<i>engl.: Loss of heterocycosity</i>)
LOI	Verlust der genomischen Prägung (<i>engl.: Loss of Imprinting</i>)
LVI	Lymphovaskuläre Invasion
M	Methyliert
MBD	Methyl-CpG-Bindeproteine
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miRNA	microRNA (RNA s.u.)
ml	Milliliter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mMol	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (<i>engl.: messenger RNA</i>)
MSP	Methylierungsspezifische PCR
N	Normalgewebe
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTC	Negativkontrolle
P1, P2, P3, P4	Promotor 1, 2, 3, 4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.: Phosphate-buffered saline</i>)
PCA	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.: Polymerase chain reaction</i>)
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie

pMol	Picomolar
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR
RB	Retinoblastom-Protein
rev	Rückwärtsgerichtet (<i>engl.: reverse</i>)
RFC	Relative differentielle Genexpression (<i>engl.: Relative fold change</i>)
RISC	<i>engl.: RNA-induced silencer complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.: Ribonucleic acid</i>)
ROI	Intakte genomische Prägung (<i>engl.: Retention of Imprinting</i>)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEM	Durchschnittliche absolute Abweichung vom Mittelwert (<i>engl.: Standard error of the mean</i>)
seq	Sequenz
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single-nucleotide polymorphism)
T	Tumorgewebe
T	Thymin
Ta	Annealing-Temperatur
U	Unmethyliert
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	Nicht-translatierte Region (<i>engl.: Untranslated region</i>)

Die beiden Abkürzungen „T“ und „U“ wurden jeweils für zwei verschiedene Begriffe genutzt. Nach Ansicht des Autors ist aus dem jeweiligen Kontext jedoch zweifelsfrei ersichtlich, welche Bedeutung gemeint ist. Zudem ist die entsprechende Verwendung der Abkürzung auch international üblich, weshalb keine abweichende Abkürzung eingeführt wurde.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Screening

Aus dem Atlas der „Gemeinschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland“, kurz GEKID, geht hervor, dass 2014 in Deutschland bei 57.732 Männern ein Prostatakarzinom (PCA) neu diagnostiziert wurde [1]. Das bedeutet, dass das PCA ca. 25% aller neu diagnostizierten Malignome in der männlichen Bevölkerung ausmacht. Am PCA verstarben 2014 12.957 Patienten [1]. Diese Zahlen allein verdeutlichen die große Bedeutung dieser Entität.

Aus den Daten der GEKID sowie des Robert-Koch-Institutes [2] geht weiterhin hervor, dass in den letzten 20 Jahren die Inzidenz stark angestiegen ist. Für diese Tatsache sind keine evidenten Gründe bekannt, es mag aber daran liegen, dass seit der Einführung des Prostataspezifischen-Antigen(PSA)-Tests die Anzahl der Neudiagnosen gestiegen ist [3]. Weiterhin ist allgemein anerkannt, dass in einer alternden Gesellschaft insgesamt die Inzidenz an Krebsneuerkrankungen steigen wird. Interessanterweise ist der Nutzen des PSA-Screenings immer noch nicht gesichert. Ein Problem des PSA ist, dass es zwar prostataspezifisch, nicht aber prostatakarzinomspezifisch ist. Eine große amerikanische Studie kam zu dem Ergebnis, dass ein bevölkerungsweites PSA-Screening keine oder nur sehr geringe Effekte auf die Mortalität des PCA hat und in manchen Fällen sogar überflüssige und schädliche Behandlungen zur Folge haben kann [4]. Bereits vor einigen Jahren wurde eine Studie veröffentlicht, die keine Vorteile einer Operation eines beim PSA-Screening entdeckten Tumors gegenüber einer abwartenden Behandlung zeigte [5]. Dennoch spielt es in der klinischen Anwendung weiterhin eine große Rolle, so ist es nach der aktuellen S3-Leitlinie gemeinsam mit dem Gleason-Score und der TNM-Klassifikation weiterhin Bestandteil der Risikoeinschätzung bei lokal beschränkten Tumoren und der Rezidiverkennung [6].

Ein weiterer Screening-Parameter ist PCA3, ein Gen, dessen Transkript zu nichtcodierender RNA prozessiert wird. PCA3 zeigte sich als weniger sensitiver, jedoch spezifischerer Marker für das Vorhandensein eines Prostatakarzinoms [7, 8]. Die klinische Signifikanz einer routinemäßigen Bestimmung von PCA3 ist jedoch nach Übersicht der Evidenzdaten bisher nicht gegeben [9], eine aktuelle Kosten-Nutzen-

Analyse bezweifelt die gesundheitsökonomische Sinnhaftigkeit des Einsatzes von PCA3 für populationsbasierte Screening [10].

Insgesamt wird weiterhin kontrovers diskutiert, welche Effekte ein Screening auf Prostatakarzinom auf die Gesamtmortalität und Lebensqualität hat [11, 12].

Ein Ausweg aus diesem Dilemma wären neue, robuste Prädiktoren, die bei neu diagnostizierten Karzinomen das Risiko weiter stratifizieren könnten, um dann so eine zielgerichtete Therapie zu planen oder vorweg die Diagnose des Karzinoms zu erleichtern.

1.1.2 Ätiologie und Pathologie

Wie bei anderen Krebsarten zählen auch beim PCA Alter, genetische Disposition wie gehäuftes familiäres Auftreten und Umwelteinflüsse wie Ernährung zu den bekannten Risikofaktoren. Ungefähr drei Viertel der Fälle treten bei Männern über 65 Jahren auf. Altersabhängigkeit von Tumoren könnte das Resultat von Anhäufungen von DNA-Schäden sein [13]. Auch epigenetische Veränderungen mehren sich im Alter [14, 15]. Das Prostatakarzinom zeigt sich wie viele andere Malignome auch als molekular sehr heterogen. Eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Veränderungen wurde beschrieben [19, 20]. So wurden in 17 verschiedenen Zelllinien, alle originär aus einem PCA, sehr heterogene zytogenetische und genetische Veränderungen gefunden [21]. Die bedeutendste epigenetische Veränderung scheint die Promotor-Hypermethylierung der Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) zu sein [22]. Dieses Enzym gehört zur Gruppe der Glutathiontransferasen, die eine wichtige Rolle bei der Entgiftung und beim Schutz vor oxidativem Stress spielen [23]. Eine aktuelle Publikation teilt das PCA in sieben molekulare Subtypen ein, die durch charakteristische prädominante genetische und epigenetische Veränderungen definiert werden. Aber auch innerhalb dieser Subtypen zeigen sich noch große Heterogenitäten, auch zeigte sich ein Teil der Karzinome als genetisch so variabel, dass sie keinem der Subtypen zugeordnet werden konnten [16]. Als Vorläuferläsionen gelten wie bei anderen Karzinomen intraepitheliale Neoplasien, in diesem Fall die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN). Die hochgradige intraepitheliale Neoplasie gilt als einzig anerkannte Vorläuferläsion [17]. Die meisten Patienten mit high-grade PIN entwickeln in den folgenden zehn Jahren ein PCA [18].

Als weithin anerkannt gilt die Tatsache der Abhängigkeit des Prostatakarzinoms von Androgenen als Wachstumsfaktor [24, 25], was sich auch in der Therapie fortgeschrittener Karzinome mit anti-androgenen Medikamenten widerspiegelt.

Ein großer Risikofaktor ist die ethnische Herkunft, so haben Männer aus dem asiatischen Raum und Nordafrika ein deutlich niedrigeres Risiko als Männer aus Europa, Nordamerika oder Ozeanien [26]. Genetische Studien liefern Hinweise auf eine unterschiedliche Frequenz an Polymorphismen von Genen in den oben genannten Populationen, die mit der Entwicklung von PCA in Verbindung gebracht werden, so zum Beispiel Gene für die Androgensynthese und Androgenrezeptoren [27]. Die Tatsache, dass Männer gleicher ethnischer Herkunft in Ländern mit unterschiedlicher Ernährungskultur ein Erkrankungsrisiko aufweisen, das dem der einheimischen Population annähernd gleicht, betont jedoch auch die Rolle soziokultureller Einflussgrößen, v.a. der Ernährung [28, 29]. Größere, prospektive Studien zum Einfluss bestimmter Nahrungsmittel bzw. Nahrungsergänzungsmittel stehen noch aus. Ein zunehmendes Augenmerk richtet sich auch auf die Rolle inflammatorischer Prozesse in der Entwicklung des PCA [30], sodass zusammenfassend von genetischen, sozio-kulturellen und metabolisch-inflammatorischen Einflüssen auf die Karzinogenese des PCA ausgegangen werden kann.

Weit über 95% der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome, also drüsig differenzierte Tumoren. Das Wachstum des PCA erfolgt zu über 80% in den dorsal gelegenen Abschnitten der äußeren Prostatazone, der größte Teil der restlichen Karzinome entspringt der periurethralen Mantelzone; es ist häufig multifokal [31].

Zu den seltenen anderen Tumoren zählen u.a. kleinzellige Karzinome, Sarkome, Plattenepithelkarzinome und Urothelkarzinome [32].

Die Metastasierung erfolgt zunächst lymphogen in regionäre Lymphknoten, später auch hämatogen. Hier sind v.a. Knochenmetastasen mit einer typischen Verteilung der Metastasierung in Wirbelsäule, Becken, Rippen und rumpfnahen Knochen zu nennen, gegebenenfalls kann es aber auch zu Metastasen im Hirn, der Lunge oder der Leber kommen.

1.1.3 Klinische und Histopathologische Einteilung

1.1.3.1 Die TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation ist eine durch die „*Union internationale contre le cancer*“, einer internationalen Organisation mit Sitz in der Schweiz geführte Klassifikation zur Einteilung maligner Tumore. Die TNM-Formel teilt sich auf in T für die Beschreibung des Primärtumors, N für die Anzahl der betroffenen regionären Lymphknoten/Lymphknotenstationen (N für *Nodus lymphaticus*) und M für das Vorhandensein von Fernmetastasen. Lymphknotenmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten gelten hierbei als Fernmetastasen. T unterteilt sich weiter in T1-4, wobei die genauere Unterteilung vom spezifischen Tumortyp abhängt (so gelten für Tumoren in Hohlorganen andere Regeln als für Tumoren in parenchymatösen Organen). N wird ebenfalls in Abhängigkeit des Primärtumors in N1-3 unterteilt, während für die M-Kategorie lediglich zwischen M0 (keine Fernmetastasen) und M1 (Fernmetastasen) unterschieden wird. Durch verschiedene Suffixe kann weiter angegeben werden, ob die TNM-Formel basierend auf bildgebenden und klinischen Befunden (cTNM) oder durch histopathologische Untersuchung (pTNM) bestimmt wurde.

Tabelle 1: Vollständige TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2018 (8. Ausgabe).

Stadium	Beschreibung
T1	Der Tumor ist klein und nicht tastbar. Er wird zufällig im Rahmen einer Prostataoperation wegen BPH oder erhöhter PSA-Werte gefunden (Inzidentaltumor).
T1a	Der Tumor befällt weniger als 5 % des Gewebes.
T1b	Der Tumor befällt mehr als 5 % des Gewebes.
T1c	Diagnose durch Nadelbiopsie
T2	Der Tumor liegt noch innerhalb der Prostatakapsel
T2a	Befall von weniger als 50% eines Seitenlappens
T2b	Befall von mehr als 50 % eines Seitenlappens.
T2c	Der Tumor befällt beide Seitenlappen.
T3	Ausbreitung des Tumors über die Prostatakapsel hinaus
T3a	Ausbreitung über die Prostatakapsel ohne die Samenblasen zu befallen.
T3b	Zusätzlicher Befall der Samenblasen
T4	Infiltration in Nachbarstrukturen
N0	Keine Metastasen in den regionären Lymphknoten.
N1	Metastasen in den regionären Lymphknoten.
M0	Keine Fernmetastasen

M1	Der Tumor hat Fernmetastasen gebildet.
M1a	Metastasen in nicht-regionäre Lymphknoten
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen.

1.1.3.2 Der Gleason-Score

Der Gleason-Score ist ein Einteilungssystem zur Beurteilung der histologischen Entartung bzw. Differenzierung (Grading) des Prostatakarzinoms [33] und korreliert mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung [34]. Zusammen mit dem PSA-Wert bzw. dem Anstieg des PSA-Werts dient der Gleason-Score der Risikostratifizierung von Prostatakarzinomen und wurde als guter, eigenständiger Prognosefaktor validiert [35-37].

Anpassend an die vielfältigen Neuerungen in Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms wurde das Grading nach Gleason zuletzt 2005 durch die Internationale Gesellschaft für Urologische Pathologie (*engl.: Internatinal Society of Urological Pathology, ISUP*) aktualisiert [38]. Trotz seiner Evidenzen als Marker wird in absehbarer Zeit das Gleason-Grading teilweise oder ganz durch ein vereinfachtes Grading-System nach Epstein ersetzt bzw. ergänzt werden [39].

Zur Bestimmung des Gleason-Scores wird entnommenes Gewebe nach Fixierung mittels gängiger Methoden gefärbt und mikroskopisch untersucht. Entscheidend beim Grading ist die Tatsache, wie sehr die Tumorzellen mikroskopisch dem ursprünglichen Gewebe ähneln. Je unähnlicher die Karzinomzellen den ursprünglichen Drüsenzellen sind, desto undifferenzierter und entarteter sind diese. Beim Gleason-Score wird, anders als beim Grading anderer Tumore, je nach Differenzierung ein Punktwert von 1 (sehr gut differenziert) bis 5 (völlig dedifferenziert) vergeben (siehe Abbildung 1). Als weitere Besonderheit werden der prädominante Differenzierungsgrad und der danach dominante Differenzierungsgrad addiert, der Score ist somit eine Summe. Damit ergibt sich für den Gleason-Score ein Wert zwischen 2 und 10.

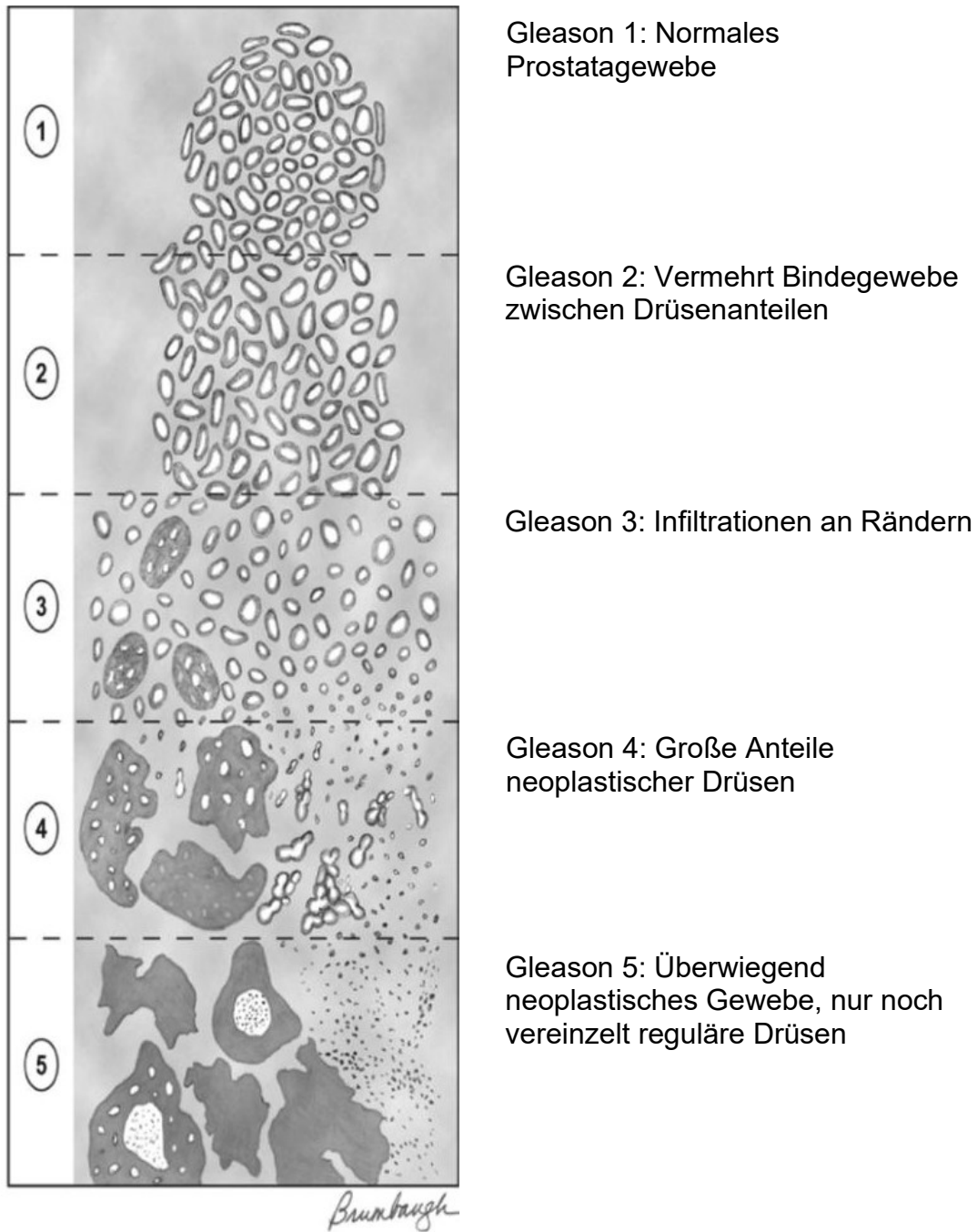


Abbildung 1: Die einzelnen Differenzierungsgrade nach Gleason von 1-5. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung des Verlags (Wolters Kluwer, Niederlande) übernommen aus: Epstein: Curr Opin Urol, Volume 16(3). Mai 2006.146-151

1.1.4 Die Therapie

Das therapeutische Vorgehen richtet sich v.a. nach Ausmaß des Befundes, man unterscheidet vereinfacht dargestellt in lokal begrenzte Tumoren, lokal fortgeschrittene Tumoren, lymphknotenpositive und fernmetastasierte Tumoren. Je nach Befund, aber auch nach Patientenwunsch, kommen als Konzepte die sog. „Aktive Überwachung“ (engl.: *Active Surveillance*), bei fortgeschrittenem Alter das „aufmerksame Warten“

(engl: *Watchfull Waiting*), eine lokale Brachytherapie, perkutane Radiatio oder eine radikale Prostatektomie mit eventuellen adjuvanten Therapien in Betracht. Im Falle eines metastasierten PCA oder eines Rezidivs wird von invasiveren Methoden zu Gunsten einer symptomorientierten, supportiv-palliativen Therapie Abstand genommen [6]. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein primäres Abwarten bei der Therapieentscheidung beim lokal begrenzten PCA einer radikalen Prostatektomie hinsichtlich der Mortalität nicht unterlegen ist [5], und das auch in langjährigen Nachbeobachtungen eine radikale Chirurgie die Gesamtmortalität nicht senken konnte, dafür aber mit einer höheren Rate an Komplikationen verbunden war [40].

1.2 Funktionen und Mechanismen der Epigenetik

1.2.1 Einführendes zur Epigenetik

Epigenetik bezeichnet die Veränderung von Genaktivitäten ohne die Basensequenz der Gene zu verändern. Dies bewirkt eine meist dauerhafte, prinzipiell aber reversible phänotypische Veränderung der Zelle. Epigenetik ist somit die Ursache verschiedener Phänotypen bei gleichem Genotyp, wesentliche Triebkraft der Zelldifferenzierung und damit auch einer gewebespezifischen Genaktivität und normalen embryonalen Entwicklung [41]. Die Genfunktionen und die Gene selbst bleiben unverändert, daher sind epigenetische Veränderungen nicht Mutationen gleich zu setzen. Die Veränderung der Genaktivität ist jedoch ausreichend, den Phänotyp und die Funktion der Zelle dauerhaft zu verändern. Diese Modifikationen mit entsprechenden phänotypischen Veränderungen stehen im Gegensatz zur klassischen Mendelschen Genetik. Die Tatsache z.B., dass manche Eigenschaften nur maternal, andere aber paternal vererbt werden, wie es beim sogenannten Imprinting vorkommt (Erklärung des Imprintings siehe 1.2.3), lässt sich nicht durch klassische Vererbungsmechanismen der Zellteilung erklären. Epigenetische Mechanismen zielen auf zeit- und gewebeabhängige Aktivierung oder Stilllegung ab und können einzelne Gene, aber auch ganze Chromosomen betreffen, wie etwa die X-Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in weiblichen Zellen.

Die biochemischen Grundlagen der epigenetischen Veränderungen sind im Wesentlichen DNA-Methylierung und Modifikationen an Histonen [42, 43]. Histone sind als Proteine zusammen mit der DNA Bestandteil des Chromatins. Die Verpackung der DNA in diese Grundstruktur ist der Anfang der Chromosomenformation. Histone liefern

als Rückgrat der Chromatinstruktur nicht nur einen immensen Beitrag zum Schutz der DNA, sondern sind auch stark an der Genregulation beteiligt. Dies geschieht über chemische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen DNA und den positiv geladenen Aminosäuren der Histone. Histonmodifikationen bedingen über eine Veränderung der Chromatininformation eine erleichterte oder erschwerte Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie der Zelle. Werden Histone etwa an Lysin acetyliert, wird die positive Ladung des Lysins neutralisiert, was wiederum die auf unterschiedlichen Ladungen basierende Wechselwirkung zwischen DNA und Histonen aufhebt. Somit können Transkriptionsfaktoren leichter binden. Eine weitere Modifikationsmöglichkeit an Histonen ist die Methylierung an Lysin- oder Argininresten, was sich je nach Art der Methylierung hemmend oder fördernd auf die Transkription auswirken kann.

1.2.2 DNA-Methylierung

Ähnliches geschieht bei der Methylierung der DNA. Diese ist gleichbedeutend mit der Stilllegung des entsprechenden Genomabschnitts.

DNA-Methylierung ist ein biochemischer Prozess, bei dem an Cytosin-Basen (C) der Nukleotidsequenzen eine Methylgruppe angehängt wird. Es können aber nur solche Basen methyliert werden, welche in Kombination mit einer Guanosinbase (G) als CpG-Dinukleotid vorkommen. Das p zwischen den beiden Basen steht für das verbindende Phosphatrückgrat, wie es zwischen sämtlichen Basenverbindungen eines einzelnen DNA-Strangs vorkommt. Diese CpG-Dinukleotide werden auch CpG-Stellen (*engl.: CpG-sites*) genannt und treten im Genom in besonderen Regionen gehäuft auf. Diese Regionen mit besonderer Häufung nennt man CpG-Inseln. Sie werden gehäuft in 5'-Richtung, also stromaufwärts (*engl.:upstream*), von regulatorischen Sequenzen wie Promotoren beobachtet [44]. Die Schätzungen über den Grad der Methylierung aller vorhandenen CpG-Sites variiert je nach Gewebe [45-47], im gesamt Genom wurden Methylierungsgrade von 60-90% beobachtet [45].

Kommt es zur Methylierung, werden Cytosinbasen an Position 5 des C6-Kohlenstoffrings durch DNA-Methyltransferasen mit einer zusätzlichen Methylgruppe versehen. Bisher wurden bei Säugetieren drei verschiedene Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3A und DNMT3B) identifiziert. DNMT1 wird allgemein als das Enzym angesehen, das in humanen Zellen - auch Krebszellen - ein Methylierungsmuster an die Tochterzelle weitergibt [48], also der Aufrechterhaltung der epigenetischen

Funktion dient. Das Muster einer Methylierung ist somit vererbbar. DNMT3A und DNMT3B werden hingegen für *de-novo*-Methylierung verantwortlich gemacht [49]. DNA-Methylierung ist prinzipiell kein irreversibler Vorgang, es gibt mit DNA-Demethylasen auch Enzyme, welche die Reaktion umkehren können sowie weitere zelluläre Mechanismen der DNA-Demethylierung [50, 51].

Methylierung von DNA führt üblicherweise durch Behinderung der Transkription zur Geninaktivierung [52, 53], beispielsweise durch die Methylierung von Promotoren oder des ersten Exons eines Gens [54]. Die Methylierung anderer regulatorischer Sequenzen kann aber auch zur verstärkten Genaktivität führen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die vorgeschlagene Regulation des Imprintings des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors 2 (IGF2), wo die Methylierung einer regulatorischen Nicht-Promotorsequenz zur verstärkten Aktivität führt (zur ausführlichen Erklärung siehe Kapitel 1.3.1). Eine andere vorgeschlagene Rolle der Methylierung könnte der Schutz der DNA gegen die Insertion fremder DNA-Moleküle oder schlicht die Konservierung von Nukleotidsequenzen und Chromatinstrukturen sein [55, 56]. Die Regulation der Transkription scheint im Wesentlichen auf zwei Mechanismen zu beruhen: auf der direkten Behinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren durch die Methylierung selbst [57], und auf der Erkennung von methylierter DNA durch spezielle Methyl-CpG-Bindeproteine (MBD) [58]. Diese MBD-Proteine binden wiederum andere Proteine wie z.B. Histondeacetylasen, Zinkfingerproteine und andere [59-61], können aber auch selbst mit der Transkription interagieren [62]. Eine weitere Folge der Methylierung ist eine generell erhöhte Mutationsrate gegenüber nicht-methylierten DNA-Abschnitten. Dies wird dadurch erklärt, dass methylierte Cytosinbasen empfindlicher gegenüber einer hydrolytischen Desaminierung sind als unmethylierte. Aus einem desaminierten Cytosin wird Thymin, wenn durch DNA-Reparaturmechanismen diese Änderung übersehen wird, entsteht eine neue Punktmutation [63, 64].

Interessanterweise scheint die Gesamtmethylierung der DNA im Alter abzunehmen [65], was ein neues Licht auf Alterungsprozesse wirft. Es gibt aber auch einige Beobachtungen über epigenetische Veränderungen, die im Alter zunehmen, gerade auch in der Prostata [66]. Methylierungsanalysen regulatorischer DNA-Sequenzen sind Hauptbestandteil der vorgelegten Arbeit.

1.2.3 Imprinting – Vorkommen und Funktion

Imprinting wird auch als genomische Prägung bezeichnet und ist gleichbedeutend mit einer epigenetischen Fixierung: Phänotypische Eigenschaften einer Zelle sind entweder paternalen oder maternalen Ursprungs und werden bei der Zellteilung auf jede Tochterzelle übertragen. Molekularbiologisch bedeutet dies, dass eine Gruppe von Genen immer nur von einem Allel, also dem paternalen oder dem maternalen, abgelesen wird und somit immer der paternale oder maternale Phänotyp eines Gens entsteht.

Mittlerweile sind eine Vielzahl durch Imprinting regulierter Gene bekannt [67], von denen viele z.B. als nicht-kodierende RNA selbst wiederum regulatorische Funktionen besitzen [67, 68]. Die Gesamtzahl der durch Imprinting regulierten Gene wird auf unter ein Prozent geschätzt, was bei geschätzten 20.000-25.000 Genen immer noch eine große Anzahl bedeutet. Eine Vielzahl durch Imprinting regulierter Gene scheint hierbei eine Rolle in der embryonalen Entwicklung zu spielen [69-71], aber auch in der weiteren Organdifferenzierung, z.B. im Gehirn [72].

Das Aufrechterhalten der genomischen Prägung wird „Retention of Imprinting“ (ROI) genannt. Auf Grund verschiedener Prozesse kann es jedoch auch zum Verlust der genomischen Prägung kommen, einem sogenannten „Loss of Imprinting“ (LOI).

1.2.4 Epigenetik und Krankheit

Ein frühes Beispiel für die Rolle von DNA-Methylierung bei der Krankheitsentstehung war die Beobachtung, dass ein gehäuftes Vorkommen von Methylcytosin zu einer höheren Mutationsrate im LDL-Rezeptor-Gen und im Tumorsuppressor-Gen P53 führt [73]. DNA-Methylierung und seine pathogenen Folgen spielen also nicht nur eine Rolle in der Krebsentstehung, ein zunehmendes Augenmerk auf epigenetische Veränderungen wird auch z.B. in der Erforschung metabolischer [74], neurodegenerativer [75], kardiologischer [76] und auch chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen [77] gelegt.

In vielen Genen, die mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden, wurden bereits unterschiedliche epigenetische Veränderungen beobachtet, die von Promotor-Hypermethylierung in Tumorsuppressor-Genen [78-80], Methylierung regulatorischer microRNA [81] (siehe auch Kapitel 1.4), LOI [82], Hypomethylierung anderer epigenetischer Regulatoren [83] sowie von Onkogenen bzw. Protoonkogenen –[84-87] bis hin zu Histonmodifikationen [88] reichen.

Viele dieser Ergebnisse liefern nicht nur Erklärungen zur Entstehung einer Krankheit, sondern haben auch klinische Relevanz, etwa als prognostische Marker. Auch für *IGF2* gibt es bereits solche Studien. Im Ovarialkarzinom etwa korrelieren verschiedene Methylierungsmuster mit einer unterschiedlichen Prognose [89, 90]. Auch im Kolonkarzinom ist eine Hypomethylierung einer spezifischen Region des *IGF2*-Gens (Differenziell methylierte Region – DMR) mit einer schlechten Prognose behaftet [91]. In Prostatagewebe und im Prostatakarzinom gibt es ebenfalls hinreichende Beispiele für die Beteiligung epigenetischer Veränderungen an der Tumorentstehung. Es wurde bereits erwähnt, dass LOI von *IGF2* in der Prostata im Alter zunimmt und auch im Prostatakarzinom auftritt [66, 92], wobei LOI von *IGF2* nicht nur im Tumor, sondern auch im restlichen Gewebe der Prostata zu finden ist [93]. Die am besten untersuchte und bisher bedeutendste epigenetische Veränderung im Prostatakarzinom dürfte die durch Hypermethylierung der Promotorregion verursachte verminderte Expression der Gluthation-S-Transferase P (*GSTP1*) sein, einem Enzym, das Zellen vor oxidativem Stress schützt [94]. Auch im Prostatakarzinom gibt es erste Korrelationen von epigenetischen Eigenschaften wie dem Grad der Methylierung oder von Histonmodifikationen zu klinisch-pathologischen Eigenschaften [95-97]. Der klinische Nutzen der genannten Korrelationen ist jedoch noch unklar.

1.3 Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 2 (*IGF2*)

Das *IGF2*-Gen (Gene ID: 3481, GenBank Accession Number: NG_008849.1) ist auf dem Chromosom 11p15.5 lokalisiert und codiert ein Peptidhormon, für das bisher zwei Isoformen bekannt sind. Die Aminosäure-Sequenzen dieser beiden Isoformen sowie die Datenbank-Referenzen sind im Anhang dieser Arbeit aufgelistet. Benachbart in diesem Genomabschnitt ist das Insulin-Gen. Zu dem verwandten Gen Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (*IGF1*) zeigt es eine 62%ige Homologie der Aminosäuresequenzen, was die Fähigkeit der beiden Proteine erklärt, an die selben Rezeptoren zu binden (siehe Abschnitt 1.3.3 und Abbildung 2).

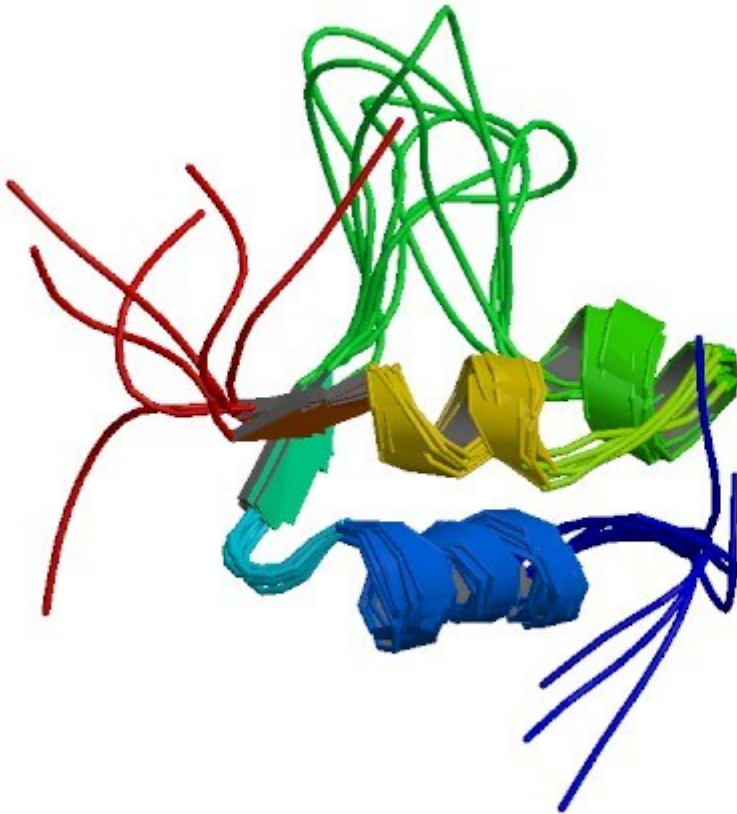


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur des IGF2-Proteins in Bindungskonformation zu seinen Rezeptoren bzw. Bindungsproteinen. Quelle: Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>

1.3.1 Regulation

Die Leber wird als Hauptquelle des im Blut zirkulierenden IGF2 angesehen [98], es wird als autokriner und parokriner Mediator jedoch in vielen Geweben angetroffen. Im Blut und auch im Gewebe liegt IGF2 hauptsächlich an einer Familie aus sechs verschiedenen Bindeproteinen, sog. *Insulin-like growth factor* Bindeproteine (IGFBP) gebunden vor [99, 100]. Diese Bindungen, die Bindeproteine und auch die intrazelluläre Bindung der mRNA an Bindeproteine haben offenbar selbst regulatorische Einflüsse auf eine normale Entwicklung und auch die Entstehung von Krankheiten [101-103]. So wurde für IGFBP3 nachgewiesen, dass es in einer Vielzahl von PCA überexprimiert wird und mit einem höheren Gleason-Score korreliert [104].

1.3.1.1 Die epigenetische Regulation von IGF2

IGF2 ist ein sogenanntes „*imprinted gene*“, was bedeutet, dass es normalerweise nur von einem Allel abgelesen wird, in diesem Fall vom paternalen Allel [105, 106]. Eine Besonderheit des Imprintings von *IGF2* ist, dass es gleichzeitig das benachbarte Gen *H19* betrifft, welches Informationen für nicht-kodierende RNA enthält. Das propagierte Modell des *IGF2/H19* – Imprintings besagt, dass sich die Expression der beiden Gene im Sinne eines Verstärker - Konkurrenten - Modells (engl.: *Enhancer competitor model*) reziprok verhält. Falls von einem Allel eines der beiden Gene abgelesen wird, kann das andere nur vom komplementären Allel abgelesen werden, nicht aber vom selben Allel. Zwischen den beiden Genen liegt eine „Imprinting-Kontroll Region (engl.: *imprinting control region*, ICR), die durch Methylierung epigenetisch reguliert werden kann. Im unmethylierten Zustand kann hier das Zinkfingerprotein CTCF binden, ein Chromatin-modulierender Transkriptionsfaktor. Diese CTCF-Bindung verhindert die Bildung einer Chromatinschleife, die durch Bindung eines 3' von *H19* gelegenen Transkriptionsverstärkers mit regulatorischen Elementen des *IGF2*-Promotors entsteht. Somit kann *IGF2* nicht abgelesen, die Transkription von *H19* jedoch initiiert werden. Ist die ICR allerdings methyliert, kann CTCF nicht binden, was in einer Transkription von *IGF2* und einer Stilllegung von *H19* mündet (siehe auch Abbildung 3) [107-109].

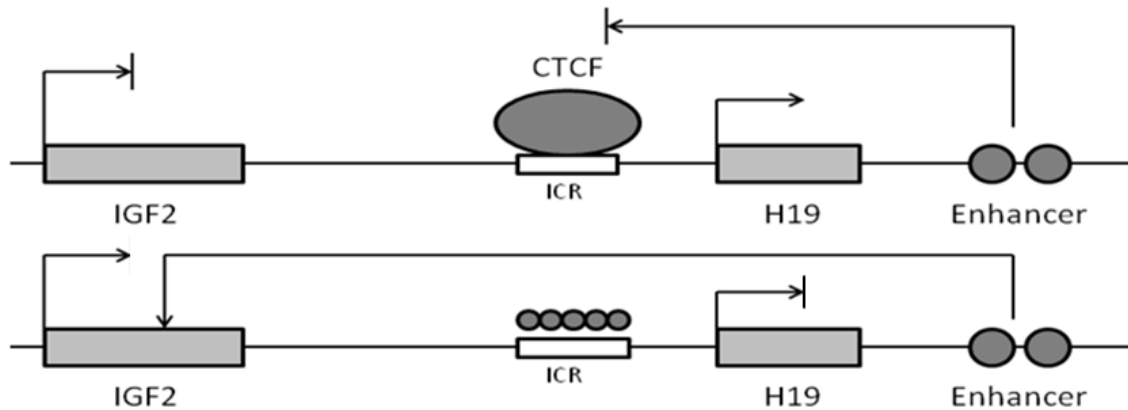


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *IGF2/H19* – Genlocus auf Chromosom 11p15.5 mit dem propagierten „Enhancer-Competitor“ Modell. Oben das maternale, unten das paternale Allel. Ist die „Imprinting-Control-Region“ (ICR) unmethyliert, kann das Zinkfingerprotein CTCF binden. Dies verhindert das Binden des Verstärkers (Enhancer) der Transkription. Somit wird vom maternalen Allel *IGF2* nicht abgelesen, dafür jedoch *H19*. Bei Methylierung der ICR, wie auf dem paternalen Allel, kann CTCF dort nicht binden. Die Bindung des Verstärkers kann stattfinden, was im Ablesen des *IGF2*-Gens resultiert, das Ablesen von *H19* wird unterbunden.

Im Menschen sind 7 CTCF-Bindungsstellen innerhalb der *IGF2*-ICR beschrieben, von denen nur eine an der Bindungsstelle 6 (BS6) als relevant für das Imprinting erachtet wird [110] (siehe auch Abbildung 4).

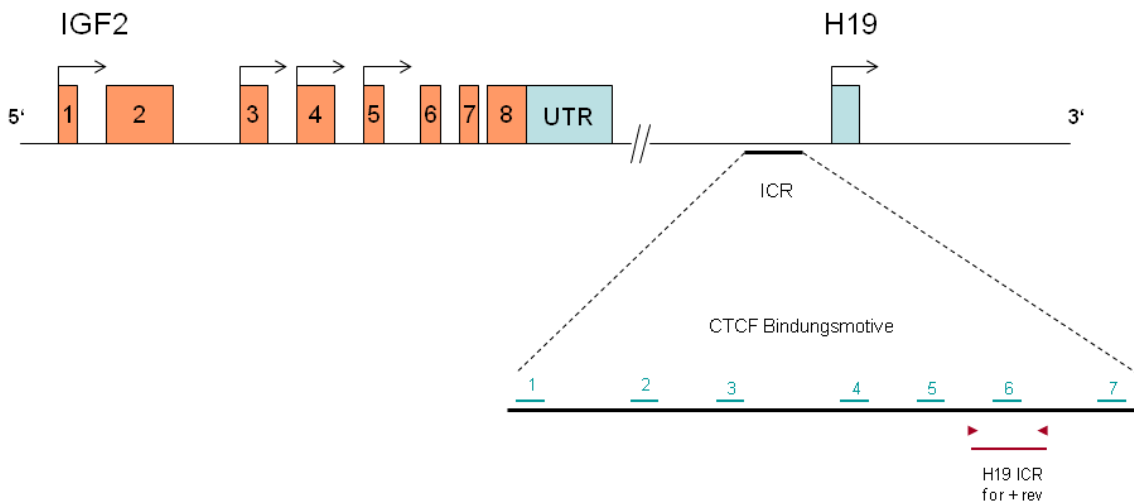


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lokalisation der ICR innerhalb des *IGF2/H19*-Genlocus. Die Boxen 1-8 stellen die Exone dar, gefolgt von einer nicht-umgeschriebenen Sequenz (engl.: *untranslated region*, UTR). Die ICR liegt zwischen UTR und *H19*. Sie beinhaltet 7 Bindungsmotive als potentielle Bindungsstellen für CTCF. Mit roten Pfeilen wurden die Bindungsstellen der Primer (*for* und *rev*) markiert, die zur Methylierungsanalyse der Bindungsstelle 6 per Sequenzierung entworfen wurden.

Zusätzlich enthält die *IGF2*-Genregion vier verschiedene Promotorregionen [111], die alle als Start zur Transkription dienen können und in entsprechenden Transkriptvarianten münden [112]. Dementsprechend sind die Varianten

unterschiedlich lang. Der Unterschied betrifft jedoch v.a. die 5' – untranslatierte Region (UTR) ohne Unterschied im daraus resultierenden Protein [112, 113]. Die Promotoren (P) 2 - 4 können auf dem paternalen Allel methyliert sein, wobei die Methylierung und Promotoraktivität in Abhängigkeit zu verschiedenen fetalen Entwicklungsstadien zu stehen scheint [114, 115]. Die Promotorbereiche P 2 - 4 können anhand des Vorhandenseins von CpG-Inseln weiter unterteilt werden, für P2 in P2A, P2B und P2C, für P3 in P3A und P3B sowie für P4 in P4A und P4B (siehe Abbildung 5).

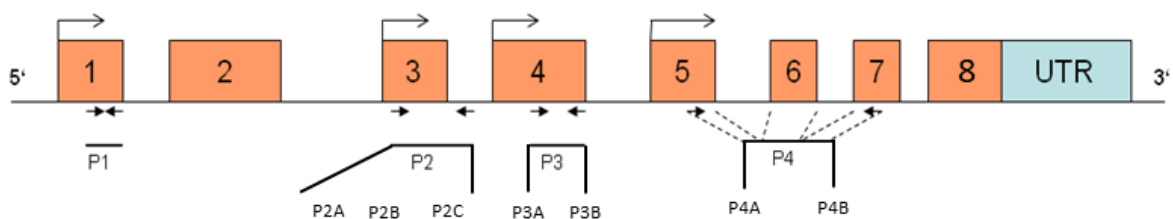


Abbildung 5: Schema der IGF2-Promotorregion. Die mit 1-8 gekennzeichneten Rechtecke symbolisieren die Exone mit durch einen Pfeil gekennzeichneten Transkriptionsstartseiten. Die schwarzen, gegenläufigen Pfeile unter den Rechtecken symbolisieren die durch die Primer der Genexpressionsanalyse und Sequenzierung abgedeckten Bereiche.

1.3.2 Die Bedeutung und Wirkung von IGF2

IGF2 wird als hauptsächlicher fetaler Wachstumsfaktor angesehen [98], der eine wichtige Rolle bei der korrekten Ausdifferenzierung von Geweben einschließlich der Prostata spielt [116]. IGF1 scheint im Gegensatz dazu eher in der postpartalen Lebensphase bedeutsam zu sein.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Expression von IGF2 zeit- und gewebeabhängig eng reguliert wird [117, 118]. Seine Eigenschaften als Wachstumsfaktor machen es zum potentiellen Onkogen [119, 120]. Weiter interessant für die Onkogenese sind seine Eigenschaften als „imprimiertes Gen“ (engl.: *imprinted gene*) (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..1**) und die häufige Beobachtung

eines LOI in der alternden Prostata [66]. LOI führt zur biallelischen Gen-Expression von IGF2, was in vielen Tumoren in erhöhten IGF2-Spiegeln resultiert [121-124]. Beim PCA sind die Befunde allerdings teilweise widersprüchlich: IGF1, IGF2 und ihre Rezeptoren sind in vielen PCA supprimiert [116]. Einige Studien [123] beschrieben erhöhte IGF2-Werte in PCA, andere erniedrigte Spiegel [93, 116].

In verschiedenen Entitäten wurde IGF2 als Prognosefaktor beschrieben, so zum Beispiel im Ovarial-CA [125], bei Hepatoblastomen [126] und bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) [127]. Für kolorektale Adenome wurde im Serum gemessenes IGF2 kürzlich als Prognosefaktor eingestuft [128], jedoch mit einer schwächeren Aussagekraft und weniger effektiv als IGF1. Für das PCA gibt es bisher lediglich Hinweise auf IGF1 und IGFBP3 als Prognosefaktoren [129].

1.3.3 Transduktion und intrazelluläre Signalwege

IGF2 bindet wie IGF1 an eine Gruppe von verwandten Rezeptoren, bestehend aus IGF1 – Rezeptor (IGF-1R), IGF2 – Rezeptor (IGF-2R) und den Insulin Rezeptor (INSR). Von dem INSR existieren zwei Isoformen, INSR – A und INSR – B, welche IGF2 und IGF1 jeweils mit unterschiedlicher Affinität binden [130, 131]. Die strukturellen Ähnlichkeiten der Rezeptoren erlauben die Bildung von Heterodimeren aus den beiden INSR – Isoformen und IGF-1R mit ebenfalls unterschiedlicher Affinität [132]. Dies bedeutet in der Konsequenz, dass auch Insulin die IGF – Rezeptoren aktivieren kann. Auf der intrazellulären Seite der Rezeptoren werden die hinlänglich bekannten Signalkaskaden des AKT-Signalweges sowie des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges aktiviert und führen somit zu den wachstumsfördernden Wirkungen der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren und des Insulins selbst [131].

Die Rolle des IGF-2R, auch als CI-MPR (*engl.: Cation-independent mannose-6-phosphate receptor*) bekannt, wurde in der Literatur bisher kontrovers diskutiert. In Untersuchungen an Zellkulturen wurden IGF-2R die Eigenschaften eines Tumorsuppressors zugesprochen [133], Studien zu dieser Eigenschaft an Gewebe aus Brustkrebspräparaten konnten dies jedoch nicht nachvollziehen [134]. Andere experimentelle Arbeiten konnten neben wachstumsfördernden Wirkungen des IGF2-Rezeptors auch autoregulatorische Funktionen finden, in dem der Rezeptor freies IGF2 bindet und der lysosomalen Degradation zuführt [135, 136].

1.3.4 IGF2 und Krebs

IGF2 wurde auf Grund seiner Funktion als Wachstumsfaktor früh als Onkogen diskutiert [119, 120]. Erhöhte Spiegel von *IGF2*-mRNA wurden in verschiedenen Krebsentitäten beobachtet, darunter auch beim Prostatakarzinom [121-123]. Die letztgenannte Tatsache wird jedoch kontrovers diskutiert, da spätere Studien im fortgeschrittenen PCA erniedrigte *IGF2*-mRNA gefunden haben [93, 116].

Messungen von IGF2-Protein im Serum von Patienten fanden eine signifikante Erhöhung in PCA-Patienten gegenüber Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH), zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation zur Tumorgröße [137], sodass IGF2 als diagnostischer Marker vorgeschlagen wurde. Eine große Studie untersuchte den Einfluss von Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: *single-nucleotide polymorphism* SNP), in Genen des IGF-Signalwegs in einem großen Kollektiv und fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen SNPs, IGF-Antisense-RNA und Mortalität [138]. Für einen bestimmten SNP im *IGF2*-Gen selbst wurde eine Assoziation zu gehäuftem Auftreten von PCA in jungem Alter gefunden, zudem zeigte sich in der selben Studie auch ein erhöhter IGF2-Serumspiegel, der unabhängig vom Imprintingstatus war [139]. Auch bei kolorektalen Karzinomen zeigen bestimmte SNPs des IGF2-Signalwegs, hier im IGF2-Rezeptor, ein erhöhtes Krebsrisiko [140].

Hinweise auf eine hohe klinische Relevanz von IGF2 im PCA ergaben sich durch die Entdeckung, dass IGF2 in PCA-Zelllinien die Steroidsynthese erhöht, und somit zur Progression beitragen könnte [141, 142]. Diese Entdeckung wurde jüngst durch eine Studie untermauert, die durch Hemmung von Insulinrezeptoren die Wirkung von antiandrogener Therapie, einem wichtigen therapeutischen Ansatz beim PCA, wiederherstellen konnte [143]. Aus den geschilderten Kontroversen zur Rolle von IGF2 im PCA leitet sich der Anspruch der vorgelegten Arbeit ab, zur Klärung der Relevanz von IGF2 im PCA beizutragen.

1.4 microRNA

microRNA-Moleküle sind kleine (meist ca. 22 nt), hochkonservierte, nicht-kodierende RNA-Sequenzen, deren Vorkommen 1993 im Fadenwurm *C. elegans* erstmals beschrieben worden sind [144]. Außer in humanen und tierischen Zellen sind microRNA-Moleküle auch in Pflanzenzellen reichlich vorhanden [145]. Viele microRNA-Sequenzen liegen in Introns anderer Gene (Host-Gene). In manchen Fällen wird die microRNA gemeinsam mit dem Host-Gen codiert und durch die RNA-

Polymerase II abgelesen [146, 147]. In den meisten Fällen liegen die Sequenzen der microRNA-Transkripte jedoch zwischen Genen und werden unabhängig ebenfalls durch die RNA-Polymerase II transkribiert [147]. Nach dem Ablesen durch die Polymerase entsteht zunächst eine Vorläufer microRNA, auch pre-miRNA genannt, die zunächst rund 80 nt lang ist und danach post-transkriptionell in mehreren Schritten in Nukleus und Cytosol zur fertigen microRNA prozessiert wird [146, 148]. Neben der transkriptionellen und post-transkriptionellen Regulation kann die Expression der microRNA auch durch epigenetische Einflüsse reguliert werden [81, 149].

Einige Funktionen der verschiedenen microRNA-Moleküle sind noch unbekannt, die Regulation der Genexpression ist jedoch gut belegt. Mittlerweile sind mehrere Mechanismen bekannt, wie microRNAs in die Genregulation eingreifen, sowohl in Transkription als auch in direkter Interferenz mit mRNA [150], aber auch durch Translationshemmung [150]. Als Teil des sogenannten RISC-Komplexes (von engl.: *RNA-induced silencing complex*) kann microRNA beispielsweise komplementäre mRNA erkennen und der Degradierung zuführen. Dieser Mechanismus wird RNA-Interferenz genannt und ist der am besten untersuchte Weg der Genregulation durch microRNA [147, 150, 151].

1.4.1 microRNA und Krankheit

microRNA-Sequenzen sind durch ihr ubiquitäres und hochkonserviertes Vorhandensein und ihren großen Einfluss auf die Genexpression fundamental wichtig für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen. Daher ist es kein Wunder, dass eine Dysregulation in vielen Krankheiten eine Rolle zu spielen scheint. So wurden microRNAs schon in Verbindung mit Nierenerkrankungen [152], Herzerkrankungen [153-155], Erkrankungen des zentralen Nervensystems [156, 157] und angeboren Wachstums- und Gehörkrankungen gebracht [158, 159]. Die Rolle in der Krebsentstehung und der Entwicklung von Therapieresistenzen war und ist ebenfalls Gegenstand vieler Studien und wurde bereits in einigen Tumorentitäten wie beispielsweise Brustkrebs, Zervixkarzinom, Blasenkrebs, Kolorektalem Karzinom und Leberkrebs belegt [160-164]. Auch für das Prostatakarzinom wurden schon viele Studien veröffentlicht, die Potential für microRNAs als künftige Prognosefaktoren oder Biomarker sehen [165, 166]. Verbindungen von microRNAs zum Androgen-Signalweg bieten eventuell Potential für künftige Therapien [167].

Generell kann eine Dysregulation der microRNAs bei Krebserkrankungen sowohl Funktionen eines Tumorsuppressors wie auch eines Onkogens betreffen. Pathomechanismen der Karzinogenese wie der Verlust der Heterozygotie (engl.: *loss of heterozygosity*, LOH), Deletionen, Amplifikationen, ein gestörtes Imprinting und andere epigenetische Mechanismen können die microRNA-Expression ebenso beeinflussen wie die Genexpression [168-170]. Bekannte Onkogene, für die eine Interferenz mit microRNAs gezeigt wurde, sind beispielsweise *MYC* und *RAS* [170].

1.4.2 microRNA--675

Das ebenfalls durch Imprinting regulierte Reziprok von *IGF2*, *H19*, ist das Vorläufermolekül der microRNA-675 (miR-675) [171]. Ähnlich wie *IGF2* ist auch *H19* vor allem in der Embryonalentwicklung stark exprimiert und postnatal meist supprimiert [172]. Über eine mögliche Rolle von *H19* in der Tumorentstehung wurde bereits früh diskutiert [173]. Die aus *H19* entstehende miR-675 ist physiologisch nur in der Plazenta exprimiert und reguliert dort deren Wachstum [174]. So führt eine Überexpression zur Wachstumshemmung, während ein Fehlen zu überschießendem Wachstum führt [174].

Experimentelle Arbeiten fanden IGF-1R und den Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein als Ziele der miR-675 [174, 175]. So kann miR-675 einerseits wachstumshemmende, andererseits durch Hemmung von Tumorsuppressoren indirekt wachstumsfördernde Wirkungen entfalten.

Eine Störung der miR-675-Expression mit Einfluss auf die Tumorentstehung wurde mittlerweile in vielen Tumorentitäten beschrieben, neben kolorektalen Karzinomen [175] auch in Brustkrebs [176], Blasenkrebs [177] und Lungenkrebs [178]. Im Prostatakarzinom scheint die Rolle in der Entstehung weniger klar. In-vitro-Ergebnisse weisen jedoch auf eine mögliche Rolle in der Metastasierung hin [179].

1.5 Das Zinkfinger-Protein CTCF

Das *CTCF*-Gen auf Chromosom 16 kodiert für das Zinkfinger-Protein CTCF, nach seinem häufigen Bindungsmotiv auch CCCTC-Bindungsfaktor genannt. Zinkfingerproteine sind hochkonservierte Chromatin-Bindungsproteine. CTCF gilt sogar als außergewöhnlich hochkonserviert und wird in vielen verschiedenen Vertebraten ubiquitär exprimiert [180]. Durch seine Struktur mit insgesamt elf

Zinkfinger-Domänen kann CTCF an vielen Stellen des Chromatins - und an mehreren gleichzeitig - binden und somit intra- und interchromosomale Kontakte schaffen [181, 182]. Dadurch können Funktionen entstehen wie transkriptionelle Regulierung (sowohl Aktivierung als auch Stilllegung von Genen), Imprinting und Chromatinmodifikation, aber auch die X-chromosomale Inaktivierung [182, 183]. Die Fähigkeit zur Chromatinbindung kann durch Methylierung verloren gehen [184].

Durch die variable Kombination der elf Zinkfinger kann CTCF an eine Vielzahl verschiedener DNA-Sequenzen binden, systematische Schätzungen anhand biostatistischer Methoden und molekularbiologische Annäherungen anhand von Sequenzierungen beziffern viele tausend potentielle Bindungsstellen [185, 186].

1.6 Das Retinoblastom-Protein

Der Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (RB), codiert durch das gleichnamige Gen, wurde nach seiner Erstbeschreibung im Retinoblastom benannt, wo es nach Verlust oder Mutation beider Allele zur Tumorentstehung kommen kann [187, 188]. RB kann den Zellzyklus beim Übertritt aus der G1- in die Synthese-Phase durch Bindung und Hemmung des Transkriptionsfaktors E2F kontrollieren und somit eine wachstumshemmende Wirkung entfalten [189, 190].

RB wurde schon früh mit der Karzinogenese des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht, ein Verlust konnte häufig beobachtet werden [191-193]. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass ein Verlust von RB weniger in der Initiation als in der Progression hin zu kastrationsresistenten Karzinomen eine Rolle zu spielen scheint. Dies geschieht durch eine Modulation des Androgenrezeptors [194, 195]. Andererseits scheint die Suszeptibilität gegenüber einer Radiotherapie bei RB-Verlust höher zu sein [196].

Weiterhin wurde im kolorektalen Karzinom sowie im hepatozellulären Karzinom gezeigt, dass RB durch miR-675 negativ reguliert werden kann [175, 197].

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die Deregulierung der IGF-Achse im Prostatakarzinom macht diese zu einem interessanten Kandidaten für prognostische und therapeutische Biomarker. Mittels Charakterisierung der Expression und Regulation von *IGF2* im Prostatakarzinom

sollen grundlegende Mechanismen der genomischen Prägung untersucht und weitere regulative Mechanismen der Genexpression gefunden werden.

Durch Korrelation mit klinischen Daten der Patienten, aus denen die Proben gewonnen wurden, sollen Hinweise auf neue Risikofaktoren gefunden und die klinische Relevanz der Ergebnisse überprüft werden. So können eventuell Rückschlüsse gezogen werden, die erlauben sollen, Patientenkollektive im Hinblick auf eine personalisierte Medizin genauer zu stratifizieren. Ein weiteres Ziel ist es, aus den Ergebnissen Anhaltspunkte für neue therapeutische Optionen zu finden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Diese Übersicht beinhaltet die verwendeten Geräte, Chemikalien, Reagenzien, Kits und biologisches Material wie die verwendeten Gewebeproben von Patienten und Zelllinien.

2.1.1 Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

- Thermocycler (PCR-Geräte)
 - GeneAmp PCR, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
 - Step One Plus Real-Time PCR-System, Applied Biosystems, USA
 - PeqSTAR 96 Universal, Peqlab, Erlangen
 - Thermocycler, Biometra, Leipzig
- Zentrifugen
 - Model V, Galaxy mini, VWR Scientific, Radnor, USA
 - Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg
 - 1-15 K, Sigma, Thum
 - Megafuge 1.0 R, Biofuge pico, Heraeus, Hanau
- Sequenziergeräte
 - 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems & Hitachi, USA & Japan
 - Pyromark Q24, Qiagen, Hilden
- Thermoblock
 - Block Heater, Stuart Scientific, Staffordshire, Großbritannien
- Thermomixer
 - Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Elektrophoresegeräte
 - QIAxcel, Qiagen, Hilden, Deutschland
 - Blue marine 200, Serva electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- Waage
 - Firma Sartorius, Göttingen
- Vortexer

- Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
- Schüttler
 - CM 9, Sarstedt, Nürnberg
- UV-Illuminationstisch
 - Peqlab, Erlangen
- Fotosystem und Fotodrucker
 - Peqlab Kamerasystem, Erlangen
 - P 93 Fotodrucker, Mitsubishi, Japan
- Spectrofotometer
 - Nanodrop, Peqlab, Erlangen
- Absorptionsmessgerät
 - Infinite 200 PRO, Tecan Group Ltd., Schweiz
- Mikrotom
 - Leica RM 2145, Leica Biosystems, Wetzlar
- Kryostat
 - Leica CM 3050S, Leica Biosystems, Wetzlar

2.1.2 Einzelne Chemikalien und Reagenzien

Es wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet, die nicht Bestandteil eines Kits waren:

- DNA-Polymerasen:
 - DFS-TAQ-Polymerase, Bioron GmbH, Ludwigshafen
 - SuperHotTaq-Polymerase, Bioron GmbH, Ludwigshafen
 - SuperHot Mastermix (2x), Bioron GmbH, Ludwigshafen
 - SYBR Green PCR Master Mix, Life Technologies, Carlsbad, USA
 - TaqMan Universal PCR-Master-Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- Agarose
 - Serva, Heidelberg
- Puffer & Marker
 - Ladepuffer
 - 6X DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 - 6X ORANGE DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 - Referenzpuffer

- ROX Reference Dye, Roche Applied Science, Mannheim
- Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer) pH 8,0
 - Tris-Base, Merck, Darmstadt
 - Borsäure, Merck, Darmstadt
 - EDTA, Merck, Darmstadt
 - 10,8g Tris + 5,5g Borsäure + 0,2g EDTA auf 1000ml destilliertes H₂O
- Elektrophoresemarker
 - O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 - GeneRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- PCR-Puffer & Salze
 - 10 x Buffer Incomplete without MgCl₂, Bioron GmbH, Ludwigshafen
 - 10 x Buffer Complete, Bioron GmbH, Ludwigshafen
 - 100 mM MgCl₂, Bioron GmbH, Ludwigshafen
- Phosphatgepufferte Salzlösung
 - PBS-Pulver, Merck, Darmstadt
 - 95,5g auf 1000ml destilliertes H₂O für eine 10-fach konzentrierte Lösung, die mit destilliertem H₂O zu einer 1-fach konzentrierten Pufferlösung verdünnt wird
- FastDigest Green Buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Pyrosequenzier-Puffer
 - Pyromark Annealing Buffer, Qiagen, Hilden
 - Pyromark Binding Buffer, Qiagen, Hilden
 - Pyromark Wash Buffer, Qiagen, Hilden
- Nukleotide
 - Set von dNTPs, Bioron GmbH, Ludwigshafen
- Verdauungsenzyme
 - DNase I, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 - FastDigest Apa1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 - FastDigest Hinf1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Trizol, Life Technologies, Carlsbad, USA
- Trypsin-EDTA, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
- Chloroform

- Phenol:Chloroform:IAA, 25:24:1, pH 6,6, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
- Proteinase-Inhibitor
 - Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™, Roche Diagnostics, Mannheim
- Lyse-Puffer
 - RIPA-Lysepuffer für Proteinextraktion: T-per, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA

2.1.3 Kits

- IGF2-ELISA, Mediagnost, Reutlingen
- Epiect Fast Bisulfite Kit, Qiagen, Hilden
- Pyromark Gold Q24 Reagents, Qiagen, Hilden
- Reverse-Transkriptase-Kits
 - RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 - Taqman™ MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
- NucleoSpin Tissue Kit, Macherey-Nagel, Düren
- DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.4 Patientenproben und Zelllinien

2.1.4.1 Patientenproben

Die Gewebeproben wurden aus radikalen Prostatektomie-Präparaten gewonnen. Die Patienten wurden in der Universitätsklinik Mannheim operiert. Die Operationen waren aus medizinischen Gründen indiziert und wurden nicht zu Forschungszwecken durchgeführt. Ausschließlich von aufgeklärten und einwilligenden Patienten wurde Material der Forschung zugeführt. Das Sammeln von humanem Material zu Studienzwecken wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Mannheim gestattet.

Von insgesamt 141 Fällen wurden Tumor- und Nicht-Tumor-Gewebe der gleichen Prostata entnommen, Teile des Frischgewebes wurden kryokonserviert und bei -80°C gelagert, andere Teile formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet. Jedes Präparat

wurde durch Pathologen der Universitätsklinik Mannheim beurteilt. In Tabelle 2 sind die klinischen Daten der Patienten aufgelistet, von denen Prostatamaterial untersucht wurde. Vor jeder Isolierung von Proteinen, RNA und DNA wurden von den asservierten Gewebeproben zur Kontrolle neue histologische Schnitte angefertigt und untersucht. Dadurch und durch exaktes Zuschneiden der Proben unter histologischer Kontrolle kann gewährleistet werden, dass in einer Probe trotz Makro-Dissektion fast ausschließlich tumoröses oder nicht-tumoröses Drüsengewebe vorliegt. Die klinischen Daten der 141 untersuchten Patienten sind in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Die klinischen Angaben zu Alter, PSA-Werten, Gleason-Score und pT-Stadium der untersuchten 141 Patienten. Fernmetastasen lagen zum Zeitpunkt der Operation nicht vor.

Patienten- und Tumoreigenschaften	
Alter in Jahren	
Mittleres Alter	64,0
Spannbreite	45-79
PSA-Werte (ng/ml)	
Mittelwert \pm Standardabweichung	8,86 \pm 6,39
Median	6,73
Spannbreite	2 - 58,8
Gleason-Score	Anzahl der Patienten
5	5
6	17
7	94
8	13
≥ 9	12
Median	7
pT Stadium	Anzahl (prozentualer Anteil)
2a	11 (7,8%)
2b	1 (0,7%)
2c	67 (47,5%)
3a	38 (27%)
3b	21 (14,9%)
4	3 (2,1%)

Zusätzlich zu den Prostataprobe wurde DNA aus einem Ovarial-Karzinom als Positivkontrolle für die methylierungsspezifische PCR verwendet. Diese Probe war Teil unserer Tumorbank, die nach schriftlicher Einwilligung der Patienten im Voraus für Forschungszwecke verwendet werden durfte.

2.1.4.2 Verwendete Zelllinien

Die teilweise für die hier genannten Versuche verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 3) wurden alle ständig nach gängiger Art in unseren Labors kultiviert und regelmäßig überprüft. Alle genannten Zelllinien sind in ihren Eigenschaften gut charakterisiert und auch kommerziell erhältlich. DNA und RNA der Zelllinien wurde lediglich zur Etablierung der Methoden verwendet, Da keine Experimente an Zellkulturen vorgenommen wurden, wird hier auf eine weitergehende Beschreibung der Kulturmethoden verzichtet.

Tabelle 3: Für diese Arbeit verwendete Prostatakarzinom-Zelllinien

Name	Histologie	Ursprung
PC3	Prostatakarzinom	Knochenmetastase
LNCaP	Prostatakarzinom	Lymphknotenmetastase
DU145	Prostatakarzinom	Hirnmetastase
BPH1	Prostataepithel	Prostata

2.1.5 Die Primersequenzen

Die folgenden Primer sind thematisch zusammengehörend in den Tabellen 4 bis 12 zusammengefasst. Die Primersequenzen wurden entweder aus Publikationen übernommen (im entsprechenden Methoden-Kapitel vermerkt), oder mittels Software (PyroMark Assay Design SW 2.0, Qiagen, Hilden) und frei zugänglicher Onlinetools (z.B. NCBI Primer Blast, siehe auch Kapitel 2.1.6) selbst entworfen.

Tabelle 4: Primersequenzen für die Genotypisierung des SNP auf Exon 9 von IGF2. Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur in Grad Celsius. Die Produktgröße ist in Basenpaaren angegeben. 5'-3' bezeichnet die Orientierung der Sequenz auf dem DNA-Strang.

	Sequenz 5'-3'	Ta (°C)	Produktgröße (bp)
Primer A	CTTGACTTTGAAGTCAAATTGG	55	292
Primer B	GGTCGTGCCAATTACATTTCA		

Tabelle 5: Primersequenzen für die Bestimmung von LOI/ROI von IGF2. Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur in Grad Celsius. Die Produktgröße ist in Basenpaaren angegeben. 5'-3' bezeichnet die Orientierung der Sequenz auf dem DNA-Strang.

Name	Sequenz 5'-3'	Ta (°C)	Produktgröße (bp)
IGF2_LC F (forward)	CTTGGACTTTGAGTCAAATTGG	55	1120
IGF2_LC R (reverse)	CCTCCTTTGGTCTTACTGGG		

Tabelle 6: Primersequenzen für Genexpressionsanalysen. Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur in Grad Celsius. Die Spezifität des Produkts wurde durch die Überprüfung der Schmelzkurve vorgenommen, daher wurde hier auf die Angabe der Produktgröße verzichtet. 5'-3' bezeichnet die Orientierung der Sequenz auf dem DNA-Strang.

Name	Sequenz 5'-3'	Ta (°C)
GAPDH for	GGTGGTCCAGGGCTCTTACT	60
GAPDH rev	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	
IGF II for	TGGAGACGTACTGTGCTACCC	60
IGF II rev	GGACTGCTTCCAGGTGTCAT	
CTCF for	CCCAACTTCGTCCCTGCGGC	60
CTCF rev	CGCCATCTGGGCCAGCACAA	
RB1 for	GCA ACC CTC CTA AAC CAC TG	60
RB1 rev	TTT CTG CTT TTG CAA TCG TG	

Tabelle 7: Name, Assay-ID und Sequenzen der zur miR-675 – Bestimmung verwendeten Taqman™-Sonde. Die Sequenz der microRNA ist in 5'-3'-Richtung angegeben.

Name	Assay-ID	Sequenz der reifen microRNA
hsa-miR-675*	121124_mat	CUGUAUGCCCUCACCGCUCA

Tabelle 8: Primersequenzen zur Bestimmung der Aktivität der IGF-II-Promotoren. Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur in Grad Celsius. Die Produktgröße ist in Basenpaaren angegeben. 5'-3' bezeichnet die Orientierung der Sequenz auf dem DNA-Strang. Für alle 4 PCR-Produkte wurde ein gemeinsamer rev-Primer verwendet.

Name	Sequenz 5' – 3'	Ta (°C)	Produktgröße (bp)
IGF-II P1for	GCTCCCAGAACTGAGGCTGG	55	147
IGF-II P2for	TGCCACAGAGCGTTCGATCG	59	158
IGF-II P3 for	GCTGTTCGGTTTGCGACACG	59	144
IGF-II P4 for	GCTTCTCCTGTGAAAGAGAC	57	174
IGF-II P1-4 rev	GCGGTAAGCAGCAATGCAGC		

Tabelle 9: Primersequenzen für die Methylierungsspezifische PCR. Die Bezeichnung „M“ steht für methyliert, die Bezeichnung „U“ für unmethyliert. Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur in Grad Celsius. Die Produktgröße ist in Basenpaaren angegeben. 5'-3' bezeichnet die Orientierung der Sequenz auf dem DNA-Strang.

Name	Sequenz 5' – 3'	Ta (°C)	Produktgröße (bp)
P 2A M for	CGGATTTTTTACGCGGGGATCG	59	127
P 2A M rev	CCGAACCTAACGAACGTCCG		
P 2A U for	GTTTGTGGATTTTTATGTGGGGATTG	59	137
P 2A U rev	ACACCCAACTTAACAAACATCCA		
P 2B M for	TTAGTCGGTCGTGCGCGTTA	62	138
P 2B M rev	CGAACCAACGAAAAAAAAACGCTACCG		
P 2B U for	AGAATTTTAGTTGGTTGTGTGTGTTA	62	148
P 2B U rev	TTCCCAAACAACAAAAAAAAAACTACCA		
P 2C M for	GACGTTAATTTTCGGGGACGTT	55	363
P 2C M rev	AACGCGAAATAAACGAACGTATACGA		
P 2C U for	TTTTGGATGTTAATTTTTGGGGATGTT	55	373
P 2C U rev	AAAAAACACAAAATAAACAAACATATACAA		
P 3A M for	CGTAGTCGGTTTTTCGCGCG	64	149

P 3A M rev	CGAACGAAACGCGCAACCG		
P 3A U for	TGGTGTAGTTGGTTTTTTGTGTGTT	64	159
P 3A U rev	CCTAAACACAAACAAAACACACAACCA		
P 3B M for	TTTACGAGTATAGGTCGTTCCGGGTATT	60	367
P 3B M rev	CGCCGAAAAACAAACGAACTACG		
P 3B U for	TTTTAGTTTATGAGTATAGGTTGTTTGGGTATT	60	380
P 3B U rev	CAACTCCACCAAAAAACAAACAACTACA		
P 4A M for	CGGTAGCGTCGTCGGTTTTTTAG	66	208
P 4A M rev	CGCGCAAAAAACGAAACCCG		
P 4A U for	GTGGGTGGTAGTGTGTTGGTTTTTTAG	66	219
P 4A U rev	AAACTCCACACAAAAAACAAACCCACA		
P 4B M for	CGAGATCGCGAGAGGAAGACG	62	217
P 4B M rev	CGCGACCTCTCTCCGAATCG		
P 4B U for	GTGTTAGTGAGATTGTGAGAGGAAGATGGG	62	226
P 4B U rev	ACCACAACCTCTCTCCAATCAAAAACCT		

Tabelle 10: Konvertierungsspezifische Primer zur Testung einer erfolgreichen Konvertierung mittels konventioneller PCR. Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur in Grad Celsius. Die Produktgröße ist in Basenpaaren angegeben. 5'-3' bezeichnet die Orientierung der Sequenz auf dem DNA-Strang.

Name	Sequenz 5'-3'	Ta (°C)	Produktgröße (bp)
H19-ICR forward	GTATAGTATATGGGTATTTTTGG	56	250
H19-ICR reverse	CTATAAATATCCTATTCCCAAATA	56	

Tabelle 11: Sequenzen der Primer zur Quantifizierung der Methylierung der CTCF-Binding-Site 6. Die Binding-Site (BS) wurde auf Grund der Größe in 2 Sequenzier-Abschnitte unterteilt (BS 6-1 und BS 6-2). Die Orientierung der Sequenzen ist in 5'-3'-Richtung angegeben.

Name	Forward PCR Primer	Reverse PCR Primer	Sequenzier-Primer	Biotinylierter Primer
BS 6-1	GGGGTTTTGTATAGT	AACTTAAACTATAATATAAA	TGTATTTTTGGAG	rev
	ATATGTGTATTT	AACCTACACT	GTTTTTT	
BS 6-2	AGTGTAGGTTTTTATA	TAACTCCCATAAATATTCTA	CTATCCCTCACTA	for
	TTATAGTTTAAGT	TCCCTCACTA	CC	

Tabelle 12: Sequenzen der Primer zur Quantifizierung der Promotormethylierung. Die Promotoren wurden zur genaueren Analyse in verschiedene Bereiche unterteilt. Die Orientierung der Sequenzen ist in 5'-3'-Richtung angegeben.

Name	Forward PCR Primer	Reverse PCR Primer	Sequenzier-Primer	Biotinylierter Primer
P2A	AGTTAAGTAGGGGATT	ATTTTTTTTTTTCTTTACCTT	GGTTTAGTTTAG	for
	AGTTTGTTT	CTCCAC	GTT	
P2B	GTTTTTAGTGTGGAGA	CCCCCAAAATCAAAAACCT	AAATCAAAAACCTA	for
	AGGTAAAGAAA	AATTATTAATA	ATTATTAAACTC	
P2C1	TTTGGGATTTTTTAAAT	ATCCAAAACCTAAAAAAAAA	CCAAACCACATAA	for
	TTAAGTATTGTT	CACATCTA	TATAAATCT	
P2C2	TTTTTAGGTTTTATAGA	AATTCCTATTTTTTAAAAA	AGGTTTTATAGAT	rev
	TTTATAGGTTAT	CAATACCT	TTATAGGTTATT	
P2C3	GGATGTGGATAGTGTT	AACCCAACAACAATATCC	AATATTAATTTTA	rev
	TTTTTTATATTTAG	CATACTA	GGGTTTTTTAAG	
P3	TTTAGTAGGTTTTAAG	CCACCTACCCAACAATAA	TTAAAACCTCAAC	for
	TTTGTTTAGAT		CA	
P4A	GGAGTGTTAGGTAGG	CCCCTACAAACACCTCAC	GTGTTAGGTAGG	for
	AGGGTTA		AGGGTTAA	
P4B1	TTGGTTTTAGGGGTGT	AAAACCTACCTTCTTAAC	CTCTCCCCAAACT	for
	TGGGTAA	CT	CCTATTTAA	
P4B2	GGGTTGTTGGTTTGAG	CTCCTCCCACCTCCTTAT	GTTAAGAAGGGT	Rev
	GTTAAGAA	AT	AGAGTT	

2.1.6 Datenbanken

Die folgenden, im Internet frei zugänglichen Datenbanken bzw. Portale kamen zum Einsatz:

- Literaturrecherche: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Gendatenbank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- Nukleotidsequenz-Recherche: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Auffinden von CTCF-Bindemotiven: <http://jaspar.genereg.net>

2.2 Methoden

2.2.1 Die Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Die Präparation von genomischer DNA aus Gewebe und Zelllinien

Für die Präparation von DNA aus Gewebe wurden 50-100 mg kryokonserviertes Gewebe aus Tumoren und Normalgewebe der Prostata am Kryotom (Leica, Wetzlar) in 10 µm dicke Röllchen geschnitten und mechanisch zerkleinert. Zellen aus Zelllinien wurden mit PBS gewaschen und durch Trypsin gelöst. Zerkleinertes Gewebe oder Zellsuspensionen wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers des Extraktionskits (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel, Düren) mit Lysepuffern und Proteinase K inkubiert.

Der eigentliche Prozess der Bindung und Aufreinigung von DNA erfolgte über die Interaktionen der Nukleinsäuren mit einer Silikonmembran, die in Zentrifugationssäulen vorgehalten DNA bindet. Nach mehreren Waschschritten mit verschiedenen Pufferlösungen, jeweiliger Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 min und anschließender Trocknung durch Zentrifugation bei 12000 U/min für 1 min wurde die DNA mit nukleasefreiem Wasser aus der Silikonmembran durch Zentrifugation eluiert. Die resuspendierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 Die Präparation von RNA aus Gewebe und Zelllinien

Die Präparation von RNA wurde mit der sogenannten Trizol-Methode durchgeführt. Trizol ist ein Reagenz, das RNA stabilisiert und gleichzeitig DNA, Proteine und andere Zellbestandteile zersetzt. Durch Zugabe von Chloroform kann weiterhin eine

Phasentrennung verursacht werden, was erlaubt, die in Wasser gelöste RNA abzunehmen.

Zur Durchführung wurden 50-100 mg kryokonserviertes Gewebe, welches am Kryotom in ca. 10 µm dicke Röllchen geschnitten wurde, in 1000 µl Trizol mit Pipettenspitzen homogenisiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 12000 U/min bei 4 °C für 10 min und Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß wurde jeweils 200 µl Chloroform zugegeben. Nach Schütteln für 15 s und erneutem Zentrifugieren bei 4 °C bei 12000 U/min für 15 min erfolgte die Phasentrennung. Die wässrige Phase mit der gelösten RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die RNA mit 1000 µl Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugieren bei 4 °C bei 12000 U/min für 30 min und Abnahme des Überstands wurde das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in sterilem, RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die resuspendierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Messung der Nukleinsäurenkonzentrationen

Zur fotometrischen Bestimmung der Konzentrationen der Nukleinsäuren (RNA und DNA) wurde ein Nanodrop™-Gerät (Peqlab, Erlangen) benutzt. Die optische Dichte der Nukleinsäurelösungen wurde bei 260 nm gemessen und durch die Quotienten aus 260 nm/280 nm bzw. 260 nm/230 nm eine mögliche Kontamination durch Proteine bzw. Salze ausgeschlossen.

2.2.2 Die Bestimmung des Imprintings von *IGF2*

Die Bestimmung des Imprintingstatus und die dafür im Vorfeld nötigen Versuche beruhen auf einem SNP in der Schnittstelle für das Restriktionsenzym Apa1 auf Exon 9 des *IGF2*-Gens. Diesen SNP nutzt man in einem zweischrittigen Verfahren aus, um zu untersuchen, ob ein ROI oder ein LOI für *IGF2* vorliegt (siehe Abbildung 6). Fälle, die mit diesem Verfahren untersucht werden sollen, müssen für diesen SNP heterozygot sein.

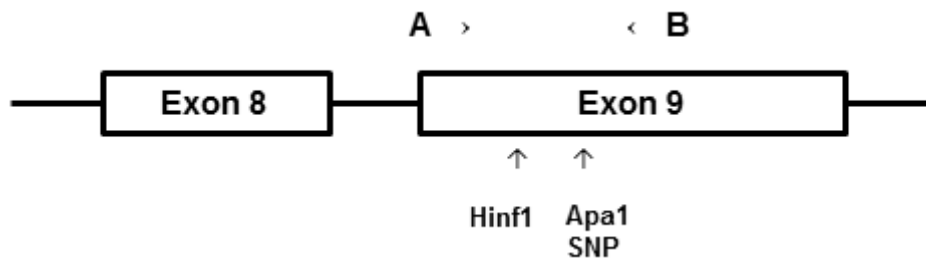


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Exon 9 eines *IGF2*-Allels. A und B symbolisieren die Primer-Bindungsstellen der PCR. Hinf1 und Apa1 sind die hier verwendeten Restriktionsenzyme. Die senkrechten Pfeile symbolisieren die jeweiligen Schnittstellen der Enzyme, die waagrechten Pfeile die Ausrichtung der Primersequenz entsprechend *forward* und *reverse* Primer (Abbildung nach: [198]).

2.2.2.1 Die Bestimmung des Genotyps und Test auf LOH

Im ersten Schritt wurde die DNA der Proben auf ihren Genotyp hinsichtlich des SNP untersucht. Nur bei heterozygoten Fällen kann mit dieser Methode festgestellt werden, ob ein oder beide Allele abgelesen werden, also ob ein LOI oder ROI vorliegt.

Das Exon 9 von *IGF2* wurde in einer PCR mit den Primern A und B (siehe Tabelle 4) amplifiziert [198]. Zusätzlich zur Apa1-Schnittstelle weist das Exon eine Schnittstelle für Hinf1 auf, ebenfalls ein Restriktionsenzym. Wird das PCR-Produkt dann einem Verdau mit beiden Restriktionsenzymen unterzogen, kann durch eine Gel-Elektrophorese eine Fragmentierung des Produkts nachgewiesen werden. Hat die Probe keinen SNP für Apa1, wird das Produkt nur von Hinf1 geschnitten, daraus resultiert in der Elektrophorese nur eine Bande mit einer charakteristischen Produktgröße. Ist die Probe homozygot für den SNP, ergibt sich ebenfalls nur eine Bande, durch die andere Position der Schnittstelle jedoch mit einer anderen, ebenfalls spezifischen Produktgröße. Hat die Probe den SNP auf einem Allel, resultiert dies in einer Doppelbande. Da immer Tumor- und Normalgewebe eines Patienten untersucht werden, ist dies somit gleichzeitig eine Untersuchung auf LOH.

Die PCR mit den Primern A und B erfolgte nach einer initialen Denaturierung bei 94 °C für vier Minuten, es wurden 40 Zyklen durchgeführt, jeweils eine Minute bei 94 °C, 30 s zur Primerbindung bei 55 °C und 30 s bei 72 °C und einer abschließenden Elongation von sieben Minuten bei 72 °C.

Der Verdau des PCR-Produkts erfolgte mit den Restriktionsenzymen „FastDigest Apa1“ und „FastDigest Hinf1“ zusammen mit dem Reaktionspuffer „FastDigest Green Buffer“ gemäß dem Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 37 °C für 20 min. Durch eine anschließende Inkubation der Proben für 5 min bei 65 °C wurde die Reaktion gestoppt.

Die Auftrennung der Verdauungsprodukte erfolgte auf einem 2%igem Agarose-Gel. Zur Identifizierung der Produktgröße wurden Elektrophoresemarker der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet.

2.2.2.2 Die Kontrolle der Allelexpression

Die Untersuchung auf LOI bzw. ROI verläuft nach dem gleichen Prinzip, allerdings verwendet man hier für die PCR und den Verdau die cDNA der zuvor getesteten heterozygoten Proben. Zur Herstellung der cDNA siehe unten in Kapitel 2.2.3.1. Die cDNA wird vor dem Verdau ebenfalls in einer PCR amplifiziert. Es wurden die Primer „IGF2_LC F“ und „IGF2_LC R“ verwendet (siehe Tabelle 5). Die PCR-Bedingungen waren dieselben wie zur Genotypisierung des SNP. Durch den vor der cDNA-Synthese durchgeführten DNase-Verdau (siehe 2.2.3.1) wurde eine DNA-Kontamination ausgeschlossen.

cDNA enthält als reverses Transkript der mRNA die Exone eines Gens, somit auch den hier beschriebenen SNP. Werden die heterozygoten Proben mit Apa1 und Hinf1 verdaut, kann man aus dem Muster der Banden erkennen, ob ein oder beide Allele abgelesen werden. Die Proben werden in zwei Ansätzen verdaut: ein Doppel-Verdau mit Apa1 und Hinf1 und ein Verdau nur mit Hinf1. Bei Proben, die denen beide Allele abgelesen werden, einem LOI entsprechend, resultieren im Doppel-Verdau zwei Banden. Bei Ablesen nur eines Allels, einem ROI entsprechend, weist der Verdau nur eine Bande auf. Zur Durchführung wurden 10 µl des PCR-Produkts wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben verdaut und anschließend mittels Agarose Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt.

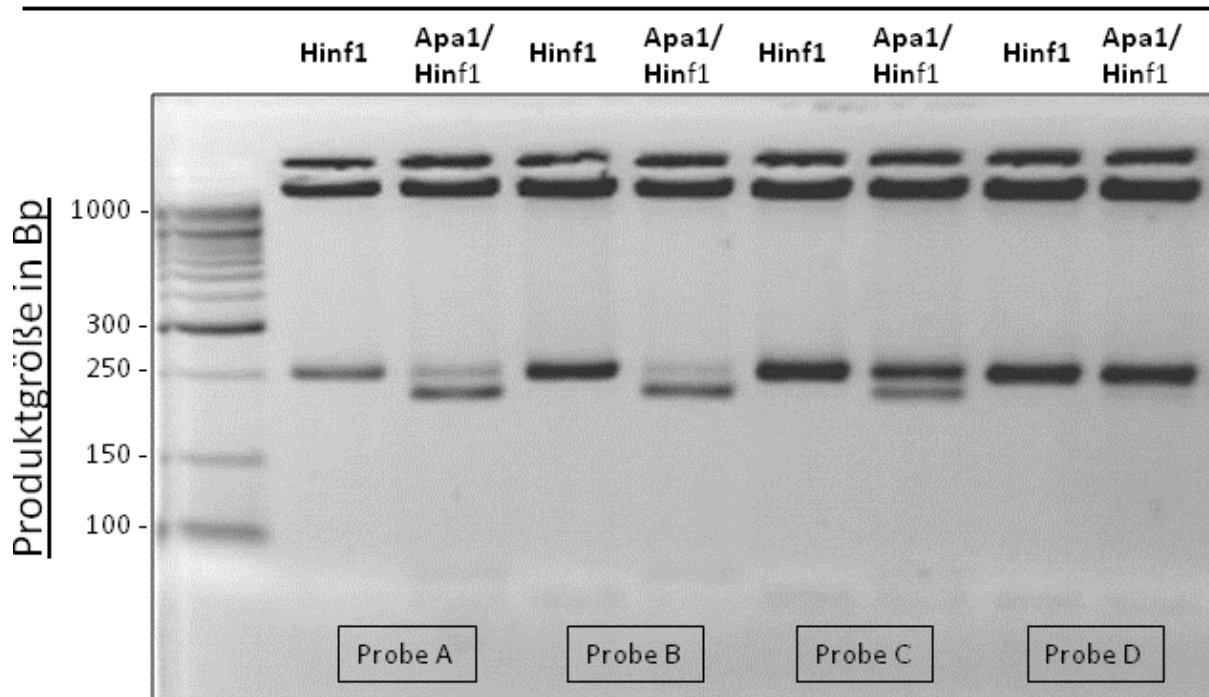


Abbildung 7: Bild einer Gelelektrophorese zur LOI/ROI-Bestimmung. Alle Proben werden einem Doppel-Verdau mit Apa1 und Hinf1 und einem Verdau mit nur Hinf1 unterzogen. Die Proben A, B und C weisen im Doppelverdau eine Doppelbande auf und sind somit LOI. Probe D weist auch im Doppelverdau nur eine Bande auf und ist somit ROI. Die Produkte der Restriktionsenzyme haben eine spezifische Größe, überprüft durch den mitgelaufenen Marker ganz links

2.2.3 Die Genexpressionsanalyse mit quantitativer Reverse-Transkriptase-PCR

2.2.3.1 Die Herstellung von cDNA

Vor der cDNA-Synthese wurde die RNA einem DNase-Verdau unterzogen, um eine Kontamination zu vermeiden. Hierfür wurde DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Protokoll des Herstellers bei 37 °C für 30 min verwendet.

Die Herstellung der cDNA erfolgte mittels Reverse-Transkriptase (RT) mit dem „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Protokoll des Herstellers. Zur Synthese wurden oligo(dT)-Primer eingesetzt, welche unspezifisch am poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden. Pro Probe wurden 500 ng RNA eingesetzt und für 60 min bei 42 °C transkribiert.

Zur Verifizierung der erfolgreichen cDNA-Synthese wurde mit jeder Probe eine für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spezifische PCR mit den vom Hersteller mitgelieferten Primern nach Protokoll des Herstellers - Primer-Annealing bei 58 °C für 30 s, 30 Zyklen - durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Die Quantitative Reverse Transkriptase-PCR

Zusätzlich zum Nachweis einer bestimmten Nukleinsäuresequenz wie bei einer herkömmlichen PCR kann mit der quantitativen Reverse Transkriptase-PCR (RT-qPCR) das PCR-Produkt quantifiziert werden. Verwendet man cDNA als Ausgangsprodukt, kann man so spezifische Genexpressionsanalysen vornehmen. Die Quantifizierung erfolgt über Fluoreszenzmessungen, die in Echtzeit während der PCR durchgeführt werden, daher auch der häufig verwendete englische Ausdruck der *real-time* PCR.

Zur Bestimmung der Expression von *IGF2* und *CTCF* nutzten wir den interkalierenden Farbstoff SYBR Green I, ein Cyanin-Farbstoff. SYBR Green I bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA [199]. Der hierbei entstehende Komplex emittiert grünes Licht und absorbiert blaues Licht. Das Fluoreszenzsignal wird durch eine spezielle Kamera des Thermocycler-Gerätes detektiert. Wird nun die DNA in der PCR vervielfältigt, steigt das Fluoreszenzsignal mit jedem PCR-Zyklus. Bei optimalen PCR-Bedingungen ist die Zunahme der Ziel-DNA, bestimmt durch das verwendete Primer-Paar, exponentiell. Der PCR-Zyklus, bei dem zum ersten Mal eine exponentielle Vermehrung stattfindet, wird „Schwellen-Zyklus“ (engl.: *cycle threshold*, ct), genannt. Wir verwendeten zur relativen Quantifizierung die sogenannte $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode, wobei gleichzeitig zur Ziel-DNA ein Referenz-Gen amplifiziert wird, von dem man ausgeht, dass es jede Zelle gleichmäßig exprimiert. Als Referenz-Gen verwendeten wir GAPDH. Der Vergleich des ct-Werts des Ziel-Gens zum ct-Wert des Referenz-Gens, der Δct -Wert, ist somit ein Maß für die Expression des Ziel-Gens. Der Vergleich der Δct -Werte zwischen den verwendeten Proben, der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert, erlaubt eine Aussage darüber, ob das Ziel-Gen unterschiedlich stark exprimiert wird [200]. Somit können durch Vergleich der einzelnen ct-Werte zwischen den verwendeten Proben Rückschlüsse auf die Expression eines Gens gezogen werden und nach der $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode [200] eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression vorgenommen werden. Durch eine Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der PCR überprüft. Bei Denaturierung des doppelsträngigen PCR-Produkts bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur wird der Fluoreszenzfarbstoff frei und kann detektiert werden. Andere PCR-Produkte, z.B. Primerdimere oder unspezifische Produkte, unterscheiden sich in ihrer Schmelztemperatur und weisen dadurch ein anderes Fluoreszenzsignal auf [201].

2.2.3.2.1 Die Bestimmung der *IGF2*-Expression

Zur Bestimmung der *IGF2*-Expression wurden speziell für qRT-PCR entworfene Primer verwendet (Tabelle 6). Die Versuche wurden auf dem „Step One Plus Real-Time PCR-System“ (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Proben wurden als Duplikate vorgelegt, die ct-Werte gegen GAPDH normalisiert ($\Delta ct = ct \text{ IGF2} - ct \text{ GAPDH}$). Zur Analyse der $\Delta\Delta ct$ -Werte wurden die mittleren ct-Werte unter Berücksichtigung der Standardabweichung verwendet. Pro einzelne Reaktion wurde 1 μl cDNA in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C folgten 40 PCR-Zyklen mit SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, USA). Das Primer-Annealing, also das Hybridisieren der Primernukleotide mit der Einzelstrang-DNA, erfolgte bei 60 °C.

2.2.3.2.2 Die Bestimmung der *CTCF*-Expression

Zur Bestimmung der *CTCF*-Expression wurden speziell für qRT-PCR entworfene Primer verwendet (Tabelle 6). Die Versuche wurden ebenfalls auf dem „Step One Plus Real-Time PCR-System“ (ABI, USA) unter den gleichen Bedingungen wie zur *IGF2*-Expressionsanalyse durchgeführt.

2.2.3.2.3 Die Bestimmung der *RB* – Expression

Unter den gleichen Bedingungen wurde die Genexpression von *RB* bestimmt. Die Primersequenzen sind ebenfalls in Tabelle 6 aufgelistet.

2.2.4 Die Bestimmung der microRNA miR-675

Für den Nachweis und die Quantifizierung der microRNA benutzten wir wie für die Genexpressionsanalyse eine qRT-PCR (siehe 2.2.3.2), allerdings wurde hierfür das „Taqman“-Verfahren benutzt, eine spezielle FRET-PCR. FRET steht für Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer. Im FRET-Prinzip wird Energie von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen. Werden Fluorochrome als Donor bzw. Akzeptor verwendet, kann deren Fluoreszenzänderung durch das qRT-PCR-Gerät detektiert werden. Beim Taqman-Verfahren nutzt man eine modifizierte Oligonukleotid-Sonde, die sogenannte Taqman-Sonde. Diese ist komplementär zur Zielsequenz der zu amplifizierenden cDNA. Außerdem ist die Sonde am 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und gleichzeitig am 3'-Ende mit einem Quencher, einem Fluoreszenzlöcher, bestückt. Der

Quencher unterbindet das Fluoreszenzsignal, solange Farbstoff und Quencher in räumlicher Nähe sind. Bindet die Sonde, ist zunächst kein Lichtsignal detektierbar. Bei Elongation der Sonde am cDNA-Strang durch eine Polymerase mit gleichzeitiger Exonuklease-Aktivität wird allerdings der Fluoreszenz-Farbstoff von seinem Quencher getrennt, und es kann ein Lichtsignal detektiert werden. Ein Lichtsignal ist also nur detektierbar, wenn die Sonde bindet und eine Elongation stattfindet. Somit ist das detektierte Lichtsignal proportional zur Menge der vervielfältigten Zielsequenz.

Die Quantifizierung erfolgt auch hier über die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode (siehe 2.2.3.2). Als Referenz wurde in dieser Anwendung RNU24 verwendet, eine microRNA, die stabil exprimiert und daher vom Hersteller der Taqman-Sonden (Applied Biosystems, USA) empfohlen wird.

Wie bei der konventionellen cDNA-Synthese (siehe 2.2.3.1) wird die RNA durch Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Aufgrund der geringen Größe und der anderen Struktur der microRNA muss man zur reversen Transkription aber ein anderes Prinzip anwenden. Hierbei wird durch eine spezielle RT und einen speziellen Primer das 3'-Ende der microRNA verlängert. Für jede Ziel-microRNA muss eine spezifische RT-Reaktion erfolgen, also auch für die Referenz-microRNA. Der hier verwendete spezifische Primer ist ein sogenannter „Stem-loop“-Primer [202]. Er bildet am 3'-Ende der microRNA eine Schlaufe, stabilisiert so die microRNA und bildet den Startpunkt für die RT. Für die RT-Reaktion verwendeten wir das „Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, USA), welches sämtliche benötigten Reagenzien enthält. Die spezifischen Primer wurden ebenfalls durch die Firma Applied Biosystems entworfen und sind kommerziell erhältlich. Die RT-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen: 30 min bei 16 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C mit anschließender Kühlung auf Eis gemäß dem Protokoll des Herstellers. Pro Reaktion wurden 10 ng RNA eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und unter Verwendung von RNAse-freien Materialien; zusätzlich wurde ein RNAase-Inhibitor beigelegt (im Reverse Transkriptase Kit enthalten).

Direkt nach Umschreiben der microRNA wurde die gewonnene cDNA ohne Zwischenlagerung mittels qRT-PCR auf dem „Step One Plus Real-Time PCR-System“ (Applied Biosystems, USA) quantifiziert. Die Proben wurden als Duplikat vorgelegt. Pro Reaktion wurden 4 μl des RT-Produktes und 5 μl Taqman-PCR-Mastermix und 1 μl der spezifischen Taqman-Sonde eingesetzt.

Zur hier vorgenommenen Analyse der miR-675 wurde eine kommerziell erhältliche Taqman-Sonde verwendet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Details zu diesem Produkt siehe Tabelle 7.

2.2.5 Die Bestimmung der Promotoraktivität von *IGF2*

Um die Aktivität der vier verschiedenen *IGF2*-Promotoren zu untersuchen, wurden die zu den verschiedenen Promotorregionen gehörenden Transkriptvarianten auf cDNA-Ebene mit einer qRT-PCR per $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode quantifiziert (siehe 2.2.32.2.3). Als Referenzgen wurde ebenfalls *GAPDH* verwendet. Die hierfür verwendeten, ursprünglich für eine Multiplex-PCR entworfenen Primer (Tabelle 8) wurden aus einer Publikation übernommen [112] und von uns für eine qRT-PCR etabliert. Hierfür wurde cDNA aus verschiedenen Zelllinien verwendet (siehe 2.1.4.2). Die vier verschiedenen Transkriptvarianten werden durch vier spezifische Forward-Primer und einen gemeinsamen Reverse-Primer nachgewiesen. Der Reverse-Primer bindet in Exon 9 von *IGF2*, die spezifischen Forward-Primer jeweils in einem Exon, das hinter dem zugehörigen Promotorbereich liegt (Abbildung 8). Durch alternatives Spleißen resultiert aus den verschiedenen Transkripten dasselbe Protein.

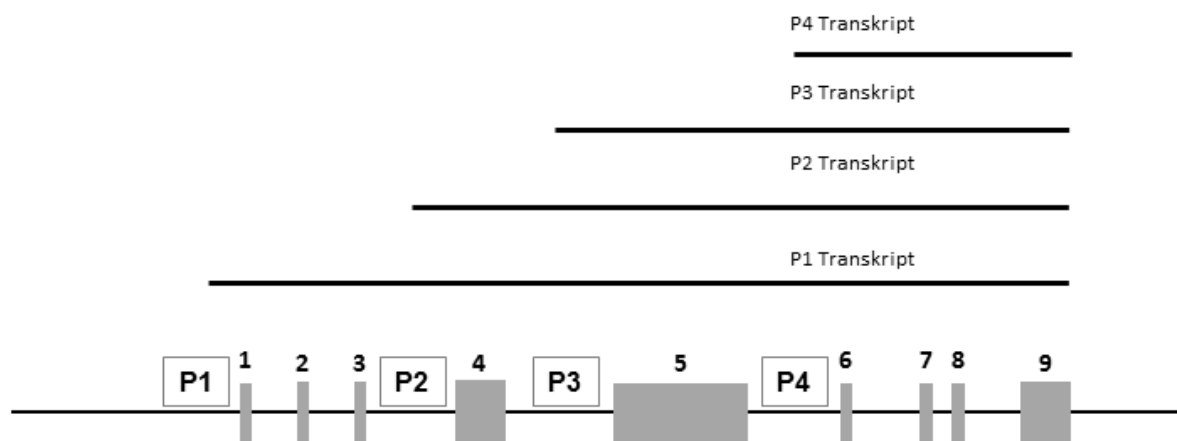


Abbildung 8: Schema der *IGF2*-Promotoren. P1 bis P4 bezeichnen die vier Promotoren, analog dazu darüber liegend die jeweiligen Transkripte. Die grauen Rechtecke dazwischen symbolisieren die Exone, die Zahl darüber deren Nummerierung. Durch Entwerfen Transkript-spezifischer Primerpaare und Amplifikation von cDNA kann auf die Aktivität des jeweiligen Promotors geschlossen werden. (Abbildung nach: [112])

Die verschiedenen Primer resultieren in unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte und können somit durch eine Schmelzkurvenanalyse spezifiziert werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Genexpressionsanalyse von *IGF2* und *CTCF* auf dem gleichen Gerät, siehe Kapitel 2.2.3.2.1

Die relative Aktivität der Promotoren untereinander wurde im Vergleich zu der am stärksten exprimierten Transskriptvariante bestimmt und dann ebenfalls mit der $\Delta\Delta$ ct-Methode relativ quantifiziert. Statt des Referenzgens wurde hier also auf die am stärksten exprimierte Transskriptvariante normalisiert. Dies wurde für N und T getrennt voneinander vorgenommen.

2.2.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen und IGF2-ELISA

2.2.6.1 Präparation von Proteinen aus Gewebe

Zur Präparation von Proteinen wurde analog zur Nukleinsäurenpräparation aus kryokonserviertem Gewebe mittels Kryotom pro Probe jeweils 10 μ m dicke Röllchen geschnitten, welche mit 500 μ l RIPA-Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) versehen wurden, dann mittels Gewebehomogenisator zerkleinert und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden. Zusätzlich wurden 12,5 μ l Proteinase-Inhibitor (Roche, Mannheim) hinzugefügt. Das Inkubieren für 45 min auf Eis erfolgte für ein verbessertes Auflösen unter gelegentlichem Schütteln. Anschließend wurde nach Zentrifugieren bei 12000 U/min für 30 min bei 4 °C der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mithilfe des DC Protein Assays (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) auf dem Infinite Pro 200 Absorptionmessgerät (Tecan Group Ltd., Schweiz). Der Assay beruht auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und der anschließenden Reduktion einer Folin-Lösung durch die Proteine. Die hierbei entstehende blaue Farbentwicklung wird zur Absorptionmessung genutzt [203].

Zur Durchführung des Assays wurde 1 μ l Proteinlösung in 20 μ l eines Gemisches aus Reagenzien S und A (im Verhältnis 1:50) verdünnt. Reagenz A ist eine alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung, Reagenz S eine 5%ige SDS-Lösung. Dazu wurden noch 200 μ l Reagenz B, eine Folin-Lösung, pipettiert. Die auf diese Weise 1:200 verdünnten Proteine wurden dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Probe wurde als

Triplikate vorgelegt. Nach Inkubation wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Aus den Mittelwerten der Triplikate wurden mit Hilfe einer Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

Zur Bestimmung der Standardkurve wurde die optische Dichte von Kontrollproben mit bekannter Proteinkonzentration bestimmt. Die Kontrollproben wurden ebenfalls als Triplikate gemessen, aus den Mittelwerten wurde durch Interpolation eine Geradengleichung nach $f(y)=mx+b$ erstellt, mit der für jede gemessene optische Dichte (y-Wert) die Proteinkonzentration der Probe errechnet werden kann (x-Wert). Vor Bestimmung der Kontrollproben wurde zudem die Extinktion des Leerwerts gemessen, der von jeder gemessenen optischen Dichte abgezogen wurde.

2.2.6.3 IGF2-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Zur Quantifizierung von IGF2 im Prostatagewebe wurde der IGF2-ELISA der Firma Mediagnost, Reutlingen, benutzt. Der Assay weist keine Abhängigkeit von IGF2-Bindeproteinen (IGFBP) auf. Durch die Ansäuerung der Probe wird natives IGF2 aus dem Bindungsproteinkomplex mit IGFBP frei und kann durch den Antikörper gebunden werden [204].

Mit Hilfe eines ELISA-Tests lassen sich Proteine spezifisch nachweisen und quantifizieren. Das Entscheidende bei dieser Methode ist, dass das gesuchte Protein an spezifische Antikörper gebunden wird. Der hier verwendete Assay ist ein sogenannter Sandwich-ELISA, bei dem ein spezifischer Antikörper für IGF2 auf einer festen Phase, hier eine Mikrotiterplatte, gebunden ist. Dieser Antikörper bindet an das IGF2-Protein in der Probe. Ein zweiter, biotinylierter Antikörper bindet anschließend ebenfalls an das immobilisierte IGF2-Protein. An diesen zweiten Antikörper bindet im nächsten Schritt ein Komplex aus Streptavidin und Peroxidase. Dieses Enzym katalysiert das anschließend hinzugegebene Substrat, wobei ein Farbumschlag sichtbar wird. Somit ist der entstehende Farbumschlag quantitativ abhängig vom IGF2-Gehalt der Proben.

Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Proben wurden als Duplikat in einer Verdünnung in H₂O von 1:20 vorgelegt und die IGF2-Konzentration nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor über eine Standardkurve (genauere Beschreibung siehe Kapitel 2.2.6.2), gebildet aus vom Hersteller mitgelieferten Standardseren mit bekannter IGF2-Konzentration, berechnet.

Es wurden 17 gepaarte Proben untersucht, d.h. jeweils Tumorgewebe und Normalgewebe desselben Patienten. Da die Proben testbedingt nur teilweise informativ für ihren Imprintingstatus waren, wurden diese unabhängig von LOI/ROI analysiert.

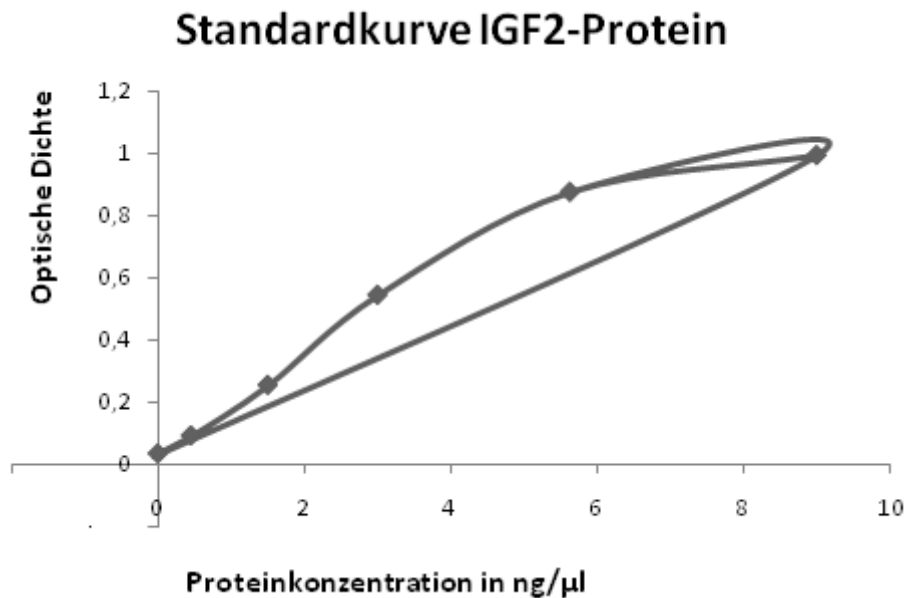


Abbildung 9: Standardkurve des IGF2-ELISA, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen der zu analysierenden Proben bestimmt wurden. Die Rauten symbolisieren die Mittelwerte der als Duplikate bestimmten Werte der optischen Dichte der mitgelieferten Kontrollseren bekannter Konzentration.

2.2.7 Die Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalysen beruhen sequentiell auf zwei verschiedenen Verfahren, die beide auf der Konvertierung von DNA durch Bisulfit basieren. In einem ersten Schritt wurde die Methylierung semiquantitativ mit Hilfe der methylierungsspezifischen PCR bestimmt. Bei Hinweisen auf eine differentielle Methylierung wurde in einem zweiten Verfahren eine exakte Quantifikation der Methylierung mittels Pyrosequenzierung durchgeführt.

2.2.7.1 Bisulfitkonvertierung

Eine Bisulfitkonvertierung führt bei unmethylierten Cytosinbasen zum Verlust der Aminogruppe [205]. Somit wird aus Cytosin Uracil (Abbildung 10). Wird die so veränderte Sequenz in einer PCR amplifiziert, werden durch die Polymerasen Thymin in den DNA-Strang eingebaut. Ist die Cytosinbase allerdings methyliert, ist sie vor der Konvertierung zu Uracil geschützt [206].

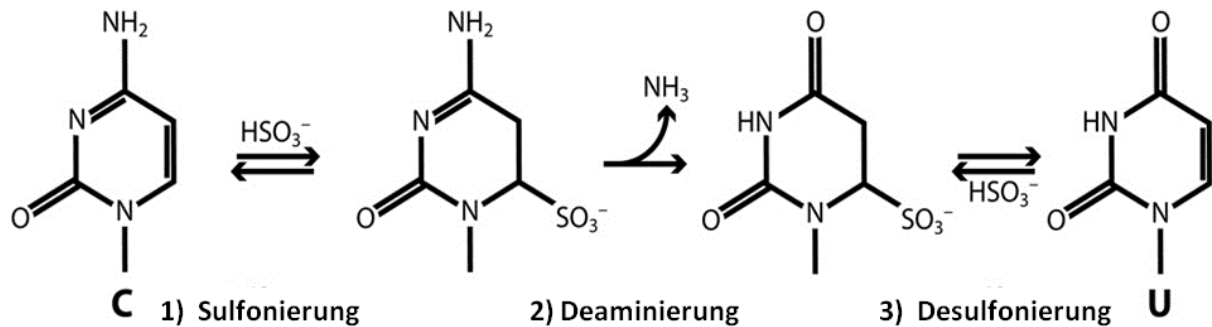


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Konvertierungsreaktion. C und U sind die Abkürzungen für Cytosin und Uracil [Abbildung nach: 207]. Im ersten Schritt erfolgt die Sulfonierung, dann die Deaminierung, im letzten Schritt wird Sulfat wieder abgespalten.

Bei konvertierter DNA kann man somit eine Methylierungsanalyse durchführen, denn es kommt in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Cytosinmethylierungen zu Sequenzänderung bzw. Ausbleiben einer solchen (beispielhaft gezeigt in Tabelle 7).

Tabelle 7: Beispiel der DNA-Sequenzänderung durch Konvertierung mit Bisulfit. Aus einem nicht methylierten Cytosin (C) wird ein Uracil (U). Methylierung von C tritt nur an CG-Stellen auf, auf Grund des Phosphat-Grundgerüsts der DNA CpG-Stelle genannt.

	Sequenz vor Konvertierung	Sequenz nach Konvertierung
Unmethylierte DNA	ACG ACG TGA ACG GTA	AUG AUG TGA AUG GTA
Methylierte DNA	ACG ACG TGA ACG GTA	ACG ACG TGA ACG GTA

Durch eine Sequenzierung nach Vervielfältigung der zu untersuchenden Sequenz kann eine quantitative Aussage über den Methylierungsgrad getroffen werden. Der Schlüssel für eine erfolgreiche und reproduzierbare Methylierungsanalyse ist die möglichst vollständige Deaminierung der Cytosinbasen und somit eine möglichst vollständige Konvertierung, was durch eine Reaktion bei niedrigem pH-Wert und ausreichend langer Inkubation erreicht werden kann [206]. Kritisch ist die Tatsache, dass durch die Reaktionsbedingungen der Konvertierung die DNA einer sehr harschen Prozedur unterzogen wird, die zu einer Degradierung der DNA und damit fehlerhafter Amplifikation oder Sequenzierung führen kann [208]. Deshalb wurde von uns ein Kit eines kommerziellen Anbieters verwendet, welches ein schnelles Protokoll aufweist und durch einen enthaltenen „DNA-Protect Buffer“ die DNA vor Degradierung schützt. Um eine erfolgreiche PCR mit der konvertierten DNA zu gewährleisten, ist eine gründliche Aufreinigung erforderlich, was durch die ebenfalls im Kit enthaltenen

Reagenzien erzielt wurde. Laut Hersteller ist bei einer Lagerung der kDNA bei -20 °C für bis zu zwei Jahre mit keinem Verlust der Qualität zu rechnen.

Zur Konvertierung wurde das „Epitect Bisulfite Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Konvertierung der DNA durch Bisulfit bei 60 °C für insgesamt fünf Stunden erfolgte nach Protokoll des Herstellers in nukleasefreien, sterilen 200 µl-Reaktionsgefäßen. Ähnlich wie bei der Isolation von DNA wird auch die kDNA anschließend an einer speziellen Membran einer Zentrifugationssäule gebunden, sequenziell mit mehreren Puffern und Zentrifugationsschritten bei 12000 U/min aufgereinigt und anschließend nach Trocknung in 20 µl eluiert, im Gegensatz zur Nukleinsäureisolation jedoch mit einem speziellen, im Kit enthaltenen Elutionspuffer, der die kDNA stabilisieren soll. In die einzelnen Konvertierungsansätze wurden von jeder Probe in Abhängigkeit von der vorhandenen Gesamt-DNA-Menge 400-1200 ng eingesetzt. Das Protokoll des Herstellers erlaubt eine Menge von 1-2000 ng. Die Konzentrationen der konvertierten DNA wurden nach Aufreinigung fotometrisch (Nanodrop, Peqlab, Erlangen) gemessen. Die Lagerung der kDNA erfolgte nach Herstellerangabe bei -20 °C.

Nach jeder Konvertierungsreaktion wurde eine Kontroll-PCR mit konvertierungsspezifischen Primern durchgeführt. Diese führen nur bei einer erfolgreichen Konvertierung zu einem PCR-Produkt in der korrekten Größe (siehe Abbildung 11). Für diese Kontroll-PCR nutzten wir Primer aus einer Publikation [110], Sequenzen siehe Tabelle 10. Hierbei wurden 20 ng kDNA und jeweils 10 pMol Primer forward und reverse eingesetzt. Es wurde die „SuperHotTaq“-Polymerase (Bioron, Ludwigshafen) und ein Puffer mit 1,5 mMol MgCl₂ (ebenfalls Bioron, Ludwigshafen) verwendet. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C für fünf min folgten 40 Zyklen mit einem Annealing bei 56 °C für 1 min und einer Elongationsphase für 1 min bei 72 °C.



Abbildung 11: Kapillarelektrophorese-Bild einer konvertierungsspezifischen PCR. In der ersten Spur (im Bild als Spalte dargestellt) ist eine Negativ-Kontrolle mit H₂O, in Spur 2 und 3 unkonvertierte DNA, in Spur 4, 5 und 6 konvertierte DNA. Die Größe des PCR-Produkts wird durch Skalierung anhand eines mitgelaufenen Markers überprüft. Links der ersten Spur sind die Referenzgrößen aus einem mitgelaufenem Marker in Anzahl der Basen aufgezzeigt.

2.2.7.2 Methylierungsspezifische PCR

Die methylierungsspezifische PCR (MSP) ist ein auf einer konventionellen PCR beruhender Ansatz zur Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten CpG – Stellen. Dieses Verfahren wurde 1996 erstmals beschrieben [209]. Wie zuvor erwähnt, erhält man nach der Konvertierung abhängig von der Methylierung eine veränderte Sequenz (beispielhaft gezeigt in Tabelle 7), gewissermaßen einen funktionellen Polymorphismus. Diesen kann man beim Primer-Design für eine MSP ausnutzen. In die Region, für die man eine unterschiedliche Methylierung erwartet, legt man seine Primer, in diesem Fall zwei Primer-Paare für die gleiche Zielsequenz: ein Primerpaar, das nur bindet, wenn die DNA methyliert ist, und ein Primerpaar, das nur bindet, wenn die DNA unmethyliert ist. Somit erhält man für dieselbe Probe und dieselbe Ziel-Sequenz in zwei getrennten PCR-Ansätzen zwei unterschiedliche PCR-Produkte. Ist die DNA in der Bindungsstelle des Primers nun methyliert, erhält man in dem PCR-Ansatz mit den Primern für methylierte DNA ein Produkt. Ist die DNA unmethyliert, erhält man in der PCR mit dem Primer für unmethylierte DNA ein Produkt. Die Methode eignet sich gut, um die Methylierung an einzelnen Stellen zu untersuchen, den Grad der Methylierung der Sequenz zwischen den Primern kann

man aber mit einer einfachen MSP nicht untersuchen. Da Methylierung ein gradueller Prozess ist und DNA praktisch nie komplett bzw. gar nicht methyliert ist, und man immer ein Gemisch aus methylierten und unmethylierten Regionen hat, kann man von einer Probe sowohl methylierte und unmethylierte CpG-Stellen nachweisen. Somit ist auch in den meisten Fällen für beide Primerpaare der MSP ein PCR-Produkt zu erwarten. Der unterschiedliche Ausprägungsgrad der Methylierung ergibt sich aus dem Vergleich der erhaltenen Produktmenge. Allerdings lässt sich mit dieser Methode keine genaue Quantifizierung vornehmen. Dies hat verschiedene Gründe, beispielsweise kann man bei einer konventionellen PCR im Gegensatz zur qRT-PCR keine Aussage über die Kinetik und damit den Grad der Vervielfältigung machen. Setzt man die gleiche Menge DNA pro Ansatz ein, kann unter der Annahme einer ungefähr gleichen Vervielfältigung pro Ansatz unter konstanten Bedingungen unter densitometrischer Auswertung der PCR-Produkte jedoch eine semiquantitative Analyse vornehmen.

Wir haben bei diesem Verfahren die Proben für die einzelnen methylierungsspezifischen Primer untereinander verglichen und können so eine Aussage treffen, ob ein Kollektiv stärker methyliert ist als ein anderes, und ob ein Kollektiv in einer Region eher methyliert oder unmethyliert ist.

Idealerweise wählt man die Primer so, dass zwei unterschiedlich große PCR-Produkte entstehen, sodass man bei einer gleichzeitigen Auftrennung, z.B. in einer Gelelektrophorese, zwei verschiedene Banden erhält, siehe auch Abbildung 12.

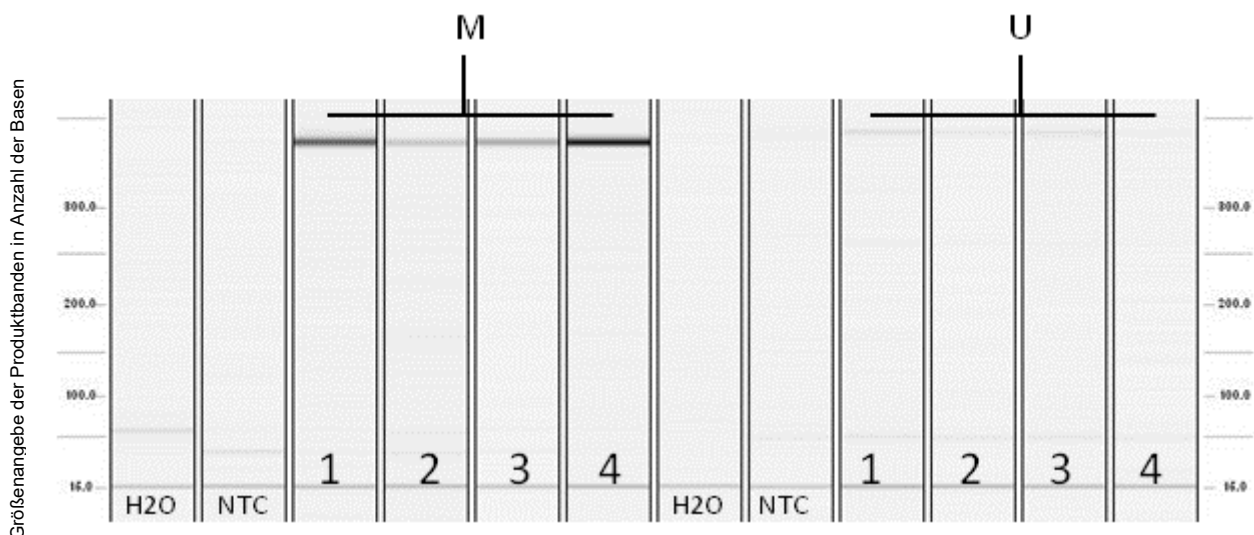


Abbildung 12: Kapillarelektrophorese-Bild einer MSP. Dieselben Proben (1, 2, 3, 4) wurden jeweils mit methylierungsspezifischen Primern („M“) und spezifischen Primern für den nicht methylierten Zustand (U) getestet. Die viel stärkeren Banden bei M bedeuten, dass die Proben in dem untersuchten DNA-Abschnitt sehr stark methyliert sind. H2O und NTC sind jeweils zwei Negativkontrollen, einmal ohne DNA (H2O), einmal mit nicht-konvertierter DNA (NTC). Bei genauerem Hinsehen erkennt man, dass die PCR-Produkte sich in ihrer Größe unterscheiden.

Dieses Verfahren wurde auch zur semiquantitativen Methylierungsanalyse der *IGF2*-Promotorregionen (siehe Abbildung 5) verwendet. Die hierfür verwendeten Primer entstammen einer Publikation [90]. Die Autoren unterteilen die Promotorbereiche anhand des Vorhandenseins von CpG-Inseln. So entstehen für Promotor 2 drei (P2A, P2B, P2C), für Promotor 3 und 4 jeweils zwei Bereiche (P3A, P3B, P4A, P4B). Mit der Auswahl dieser Bereiche wurde versucht, für die einzelnen Promotoren mehrere CpG-Stellen abzudecken. Für die Bereiche P2A, P2B und P2C sowie P4A und P4B werden jeweils 8 CpG-Stellen abgedeckt, für P3A 11 und für P3B 7 CpG-Stellen.

Pro PCR-Reaktion wurden 10 ng kDNA eingesetzt. Bis auf die spezifischen Primer-Bindungstemperaturen erfolgten die PCR-Reaktionen für alle Primerpaare bei den gleichen Bedingungen: 2,5 mMol MgCl₂-Konzentration im Puffer, je 10 pMol Primer forward und reverse, 5 Minuten initiale Denaturierung bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit jeweils 1 Minute bei 95°C, 1 Minute bei der spezifischen Bindungstemperatur und 1 Minute bei 72 °C. Abschließend folgte eine Elongationsphase von 7 Minuten bei 72 °C. Als Polymerase wurde die „SuperHotTaq“-Polymerase (Bioron, Ludwigshafen) verwendet. Alle Primerpaare wurden vor Testung der Prostatagewebe mit konvertierter DNA aus Zelllinien (siehe verwendete Zelllinien) und einer Probe aus einem Ovarial-Karzinom validiert. Diese wurden bei der MSP dann auch als Positivkontrolle verwendet.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Kapillarelektrophorese semiquantitativ ausgewertet. Das hierfür verwendete Gerät QIAxcel (Qiagen, Hilden) misst fotometrisch die Konzentration der einzelnen Banden des PCR-Produkts und gibt im Abgleich zu einem Marker die Produktgröße in Basenpaaren an (siehe Abbildung 12). Vergleicht man die Konzentrationen verschiedener Banden miteinander, kann man eine relative Quantifizierung der Methylierung einzelner Proben untereinander vornehmen. Zusätzlich wurden die Konzentrationen in Relation zueinander gesetzt, wobei hier die Werte für T als Referenz gesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte im Vergleich Tumor- gegen Normalgewebe.

Die Spezifität der Produkte wurde anhand der Produktgrößen überprüft. Durch Verwendung einer Positivkontrolle (stark methylierte DNA aus Ovarialkarzinom) wurden negative Ergebnisse validiert.

2.2.7.3 Die Quantitative Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung

Da durch MSP die Methylierung nur in den Primerbindungsstellen, also primerkomplementären Sequenzen nachzuweisen ist, und man sie zudem nicht valide quantifizieren kann, wurden weitere Proben mittels Pyrosequenzierung untersucht, einer Methode, die eine genauere Quantifizierung zulässt.

Die Pyrosequenzierung wurde erstmals 1993 in Stockholm beschrieben [210, 211]. Es ist ein auf einer Polymerase beruhendes Elongationsverfahren, bei dem durch eine Enzymkaskade abhängig von den eingebauten Nukleotiden ein Signal erzeugt und durch ein Gerät detektiert wird, wodurch eine Sequenz entschlüsselt werden kann. Zunächst wird eine Nukleotidsequenz in einer PCR amplifiziert. Die Elongation zur Sequenzierung findet am DNA-Einzelstrang statt. Hierzu muss der spezifische Sequenzierprimer am einzelsträngigen PCR-Produkt binden. Einen Einzelstrang des PCR-Produkts erhält man durch Denaturierung in alkalischer Lösung. Einer der PCR-Primer ist biotinyliert und wird nach dem Denaturierungsschritt über eine Wechselwirkung mit Streptavidin gebunden. Der nicht-gebundene DNA-Einzelstrang wird anschließend mit der Denaturierungslösung entfernt. Der so vorbereitete Ansatz kann nun sequenziert werden. Das Sequenziergerät gibt Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) in einer festgelegten Reihenfolge in die Reaktion. Diese Reihenfolge richtet sich nach der zu analysierenden Sequenz. Die Enzymkaskade der Reaktion besteht aus einer Polymerase, sowie aus den Enzymen Sulfurylase, Luciferase und Apyrase.

Das beim Einbau einzelner dNTPs durch die Polymerase freiwerdende Pyrophosphat wird durch die Sulfurylase zu ATP synthetisiert, welches wiederum durch die Luciferase gespalten wird. Das dadurch entstehende Lichtsignal wird detektiert, wobei die Stärke des Signals direkt proportional zur Menge des gebildeten ATPs ist. Werden also zwei gleiche dNTPs nacheinander eingebaut, ist das Lichtsignal doppelt so hoch wie beim Einbau von nur einem dNTP. Überschüssige, nicht eingebaute dNTPs werden durch ein zusätzliches Enzym, die Apyrase, abgebaut. Somit weiß man, dass bei einem Lichtsignal nach Hinzugeben eines bestimmten Nukleotids in der zu analysierenden Sequenz die komplementäre Base liegt.

2002 wurde erstmals gezeigt, dass durch Pyrosequenzierung eine quantitative Methylierungsanalyse möglich ist [212]. Dabei nutzt man die Bisulfitkonvertierung und vervielfältigt die zu analysierende Sequenz in einer PCR mit einem konvertierungsspezifischen Primerpaar, ein Primer davon ist biotinyliert. CpG-

Nukleotidsequenzen sind nach Konvertierung ein möglicher Polymorphismus, da aus C bei fehlender Methylierung U respektive T wird (siehe Tabelle 7). Polymorphismen lassen sich durch Sequenzierung nachweisen. Wird eine Region mit potentieller Methylierung in einer PCR amplifiziert, werden unmethylierte und methylierte CpG-Stellen im gleichen Verhältnis vervielfältigt. Durch den linearen Zusammenhang des Lichtsignals zum Einbau komplementärer Basen kann im Gegensatz zur MSP aus dem Verhältnis von Cytosin zu Thymin in der Sequenzierung mithilfe einer Software eine quantitative Methylierungsanalyse durchgeführt werden.

Die Versuche zur quantitativen Methylierungsanalyse wurden auf dem „Pyromark Q24“-Sequenziergerät (Qiagen, Hilden) mit dem „Pyromark Q24 Gold Reagents“-Kit und den dazu gehörigen Puffern und Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Die Auswertung und Programmierung des Geräts erfolgte durch eine Software des Herstellers, mit der man Methylierungsassays erstellen kann. Die Primer-Assays „P2A“, „P2B“, „P2C1“, „P2C2“, „P2C3“, „P3“, „P4A“, „P4B1“, „P4B2“ zur Quantifizierung der Promotor-Methylierung und die Primer „BS 6-1“ und „BS 6-2“ zur Quantifizierung der Bindungsstelle 6 von CTCF wurden auf der Software „PyroMark Assay Design SW 2.0“ (Qiagen, Hilden) erstellt und basieren im Wesentlichen auf den in der MSP untersuchten Promotorbereichen. Da durch die Methode der Pyrosequenzierung jedes einzelne CpG auf Methylierung untersucht werden kann, wurden die Promotorbereiche nochmals unterteilt, um möglichst viele CpG-Stellen abzudecken. Dadurch können insgesamt 100 CpG in den Promotorsequenzen auf Methylierung untersucht werden. Die Sequenz der BS6 für CTCF (GenBank accession no. AF087017) in der ICR umfasst 227 Nukleotide und 17 CpG-Stellen. Die Aufteilung auf zwei Primer-Paare, „BS 6-1“ und „BS 6-2“ ermöglicht eine volle Abdeckung der 17 CpG-Stellen bei besserer Qualität als bei Verwendung eines Primer-Paares.

Die konvertierungsspezifischen PCRs wurden für die Primer „P2A“, „P3“, „P4A“ und „P4B“ mit der „SuperHotTaq“-Polymerase (Bioron, Ludwigshafen) durchgeführt, pro Reaktionsansatz 2,5 Units. Es wurden jeweils, wie vom Hersteller des Sequenziergerätes empfohlen, 10-20 ng konvertierter DNA und je 10 pMol Primer forward und reverse in einen 25 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die Menge der hinzugegebenen dNTPs betrug 0,25 mMol pro Ansatz. Zur Optimierung der jeweiligen PCR-Bedingungen wurden unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen mit den entsprechenden Puffern (Bioron, Ludwigshafen) eingesetzt. Für die genauen PCR-Bedingungen siehe Tabelle 13.

Für die Primer „P2B“, „BS6-1“ und „BS6-2“ wurde der „SuperHot Master Mix (2x)“ der Firma Bioron, Ludwigshafen, verwendet. Dieser Mix beinhaltet eine Hotstart-Polymerase, PCR Puffer, MgCl₂ und dNTP`s in zweifacher Konzentration. Auch hier wurden jeweils 10-20 ng konvertierter DNA und je 10 pMol Primer forward und reverse in einen 25 µl Reaktionsansatz gegeben. Der Mastermix ergibt nach Verdünnung gemäß Protokoll eine finale MgCl₂-Konzentration von 3,0 mMol. Für die genauen PCR-Bedingungen siehe Tabelle 13.

Das Thermocycler-Protokoll für alle Primerpaare entspricht folgendem: Denaturierung bei 95°C für 5 min – 45 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95°C, Annealing für 30 s bei der jeweiligen Annealing-Temperatur (T_m) und Elongation bei 72 °C für 30 s – und einer finalen Elongation für 5 min bei 72°C, gefolgt von einer abschließenden Abkühlung der Reaktion auf 8°C. Die PCR-Produkte wurden vor ihrer Sequenzierung für maximal 24 h bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Übersicht über die PCR-Bedingungen der jeweiligen Primer der Promotorassays und der CTCF-Bindungsstellen (BS 6-1 und BS 6-2). Die Größe des PCR-Produkts wird in Basenpaaren angegeben (Bp), die Konzentration von MgCl₂ im Reaktionsansatz in Millimol (mMol). Ta bezeichnet die Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers, angegeben in °C.

Name	Ta (°C)	MgCl ₂ -Konzentration (mMol)	Produktgröße (bp)	PCR-Puffer
P2A	55	1,5	282	10x Buffer incomplete
P2B	54	3,0	258	Mastermix
P2C 1	57	1,5	212	10x Buffer incomplete
P2C 2	57	1,5	190	10x Buffer incomplete
P2C 3	60	2,5	235	10x Buffer incomplete
P3	56	1,5	167	10x Buffer incomplete
P4A	60	1,0	358	10x Buffer incomplete
P4B 1	57	2,5	157	10x Buffer incomplete
P4B 2	60	2,5	163	10x Buffer incomplete
BS 6-1	59	3,0	141	Mastermix
BS 6-2	60	3,0	131	Mastermix

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte auf einem Kapillarelektrophorese-Gerät (QIAXcel, Qiagen, Hilden) anhand der Produktgröße auf Spezifität kontrolliert. Zur Sequenzierung wurden 10 µl des PCR-Produkts zu einem 70 µl Reaktionsansatz aus Streptavidin, Bindungspuffer und sterilem, nukleasefreiem Wasser gegeben und für zehn min bei 1400 U/min geschüttelt. Die Mischung des PCR-Produkts und der Streptavidin-Lösung wurde durch Ansaugen mit einer Vakuumpumpe in einer Matrix

gebunden. Unter Beibehalten des Vakuums folgten ein Waschschrift in 70%igem Ethanol für 10 s, die Denaturierung in alkalischer Lösung für 10 s und ein Waschschrift in einem speziellen Waschpuffer für 15 s. Das nun einzelsträngig vorliegende PCR-Produkt wurde durch Ausschalten des Vakuums in eine spezielle Sequenzierplatte überführt. In dieser lag in jeder Vertiefung ein Gemisch aus 15 pMol des spezifischen Sequenzier-Primers und einem Sequenzierpuffer vor. Vor der Sequenzierung folgte ein letzter Denaturierungsschritt auf einem Heizblock bei 80°C für zwei Minuten und einer anschließenden Abkühlung auf Raumtemperatur. Die Phase der Abkühlung wurde zur Bestückung des Gerätes mit den Enzymen und Substraten genutzt.

Die Software des Herstellers wertete die einzelnen Sequenzierungsläufe automatisch aus und errechnete so nach dem beschriebenen Prinzip den prozentuellen Grad der Methylierung einzelner CpG - Stellen innerhalb der analysierten Sequenz. Gleichzeitig erfolgte so eine Qualitätskontrolle, da die Software auch verschiedene Kriterien der Testgenauigkeit überprüft, z.B. die erfolgreiche Konvertierung, die Standardabweichungen der einzelnen Signale oder das Verhältnis vom eigentlichen Signal zu Störungssignalen.

2.2.8 Statistische Methoden

2.2.8.1 Vergleichende Analysen molekularbiologischer, genetischer und epigenetischer Merkmale

Aus den Ergebnissen des ELISA von IGF2, der qPCR von *IGF2*, *CTCF*, miR-675, der Transkriptvarianten der Promotoren sowie aus den Ergebnissen der Methylierungsanalysen per MSP und Pyrosequenzierung wurden die Mittelwerte und Streuungsmaße berechnet und per zweiseitigem T-Test auf Signifikanz überprüft („Excel“, Microsoft, Redmond, USA sowie „Graph Pad Prism“, Graph Pad Software, La Jolla, USA).

2.2.8.2 Korrelationsanalysen

Für die Korrelationsanalysen der Genexpressionen, miR-675-Expression und Expression der Transskriptvarianten sowie der Methylierung wurden die Δ ct-Werte der qRT-PCR und/oder die durchschnittliche Methylierung in Prozent des jeweils selben Falls verwendet. Korrelationskoeffizienten nach Pearson (im Falle einer

Normalverteilung der Werte) oder Spearman (bei Nicht-Vorhandensein einer Normalverteilung) und p-Werte in einem zweiseitigen t-Test wurden mit „Graph Pad Prism“ (Graph Pad Software, USA) berechnet.

2.2.8.3 Test auf Normalverteilung

Tests auf Normalverteilung wurden nach D'Agostino und Pearson ebenfalls mit „Graph Pad Prism“ berechnet.

2.2.8.4 Test auf Abhängigkeit einer Größe

Tests auf Abhängigkeit einer Größe wurden mittels Exaktem Fisher-Test durchgeführt (Microsoft Excel).

2.2.8.5 Multivariate Datenanalyse

Der Vergleich der Promotoraktivität in Abhängigkeit von N und T wurde mittels 2way – ANOVA und Bonferroni – Posttest mit „Graph Pad Prism“ auf Signifikanz getestet. Auf die gleiche Weise wurde der Expressionsvergleich von IGF2, CTCF und miR-675 in Abhängigkeit von LOI/ROI und N/T durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Im Folgenden werden statistischen Auswertungen der molekularbiologischen, genetischen/epigenetischen Merkmale sowie der klinischen Daten der Patienten und deren Korrelation zueinander präsentiert.

3.1 Screening auf Apa1-SNP und Imprinting

3.1.1 Verteilung des SNP

Von den 141 Patienten war teilweise entweder nur Normal- oder Tumorgewebe für Forschungszwecke verfügbar. Dies ist darin begründet, dass das Gewebe im Sinne der Patienten vorrangig zu diagnostischen Zwecken untersucht werden musste. Somit wurden insgesamt 122 Normal- und 128 Tumorproben auf das Vorhandensein des Apa1-SNP und Heterozygotie sowie LOH für diesen mit den oben genannten Methoden überprüft. Von 109 Patienten lagen gepaarte Proben, also jeweils N und T aus der gleichen Prostata vor. 32 N und 32 T zeigten sich heterozygot für den SNP in Exon 9 und damit informativ für Imprinting (siehe Tabelle 9).

3.1.2 Verteilung von LOI und ROI

Die jeweils 32 Fälle N und T konnten einer anschließenden Imprinting-Analyse zugeführt werden, in 22 Fällen lag N und T aus demselben Patienten vor. Unter den 64 getesteten Proben zeigten 35 ROI (55%) und 29 LOI (45%). Innerhalb der ROI-Fälle waren 16 T und 19 N. Unter den LOI-Fällen waren 16 T und 13 N. Somit zeigte sich kein Unterschied in der Verteilung von LOI/ROI in T und N. 16 der 22 gepaarten Fälle zeigten den gleichen Imprinting-Status in N und T. Von den 6 Fällen mit ungleichem Imprinting lag bei ROI in N LOI in T vor. In einem Fall zeigte sich ROI in T und LOI in N. Die Ergebnisse der Untersuchung des Imprintings sind in Grafik 13 und Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse für Heterozygotie und Imprinting im Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) der 141 untersuchten Patienten. Nicht von allen Patienten war N und/oder T Gewebe verfügbar. Von 109 Patienten lag jeweils N und T aus derselben Prostata vor.

Untersuchte Größe	Anzahl
Auf Heterozygotie untersuchte Patienten	141
N	122
T	128
Gepaart (je T und N)	109
SNP-Verteilung	
Homozygot (T/N)	76/75
Heterozygot (T/N)	32/32
Imprinting T (n = 32)	
LOI	16
ROI	16
Imprinting N (n = 32)	
LOI	13
ROI	19
Imprinting gepaarte Proben (n = 22)	
Konkordantes Imprinting in N und T	16
LOI	4
ROI	12
Diskordantes Imprinting in N und T	6
LOI T/ROI N	5
ROI T/LOI N	1

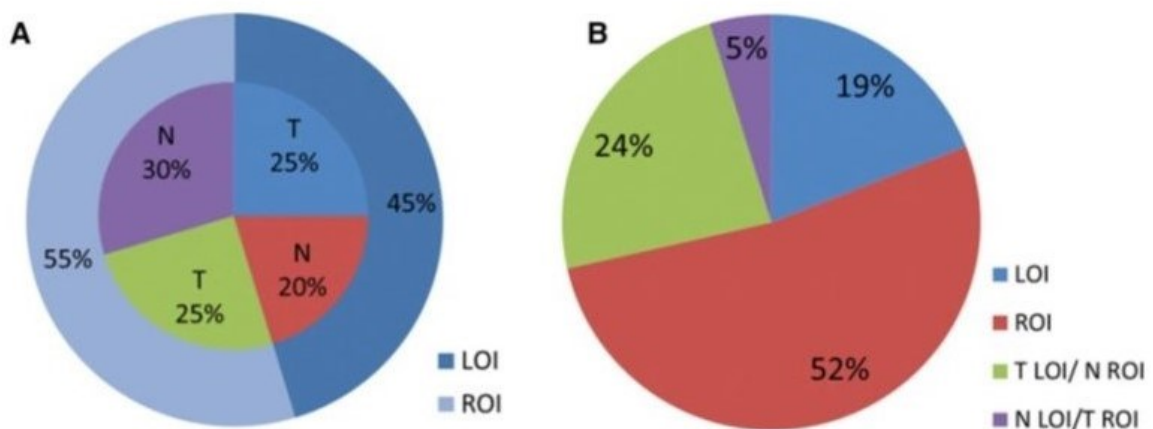


Abbildung 13: Verteilung des Imprinting-Status LOI/ROI in T und N (A) sowie der Konkordanz von LOI/ROI in T und N in 22 gepaarten Proben (B). Von diesen 22 Proben zeigten 52% ROI in T und N, 19% LOI in T und N und waren somit konkordant in ihrem Imprinting-Status. Von diesen 22 gepaarten Proben zeigten sich insgesamt 29% diskordant (24% LOI in T während ROI in N, 5% LOI in N während ROI in T). Abbildung aus: *Insulin-like growth factor 2 expression in prostate cancer is regulated by promoter-specific methylation* [213]

3.1.3 Korrelation des Imprinting-Status mit klinischen Parametern

Während Alter, Tumorstadium, Gleason-Score, PSA-Werte und perineurale Invasion keinen Zusammenhang mit Imprinting zeigten, fand sich ein statistischer Zusammenhang zwischen Imprinting und lymphovaskulärer Invasion (LVI). Vier von sieben Tumorgeweben mit LOI wiesen eine LVI auf, während dies nur bei einem von sieben Tumorgeweben mit ROI der Fall war (p-Wert 0,025 Fisher-Exakt-Test).

3.2 Genexpressionsanalysen und miRNA-Expression

3.2.1 Die *IGF2*-Expression und Korrelation zu klinischen Daten

IGF2-mRNA als Maß der Genexpression wurde in insgesamt 126 Proben per Reverse-Transkriptase-qPCR bestimmt, davon 65 Normalgewebe und 61 Karzinome. Von 60 Fällen wurden aus derselben Prostata sowohl Tumor (T) als auch Normalgewebe (N), somit waren 120 der 126 Proben gepaart.

Über alle Proben gesehen war die Expression von *IGF2* in N signifikant höher als in T. Der Mittelwert der Δ ct-Werte in N betrug 4,72 (\pm 1,61), verglichen mit 5,72 (\pm 1,50) in T. Ein Test auf Normalverteilung nach D'Agostino & Pearson war positiv, so dass von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden kann.

Somit ergab sich für die Mittelwerte ein $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert zwischen N und T von -1,00. Nach der $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode ergab sich ein Wert für die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von 2,01, was bedeutet, dass im Normalgewebe der Prostata IGF2 auf mRNA-Ebene etwa doppelt so stark exprimiert wird wie im Tumorgewebe. Ein zweiseitiger T-Test für diese Untersuchung ergab einen p-Wert von $\leq 0,00043$.

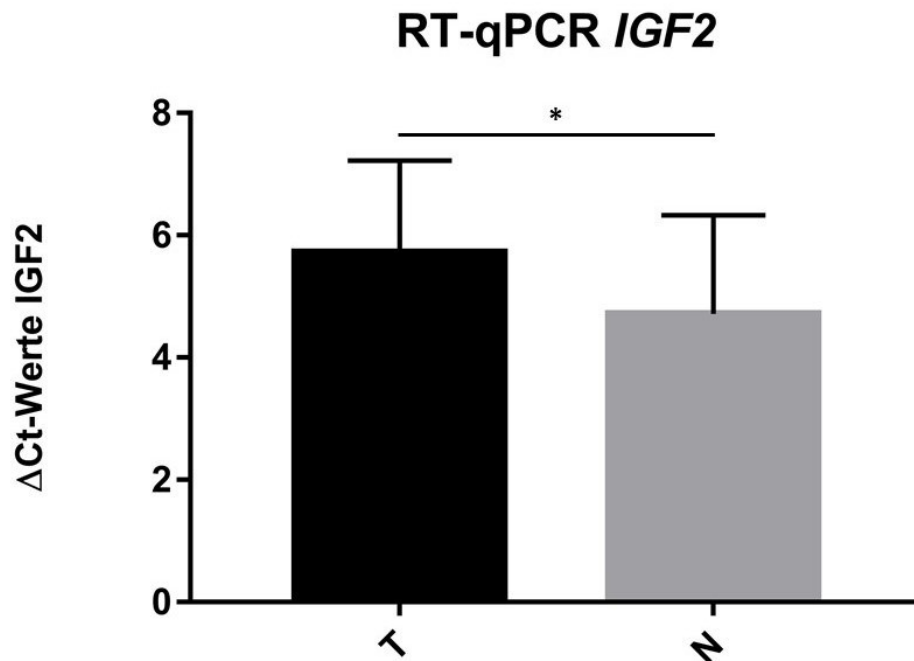


Abbildung 8: Ergebnisse der IGF2-RT-qPCR. Die gemessenen ΔCt -Werte unterschieden sich signifikant zwischen Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (N). Insgesamt wurden 126 Proben gemessen, davon 120 gepaarte Proben mit korrespondierendem Tumor- und Normalgewebe aus demselben Patienten, zusätzlich 5 Normal- und 1 Tumorgewebe.

Der Bereich der intra-individuellen $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte zwischen N und T, also der Vergleich zwischen gepaarten Proben N und T aus demselben Fall, erstreckt sich von -5,86 bis 4,72, bei einer Standardabweichung von 1,88. Nach der $2^{\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode ergibt sich für den Maximalwert eine relative differentielle Genexpression von IGF2 zwischen N und T von ungefähr 58, also einer um den Faktor 58 höheren Expression von IGF2 im Normalgewebe. Für den Minimalwert ergibt sich eine relative differentielle Genexpression von ungefähr 0,038, also einer ungefähr 26-fach geringeren Expression im Normalgewebe. Tabelle 10 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der IGF2-qPCR aller getesteten Proben. Insgesamt ergibt sich in N gegenüber T eine hochsignifikante, 2,01-fach höhere IGF2-Expression (RFC, markiert mit *). SD bezeichnet als Standardabweichung die Streuung der Δct -Werte, *Min* und *Max* geben den jeweils niedrigsten und höchsten Δct -Wert der Gruppe an. Die Fallzahl variiert probenbedingt, 120 Proben (also je 60 N und T) sind gepaart, d.h. vom gleichen Fall.

	Mittelwert Δct -Werte	SD	Min Δct	Max Δct	RFC *	p-Wert	Fallzahl n
N	4,72	1,61	0,51	8,23	2,01	0,0004	65
T	5,72	1,50	1,31	8,58			61

In 12 der 60 gepaarten Fälle war IGF2 in T höher exprimiert als in N, was einem Anteil von 20% entspricht. Innerhalb dieser 12 Proben streute die Genexpression im Vergleich zwischen N und T stark. Berechnet nach der $2^{\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode ergibt sich eine in T gegenüber N erhöhte IGF2-Expression vom 1,1- bis 26,42-fachen (im Mittel 2,64-fach), siehe auch Abbildung 15. Die Ergebnisse der Subgruppe, in der IGF2 in T höher als in N exprimiert ist, sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

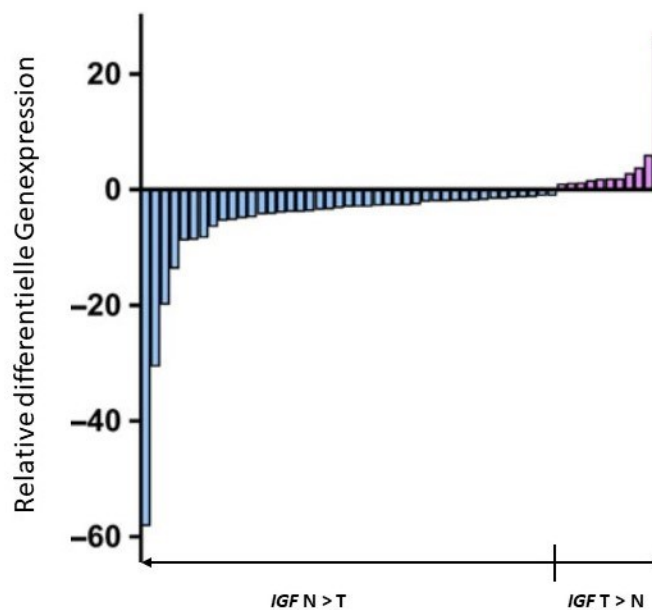


Abbildung 15: Darstellung des Expressionsverhältnisses von IGF2 zwischen N und T der gepaarten 60 Proben als relative differentielle Genexpression (RFC). In 12 der 60 gepaarten Proben zeigte sich in T eine stärkere Expression als in N, resultierend in einem positiven Wert für RFC. Diese Fälle sind am rechten Ende der Verteilung in rosa abgebildet. Sowohl für IGF2 N > T als auch T > N zeigen sich starke Schwankungen im Expressionsverhältnis. Abbildung aus: *Insulin-like growth factor 2 expression in prostate cancer is regulated by promoter-specific methylation* [213]

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der Δ ct-Werte und $\Delta\Delta$ ct-Werte der IGF2-qPCR der Subgruppe mit einer höheren IGF2-Expression in T als in N. Der $\Delta\Delta$ ct-Wert bildet sich aus der Differenz der Δ ct-Werte von N und T. Im Mittel zeigte diese Subgruppe eine signifikante, 2,64-fach höhere IGF2-Expression in T als in N (RFC), wobei die relative differentielle Genexpression von 1,10-fach bis 26,42-fach variiert. Der angegebene p-Wert von 0,05 bezieht sich auf den gemittelten Relative Fold Change (RFC, markiert mit *) der gesamten Subgruppe im Vergleich T vs N.

	Mittelwert Δ ct-Werte	SD Δ ct	Mittelwert $\Delta\Delta$ ct-Werte	SD $\Delta\Delta$ ct	RFC Gesamt *	RFC min	RFC max	p-Wert	Fallzahl n
N	5,97	1,48	1,40	1,22	2,64	1,10	26,42	0,05	12
T	4,57	1,88							12

Die Subgruppe der Patienten mit einer höheren *IGF2*-Genexpression in T (definiert durch $RFC > 1$) zeigten im Vergleich zur Subgruppe mit höherer Expression in N keine statistisch signifikanten Unterschiede in klinischen Variablen wie Tumorgroße, präoperativem PSA-Wert oder Gleason-Score. Zum Zeitpunkt der Prostatektomie lagen bei keinem der Patienten mit erhöhtem *IGF2* im Tumorgewebe Metastasen vor. Lediglich beim Alter der Patienten zeigte sich bei einem p-Wert von 0,10 (zweiseitiger T-Test) ein Trend zu einem jüngeren Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation. Die klinischen Daten der 60 Patienten, von denen *IGF2* per RT-qPCR bestimmt wurde, sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Tumorstadien der 60 Patienten, von denen eine gepaarte Analyse der *IGF2*-Expression in T und N durchgeführt wurde, aufgeteilt nach Alters-Subgruppen. Abgesetzt findet sich der Vergleich der Kollektive mit höherer *IGF2*-Expression in T oder N. Es zeigen sich hier keine signifikanten Unterschiede bei Alter, PSA-Wert, Tumorstadium oder Gleason-Score. Für das Alter bei Operation ergibt sich allerdings ein statistischer Trend zu einem jüngeren Alter bei *IGF2* T > N (p-Wert 0,10 im zweiseitigen T-Test). Bei gleichem medianem Tumorstadium und Gleason-Score der Subgruppen wurde hier kein statistischer Test durchgeführt (n.d.).

Tumorstadium	2a	2b	2c	3a	3b	4	Total (n)
N	3	0	35	15	6	1	60
> 70	1	0	4	8	1	0	14
60 - 69	1	0	18	5	4	0	28
50 – 59	1	0	12	2	1	1	17
< 50	0	0	1	0	0	0	1

Subgruppenanalyse *IGF2* im Verhältnis T zu N

	Mittleres Alter in Jahren	Medianes Tumorstadium	Mittlerer PSA- Wert präoperativ	Medianer Gleason-Score
<i>IGF2</i> T > N (n = 12)	60,4	2c	12,35	7
<i>IGF2</i> N > T (n = 48)	64,3	2c	9,76	7

p-Wert	0,10	n.d.	0,48	n.d.
--------	------	------	------	------

3.2.2 Die Expression von *IGF2* in Abhängigkeit von Imprinting und Dignität

Von 17 LOI- und 20 ROI-Proben konnte die *IGF2*-Expression quantifiziert werden. Von diesen 37 Proben waren 21 N und 16 T.

Unabhängig von N oder T zeigte sich ein Trend zu einer höheren Expression von *IGF2* bei LOI im Vergleich zu ROI. Die Berechnung der relativen differentiellen Genexpression ergab für LOI eine 1,92-fach höhere Expression von *IGF2* gegenüber ROI (p-Wert von 0,08 im zweiseitigen T-Test).

Getrennt nach N und T zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied noch ein statistischer Trend. Unter den 21 N waren 10 LOI und 11 ROI. Das Mittel der Δ ct-Werte lag für LOI hier bei 5,63 (\pm 1,22), für ROI bei 6,77 (\pm 2,04), der p-Wert hierfür bei 0,14 (zweiseitiger T-Test) und die relative differentielle Genexpression eine ungefähr 2,2-fach höhere Expression von *IGF2* bei LOI.

Unter den 16 T waren 7 LOI und 9 ROI. Das Mittel der Δ ct-Werte lag hier für LOI bei 6,96 (\pm 1,08) und für ROI bei 7,04 (\pm 0,65). Der Wert für die relative differentielle Genexpression ergab hier ungefähr 1,05 bei einem p-Wert von 0,92 im zweiseitigen T-Test. Die p-Werte wurden zudem in einer multivariaten Datenanalyse berechnet, siehe diesen Abschnitt unten.

Während sich also unabhängig von der Dignität zwischen LOI und ROI ein Trend zu höherer Expression von *IGF2* bei LOI abzeichnet, der sich in der Tendenz auch in N widerspiegelt, findet sich im Tumorgewebe kein Unterschied mehr zwischen LOI und ROI. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 und Tabelle 13 zusammengefasst.

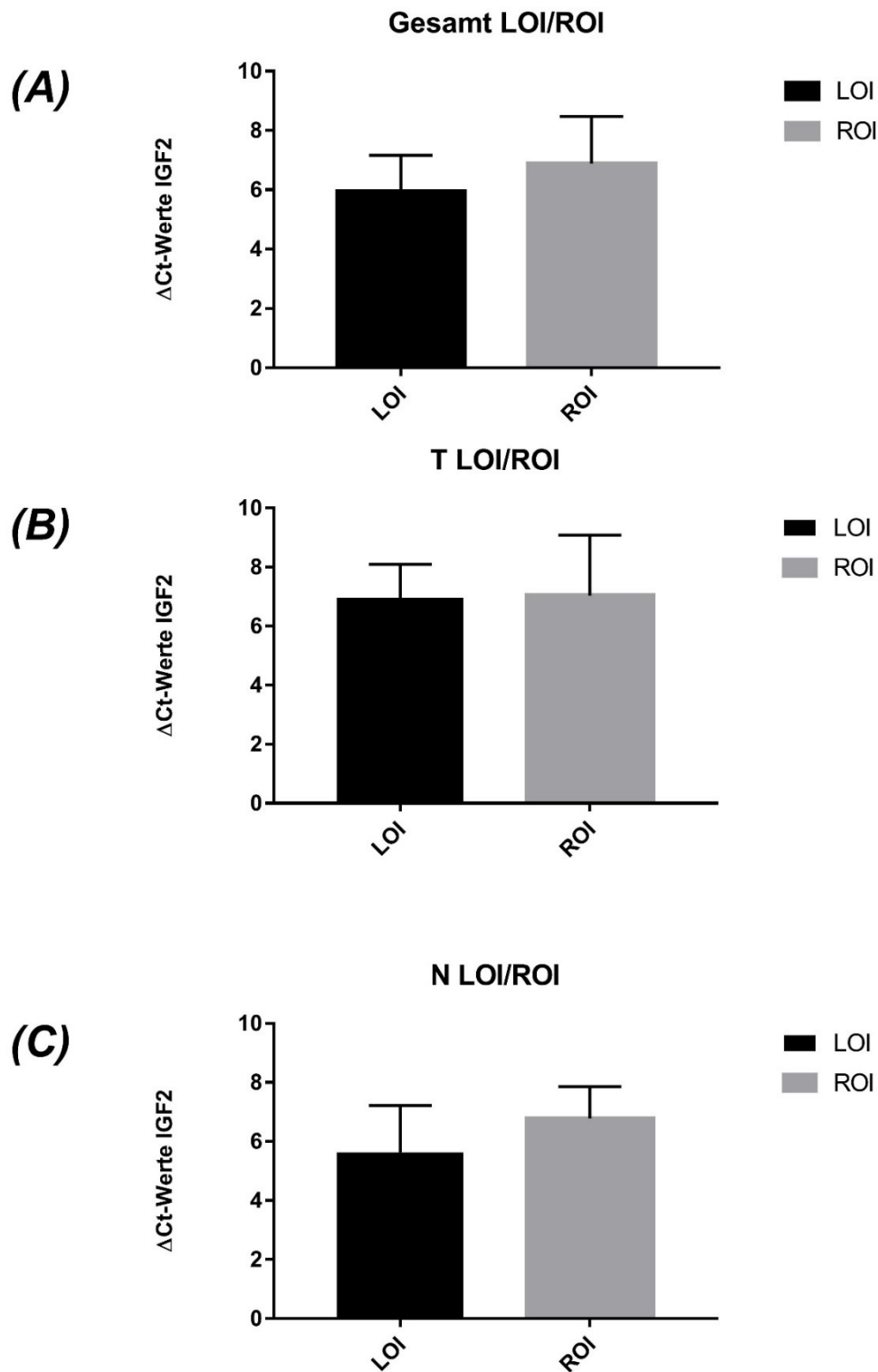


Abbildung 9: Expression von *IGF2* gemessen per RT-qPCR im Vergleich zwischen LOI und ROI. Darstellung als ΔCt -Wert. Insgesamt findet sich unabhängig von der Dignität bei einem p-Wert von 0,08 ein statistischer Trend zu einer vermehrten Expression in LOI im Vergleich zu ROI (LOI n=17, ROI n=20). Im Tumorgewebe geht dieser Trend verloren, es zeigt sich kein Unterschied zwischen LOI (n=7) und ROI (n=9). Im Normalgewebe spiegelt sich die Tendenz zu einer erhöhten Expression in LOI wider (LOI n=10, ROI n=11)

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der *IGF2*-qPCR der Proben, die für ihren Imprintingstatus informativ waren. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied, lediglich zwischen LOI und ROI, unabhängig von T oder N, zeigte sich mit $p=0,08$ ein Trend zur höheren Expression (RFC) bei LOI. Während sich in N die Werte trotz weniger signifikantem p-Wert tendenziell wie in Gesamt LOI/ROI verhalten, verliert sich diese Tendenz in T. RFC bezeichnet die relative differentielle Expression. Die Fallzahl n variiert probenbedingt. SD bezeichnet als Standardabweichung die Streuung der Werte.

	LOI	ROI	N LOI	N ROI	T LOI	T ROI
Mittlere Δ ct-Werte	5,94	6,88	5,63	6,77	6,96	7,04
SD	1,22	1,59	1,59	1,08	1,13	2,04
RFC	1,92			2,22	1,05	
p-Wert	0,08			0,14	0,92	
Fallzahl n	17	20	10	11	7	9

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der *IGF2*-Expression von LOI/ROI in Abhängigkeit von N oder T wurde eine Analyse per 2way-ANOVA durchgeführt. Für den gemeinsamen Einfluss (Interaktion) der beiden Einflussgrößen Imprinting und Dignität ergab sich ein p-Wert von 0,3785, für den Einfluss der Dignität alleine 0,19 und für den Einfluss des Imprintings alleine 0,31. Es wurde somit kein statistischer Zusammenhang zwischen Imprinting, Dignität und *IGF2*-Expression gefunden. Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Ergebnisse der multivariaten Analyse der Abhängigkeit der *IGF2*-Expression von Dignität und Imprinting. In den untersuchten, für Imprinting informativen Proben konnte mittels 2way-Anova kein statistischer Zusammenhang zwischen Imprinting/Dignität und *IGF2*-Expression gefunden.

	N			T		
	Mittlerer Δ ct-Wert	SD	Fallzahl n	Mittlerer Δ ct-Wert	SD	Fallzahl n
LOI	5,63	1,13	10	6,96	1,08	7
ROI	6,77	2,04	11	7,04	0,65	9
	Interaktion Imprinting/Dignität			Dignität		Imprinting
p-Wert	0,38			0,19		0,31

3.2.3 CTCF-Expression

Die Expression von *CTCF* wurde bei 53 N und 51 T bestimmt. Von 33 dieser Proben war der Imprinting-Status bekannt, 20 davon N und 13 T. Bei zwei T dieser 33 Proben, jeweils ein LOI und ein ROI, konnte kein CTCF bestimmt werden, da die Messung aus unklaren Gründen wiederholt scheiterte. Von den 11 übrigen T waren zwei LOI und

neun ROI. Von den 20 N waren zehn LOI und zehn ROI. Insgesamt wurden also 19 ROI und 12 LOI bestimmt.

3.2.3.1 Expression in Abhängigkeit von Imprinting

Unabhängig von N oder T zeigte sich bei den LOI-Proben eine nicht signifikant erhöhte *CTCF*-Expression. Der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert zwischen den Mittelwerten von LOI und ROI betrug -1,13. Somit ergab sich eine relative differentielle Genexpression (RFC) von 2,18 zwischen LOI und ROI. Der p-Wert in einem zweiseitigen t-Test betrug 0,13. Tabelle 15 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 15: Vergleich der mittleren Δct -Werte der *CTCF* RT-qPCR zwischen LOI und ROI. Die Fallzahl variiert probenbedingt. SD bezeichnet die Standardabweichung und ist somit ein Streuungsmaß. RFC bezeichnet die relative differentielle Genexpression (Relative Fold Change). Der p-Wert wurde in einem zweiseitigen t-Test ermittelt.

	LOI	ROI	N LOI	N ROI	T LOI	T ROI
Mittlere Δct -Werte	2,77	3,90	2,68	4,67	3,34	3,06
SD	1,69	2,33	1,92	2,36	0,26	4,69
RFC	2,18		3,77		0,83	
p-Wert	0,13		0,055		0,87	
Fallzahl n	12	19	10	10	2	9

Innerhalb der 20 N-Proben, jeweils zehn LOI und zehn ROI, fand sich ein Trend zur höheren Expression von *CTCF* bei den LOI-Proben. Die Δct -Werte der LOI-Fälle wiesen in dieser Subgruppe ein Mittel von 2,68 ($\pm 1,92$) auf. Die Δct -Werte der ROI-Fälle wiesen ein Mittel von 4,67 ($\pm 2,36$) auf. Das entsprach einer 3,77-fachen relativen differentiellen Genexpression (RFC) von *CTCF* bei LOI gegenüber ROI im Normalgewebe, bei einem p-Wert von 0,055 im zweiseitigen t-Test.

Innerhalb der elf getesteten T-Proben betrug der mittlere Δct -Wert der beiden LOI-Proben 3,34 ($\pm 0,26$), der mittlere Δct -Wert der 9 ROI-Proben 3,06 ($\pm 2,36$). Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied in der *CTCF*-Expression zwischen T LOI und T ROI.

In einer bivariaten Datenanalyse mittels 2way-ANOVA zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der *CTCF*-Expression und Dignität/Imprinting (siehe auch Tabelle 21).

Tabelle 16: Ergebnisse der 2way-ANOVA-Analyse von LOI N/T gegen ROI N/T sowie von N LOI/ROI und T LOI/ROI. Die Unterschiede berechnen sich aus den mittleren Δ ct-Werten der *CTCF*-qPCR der jeweiligen Subgruppe. In den untersuchten, für Imprinting informativen Proben konnte mittels 2way-Anova kein statistischer Zusammenhang zwischen Imprinting/Dignität und *CTCF*-Expression gefunden.

	Mittelwert Δ ct-Wert <i>CTCF</i>	SD	Fallzahl n	Mittelwert Δ ct-Wert <i>CTCF</i>	SD	Fallzahl n	
	N			T			
LOI	2,68	1,92	10	3,34	0,26	2	
ROI	4,67	2,36	10	3,06	2,36	9	
p-Wert	Interaktion Imprinting/Dignität 0,45			Dignität 0,67			Imprinting 0,29

3.2.3.2 Expression in Abhängigkeit von Dignität

Unabhängig vom Imprintingstatus zeigte sich kein Unterschied der *CTCF*-Expression zwischen Tumor- und Nichttumorgewebe, siehe auch Tabelle 17.

Tabelle 17: Vergleich der mittleren Δ ct-Werte der *CTCF*-qPCR zwischen N und T. Die Fallzahl variiert probenbedingt. SD bezeichnet die Standardabweichung ist somit ein Streuungsmaß. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. RFC bezeichnet die relative differentielle Genexpression (Relative Fold Change).

	N	T
Mittelwert Δ ct-Werte	2,67	2,83
SD	2,25	2,47
p-Wert	0,73	
Fallzahl n	53	51

3.2.4 Korrelation zwischen *IGF2* und *CTCF*

Nach Test auf Normalverteilung wurden nach Pearson die Korrelationskoeffizienten zwischen der Expression von *CTCF* und *IGF2* derselben Fälle für N, T, LOI und ROI berechnet. Es zeigte sich für keine Gruppe eine signifikante Korrelation zwischen *IGF2* und *CTCF*, siehe auch Tabelle 18.

Tabelle 18: Korrelationen der Δ ct-Werte der *IGF2* RT-qPCR mit den Δ ct-Werten der *CTCF* RT-qPCR derselben Fälle für N, T, LOI und ROI (Korrelationskoeffizienten r nach Pearson bei Normalverteilung). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation. Test- und probenbedingt variierten die Fallzahlen.

	N	T	LOI	ROI
Korrelationskoeffizient r	0,16	0,13	0,35	-0,15
p-Wert	0,32	0,43	0,40	0,62
Fallzahl n	39	40	8	13

3.2.5 miR-675-Expression

3.2.5.1 Vergleich der Expression zwischen N und T sowie LOI und ROI

Der Vergleich der mittleren Δ ct-Werte der qPCR von miR-675 zeigte weder einen signifikanten Unterschied zwischen N ($n=25$) und T ($n=30$) (unabhängig von Imprinting) noch zwischen LOI (12) und ROI (16) (unabhängig von N und T). Von den 25 Proben N konnte jeweils auch eine Probe T untersucht werden, entsprechend 25 gepaarten Proben desselben Falls. In neun der 25 gepaarten Proben zeigte sich eine höhere Expression in T. Probenbedingt variierten die Fallzahlen, besonders die Proben, die informativ für LOI/ROI sind, wiesen unterschiedliche Fallzahlen auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Vergleich der durchschnittlichen Δ ct-Werte der miR-675 qPCR zwischen N und T sowie LOI und ROI. Es zeigte sich jeweils kein signifikanter Unterschied.

	N	T	LOI	ROI
Mittelwert	6,75	7,13	6,97	7,69
p-Wert		0,55		0,38
SD	2,43	2,23	2,06	2,20
Fallzahl n	25	30	12	16

Der Vergleich zwischen LOI und ROI in Abhängigkeit von N und T erbrachte in der Analyse per 2way-ANOVA wie auch der Vergleich zwischen N und T in Abhängigkeit von LOI und ROI keine signifikanten Unterschiede.

3.2.5.2 Korrelation zu IGF2-Expression

Nach Test auf Normalverteilung wurden nach Pearson die Korrelationskoeffizienten zwischen der Expression von miR-675 und IGF2 derselben Fälle berechnet. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen IGF2 und miR-675. Die Ergebnisse sind in Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 25: Korrelationen der Δ ct-Werte der IGF2 RT-qPCR mit den Δ ct-Werten der miR-675-qPCR derselben Fälle für N, T, LOI und ROI. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation. Test- und probenbedingt variierten die Fallzahlen. Der Korrelationskoeffizient r wurde nach Pearson berechnet.

	N	T	LOI	ROI
Korrelationskoeffizient r	0,13	-0,04	0,11	-0,21
p-Wert	0,57	0,90	0,77	0,46
Fallzahl n	20	15	9	14

3.2.6 RB-Expression

Die Expression von RB – mRNA wurde in insgesamt 35 Proben per RT-qPCR untersucht. Von diesen waren 18 N und 17 T. 13 der Proben waren informativ für ihren Imprintingstatus, resultierend in fünf LOI (davon vier N und ein T) und acht ROI (davon vier N und vier T).

3.2.6.1 Expression in Abhängigkeit von Dignität

Bei den 35 getesteten Proben konnte kein Unterschied in der RB-Expression zwischen N und T festgestellt werden. Die Stichprobe N (n=18) zeigte einen mittleren Δ ct-Wert von $5,58 \pm 3,20$, die Stichprobe T (n=17) einen mittleren Δ ct-Wert von $5,37 \pm 1,97$. Tabelle 26 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 26: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der RB RT-qPCR für N und T. SD bezeichnet als Standardabweichung die Streuung der Δ ct-Werte. Die Fallzahl n variiert probenbedingt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der RB-Expression zwischen N und T. Der p-Wert wurde in einem zweiseitigen T-Test bestimmt.

	Mittelwert Δ ct-Werte	SD	p-Wert	Fallzahl n
N	5,58	3,20	0,82	18
T	5,37	1,97		17

3.2.6.2 Expression in Abhängigkeit von Imprinting

Die Analyse der 13 für ihren Imprintingstatus informativen Proben zeigte ebenfalls keinen Unterschied in der Expression von *RB*-mRNA. So zeigte LOI (n=5) einen mittleren Δ ct-Wert von $6,11 \pm 2,42$, ROI einen mittleren Δ ct-Wert von $5,98 \pm 1,87$.

Auf eine Unterteilung in weitere Subgruppen nach Imprintingstatus und N/T wurde auf Grund der sehr geringen Fallzahlen verzichtet (LOI T n=1). Tabelle 27 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 27: tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der *RB*-qPCR für LOI und ROI. SD bezeichnet als Standardabweichung die Streuung der Δ ct-Werte. Die Fallzahl n variiert probenbedingt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der *RB*-Expression zwischen LOI und ROI. Der p-Wert wurde in einem zweiseitigen T-Test bestimmt.

	Mittelwert Δ ct-Werte	SD	p-Wert	Fallzahl n
LOI	6,11	2,42	0,91	5
ROI	5,98	1,87		8

3.2.6.3 Korrelation zur miR-675-Expression

Die Korrelation der *RB* – mRNA zur miR-675-Expression konnte nach Testung auf Normalverteilung in 18 Fällen bestimmt werden. Davon waren 7 T und 11 N, zudem konnte von 4 LOI und von 6 ROI die Korrelation berechnet werden. Weder für alle Proben zusammengefasst, noch getrennt nach LOI/ROI oder N und T ergab sich eine signifikante Korrelation der *RB* – mRNA mit der Expression der miR-675.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Korrelationen der Ergebnisse der miR-675 qPCR mit denen der *RB*-RT-qPCR (Korrelation der Δ ct-Werte) nach Test auf Normalverteilung (Korrelationskoeffizient r nach Pearson). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation (p-Wert im zweiseitigen T-Test berechnet). Die Fallzahl n variiert probenbedingt.

	Gesamt	N	T	LOI	ROI
Korrelationskoeffizient r	-0,04255	0,2443	-0,4933	-0,38721973	0,08075
p-Wert	0,8669	0,469	0,2606	0,6128	0,8791
Fallzahl n	18	11	7	4	6

3.3 Aktivität der einzelnen Promotoren und deren Korrelation zur Genexpression

Die Promotoraktivität wurde wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben mittels RT-qPCR der den Promotoren zugehörigen Transkriptvarianten gemessen. Die Ergebnisse variierten stark, sowohl innerhalb eines Promotors zwischen N und T als auch zwischen den

einzelnen Promotoren. Für den Promoter P3 und P4 zeigte sich eine signifikant stärkere Expression in N als in T. So ergab sich in P3 eine 2,92 – fach stärkere Expression in N als in T, bei einem p-Wert von 0,0002 im zweiseitigen t-Test (n=45 für T und N). In P4 ergab sich eine 2,96 – fach höhere Expression in N gegenüber T (n=45 für T und N), bei einem p-Wert von 0,005 im zweiseitigen t-Test. Für die Promotoren P1 und P2 ergab sich kein signifikanter Unterschied auf Transkriptebene zwischen N und T. Die detaillierten Ergebnisse sind in den Abschnitten zu den einzelnen Promotoren beschrieben sowie in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Unterschiede der Expression der Transkriptvarianten (in Δ ct-Werten) zwischen N und T innerhalb desselben Promotors. Die mit * gekennzeichneten Promotoren zeigen jeweils einen signifikanten Unterschied mit höheren Δ ct-Werten in. Test- und probenbedingt variiert die Fallzahl zwischen den unterschiedlichen Promotoren und teilweise zwischen N und T innerhalb eines Promotors. Die relative differentielle Expression RFC ist im Verhältnis N zu T angegeben. SD bezeichnet die Standardabweichung der Δ ct-Werte. p-Werte wurden im zweiseitigen t-Test berechnet.

Promotor	P1	P2	P3*	P4*
Δ ct N	10,35	8,76	5,08	6,56
Δ ct T	9,85	9,56	6,62	8,17
RFC N vs T	0,71	1,74	2,92	2,96
p-Wert	0,2215	0,2886	0,0002	0,005
SD N	1,55	3,10	1,87	1,44
SD T	1,76	2,88	1,71	3,14
Fallzahl	n	n	n	n
	T: 32 N: 36	T: 33 N: 31	T&N: je 45	T&N: je 45

3.3.1 Vergleich der Aktivität der einzelnen Promotoren untereinander

Unabhängig von N oder T wiesen die Promotoren (gemessen anhand der Expression der Transkriptvarianten) eine sehr unterschiedliche Aktivität untereinander auf. Promotor P3 war in N und T der Promotor mit der weitaus stärksten Aktivität, gefolgt von Promotor P4 (Abbildung 17). Die Transkriptvarianten der Promotoren P1 und P2 waren um ein Vielfaches schwächer exprimiert. Die Reihenfolge der Promotoraktivität war für N und T gleich.

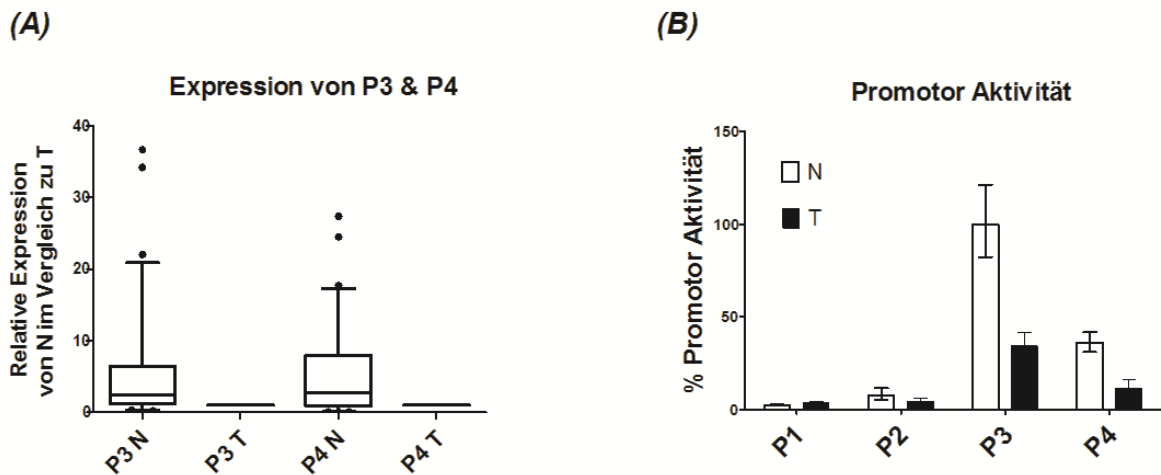


Abbildung 17: (A) Die Expression der beiden vornehmlich exprimierten Transkriptvarianten der Promotoren P3 und P4 jeweils im Vergleich N (n=45) zu T (n=39), wobei T=1 und N als relatives Vielfaches (Relative Fold Change) abgebildet ist. Darstellung als Box-Whiskers-Plot mit Median, oberer/unterer Quartil und Ausreißern. (B) Vergleich der relativen Promotoraktivität der vier Promotoren P1-P4 zueinander und innerhalb der einzelnen Promotoren jeweils zwischen N und T. Die höchste durchschnittliche Expression in P3 N wurde als 100% gesetzt, entsprechend die Promotoraktivität. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Durch Normalisierung auf P3 N, wo die stärkste Expression einer Transkriptvariante gemessen wurde, wurde die Werte für N und T der anderen Promotoren in Relation zueinander gesetzt (Relative Fold Change). Die Relationen zueinander sind in Tabelle 30 gegenübergestellt.

Tabelle 30: Relative Expression (Relative Fold Change) der Promotoren zueinander. Promotor P3 ist sowohl in N als auch in T am stärksten exprimiert. Test- und probenbedingt variiert die Fallzahl zwischen den unterschiedlichen Promotoren und teilweise zwischen N und T innerhalb eines Promotors.

Promotor	P1	P2	P3	P4
N	0,026	0,0784	1	0,360
T	0,107	0,131	1	0,343
Fallzahl n	T: 32 N: 36	T: 33 N: 31	T&N: je 45	T&N: je 45

Zur Berechnung der statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Promotoren in Abhängigkeit von N und T wurde nach Normalisierung eine Analyse per 2way-ANOVA durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 31 zusammengefasst sind. Bis auf den Vergleich zwischen P1 und P2, wo es weder zwischen N noch zwischen T signifikante Unterschiede gab, zeigten sich zwischen allen anderen Promotoren sowohl zwischen N als auch zwischen T signifikante bis hochsignifikante

Unterschiede. P3 zeigt sich in N und in T als aktivster Promotor (p-Wert $\leq 0,0001$ gegenüber P1, P2 und P4 sowohl für N als auch T).

Tabelle 31: Übersicht über die Unterschiede der Promotoraktivität untereinander in Abhängigkeit von N und T. Bis auf den Vergleich zwischen P1 und P2 ergab sich überall ein hoch- oder höchstsignifikanter (*) Unterschied, die p-Werte sind jeweils angegeben. Die Unterschiede berechnen sich aus der Differenz der Mittelwerte der Promotoren zu P3, was als aktivster Promotor 100% entspricht. Die Unterschiede ergeben die prozentualen Relationen, so hat P1 beispielsweise in N eine 97,4% niedrigere Aktivität als P3 in N, respektive eine 2,6%ige Aktivität von P3.**

P1 vs P2		P1 vs P3		***	P1 vs P4		***	
	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert		
N	5,23	> 0.05	97,4	<0.001	33,45	<0.001		
T	0,81	> 0.05	30,75	<0.001	8,11	<0.01		
P2 vs P1		P2 vs P3		***	P2 vs P4		***	
	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert		
N	-5,23	> 0.05	92,17	<0.001	28,21	<0.001		
T	-0,81	> 0.05	29,94	<0.001	7,30	<0.01		
P3 vs P1		***	P3 vs P2		***	P3 vs P4		***
	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert		
N	-97,40	<0.001	-92,17	<0.001	-63,95	<0.001		
T	-30,75	<0.001	-29,94	<0.001	-22,64	<0.001		
P4 vs P1		***	P4 vs P2		***	P4 vs P3		***
	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert	Unterschied	p-Wert		
N	-33,45	P<0.001	-28,21	<0.001	63,95	<0.001		
T	-8,11	P<0.01	-7,30	<0.01	22,64	<0.001		

3.3.2 Promotor 1

Von Promotor 1 wurden 36 N und 32 T untersucht. Die Δ ct-Werte der N reichten von 7,19 bis 13,18. Der Mittelwert lag bei 10,35 bei einer SD von 1,55. Die Δ ct-Werte der T reichten von 6,07 bis 12,76. Der Mittelwert lag bei 9,85 bei einer SD von 1,76.

Der $\Delta\Delta$ ct-Wert der mittleren Δ ct-Werte von P1 von N und T lag somit bei 0,5, was einer ungefähr 0,71-fachen relativen differentiellen Expression (RFC) der Transkriptvariante von P1 in N gegenüber T entspricht (p-Wert in einem zweiseitigen t-Test 0,22). Es lag somit kein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität von P1 zwischen N und T vor.

Tabelle 32: Tabellarische Übersicht der statistischen Werte der Δ ct-Werte der P1 RT-qPCR getrennt nach N und T. SD bezeichnet die Standardabweichung, der $\Delta\Delta$ ct –Wert wird aus der Differenz der Mittelwerte gebildet, der RFC ergibt sich nach der $2^{\Delta\Delta$ ct-Methode. Die Fallzahl variiert probenbedingt.

P1		
	N	T
Mittel	10,35	9,85
SD	1,55	1,76
Fallzahl n	36	32
$\Delta\Delta$ ct	0,50	
RFC N zu T	0,71	
p-Wert	0,22	

3.3.3 Promotor 2

Von Promotor 2 wurden 31 N und 33 T untersucht. Die Δ ct-Werte der N reichten von 4,74 bis 15,19. Der Mittelwert lag bei 8,76 bei einer SD von 3,10. Die Δ ct-Werte der T reichten von 2,28 bis 13,94. Der Mittelwert lag bei 9,56 bei einer SD von 3,88.

Der $\Delta\Delta$ ct-Wert der mittleren Δ ct-Werte von P2 von N und T lag somit bei -0,80, was einer ungefähr 1,74-fachen relativen differentiellen Expression (RFC) der Transkriptvariante von P2 in N gegenüber T entspricht (p-Wert in einem zweiseitigen t-Test 0,29). Es lag somit kein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität von P2 zwischen N und T vor.

Tabelle 33: Tabellarische Übersicht der statistischen Werte der Δ ct-Werte der P2 RT-qPCR getrennt nach N und T. SD bezeichnet die Standardabweichung, der $\Delta\Delta$ ct –Wert wird aus der Differenz der Mittelwerte gebildet, der RFC ergibt sich nach der $2^{\Delta\Delta$ ct-Methode. Die Fallzahl variiert probenbedingt.

P2		
	N	T
Mittel	8,76	9,56
SD	3,10	3,88
Fallzahl	31	33
$\Delta\Delta$ ct	-0,80	
RFC N zu T	1,74	
p-Wert	0,29	

3.3.4 Promotor 3

Von Promotor 3 wurden 45 N und 45 T untersucht. Die Δct -Werte der N reichten von 0,82 bis 12,11. Der Mittelwert lag bei 5,08 bei einer SD von 1,87. Die Δct -Werte der T reichten von 2,19 bis 10,98. Der Mittelwert lag bei 6,62 bei einer SD von 1,71.

Der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert der mittleren Δct -Werte von P3 von N und T lag somit bei -1,54, was einer 2,92-fachen relativen differentiellen Expression der Transskriptvariante von P3 in N gegenüber T entspricht (p-Wert in einem zweiseitigen t-Test 0,0002). Es lag somit ein hochsignifikanter Unterschied der Promotoraktivität von P3 zwischen N und T vor.

Tabelle 34: Tabellarische Übersicht der statistischen Werte der Δct -Werte der P3 RT-qPCR getrennt nach N und T. SD bezeichnet die Standardabweichung, der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert wird aus der Differenz der Mittelwerte gebildet, der RFC ergibt sich nach der $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode. Die Fallzahl variiert probebedingt.

P3		
	N	T
Mittel	5,08	6,62
SD	1,87	1,71
Fallzahl	45	45
$\Delta\Delta\text{ct}$	-1,54	
RFC N zu T	2,92	
p-Wert	0,0002	

3.3.5 Promotor 4

Von Promotor 4 wurden 45 N und 45 T untersucht. Die Δct -Werte der N reichten von 4,14 bis 9,54. Der Mittelwert lag bei 6,56 bei einer SD von 1,44. Die Δct -Werte der T reichten von 2,33 bis 17,96. Der Mittelwert lag bei 8,17 bei einer SD von 3,14.

Der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert der mittleren Δct -Werte von P4 von N und T lag somit bei -1,61, was einer ungefähr 2,96-fachen relativen differentiellen Expression der Transskriptvariante von P4 in N gegenüber T entspricht (p-Wert in einem zweiseitigen t-Test 0,0039). Es liegt somit ein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität von P4 zwischen N und T vor.

Tabelle 35: Tabellarische Übersicht der statistischen Werte der Δ ct-Werte der P4 RT-qPCR getrennt nach N und T. SD bezeichnet die Standardabweichung, der $\Delta\Delta$ ct –Wert wird aus der Differenz der Mittelwerte gebildet, der RFC ergibt sich nach der $2^{\Delta\Delta$ ct-Methode. Die Fallzahl variiert probenbedingt.

P4		
	N	T
Mittel	5,08	8,17
SD	1,44	3,14
Fallzahl	45	45
$\Delta\Delta$ ct	-1,56	
RFC N zu T	2,96	
p-Wert	0,0039	

3.3.6 Korrelation der *IGF2*-Expression zur Promotoraktivität

Von allen Promotoren wurde die Korrelation zwischen der Expression der spezifischen Transkriptvariante (stellvertretend für die Promotoraktivität) und der Expression der *IGF2*-mRNA berechnet, jeweils getrennt nach N und T. Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen sind in Tabelle 36 zusammengefasst und in Abbildung 18 grafisch dargestellt.

Tabelle 36: Übersicht der Korrelationen der Promotoraktivität mit der *IGF2*-mRNA jeweils für N und T. Bei Gauss-Verteilung der Δ ct-Werte wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet, bei Nicht-Vorhandensein nach Spearman (so in P4 T, P2 N). Promotoren, die mit + markiert sind, zeigen eine signifikante Korrelation in N. P3 zeigt sowohl in N als auch in T eine signifikante Korrelation der *IGF2*-mRNA zur Promotoraktivität. Die Fallzahl n variiert probenbedingt.

	P1 ⁺	P2	P3 ⁺	P4 ⁺
N				
Korrelationskoeffizient r	-0,51	0,03	0,45	0,72
p-Wert	0,004	0,91	0,002	≤0,0001
n	31	17	45	45
T				
Korrelationskoeffizient r	0,05	-0,22	0,51	0,05
p-Wert	0,79	0,37	0,001	0,74
n	28	18	39	41

Für die Expression von *IGF2* ergab sich im Normalgewebe eine signifikante Korrelation mit der Aktivität von P1, P3 und P4. So zeigte P1 in N als einziger Promotor bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,51$ eine mittelstarke negative Korrelation zur *IGF2*-Expression (p-Wert 0,004, berechnet in einem zweiseitigen t-Test). P3 zeigte eine

mittelstark positive Korrelation von $r = 0,45$ bei $p = 0,002$ im zweiseitigen T-Test. P4 zeigt mit $r = 0,72$ eine hochsignifikante, starke positive Korrelation ($p \leq 0,0001$ im zweiseitigen t-Test).

Im Tumorgewebe ergab sich lediglich für P3 eine signifikante Korrelation bei einem Koeffizienten von $0,51$ und einem p-Wert von $\leq 0,001$ im zweiseitigen t-Test. Somit liegt sowohl in N als auch in T eine signifikante mittlere Korrelation von IGF2 und der Aktivität von P3 vor.

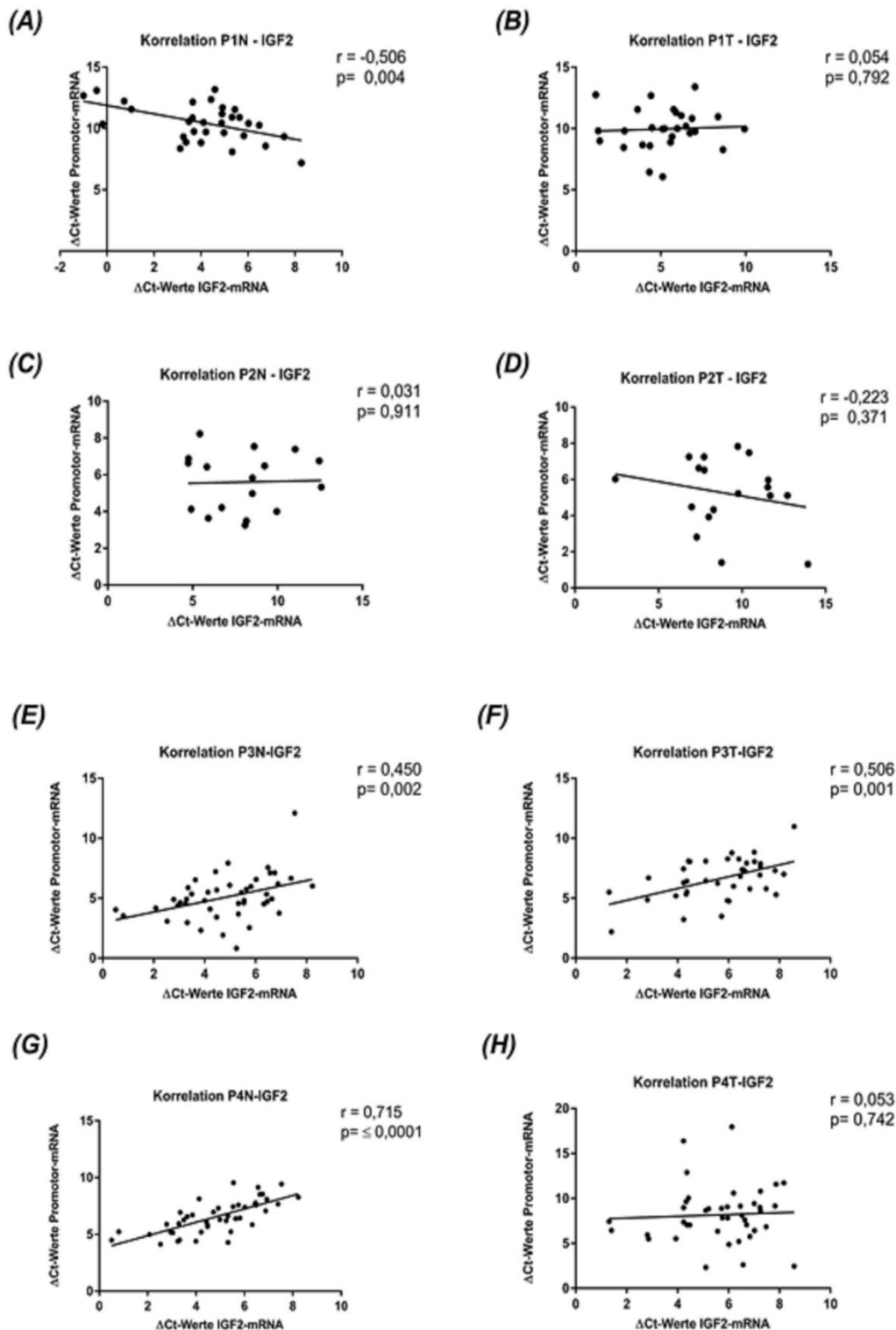


Abbildung 18: Korrelationen der Aktivität der Promotoren P1-P4 zur *IGF2* – mRNA, getrennt nach N und T für jeden Promotor. Die Δ Ct-Werte der Promotor-qPCR (Ordinate) wurden mit den Δ Ct-Werten der *IGF2* RT-qPCR (Abszisse) korreliert. (A) P1 zeigt in N eine signifikante, mittlere negative Korrelation der Promotoraktivität zur *IGF2*-Expression. (B) In T findet sich keine Korrelation zwischen der Aktivität von P1 mit *IGF2*. (C)+(D) P2 zeigt weder in N noch in T eine Korrelation zur *IGF2*-Expression. (E)+(F) P3 korreliert sowohl in N als auch in T positiv mit der Expression der *IGF2*-mRNA. (G) P4 zeigt in N eine höchst signifikante, starke positive Korrelation zur *IGF2*-Expression. (H) In T findet sich für P4 keine Korrelation zwischen Promotoraktivität und *IGF2*-Expression.

Lieber Tobias, die Auflösung der Abbildungen aus der Publikation ist relativ schlecht – kannst Du nicht die Originalgrafik einfügen? In diesem Fall bitte zitieren! (gilt auch für die anderen Abb aus dem paper)

3.4 Proteinkonzentrationen im Gewebe

Die Konzentration von IGF2-Protein in gepaartem Tumor- und Normalgewebe von 17 Patienten wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt. Die durchschnittliche IGF2-Proteinkonzentration im Gewebelysat von N betrug 2,45 ng/ μ l (SD 1,19), in T 2,04 ng/ μ l (SD 1,28), siehe auch Abbildung 19 und Tabelle 37. Der Unterschied zwischen N und T zeigte auf Grund der hohen Streuung keine Signifikanz (p -Wert 0,34 im zweiseitigen t -Test). Vier Patienten (23,5%) zeigten eine höhere Expression von IGF2-Protein in T als in N. Drei dieser vier Patienten zeigten auch eine höhere Expression der *IGF2*-mRNA, beim vierten Patienten versagte die Bestimmung der *IGF2*-mRNA per qPCR wiederholt aus unbekanntem Gründen. Die Patienten mit niedrigerem IGF2-Protein in T hatten korrespondierend alle eine niedrigere *IGF2*-mRNA-Expression in T.

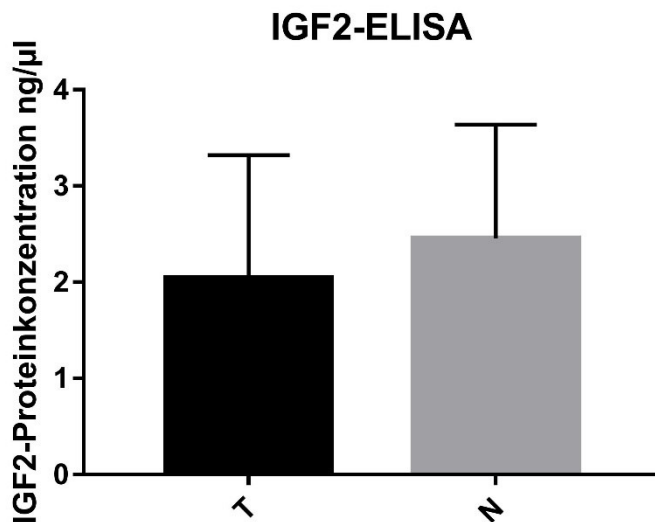


Abbildung 19: Auswertung der IGF2-Bestimmung per ELISA. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (N) gefunden werden (jeweils $n=17$).

Tabelle 37: Ergebnisse des IGF2-ELISA aus Prostatlysaten. Die Proteinkonzentration wurden in ng/µl umgerechnet. SD gibt als Standardabweichung die Streuung der Werte an. In vier der 17 gepaarten Proben war die IGF2-Proteinkonzentration in T höher als in N. Der Unterschied der Mittelwerte von N und T war nicht signifikant.

	IGF2 in ng/µl	SD	p-Wert	IGF2 N>T	IGF2 T>N
N (n=17)	2,45	1,19	0,33	13	
T (n=17)	2,04	1,28		4	

Eine direkte Korrelation der Proteinkonzentrationen mit der Genexpression konnte anhand der Δ ct-Werte oder der RFC von *IGF2* nicht gezeigt werden. Das Verhältnis von Protein- und Genexpression zwischen N und T war jedoch für alle gepaarten Proben gleichsinnig. Die Werte der Korrelationskoeffizienten sind mit p-Werten in Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 20: Eine Untersuchung auf Korrelation der IGF2-Proteinkonzentration mit den Ergebnissen der IGF2-RT-qPCR. Es wurden getrennt die Korrelationen der Ergebnisse des ELISA mit den Werten Δ ct-Werten und der relativen differentiellen Genexpression (RFC) bestimmt. Da für eine Probe, bei der die Proteinkonzentration bestimmt wurde, die RT-qPCR wiederholt scheiterte, weicht die Fallzahl hier von der des ELISA ab. Bei vorliegender Normalverteilung wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson bestimmt. Test auf Signifikanz nach zweiseitigem t-Test.

Korrelation Protein – Δ ct-Werte			Korrelation Protein – RFC		
	Korrelationskoeffizient r	p-Wert		Korrelationskoeffizient r	p-Wert
T (n=17)	0,164	0,54	T (n=17)	-0,262	0,32
N (n=17)	0,089	0,74	N (n=17)	-0,157	0,56

Ein Exakter Test nach Fisher ergab jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression auf Protein- und Transkriptionsebene in *IGF2* T > N (p-Wert 0,0015), siehe auch als 2x2-Kontingenztafel in Tabelle 39. Somit findet sich in einem Teil der Patienten sowohl auf Proteinebene als auch Transkriptionsebene eine verstärkte Expression in T gegenüber N.

Tabelle 39: 2x2-Kontingenztafel der Abhängigkeit des Verhältnisses der Proteinkonzentration in T zu N von der mRNA-Konzentration im Verhältnis T zu N. Nach Exaktem Test nach Fisher ergibt sich bei einem p-Wert von 0,0015 eine signifikante Abhängigkeit einer erhöhten IGF2-Proteinkonzentration von einer erhöhten *IGF2*-mRNA-Expression in T im Vergleich zu N (gepaarte Proben, n=17).

	mRNA T/N > 1	mRNA T/N < 1	Total
Protein T/N > 1	3	0	3
Protein T/N < 1	0	14	14
Total	3	14	17

3.5 Promotormethylierung

3.5.1 Semiquantitative Auswertung per Methylierungsspezifischer PCR (MSP)

Mittels MSP wurden von uns in 12 Fällen jeweils Tumor- und Nicht-Tumor-Gewebe desselben Patienten, sowie zusätzlich von einem Fall – hier lag kein Tumorgewebe mehr vor – in Normalgewebe die Methylierung der *IGF2*-Promotor-Regionen untersucht.

Für jeden Promotorbereich wurde wie im Methodenteil beschrieben für alle Proben das PCR-Produkt des Primerpaares für methylierte und unmethylierte CpG-Stellen in seiner Konzentration bestimmt. Die Angaben erfolgen hierfür in ng/µl. Als statistischer Test wurde jeweils ein zweiseitiger t-Test durchgeführt.

3.5.1.1 Vergleich Tumor- mit Normalgewebe

Bis auf Promotorbereich P2C waren bei allen Promotorbereichen die Konzentrationen des PCR-Produktes der Primerpaare für unmethylierte CpG-Stellen (U) zum Teil deutlich stärker als die für methylierte CpG-Stellen (M). In allen anderen Bereichen ergaben sich z.T. massiv schwächere Konzentrationen für M als für U.

In den Bereichen 2A, 2C, 3A, 3B und 4B ergaben sich für M stärkere Konzentrationen der PCR-Produkte in T gegenüber N, jeweils nicht signifikant. In den Bereichen 2B und 4A ergab sich eine höhere Konzentration für M in N gegenüber T. Für 4A ergab sich relativ eine um 16% höhere Konzentration, wobei die absoluten Werte im Vergleich zu den Konzentrationen für U marginal sind. Für Bereich 2B ergab sich relativ eine 2,75-fach stärkere Konzentration für M in N gegenüber T mit einem statistischen Trend von 0,10 im zweiseitigen t-Test.

Bei Zusammenfassung der Bereiche P2A, P2B und P2C zeigt sich, dass diese mit dieser Methode die stärkste Methylierung zeigen. Diese drei Bereiche zusammen zeigen eine fast gleichermaßen ausgeprägte Methylierung zwischen T und N. Das Mittel der Konzentrationen der PCR-Produkte lag hier für T bei 0,51 (Standardabweichung 0,80) und für N bei 0,54 (Standardabweichung 0,61).

Bei Zusammenfassung der Bereiche P3A und P3B ergab sich für Promotorregion 3 in einem zweiseitigen T-Test mit einem p-Wert von 0,027 eine signifikant höhere Methylierung der untersuchten CpG-Stellen in T. Für kein N wurde mit dieser Methode eine Methylierung in Promotorbereich 3 gezeigt. Die Promotorbereiche P3A und P3B wiesen jeweils einen statistischen Trend zu stärkeren Konzentration für M in T gegenüber N auf (p-Wert von 0,07).

Über die gesamten untersuchten Promotorbereiche gesehen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Methylierung zwischen T und N (p-Wert 0,80 im zweiseitigen t-Test). Die kompletten Ergebnisse der MSP sind in Tabelle 40 aufgeführt. Insgesamt wiesen die PCR-Produkte für die U-Primer, also die Primerpaare, die an unmethylierten CpG-Stellen binden, bei gleicher Menge eingesetzter DNA eine deutlich stärkere Amplifikation als die der M-Primer – die an methylierten CpG-Stellen binden – auf (p-Wert < 0,0001 im zweiseitigen t-Test), auch getrennt nach N und T blieben die Unterschiede signifikant (p=0,002 für T und N im zweiseitigen t-Test). Siehe auch Abbildungen 20 und 21. Indirekt kann daraus geschlossen werden, dass die Promotorbereiche insgesamt eher unmethyliert vorliegen. Es zeichnen sich teilweise jedoch Unterschiede der Methylierung zwischen T und N bei einzelnen Promotoren oder Promotorteilbereichen ab.

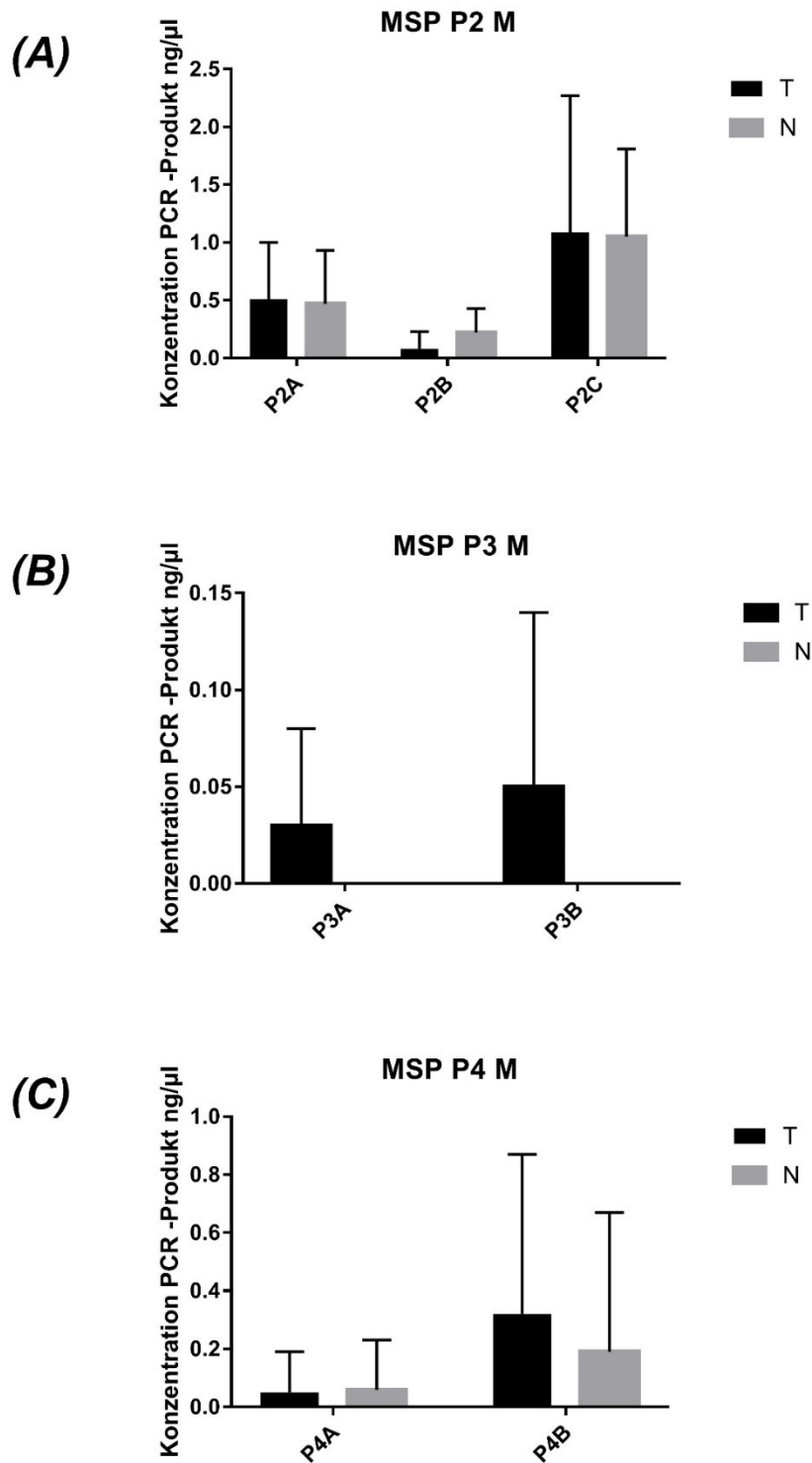


Abbildung 20: Grafische Darstellung der semiquantitativen Methylierungsanalyse der *IGF2*-Promotoren mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) für Promotor 2-4 (P2-4) und deren jeweiligen Unterteilungen A/B/C bzw. A/B. Die Darstellung bezieht sich auf die Ergebnisse der PCR für die M-Primerpaare, die an methylierten CpG-Stellen binden und eine Amplifikation somit nur im methylierten Zustand erlauben. Die Konzentrationen der PCR-Produkte wurden densitometrisch in ng/µl bestimmt. In P3A und P3B konnte in N mit dieser Methode keine Methylierung nachgewiesen werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Promotorassays gefunden.

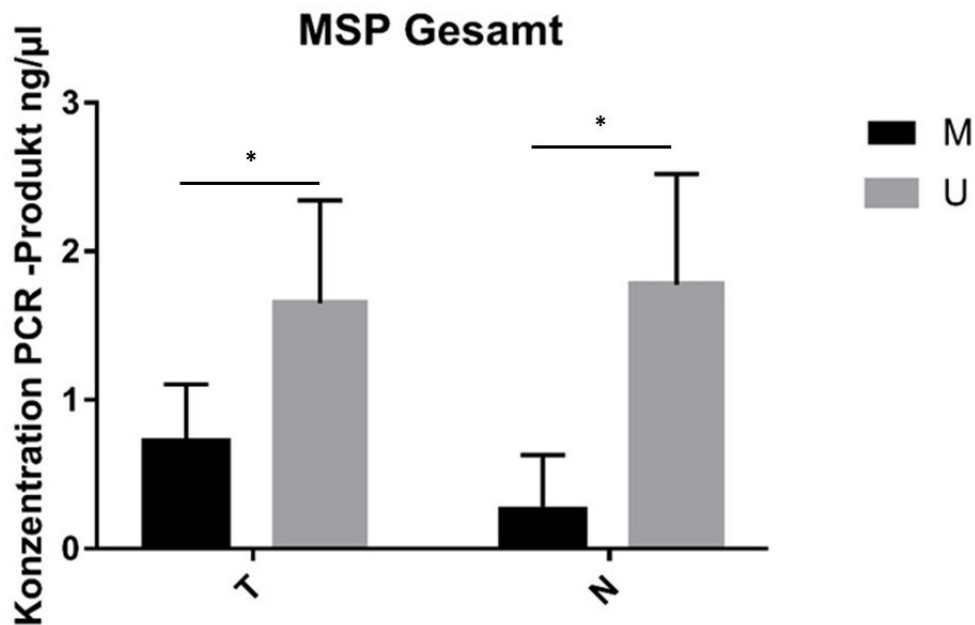


Abbildung 21: Gesamtauswertung der methylierungsspezifischen PCR (MSP). Über alle Promotorassays hinweg zeigte sich eine stärkere Amplifikation (gemessen an der Konzentration des PCR-Produkts bei gleicher Menge eingesetzter DNA) der Produkte der U-Primerpaare (U), die an unmethylierten CpG-Stellen binden. M steht für die PDR-Produkte der Primerpaare, die an methylierten CpG-Stellen binden. T bezeichnet Tumorgewebe, N Normalgewebe.

- Promotorbereich 2A

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares M betrug im Mittel 0,47 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,46 und 0,51 ng/μl bei einer Standardabweichung von 0,49 für T. Relativ gesehen betrug die Methylierung von N ca. das 0,92-fache von T. Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 2,14 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,34 und 2,10 ng/μl für T bei einer Standardabweichung von 0,45. Sowohl bei N als auch bei T war die Konzentration des PCR-Produkts von U mehr als viermal so stark wie die von M.

- Promotorbereich 2B

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für M betrug im Mittel 0,22 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,21 und 0,08 ng/μl bei einer Standardabweichung von 0,15 für T. Relativ gesehen betrug die Methylierung von N das 2,75 -fache von T (p-Wert 0,07). Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 1,64 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,23 und 1,40 ng/μl für T bei einer

Standardabweichung von 0,51. Bei N war die Konzentration des PCR-Produkts von U mehr als siebenmal so stark wie die von M, bei T mehr als 16-mal so stark.

- Promotorbereich 2C

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für M betrug im Mittel 1,05 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,76 und 1,09 ng/μl bei einer Standardabweichung von 1,18 für T. Relativ gesehen betrug die Methylierung von N ca. das 2,62-fache von T. Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 0,97 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,76 und 0,72 ng/μl für T bei einer Standardabweichung von 0,57. Sowohl bei N als auch bei T war die Konzentration des PCR-Produkts von U etwas schwächer als die von M.

- Promotorbereich 3A

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für M betrug bei allen Proben 0 ng/μl für N. Bei T ergab sich ein Mittel von 0,03 ng/μl bei einer Standardabweichung von 0,05, wobei bei 9 von 12 Proben ebenfalls kein PCR-Produkt für M nachweisbar war. Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 1,51 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,41 und 1,65 ng/μl für T bei einer Standardabweichung von 0,41. Bei T war die Konzentration des PCR-Produkts von U mehr als 58-mal so stark wie die von M.

- Promotorbereich 3B

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für M betrug wie in Promotorbereich 3A bei allen Proben 0 ng/μl für N. Bei T ergab sich eine mittlere Konzentration von 0,05 ng/μl bei einer Standardabweichung von 0,09. Auch hier waren nur 3 von 12 Proben positiv für M bei T, allerdings drei andere als bei P3A. Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 1,24 ng/μl für N bei einer Standardabweichung von 0,88 und 0,99 ng/μl für T bei einer Standardabweichung von 0,72. Bei T war die Konzentration des PCR-Produkts von U mehr als 19-mal so stark wie die von M.

- Promotorbereich 4A

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für M betrug im Mittel 0,06 ng/µl für N bei einer Standardabweichung von 0,17 und 0,05 ng/µl bei einer Standardabweichung von 0,14 für T. Relativ gesehen betrug die Methylierung von N ca. das 1,16-fache von T. Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 1,86 ng/µl für N bei einer Standardabweichung von 0,48 und 1,35 ng/µl für T bei einer Standardabweichung von 0,71. Bei N war die Konzentration des PCR-Produkts von U mehr als 32-mal so stark wie die von M, bei T mehr als 27-mal.

- Promotorbereich 4B

Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für M betrug im Mittel 0,19 ng/µl für N bei einer Standardabweichung von 0,48 und 0,32 ng/µl bei einer Standardabweichung von 0,55 für T. Relativ gesehen betrug die Methylierung von N ca. das 0,6-fache von T. Die Konzentration des PCR-Produkts des Primerpaares für U betrug im Mittel 3,32 ng/µl für N bei einer Standardabweichung von 2,05 und 3,06 ng/µl für T bei einer Standardabweichung von 2,13. Bei N war die Konzentration des PCR-Produkts von U mehr als 17-mal so stark wie die von M, bei T mehr als neunmal.

Tabelle 40: Zusammenfassung der MSP der IGF2-Promotorbereiche. Fallzahl n=12 für T und n=13 für N. Die Konzentration der PCR-Produkte ist in ng/µl angegeben. Die Berechnung der p-Werte erfolgte in einem zweiseitigen t-Test. N/T bezeichnet das Verhältnis der Methylierung zwischen N und T (für Promotor 3A, 3B und P3 gesamt wurde bei einer Methylierung von 0% in N kein Verhältnis berechnet (n.d.)). Zusätzlich wurden die einzelnen Promotorbereiche jeweils zusammengefasst (P2A, 2B und 2C zu P2, P3A und P3B zu P3, P4A und 4B zu P4). Weiterhin wurde die Gesamtmethylierung der Promotorregionen von N und T aus dem Mittel der einzelnen Abschnitte berechnet.

Methylierung der einzelnen Promotorbereiche							
P2A				P2A			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,51	0,49	0,92	T	2,10	0,45	1,02
N	0,47	0,46		N	2,14	0,34	
		p-Wert	0,87		p-Wert		0,89
P2B				P2B			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,08	0,15	2,75	T	1,40	0,51	1,17
N	0,22	0,21		N	1,64	0,23	

		p-Wert			p-Wert		
		0,07			0,65		
P2C				P2C			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	1,09	1,18	0,96	T	0,72	0,57	1,35
N	1,05	0,76		N	0,97	0,76	
		p-Wert	0,92			p-Wert	0,74
P2 gesamt				P2 gesamt			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,51	0,80	1,06	T	1,58	0,51	0,88
N	0,54	0,61		N	1,41	0,44	
		p-Wert	0,86			p-Wert	0,77
P3A				P3A			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,03	0,05	n.d.	T	1,65	0,41	0,92
N	0	0		N	1,51	0,41	
		p-Wert	0,1			p-Wert	0,90
P3B				P3B			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,05	0,09	n.d.	T	1,28	0,88	0,77
N	0	0		N	0,99	0,72	
		p-Wert	0,1			p-Wert	0,62
P3 gesamt				P3 gesamt			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,04	0,07	n.d.	T	1,46	0,65	0,77
N	0	0		N	1,25	0,57	
		p-Wert	0,027			p-Wert	0,69
P4A				P4A			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,05	0,14	1,2	T	1,35	0,71	1,38
N	0,06	0,17		N	1,86	0,48	
		p-Wert	0,91			p-Wert	0,70
P4B				P4B			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,32	0,55	0,59	T	3,06	2,13	1,09
N	0,19	0,48		N	3,32	2,05	
		p-Wert	0,27			p-Wert	0,45

P4 gesamt				P4 gesamt			
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,19	0,35	0,68	T	2,21	1,42	1,17
N	0,13	0,33		N	2,59	1,27	
		p-Wert	0,56			p-Wert	0,66

Gesamtmethylierung							
M				U			
	Mittlere Konzentration	SD	N/T		Mittlere Konzentration	SD	N/T
T	0,30	0,36	0,93	T	1,65	0,69	1,07
N	0,28	0,35		N	1,78	0,74	
		p-Wert	0,80			p-Wert	0,80

3.5.2 Quantifizierung mit Pyrosequenzierung

Mithilfe der MSP ist höchstens eine semiquantitative Auswertung möglich, da keine vergleichbare Aussage über die Effektivität der Amplifikation unterschiedlicher Primerpaare bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen getroffen werden kann, und die Auswertung densitometrisch erfolgt. Daher ist ein Rückschluss auf die Methylierung nur sehr eingeschränkt möglich. Aufgrund der Limitationen der MSP führten wir zur genaueren Quantifizierung der Methylierung eine Pyrosequenzierung bei einer größeren Gruppe von Proben durch. Mit dieser Methode kann die Methylierung jeder einzelnen Cytosin-Base exakt bestimmt werden.

Wie in 2.2.7.3 beschrieben, wurden die Assays für die einzelnen Promotorbereiche von uns für diese Methode angepasst. Für jeden der insgesamt 9 Assay wurden von uns 22 N und T ausgewählt. Aufgrund von Durchführungsschwierigkeiten und limitiertem Probenmaterial konnte nicht für jeden Assay die komplette Probengruppe getestet werden. So variiert n zwischen 18 und 22.

3.5.2.1 Vergleich Tumor- mit Normalgewebe

Die neun durchgeführten Assays decken insgesamt 100 CpG-Stellen in den Promotoren P2-P4 ab.

Ähnlich zur MSP ergab sich auch hier kein signifikanter Unterschied in der Gesamtmethylierung der getesteten CpG-Stellen zwischen N, wo die durchschnittliche Methylierung 9,65% (SD 5,17%) betrug, und T, wo die durchschnittliche Methylierung 9,33% (SD 3,97%) betrug (p-Wert 0,52 im zweiseitigen T-Test).

Bei Betrachtung der einzelnen Abschnitte und Promotoren ergibt sich ein differenzierteres Bild (siehe Tabelle 41). In den Promotorassays P2C3, P3 und P4B2 zeigten sich signifikante Unterschiede der Methylierung zwischen T und N in der Zusammenfassung der einzelnen CpG-Stellen desselben Bereichs, in zweien – Promotorassays P2C2 und P4B1 - nur bei Betrachtung einzelner CpG-Stellen innerhalb eines Bereichs.

Tabelle 41: Übersicht der durchschnittlichen Methylierung der einzelnen Promotorbereiche in %. Die Promotorassays markiert mit + zeigen insgesamt keine Signifikanz in der Methylierung zwischen T und N, jedoch in einzelnen untersuchten CpG-Stellen (siehe jeweiliger Abschnitt). Assays mit* zeigen eine Gesamtsignifikanz in der Methylierung zwischen T und N. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die zusammengenommene Methylierung der einzelnen CpG-Stellen.

	P2A	P2B	P2C1	P2C2 ⁺	P2C3 [*]	P3 [*]	P4A	P4B1 ⁺	P4B2 [*]
T	9,12	7,21	12,20	15,75	11,68	7,67	6,36	5,95	8,06
N	9,38	7,62	12,58	18,69	14,52	6,26	6,16	5,38	6,14
p-Wert	0,80	0,88	0,79	0,058	0,004	0,037	0,76	0,43	0,042
Anzahl CpG	14	16	7	5	8	16	18	11	5

Die Unterschiede zwischen N und T sind in den auffälligen Assays nicht gleichgerichtet, in P3, P4B1 und P4B2 ist die Methylierung in T stärker als in N. In P2C2 und P2C3 sowie in der Gesamtbetrachtung des Promotors 2 findet sich in N eine stärkere Methylierung als in T. Die detaillierten Ergebnisse sind in den Kapiteln der entsprechenden Promotorbereiche sowie zusammengefasst.

In einer Zusammenfassung der beiden hauptsächlich aktiven Promotoren P3 und P4 zeigt sich in insgesamt 50 analysierten CpG-Stellen in T mit durchschnittlich 7,00% (SD 1,93%) eine signifikant höhere Methylierung als in N mit durchschnittlich 5,95% (SD 2,25%) (p-Wert 0,007); siehe auch Abbildung 22.

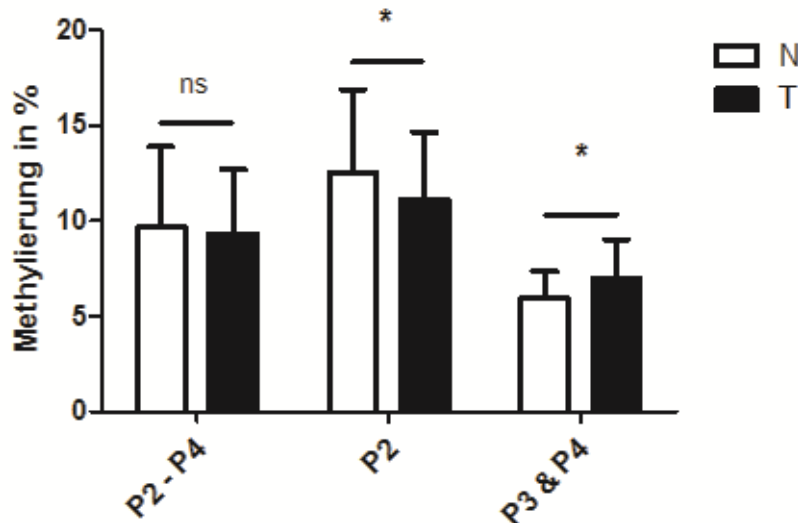


Abbildung 22: P2-P4 zeigt die durchschnittliche Gesamtmethylierung der insgesamt 100 CpG-Stellen aller neun getesteten Promotorassays im Vergleich zwischen N (je nach Assay variierend von n=22 bis N=18) und T (variierend von n=21 bis n=18) in Prozent; es ergab sich kein Unterschied. P2 zeigt die Gesamtmethylierung der insgesamt 50 CpG-Stellen der Unterbereiche von P2 bestehend aus P2A, P2B, P2C1, P2C2 und P2C3, ebenfalls im Vergleich N gegen T. Es zeigte sich eine signifikant höhere Methylierung in N gegenüber T. P3&P4 fasst analog die Ergebnisse der Assays P3, P4A, P4B1 und P4B2 zusammen, ebenfalls im Vergleich N gegen T, hier zeigte sich eine signifikant höhere Methylierung in T. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung.

3.5.2.1.1 Promotor 2

Der Promotorbereich 2 unterteilt sich in die drei verschiedenen Bereiche P2A, P2B und P2C, wobei sich P2C nochmals in die drei Unterbereich P2C1, P2C2 und P2C3 unterteilt. Die einzelnen Bereiche decken zusammen für Promotor 2 50 CpG-Stellen ab.

Alle Bereiche zusammengefasst zeigte sich insgesamt eine signifikant höhere Methylierung in N (12,54%) verglichen mit T (11,15%), p-Wert 0,04 im zweiseitigen T-Test bei einer Standardabweichung von 4,79 für N und 5,17 für T (siehe auch Abbildung 22).

3.5.2.1.1.1 Promotorbereich P2A

In Promotorbereich P2A wurden 14 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle, für T 21 Fälle untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Methylierung zwischen N (9,38%) und T (9,12%), p-Wert 0,80. Die Standardabweichung für N beträgt 3,29 und für T 1,72. Auch die Analyse der einzelnen CpG-Stellen erbrachte

keinen Unterschied zwischen N und T. Tabelle 42 zeigt die genauen Werte der einzelnen CpG-Stellen.

Tabelle 21: Durchschnittliche Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2A, jeweils im Vergleich N gegen T. Für N n=22, für T n=21. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
N	4,23	5,32	5,55	8,23	9,82	6,73	7,36	6,36	4,27	9,27	36,23	7,68	12,59	7,64
SD	2,18	3,37	4,42	4,90	4,46	2,85	3,40	2,28	2,41	6,31	22,79	3,14	6,63	3,76
T	4,24	4,76	5,62	8,10	10,62	6,38	7,29	7,29	4,57	10,90	29,67	8,43	11,76	8,05
SD	1,22	1,51	2,11	3,35	3,77	1,66	2,17	2,57	1,36	2,68	11,63	3,46	3,85	2,06
p-Wert	0,98	0,48	0,94	0,91	0,58	0,62	0,92	0,22	0,61	0,27	0,24	0,46	0,61	0,65

3.5.2.1.1.2 Promotorbereich P2B

In Promotorbereich P2B wurden 16 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle, für T 21 Fälle untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Methylierung zwischen N (7,62%) und T (7,21%), p-Wert 0,88. Die Standardabweichung für N beträgt 2,19 und für T 2,11. Die Analyse der einzelnen CpG-Stellen zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen N und T. Tabelle 43 zeigt die genauen Werte der einzelnen CpG-Stellen.

Tabelle 43: Durchschnittliche Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2B, jeweils im Vergleich N gegen T. Für N n=22, für T n=21. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
N	6,09	13,14	5,23	4,95	14,41	5,59	3,68	5,64	9,77	3,86	9,09	3,50	10,27	12,27	2,73	11,64
SD	1,97	4,12	3,42	2,10	4,76	3,25	2,59	3,35	3,64	2,27	5,81	1,63	6,63	7,67	1,86	6,78
T	6,29	13,14	5,00	4,81	13,52	5,43	4,43	6,62	9,71	3,90	6,86	3,76	8,29	10,33	2,76	10,57
SD	2,12	2,56	2,39	1,91	4,27	3,26	2,16	4,07	2,80	1,84	2,41	1,48	2,85	3,76	1,04	5,01
p-Wert	0,75	0,99	0,80	0,85	0,52	0,87	0,31	0,39	0,93	0,94	0,11	0,58	0,21	0,30	0,94	0,53

3.5.2.1.1.3 Promotorbereich P2C1

In Promotorbereich P2C1 wurden 7 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle, für T 21 Fälle untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Methylierung zwischen N (12,58%) und T (12,20%), p-Wert 0,79. Die Standardabweichung für N beträgt 2,74 und für T 5,71. Auch die Analyse der einzelnen CpG-Stellen erbrachte keinen Unterschied zwischen N und T. Tabelle 44 zeigt die genauen Werte der einzelnen CpG-Stellen.

Tabelle 44: Durchschnittliche Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2C1, jeweils im Vergleich N gegen T. Für N n=22, für T n=21. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2	3	4	5	6	7
N	24,59	11,41	12,27	14,82	5,73	11,27	7,30
SD	5,09	4,59	3,33	4,33	2,27	3,06	4,46
T	22,14	11,71	12,76	12,62	6,19	11,24	8,71
SD	5,96	5,21	9,56	9,69	4,14	4,40	6,74
p-Wert	0,15	0,84	0,82	0,34	0,65	0,97	0,45

3.5.2.1.1.4 Promotorbereich P2C2

In Promotorbereich P2C2 wurden 5 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle, für T 20 Fälle untersucht. Es zeigte sich in der Zusammenfassung aller CpG-Stellen des Bereichs ein Trend zu einer stärkeren Methylierung in N (18,69%) gegenüber T (15,75%), p-Wert 0,058. Die Standardabweichung für N beträgt 4,31 und für T 5,34. An CpG-Stelle 2 des Bereichs P2C2 zeigte sich eine signifikant stärkere Methylierung in N (30,95%) als in T (22,60%), p-Wert 0,002. Tabelle 45 und Abbildung 23 fassen die Ergebnisse der einzelnen CpG-Stellen zusammen.

Tabelle 45: Durchschnittliche Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2C2, jeweils im Vergleich N gegen T. Für N n=22, für T n=20. Die mit * gekennzeichnete CpG-Stelle zeigt eine signifikant höhere Methylierung in N als in T. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2*	3	4	5
N	14,36	30,95	20,00	16,45	11,68
SD	6,05	8,36	5,64	5,54	3,81
T	14,00	22,60	17,80	14,30	10,05
SD	5,55	7,66	7,68	6,89	5,40
p-Wert	0,841	0,002	0,293	0,269	0,261

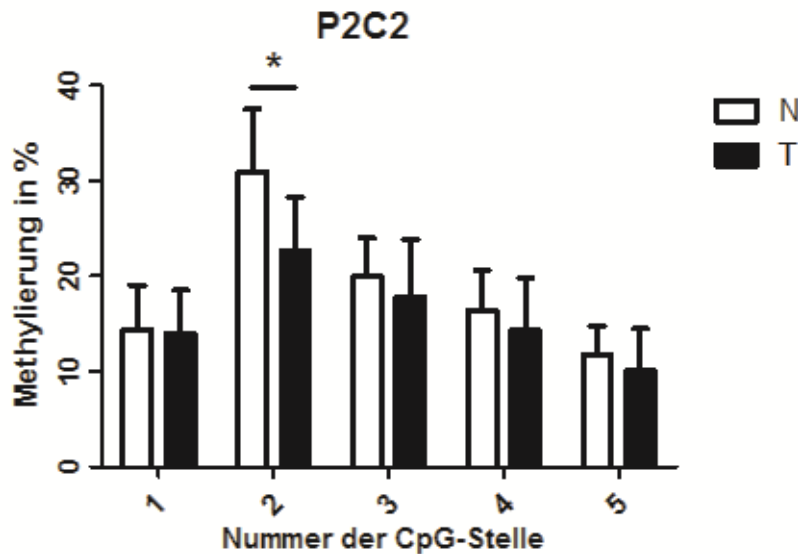


Abbildung 23: Grafische Darstellung der durchschnittlichen Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2C2 im Vergleich N (n=22) gegen T (n=20). Die mit * gekennzeichnete CpG-Stelle weist eine signifikant höhere Methylierung in N gegenüber T auf. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.5.2.1.1.5 Promotorbereich P2C3

In Promotorbereich P2C3 wurden 8 CpG-Stellen analysiert. Für N und T wurden jeweils 21 Fälle untersucht. Es zeigte sich in der Zusammenfassung aller 8 CpG-stellen eine signifikant stärkere Methylierung in N (14,52%) gegenüber T (11,68%), p-Wert 0,004. Die Standardabweichung für N beträgt 2,82 und für T 3,14. Insgesamt zeigten vier der acht (Nr. 3 – 6) untersuchten CpG-Stellen jeweils eine signifikant höhere Methylierung in N als in T. Die Ergebnisse der einzelnen CpG-Stellen sind in Tabelle 46 zusammengefasst sowie in Abbildung 24 dargestellt.

Tabelle 46: durchschnittliche Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2C3, jeweils im Vergleich N (n=21) gegen T (n=21). Die mit * gekennzeichneten CpG-Nummern zeigen an der entsprechenden CpG-Stelle einen signifikanten Unterschied. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2	3*	4*	5*	6*	7	8
N	20,19	12,52	21,00	14,86	8,86	19,05	8,29	11,38
SD	4,12	3,25	4,88	4,28	2,10	7,75	3,47	5,70
T	16,95	10,38	17,19	11,62	7,19	12,81	7,76	9,57
SD	7,61	4,52	6,21	4,68	2,38	4,30	3,25	3,82
p-Wert	0,096	0,086	0,033	0,025	0,021	0,003	0,616	0,235

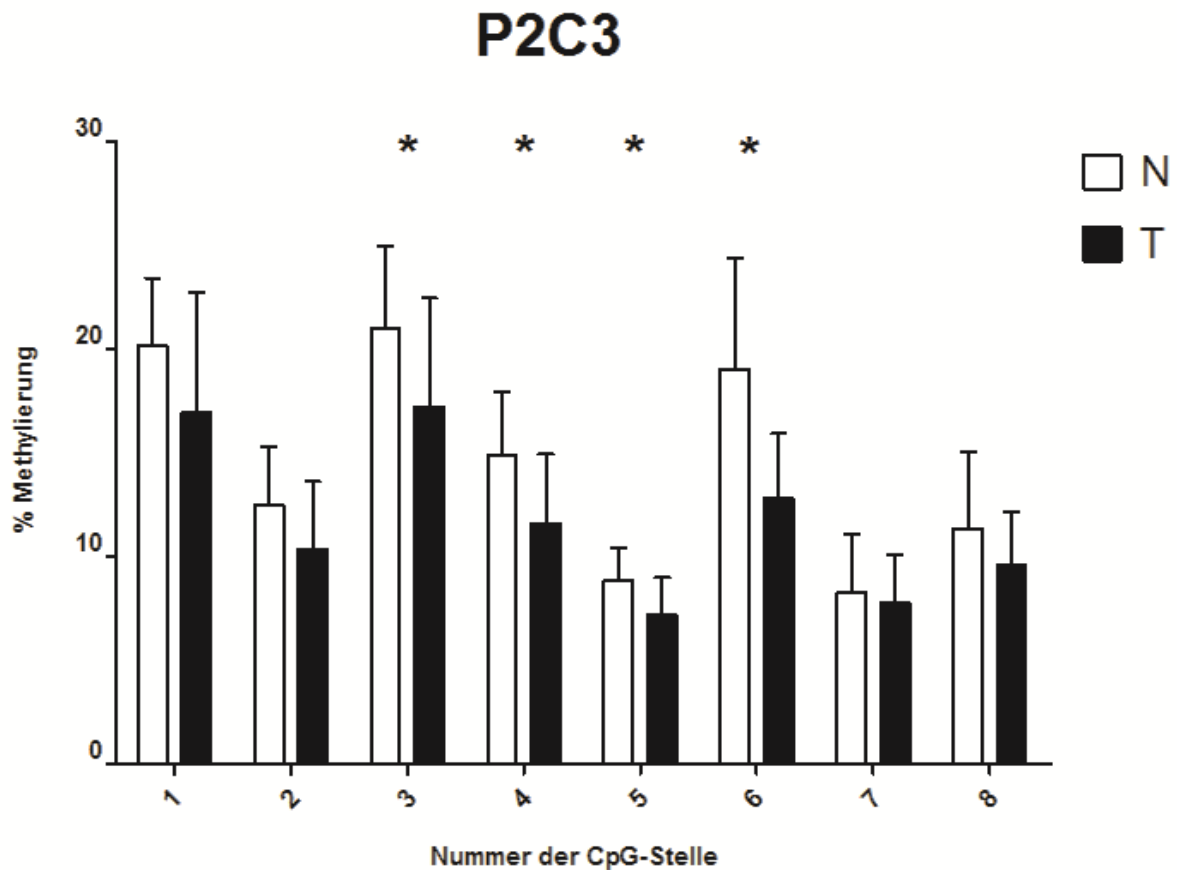


Abbildung 24: Grafische Darstellung der durchschnittlichen Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P2C3 im Vergleich N (n=21) gegen T (n=21). Die mit * gekennzeichneten CpG-Stellen weisen jeweils eine signifikant höhere Methylierung in N gegenüber T auf. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.5.2.1.2 Promotor 3

Promotor 3 wurde nicht in Unterbereiche unterteilt. Im Promotorassay 3 wurden 16 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle, für T 20 Fälle analysiert. Es zeigte sich in der Zusammenfassung aller 16 CpG-Stellen eine signifikant stärkere Methylierung in T (7,67%) gegenüber N (6,26%), p-Wert 0,037. Die Standardabweichung für N beträgt 1,63 und für T 2,47. Bis auf zwei CpG-Stellen (16 und 13) zeigten alle Stellen einen Trend zur stärkeren Methylierung oder eine signifikant höhere Methylierung (die CpG-Stellen 1-4, 6, 11 und 12) in T gegenüber N. Für die genauen Werte der einzelnen Stellen siehe Tabelle 47 sowie in der grafischen Darstellung (Abbildung 25).

Tabelle 47: Durchschnittliche Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P3, jeweils im Vergleich N (n=22) gegen T (n=20). Die mit * gekennzeichneten CpG-Nummern zeigen an der entsprechenden CpG-Stelle einen signifikanten Unterschied, die mit ** gekennzeichnete einen hochsignifikanten Unterschied mit $p \leq 0,001$. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr	1*	2*	3*	4*	5	6*	7	8	9	10	11*	12**	13	14	15	16
N	5,36	4,41	4,77	4,18	4,27	5,91	4,50	6,91	9,18	5,82	3,68	7,82	12,50	6,55	7,59	6,77
SD	1,65	2,46	2,98	2,02	2,14	1,60	2,63	1,48	2,54	5,01	1,55	2,15	8,37	1,77	2,67	3,01
T	6,86	7,90	7,81	7,24	5,67	8,19	5,10	7,81	10,48	6,33	5,29	11,00	11,67	6,95	7,81	6,33
SD	2,17	4,16	5,64	5,68	2,61	2,96	2,34	2,38	3,17	2,24	1,90	3,26	6,95	1,56	3,09	3,44
p-Wert	0,016	0,002	0,036	0,028	0,064	0,004	0,438	0,148	0,149	0,664	0,004	0,0006	0,724	0,428	0,806	0,658

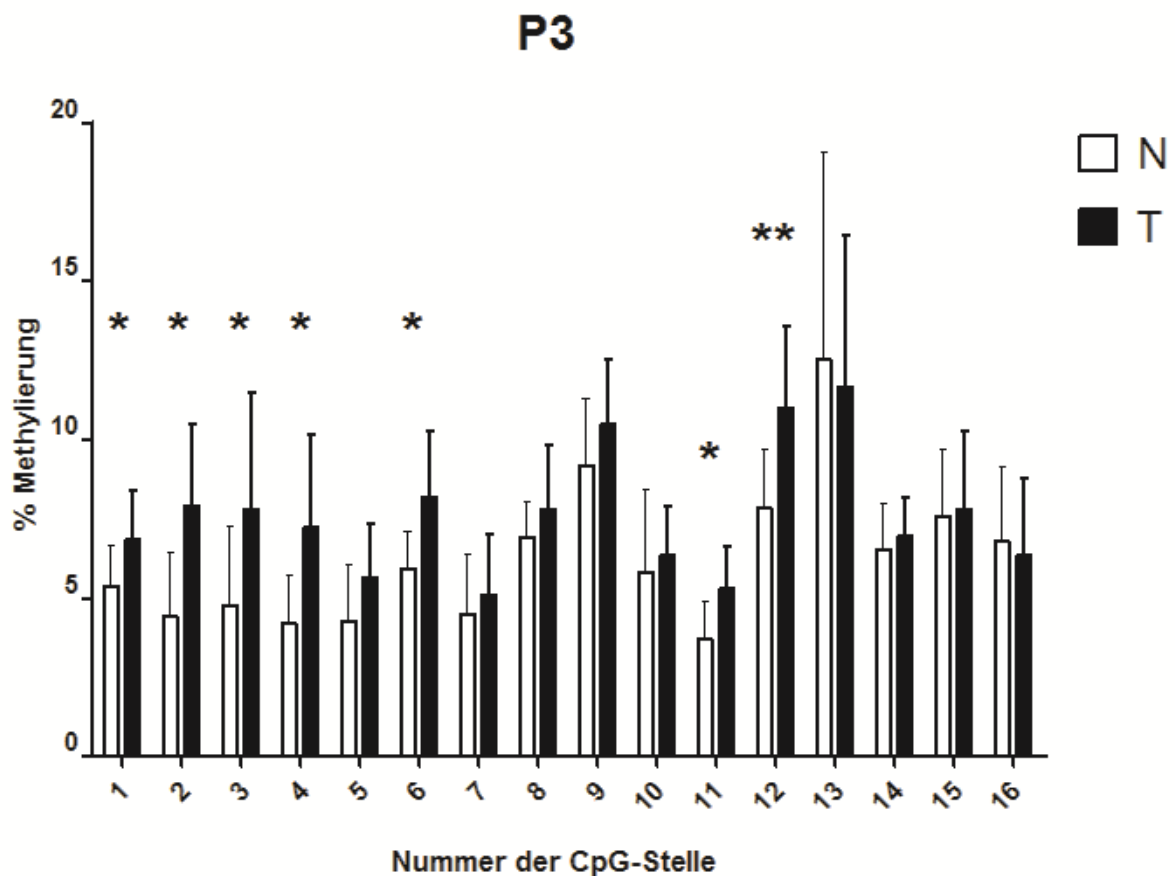


Abbildung 25: Grafische Darstellung der durchschnittlichen Methylierung in Prozent der einzelnen CpG-Stellen des untersuchten Bereichs von Promotor 3 im Vergleich N (n=22) gegen T (n=20). Die mit * gekennzeichneten CpG-Stellen weisen jeweils eine signifikant höhere Methylierung in T gegenüber N auf. CpG-Stelle 12 (gekennzeichnet mit **) weist einen hochsignifikanten Unterschied auf. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.5.2.1.3 Promotor 4

Promotor 4 wurde in den drei Assays P4A, P4B1 und P4B2 untersucht, die zusammen 34 CpG-Stellen abdecken. Die Ergebnisse der einzelnen Assays sind in den entsprechenden Unterkapiteln aufgeführt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse

ergab für Promotor 4 einen Trend zur schwächeren Methylierung in N (5,88%) gegenüber T (6,76%), p-Wert 0,057. Die Zusammenfassung von P4B1 und P4B2 ergab für den Promotorabschnitt P4B eine signifikant höhere Methylierung in T (7,11%) als in N (5,76%), p-Wert 0,023. Siehe Abbildung 26.

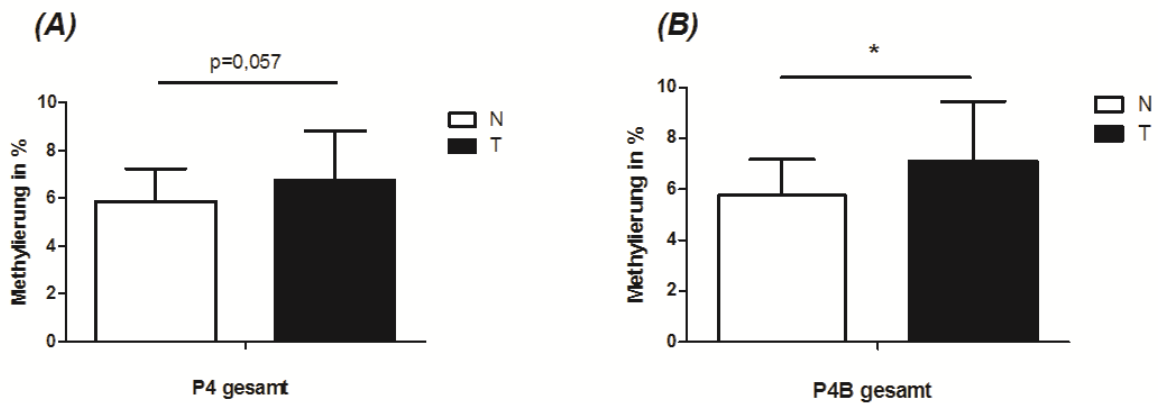


Abbildung 26: (A) zeigt die Zusammenfassung der durchschnittlichen Methylierung in Prozent der 34 CpG-Stellen, die als Promotorassays P4A, P4B1 und P4B2 für Promotor 4 stehen, im Vergleich zwischen N (n zwischen 20 und 22 variierend je nach Assay) und T (n 20-21 variierend je nach Assay). (B) zeigt analog das zusammenfassende Ergebnis der 16 CpG-Stellen des Promotorabschnitts P4B, zusammensetzend aus P4B1 (11 CpG) und P4B2 (5 CpG). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen T (n=21) und N (n=22), gekennzeichnet durch *. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.5.2.1.3.1 Promotorbereich P4A

In Promotorbereich P4A wurden 18 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 20 Fälle, für T 18 Fälle untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Methylierung zwischen N (6,16%) und T (6,36%), p-Wert 0,76. Die Standardabweichung für N beträgt 1,83 und für T 2,26. Auch die Betrachtung der einzelnen CpG-Stellen erbrachte keinen Unterschied zwischen N und T. Tabelle 48 fasst die Ergebnisse der einzelnen CpG-Stellen zusammen.

Tabelle 48: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P4A in %, jeweils für N (n=20) und T (n=18). SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
N	10,37	14,85	9,00	3,15	3,50	3,35	4,00	3,85	4,50	5,05	3,05	5,45	7,20	8,95	10,15	7,61	4,10	3,45
SD	4,45	10,98	3,46	1,31	1,19	1,73	1,26	1,39	1,47	1,10	1,47	2,37	2,28	2,70	5,04	5,20	2,40	1,50
T	12,76	17,06	10,39	3,33	3,89	3,28	3,94	4,11	4,56	4,33	3,39	5,39	7,28	8,28	8,94	8,79	4,17	2,94
SD	6,83	9,46	6,09	1,91	1,49	1,36	1,89	1,75	2,20	2,00	1,85	3,76	2,54	1,99	4,89	5,00	2,60	1,73
p-Wert	0,216	0,528	0,387	0,73	0,378	0,888	0,915	0,611	0,927	0,174	0,534	0,952	0,921	0,393	0,46	0,524	0,935	0,342

3.5.2.1.3.2 Promotorbereich P4B1

In Promotorbereich P4B1 wurden 11 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle, für T 21 Fälle untersucht. In der Zusammenfassung zeigte sich kein Unterschied in der Methylierung zwischen N (5,38%) und T (5,95%), p-Wert 0,43. Die Standardabweichung für N beträgt 2,10 und für T 2,56. Die CpG-Stellen 1 und 2 zeigten jedoch jeweils eine signifikant stärkere Methylierung in T (3,38% bzw. 3,10%) gegenüber N (beide 2,36%) (p-Wert 0,027 bzw. 0,023), siehe auch Abbildung 27. Die Ergebnisse der einzelnen CpG-Stellen sind in Tabelle 49 zusammengefasst.

Tabelle 49: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P4B1 in Prozent, jeweils im Vergleich N (n=22) gegen T (n=21). Die mit * gekennzeichneten CpG-Nummern zeigen an der entsprechenden CpG-Stelle einen signifikanten Unterschied. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1*	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N	2,36	2,36	6,27	5,05	2,77	4,10	3,23	6,36	10,18	12,82	3,55
SD	0,73	0,79	3,63	1,89	1,11	3,33	1,80	3,00	7,04	5,55	1,79
T	3,38	3,10	6,19	6,57	3,14	5,29	2,81	6,38	12,38	14,10	4,52
SD	1,86	1,18	3,44	4,15	1,56	2,69	1,81	2,64	6,95	6,94	2,40
p-Wert	0,027	0,023	0,940	0,135	0,378	0,210	0,452	0,984	0,310	0,507	0,140

3.5.2.1.3.3 Promotorbereich P4B2

In Promotorbereich P4B2 wurden 5 CpG-Stellen analysiert. Für N wurden 22 Fälle untersucht, für T 21 Fälle. Es zeigte sich in der Zusammenfassung aller 5 CpG-Stellen eine signifikant stärkere Methylierung in T (8,06%) gegenüber N (6,14%), p-Wert 0,042. Die Standardabweichung für N beträgt 1,88 und für T 3,71. Die CpG-Stellen 3 und 4 zeigten eine signifikant höhere Methylierung in T (10,67% bzw. 6,19%) als in N (7% bzw. 3,64%), p-Wert 0,006 bzw. 0,027. (siehe auch Abbildung). Die restlichen CpG-Stellen zeigten eine nicht-signifikante stärkere Methylierung in T gegenüber N. Tabelle 50 fasst die Werte der einzelnen CpG-Stellen zusammen. Siehe hierzu auch Abbildung 27.

Tabelle 22: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen des Promotorassays P4B2 in Prozent, jeweils im Vergleich N (n=22) gegen T (n=21). Die mit * gekennzeichneten CpG-Nummern zeigen an der entsprechenden CpG-Stelle einen signifikanten Unterschied. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen.

CpG-Nr.	1	2	3*	4*	5
N	4,45	5,77	7,00	3,64	9,82
SD	1,37	2,02	2,58	1,36	3,86
T	5,24	6,33	10,67	6,19	11,86
SD	2,43	2,96	5,07	4,77	5,98
p-Wert	0,205	0,474	0,006	0,027	0,195

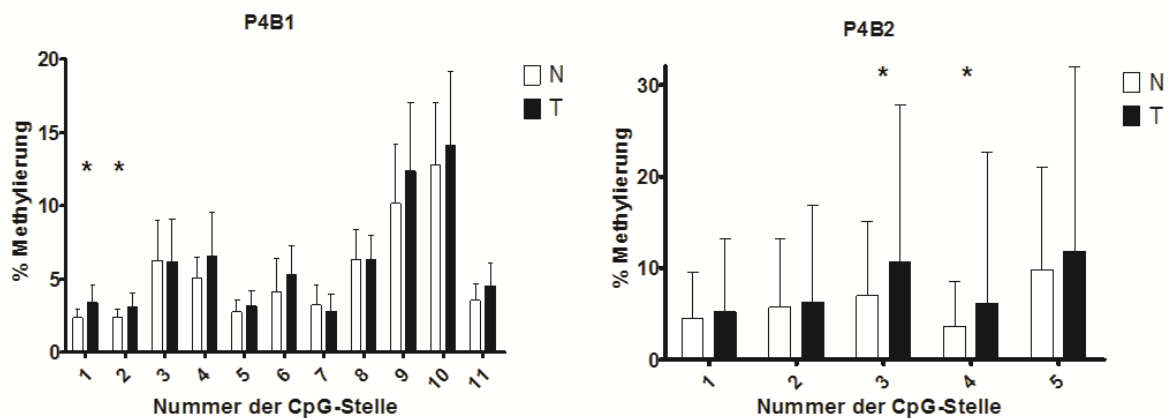


Abbildung 27: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen in den beiden Promotorbereichen P4B1 und P4B2 in Prozent jeweils für N (n=22 bei beiden Assays) und T (n=21 bei beiden Assays). CpG-Stellen, die mit * markiert sind, wiesen einen signifikanten Unterschied auf. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.5.3 Vergleich der Promotormethylierung untereinander und Korrelation zur Promotoraktivität und *IGF2*-Expression

3.5.3.1 Methylierungsverhältnis der einzelnen Promotoren zueinander

Das Muster der Promotormethylierung passte zum Muster der Promotoraktivität. Die beiden stark transkribierten Promotoren P3 und P4 zeigten sowohl in N als auch in T eine signifikant niedrigere durchschnittliche Methylierung als der niedriger exprimierte Promotor P2. Im Vergleich der durchschnittlichen Methylierung zwischen P3 und P4 ergab sich sowohl in N als auch in T kein signifikanter Unterschied. Allerdings zeigte sich in P3 und P4 eine niedrigere Methylierung in N als in T, was sich auch in einer stärkeren Promotoraktivität widerspiegelt.

Zur Berechnung der Signifikanz wurden die Mittelwerte der Methylierung der einzelnen Promotorassays im zweiseitigen T-Test verglichen (siehe Tabelle 51).

Tabelle 23: Verhältnis der durchschnittlichen Methylierung des schwach exprimierten Promotors P2 zu den stark exprimierten Promotoren P3&P4 jeweils für N (n je nach Promotorassay zwischen 22 und 18) und T (n je nach Promotorassay zwischen 21 und 18). Für alle Verhältnisse zeigt P2 eine deutlich höhere Methylierung. Ebenso Verhältnis Promotor P3 zu P4, bei dem sich weder in T noch in N ein signifikanter Unterschied zeigt.

Verhältnis P2/P3			Verhältnis P2/P4			Verhältnis P3/P4		
		p-Wert			p-Wert			p-Wert
N	2,02	≤0,0001	N	2,13	≤0,0001	N	1,31	0,47
T	1,79	0,002	T	1,65	≤0,0001	T	0,92	0,21

3.5.3.2 Korrelation der Promotormethylierung zur Promotoraktivität

Nach Testung auf Normalverteilung der einzelnen Mittelwerte (der CpG – Stellen eines Assays) wurde die Korrelation der Promotormethylierung zur Promotoraktivität desselben Falls nach Spearman berechnet. Auf diese Weise wurde eine Korrelation der Promotoraktivität von P2 mit der durchschnittlichen Methylierung von P2A, P2B, P2C1, P2C2, P2C3 und P2 gesamt, von P3 mit der durchschnittlichen Methylierung von P3, sowie der Promotoraktivität von P4 mit der durchschnittlichen Methylierung von P4A, P4B1, P4B2 und P4 gesamt erstellt. Unabhängig von N und T konnte keine signifikante Korrelation der Promotormethylierung mit der mittels RT-qPCR bestimmten Promotoraktivität gefunden werden (siehe auch Tabelle 52).

Test- und probenbedingt konnte hier nur eine kleine Fallzahl von korrespondierenden Proben (Methylierungs- und Aktivitätsanalyse im gleichen Fall) zusammengestellt werden.

Tabelle 52: Korrelationen der Δ ct-Werte der einzelnen Promotor-RT-qPCR mit den korrespondierenden Mittelwerten der Promotormethylierung derselben Fälle. Die Fallzahlen variieren deutlich und weichen test- und probenbedingt stark von den Fallzahlen der Pyrosequenzierung und Expressionsanalysen ab.

Promotorassay	P2	P3	P4	P2A	P2B	P2C1	P2C2	P2C3	P4A	P4B1	P4B2
Korrelationskoeffizient r	-0,20	0,20	0,07	0,29	-0,19	-0,26	-0,17	-0,45	-0,31	-0,25	-0,25
p-Wert	0,51	0,28	0,74	0,33	0,52	0,39	0,60	0,12	0,33	0,36	0,36
Fallzahl n	13	12	13	13	13	13	13	13	12	15	15

Getrennt nach N und T konnte für P4A in T eine signifikante Korrelation zwischen Methylierung und Δ ct-Werten des spezifischen Promotortranskripts gefunden werden

($r=0,80$, p -Wert $0,012$), somit geht hier eine stärkere Methylierung mit einer geringeren Promotoraktivität einher (siehe Abbildung 28). Die gesamten Ergebnisse der Korrelation von Promotormethylierung und Promotoraktivität getrennt nach N und T finden sich in Tabellen 53 und 54.

Tabelle 24: Korrelationen der Δ ct-Werte der einzelnen Promotor-RT-qPCR mit den korrespondierenden Mittelwerten der Promotormethylierung derselben Fälle für N. Die Fallzahlen variieren deutlich und weichen test- und probenbedingt stark von den Fallzahlen der Pyrosequenzierung und Expressionsanalysen ab.

Promotorassay	P2	P3	P4	P2A	P2B	P2C1	P2C2	P2C3	P4A	P4B1	P4B2
Korrelationskoeffizient r	0,48	0,30	0,37	0,42	0,50	0,42	-0,39	0,49	-0,64	0,09	0,35
p-Wert	0,13	0,21	0,11	0,15	0,11	0,11	0,59	0,14	0,28	0,86	0,22
Fallzahl n	6	5	6	6	6	6	6	6	5	7	7

Tabelle 25: Korrelationen der Δ ct-Werte der einzelnen Promotor-RT-qPCR mit den korrespondierenden Mittelwerten der Promotormethylierung derselben Fälle für T. Die Fallzahlen variieren deutlich und weichen test- und probenbedingt stark von den Fallzahlen der Pyrosequenzierung und Expressionsanalysen ab. P4A* zeigte in T eine signifikante Korrelation von Promotormethylierung und -aktivität.

Promotorassay	P2	P3	P4	P2A	P2B	P2C1	P2C2	P2C3	P4A*	P4B1	P4B2
Korrelationskoeffizient r	0,27	0,44	0,31	-0,01	-0,46	-0,08	0,59	-0,42	0,80	0,14	0,23
p-Wert	0,23	0,12	0,20	0,78	0,19	0,90	0,25	0,15	0,01	0,66	0,63
Fallzahl n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8

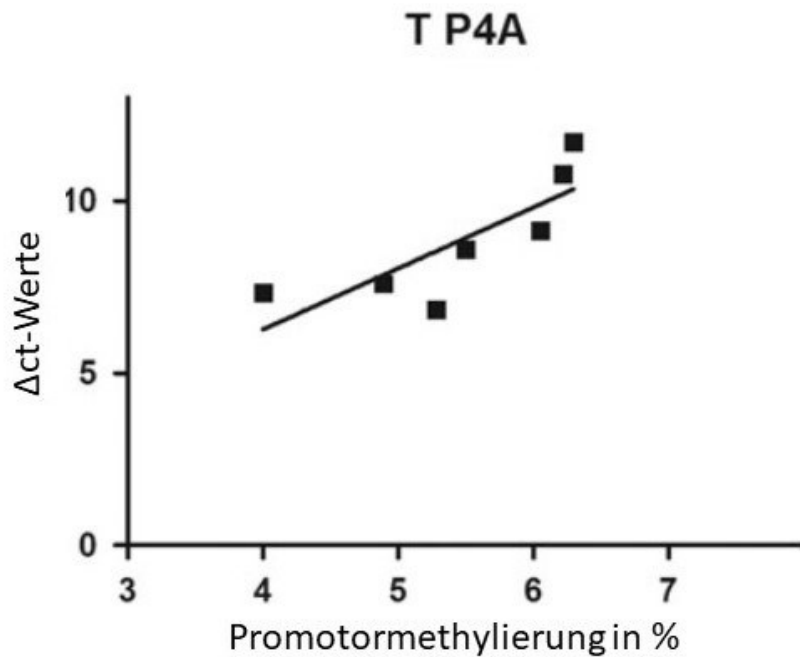


Abbildung 10: Die Methylierung des Promotorteilbereichs P4A korreliert signifikant mit den Δ ct-Werten der RT-qPCR des spezifischen Promotortranskripts P4. Somit geht eine stärkere Methylierung mit einer geringeren Promotoraktivität einher ($r = 0.80$, $P < 0.05$, $n=7$).

3.5.3.3 Korrelation der Promotormethylierung zur *IGF2*-Expression

Nach Testung auf Normalverteilung der einzelnen Mittelwerte (der CpG – Stellen eines Assays) wurde die Korrelation der Promotormethylierung zur *IGF2*-Expression auf mRNA – Ebene desselben Falls entweder nach Pearson oder Spearman berechnet (siehe Kapitel „Statistische Methoden“). Aus bereits erwähnten Problemen variiert die Fallzahl n , zusätzlich versagte bei einzelnen Proben die *IGF2* – Messung aus unbekanntem Gründen, was zu einer zusätzlichen Fallzahlreduktion bei der Korrelation führte. So liegen die Fallzahlen der Korrelationen teilweise unter den Fallzahlen der Bestimmung der Promotormethylierung.

Die Methylierung der Promotoren korreliert teilweise mit der Expression von *IGF2* auf mRNA – Ebene. Fasst man die durchschnittlichen Methylierungswerte aller CpG – Stellen eines Promotorbereichs unabhängig von N und T zusammen und korreliert diese mit den Δ ct – Werten der *IGF2*-RT-qPCR desselben Falls, ergab sich für Promotor 3 und die beiden Promotorteilbereiche P2C2 und P2C3 eine signifikante Korrelation der Promotormethylierung mit der *IGF2* – Expression auf mRNA – Ebene (Tabelle 26). Promotor 3 zeigt eine positive Korrelation zwischen Methylierung und Δ ct – Werten (Pearson's $r = 0,32$ bei $p=0,05$). Im Gegensatz dazu zeigen die Promotorteilbereiche P2C2 und P2C3 eine negative Korrelation zwischen

Methylierung und Δct – Werten (Pearson's $r = -0,32$ bei $p=0,05$ für P2C2 und Pearson's $r = -0,33$ bei $p=0,05$ für P2C3). Für Promotorteilbereich P4B2 ergab sich unabhängig von N und T ein Trend zu höheren Δct – Werten bei steigender Methylierung (Spearman's $r = 0,29$ bei $p=0,08$).

Die Zusammenfassung der Promotorteilbereiche des Promotors P2 ergab keine signifikante Korrelation von P2 zu *IGF2*, das gleiche gilt für Promotor P4, siehe Tabelle 55 und Abbildung 30.

Die Korrelationen der Promotormethylierung zur *IGF2*-Expression auf mRNA-Ebene getrennt nach N (siehe Tabelle 56) und T (siehe Tabelle 57) ergab für alle Proben zusammengefasst zunächst keine signifikanten Zusammenhänge. Nach einer Subgruppenanalyse ergab sich bei den Proben, in denen *IGF2* in T stärker exprimiert war als in N, für den Promotors 4 in T eine signifikante positive Korrelation (Pearson's $r=0,64$, p -Wert $0,05$) der Methylierung mit den Δct -Werten der *IGF2*-RT-qPCR, was einer verminderten Expression bei höherer Promotormethylierung entspricht.

Zusammenfassend fanden sich also bei P3 und P4 eine niedrigere *IGF2*-Expression bei stärkerer Methylierung und eine höhere Expression bei höherer Methylierung der Promotorteilbereiche P2C2 und P2C3. Zudem korrelierte in den Fällen, in denen *IGF2*-Expression in $T > N$ war, die Methylierung in P4 signifikant mit der *IGF2*-Expression (siehe Abbildung 29).

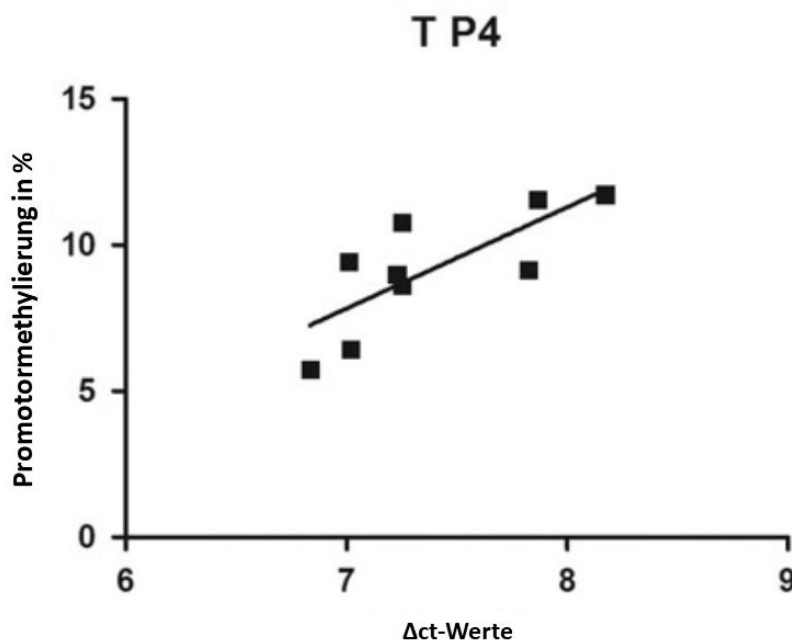


Abbildung 11: Korrelation der Methylierung des Promotors P4 mit den Δct -Werten der *IGF2*-RT-qPCR der Fälle, die eine im Vergleich zu N höhere Expression in T aufweisen ($n=9$, $r=0,64$, p -Wert $0,05$).

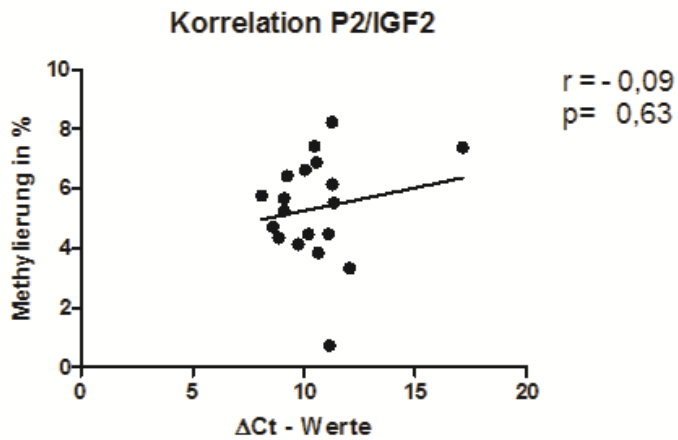
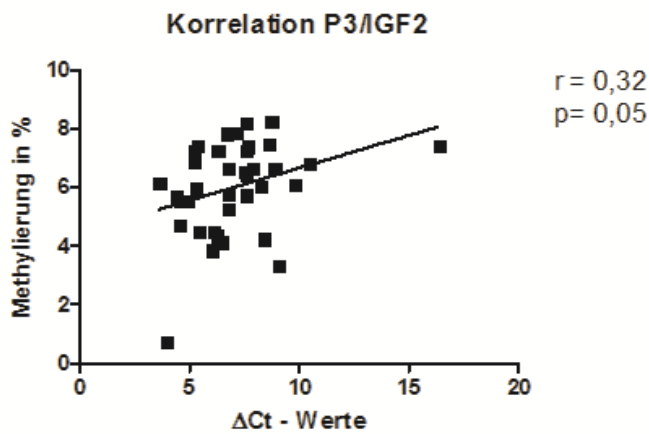
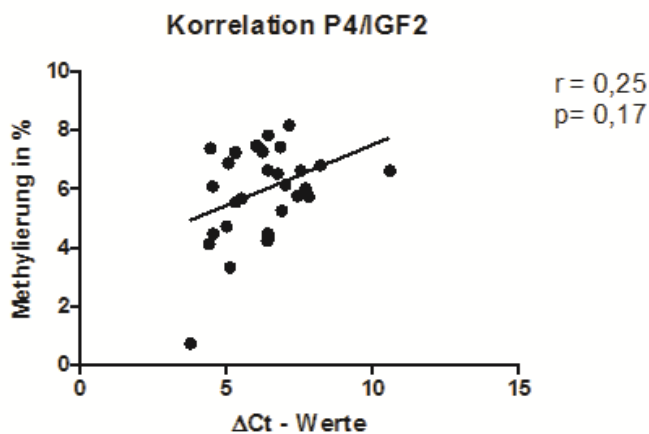
(A)**(B)****(C)**

Abbildung 30: Korrelationen der Methylierung der einzelnen Promotoren in Prozent mit den Δ Ct-Werten der *IGF2*-RT-qPCR derselben Fälle unabhängig von T und N. Fallzahlen variieren, siehe hierzu Tabelle 26. (A) zeigt die Korrelation zwischen Promotor P2 (bestehend aus den Einzel-Assays P2A, P2B und P2C1-P2C3) und *IGF2*, (B) zwischen Promotor P3 und *IGF2* und (C) zwischen Promotor P4 (bestehend aus den Einzel-Assays P4A, P4B1 und P4B2) und *IGF2*.

Tabelle 26: Korrelationen der durchschnittlichen Methylierung eines Promotorbereichs mit den Δ ct-Werten der *IGF2*-RT-qPCR desselben Falls unabhängig von N und T. Promotorbereiche, die einen signifikanten Unterschied zeigen, sind mit * markiert. Die Markierung * steht für einen statistischen Trend. Die Fallzahl n setzt sich jeweils aus N und T zusammen.

Promotorbereich	P2	P3*	P4	P2A	P2B	P2C1	P2C2*	P2C3*	P4A	P4B1	P4B2*
Korrelationskoeffizient r	-0,09	0,32	0,25	0,21	0,13	-0,16	-0,32	-0,33	0,25	0,13	0,29
p-Wert	0,63	0,05	0,17	0,22	0,43	0,36	0,05	0,05	0,17	0,44	0,08
n	35	37	32	37	37	37	36	36	31	37	37

Tabelle 56: Übersicht der Korrelationen der Methylierung der einzelnen Promotorteilbereiche mit den Δ ct-Werten der *IGF2*-RT-qPCR derselben Fälle für N. Die Fallzahl n variiert je nach Assay.

Promotorbereich	P2	P3	P4	P2A	P2B	P2C1	P2C2	P2C3	P4A	P4B1	P4B2
Korrelationskoeffizient r	0,06	0,29	0,38	0,42	0,02	-0,18	-0,30	-0,20	-0,04	0,27	0,17
p-Wert	0,79	0,21	0,14	0,95	0,93	0,44	0,19	0,41	0,89	0,25	0,47
n	19	20	17	20	20	20	20	19	17	20	20

Tabelle 57: Übersicht der Korrelationen der Methylierung der einzelnen Promotorteilbereiche mit den Δ ct-Werten der *IGF2*-RT-qPCR derselben Fälle für T. Die Fallzahl n variiert je nach Assay.

Promotorbereich	P2	P3	P4	P2A	P2B	P2C1	P2C2	P2C3	P4A	P4B1	P4B2
Korrelationskoeffizient r	-0,21	-0,14	-0,28	-0,01	-0,46	0,02	-0,13	-0,19	-0,07	0,14	0,05
p-Wert	0,43	0,59	0,32	0,74	0,53	0,93	0,62	0,46	0,81	0,58	0,84
n	16	17	15	17	17	17	16	17	14	17	17

Tabelle 27: Übersicht der Korrelationen der Methylierung der einzelnen Promotorteilbereiche mit den Δ ct-Werten der *IGF2*-RT-qPCR derselben Fälle für die Fälle mit einer höheren *IGF2*-Expression in T als in N. Die Fallzahl n variiert je nach Assay. Für Promotor P4 ergab sich in diesen Proben eine signifikante Korrelation von Methylierung mit Expression, wenn alle Teilbereiche zusammengefasst wurden.

Promotorbereich	P2	P3	P4*	P2A	P2B	P2C1	P2C2	P2C3	P4A	P4B1	P4B2
Korrelationskoeffizient r	0,07	0,47	0,64	0,02	0,14	-0,05	-0,17	-0,21	0,19	0,11	0,09
p-Wert	0,57	0,10	0,05	0,35	0,39	0,71	0,44	0,27	0,14	0,12	0,11
n	11	11	9	11	11	11	11	11	9	11	11

3.6 Methylierung der CTCF-Bindungsstelle 6 (CTCF BS6)

Wie bereits erwähnt waren testbedingt nur eine eingeschränkte Anzahl von Proben informativ für ihren Imprintingstatus. Es wurden jeweils 18 Proben N und T auf Methylierung der CTCF BS6 untersucht. Von N waren 12 Fälle informativ für ihren Imprintingstatus, jeweils 6 zeigten LOI bzw. ROI. Unter den T-Proben waren ebenfalls 12 informativ bezüglich Imprinting, hier zeigte sich ein Verhältnis von 10 ROI und 2 LOI. Somit konnten insgesamt 16 ROI-Fälle (6-mal N sowie 10-mal T) und 8 LOI-Fälle (6-mal N sowie 2-mal T) untersucht werden. Insgesamt wurden pro Probe 17 CpG-Stellen analysiert. Die Methylierungsunterschiede zwischen den einzelnen CpG-

Stellen zeigten eine deutlich stärkere Ausprägung als die CpG-Stellen der IGF2-Promotorbereiche. So variierte diese hier zwischen durchschnittlich 26% bei CpG-Stelle 8 und durchschnittlich 83% für CpG-Stelle 4.

3.6.1 Vergleich LOI mit ROI

Der Vergleich der Methylierung der CTCF BS6 zeigte keinen Unterschied zwischen LOI und ROI, weder in der Gesamtmethylierung der untersuchten Region noch in einzelnen CpG-Stellen, egal ob unabhängig von N/T oder getrennt analysiert nach N und T. Die durchschnittliche Gesamtmethylierung betrug für LOI (n=8) 42,78% (SD 7,28), für ROI (n=16) 42,93% (SD 4,72), p-Wert 0,647. Die Ergebnisse der einzelnen CpG-Stellen sind in Tabelle 59 zusammengefasst.

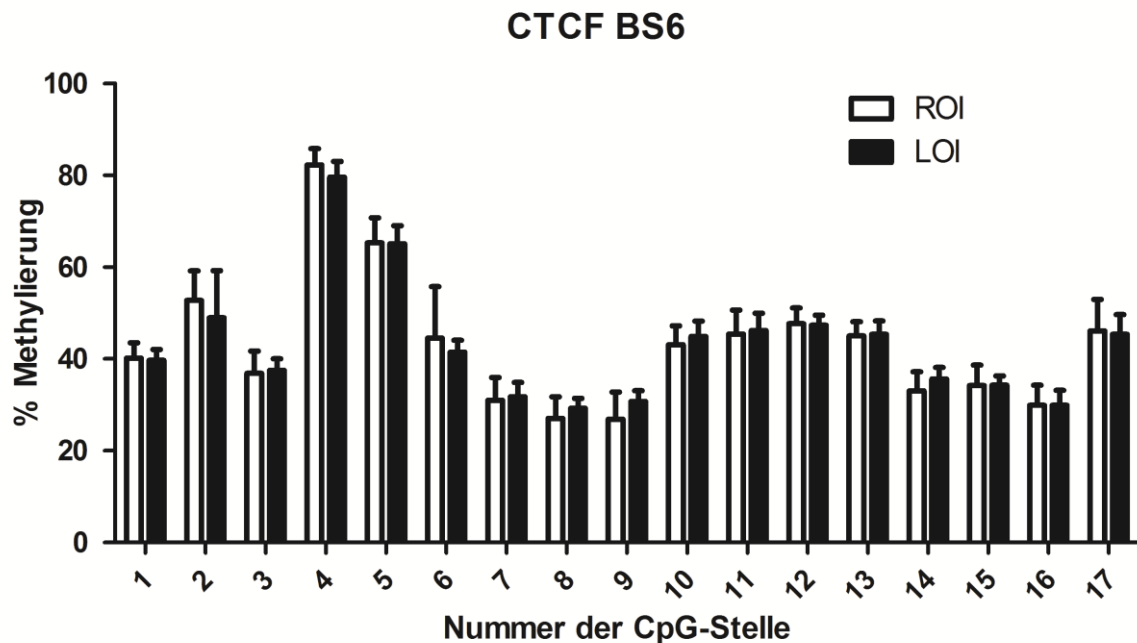


Abbildung 31: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen in Prozent jeweils für ROI (n=16) und LOI (n=8), unabhängig von N oder T. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Tabelle 59: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen in Prozent jeweils für LOI (n=8) und ROI (n=16), unabhängig von T und N. SD bezeichnet die Standardabweichung der einzelnen CpG-Stellen, p den p-Wert.

CpG-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
LOI	40,13	52,75	36,88	82,25	65,25	44,50	31,00	27,00	26,88	43,11	45,44	47,67	45,00	33,00	34,22	29,89	46,11
SD	4,45	9,21	6,38	4,98	6,88	15,06	6,41	6,28	8,74	7,06	7,99	4,15	4,09	6,50	7,43	6,77	11,41
ROI	39,69	49,00	37,50	79,56	65,06	41,44	31,75	29,25	30,69	44,88	46,19	47,31	45,38	35,63	34,25	29,88	45,38
SD	3,26	15,50	3,46	3,83	5,95	3,69	3,73	2,77	3,22	4,79	5,60	3,07	4,29	3,48	2,79	4,65	6,16
p	0,78	0,53	0,75	0,15	0,94	0,44	0,71	0,23	0,13	0,46	0,78	0,81	0,83	0,19	0,999	0,95	0,84

3.6.2 Vergleich Tumor- gegen Normalgewebe

Unabhängig vom Imprintingstatus konnten jeweils 18 Proben Tumor- und Normalgewebe auf deren Methylierung der der CTCF BS6 untersucht werden. Es ergab sich weder in der Gesamtmethylierung über alle getesteten 17 CpG-Stellen noch bei einzelnen CpG-Stellen ein Unterschied der Methylierung zwischen N und T. Die durchschnittliche Methylierung für N betrug 42,31% bei einer Standardabweichung von 2,98 und 42,70% für T bei einer Standardabweichung von 5,35 (p-Wert 0,65). Die Werte der einzelnen CpG-Stellen sind in Tabelle 60 aufgeführt.

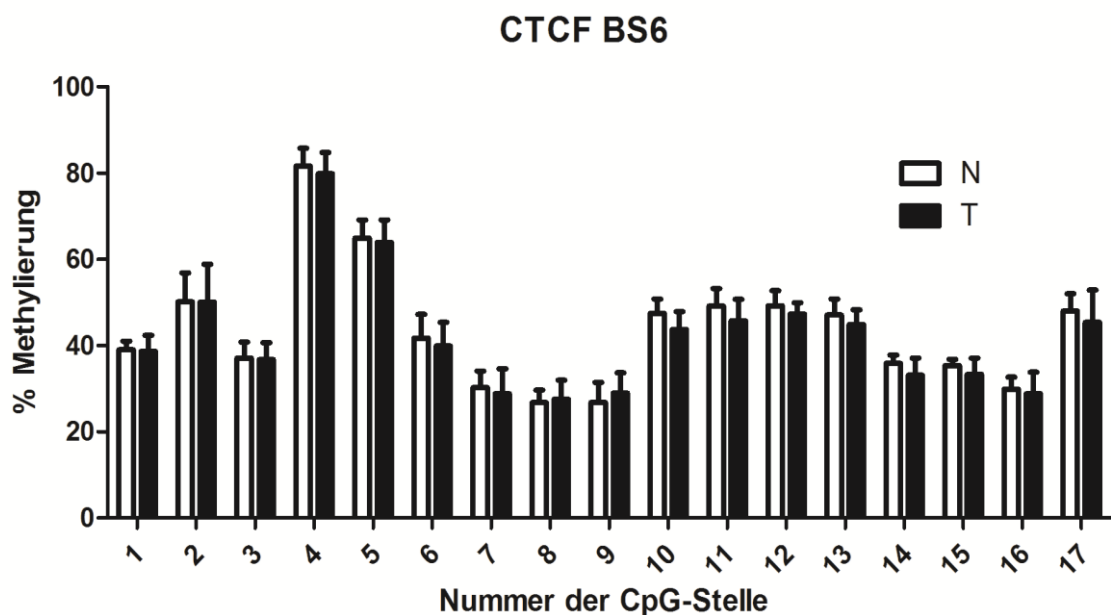


Abbildung 32: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen in Prozent jeweils für N (n=18) und T (n=18), unabhängig vom Imprintingstatus. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Tabelle 60: Durchschnittliche Methylierung der einzelnen CpG-Stellen in Prozent jeweils für T (n=18) und N (n=18), unabhängig vom Imprintingstatus. SD gibt als Standardabweichung jeweils die Streuung der Werte an.

CpG-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
N	39,94	50,11	37,06	81,61	64,94	41,72	30,22	26,72	26,78	47,44	49,17	49,22	47,06	35,89	35,33	29,89	48,72
SD	3,61	11,26	4,45	5,35	4,77	9,58	4,85	3,59	5,90	4,05	4,63	4,04	4,43	2,89	1,94	3,86	5,74
T	38,67	50,06	36,72	79,83	63,89	39,89	28,78	27,50	28,94	43,72	45,72	47,28	44,83	33,06	33,28	28,83	45,39
SD	4,60	12,69	5,75	6,47	7,88	7,26	7,26	5,54	6,01	6,56	7,31	3,54	4,73	5,38	5,83	6,64	10,56
p-Wert	0,36	0,98	0,84	0,37	0,62	0,52	0,48	0,62	0,28	0,048	0,10	0,13	0,15	0,06	0,16	0,56	0,24

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Expression von IGF2 im Prostatakarzinom genauer zu charakterisieren und neue Mechanismen der Genregulation zu beschreiben. Ein besonderer Schwerpunkt hierbei lag auf der Entschlüsselung epigenetischer Einflüsse wie Imprinting und Methylierung in klinischen Proben. Die Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit klinischen Daten sollten Einfluss in die Entwicklung neuer Biomarker des Prostatakarzinoms finden. Im Folgenden werden nun die relevanten Ergebnisse und deren Implikationen diskutiert

4.1 Die Expression und Regulation von IGF2 und die Korrelation zu Expression von CTCF, miR-675 und RB

4.1.1 Die Expression von *IGF2* und dessen Kontrolle durch Promotormethylierung

Der auch im Prostatakarzinom diskutierten und in anderen Tumorentitäten [214] gut belegten Rolle von IGF2 als Onkogen steht diametral zunächst die Beobachtung gegenüber, dass die Expression auf Transkript- und Proteinebene in der Mehrzahl der Fälle im Tumorgewebe niedriger war als im umgebenden Normalgewebe. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien anderer Autoren, die ebenfalls eine Reduktion der *IGF2*-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem benachbarten Normalgewebe fanden [93, 215]. Weder in Publikationen noch Datenbanken ließen sich Daten zur Expression von IGF2 in jungen gesunden Prostata finden, sodass nicht ausreichend beurteilt werden kann, ob die verminderte Expression in Tumoren gegenüber Normalgeweben eine wirkliche Reduktion der Expression darstellt, oder eine ausbleibende Erhöhung. Chromosomale Veränderungen wie Deletionen sind für den betroffenen Genlokus auf Chromosomenabschnitt 11p15.5 nicht gehäuft beschrieben und können daher nicht als Erklärung einer geringeren Expression dienen. Konzentrationen von IGF2 oder seiner Bindeproteine im peripheren Blut wurden in dieser Studie nicht bestimmt, aber die Bestimmung dessen in einer großen Kohorte durch Belharazem *et al.* mit dem Nachweis einer erhöhten peripheren IGF2-Konzentration lassen vermuten, dass dies auch im hier untersuchten Kollektiv so war [139].

Während Ribarska *et al.* keine Erklärungen für eine reduzierte *IGF2*-Expression in T fanden, konnten Bhusari *et al.* diese mit einer Hypomethylierung der DMR0 in

Verbindung bringen, einer differentiell methylierten Region, die zwischen Promotor 1 und 2 des *IGF2*-Gens liegt [93, 215]. Hypomethylierungen dieser Region konnten in anderen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose korreliert werden [91, 216].

Unsere Ergebnisse belegen neben spezifischen Methylierungsunterschieden der Promotorbereiche zwischen N und T nun durch signifikante Korrelationen der spezifischen Promotoraktivität und -methylierung mit der Expression von *IGF2* eine entscheidende Rolle der Promotormethylierung in der Expressionskontrolle von *IGF2* in N und auch T. Zusammen mit den Ergebnissen der zitierten Studie von Bhusari *et al.* scheinen also Methylierungsunterschiede in regulatorischen Abschnitten zwischen Promotoren und der Promotoren selbst für Expressionsunterschiede verantwortlich zu sein.

Trotz der signifikanten Korrelationen muss einschränkend gesagt werden, dass die relativen Unterschiede der Methylierung zwar deutlich waren, die absoluten Methylierungsunterschiede aber nur wenige Prozentpunkte betragen und dass unklar ist, wie es zu diesen Unterschieden kommt. Gleiches gilt für die Arbeit von Bhusari *et al.*, die in der DMR0 ebenfalls zwar signifikante, aber absolut gesehen nur geringe Unterschiede der Methylierung fanden.

Die Zweifel an der Relevanz von wenigen Prozent Unterschied in der Methylierung können teilweise entkräftet werden, indem man sich die Methylierung im Detail anschaut, denn oft sind es v.a. einzelne CpG-Stellen, die den signifikanten Unterschied der Methylierung bewirken. So betrug der Gesamtunterschied der Methylierung zwischen T und N, also das Mittel der Methylierung aller CpG-Stellen, für den Promorteilbereich P2C3 ca. 3%, an der CpG-Stelle Nr. 6 jedoch über 6%. Die Unterschiede in der Methylierung sind somit an einzelnen Stellen zum Teil deutlich stärker ausgeprägt als im Gesamtbereich oder anderen einzelnen CpG-Stellen. Passend dazu fanden auch Damaschke *et al.* in einzelnen Bereichen der Prostata (sowohl im Gesunden als auch in Tumoren) mit dem Alter zunehmende fokale Hypermethylierungen, während es global gesehen im Prostatakarzinom eher zu Hypomethylierungen kam [217].

Möglicherweise sind signifikante Unterschiede der Methylierung einzelner CpG-Stellen gerade in Promotorbereichen für die Transkription und konsekutive Expression entscheidender als die Gesamtmethylierung. Unterstützt wird diese These durch Erkenntnisse aus Studien zur Untersuchung der Promotormethylierung des

Oxytocinrezeptors, wo experimentell gezeigt werden konnte, dass die Methylierung einzelner CpG-Stellen entscheidend für die Aktivität sein kann [218].

Primär sollte in der Theorie die Methylierung eines Promotors mit einer geringeren Transkription und damit auch Genexpression einhergehen. Wir fanden in Promotor 2 jedoch eine positive Korrelation von Methylierung und IGF2-Expression. Da P2 im Vergleich zu P3 und P4 nur marginal transkribiert zu sein scheint, mag dies zunächst zwar paradox erscheinen. Eine kürzlich publizierte Studie konnte aber zeigen, dass in der P2-Region auch CTCF-Bindungsstellen liegen [219]. Bei stärkerer Methylierung in P2 kann CTCF vermutlich dort schlechter binden, womit es analog zum Enhancer-Competitor-Modell zu einer vermehrten Expression von *IGF2* kommen kann. Somit ließe sich die verstärkte *IGF2*-Expression bei erhöhter P2-Methylierung trotz wenig vorhandenem P2-Transkript und damit geringerer Promotoraktivität erklären.

Dass eine veränderte Promotormethylierung von *IGF2* auch eine prognostische Relevanz haben kann, zeigten Qian *et al.* für das Ovarial-Karzinom, wo sich eine Korrelation eines bestimmten Methylierungsprofils von P2 und P3 mit der Progression des Tumors zeigte [89]. Im Prostatakarzinom konnten ähnliche Ergebnisse für Methylierungsmuster von Promotoren anderer Gene gezeigt werden. So war die Promotor-Hypermethylierung von *RASSF1* ein Risikofaktor für ein Rezidiv [220], die Methylierung des Promotors von *CDH13* ein Marker für eine schlechte Prognose [221] und die Promotormethylierung von *GSTP1* ebenfalls ein Risikofaktor für ein Rezidiv [222].

Da im von uns untersuchten Patientenkollektiv keine Daten der Nachsorgeuntersuchungen nach Prostatektomie vorlagen, konnte keine Auswertung hinsichtlich der Prognose oder des Rezidivs vorgenommen werden, dies wäre nach unseren Daten aber sicher interessant.

4.1.2 Die Kontrolle der Expression durch Imprinting

Im Gegensatz zur Promotoraktivität und der Promotormethylierung dient der Imprintingstatus nur bedingt zur Erklärung der *IGF2*-Expression im Prostatakarzinom. Während im Normalgewebe noch ein deutlicher Trend zur höheren Expression bei LOI nachweisbar war, zeigte sich im Tumorgewebe kein Unterschied mehr. Auch diese Beobachtung bestätigt Ergebnisse anderer Autoren mit gleichen Ergebnissen [93], [215]. Ribarska *et al.* fanden interessanterweise auch andere durch Imprinting regulierte Gene im Tumorgewebe geringer exprimiert als im umgebenden Normalgewebe. Hier schien ein komplettes Netzwerk von durch Imprinting regulierten

Genen gestört zu sein. In der gleichen Studie konnten andere Imprinting-regulierte Gene durch Androgene induziert werden, *IGF2* aber nicht. Für *IGF2* konnte dies in Prostatakarzinom-Zelllinien jedoch durch Überexpression des Transkriptionsfaktors ZAC1 erreicht werden, ohne den Imprintingstatus zu ändern [215].

Unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Daten aus anderen Tumorarten wie z.B. dem Dickdarmkarzinom [223] und dem Ösophaguskarzinom [216], wo LOI mit erhöhter IGF2-Proteinkonzentrationen einher ging. Im Ovarial-Karzinom hingegen fand sich wie in unserer Untersuchung kein Zusammenhang zwischen LOI und Expressionsstatus [224]. Insgesamt finden sich also zumindest im Tumorgewebe entitätenübergreifend kontroverse Ergebnisse für die Bedeutung des Imprintings für die Regulation von *IGF2*, was eine Rolle in der Karzinogenese mit erhöhter Expression im Normalgewebe allerdings nicht ausschließt. Zudem ist ein durch LOI erhöhter IGF2-Spiegel im Normalgewebe möglicherweise auch für benachbarte Tumorgewebe relevant, da IGF2 v.a. autokrin und parakrin wirkt.

4.1.3 Die epigenetisch unabhängigen Transkriptionseinflüsse

Unter den vier verschiedenen Promotoren gibt es mit P1 auch einen, der nicht durch Methylierung beeinflussbar ist. Für P1 fanden wir ebenfalls eine signifikante Korrelation der Promotoraktivität mit der *IGF2*-Expression, allerdings ist die Aktivität von P1 im Vergleich zu P3 und P4 nur marginal. Zudem ergab sich kein Unterschied der Aktivität zwischen T und N. Da es aber auch in P1 durchaus eine Varianz der Aktivität gibt, sind die Expressionsunterschiede auch der anderen, durch Methylierung kontrollierten Promotoren möglicherweise nicht alleine durch Epigenetik zu erklären. Zwei neue Faktoren, welche die *IGF2*-Expression beeinflussen können, wurden in dem Stammzell-Transkriptionsfaktor ZFP57 und dem Transkriptionsfaktor STAT3 gefunden, einem Mitglied der STAT-Proteinfamilie. Für ZFP57 wurde gezeigt, dass es an die ICR des *IGF2/H19*-Genlokus binden und dadurch die Expression fördern kann [225]. Die beschriebenen Ergebnisse wurden in embryonalen Stammzellen beobachtet, ob eine IGF2-kontrollierende Rolle sich auch im Prostatakarzinom finden lässt, bleibt abzuwarten. Für STAT3 gibt es jedoch schon Evidenz, dass es zur Progression im Prostatakarzinom beitragen kann, es wurde auch bereits als therapeutisches Ziel diskutiert [226, 227]. Zusätzlich fand man in aktuellen Studien Hinweise, dass STAT3 über einen Imprinting-unabhängigen Mechanismus die

Expression von *IGF2* induzieren kann [228]. Auch hier steht die Bestätigung der Ergebnisse im Prostatakarzinom allerdings noch aus.

4.1.4 CTCF – Expression und Korrelation zu *IGF2*

Während für das CTCF-Paralog BORIS Hinweise für eine Rolle im Prostatakarzinom vorliegen [229], ist über einen direkten Einfluss von CTCF auf das Prostatakarzinom wenig bekannt, lediglich seine Beteiligung an der Regulation chromosomaler Strukturen ist hinlänglich beschrieben [182, 230].

In der Expression von *CTCF* ergab sich auf Transkriptionsebene in N ein deutlicher Trend hin zu einer höheren Expression in LOI. In der Gesamtheit der untersuchten Proben von N und T zeigte sich eine gleichgerichtete Tendenz, während in T kein Unterschied mehr zu beobachten war. Einschränkend muss hier auf die geringe Fallzahl gerade in T verwiesen werden, so konnte nur in 2 Proben T *CTCF* bestimmt werden. Dennoch reiht sich die Beobachtung eines nachlassenden Unterschieds in der Expression in gleichgerichtete Unterschiede der *IGF2*-Expression zwischen LOI und ROI von N zu T ein. Im Kontext des propagierten Enhancer-Competitor-Modells ist eine erhöhte *CTCF*-Expression schwierig zu interpretieren, da eine Bindung von CTCF an der ICR nach diesem Modell die Transkription verhindern würde. Zwischen T und N konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden, es zeigte sich auch keine Korrelation zur Expression von *IGF2*.

Da in dieser Studie keine Quantifizierung des CTCF-Proteins vorgenommen und auch keine Bindung an der ICR per Chromatin-Immunpräzipitation untersucht wurde, soll hier auf eine weitere Interpretation der Bedeutung dieser Beobachtungen verzichtet werden.

4.1.5 miR-675 – Expression und Korrelation zu *IGF2* und *RB*

Die Tatsache, dass miR-675 zum einen laut Enhancer-Competitor-Modell ein reziprokes Verhalten zu *IGF2* aufweisen soll, und dass zum anderen *IGF-1R* und *RB* Ziele dieser microRNA sind [174, 175, 231], ließen dieses Molekül für unsere Studie interessant werden. Zusammenfassend muss hier festgestellt werden, dass keinerlei Unterschiede der Expression festgestellt werden konnten, weder zwischen LOI und ROI noch zwischen T und N. Auch konnte keinerlei Korrelation zwischen der Expression von *IGF2* oder *RB* mit der Expression der miR-675 gefunden werden.

Zumindest die fehlende Korrelation zu *IGF2* war zunächst überraschend, da hier bei LOI nach besagtem Modell doch eine zu *IGF2* gegenläufige Expression zu erwarten war. Ähnliche Ergebnisse einer aufgehobenen Korrelation von *IGF2* und miR-675 zumindest im Tumorgewebe der Prostata fanden sich aber auch bei Bhusari *et al.*, wobei hier im tumorumgebenden Normalgewebe der Prostata sogar eine positive Korrelation von *IGF2* und H19/miR-675 gefunden wurde [93], was eigentlich auch dem gängigen Modell der Regulation widerspricht. Die Gesamtexpression von *H19* war hier im Gegensatz zu unseren Daten im Tumor niedriger als im Normalgewebe. Diese von uns abweichenden Ergebnisse liegen möglicherweise an der Heterogenität des Patientenkollektivs oder an methodischen Unterschieden.

Die Ergebnisse zusammen genommen implizieren jedoch zum einen, dass es wie bei der Regulation von *IGF2* auch für *H19* weitere Einflüsse der Regulation als das beschriebene Modell des Imprintings geben muss, und dass *H19* möglicherweise bei verstärkter Expression in Umgebung eines Tumors, aber erniedrigter intratumoraler Expression auch tumorsuppressive Eigenschaften hat, etwa durch die Degradation der IGF-1R-mRNA, wie in Zelllinien und Mausplazenta gezeigt werden konnte [174]. In Prostatakarzinom-Zelllinien konnte außerdem beobachtet werden, dass *H19*/miR-675 die Migration und damit womöglich die Metastasierung hemmen kann [179]. Somit ist *H19*/miR-675 trotz kontroverser Resultate sicher ein interessanter Kandidat für weitergehende funktionelle Studien und genauerer Analyse als Biomarker im Prostatakarzinom.

4.1.6 RB – Expression und Korrelation zu miR-675

Die Expression von RB in unserer Patientenkohorte sollte untersucht werden, da *RB*-mRNA eine Zielstruktur der ebenfalls untersuchten miR-675 ist [175, 197, 231]. Zudem spielt RB eine Rolle in der Modulation des im Prostatakarzinom wichtigen Androgen-Signalwegs [194], ein Verlust von RB gehört zu den häufigsten molekularen Veränderungen des PCA [232].

Im Kontrast zur zitierten Studie von Taylor *et al.*, fanden wir keinen Unterschied in der Expression von RB zwischen N und T. Die von Taylor *et al.* untersuchte Kohorte war mit 194 Tumoren um ein Vielfaches größer als die 17 von uns getesteten Tumorproben, sodass die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise durch eine Stichprobenverzerrung entstanden. Eine Erklärung für diese Stichprobenverzerrung könnte neben der Fallzahl die Tatsache sein, dass in unserer Studie lediglich Proben

analysiert wurden, die zuvor eine Voruntersuchung auf LOH unterlaufen waren, denn für die Testung auf LOI/ROI konnten lediglich heterozygote Fälle benutzt werden. Eine Reduktion der RB-Expression in PCA-Proben kommt v.a. durch Deletionen zustande. Diese betreffen mit Chromosom 13 zwar eine andere genomische Region als *IGF2/H19* auf Chromosom 11, aber möglicherweise entfielen vermehrt solche Proben mit *RB*-Deletion oder genomischer Re-Arrangements unserer *RB*-Analyse, da chromosomale Instabilität/Veränderungen gehäuft global auftreten und somit ein LOH für ein einzelnes Gen, wie in diesem Fall *IGF2*, mit mutmaßlich höherer Wahrscheinlichkeit für weitere genomische Veränderungen einhergeht als bei Proben ohne LOH. Weitergehende chromosomale/genomische Untersuchungen wurden in der vorgelegten Arbeit nicht unternommen, da diese nicht im Fokus standen.

Analysen der Korrelation der *RB*-Expression mit der miR-675-Expression konnten keinerlei Zusammenhang dieser Moleküle in der untersuchten Stichprobe finden, weder in N, T, LOI oder ROI. Eine Degradierung von *RB*-mRNA durch miR-675 mit konsekutiver Proliferationssteigerung konnte im KRK, dem HCC und im Gliom gezeigt werden [175, 197, 231]. Entweder weisen nun unsere Ergebnisse möglicherweise darauf hin, dass im PCA ein solcher Zusammenhang nicht besteht, oder die Ergebnisse sind auf Grund der bereits diskutierten Limitationen der Untersuchungen auf *RB*- und miR-675-Expression nicht repräsentativ und daher von beschränkter Aussagekraft.

4.2 Die Bedeutung von LOI

Beobachtungen über ein gehäuftes *IGF2*-LOI in der alternden Prostata gibt es schon länger [66], auch in humanen Zelllinien konnte ein gehäuftes LOI mit Seneszenz in Verbindung gebracht werden [233]. Daten zur Prävalenz von *IGF2*-LOI in jungen, gesunden humanen Prostaten liegen jedoch nicht vor. In einem Tiermodell mit artifiziellm LOI in der Prostata der Maus konnte jetzt allerdings demonstriert werden, dass eine erhöhte *IGF2*-Expression durch biallelische Expression mit einer gehäuften Anzahl von prämaligen PIN einhergeht [234]. Während in jungen Tieren der Unterschied in der *IGF2*-Expression zwischen LOI und ROI fast das Doppelte beträgt, verringert sich der Unterschied in der alternden Prostata durch eine zunehmende *IGF2*-Expression auch im ROI-Gewebe. Dennoch ist diese Studie wegweisend für die Rolle eines frühen LOI in der Entstehung prämaligener Läsionen und vermutlich auch konsekutiver Karzinome.

Auch Bhusari *et al.* sehen ein *IGF2*-LOI im Sinne einer Feldkarzinogenese als frühen Schritt der Tumorentwicklung an [93, 217]. Zusätzlich wurde *IGF2*-LOI als charakteristische Eigenschaft von Krebsstammzellen beschrieben [235]. Die Tatsache einer ähnlichen Frequenz von LOI in N und T und die häufige Konkordanz des Imprintings in korrespondierenden N und T in unserer Studie stärken die Hypothese, dass ein gestörtes Imprinting ein frühes Ereignis der Karzinogenese ist. Die Vergesellschaftung von *IGF2*-LOI mit anderen Imprinting-Störungen [215] weist darauf hin, dass in Tumoren unabhängig von chromosomalen Veränderungen andere globale Veränderungen auftreten, sodass ein gestörtes Imprinting eines einzelnen Gens wie *IGF2* sicher nur einer von vielen Bausteinen der Karzinogenese ist.

Eine klinische Relevanz des *IGF2*-LOI könnte durch unsere Beobachtung entstehen, dass LOI mit LVI korreliert und somit Potential als prognostischer Biomarker offenbart, da LVI in einer großen Kohortenstudie mit einem höheren Risiko für ein Rezidiv nach Prostatektomie assoziiert war [236]. *In-vitro*-Daten in KRK-Zelllinien beschrieben *IGF2*-LOI als Ursache für eine Resistenz gegenüber Radio-Chemotherapie [235], *in-vivo*-Daten hierzu gab es zum Zeitpunkt der vorgelegten Arbeit noch nicht. Ob *IGF2*-LOI selbst ein unabhängiger Risikofaktor für eine höhere Mortalität, ein Therapieversagen oder ein Rezidiv ist, sollte nach der vorliegenden Datenlage in einer möglichst großen Kohorte prospektiv untersucht werden.

4.3 Das *IGF2 Enhancer-Competitor*-Modell und Kontrolle des Imprintings

Das klassische Modell zur Regulation des Imprintings von *IGF2* betrifft den *IGF2/H19*-Genlocus und besagt eine reziproke Expression von *IGF2* und *H19* in Abhängigkeit der Methylierung einer Imprinting-Control-Region (ICR). Gemäß diesem Modell wird bei intaktem Imprinting von einem Allel *IGF2* abgelesen, vom komplementären Allel *H19*, das für miR-675 kodiert (siehe Kapitel 1.3.1.1) [107]. Kommt es zu einem Verlust des Imprintings, wird von beiden Allelen *IGF2* abgelesen, was in der Theorie in einer doppelten Gendosis resultiert. In einigen Tumorarten wie Kolonkarzinom, Adenokarzinom des Ösophagus oder auch Wilms-Tumor konnte diese Theorie bestätigt werden [223, 237, 238].

Auch in Untersuchungen von Mäuseprostaten konnte eine erhöhte *IGF2*-Expression bei LOI beobachtet werden [66]. Experimentell konnte in einem Mausmodell durch eingefügte Mutationen in den CTCF-Bindungsstellen der *IGF2/H19*-ICR eine biallelische Expression erzeugt werden, was ein LOI simuliert. Dieses artifizielle LOI

resultierte in einer gehäuften Frequenz prämaligener prostaticher intraepithelialer Neoplasien [234].

Die vorliegende Arbeit kann, wie auch andere Autoren [93], diesen Zusammenhang zwischen biallelischer Expression von *IGF2*, resultierend in einer Überexpression, bei LOI im Normalgewebe der Prostata bestätigen, während dieser Effekt im Tumorgewebe verloren zu gehen scheint.

In Konflikt zum propagiertem Modell steht zudem die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie keinerlei Korrelation zwischen Expression von miR-675 zu *IGF2* gefunden wurde, weder in N noch T. So sollte nach dem präsentierten Modell bei LOI die *IGF2*-Expression biallelisch sein, während die von *H19* auf beiden Allelen blockiert sein sollte, folglich müsste eine erhöhte *IGF2*-Expression bei LOI mit einer Reduktion von miR-675 einhergehen. In anderen Tumorentitäten wie etwa dem Wilms-Tumor konnte dieses reziproke Verhalten auch gezeigt werden [237].

Während im ursprünglichem Modell das Imprinting über differentielle Methylierung an Bindungsstellen des Chromatinmodulators CTCF in der ICR reguliert wird, fanden sich weder im Vergleich zwischen LOI und ROI noch im Vergleich zwischen N und T Unterschiede in der Methylierung der ICR oder in der Expression von *CTCF*. Beim Vergleich der *CTCF*-Expression ergab sich immerhin ein deutlicher Trend zu einer höheren Expression in LOI im Normalgewebe gegenüber ROI im Normalgewebe. In Zusammenschau mit Erkenntnissen, dass CTCF zusammen mit anderen Faktoren die Chromatinstruktur des *IGF2/H19*-Genlocus verändert [239, 240], kann über eine Rolle von CTCF an der Kontrolle des Imprintings weiter diskutiert werden. Die auch im Zusammenhang mit einer veränderten Expression beschriebene DMR0 war in anderen Tumorarten mit LOI assoziiert, nicht aber im Prostatakarzinom [93, 216], sodass auch Methylierungsunterschiede in dieser genomischen Region hier keine mechanistischen Erklärungen für LOI bieten können.

Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit anderen Autoren [93] lässt sich das Phänomen LOI wie auch die Expression von *IGF2* im Prostatakarzinom nicht ausreichend mit dem propagierten *Enhancer-Competitor*-Modell erklären.

Die genaue Regulation von *IGF2*-LOI speziell im Prostatakarzinom sowie deren Einfluss auf die *IGF2*-Expression ist demnach weiter unklar. Es zeigten sich jedoch Hinweise, dass LOI von *IGF2* in der Prostata mit anderen, ebenfalls durch Imprinting beeinflussten Genen co-kontrolliert wird [215]. Die Gründe der initialen Störung dieses Netzwerks von durch Imprinting regulierten Genen konnten auch hier nicht gefunden

werden, es wurde mit der funktionellen Beschreibung des Transkriptionsfaktors ZAC1 in der zitierten Studie aber immerhin ein neuer Regulator des Imprintings für *IGF2* und andere Gene gefunden. Neuere Studien lenkten das Augenmerk der Imprinting-Regulation auch auf die Rolle neu charakterisierter microRNA-Moleküle. So wurde jüngst für miR-483 die Fähigkeit zur Beeinflussung des Imprintings durch epigenetische Modifikationen wie Histonmethylierung beschrieben, wodurch auch die Bindung des Zinkfingerproteins CTCF am *IGF2/H19*-Genlocus beeinflusst werden kann [219].

In Forschungen an Stammzellen und *in-vitro*-Reproduktionsmethoden fanden sich Hinweise für eine kausale Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen wie Methylierung und Imprinting, die auch *IGF2* betrafen, durch veränderte Sauerstoffkonzentrationen und ROS in den Kultivierungsbedingungen [241]. Da ROS auch an der Karzinogenese der Prostata beteiligt sind [242, 243], könnten hier möglicherweise die initialen Gründe für die Entstehung eines gestörten Imprintings im Prostatakarzinom liegen.

4.4 Klinische Implikationen, Schlussfolgerungen und Ausblicke

Die onkogene Rolle von *IGF2* im Prostatakarzinom war im Gegensatz zu anderen Entitäten bisher weniger eindeutig. Im KRK beispielsweise konnte klar gezeigt werden, dass *IGF2* zur Karzinogenese beiträgt [244, 245] und auch bei der Entstehung von Therapieresistenzen eine Rolle spielt [246].

Auch die mit dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse der Assoziation von LOI mit einer Häufung von LVI und einem Trend zu jüngerem Alter bei Operation bei Patienten mit höherer *IGF2*-Expression im Tumorgewebe als Surrogatmarker für eine beschleunigte Karzinogenese/Aggressivität sind auf Grund der Limitationen dieser Studie hinsichtlich Probengröße und fehlender experimenteller Bestätigung in Tumormodellen nur eingeschränkt aussagekräftig. Allerdings stehen die Daten in einer Reihe anderer aktueller Ergebnisse für eine klinische Relevanz von erhöhtem *IGF2* im Prostatakarzinom. Im Zusammenhang mit dem Nachweis höherer *IGF2*-Plasmapiegel in PCA-Patienten im Vergleich zu Gesunden [139] muss eine Rolle von *IGF2* als Onkogen auch im Prostatakarzinom weiter diskutiert werden. Zudem fanden sich in der vorliegenden Arbeit erstmals Hinweise für eine klinische Relevanz des Imprintingstatus von *IGF2*, da hier LOI mit LVI assoziiert ist, was als Maß der Invasivität und damit der Aggressivität angesehen werden kann. Die gefundenen Hinweise sollten

in jedem Fall in größeren Patientenkollektiven validiert werden. Unterstützend lässt sich eine aktuelle Studie anführen, die reaktive Sauerstoffspezies, die auch gehäuft in alternden Prostaten vorkommen und die Karzinogenese beeinflussen können [13], mit IGF2-LOI in Verbindung setzt [247].

Mutationen des IGF-Signalwegs zeigten zudem in großen Kohortenstudien einen Einfluss auf die Prostatakarzinom-Mortalität [138], ein *IGF2*-SNP in Exon 7 war mit einem jüngeren Alter bei Diagnose des Prostatakarzinoms assoziiert [139]. Einflüsse von zirkulierendem IGF2 konnten bisher weder für Mortalität oder andere klinische Variablen wie Tumorstadium, Gleason-Score oder PSA-Werte gezeigt werden. Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten Patienten mit PCA selbst Jahre nach einer radikalen Prostatektomie noch höhere IGF2-Plasmaspiegel als gesunde Männer [139]. Allenfalls für IGF1 und IGFBP3 konnten schwache Evidenzen für Zusammenhänge mit klinischen Variablen oder prognostischem Wert gezeigt werden [129, 248]. Eine erhöhte Expression des IGF-1R, für den auch IGF2 ein Ligand ist, konnte jedoch einen prognostischen Wert hinsichtlich der Mortalität zeigen, v.a. in Zusammenhang mit einer verminderten Expression des Tumor-Suppressors PTEN [249]. PTEN ist eine Phosphatase, die Phosphatidyl-Inositol-Trisphosphat spalten kann, ein Substrat des durch die Signaltransduktion des IGF-1R aktivierten AKT-Signalwegs.

Begleitend zur Beeinflussung der Karzinogenese und Invasivität sowie prognostischem Einfluss fanden sich in aktuellen Studien anderer Arbeitsgruppen auch vermehrt Hinweise für eine therapeutische Relevanz. Nachdem im KRK eine Assoziation von IGF2-Überexpression und verminderter Sensitivität gegenüber einer Therapie mit Cetuximab berichtet wurde [250], wurden auch zum Prostatakarzinom Daten veröffentlicht, die möglicherweise in Zukunft prädiktive Eigenschaften haben könnten.

Eine 2015 publizierte Studie ergab neben Hinweisen, dass IGF2 zur Progression und Aggressivität des Prostatakarzinoms beitragen kann, auch Daten, die einen Zusammenhang von IGF2 und Ansprechen gegenüber Chemotherapie belegen [143]. Die Autoren zeigten, dass der Transkriptionsfaktor GATA2 eine Gensignatur reguliert, die zur Onkogenese und weiterhin zur Resistenz gegenüber Zytostatika der Gruppe der Taxane beiträgt. Zu diesen durch GATA2 regulierten Genen gehört auch *IGF2*, das in der zitierten Studie als Mediator der tumorfördernden Eigenschaften von GATA2 charakterisiert wurde.

Ein weiterer Mechanismus der Tumorprogression scheint neben der mitogenen Aktivierung des AKT-Signalwegs durch Bindung von IGF2 an IGF-1R auch die Bildung para- und autokrin wirkender Androgene in Prostatakrebszellen über eine Aktivierung von IRS-2 (ein Substrat der Insulinrezeptor-Familie) durch Insulin zu sein, was die im fortgeschrittenen Prostatakarzinom häufig eingesetzte antiandrogene Therapie konterkariert und eine Progression fördern kann [142]. Eine konsekutive Studie derselben Autoren zeigte 2013, dass IGF2 die gleichen Auswirkungen auf die Steroidsynthese in Prostatazellen hat, und dass eine pharmakologische Inhibierung dieses IGF2-Signalwegs die IGF2-vermittelte *de-novo*-Steroidsynthese unterbrechen kann [141]. Eine gegen IGF-1R gerichtete Therapie konnte in der zitierten Studie von Vidal *et al.* in Verbindung mit Chemotherapie in Tumor-Mausmodellen Tumoren verkleinern und ein verlängertes Überleben der Tiere bewirken [143].

Eine Hemmung des Rezeptor-Signalwegs über Antikörper gegen IGF-1R, an den auch IGF2 binden kann, wurde bereits als neuer Angriffspunkt von Krebstherapien betrachtet [251].

Allerdings zeigten klinische Studien in verschiedenen soliden Malignomen bisher allenfalls in Kombination mit anderen signalweghemmenden Substanzen geringe klinische Effekte [252, 253]. Eine Monotherapie mit einem monoklonalen Anti-IGF-1R Antikörper zeigte bisher keinen Nutzen [254]. Aktuell finden sich keine aktiv rekrutierenden klinischen Studien zum Einsatz von zielgerichteten Therapien gegen die IGF/INSR-Achse.

Einen interessanten Ansatzpunkt, um das Phänomen des LOI therapeutisch zu nutzen, fanden Wissenschaftler in *in-vitro*-Experimenten mit KRK-Zelllinien. Nie *et al.* nutzen die biallelische Expression im LOI-Stadium, um gezielt in LOI-Krebszellen das onkolytische Potential genetisch veränderter Adenoviren zu entfalten [255]. In weiteren Schritten konnte dieser gentherapeutische Ansatz auch schon in Xenograft-Mäusen überprüft werden, wo sich eine Wachstumshemmung von Tumoren unter Therapie mit Adenoviren unter Kontrolle des *IGF2*-LOI-Systems zeigte [256]. Zur Übertragung dieses Therapieansatzes auf das Prostatakarzinom fanden sich bislang keine publizierten Studien, die Häufigkeit von *IGF2*-LOI in Prostatakarzinomzellen prädestinieren diese Karzinome jedoch geradezu für einen solchen Ansatz. Neuere gentherapeutische Methoden wie die CRISPR-Cas-Technologie, die auch schon Anwendung in ersten klinischen Studien fand, versprechen zudem eine Vereinfachung von Gentherapien [257, 258].

Betrachtet man *IGF2*-LOI, wie im Sinne der Feldkarzinogenese diskutiert, als frühes Ereignis der Karzinogenese und möglicherweise als Teil eines global gestörten Imprintings, wäre eine Umkehr von LOI zu ROI eine Methode, die Tumorprogression zu verhindern. Eventuell lassen sich in der Zukunft biallelische Expressionen eines Onkogens im LOI-Stadium durch gezielte Deletion eines Allels mittels CRISPR-Cas-Technologie oder durch Methoden einer epigenetischen Modifizierung verhindern bzw korrigieren. Auch ließe sich durch pharmakologisch induzierbare Faktoren, die im Komplex mit CTCF Imprinting regulieren können, eventuell ein Imprinting wieder herstellen, was z.B. bei Tumoren mit erhöhter IGF2-Konzentration ein therapeutischer Ansatz sein könnte [239].

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der klinischen Relevanz sagen, dass sich nach Kontroversen zur Rolle von IGF2 im Prostatakarzinom die Zeichen für eine biologische Relevanz des *IGF*-LOI und der IGF/INSR-Achse mehren, und sich darüber hinaus Potentiale als Biomarker oder therapeutische Ziele offenbaren.

Wahrscheinlich muss hier, wie in anderen malignen Erkrankungen auch, eine Kohorte von Karzinompatienten molekular genauer charakterisiert werden, die eine differentielle Tumorbilogie aufweisen und auf Grund spezieller, noch zu klärender Eigenschaften von einer zielgerichteten Anti-IGF/INSR-Therapie im Sinne einer personalisierten Medizin profitieren.

Zusätzlich sollten prospektive Beobachtungsstudien hinsichtlich des Einflusses der Expression von IGF2 auf ein Therapieansprechen mit herkömmlichen Therapien wie Zytostatika und Anti-Androgenen erfolgen, um die bisherigen retrospektiven Daten zu Zusammenhängen von Therapieresistenz und IGF2 zu validieren. Besonderes Augenmerk sollte auf Grund der v.a. präklinisch gewonnenen, neueren Daten zur möglicherweise therapeutischen Relevanz einer IGF2-Überexpression auf Patienten mit hohen IGF2-Spiegeln liegen.

4.5 Limitationen der Studie

Einschränkend muss gesagt werden, dass in dieser Studie keine Untersuchung der Rezeptoren von IGF2 und deren Signalkaskaden unternommen wurden. Dies kann relevant sein, da neben einer veränderten Expression auch ein veränderter Signalweg eine verstärkte Wirkung eines Wachstumsfaktors auslösen und somit potentiell onkogen sein kann.

Limitierend ist weiterhin, dass keine Untersuchung der Proteinexpression *in situ* vorgenommen wurde. Somit können spatiale Expressionsunterschiede bei gleicher Gesamtexpression des Proteins übersehen worden sein.

Es konnten zwar durch *ex-vivo* Untersuchungen Zusammenhänge zwischen Methylierung und Genaktivität hergestellt werden, eine experimentelle Überprüfung der Resultate mittels gezielter epigenetischer oder molekularer Veränderungen *in-vitro* oder *in-vivo* in Tumormodellen blieb jedoch aus. Bei relevanten Unterschieden in Methylierungsprofilen erfolgte keine Bestimmung von Faktoren, die Methylierung beeinflussen wie z.B. Methyltransferasen, was ebenfalls als Manko angesehen werden muss.

Die Abhängigkeit der Untersuchung auf LOI/ROI vom Vorhandensein von Heterozygotie für einen SNP reduziert die informativen Patientenproben deutlich. Von initial 141 Patienten zeigten sich nur 32 informativ für den Imprintingstatus. Bei weiterer Unterteilung in Subgruppen (T LOI – N LOI, T ROI – N ROI) muss daher ein sehr großes Patientenkollektiv im Vorfeld untersucht werden, um repräsentative Fallzahlen zu erhalten, außerdem ist nicht auszuschließen, dass durch das Vorscreening ein statistischer Bias in das verwendete Kollektiv eingeführt wird. Kommt es, wie teilweise in dieser Studie, zusätzlich zu Probenausfällen, ist die Aussagekraft bei geringer Größe der Subgruppe sehr eingeschränkt. Es konnten beispielsweise nur 2 Proben mit den Merkmalen T und LOI auf die Expression von *CTCF* untersucht werden. Somit ist der Aufwand des Screenings vor den eigentlichen Analysen sehr hoch. Durch alternative Methoden zur Bestimmung des Imprintings, die auf das gesamte Kollektiv anwendbar sind, ließen sich die benötigten Fallzahlen zum Erreichen einer repräsentativen Subgruppe reduzieren. Weiterhin ist Imprinting in der Gesamtheit eines Organs vermutlich kein binärer Status, sondern kann durch neuere Methoden wie z.B. *Next Generation Sequencing* des gesamten Transkriptoms auch quantifiziert werden [259], was exaktere Untersuchungen des Einflusses von Imprinting auf biologische Prozesse und zeitliche Veränderungen des Imprintings zuließe.

Durch fehlende Langzeitdaten hinsichtlich Gesamtüberleben, Letalität und/oder Auftreten eines Rezidivs konnten leider nur sehr eingeschränkt Aussagen über das Potential der gefundenen Ergebnisse als Biomarker getroffen werden. Auch dies wäre sicher ein lohnenswertes Ziel künftiger Studien.

5 ZUSAMMENFASSUNG

IGF2 wird als hauptsächlicher fetaler Wachstumsfaktor angesehen, eine Überexpression und veränderte Regulierung von IGF2, dessen Rezeptoren und Signalwege spielen in verschiedenen Krebserkrankungen und anderen Syndromen eine große Rolle. Zielgerichtete Therapien gegen dieses System wurden bereits entwickelt und in klinischen Studien auf ihre Wirkung untersucht. IGF2 ist im Gesunden streng differentiell reguliert und wird gewebe- und zeitabhängig exprimiert. Mechanismen der Regulation beinhalten epigenetische Phänomene wie Imprinting und Methylierung. Ein Verlust des Imprintings wurde in der alternden Prostata gehäuft beschrieben, die genauen Mechanismen dieses Verlusts und die Relevanz von IGF2 im Prostatakarzinom waren jedoch bisher nicht vollständig geklärt. Nach gängiger Vorstellung resultiert aus einem Verlust des Imprintings eine höhere, weil biallelische Expression. Allerdings fanden wir in den meisten untersuchten Tumorproben eine Reduktion der IGF2-Expression im Vergleich zum umliegenden Nicht-Tumorgewebe. Zudem fanden wir in Tumorgewebe im Gegensatz zu Normalgewebe keinen Zusammenhang zwischen Imprintingstatus und Genexpression. Stattdessen zeigte sich ein spezifischer Zusammenhang mit der differentiellen Aktivität der vier verschiedenen IGF2-Promotoren und deren Methylierung. So war im Normalgewebe und Tumorgewebe die Expression v.a. durch Promotor 3 und 4 gesteuert. Ein Teil der untersuchten Patienten zeigte eine in T erhöhte IGF2-Expression, was sich ebenfalls durch eine differentielle Methylierung in einem Teilbereich des Promotors 4 erklären ließ. Diese Patienten wiesen einen Trend zu jüngerem Alter zum Zeitpunkt der Prostataektomie auf. Die Kontrolle des Imprintings soll nach bisher gängigem Modell durch Methylierung einer Imprinting-Kontroll-Region erfolgen. Es konnten an dieser jedoch keine Unterschiede zwischen Proben mit Verlust des Imprintings und erhaltenem Imprinting festgestellt werden. Allerdings fanden sich bei Karzinomen mit Verlust des Imprintings häufiger Tumoreinbrüche in Lymphgefäße. Zusammenfassend zeigte die Mehrzahl der Prostatakarzinome eine verminderte IGF2-Expression, die sich durch differentielle Promotormethylierung und -aktivität erklären lässt. Die Unabhängigkeit von Imprinting und die fehlenden Methylierungsunterschiede zwischen erhaltenem und verlorenem Imprinting nähren zudem Zweifel an der Vollständigkeit und Relevanz des bisherigen Modells der IGF2-Imprintingkontrolle zumindest beim Prostatakarzinom. IGF2 und Verlust des Imprintings bieten jedoch

Potential als Biomarker des Prostatakarzinoms, was in größeren Studien validiert werden sollte. Große Teile dieser Arbeit wurden 2018 in einer internationalen Fachzeitschrift mit Peer-review System publiziert [213].

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. GEKID, *Atlas der Krebsinzidenz und Krebsmortalität*, in *Der GEKID Atlas*. 2014, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Erlangen. p. 19.
2. Zentrum für Krebsregisterdaten, *Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland* Gesundheitsberichterstattung des Bundes Vol. 2012. 2012. 5-6.
3. Batzler W, G.K., Hentschel S, et al., *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*, in *Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* 2008, Robert Koch-Institut, , p. 70-74.
4. Chou, R., et al., *Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force*. *Ann Intern Med*, 2011. **155**(11): p. 762-71.
5. Dahm, P. and S. Gilbert, *Radical prostatectomy and observation did not differ for mortality in localized prostate cancer*. *Ann Intern Med*, 2012. **157**(8): p. JC4-5.
6. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, A.d.W.M., *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und rapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms*. 2016.
7. Neves, A.F., et al., *Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis*. *Clin Biochem*, 2008. **41**(14-15): p. 1191-8.
8. Bussemakers, M.J., et al., *DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer*. *Cancer Res*, 1999. **59**(23): p. 5975-9.
9. Group, E.o.G.A.i.P.a.P.E.W., *Recommendations from the EGAPP Working Group: does PCA3 testing for the diagnosis and management of prostate cancer improve patient health outcomes?* *Genet Med*, 2014. **16**(4): p. 338-46.
10. Nicholson, A., et al., *The clinical effectiveness and cost-effectiveness of the PROGENSA(R) prostate cancer antigen 3 assay and the Prostate Health Index in the diagnosis of prostate cancer: a systematic review and economic evaluation*. *Health Technol Assess*, 2015. **19**(87): p. i-xxxii, 1-191.
11. Gomella, L.G., et al., *Screening for prostate cancer: the current evidence and guidelines controversy*. *Can J Urol*, 2011. **18**(5): p. 5875-83.
12. Ilic, D., et al., *Screening for prostate cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. **1**: p. CD004720.
13. Malins, D.C., et al., *Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 6025-8.
14. Sinclair, D.A. and P. Oberdoerffer, *The ageing epigenome: damaged beyond repair?* *Ageing Res Rev*, 2009. **8**(3): p. 189-98.
15. Talens, R.P., et al., *Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs*. *Aging Cell*, 2012. **11**(4): p. 694-703.
16. TCGA, *The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer*. *Cell*, 2015. **163**(4): p. 1011-25.
17. Bostwick, D.G. and L. Cheng, *Precursors of prostate cancer*. *Histopathology*, 2012. **60**(1): p. 4-27.
18. Bostwick, D.G. and J. Qian, *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia*. *Mod Pathol*, 2004. **17**(3): p. 360-79.

19. Jeronimo, C., et al., *Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance*. Eur Urol, 2011. **60**(4): p. 753-66.
20. Boyd, L.K., X. Mao, and Y.J. Lu, *The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity*. Nat Rev Urol, 2012. **9**(11): p. 652-64.
21. van Bokhoven, A., et al., *Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines*. Prostate, 2003. **57**(3): p. 205-25.
22. Lee, W.H., et al., *Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11733-7.
23. Kanwal, R., et al., *Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1*. Mol Carcinog, 2012.
24. Deutsch, E., et al., *Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5**(5): p. 303-13.
25. Damber, J.E. and G. Aus, *Prostate cancer*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1710-21.
26. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
27. Li, J., et al., *Ethnic disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes*. Am J Cancer Res, 2013. **3**(2): p. 127-51.
28. Shimizu, H., et al., *Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County*. Br J Cancer, 1991. **63**(6): p. 963-6.
29. Wilson, K.M., E.L. Giovannucci, and L.A. Mucci, *Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer*. Asian J Androl, 2012. **14**(3): p. 365-74.
30. Nakai, Y. and N. Nonomura, *Inflammation and prostate carcinogenesis*. Int J Urol, 2013. **20**(2): p. 150-60.
31. Bastacky, S.I., et al., *Pathological features of hereditary prostate cancer*. J Urol, 1995. **153**(3 Pt 2): p. 987-92.
32. Mazzucchelli, R., et al., *Rare and unusual histological variants of prostatic carcinoma: clinical significance*. BJU Int, 2008. **102**(10): p. 1369-74.
33. Gleason, D., *The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma*. Urologic Pathology: The Prostate. 1977: Tannenbaum, M.
34. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.
35. Lerner, S.E., M.L. Blute, and H. Zincke, *Risk factors for progression in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy*. Semin Urol Oncol, 1996. **14**(2 Suppl 2): p. 12-20; discussion 21.
36. Mitchell, R.E., et al., *Changes in prognostic significance and predictive accuracy of Gleason grading system throughout PSA era: impact of grade migration in prostate cancer*. Urology, 2007. **70**(4): p. 706-10.
37. Lilleby, W., et al., *Prognostic significance of histologic grading in patients with prostate carcinoma who are assessed by the Gleason and World Health Organization grading systems in needle biopsies obtained prior to radiotherapy*. Cancer, 2001. **92**(2): p. 311-9.
38. Epstein, J.I., et al., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1228-42.
39. Gordetsky, J. and J. Epstein, *Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications*. Diagn Pathol, 2016. **11**: p. 25.

40. Wilt, T.J., et al., *Follow-up of Prostatectomy versus Observation for Early Prostate Cancer*. N Engl J Med, 2017. **377**(2): p. 132-142.
41. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
42. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
43. Li, E., *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(9): p. 662-73.
44. Antequera, F., *Structure, function and evolution of CpG island promoters*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(8): p. 1647-58.
45. Ehrlich, M., et al., *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2709-21.
46. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(10): p. 3087-95.
47. Tucker, K.L., *Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience*. Neuron, 2001. **30**(3): p. 649-52.
48. Robert, M.F., et al., *DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 61-5.
49. Chedin, F., *The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **101**: p. 255-85.
50. Cervoni, N., S. Bhattacharya, and M. Szyf, *DNA demethylase is a processive enzyme*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8363-6.
51. Seisenberger, S., et al., *Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1609): p. 20110330.
52. Morgan, H.D., et al., *Epigenetic reprogramming in mammals*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No 1**: p. R47-58.
53. Zemach, A., et al., *Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation*. Science, 2010. **328**(5980): p. 916-9.
54. Esteller, M., *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5427-40.
55. Huff, J.T. and D. Zilberman, *Dnmt1-independent CG methylation contributes to nucleosome positioning in diverse eukaryotes*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1286-1297.
56. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
57. Choy, M.K., et al., *Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 519.
58. Bogdanovic, O. and G.J. Veenstra, *DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function*. Chromosoma, 2009. **118**(5): p. 549-65.
59. Ng, H.H., et al., *MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 58-61.
60. Sekimata, M., et al., *Involvement of a novel zinc finger protein, MIZF, in transcriptional repression by interacting with a methyl-CpG-binding protein, MBD2*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 42632-8.
61. Brackertz, M., et al., *Two highly related p66 proteins comprise a new family of potent transcriptional repressors interacting with MBD2 and MBD3*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40958-66.

62. Boeke, J., et al., *The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 34963-7.
63. Mazin, A.L., *[The mechanism of replicative and post-replicative DNA methylation as a generator of mutations in a cell]*. Mol Biol (Mosk), 1993. **27**(5): p. 965-79.
64. Holliday, R. and G.W. Grigg, *DNA methylation and mutation*. Mutat Res, 1993. **285**(1): p. 61-7.
65. Heyn, H., et al., *Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10522-7.
66. Fu, V.X., et al., *Aging and cancer-related loss of insulin-like growth factor 2 imprinting in the mouse and human prostate*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6797-802.
67. Morison, I.M., J.P. Ramsay, and H.G. Spencer, *A census of mammalian imprinting*. Trends Genet, 2005. **21**(8): p. 457-65.
68. Reik, W. and A. Lewis, *Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 403-10.
69. Isles, A.R. and A.J. Holland, *Imprinted genes and mother-offspring interactions*. Early Hum Dev, 2005. **81**(1): p. 73-7.
70. Barton, S.C., M.A. Surani, and M.L. Norris, *Role of paternal and maternal genomes in mouse development*. Nature, 1984. **311**(5984): p. 374-6.
71. McGrath, J. and D. Solter, *Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes*. Cell, 1984. **37**(1): p. 179-83.
72. Davies, W., A.R. Isles, and L.S. Wilkinson, *Imprinted gene expression in the brain*. Neurosci Biobehav Rev, 2005. **29**(3): p. 421-30.
73. Rideout, W.M., 3rd, et al., *5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes*. Science, 1990. **249**(4974): p. 1288-90.
74. Kowluru, R.A., J.M. Santos, and M. Mishra, *Epigenetic modifications and diabetic retinopathy*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 635284.
75. Lu, H., et al., *DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases*. Front Aging Neurosci, 2013. **5**: p. 85.
76. Tingare, A., B. Thienpont, and H.L. Roderick, *Epigenetics in the heart: the role of histone modifications in cardiac remodelling*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(3): p. 789-96.
77. Ventham, N.T., et al., *Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics*. Gastroenterology, 2013. **145**(2): p. 293-308.
78. Sakai, T., et al., *Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(5): p. 880-8.
79. Herman, J.G., et al., *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9700-4.
80. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
81. Wang, Z., et al., *Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs*. Cancer Lett, 2013. **331**(1): p. 1-10.
82. Uribe-Lewis, S., et al., *Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e2.
83. Baba, Y., et al., *LINE-1 Hypomethylation, DNA Copy Number Alterations, and CDK6 Amplification in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. Clin Cancer Res, 2014.

84. Zhang, W., et al., *Hypomethylation upregulates the expression of CD30 in lymphoma induced by Marek's disease virus*. *Poult Sci*, 2012. **91**(7): p. 1610-8.
85. Xie, R., et al., *Hypomethylation-induced expression of S100A4 in endometrial carcinoma*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(10): p. 1045-54.
86. Wang, W.F., et al., *PIK3CA hypomethylation plays a key role in activation of the PI3K/AKT pathway in esophageal cancer in Chinese patients*. *Acta Pharmacol Sin*, 2013. **34**(12): p. 1560-7.
87. Liu, L., et al., *Hypomethylation mediated by decreased DNMTs involves in the activation of proto-oncogene MPL in TK6 cells treated with hydroquinone*. *Toxicol Lett*, 2012. **209**(3): p. 239-45.
88. Seligson, D.B., et al., *Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(5): p. 1619-28.
89. Qian, B., et al., *IGF-II promoter specific methylation and expression in epithelial ovarian cancer and their associations with disease characteristics*. *Oncol Rep*, 2011. **25**(1): p. 203-13.
90. Beeghly, A.C., et al., *IGF-II promoter methylation and ovarian cancer prognosis*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007. **133**(10): p. 713-23.
91. Baba, Y., et al., *Hypomethylation of the IGF2 DMR in colorectal tumors, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(6): p. 1855-64.
92. Jarrard, D.F., et al., *Regional loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs in human prostate tissues*. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(12): p. 1471-8.
93. Bhusari, S., et al., *Insulin-like growth factor-2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer*. *Prostate*, 2011. **71**(15): p. 1621-30.
94. Millar, D.S., et al., *Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer*. *Oncogene*, 1999. **18**(6): p. 1313-24.
95. Maruyama, R., et al., *Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(2): p. 514-9.
96. Kron, K., et al., *Correlation of ERG expression and DNA methylation biomarkers with adverse clinicopathologic features of prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(10): p. 2896-904.
97. Deligezer, U., et al., *Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(19-20): p. 1452-6.
98. O'Dell, S.D. and I.N. Day, *Insulin-like growth factor II (IGF-II)*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. **30**(7): p. 767-71.
99. Martin, J.L. and R.C. Baxter, *Insulin-like growth factor-binding protein from human plasma. Purification and characterization*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(19): p. 8754-60.
100. Drop, S.L., *Report on the nomenclature of the IGF binding proteins*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1991. **125**(6): p. 707-8.
101. Nielsen, J., et al., *A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 1262-70.
102. Christiansen, J., et al., *IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes*. *J Mol Endocrinol*, 2009. **43**(5): p. 187-95.

103. Nielsen, F.C., J. Nielsen, and J. Christiansen, *A family of IGF-II mRNA binding proteins (IMP) involved in RNA trafficking*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2001. **234**: p. 93-9.
104. Ikenberg, K., et al., *Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3 (IMP3) is overexpressed in prostate cancer and correlates with higher Gleason scores*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 341.
105. Ogawa, O., et al., *Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 749-51.
106. Ekstrom, T.J., *Parental imprinting and the IGF2 gene*. Horm Res, 1994. **42**(4-5): p. 176-81.
107. Nordin, M., et al., *Epigenetic regulation of the Igf2/H19 gene cluster*. Cell Prolif, 2014. **47**(3): p. 189-99.
108. Hark, A.T., et al., *CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 486-9.
109. Yang, Y., et al., *Epigenetic regulation of Igf2/H19 imprinting at CTCF insulator binding sites*. J Cell Biochem, 2003. **90**(5): p. 1038-55.
110. Paradowska, A., et al., *Aberrant epigenetic modifications in the CTCF binding domain of the IGF2/H19 gene in prostate cancer compared with benign prostate hyperplasia*. Int J Oncol, 2009. **35**(1): p. 87-96.
111. van Dijk, M.A., et al., *Initial characterization of the four promoters of the human insulin-like growth factor II gene*. Mol Cell Endocrinol, 1991. **81**(1-3): p. 81-94.
112. Hartmann, W., et al., *Promoter-specific transcription of the IGF2 gene: a novel rapid, non-radioactive and highly sensitive protocol for mRNA analysis*. Virchows Arch, 2001. **439**(6): p. 803-7.
113. Lu, L., et al., *Promoter-specific transcription of insulin-like growth factor-II in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(3): p. 990-5.
114. Li, X., et al., *Developmental-dependent DNA methylation of the IGF2 and H19 promoters is correlated to the promoter activities in human liver development*. Int J Dev Biol, 1998. **42**(5): p. 687-93.
115. Li, X., et al., *Expression levels of the insulin-like growth factor-II gene (IGF2) in the human liver: developmental relationships of the four promoters*. J Endocrinol, 1996. **149**(1): p. 117-24.
116. Massoner, P., et al., *Expression of the IGF axis is decreased in local prostate cancer but enhanced after benign prostate epithelial differentiation and TGF-beta treatment*. Am J Pathol, 2011. **179**(6): p. 2905-19.
117. Holthuizen, P., et al., *Transcriptional regulation of the major promoters of the human IGF-II gene*. Mol Reprod Dev, 1993. **35**(4): p. 391-3.
118. Wu, H.K., et al., *Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **233**(1): p. 221-6.
119. Yu, H. and T. Rohan, *Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1472-89.
120. Toretsky, J.A. and L.J. Helman, *Involvement of IGF-II in human cancer*. J Endocrinol, 1996. **149**(3): p. 367-72.
121. Shiraishi, T., et al., *Expression of insulin-like growth factor 2 mRNA in human gastric cancer*. Int J Oncol, 1998. **13**(3): p. 519-23.
122. Li, S.L., et al., *Expression of insulin-like growth factor (IGF)-II in human prostate, breast, bladder, and paraganglioma tumors*. Cell Tissue Res, 1998. **291**(3): p. 469-79.
123. Tennant, M.K., et al., *Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA*

- is increased in human prostate carcinoma compared to benign prostate epithelium.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(10): p. 3774-82.
124. Renehan, A.G., et al., *Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer.* Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1344-50.
125. Lu, L., et al., *The relationship of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor binding protein-3, and estrogen receptor-alpha expression to disease progression in epithelial ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1208-14.
126. Regel, I., et al., *IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors.* Mol Cancer, 2012. **11**: p. 9.
127. Rikhof, B., et al., *'Big'-insulin-like growth factor-II signaling is an autocrine survival pathway in gastrointestinal stromal tumors.* Am J Pathol, 2012. **181**(1): p. 303-12.
128. Gao, Y., et al., *Serum IGF1, IGF2 and IGFBP3 and risk of advanced colorectal adenoma.* Int J Cancer, 2012. **131**(2): p. E105-13.
129. Rowlands, M.A., et al., *Serum insulin-like growth factors and mortality in localised and advanced clinically detected prostate cancer.* Cancer Causes Control, 2012. **23**(2): p. 347-54.
130. Furstenberger, G. and H.J. Senn, *Insulin-like growth factors and cancer.* Lancet Oncol, 2002. **3**(5): p. 298-302.
131. Pollak, M., *The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(3): p. 159-69.
132. Pandini, G., et al., *Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved.* J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39684-95.
133. Devi, G.R., et al., *Altered ligand binding by insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors bearing missense mutations in human cancers.* Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4314-9.
134. Lemamy, G.J., et al., *Is the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor coded by a breast cancer suppressor gene?* Adv Exp Med Biol, 2008. **617**: p. 305-10.
135. Harris, L.K., et al., *IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor.* Biol Reprod, 2011. **84**(3): p. 440-6.
136. Wang, Z.Q., et al., *Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 464-7.
137. Trojan, L., et al., *IGF-II serum levels increase discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and improve the predictive value of PSA in clinical staging.* Eur Urol, 2006. **49**(2): p. 286-92; discussion 292.
138. Cao, Y., et al., *Insulin-like growth factor pathway genetic polymorphisms, circulating IGF1 and IGFBP3, and prostate cancer survival.* J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(6): p. dju085.
139. Belharazem, D., et al., *Relaxed imprinting of IGF2 in peripheral blood cells of patients with a history of prostate cancer.* Endocr Connect, 2012. **1**(2): p. 87-94.
140. Hoyo, C., et al., *IGF2R genetic variants, circulating IGF2 concentrations and colon cancer risk in African Americans and Whites.* Dis Markers, 2012. **32**(2): p. 133-41.
141. Lubik, A.A., et al., *IGF2 increases de novo steroidogenesis in prostate cancer cells.* Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(2): p. 173-86.

142. Lubik, A.A., et al., *Insulin increases de novo steroidogenesis in prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2011. **71**(17): p. 5754-64.
143. Vidal, S.J., et al., *A targetable GATA2-IGF2 axis confers aggressiveness in lethal prostate cancer*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(2): p. 223-39.
144. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
145. Llave, C., et al., *Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants*. *Plant Cell*, 2002. **14**(7): p. 1605-19.
146. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
147. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
148. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. *RNA*, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
149. Baer, C., R. Claus, and C. Plass, *Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 473-7.
150. Morozova, N., et al., *Kinetic signatures of microRNA modes of action*. *RNA*, 2012. **18**(9): p. 1635-55.
151. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
152. Bhatt, K., M. Kato, and R. Natarajan, *Emerging Roles of microRNAs in the Pathophysiology of Renal Diseases*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015: p. ajrenal 00387 2015.
153. Latronico, M.V., D. Catalucci, and G. Condorelli, *Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology*. *Circ Res*, 2007. **101**(12): p. 1225-36.
154. Catalucci, D., P. Gallo, and G. Condorelli, *MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009. **2**(4): p. 402-8.
155. van Rooij, E. and E.N. Olson, *MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(9): p. 2369-76.
156. Satoh, J., *Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains*. *Exp Neurol*, 2012. **235**(2): p. 436-46.
157. Junker, A., R. Hohnfeld, and E. Meinl, *The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis*. *Nat Rev Neurol*, 2011. **7**(1): p. 56-9.
158. Mencia, A., et al., *Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss*. *Nat Genet*, 2009. **41**(5): p. 609-13.
159. de Pontual, L., et al., *Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 1026-30.
160. Mizuguchi, Y., et al., *Dysregulated microRNAs in progression of hepatocellular carcinoma: A systematic review*. *Hepatol Res*, 2015.
161. Wang, J., et al., *The Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Breast Cancer*. *Drug Dev Res*, 2015. **76**(7): p. 368-74.
162. Gonzalez-Quintana, V., et al., *MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review)*. *Oncol Rep*, 2015.
163. Amirkhah, R., et al., *The role of microRNAs in the resistance to colorectal cancer treatments*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015. **61**(6): p. 17-23.

164. Luo, M., et al., *Upregulated H19 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating ID2 expression*. FEBS J, 2013. **280**(7): p. 1709-16.
165. Zhang, X. and J. Wu, *Prognostic role of microRNA-145 in prostate cancer: A systems review and meta-analysis*. Prostate Int, 2015. **3**(3): p. 71-4.
166. Jackson, B.L., A. Grabowska, and H.L. Ratan, *MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 930.
167. Khanmi, K., S. Ignacimuthu, and M.G. Paulraj, *MicroRNA in prostate cancer*. Clin Chim Acta, 2015. **451**(Pt B): p. 154-60.
168. Tomaru, Y. and Y. Hayashizaki, *Cancer research with non-coding RNA*. Cancer Sci, 2006. **97**(12): p. 1285-90.
169. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
170. Stahlhut Espinosa, C.E. and F.J. Slack, *The role of microRNAs in cancer*. Yale J Biol Med, 2006. **79**(3-4): p. 131-40.
171. Cai, X. and B.R. Cullen, *The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor*. RNA, 2007. **13**(3): p. 313-6.
172. Bartolomei, M.S., S. Zemel, and S.M. Tilghman, *Parental imprinting of the mouse H19 gene*. Nature, 1991. **351**(6322): p. 153-5.
173. Wrana, J.L., *H19, a tumour suppressing RNA?* Bioessays, 1994. **16**(2): p. 89-90.
174. Keniry, A., et al., *The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(7): p. 659-65.
175. Tsang, W.P., et al., *Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(3): p. 350-8.
176. Vennin, C., et al., *H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b*. Oncotarget, 2015. **6**(30): p. 29209-23.
177. Liu, C., et al., *H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation*. Tumour Biol, 2015.
178. He, D., et al., *Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 73.
179. Zhu, M., et al., *lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI*. FEBS J, 2014. **281**(16): p. 3766-75.
180. Filippova, G.N., et al., *An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 2802-13.
181. Feinauer, C.J., et al., *Zinc finger proteins and the 3D organization of chromosomes*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2013. **90**: p. 67-117.
182. Phillips, J.E. and V.G. Corces, *CTCF: master weaver of the genome*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1194-211.
183. Xu, N., et al., *Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctcf protein*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1390-6.
184. Bell, A.C. and G. Felsenfeld, *Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 482-5.
185. Xie, X., et al., *Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7145-50.

186. Kim, T.H., et al., *Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1231-45.
187. Cavenee, W.K., et al., *Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma*. Nature, 1983. **305**(5937): p. 779-84.
188. Gallie, B.L. and R.A. Phillips, *Retinoblastoma: a model of oncogenesis*. Ophthalmology, 1984. **91**(6): p. 666-72.
189. Chellappan, S.P., et al., *The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein*. Cell, 1991. **65**(6): p. 1053-61.
190. Weintraub, S.J., C.A. Prater, and D.C. Dean, *Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element*. Nature, 1992. **358**(6383): p. 259-61.
191. Brooks, J.D., G.S. Bova, and W.B. Isaacs, *Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas*. Prostate, 1995. **26**(1): p. 35-9.
192. Ittmann, M.M. and R. Wieczorek, *Alterations of the retinoblastoma gene in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas*. Hum Pathol, 1996. **27**(1): p. 28-34.
193. Tricoli, J.V., et al., *Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1996. **15**(2): p. 108-14.
194. Sharma, A., et al., *The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4478-92.
195. Aparicio, A., R.B. Den, and K.E. Knudsen, *Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2011. **8**(10): p. 562-8.
196. Thangavel, C., et al., *The retinoblastoma tumor suppressor modulates DNA repair and radioresponsiveness*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(21): p. 5468-82.
197. Hernandez, J.M., et al., *miR-675 mediates downregulation of Twist1 and Rb in AFP-secreting hepatocellular carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2013. **20** Suppl 3: p. S625-35.
198. Davies, S.M., *Maintenance of genomic imprinting at the IGF2 locus in hepatoblastoma*. Cancer Res, 1993. **53**(20): p. 4781-3.
199. Schneeberger, C., et al., *Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(4): p. 234-8.
200. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
201. Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer, *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. Anal Biochem, 1997. **245**(2): p. 154-60.
202. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(20): p. e179.
203. Peterson, G., *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall*. Anal Biochem., 1979.
204. Blum, W.F., M.B. Ranke, and J.R. Bierich, *A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I*. Acta Endocrinol (Copenh), 1988. **118**(3): p. 374-80.
205. Hayatsu, H., *Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1976(16:75-124).

206. Wang, R.Y., C.W. Gehrke, and M. Ehrlich, *Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues*. *Nucleic Acids Res*, 1980. **8**(20): p. 4777-90.
207. Darst, R.P., et al., *Bisulfite sequencing of DNA*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2010. **Chapter 7**: p. Unit 7 9 1-17.
208. Grunau, C., S.J. Clark, and A. Rosenthal, *Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(13): p. E65-5.
209. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
210. Nyren, P., B. Pettersson, and M. Uhlen, *Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay*. *Anal Biochem*, 1993. **208**(1): p. 171-5.
211. Ronaghi, M., et al., *Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing*. *Anal Biochem*, 1999. **267**(1): p. 65-71.
212. Uhlmann, K., et al., *Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(24): p. 4072-9.
213. Kuffer, S., et al., *Insulin-like growth factor 2 expression in prostate cancer is regulated by promoter-specific methylation*. *Mol Oncol*, 2018. **12**(2): p. 256-266.
214. Livingstone, C., *IGF2 and cancer*. *Endocrine-related cancer*, 2013. **20**(6): p. R321-39.
215. Ribarska, T., et al., *Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer*. *Epigenetics*, 2014. **9**(5): p. 704-17.
216. Murata, A., et al., *IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(4): p. 1166-74.
217. Damaschke, N.A., et al., *Epigenetic susceptibility factors for prostate cancer with aging*. *Prostate*, 2013. **73**(16): p. 1721-30.
218. Mamrut, S., et al., *DNA methylation of specific CpG sites in the promoter region regulates the transcription of the mouse oxytocin receptor*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56869.
219. Zhang, Y., et al., *CRISPR Cas9-guided chromatin immunoprecipitation identifies miR483 as an epigenetic modulator of IGF2 imprinting in tumors*. *Oncotarget*, 2017. **8**(21): p. 34177-34190.
220. Daniunaite, K., et al., *Prognostic value of RASSF1 promoter methylation in prostate cancer*. *J Urol*, 2014. **192**(6): p. 1849-55.
221. Wang, L., et al., *Aberrant promoter methylation of the cadherin 13 gene in serum and its relationship with clinicopathological features of prostate cancer*. *J Int Med Res*, 2014. **42**(5): p. 1085-92.
222. Maldonado, L., et al., *GSTP1 promoter methylation is associated with recurrence in early stage prostate cancer*. *J Urol*, 2014. **192**(5): p. 1542-8.
223. Belharazem, D., et al., *Carcinoma of the colon and rectum with deregulation of insulin-like growth factor 2 signaling: clinical and molecular implications*. *Journal of gastroenterology*, 2016.
224. Murphy, S.K., et al., *Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer*. *Mol Cancer Res*, 2006. **4**(4): p. 283-92.

225. Tada, Y., et al., *The stem cell transcription factor ZFP57 induces IGF2 expression to promote anchorage-independent growth in cancer cells.* *Oncogene*, 2015. **34**(6): p. 752-60.
226. Han, Z., et al., *Inhibition of STAT3 signaling targets both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate cancer.* *Oncotarget*, 2014. **5**(18): p. 8416-28.
227. Bishop, J.L., D. Thaper, and A. Zoubeidi, *The Multifaceted Roles of STAT3 Signaling in the Progression of Prostate Cancer.* *Cancers (Basel)*, 2014. **6**(2): p. 829-59.
228. Lee, S.C., et al., *Essential role of insulin-like growth factor 2 in resistance to histone deacetylase inhibitors.* *Oncogene*, 2016. **35**(42): p. 5515-5526.
229. Cheema, Z., et al., *Expression of the cancer-testis antigen BORIS correlates with prostate cancer.* *Prostate*, 2014. **74**(2): p. 164-76.
230. Marshall, A.D., C.G. Bailey, and J.E. Rasko, *CTCF and BORIS in genome regulation and cancer.* *Curr Opin Genet Dev*, 2014. **24**: p. 8-15.
231. Zheng, Y., et al., *MicroRNA-675 promotes glioma cell proliferation and motility by negatively regulating retinoblastoma 1.* *Hum Pathol*, 2017. **69**: p. 63-71.
232. Taylor, B.S., et al., *Integrative genomic profiling of human prostate cancer.* *Cancer Cell*, 2010. **18**(1): p. 11-22.
233. Fu, V.X., et al., *A loss of insulin-like growth factor-2 imprinting is modulated by CCCTC-binding factor down-regulation at senescence in human epithelial cells.* *J Biol Chem*, 2004. **279**(50): p. 52218-26.
234. Damaschke, N.A., et al., *Loss of Igf2 Gene Imprinting in Murine Prostate Promotes Widespread Neoplastic Growth.* *Cancer Res*, 2017. **77**(19): p. 5236-5247.
235. Zhao, X., et al., *Loss of insulin-like growth factor II imprinting is a hallmark associated with enhanced chemo/radiotherapy resistance in cancer stem cells.* *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 51349-51364.
236. May, M., et al., *Prognostic impact of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens.* *BJU Int*, 2007. **99**(3): p. 539-44.
237. Hubertus, J., et al., *Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors.* *Oncol Rep*, 2011. **25**(3): p. 817-23.
238. Mori, M., et al., *Relaxation of insulin-like growth factor 2 gene imprinting in esophageal cancer.* *Int J Cancer*, 1996. **68**(4): p. 441-6.
239. Wang, H., et al., *Restoration of IGF2 imprinting by polycomb repressive complex 2 docking factor SUZ12 in colon cancer cells.* *Exp Cell Res*, 2015. **338**(2): p. 214-21.
240. Liu, Q., et al., *Vigilin interacts with CCCTC-binding factor (CTCF) and is involved in CTCF-dependent regulation of the imprinted genes Igf2 and H19.* *FEBS J*, 2014. **281**(12): p. 2713-25.
241. Skiles, W.M., et al., *Oxygen-induced alterations in the expression of chromatin modifying enzymes and the transcriptional regulation of imprinted genes.* *Gene Expr Patterns*, 2018. **28**: p. 1-11.
242. Cho, K.H., et al., *A ROS/STAT3/HIF-1alpha signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion.* *Prostate*, 2014. **74**(5): p. 528-36.
243. Khandrika, L., et al., *Oxidative stress in prostate cancer.* *Cancer Lett*, 2009. **282**(2): p. 125-36.
244. Rogers, M.A., et al., *IGF2 knockdown in two colorectal cancer cell lines decreases survival, adhesion and modulates survival-associated genes.* *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 12485-12495.

245. Unger, C., et al., *Stromal-derived IGF2 promotes colon cancer progression via paracrine and autocrine mechanisms*. *Oncogene*, 2017. **36**(38): p. 5341-5355.
246. Vigneri, P.G., et al., *The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 230.
247. Yang, B., et al., *A novel pathway links oxidative stress to loss of insulin growth factor-2 (IGF2) imprinting through NF-kappaB activation*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e88052.
248. Rowlands, M.A., et al., *Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in active monitoring of localized prostate cancer: a population-based observational study*. *Cancer Causes Control*, 2013. **24**(1): p. 39-45.
249. Zu, K., et al., *Protein expression of PTEN, insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR), and lethal prostate cancer: a prospective study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(11): p. 1984-93.
250. Zanella, E.R., et al., *IGF2 is an actionable target that identifies a distinct subpopulation of colorectal cancer patients with marginal response to anti-EGFR therapies*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(272): p. 272ra12.
251. Li, R., A. Pourpak, and S.W. Morris, *Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach*. *J Med Chem*, 2009. **52**(16): p. 4981-5004.
252. Di Cosimo, S., et al., *Combination of the mTOR inhibitor ridaforolimus and the anti-IGF1R monoclonal antibody dalotuzumab: preclinical characterization and phase I clinical trial*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(1): p. 49-59.
253. Dasari, A., et al., *Phase I study of the anti-IGF1R antibody cixutumumab with everolimus and octreotide in advanced well-differentiated neuroendocrine tumors*. *Endocr Relat Cancer*, 2015. **22**(3): p. 431-41.
254. von Mehren, M., et al., *A phase 1, open-label, dose-escalation study of BIIB022 (anti-IGF-1R monoclonal antibody) in subjects with relapsed or refractory solid tumors*. *Invest New Drugs*, 2014. **32**(3): p. 518-25.
255. Nie, Z.L., et al., *Gene therapy for colorectal cancer by an oncolytic adenovirus that targets loss of the insulin-like growth factor 2 imprinting system*. *Mol Cancer*, 2012. **11**: p. 86.
256. Pan, Y., et al., *Gene therapy for colorectal cancer by adenovirus-mediated siRNA targeting CD147 based on loss of the IGF2 imprinting system*. *Int J Oncol*, 2015. **47**(5): p. 1881-9.
257. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science*, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
258. Cyranoski, D., *CRISPR gene-editing tested in a person for the first time*. *Nature*, 2016. **539**(7630): p. 479.
259. Babak, T., *Identification of imprinted loci by transcriptome sequencing*. *Methods Mol Biol*, 2012. **925**: p. 79-88.

7 ANHANG

AMINOSÄURENSEQUENZEN VON IGF2

ISOFORM I

UniProtKB/Swiss-Prot: P01344.1

MGIPMGKSMLVLLTFLAFASCCIAAYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVE
ECCFRSCDLALLETYCATPAKSERDVSTPPTVLPDNFPRYPVGKFFQYDTWKQSTQRLRRGLPALLR
ARRGHVLAKELEAFREAKRHRPLIALPTQDPAHGGAPPEMASNRK

ISOFORM II

NCBI Reference Sequence: NP_001121070.1

MVSPDPQIIIVAPETELASMVQRTEDGVTIIQIFWVGRKGELLRRTPVSSAMQTPMGIPMGKSMLVL
LTFLAFASCCIAAYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALL
ETYCATPAKSERDVSTPPTVLPDNFPRYPVGKFFQYDTWKQSTQRLRRGLPALLRARRGHVLAKELE
AFREAKRHRPLIALPTQDPAHGGAPPEMASNRK

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Gutting, Tobias

Geburtsdatum: 20.02.1982

Geburtsort: Bad Dürkheim

Familienstand: verheiratet

Vater: Gutting, Peter

Mutter: Gutting, Elvira

SCHULISCHER WERDEGANG

1988-1992 Grundschule Deidesheim

1992-2001 Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium Neustadt a.d. Weinstraße

08.06.2001 Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2006/2007 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen

04.09.2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,0

16.05.2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,66

BERUFLICHER WERDEGANG

02/2002-11/2004 Ausbildung zum Rettungsassistenten

Seit 08/2013 Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik der
Universitätsmedizin Mannheim

PUBLIKATIONEN

Stefan Küffer*, Tobias Gutting*, Djeda Belharazem, Christian Sauer, Maurice S. Michel, Alexander Marx, Lutz Trojan, Philipp Ströbel. *Insulin-like growth factor 2 expression in prostate cancer is regulated by promoter-specific methylation. Molecular Oncology*, 4. Januar 2018. Doi: 10.1002/1878-0261.12164.

*: Geteilte Erstautorenschaft. [213]

9 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Alexander Marx danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Professor Dr. Philipp Ströbel und Herrn Stefan Küffer vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen, ohne die diese Arbeit und die daraus hervorgegangene Publikation nicht zustande gekommen wären. Die beiden standen mir auch über die räumliche Distanz hinweg stets mit Rat und Tat zur Seite und waren federführend an Konzeption und Durchführung beteiligt.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Christian Sauer, Frau Dr. Djeda Belharazem, Frau Dr. Katja Simon-Keller, Frau Dr. Katharina Mößinger, Frau Monique Becker und Frau Sabine Wolf aus den pathologischen Instituten Mannheim und Göttingen für die Zeit, die sie damit verbracht haben, mir das Arbeiten im Labor beizubringen und mit mir Proben zu suchen und aufzuarbeiten.

Ein großer Dank gilt auch den Kollegen Herrn Professor Dr. Lutz Trojan aus Göttingen, der zu seiner Zeit in Mannheim mit Herrn Professor Dr. Maurice S. Michel die Sammlung von Prostatagewebe, die für die abgegebene Arbeit analysiert wurde, initiiert hatte, sowie Herrn Professor Dr. Maurice S. Michel aus der Klinik für Urologie der Universitätsmedizin Mannheim selbst.

Ebenso danke ich Frau Dr. Elisabeth Gutting für die Durchsicht meiner Arbeit und die Unterstützung, die zur Vollendung derselben notwendig waren.