Aus der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Albers

Amplifikation und Expression von Genen im Chromosomenabschnitt 6p22.3 im Harnblasenkarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Qiong Wu

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

gez.: Univ.- Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Gattermann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitug **1**
1.1 Das Harnblasenkarzinom 1
1.2 Molekulare Veränderungen in Harnblasenkarzinomen 7
1.3 Amplifikationsbereich auf Chromosom 6p22.3 10
1.3.1 Genamplifikation 10
1.3.2 Amplifikationen des Chromosomen-Abschnitts 6p22 11
1.3.3 Der *ID4*-Locus 13
1.4 Ziel der Arbeit 15

2 Material und Methode **16**
2.1 Zellinien 16
2.2 Gewebeproben 16
2.3 Chemikalien und Molekularbiologische Kits 18
2.4 Enzyme 19
2.5 Lösung und Puffer 19
2.5.1 Lösungen PCR und RT-PCR 19
2.5.2 Lösungen Western Blot 20
2.6 Oligonukleotidprimer 22
2.7 Antikörper 24
2.8 Geräte und Zubehör 24
2.9 Software und Datenbank 24
2.9.1 Software 24
2.9.2 Datenbanken 25
2.10 RNA-Isolierung 25
2.10.1 RNA-Isolierung aus Kulturzellen 25
2.10.2 RNA-Isolierung aus EDTA-Blut 25
2.11 DNA-Isolierung 25
2.12 Quantitätskontrolle von Nukleinsäuren 25
2.13 RT-PCR 26
2.13.1 Reverse Transkription 26
2.13.2 Polymerase-Kettenreaktion 26
2.13.3 DNA-Agarosegelelektrophorese 28
2.14 Real-time-PCR (Light Cycler) 28
2.15 Mikrosatelliten-Analyse 31
2.16 Proteinanalyse 33
2.16.1 Herstellung der Proteinlysate 33
2.16.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 33
2.16.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 33
2.16.4 Western-Blot 34
2.16.5 Immundetektion 34

3 Ergebnisse **35**
3.1 Expressionanalyse von Genen im Chromosomenabschnitt 6p22 auf mRNA-Ebene 35
3.1.1 Untersuchung durch Standard-RT-PCR 35
3.1.2 Untersuchung durch Real-time-RT-PCR 36
3.2 Genamplifikationsanalyse auf DNA-Ebene 48
3.2.1 Untersuchung von Mikrosatelliten mittels PCR 48

3.2.2 Verhältnis von Genkopienzahl und Genexpression 53
3.2.3 Korrelationen der 6p22 Mikrosatelliten Kopienzahl und mRNA-Expression benachbarter Gene 55
3.3 Analyse von ID4 auf Proteinebene 58

4 Diskussion **59**
4.1 *ID4, E2F3 und DEK* mRNA Expression in Harnblasenkarzinom-Zellinien 60
4.1.1 *ID4, E2F3 und DEK* mRNA Expression in Harnblasenkarzinom Zellinien 60
4.1.2 *ID4, E2F3 und DEK* mRNA Expression in Harnblasenkarzinom Gewebeproben 61
4.1.3 *DEK* und *ID4* mRNA Expression in verschiedenen Stadien der Tumoren 62
4.2 Genamplifikationen im Bereich 6p22.3 63
4.3 Gen-Amplifikationen und Onkogen-Identifizierung im Bereich 6p22.3 65
4.4 Tumorbiologische Bedeutung von Genen in Chromosom 6p22.3 67

5 Literatur **70**
6 Abkürzungen **81**
Danksagung **82**
Zusammenfassung **83**
Lebenslauf **84**

1. Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist der zweithäufigste urologische Tumor nach dem Prostatakarzinom und stellt 3% aller malignen Tumoren [Leitlinen der deutsche Krebsgesellschaft, 2008]. Insgesamt 28,750 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich an Harnblasenkarzinomen. Männer sind knapp dreimal so häufig betroffen wie Frauen. Die Inzidenz wird für Männer mit 41.7 neuen Fällen pro Jahr pro 100,000 Einwohner und für Frauen mit 10.3 neuen Fällen pro Jahr pro 100,000 Einwohner angegeben [Batzler et al., 2008].

Die Häufigkeit des Tumors nimmt mit dem Anstieg des Lebensalters zu; das mittlere Erkrankungsalter für Männer liegt bei 71 Jahren, für Frauen bei 74 Jahren [Batzler et al., 2008]. Die Inzidenz ist in industrialisierten häufiger als in ländlichen Regionen [Hautmann et al., 2006].

Ätiologie

Für die Entstehung von Blasenkarzinomen wird ein multifaktorieller, mehrstufiger Prozess angenommen; dabei sind als potenzielle Karzinogene verschiedene chemische Substanzen und proliferationsstimulierende Kokarzinogene identifiziert worden. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden aromatische Amine als Karzinogene bei dieser Tumorart identifiziert. Heute gilt als Hauptursache für die Entstehung von Blasenkarzinom das Rauchen. Zigarettenrauch enthält über 40 kanzerogene Substanzen, auch hier scheinen aromatische Amine wie β-Naphthylamin eine entscheidende Rolle zu spielen. Das Risiko, ein Urothelkarzinom zu entwickeln, ist bei Rauchern zweimal bis dreimal so groß wie bei Nichtrauchern [Pitard et al., 2001]. Eine positive Korrelation wurde sowohl mit der Zigarettenanzahl als auch mit Raucherjahren gezeigt.

Weiterhin wurden verschiedene Chemikalien, die in der industriellen Produktion oder im Handwerk vorkommen, als Kanzerogene identifiziert, neben β-Naphthylamin andere aromatische Amine wie Benzidin und Dichlorobenzidin, sowie die Medikamente Phenacetin und Cyclophosphamid [Otto et al., 1993]. Insbesondere für Naphtylamin wurde eine Erhöhung des Erkrankungsrisiko um das Siebenfache gezeigt [Sliverman et al., 2006]. Bei Arbeitern aus der Farbstoff-, Textil- und Lederindustrie, sowie Anwendern von Azofarben findet sich ein erhöhtes Risiko, am Harnblasenkarzinom zu erkranken. Die

Blasentumorerkrankung wird bei Exposition gegenüber aromatischen Aminen in entsprechenden Betrieben als Berufskrankheit nach Nr. 1301 der Berufskrankheitenverordnung anerkannt.

Eine chronische Harnweginfektion des Urothels kann zu einer erhöhten Inzidenz führen. Insbesondere bei jahrelanger Dauerkatheterbehandlung kann es zur Bildung von Plattenepithelkarzinomen kommen. Blasensteine, Nephropathien, Bilharziose sind gleichfalls Risikofaktoren der Bildung von Harnblasenkarzinomen [Erbar, 2000]. Die Bedeutung von Infektionen mit Humanpapillomviren bei der Entstehung von Urothelkarzinomen wird dagegen als minimal eingeschätzt [Chetsanga et al., 1992].

Eine Rolle spielt auch der Missbrauch von Analgetika, z.B. Phenacetin, deren Metabolite als Hauptursache von Harnblasenkrebs bei Frauen unter 50 Jahren angesehen werden [Piper et al., 1985]. Auch das Cyclophosphamid, ein Chemotherapeutikum, welches über einen längeren Zeitraum angewandt, eine chemische Zystitis auslöst, erhöht das Blasentumorrisiko.

Exogenen Noxen bei der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms genetische und epigenetische Veränderungen, z.B. kann der Zigarettenkonsum *p53* Mutationen auslösen, die mit hohem Grading im Urothelkarzinom einhergehen [Wallerand et al., 2005].

Pathogenese und Histologie

Bei der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms sind multiple Veränderungen involviert, wobei auch epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. In der Mehrzahl der Harnblasenkarzinome (>90%) handelt es sich um ein Karzinom, das morphologisch ersichtlich aus dem Übergangsepithel der ableitenden Harnwege, dem Urothel, hervorgeht. In ca. 5-6% der Harnblasenkarzinome finden sich Plattenepithelkarzinome. Daneben sind ca. 1-2% der Fälle Adenokarzinome [Wetterauer et al., 1995]. Die neue WHO Klassifikation verwendet die Bezeichnung Urothelkarzinome (englisch: urothelial cell carcinoma, UCC) für die zuvor als Transitionalzellkarzinome (englisch: transitional cell carcinoma, TCC) bezeichneten Tumore. Für die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben wurde noch die UICC Klassifikation von 1997 verwendet, die in der Klassifikation von 2002 etwas verfeinert wurde.

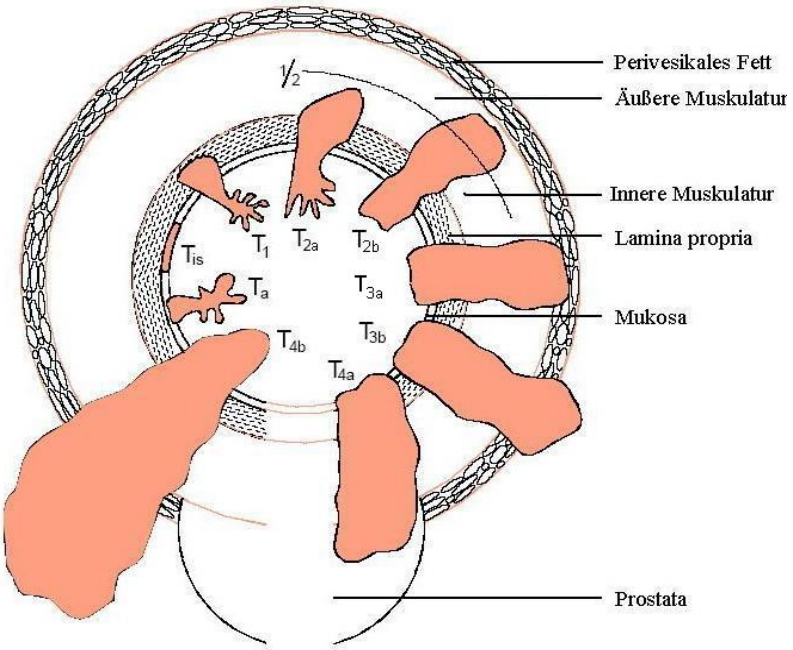


Abbildung 1-1: Tumorausdehnung und Stadieneinteilung beim Harnblasenkarzinom [Wetterauer et al., 1995].

Tabelle 1-1: TNM-Klassifikation nach UICC (2002)

T- Primärtumor

Ta	Nichtinvasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ (CIS): flacher Tumor
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T1a	Infiltration des subepithelialen Bindegewebes
T1b	Infiltration der Lamina muscularis mucosae
T1c	Infiltration über die Lamina muscularis mucosae hinaus
T2	Tumor infiltriert Muskulatur propria
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert über die Muskulatur hinaus
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Tumor infiltriert andere Organe
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Beckenwand oder Abdominalwand

N-Regionäre Lymphknoten(LK)

Nx	Regionäre LK können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre LK
N1	Solitäre Lymphknotenmetastase $\leq$2cm
N2	Einzelne oder multiple Lymphknotenmetastase bis 5 cm
N3	Lymphknotenmetastase größer als 5 cm

M-Fernmetastasen

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die Stadieneinteilung der Blasentumoren wird gemäß den Richtlinien der Union International Contre le Cancer (UICC) vorgenommen. Die vorliegende Version von 2002 bezieht sich sowohl auf die klinische Einteilung (TNM) als auch auf die postoperative pathologische Einteilung (pTNM). Das T-Stadium beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors und die Infiltrationstiefe. Von besonderer Bedeutung für die Therapieentscheidung ist die Unterscheidung in oberflächliche (Tis, Ta, T1) und invasiv wachsende Tumoren (T2, T3), die die Blasenmuskulatur infiltrieren [Jocham et al., 2003] (siehe. Abb.1-1, Tab.1-1).

Eine zusätzliche histopathologische Beurteilung der Zell-und Gewebedifferenzierung erfolgt gemäß der WHO-Klassifikation. Sie wurde in vier unterschiedlichen Malignitätsgraden angegeben, von G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert), bis G4 (undifferenziert) [Sökeland et al., 2002] und ist in der neuen Klassifikation nur für pTa Tumore modifiziert worden. Dort werden nur noch zwei Differenzierungsgrade unterschieden.

Das Harnblasenkarzinom tritt in zwei Formen auf, einem häufigen papillären Subtyp und einem selteneren invasiven Subtyp [Knowles, 2001] (Abb.1-2). 70% der Urothelkarzinome sind papilläre Tumore und meist gut differenziert. Die Transformation einer gesunden Zelle zu einer entarteten Zelle erfolgt über mehrere Schritte und über einen längeren Zeitraum [Knowles, 2006].

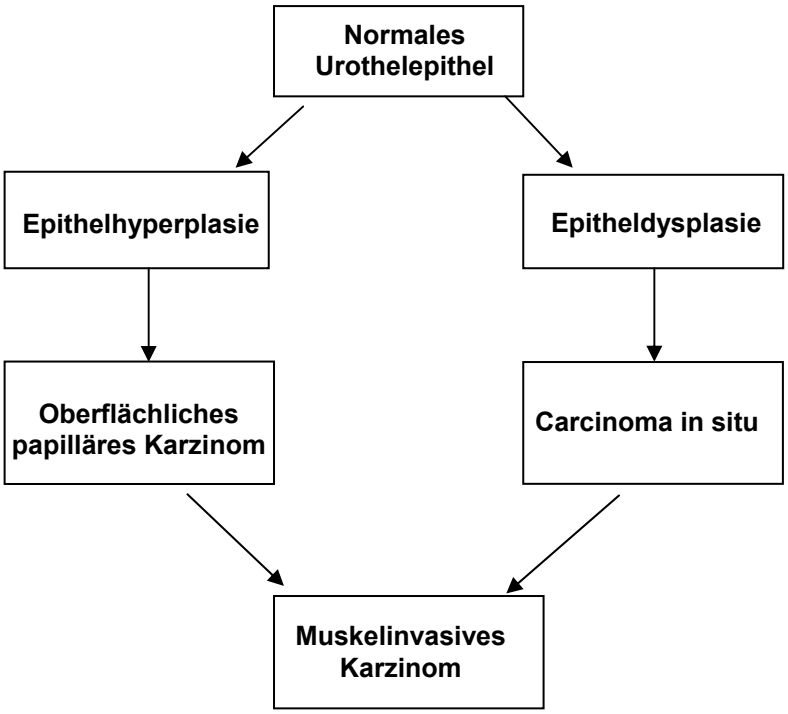


Abbildung 1-2: Transformationsstadien beim Harnblasenkarzinom [WHO , 2004].

In Abb.1-2 werden die beide Transformationswege für das Harnblasenkarzinom gezeigt [Knowles, 1999]. Papilläre Tumore entwickeln sich meist aus Hyperplasien und infiltrieren nicht die Basalmembran. Solche Tumoren werden als Ta-Tumor beschrieben und sind normalerweise nicht mit Carzinomata in situ (CIS) assoziiert [WHO, 2004]. Das invasive Harnblasenkarzinom wird meist in Patienten ohne vorherige papilläre Tumoren diagnostiziert. Es entwickelt sich meist aus Atypien und hoch dysplastischen Carzinomata in situ. Übergänge eines primär oberflächlichen papillären Karzinoms mit hohem Differenzierungsgrad in ein entdifferenziertes, aggressiv invasiv wachsendes Karzinom treten jedoch ebenfalls auf [Knowles, 2006]. Auch innerhalb eines Tumors werden Zellen unterschiedlicher Differenzierungsgrad gefunden, wobei für die Prognose immer der höchste Atypiegrad entscheidend ist [Wetterauer et al., 1995].

Symptomatik und Diagnostik

Das charakteristische Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist in ca. 80% der Fälle die schmerzlose Makrohämaturie bis hin zur Blasentamponade. Zu 30% sind Blasenkarzinome mit zystitischen Beschwerden, wie Dysurie, Pollakisurie und Urgesymptomatik, vergesellschaftet. Noch 20% der Diagnosen werden zufällig aufgrund einer Mikrohämaturie gestellt. Bei fortgeschrittenen Blasenkarzinomen können weitere Symptome wegen der lokalen Infiltration und Metastasierung auftreten, wie Flankenschmerzen, Restharnbildung, Obstipation, Diarrhoe und Knochenschmerzen [Merkle, 1997].

Die Anamnese, klinische Untersuchung, Urinuntersuchungen, Laboruntersuchungen und Sonographie dienen der Abklärung zur Diagnostik von Harnblasenkarzinomen. Die Diagnose wird definitiv durch Urethro-Zystoskopie und eventuell Blasenschleimhautbiopsie gestellt, um Tumorwachstum, Tumorzahl, Tumorlokalisation und histopathologische Klassifikationen zu dokumentieren. Innerhalb der Blase befinden sich die Tumoren bevorzugt an der Seiten- und Hinterwand sowie im Trigonumbereich. Tumoren am Blasendach und der Vorderwand treten relativ selten auf und können aufgrund ihrer Lokalisation bei der Endoskopie übersehen werden [Jocham et al., 2003].

Weitere technische Verfahren (CT, Knochenszintigraphie, Röntgen, etc) sind nur bei fortgeschrittenen Stadien im Rahmen des Metastasen-Screenings von Bedeutung [Campbell-Walsh, 2002].

Therapie und Prognose

Die Behandung von Harnblasenkarzinomen erfolgt stadienabhängig. Der erste Schnitt zur Diagnosesicherung ist die Transurethrale Elektroresektion (*TUR*). Nach vorläufiger Stadienbestimmung und Grading reichen die therapeutischen Alternativen von der Blasenteilresektion bis hin zur radikalen Zystoprostatovesikulektomie bei infiltrierenden, muskelinvasiven Tumoren. Je nach Tumorstadium kann zusätzlich eine systemische Chemotherapie angewendet werden [Wetterauer et al., 1995].

Die Prognose wird durch verschiedene klinische Parameter bestimmt und ist sehr variabel. Eine sehr gute Prognose, bezogen auf die 5-Jahres-Überlebensrate, zeigen die oberflächlichen und gut bis mäßig differenzierten Tumoren; sie liegt über 90% [Wetterauer et al, 1995]. Trotz einer kompletten transurethralen Resektion entwickeln oberflächliche Harnblasenkarzinome zu 60-80% Rezidive, wobei 80% im ersten Jahr nach der Resektion auftreten [Hautmann et al., 2006]. Daher wird inzwischen in vielen Institutionen eine Nachresektion innerhalb einer kurzen Frist nach der ersten Operation vorgenommen [Grimm et al., 2003]. Bei den schlecht differenzierten Tumoren liegt ein höheres (über 70%) Rezidivrisiko vor. Die 5-Jahres Überlebensrate bei den invasiven Tumoren nach erfolgter radikaler Zystektomie wird stadienabhängig zwischen 40% und 60% beschrieben [Wetterauer et al., 1995]. Wenn eine Absiedlung in Lymphknoten bereits eingetreten ist, bestehen nur noch geringe Aussichten auf Heilung [Batzler et al., 2008]. Aufgrund der hohen Rezidivrate ist eine engmaschige Nachkontrolle erforderlich.

Nachsorge

Wie oft Patienten mit Harnblasenkrebs nach der ersten Behandlung wieder zum Arzt müssen, hängt von der Ausbreitung des Tumors und der Art der Behandlung ab. Die Kontrollen umfassen Urin-(Mikroskopie/Zytologie) und Laborbestimmungen, Untersuchungen des harnableitenden Systems (Sonographie, Röntgen) und regelmäßig durchzuführende Zystoskopien (ggf. mit Biopsie). Die erweiterten Untersuchungen für Fernmetastasen schließen Röntgen-Thorax, CT und Ganzkörperszintigraphie ein [Wetterauer et al., 1995]. Mehrere biochemische und immunologische Testverfahren zum Tumornachweis im Urin sind in den letzten Jahren ergänzend eingeführt worden; jedoch reicht ihre Sensitivität und Spezifität noch nicht aus, um die Häufigkeit von Zystokopien zu vermindern [Black et al., 2006].

1.2 Molekulare Veränderungen in Harnblasenkarzinomen

Wie andere maligne Erkrankungen wird auch das Harnblasenkarzinom durch verschiedene molekulare Veränderungen ausgelöst. Einige Onkogene sind von größerer Bedeutung im Harnblasenkarzinom, z.B. *HRAS*, *MYC* und *CCND1* [Knowles, 2001]. *FGFR3* und *E2F3* werden inzwischen auch als Onkogene betrachtet, die durch Punkt-Mutationen und Amplifikationen aktiviert wurden [Schulz, 2006]. Drei wichtigste Tumorsuppressorgene *TP53*, *RB1* und *CDKN2A* sind in die Kontrolle des Zellzyklus involviert und spielen bei der Karzinogenese des Harnblasenkarzinoms eine wichtige Rolle [Schulz, 2006].

Die Art und Anzahl molekularer Veränderungen von Harnblasenkarzinomen hängen von Tumorstadium ab. Gut differenzierte pTa Tumoren enthalten oft eine begrenzte Anzahl von chromosomalen Veränderungen. In invasiven Karzinomen finden sich bereits in T1-Tumoren oft schon mehr als 10 chromosomale Veränderungen [Richter et al., 1997], deren Zahl in weiter fortgeschrittenen Stadien noch zunehmen kann [Knowles, 2006]. Tab.1-2 zeigt typische genetische Veränderungen während der Progression des Urothelkarzinoms.

Tumor Stage	Gen-Verlust	Gen-Zugewinn	Gen-Amplifikation
Ta	9p, 9q, 10q, 11p,Y	1q, 17, 20q	11q
T1	2q, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 17p, 18p, 18q, Y	1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 8q, 10p, 17q, 19p, 19q, 20p, 20q	1q22–24, 3p24–25, 6p22, 8p12, 8q22, 10p12–14, 10q22–23, 11q13, 12q12–21, 17q21, 20q13
T2-4	wie T1 + 15q	wie T1 + 7p, Xq	wie T1

Tabelle 1-2: CGH (Comparative genomic hybridization) Ergebnisse der genetischen Veränderungen während der Progression von Urothelkarzinomen [Knowles, 2006]

Verluste werden am häufigsten an Chromosom 9 gefunden; sowohl 9p als auch 9q sind involviert. Außerdem sind die Chromosomenarme 2q, 5q, 8p, 10q, 11p, 18q und Y auch häufig von Verlusten betroffen. Zugewinne wurden häufig an der Chromosomenarme 1q, 5p, 6p, 8q, 17q und 20q gezeigt [Knowles, 2006; Hovey et al., 1998]. Genamplifikation ist eine wichtige Veränderung in fortgeschrittenen Karzinomen. Zwei auf hoher Ebene amplifizierte Regionen sind 10q22-q23 (32.6%) and 17q21 (23.9%) [Hovey et al., 1998]. Ein Teil der Tumoren verfügt über Amplifikationen von Bereichen der Chromosomen 5p, 6p, 8q, 11q und 20q [Hurst et al., 2004] (Tab.1-2) (Abb.1-3). Es wird angenommen, dass Genamplifikationen in fortgeschrittenen Stadien mit der Progression vieler Tumoren assoziiert sind [Schwab, 1999]. Insgesamt sind die molekularen Veränderungen zwischen den pT1-Tumoren und pT2-

Tumoren nicht sehr unterschiedlich, die Anzahl steigt aber im allgemeinen mit dem Stadium an [Knowles, 2006].

Molekulare Veränderungen in papillären Tumoren

Der vollständige Verlust oder ein Teilverlust von Chromosom 9 sind die häufigsten Deletionen beim Blasenkarzinom in allen Malignitätsgraden und Stadien [Hartmann et al., 2002]. LOH von Chromosom 9q trat bei pTa-Tumoren ebenso wie bei CIS und Dysplasien auf [Chapman et al., 2005]. Außer 9q-Verlust wurden Mutationen des FGF Rezeptors 3 (*FGFR3*) in gut bis mäßiggradig differenzierten (G1-2) pTa-Tumoren identifiziert; bis zu 80% gut differenzierter pTa Tumoren verfügen über diese Mutation [Billerey et al., 2001]. Mutationen von *FGFR3* hat man auch im urothelialem Papillom gefunden [van Rhijn et al., 2002] (Abb.1-3). Die Mutationen aktivieren die Tyrosinkinase des Rezeptors. Offenbar alternativ dazu sind Mutationen von *HRAS* von Bedeutung, die Proliferation und Differenzierung des Urothels verändern [Jebar et al., 2005].

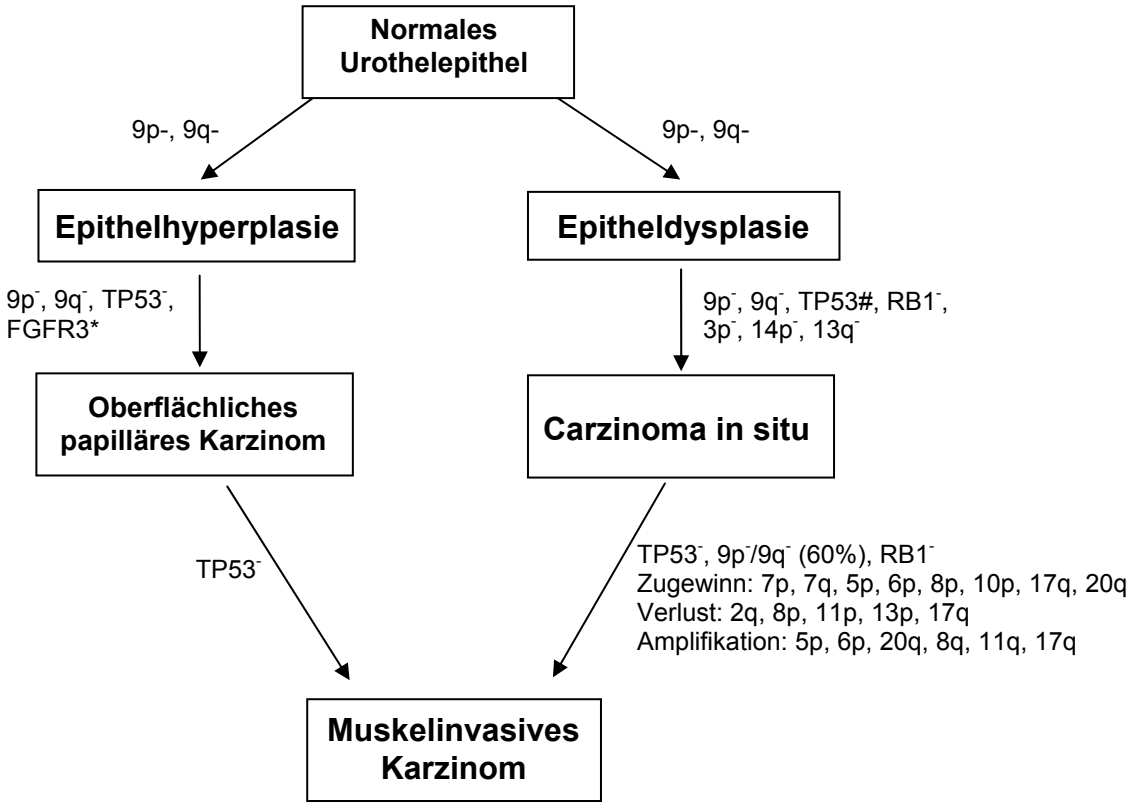


Abbildung 1-3: Genetische Veränderungen während der Progression in UCC. In invasiven Karzinomen finden sich mehr chromosomale Veränderungen als in papillären Karzinomen.
„-"= Gen-Verlust; „"= aktivierende Mutation; „#"= inaktivierende Mutation [Brandau et al., 2000] [Luis et al., 2007].*

Molekulare Veränderungen in invasiven Karzinomen

Zwei wichtige Tumorsuppressor-Gene *RB1* und *TP53,* spielen in invasiven Harnblasenkarzinomen eine zentrale Rolle [Knowles et al., 2006; Schulz et al., 2006]. Die Inaktivierung von *RB1* beim muskelinvasiven Blasenkarzinom ist meist mit einer Deletion im Chromosomenbereich 13q assoziiert [Chatterjee et al., 2004]. Über *RB1* wird der Übergang von der G1 zur S Phase des Zellenzyklus reguliert. Wie in papillären Tumoren, wurde auch LOH im Abschnitt 9p21 in vielen invasiven Tumoren (>50%) beobachtet [Hartmann et al., 2002] [Knowles, 2006]. Die Verluste auf Chromosom 9p betreffen vorrangig das *CDKN2A*-Gen, das für Regulatoren von *RB1* bzw. *TP53* kodiert; die genaue Bedeutung der 9q-Verluste ist noch nicht vollends geklärt [Dinney et al., 2004]. Eine Korrelation wird zwischen *RB1*-Mutation und höherem Tumorstadium und schlechteren Prognose erkennbar [Chatterjee et al., 2004; Shariat et al., 2004].

Etwa 50% aller menschlicher Tumoren enthalten eine Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53*. *TP53* ist ein Transkriptionsfaktor, der bei verschiedenen Formen von Zellstress Proteine induziert, die Zellvermehrung verhindern. Dieses Protein hemmt die zyklinabhängigen Kinasen (CDKs) und führt zum Stopp zwischen G1 und S-Phase. Andere von *TP53* induzierte Proteine lösen Apoptose aus. Wenn *TP53* mutiert ist, unterliegen die Zellen keiner Apoptose oder keinem Zellzyklusstopp mehr und der Tumor breitet sich aus [Sarkis et al., 1993]. Es gibt eine deutliche Korrelation zwischen *TP53*-Mutation und Tumorstadium bzw. -grad beim Harnblasenkarzinom [Reznikoff et al., 1996]. *TP53* Mutationen treten häufig bei CIS und selten bei Ta auf. In gut differenziertem Ta-Tumoren wurden zu nur 3% Mutationen von *TP53* entdeckt [Spruck et al., 1994]. Invasive, schlecht differenzierte Tumoren verfügen über eine wesentlich höhere *TP53*-Mutationsrate als oberflächliche, gut differenzierte Tumoren. *TP53*-Mutationen sind auch mit schlechterer Prognose in allen Tumorstadien assoziiert. Es ist aber fraglich, ob sie wesentliche prognostische Informationen über die histopathologischen Parameter hinaus liefern [Sarkis et al., 1993].

Amplifikationen wurden bei Harnblasenkarzinomen am häufigsten in den Chromosomenbereichen 8p, 8q, 7p, 17q und 5p entdeckt. Eine Amplifikation im Bereich 6p22 wurde in bis zu 20% der schlecht differenzierten invasiven Tumoren identifiziert [Luis et al., 2007]. Das Ziel unserer Studie war daher, die Struktur und Häufigkeit sowie potentielle Onkogene im 6p22 Amplikon zu untersuchen.

1.3 Der Amplifikationsbereich auf Chromosom 6p22.3

1.3.1 Genamplifikation

Genamplifikation bezeichnet die Vervielfachung einer DNA-Sequenz bzw. eines Gens, die zu einem erhöhten Anteil eines relativ kleinen Sequenzabschnitts im Genom führt. Der vervielfachte Abschnitt wird als Amplikon bezeichnet. Amplifizierte DNA kann in verschiedenen Formen vorliegen: in Form von extrachromosomalen „*Double-minutes* (*dmin*)“ Chromosomen oder als intra-chromosomale „*homogeneously staining regions* (*hsr*)“ [Brison, 1993; Singer et al., 2000]. Regionen mit Genamplifikation können besonders mit Hilfe der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) und der Fluoreszenz-in situ Hybridisierung (FISH) detektiert werden.

Genamplifikation tritt in gesundem Gewebe nicht auf [Schwab, 1999]. Es wird vermutet, dass Amplifikationen in Tumoren selektiert werden, um die Transkriptionsrate eines oder mehrere Gene massiv zu steigern, um eine natürliche Limitierung der Wachstumsrate durch begrenzt verfügbare Genprodukte zu übergehen [Fukumoto et al., 1988]. Die amplifizierten Sequenzen enthalten oft spezifische Onkogene, die Tumorzellen einen selektiven Wachstumsvorteil bieten. In manchen Tumorarten geht eine Überaktivität von Onkogenen hauptsächlich auf eine Amplifikation zurück, z.B. wird beim Neuroblastom des Kindesalters häufig eine Amplifikation des *MYCN* (*N-MYC*)-Gens beobachtet [Cetinkaya et al., 2007]. Amplifikationen tragen auch zur Resistenzentwicklung bei, z.B. entsteht durch Vervielfachung des *DHFR*-Gens eine Resistenz gegen Methothrexat [Snijders et al., 2008].

Der genaue Entstehungsmechanismus von Genamplifikationen ist bislang ungeklärt. Eine Theorie zur Entstehung der „*Double-minutes*“ Chromosomen geht von DNA-Schäden aus, die zur Deletion eines Chromosomenstücks führen. Das deletierte Stück besteht als azentrisches Fragment fort und kann unter besonderen Umständen in *dmin* zerfallen [Hahn, 1993]. Ein wahrscheinlicher Mechanismus zur Entstehung der „*homogeneously staining regiones*“ wird als Bruch-Fusions-Brücken-Zyklus (breakage-fusion-bridge cycle, BFB) bezeichnet [Kuwahara et al., 2004] (Abb.1-4). Nach diesem Modell erzeugt ein initialer Chromatidbruch (breakage) zwischen einer Zielregion (z.B. einem Onkogen) und dem Telomer ein Chromatid mit offenem, ungeschütztem Ende. Nach Durchlaufen einer Replikationsrunde wird das gebrochene Chromosomenende durch Schwesterchromatidfusion repariert. Die fusionierten Chromosomen werden im Laufe der Zellteilung durch den Spindelapparat auseinandergezogen, dadurch kommt es erneut zum Bruch. Bricht die DNA nun etwas neben

der Fusionsstelle so fehlt einer Tochterzelle ein Stück DNA, während die andere zwei Kopien des selben Stücks enthält. Mehrfache Wiederholungen des Kreislaufs von Fusionen und Brüchen können schließlich zu einer intrachromosomalen Amplifikation führen. Solche Bruchstellen wurden in CFS (Common Fragile Site)-exprimierenden chromosomalen Bereichen von humanen Zellen [Ciullo et al., 2002; Hellman et al., 2002] und Hamsterzelllinien [Kuo et al., 1994; Coquelle et al., 1997] identifiziert.

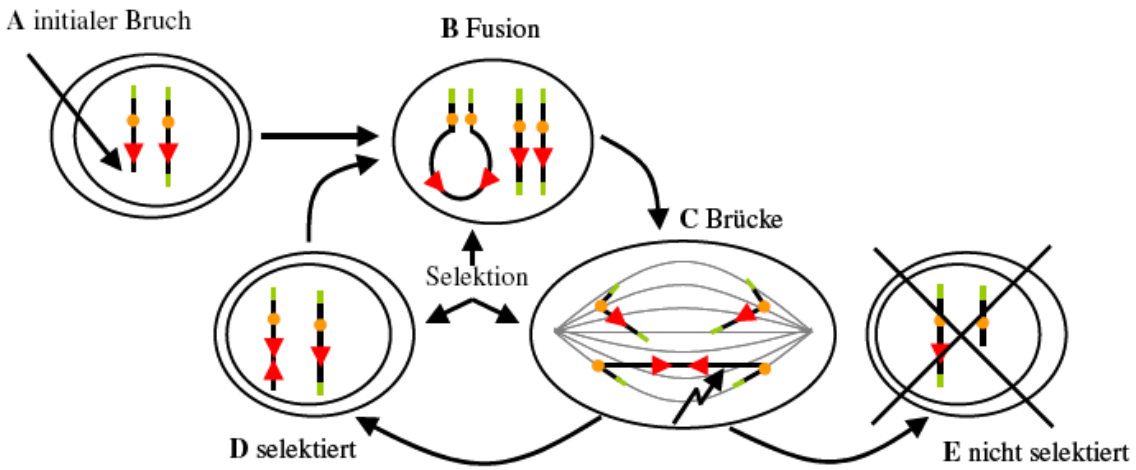


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der Genamplifikation durch den Bruch-Fusion-Brücken-Zyklus. Die Dreiecke stellen das Amplikon dar; die Kreise symbolisieren Zentromere. A: Interphase: ein initialer Bruch führt zur Entstehung eines offenen Chromatidendes; B: Metaphase: die Fusion zweier ungeschützter Schwesterchromatidenden resultiert in einem dizentrischen Chromoso; C: Anaphase: das dizentrische Chromosom bildet eine Brücke zwischen den gegensätzlichen Polen aus. Durch einen Bruch in dem Chromosom enthält eine Tochterzelle. D: 3 Kopien der Zielregion und eine weitere Zelle. E: nur eine Kopie. Als Folge von Selektion wird der BFB-Zyklus mehrmals wiederholt, was eine weitere Vergrößerung des Amplikons bewirk [Hellman et al., 2002].

1.3.2 Amplifikationen des Chromosomenabschnitts 6p22

Genamplifikationen sind eine der häufigsten Veränderung in vielen bösartigen Tumoren, z.B. in Har–nblasen-, Kolon-, Ovalial-, und Hepatozellulären Karzinomen [Santos et al., 2007]. Eine Amplifikation in 6p22.3 wird in ca. 10-25% aller fortgeschrittenen Harnblasenkarzinome nachgewiesen und ist in vielen Harnblasenkarzinom-Zelllinien repräsentiert [Evans et al., 2004]. Der Zugewinn von 6p oder Amplifikationen wurde mit fortgeschrittenen Stadien, hoher proliferativer Aktivität, Metastasen und schlechter Prognose assoziiert [Tomovska et al., 2001; Prat et al., 2001]. Insgesamt liegen 624 Gene im 33-Mb-Abschnitt von 6p21-p23, was ungefähr die Hälfte aller Gene auf dem ganzen Chromosom 6 darstellt. Die Zahl von CpG Inseln im 6p21-p23 Gebiet beträgt etwa einen Drittel aller CpG-Inseln auf Chromosom 6 [Santos et al., 2007].

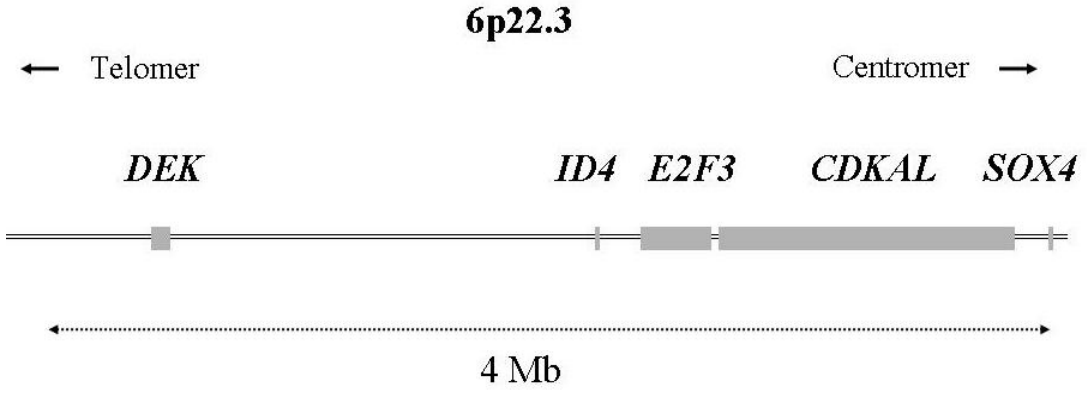


Abbildung 1-5: SOX4, CDKNAL, E2F3, ID4 und DEK lokalisieren im 6p22.3 Amplikon

Das Zielgen der 6p22-Amplifikation beim Harnblasenkarzinom war zu Beginn dieser Untersuchung nicht genau definiert. Mehrere Ansätze wurden unternommen, um die Amplifikationsregion einzugrenzen und potenzielle Harnblasenkarzinom-Onkogene zu identifizieren [Bruch et al., 1998 ; Bruch et al., 2000; Evans et al., 2004; Feber et al., 2004; Hurst et al., 2004; Oeggerli et al., 2004]. Durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit speziellen Sonden wurde gezeigt, dass einige bekannte Gene (*SOX4, CDKAL, E2F3, ID4, DEK*) in einer 4 Mb umfassenden amplifizierten Region lokalisiert sein könnten (sieh. Abb.1-5) [Evans et al., 2004; Bruch et al., 2000; Feber at al., 2004].

SOX4 wurde zuerst als ein häufiges, aber nicht immer konsistentes Zielgen charakterisiert [Bruch et al., 2000]. Im Gegenteil wurde berichtet, dass eine Korrelation zwischen *SOX4*-Überexpression und verlängerter Überlebenszeit der Patienten erkannt wird. *SOX4*-Überexpression reduziert die Zelllebensfähigkeit und führt zur Apoptose in der Harnblasenkarzinom-Zelllinie HU609 [Aaboe et al., 2006]. Durch eine auf Mikroarrays basierende genomische Hybridisierung wurde *CDKAL1,* das zwischen *SOX4* und *E2F3* liegt, als ein amplifiziertes Gen identifiziert [Hurst et al., 2004; Hurst et al., 2008].

Überexpression von *E2F3* wurde am häufigsten in der Literatur erwähnt, *E2F3*-Amplifikation und dessen kodierten Proteinen, E2F3a und E2F3b, gehen mit invasivem Tumorwachstum, rascher Tumorzellproliferation und schlechter Differenzierung einher [Oeggerli et al., 2006]. Der Transkriptionsfaktor *E2F3* ist ein Mitglied einer Gruppe von Proteinen (E2Fs) mit zentraler Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus. E2F Proteine können den Tumorsuppressor Faktor pRB1 binden und fungieren als Transaktivatoren. Phosphorylierung von RB1 durch zyklinabhängige Kinasen (CDKs) führt zur Dissoziation des RB1/E2F3-Komplexes und zum Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus [Qian et

al., 1992; Hurst et al., 2008]. Der Zusammenhang von *E2F3*-Amplifikation und Überexpression der kodierten Proteine in Harnblasenkarzinomen mit invasivem Wachstum, fortgeschrittenem Tumorstadium, schlechter Differenzierung, und erhöhter Proliferationsrate wurde in mehreren Arbeiten bestätigt [Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004], und sogar in einem seltenen histologischen Typ, dem kleinzelligen Harnblasenkarzinom, wurden Zugewinne an 6p22.3 (*E2F3*) berichtet [Terracciano et al., 1999].

DEK wurde zuerst als Autoantigen in verschiedenen menschlichen Autoimmunkrankheiten identifiziert, wie zum Beispiel bei der juvenilen rheumatoiden Arthritis [Sierakowska et al., 1993]. *DEK* ist überexprimiert in vielen untersuchten Tumoren, z.B. akuter myeloischer Leukämie (AML), Kolonkarzinom, malignem Melanom und Harnblasenkarzinom [Carro et al., 2006; Larramendy et al., 2002; Sanchez-Carbayo et al., 2003]. *DEK* und *E2F3* wurden als potenzielle Zielgene von 6p-Zugewinnen auch in primären Retinoblastomen identifiziert [Grasemann et al., 2005; Orlic et al., 2006]. In einer bisherigen Veröffentlichung wurde bereits eine verstärkte *DEK*-Expression im Zusammenhang mit Amplifikationen in Harnblasenkarzinom-Geweben beschrieben [Evans et al., 2004]. Jedoch wurde auch eine verstärkte Expression in früheren Stadien des Tumors berichtet [Sanchez-Carbayo et al., 2003]. Im Intervall zwischen *E2F3* und *DEK* gibt es ein weiteres plausibles Onkogen, nämlich *ID4* (Abb.1-5), das im Zentrum dieser Arbeit stand.

1.3.3 Der *ID4*-Locus

Der Name Id steht sowohl für „inhibitor of DNA binding“ als auch für „inhibitor of differentiation“ und beschreibt einerseits den Wirkmechanismus sowie andererseits die biologischen Konsequenzen dieser Wirkung [Benezra et al., 1990; Norton et al., 1998]. Die Id-Proteine, in der Reihenfolge ihrer Entdeckung Id1 bis Id4 benannt, gehören zu der weit mehr als 200 Mitglieder umfassenden Familie der helix-loop-helix (HLH)-Transkriptionsfaktoren [Riechmann et al., 1994]. Die Id-Proteine können mit HLH Transkriptionsfaktoren Dimere binden und die von diesen hervorgerufene Zelldifferenzierung blockieren. Die Phosphorylierung von Id-Proteine durch CDK2 verändert ihre Affinität gegenüber verschiedenen bHLH [Lasorella et al., 2001; Ruzinova et al., 2003; Sikder et al., 2003]. Id-Proteine nehmen auch Einfluss auf die Richtung der Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen. Als Inhibitoren der Zelldifferenzierung wirken Id-Proteine als positive Regulatoren der Zellproliferation [Jonathan et al., 2005]. Id2 und Id4, aber nicht Id1

und Id3, sind in der Lage, das Retinoblastomprotein (pRB) zu binden. Diese Interaktion führt zur Freisetzung des an pRB gebundenen Transkriptionsfaktors E2F, der die Transkription von S-Phase-Genen reguliert [Zebedee et al., 2001]. Id-Proteine binden auch ETS-domänehaltigen Proteine und regulieren ihre Aktivität. Die Funktion von pRB1 ist wichtig in der Kontrolle des Zellzyklus, und ETS-Domänenproteine können wichtige Prozesse bei der Invasion von Tumorzellen beeinflussen [Chaudhary et al., 2005].

Im Vergleich zu ID1, ID2 und ID3 ist ID4 ein nicht gut charakterisiertes Mitglied der ID-Familie. Es wird in recht spezifischer Weise in verschiedenen Geweben exprimiert, mit dem höchsten Expresssionsniveau in Hoden und Gehirn [Riechmann et al., 1994]. Das menschliche *ID4*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im Bereich 6p22 und umfasst eine Länge von ca. 3 kb. Das ID4-Protein soll ein Molekulargewicht von ca. 16 kDa besitzen.

Eine *ID4* mRNA-Überexpression wurde im Prostatakarzinom gezeigt, die mit erhöhtem Risiko zur Entwicklung von Metastasen assoziiert war [Yuen et al., 2006]. Im Glioblastom, dem häufigsten bösartigen Hirntumor, und Oligodendrogliom, einem neuroepithelialen Tumor, wurde ebenfalls erhöhte *ID4* mRNA-Expression beobachtet [Liang et al., 2005]. Eine Veränderung des *ID4* Gens durch eine Chromosomen-Translokation wurde in akuten B-Zell Lymphoblastischen Leukämien beobachtet [Russell et al., 2008].

Viele neue Forschungen fokussieren auf eine *ID4* Promotor-Hypermethylierung. *ID4* Promotor-Hypermethylierung korreliert sehr eng mit niedriger Expression des ID4 Proteins in vielen Tumorproben [Noetzel et al., 2008; Umetani et al., 2005; Zhao et al., 2008]. Es wurde berichtet, dass in Kolon-Karzinomen die *ID4* Expression durch Promoter-Hypermethylierung reprimiert wird [Gómez Del Pulgar et al., 2008; Umetani et al., 2004]. *ID4* wurde auch als ein potenzielles Tumorsuppressorgen im Mammkarzinom identifiziert; *ID4* Promotor-Methylierung wurde als ein Biomarker für Rezidive vorgeschlagen und war mit Lymphknoten-Metastasierung assoziiert [Noetzel et al., 2008; Umetani et al., 2005]. Der Status der *ID4* Promotor-Methylierung wurde als ein „Reporter“ für klinische Progression und Rezidive in vielen hämatologischen Erkrankungen identifiziert, beispielsweise in akuter lymphatischer Leukämie (ALL), akuter myeloischer Leukämie (AML) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) [Zhao et al., 2008].

1.4 Ziel der Arbeit

Um Tumoren möglichst effizient behandeln zu können, müssen auf dem Verständnis der Tumorbiologie basierende zuverlässige Parameter gefunden werden. Die molekulare Analytik ist von großer Bedeutung um die Invasivität und Aggressivität eines Tumors für die unmittelbare Behandlung zu bestimmen und die Rezidivwahrscheinlichkeit für die notwendige Tumornachsorge einzuschätzen. Molekulare Untersuchungen des Harnblasenkarzinoms sollen somit Verbesserungen der Diagnostik und Therapie ermöglichen. Zugewinne und Amplifikationen von Chromosom 6 sind häufige Veränderungen während der Progression des Harnblasenkarzinoms. Die Region 6p22 enthält eine Gruppe von Genen, die als mögliche Zielgene im 6p22.3 Amplikon vorgeschlagen wurden. Die Überexpression der Gene *E2F3, SOX4* und *CDKAL* wurde bereits in der Literatur beschrieben. Neben diesen Genen kommt auch *ID4* als Kandidat für das Zielgen der 6p22-Amplifikation in Frage. Das Ziel unserer Studie war daher, die Amplifikationsstärke und Häufigkeit insbesondere von *ID4*, sowie benachbarter Gene im 6p22.3 Amplikon, zu untersuchen.

Um Hinweise auf eine Amplifikation zu erlangen, wurden zunächst Veränderungen der Expression von *E2F3*, *ID4* und *DEK* an 16 Blasenkarzinomzelllinien auf mRNA-Ebene untersucht. Nach einer zunächst qualitativen Analyse wurden die mRNA Expressionen von *E2F3*, *ID4*, und *DEK* mit Hilfe einer quantitativen Real-time-PCR untersucht. Weiterhin wurden 28 Tumorgewebeproben und 6 morphologische normale Gewebeproben untersucht. Die Expressionsniveaus wurde im Vergleich zu normalen Urothelzellen (UP) als Kontrollen und zu β-Aktin als Referenzgen bestimmt.

Um mögliche Gen-Amplifikationen in der Chromosomregion 6p22 nachweisen zu können, wurde in 28 Tumorgewebeproben unterschiedlicher Stadien und Malignitätsgrade mittels quantitativer PCR Mikrosatellitenmarker, die die Gene flankieren, auf DNA-Ebene untersucht. Acht Mikrosatelliten neben den Genen *DEK, ID4, E2F3* wurden ausgewählt. Zwei Mikrosatelliten von Chromosom 12 und Chromosom 15 wurden als Kontrollen gleichzeitig mit den untersuchten Mikrosatellitenmarkern in jeder PCR-Reaktion amplifiziert. Zwei DNAs aus Leukozyten, amplifiziert unter gleichen Bedingungen, dienten als Normal-Kontrolle. Es wurde ferner auch durch Vergleich der Ergebnisse aus DNA-PCR und RT-PCR untersucht, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen erhöhten Kopienzahlen und vermehrter Genexpression besteht. Abschließend sollte mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse die ID4 Proteinmenge in UCC-Zellinien und normalen Urothelzellen verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende humane Harnblasenkarzinomzelllinien (TCC-Zelllinien) untersucht: 5637, HT1376, SD, EJ, VmCub1, VmCub2, 253J, J82, SW1710, BFTC905, BFTC909, RT112, 639V, MGHU4, T24 und UmUC3. Diese wurden freundlicherweise von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, USA, über Herrn Prof. Dr. Schmitz-Dräger und von Dr. M.A. Knowles, ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds, UK, zur Verfügung gestellt. Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf eventuelle Kontamination mit Mykoplasmen getestet.

Zelllinie	Tumorstadium	Tumorgrad	Geschlecht des Patienten	Alter des Patienten
5637	-	-	M	68
HT-1376	pT2	G3	W	58
SD	-	-	-	-
VMCub1	-	-	M	-
VMCub2	-	-	M	-
253J	pT4	G4	M	-
SW1710	pTa	G3	W	84
BFTC905	pTa	G3	W	51
BFTC909	pTx	G3	M	64
T24	-	G3-4	W	81
RT-112	pTa	G2	W	-
EJ	-	G3	W	-
639V	-	G3	M	69
J82	pTa	G1-2	M	58
UmUC3	-	-	M	-
MGHU4	-	-	M	-

Tabelle 2-1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Harnblasenkarzinom (TCC)-Zelllinien und Tumoren aus denen sie etabliert wurden, "-„ = Daten nicht sicher bekannt [Neveling et al., 2005; John et al., 1986]

2.2 Gewebeproben

Die für die Isolation von DNA und RNA verwendeten Proben der Harnblasenkarzinom-Gewebeproben, Hodengewebeproben sowie die Normalgewebeproben wurden aus der Gewebebank der Urologischen Klinik, Universität Düsseldorf, bereitgestellt. Die untersuchten Harnblasenkarzinomproben und Normalgewebe wurden von Patienten gewonnen, welche an der Klinik aufgrund eines Harnblasentumors behandelt wurden. Die normalen uroepithelialen Zellen (UP) wurden aus Harnleitern gewonnen, die aus

Nephrektomie-Operationen der Urologischen Klinik zur Verfügung gestellt wurden. Alle Gewebe wurden unmittelbar nach Begutachtung durch einen Pathologen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C gelagert. Für die Isolierung von RNA aus Blutproben wurde EDTA-Blut von Patienten der Urologischen Klinik verwendet. Eine Auflistung der verwendeten Harnblasenkarzinom-Gewebeproben mit entsprechendem pathologischem Befund gibt die nachfolgende Tabelle:

DNA-Nr	cDNA-Nr	Geschlecht	Alter	Tumor stadium	Lymphknotenstatus	Metastasen	Grad	Pathologischer Befund
2	3	m	66	pT3b	N0	M0	G2	Tumor
9	6	m	68	pT3b	pN2	M0	G3	Tumor
13	12	m	60	pT3a	N0	M0	G3	Tumor
	28	m	61	pT3b	N0	M0	G3	Tumor
31	41	f	46	pTa	Nx	Mx	G2	Tumor
	47	m	67	pT3b	N0	M0	G3	Tumor
38	52	f	78	pT3b	N0	M0	G3	Tumor
	55	m	74	pT4a	N1	M0	G3	Tumor
186	61	m	69	pT3b	N0	M0	G3	Tumor
48	62	f	70	pT3b	N0	M0	G2	Tumor
52	64	m	66	pT3b	N2	M0	G3	Tumor
	67	f	84	>pT2	Nx	Mx	G3	Tumor
157	69	m	68	pT3b	N0	M0	G3	Tumor
	104	m	53	pT1	N0	M0	G2	Tumor
	105	m	73	pTa	Nx	M0	G2	Tumor
82	109	m	60	pT4a	N0	M0	G3	Tumor
85	111	m	73	pT3b	N0	M0	G2-3	Tumor
37	115	m	65	pT3a	N2	M0	G3	Tumor
	120	m	57	pT2	N0	Mx	G2	Tumor
132	150	f	72	pT3a	N2	M0	G3	Tumor
119	168	m	58	pT3a	N2	M0	G3	Tumor
124	170	f	55	pT2	N0	M0	G2	Tumor
78	172	m	65	pT3a	N0	M0	G3	Tumor
	205	f	61	pT3a	N0	M0	G2	Tumor
	212	m	68	pT2a	N1	M0	G2	Tumor
	224	m	60	pT2a	N0	M0	G2	Tumor
	231	m	85	>pT2	Nx	M0	G2	Tumor
	246	m	62	pT4a	N2	M0	G3	Tumor
	15	m	70	pT2a	N0	M0	G3	N
	32	m	62	pT3b	N0	M0	G3	N
	127	w	55	pT3b	N2	M0	G3	N
	253	w	61					N
	257	w	77					N
	259	w	-					N

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Harnblasenkarzinom-Gewebeproben mit zugehörigem pathologischem Befund, N=Normale Gewebeproben.

2.3 Chemikalien und Molekularbiologische Kits

6 x Loading Dye Solution	MBI Fermentas	St.- Leon-RotE
Acrylamid 37,5:1 30%	AppliChem	Darmstadt
Agarose	Peqlab	Erlangen
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie	Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich Chemie	Deisenhofen
DMSO	Sigma Aldrich Chemie	Deisenhofen
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot
dNTP-Mix	PeqLab	Erlangen
DyNazyme^{TM}II 10 x PCR-Puffer	Finnzyme OY über Biometra	Göttingen
Ethanol	Merk	Darmstadt
Harnstoff	Merk	Darmstadt
HotStar (10 x) PCR-Puffer	QIAGEN	Hilden
Magermilchpulver	Trade Service Int	Zewen
Mineralöl	Siegma Aldirch	Deisenhofen
Methanol	Merk	Darmstadt
Oligo (dT15)	Roche	Mannheim
PBS	Biochrom	Berlin
Protein-Marker	PeqLab	Erlangen
Q-Solution	QIAGEN	Hilden
SequaGel ultra pure 25%	National Diagnostics Inc	Atlanta, USA
STR Marker	LI-COR	Lincoln, USA
TBE, TAE, SSC (Konzentrate)	Eppendorf	Hamburg
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie	Deisenhofen
Tris (Base)	Merk	Darmstadt
Tween 20	SERVA	Heidelberg
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	QIAGEN	Hilden
LightCycler Faststart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kit	Roche	Mannheim
ECL Western Blotting system Kit	Amersham Pharmacia	Freiburg
RNeasy®Mini Kit	QIAGEN	Hilden

2.4 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega	Mannheim
DyNazyme^{TM}II	Finnzyme OY	Espoo, Finnland
DNA-Polymerase	über Biometra	Göttingen
HotStarTaq DNA Polymerse	QIAGEN	Hilden
Restriktionsendonukleasen	Roche	Mannheim
	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot
Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas	St.- Leon-Rot
SuperScript^{TM}II Reverse Transkriptase	Invitrogen	Groningen, NL

2.5 Lösung und Puffer

2.5.1 Lösungen PCR und RT-PCR

<u>6 x Ladepuffer für Agarosegele (pH 8,0)</u>

30%	Glycerin
0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol
0,2%	EDTA

<u>LI-COR-Gel (6%):</u>

8,5 µl	SequaGel ultra pure 25%
7 ml	5 x TBE
10,09 g	Harnstoff
max.19 ml	dH_2O
240 µl	APS
24 µl	TEMED

5 x TBE (1000 ml)

54 g	Tris-Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad	dH_2O

50 x TAE (1000 ml)

242 g	Tris.Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad	dH_2O

2.5.2 Lösungen Western Blot

Trenngel (Ansatz für 2 Gele à 6,2 cm x 8,7 cm):

3,25 ml	dH_2O
7,5 ml	Acrylamid 37,5:1, 30%
3,8 ml	1,5 M Tris-Base pH 8,8
0,3 µl	10% SDS
150 µl	10% APS
6 µl	TEMED

Sammelgel (Ansatz für 2 Gele à 6,2 cm x 8,7 cm):

4,8 ml	dH_2O
1,25 ml	Acrylamid 37,5:1, 30%
0,5 ml	1 M Tris pH 6,8
75 µl	10% SDS
44,5 µl	10% APS
4,45 µl	TEMED

RIPA-Puffer, pH 7,4:

50 mM	Tris-Base
150 mM	NaCl
1%	Nonidet P40
0,5%	Na-Desoxycholat
0,1%	SDS
10 mM	NaF
10 mM	Na-Pyrophosphat
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 mM	Na-Vanadat
20 mM	β-Glyzerophosphat
1 Tablette	Proteaseinhibitorcocktail pro 10 ml (Zugabe vor Gebrauch)

Lagerung bei -20°C

5 x Laufpuffer :

72,06 g	Glycin
17,2 g	Tris-Base
50 ml	10% SDS
ad 1000 ml	dH_2O

Western-Blot-Puffer, pH 8,3:

28,4 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
10%	Methanol

Lämmli-Ladepuffer:

120 mM	Tris-Base
10%	SDS
10%	Glycerol
25%	β-Mercaptoethanol
0,01%	Bromphenolblau

PBS, pH 7,2:

137,0 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na_2HPO_4
1,5 mM	KH_2PO_4

Blockpuffer:

5% Blotting Agent-Lösung in PBS

Antikörper-Lösungen:

0,1%	Tween 20 in PBS
1%	Blotting Agent-Lösung

entsprechende Verdünnung des Antikörpers

Waschlösung:

0,1%	Tween 20 in PBS

2.6 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthesiert. Selbst entworfene Primer wurden durch Verwendung der Programme Oligo 4.1 ausgewählt. Die Mikrosatelliten-Primer wurden über die Datenbank „Nucleotide“ des National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) einschließlich ihrer Amplifikationsbedingungen sowie ihrer Position und Länge ausgewählt. Die forward-Primer der Mikrosatellitenanalyse waren jeweils Fluoreszenz markiert (IRD800). Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind nachfolgend entsprechend ihrer Verwendung gruppiert aufgeführt.

RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5`➔ 3`	Tm(°C)	Amplifikat (bp)
GAPDH 350 s	TCCCATCACCATCTTCCA	62.3	379
GAPDH 350 as	CATCACGCCACAGTTTCC	61.9	
ß-Aktin s	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	72.2	661
ß-Aktin as	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG	70.9	
ID4 s	CCGCCCAACAAGAAAGTCAG	59.4	188
ID4 as	GGTGTTGAGCGCAGTGAG	58.2	
E2F3 s	ACGTCTCTTGGTCTGCTCAC	59.4	155
E2F3 as	TCTTAATGAGGTGGATGCCT	55.3	
DEK s	GTGGGTCAGTTCAGTGGC	58.2	291
DEK as	AGGACATTTGGTTCGCTTAG	55.3	

Tabelle 2-3: Auflistung sämtlicher verwendeter RT-PCR Primer

Mikrosatellitenanalyse

Bezeichnung	Sequenz 5`➔ 3`	TM (°C)	Accession-Nr.	Amplifikat (bp)
D6S 1567 fw	AACTATTAGATTGCCATGTCTCTG	59.7	Z52559	94-120
D6S 1567 rv	TGTGATAAAATCAGGACTCGTG	56.5	Z52559	
D6S 2051 fw	TTTTCTAAATCCTTGTTAAGCAACG	56.4	G13450	128
D6S 2051 rv	TGCAAGATTTTAAACTAAAAATGGC	54.8	G13450	
D6S 285 fw	TGTGAAATGGAGAATGACACAGACA	59.7	Z16829	207-221
D6S 285 rv	TCCAATAGAAATCAAGCCCTGGTT	59.3	Z16829	
D6S 1946 fw	AAATTTTTTCACACAGAGACAAACA	54.8	G05340	300-301
D6S 1946 rv	TTCCAATTTTGGCTAGTGGG	55.3	G05340	
D6S 1453 fw	GCATTCATCCTGTAGCCCAT	57.3	G04368	175-176
D6S 1453 rv	CCATGGTTGTTCTTAATGGC	55.3	G04368	
D6S1228Efw	GGTTAGATAGGACTATCAGGG	57.9	StSG6344	153
D6S1228E rv	CAGACCACGTTATACACACAG	57.9	StSG6344	
D6S 1678 fw	GCCACGTTGTACCATACC	56.0	Z51403	252-305
D6S 1678 rv	TCTCAGGATCTCGGGG	54.3	Z51403	
D6S 422 fw	TTTAGGGGACTGTGGG	51.7	Z23717	191-221
D6S 422 rv	TGCCTACATGGTGAAGAC	53.7	Z23717	
D12S1650fw	CTGAAATGAGGCAACATAGGCT	58.4	Z53239	212-228
D12S1650rv	GCTTGGATCACAGGGAACAATA	58.4	Z53239	
D15S127 fw	CCAACCACACTGGGAA	51.7	Z17013	136
D15S127 rv	AACAGTTGCCCACGGT	51.7	Z17013	

Tabelle 2-4: Auflistung sämtlicher verwendeter Primer für die Mikrosatelliten-Analyse

2.7 Antikörper

Anti-rabbit Antikörper für ECL-Kit	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
ID4 (H-70): sc-13047	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
ID4 (L-20): sc-491	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA

2.8 Geräte und Zubehör

EASY-CAST™ Elektrophoresis Systems	Owl Scientific	USA
Gel Print 2000i	MWG-Biotech	Ebersberg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia	Freiburg
Immobilon™-P	Millipore	Bedford, USA
LI-COR-Sequencer 4000/4200	LI-COR Inc.	USA
	über MWG-Biotech GmbH	Ebersberg
Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System	Biometra	Göttingen
pH-Meter	WTW	Weilheim
Spektralphotometer	Eppendorf	Köln
S&S Gel-Blotting Papier	Schleicher&Schuell	Dassel
T3 ThermoCycler	Biometra	Göttingen
Trio Thermoblock	Biometra	Göttingen
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
Whatman Filterpapier	Whatman	Maidstone, UK
X-OMAT MS Röntgenfilme	Kodak	Stuttgart

2.9 Software und Datenbank

2.9.1 Software

Base ImagIR™ 4.1; LI-COR, inc.

LightCycler Operator's Manual, Version 3.5, 2000

Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences, Inc., 1992

ONE-Dscan, 1998

Sämtliche statistische Rechungen (Boxplot und Pearson'sche Korrelationkoeffizient Analysen) wurden unter Verwendung von Microsoft Excel durchgeführt. Betriebssystem: Windows NT.

2.9.2 Datenbanken

Blast, Pubmed, Nucleotide [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]
Human Genome Browser [http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/]
Genethon-Marshfield Genetic Maps
[http://www.bli.unizh.ch/BLI/Projects/genetics/maps/gthon_marsh.html]

2.10 RNA-Isolierung

2.10.1 RNA-Isolierung aus Kulturzellen

Die Isolierung der RNA aus den Blasenkarzinom-Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy-Kits nach Angaben des Herstellers.

2.10.2 RNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Die Isolierung der RNA aus EDTA-Blut wurde mit Hilfe des RNeasy Blood Mini-Kits nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

2.11 DNA-Isolierung

Die Isolierung der hochmolekularen genomischen DNA aus Kulturzellen wurde mit Hilfe des QIAGEN Blood & Cell Culture Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.12 Quantitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von genomischer DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm in einer 1:25 Verdünnung vorgenommen. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist nach Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} ein Verhältnis von etwa 2,0 auf.
Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte durch Messung der OD bei 260 nm und 280 nm in einer 1:25 Verdünnung, wobei eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 37 µg/ml entspricht.

2.13 RT-PCR

2.13.1 Reverse Transkription

Zur Bestimmung der mRNA Expression in Zelllinien und Geweben wurde vor der Polymerase-Kettenreaktion eine Reverse Transkription von mRNA zu cDNA (complementary DNA) durchgeführt. Hierbei wurden im Verlauf der Arbeit zwei verschiedene Methoden benutzt:

1. Es wurde die AMV Reverse Transkriptase des Herstellers Promega verwendet. 2 µg RNA aus Zelllinien oder Gewebe wurden mit 4 µl (160 pmol) Oligo $(dT)_{15}$ Primern und sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht und für 10 min bei 70°C inkubiert. Weiter wurden 4 µl 25 mM $MgCl_2$, 2 µl 10 x Reverse Transkriptase Puffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 20 U Ribonuclease Inhibitor und 8,5 U AMV Reverse Transkriptase pro Ansatz gemischt. Nach 45 min bei 70°C Inkubation erfolgte eine weitere Zugabe von 5U/Ansatz AMV Reverse Transkriptase und 1,5 µl sterilem Wasser und 30 minütige Inkubation bei 42°C. Zur Denaturierung der reversen Transkriptase wurde der Ansatz 5 Minuten auf 95°C erhitzt, danach auf 4°C abgekühlt und bei –80°C gelagert.

2. Bei der zweiten Methode wurde die SuperScript^{TM}II Reverse Transkriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Invitrogen verwendet. 2 µg RNA aus Zellinien oder Gewebe wurden mit 500 ng (500 ng/µl) Oligo $(dT)_{15}$ Primern, 10 mM dNTP Mix und sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht und für 5 min bei 65°C inkubiert. Auf Eis wurden 7 µl eines Ansatzes, bestehend aus 4 µl 5 x First-Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 40 U RNase-Inhibitor für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 200 U SuperScript^{TM}II Reverse Transkriptase folgten Inkubationen von 50 min bei 42°C, 15 min bei 70°C und eine kurze Abkühlung auf Eis. Die hergestellten cDNAs wurde bei –80°C gelagert.

2.13.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch *Polymerase Chain Reaction,* PCR), ist ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung von DNA-Abschnitten. Es besteht im Wesentlichen aus drei wiederholten Schritten: Denaturieren, Hybridisieren, Extension.

Der DNA-Doppelstrang wurde durch Temperaturanstieg bei 95°C denaturiert, d.h. der Doppelstrang wurde in zwei DNA-Einzelstränge getrennt. Für die DNA-Synthese wird ein DNA-Strang mit einem freien 3`-OH-Ende benötigt. Dieser wird in einer PCR künstlich durch kurze DNA-Fragmente, Primer-Oligonukleotide, zur Verfügung gestellt. Die beiden

Primer (sense und antisense) lagern sich an die DNA-Einzelstränge. Danach werden die DNA-Einzelstränge zu einem DNA-Doppelstrang ergänzt durch die Polymerase, so dass der gewählte DNA-Abschnitt verdoppelt wird. Die Annealing-Temperatur wird durch den Gehalt an G-und C-Nukleotiden der Primer bestimmt. Im nächsten Zyklus werden die beiden DNA-Stränge wieder getrennt, die Primer angelagert und mittels Taq-Polymerase wieder zu DNA-Doppelsträngen ergänzt.

Für die molekulare Untersuchung des Gen-Locus auf Chromosom 6p22.3 sollte zunächst das Expressionsniveau von *E2F3*, *ID4*, und *DEK* mit Hilfe einer RT-PCR untersucht werden. Um das Niveau der Expression besser einordnen zu können, wurde gleichzeitig ein Sequenzabschnitt des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. Ein Standard-Reaktionsansatz enthält 100 ng cDNA (200 ng bei *ID4*), 1 x PCR Puffer, 75 µM dNTP-Mix, je 20 pmol Primer und 1 U DyNAzyme DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Zusätzlich wurde 1 x Q-Solution zur Amplifikation der *ID4* und *E2F3* mRNA in diese Ansätze zugegeben. Jeder Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die PCR-Bedingungen wurden auf dem Biometra Trio-Thermoblock wie folgt gewählt:

Programm-Schritt	**Temperatur(°C)**	**Dauer**	**Zyklenzahl**
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	94	30 sec	24-40*
Primer-Anlagerung	54-59	40 sec	
Primer-Verlängerung	72	30 sec	
Primer-Verlängerung	72	10 min	1

Tabelle 2-5: RT-PCR-Bedingungen für ID4, E2F3, DEK und GAPDH;
* *ID4: 40 Zyklen; E2F3: 35 Zyklen; DEK: 25 Zyklen; GAPDH: 24 Zyklen*

Die Temperatur (*ID4*: 57°C*; E2F3*: 59°C*; DEK*: 56°C *; GAPDH*: 54°C) der Primer-Anlagerung wurde meist im Bereich des T_M-Wertes der benutzten Primerpaare gewählt. Die Dauer der Primer-Verlängerung hängt von der Länge des entstehenden PCR-Produkts ab, wobei ca. 1000 bp pro Minute amplifiziert werden können. Es wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt aus den beiden Reaktionen miteinander für Test- und Kontrollgen vermischt und zusammen mit 2 µl 6 x Loading Dye Solution (Blaumarker) über ein Agarosegel (2%) aufgetrennt.

2.13.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten kann zur Bestimmung ihrer Größe genutzt werden. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen der aufzutrennenden Produkte wurde ein Längenstandard („Gene-Ruler 100 bp DNA-Ladder“) mitgeführt. Die DNA-Proben sowie der Längenstandard wurden mit 2-4 µl Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 90-120 V aufgetrennt. Die Dichte des Gels wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße gewählt. Die Nukleinsäuren werden mittels Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Hierfür wurde das Gel 5-20 min in der Ethidiumbromidlösung gefärbt, so dass der Farbstoff in die DNA interkalieren konnte. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera.

2.14 Real-time-PCR (Light Cycler)

Bei der Real-time-PCR (RT-PCR) wird die PCR-Produkt-Akkumulation in Echtzeit verfolgt, um die exponentielle Phase der Reaktion zu identifizieren und in der Folge für eine Quantifizierung der Ausgangstemplatemenge zu nutzen. Die Messung der Produktzunahme geschieht über Fluoreszenz, welche in Abhängigkeit von der Produktmenge zunimmt. Der zur Messung verwendete Flureszenzfarbstoff ist SYBR Green I im Roche *lightcycler FastStart DNA Master*^{PLUS}. SYBR Green I ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff, der in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA sequenzunabhängig bindet und nach Anregung etwa 1000mal stärker als der freie Farbstoff fluoresziert. Der Zeitpunkt der Flureszenzmessung ist für SYBR Green I-Detektion am Ende des Amplifikationssegments. Der eingestellte Messmodus ist „ single“, d.h. in jedem Zyklus wurde jeweils ein Messpunkt aufgezeichnet. Dafür wurde ein Signal-Schwellenwert angegeben, bei welchem sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befindet. Die Zeitpunkt (in Zyklen), zu dem das Signal diesen Schwellenwert erreicht, wird als Schwellenwertzyklus, crossing point oder C_T-Wert bezeichnet. Der genaue Wert muss keine Ganzzahl sein. Da die C_T-Werte proportional zum Logarithmus der initialen Templatemenge sind, misst die Real-time-PCR Unterschiede in der Konzentration der Template. Nach 30-45 Zyklen wurden die Schmelzkurve der gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen. Die Proben werden nach der Amplifikation langsam erhitzt. Während dessen werden die

Fluoreszenzänderungen aufgezeichnet und eine Schmelzkurve erzeugt. Aus der Ableitung dieser Kurven ergibt sich die Schmelztemperatur für jedes Amplikon. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakeristisch für jedes PCR-Produkt ist. Durch die Analyse der Schmelzkurve kann man die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte erkennen.
In der Arbeit wurden die mRNA Expression von *E2F3*, *ID4* und *DEK* mit Hilfe einer Real-time-PCR untersucht. Im Vergleich zur konventionellen Expressionsanalyse wurde hier eine Aktin-Kontrolle mitgeführt. Die als Template verwendete komplementäre DNA (cDNA) und die Primer blieben unverändert. Ein Standard-Reaktionsansatz enthält 20 ng cDNA, je 5 pmol Primer und 2 µl Enzym-Mix in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Zusätzlich wurde 4% DMSO zur Amplifikation von *ID4* in dem Ansatz zugegeben. Der Ansatz wurde in die Glaskapillare eingeführt. Die Produktbildung wird nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt. Der eingestellte Temperaturgradient in der Schmelzkurve betrug immer 20°C /sec. Die PCR-Bedingungen wurden wie Tab. 2-6 gewählt.

Die mRNA Expression wurden anhand der individuellen Crossing Points bei der entsprechenden Real-time PCR Reaktion berechnet. Bei der Berechnung der *E2F3* und *DEK* mRNA Expression wurde der Durchschnittswert der beiden UP-Kontrollen als „1“ eingestehen und bei *ID4* wurde der Wert der normalen Hodengewebeprobe 40B als „1“ gesetzt. Die mRNA-Expression wurde in willkürlichen Einheiten (AU) bestimmt.

	Programm-schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Slope (°C/sec)	Zyklenzahl
ID4	Denaturation	95	600	20	1
	Amplification	95	15	20	45
		63	5	20	
		72	10	20	
		90	1	20	
	Schmelzkurve	99	0	20	1
		73	20	20	
		99	0	0.1	
	Cooling	40	30	20	1
	Programm-schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Slope (°C/sec)	Zyklenzahl
E2F3	Denaturation	95	600	20	1
	Amplification	95	15	20	40
		62	5	20	
		72	10	20	
	Schmelzkurve	99	0	20	1
		72	20	20	
		99	0	0.1	
	Cooling	40	30	20	1
	Programm-schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Slope (°C/sec)	Zyklenzahl
DEK	Denaturation	95	600	20	1
	Amplification	95	15	20	40
		61	5	20	
		72	10	20	
	Schmelzkurve	99	0	20	1
		71	20	20	
		99	0	0.1	
	Cooling	40	30	20	1
	Programm-schritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Slope (°C/sec)	Zyklenzahl
Aktin	Denaturation	95	600	20	1
	Amplification	95	15	20	30
		65	5	20	
		72	20	20	
		83	1	20	
	Schmelzkurve	99	0	20	1
		75	20	20	
		99	0	0.1	
	Cooling	40	30	20	1

Tabelle 2-6: Real-time-RT-PCR-Bedingungen für ID4, E2F3, DEK und ß-Aktin; Slope: der eingestellte Temperaturgradient

2.15 Mikrosatelliten-Analyse

Um mögliche Genamplifikationsregionen im Chromosom 6p22 auf DNA-Ebene nachweisen zu können, wurden über PCR-Methodik Gen-flankierende Mikrosatellitenmarker untersucht. Das menschliche Genom enthalt eine Vielzahl von unterschiedlich langen Di- oder Trinukleotidwiederholungen, sog. Mikrosatellitenmarkern. In dieser Arbeit wurden 8 Mikrosatellitenmarker in 6p22.3 verwendet. Die Analyse der PCR-Produkte wurde zur Bestimmung des Amplifikationsgrades benutzt. Zwei Mikrosatelliten von Chromosom 12 (D12S1650) oder Chromosom 15 (D15S127) wurden als Kontrollen gleichzeitig mit den untersuchten Mikrosatellitenmarkern in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthielt 100 ng DNA, unterschiedliche Konzentrationen der untersuchten Mikrosatelliten-Primer und Kontroll-Mikrosatelliten-Primer (s. Tab.2-8), 1 x Reaktionspuffer, 75 µM dNTPs, 1 U HotStarTaq DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Die in dieser PCR eingesetzten forward-Primer sind für die anschließende Analyse mit dem LI-COR-Automaten fluoreszenzmarkiert. Diese Markierung erfordert eine möglichst kurze Lichtexposition der Reaktionsansätze. Die PCR-Bedingungen auf dem T3 Thermocycler mit Deckelheizung lauteten wie folgt (Tab. 2-7):

Programm-Schritt	Temperatur(°C)	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	94	30 sec	30/35
Primer-Anlagerung	55	40 sec	
Primer-Verlängerung	72	30 sec	
Primer-Verlängerung	72	7 min	1

Tabelle 2-7: PCR-Bedingungen für die Mikrosatelliten-Marker

Für jeden Chromosom 6p Mikrosatelliten wurden Zyklenzahl und Primer-Konzentration optimiert. Die Unterscheidung bei den einzelen Reaktionen wird in Tab.2-8 gezeigt. Die Elektrophorese des PCR-Produkts erfolgte im LI-COR-Automaten. Dabei werden Polyacrylamidgele durch Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer hergestellt. Zur Mikrosatellitenanalyse wurden denaturierende Polyacrylamidgele eingesetzt. Diese Gele erlauben im Vergleich zu Agarosegelen eine genauere Auftrennung von DNA-Molekülen, die sich in ihrer Länge um nur ein Nukleotid unterscheiden brauchen.

Untersuchte -MS	Kontroll-MS	MS-Primer (For+Rev) (pmol)	Kontroll MS-Primer (For+Rev) (pmol)	Zyklen -zahl	Verdünung beim Auftragen
D6S1567	D12S1650	15+15	5+5	35	1:5
D6S2051	D12S1650	20+20	10+10	35	1:5
D6S285	D15S127	7.5+7.5	20+20	35	1:5
D6S1946	D12S1650	30+30	7.5+7.5	30	1:5
D6S1453	D12S1650	7.5+7.5	10+10	30	1:7.5
D6S1228E	D12S1650	10+10	10+10	30	1:10
D6S1678	D12S1650	5+5	5+5	35	1:5
D6S422	D15S127	30+30	20+20	35	1:5

Tabelle 2-8: Auflistung Primer-Konzentration, PCR-Zyklenzahl und Verdünnugskonzentration der Mikrosatelliten-Analyse; MS=Mikrosatellitenmarker

Zur Erstellung eines 0,2 mm dicken Gels wurden 35 ml der oben beschriebenen LI-COR-Gel-Lösung zwischen gesäuberte Glasplatten gegossen und nach Einsetzen eines Vorkamms 60 min auspolymerisiert. Das Gel wurde in 1 x TBE-Laufpuffer in den LI-COR-Automaten eingesetzt und nach Entfernung des Vorkamms für mind. 15 min einem Vorlauf bei 1500 V unterzogen. Danach wurde die Gelkante mit 1 x TBE-Puffer gespült, ein Haifischzahnkamm eingesetzt und 1 µl der verdünnten Proben je Spur aufgetragen. Jede Proben wurde in verschiedener Konzentration zum Auftragen verdünnt. Die Zusammensetzung der Auftrugsmischung lauteten wie folgt:

Verdünnung	Komponenten
1:5	2 µl PCR-Produkte + 9 µl H_2O +2 µl Lade-Puffer
1:7.5	2 µl PCR-Produkte + 13 µl H_2O +2 µl Lade-Puffer
1:10	2 µl PCR-Produkte + 18 µl H_2O +2 µl Lade-Puffer

Die Proben wurden über Nacht elektrophoretisch bei 1500 V aufgetrennt. Der anregende Laserstrahl des LI-COR-Automaten strahlt auf der Höhe des Detektors in das Gel. Zur laserinduzierten Fluoreszenz sind jeweils die forward-Primer IRD800-markiert. Die vom Detektor gewonnene Signale werden zur Darstellung des Bandenmusters an den Computer übermittelt. Die anschliessende Dokumentation und Auswertung erfolgte mittels der serienmäßigen LI-COR-Software und der ONE-Dscan-Software.

2.16 Proteinanalyse

2.16.1 Herstellung der Proteinlysate

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden 2 ml Proteinlysepuffer auf eine mit PBS gewaschene Kulturschale gegeben und 1 h auf Eis geschwenkt. Anschliessend wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefässes abgeschabt und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Spritze weiter homogenisiert.

2.16.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden 10 µl des Lysats auf einer ELISA-Platte mit 4 µl der Pierce BCA-Protein Assay enthaltenen Lösung A und 196 µl Lösung B vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen. Als Proteinstandard diente eine Albumin-Verdünnungsreihe. Die Konzentration der zu untersuchenden Proben wurde über die Standardreihe berechnet.

2.16.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Denaturierung der Proteine wird durch einen SDS-haltigen Ladepuffer erreicht. Zur Auflösung von Disulfidbrücken des Proteins durch Reduktion enthält dieser Puffer zusätzlich Mercaptoethanol, damit das Protein linearisiert ist. Durch Bindung des negativ geladenen SDS an die Hauptketten des Proteins erhält dieser Komplex eine negative Ladung, damit alle Proteine zum Pluspol wandert. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins wird vernachlässigbar. Die denaturierten Proteine werden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt.
Für den Gellauf wurde zunächst ein 15%-iges Polyacrylamidgel zwischen zwei 6,2 x 8,7 cm Glasplatten gegossen und sofort mit Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde die Gelfront mit destilliertem Wasser gewaschen. Ein Kamm wurde eingesetzt und die Sammelgellösung luftblasenfrei auf das Trenngel pipettiert. Nach Entnahme des Kamms wurden in der Laufkammer die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein mit 2.5 µl Lämmli-Puffer (5x) vermischt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend in der Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 150 V, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

2.16.4 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel weiter für den Proteinblot verwendet. Für die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Immobilon^{TM}-P-Membran wurde das Tankblotting-Verfahren angewendet. Zwischen beide Teile der Gitterkammer wurde ein „sandwich", bestehend aus einem Transferkissen, einer Lage Whatman Papier, das in 100% Methanol getränkt wurde, PDVF-Membran, dem SDS-Gel, einer weiteren Lage Whatman Papier und dem zweiten Transferkissen, gelegt. Der Blotvorgang erfolgte für etwa 1,5 h bei 150 V.

2.16.5 Immundetektion

Unspezifische Bindungsstellen der Blotmembran wurden bei 4°C über Nacht mit 10% (w/v) Milchpuffer abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (ID4(H-70); ID4(L-20)) erfolgte in 5% Milchpulver in TBS bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Durch dreimaliges zehnminütiges Waschen mit 0,1% Tween 20 in PBS wurden ungebundene, überschüssige Antikörper-Moleküle entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem anti-rabbit Sekundärantikörper (1:5000 in TBS/5% Milchpulver) für 1 Stunde unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss an eine dreifache Waschung wurde die Peroxidasereaktion mit einem lumineszierenden Farbstoff gestartet. Hierfür wurden die ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 (1:1) gemischt und die Membran darin für 1 min geschwenkt. Die Membran wurde luftblasenfrei in Folie verpackt und in der Dunkelkammer gegen Röntgenfilme exponiert. Die Belichtungszeit variierte in der Arbeit von 5 min bis zu 1 h.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionanalyse von Genen im Chromosomenabschnitt 6p22 auf *mRNA-Ebene*

3.1.1 Untersuchung durch Standard-RT-PCR

Als Grundlage dieser Arbeit sollte zunächst die Stärke der Expression von *E2F3, ID4* und *DEK* in 16 Harnblasenkarzinom (TCC)-Zelllinien über RT-PCR untersucht werden. Als Kontrolle für normale Expressionsstärke wurde RNA aus normalen Uroepithelzellen (UP-Kontrolle) herangezogen. Da das ID4-Protein überwiegend im Nervensystem und Keimzellen auftritt [Yokota, 2001], wurde bei *ID4* eine Hoden-RNA als Kontrolle in Relation gesetzt. Die Hoden-Kontrolle zeigte ein vergleichsweise starkes *ID4*-Signal. Um die Intensität der Gene-Expression besser einschätzen zu können, wurde gleichzeitig ein Sequenzabschnitt des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in der RT-PCR amplifiziert. Zur Auswertung wurden die Proben auf einem 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und fotografisch dokumentiert.

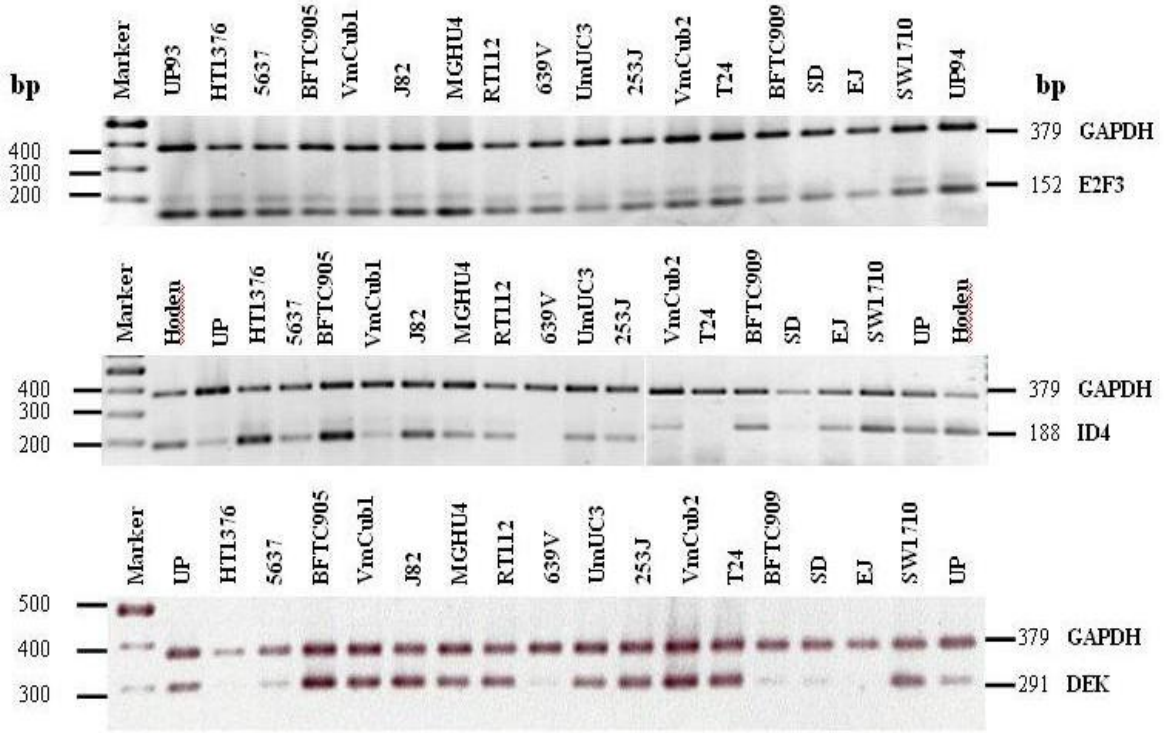


Abbildung 3-1: Expressionsstärke von E2F3, ID4 und DEK im Vergleich zu GAPDH in TCC-Zellininen

Die Abb.3-1 zeigt, dass *E2F3* deutlich in drei (HT1376, 5637, J82) von insgesamt 16 untersuchten Zelllinien (19%) vermehrt exprimiert wird. Im Vergleich der Hoden-Kontrolle

zeigten drei Zelllinien (HT1376, BFTC905, J82) von insgesamt 16 (19%) eine Erhöhung der *ID4*-Expression. Bei *DEK* ergaben nur zwei (BFTC905, VmCub2) von 16 untersuchten Zelllinien (13%), eine erhöhte Expression als Hinweis auf eine mögliche Amplifikation.

3.1.2 Untersuchung durch Real-time-RT-PCR

3.1.2.1 Real-time-RT-PCR in Harnblasenkarzinom-Zellinien

Um exakt die Expression der drei Gene (*ID4, E2F3, DEK*) auf Chromosom 6p22 auf der Ebene der mRNA feststellen zu können, wurde die wesentlich sensitivere Real-Time-RT-PCR-Methode zur Expressionsanalyse eingesetzt. Neben den 16 Harnblasenkarzinom-Zelllinien (wie bei der Standard RT-PCR) wurden 6 normale Harnblasengewebeproben und 28 Harnblasenkarzinomproben zusätzlich untersucht. Der Transkriptnachweis erfolgte mit entsprechenden Primern *ID4, E2F3* und *DEK* im Vergleich zu β-Aktin.
Bei der Berechnung der *E2F3* und *DEK* mRNA Expression wurde der Durchschnittswert der beiden UP-Kontrollen als „1“ eingesetzt und bei *ID4* wurde der Wert der stabiler messbaren normalen Hodengewebeprobe 40B als „1“ gesetzt (durch den Bezug auf die Expression im Hoden erscheinen die ID4 Werte relativ niedrig). Die mRNA-Expression wurde in willkürlichen Einheiten (AU) bestimmt.

Eine Zusammenfassung der Real-time-RT-PCR-Ergebnisse für alle untersuchten Zelllinien und Gewebeproben gibt die nachfolgende Tabelle (Tab.3-1):

TCC-Zellinie	mRNA Expression			Tumor Gewebe-Nr	mRNA Expression		
	E2F3	ID4	DEK		E2F3	ID4	DEK
HT1376	4.88	5.56	4.88	**3**	5.59	0.48	4.88
5637	33.59	0.33	1.58	**6**	10.37	0.36	1.37
BFTC905	2.13	0.47	3.46	**12**	1.73	0.04	1.99
VmCub1	0.37	0.34	0.87	**28**	3.73	0.24	2.27
J82	6.43	1.79	4.68	**41**	11.69	0.49	3.29
MGHV4	0.44	0.09	0.78	**47**	3.75	0.19	1.84
RT112	3.88	0.68	8.60	**52**	2.86	0.25	1.43
639V	1.37	0.00	0.37	**55**	1.25	0.18	0.52
UmUc3	1.16	0.15	3.99	**61**	1.98	0.12	1.48
253J	0.44	0.10	1.80	**62**	1.60	0.54	0.72
VmCub2	1.89	0.03	2.62	**64**	3.34	0.11	1.26
T24	6.88	0.00	4.05	**67**	4.38	0.33	1.50
BFTC909	0.43	0.09	0.28	**69**	2.17	0.14	1.19
SD	0.97	0.03	0.42	**104**	1.49	0.24	0.72
EJ	0.47	0.18	0.21	**105**	3.80	0.27	1.88
SW1710	1.20	0.24	1.87	**109**	2.14	0.23	0.30
				111	2.24	0.52	0.61
				115	1.74	0.12	0.84
				120	3.12	0.15	0.66
				150	0.54	0.20	0.86
				168	1.68	0.12	1.42
				170	0.58	0.08	0.27
				172	1.73	0.13	0.85
				205	0.36	0.10	0.17
				212	0.62	0.16	0.79
				224	4.29	3.39	1.87
				231	13.04	1.11	1.59
				243	4.42	0.97	0.74
				246	3.07	0.27	1.29
Kontrollen				**Normales Gewebe-Nr**			
UP93	0.89	0.03	1.16	**15**	1.30	0.23	0.55
UP94	1.12	0.04	0.87	**32**	4.71	0.26	2.55
Hoden 40A	1.66	0.75	0.49	**127**	0.98	0.20	0.49
Hoden 40B	1.41	1.00	0.58	**253**	0.33	0.09	0.17
				257	0.30	0.14	0.31
				259	0.45	0.21	0.79

Tabelle 3-1: Berechnete Real-Time-RT-PCR Werte für ID4, E2F3, und DEK in TCC-Zelllinien und Gewebeproben; UP93 und UP94: normalen Uroepithelzellen; Hoden 40A: Hodentumor-Gewebe; Hoden 40B: normales Hodengewebe; Einheit der Werte:Arbitrary Units (AU), wie im Text definiert.

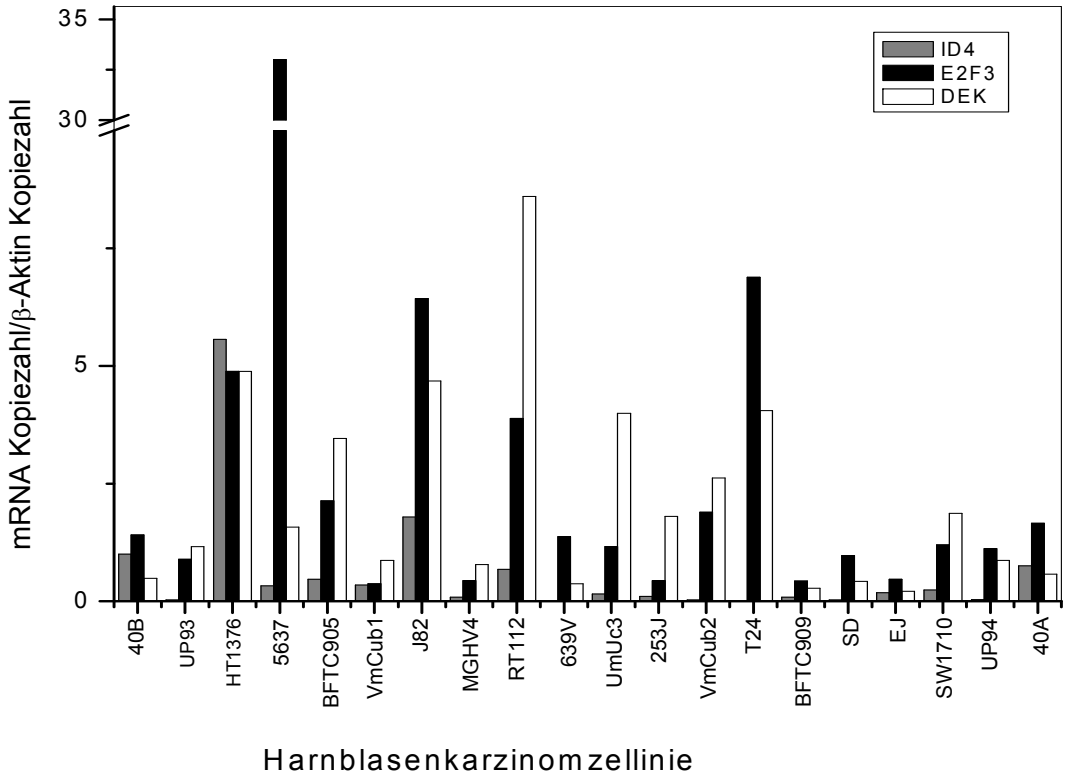


Abbildung 3-2: 6p22 Gen-Expression (ID4, E2F3, DEK) in Bezug zu Kontrollen bei Harnblasenkarzinom-Zelllinien. Graue Säulen: ID4 (AU); Schwarze Säulen: E2F3(AU); Weiße Säulen: DEK.

In Abb.3-2 ist die Expression der drei Gene auf 6p22 in Harnblasenkarzinom-Zelllinien in einem Diagramm verglichen. Dargestellt sind neben 16 Harnblasenkarzinom-Zelllinien noch 2 Kulturen normaler Uroepithelzellen (UP93 und UP94) und 2 Hodengewebeproben (40B: normal; 40A: Tumor). Der höchste Wert für die *ID4* mRNA lag bei 5.56 in Zelllinie HT1376, die ca 159-fach im Vergleich zur UP-Kontrolle gesteigert ist. Wenn das mehr als Zweifache der Durchschnittswerte der beiden UP-Kontrollen als Überexpression bewertet wird, ergaben zwölf Harnblasenkarzinom-Zelllinien (75%) Überexpression von *ID4*. Nach diesem Einteilungsprinzip erkennt man für *E2F3* bei sechs Harnblasenkarzinom-Zelllinien (38%) Überexpression, am stärksten in Zelllinie 5637 mit einen ca. 34-fachen Anstieg. In sechs Zelllinien (38%) stieg das *DEK*-Expressionsniveau, der höchste Wert in RT112 lag es bei dem ca. Neunfachen. Vier der 16 (25%) untersuchten Harnblasenkarzinom-Zelllinien zeigten eine Überexpression aller drei mRNAs. Diese waren HT1376, BFTC905, J82 und RT112. Die übrigen Zelllinien zeigten für eine oder zwei mRNAs Überexpression, nur die Zelllinie 639V zeigt keine starke mRNA-Expression einer der drei Gene.

3.1.2.2 Korrelationen zwischen der *ID4, E2F3* und *DEK* mRNA-Expression

Um einen möglichen linearen Zusammenhang zwischen mRNA Expressionen in einer einzigen Maßzahl auszudrücken, wird ein Korrelationskoeffizient berechnet, der als Pearson'scher Korrelationkoeffizient (*r*) bezeichnet wird. Der Koeffizient nimmt Werte zwischen +1 und -1 an. Je größer der absolute Wert des Koeffizienten ist, desto stärker ist der lineare Zusammenhang zwischen den Variablen. Man kann sich an folgenden Richtwerten orientieren, die jedoch nicht als klare Grenzwerte, sondern bestenfalls als Orientierungshilfen zu verstehen sind.

Betrag des Korrelationskoeffizienten	**Mögliche Interpretation**
0	Keine Korrelation
über 0-0.2	Sehr schwache Korrelation
0.2-0.4	Schwache Korrelation
0.4-0.6	Mittlere Korrelation
0.6-0.8	Starke Korrelation
0.8-unter 1	Sehr starke Korrelation
1	Perfekte Korrelation

Tabelle 3-2: Richtwerte des Pearson'schen Korrelationkoeffizients

Auch wenn vier Zelllinien sämtliche drei Gene überexprimierten, gab es keine starke Korrelationen zwischen *ID4* und *E2F3*. Der Pearsons *r* zwischen *ID4* und *E2F3* war 0.08 (Abb.3-3 links), der einen sehr schwachen linearen Zusammenhang anzeigt. Die Divergenz wird grundsätzlich durch die jeweilige Überexpression in Zelllinien HT1376 und 5637 bestimmt, die separat eine starke Überexpression von *ID4* und *E2F3* zeigten. Der Pearsons *r* zwischen *ID4* und *DEK* betrug 0.39 (Abb.3-3 rechts), was einen schwachen linearen Zusammenhang anzeigt. In Zellinie RT112 wird *DEK* deutlich vermehrt exprimiert, aber die Erhöhung der *ID4*-Expression ist nur mäßig erhöht.

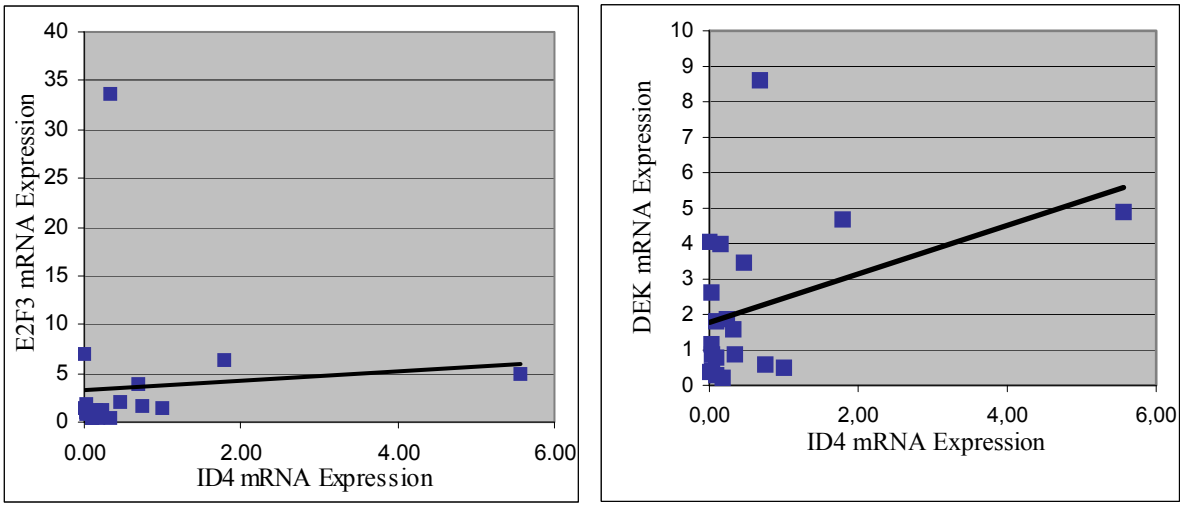


Abbildung 3-3: Korrelation der ID4 mRNA Expression und E2F3 bzw.DEK mRNA Expression in Harnblasenkarzinom-Zelllinien. Links: ID4 gegen E2F3 (r=0.08); Rechts: ID4 gegen DEK (r=0.39)

3.1.2.3 Real-time-RT-PCR in Harnblasenkarzinom-Gewebeproben

Zur weiteren Analyse der mRNA-Expressionen wurden 28 Tumorgewebeproben und 6 morphologische normale Gewebeproben mit der Real-time-RT-PCR untersucht. Die Expressionsniveaus wurden im Vergleich zu UP-Kontrollen und Aktin-RT-PCR in willkürlichen Einheiten berechnet (Tab.3-1). In Abb.3-4 ist der Vergleich der drei 6p22 Gen-mRNA-Expressionen in den Harnblasenkarzinom-Gewebeproben dargestellt. Wenn 2 Arbitrary Units als Schwellenwert für eine Überexpressions verwendet wird, wird *E2F3* in 16 von insgesamt 29 untersuchten Tumorproben (55%) vermehrt exprimiert. Nur in 3 von insgesamt 29 Tumorproben kann es zu einer Erhöhung der *DEK*-Expression (10%). Tumorgewebeproben 3, 6, 41, 224, 231, 241 zeigen eine Überexpression aller drei Gene oder zweier Gene. Interessant ist, dass nahezu sämtliche Gewebeproben mehr als zweifach den UP-Wert von *ID4* exprimieren, sogar normale Gewebeproben. Es ist zu berücksichtigen, dass das normales Gewebe Nr.32 auch eine Erhöhung der *E2F3* und *DEK*-Expression aufweist. Da normales Gewebe in der Nähe des Tumorgewebes gewonnen wird, ist es möglich, dass in dem um den Tumor herum liegenden Gewebe *ID4* ebenfalls überexprimiert werden kann, obwohl das Gewebe histologisch normal erscheint.

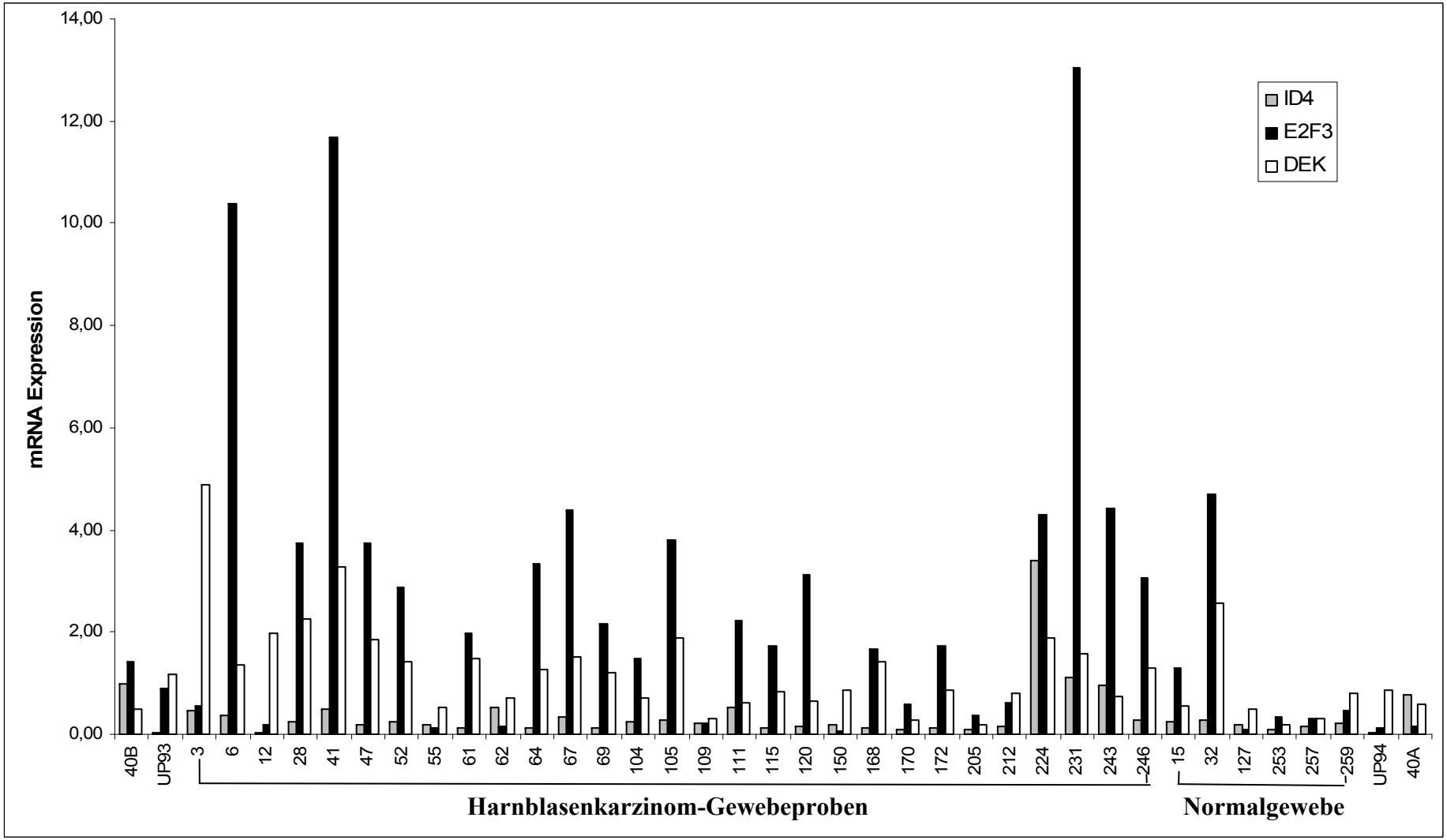


Abbildung 3-4: Real-Time-RT-PCR Analyse der Gene-Expression (ID4, E2F3, DEK) von Harnblasenkarzinomgeweben in Bezug zu Kontrollen. UP93 und UP94: normale Uroepithelzellen; 40B: normales Hodengewebe; 40A: Hodentumorgewebe; Nr.15, 32, 127, 253, 257, 259 auf der rechten Seite der Abbildung sind normale Gewebeproben; Graue Säulen: ID4 (AU); Schwarze Säulen: E2F3 (AU); weiße Säulen: DEK (AU).

Zur Darstellung der unterschiedlichen Expressionen zwischen Tumorproben und normalen Proben wurden die Boxplot-Darstellung benutzt, die einen schnellen Überblick über die Häufigkeitsverteilung von numerischen Werten liefern. Für jeden einzelnen Boxplot müssen 5 Werte berechnet werden, nämlich Median, unteres und oberes Quartil, Minimum und Maximum (wie Tab.3-3.). Zwischen Median und dem jeweiligen Quartil liegen dabei je 25% der Verteilung .

mRNA		Maximum	Oberes Quartil	Median	Unteres Quartil	Minimum
E2F3	N	4.71	1.22	0.715	0.36	0.3
	T	13.04	3.74	2.24	1.66	0.36
DEK	N	2.55	0.73	0.52	0.355	0.17
	T	4.88	1.59	1.26	0.72	0.17
ID4	N	0.26	0.225	0.205	0.155	0.09
	T	3.39	0.36	0.23	0.04	0.04

Tabelle 3-3: Statistische Analyse „Boxplots“ der 6p22 Genexpression im Harnblasenkarzinom-Gewebeproben

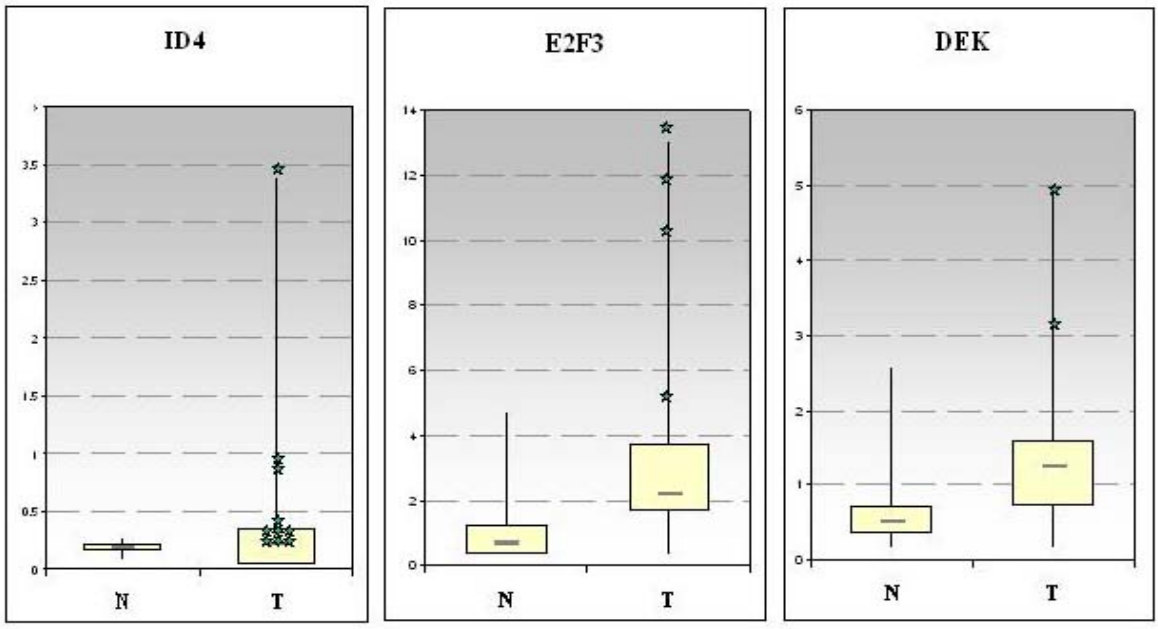


Abbildung 3-5: Boxplot Analyse der 6p22 Genexpression im Harnblasenkarzinom-Gewebeproben. N: Normale Gewebeproben; T: Tumorproben; die drei Boxplots haben verschiedene Skalen auf der Y-Achse.

Abbildung 3-5 zeigt die Boxplots der mRNA Expression der drei Gene *ID4, E2F3* und *DEK* entsprechenden Daten in Tabelle 3-3.

Während die *E2F3* mRNA-Expression in den normalen Geweben zwischen 0.3 AU und 4.71 AU lag (Mittelwert 0.72 AU), betrug die *E2F3* Expression in den Tumorproben zwischen 0.36 AU und 13.04 AU (Mittelwert 2.24 AU). Der Mittelwert der Tumorproben erhöhte sich ca. dreifach gegenüber den Mittelwert der normalen Gewebe. Im T-Test Vergleich konnte eine statistische Signifikanz ermittelt werden ($p=0.039 < 0.05$).

Der Mittelwert der Tumorproben von *DEK* war ca. 2.5-fach gegenüber den Mittelwert der normalen Gewebe erhöht. Bei dem Vergleich konnte aber keine statistische Signifikanz ermittelt werden ($p=0.23 > 0.05$).

Der Mittelwert der *ID4* mRNA Expression zeigt keinen deutlichen Unterschied zwischen den Tumorproben und den normalen Geweben. Einige Proben wiesen aber sehr hohe *ID4* mRNA Expression auf mit einem Maximum von 3.39AU, das ca. 17-fach höher als der Medianwert der normalen Gewebe lag.

3.1.2.4 Korrelationen zwischen mRNA-Expression und der Tumor-Klassifikation

Die *ID4*- und *DEK*-mRNA Expression im Vergleich zu dem Tumorstadium bzw. Tumorgrade sind in den Tab.3-4 aufgeführt.

Tumor ID	Stadium	Grad	ID4 mRNA Expression (AU)	DEK mRNA Expression (AU)
41	pTa	G2	0.49	3.29
105	pTa	G2	0.27	1.88
104	pT1	G2	0.24	0.72
120	pT2	G2	0.15	0.66
170	pT2	G2	0.08	0.27
212	pT2a	G2	0.16	0.79
224	pT2a	G2	3.39	1.87
67	>pT2	G3	0.33	1.50
231	>pT2	G2	1.11	1.59
12	pT3a	G3	0.04	1.99
115	pT3a	G3	0.12	0.84
150	pT3a	G3	0.20	0.86
168	pT3a	G3	0.12	1.42
172	pT3a	G3	0.13	0.85
205	pT3a	G2	0.10	0.17
3	pT3b	G2	0.48	4.88
6	pT3b	G3	0.36	1.37
28	pT3b	G3	0.24	2.27
47	pT3b	G3	0.19	1.84
52	pT3b	G3	0.25	1.43
61	pT3b	G2	0.12	1.48
62	pT3b	G3	0.54	0.72
64	pT3b	G3	0.11	1.26
69	pT3b	G3	0.14	1.19
111	pT3b	G2-3	0.52	0.61
55	pT4a	G3	0.18	0.52
109	pT4a	G3	0.23	0.30
246	pT4a	G3	0.27	1.29
15	Normales Gewebe		0.23	0.55
32	Normales Gewebe		0.26	2.55
127	Normales Gewebe		0.20	0.49
253	Normales Gewebe		0.09	0.17
257	Normales Gewebe		0.14	0.31
259	Normales Gewebe		0.21	0.79

Tabelle 3-4: ID4- und DEK-mRNA Expression (AU) in Tumorgewebe und normalen Geweben

Korrelationen zwischen *ID4* mRNA-Expression und der Tumor-Klassifikation

Im Hinblick auf das Tumorstadium lässt sich keine eindeutige Tendenz erkennen, wenn die Tumorstadien pT1, pT2, pT3 und pT4 betrachtet werden. In verschiedenen Tumorstadien lag die mRNA Expression meist im Bereich 0.1-0.5 AU (Abb.3-6). Der Mittelwert der pT3, pT4 und normaler Gewebe war fast gleich. Der Mittelwert der pT1 und pT2 Tumoren war erhöht gegenüber normalen Geweben (Tab.3-5), weil eine pT2 Probe (Nr.224) eine mehr als 17-fach erhöhte *ID4* mRNA Expression aufwies.

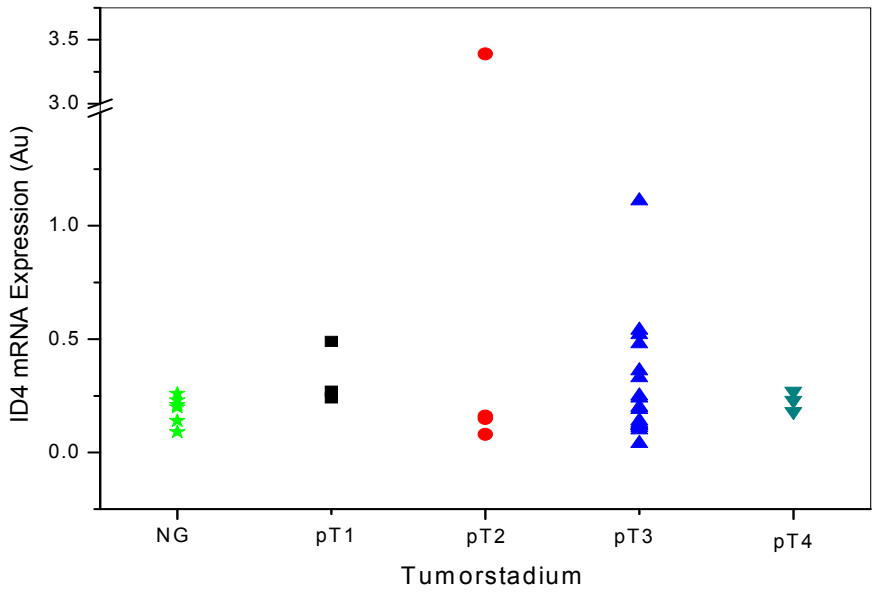


Abbildung 3-6: ID4 mRNA Expression in verschiedenen Tumorstadien. NG=normale Gewebe

	Mittelwert (AU)
Normale Gewebeproben	0.19
pT1	0.33
pT2	0.87
pT3	0.22
pT4	0.22

Tabelle 3-5: Verhältnis Mittelwert ID4 mRNA Expression zu Tumorstadium

Da nahezu sämtliche Gewebeproben mehr als zweifach den UP-Wert von *ID4* exprimieren, wurde die *ID4*-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu dem Medianwert der normalen Gewebe analysiert. Der Mittelwert der *ID4* mRNA Expression in normalen Gewebe ist 0.19

AU. Weniger als 0.20 AU wird als normale Expression, 0.20-0.40 AU als erhöhte Expression und mehr als 0.40 AU als starke erhöhte Expression einteilt.

	***ID4* mRNA Expression (AU)**			Gesamt
	<0.20	0.20-0.40	>0.40	
<pT1	-	2	1	3 (11%)
pT2	3	-	1	4 (14%)
pT3	9	5	4	18 (64%)
pT4	1	2	-	3 (11%)
Gesamt	13 (47%)	9 (32%)	6 (21%)	28

Tabelle 3-6: Verhältnis ID4 mRNA Expression zu Tumorstadium

Im Vergleich der *ID4* mRNA Expression mit dem Stadium der Tumoren (Tab.3-6), war in einem Großteil (47%) der Tumorproben keine erhöhte Expression gegenüber normalen Geweben zu sehen. 6 (21%) Proben wiesen eine stark erhöhte *ID4* mRNA Expression auf, 3 von 3 (100%) oberflächlichen Tumoren (pTa-pT1), 1 von 4 (25%) der pT2-Tumoren, 9 von 18 (50%) der pT3-Tumoren und 2 von 3 (67%) der pT4 wiesen eine erhöhte *ID4* mRNA-Expression auf. Es werden keine deutliche Korrelation zwischen *ID4* mRNA Expression und Tumorstadium erkennbar.

	***ID4* mRNA Expression (AU)**			Gesamt
	<0.20	0.20-0.40	>0.40	
G1	-	-	-	-
G2	5	2	4	11 (39%)
G3	8	7	2	17 (61%)
Gesamt	13 (46%)	9 (32%)	6 (21%)	28

Tabelle 3-7: Verhältnis ID4 mRNA Expression zu Malignitätsgrad

Bei der Korrelation der *ID4* mRNA Expression mit dem Differenzierungsgrad (Tab.3-7), wie in Tab.3-6 zu erkennen, zeigten 6 (54%) von 11 der mäßig differenzierten Tumorgewebe (G2) eine erhöhte *ID4* mRNA Expression, demgegenüber war das Gen in 9 (53%) von 17 der wenig differenzierten Karzinome (G3) überexprimiert. Demnach besteht kein Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und *ID4* mRNA Expression.

Korrelationen zwischen *DEK* mRNA-Expression und der Tumor-Klassifikation

In Tab.3-8 wurde für die *DEK* mRNA-Expression gezeigt, dass der Mittelwert der pTa und pT3 Tumoren erhöht gegenüber normalen Geweben war. Der Mittelwert der pT1, pT4 und normaler Gewebe war fast gleich.

	Mittelwert (AU)
Normale Gewebeproben	0.81
pTa	2.59
pT1	0.72
pT2	0.90
pT3	1.46
pT4	0.70

Tabelle 3-8: Verhältnis Mittelwert DEK mRNA Expression zu Tumorstadium

Im Vergleich der *DEK* mRNA Expression mit dem Stadium der Tumoren (Tab.3-9), war in einem Großteil (68%= 43%+25%) der Tumorproben eine erhöhte Expression gegenüber normalen Geweben zu sehen. 15 von 18 (83%) pT3-Tumorproben und 2 von 3 (67%) oberflächlichen Tumoren (pTa-pT1) wiesen eine erhöhte *DEK* mRNA Expression auf, demnach schien keine Korrelation zwischen *DEK* mRNA Expression und dem Tumorstadium zu bestehen.

	***DEK* mRNA Expression (AU)**			Geamt
	<0.81	0.81-1.62	>1.62	
<pT1	1	-	2	3 (11%)
pT2	3	-	1	4 (14%)
pT3	3	11	4	18 (64%)
pT4	2	1	-	3 (11%)
Gesamt	9(32%)	12 (43%)	7 (25%)	28

Tabelle 3-9: Verhältnis DEK mRNA Expression zu Tumorstadium

3.2 Genamplifikationsanalyse auf *DNA-Ebene*

3.2.1 Untersuchung von Mikrosatelliten mittels PCR

Um mögliche Gen-Amplifikationen in der Region Chromosom 6p22 nachweisen zu können, wurden mittels PCR die Gene flankierenden Mikrosatellitenmarker amplifiziert. Acht Mikrosatelliten neben den Genen *DEK, ID4, E2F3* wurden ausgewählt (Abb.3-7). Drei Mikrosatelliten-Marker D6S1946, D6S1453 und D6S1678 liegen telomerisch und centromerisch ganz nahe zum *ID4*-Locus. Der Marker D6S1228E ist ein intragenischer Mikrosatellit von Gen *ID4*. Die Entferungen zwischen D6S1678 und *ID4*, D6S1678 und *E2F3* betragen jeweils ca. 0.2 Mb und 0.35 Mb. D6S422 liegt am nächsten zum *E2F3*-Locus. Drei Mikrosatellitenmarker, D6S1567 (telomerisch ca. 0.8 Mb zu *DEK*), D6S285 (centromerisch ca. 0.35 Mb zu *DEK*) und D6S2051 (intragenischer Marker im Gen *DEK*), wurden ebenfalls gewählt. Da *ID4* im Zentrum dieser Arbeit stand, wurden v.a. Mikrosatelliten in und um dieses Gen untersucht. Amplifikationen von *E2F3* waren bereits in früheren Arbeiten untersucht worden [Evan et al. 2004; Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004]. Zwei Mikrosatelliten von Chromosom 12 (D12S1650) und Chromosom 15 (D15S127) wurden als Kontrollen gleichzeitig mit den untersuchten Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 6 in jeder PCR-Reaktion amplifiziert. Die Regionen beider Kontrollen werden selten von Chromosomenveränderungen in Harnblasenkarzinomen beeinflusst.

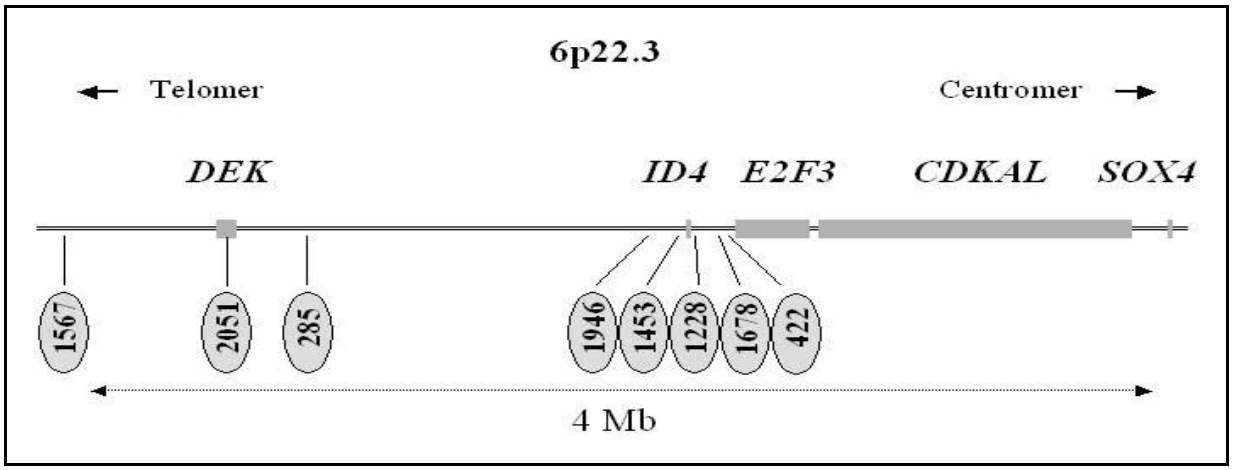


Abbildung 3-7: Gene und Mikrosatelliten in der Chromosom 6p22.3 Region

Die Dokumentation und Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte in einem automatisierten Infrarot-DNA-Elektrophoresesystem (LI-COR). Die Abbildung 3-8 zeigt als Beispiel die

PCR-Ergebnisse der Marker D6S285 und der Kontrolle D15S127 unter gleichen Reaktionsbedingungen.

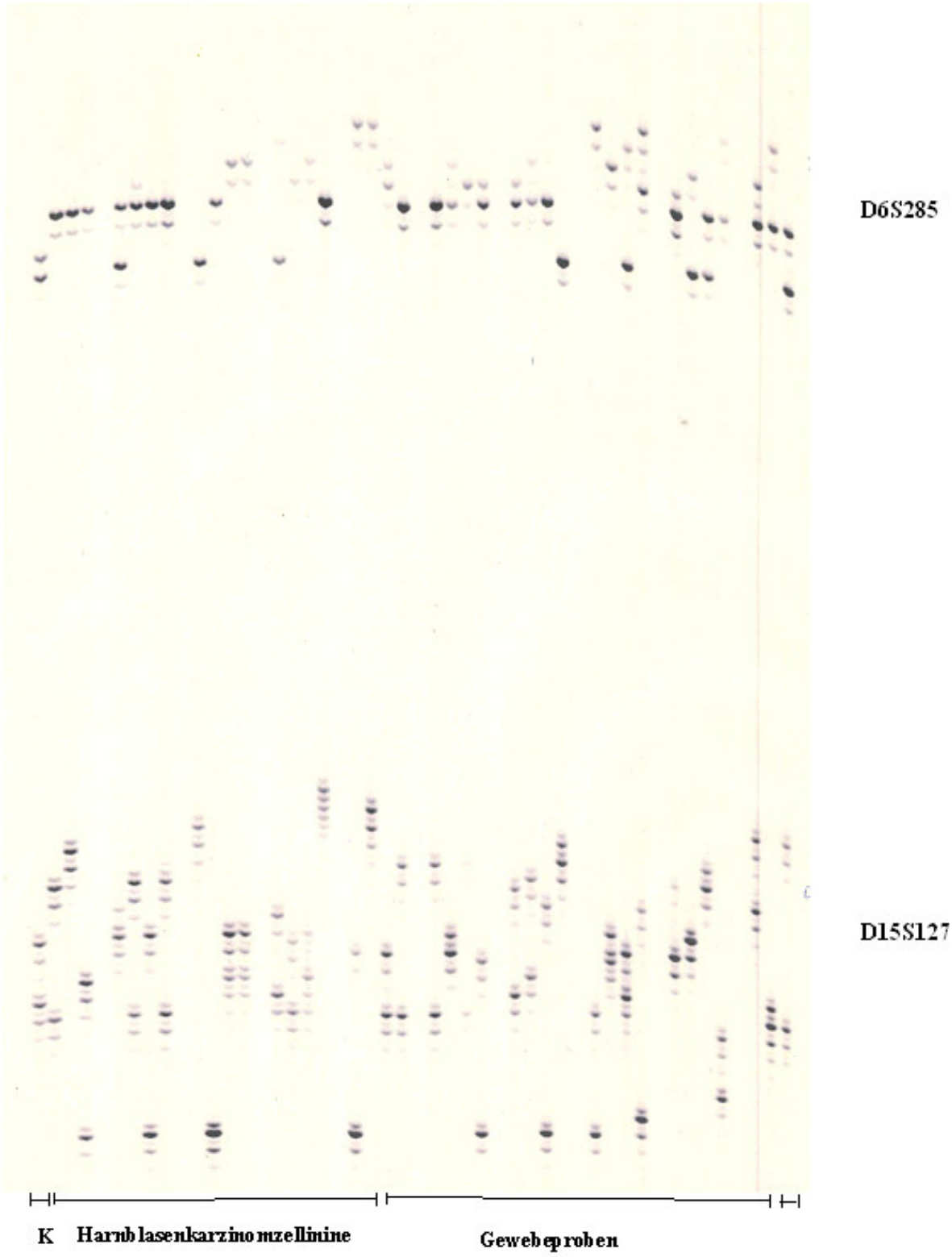


Abbildung 3-8: Expressionsstärke von Marker D6S285 im Vergleich zu D15S127 in TCC-Zelllininen und Gewebeproben. K:Kontrolle Leukozyten 749 (links) 795 (rechts); Harnblasenkarzinomzelllinien (von links nach rechts): 5637, BFTC905, VmCub1, J82, MGHU4, RT112, 639V, UmUc3, 253J, VmCub2, T24, BFTC909, SD, EJ, SW1710, HT1376, VmCub3; Gewebeproben (von links nach rechts): 2, 9, 13, 697, 23, 31, 38, 186, 52, 157, 119, 78, 82, 124, 85, 37, 132, 166, 42, 48.

Die Stärke der Signale in der PCR wurden mit Hilfe der ONE-Dscan-Software errechnet. Zwei DNAs aus Leukozyten, amplifiziert bei gleichen Bedingungen, dienten als Kontrolle. Die nach dem ONE-Dscan-Software errechneten willkürlichen Einheiten der Leukoyzten-DNA (Wert der untersuchten MS zu der Kontroll-MS) wurden als Referenzwert verwendet. Der Mittelwert der Referenzwerte der beide Leukoyzten wurde als Genkopienzahl „1“ definiert. Die relative Genkopienzahlen der untersuchten Proben können im Vergleich zu der Referenzwert der Leukoyzten errechnet wurden.

Tabelle 3-10 zeigt die relativen Genkopienzahlen der 8 Mikrosatellitenmarker in Harnblasenkarzinom-Zelllinen und Gewebeproben.

	D6S1567	**D6S2051**	**D6S285**	**D6S1946**	**D6S1453**	**D6S1228E**	**D6S1678**	**D6S422**
HT1376	6.03	1.30	0.24	12.98	8.75	8.52	13.25	1.39
5637	0.25	0.76	1.23	0.16	0.55	0.57	0.80	7.69
BFTC905	0.72	0.23	1.17	0.34	0.59	0.68	0.61	0.17
VmCub1	2.52	2.98	0.45	1.70	1.62	2.22	1.14	0.04
J82	2.56	2.24	2.86	2.76	1.79	3.70	1.89	0.26
MGHU4	0.98	1.14	0.98	0.58	0.50	0.86	0.17	0.30
RT112	1.56	6.50	0.52	0.35	0.73	0.87	0.53	0.40
639V	2.09	0.35	1.32	1.70	2.30	2.65	1.41	1.66
UmUc3	0.23	0.27	1.76	1.05	0.81	1.10	2.14	4.65
253J	0.98	1.11	0.14	0.26	0.81	1.39	0.33	0.04
VmCub2	0.37	0.32	0.66	0.19	0.35	0.30	0.32	0.55
T24	0.11	0.32	0.64	0.33	0.33	0.52	0.47	0.58
BFTC909	1.04	0.97	0.75	0.33	0.67	0.66	1.07	0.21
SD	0.42	0.64	0.45	0.89	0.36	1.18	0.55	0.54
EJ	0.66	0.56	0.58	0.44	0.87	0.77	1.10	1.77
SW1710	2.57	3.07	8.84	0.06	1.38	1.25	0.48	0.85
2	1.37	0.95	0.18	2.45	1.67	0.64	1.16	0.33
9	2.57	2.94	3.32	1.14	4.52	1.71	1.03	0.30
13	2.26	3.97	3.49	4.78	4.97	1.36	1.09	0.50
31	0.43	0.45	0.39	0.50	0.82	0.26	1.47	1.54
38	0.43	0.30	0.85	0.43	1.08	0.42	2.89	1.24
186	0.98	0.82	0.33	1.01	1.33	0.43	1.23	1.08
52	1.74	1.34	0.61	0.50	0.54	0.33	1.34	0.31
157	0.34	0.37	3.84	0.33	0.94	0.40	1.52	0.48
119	2.38	1.64	0.31	2.55	4.34	0.90	1.70	0.27
78	0.47	0.26	0.85	0.28	0.94	0.11	2.01	0.78
82	1.96	0.42	1.26	0.42	1.08	0.40	1.24	1.87
124	4.10	1.43	0.50	0.64	0.92	0.30	0.84	0.78
85	0.91	0.52	2.00	0.47	0.98	0.77	1.5	1.13
37	1.15	0.64	0.48	0.42	1.15	2.77	3.22	0.79
132	2.53	0.40	2.19	0.90	3.21	0.53	2.77	1.54
48	0.95	1.44	0.92	1.17	3.48	0.52	1.81	0.70

Tabelle 3-10: Relative Mikrosatelliten Genkopienzahl in Harnblasenkarzinom-Zelllinen und Gewebeproben. 2-48: DNA-Nr. der Harnblasenkarzinom/Gewebe. D6S1567-D6S422: Mikrosatellitenmarker auf Chr. 6p22.3.

Die PCR Ergebnisse demonstrieren eine deutliche Variation der Mikrosatelliten Genkopienzahl in verschiedenen Zellinien. Die Amplifikationsbereiche in jeder Zelllinien sind in Abb.3-9 dargestellt.

a.

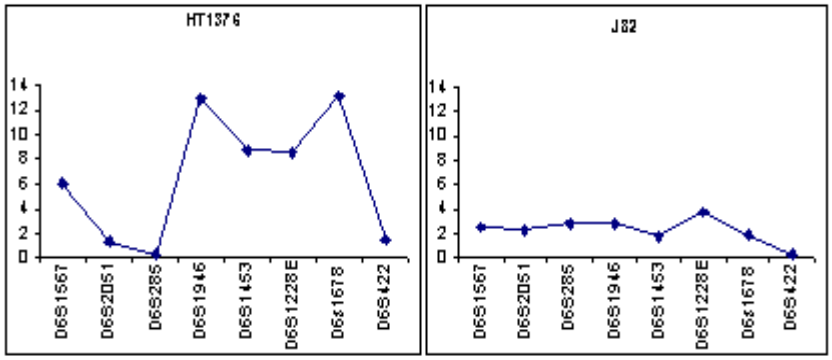


Abbildung 3-9a: Relative Genkopienzahl von acht Mikrosatelliten auf Chromosom 6p22.3 bei Harnblasenkarzinomzellinien HT1376 und J82; Y-Achse: Relative Genkopienzahl.

Abbildung 3-9a zeigt, dass in J82 und HT1376 nahezu sämtliche Mikrosatelliten amplifiziert vorliegen. Bei HT1376 können zwei Amplifikationssegmente bestimmt werden. Einer liegt telomerisch zum *DEK*-Locus und einer telomerisch und centromerisch am nächsten zum *ID4*-Locus. In der Literatur wird berichtet, dass die Zelllinie HT1376 auch überwiegend um die *E2F3* und *SOX4*-Loci Amplifikation aufweist [Feber et al., 2004]. Das bedeutet, dass es mindestens drei diskontinuierliche Amplifikationssegmente bei HT1376 gibt. Bei J82 ist die Genkopienzahl nahezu gleichmäßig an sämtlichen Mikrosatelliten erhöht außer dem Mikrosatelliten neben *E2F3*, obwohl *E2F3* mRNA in J82 vermehrt exprimiert wird.

b.

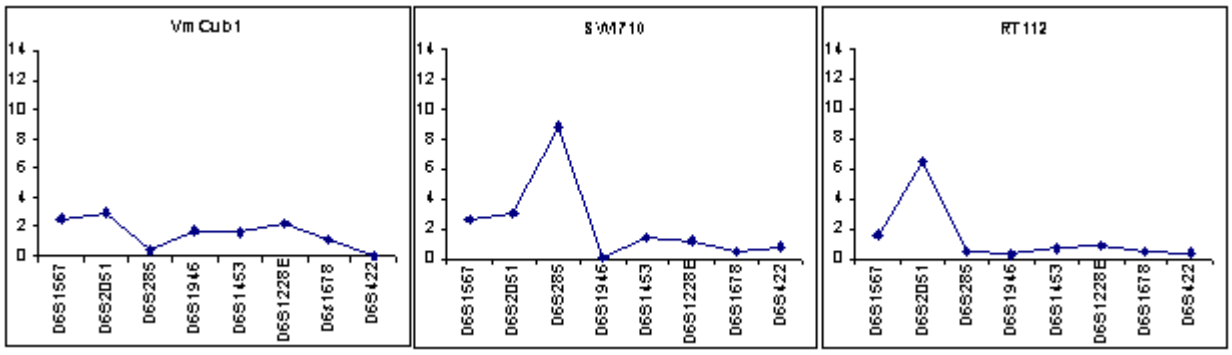


Abbildung 3-9b: Relative Genkopienzahl von acht Mikrosatelliten auf Chromosom 6p22.3 bei Harnblasenkarzinomzelllinien VmCub1, SW1710 und RT112; Y-Achse:Relative Genkopienzahl.

Abbildung 3-9b zeigt, dass in VmCub1 und SW1710 die Mikrosatelliten telomerisch und centromerisch um dem *DEK*-Locus amplifiziert sind, den intragenischen Mikrosatellit D6S2051 inbegriffen. Dennoch stieg das *DEK*-Expressionsniveau nicht bei diesen beiden Zelllinien. Im Gegenteil liegen in der Zelllinie RT112 sowohl starke *DEK*-Expression als auch vermehrte Genkopienzahl der um *DEK* liegenden Mikrosatelliten vor.

c.

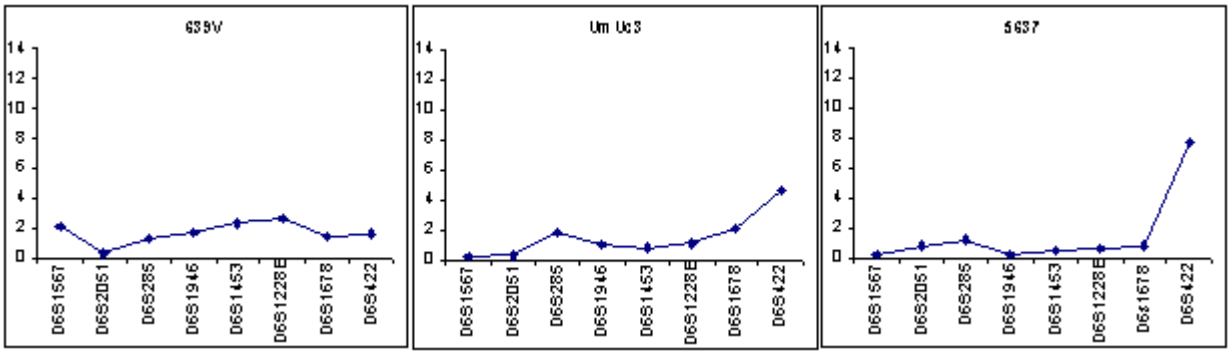


Abbildung 3-9c: Relative Genkopienzahl von acht Mikrosatelliten auf Chromosom 6p22.3 bei Harnblasenkarzinomzelllinien 639V, UmUc3 und 5637; Y-Achse:Relative Genkopienzahl.

In Abb.3-9c sind vier um *ID4* liegende Mikrosatelliten in den Zelllinie 639v und UmUc3 amplifiziert. 639v zeigte eine sehr schwache und UmUc3 eine starke *ID4* Expression. Folglich kann ein um *ID4* lokalisiertes Amplifikationssegment in UmUc3 bestimmt werden. Für 5637 wurde schon bestätigt [Feber et al., 2004], dass überwiegend der *E2F3* und *SOX4*-Locus amplifiziert vorliegt. Entsprechend erscheint auch der telomerisch am nächsten zum *E2F3*-Locus lokalisierte MS D6S422 stark amplifiziert.

d.

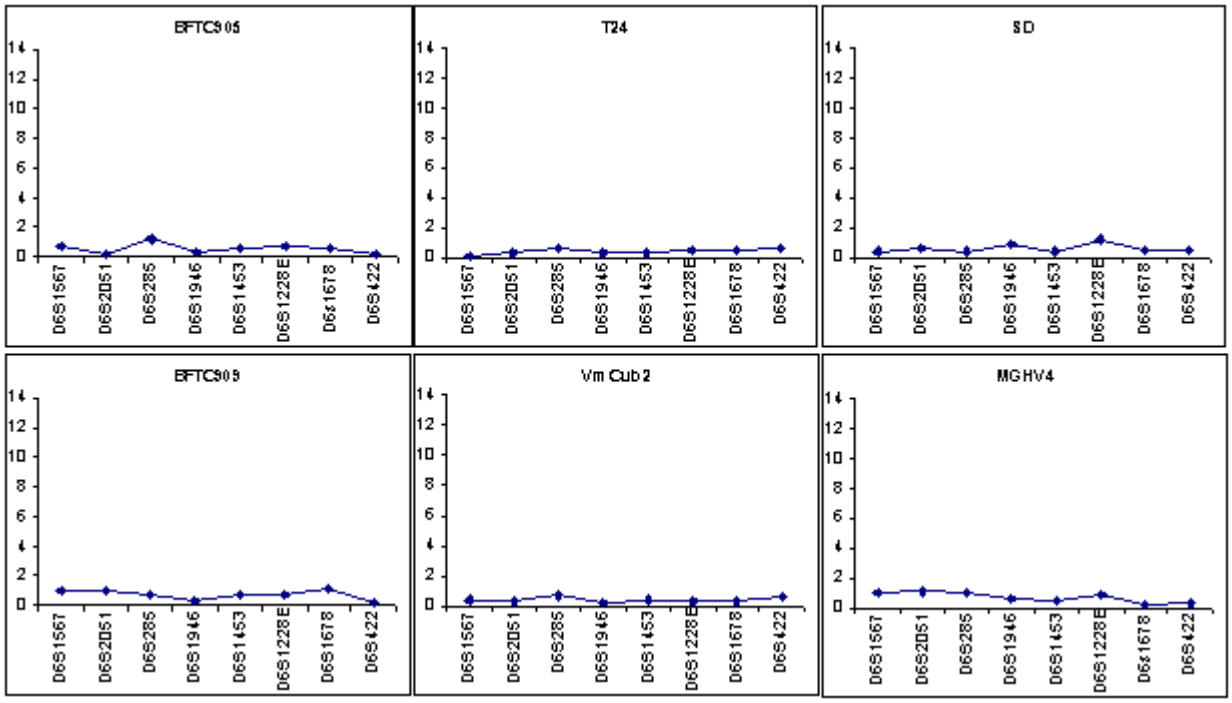


Abbildung 3-9d: Relative Genkopienzahl von acht Mikrosatelliten auf Chromosom 6p22.3 bei Harnblasenkarzinomzelllinien BFTC905, Vmcub2 und MGHU4; Y-Achse:Relative Genkopienzahl

Die Zelllinien in der Abb.3-9d zeigen keine signifikant amplifizierte MS-Genexpression. Interessant sind T24 und BFTC905. BFTC905 wies eine Überexpression aller drei mRNAs auf. T24 zeigte für zwei mRNAs Überexpression (*DEK* und *E2F3*).

Zusammenfassend erscheinen die Amplifikationssegmente auf dem Chromosom 6p22.3 sehr variabel. Drei unterschiedliche Segmente liegen offenbar telomerisch und centromerisch nahe am *DEK, ID4* und *E2F3*-Locus. Manchmal amplifizieren die Zelllinien eine oder zwei Segmente, oder sogar generell alle drei.

3.2.2 Verhältnis von Genkopienzahl und Genexpression

Zum Abschluss sind sämtliche bisher in den UCC-Zelllinien und einigen Tumorgewebeproben erzielten Resultate der einzelnen Analysen in einer Übersicht in Abb.3-10 zusammengefasst.

Die Abb.3-10 zeigt die Reihenfolge der insgesamt acht untersuchten Mikrosatellitenmarker und drei Gene auf Chromosom 6p22.3 als rote Säulen und grüne Rechtecke. Die Abstände der einzelnen Marker zueinander sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.
Diese Abbildung beinhaltet die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse, die als Kugeln dargestellt sind. Schwarze Kugeln bedeuten ein starkes Amplifikationsniveau der Mikrosatelliten, blaue Kugeln ein mittleres Amplifikationsniveau. Weiße Kugeln bedeuten keine Amplifikation und Genkopienzahl weniger als 1. Der Bereich 1-2 wurde als mittleres Amplifikationsniveau definiert, mehr als 2 wurden als starkes Genexpressionsniveau definiert.
Unter den jeweiligen Genen werden die Ergebnissen der RT-PCR als gefärbtes Rechteck dargestellt. Schwarze Rechtecke bedeuten eine starke mRNA Expression und AU mehr als 2. Weiße Rechtecke bedeuten eine normale mRNA Expression und AU weniger als 2.
Die Amplifikationssituationen sind sehr variabel. Einige Zelllinien (z.B. HT1376, J82) und Gewebe (Nr. 13, 9, 2) überexprimieren die drei Gene-Loci. In den anderen Zelllinien und Gewebeproben sind nur in ein oder zwei Gene oder Segmente betroffen.

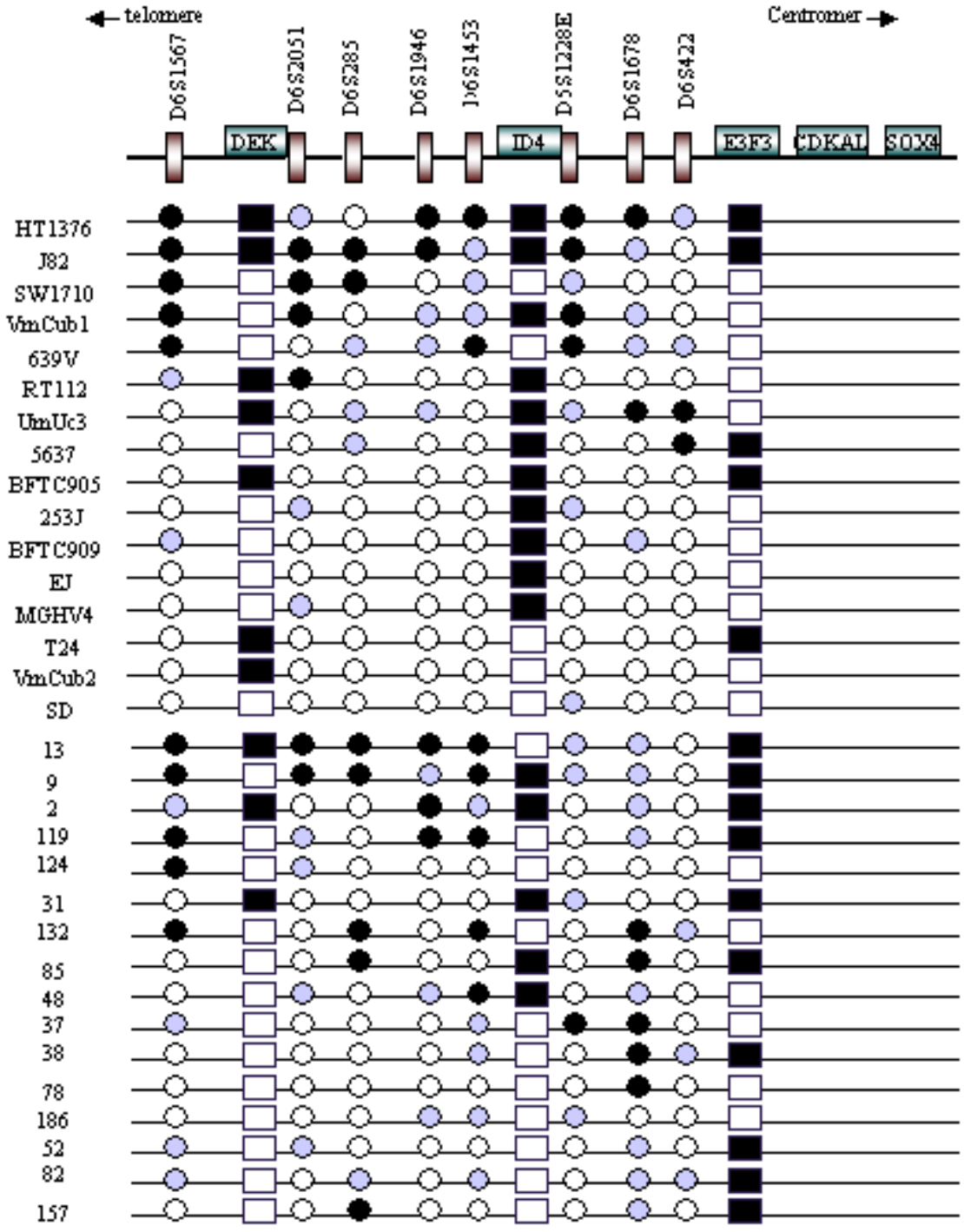


Abbildung 3-10: Gesamtübersicht über die Analysen in TCC-Zelllinien und Gewebeproben auf DNA- und RNA-Ebene; rote Säulen: Mikrosatelliten-Marker; grünes Rechteck: Gene auf Chromosom 6p22.3; schwarze Kugeln: starkes Amplifikationsniveau; blaue Kugeln: mittles Amplifikationsniveau; weiße Kugeln: keine Amplifikation; schwarze Rechtecke: starke mRNA Expression; weiße Rechtecke: normale mRNA Expression.

3.2.3 Korrelationen der 6p22 Mikrosatelliten Kopienzahl und mRNA-Expression benachbarter Gene

Um eine kausalen Zusammenhang zwischen mRNA Überexpression und DNA Amplifikation zu verfolgen, wurde der lineare Zusammenhang zwischen beiden Größen bestimmt. Dabei wurde der Pearson'sche Korrelationkoeffizient (*r*) berechnet.

3.2.3.1 Korrelationen der Mikrosatelliten Genkopienzahl und der *E2F3* mRNA-Expression

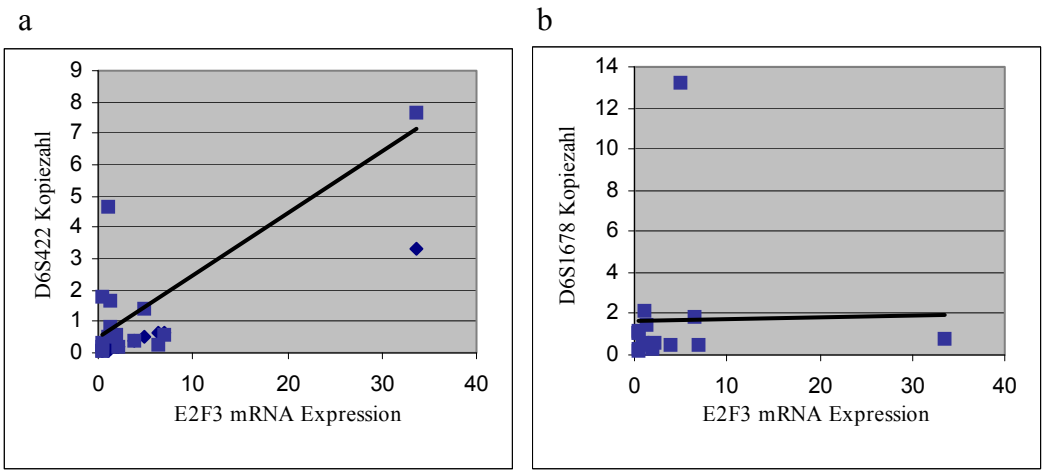


Abbildung 3-11: Korrelation der E2F3 mRNA Expression und Mikrosatelliten Kopienzahl in Harnblasenkarzinom-Zelllinien. a: links, E2F3 gegen D6S422 (r=0.79); b: rechts, E2F3 gegen D6S1678 (r=0.02).

D6S422 liegt nahe zum *E2F3*-Locus und die Entfernung zwischen D6S1678 und *E2F3* beträgt ca. 0.04 Mb. Der Pearsons *r* zwischen *E2F3* und D6S422 beträgt 0.79 (Abb.3-11a), was einen starken linearen Zusammenhang anzeigt. Im Gegenteil beträgt r zwischen *E2F3* und D6S1678 nur 0.02 (Abb.3-11b), was nahezu keine Korrelation anzeigt. Da keine Korrelationen zwischen *E2F3* und D6S1678, *ID4* und D6S422 bestehen, wird vermutet, dass im Segment zwischen D6S1678 und D6S422 die Grenze zwischen zwei Amplifikationssegmenten liegt.

3.2.3.2 Korrelationen zwischen Mikrosatelliten Kopienzahl und der *ID4* mRNA-Expression

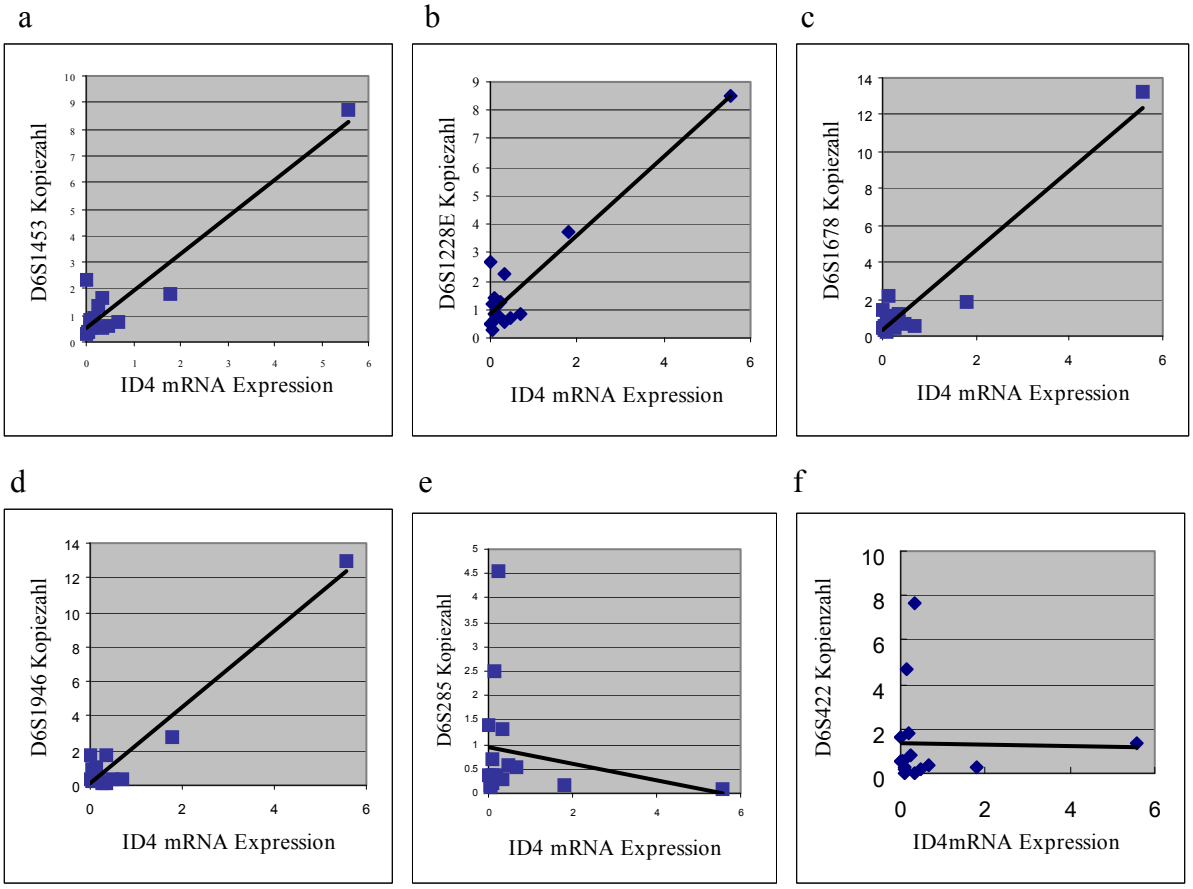


Abbildung 3-12: Korrelation der ID4 mRNA Expression und Mikrosatelliten Kopienzahl in Harnblasenkarzinom-Zelllinien. a: ID4 gegen D6S1453 (r=0.94); b: ID4 gegen D6S1228E (r=0.94); c: ID4 gegen D6S1678 (r=0.96); d: ID4 gegen D6S1946 (r=0.97); e: ID4 gegen D6S285(r=-0.20); f: ID4 gegen D6S422 (r=-0.02).

Zwölf Zelllinien zeigten Überexpressionen von *ID4* mRNA, und in einigen davon waren benachbarte Mikrosatelliten amplifiziert. Vier Mikrosatelliten-Marker D6S1946, D6S1453, D6S1228E und D6S1678 liegen telomerisch und centromerisch nahe zum *ID4*-Locus. Die Entfernung zwischen D6S1946 und D6S1678, die das Gen *ID4* umfassen, beträgt ca. 0.3 Mb. Es gibt eine starke Korrelationen zwischen Expression und Amplifikation. Der Pearson'scher Korrelationkoeffizient *r* zwischen *ID4* und der Mikrosatelliten liegt zwischen 0.94 bis 0.97 (Abb.3-12 a, b, c, d), was einen sehr starken linearen Zusammenhang anzeigt. Die starke Korrelationen wird grundsätzlich durch die Überexpression in Zelllinien HT1376 und 5637 bestimmt. Wenn die beiden Zelllinien abgezogen wurden, liegt keine so starke Korrelation vor. D6S285 und D6S422 liegen vom *ID4* Gen separat telomerisch 1.2 Mb und centromerisch 0.5 Mb entfernt. Offenbar wegen der weiten Entfernung gibt es keinen linearen Zusammenhang. Der Pearsons *r von* D6S285 und D6S422 Kopienzahl zu *ID4*-Genexpression liegt bei -0.20 und -0.02 (Abb.3-12 e, f).

3.2.3.3 Korrelationen der Mikrosatelliten Kopienzahl und der *DEK* mRNA-Expression

Abbildung 3-13 zeigt, dass die Mikrosatellitenmarker D6S2051 (intragenischer Marker von Gen *DEK*) mit *DEK* Expression in einen mittelstarken linearen Zusammenhang steht (r= 0.57) (Abb.3-13a.). Der Pearsons *r* zwischen D6S1567 (telomerisch ca. 0.8 Mb zu *DEK*) und *DEK* beträgt 0.08, der nur eine sehr schwache Korrelation anzeigt (Abb. 3-13b). Keine Korrelation wird zwischen D6S285 (centromerisch ca. 0.35 Mb zu *DEK*) und *DEK* angezeigt. Es wird vermutet, dass ein weiteres amplifiziertes Segment überwiegend in der Nähe und telomerisch vom *DEK*-Locus liegt.

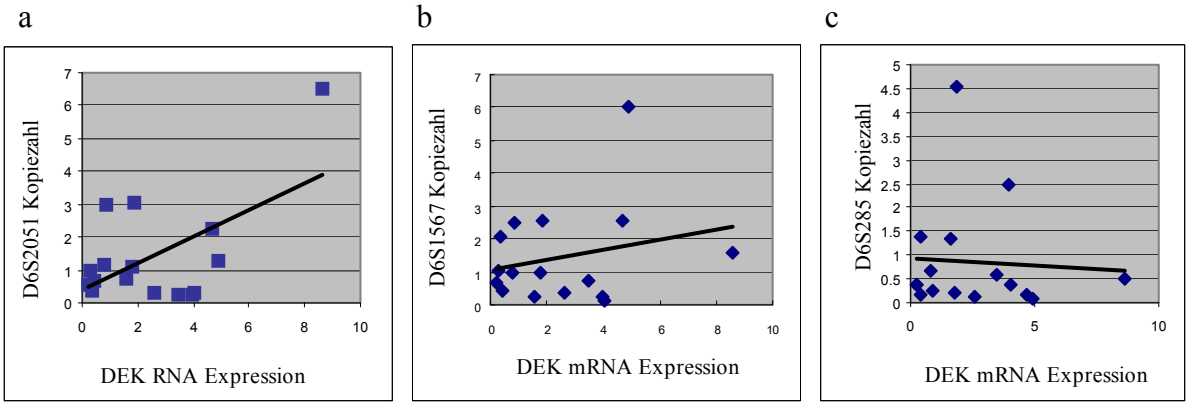


Abbildung 3-13: Korrelation der DEK mRNA Expression und Mikrosatelliten Kopienzahl in Harnblasenkarzinom-Zellinien. a: DEK gegen D6S2051 (r=0.57); b: DEK gegen D6S1567 (r=0.24); c: DEK gegen D6S285 (r=0.08).

3.3 Analyse von ID4 auf Proteinebene

Um die Expression des ID4 Protein zu verfolgen, ist ein spezifischer Antikörper *ID4* (H-70) verfügbar. In dieser Arbeit wurden Western-Blots von einigen Harnblasenkarzinom-Zellinien angefertigt, um einen spezifischen Nachweis des ID4-Proteins zu erbringen. Proteinlysate aus normalem Hodengewebe wurden gleichzeitig untersucht.

Wie die Ensembl Datenbank beschreibt, soll die Produktgröße beim Nachweis mit dem Antikörper ID4 (H-70) bei 16622 Da liegen. In der Westernblot-Analyse waren aber nur zwei Proteinbanden zwischen 55 kD und 72 kD (Abb.3-14 links) in UCC-Zellinien und Hodengewebe sichtbar. Das nachgewiesene Protein im Hodengewebe war etwas kleiner. Die Intensität der Bande in UCC-Zellinien und Hodengewebe war fast gleich. Es zeigte sich keine Bande in einer Höhe von 16 kD (Abb.3-14 links).

Um die Möglichkeit des technischen Fehlers auszuschließen, wurde ein anderer unabhängiger Antikörper gegen ID4 (L-20) bestellt und untersucht. Zusätzlich wurde noch zweifach Lämmlipuffer mit den Proteinlysaten vermischt, um Proteine noch sicherer zu denaturieren und verlässlich nach dem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Proteinbande blieb dennoch zwischen 55 kD und 72 kD. Die Intensität der Bande in UCC-Zellinien und Hodengewebe war wiederum fast gleich. Die Intensitäten der Banden in UCC-Zellinien 5637 und SD mit einem 10 fachen Unterschied in der RNA-Expression sind fast gleich (Abb.3-14 rechts).

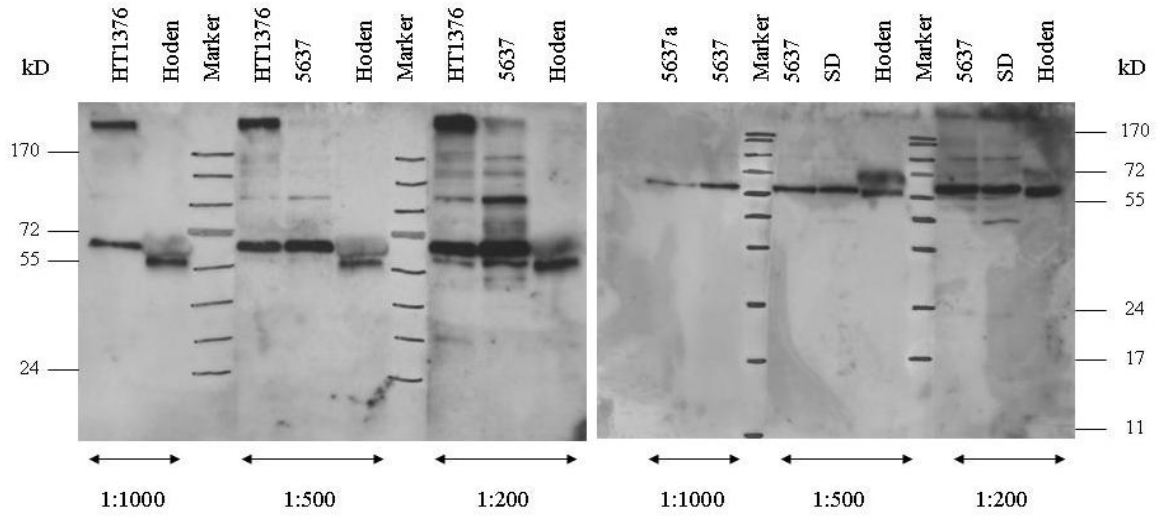


Abbildung 3-14: Westernblot-Analyse des ID4 Proteins in Harnblasenkarzinom-Zellinien und Hoden-Gewebe. Links: mit AK ID4 (H-70); rechts: mit AK ID4 (L-20); Der Antikörper wurde in verschiedener Verdünnung, 1:1000, 1:500 und 1:200 eingesetzt. kD: Molekulargewicht.
HT1376, 5637, SD: Harnblasenkarzinom-Zellinien; Hoden: Hodengewebe
5637a: einfach Lämmlipuffer mit Proteinlysat vermischt, in Vergleich mit 5637, wo zweifach Lämmlipuffer mit Proteinlysat vermischt wurde.

4 Diskussion

Genamplifikationen sind eine der häufigsten Veränderungen in der Progressionsphase vieler maligner Tumoren [Santos et al., 2007]. In fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen liegt eine häufige, wiederkehrende Amplifikationsregion im Bereich 6p22.3 [Bruch et al., 1998; Bruch et al., 2000; Veltman et al., 2003; Evans et al., 2004; Feber et al., 2004; Hurst et al., 2004; Oeggerli et al., 2004]. Diese Amplifikation wurde meist in späten Stadien und selten früh beobachtet [Richter et al., 1999; Santos et al., 2007]. Der Zugewinn von 6p22 wurde ebenfalls häufiger in pT1G3 als in pT1G2 Tumoren nachgewiesen [Prat et al., 2001]. Insgesamt wird diese Amplifikationsregion in 10-25% aller fortgeschrittenen Harnblasenkarzinome nachgewiesen und ist in vielen Harnblasenkarzinom-Zellinien repräsentiert. Darüber hinaus sind Zugewinne von Chromosom 6p sehr häufig. Diese Zelllinien bieten sich als Modelle zur Erforschung dieser Amplifikation mit geeigneten experimentellen Methoden an, mit dem Ziel, die Amplifikationsregion zu umschreiben und darin potenzielle Harnblasenkarzinom-Onkogene zu identifizieren.

Verschiedene Forschungsgruppen haben unterschiedliche Gene als Zielgene - also potenzielle Onkogene - im 6p22.3 Amplikon identifiziert. Die Forschungen, die dieser Arbeit vorausgingen, haben auf den centromer-näheren Abschnitt von 6p22.3 fokussiert, der die Gene *SOX4*, *CDKAL1* und *E2F3* umfasst [Bruch et al., 2000]. Als erstes einzelnes Gen wurde *SOX4* als häufiges, aber nicht durchgehend amplifiziertes und überexprimiertes Gen gekennzeichnet [Bruch et al., 2000]. Danach wurde gezeigt, dass *E2F3*-Amplifikation und Überexpression von dessen kodierten Proteinen mit invasivem Wachstum, fortgeschrittenem Tumorstadium, schlechter Differenzierung und erhöhter Proliferationsrate einhergehen [Feber et al., 2004, Oeggerli et al., 2004]. Eine Analyse durch Microarray-basierte genomische Hybridisierung hat auch *CDKAL1*, das zwischen *SOX4* und *E2F3* liegt, als eines der am häufigsten amplifizierten Gene identifiziert [Hurst et al., 2004]. Amplifikationen von *DEK,* das ca. 2 Mb telomerisch zu diesen Genen liegt, wurden ebenfalls nachgewiesen [Evans et al., 2004] und *DEK*-Überexpression wurde mittels cDNA Microarray-Analysen besonders in frühen Stufen des Harnblasenkarzinoms festgestellt [Sanchez-Carbayo et al., 2003]. Im Intervall zwischen *E2F3* und *DEK* gibt es ein weiteres plausibles Onkogen, nämlich *ID4* (Abb.1-5), das im Zentrum dieser Arbeit stand.

Der etwas verwirrende Status der Forschung ist sicherlich teilweise auf verschiedene Techniken bei der Untersuchung, z.B. cytogenetisch vs. molekularbiologisch, zurückzuführen. Eine weitere Ursache ist, dass viele Arbeiten vor der Publikation der definitiv bearbeiteten humanen Chromosom 6 Sequenz im Okctober 2003 [Mungall et al., 2003] durchgeführt

wurden. Jedoch weisen die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeiten auch darauf hin, dass die Amplifikationsregion in 6p22 nicht uniform ist und vielleicht mehrere Gene als Zielgene der Amplifikation identifiziert werden können. Dieser Eindruck wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstrichen. Insbesondere war eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob auch *ID4* ein potentielles Onkogen ist.

Die ID Proteine ('inhibitor of differentiation') sind nach ihrem Wirkmechanismus benannt. ID-Proteine können sich mit HLH Transkriptionsfaktoren verbinden und die durch diese hervorgerufene Zelldifferenzierung blockieren [Lasorella et al., 2001; Ruzinova et al., 2003; Sikder et al., 2003]. Daher neigen sie dazu, die Zell-Proliferation zu stimulieren und treten verstärkt in verschiedenartigen Karzinomen auf [Perk et al., 2005; Shan et al., 2003; Bellido et al., 2003; Umetani et al., 2004; Umetani et al., 2005]. Im Vergleich zu ID1, ID2 und ID3 ist ID4 ein weniger gut charakterisiertes Mitglied der ID-Familie. ID4 wird mit dem höchsten Niveau in Hoden- und Gehirn-Gewebe exprimiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie *ID4* Genkopienzahl und Expressionsniveau im Vergleich zu *E2F3* and *DEK* durch 6p22 Amplifikationen beeinflusst werden.

4.1 *ID4, E2F3 und DEK* mRNA Expression in Harnblasenkarzinom-Zelllinien

4.1.1 *ID4, E2F3 und DEK* mRNA Expression in Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Als Grundlage der Arbeit wurde zunächst die vermehrte Expression von *E2F3, ID4* und *DEK* mRNA in mehreren von 16 Harnblasenkarzinom-(TCC)-Zelllinien mittels qualitativer RT-PCR dokumentiert. Als Kontrollen wurden normale Uroepithelzellen (UP) und zwei Gewebeproben aus Hoden (Tumor- und Normalgewebe) verwendet, um die *ID4*-Expressionsniveaus der Zelllinien zu physiologisch normalen bzw. maximalen in Relation setzen zu können. Drei Zelllinien von insgesamt 16 (19%) zeigten eine unzweifelhafte Erhöhung der *ID4*-Expression, wie auch *E2F3* deutlich in drei von insgesamt 16 untersuchten Zelllinien (19%) vermehrt exprimiert wurde. Bei *DEK* zeigten nur zwei von 16 untersuchten Zelllinien (13%) deutlich erhöhte Expression im Vergleich zur UP-Kontrolle.

Um die Expression der drei Gene exakt feststellen zu können, wurde die sensitivere Real-Time-RT-PCR-Methode zur Expressionsanalyse eingesetzt. Neben den 16 Harnblasenkarzinom Zelllinien (wie bei der Standard RT-PCR) wurden 6 normale

Harnblasengewebeproben und 28 Harnblasenkarzinomproben mit untersucht. Der Transkriptnachweis erfolgte mit entsprechenden Primern im Vergleich zu β-Aktin. Die mRNA-Expression wurde in willkürlichen Einheiten (AU) bestimmt. Wenn mehr als zweimal der Durchschnittswert der beiden UP-Kontrollen als Überexpression bewertet wurde, ergaben zwölf der 16 Harnblasenkarzinom-Zelllinien (75%) Überexpression von *ID4*. Nach diesem Einteilungsprinzip erkennt man für *E2F3* bei sechs Harnblasenkarzinom-Zelllinien (38%) Überexpression, wobei der höchste Anstieg in der Zelllinie 5637 beim ca. 34-fachen lag. In sechs Zelllinien (38%) stieg das *DEK*-Expressionsniveau, der höchste Wert in RT112 lag beim ca. Neunfachen. Vier der 16 (25%) untersuchten Harnblasenkarzinom-Zelllinien zeigten eine Überexpression aller drei mRNAs (vgl. Abb.3-2). Die übrigen Zelllinien zeigten für eine oder zwei mRNAs Überexpression, nur die Zelllinie 639V zeigt keine starke mRNA-Expression eines der drei Gene. Dies lässt vermuten, dass Überexpression eines Gens mit dem eines oder zweier anderer Gene zusammen auftritt; jedoch konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Es gab tatsächlich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression irgend zweier Gene. Die beste Korrelation zwischen *ID4* und *DEK* betrug 0.39 (vgl. Abb.3-3 rechts), was einen schwachen linearen Zusammenhang anzeigt. Diese Divergenz wird grundsätzlich durch die jeweilige Überexpression in Zelllinien HT1376 und 5637 bestimmt: Beide Zelllinien überexprimierten alle drei Gene; doch zeigte HT1376 eine starke Überexpression von *ID4* und 5637 von *E2F3*.

4.1.2 *ID4, E2F3 und DEK* mRNA Expression in Harnblasenkarzinom Gewebeproben

Um die Ergebnisse in den Harnblasenkarzinom-Zelllinien zu überprüfen, wurden 28 Tumorgewebeproben und 6 morphologische normale Gewebeproben durch Real-time-RT-PCR untersucht (vgl. Kap.3-1-2-3). Die Expressionsniveaus wurden im Vergleich zu UP-Kontrollen und Aktin RT-PCR in willkürlichen Einheiten berechnet (vgl. Tab.3-1). Zur Darstellung der unterschiedlichen Expressionen zwischen Tumorproben und normalen Proben wurde die „Boxplot"-Methode benutzt (vgl. Tab.3-3; Abb.3-5). Der Mittelwert der Tumorproben (2.24 AU) in *E2F3* erhöhte sich ca. dreifach gegenüber den Mittelwert der normalen Gewebe (0.72 AU). Im Vergleich konnte eine statistische Signifikanz ermittelt werden ($p=0.039 < 0.05$). Der Mittelwert der Tumorproben (1.26 AU) in *DEK* war ca. 2.5-fach gegenüber den Mittelwert der normalen Gewebe (0.52 AU) erhöht. Bei dem Vergleich konnte aber keine statistische Signifikanz ermittelt werden ($p=0.23 > 0.05$). Demnach

erscheint die *E2F3* Expression und in geringerem Maße die *DEK* Expression in Urothelkarzinomen generell erhöht.

Der Mittelwert der *ID4* mRNA Expression zeigte keinen deutlichen Unterschied zwischen den Tumorproben (0.23 AU) und den normalen Geweben (0.20 AU). Einige Proben zeigen aber sehr hohe *ID4* mRNA Expression mit einem Maximum von 3.39AU, das ca. 17-fach höher als der Medianwert der normalen Gewebe lag. Es erscheint möglich, in den Gewebeproben, die um den Tumor liegt, *ID4* mRNA überexprimiert werden kann, obwohl das Gewebe histologisch normal ist. Andererseits ist auffällig, dass einzelne Tumorproben das Gen sehr deutlich überexprimieren. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Expression in Tumoren gewöhnlich im Normalbereich verbleibt, aber in einzelnen Tumoren erhöht ist, vermutlich infolge einer Amplifikation (s.u.).

4.1.3 *DEK* und *ID4* mRNA Expression in verschiedenen Stadien der Tumoren

DEK

DEK wurde als Onkogen im Harnblasenkarzinom vorgeschlagen, jedoch keine Korrelation zwischen der *DEK* mRNA Expression und Stadium oder Differenzierungsgrad nachgewiesen [Evans, 2004; Veltman et al., 2003]. Dagegen wurde eine verstärkte Expression in früheren Stadien des Tumors berichtet [Sanchez-Carbayo et al., 2003].

Im Vergleich der *DEK* mRNA Expression in verschiedenen Stadien der Tumoren (vgl. Tab.3-9) war eine erhöhte Expression in einem Großteil (68%=43%+25%) der Tumorproben gegenüber normalen Geweben nachzuweisen, 25% Proben exprimierten sehr stark. 15 von 18 (83%) pT3-Tumorproben und 2 von 3 (67%) oberflächlichen Tumoren (pTa-pT1) wiesen eine erhöhte *DEK* mRNA Expression auf. Dieses Ergebniss unterstüzt das Ergebnis von Evans et al. [Evans et al., 2004; Veltman et al., 2003], wonach die Überexpression sowohl in frühem als auch spätem Tumorstadium auftreten. Es gibt das gleiche Problem in meiner Arbeit und der von Sanchez-Carbayo, dass nur wenige Gewebeproben aus den oberflächlichen Tumoren in die Analyse untersucht werden konnten. Fünfzehn Gewebeproben wurden bei Sanchez-Carbayos studiert und bei mir nur 3 [Sanchez-Carbayo et al., 2003]. Ein multifokales Auftreten des Harnblasenkarzinoms mit unterschiedlichen Studium und Differenzierungsgrad könnte diese Ergebnisse darüber hinaus beeinflussen [Jocham et al., 2003].

ID4

Das Verhältnis zwischen *ID4* mRNA Expression und dem Tumorstadium bzw. Malignitätsgrad wurde ebenfalls analysiert. Der Mittelwert der *ID4* mRNA Expression in verschiedenen Tumorstadium war fast gleich, also keine eindeutige Korrelation zu erkennen.

4.2 Genamplifikationen im Bereich 6p22.3

Um zu ermitteln, ob die erhöhten mRNA Expressionen von Genamplifikationen verursacht wurden, wurden mittels PCR Mikrosatellitenmarker untersucht, welche die Gene flankieren. Acht Mikrosatelliten neben den Genen *DEK, ID4,* und *E2F3* wurden ausgewählt (Abb.3-7), drei davon nahe am *ID4*-Locus. Der Marker D6S1228E ist ein intragenischer Mikrosatellit des Gen *ID4*. Als Kontrollen wurden Mikrosatelliten von Chromosom 12 und Chromosom 15 gleichzeitig mit den untersuchten Mikrosatellitenmarkern in jeder PCR-Reaktion amplifiziert und die relativen Genkopienzahlen der untersuchten Proben im Vergleich zum Referenzwert von Leukozyten errechnet (vgl. Kap.3-2).

Die PCR Ergebnisse belegen eine deutliche Variation der Mikrosatelliten Genkopienzahl in den verschiedenen Zelllinien. Bei HT1376 können zwei Amplifikationssegmente unterschieden werden (vgl. Abb.3-9a). Eines liegt telomerisch zum *DEK*-Locus und eines telomerisch und centromerisch um den *ID4*-Locus. In der Literatur wird berichtet, dass die Zelllinie HT1376 überwiegend um den *E2F3* und *SOX4*-Locus amplifiziert ist [Hurst et al., 2004; Bruch et al., 2000; Feber et al., 2004]. Das bedeutet, dass es mindestens drei diskontinuierliche Amplifikationssegmente bei HT1376 gibt. Im Vergleich zu HT1376 liegt in 5637 keine Amplifikation telomerisch zu *E2F3* vor (vgl. Abb.3-9c). Von 5637 wurde schon berichtet, dass überwiegend der *E2F3* und *SOX4*-Locus amplifiziert vorliegen [Hurst et al., 2004; Bruch et al., 2000; Feber et al., 2004]. J82 ist eine Zelllinie, die aus einem oberflächlichen pTa Tumor stammt, der gut bis mäßig differenziert (G1-G2) war [John et al., 1986]. Bei J82 ist die Genkopienzahl nahezu gleichmäßig an sämtlichen Mikrosatelliten erhöht außer den Mikrosatelliten neben *E2F3* (vgl. Abb.3-9a), obwohl gerade *E2F3* mRNA in J82 vermehrt exprimiert wird. Die gleichförmige und mäßige Erhöhung der Kopienzahlen in J82 spricht für einen chromosomalen Zugewinn. In VmCub1 und SW1710 sind die Mikrosatelliten telomerisch und centromerisch vom *DEK*-Locus amplifiziert (vgl. Abb.3-9b). Dennoch stieg das *DEK*-Expressionsniveau bei diesen beiden Zelllinien nicht. Im Gegensatz dazu liegen in der Zelllinie RT112 sowohl starke *DEK*-Expression als auch vermehrte Genkopienzahl der um *DEK* liegenden Mikrosatelliten vor. In T24 und BFTC905 gab es keine signifikante Mikrosatelliten-Erhöhung. Jedoch zeigte BFTC905 eine Überexpression aller drei mRNAs und die Zelllinie T24 zeigte für zwei mRNAs (*DEK* und *E2F3*) Überexpression.

Zusammenfassend erscheinen die Amplifikationssegmente im Chromosomenabschnitt 6p22.3 sehr variabel. Drei unterscheidbare Segmente liegen meist telomerisch und centromerisch

nahe zum *DEK, ID4* und *E2F3*-Locus. Manchmal amplifizieren ein oder zwei Segmente, oder sogar alle drei. In anderer Literatur wird ebenfalls berichtet, dass die Amplifikationen an 6p22.3 in Harnblasenkarzinom heterogen waren [Evans et al., 2000]. Das Phänomen, dass nicht alle Harnblasenkarzinom-Zellinien eine Veränderung einer Genopienzahl an 6p22 besitzen, konnte mit Czerniaks Theorie erklärt wurden, dass die Progression des Harnblasenkarzinoms durch verschiedene „Molekulare Pathways" verursacht wird; einige Fälle sind von Gen-Überexpression in 6p22 abhängig, einige Fälle hängen nicht von Gen-Überexpression in dieser Region ab [Czerniak et al., 2000].

PRL und *SOX4* wurden nicht in der zentralen Region des 6p22 Amplifikons identifiziert [Feber et al., 2004] und ihre Expression lässt keine deutliche Korrelation mit Amplifikation erkennten [Aaboe et al., 2006; Bruch et al., 2000; Hurst et al., 2004]. Real-time RT-PCR Analyse von *CDKAL1* and *E2F3* hatte gezeigt, dass die Überexpression der beiden Gene und 6p22 Amplifikation in Harnblasenkarzinomzellinien miteinander korrelieren [Hurst et al., 2004; Olsson et al., 2007]. In anderen Forschungen wird berichtet, dass die Überexpression von *E2F3* und 6p22 Amplifikation, spätes Tumorstadium, schlechter Differenzierungsgrad, höhere Proliferationsrate korrelieren [Aaboe et al., 2006; Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004]. In meiner Arbeit war die Überexpression von *E2F3* weitverbreitet. Jedoch muss man bedenken, dass viele Proben aus fortgeschrittenen Tumoren stammten.

Um den kausalen Zusammenhang der mRNA Überexpression mit der DNA-Amplifikation zu bestätigen, wurde der lineare Zusammenhang zwischen beiden Größen in dieser Arbeit bestimmt (vgl. Kap.3.2.3). Dabei wurde der Pearson'sche Korrelationkoeffizient (*r*) berechnet. Der Pearsons *r* zwischen *ID4* und den darum liegenden Mikrosatelliten liegt zwischen 0.94 bis 0.97 (vgl. Abb.3-12a, b, c, d), was einen sehr starken linearen Zusammenhang anzeigt. Die starke Korrelation wird allerdings grundsätzlich durch die Überexpression in den Zelllinien HT1376 und 5637 bestimmt. Wenn diese beiden Zelllinien ausgenommen wurden, schwächt sie sich ab. Da keine Korrelationen zwischen *E2F3* und D6S1678, *ID4* und D6S422 bestehen (vgl. Abb.3-11b; Abb.3-12f), ist zu vermuten, dass der Abschnitt zwischen D6S1678 und D6S422 die Grenze zwischen zwei Amplifikationssegmenten darstellt. Der Mikrosatellitenmarker D6S2051, ein intragenischer Marker des Gens *DEK*, steht mit *DEK* Expression in einem mittleren linearen Zusammenhang (r=0.57) (vgl. Abb.3-13a). Dies bedeutet, dass nicht jede Genexpressionerhöhung auf eine Amplifikation zurückzuführen ist und umgekehrt. Mit dieser Schlussfolgerung sind auch die Beobachtungen von Sanchez-Carbayo vereinbar [Sanchez-Carbayo et al., 2003], wonach Überexpression von *DEK* in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms vorkommt, wo

Amplifikationen die Ausnahme darstellen. Keine Korrelationen wurden zwischen D6S285, D6S1567 und *DEK* angezeigt (vgl. Abb.3-13b, c). Es steht zu vermuten, dass ein weiteres amplifiziertes Segment überwiegend in der Nähe und telomerisch vom *DEK*-Locus liegt.
Unsere Befunde legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Amplifikationen auf 6p22.3 im Harnblasenkarzinom noch mehr Heterogenität aufweisen als vorher vermutet wurde. In vorherigen Forschungen wurden die centromeren Regionen um *CDKAL1* als Amplifikationsregionen identifiziert, die häufig, aber nicht immer *SOX4* and *E2F3* einschließen [Hurst et al., 2004; Bruch et al., 2000; Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004]. Die telomere Region um *DEK* wurde noch nicht genauso gut erforscht [Evans et al., 2004]. In unserer Forschungen wurde bestätigt, dass Amplifikationen in dieser Region zu erhöhter Mikrosatelliten-Genkopienzahl führen können. Jedoch äußern sich die Amplifikationssituationen sehr variabel. Dieses Ergebnis passt zu anderen Forschungen [Evans et al., 2004]. Drei Marker (*STS-X64229, RH122450, A009N14*), die innerhalb von 0.5 Mb in 6p22.3 um *DEK* lokalisieren, waren kontinuierlich amplifiziert in 24% der Proben. Die drei Marker amplifizieren sich individuell in 64%, 56%, und 45% Proben. Daher ist es ersichtlich, dass dies eine Amplifikationsregion mit hoher Heterogenität ist. Das Mittelstück um *ID4*, das zwischen *DEK* und *CDKAL1* liegt, blieb in frühen Forschungen mehr oder weniger unbeachtet. Aber unser Ergebnis zeigt, dass Gene in dieser Region verstärkt exprimiert und sogar amplifiziert sind in vielen Proben. Manchmal treten diese Veränderungen selbständig auf, manchmal treten sie begleitend mit *E2F3*- und *DEK*-Veränderungen auf. Aus diesem Grund lässt sich die Region um *ID4* als eine von drei essentiellen Amplifikationsregionen erkennen, die weiter in Subregionen in individuellen Karzinomen aufgesplittert werden kann. Das 6p22.3 Amplikon ist also durch eine ausgeprägte Heterogenität und bedeutende strukturelle Komplexität gekennzeichnet. Weiterreichende Untersuchungen werden über biochemische und funktionelle Eigenschaften von *ID4* in normalem Urothelgewebe und urothelialen Tumorgeweben gebraucht.

4.3 Gen-Amplifikationen und Onkogen-Identifizierung im Bereich 6p22.3

In den centromerischen und telomerischen Abschnitten der Amplifikationsregion 6p22.3 wurden *SOX4, E2F3, CDKAL1* und *DEK* durch verschiedene Untersuchungen als potenziell relevante Gene identifiziert. Die vorliegende Untersuchung hat *ID4* dieser Liste hinzugefügt. Es ist interessant, dass *ID4* nur in einzelnen Tumorgewebeproben, jedoch breiter in den untersuchten Zellinien verstärkt exprimiert war, obgleich sich in den Zelllinien wie in den

Geweben generell eine verstärkte *E2F3*- und *DEK*-Expression gezeigt hat (vgl. Abb.3-5). Diese Diskrepanz kann man durch eine Hypothese erklären. Obwohl die Zellproliferation als Antwort auf Gewebeschädigungen stark ansteigen kann, ist normales Harnblasengewebe relativ inaktiv („quiescent“) [Rubin,1999]. Normales Gewebe unterscheidet sich von Tumorgewebe nicht nur durch die Expression spezifischer Tumorgene, sondern auch durch Überexpression der Gene, die allgemein mit der Zellproliferation verknüpft sind [Mysorekar et al., 2002]. Die generalisierte verstärkte Expression von *E2F3* und *DEK* in Tumorgewebe spiegelt diesen Mechanismus wider, d.h. die Gene werden im Rahmen der erhöhten Zellproliferation verstärkt exprimiert. Die Überexpressionen in individuellen Proben beruhen auf dieser Deregulation und zusätzlich der erhöhten Kopienzahlen dieser Gene. Die kultivierten uroepitheliale Zellen proliferieren ebenso rasch wie Harnblasenkarzinomzelllinien [Southgate et al., 1994; Freeman et al., 1997; Swiatkowski et al., 2003]. Daher ist der Anstieg der *E2F3*- und *DEK*-Expression im Vergleich in Tumorzellen zu normalen Gewebezellen relativ moderat. Im Gegensatz dazu ist *ID4* Expession vermutlich als ektopische Veränderung im Harnblasenkarzinom zu betrachten, weil sie normalerweise auf andere Gewebe beschränkt ist, z.B. in Hoden und Gehirn [Riechmann et al., 1994]. Die *ID4*-Überexpression hängt daher strenger von einer Genamplifikation ab, besonders in Tumorgewebe. In Zelllinien erscheint eine Überexpression häufiger, vielleicht weil sie die Etablierung von Zelllinien begünstigt.

Es wird vermutet, dass die in Karzinomen vervielfältigten Genomregionen Protoonkogene enthalten. Diese Protoonkogene werden durch erhöhte Genkopiezahl und die daraus folgende Genüberexpression aktiviert. Eine Reihe von Onkogenen wurde aufgrund der Tatsache, dass sie sich in amplifizierten Regionen befanden, durch Klonierung des Amplikons identifiziert. In solchen Fällen enthalten die Amplikone immer dieses besondere Gen, allein oder zusammen mit anderen Genen, zum Beispiel, *ERBB2* allein oder zusammen mit *TOP2A*. Die Struktur des Amplikons lässt sich relativ einfach darstellen [Simon et al., 2003; Kuwahara et al., 2004; Vogt et al., 2004]. Der Mechanismus der Amplifikation wurde noch nicht abschließend nachgewiesen. Vielleicht amplifizieren solche Onkogene durch eine Re-Replikation bestimmter Chromosomenfragmente, höchstwahrscheinlich durch mindestens einen Durchlauf eines *double-minute* Zustandes [Vogt et al., 2004]. Das 6p22 Amplikon im Harnblasenkarzinom gehört eindeutig einer unterscheidbaren Klasse von Amplikonen an. Diese Amplikone sind durch umfangreiche Heterogenität und Instabilität gekennzeichnet. Solche Amplikone beinhalten oft verschiedene Segmente und verschiedene Gene einer Region, nicht selten sogar Sequenzen verschiedener Chromosomen [Janssen et al., 2002;

Volik et al., 2003; Yang et al., 2004; Zatkova et al., 2004]. Als höchstwahrscheinliche Mechanismen, die solche Amplifikationen verursachen, werden „Bruch-Fusion-Brücken-Zyklen (breakage-fusion-bridge cycle, BFB)“ betrachtet, die z.B. durch Hypoxie [Coquelle et al., 1998] oder Gewebe-Schädigungen [Hellman et al., 2002] ausgelöst werden können. Einmal entstanden, können sich die Amplikone durch Rekombinationsmechanismen ausdehnen, verkürzen und umlagern.

Dieser Hintergrund muss bei der Beantwortung der Fragen, welche Zielgene des 6p22 Amplikons in Harnblasenkarzinom wichtig sind und ob *ID4* ein Onkogen ist, berücksichtigt werden und entsprechend vorsichtig geschlussfolgert werden. Die Struktur des Amplikons kann in jedem Einzelfall von Zufallsfaktoren wie zum Beispiel der Bruchstelle und strukturellen Faktoren im Chromosom beeinflusst werden. Als strukturelle Faktoren kann man bevorzugte Bruchstellen ansehen, die beispielsweise in dicentrischen Chromosomen in Bruch-Fusion-Brücken-Zyklen aufkommen. In der relativ hohen Prävalenz von 6p22 Amplifikationen und der relativen Spezifität dieser Amplifikationen ist jedoch in jedem Falle eine funktionelle Auswahl zu erkennen.

4.4 Tumorbiologische Bedeutung von Genen in Chromosom 6p22.3

Da mehrere Gene in 6p22 amplifiziert werden, wird vermutet, dass die Überexpression solcher Gene mit einer starker Aggressivität des Tumorzell-Phänotyps in Harnblasenkarzinomen korrelieren. *SOX* Faktoren beeinflussen die Apoptose und Zelldifferenzierung [Dong et al., 2004]. Daher kann *SOX4* Überexpression vermutlich eine weitere Dedifferenzierung herbeiführen. *E2F* Transkriptionsfaktoren aktivieren die Transkription vieler Gene, die für die DNA-Synthese benötigt werden. *E2F3* verdrängt *E2F1* an von *E2F1* aktivierten Promotoren, z.B. dem ARF Promotor im *CDKN2A* Lokus [Aslanian et al., 2004]. *E2F3*-Amplifikation und -Überexpression der kodierten Proteine sind mit invasivem Wachstum, fortgeschrittenem Tumorstadium, schlechter Differenzierung, und erhöhter Proliferationsrate in Harnblasenkarzinomen assoziiert [Hurst et al., 2008; Feber et al, 2004, Oeggerli et al, 2004; Olsson et al., 2007]. Beide Isoformen E2F3a und E2F3b zeigen erhöhtes Protein-Niveau in Zelllinien und spielen eine wichtige Rolle bei der Rb-Inaktivierung. Erhöhte *E2F3* und *DEK* mRNA-Expression und Genzugewinne wurden auch in Retinoblastomen nachgewiesen, *E2F3* und *DEK* wurden in diesem Tumor als potentiale Onkogene identifiziert [Orlic et al., 2006; Grasemann et al., 2005].

Das DEK Protein ist mit vielen Erkrankungen assoziiert, z.B. AML, Melanom, Glioblastom, Harnblasenkarzinom und autoimmunen Erkrankungen [Carro et al., 2006; Cleary et al., 2005].

DEK wurde zuerst als Autoantigen in verschiedenen menschlichen Autoimmunkrankheiten identifiziert, wie zum Beispiel bei der juvenilen rheumatoiden Arthritis [Sierakowska et al., 1993]. Die Fusion von *DEK* und einem anderem Gen *CAN* in der t(6;9)(p23;q34) Translokation resultiert in einer akuten Myeloischen Leukämie. Über diese Fusion in einem 9 Kb Intron wurde *DEK* zuerst als mögliches Onkogen identifiziert [von Lindern et al., 1992]. Eine Korrelation wurde zwischen der t(6;9) Translokation und Tumorprognose erkannt [Hamaguchi et al., 1998]. *DEK* kann die Struktur von Chromatin regulieren, die im Harnblasenkarzinom deutlich anormal ist [Carro et al., 2006; Cleary et al., 2005]. Untersuchungen zur Funktion dieses Proteins speziell in urothelialen Zellen gibt es jedoch nicht.

Der Name *CDKAL1* steht für „CDK5 regulatory subunit associated protein 1“. Die Funktion von *CDKAL1* ist noch unbekannt. Man kann die Expression von *CDKAL1* nicht analysieren, weil bisher kein Antikörper verfügbar ist [Hurst et al., 2008].

ID4 gehört zur ID Protein-Familie, deren Mitglieder die Zelldifferenzierung verhindern und die Proliferation von Vorläuferzellen begünstigen [Perry et al., 2007]. Die ID-Proteine blockieren dabei durch Dimerbildung die Wirkung von gewebespezifischen HLH Transkriptionsfaktoren [Lasorella et al., 2001; Ruzinova et al., 2003; Sikder et al., 2003]. ID-Überexpression wurde in vielen humanen Karzinomen beschrieben [Israel et al., 1999; Norton et al., 2000; Lasorella et al., 2000; Lasorella et al., 2001; Sikder et al., 2003]. Es gibt ein kompliziertes Gleichgewicht zwischen den ID-Isoformen. ID1 und ID3 haben eine Zellproliferationen zur Folge. ID2 verursacht Zell-Apoptose. ID4 wurde sogar als potentielles Tumorsuppressorgen betrachtet [Asirvatham et al., 2006]. Die Expression von ID4 ist in verschiedenen Geweben unterschiedlich, mit dem höchsten Expresssionsniveau in Hoden, Gehirn und Nieren [Riechmann et al., 1994].

Die *ID4* mRNA-Überexpression wurde in einigen bösartigen Tumoren identifiziert, wie zum Beispiel im Prostatakarzinom, Glioblastom, Oligodendrogliom [Yuen et al., 2006; Liang et al., 2005]. *ID4* Überexpression wurde in Brustkarzinomen von Ratten nachgewiesen. Die Veränderung von *ID4* blockiert die Differenzierung in *HC11* Brustdrüse-Epithelzellen und stimuliert ihre Proliferation [Shan et al., 2003]. *ID4* ist auch ein Target einer speziellen Chromosomen-Translokation in einer B-Zell akuten Lymphoblastischen Leukämie; dabei wurde die *ID4* mRNA-Überexpression mittels quantitativer real-time PCR identifiziert [Bellido et al., 2003; Russell et al., 2008].

Im Gegenteil wurde berichtet, dass in Kolon-Karzinomen die *ID4* Expression durch Promoter-Hypermethylierung reprimiert wird, was mit schlechter Differenzierung und

ungünstiger Prognose korreliert [Gómez Del Pulgar et al., 2008; Umetani et al., 2004]. *ID4* wurde auch als ein potenzielles Tumorsuppressorgen im Mammakarzinom und einigen hämatologischen Erkrankungen, z.B. ALL, AML, NHL identifiziert. *ID4* Promotor-Methylierung, die mit niedriger Expression von ID4 Proteine korreliert, dient als ein „Biomarker" in diesen Erkrankungen für Rezidiv und die Lymphknoten-Metastasierung [Noetzel et al., 2008; Umetani et al., 2005; Zhao et al., 2008].

Diese entgegengesetzten Wirkungen weisen vielleicht darauf hin, dass die Fähigkeit von ID4, entweder Proliferation oder Apoptose herbeizuführen, vom Zell-Ursprung abhängt. In verschiedenen Zelllinien, die aus verschiedenen Organen kommen, hat ID4 verschiedene Auswirkungen. Es kann sein, dass die Wirkung von ID4 Expression auf lymphoide Zellen im Vergleich zu myeloiden Zellen ganz unterschiedlich ist. ID4 Expression führt in den meisten Fällen zu einer Suppression des Wachstums, manchmal zu aberranter Transformation [Russell et al., 2008].

Western-Blot-Analyse

Die Expression von ID4-Protein wurde in meiner Arbeit mittels Western-Blots analysiert. Wie die Ensembl Datenbank beschreibt, soll die Produktgröße bei 16622 Da liegen. Zwei unabhängige Antikörper gegen ID4 (L-20 und H-70) wurden untersucht, um die Möglichkeit eines technischen Fehlers auszuschließen. Es zeigte sich keine Bande in einer Höhe von 16 kD, sondern nur Banden zwischen 55 kD und 72 kD (vgl. Abb.3-14). Es ist also zu vermuten, dass diese Banden ein anderes Protein als ID4 darstellt, das mit dem monoklonalen Antikörper reagiert.

Aufgrund der mRNA-Messung wurde gezeigt (vgl. Kap.3-1-2-1), dass die mRNA Expression von *ID4* in Zellinie 5637 und SD ca. 9-fach und 1-fach im Vergleich zur UP-Kontrolle betrug. Demnoch waren die Intensitäten der Bande im Western-Blot in 5637 und SD fast gleich. In Kap.3.1.2 wurde erwähnt, dass die *ID4* mRNA Expression in nahezu allen Gewebeproben mehr als zweifach der UP-Kontrolle betrug, sogar in normalen Gewebeproben. Die Intensität der Bande in UCC-Zelllinien und Hodengewebe war in Western-Blots jedoch fast gleich. Da das höchste Expresssionsniveau von *ID4* in Hoden, Gehirn und Nieren erscheint [Wetterauer et al., 1995], müsste *ID4* in Harnblasen ebenso stark exprimiert sein. Die Ergebnisse aus den Western-Blots passen also nicht zu allen anderen. Um diese Diskrepanz zu erklären, muss man weitere Experimente durchführen.

5 Literatur

Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C, Sørensen FB, Thykjaer T, Sauter G, Jensen KM, Dyrskjøt L, Ørntoft T (2006)
SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization.
Cancer Res. **66**:3434-3442

Asirvatham AJ, Schmidt MA, Chaudhary J (2006)
Non-redundant inhibitor of differentiation (Id) gene expression and function in human prostate epithelial cells.
Prostate. **66**:921-935

Aslanian A, Iaquinta PJ, Verona R, Lees JA (2004)
Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics.
Genes Dev. **18**:1413-1422

Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Haberland J, Wolf U (2008)
Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeit und Trends.
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (Hrsg.), 6. überarbeitete Auflage, Berlin

Bellido M, Aventin A, Lasa A, Estivill C, Carnicer MJ, Pons C, Matias G, Bordes R, Baiget M, Sierra J, Nomdedéu JF (2003)
Id4 is deregulated by a t(6;14)(p22;q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia.
J Hematol. **88**:994-1001

Benezra R, Davis R, Lockshon D, Turner D, Weintraub H (1990)
The protein ID – a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins.
Cell. **61**:49-59

Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F (2001)
Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors.
Am J Pathol. **158**:1955-1999

Black PC, Brown GA, Dinney CP (2006)
Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer.
J Clin Oncol. **24**:5528-5535

Brandau S, Böhle A (2000)
Molekulare und genetische Mechanismen bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms.
Akt Urol. **31**:149-156

Brison O (1993)
Gene amplification and tumor progression.
Biochim Biophys Acta. **1155**:25-41

Bruch J, Wöhr G, Hautmann R, Mattfeldt T, Brüderlein S, Möller P, Sauter S, Hameister H, Vogel W, Paiss T (1998)
Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q.
Genes Chromosomes Cancer. **23**:167-174

Bruch J, Schulz WA, Haussler J, Melzner I, Bruderlein S, Moller P, Kemmerling R, Vogel W, Hameister H (2000)
Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines.
Cancer Res. **60**:4526-4530

Campbell-Walsh (2002)
Campbell's Urology
WB Saunders Verlag, 8. Auflage

Carro MS, Spiga FM, Quarto M, Di Ninni V, Volorio S, Alcalay M, Müller H (2006)
DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types.
Cell Cycle. **5**:1202-1207

Cetinkaya C, Hultquist A, Su Y, Wu S, Bahram F, Påhlman S, Guzhova I, Larsson LG (2007)
Combined IFN-gamma and retinoic acid treatment targets the N-Myc/Max/Mad1 network resulting in repression of N-Myc target genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells.
Mol Cancer Ther. **6:**2634-2641

Chapman EJ, Harnden P, Chambers P, Johnston C, Knowles MA (2005)
Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype.
Clin. Cancer Res. **11**:5740-5747

Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, Young L, Shi SR, Gee C, Groshen S, Skinner DG, Cote RJ (2004)
Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma.
J Clin Oncol. **22**:1007-1013

Chaudhary J, Schmidt M, Sadler-Riggleman I (2005)
Negative acting HLH proteins Id1, Id2, Id3, and Id4 are expressed in prostate epithelial cells.
Prostate. **64**:253-264

Chetsanga C, Malmstrom PU, Gyllensten U, Moreno-Lopez J, Dinter Z, Petterson U (1992)
Low incidence of human papilloma virus type 16 DNA in bladder tumor detected by the polymerase chain reaction.
Cancer. **68**:1208-1211

Ciullo M, Debily MA, Rozier L, Autiero M, Billault A, Mayau V, El Marhomy S, Guardiola J, Bernheim A, Coullin P, Piatier-Tonneau D, Debatisse M (2002)
Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I.
Hum Mol Genet. **11**:2887-2894

Cleary J, Sitwala KV, Khodadoust MS, Kwok RP, Mor-Vaknin N, Cebrat M, Cole PA, Markovitz DM (2005)
p300/CBP-associated factor drives DEK into interchromatin granule clusters.
J Biol Chem. **280**:31760-31767

Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M (1997)
Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons.
Cell. **89**:215-225

Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M (1998)
A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs.
Mol Cell. **2**:259-265

Czerniak B, Li L, Chaturvedi V, Ro JY, Johnston DA, Hodges S, Benedict WF (2000)
Genetic modeling of human urinary bladder carcinogenesis.
Genes Chromosomes Cancer. **27**:392-402

Deutsche Krebsgesellschaft e. V.
Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008 (http://www.krebsgesellschaft.de/download/ll_f_04.pdf)

Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-Eli M, Adam L, Kamat AM, Siefker-Radtke AO, Tuziak T, Sabichi AL, Grossman HB, Benedict WF, Czerniak B (2004)
Focus on bladder cancer.
Cancer Cell. **6**:111-116

Dong C, Wilhelm D, Koopman P (2004)
Sox genes and cancer.
Cytogenet Genome Res. **105**:442-447

Erbar P (2000)
Onkologie
Schattauer Verlag, Stuttgart

Evans PC, Kilshaw PJ (2000)
Interleukin-13 protects endothelial cells from apoptosis and activation: association with the protective genes A20 and A1.
Transplantation. **70**:928-934

Evans AJ, Gallie BL, Jewett MAS, Pond GR, Vandezande K, Underwood J, Fradet Y, Lim G, Marrano P, Zielenska M, Squire JA (2004)
Defining a 0.5-Mb region of genomic gain on chromosome 6p22 in bladder cancer by quantitative-multiplex polymerase chain reaction.
Am J Pathol. **164**:285-293

Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T, Kovacs G, Dennis N, Fisher C, Wooster R, Huddart R, Foster CS, Cooper (2004)
Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer.
Oncogene. **23**:1627-1630

Freeman MR, Yoo JJ, Raab G, Soker S, Adam RM, Schneck FX, Renshaw AA, Klagsbrun M, Atala A (1997)
Heparin-binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder.
J Clin Invest. **99**:1028-1036

Fukumoto M, Shevrin DH, Roninson IB (1998)
Analysis of gene amplification in human tumor cell lines.
Proc Natl Acad Sci USA. **85**:6846-6850

Gómez Del Pulgar T, Valdés-Mora F, Bandrés E, Pérez-Palacios R, Espina C, Cejas P, García-abezas MA, Nistal M, Casado E, González-Barón M, García-Foncillas J, Lacal JC (2008)
Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism.
Int J Oncol. **33**:185-193

Grasemann C, Gratias S, Stephan H, Schuler A, Klein-Hitpass L, Rieder H, Schneider S, Kappes F, Eggert A, Lohmann DR (2005)
Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma.
Oncogene. **24**:6441-6449

Grimm MO, Steinhoff C, Simon X, Spiegelhalder P, Ackermann R, Vögeli TA (2003)
Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study.
J Urol. **170**:433-437

Hahn PJ (1993)
Molecular biology of double-minute chromosomes.
Bioessays. **15**:477-484

Hamaguchi H, Nagata K, Yamamoto K, Fujikawa I, Kobayashi M, Eguchi M (1998)
Establishment of a novel human myeloid leukaemia cell line (FKH-1) with t (6;9)(p23;q34) and the expression of dek-can chimaeric transcript.
Br J Haematol. **102**:1249-1256

Hartmann A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R (2002)
Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder.
Cancer Res. **62**:809-818

Hautmann R, Huland H (2006)
Urologie
Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L, Kerem B (2002)
A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes.
Cancer Cell. **1**:89-97

Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, Carroll PR, Waldman FM (1998)
Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases.
Cancer Res. **58**:3555-3560

Hurst CD, Fiegler H, Carr P, Williams S, Carter NP, Knowles MA (2004)
High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization.
Oncogene. **23**:2250-2263

Hurst CD, Tomlinson DC, Williams SV, Platt FM, Knowles MA (2008)
Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification.
Oncogene. **27**:2716-2727

Israel MA, Hernandez MC, Florio M, Andres-Barquin PJ, Mantani A, Carter JH, Julin CM (1999)
Id gene expression as a key mediator of tumor cell biology.
Cancer Res. **59**:1726-1730

Janssen JW, Imoto I, Inoue J, Shimada Y, Ueda M, Imamura M, Bartram CR, Inazawa J (2002)
MYEOV, a gene at 11q13, is coamplified with CCND1, but epigenetically inactivated in a subset of esophageal squamous cell carcinomas.
J Hum Genet. **47**:460-464

Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA (2005)
FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma.
Oncogene. **24**:5218-5225

Jocham D, Miller K (2003)
Praxis der Urologie
Georg Thieme Verlag

Knowles MA (2001)
What we could do now: molecular pathology of bladder cancer.
Mol Pathol. **54**:215-221

Knowles MA (2006)
Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?
Carcinogenesis. **27**:361-373

Kuo MT, Vyas RC, Jiang LX, Hittelman WN (1994)
Chromosome breakage at a major fragile site associated with P-glycoprotein gene-amplification in multidrug-resistant CHO cells.
Mol Cell Biol. **14**:5202-5211

Kuwahara Y, Tanabe C, Ikeuchi T, Aoyagi K, Nishigaki M, Sakamoto H, Hoshinaga K, Yoshida T, Sasaki H, Terada M (2004)
Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers.
Genes Chromosomes Cancer. **41**:125-132

Larramendy ML, Niini T, Elonen E, Nagy B, Ollila J, Vihinen M, Knuutila S (2002)
Overexpression of translocation-associated fusion genes of FGFRI, MYC, NPMI, and DEK, but absence of the translocations in acute myeloid leukemia.
Haematologica. **87**:569-577

Lasorella A, Noseda M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A (2000)
Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins.
Nature. **407**:592-598

Lasorella A, Uo T, Iavarone A (2001)
Id proteins at the cross-road of development and cancer.
Oncogene. **20**:8326-8333

Liang Y, Bollen AW, Nicholas MK, Gupta N (2005)
Id4 and FABP7 are preferentially expressed in cells with astrocytic features in oligodendrogliomas and oligoastrocytomas.
BMC Clin Pathol. **5**:6

Luis NM, Lopez-Knowles E, Real FX (2007)
Molecular biology of bladder cancer.
Clin Transl Oncol. **9**:5-12

Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S, Parkar M, Hill BT, Riddle PR, Franks LM (1986)
Tissue culture model of transitional cell carcinoma: Characterization of twenty-two human urothelial cell lines.
Cancer Res. **46**:3630-3636

Merkle Walter (1997)
Urologie
Hippokrates Verlag, Stuttgart

Mysorekar IU, Mulvey MA, Hultgren SJ, Gordon JI (2002)
Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic Escherichia coli.
J Biol Chem. **277**:7412-7419

Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, Jones MC, Horton R, Hunt SE, Scott CE, Gilbert JG, Clamp ME, Bethel G, Milne S, Ainscough R, Beck S et al. (2003)
The DNA sequence and analysis of human chromosome 6.
Nature. **425**:805-811

Neveling K, Kalb R, Florl AR, Herterich S, Friedl R, Hoehn H, Hader C, Hartmann FH, Nanda I, Steinlein C, Schmid M, Tonnies H, Hurst CD, Knowles MA, Hanenberg H, Schulz WA, Schindler D (2007)
Disruption of the FA/BRCA pathway in bladder cancer.
Cytogenet Genome Res. **118**:166-176

Noetzel E, Veeck J, Horn F, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E (2008)
Promoter methylation of ID4 : A marker for recurrence-free survival in human breast cancer.
Pathologe. **l 2**:319-327

Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F (1998)
ID helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation.
Trends Cell Biol. **8**:58-65

Norton JD (2000)
ID proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis.
J Cell Sci. **113**:3897-3905

Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch MJ, Sauter G (2004)
E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell roliferation in urinary bladder cancer.
Oncogene. **23**:5616-5623

Oeggerli M, Schraml P, Ruiz C, Bloch M, Novotny H, Mirlacher M, Sauter G, Simon R (2006)
E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer.
Oncogene. **25**:6538-6543

Olsson AY, Feber A, Edwards S, Te Poele R, Giddings I, Merson S, Cooper CS (2007)
Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells.
Oncogene. **26**:1028-1037

Orlic M, Spencer CE, Wang L, Gallie BL (2006)
Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma.
Genes Chromosomes Cancer. **45**:72-82

Otto T, al Enzawi S, Rübben H (1993)
Therapeutic strategies in patients with bladder tumors according to histopathological findings.
Verh Dtsch Ges Pathol. **77**:199-203

Perk J, Iavarone A, Benezra R (2005)
Id family of helix-loop-helix proteins in cancer.
Nat Rev Cancer. **5**:603-614

Perry SS, Zhao Y, Nie L, Cochrane SW, Huang Z, Sun XH (2007)
Id1, but not Id3, directs long-term repopulating hematopoietic stem cell maintenance.
Blood. **110**:2351-2360

Piper JM, Tonascia J, Matanoski GM (1985)
Heavy phenacetin use and bladdercancer in wimen aged 20 to 49 years.
N Engl J Med. **313**:292-295

Pitard A, Brennan P, Clavel J, Greiser E, Lopez-Abente G, Chang-Claude J, Ahrendorf J, Serra C, Kogevinas M, Boffetta P (2001)
Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men.
Cancer Causes Control. **12**:551-556

Prat E, Bernues M, Caballin MR, Egozcue J, Gelabert A, Miró R (2001)
Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization.
Urology. **57**:986-992

Qian Y, Luckey C, Horton L, Esser M, Templeton DJ (1992)
Biological function of the retinoblastoma protein requires distinct domains for hyperphosphorylation and transcription factor binding.
Mol Cell Biol. **12**:5363-5372

Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR (1996)
A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis.
Sem Oncol. **23**:571-584

Richter J, Jiang F, Görög JP, Sartorius G, Egenter c, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G (1997)
Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.
Cancer Res. **57**:2860-2864

Richter J, Wagner U, Schraml P, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G (1999)
Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer.
Cancer Res. **59**:5687-5691

Riechmann V, van Cruchten I, Sablitzky F (1994)
The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein is distinct from Id1, Id2 and Id3.
Nucleic Acids Res. **22**:749-755

Rubin H (1999)
Cell damage, aging and transformation: a multilevel analysis of carcinogenesis.
Anticancer Res. **19**:4877-4886

Russell LJ, Akasaka T, Majid A, Sugimoto KJ, Loraine Karran E, Nagel I, Harder L, Claviez A, Gesk S, Moorman AV, Ross F, Mazzullo H, Strefford JC, Siebert R, Dyer MJ, Harrison CJ (2008)
t(6;14)(p22;q32): a new recurrent IGHα translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL).
Blood. **111**:387-391

Ruzinova MB, Schoer RA, Gerald W, Egan JE, Pandolfi PP, Rafii S, Manova K, Mittal V, Benezra R (2003)
Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors.
Cancer Cell. **4**:277-289

Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G, Cordon-Cardo C (2003)
Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays.
Am J Pathol. **163**:505-516

Santos GC, Zielenska M, Prasad M, Squire JA (2007)
Chromosome 6p amplification and cancer progression.
J Clin Pathol. **60**:1-7

Sarkis AS, Dalbagni g, Cordon-Cardo C (1993)
Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression.
J Natl Cancer Inst. **85**:53

Schulz WA (2006)
Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways.
Int J Cancer. **119**:1513-1518

Schwab M (1999)
Oncogene amplification in solid tumors.
Semin Cancer Biol. **9**:319-325

Shan L, Yu M, Qiu C, Snyderwine EG (2003)
Id4 regulates mammary epithelial cell growth and differentiation and is overexpressed in rat mammary gland carcinomas.
Am J Pathol. **163**:2495-2502

Shariat SF, Tokunaga H, Zhou J, Kim J, Ayala GE, Benedict WF, Lerner SP (2004)
p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer.
J Clin Oncol. **22**:1014-1024

Sierakowska H, Williams KR, Szer IS, Szer W (1993)
The putative oncoprotein DEK, part of a chimera protein associated with acute myeloid leukaemia, is an autoantigen in juvenile rheumatoid arthritis.
Clin Exp Immunol. **94**:435-439

Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM (2003)
Id proteins in cell growth and tumorigenesis.
Cancer Cell. **3**:525-530

Simon R, Eltze E, Schafer KL, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ, Bocker W (2001)
Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells.
Cancer Res. **61**:355-362

Simon R, Atefy R, Wagner U, Forster T, Fijan A, Bruderer J, Wilber K, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2003)
HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer.
Int J Cancer. **107**:764-772

Singer MJ, Mesner LD, Friedman CL, Trask BJ, Hamlin JL (2000)
Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks.
Proc Natl Acad Sci USA. **97**:921-926

Sliverman DT, Devessa SS, Morre LE, Rothman N (2006)
Bladder cancer
Oxford University press, New York

Snijders AM, Hermsen MA, Baughman J, Buffart TE, Huey B, Gajduskova P, Roydasgupta R, Tokuyasu T, Meijer GA, Fridlyand J, Albertson DG (2008)
Acquired genomic aberrations associated with methotrexate resistance vary with background genomic instability.
Genes Chromosomes Cancer. **47**:71-83

Sökeland J, Schulze H, Rübben H (2002)
Urologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK (1994)
Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification.
Lab Invest. **71**:583-594

Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M (1994)
Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder.
Cancer Res. **55**:784-788

Swiatkowski S, Seifert HH, Steinhoff C, Prior A, Thievessen I, Schliess F, Schulz WA(2003)
Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines.
Exp Cell Res. **282**:48-57

Terracciano L, Richter J, Tornillo L, Beffa L, Diener PA, Maurer R, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G (1999)
Chromosomal imbalances in small cell carcinomas of the urinary bladder.
J Pathol. **189**:230-235

Thievessen I, Seifert HH, Swiatkowski S, Florl AR, Schulz WA. (2003)
E-cadherin involved in inactivation of WNT/3-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells.
Br J Cancer. **88**:1932-1938

Tomovska S, Richter J, Süess K, Wagner U, Rozenblum E, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G, Schraml P (2001)
Molecular cytogenetic alterations associated with rapid tumor cell proliferation in advanced urinary bladder cancer.
Int J Oncol. **18**:1239-1244

UICC (1997)
TNM (Classification of Malignant Tumours)
Springer-Verlag, Heidelberg

Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS (2004)
Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis.
Clin Cancer Res. **10**:7475-7483

Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE, Hoon DS (2005)
Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer.
Oncogene. **24**:4721-4727

van Rhijn BW, Montironi R, Zwarthoff EC, Jobsis AC, van der Kwast TH (2002)
Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma.
J Pathol. **198**:245-251

Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM (2003)
Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors.
Cancer Res. **63**:2872-2880

Vogt N, Lefebre SH, Apiou F, Dutrillaux AM, Cor A, Leuraud P, Poupon MF, Dutrillaux B, Debatisse M, Malfoy B (2004)
Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas.
Proc Natl Acad Sci USA. **101**:11368-11373

Volik S, Zhao S, Chin K, Brebner JH, Herndon DR, Tao Q, Kowbel D, Huang G, Lapuk A, Kuo WL, Magrane G, De Jong P, Gray JW, Collins C (2003)
End-sequence profiling: sequence-based analysis of aberrant genomes.
Proc Natl Acad Sci USA. **100**:7696-7701

von Lindern M, Fornerod M, van Baal S, Jaegle M, de Wit T, Buijs A, Grosveld G (1992)
The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia-specific dek-can mRNA.
Mol Cell Biol. **12**:1687-1697

Wallerand H, Bakkar AA, de Medina SG, Pairon JC, Yang YC, Vordos D, Bittard H, Fauconnet S, Kouyoumdjian JC, Jaurand MC, Zhang ZF, Radvanyi F, Thiery JP, Chopin DK (2005)
Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens.
Carcinogenesis. **26**:177-184

Wetterauer U, Rutishauser G, Sommerkamp H (1995)
Urologie
Walter de Gruyter Verlag, New York

WHO (2004)
WHO Classification Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.
IARC Press, Lyon

Yang ZQ, Albertson D, Ethier SP (2004)
Genomic organization of the 8p11-p12 amplicon in three breast cancer cell lines.
Cancer Genet Cytogenet. **155**:57-62

Yokota Y (2001)
ID and development.
Oncogene. **20**:8290-8298

Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW(2006)
Id proteins expression in prostate cancer: high-level expression of Id-4 in primary prostate cancer is associated with development of metastases.
Mod Pathol. **19**:931-941

Zatkova A, Ullmann R, Rouillard JM, Lamb BJ, Kuick R, Hanash SM, Schnittger S, Schoch C, Fonatsch C, Wimmer K (2004)
Distinct sequences on 11q13.5 and 11q23-24 are frequently coamplified with MLL in complexly organized 11q amplicons in AML/ MDS patients.
Genes Chromosomes Cancer. **39**:263-276

Zebedee Z, Hara E (2001)
Id proteins in cell cycle control and cellular senescence.
Oncogene. **20**: 8317-8325

Zhao Y, Li HH, Dou LP, Jing Y, Wang QS, Yu L (2008)
Preliminary study on Id4 as a reporter for ALL patients before relapse.
Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. **16**:90-92

Zhao Y, Jing Y, Bo J, Wang SH, Wang QS, Li HH, Yu L (2008)
Significance of id4 gene promoter methylation detection in lymphoma.
Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. **16**:22-24

Zhao Y, Wang QS, Li HH, Bo J, Dou LP, Jing Y, Wang SH, Yu L (2008)
Significance of Id4 promoter methylation in monitoring AML patients with completely remission.
Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. **16**:76-78

6 Abkürzungen

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMV	avain myeloblastosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
BFB	breakage-fusion-bridge (Bruch-Fusions-Brücken-Zyklus)
CDI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitors
CFS	Common Fragile Site
CGH	Comparative genomic hybridization
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HLH	helix-loop-helix
Id	Inhibitor of DNA binding / inhibitor of differentiation
LOH	loss of heterozygosity
MS	Mikrosatellitenmarker
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
RIPA	radio immunoprecipitation assay
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard sodium citrat buffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCC	transitional cell carcinoma
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union International Contre le Cancer
UP	normales Urothelgewebe

Danksagung

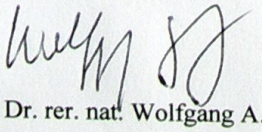
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schulz für die Vergabe des interessanten Themas, die freundliche und gute Betreuung meiner Arbeit, viele wertvolle Anregungen und die hilfsbereite Unterstützung jederzeit.
Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Gattermann für die Übernahme des Zweitgutachtens, PD Dr. Reinecke für die Übernahme der Drittprüfung,
Herrn Prof. Dr. med. R. Ackermann danke ich für die die Bereitstellung der untersuchten Proben und die Unterstützung des urologischen Forschungslabors.
Den Mitgliedern des Urologischen Forschungslabors, Frau C. Hader, Frau Dr. A. R. Linnemann-Florl, Herrn T. Laner, Herrn Dr. M. V. Cronauer und Herrn S. Raschke danke ich für uneingeschränkte Hilfe zu jeder Zeit. Die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre trug dazu bei, dass ich meine Arbeiten im Labor täglich gerne erledigte. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. M. Hoffmann und Frau A. Prior, die mich in allgemeinen, experimentellen und technischen Fragen in jeder Hinsicht unterstützt haben.
Ein spezieller Dank gilt meinen Eltern, Frau SG. Kong und Herrn ZT. Wu, für Ihre Förderung und die uneingeschränkte Unterstützung, die für das Gelingen meines Studiums wesentlich war und ist. Meinem Mann, Herrn Prof. Dr. Z. Lu, und meiner Tochter danke ich für den besonderen familiären Rückhalt, ihren steten Glauben an mich und viel Liebe.

Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom (Urothelkarzinom oder „*transitional cell carcinoma*“, TCC) ist der häufigste maligne Tumor des Harntraktes bei Männer und Frauen. Invasive TCC weisen vielfältige Chromosomenaberrationen auf. Unter den Amplifikationen sind die auf dem Chromosomenarm 6p22.3 am häufigsten. Dieser Bereich enthält mehrere Gene, die als mögliche Onkogene anzusehen sind. Eine Überexpression der Gene *E2F3, SOX4* und *CDKAL* wurde bereits in der Literatur beschrieben. Neben ihnen kommt *ID4* als Kandidat für das Zielgen der 6p22-Amplifikation in Frage. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die *ID4* Expression und Genkopienzahl im Harnblasenkarzinom untersucht. Tumorgewebe und -Zellinien wurden mittels PCR, RT-PCR, real-time-PCR und Western-Blot untersucht.

ID4 mRNA war in 12 von 16 Harnblasenkarzinom-Zelllinien (75%) gegenüber normalen Urothelzellen überexprimiert. In je sechs Zellinien (38%) stieg das *DEK* und *E2F3*-Expressionsniveau. Jedoch bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen irgend zwei Genen - die beste Korrelation zwischen *ID4* und *DEK* war (Pearson'scher Korrelationkoeffizient) r=0.39. Einzelne Tumorgewebe zeigten starke *ID4* mRNA Expression, jedoch bestand beim Mittelwert kein deutlicher Unterschied zwischen Tumorproben (0.23 AU) und normalen Geweben (0.20 AU). Keine Korrelation war zwischen *ID4* oder *DEK* mRNA Expression und Tumorstadium erkennbar. Gen-Amplifikation wurde mittels quantitativer PCR von Mikrosatelliten nachgewiesen. Für die Beziehung zwischen *ID4* Expression und Genkopienzahl der darum liegenden Mikrosatelliten lag r zwischen 0.94 bis 0.97, was einen sehr starken linearen Zusammenhang anzeigt. Dagegen bestanden ein starker Zusammenhang zwischen *E2F3* und diesen Mikrosatelliten sowie ein mittelstarker Zusammenhang zwischen *DEK* und benachbarten Mikrosatelliten. Demnach sind in vielen TCC mehrere Gene in der 6p22.3 Region verstärkt exprimiert, manchmal ist *ID4* alleine verändert, manchmal treten begleitend *E2F3* und *DEK* Veränderungen auf. Die Überexpression von *ID4* ist recht strikt von Amplifikationen abhängig, die von *DEK* weniger und *E2F3* erscheint generell erhöht exprimiert. Die Amplifikationssegmente in Chromosom 6p22.3 sind offenbar sehr variabel. Es lassen sich drei unterschiedliche Segmente unterscheiden, telomerisch und centromerisch nahe zum *DEK, ID4* und *E2F3*-Locus. Manchmal amplifizieren die Tumoren eine oder zwei Segmente, oder sogar alle drei. Die Region um *ID4* stellt also eine von drei Amplifikationsregionen dar, die in individuellen Karzinomen weiter in Subregionen aufgesplittert sein kann. Zusammenfassend ist das 6p22.3 Amplikon in fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen durch ausgeprägte Heterogenität und strukturelle Komplexität gekennzeichnet. Die Amplifikationen können verschiedene, meist mehrere Gene umfassen, zu denen *ID4* zählt. Daher sollten die funktionellen Konsequenzen der Überexpression für jedes Gen bestimmt werden, einschließlich *ID4*.

Genehmigt und unterzeichnet von



Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz (Referent)

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Qiong Wu
Geburtsdatum	16. April 1972
Geburtsort	Liaoning, P.R.China
Staatsangehörigkeit	Chinese

Schulbildung

09/1978--07/1983	Grundschule in Fuxin, V.R.China
09/1983--07/1990	Gymnasium in Fuxin, V.R.China, Abschluss: Abitur

Stadium und Arbeit in China

09/1990--07/1995	Studium der Medizin, China Medical University, Shenyang Abschluss: Bachelor
08/1995--08/1996	Ärztin im Praktikum als Ultraschall-Ärztin in der Ambulanz, Jinqiu Krankenhaus in ShenYang, V.R.China
09/1996--11/1998	Assistenzärztin als Ultraschall-Ärztin in der Ambulanz, Jinqiu Krankenhaus in ShenYang, V.R.China

Stadium in Deutschland

01/1999--10/1999	Privater Deutschkurs in Erlangen
11/1999--07/2000	Deutschkurs an der Universität Erlangen/Nürnberg, Abschluss: DSH
10/2000--04/2001	Studium der Biologie, Friedrich-Alexander-Univerität Erlangen/Nürnberg
04/2001--10/2008	Studium der Medizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
16.10.2008	Staatsexamen mit dem Abschluss der Ärztlichen Prüfung