

Verlauf und Wirkung des NOTCH Signalwegs in Urothelkarzinomzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annemarie Koch

aus Kamp-Lintfort

Düsseldorf, November 2012

aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz, Forschungslabor der Urologischen
Klinik, Heinrich-Heine-Universität

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-
Universität

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2013

Publikationen

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht unter dem Titel

“Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines”

Koch, A, Hatina J, Rieder H, Seifert HH, Huckenbeck W, Jankowiak F, Florl AR, Stoehr R, Schulz WA. in Cell Oncol (Dordr). 2012 Aug;35(4):243-57.

Teile der Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht unter dem Titel

“A novel epigenetic mechanism underlying concomitant downregulation of the reciprocally imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 in urothelial carcinoma“

Annemarie Koch, Judith Knievel, Teodora Ribarska, Günter Niegisch, Wolfgang A. Schulz

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY.....	II
<i>I. EINLEITUNG.....</i>	<i>I</i>
<i>I.1 Das Urothel und Urothelkarzinome.....</i>	<i>1</i>
<i>I.2 Zelllinienmodelle zur Untersuchung von Urothel und Urothelkarzinomen.....</i>	<i>7</i>
<i>I.3 Der Notch Signalweg.....</i>	<i>10</i>
<i>I.4 Ziel der Arbeit.....</i>	<i>27</i>
<i>II. MATERIALIEN.....</i>	<i>29</i>
<i>II.1 Gewebeproben.....</i>	<i>29</i>
<i>II.2 Zelllinien.....</i>	<i>31</i>
<i>II.3 Medien und Zusätze.....</i>	<i>33</i>
<i>II.4 PCR Reagenzien.....</i>	<i>33</i>
<i>II.5 Primer.....</i>	<i>34</i>
<i>II.6 Reagenzien für Proteinanalysen.....</i>	<i>40</i>
<i>II.7 Chemikalien und Antibiotika.....</i>	<i>41</i>
<i>II.8 γ-Sekretase-Inhibitoren.....</i>	<i>42</i>
<i>II.9 Bakterienstämme.....</i>	<i>42</i>
<i>II.10 Plasmide.....</i>	<i>43</i>
<i>II.11 Verwendete Kits.....</i>	<i>46</i>
<i>II.12 Software.....</i>	<i>47</i>
<i>III. METHODEN.....</i>	<i>50</i>

<i>III.1 Zellkultur</i>	50
<i>III.2 Isolation von Nukleinsäuren</i>	51
<i>III.3 Proteinanalyse</i>	58
<i>III.4 Funktionelle Versuche</i>	60
<i>IV. ERGEBNISSE</i>	64
<i>IV.1 Etablierung von Zellkulturmodellen</i>	64
<i>IV.2 Analyse zweier nicht-kanonischer Notch Liganden: DLK1 und EGFL7</i>	83
<i>IV.3 Liganden und Rezeptoren des Notch Signalwegs im UC</i>	101
<i>V. DISKUSSION</i>	146
<i>V.1 Charakterisierung von zwei neuen papillären Urothelkarzinomzelllinien</i>	146
<i>V.2 Epigenetische Inaktivierung der beiden Notch Regulatoren DLK1 und MEG3</i>	152
<i>V.3 Die Bedeutung der Differenzierung für Urothelkarzinome</i>	160
<i>V.4 Notch in der Epidermis - ein Modell für den Notch Signalweg in Urothelzellen?</i>	166
<i>V.5 Verlauf und Wirkung des Notch Signalwegs</i>	169
<i>VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	I
<i>VII. ERKLÄRUNG</i>	IV
<i>VIII. DANKSAGUNG</i>	V
<i>IX. REFERENZEN</i>	VI
<i>X. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</i>	XVIII

Zusammenfassung

Der Notch Signalweg vermittelt Signale zwischen benachbarten Zellen bei der Gewebeentwicklung und -erhaltung. Seine Funktion ist im Urothel und in Urothelkarzinomen (UC) weitgehend unbekannt. In diesem Zusammenhang wurden drei Projekte verfolgt.

Im Projekt I wurden die zellulären und molekulargenetischen Eigenschaften der papillären UC-Zelllinien BC44 und BC61 charakterisiert. Dabei wurde erstmals die Differenzierungsfähigkeit von BC61 an Hand von induzierbarer Stratifizierung und Expression von Differenzierungsmarkern nachgewiesen. Damit einhergehend wurden insbesondere die Notch Liganden induziert, wohingegen in differenzierenden normalen Urothelkulturen die Notch Rezeptoren verstärkt exprimiert wurden. In diesen Zelllinien wurden erstmals im UC dominant-negative p53 Δ 133 Isoformen detektiert, die entweder zusätzlich zum wildtypischen p53 oder solitär transkribiert werden. Dies könnte ein weiterer Mechanismus zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 im UC sein.

Im Projekt II wurde der nicht-kanonische Notch Ligand *DLK1* und die nicht-proteinkodierende RNA *MEG3* untersucht. *DLK1* und *MEG3* sind im elterlich geprägten (imprinted) Gencluster auf dem Chromosom 14q32 lokalisiert und werden normalerweise reziprok exprimiert. Im normalen Blasengewebe war die elterliche Prägung der Kontrollregionen erhalten, während im UC charakteristische Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters, der Histonmodifikationen, der Chromatinzugänglichkeit und fixierte Nukleosomen mit einer gemeinsamen Inaktivierung beider Gene *DLK1* und *MEG3* einhergehen.

Im Projekt III wurden die Komponenten des kanonischen Notch Signalwegs auf mRNA- und Proteinebene in 25 Blasentumoren und 19 Urothelkarzinomzelllinien vergleichend mit 11 normalen Blasengeweben und 8 normalen Urothelzellkulturen untersucht. Während die Notch Rezeptoren und Liganden zumeist signifikant vermindert waren, wurden die Notch-spezifischen Transkriptionsregulatoren und Zielgene verstärkt exprimiert. Immunhistochemisch ließ sich ebenfalls eine Abnahme von NOTCH1, DELTA1 und JAGGED1 in UC nachweisen. Inhibition der γ -Sekretase führte eher zu einer verstärkten Proliferation. Eine ektopische N1ICD Transfektion bewirkte eine dosisabhängige Induktion der ansonsten fehlenden Notch-Aktivität in Reporterassays. Modulation mit Kalzium, Transfektions- und RNAi-Experimente weisen darauf hin, dass insbesondere DELTA1 sehr kritisch für die Notch-Aktivität ist und im UC einer komplexen posttranskriptionellen Regulation unterliegt. Zusammenfassend scheint eine Deregulation des Notch Signalwegs auf mehreren Ebenen im Urothelkarzinom mit einer gestörten Differenzierung assoziiert. Als kritischer Faktor für die Aktivität des gesamten Signalwegs wurde der Ligand DELTA1 identifiziert.

Summary

The Notch pathway transduces signals between adjacent cells during tissue development and homeostasis. Its functions in the normal bladder urothelium and in urothelial cancer (UC) are largely unknown. In this thesis three pertinent projects were performed.

In project I cellular and genetic properties of the newly established papillary UC cell lines BC44 and BC61 were characterized. In particular BC61 was shown to retain a potential for differentiation, as indicated by induction of stratification and differentiation markers. Simultaneously, expression of Notch ligands was induced, whereas rather Notch receptors became induced in differentiating cultured normal urothelial cells. In addition, both cell lines expressed dominant-negative p53 Δ 133 isoforms solely or together with wildtype p53. These isoforms may constitute a further, previously undescribed mode of inactivation of the tumor suppressor gene p53 in UC.

In project II the non-canonical ligand *DLK1* and the non-protein coding RNA *MEG3* were analyzed. Both their genes are located in an imprinted gene cluster at chromosome 14q32 and are normally reciprocally expressed. In benign bladder tissues imprinting of the regulatory regions in the cluster was maintained, whereas characteristic changes of their DNA methylation pattern, histone modifications, chromatin accessibility and fixed nucleosomes were associated with concomitant downregulation of both genes *DLK1* and *MEG3* in UC.

In project III components of the Notch signaling pathway were analyzed at the mRNA and protein level in 25 urothelial tumor tissues and 19 cell lines compared to 11 benign bladder tissues and 8 normal urothelial cell cultures. Gene expression of Notch receptors and ligands was generally reduced in the cancers, although Notch-specific transcription regulators and target genes were strongly expressed. Immunohistochemistry revealed decreased expression of NOTCH1, DELTA1 and JAGGED1 in tumor tissues. Inhibition of γ -secretase rather enhanced proliferation of UC cell lines. Reporter assays demonstrated lack of Notch activity, which was restored by ectopic N1ICD overexpression, more strongly so in normal urothelial cells. Modulation by calcium, shRNA transfection and RNAi experiments suggest that DELTA1 is critical for Notch activity in normal and cancerous urothelial cells and is tightly regulated by posttranscriptional mechanisms. In summary, inactivation of the Notch signaling pathway at several levels appears to be associated with disturbed differentiation in urothelial cancer. DELTA1 was identified as a particularly important critical factor for the activity of the pathway in urothelial tissue and cancers.

I. Einleitung

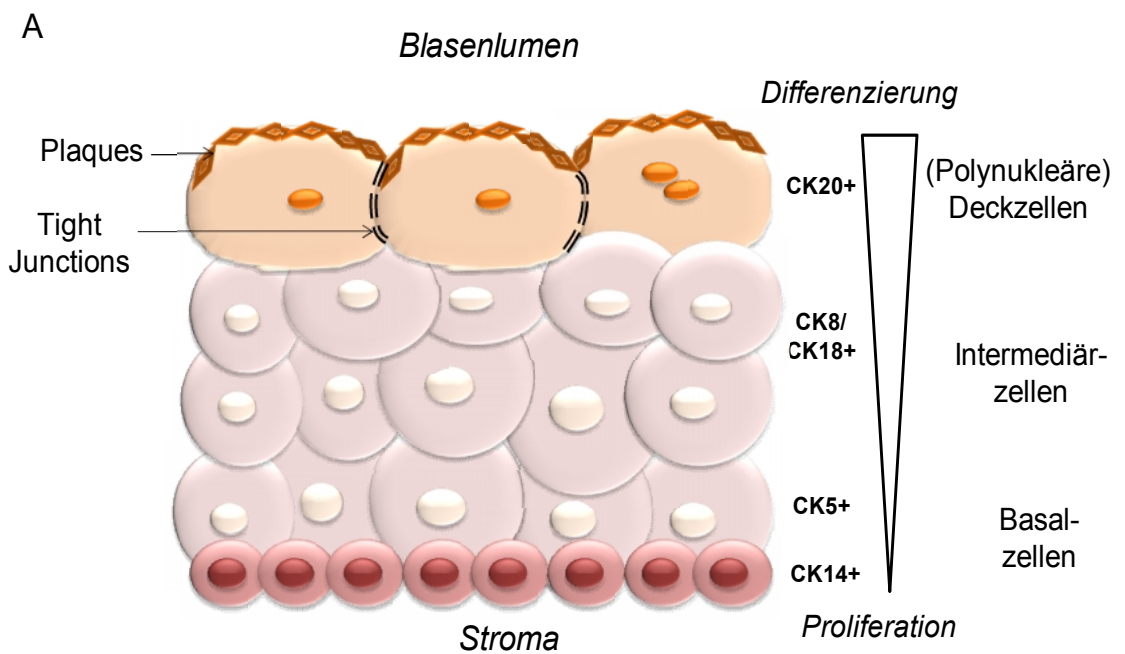
I.1 Das Urothel und Urothelkarzinome

Das Urothel ist ein mehrreihiges Epithel, das die Harnblase und den Harntrakt auskleidet (Abbildung I.1-1). Es setzt sich zusammen aus den am Stroma angrenzenden Basalzellen, den Intermediärzellen und den Deckzellen. Diese schützen die Blasenmuskulatur sowie das Bindegewebe vor Urin und Infektionen und reagieren flexibel auf den Füllungszustand [1]. Diese drei Zelltypen exprimieren unterschiedliche Zytokeratine, die mit den Differenzierungszuständen innerhalb des Urothels assoziiert werden können. Die viel diskutierten Stammzellen stellen im Urothel eine CK14+/CK5-Zellpopulation dar [2]. Beide Zytokeratinmarker werden mit zunehmender Differenzierung weniger exprimiert und sind in den terminal differenzierten Deckzellen mit limitierter Proliferation nicht mehr detektierbar [3]. Die Deckzellen zeichnen sich durch die Expression von CK8/18 und CK20 aus. Diese relativ strikte Zuordnung ermöglicht den Aufbau eines hoch-spezialisierten, pseudostratifizierten Urothels, dessen Funktionalität in den Deckzellen (*umbrella cells*) durch *Tight Junctions* und Plaques erzeugt wird, die aus den urothelspezifischen Uroplakinen und GAG (*sulfated polysaccharide glycosaminoglycan*) gebildet werden [4].

Wird das Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Proliferation gestört, entstehen Tumore. Folglich können diese Tumore durch den (teilweisen) Verlust des „Differenzierungsphänotypen“ definiert werden [5].

Die aus dem Urothel entstehenden Karzinome bilden mit 90% die häufigste Form des Harnblasenkarzinoms, viel seltener sind Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome. Für ihre Entstehung werden die berufliche Exposition gegenüber Chemikalien (aromatische Amine, polyzyklische Aromate, Nitroverbindungen, halogenierte Kohlenwasserstoffe), durch Zigarettenrauch freigesetzte Gifte, endemische Arsenexposition, sowie ionisierende Strahlung, seltener eine familiäre Prädisposition verantwortlich gemacht. Während die Mortalität der Urothelkarzinome nur leicht rückläufig ist, steigt die Anzahl der Neuerkrankungen (Ergebnisse zur Prävalenz des Urothelkarzinoms, Robert Koch Institut 2012).

Die Therapie richtet sich nach den *UICC* Kriterien, die nicht-invasive, oberflächliche (papilläre) Tumoren (pTa) von den invasiven Tumoren (pT1-pT4) mit unterschiedlicher Eindringtiefe in die Harnblase unterscheidet, sowie Lymphknotenbefall (N0, N1, N2) und *Grading*. Seit 1973 gilt das *Grading* als Maß für die Abweichung vom Herkunftsgewebe mit der Unterteilung in gut (*G1, low grade*), mäßig (*G2*), schlecht (*G3*), anaplastisch (*G4*) und unbestimmt (*Gx*) [6]. Seit 2004 vereinfacht sich die Unterteilung in *low* und *high grade*, die die Progression und Invasivität eines Tumors berücksichtigt [7, 8]. Gut differenzierte Tumore werden als *low grade* bezeichnet, da ihr Progressionspotential gering ist. Mäßig differenzierte Tumore können als *low grade* oder *high grade* eingeordnet werden; schlecht differenzierte und anaplastische Tumore werden immer als *high grade* eingestuft.



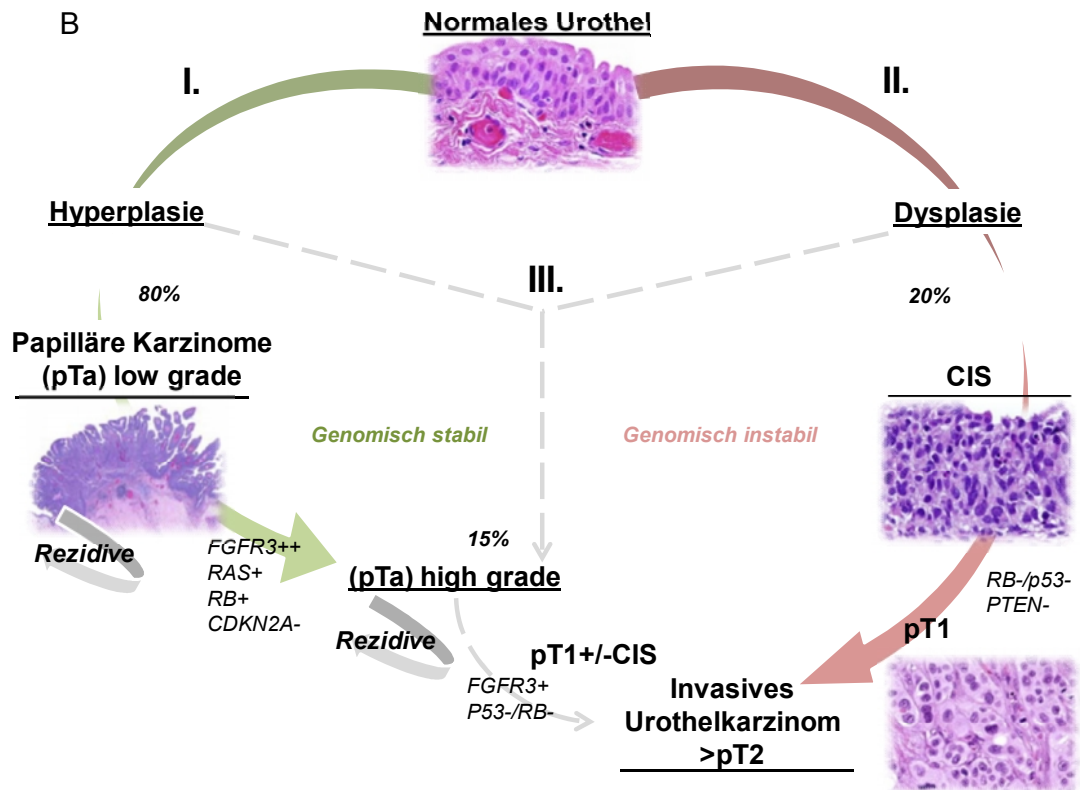


Abbildung I.1-1 Urothel und Urothelkarzinome (A) Das Urothel besteht aus drei unterschiedlich differenzierten Zelltypen, den CK14 und CK5 positiven Basalzellen, den CK5 und CK8/18 positiven Intermediärzellen und den CK20 positiven Deckzellen. Die Deckzellen sind teilweise mehrkernig und bilden Plaques. Sie sind über Tight Junctions verbunden. (B) Papilläre Urothelkarzinome (I) entwickeln sich aus Hyperplasien, invasive Tumore entstehen meist aus Dysplasien (II) und papilläre high grade Tumore (III) könnten aus Vorläufern bestehen, die sowohl dysplastisch, als auch hyperplastisch sind. (+) bezeichnet onkogene Aktivierung, (-) Inaktivierung durch Deletion, Mutation oder Hypermethylierung; (B) modifiziert nach [9, 10]

Molekulargenetische Analysen weisen auf mindestens zwei unterschiedliche Formen von Urothelkarzinomen hin (Abbildung I.1-1B). Papilläre *low grade* Urothelkarzinome bilden die weitaus häufigere Gruppe (ca. 80%) und entstehen aus einer Vergrößerung des Urothels durch übermäßige Zellvermehrung (*Hyperplasie*) (Weg I). Sie sind genetisch relativ stabil mit wenigen chromosomalen Veränderungen. Insbesondere Chromosom 9 Verluste, Hypermethylierung und Punktmutationen sind typisch und führen zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *PTCH1*, *DBC1* und *TSC1*. Papilläre Karzinome zeichnen sich des Weiteren durch Hyperaktivität bestimmter Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Signalwege aus, die durch onkogene Mutationen in den Genen *FGFR3*, *PIK3CA* und *RAS* verursacht werden [11, 12].

Der Großteil der papillären Tumore tritt multifokal auf, mit einer geringen Tendenz zur Invasivität, aber mit einer sehr großen Wahrscheinlichkeit der Neubildung (Rezidiv).

Die zweite Unterform (Weg II) entwickelt sich meist aus Dysplasien über einen flach wachsenden *high grade* Tumor innerhalb der Mukosa, einem sogenannten *Carcinoma in situ* (CIS). Invasive *high grade* Urothelkarzinome sind genomisch instabil und zeichnen sich durch eine gestörte Zellzyklusregulation aus, die durch Inaktivierung (Deletion und Mutation) der Zellzyklusregulatoren *p53*, *RB* (alternativ *CDKN2A*) und *PTEN* ausgelöst wird.

Invasive Karzinome können sich auch über papilläre *high grade* Urothelkarzinome entwickeln (Weg III), die sich genetisch und epigenetisch von den papillären pTa-Tumoren (I.) und den CIS-Tumoren (II.) unterscheiden. Sie entstehen möglicherweise aus Dysplasie/Hyperplasie-Mischformen [9, 10].

Im Gegensatz zu den überaktiven Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwegen über MAPK und PI3K [13, 14] ist die Bedeutung wichtiger Tumor-Signalwege wie Sonic Hedgehog (SHH) und WNT noch unklar [15]. Von Interesse ist auch der Notch Signalweg, weil er in sehr vielen Tumoren überaktiviert ist und zunehmend Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien (*targeted therapy*) wird. Die Funktion des Notch Signalwegs und seine mögliche Bedeutung bei der Differenzierung des normalen Urothels und im Urothelkarzinom werden detailliert in Kapitel I.3 der Einleitung beschrieben.

Invasive Urothelkarzinome werden vor allem chirurgisch mittels radikaler Zystektomie behandelt. Entsprechend ihres Risikos kann vorher oder nachher eine Chemotherapie erfolgen [16]. Die Therapie nichtmuskel-invasiver Tumoren (pTa, pT1) wird durch die Risikofaktoren Anzahl (Multifokalität), Größe der Tumoren, sowie der Präsenz eines *Carcinoma in situ*, *Grading* und Tumormarker wie p53 bestimmt.

Im Urothelkarzinom ist der Tumorsuppressor *p53* wichtig, der in 50% aller invasiven Karzinome mutiert ist. Allelverluste des Gens auf Chromosom 17 werden mit zunehmender Invasivität häufiger [12]. Obwohl viele Studien einen Zusammenhang zwischen *p53* Mutationen, nukleärer Proteinakkumulation und Tumorprognose zeigen, wird *p53* als Tumormarker im Urothelkarzinom kontrovers diskutiert [17].

Das Protein p53 wird als Antwort auf DNA-Schädigung, Sauerstoffmangel, UV-Strahlung und Onkogen-Aktivierung vermehrt gebildet und aktiviert. Konsequenzen der p53-Aktivierung sind die Regulation metabolischer Prozesse, der DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose [18]. Da sich alle genannten Prozesse in der Regel tumorsuppressiv auswirken, ist p53 in vielen Tumoren inaktiviert. Die Entdeckung von *gain-of-function* Proteinen belegt jedoch auch eine onkogene Wirkung bestimmter p53-Mutanten [19], die detailliert im Mamma- und Cervixkarzinom untersucht worden ist [20, 21].

Im Urothelkarzinom treten Mutationen im *p53* Gen sehr viel häufiger in invasiven als in papillären Tumoren auf und betreffen meistens die Exons 5-8, die für die DNA-Bindedomäne kodieren [22]. Diese p53-Mutanten können die Wildtyp-Funktion einschränken, indem sie als dominant-negative oder *gain-of-function* Proteine agieren und die Aktivierung der Zielgene durch Bindung von wildtypischem p53 verhindern. Weiterhin kann die Veränderung von Regulatoren (z.B. Amplifikation von *MDM2/HDM2*), sowie differentielles Spleißen die Funktion von p53 beeinträchtigen [23-25]. Alternatives Spleißen von Exon/Intron 9 generiert die Isoformen α , β und γ . Zusätzlich können durch die Verwendung alternativer Promotoren (P1*, P2/int4) und alternativer Translationsstartcodons (Met40, Met133, Met160) unterschiedliche mRNA Transkripte bzw. Proteine hergestellt werden (Abbildung I.1-2), die sich zum Teil gegenseitig regulieren und ein unterschiedliches Zielgenspektrum haben. Das *p53* Standardtranskript, auch *TA-p53* genannt, wird vom Promotor P1 aus transkribiert. Es kodiert für ein 50 kD Protein mit zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), einer DNA-Bindedomäne (DBD), einer Tetradimerisierungsdomäne (TD), sowie einer C-terminalen regulatorischen DNA-bindenden Domäne (RD) [26]. Der Promotor P1* ermöglicht die Transkription von *p53 Δ 40* Isoformen, denen ein Teil der TAD fehlt. Kürzlich wurde ein alternativer Promotor P2/int4 identifiziert, der die Transkription von *p53 Δ 133* und *p53 Δ 160* Isoformen beginnend in Intron 4/Exon 5 ermöglicht. Diesen Isoformen fehlen die wichtigen Domänen TAD und DBD [27]. Weitere Isoformen sind tumorspezifisch und können durch Deletion von Exons [28], Spleißmutationen [29] und intronische Punktmutationen [30] gebildet werden. Nicht zuletzt wegen dieser *p53* Isoformendiversität ist die immunhistochemische Analyse von p53 von der Wahl geeigneter Antikörper abhängig.

Routinemäßig verwendete Antikörper wie Ab6 erkennen ausschließlich Epitope in der Transaktivierungsdomäne und detektieren daher nur einen Teil der Isoformen.

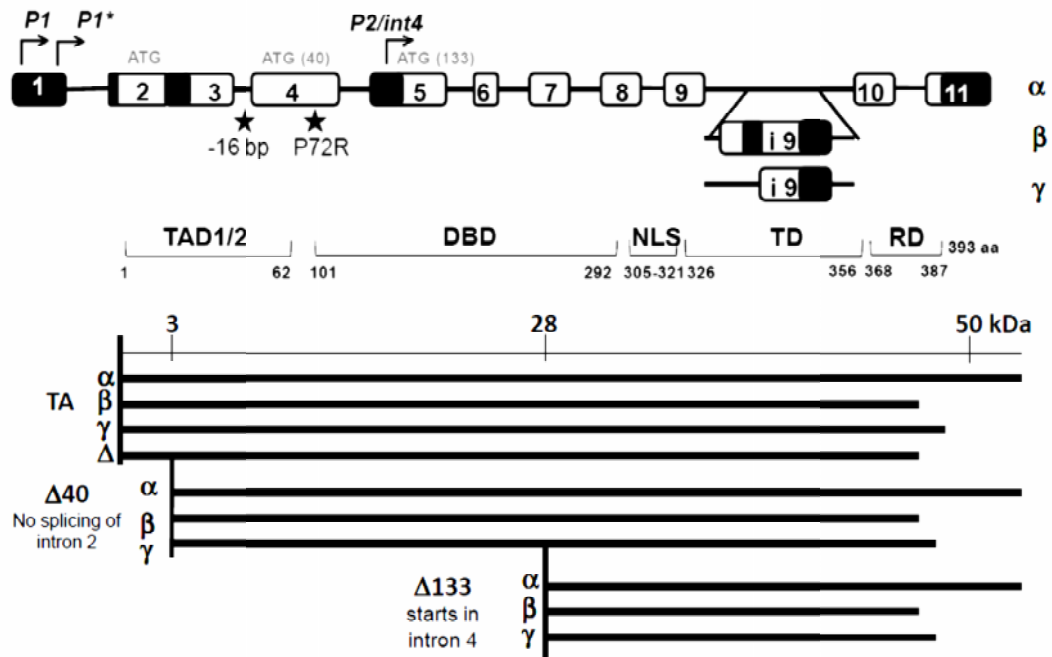


Abbildung I.1-2 p53 Genaufbau und Isoformen [31]. Das p53 Gen hat drei Promotoren. Der proximale P1 Promotor reguliert die Expression des Standardtranskripts TA-p53, welches zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), eine DNA Bindedomäne (DBD), eine Nukleusimportsequenz (NLS), eine Tetramerisierungsdomäne (TD), sowie eine C-terminale DNA Bindedomäne (RD) besitzt. Der alternative Promotor P1 reguliert die Expression der $\Delta 40$ Isoformen. Der alternative Promotor P2/int4 reguliert die Expression der $\Delta 133$ Isoformen. Diesen Isoformen fehlen die TAD und DBD. Durch alternatives Spleißen von Exon und Intron 9 entstehen die Isoformen α , β und γ .*

I.2 Zelllinienmodelle zur Untersuchung von Urothel und Urothelkarzinomen

I.2.1 Urothelkarzinomzelllinien

Seit 1970 wurden viele Zelllinien aus Urothelkarzinomen etabliert, um biologische Mechanismen der Tumorentstehung zu untersuchen und therapeutische Ansätze zu testen. Sie sind gut charakterisiert und spiegeln das Spektrum der genetischen Veränderungen in Urothelkarzinomen wieder. Sie können in epitheliale, gut differenzierte oder mesenchymal wachsende, schlecht differenzierte Zelllinien unterschieden werden. Die Kultivierung setzt eine Anpassungsfähigkeit voraus, welche die Kultivierung von genomisch instabilen Urothelkarzinomen begünstigt, aber die der genomisch stabileren Tumoren erschwert. Somit ist die Zahl papillärer Urothelkarzinomzelllinien sehr begrenzt, obwohl diese Tumore klinisch häufiger auftreten. Bei den wenigen papillären Zelllinien handelt es sich eher um *high grade* Urothelkarzinome, die seltener *FGFR3* und *PI3K*-Mutationen aufweisen. Daher haben wir ein Zellkultursystem zur Kultivierung papillärer *low grade* Urothelkarzinome etabliert [32]. Mit diesem Zellkultursystem konnten zwei Zelllinien aus papillären Urothelkarzinomen (BC61 und BC44) erfolgreich etabliert und kultiviert werden. Dieses Zellkultursystem orientiert sich an den Bedingungen für normale Urothelzellen und verwendet kalzium- und serumarmes Spezialmedium (Epilife mit ausgewählten Supplementen siehe III.1). Wie sich bei der Charakterisierung herausstellte, zeigten die beiden Zelllinien typische genetische Veränderungen progredienter, papillärer Tumoren und entsprechend keine Mutation in p53. Trotzdem konnte nur in einer Zelllinie (BC61) p53-Protein detektiert werden. Dieser Befund wurde vor dem Hintergrund neu entdeckter p53 Isoformen detailliert untersucht (siehe Kapitel IV.1) [24, 25].

I.2.2 Normale urotheliale Primärkulturen

Eine reproduzierbare Methode zur Kultivierung von Primärkulturen aus Uretern wurde von Reznikoff et al, 1983 [33] beschrieben. Die Prozedur sieht vor, den Ureter zunächst von Bindegewebe und Fett zu befreien. Anschließend wird das Urothel abgetrennt, enzymatisch mit einer Trypsin-EDTA-Kollagenase II Lösung verdaut und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen werden dann in einer mit Kollagen beschichteten Zellkulturflasche ausgesät. Eine Weiterentwicklung dieses Protokolls wurde von Southgate *et al.* [34] beschrieben, die einen Verdau ausschließlich in einer EDTA-HEPES Lösung vorsieht. Diese Weiterentwicklung ohne Herstellung einer Einzelzellsuspension wird zur Kultivierung der primären Urothelzellen verwendet.

Die Kultivierung erfolgt über wenige Passagen in kalziumreduziertem (0.07 mM), serumfreiem Medium, welches mit Wachstumsfaktoren supplementiert ist. Die Kulturbedingungen selektionieren auf urotheliale Basal- und Intermediärzellen, die aus dem ruhenden Zustand in einen proliferativen Zustand wechseln; Deckzellen gehen verloren. Die Zellen durchlaufen dabei den Zellzyklus sehr schnell, gehen bei Erreichen der Konfluenz in den Zellzyklusarrest und werden nach mehreren Passagen seneszent [35, 36]. Organotypische Kulturmaßnahmen, Zugabe von 1 mM Kalzium und Entzug mitogener Stimuli bewirken, dass die Urothelzellen gewebetypisch ausdifferenzieren und verstärkt Uroplakin und Zytokeratin 20 (CK20) bilden [37]. Dies gilt als Beweis vorhandener Differenzierungsfähigkeit normaler proliferativer Urothelkulturen. Allerdings betten die Urothelzellen in Kultur ihr exprimiertes Uroplakin nicht optimal in Plaques ein und exprimieren übermäßig Zytokeratin 5 (CK5), das charakteristische Zytokeratin intermediärer Zellen. Mit diesen Einschränkungen gelten primäre Urothelkulturen als geeignete Modelle mit modulierbarem Proliferations- und Differenzierungspotential und werden auch in unserem Labor für diese Zwecke verwendet.

Die Differenzierungsmodelle für das Urothel orientieren sich an dem besser charakterisierten Differenzierungsmodell [38] von Keratinozyten der Haut.

I.2.3 Immortalisierte normale Urothelzelllinien

Normale Urothelzellen können nur über wenige Passagen kultiviert werden, daher wurden immortalisierte Urothelzelllinien hergestellt. Insbesondere die beiden Zelllinien TERT-NHUC und UROtsa werden weltweit verwendet.

Die Zelllinie TERT-NHUC wurde mit hTERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, immortalisiert [39]. Die so entstandene Zelllinie aus normalen Urothelzellen ist diploid und genetisch stabil. Sie verfügt über eine etwa 10-fach stärkere Telomeraseaktivität gegenüber normalen Urothelkulturen. Infolge der Immortalisierung ist in TERT-NHUC die Genexpression von mehr als 100 Genen signifikant verändert. Am auffälligsten ist die Veränderung in Polycomb Group Proteinen (*PcG*) und in einer Gruppe von 11 Genen (*NME5*, *PSCA*, *TSPYL5*, *LY75*, *IGFBP2*, *IGF2*, *CEACAM6*, *XG*, *NOX5*, *KALI* und *HPGD*), die als „Telomerase Signatur“ bezeichnet wird und Zielgene der PcG Proteine darstellen.

Das veränderte Genexpressionsprofil ermöglicht den TERT-NHUC Zellen zwar eine Induktion terminaler Differenzierungsmarker (Uroplakin 2, CK20), aber eine Stratifizierung, wie sie in normalen Urothelkulturen erzielt wird, ist nicht oder nur eingeschränkt möglich, besonders bei höheren Passagen [40]. Genauso wie die normalen Urothelkulturen wird die Urothelzelllinie in kalziumarmem und serumfreiem Medium gehalten. Die Supplementierung ähnelt der der papillären Urothelkarzinomzellkulturen.

Im Jahr 1995 wurde die Urothelzelllinie UROtsa aus dem Ureter einer 12 Jahre alten Patientin angelegt und durch Transduktion mit dem *Simian Virus 40 large T antigen* (SV40) immortalisiert [41]. Diese Zelllinie wächst einlagig und wird wie die Urothelkarzinomzelllinien in DMEM (mit 1.8 mM Ca^{2+}) mit 5% Serum kultiviert. Eine Kultivierung unter serum- und kalziumreduzierten Bedingungen ist ebenso möglich. Allerdings ändert die Zelllinie dann ihre Zellmorphologie und wächst in mehreren Schichten (*multilayer*) [42]. UROtsa wird vor allem als Modell zur Karzinogenese verwendet, weil sie sich hervorragend durch Arsen und Cadmium transformieren lässt [43].

I.3 Der Notch Signalweg

I.3.1 Kanonischer Notch Signalweg

Trans-Aktivierung

„Notch“ bezeichnet in der Fruchtfliege *Drosophila* ein mutiertes Allel, welches sich phänotypisch in gekerbten Flügeln („*notched wings*“) äußert. Seit der Entdeckung wurde die Funktion und Wirkung von Notch in allen Modellorganismen untersucht. Als Schlüsselkomponenten wurden Liganden, Rezeptoren, Proteasen, Transkriptionsfaktoren und Zielgene identifiziert, deren Interaktion, Regulation und Transkription wir heute im kanonischen Notch Signalweg zusammenfassen (Abbildung I.3-1). Nach dem gegenwärtigen Verständnis basiert die kanonische Notch Signalweiterleitung auf einer direkten Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne eines Notch Rezeptors und der extrazellulären Domäne (ECD) eines Liganden der Jagged oder Delta Familie. Infolgedessen wird die aktivierte intrazelluläre Notch Domäne, kurz NICD, durch zwei aufeinanderfolgende Proteolysen von der Membran gespalten. Die erste (S2) Proteolyse wird durch die Metalloprotease ADAM/TACE vermittelt und trennt die ECD vom Rezeptor. Sie wird mit den Liganden von der Liganden-Zelle endozytiert und degradiert. Die zweite (S3) Proteolyse, vermittelt durch den γ -Sekretase-Komplex, trennt die zytoplasmatische Notch Domäne von der Membran ab. Die NICD wird in den Nukleus transportiert und kann durch Bindung an den Transkriptionsfaktor CBF1/RBPJ κ in Anwesenheit weiterer Koaktivatoren der Mastermind-Familie (MAML1-3) die Transkription zelltypspezifischer Zielgene initiieren. Am häufigsten werden Gene der Familien *HES* und *HEY* aktiviert. Nach kurzer Lebensdauer wird die NICD durch Phosphorylierung und Ubiquitinylierung durch CDK8, FBXW7 oder andere E3-Ubiquitin-Ligasen degradiert.

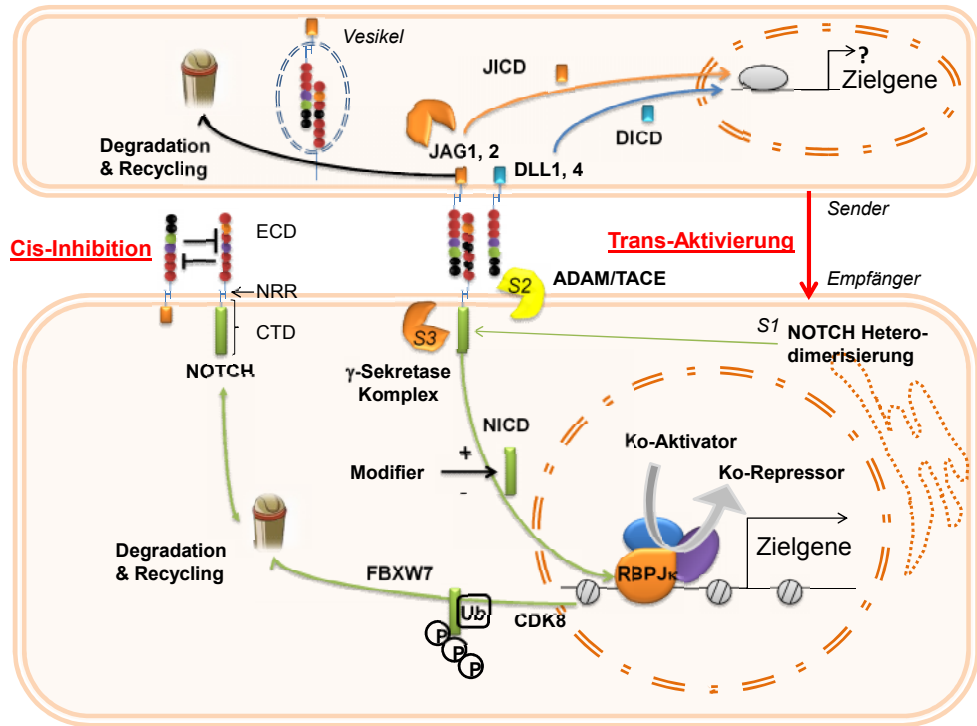


Abbildung 1.3-1 Aktivität des kanonischen Notch Signalwegs. Die Trans-Aktivierung bedingt eine direkte Interaktion von den JAGGED (JAG) und DELTA (DLL) Liganden der signalsendenden Zelle mit den Notch Rezeptoren auf dem empfangenden Zelle. In Folge der Strukturänderung des Rezeptors können ADAM und γ -Sekretasen den Notch Rezeptor proteolytisch spalten. Dies führt zur Freisetzung der NICD, die post-translational modifiziert wird und in Vesikeln in den Nucleus gelangt. Dort werden durch Bindung an CBF1/RBPJk und Rekrutierung weiterer Koaktivatoren zelltypspezifische Zielgene aktiviert. Durch Auflösung des Transkriptionskomplexes kann die NICD degradiert werden und die Zelle auf einen erneuten Notch-Stimulus vorbereitet werden. In der Senderzelle sind die Prozesse weniger gut verstanden, es werden jedoch Mechanismen analog zur Notch Prozessierung diskutiert. Eine Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren auf der gleichen Zelloberfläche in cis ist inhibitorisch.

Die Tatsache, dass der kanonische Notch Signalweg in Metazoen hochkonserviert ist, zeugt von seiner essentiellen Bedeutung in nahezu jeder Phase der Entwicklung. Dies gilt insbesondere für die Determinierung von Zellverbänden, Erhaltung des Stammzellcharakters, Spezifizierung und Differenzierung von Zellen aus Progenitorzellen, sowie der Apoptose [44]. Obwohl der Signalweg vergleichsweise einfach aufgebaut ist und ohne Signalamplifikation und *second messenger* auskommt, sind seine Auswirkungen hoch pleiotrop [45].

Zu der Diversität trägt die wechselseitige Kontrolle des Zellschicksals und Festlegung von Zellidentitäten durch laterale Inhibition, Cis-Inhibition und Trans-Aktivierung des Signalwegs bei (Abbildung I.3-1). Diese Prozesse wirken zusammen und regulieren die Signalrichtung und die Signalstärke durch die unterschiedlichen Verhältnisse von Ligand und Rezeptor in einer Zelle und zwischen benachbarten Zellen.

Ein hohes Verhältnis von Ligand zu Rezeptor befähigt die Zelle ein Signal zu senden und eine benachbarte Zelle zu determinieren. Ein umgekehrtes Verhalten befähigt die Zelle ein Signal aufzunehmen. Dies wird als Trans-Aktivierung bezeichnet. Wenn Ligand und Rezeptor auf der gleichen Zelloberfläche miteinander interagieren, führt dies zur Inhibition des Notch Signalwegs. Zusammen erzeugen diese Mechanismen Muster der Determinierung (s. Abschnitt Musterbildung).

Pleiotropie wird in Säugetieren zusätzlich durch die hohe Anzahl der Rezeptoren und Liganden erzeugt. Es gibt vier Notch Rezeptoren, NOTCH1-4, die sich im Wesentlichen in der Anordnung und Anzahl der EGF-Wiederholungen in der extrazellulären Domäne unterscheiden [46]. Alle Mitglieder der Notch Familie sind Typ-1-Transmembrandomänen-Proteine, bestehend aus je einer N-terminalen extrazellulären, einer Transmembran- und C-terminalen intrazellulären Domäne. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer RAM/ANK Domäne zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren im Nukleus, einer Nukleusimport-Sequenz, sowie einer PEST (Prolin/Glutaminsäure/Serin/Threonin)-Sequenz, deren post-translationale Modifikation den Abbau des Proteins bestimmt [47]. Bisher sind fünf kanonische Liganden aus zwei Familien bekannt; zwei Liganden aus der Serrate/Jagged-Familie, JAGGED1 (JAG1) und JAGGED2 (JAG2), sowie drei Mitglieder der Delta-Familie, DELTA1 (DLL1), DELTA3 (DLL3) und DELTA4 (DLL4). Die Jagged Liganden haben verglichen mit den Delta Liganden doppelt so viele EGF-Wiederholungen und besitzen zusätzlich eine cysteinreiche Region [48]. Der intrazelluläre Teil ist weniger gut charakterisiert, aber JAG1, DLL1 und DLL4 besitzen eine PDZ-Domäne und können mit Komponenten des Aktin-Zytoskeletts interagieren [49, 50]. Die Vielzahl möglicher Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren kann unterschiedliche zelluläre Antworten erzeugen. Mit Ausnahme von DLL3 sind für alle kanonischen Liganden Cis- und Trans-Interaktionen mit NOTCH1, NOTCH2 und NOTCH3 beschrieben [51, 52]. Welcher Ligand mit welchem Rezeptor interagiert, wird gewebe- und zelltypspezifisch durch die Regulation der Genexpression der Liganden und Rezeptoren und der post-translationalen

Modifizierung des Rezeptors festgelegt. O-Fucosylierung durch die GlcNAc-Transferase FRINGE bevorzugt die Interaktion von Notch mit Delta Proteinen gegenüber Jagged und kann daher die Auswahl der induzierbaren Gene in der signalempfangenden Zelle beeinflussen [53]. Die Möglichkeit zur Interaktion und damit die Signalstärke kann durch die zelluläre Verteilung der Liganden und Rezeptoren, ihre Interaktionen mit Positiv- und Negativregulatoren (*Modifier*), sowie deren Endozytose und Recycling, reguliert werden [54, 55].

Zusammenfassend beruht die Diversität im Notch Signalweg auf einer großen Kombinationsvielfalt in der Interaktion von Liganden und Rezeptoren, auf Unterschieden in Cis- und Trans-Interaktionen, auf gewebespezifischer Expression dieser Proteine, auf post-translationalen Modifikationen der Rezeptoren und deren zelluläre Verteilung, sowie auf Regulatoren (*Modifier*), die das Notch Protein nach Aktivierung phosphorylieren, acetylieren oder ubiquitinylieren und damit entweder stabilisieren oder degradieren. Es ist weniger gut bekannt, was mit den Liganden in der signalsendenden Zelle geschieht. Viele Beobachtungen weisen aber darauf hin, dass die Liganden ebenfalls als Substrate von ADAM und dem γ -Sekretase-Komplex erkannt werden können, wenn keine Interaktion stattfindet [56]. Die ADAM17 vermittelte S2 Proteolyse führt in diesem Fall zur Freisetzung der extrazellulären Ligandendomäne und zur Entstehung des C-terminalen Fragments. Dieses Intermediat wird erneut durch den γ -Sekretase-Komplex gespalten, wodurch die intrazelluläre Ligandendomäne (JICD oder DICD) gebildet wird, die im Nukleus die Genexpression beeinflussen kann [57]. Damit erweitert sich die Komplexität des Notch Signalwegs deutlich.

Im Nukleus der Empfängerzelle aktiviert die NICD diejenigen Gene, deren Promotor von einem Mitglied der CSL Familie CBF1/RBPJ κ (=C *promoter binding factor 1*) reprimiert wird. Die Inhibition der Transkription ist effektiv, weil CBF1/RBPJ κ mit SKIP und weiteren Korepressoren interagiert, die eine Veränderung in der Chromatinstruktur der Zielgene bewirken [58]. Am besten charakterisiert ist der SHARP/MINT Komplex, der die Korepressoren CtIP/CtBP, ETO und SMRT rekrutiert. Es wurden noch zwei alternative Korepressorkomplexe beschrieben, die mit CBF1/RBPJ κ interagieren; einer enthält KyoT2, RING1 und weitere PcG (*Polycomb Group*) Proteine, der andere besteht aus CIR, HDAC1/2, SAP30 oder NKAP. Allen gemeinsam ist die Etablierung von reprimierenden Histonmodifikationen, wie die Trimethylierung von Lysin 27 am Histon 3 (H3K27me3) [55].

Die NICD bindet an CBF1/RBPJK, dies wird unterstützt durch den Koaktivator Mastermind-like 1 (MAML1), der an die RAM/ANK-Domäne der NICD und an CBF1 bindet, weitere Koaktivatoren rekrutiert und Korepressoren verdrängt. Zu den Koaktivatoren gehören noch weniger gut charakterisierte Histon-Methyltransferasen (HMT) und die Histon-Acetyltransferasen (HAT) p300 oder GCN5/PCAF und Demethylasen wie KDM5A, die zusammen mit MAML1 Lysine der Histone H3 und H4 acetylieren. Somit tragen sie zur Auflockerung des Chromatins bei [46]. Damit ist die Transkription von Notch Zielgenen der *HES* und *HEY* Familie und weiterer spezifischer Gene möglich. Nach erfolgreicher Transkriptionsaktivierung wird die NICD durch CDK8 an der PEST-Domäne phosphoryliert und in das Zytoplasma zurück transportiert. Dies ermöglicht ihre Erkennung und Degradation durch E3-Ubiquitinligasen wie FBXW7. Im Nukleus werden die Notch Zielgene erneut reprimiert und auf einen nächsten Notch-Stimulus vorbereitet.

Bedeutung der Musterbildung durch den Notch Signalweg

Die Interaktion der kanonischen Liganden mit den Notch Rezeptoren führt nur zur Aktivierung des Notch Signalwegs, wenn beide auf benachbarten Zellen lokalisiert sind. Die Liganden-Zelle funktioniert als Sender, der ein Signal an den Empfänger, die Rezeptor-Zelle, in Form einer direkten Interaktion weitergibt. Die Zuordnung als Sender oder Empfänger ist gegeben, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Liganden und Rezeptoren in der jeweiligen Zelle vorliegt: Der Sender definiert sich durch mehr Liganden als Rezeptoren an der Zelloberfläche. Folgerichtig zeichnet sich der Empfänger durch mehr Rezeptoren als Liganden an der Zelloberfläche aus (Abbildung I.3-2A). Dieses Ungleichgewicht kann sich aus mehreren Gründen angleichen, sodass genauso viele Liganden wie Rezeptoren vorhanden sind und die Zelle ihren Status als Sender oder Empfänger verliert [59]. Das Gleichgewicht kann durch eine symmetrische Cis-Inhibition hergestellt werden, das bedeutet, dass Rezeptoren in der gleichen Zelle Liganden inhibieren und umgekehrt. Die beiden Prozesse der Trans-Aktivierung und Cis-Inhibition sind dynamisch und ultrasensitiv und werden im mathematischen Model LIMI „*lateral inhibition with mutual inactivation*“ erklärt [60] (Abbildung I.3-2B). Die Sensitivität und Dynamik des Systems ergibt sich auch daraus, dass beide Prozesse gleichzeitig stattfinden. Wenn trotz Cis-Inhibition in einer Zelle ein Überschuss von Liganden oder Rezeptoren vorhanden ist, kann sie zum Sender oder Empfänger werden.

Das Zusammenspiel von gegenseitiger Inhibition und Aktivierung, sowie weiterer Faktoren, ermöglicht die Musterbildung „*pattern formation*“ in mehrzelligen Systemen. In der Embryonalentwicklung steuert die Musterbildung die Keimblattausbildung und später die Identität der Zellen in Zellverbänden und Geweben. Insbesondere in der Ommatidienentwicklung von *Drosophila*, im Zentralnervensystem und während der Haarentwicklung im Innenohr von Vertebraten wird die Musterbildung deutlich in Form eines „*checkerboard*“ oder „*salt and pepper*“ Musters beschrieben [61]. Hierbei handelt es sich um das allgemeine Prinzip der lateralen Inhibition, die prinzipiell die zeit- und ortsabhängige inhibitorische Wirkung eines Systems auf ein benachbartes System beschreibt und die Generierung unterschiedlicher Zellschicksale ermöglicht [62].

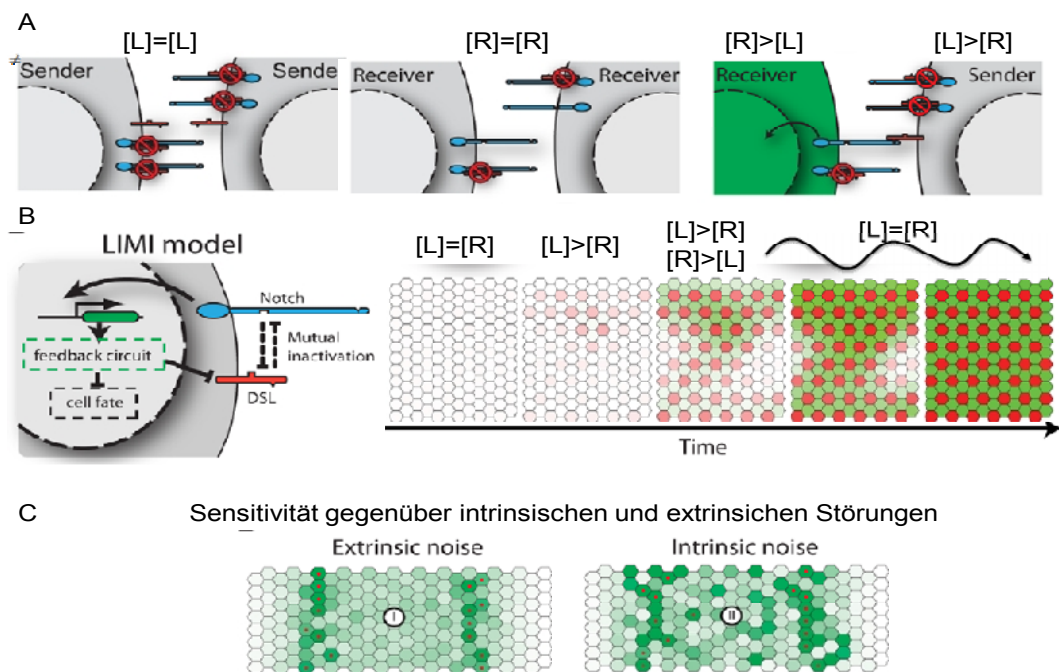


Abbildung I.3-2 Modell der Musterbildung. (A) Zellen können sich in gleichen Zuständen $[L]=[L]$; $[R]=[R]$ oder in unterschiedlichen Zuständen $[R]>[L]$; $[L]>[R]$ befinden. Gleiche Zustände werden durch Cis-Inhibition (dargestellt als Verbotsschild) erzeugt, ungleiche Zustände ermöglichen eine Trans-Aktivierung. (B) Muster werden nach dem LIM-Modell generiert, wenn sich zu einem Zeitpunkt $[L]$ oder $[R]$ ändert. Eine Voraussetzung ist, dass sich beide Variablen inhibieren können und zudem die Prozesse parallel stattfinden. (C) Das LIM-System zeigt eine Insensitivität gegenüber extrinsischen und Sensibilität gegenüber intrinsischen Signalen. Extrinsische Signale sind die unterschiedlichen Produktionsraten von $[L]$ und $[R]$, intrinsische Signale sind zelluläre Schwankungen anderer interagierender Variablen (Proteine anderer Signalwege). LIM = lateral inhibition with mutual inactivation; $[L]$ = Ligandenkonzentration; $[R]$ = Rezeptorkonzentration; DSL = kanonische Notch Liganden (modifiziert nach [59, 60])

Das Muster ist jedoch störungsanfällig und das System reagiert mit unterschiedlicher Sensitivität auf die Änderung extrinsischer oder intrinsischer Signale (Abbildung I.3-2C). Systeminterne Störungen, wie die zyklische Expression der Notch Komponenten und Ausbildung der Filopodien zur Ausbreitung des Signals [63], haben nur geringe Auswirkungen auf die Musterbildung. Störungen, die von außen auf das System wirken, wie beispielsweise die zyklische Expression von Proteinen anderer mit Notch interagierender Signalwege (WNT, FGF) [64], unterschiedliche microRNAs [65], sowie Apoptose [66], haben eine erhebliche Wirkung auf das Muster.

Die Interaktionen von Notch mit Komponenten anderer Signalwege und die daraus resultierenden zellulären Effekte werden auch unter dem Begriff „nicht-kanonischer Notch Signalweg“ zusammengefasst.

I.3.2 Nicht-kanonischer Notch Signalweg

Der Begriff „nicht-kanonisch“ umfasst alle vom kanonischen Notch Signalweg abweichenden zellulären Prozesse [67], die sowohl aktivierend, als auch inhibierend sein können. Dies beinhaltet

- (i) eine von kanonischen Liganden unabhängige Interaktion von Notch-Rezeptoren mit anderen Liganden an der Zellmembran [48, 54],
- (ii) eine Modulation der intrazellulären NOTCH Domäne (NICD) durch Ligasen und Proteinkinasen (Deltex, GSK3 β [68]),
- (iii) die Interaktion der NICD mit Proteinen im Zytoplasma [69],
- (iv) die RBPJ κ /CBF1 unabhängige Interaktion der NICD mit Proteinen anderer Signalwege im Nukleus,
- (v) Furin- (S1 Proteolyse) [70] oder Presenilin-unabhängige Notch Signalweiterleitung (S3 Proteolyse) [71].

Nachfolgend werden ausschließlich die Interaktionen (i) mit den zwei nicht-kanonischen Liganden EGFL7 und DLK1 detaillierter beschrieben, da die beiden Gene in dieser Arbeit untersucht wurden.

Der nicht kanonische Ligand DLK1

Delta-like 1 Homolog (DLK1), auch als *Preadipocyte Factor 1* (PREF1) bezeichnet, ist ein EGF-ähnliches Membranprotein mit sechs EGF Domänen, das von der extrazellulären Metalloprotease ADAM/TACE proteolytisch gespalten werden kann. Das sekretierte Protein DLK1 wird auch *Fetal Antigen 1* (FA1) genannt. Die drei Namen für dieses Protein beschreiben dessen Eigenschaften zum einen als DELTA1 ähnlichen Liganden [72], als sekretorisches Protein im Serum von Föten [73], sowie als Marker von Vorläuferzellen in Preadipozyten [74]. Seine Funktion als nicht-kanonischer Notch Ligand ist erst seit wenigen Jahren bekannt und beruht auf der starken Homologie zum kanonischen Liganden DELTA1. Da lediglich die DSL Domäne zur Notch Aktivierung fehlt, wird DLK1 als DOS-Koligand bezeichnet. Eine inhibitorische Wirkung (Cis-Inhibition) wurde in verschiedenen mesenchymalen Zelllinien gezeigt, und die Überexpression von Maus-*Dlk1* in *Drosophila* bewirkte eine veränderte Notch1 Lokalisation in der Zelle, sowie eine reduzierte Aktivierung der Notch Zielgene *Hes1* und *Hey1* [75].

Wie DLK1 moduliert auch sein Gegenspieler, die nicht-kodierende RNA (ncRNA) *MEG3*, den Notch Signalweg. Sie interagiert außerdem mit RTK-Signalwegen (MAPK, PI3K), sowie JAK/STAT, WNT und p53 [76].

DLK1 und *MEG3* sind benachbarte Gene auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2-32.31 (Abbildung I.3-3A). Evolutionär wurden die Gene auf diesem Chromosomenabschnitt in Mammalia „geprägt“, sodass nur eine Genkopie transkribiert wird. Diese Prägung wird auch als Imprinting bezeichnet, die durch allelspezifische Methylierung der DNA, sowie durch Histonmodifikationen, erzeugt wird. Diese unterschiedlich methylierten Bereiche werden als DMRs (differenziell methylierte Regionen) bezeichnet und funktionieren als Imprinting-Kontrollregionen (ICR), die auf dem paternalen (väterlichen) Allel methyliert und auf dem maternalen (mütterlichen) Allel unmethyliert sind [77].

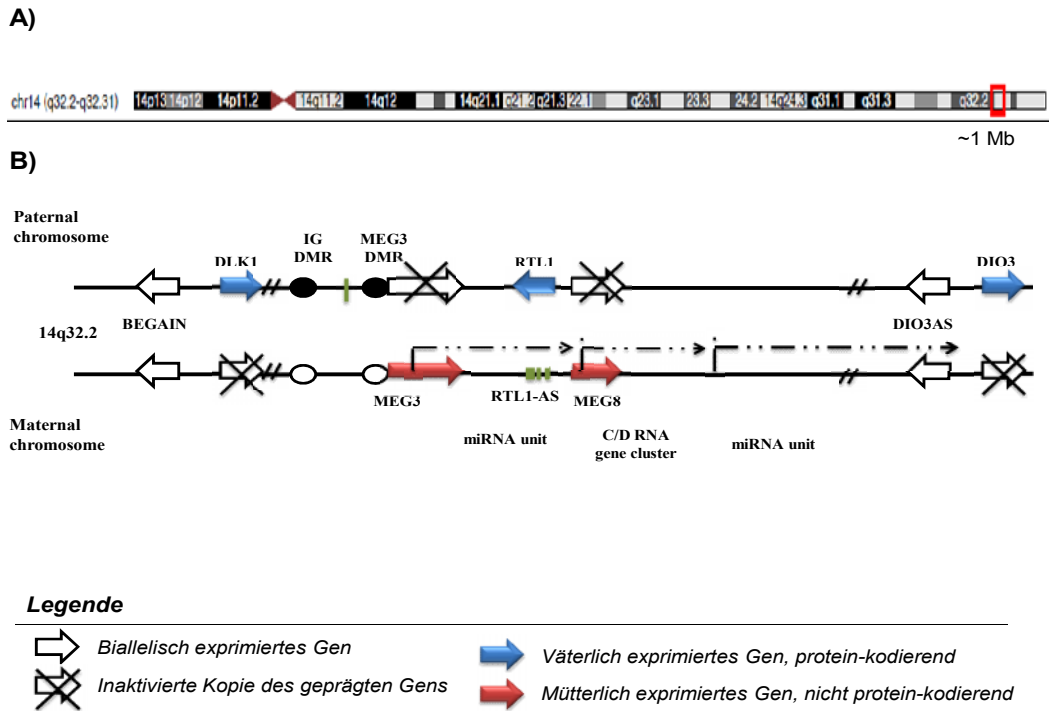


Abbildung I.3-3 DLK1-MEG3 Gengruppe (A) Die telomerische Lage der untersuchten Gene auf Chromosom 14 ist gekennzeichnet mit einem roten Kästchen. (B) Organisation der elterlich geprägten Gengruppe. Dargestellt sind einmal die biallelisch exprimierten Gene BEGAIN und DIO3-AS (weiße Pfeile). Die „blauen“ Gene werden ausschließlich vom väterlichen Allel transkribiert und kodieren für Proteine. Die auf dem mütterlichen Allel nicht-proteinkodierenden Gene sind in rot dargestellt. Ferner gibt es zahlreiche microRNA Gene, darunter das in grün dargestellte microRNA Gen RTL1-AS. Schwarze Kugeln repräsentieren methylierte Abschnitte, weiße Kugeln unmethylierte Abschnitte der DMR.

In dieser elterlich geprägten Gengruppe werden die proteinkodierenden Gene *DLK1*, *RTL1* und *DIO3* vom paternalen Allel exprimiert, während die nicht-kodierenden Gene *MEG3*, *MEG8* und *anti-RTL1* vom maternalen Allel exprimiert werden (Abbildung I.3-3B). Die intergenische DMR (IG DMR) zwischen *DLK1* und *MEG3* hat sich als die wesentliche regulatorische ICR etabliert, die die Expression der gesamten Gengruppe kontrolliert. Sie ist schon in der Keimbahn differentiell methyliert. Eine zweite DMR liegt in der Promotorregion von *MEG3*, sie wird als *MEG3*-DMR bezeichnet und ihr Methylierungszustand wird postnatal gewebespezifisch etabliert [78]. Über welche Mechanismen die ICRs ihre Kontrolle in diesem Locus ausüben ist bislang unklar [79].

Auf dem maternalen Allel sind zudem 53 regulatorische RNAs unterschiedlicher Kategorien (SNORD, piRNA, miRNA) lokalisiert und auf dem paternalen eine regulatorische RNA (miR1247). Es handelt sich um das größte bekannte microRNA/regulatorische RNA Cluster im menschlichen Genom. Alle diese RNAs beeinflussen entweder ihre protein-kodierenden Gene auf dem väterlichen Allel oder modulieren Signalwege [76]. Der Großteil dieser regulatorischen RNAs ist in Tumoren verändert exprimiert. Einige microRNAs aus dieser elterlich geprägten Gengruppe sind im Urothelkarzinom nicht mehr exprimiert [80].

Die Expression der Gene *DLK1* und *MEG3* ist in der Harnblase und im Urothelkarzinom noch nicht untersucht, obwohl die Gene in einem Bereich liegen, der im Urothelkarzinom häufig deletiert ist. Beide Gene können in Tumoren inaktiviert sein und tumorsuppressiv wirken [81, 82]. Allelverluste, Mutationen und epigenetische Veränderungen können die Genexpression entscheidend beeinträchtigen. Diese Mechanismen werden auch für das *DLK1-MEG3* Cluster beschrieben: Zum einen sind Mikrodeletionen bekannt, die die Imprinting-Kontrollregionen betreffen [80]. Weiterhin kann in Tumoren aufgrund von Allelverlust das väterliche oder das mütterliche Allel verloren sein. Das führt zu folgenden Überlegungen, die für das Verständnis der Daten im Ergebnisteil wichtig sind: Allelverlust (LOH) führt zu einem einheitlichen Methylierungsmuster in den ICRs (IG DMR, *MEG3*-DMR), die nun entweder ausschließlich methyliert oder unmethyliert sind. Folgerichtig verliert die Gengruppe ihre Prägung und die Gene des verbliebenen Allels werden exprimiert, wenn die Methylierung und Chromatinstruktur im Promotor des jeweiligen Gens eine Transkription zulässt. Unsere Daten weisen aber auf einen neuen Mechanismus zur Inaktivierung der Gengruppe hin. Dies wird im Kapitel IV.2 des Ergebnisteils detailliert dargestellt.

Der nicht-kanonische Ligand *EGFL7*

EGFL7 ist auf dem Chromosomenabschnitt 9q34 lokalisiert und liegt benachbart zu *NOTCH1* in gegensätzlicher Orientierung. *EGFL7* ist ein von Endothelzellen sekretiertes Protein, das mit Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren kann und hauptsächlich die Bildung und Reparatur von Blutgefäßen (Angiogenese) zusammen mit VEGF und FGF2 kontrolliert [83]. *EGFL7* wird durch Hypoxie induziert und seine Funktion durch den Notch Signalweg moduliert.

Es wird postuliert, dass EGFL7 und NOTCH1 einander sowohl autokrin (gleiche Zelle) als auch parakrin (andere Zelle) inhibieren können. Daher wird EGFL7 als nicht-kanonischer Notch Ligand bezeichnet und als Inhibitor in einer zielgerichteten Therapie gegen einen hyperaktiven Notch Signalweg eingesetzt (siehe Abschnitt *zielgerichtete Therapien*) [84]. Im Intron 7 von *EGFL7* sind die microRNAs miR126 und miR126* lokalisiert, deren Expression durch epigenetische Mechanismen kontrolliert wird [85]. Beide microRNAs liegen im Urothel- und Prostatakarzinomgewebe durch Promotor-Hypermethylierung vermindert vor [86]. Die Expression von *EGFL7* selbst ist jedoch im Urothelkarzinom nicht weiter untersucht worden.

I.3.3 Bedeutung des Notch Signalwegs in Tumoren und die Möglichkeiten einer Therapie

Notch in Tumoren

Notch Signale beeinflussen in nahezu jeder Entwicklungsphase die Identität von Zellen im Gewebe, in der Angiogenese und in der Neurogenese. Wegen der pleiotropen Rolle des Signalwegs in der Differenzierung, Proliferation und Zelldeterminierung, führen Störungen in diesem hoch komplexen, extrem stark regulierten System zu Krankheiten und speziell zu Tumoren. Die Komponenten des Notch Signalwegs wirken tumorspezifisch und kontextabhängig entweder

- i) als Tumorsuppressoren
- ii) als Onkogene
- iii) als Förderer der Metastasierung
- iv) in der Erhaltung und Etablierung der Tumorstammzellen.

Diese Einteilung ist keinesfalls starr, sondern kann sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung des Tumors in Abhängigkeit von der Deregulation anderer Tumorsignalwege und der Tumorumgebung verändern. Des Weiteren können einzelne Komponenten des Signalwegs als Tumorsuppressoren inaktiviert werden, wohingegen andere Mitglieder verstärkt aktiviert werden und onkogen wirken [87, 88]. Die Autoren P. Ranganathan *et al.* [89] fassen die Komplexität und Diversität des Notch Signalwegs in Tumoren folgendermaßen zusammen: *“Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time.”*

Tumorsuppressoren werden inaktiviert, weil ihre normale Funktion die Tumorentwicklung und Tumorprogression negativ beeinflusst. Da der kanonische Notch Signalweg die Ausreifung und Spezialisierung von Zellen in unterschiedlichen Geweben fördern kann und damit der Zellproliferation entgegen wirkt, müssen seine differenzierungsfördernden Signale in diesem Kontext unterbunden werden.

Die Mechanismen der Inaktivierung sind vielfältig und reichen von Allelverlusten, über epigenetische Inaktivierung und Punktmutationen, bis hin zur Überaktivierung von Negativregulatoren des Notch Signalwegs und veränderter Genexpression. Inaktivierende Mutationen von Notch Rezeptoren finden sich insbesondere in Plattenepithelkarzinomen aller Organe (Lunge, Speiseröhre, Kopf und Hals) [90]. In Basalzellkarzinomen der Haut führt die Inaktivierung von NOTCH1 zur Aktivierung von β -CATENIN und damit zur Hyperplasie, während in den Plattenepithelkarzinomen der Haut die NOTCH1 Inaktivierung mit einer RAS Aktivierung assoziiert ist, die eine aggressive Form dieses Tumors auslöst [91, 92].

Die Funktion von Notch als Tumorsuppressor hängt mit seiner differenzierungsfördernden Wirkung in der Epidermis zusammen [93, 94]. In den Keratinozyten der Epidermis sind die Notch Rezeptoren und Liganden unterschiedlich exprimiert [95]. Die DELTA1 Expression ist am höchsten in Stammzellclustern [96]. Das wichtigste Zielgen des aktiven Notch Signalwegs ist *HES1*, das in den suprabasalen Schichten detektiert wird [93]. Es wurde gezeigt, dass insbesondere NOTCH1 den Zellzyklusarrest reguliert und die terminale Differenzierung fördert, indem *CDKN1A/p21* CBF1/RBPJk abhängig aktiviert wird [97]. Eine Störung in diesem System führt zu hyperproliferierenden Zellen und begünstigt die Entstehung von Tumoren. Die Epidermis hat einen ähnlichen Aufbau wie das Urothel mit dem grundlegenden Unterschied, dass die Epidermis ein stratifiziertes, verhornendes Plattenepithel darstellt, während das Urothel ein nicht-verhornendes, aber stratifiziertes Übergangsepithel darstellt. Die Epidermis und die daraus entstehenden Tumoren können am ehesten Anhaltspunkte für die Funktion des Notch Signalwegs im Urothel und Urothelkarzinomen liefern.

In Sarkomen wird der Notch Signalweg auf mehreren Ebenen durch das EWS-FLI1 Fusionsprotein gehemmt [98], im nicht-metastatischen Prostatakarzinom ist beispielsweise das Notch Zielgen *HEY1* vermindert und im Nierenkarzinom, sowie in

neuroendokrinen Tumoren, wird der nicht-kanonische Ligand *DLK1* in Folge der Hypermethylierung der Imprinting-Kontrollregion nicht mehr exprimiert [81].

In all diesen vorgestellten Fällen gibt es jedoch auch mindestens ein Gegenbeispiel, wie andere Komponenten des Notch Signalwegs überaktiviert werden können.

In Geweben, in denen der Notch Signalweg zur Proliferation beiträgt, sind Komponenten des Signalwegs im entsprechenden Tumor überaktiviert [99]. Am häufigsten treten Genamplifikationen, aktivierende bzw. proteinstabilisierende Mutationen und Fusionsproteine auf, sowie eine verminderte Expression der Negativregulatoren des Notch Signalwegs. In T-ALL finden sich insbesondere Mutationen in der Heterodimerisierungsdomäne der Notch-ECD (20%), sowie Deletionen in der PEST-Domäne (5%), die den Abbau von NOTCH1 verhindern [100-102]. Im Mammakarzinom sind die Notch Rezeptoren ebenfalls in chromosomale *Rearrangements* verwickelt [103], und im Mucoepidermoid-Karzinom wird durch die Translokation t(11;19) das Fusionsprotein MECT1-MAML1 gebildet [104]. Zusätzlich werden in vielen Tumoren E3-Ligasen, die für die Degradation zuständig sind, durch Mutationen inaktiviert. Dies trifft vor allem auf die E3-Ligase FBXW7 zu, die in einer Vielzahl von Tumoren mit Überaktivität von NOTCH1 und cMYC inaktiviert ist [105]. In Melanomen beispielsweise werden *NOTCH2* und *JAGGED1* verstärkt exprimiert, im Mammakarzinom sind *NOTCH1* und *NOTCH4* überaktiv [106]. Im nicht-metastatischen Prostatakarzinom sind *JAGGED1* und *NOTCH1* verstärkt exprimiert [107]. Im Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom und Medulloblastom werden diejenigen Notch Rezeptoren verstärkt aktiviert, die mit dem WNT Signalweg interagieren [108-110].

Eine wesentliche Erkenntnis aus zahlreichen Studien zur Funktion des Notch Signalwegs in Tumoren ist, dass er abhängig von seiner Interaktion mit anderen im jeweiligen Tumor veränderten Signalwegen entsprechend inaktiviert oder überaktiviert wird um Tumorprogression zu gewährleisten [111, 112]. Offensichtlich lösen die Rezeptoren und Liganden unterschiedliche Signale in der Zelle aus, daher werden bestimmte Rezeptoren-Liganden-Interaktionen unterbunden, während andere Rezeptoren-Liganden-Kombinationen verstärkt aktiviert werden. Man kann daher selten von einer generellen Inaktivierung des Notch Signalwegs sprechen, sondern immer nur von einer Störung in der Signalweiterleitung aus der Perspektive eines Notch-Rezeptors in Kombination mit einem der kanonischen Liganden.

Ein Malignitätskriterium ist die Metastasierungsfähigkeit eines Tumors. Nach der „*Seed and Soil*“ Theorie [113] hängt der Erfolg der Metastasierung von der Interaktion der Tumorzellen mit der Mikroumgebung des Zielorgans ab, sowie von einer erfolgreichen Invasion und Intravasation (Eindringen ins Blutgefäß), Überleben als zirkulierende Tumorzelle, Extravasation und Fähigkeit zur Koloniebildung. Diese Prozesse erfordern von den Tumorzellen die Fähigkeiten zur epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), sowie zur erneuten Koloniebildung in einer neuen Mikroumgebung, zumeist mit Umkehrung der EMT, also MET. Verschiedene Studien im Mammakarzinom und Rhabdomyosarkom haben bereits gezeigt, dass der Notch Signalweg sowohl an der epithelialen-mesenchymalen Transition beteiligt sein kann [114], als auch beim Aufbau einer geeigneten Nische für die Koloniebildung, beispielsweise von Knochenmetastasen [115, 116].

Des Weiteren spielt der Notch Signalweg in der Angiogenese eine bedeutende Rolle durch Überexpression von DELTA4 [117]. Eine verstärkte Notch-Delta induzierte Vaskularisierung des Tumors ermöglicht unter Umständen zirkulierenden Tumorzellen einen Übergang in das Blutgefäßsystem und damit eine systemische Ausbreitung. Daher wird eine mögliche Beteiligung des Notch Signalwegs an der Erhaltung von (zirkulierenden) Tumorstammzellen diskutiert [118]. In dieser Zellpopulation soll der Notch Signalweg durch seine onkogene Wirkung das Selbsterneuerungspotential erhalten. Tumorstammzellen wird auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie zugeschrieben. Vor allem um diese Stammzellpopulation anzugreifen, soll mittels zielgerichteter Therapie der Notch Signalweg direkt inhibiert werden [119, 120].

Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie im Notch Signalweg

Mutationen betreffen im Notch Signalweg sowohl Liganden und Rezeptoren, als auch seine Regulatoren und Zielgene. Da homozygote Mutationen sich meist letal auswirken, werden schwerwiegende Defekte und Krankheiten wie das Alagille Syndrom (JAG1, NOTCH2), CADASIL (NOTCH3), Hajdu-Cheney-Syndrom (NOTCH2), Herzkrankheiten (NOTCH1) und Spondylocostal dysostosis (DLL3, HES7, LFNG, MESP2) [121] bis hin zu Tumoren durch heterozygote Mutationen ausgelöst. Sie machen eine zielgerichtete Therapie notwendig und wünschenswert.

Die therapeutischen Ansätze sind vielfältig; eine Inhibition kann im Notch Signalweg an vielen Stellen ansetzen (Abbildung II.3-4) [90]. In unterschiedlichen klinischen Versuchen (Phase I-III Studien) werden insbesondere γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) und ihre Wirksamkeit in soliden Tumoren untersucht. Sie wurden bereits (erfolgreich) zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung (unterbundene Bildung des A β -Peptides aus APP) und der T-ALL mit onkogener NOTCH1 Mutation angewendet. Die Wirkung dieser Inhibitoren ist jedoch unspezifisch und zum Teil unkalkulierbar, da die Zielsequenzen der γ -Sekretasen in einer sehr großen Anzahl von Proteinen vorhanden sind. Gleiches gilt für ADAM/TACE-Inhibitoren (Abbildung I.3-4A). Synthetische Peptide (SAHM1 gegen den Transkriptionskomplex) und Antikörper könnten spezifische Inhibitoren darstellen, da sie direkt an die Zielproteine binden und sie inaktivieren [84, 122]. Decoys stellen die lösliche Form der extrazellulären Domäne der Liganden JAGGED1, EGFL7 und DLK1 oder der Notch Rezeptoren dar. Therapeutische Antikörper gegen die NRR (Negativ-Regulatorische Region) der Rezeptoren, NOTCH1 und NOTCH2, sowie von DELTA4, werden in klinischen Versuchen getestet. Ein Anti-DLL4-Antikörper soll vor allem als Angiogenese-Hemmer eingesetzt werden und scheint als solcher auch zu wirken (Abbildung II.3-4B). Neben den Inhibitoren gibt es auch einen Ansatz zur Aktivierung des Notch Signalwegs [123]. Im Fall einer epigenetischen Inaktivierung sollen HDAC Inhibitoren zur Genreaktivierung führen. In verschiedenen Phase II-Studien werden die HDAC Inhibitoren VPA und LBH589 zur Behandlung von Tumoren wie Melanomen, Prostata-Cervix- und Mammakarzinomen erprobt [124, 125].

Da die Wirkung von Notch Signalen jedoch tumor- und gewebespezifisch ist, sind systemische Therapien schwierig und bedürfen einer genauen Überprüfung und Abwägung der Risiken. γ -Sekretasen-Inhibitoren lösen beispielsweise Hauttumore aus, Decoys können durch überaktive Proteinasen zu Aktivatoren des Notch Signalwegs werden und die Anti-Notch-Antikörper haben sich zum Teil als hoch toxisch erwiesen.

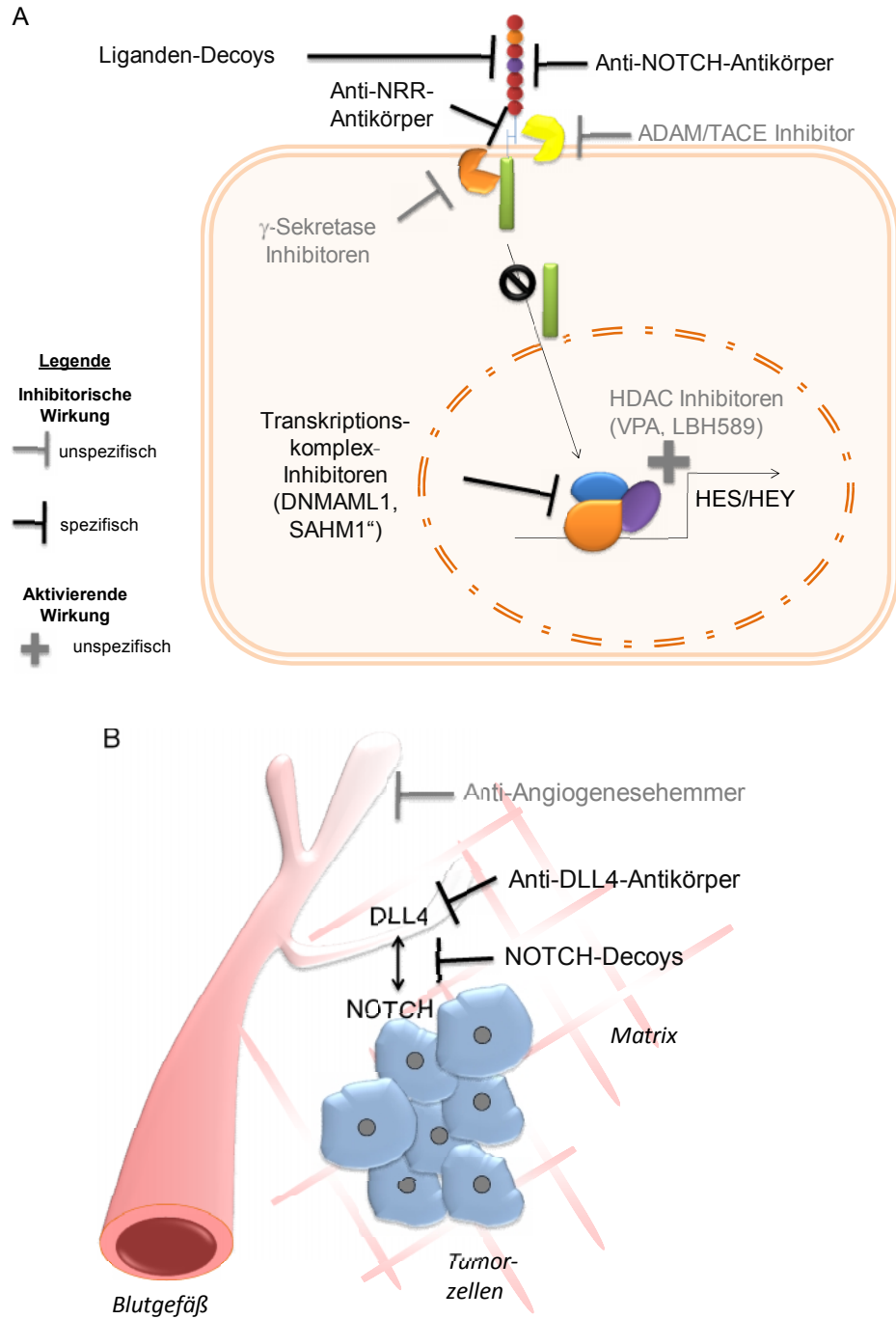


Abbildung I.3-4 Zielgerichtete Therapien. (A) Spezifische Inhibitoren (Decoys, DNMAML1-Peptide und Anti-Notch und Anti-NRR-Antikörper) und unspezifische Inhibitoren (γ -Sekretase- und HDAC-Inhibitoren), die die Aktivierung des Notch Signalwegs unterbinden sollen, werden in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit und Toxizität getestet und in einigen Tumoren bereits angewendet. (B) Decoys und Antikörper sollen die Tumorangiogenese hemmen und dabei Notch-Signale unterbinden. Graue Symbole bedeuten unspezifische Effekte, schwarze Symbole kennzeichnen spezifische Effekte. Abkürzungen: NRR= Negative Regulatorische Region; DNMAML1= dominant-negatives Mastermind-like 1; HDAC= Histon Deacetylase

I.3.4 Der Notch Signalweg im Urothelkarzinom

Die Literaturlage zum Notch Signalweg im Urothelkarzinom ist zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit sehr überschaubar. Bisher gibt es zwei *Research Paper* [117, 126] - eine immunhistochemische Studie zu NOTCH1 und JAGGED1, sowie eine Untersuchung zur Bedeutung von DELTA4 in der Angiogenese beim Harnblasenkarzinom - und einen *Letter* [127] über Notch und seine vermutete tumorsuppressive Wirkung in urologischen Tumoren. Eigene Vorarbeiten (Masterarbeit zum gleichen Thema) sprechen in der Tat für eine beeinträchtigte Aktivierung dieses Signalwegs auf mehreren Ebenen in Urothelkarzinomzellen: Erstens zeigen die Untersuchungen zum Notch Signalweg, dass die kanonischen Liganden und Rezeptoren auf mRNA Ebene in Urothelkarzinomen signifikant niedriger exprimiert werden. Zweitens zeigen unsere immunzytochemischen Färbungen die N1ICD nur in vesikulären Strukturen im Zytoplasma von Urothelkarzinomzellen. Die N2ICD ist dagegen kolonie- und zelllinienspezifisch im Nukleus detektierbar. Drittens korreliert die Expression der kanonischen Zielgene und Effektoren *HES1* und *HEY1* in keinem Fall mit der Expression der Notch Rezeptoren oder der Menge an aktiviertem NICD Protein.

I.4 Ziel der Arbeit

Wie im vorherigen Abschnitt detailliert beschrieben, vermittelt der Notch Signalweg Signale zwischen benachbarten Zellen durch direkte Interaktion zwischen Liganden auf der signalsendenden Zelle und Rezeptoren der signalempfangenden Zelle. Die Kommunikation zwischen den Zellen wird als kanonische aktivierende Signalweiterleitung bezeichnet. Die Signalweiterleitung kann durch Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren in der gleichen Zelle gehemmt werden. Welche Signale der Notch Signalweg vermittelt, ist von vielen Faktoren abhängig, u.a. vom Gewebe, Entwicklungszustand, Aktivität anderer Signalwege und kann Zellen zum Wachstum (Proliferation) oder zur Spezialisierung und Ausreifung (Differenzierung) anregen.

Verlauf und Wirkung der Signale sind im Urothel und daraus abgeleiteten Tumoren noch kaum untersucht. Zur Klärung dieser Fragestellung ist die Arbeit in mehrere Abschnitte unterteilt:

- I. Etablierung geeigneter Zelllinienmodelle, in denen die mit der Differenzierung assoziierten Veränderungen des Notch Signalwegs untersucht werden können.
- II. Analyse nicht-kanonischer Notch Liganden
- III. Analyse des kanonischen Notch Signalwegs

(I) Wir vermuten eine differenzierungsfördernde Wirkung des Notch Signalwegs. Um diese Wirkung auf Urothelzellen untersuchen zu können, ist die Entwicklung und Optimierung von Zellkulturmodellen notwendig, in denen dieser Prozess induziert werden kann. Von normalen, proliferativen Urothelzellkulturen ist bekannt, dass sie *in vitro* ausdifferenzieren können. Daher wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Wie verändern sich die Zytokeratine in proliferativen Urothelzellkulturen, die mit den verschiedenen Differenzierungszuständen im Urothel assoziiert werden? Können auch Urothelkarzinomzelllinien kalziumabhängig *in vitro* ausdifferenzieren? Gibt es Unterschiede im Differenzierungsprozess und in differenzierungs-assoziierten Signalwegen in normalen, proliferativen Urothelkulturen und in Urothelkarzinomzelllinien?

Dazu wurden die seltenen Zelllinien aus papillären Urothelkarzinomen BC61 und BC44 detailliert charakterisiert.

Dabei fiel auf, dass sich beide Zelllinien hinsichtlich ihres p53 Status unterscheiden. Um diesen Befund aufzuklären wurden folgende Fragen bearbeitet: Sind Methylierungsveränderungen im Promotorbereich von p53 für die Inaktivierung des wildtypischen p53 in der Zelllinie BC44 verantwortlich? Können andere p53 Isoformen unabhängig vom wildtypischen TA-p53 auf Proteinebene und mRNA identifiziert werden?

(II) Die Wirkung der Notch Signale kann sowohl auf einer kanonischen, als auch auf einer nicht-kanonischen Notch Signaltransduktion beruhen. Hinweise aus der Literatur und eigene Vorarbeiten deuteten auf eine mögliche tumorsuppressive Wirkung des nicht-kanonischen Liganden *DLK1* hin, die häufig mit einer epigenetischen Inaktivierung dieses Gens verbunden ist. *DLK1* ist ein elterlich geprägtes Gen auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2, dessen Expression über die nicht-proteinkodierende RNA *MEG3* und differentiell methylierte Kontrollregionen (DMR) reguliert wird. Diese DMRs kontrollieren die Expression aller geprägten Gene in dieser Gengruppe, vor allem auch die der RNA *MEG3*. Wir konnten eine gemeinsame hoch signifikant verminderte Genexpression von *DLK1* und *MEG3* finden. Dies führte zu folgender Fragestellung: Welche epigenetischen Mechanismen unterliegen der transkriptionellen Inaktivierung beider Gene?

Ein weiteres Gen *EGFL7* liegt benachbart zu *NOTCH1* auf dem Chromosomenabschnitt 9q34, der häufigen Gendosisverlusten im Urothelkarzinom unterliegt. Eigene Vorarbeiten wiesen darauf hin, dass *NOTCH1* stark vermindert exprimiert wird. Wird *EGFL7* parallel zu *NOTCH1* in Blasentumorgewebe und Zelllinien ebenfalls vermindert exprimiert?

(III) Eigene Vorarbeiten deuteten auf eine verminderte Genexpression von Notch Liganden und Rezeptoren hin. Daher sollten folgende Fragen geklärt werden: Unterliegen die Transkriptionsregulatoren und mutmaßlichen Zielgene äquivalent zu den Notch Rezeptoren und Liganden ebenfalls Genexpressionsveränderungen in Urothelkarzinomzelllinien und –gewebe? Können die Genexpressionsveränderungen auf Proteinebene mittels Immunocytochemie, Western Blot und Immunhistochemie verifiziert werden? Wie verhält sich der Notch Signalweg nach (A) ektopischer NOTCH1 Überexpression, (B) Hemmung des Signalwegs nach Behandlung mit γ -Sekretase-Inhibitoren und (C) nach Reduktion eines Liganden?

II. Materialien

II.1 Gewebeproben

Tabelle II.1-1 Normales und tumorhaltiges Blasengewebe für DNA und RNA Analysen

<i>Blasengewebe</i>	<i>Alter & Geschlecht</i>	<i>TNM Klassifikation</i>
BN15	70 J, m	benigne
BN 18	73 J, m	benigne
BN 273	68 J, m	benigne
BN 274	66 J, m	benigne
BN 275	62 J, m	benigne
BN 351	77 J, w	benigne
BN 363	75 J, m	benigne
BN 365	65 J, m	benigne
BN 369	86 J, m	benigne
BN 373	63 J, m	benigne
BN 374	69 J, m	benigne
BN371	72 J, m	benigne
<i>Blasentumor</i>	<i>Alter & Geschlecht</i>	<i>TNM Klassifikation</i>
BT 3	75 J, m	pT3 N0 G3
BT 6	76 J, m	pT3bii N2 G3
BT 12	60 J, m	pT3a N0 G3
BT 28	68 J, m	pT3b N0 G3
BT 41	54 J, w	pTa N0 G2
BT 55	74 J, m	pT4a N1 G3
BT 61	75 J, m	pT3b N0 G3
BT 62	80 J, w	pT3b N0 G2-3
BT 67	94 J, w	pT2 N0 G3
BT 69	77 J, m,	pT3b N0 G3
BT 104	52 J, m	pT1 N0 G3
BT 105	66 J, m	pTa N0 G2
BT 111	66 J, m	pT3b N0 G2-3
BT 115	65 J, m	pT3a N0 G3
BT 120	57 J, m	pT2 N0 G2
BT 168	64 J, m	pT3 N0 G3
BT 170	55 J, m	pT2 N0 G2
BT 172	72 J, m	pT3a N0 G3
BT 212	unbekannt	pT2a N1 G3
BT 246	61 J, m	PT4a Nx G3
BT 320	67 J, m	pT2a N1 G3

BT 322	70 J, m	pT4a N0 G3
BT 354	57 J, w	pT2b N0 G3
BT 360	76 J, m	pT4a Nx G3
BT 362	75 J, m	pT2a N0 G2
BT 364	65 J, m	pT4a N1 G3

Tabelle II.1-2 Paraffingewebe für immunhistochemische Analysen. Es wurden insgesamt 12 papilläre Tumoren, ein nicht-muskelinvasiver Tumor und 16 invasive Urothelkarzinome analysiert. Als Positivkontrollen dienten die Fälle 30-32. m = männlich, w = weiblich. CIS= Carcinoma in situ. High und low grade Karzinome wurden laut Befund nicht genauer aufgeschlüsselt.

<i>Fall #</i>	<i>Geschlecht & Geburtsjahr</i>	<i>TNM</i>
1	m, 1953	pTa low
2	m, 1930	pTa low
3	w, 1924	pTa low
4	w, 1940	pTa low
6	m, 1947	pTa low
7	w, 1932	pTa high
8	m, 1931	CIS
9	m, 1939	pTa high
10	m, 1944	pT1 G3
11	m, 1914	pT1 G3
12	m, 1960	pTa high
13	m, 1936	pT2b G2-3
14	m, 1957	pT3a N1-3
15	m, 1943	pT3a high
16	m, 1936	pT3a N1-3
17	m, 1942	pT2b G2-3
18	m, 1933	pT1 G3
19	w, 1938	pTa high
20	m, 1931	pTa high
21	m, 1953	pT4a N2 G3
22	m, 1941	pT2b G2-3
23	m, 1925	pT1 G3
24	m, 1936	pT1 G3

25	m, 1938	pTa low
26	w, 1976	pT3b N1-3
27	w, 1932	pT3a high
28	m, 1927	pTa low
29	m, 1947	pT2b G2-3
34	m, 1925	pT4a N2 G3
35	m, 1947	pT4a N2 G3
<i>Positivkontrollen</i>		
30	w	Invasives, duktales Mammakarzinom
31	m	Normaler Herzmuskel
32	m	Normale Gallenblase
33	w	Normale Gallenblase

II.2 Zelllinien

Die verwendeten Urothelkarzinomzelllinien wurden von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Research Center, Rye, NY USA und von Dr. M.A. Knowles, ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds, UK zur Verfügung gestellt und im urologischen Forschungslabor kultiviert. Die Zelllinie HEK293 wurde von Prof. Frau Kolb Bachofen (Forschungsgruppe Immunbiologie der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität) zur Verfügung gestellt. Die Mammakarzinomzelllinien wurden uns aus der Frauenklinik zur Verfügung gestellt. Die Urothelkarzinomzelllinien sind im Buch *Human Cell Cultures Volume I, 2002* beschrieben [128], mit Ausnahme der in unserem Labor etablierten Urothelkarzinomzelllinien BC44 und BC61 [31] und der immortalisierten Urothelzelllinie TERT-NHUC [39].

Tabelle II.2-1 Zusammenstellung der Zelllinien mit der Einordnung der gültigen UICC-TNM Klassifikation der Ausgangstumoren, soweit bekannt. E/M bedeutet epithelial und/oder mesenchymal wachsend. TCC ist die früher übliche Bezeichnung für Urothelkarzinome.

<i>Zelllinie</i>	<i>Geschlecht & Alter</i>	<i>TNM</i>	<i>Morphologie</i>
<i>Urothelkarzinom</i>			
BC44	w	(papillär) pT4G3	epithelial
BC61	m	pTaG2	epithelial
BFTC905	m, 51 J	pTaG3	epithelial
J82	m	(papillär) G3	E/M
RT4	m, 63 J	(papillär) pT2G1	epithelial
RT112	w	(papillär) G2	epithelial
SW1710	w, 84 J	(papillär) G3	E/M
253J	w, 84 J	Lymphknotenmetastase von TCC, G2	epithelial
5637	m, 68 J	TCC, G2	epithelial
639v	m, 69 J	TCC, G3	mesenchymal
647v	m, 59 J	pT1G2	epithelial
HT1376	w, 58 J	pT2 G3	epithelial
SD	m	TCC	epithelial
T24	w, 81 J	TCC, G3 Recurrence	mesenchymal
UMUC3	m	TCC, G3	mesenchymal
UMUC6	m	TCC	epithelial
VmCUB1	m	TCC	E/M
MGHU4	m, 57 J	Urotheliale Atypie	epithelial
SCaBER	m	Plattenepithelkarzinom	epithelial
<i>Mammakarzinom</i>			
MCF7	F, 69 J	Adenokarzinom	epithelial
T-47D	F, 56 J	duktales Adenokarzinom, ER positiv, HER2 positiv	epithelial
<i>Immortalisierte Zelllinien</i>			
HEK293	unbekannt	normale Niere	epithelial
TERT-NHUC	unbekannt	normales Urothel, immortalisiert mit TERT	epithelial

II.3 Medien und Zusätze

II.3.1 Für papilläre Urothelkarzinomgewebe und -Zelllinien

- Epilife Medium (M-EPI-500-CA, #491815, Invitrogen); Insulin-Transferrin-Selenium (#292422, Invitrogen); Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) (#91674, Invitrogen)
- Versene (#L2113, 1% EDTA in PBS, Biochrom)
- Fibroblastenüberstand (im Labor hergestellt aus in DMEM mit 15% FCS kultivierten Vorhautfibroblasten)
- FCS/ FBS (unterschiedliche Chargen)
- Accutase (#L11-007, PAA)

II.3.2 Für etablierte Urothelkarzinomzelllinien

- DMEM GlutaMAX (#536336 Invitrogen)
- Trypsin (#9A0636, Sigma)
- Versene (#15040-066, 0.2% EDTA in PBS, Invitrogen)

II.3.3 Für primäre Urothelkulturen (UP)

- KSFM und KSFM-Supplemente (BPE, EGF #496468, Invitrogen)
- Kollagen IV (#C5533-5mg, Sigma)
- Hydrocortison (#H0888-1G, Sigma)
- Cholera Toxin (#BML-G117, Enzo Life Science)
- Trypsin-Inhibitor (#T-9253-1G, Sigma)
- Epinephrin (E-1635-5G, Sigma)

II.4 PCR-Reagenzien

- Reverse Transkription: 100 μ M Oligo(dT)18 Primer (#S0131, Fermentas), 0.2 μ g/ μ l Random Hexamer Primer (#S0142, Fermentas), 10 mM dNTP-Mix (#R0192, Fermentas), 40 U/ μ l RiboLock RNase Inhibitor (#E00382, Fermentas), Superscript II Reverse Transkriptase Kit (200 U/ μ l; #18064-014, Invitrogen)
- QuantiTect Reverse Transcription (#205313, Qiagen)
- SYBR Green PCR Mastermix (#133190724, Qiagen)
- HotStarTaq Polymerase Kit (5 U/ μ l; #203205, Qiagen)
- Sepharose-Beads (#40-0100, Qiagen)
- Pyromark PCR Kit (#978-703, Qiagen)

- Pyromark-Puffer und Zubehör (Qiagen): Annealingpuffer (#979-009), Waschpuffer (#979-008), Denaturierungspuffer (#979-007), Bindepuffer (#979-006), Q24 Reagenzien (Enzym- und Substratmix, Nukleotidmix; #970-802), Q24 Kartuschen (#979-202), Platten (#979-201) und Plattenhalter (#979-205)

II.5 Primer

Tabelle II.5-1 Primer zur Analyse der DNA-Methylierung mittels Bisulfitsequenzierung, COBRA und Pyrosequenzierung

<i>Gen</i>	<i>Primername</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>T_m [°C]</i>	<i>Produkt [bp]</i>
<i>DLK1 Promotor</i>	BiSeq_DLK1-R2_F	GTTTTTATGGTTAGG GGTATAGGG	59	204
	BiSeq_DLK1-R2_R	CAAACCTCCCCAAAA ACACATT	58	
<i>MEG3 DMR</i>	BiSeq_MEG3ICR_F	GTAAGTTTTATAGGT TGTAAGGGGGTGT	62	212
	BiSeq_MEG3ICR_R	CCACAATAATAACT AAAAAATAAACATT	55	
<i>NOTCH1</i>	Biseq_NOTCH1_F	TAGTAGAGTTAGGTA GAGTAG	54	316
	Biseq_NOTCH1_R	CTCTAAACCTCACTA ATACCT	54	
<i>IG DMR</i>	Biseq_IGDMR_F	GTTAAGAGTTTGTGG ATTTGTGAGAAA	58	469
	Biseq_IGDMR_R	CTAAAAATCACCAA ACCCATAAAATC	59	
<i>MEG3 DMR (Pyrosequenzierung)</i>	Pyro_MEG3_DMR_F	AGTTAATGATTAGGG AGGTGAATATTGAT- 5'Biotin	59	240
	Pyro_MEG3_DMR_R	TCCCAAACCTCTAATC CCTAAAACCTCCT	61	
<i>DLK1 Promotor (COBRA)</i>	Pyro_MEG3_DMR_S	TCTCTATCTCCCCAA CAATA	53	40
	MS-DLK1-TaqI_F	GTATATATAGGTTTG TTTAGGATA	52	280
MS-DLK1-TaqI_R	TACCACCAAACAAC ACATTTTT	53		

Tabelle II.5-2 Primer zur Chromatinanalyse (ChIP, Nukleaseverdau und Nukleosomenpositionierung/NuSA)

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>T_m [°C]</i>	<i>Produkt [bp]</i>
MEG3	ChIP MEG3_F1	GCTGTTTCCTAGCTATTAATACTG	57,6	82
	ChIP MEG3_R1	CGCTTCAAAAAATCATGG	49,1	
	ChIP MEG3_F2	GTGTCTACGACAGCCTCC	58,2	233
	ChIP MEG3_R2	CTAGGAAACAGCCAGAGC	56	
DLK1	ChIP DLK1_F	AGTGTTCGGTGTTCCTG	53,7	88
	ChIP DLK1_R1	GCCTGCCTAGGACAAGTC	58,2	
	ChIP DLK1_R2	TACACGTTCCCTCACACTG	56,7	136
IG DMR	ChIP_IGDMR_M_F1	CTTGCTAATTGCCAGCGAT	54,5	73
	ChIP_IGDMR_M_R1	GGATTACGGGTTTAGCGGA	56,7	
	ChIP_IGDMR_U_F2	CAATGGACTCGCCCTTTAG	56,7	96
	ChIP_IGDMR_U_R2	AACCATGGCGAATTGTGGT	54,5	
DIO3	EpiQ_DIO3_F	CAGCCCAAGATTTCTAGG	53,3	137
	EpiQ_DIO3_R	GCAGTGCAGGGAGTTCAA	58	
14q32_R1	ChIP_14q32_R1_F	CATACATTCAATGCTCTGAGA	54	135
	ChIP_14q32_R1_R	GTACATTTCCCAGAAATTCTC	54	
14q32_R2	ChIP_14q32_R2_F	ACCCTCAACATCCCTATTTA	53	122
	ChIP_14q32_R2_R	CTACCTCAACCTCCCAAAGT	57	
14q32_R3	ChIP_14q32_R3_F	CCTTCGTTTGCTTTTCCTTA	53	119
	ChIP_14q32_R3_R	GGCTCAAATGTTCAACATAC	53	
GAPDH	GAPDH_F94	GGCGGCCTCCGCATTGCA	62	70
(NuSA)	GAPDH_R164	CCCACCAGGCCTCCATGC	62	

<i>GAPDH</i>	ChIP_GAPDH_F	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	60	
	ChIP_GAPDH_R	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	66	
<i>CTCF</i>	ChIP_CTCFL_F	GAACAGCCCATGCTCTTGGAG	62	
	ChIP_CTCFL_R	CAGAGCCCACAAGCCAAAGAC	62	
	ICR-1_F38	GTCCCCAAGTAGAGGGTG	58	
	ICR-1_R105	TCCAGCCTGGGGTGTAAC	58	67
	ICR-2_F308	GTTGCCCATGGCTTGCTAAT	57	
	ICR-2_R355	ACCACTCGCAATTGGCAAAT	55	47
	ICR-6_F94	CCCCAGGCTGGAATTGCTAAG	61	
<i>IG DMR</i>	ICR-6_R175	CACAGGCAACTGGCAAGGCC	63	81
<i>(NuSA)</i>	ICR-8_F387	ATCCTGTGGTACTGTAAGT	55	
	ICR-8_R460	CTGCATTTGGGCAAAGAGG	57	73
	ICR-9_F443	TCTTTTGCCCAAATGCAGTTCT	56	
	ICR-9_R534	AGAATCACCAAGACCCATGAA	56	91
	ICR-12_F551	TACGGTCCTCAGGCAACTTC	60	
	ICR-12_R634	GGGGAGGTGCAGGACACAA	61	83

Tabelle II.5-3 Primer zur Genexpressionsanalyse von Komponenten des Notch Signalwegs und Zytokeratinen

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>T_m [°C]</i>	<i>Produkt [bp]</i>
MEG3	MEG3_F	CTGTCTACACTTGCTGTCTT	58	259
	MEG3_R	TTCCCACGTAGGCATCCAGG	64	
CDKN1A (P21)	P21_F	GGAAGACCATGTGGACCTGT	59	146
	P21_R	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	57	
NOTCH3	NOTCH3_F	TGTGGACGAGTGCTCTATCG	60	238
	NOTCH3_R	AATGTCCACCTCGCAATAGG	59	
MAML1	qPCR_MAML1_F1	TACCAAGACCCGACACAA	53	
	qPCR_MAML1_R1	ATCATAGGCAGTGCACAAC	54	83
	qPCR_MAML1_R2	TCGAGGACAGCTGGAGTT	56	114
CBF1	qPCR_CBF1_F1	TGGGATAGGAAATAGTGACC A	55	82
	qPCR_CBF1_R1	TATATACAATGTTTTGGCTGT GC	55	
SKIP	qPCR SKIP_F1	GAGAAGAGCTGGGATCAAA	54	90
	qPCR SKIP_R1	CTCTCTTTTCGCCTGTCA	53	
EGFL7	EGFL7_F	GTAGGGTGTGTGCTGTCC	58	138
	EGFL7_R	GGTAGGCGGCCTATAGA	56	
NOTCH1	qRT-NOTCH1_F2	CTGGTCAGGGAAATCGTG	56	95
	qRT-NOTCH1_R2	AGATGTAGGAGGCCTCGA	56	
TBP	qRT-TBP_F1	CGAAACGCCGAATATAATCC	55	62
	qRT-TBP_R1	CGTGGCTCTCTTATCCTCA	56	
KDM5A	RT-KDM5A_F1	GCTGTGAACTTCTGFACTG	54	106
	RT-KDM5A_R1	AAATTAGTTCCTCGTGTGA	50	

<i>HES1</i>	RT-HES1_F2	GGATGCTCTGAAGAAAGATA	53	132
	RT-HES1_R2	ACACTTGGGTCTGTGCTC	56	
<i>MYC</i>	RT-MYC_F	GCTCCATGAGGAGACACC	58	94
	RT-MYC_R	CCTCTTTTCCACAGAAAC	51	
<i>DELTEX1</i>	RT-DTX1_F	CAGCTTGTGCCCTACATC	56	98
	RT-DTX1_R	GACGGGTCGTAGAAGTTG	56	
<i>DELTA1</i>	DLL1_F (ex5/6)	GAATGCAAGTGCAGAGTG	58	148
	DLL1_R (ex6/7)	TAGTTCAGGTCCTGGTTG	57	
<i>JAGGED1</i>	JAGGED1_F	AGGACTATGAGGGCAAGAAC T	58	140
	JAGGED1_R	AAATATACCGCACCCCTTC	54	
<i>KRT14</i>	CK14_F	GCGCACCATGCAGAACCTG	61	140
	CK14_R	CCTCCACGCTGCCAATCATC	61	
<i>KRT5</i>	CK5_F	GATGATCCAGAGGCTGAGAG C	62	130
	CK5_R	CTCGGCCAGCTTGTTCTG	61	
<i>KRT20</i>	CK20_F	GAAGTGGAGTTCAACTAACG GAGC	62	100
	CK20_R	TGGCTAACTGGCTGCTGTAAC G	62	
<i>UPK2</i>	UPK2_F	GACAGCCACTGAGTCCAGCA G	64	114
	UPK2_R	AGCACCGTGATGACCACCAT G	63	

Tabelle II.5-4 Primer für Sequenzierungs-, Mutations-, Methylierungs- und Genexpressionsanalysen von p53 [31]. PU/PD Primer wurden für DNA-PCRs verwendet. PU= p53 up= forward=F=sense und PD= p53 down=reverse=R=antisense.

<i>Primer</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>T_m [°C]</i>	<i>Produkt [bp]</i>
<i>p53_In2Ex4_F</i>	CCAGGTGACCCAGGGTTG	62	417
<i>p53_In2Ex4_R</i>	GCAAGGGGGACTGTAGATGG	61	
<i>PU4</i>	CACCCATCTACAGTCCCCCTTGC	68	321
<i>PD4</i>	ATGGAAGCCAGCCCCTCAGGGCA	75	
<i>PU5</i>	CTCTTCCTACAGTACTCCCCTGC	60	211
<i>PD5</i>	GCCCCAGCTGCTCACCATCGCTA	73	
<i>PU6</i>	GATTGATCTTAGGTCTGGCCCCTC	65	182
<i>PD6</i>	GGCCACTGACAACCACCCTTAACC	68	
<i>PU7</i>	GTGTTGTCTCCTAGGTTGGCTCTG	63	139
<i>PD7</i>	CAAGTGGCTCCTGACCTGGAGTC	66	
<i>PU8</i>	ACCTGATTCCTTACTGCCTCTTGC	65	200
<i>PD8</i>	GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT	65	
<i>p53cDNAup</i>	CAGATAGCGATGGTCTGGCC	63	381
<i>p53cDNAdown</i>	TGGGCAGTGCTCGCTTAGTG	64	
<i>cDNA_p53_fwdPK</i>	GTGACACGCTTCCCTGGAT	58	1100
<i>cDNA_p53_revPK</i>	GAGTTCCAAGGCCTCATTCA	57	
<i>RT_p53_4b_fwd</i>	TAGACGCCAACTCTCTCTAG	59	
<i>RT_p53_4b2_fwd</i>	TGGGTTGCAGGAGGTGCTTACGC	64	
<i>RT_p53_10a_rev</i>	CTCACGCCCACGGAT	61	
<i>RT_p53_RT1_rev</i>	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC	68	
<i>MS_p53_U_fwd</i>	TTTGGTAGGTGGATTATTTGTT	52	243
<i>MS_p53_U_rev</i>	CCAAAAAACATATCACCATCA	52	

<i>MS_p53_M_fwd</i>	TTCGGTAGGCGGATTATTTGTT	56	242
<i>MS_p53_M_rev</i>	CAAAAAACGTATCACCGTCGT	56	
<i>p53 Ex1_F</i>	GTTTTCCCCTCCCATGTG	56	
<i>p53 Int 1_R</i>	GGTGGATGTGCAAAGAAGTACGC	62	464
<i>DNA_GAPDH_F</i>	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	59	166
<i>DNA_GAPDH_R</i>	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	65	

Tabelle II.5-5 Zusammenfassung der käuflich erworbenen PCR-Assays. Die Expressionsassays wurden von der Firma Qiagen erworben. Von den Assays waren nur die relative Lokalisation der Primer und ihre amplifizierte Produktgröße bekannt. QuantiTect Assays funktionierten generell bei $T_m=55^\circ\text{C}$.

<i>Gen</i>	<i>Primerassay</i>	<i>Relative Primerlage</i>	<i>Produkt [bp]</i>
<i>CDKN1B</i>	QT00998445	Exon 2	146
<i>DLK1</i>	QT00093128	Exon 3/4	136
<i>DLL1</i>	QT00057631	Exon 4-6	124
<i>HEY1</i>	QT00035644	Exon 4/5	126
<i>NOTCH2</i>	QT00072212	Exon 33/34	109
<i>TBP</i>	QT00000721	Exon 4-6	131
<i>KRT7</i>	QT01672951	Exon 3/4	106

II.6 Reagenzien für Proteinanalysen

- Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-170 kD (#SM0671, Fermentas), Page Ruler Prestained Plus Protein Ladder 10-250 kD (#SM1811, Fermentas) Rinderserumalbumin Fraktion 5 (#70210725, Roche), RIPA Puffer bestehend aus 150 mM NaCl; 1% Triton X-100, 0.5% DOC; 0.1% Sodiumdodecylsulfat; 50 mM Tris, pH 8, BCA-Protein Assay Kit (#KB129065, Pierce)
- 10xTris/Glycin/SDS Puffer (#161-0732, BioRad); Blotting Puffer 5x bestehend aus 28.4 mM Tris; 192 mM Glyzin, pH 8.3

- Blocking Puffer abhängig vom jeweiligen Protokoll mit 5% Magermilchpulver (Drogerie) in 0.1% Tween-TBS oder 5% BSA in 0.1% Tween-TBS
- TBS bestehend aus 50 mM Tris, 150 mM NaCl, Millipore ad 1l, pH 7.6
- Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (#K6NN8585V, Millipore)
- Mini-Protean4-TGX-Gele (#456-xxx, Biorad)
- ECLTM advanced Western Blotting Detection Kit (RPN2135, #25, Amersham, GE Healthcare), ECLTM Western Blotting Analysis System (RPN2109, #103, Amersham, GE Healthcare)
- Hyperfilm ECLTM *high performance chemoluminescence film* (Amersham, GE Healthcare)
- Mounting Medium (#10016125, Dako)
- Saponin (#034K7023, Sigma)
- Protease Inhibitor Cocktail (#P0044-1, Sigma)

II.7 Chemikalien und Antibiotika

- Methanol (#K38650909-834, Merck), Ethanol (#K38741783-821, Merck), Formaldehyd (#K27267303-952, Merck), DMSO (#32K0063, Sigma)
- QIAzol (#42472490, Qiagen)
- PBS Dulbecco 9.55 g/l (#0141T, Biochrom AG)
- LB-Medium: 25 g Luria Broth Base auf 1 l dH₂O [BD], LB-Agar: 30 g Luria Agar Base Miller (#8119716) auf 1 l dH₂O
- Kanamycinsulfat (#18891, Serva) & Ampicillinnatriumsalz (#056K0673, Sigma)
- GIEMSA Lösung (#HX884850, Merck)
- Blastidicin S HCl (50 mg; R210-01, Invitrogen)
- Zeocin Selection Reagent (R250-01, Invitrogen)
- Geneticin Selective Antibiotic G418-Sulfat (#11811-023, Invitrogen)
- Agarose (#A9539-500, Sigma)
- TAE (#2500060, 5 Prime)
- Tris-Base (#77861, Merck)
- Glyzin (#56404, Merck)

II.8 γ -Sekretase-Inhibitoren

- DAPT (#2634, TOCRIS/R&D Systems)
- L-685,458 (#2627, TOCRIS/R&D Systems)
- Compound E (#56597, Calbiochem/Millipore)
- Compound W (#2654, TOCRIS/R&D Systems)

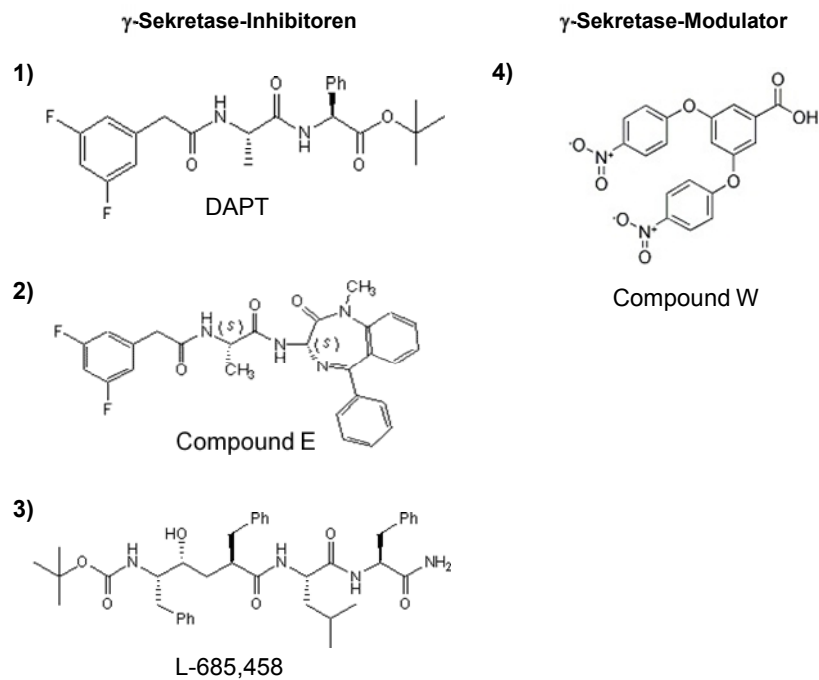


Abbildung II.8-1 Übersicht über die chemische Struktur der γ -Sekretase-Inhibitoren (1) DAPT, (2) Compound E, (3) L-685,458 und (4) Compound W

II.9 Bakterienstämme

- OneShot®TOP10 chemisch kompetente *E.coli* (#C-4040-10, Invitrogen), Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
- XL2-Blue ultrakompetent (#200150, Stratagene), Genotyp: endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr].
- XL1 kompetent (#200250, Stratagene), Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]

II.10 Plasmide

II.10.1 Reporterkonstrukte:

- pGL3 basic Luciferase (#E1741, Promega)
- p850 enthält ein 850 bp langes LINE1 Fragment mit dem 5'UTR im pGL3 Vektor
- pJH26A enthält 4 Bindestellen für den CBF1/RBPJ κ Repressor in der Promotorregion der Luciferase im pGL2 basic Vektor, zur Verfügung gestellt von Dr. Diane Hayward, John Hopkins University [129]
- pJH28A enthält 4 mutierte Bindestellen für den CBF1/RBPJ κ Repressor [129]

II.10.2 NOTCH1-Plasmide:

- Humane NOTCH1-ICD im pIRES2-GFP Vektor in den Restriktionsschnittstellen SrgAI/XhoI, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Giebel, vormals aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Murine Notch1-ICD im pcDNA3.1 Vektor in den Schnittstellen BamHI/XhoI, zur Verfügung gestellt von Prof. Keith Brennan, University of Manchester, England [130]
- Humanes Vollängen NOTCH1 Wildtyp-Konstrukt und NOTCH1 R2328W Mutante im pcDNA3-HA/FLAG Vektor, zur Verfügung gestellt von Prof. Piero Paolo Di Fiore, Yale University School of Medicine, USA [131]

II.10.3 shRNA Plasmide:

- shRNA JAGGED1 im pCLIP-Neomycin Vektor unter der Kontrolle eines U1 Promotors, vier unterschiedliche shRNA JAGGED1 Sequenzen, käuflich erworben von SABiosciences (#336313 KH06022N)
- shRNA NOTCH2 im pCLIP-Neomycin Vektor unter der Kontrolle eines U1 Promotors, vier unterschiedliche shRNA NOTCH2 Sequenzen, käuflich erworben von SABiosciences (#336312 KH06330N)
- shRNA DELTA1 im pCLIP-Neomycin Vektor unter der Kontrolle eines U1 Promotors, vier unterschiedliche shRNA DELTA1 Sequenzen, käuflich erworben von SABiosciences (#336314 KH06024N)
- shRNA Irrelevante im pCLIP-Neomycin Vektor unter der Kontrolle eines U1 Promotors, drei unterschiedliche shRNA IR (IR Klon1, Klon 2, Klon 4) Sequenzen, käuflich erworben von SABiosciences

Tabelle II.10-1 Übersicht über die verwendeten siRNA Sequenzen. Alle Ambion und Invitrogen siRNAs sind silencer select stealth RNAi

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>Firma</i>
<i>Notch2</i>	Sense	GAUGUAACAUGACAUGATT	Ambion, s9639
	Antisense	UCAAUGUCA AUGUUACAUCTC	
<i>Delta1</i>	Sense	CGGGAUGGCGUGAACGACUUCUC CU	Invitrogen, DLL1HSS1- 78768-20
	Antisense	AGGAGAAGUCGUUCACGCCAUCC CG	
<i>Negativ- kontrolle</i>	Low CG Duplex	unbekannt	Invitrogen, 45-2002
<i>Negativ Kontrolle</i>	On-Target Plus Control Pool	unbekannt	Dharmacon, (NK)D001810-10-05

Tabelle II.10-2 Primärantikörper

<i>Anwendung</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Klon, Firma und Wirt</i>	<i>Konzentration</i>
<i>Chromatinimmun- präzipitation (ChIP)</i>	H3K4me3	ab8980, Abcam	3 µg pro ChIP
	Histon3ac	#39139, Active Motif	3 µg pro ChIP
	H3K27me3	#39535, Active Motif	3 µg pro ChIP
	H3K9me3	Ab8898, Abcam	3 µg pro ChIP
	H4K16ac	#391678, Active Motif	3 µg pro ChIP
<i>Western Blot (WB), Immunozytochemie (ICC), Immunhistochemie (IHC),</i>	NOTCH1	EP1238Y, Epitomics, C-terminal, Kaninchen	WB 1:3000, ICC 1:100, IHC 1:100
	NOTCH2	Ab8926, Abcam, N2ICD, Kaninchen	WB 1:7000, ICC 1:200

DELTA1	H-265, Santa Cruz, C-terminal, Kaninchen	WB 1:2000, ICC 1:100, IHC 1:100
DELTA1	ab84620, Abcam, N-terminal, Kaninchen	WB 1:3000, ICC 1:100
JAGGED1	H-114, Santa Cruz, C-terminal, Kaninchen	WB 1:7000, ICC 1:100, IHC 1:100
α -Tubulin	B-512, Sigma, Maus	WB 1:50000
CK14	C8791, Sigma, Maus	ICC 1:100
CK5	Ab53121, Abcam, Kaninchen	WB 1:2000, ICC 1:100,
CK20	M7019, Dako, Maus	ICC 1:20
CK8/18	sc1820, Santa Cruz, Maus	WB 1:2000, ICC 1:100,
UPK2	Sc15179, Santa Cruz, Ziege	ICC 1:20
P53	DO12, Maus	Unverdünn
P53	pAB240, Santa Cruz, DNA Binde- Domäne, Maus	WB 1:500, ICC 1:50, IHC 1:100
P53	Ab6, Oncogene Science, N-Terminal, Maus	WB 1:1000, ICC 1:100
Ki67	MIB1, Santa Cruz, Kaninchen	WB 1:1000, ICC 1:50
GAPDH	6C5, Abcam, Maus	WB 1:20000

Tabelle II.10-3 Sekundärantikörper

Anwendung	Antikörper	Klon, Firma und Wirt	Konzentration
Western Blot	anti-rabbit HRP	Sc-2004, Santa Cruz, Ziege	1:200000 bis 1:500000
	anti-mouse HRP	Sc-2005, Santa Cruz, Ziege	1:200000 bis 1:500000
Immunozytochemie	Anti-rabbit Alexa Fluor 488 nm	A11034, Invitrogen, Ziege	1:500
	Anti-mouse Alexa Fluor 488 nm	A11025, Invitrogen, Ziege	1:500
	Anti-mouse Cy3 550 nm	#115-165-146, Jackson Immuno Research	1:500

II.11 Verwendete Kits

II.11.1 Kits für die RNA Isolierung von Qiagen

- RNeasy Mini Kit (#130181240)
- RNeasy Micro Kit (#133193958)
- QIAshredder Säulen (#11876858)

II.11.2 Kits für DNA Isolierung und Aufkonzentrierung

- Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (#13343, Qiagen)
- QIAamp DNA Mini Kit (#51304, Qiagen)
- ZymoClean DNA Recovery Kit (#D4001, ZymoResearch)
- DNA Clean and Concentrator-5 (#D4005, ZymoResearch)

II.11.3 Kits für die Kern-Proteinextraktion, Konzentrationsbestimmung und Co-IP

- Nucleus Extraction Kit (#40010, ActiveMotif)
- Microcon (#R9CN87581, Millipore)
- BCA Assay Kit (#23225, Pierce)
- Protein Assay (Bradford) (#500-0001, BioRad)
- Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit (#88805, Pierce/ Thermo Fisher Scientific)

II.11.4 Kits für die Plasmidisolierung

- EndoFree Plasmid Maxi Kit (#12362, Qiagen)
- Qiagen Plasmid Maxi Kit (#12163, Qiagen)
- HiSpeed Plasmid Maxi kit (#12663, Qiagen)
- Zyppy-Plasmid Miniprep Kit (#D4036, ZymoResearch)

II.11.5 Kits für Methylierungs- und Chromatinanalysen

- EZ DNA Methylation GOLD Kit (#D5005, ZymoResearch)
- TOPO®TA Cloning® Kit mit dem pCR4-TOPO Vektor zur Bisulfitequenzierung (#K4575-10, Invitrogen)
- EpiQ Chromatin Prep Kit (#172-5400, Biorad)
- ChIP-IT Express Kit (#53008, Activ Motif)
- EZ Nucleosomal DNA Prep Kit (#D5220, ZymoResearch)

II.11.6 Kits für funktionelle Analysen

- Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (#E1910, Promega)
- CellTiter-Glo Luminescent Viability Assay (#G7571, Promega)
- Caspase 3/7-Glo Luminescent Assay (#G8091, Promega)
- MTT Reagenz (#M5655, Sigma)

II.12 Software

- PyroMark Assay Design Version 2.0 zum Design von methylierungsspezifischen und normalen Primern
- SDS Software Version 2.2 zur Programmierung und Auswertung der qPCRs am ABI7900HT (Applied Biosystems)
- IBM/SPSS Version 20 zur statistischen Analyse der Daten
- Endnote X5-Literaturprogramm
- ApE- a vector map editor Version 2.0.45 zur Erstellung der Plasmidkarten und in-silico Restriktionsverdau

Tabelle II.12-1 Übersicht über die verwendeten Geräte

<i>Verwendung</i>	<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
Absorptionsmessung	ELISA	SLT Labinstruments Austria
	Viktor	Wallac
	Nanodrop	Nanodrop Technologies
Filmentwicklung	Curix 60	AGFA
Gelelektrophorese	Gelelektrophoresekammer	Biometra
	Gelelektrophoreseentwicklung	Intas
Mikroskopie	Zellkulturmikroskop Nikon Eclipse200	Nikon
	Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse400	Nikon
Pyrosequenzierung	Pyromark Workstation Q24	Qiagen
Qualitative PCR	ThermocyclerT3	Biometra
Real Time PCR	ABI7900HT	Applied Biosciences
	LightCycler2.0	Roche
Reportergenassays	LB 9506 MiniLumat	Berthold Technologies
Schüttler & Zentrifugen	Orbitalshaker	Neolab, Stuart Scientific
	Avanti TM 30/ Allegra 21R	Beckmann Coulter
	Tischzentrifugen	Eppendorf
	Roller	Neolab, Stuart Scientific
Thermomixer und Vortexer	Thermomixer	Eppendorf
	Vortexer	Neolab
Western Blot	TetraCell	Biorad
Zellkultur	Brutschrank	Heraeus, Edison

Tabelle II.12-2 Datenbanken: Verwendung und Internetadresse

<i>Datenbank</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Internetadresse</i>
<i>bisearch</i>	Suche und Design von Primern für Methylierungsanalysen: MS-PCR, Bisulfitsequenzierung	http://bisearch.enzim.hu/
<i>Cancer genome workbench</i>	Sammlung von Mutationen, Gendosisveränderungen (Amplifikation, Deletion), Expression- und Methylierungsdaten von verschiedenen Projekten; insbesondere in Zelllinien und Geweben	https://cgwb.nci.nih.gov/
<i>COSMIC (catalogue for somatic mutations in cancer)</i>	Darstellung von DNA Veränderungen und Mutationen in Gewebe und Zelllinien	http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/
<i>Ensembl</i>	Genomkartierung mit vielfältigen Tools zur Analyse von Genmodifikation, Expression, Regulation, Ausgabe von DNA und RNA Sequenzen, gute Übersicht über Spleißvarianten	http://www.ensembl.org/index.html
<i>pubmed</i>	Literatur	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
<i>NuPoP (nucleosome positioning prediction engine)</i>	Vorhersage und graphische Darstellung von Nukleosomen	http://nucleosome.stats.northwestern.edu/
<i>Oncomine</i>	Sammlung von Microarrays und Genexpressionsanalysen	http://oncomine.org/
<i>QUMA (quantification tool of methylation analysis)</i>	Analyse und graphische Darstellung nach Bisulfitsequenzierung	http://quma.cdb.riken.jp/
<i>UCSC genome browser</i>	Genomkartierung mit vielfältigen Tools zur Analyse von Genmodifikation, Expression, Regulation, Ausgabe von DNA und RNA Sequenzen, in-silico PCR, Blasten	http://genome.ucsc.edu/
<i>IARC p53 Database</i>	P53 Datenbank mit Polymorphismen, Mutationsanalysen, Isoformen	http://www.p53.iarc.fr/

III. Methoden

III.1 Zellkultur

III.1.1 Zelllinien

Alle Urothelkarzinomzelllinien wurden in kalziumreichem (1.8 mM Ca²⁺) DMEM Medium mit 10% FCS bei 37°C kultiviert. Primäre Urothelkulturen und papilläre Urothelkarzinomzelllinien wuchsen nur in einem serumreduzierten Spezialmedium Epilife mit Kollagen IV Beschichtung.

Bei *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)* handelt es sich um eine Modifizierung des Basal- und Minimalmediums nach Eagle, mit einer vielfach erhöhten Konzentration von Aminosäuren, Vitaminen und Pufferung.

Epilife enthält nur 60 µM Kalziumchlorid, optimal für das Wachstum von epidermalen Keratinozyten und kornealen Epithelzellen. Es stellt ein definiertes Basalmedium dar, das nicht-essentielle Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze und Spurenminerale enthält. Bei der Kultivierung der papillären Urothelkarzinomzelllinien und der papillären Blasen-tumoren wurde FCS durch verschiedene Supplemente wie 1% Insulin-Transferrin-Selenium, Keratinozyten-SFM Supplemente mit 0.25 µg EGF und 12.5 mg BPE (bovine pituitary extract), 3 mM Glyzin, 10% Fibroblastenüberstand und 1% Antibiotika ersetzt. Durch den Fibroblastenüberstand kommt ein Anteil von 1% FCS zustande.

III.1.2 Urotheliale Primärkulturen

Urotheliale Primärzellen wurden aus Uretern nach Nephrektomien (in der Urologischen Klinik der Heinrich Heine Universität) in Kollagen IV beschichteten Zellkulturflaschen in KSFM kultiviert. *KSFM* ist ein serum- und kalziumfreies Medium mit 5 ng/ml EGF (*epidermal growth factor*) und 50 µg/ml BPE (*bovine pituitary extract*) supplementiert.

Dazu wurden die Ureter von Fett und Bindegewebe befreit, der Länge nach aufgeschnitten und mit der Urothelseite nach oben in einer Versene/10 mM HEPES/ 2 KU Aprotinin-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Urothelzellen vom Ureter abgeschabt, zweimal zentrifugiert, mit Medium gewaschen und auf Kollagen IV-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät.

III.1.3 Passagieren und Einfrieren

Die Urothelkarzinomzelllinien wurden durch Zugabe von 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst und die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt. In Zelllinien und Primärkulturen, die in serumfreiem Medium kultiviert werden müssen, wurde die Reaktion entweder mit dem doppelten Volumen Trypsin-Inhibitor [1 mg/ml in PBS] abgestoppt oder 2 ml Accutase statt Trypsin verwendet.

Die Zellen wurden in eiskaltem FCS mit DMSO (Verhältnis 9:1) erst bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Primärkulturen und papilläre Urothelkarzinomzelllinien wurden in ihrem jeweiligen Spezialmedium und DMSO im Verhältnis 9:1 eingefroren.

III.2 Isolation von Nukleinsäuren

III.2.1 RNA Isolation und Reverse Transkriptase PCR

Totale RNA wurde aus subkonfluenten Zellkulturen nach dem Labor-Standardprotokoll (vom Oktober 2009) mit Trizol/Cholorform extrahiert, mit dem RNA Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit Wasser in 35 µl eluiert. Für geringe Zellmengen wurde entsprechend das RNA Micro Kit verwendet. 2 µg RNA wurden in die cDNA Reaktion, bestehend aus 10 mM dNTPs, 300 ng OligodT, 25 ng Random Hexamer Primer und 200 U SuperScriptII Reverse Transkriptase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt (siehe Tabelle III.2-1).

Tabelle III.2-1 Mastermixe und Bedingungen für die Reverse Transkription

	Volumen [μ l]	Programm
<u>Mix A</u>		
2 μg RNA	10	
dNTP [10 mM]	1	
OligodT [500 ng/μl]	0.6	
Random Hexamere [200 ng/μl]	0.125	
Wasser	0.275	
		65°C 5 min
<u>Mix B</u>		
5xFS Puffer	4	
10x DTT	2	
RNase Inhibitor	1	
SIIRT [200 U/μl]	1	
		25°C 10 min
		50°C 50 min
		70°C 10 min

III.2.2 Quantitative PCR

Die Genexpressionsanalysen wurden am ABI7900HT (Applied Biosystems) oder am LightCycler (Roche) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 2x QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix (Qiagen) und Primern (10x QuantiTect Primer Assay oder 5-10 μ M Primer), sowie 10 ng cDNA. Als Referenz und zur Qualitätskontrolle wurde *TBP* für jede cDNA mitgeführt. Zum Ausschluss von Primerdimeren und zur Kontrolle spezifisch gebildeter Amplifikate wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und das Produkt auf einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bedingungen für die qPCR mit nachfolgender Schmelzkurvenanalyse sind in der folgenden Tabelle III.2-2 dargestellt.

Die relative Expression eines Gens wurde durch das Verhältnis vom Messgen zum Referenzgen *TBP* berechnet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Version 20 (IBM) unter Anwendung des Mann-Whitney U Tests, einem nicht-parametrischen Test für ungepaarte Stichproben.

Tabelle III.2-2 qRT-Bedingungen für die Real Time PCR

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	15 min	
Amplifizierung	95	15 sec	
	T_m *	20-30 sec	45x
	72	**	
Schmelzkurvenanalyse	90	Gradient 0,2°C/sec	
	60-99		
Kühlung	42	20 sec, Ende	

*Annealingtemperatur vergleiche Primertabellen (Kapitel II.5) im Materialteil, **Die Elongationszeit ist abhängig von der Produktgröße und wird folgendermaßen ermittelt: $\text{Produktgröße [bp]} / 25 = \text{Elongationszeit [sec]}$

III.2.3 DNA Isolierung

Genomische DNA wurde nach dem Standardprotokoll aus subkonfluenten Zellkulturen mit Hilfe des DNA Midi Kits (Qiagen) gewonnen. Die genomische DNA wurde für Methylierungs- und Chromatinanalysen, Gendosis-Messungen und für Mutationsanalysen verwendet.

III.2.4 Methylierungsanalysen

Für die methylierungsspezifischen PCRs wurde 1 µg DNA mit dem *EZ DNA Methylation GOLD Kit* (Zymo Research Corp.) bei 95°C für 10 min und bei 64°C für 2.5 h bisulfitkonvertiert. Nach erfolgreicher Konvertierung sind alle unmethylierten Cytosine in Uracile umgewandelt, so dass alle verbleibenden Cytosine methyliert sind.

20-60 ng bisulfitkonvertierte DNA, 150 µM dNTPs, 10-20 pmol Primer und 1.25 U HotStar Taq Polymerase wurden unter geeigneten Pufferbedingungen in den methylierungsspezifischen PCRs amplifiziert und für die nachfolgenden Anwendungen eingesetzt (siehe Abbildung III.2-1). Die Bedingungen der Amplifikationsreaktion sind wie folgt: *Hot Start* mit 95°C für 15 min, 37 Zyklen mit je 94°C für 30 sec, Annealingtemperatur abhängig vom Primer für 30 sec, 72°C abhängig von der Produktgröße und Elongation bei 72°C für 10 min.

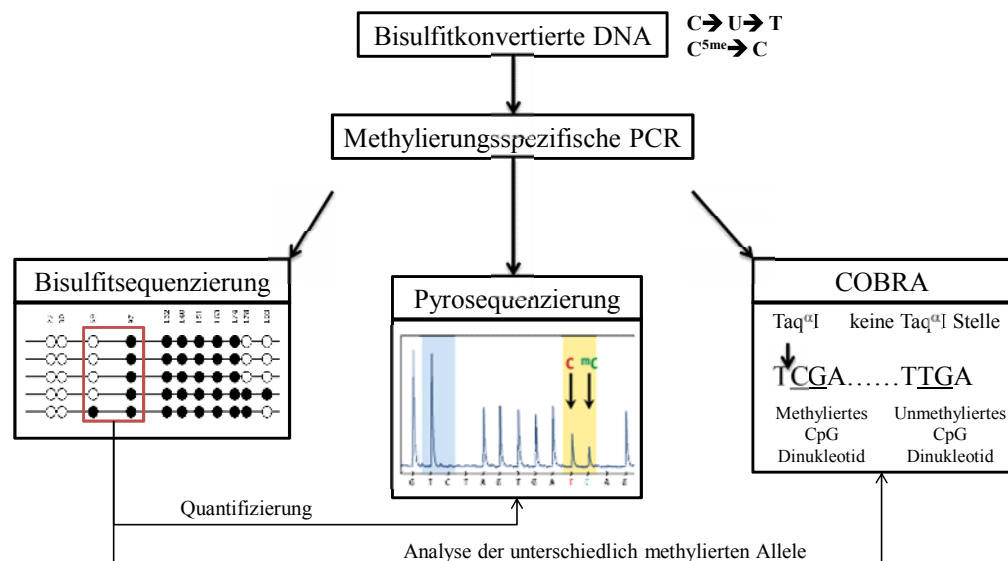


Abbildung III.2-1 Übersicht über die drei Methoden Bisulfitsequenzierung, Pyrosequenzierung und COBRA. Die Pyrosequenzierung und der methylierungssensitive Restriktionsverdau COBRA dienen zur Verifizierung der über Bisulfitsequenzierung gefundenen Methylierungsmuster in einem größeren Probenstet.

Bisulfitsequenzierung

Für die Bisulfitsequenzierung wurden die erfolgreich gebildeten und kontrollierten PCR Produkte mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert, in TOP10 kompetente E.coli transformiert, Plasmid DNA isoliert und die Klone vom Molekularbiologischen Zentrallabor des BMFZ der Heinrich-Heine Universität sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit dem QUMA (*Quantification Methylation Analysis Tool*), welches frei zugänglich unter <http://quma.cdb.riken.jp/> zu finden ist. Die Bisulfitsequenzierung ermöglicht die detaillierte Analyse vieler CpG Dinukleotide und zeigt durch die Sequenzierung einer entsprechenden Anzahl von Klonen ein präzises Methylierungsmuster.

Pyrosequenzierung

Für die Pyrosequenzierung wurden die kontrollierten PCR-Produkte an der PyroMark Q24 Workstation nach den Angaben des Herstellers Qiagen sequenziert. Dazu wurden die PCR-Produkte denaturiert, an Sepharose-Beads gebunden und die biotinylierten Sequenzierprimer an das nun einzelsträngige Amplikon gebunden. Bei der Sequenzierung wird nach erfolgreichem Einbau der Nukleotide ein Lichtquant frei und in einem Pyrogramm dargestellt. Das Primerdesign und die Auswertung der Sequenzierung erfolgten mit dem PyroMarkAssay Designer und der PyroMarkAssay Analysis Software. Die Pyrosequenzierung diente zur Bestätigung der über Bisulfitsequenzierung gefundenen Methylierungsmuster in der *MEG3* DMR. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der Methylierung einzelner CpG Dinukleotide in einer relativ großen Anzahl von Proben.

COBRA

Für den methylierungssensitiven Taq^(α)I-Restriktionsverdau wurden die kontrollierten PCR-Produkte mit dem DNA Clean and Concentrator-5 Kit aufgereinigt und in einem 50 µl Reaktionsansatz mit 20 U Taq^(α)I (100000 U/µl, NEB #R0149T), 100 µg/ml BSA in NEB Puffer 4 für 1 Stunde bei 65°C verdaut, abgestoppt und über ein 3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Dieser methylierungssensitive Restriktionsverdau (auch COBRA genannt) diente zur Bestätigung der über Bisulfitsequenzierung gefundenen Methylierungsmuster im *DLK1* Promotor. Eine Quantifizierung der Methylierung oder eine detaillierte Methylierungsanalyse ist schwierig, die Methode eignet sich jedoch, um vorher definierte Unterschiede in der Methylierung von CpG Dinukleotiden in einer großen Probenanzahl nachzuweisen.

III.2.5 Analyse von p53 Isoformen, Mutationen und Polymorphismen

Isoformenanalyse

Für die *p53* Isoformenanalyse wurden unterschiedliche RT-PCRs etabliert: Zur Detektion des Standardtranskripts *TA-p53* über die Exons 1-10 wurden die Primer cDNA_p53_fwdPK/revPK verwendet und die Primer RT_p53_4b_fwd/RT1_rev zur Detektion der *Δ133-p53* Isoformen ausgehend vom Intron 4b/Exon 5. Zur Unterscheidung der Isoformen α , β und γ wurden die Primer p53cDNAup/RT_p53_10a_rev verwendet, die die Exons 5/6-10 umspannen.

Als Referenz wurde *GAPDH* verwendet. Die Primersequenzen und Bedingungen sind in Tabelle II.5-4 zusammengefasst. Für die RT-PCRs wurden 2 µl verdünnte cDNA, 10 pmol Primer und 1.25 U Hot Star Taq Polymerase in einem 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt und bei 58-61°C über 38 Zyklen amplifiziert. Die Produkte wurden der Produktgröße entsprechend in einem 1% bis 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Polymorphismen- und Mutationsanalyse

Zur Analyse von *TP53* Mutationen und Polymorphismen wurden die folgende Abschnitte untersucht: Exon1/Intron1, Exon 2-4 und Exon 1-10. Für die DNA PCRs wurde 40 ng DNA, 25 pmol Primer (p53_Ex1F/In1R, sowie p53_In2Ex4_F/R) und 1.5 U Hot Star Taq Polymerase in einem 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. In die cDNA PCR wurden 2 µl unverdünnte cDNA und 15 pmol Primer p53_cDNA_up/down eingesetzt und über 39 Zyklen bei 61°C amplifiziert. Erfolgreich amplifizierte PCR Produkte wurden aufgereinigt und vom BMFZ der Heinrich-Heine Universität sequenziert. Die Sequenzierergebnisse wurden mit dem Programm *Clustal W2 alignment* (www.ebi.ac.uk/clustalw/) und dem *TP53* Referenztranskript 201 (Ensembl release 59) ausgewertet. Die Primersequenzen und Bedingungen sind in Tabelle II.5-4 zusammengefasst.

Array-CGH und Zytogenetische Charakterisierung

Die Karyotypisierung und Array-CGH der beiden neuen Urothelkarzinomzelllinien BC44 und BC61 wurden in Kooperation mit Prof. Rieder aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt und ausgewertet. Die Methoden sind detailliert in Koch *et al.* 2012 [31] beschrieben.

III.2.6 Gendosisanalysen

Zur Bestimmung der Gendosis wurden 25 ng genomische DNA in einer quantitativen PCR am LightCycler mit 2x QuantiTect Sybr Green und 5 µM ChIP Primer spezifisch für *DLK1*, IG DMR und *MEG3* bei 55°C über 40 Zyklen amplifiziert. *GAPDH* (lokalisiert auf Chromosom 12) wurde als Referenzgen verwendet. Als Standard wurde Leukozyten-DNA in unterschiedlichen Mengen von 50-0.5 ng verwendet.

III.2.7 Untersuchungen des Chromatins

Die DNA ist im Zellkern um Histone gewunden. Die Histone können reversibel enzymatisch durch Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung an Lysinen und Serinen modifiziert werden. Das Gesamtmuster der Histonmodifikationen an einem Gen spiegelt dessen Aktivitätszustand wieder.

Chromatinimmunpräzipitation

Mit Hilfe der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) kann die Anreicherung der Histonmodifikation an Genen und regulatorischen DNA Abschnitten untersucht werden und somit Aufschluss über den Aktivitätszustand des Gens geben. Die ChIP Analysen wurden mit dem *ChIP-IT Express Kit* (Active Motif) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd fixiert, lysiert, 7x 30 Sekunden sonifiziert und das Chromatin mit 3 µg Antikörper für aktivierende (H3K9ac, H3ac) und repressive Histonmodifikationen (H3K9me3, H3K27me3), sowie für fixierte Nukleosomen (H4K16ac) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die angereicherten Fraktionen über magnetische Beads aufgereinigt und eluiert. Die Anreicherung der Histonmodifikationen wurde über eine quantitative PCR mit 4 µl unverdünntem Chromatin, dem 2x QuantiTect Syber Green Kit und 5 µM ChIP-Primer für den *DLK1* Promotor, die IG DMR und der *MEG3* DMR am ABI7900HT gemessen (Primer siehe II.5-2). Die ChIP Primer liegen in den über Bisulfitequenzierung analysierten Regionen. Als Referenz für ein aktives Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Kontrolle für ein reprimiertes Gen diente *CTCF*. Die Input-DNA der jeweiligen Probe wurde als Standard verwendet.

Chromatinzugänglichkeit & Nukleosomenpositionierung

Weitere Möglichkeiten den Aktivitätszustand eines Gens zu analysieren, bestehen in der Untersuchung zur Chromatinzugänglichkeit (*chromatin accessibility*) und Nukleosomenpositionierung (*nucleosome positioning*) durch Präparation von Nukleosomen mit anschließendem Nukleaseverdau. Die Chromatinzugänglichkeit wurde mit dem *EpiQ Chromatin Preparation Kit* von Biorad analysiert. Dazu wurden die Zellen in Triplikaten in 24-Lochplatten ausgesät und *in vitro* 1-2 h mit 2 µl EpiQ-Nuklease (keine Angaben des Herstellers zur Konzentration) in einem Chromatinlysispuffer verdaut. Die verdaute und unverdaute DNA wurde über ein säulenbasiertes System gereinigt und eluiert.

Zwei ng dieser DNA wurde mittels quantitativer PCR analysiert. Die Chromatinzugänglichkeit ergibt sich aus der Differenz unverdauter DNA zu verdauter DNA ($CT^{\text{DNA uncut}} - CT^{\text{DNA cut}}$). Als Referenz für zugängliches, offenes Chromatin wurde *GAPDH* gewählt, sowie *CTCF* als Referenz für unzugängliches Chromatin. Alle Werte innerhalb einer Zelllinie wurden auf dem *GAPDH*-Wert normiert.

Die zweite Methode wurde mit dem *Nucleosome Prep* Kit von ZymoResearch durchgeführt. Dazu wurden $1.7 \cdot 10^6$ Nuklei mit 0.5 U *Micrococcus* Nuklease für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt und DNA über ein säulenbasiertes System gereinigt und eluiert. Die nukleosomale DNA wurde über ein 2% Agarosegel aufgetrennt, um die Anreicherung von Mononukleosomen zu überprüfen. 5 ng mononukleosomale DNA wurde in einer quantitativen PCR eingesetzt. Dieser Assay wird auch als NuSA (*nucleosome scanning assay*) bezeichnet. Um die Dynamik von Nukleosomen zu analysieren, wurde mit Hilfe des Programms „NuPOP“ (*nucleosome positioning prediction engine*) die Präsenz der Nukleosomen vorhergesagt und die Primer so etabliert, dass sie Nukleosomen überlappend liegen. 5 ng verdaute DNA wurde mit allen Primerpaaren (5 μ M Primer) quantifiziert und die Zyklus-Abweichung bei annähernd gleicher PCR Effizienz analysiert. Große Unterschiede zwischen den CT-Werten deuten auf fixierte Nukleosomen hin, während geringe oder keine Unterschiede auf dynamische Nukleosomen hinweisen.

III.3 Proteinanalyse

III.3.1 Proteinextraktion und Western Blot

Für die Ganzzellproteinextraktion wurden die Zellen in RIPA Puffer auf Eis lysiert. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Pierce BCA-Protein Assay Kit durchgeführt und bei 570 nm Absorption am ELISA Reader gemessen. 10 μ g Protein wurden über eine SDS Page im Gradientengel (4-20% TGX Gel, Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt, 90 min bei 180 mA auf eine PVDF Membran geblottet und anschließend je nach Antikörper (siehe Tabelle III.10-2) mit 5% NFD (fettfreies Milchpulver, Drogerie) oder BSA blockiert, über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert (siehe Tabelle III.10-3). Zur Detektion wurde das *ECL advanced Kit* (GE Healthcare) verwendet. Als Kontrolle wurde α -Tubulin (B-1-5-2, Sigma) in einer Verdünnung von 1:50000 verwendet.

III.3.2 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Für die Co-IP wurde das *Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit* (Pierce/ Thermo Fisher Scientific) nach dem Standardprotokoll verwendet. Die Zellen wurden auf zwei 10 cm Schalen ausgesät, bis zur Konfluenz kultiviert und in 500 µl IP-Lysispuffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Assay Kit bestimmt. 5 µg DELTA1 Antikörper (ab84620, Abcam und H-265, Santa Cruz Biotechnology) wurde mit 25 µl Protein A/G magnetische Beads für 15 min inkubiert und mit dem DSS *Crosslinker* gebunden. Das Antigen wurde immunopräzipitiert, indem 1 mg Proteinlysate in einem Volumen von 500 µl Lysispuffer für 1 h bei Raumtemperatur mit den Antikörper-gekoppelten Beads inkubiert wurde. Anschließend wurde in 100 µl Elutionspuffer bei pH 2.0 eluiert und die Reaktion mit 10-20 µl Puffer neutralisiert. Zur weiteren Analyse wurden 10 µl der Co-IP Lysate für den Western Blot eingesetzt.

III.3.3 Immunocytochemie

Die Zellen wurden auf 10-15 mm² Deckgläschen ausgesät und wahlweise mit eiskaltem Methanol oder mit 4% Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurde mit 0.1% Saponin in PBS (30 min) permeabilisiert und mit 1% BSA in 0.2% PBS-T und 0.3 mM Glyzin für 30 min blockiert. Die Zellen wurden jeweils eine Stunde mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung zwischen 1:100 bis 1:250 und dem Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper (*AlexaFluor goat anti mouse/rabbit highly cross adsorbed* 1:500) inkubiert (siehe Tabelle II.10-2/3). Zur Orientierung wurde der Zellkern mit 1 µg/ml DAPI gefärbt und das Präparat mit Mounting Medium (Dako) eingedeckelt. Die immunocytochemischen Färbungen wurden am Mikroskop Nikon Eclipse 400 mit dem Fluoreszenzfilter GFP (R)-LP/HQ-FITC-LP (Ex 400-500, DM 505, BA 510) und dem DAPI Filter angeregt und mit Hilfe der NIS-Elements Software ausgewertet. Die Bilder entstanden in 400-facher Vergrößerung mit einem PlanFluor Objektiv.

III.3.4 Immunohistochemie

Die immunhistochemischen Analysen wurden im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf in Kooperation mit Dr. Silvia Jankowiak (Notch Projekt) und Dr. Frank Jankowiak (p53 Projekt) durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden mit Xylen und Ethanol behandelt, rehydriert und die endogene Peroxidaseaktivität mit Wasserstoffperoxid eliminiert. Nach der Antigen-Freilegung durch einen Zitratpuffer im Schnellkochtopf wurde das endogene Biotin geblockt. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern (NOTCH1, Epitomics 1:100; DELTA1, H-265 Santa Cruz 1:100, JAGGED1; H-114, Santa Cruz 1:100; p53 ab6 1:100) über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit einem Biotin-konjugierten Antikörper und einem Avidin-Biotin-Peroxidase Reagenz behandelt. Die Reaktion wurde durch Diaminobenzidintetrachlorid sichtbar gemacht und mit Haematoxilin (HE) gegengefärbt.

III.4 Funktionelle Versuche

III.4.1 Behandlung mit γ -Sekretase-Inhibitoren und Modulatoren

Die Urothelkarzinomzelllinien wurden mit den γ -Sekretase-Inhibitoren DAPT, Compound E, L-685,458, sowie mit dem γ -Sekretase-Modulator Compound W behandelt. Zur Analyse der Zellvitalität mit dem MTT Assay wurden die Zellen in einer Konzentrationsreihe mit 0.5-20 μ M DAPT, 0.25-5 μ M L-685,458, 0.25-5 μ M Compound E, sowie 0.5-10 μ M Compound W für 24-48 h behandelt. Parallel wurde nach der 24 h-Behandlung mit 20 μ M DAPT, 2.5 μ M L-685,458, 5 μ M Compound E und 10 μ M Compound W Proteinlysate hergestellt und im Western Blot mit Antikörpern gegen NOTCH1 und NOTCH2 analysiert.

III.4.2 Knock-down Versuche

shRNA Transfektion

Für die shRNA Transfektion wurden 50000 bis 100000 Zellen pro Well einer 6-Lochplatte einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Die Zellen wurden dann durch XtremeGene9 mit 1 μ g shRNA Plasmid im Verhältnis 3:2 in Opti-Mem transfiziert. Im Rahmen einer transienten Transfektion wurde nach 24-48 h RNA und Protein isoliert. Für eine stabile Integration der shRNA wurden die Zellen nach zwei Tagen auf 10 cm Schalen umgesetzt und mit G418 über drei Wochen alle zwei Tage behandelt. Die shRNA Plasmide tragen eine Neomycin Resistenz.

Dies erlaubt die Selektionierung transfizierter Zellen mit Geneticin (G418-Sulfat). Zur Herstellung stabiler shRNA DELTA1 Klone, JAGGED1 Klone, NOTCH2 Klone und stabiler shRNA IR (Irrelevante) Klone wurde die Urothelkarzinomzelllinie BFTC905 mit 700 µg/ml G418 behandelt. Die Klone wurden mit in Trypsin getränkten, sterilen Filterpapieren einzeln entnommen und in 24-Lochplatten bei anhaltender Selektion so lange kultiviert, bis die angewachsenen Klone in 6-Lochplatten und schließlich in 25cm² Zellkulturflaschen kultiviert werden konnten. Aus den so gewonnenen BFTC905 shRNA Klonen wurde für verschiedene Analysen RNA und Protein isoliert.

siRNA Transfektion

Die siRNA Transfektion wurde wahlweise nach dem *forward transfection* Protokoll oder nach dem *reverse transfection* Protokoll von Invitrogen mit dem Transfektionsreagenz RNAiMAX durchgeführt. Nach dem *forward transfection* Protokoll wurden die Zellen nahezu konfluent einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einem 300 µl Reaktionsansatz transfiziert, bestehend aus 4.5 µl RNAiMax in 150 µl Opti-Mem mit 5-10 µM siRNA (Zielgenspezifisch und eine Irrelevante = IR) in 150 µl Opti-Mem. Nach dem *reverse transfection* Protokoll wurde zuerst der 300 µl siRNA Reaktionsansatz tropfenweise in ein Well pipettiert und die Zellen anschließend konfluent ausgesät. Nach 24-72 h wurde je nach Fragestellung RNA oder Protein isoliert und analysiert. Für Reportergenassays wurden die Zellen zuerst mit 5 µM siRNA nach dem *reverse transfection* Protokoll und einen Tag später mit 500 ng Reportergenkonstrukten transfiziert.

III.4.3 Überexpression von NOTCH1 in Zelllinien

Für Überexpressionsversuche mit NOTCH1 Konstrukten wurden 10⁵ bis 2.5*10⁵ Zellen pro Well je nach Zelllinie in 6-Lochplatten ausgesät und einen Tag später durch Xtreme-Gene9 mit 1 µg Plasmid-DNA im Verhältnis 3:2 in Opti-Mem transfiziert. Je nach Anwendung wurde 24-48 h später RNA und/oder Protein isoliert und in qPCR, Western Blot, Immunzytochemie oder Reportergenassays analysiert.

III.4.4 Reporterassays

Der Reporterassay erlaubt die Messung der Notch-Aktivität in den Zelllinien. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in 6-Lochplatten in Duplikaten ausgesät (je nach Wachstumsgeschwindigkeit $0.75-2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well) und bei annähernd 70-80% Konfluenz durch XtremeGene9 (Roche) mit 500 ng Luciferase-Plasmiden im Verhältnis 3:2 in Opti-Mem transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 200 μ l PLB (*Passive Lysis Buffer*) lysiert und die Reporteraktivität mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) in einem Luminometer als R.L.U (*relative light units*) gemessen. Für verschiedene Analysen wurden 250 ng Reporter mit 250 ng NOTCH1 Plasmiden oder shRNA-Plasmiden kotransfiziert oder die Zellen mit γ -Sekretase-Inhibitoren behandelt. Für die Experimente wurden die Reporterstrukturen aus Abschnitt II.10.1 verwendet. Die Notch-Aktivität ergibt sich dabei als das Verhältnis des Notch-abhängigen Reporters (pJH26A) zum Notch-unabhängigen Reporter (pJH28A).

III.4.5 Untersuchung der Zell-Vitalität und Apoptose

Um die Auswirkung einer NOTCH1 Überexpression oder eines DELTA1 Knockdowns, sowie die Behandlung mit Zytostatika auf die Zellen zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zellparameter gemessen. Die Lebensfähigkeit wurde durch die ATP Konzentration mit Hilfe des *CellTiter-Glo Luminescent Assay Kits* ermittelt. Dieses Kit enthält Reagenzien, die die Zellen lysieren, ATPasen inhibieren und das freie ATP durch eine Luciferase abhängige Reaktion in Lichtquanten umsetzt. Ein weiterer Parameter ist die Apoptose, die durch die Caspase 3 und Caspase 7 Aktivität mit Hilfe des *Caspase3/7-Glo Luminescent Assays* in einer Luciferase-abhängigen Reaktion gemessen wird. Für beide Versuche wurden je 20000 Zellen in Quadruplikaten in 96-Lochplatten einen Tag vor der Behandlung ausgesät, nach Versuchsende mit 50 μ l Reagenz aus dem jeweiligen Kit lysiert und im Luminometer (Viktor) gemessen.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Zellproliferation ist der MTT Assay, bei dem der gelbe, wasserlösliche Farbstoff MTT in den Zellen durch die NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen (wie die Succinat-Dehydrogenase) zu blau-violettem, wasserunlöslichem Formazan reduziert wird.

Für diesen Versuch wurden $4 \cdot 10^4$ Zellen in eine 24-Lochplatte ausgesät und mit Inhibitoren behandelt. Nach Versuchsende wurden die Zellen 30 min bei 37°C mit $50 \mu\text{l}$ [5 mg/ml] MTT-Reagenz inkubiert, das Medium entfernt, die Formazankristalle mit $250 \mu\text{l}$ DMSO gelöst und in eine 96-Lochplatte überführt. Die Absorption wurde mit einem ELISA Reader bei 570 nm gemessen.

III.4.6 GIEMSA Färbung

Die GIEMSA Färbung dient zur Untersuchung der Klonogenität der Zellen. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen erst mit PBS, dann mit PBS/Methanol im Verhältnis 1:1 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit 100% Methanol fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt und die Zellen mit GIEMSA Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) für 2 min inkubiert. Die GIEMSA Lösung wurde in mehreren Waschschritten entfernt, so dass nur noch die gefärbten Zellen sichtbar waren.

III.4.7 Stratifizierung von Urothelkulturen und Urothelkarzinomzellen

Zu konfluent bewachsenen Urothelkulturen wurde Kalziumchlorid in einer Endkonzentration von 1.2 mM zugesetzt und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Die morphologischen Veränderungen der Zellen wurden dokumentiert und Expressionsveränderungen der Zytokeratine und Notch Komponenten auf RNA und Proteinebene zu bestimmten Zeitpunkten gemessen.

III.4.8 Anpassung von Zelllinien an niedrig-Kalzium Bedingungen

Die Urothelkarzinomzelllinien HT1376 und BFTC905 wurden über mehrere Wochen hinweg in *Epilife*-Medium mit Supplementen kultiviert. Dazu wurde zunächst *Dulbecco's modified Eagle's* Medium in zunehmender Menge mit dem *Epilife* Spezialmedium gemischt, sodass die Zellkulturen über mehrere Passagen hinweg über die Mischungsverhältnisse 30%, 50%, 70% und 100% an die serum- und kalziumreduzierten Bedingungen gewöhnt wurden. Die Zellen wurden über je zwei Passagen an das jeweilige Medium gewöhnt. Nach 8 Passagen wurden RNA und Protein für verschiedene Anwendungen isoliert und die Zellkulturen eingefroren.

IV. Ergebnisse

IV.1 Etablierung von Zellkulturmodellen

IV.1.1 Charakterisierung von zwei papillären Urothelkarzinomzelllinien¹

Die beiden Urothelkarzinomzelllinien BC44 und BC61 sind aus papillären Tumoren nach transurethraler Resektion 2004 bzw. 2006 erfolgreich etabliert worden. Beide Zelllinien wurden über 30 Passagen im serumfreien und kalziumreduzierten Spezialmedium Epilife mit Supplementen kultiviert. Die Zelllinien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Tumorklassifikation (TNM-Stadium), Zellmorphologie, Karyotyp und der molekulargenetischen Veränderungen.

Die Zelllinie BC61 wurde 2006 von einem mäßig differenzierten, papillären Tumor (pTa G2) eines männlichen Patienten angelegt. Diese Zelllinie wuchs als einlagige Zellschicht (*Monolayer*) abhängig von einer Kollagen IV-Matrix. In mäßig stark bewachsenen (subkonfluenten) Zellkulturflaschen bildete BC61 Kolonien aus mehreren hundert Zellen, die im Koloniezentrum klein und dicht gepackt waren; am Außenrand waren sie groß mit deutlich sichtbarer Migrationsfront (Abbildung IV.1-1A-B). Dicht bewachsene (konfluente) BC61 Zellkulturen zeigten zudem einige stark vergrößerte Zellen mit Meganuklei, deren Menge nach Kalzium-Zugabe zunahm (Abbildung IV.1-1C-D). Das Karyogramm dieser Zelllinie (Abbildung IV.1-1E) ergab einen hypotetraploiden Chromosomensatz mit numerischen Veränderungen von insbesondere Chromosom 9 und 17, sowie strukturellen Veränderungen von Chromosom 5 (Isochromosom 5p) sowie Chromosom 11 und 19. Die Microarray-basierte, vergleichende Genomhybridisierung (*Array-CGH*) bestätigte die numerischen Veränderungen und zeigte vor allem lokal begrenzte Verluste und Zugewinne auf fast allen Chromosomen (Abbildung IV.1-1F). Durch molekulargenetische Analysen wurden bereits die Deletion des Zellzyklusinhibitors *CDKN2A/p16^{INK4A}* und eine onkogene *FGFR3* Mutation am Glyzin 372 (G372C) identifiziert. Diese Mutationen wurden ebenfalls im Primärtumor des Patienten verifiziert.

¹ Teile dieses Abschnitts 1 zur Charakterisierung und p53-Isoformenanalyse von BC61 und BC44 sind bereits in A.Koch et al, *Cellular Oncology* 2012 veröffentlicht.

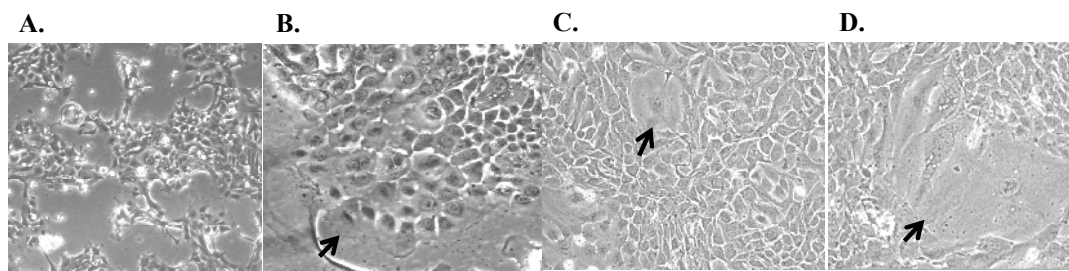
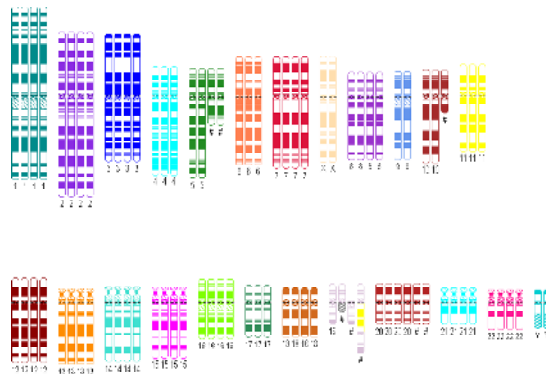
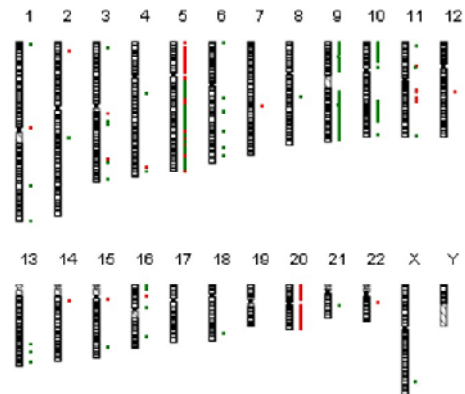
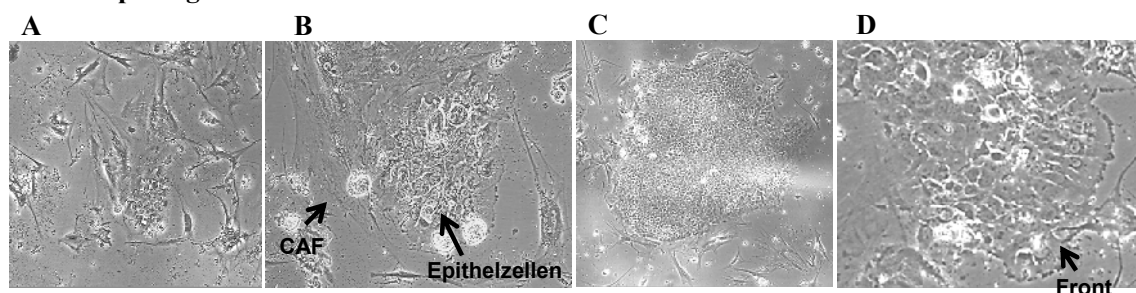
Zellmorphologie**E. Karyotypenanalyse****F. Array-CGH**

Abbildung IV.1-1 Zellbiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Zelllinie BC61 (A-D) Morphologie der Zellen in Kultur mit (A) Übersicht über die Koloniebildung und (B) Migrationsfront (Pfeil) mit größeren Zellen am Rand der Kolonie, (C) große Zellen vor und (D) nach Kalziumzugabe als Hinweis auf differenzierte Zellen. (E) Karyotypenanalyse eines hypotetraploiden männlichen Chromosomensatzes. Die unterschiedlichen Farben symbolisieren jeweils ein Chromosom. Translokationen sind durch mehrfarbige Chromosomen ersichtliche, z.B. am Chromosom 19. (F) Array CGH mit punktuellen oder großräumigen Deletionen (grün) und Zugewinnen (rot) auf jedem Chromosom.

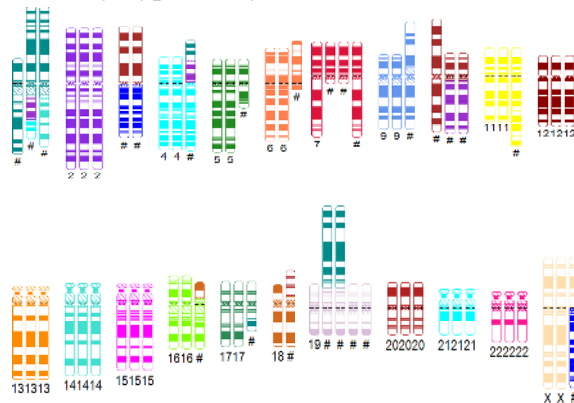
Die Zelllinie BC44 wurde 2004 aus dem papillären Anteil eines schlecht differenzierten, invasiven Urothelkarzinoms (pT4 G3) einer Patientin angelegt. Ähnlich wie BC61 wuchs diese Zelllinie im Monolayer, anfangs aber in Kokultur mit Fibroblasten und abhängig von einer Kollagen IV-Matrix (Abbildung IV.1-2A). Subkonfluente BC44 Zellkulturen bildeten Kolonien aus sehr kleinen Zellen mit kaum sichtbaren zellulären Strukturen. Anders als in der Zelllinie BC61 wurden keine vergrößerten Zellen mit Meganuklei beobachtet (Abbildung IV.1-2B-D). Typische Merkmale für ein progressives papilläres Urothelkarzinom waren die zahlreichen numerischen und strukturellen Veränderungen des nahezu hypotriploiden Chromosomensatzes.

Insbesondere die Isochromosomen i(5p), i(9q) und i(10q) waren für diese Zelllinie charakteristisch (Abbildung IV.1-2E). Diese wurden in der *Array-CGH* Analyse als großräumige Veränderungen ersichtlich. Insgesamt war diese Zelllinie durch komplexe Gendosisveränderungen gekennzeichnet, die ganze Chromosomenarme betrafen (Abbildung IV.1-2F). Molekularbiologisch untersucht und bestätigt wurde bereits eine Deletion des Zellzyklusinhibitors *CDKN2A/p16^{INK4A}*. Die Gene *FGFR3* und *PIK3CA* waren wildtypisch. Die *CDKN2A* Deletion wurde ebenfalls im Primärtumor der Patientin verifiziert.

Zellmorphologie



E. Karyotypenanalyse



F. Array-CGH

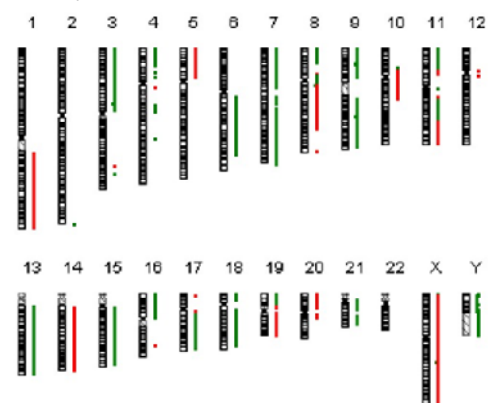
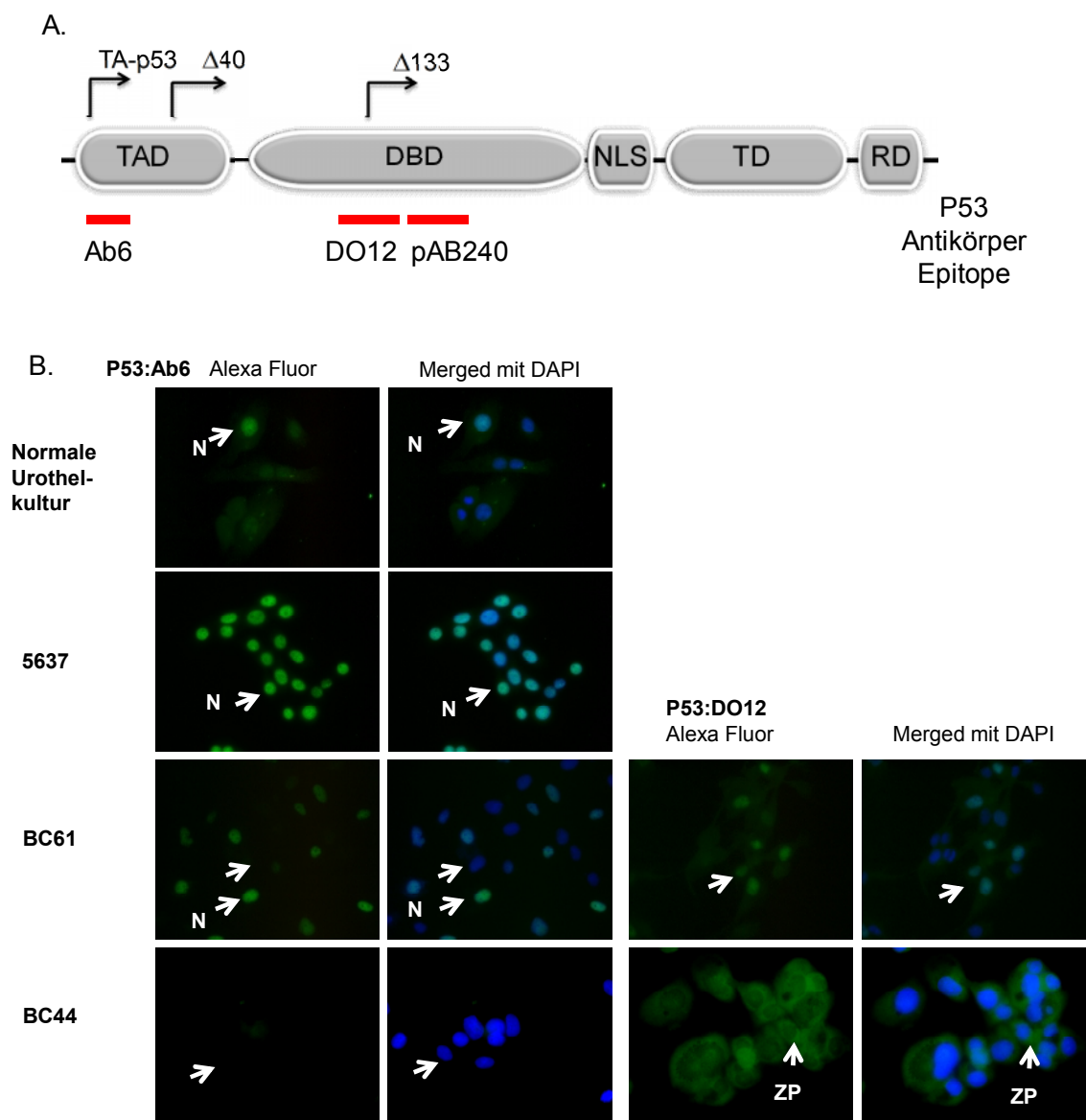


Abbildung IV.1-2 Zellbiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Zelllinie BC44. (A-B) Wachstum der BC44 Epithelzellen in Kokultur mit Fibroblasten (CAF), (C) Kolonien bestehend aus sehr kleinen Zellen und (D) mit deutlicher Migrationsfront. (E) Die Karyotypenanalyse zeigt einen hypertriploiden weiblichen Chromosomensatz mit deutlichen Veränderungen, erkenntlich an der farblichen Zuordnung der Chromosomen. Translokationen sind durch mehrfarbige Chromosomen ersichtlich. Diese sind auch in (F) bei der Array-CGH Analyse durch sehr große Deletionen (grün), aber auch durch Zugewinne (rot) zu erkennen.

P53 Isoformen

Im Rahmen der molekulargenetischen Analysen der beiden neuen papillären Urothelkarzinomzelllinien BC44 und BC61 wurde das Tumorsuppressorgen *p53* (TP53) auf DNA und RNA Ebene mittels qualitativer PCR untersucht. Nur in der gut differenzierten Zelllinie BC61 wurde ein wildtypisches *p53* Transkript gefunden. Proteinanalysen mit dem routinemäßig verwendeten *p53* Antikörper Ab6 bestätigten die Präsenz von *p53* Protein im Nukleus einiger BC61 Zellen. In der Zelllinie BC44 konnte mit diesem Antikörper kein Protein detektiert werden (Abbildung IV.1-3B-C). Ab6 erkennt Epitope im N-Terminus des *p53* Proteins (Abbildung IV.1-3A).



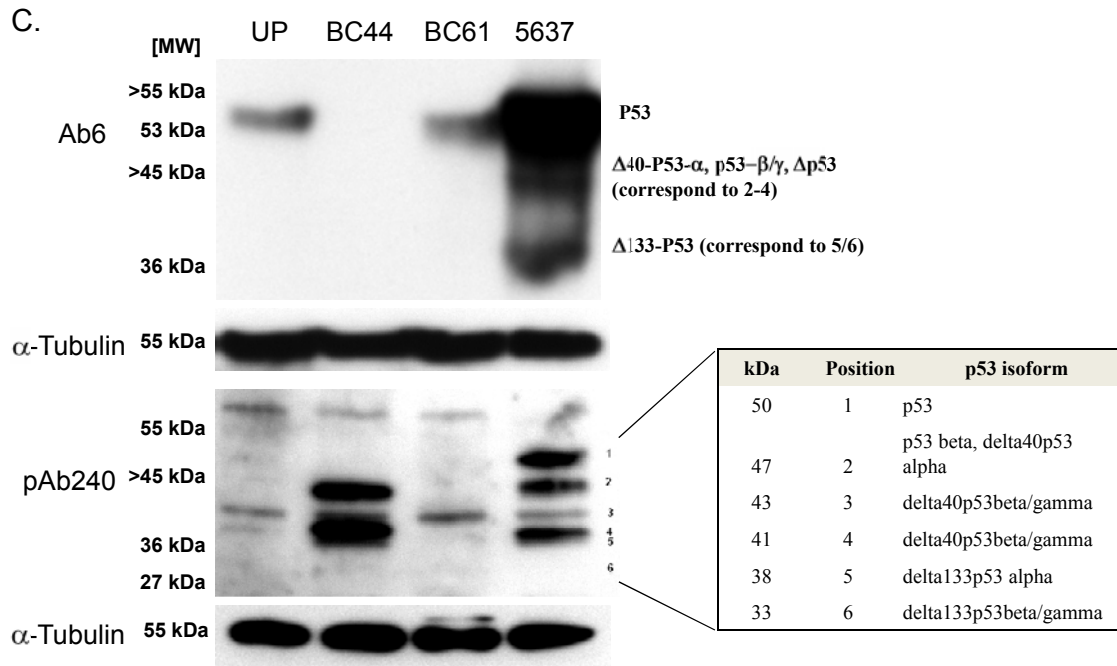
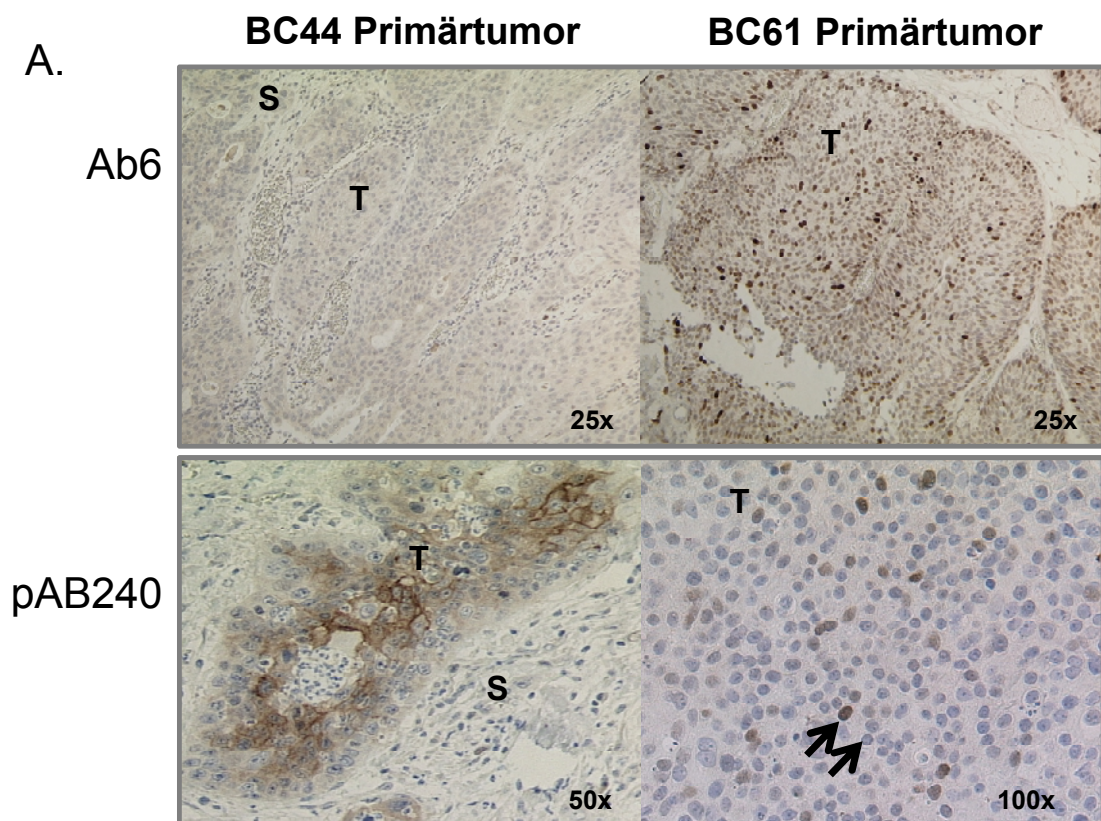
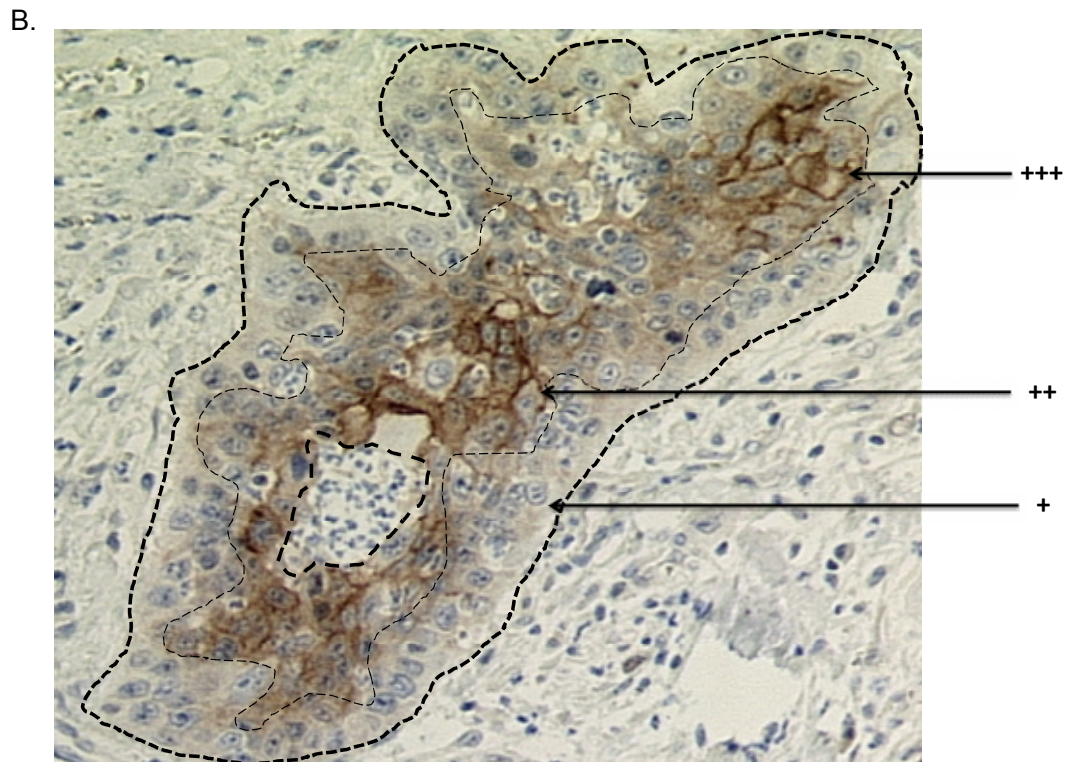


Abbildung IV.1-3 p53 Proteinanalysen (A) graphische Darstellung des p53 Proteins mit den Erkennungsstellen der verwendeten monoklonalen p53 Antikörper. Der Antikörper Ab6 bindet in der TAD, während die Antikörper DO12 und pAb240 Epitope innerhalb der DBD erkennen. (B) Immunocytochemie mit dem p53 Antikörper Ab6 detektiert nukleäres TA-p53 Protein in einigen Zellen in normalen Urothelkulturen und BC61, stark in 5637 und gar nicht in BC44 (weiße Pfeile, N). Der Antikörper pAB240 detektiert überwiegend zytoplasmatisches p53 Protein in BC44 (weißer Pfeil, ZP). Die Nuklei sind mit DAPI sichtbar gemacht. (C) Western Blot Analysen mit Ab6 detektieren p53 Protein in allen Zelllinien außer in BC44. Mit dem pAB240 Antikörper können verschiedene p53 Isoformen auch in BC44 detektiert werden, die mit 1-6 bezeichnet werden. ZP= Zytoplasma; N= Nukleus

Die Proteinanalysen wurden mit zwei weiteren Antikörpern, pAB240 und DO12, wiederholt, die Epitope in der p53 DNA-Bindedomäne erkennen (Abbildung IV.1-3). Immunocytochemische Färbungen mit DO12 zeigten eine deutliche Lokalisation von p53 im Zytoplasma der Zelllinie BC44 und im Nukleus von BC61 Zellen (Abbildung IV.1-3B). Western Blot Analysen mit pAB240 detektierte p53 Proteine unterschiedlicher Größe (55-27 kD) vor allem in der Zelllinie BC44 und zum geringeren Anteil in der Zelllinie BC61. Die Urothelkarzinomzelllinie 5637 (als Positivkontrolle mit einer tumortypischen Mutation in der DNA-Bindedomäne) zeigte ebenfalls Proteinsignale mit unterschiedlichem Molekulargewicht (Abbildung IV.1-3C).

In den Primärtumoren der beiden Zelllinien BC44 und BC61 konnten die Befunde mittels Immunhistochemie bestätigt werden (Abbildung IV.1-4A). Mit dem routinemäßig verwendeten Antikörper Ab6 waren nur im BC61 Primärtumor p53-positive Nuklei detektierbar. Die Stärke der p53 Färbung variierte zwischen den Zellen zum Teil erheblich. Mit dem Antikörper pAB240 konnte in beiden Primärtumoren in unterschiedlichen Zellkompartimenten und in unterschiedlicher Stärke p53 Protein detektiert werden. Im BC61 Primärtumor waren einige Nuklei p53 positiv. Das p53 Protein war im Zytoplasma und an der Zellmembran des BC44 Primärtumors detektierbar, weniger häufig im Nukleus. Die Färbung war insbesondere in Zellverbänden mit plattenepithelialer Transdifferenzierung am stärksten (Abbildung IV.1-4B).





+++ = Nukleus, Zytoplasma und Membran positiv; ++ = Zytoplasma und Membran positiv; + = Zytoplasma positiv

Abbildung IV.1-4 (A) Immunhistochemische Färbungen im Primärtumor von BC44 und BC61 mit den beiden Antikörpern Ab6 (oben) und pAB240 (unten). Im Gewebe sind die braunen Areale p53 positiv und in blau mit HE gegengefärbt. Auffällig ist die heterogene p53-Färbung mit dem Antikörper Ab6 im BC61 Primärtumor, die mit dem pAb240 Antikörper nur sehr schwach ist (Pfeile). T= Tumor und S= Stroma. (B) Detailausschnitt aus dem BC44 Primärtumor mit dem pAB240 Antikörper aus (A). P53 ist heterogen in den Tumorzellen verteilt. Einige Zellen sind positiv für p53 Protein im Nukleus, Zytoplasma und an der Zellmembran (+++), weitere Zellen sind positiv für p53 Protein im Zytoplasma und an der Membran (++), und randständige Zellen sind nur zytoplasma-positiv (+).

Auf Grund dieser Proteindaten untersuchten wir die Verwendung der unterschiedlichen Promotoren. Der erste Promotor liegt in Exon 1. Der alternative Promotor p2/int4 umspannt Exon 2 bis Intron 4 und hat im Intron 4/Exon 5 einen alternativen Transkriptionsstartpunkt (ATG133), der die Transkription von *p53Δ133*-Isoformen ermöglicht. Es wurden verschiedene Primerassays entworfen, die wildtypisches *TA-p53* Transkript vom ersten Promotor erkennen (Abbildung IV.1-5A), alle *p53*-Isoformen detektieren (Abbildung IV.1-5B) oder spezifisch die *p53Δ133*-Isoformen amplifizieren (Abbildung IV.1-5C).

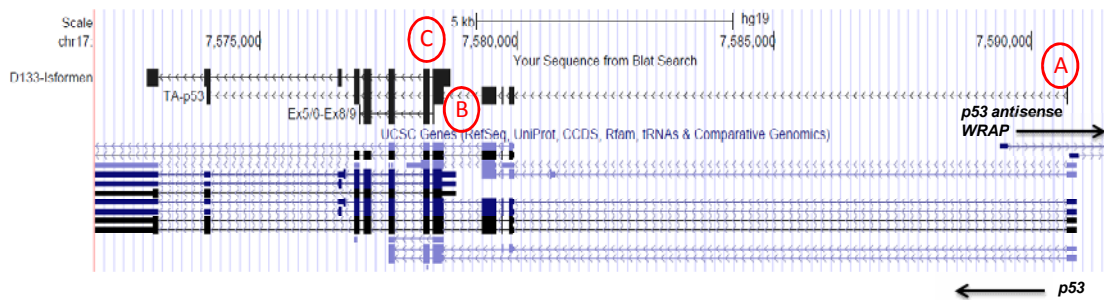


Abbildung IV.1-5 Lage der Primer zur Identifizierung der p53 Isoformen. Laut UCSC genome browser detektiert der Primerassay (A) TA-p53 Transkripte vom normalen Promotor P1, der Primerassay (B) erkennt alle Isoformen und der Primerassay (C) ist spezifisch für die $\Delta 133$ Isoformen vom alternativen Promotors P2/int4. Die Pfeile deuten die Orientierung des Gens p53 und des antisense Transkripts WRAP53 an.

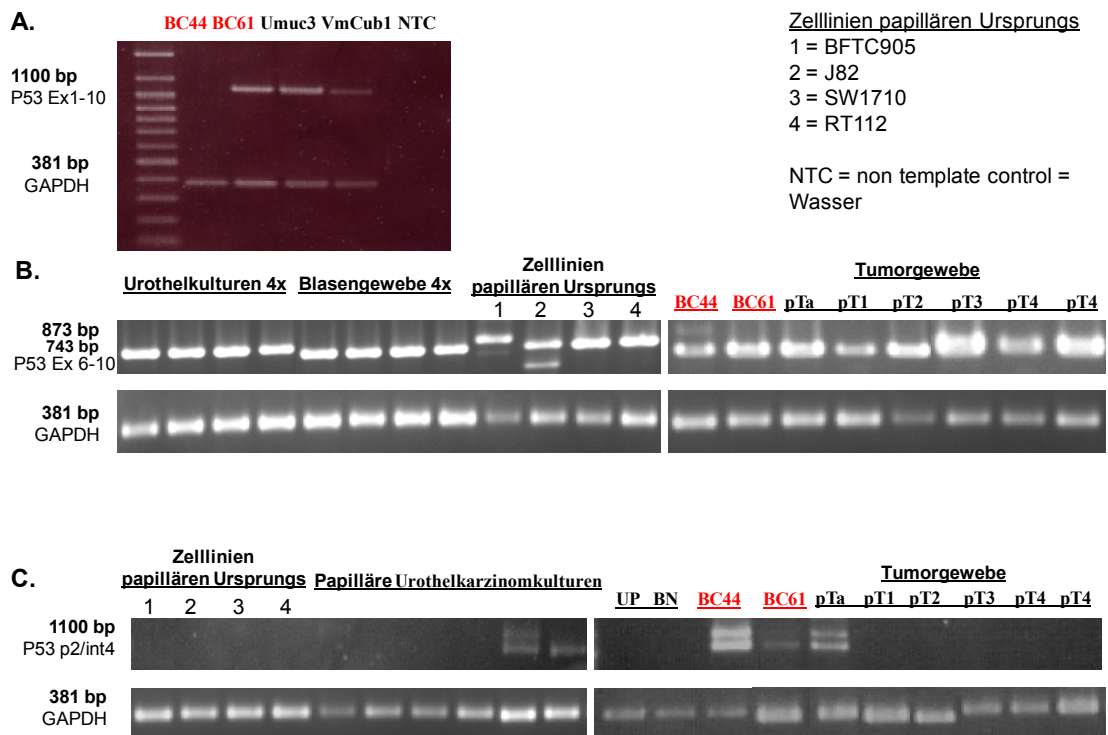


Abbildung IV.1-6 Identifizierung der p53 Isoformen. (A) Expression des TA-p53 Transkripts in BC44, BC61 und den beiden Zelllinien Umuc3 und VmCub1 mit dem Primerassay A bei 1100 bp im Vergleich zu GAPDH bei 381 bp. (B) Analyse mit dem Primerassay B detektiert in Urothelkulturen, Blasengeweben, Urothelkarzinomzelllinien, Blasentumoren aller Stadien und in BC44 und BC61 p53 Transkripte im Vergleich zu GAPDH. (C) Analyse der $\Delta 133$ Isoformen mit dem Primerassay C in ausgewählten Proben. Erwartet wird ein 1100 bp Produkt nach Verwendung des alternativen Promotors p2/int4. In rot sind die beiden neuen Zelllinien dargestellt.

In den untersuchten Urothelkarzinomzelllinien BC61, Umuc3 und VmCub1 entstand mit dem Primerassay (A) ein 1100 bp langes PCR-Produkt, das als *TA-p53* Transkript identifiziert wurde; jedoch nicht in BC44 (Abbildung IV.1-6A). Mit dem Primerassay (B) konnten sowohl in den beiden neuen Zelllinien BC44 und BC61, als auch in den Urothelkarzinomzelllinien BFTC905, J82, SW1710 und RT112 Produkte unterschiedlicher Größe amplifiziert werden, die zum Teil auf alternativem Spleißen von Exon 9 beruhten (Abbildung IV.1-6B). BC44 und BC61 exprimierten überwiegend *p53α* Transkripte, wohingegen die Zelllinie BFTC905 verstärkt *p53β* Transkripte exprimierte und nur zum geringeren Teil *p53α*. Zusätzlich zum Standardtranskript entstand in der Zelllinie J82 ein kleineres Produkt durch eine heterozygote Deletion im Exon 6-7 (Position 783- 919). Trotz der Basensubstitution an den Positionen c743 G>C und c815 C>T in den Zelllinien RT112 und SW1710 wurde das Standardtranskript amplifiziert. Die Standardtranskripte konnten ebenfalls in Blasentumorgeweben unterschiedlicher Invasivität (pTa-pT4) sowie in Blasengeweben und proliferativen Urothelkulturen detektiert werden. Zur Kontrolle wurde jeweils das Haushaltsgen *GAPDH* amplifiziert. Mit dem Primerassay (C) wurden insbesondere in BC44 Zellen, aber auch in BC61 und 5637 (nicht in der Abbildung dargestellt), sowie in einigen papillären Urothelkarzinomzellkulturen, Produkte unterschiedlicher Größe amplifiziert. Von insgesamt 24 untersuchten Blasentumorgeweben (9 pT4 G3, 7 pT3 G3, 6 pT2 G3, je ein Fall pT1 G2 und pT2 G2) wurden alternative *p53* Transkripte nur in einem papillären Tumor pTa G2 und in drei invasiven Tumoren mit Lymphknotenbefall (pT2 N1 G3, pT3 N2 G3, pT4 N1 G3) gefunden (Abbildung IV.1-6C). In den untersuchten Urothelkarzinomzelllinien BFTC905, SW1710, J82 und RT112, sowie in normalen Urothelkulturen und Blasengeweben, wurden keine Transkripte vom alternativen Promotor identifiziert.

Nachfolgende Mutationsanalysen sollten zeigen, ob Mutationen die Transkription von Isoformen, ausgehend vom alternativen Promotor p2/int4, begünstigten. In keiner der beiden Zelllinien, BC61 und BC44, konnten Spleiß- oder *Nonsense*-Mutationen nachgewiesen werden. Auffällig waren jedoch verschiedene Polymorphismen (*SNP*). Beide Zelllinien hatten im Intron 1 den SNP rs17886250 (Abbildung IV.1-7A) und in Intron 3 den SNP rs17878362 (Abbildung IV.1-7B). Bei dem Polymorphismus in Intron 3 handelte es sich um eine 16 bp Deletion, die in BC44 und in 10 von 11 untersuchten Urothelkarzinomzelllinien homozygot vorkam. Die Zelllinien BC61 und J82 waren heterozygot (nur ein betroffenes Allel) für diesen Polymorphismus. Im p53 Transkript der Zelllinie BC61 konnte zusätzlich im Exon 4 der weitverbreitete Polymorphismus rs1042522 identifiziert werden, der im Protein an der Position 72 entweder für Arginin oder Prolin codiert (Abbildung IV.1-7C).

A. SNP in Intron 1

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
                                                    rs17886250
                                                    ↓
BC61          -----CTAGGCGTTCAACTTTGAGTTCGGATGGTCCTAACATCCCCATCATATACCCC 54
BC44          CTCTGCCTIAGGCGTTCAACTTTGAGTTCGGATGGTCCTAACATCCCCATCATATACCCC 60
reference     CTCTGCCTIAGGCGTTCAACTTTGAGTTCGGATGGTCCTAACATCCCCATCATCTACCCC 60
              *****

BC61          AGGTCTCCCAACAATGCAACTCCTATGATGATCCCTCTAGCCAAGCTTCCATCCCACTCA 114
BC44          AGGTCTCCCAACAATGCAACTCCTATGATGATCCCTCTAGCCAAGCTTCCATCCCACTCA 120
reference     AGGTCTCCCAACAATGCAACTCCTATGATGATCCCTCTAGCCAAGCTTCCATCCCACTCA 120
              *****

BC61          CCCCCAAACTCGCTAAGTCCCCACTGCCCCACCCCGAGCCCGAGGATTTTCCCGAGCTG 174
BC44          CCCCCAAACTCGCTAAGTCCCCACTGCCCCACCCCGAGCCCGAGGATTTTCCCGAGCTG 180
reference     CCCCCAAACTCGCTAAGTCCCCACTGCCCCACCCCGAGCCCGAGGATTTTCCCGAGCTG 180
              *****

BC61          AAAATACACGGAGCCGAGAGCCCGTGACTCAGAGAGGACTCATCAAGTTCAGTCAGGAGC 234
BC44          AAAATACACGGAGCCGAGAGCCCGTGACTCAGAGAGGACTCATCAAGTTCAGTCAGGAGC 240
reference     AAAATACACGGAGCCGAGAGCCCGTGACTCAGAGAGGACTCATCAAGTTCAGTCAGGAGC 240
              *****
              ← Intron 1

BC61          TTACCCAATCCAGGGAAGCGTGTACCCGTGCGTGGAAAGCACGCTCCCAGCCCGAACGCAA 294
BC44          TTACCCAATCCAGGGAAGCGTGTACCCGTGCGTGGAAAGCACGCTCCCAGCCCGAACGCAA 300
reference     TTACCCAATCCAGGGAAGCGTGTACCCGTGCGTGGAAAGCACGCTCCCAGCCCGAACGCAA 300
              *****

BC61          AGTGTCCCCGGAGCCCGAGCAGCTACCTGCTCCCTGGACGGTGGCTCTAGACTTTTIGAGAA 354
BC44          AGTGTCCCCGGAGCCCGAGCAGCTACCTGCTCCCTGGACGGTGGCTCTAGACTTTTIGAGAA 360
reference     AGTGTCCCCGGAGCCCGAGCAGCTACCTGCTCCCTGGACGGTGGCTCTAGACTTTTIGAGAA 360
              *****
              ← Exon 1

BC61          GCTCAAACTTTTAGCGCCAGTCTTIGAGCACATGGGAGGGGAAAAC 400
BC44          GCTCAAACTTTTAGCGCCAGTCTTIGAGCACATGGGAGGGGAAAAC 406
reference     GCTCAAACTTTTAGCGCCAGTCTTIGAGCACATGGGAGGGGAAAAC 406
              *****
    
```

PLEASE NOTE: Showing colors on large alignments is slow.

B. SNP in Intron 3



C. SNP in Exon 4

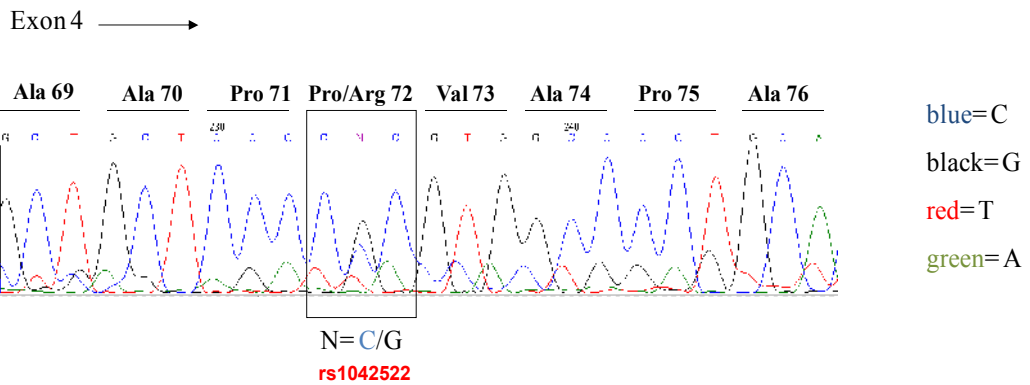


Abbildung IV.1-7 Sequenzierung zur Identifizierung von p53 Polymorphismen in den beiden Zelllinien BC44 und BC61. (A) Im Intron 1 beider Zelllinien wurde im Vergleich zur Referenz ein C>A Austausch detektiert, der als Polymorphismus rs17886250 bekannt ist. (B) Ein 16 bp Duplikations-SNP in Intron 3 wurde detektiert und in weiteren Zelllinien analysiert. Nur in BC61 und J82 wurden Doppelbanden als Zeichen eines heterozygoten Polymorphismus gefunden. (C) In Exon 4 der Zelllinie BC61 wurde der heterozygote Polymorphismus R72P detektiert mit N=C oder G.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die beiden neu etablierten papillären Urothelkarzinomzelllinien, BC44 und BC61, typische Merkmale entsprechend ihres Tumorgades und ihrer Progressivität besitzen. Zudem unterschieden sich beide in der Expression und zellulären Lokalisation der neu identifizierten p53 Isoformen und der zusätzlichen (BC61) oder ausschließlichen (BC44) Verwendung des alternativen Promotors. Beide Zelllinien stellen damit neue, einzigartige Modelle zur Analyse von p53-abhängigen Prozessen im Urothelkarzinom dar.

Wirkung von Kalzium auf maligne und benigne Urothelzellen

Proliferative Urothelkulturen (UP) wurden aus Uretern nach Nephrektomien in kalziumarmem Medium KSFM mit Kollagen IV-Matrix angelegt. Mehrere Experimente wurden über einen Zeitraum von 8-14 Tagen durchgeführt.

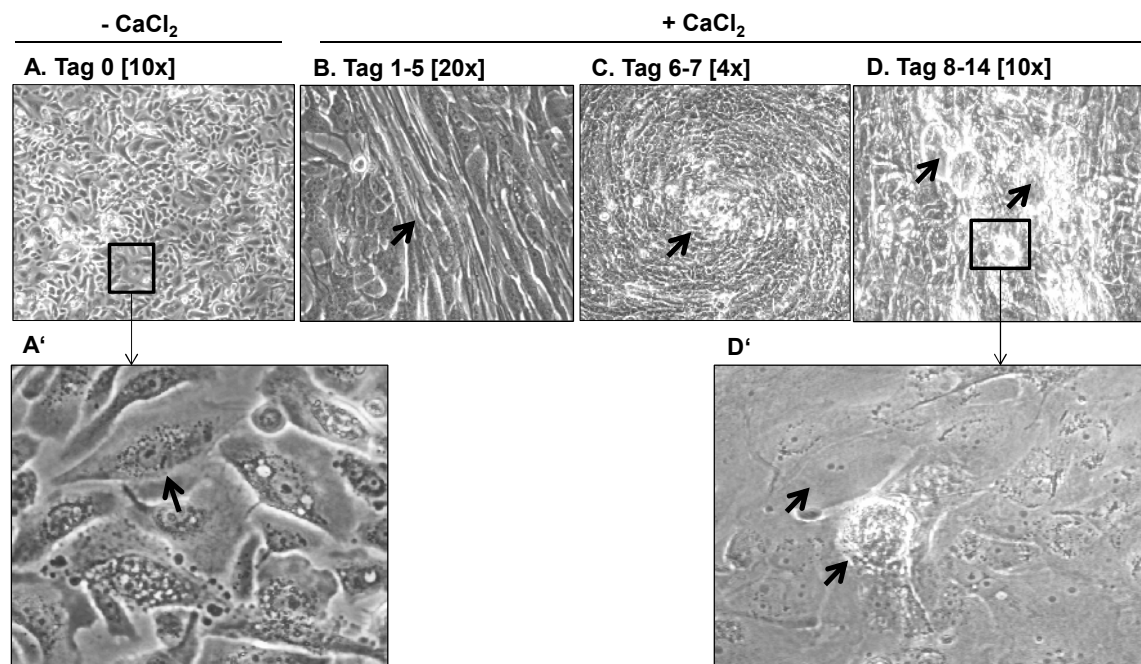
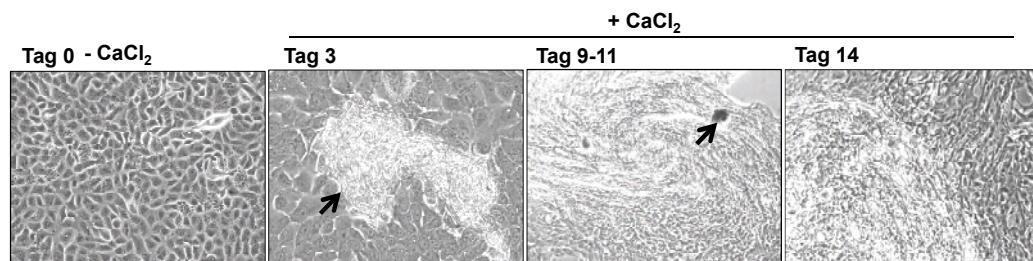


Abbildung IV.1-8 morphologische Veränderungen einer repräsentativen normalen Urothelkultur nach Zugabe von Kalziumchlorid zum KSFM Medium. (A) Eine konfluent bewachsene Urothelkultur zum Zeitpunkt 0 vor der CaCl₂ Zugabe. A' zeigt eine Vergrößerung mit deutlich polygonalen Zellen, granulären Strukturen und erkennbaren Zellkernen. (B-D) Durch Zugabe von CaCl₂ werden morphologische Veränderungen sichtbar mit Ausbildung mehrlageriger Urothelstrukturen ab Tag 1 bis Tag 5 (B), die deutliche Wirbel zeigen (C) und in dessen Zentrum kleine weiße Aggregate entstehen.(D) Die weißen Aggregate nehmen im Verlauf der Stratifizierung größen- und zahlenmäßig zu. D' zeigt eine Vergrößerung eines weißen Aggregats und deutlich abgeflachte Zellen ohne granuläre Strukturen als Hinweis auf Differenzierung.

Nach Erreichen der Konfluenz (Tag 0) wurde CaCl_2 zum Medium in einer Endkonzentration von 1.2 mM Kalzium zugesetzt. Ein bis fünf Tage nach Zugabe von CaCl_2 waren in den Urothelkulturen erste morphologische Veränderungen der Zellen sichtbar (Abbildung IV.1-8 B-D). Die polygonalen Zellen mit deutlich sichtbarem Zellkern vor der Behandlung (A') wurden länger und schmaler. In den darauf folgenden Tagen zeigten sich in Kultur Anzeichen einer Stratifizierung (weiße Aggregate) und Wirbelstrukturen (Abbildung IV.1-8 C-D). Bis zum Ende der Experimente konnte keine perfekte Urothelschichtung erzielt werden. Jedoch wurde eine weitere morphologische Veränderung der Urothelzellen unterhalb der Keratinschicht sichtbar (Abbildung IV.1-8D'). Diese Zellen erschienen sehr groß, flach, mit kaum sichtbaren zellulären Strukturen.

A. Morphologische Veränderungen



B. Genexpressionsanalyse von Zytokeratinen während der CaCl_2 Behandlung

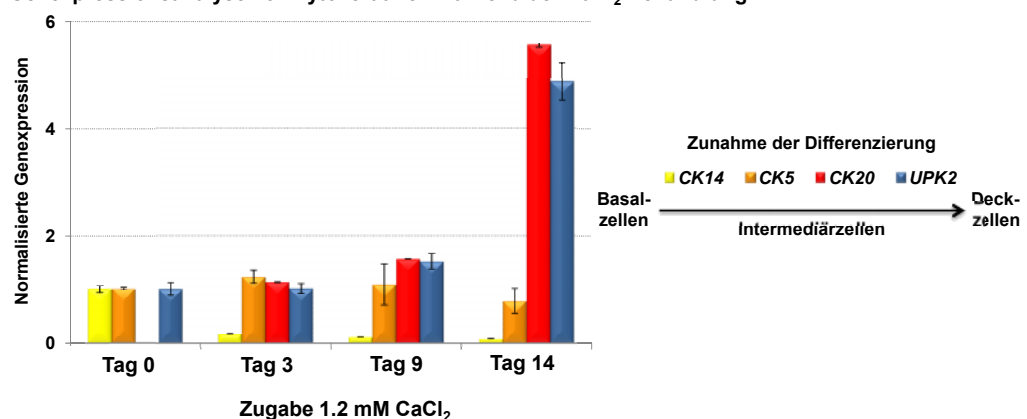


Abbildung IV.1-9 Detaillierte Analyse in der Urothelkultur UP220 Passage 1. (A) morphologische Veränderungen der konfluenten Urothelkultur nach Induktion der Differenzierung mit Kalzium zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Ab Tag 3 bildeten sich weiße Aggregate, die sich zu großflächigen, wirbelartigen Strukturen mit kleineren Aggregaten am Tag 9-11 ausbildeten. (B) Genexpressionsveränderungen der Zytokeratinmarker CK14, CK5, CK20 und UPK2 (Uroplakin2) mittels quantitativer Real Time PCR. Die Zytokeratinmarker sind mit unterschiedlich differenzierten Zuständen im Urothel assoziiert. Im Verlauf der Kalziumbehandlung nahmen Marker für Differenzierung (CK20, UPK2) zu und Proliferationsmarker (CK14) ab.

In einem weiteren Experiment mit der ersten Passage der Urothelkultur UP220 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kalziuminduktion RNA isoliert und das Genexpressionsprofil verschiedener Marker untersucht (Abbildung IV.1-9B). Analysiert wurden Zytokeratine (CK), die im Urothel mit Vorläuferzellen (CK14+), wenig differenzierten Zellen (CK5+) und terminal differenzierten Deckzellen (CK20+, UPK2) assoziiert sind. Die Genexpressionsanalyse zeigte eine deutliche Abnahme von CK14 ab dem dritten Tag, sowie eine schwache Zunahme von CK20 und UPK2 ab dem neunten Tag und eine starke Zunahme beider Marker am letzten Tag der Messreihe (Tag 14). CK5 war über dem gesamten Zeitraum sehr stark exprimiert und änderte sich nicht signifikant.

Um die Differenzierungsfähigkeit der im kalziumarmen Spezialmedium kultivierten, neu etablierten papillären Urothelkarzinomzelllinie BC61 zu überprüfen, wurde CaCl_2 konfluent bewachsenen BC61 Kulturen zugesetzt. In BC61 Zellen konnten ähnliche morphologische Veränderungen beobachtet werden wie zuvor in den Urothelkulturen (Abbildung IV.1-10A). Einen Tag nach CaCl_2 Zugabe zeigten sich deutliche Anzeichen der Stratifizierung. Während der Kultivierung mit Kalzium riss die konfluente Zellschicht auf und es bildeten sich Löcher. Durch die Inkubation bei Raumtemperatur am sechsten Tag löste sich die Zellschicht ab und wurde als „Häutchen“ gewonnen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proteinlysate und RNA hergestellt.

Um Veränderungen in der Proliferation zu verfolgen wurde Ki67 verwendet. CK8/18 (ein Zytokeratin intermediärer und differenzierter Urothelzellen) und UPK2 waren Indikatoren für eine erfolgreiche Differenzierung (Abbildung IV.1-10B). Zur Kontrolle der Proteinqualität und -quantität wurde die Western Blot Membran mit α -Tubulin inkubiert. Die Western Blot Filme zeigten eine Abnahme von Ki67. Die Doppelbanden für CK8/18 waren gleichbleibend stark, wobei das Signal oberhalb von 55 kD in der Tag 6 Probe zunahm, jedoch im Häutchen kaum detektierbar blieb. Die UPK2 Signale bei 27 kD nahmen vom ersten bis zum letzten Tag kontinuierlich zu. Die Zunahme der *UPK2* Expression konnte auch auf RNA Ebene gezeigt werden. Zusätzlich nahm die *CK20* Expression zu und die *CK14* Expression ab (Abbildung IV.1-10C).

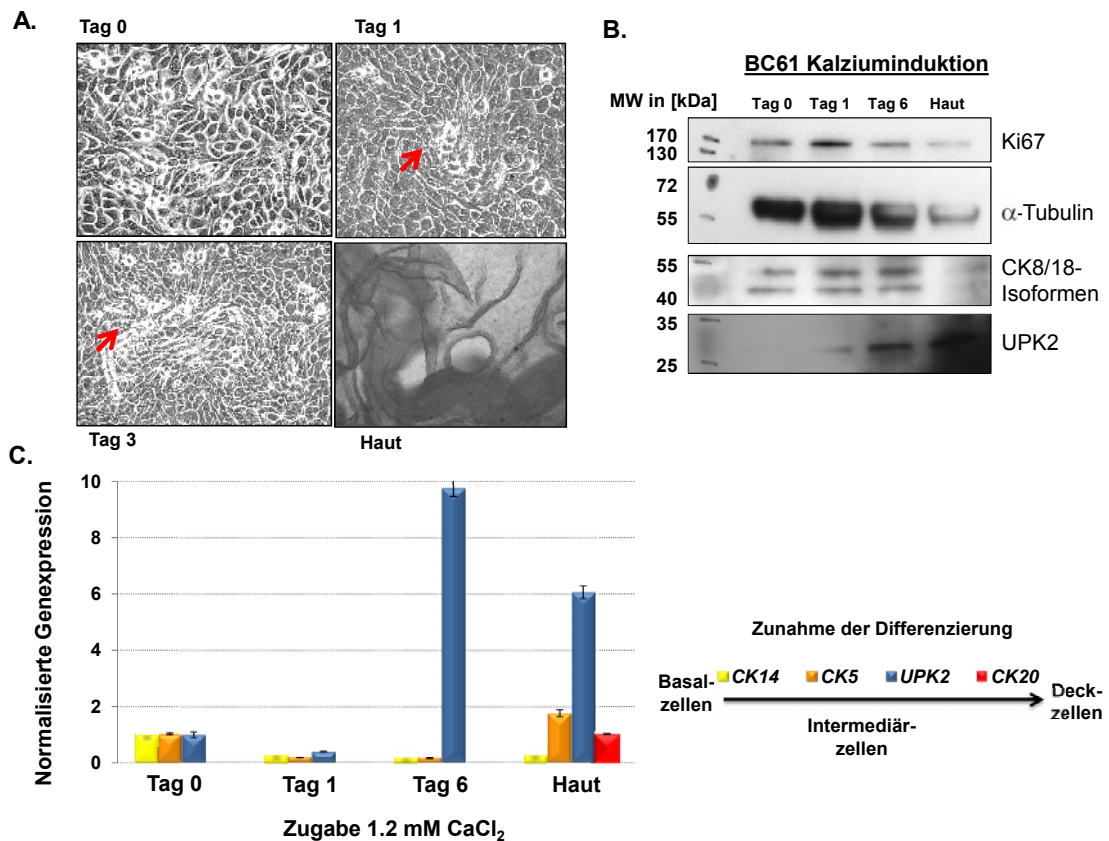
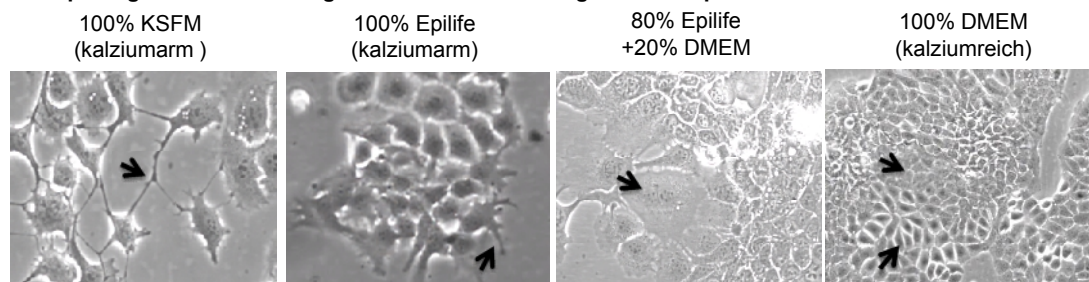
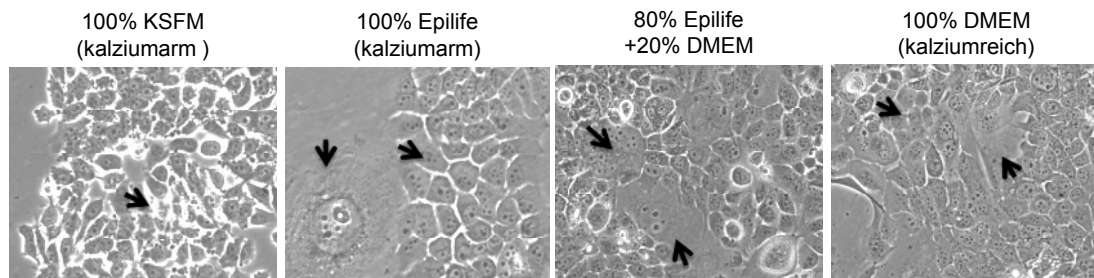


Abbildung IV.1-10 Kalziuminduzierte Differenzierung in der papillären Urothellarzinomzelllinie BC61 (A) morphologische Veränderungen nach Zugabe von Kalzium zur konfluenten Zellkultur innerhalb von sechs Tagen. Zu den markanten Veränderungen zählen die wirbelartigen Strukturen am Tag 1, sowie die Bildung von Aggregaten und schließlich eine fertige Haut. (B-C) Analyse differenzierungsspezifischer Marker. (B) Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki67, dem Zytokeratinpaar CK8/18 und dem Deckzellmarker UPK2 zeigen eine entsprechende Zunahme differenzierungsassoziierter Marker. (C) Genexpressionsanalyse nach Zugabe von Kalzium von Zytokeratinen, die mit Differenzierungszuständen assoziiert sind mittels qPCR. Insbesondere die UPK2 und CK20 Genexpression als Hinweis auf eine erfolgreiche Differenzierung nimmt zu.

Nach erfolgreicher Etablierung zweier Differenzierungsmodelle untersuchten wir die Wirkung von Kalziumentzug auf Urothelkarzinomzelllinien, die seit mehr als 70 Passagen an die hohen Kalziumkonzentrationen von DMEM mit fötalem Kälberserum gewöhnt waren. Die beiden ausgewählten Zelllinien HT1376 und BFTC905 zeichneten sich durch die Heterogenität der Zellmorphologie innerhalb einzelner Kolonien aus (Abbildung IV.1-11A-B). In der Zelllinie BFTC905 waren sehr große Zellen mit Meganuklei zu beobachten (Abbildung IV.1-11B rechts).

A. Morphologische Veränderungen durch Kalziumentzug in HT1376 p. 70-76**B. Morphologische Veränderungen durch Kalziumentzug in BFTC905 p.54-60**

← Kalziumentzug über mehrere Passagen durch Beimengung von kalziumarmem Medium zum normalen kalziumreichen Medium DMEM

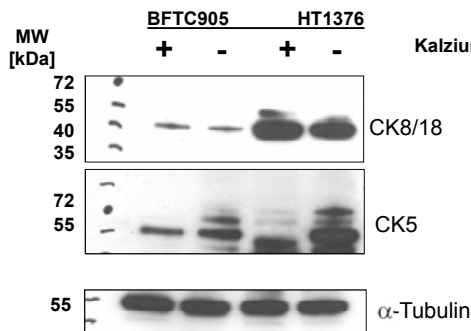
Abbildung IV.1-11 Veränderungen der Zellmorphologie infolge von Kalziumentzug auf die beiden Zelllinien HT1376 (A) und BFTC905 (B). Von rechts nach links Abnahme der Kalziumionenkonzentration im Medium durch Beimengung von kalziumreduziertem Epilife Medium zum kalziumreichen DMEM, in dem die Zelllinien normalerweise kultiviert werden. In DMEM kultivierte Zellen bilden Kolonien aus unterschiedlich großen Zellen (Pfeile). Durch Kalziumentzug nimmt die Zahl der flacher und größer werdenden Zellen in beiden Zelllinien zu. Zellen in KSFM oder Epilife zeigen deutliche Zellausläufer und aberrante Zellmorphologien (schwarze Pfeile).

Die Urothelkarzinomzelllinien wurden über mehrere Passagen an niedrige Kalzium- und Serum- Konzentrationen gewöhnt. Dazu wurde DMEM mit KSFM in steigender Konzentration bis 100% KSFM gemischt. Bei 100% KSFM überlebten die Zellen maximal drei Tage (Abbildung IV.1-11A-B links). Zudem fehlten Zell-Zellkontakte und die Zelladhärenz war vermindert. Diese Effekte konnten durch einen Wechsel von KSFM zu Epilife mit einer stärkeren Supplementierung etwas abgeschwächt werden (Abbildung IV.1-11A-B Mitte). Durch die Kultivierung mit Epilife wurden Unterschiede zwischen Kolonien beobachtet. Einige Kolonien bestanden ausschließlich aus flachen, sehr großen Zellen, die in der Mutterzelllinie nicht erkennbar waren. Um die Effekte durch Kalziumentzug auf Proteinebene zu analysieren, wurden Western Blot Analysen und Immunzytochemie auf CK14, CK5, CK8/18, CK20, sowie Ki67 durchgeführt (Abbildung IV.1-12A-C).

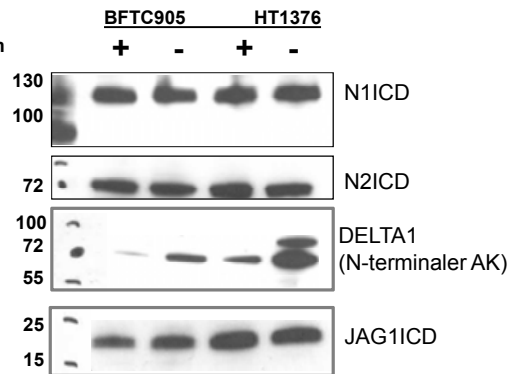
Im Western Blot gab es keine Änderungen in der Proteinmenge von CK8/18 (Abbildung IV.1-12A). Es jedoch konnte ein Wechsel der CK5-Isoformen detektiert werden. So war durch Kalziumentzug in BFTC905 eine zusätzliche Bande bei ~70 kD erkennbar. In der Zelllinie HT1376 waren durch Kalziumentzug ebenfalls zusätzliche Signale zwischen 55-70 kD detektierbar.

A. Western Blot

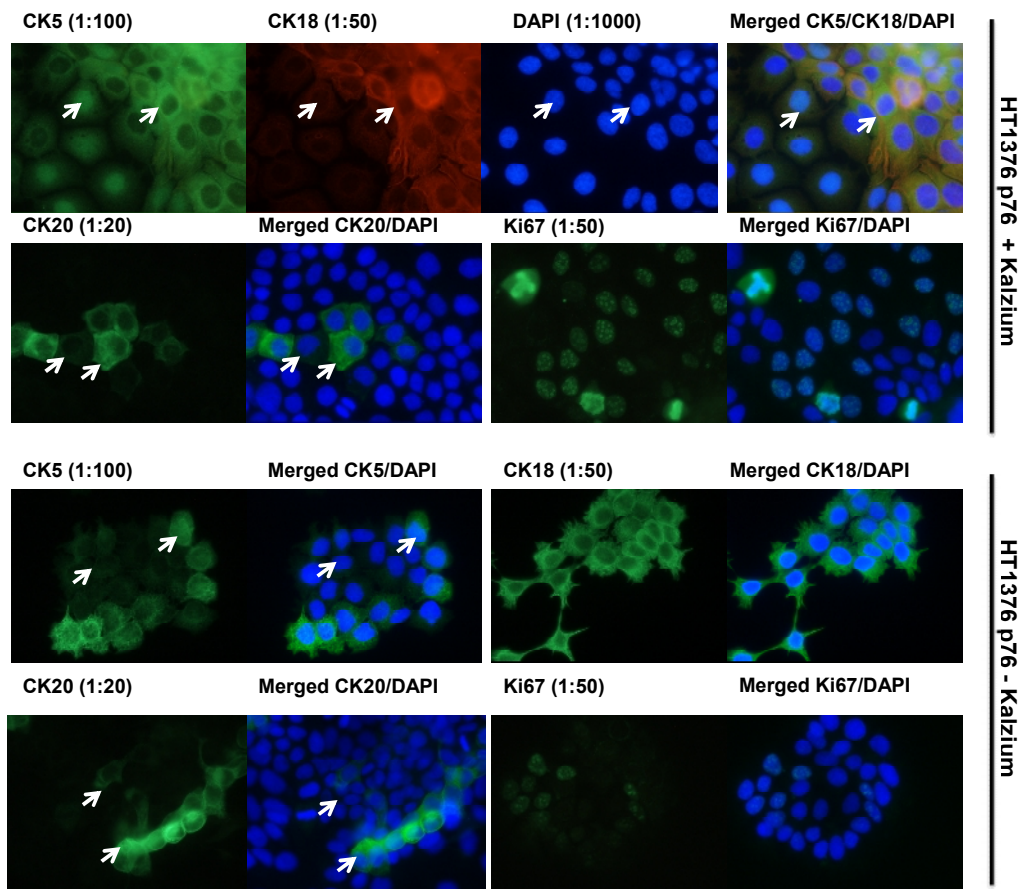
Zytokeratin-Profil



Notch-Profil



B. ICC



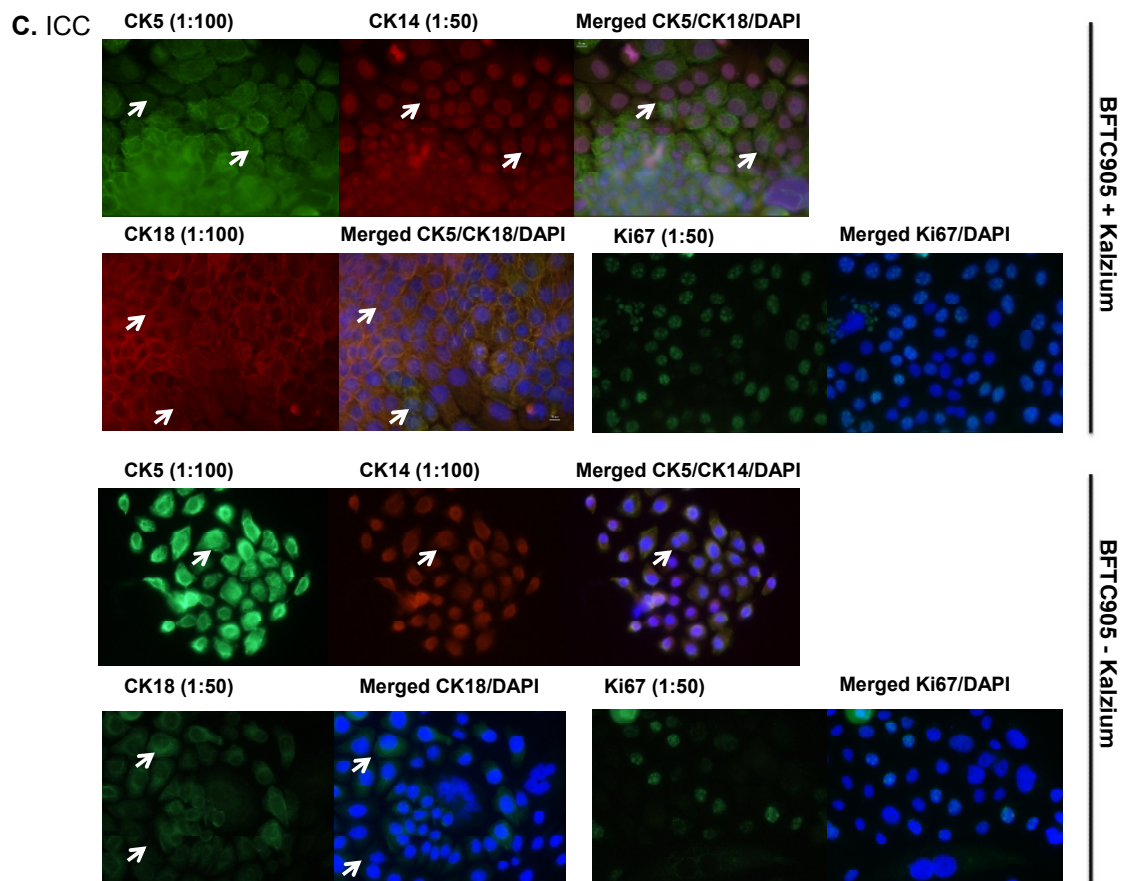


Abbildung IV.1-12 Proteinanalysen in den Zelllinien HT1376 und BFTC905 nach Kalziumentzug. (A) links: Analyse der Zytokeratinmarker CK8/18 und CK5. Auffällig sind die CK5-Signale in beiden Zelllinien unter Kalziumentzug. Rechts: Analyse der Notch Rezeptoren N1ICD, N2ICD und der Liganden DELTA1 und JAGGED1 im Western Blot. DELTA1 nimmt in beiden Zelllinien unter Kalziumentzug zu. (B-C) Immunzytochemie von Zellen in kalziumreichem Medium DMEM (obere Bildhälfte) und in kalziumreduziertem Medium Epilife (untere Bildhälfte). (B) Verteilung der Zytokeratinmarker in HT1376 und (C) in BFTC905. Die Zytokeratine sind in den Zellen unterschiedlich lokalisiert und exprimiert. CK5 kann zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert sein. CK8/18 und CK20 können zytoplasmatisch oder membranär lokalisiert sein, während CK14 und Ki67 auch nukleär detektierbar sind. Die heterogene Verteilung ist durch Pfeile gekennzeichnet. Man beachte die unterschiedlichen Analysen in den beiden Zelllinien. CK20 wurde ausschließlich in HT1376 Zellen verwendet und CK14 ausschließlich in BFTC905 Zellen. Grün= Alexa Fluor 488 nm; rot= Cy3; Blau= DAPI.

Die immunzytochemischen Färbungen in der Zelllinien HT1376 (Abbildung IV.1-12B) detektierten in den DMEM kultivierten HT1376 Zellen CK5 entweder im Nukleus oder im Zytoplasma. Die CK5 positiven Nuklei waren außerdem CK8/18 negativ.

In den mit Epilife kultivierten Zellen waren CK5 und CK8/18 dagegen an der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisiert. Ki67 positive Zellen waren häufiger in Zellen, die in DMEM kultiviert wurden (Abbildung IV.1-12B/C). In der Zelllinie BFTC905 war CK5 in größeren Zellen zytoplasmatisch lokalisiert, in kleineren hingegen nukleär. Alle Nuklei waren zudem CK14 positiv und CK8/18 negativ. Dieses letzte Zytokeratinpaar war an der Zellmembran zwischen Zellen mit Zell-Zell-Kontakt lokalisiert. In den BFTC905 Zellen, die in Epilife kultiviert wurden, waren die Zytokeratine CK5, CK14 und CK8/18 eher im Zytoplasma und perinukleär detektierbar (Abbildung IV.1-12C).

Um die Auswirkungen einer erhöhten Kalziumdosis zu testen wurde 2 mM Kalzium zum kalziumarmen Spezialmedium Epilife zugegeben (Abbildung IV.1-13). Die Zellen reagierten innerhalb von fünf Tagen auf die Zugabe von 2 mM Kalziumchlorid zum Medium Epilife mit deutlichen morphologischen Veränderungen und einer Ablösung. Die Rückführung in DMEM ergab ähnliche morphologische Veränderungen in weniger ausgeprägter Form.

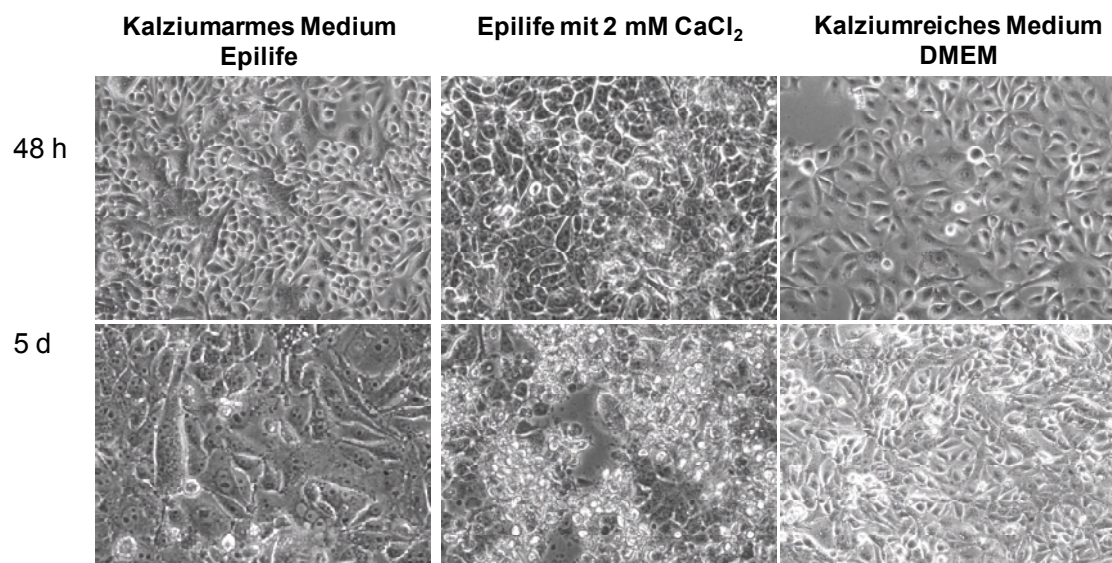


Abbildung IV.1-13 morphologische Veränderungen in der Zelllinie BFTC905 nach Modulation des Kalziumgehalts im Medium nach 48h und 5 Tagen. Die Zugabe von 2 mM CaCl₂ zum kalziumreduzierten Medium Epilife (mitte) kann eine partielle Schichtung und Ablösung der Zellen bewirken (weiße Zellen). Die Rückführung der Zellen in ihr ursprüngliches DMEM Medium (rechts) hat keine großen Veränderungen zur Folge.

IV.2 Analyse zweier nicht-kanonischer Notch Liganden: *DLK1* und *EGFL7*

IV.2.1 Der nicht-kanonische Ligand *DLK1*²

DLK1 und *MEG3* Expressionsanalysen

Die elterlich geprägten Gene *DLK1* und *MEG3* wurden mittels quantitativer Real-Time PCR in den Urothelkarzinomzelllinien und Harnblasentumorgeweben, sowie den entsprechenden Kontrollen untersucht. Die Werte wurden gegen *TBP* normiert (Abbildung IV.2-1A-D). Die Leberkarzinomzelllinie HepG2 diente als *DLK1* exprimierende Positivkontrolle. *DLK1* war in allen 11 normalen Blasengeweben nachweisbar (Abbildung IV.2-1A). Im Vergleich dazu war dieses Gen überwiegend schwach bis gar nicht in den Harnblasentumorgeweben exprimiert. Sechs von 24 Tumorproben hatten eine vergleichsweise sehr starke Expression. Die Verminderung der Expression in den Harnblasentumoren war statistisch signifikant mit $p=0.004$.

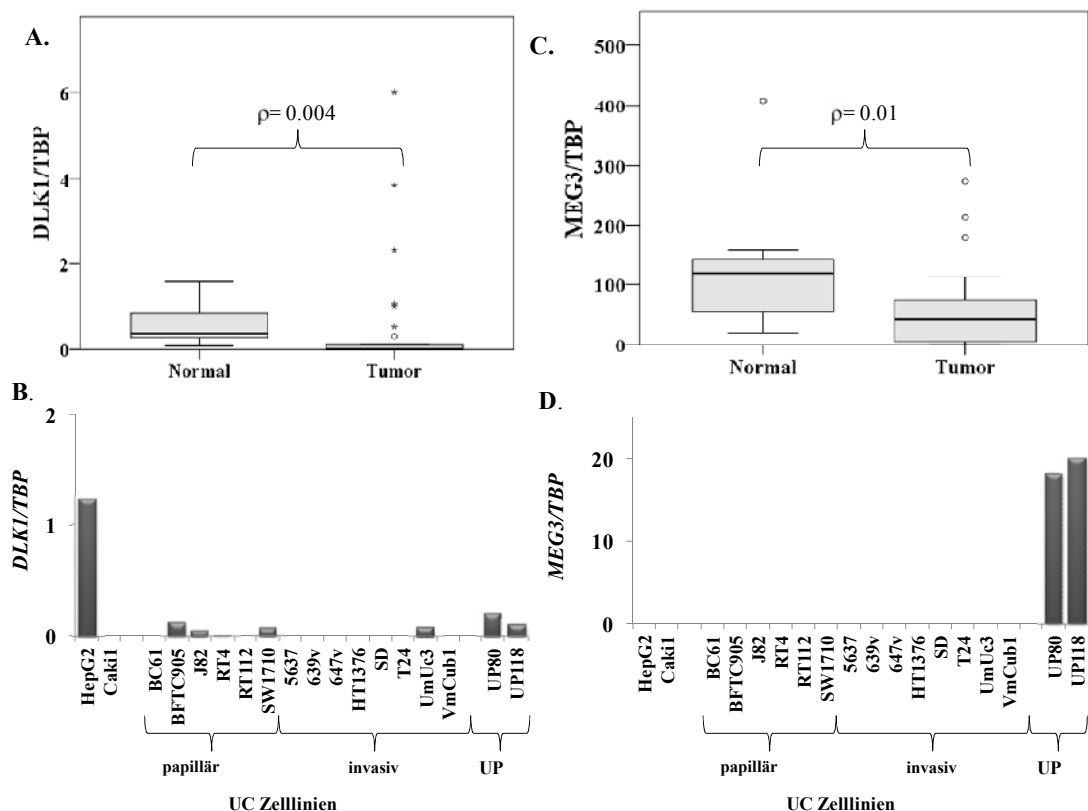


Abbildung IV.2-1 *DLK1* und *MEG3* Expressionsanalysen mittels qPCR. *DLK1* (A) und *MEG3* (C) Expressionsanalysen im Gewebe dargestellt als Boxplot-Diagramme, und (B/C) Expressionsanalyse in Zelllinien und Urothelkulturen (UP) dargestellt als Balken-diagramme mit den Kontrollzelllinien HepG2 und Caki1.

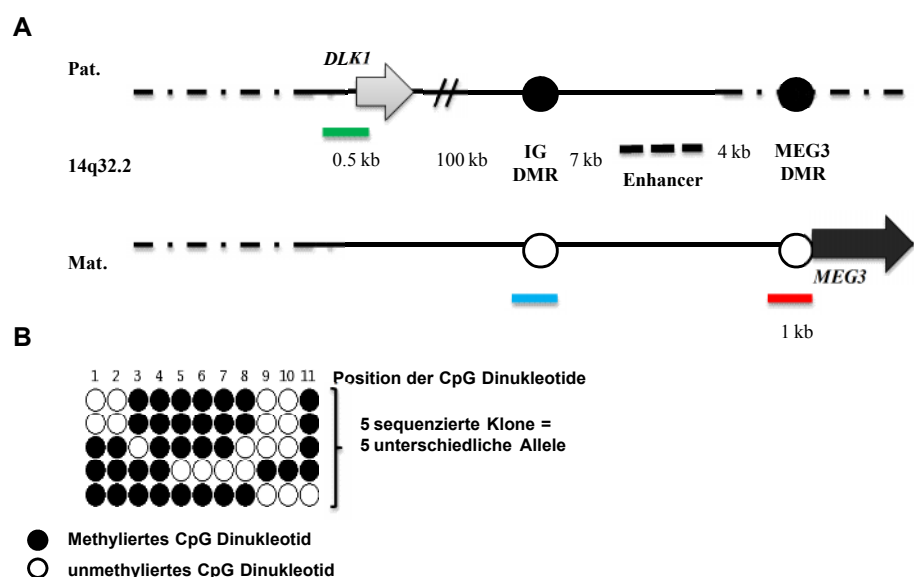
² Teile dieses Abschnitts sind zur Publikation mit dem Titel „A novel epigenetic mechanism underlying concomitant downregulation of the reciprocally imprinted genes *DLK1* and *MEG3* at 14q32.2 in urothelial carcinoma“ eingereicht

In den Urothelkarzinomzelllinien, jedoch auch in normalen Urothelkulturen (UP) war die *DLK1* Expression kaum messbar (Abbildung IV.2-1B). Der Unterschied zwischen *DLK1* und dem Standardgen *TBP* betrug zum Teil mehr als 10 Zyklen.

Die Expression des benachbarten Gens *MEG3* wurde in den gleichen Proben gemessen (Abbildung IV.2-1C-D). Als Positivkontrolle diente normales Nierengewebe. In den 11 normalen Harnblasengeweben war *MEG3* im Vergleich zu *DLK1* um den Faktor 100 stärker exprimiert. In den Blasentumorgeweben war die *MEG3* Expression mit $p=0.01$ signifikant vermindert, obwohl die detektierbare *MEG3* mRNA um ein Vielfaches höher blieb als die *DLK1* mRNA Menge (Abbildung IV.2-1C). In den proliferativen Urothelkulturen (UP) betrug die *MEG3* mRNA Menge im Vergleich zu den normalen Blasengeweben nur ein Fünftel (Abbildung IV.2-1D). In Übereinstimmung mit publizierten Daten [81, 132] konnte weder in der Leberkarzinomzelllinie HepG2 noch in der Nierenkarzinomzelllinie Caki1 *MEG3* mRNA detektiert werden. In den Urothelkarzinomzelllinien war *MEG3* ebenfalls nicht detektierbar.

DNA-Methylierungsveränderungen in den regulatorischen Regionen

Um zu überprüfen, ob DNA-Methylierungsveränderungen zu der verminderten Genexpression führen, wurden die folgenden drei regulatorischen Regionen in dem 130 kb Chromosomenabschnitt zwischen den beiden Genen über Bisulfitsequenzierung analysiert (Abbildung IV.2-2A): der *DLK1* Promotor, eine differenziell methylierte Region (IG DMR) zwischen beiden Genen, sowie eine DMR im Promotor von *MEG3* (*MEG3* DMR).



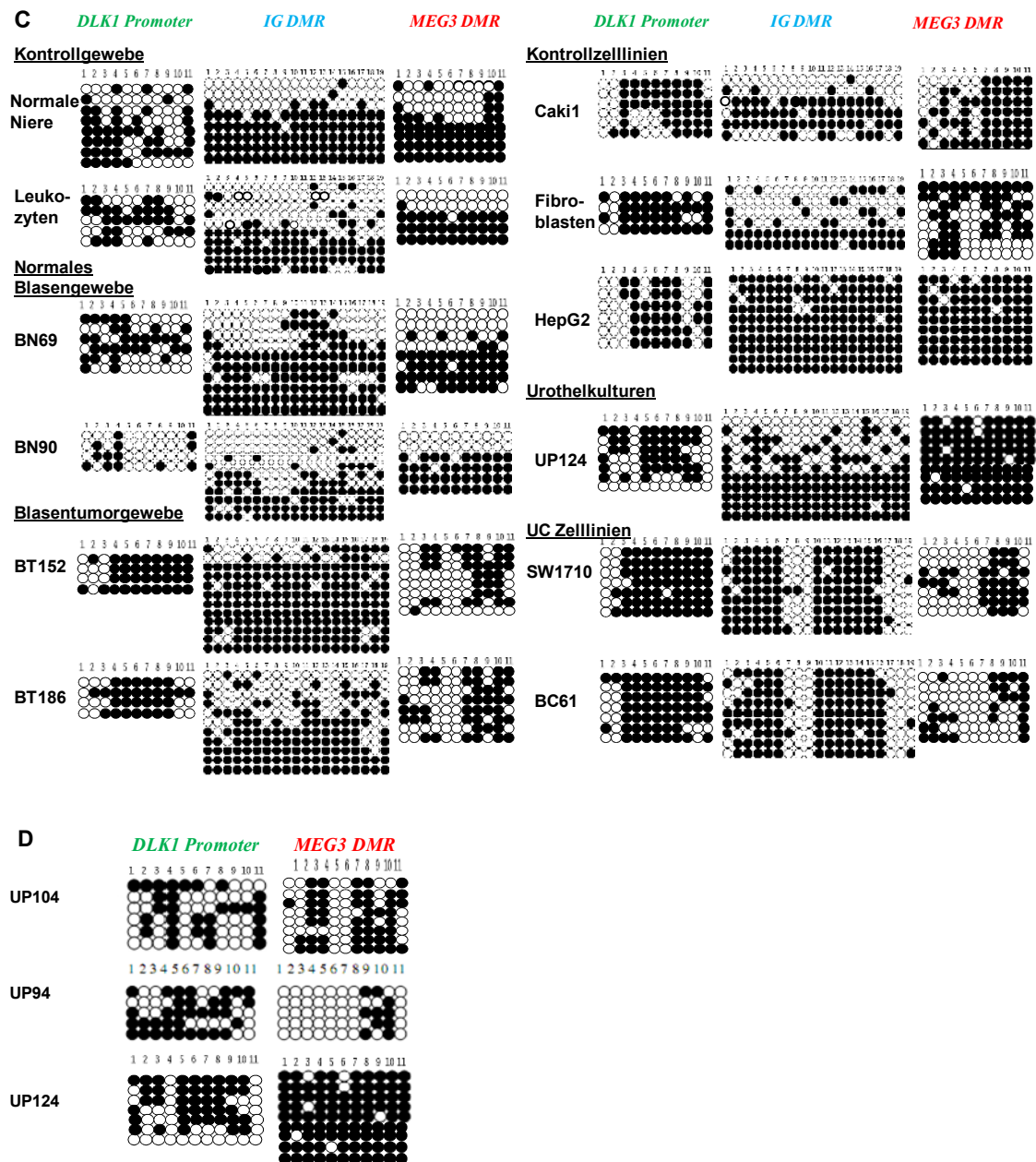


Abbildung IV.2-2 Bisulfitsequenzierung (A) schematische Darstellung des DLK1-MEG3 Clusters mit den regulatorischen Regionen, die mittels Bisulfitsequenzierung analysiert wurden: in grün der DLK1 Promotor, in blau die IG DMR und in rot die MEG3 DMR. (B) Darstellung des Bisulfitsequenzierungsmuster einer Probe als Beispiel. Schwarze Kugeln bedeuten methylierte CpG Stellen, weiße Kugeln bedeuten unmethylierte CpG Stellen. Jede waagerechte Reihe steht für einen sequenzierten Klon, der ein Allel repräsentiert. (C) Bisulfitsequenzierung des DLK1 Promotors, der IG DMR und der MEG3 DMR (im Uhrzeigersinn) im Kontrollgewebe, in Kontrollzelllinien, in Urothelkulturen und Urothelkarzinomzelllinien, in Blasentumoren und normalem Blasengewebe. (D) variable Methylierung des DLK1 Promotors und der MEG3 DMR in den normalen Urothelkulturen (UP).

Der *DLK1* Promotor war in Leukozyten, in Nierengewebe und in den normalen Blasengeweben (BN69 und BN90) mäßig stark methyliert (Abbildung IV.2-2C). Die einzelnen Allele waren insbesondere an den CpG Dinukleotiden 1-4 stärker methyliert als an den CpG Dinukleotiden 5-10. In den Harnblasentumorgeweben (BT152 und BT186) und in den Urothelkarzinomzelllinien (BC61 und SW1710), sowie in HepG2 erschien das Methylierungsmuster umgekehrt. Die vorderen CpG Dinukleotid-Positionen 1-4 waren weniger stark methyliert als die CpG Dinukleotide 5-10. Diese Methylierungsverteilung konnte auch in der Nierenkarzinomzelllinie Caki1 und in den Fibroblasten VHF gezeigt werden. In den normalen Urothelkulturen war die Methylierung des *DLK1* Promotors ebenfalls mäßig stark, aber zwischen den Proben variabel (Abbildung IV.2-2B-C).

Eine differenzielle Methylierung der IG DMR war für Leukozyten und Nierengewebe aus der Literatur bekannt und wurde hier bestätigt (Abbildung IV.2-2C). Beide Proben hatten eine annähernd gleiche Verteilung methylierter und unmethylierter Allele. Dieses Methylierungsmuster konnte ebenfalls in den normalen Blasengeweben (BN69, BN90), in einem Blasen tumor (BT186), sowie in den Fibroblasten, Caki1 und einer Urothelkultur (UP124) gezeigt werden. In dem Blasen tumor BT152 und der hepatozellulären Zelllinie HepG2 waren nahezu alle Allele methyliert. In den beiden Urothelkarzinomzelllinien BC61 und SW1710 konnte keine differenzielle Methylierung gezeigt werden. Stattdessen waren die CpG Dinukleotide an den Positionen 1-6 und 10-16 komplett methyliert und an den Positionen 7-9 und 17-19 unmethyliert. Dieses gestreifte Methylierungsmuster war einzigartig und ausschließlich in den urothelialen Zelllinien zu finden.

Die *MEG3* DMR war in Leukozyten, normalen Nieren- und Blasengeweben differenziell methyliert (Abbildung IV.2-2C). In allen anderen Proben war die differenzielle Methylierung der *MEG3* DMR nicht nachweisbar. In den Blasen tumor gewebe n und Urothelkarzinomzelllinien waren die CpG Dinukleotide an den Positionen 1-6 eher unmethyliert und die Positionen 7-11 stärker methyliert. Ein vergleichbares Methylierungsmuster besaß die Nierenkarzinomzelllinie Caki1. In den Fibroblasten VHF waren die Positionen 2-4 und 7-11 stärker methyliert, wohingegen die Positionen 1, 5-6 nahezu unmethyliert waren. Eine noch stärkere Methylierung mit Ausnahme von Position 6 war in HepG2 zu finden. Die Methylierung der *MEG3* DMR war in den normalen Urothelkulturen (UP124, UP94, UP104) sehr variabel.

Das Methylierungsmuster in der UP104 ähnelte dem Fibroblasten-Methylierungsmuster, wohingegen die Methylierung in der UP94 der in den Zelllinien ähnelte (Abbildung IV.2-2C-D).

Da die Methylierungsveränderungen in der *MEG3* DMR am auffälligsten waren, wurden die Veränderungen an den CpG Dinukleotiden 5-10 mittels Pyrosequenzierung in einem größeren Probenset analysiert. Die Pyrosequenzierung der *MEG3* DMR ergab eine 50%ige Methylierung über alle CpG Dinukleotide in den sechs Blasengewebeproben (Abbildung V.2-3A) und in den vier Leukozytenproben (Abbildung V.2-3B).

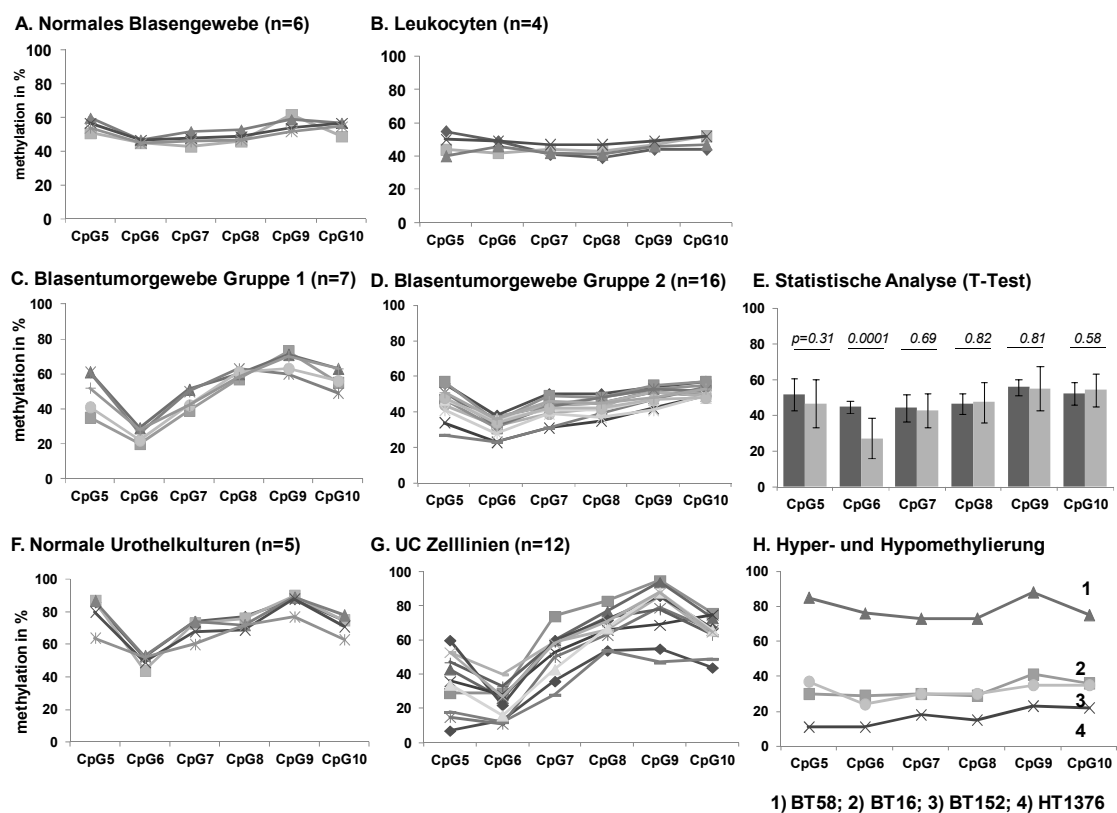


Abbildung IV.2-3 Pyrosequenzierung (A) von normalem Blasengewebe, (B) von Leukozyten, (C) in Blasentumoren der Gruppe 1, (D) Blasentumoren der Gruppe 2, (E) T-Test in Blasentumorgeweben (dunkel graue Balken) und in Zelllinien (hell graue Balken), (F) Methylierung in normalen Urothelkulturen, (G) in den Zelllinien und (H) vier Fälle von Hyper- oder Hypomethylierung.

Die Blasentumorgewebe unterteilten sich in zwei Gruppen, die beide an der CpG Position 6 die niedrigste Methylierung hatten. Die erste Gruppe (Abbildung IV.2-3C) unterschied sich von der zweiten Gruppe (Abbildung IV.2-3D) durch eine sehr starke Methylierung (zwischen 60-80%) an den CpG Dinukleotiden 8-10.

Die Verminderung der Methylierung an Position 6 war in den Blasentumorgeweben statistisch hochsignifikant mit $p=0.0001$ (Abbildung IV.2-3E). 10 von 13 untersuchten Urothelkarzinomzelllinien spiegelten das Methylierungsmuster der Blasentumorgruppe 1 wieder, mit der geringsten Methylierung an CpG 6 und einer sehr starken Methylierung (60-100%) an den hinteren CpG Dinukleotiden (Abbildung IV.2-3G). Zwei Urothelkarzinomzelllinien entsprachen eher der Blasentumorgewebegruppe 2. Die Zelllinie HT1376 war über alle CpG Dinukleotide hinweg schwach methyliert, zwischen 15-30% (Abbildung IV.2-3H). Zwei weitere Blasentumore (BT16, BT152) hatten eine durchschnittliche Methylierung von ca. 40%, ein weiterer Blasentumor (BT58) hatte dagegen eine sehr starke Methylierung von durchschnittlich 85%.

Diese letzteren vier Befunde lassen sich mit der Auswirkung von Allelverlusten (entweder das paternale oder das maternale Allel) erklären. Im Gegensatz zu den Blasengeweben war in den Urothelkulturen die Methylierung an allen untersuchten CpG Positionen erhöht, sie lag zwischen 55-90%. Das CpG Dinukleotid 6 hatte in allen fünf Proben die geringste Methylierung (Abbildung IV.2-3F).

Da wegen der Besonderheiten der Sequenz kein Pyrosequenzierungsassay für den *DLKI* Promotor entworfen werden konnte, nutzten wir einen methylierungssensitiven Restriktionsverdau. Diese angewandte Methode wird als COBRA bezeichnet und nutzt den Restriktionsverdau in bisulfitumgewandelter methylierter DNA an bestimmten CpG-Positionen. Für die Analysen des *DLKI* Promotors verwendeten wir das Restriktionsenzym $Taq^{\alpha}I$, das die CpG Positionen 2 und 8 mit der Erkennungssequenz TCGA im reversen Strang erkennt, wenn die methylierten Cytosine erhalten blieben. Daher können je nach Methylierungszustand an CpG 2 und CpG 8 unterschiedliche Fragmentlängen nach dem Restriktionsverdau detektiert werden (Abbildung IV.2-4). Mit dieser Methode sollten die Unterschiede zwischen normalem Blasengewebe, Blasentumorgewebe und Zelllinien verifiziert werden.

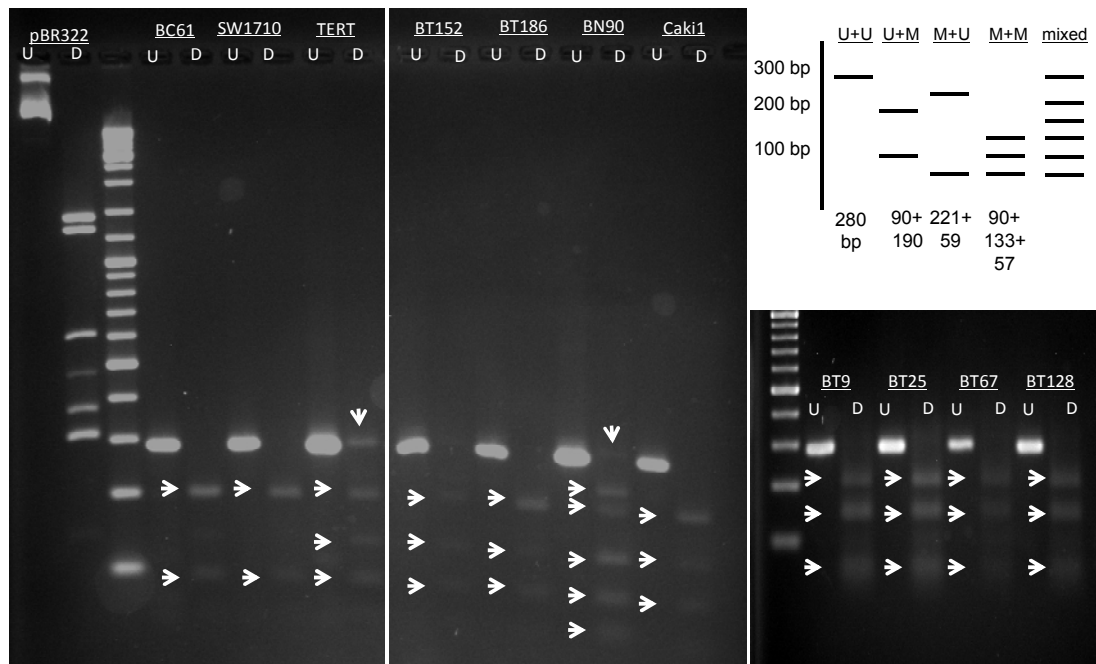


Abbildung IV.2-4 COBRA-Fragmentlängenanalyse in den über Bisulfidsequenzierung analysierten Proben und ausgewählten Blasenmorgeweben und Kontrollen. Die weißen Pfeile weisen auf die unterschiedlichen Fragmente im Gel hin. U= unverdaut, D= verdaut mit TaqI. Links: Der Verdau des Kontrollplasmids pRB322 mit Taq^(α)I zeigte die erwarteten sieben Fragmente (1,4 kb, 1,3 kb, 600 bp, 480 bp, 390 bp, 320 bp und 130 bp). Zum Vergleich ist das erwartete in-silico Muster dargestellt. U+U bedeutet, dass beide CpG Positionen unmethyliert sind, das Produkt wird nicht verdaut. U+M bedeutet Methylierung an CpG8 und M+U bedeutet Methylierung an CpG2 mit den entsprechenden Fragmentlängen nach dem Verdau. Bei vollständiger Methylierung entstehen drei Fragmente bei 90 bp, 133 bp und 57 bp. Sind die CpG Positionen auf den Alleln unterschiedlich methyliert entstehen viele Fragmente unterschiedlicher Länge.

Das unverdaute PCR-Produkt (U) für den *DLK1* Promotor lag für alle Proben bei 280 bp (Abbildung IV.2-4). Nach dem Restriktionsverdau (D) waren in den Urothelkarzinomzelllinien BC61 und SW1710 zwei Fragmente bei 190 bp und 90 bp erkennbar. In den Blasenmorgeweben (BT9, BT25, BT67, BT128) waren in der Regel drei Fragmente bei 190 bp, 133 bp und unter 100 bp zu erkennen. Normale Blasenmorgewebe hatten alle möglichen Fragmente nach dem Taq^(α)I Restriktionsverdau. Mit dieser Methode konnte in Tumoren (Zelllinien und Geweben) das Muster aus der Bisulfidsequenzierung bestätigt werden, nämlich eine konsistente versus heterogene Methylierung (vergleiche Abbildung IV.2-2).

Gendosisanalysen am *DLK1* Promotor und den beiden DMRs

Um zu analysieren, wie Änderungen der DNA-Methylierung und der Gendosis in diesen drei Regionen zusammenhängen, wurde die Gendosis über 130 kb hinweg an den drei folgenden Stellen gemessen (Abbildung IV.2-5): am *DLK1* Promotor, an einer regulatorischen Region (IG DMR) zwischen *DLK1* und *MEG3*, sowie am *MEG3* Promotor (*MEG3* DMR).

Alle Ergebnisse wurden je Probe im Verhältnis zum Standardgen *TBP* gesetzt und auf die normale Gendosis von 2 in Leukozyten normiert. Die Gendosis am *DLK1* Promotor, an der IG DMR und an der *MEG3* DMR variierte innerhalb jeder Probe kaum. Sie betrug 2 für die normalen Blasengewebe (BN69 und BN90), für einen Teil der Blasentumore (BT186, BT61, BT116, BT132, BT58, BT40, BT60), für die Urothelkulturen (UP124, UP94) und für die Urothelkarzinomzelllinie BC61. In vier Blasentumorgewebeproben wurde eine höhere Gendosis (BT114, BT28, BT31, BT27) gemessen. In drei weiteren wurde eine niedrigere Gendosis (BT16, BT106, BT152) ermittelt. In den Urothelkarzinomzelllinien SW1710, 639v, RT4 und Umuc3 war die Gendosis ebenfalls vermindert. Die Gendosis in den Zelllinien HT1376 und BC44 war dagegen erhöht (nicht im Diagramm). Die Zellliniendaten stimmten mit den Angaben der Datenbank *cancer genome workbench* überein.

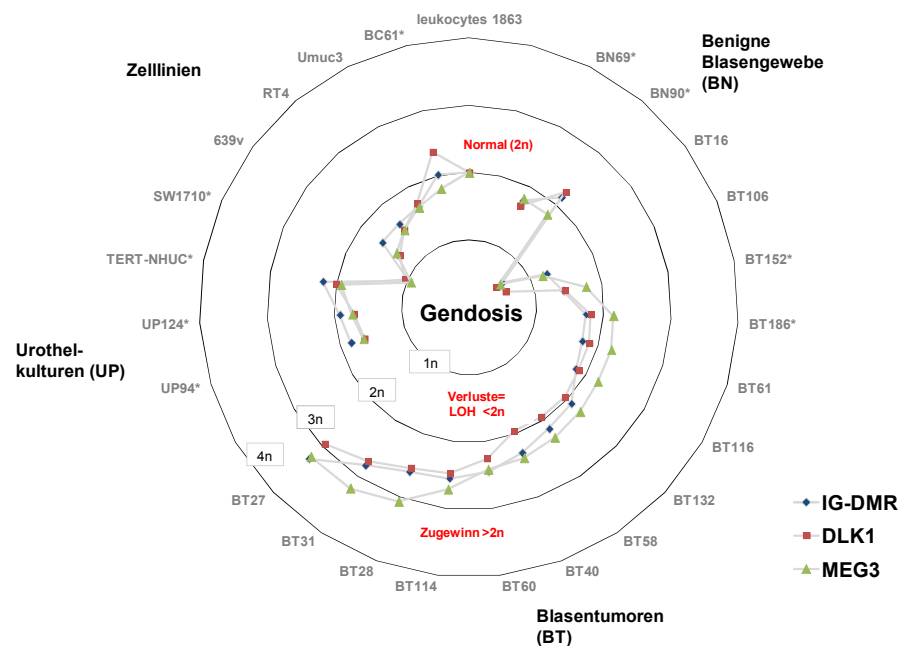


Abbildung IV.2-5 Gendosismessung dargestellt als Kreisdiagramm am *DLK1* Promotor (rot), IG DMR (blau) und *MEG3* DMR (grün). Von innen nach außen nimmt die Gendosis zu. 1n bedeutet LOH, über 2n sind Zugewinne. Alle Proben wurden auf den diploiden Chromosomensatz der Leukozyten bezogen und gegen *TBP* normiert.

Nukleosomenpositionierung in der regulatorischen Region

In den Tumoren war das gestreifte Methylierungsmuster sehr auffällig. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass DNA-Abschnitte auf oder zwischen Nukleosomen unterschiedlich methyliert vorliegen. Daher wurde eine *in silico* Analyse mit der DNA Sequenz der jeweiligen Region durchgeführt. Um die mögliche Lokalisation von Nukleosomen zu ermitteln wurde das frei zugängliche Programm NuPoP (*nucleosome positioning prediction engine*) verwendet [133].

Die untersuchte 240 bp lange DNA im Bereich des *DLK1* Promotors war nach NuPoP Vorhersage zum Großteil um ein Nukleosom gewunden (Abbildung IV.2-6A). Der mögliche Beginn des Nukleosoms (blaue Linie) lag zwischen 30-59 bp. Im Bereich zwischen 59-193 bp war die Wahrscheinlichkeit für die Präsenz des Nukleosoms am größten (rote Linie). Eine Zusammenschau mit dem typischen Methylierungsmuster am *DLK1* Promotor zeigte, dass in Tumoren die ersten beiden CpG Dinukleotide außerhalb des Nukleosoms lagen und eher unmethyliert waren. Die CpG Dinukleotide innerhalb des Nukleosoms waren stärker methyliert. Die 210 bp lange DNA Sequenz im Bereich der *MEG3* DMR läge nach Vorhersage des Programms NuPoP fast vollständig innerhalb eines Nukleosoms. Der mögliche Beginn des Nukleosoms erstreckte sich über 83 bp (Abbildung IV.2-6B). Das Methylierungsmuster war zwischen den Tumor und Normalproben im Bereich zwischen CpG5-10 unterschiedlich.

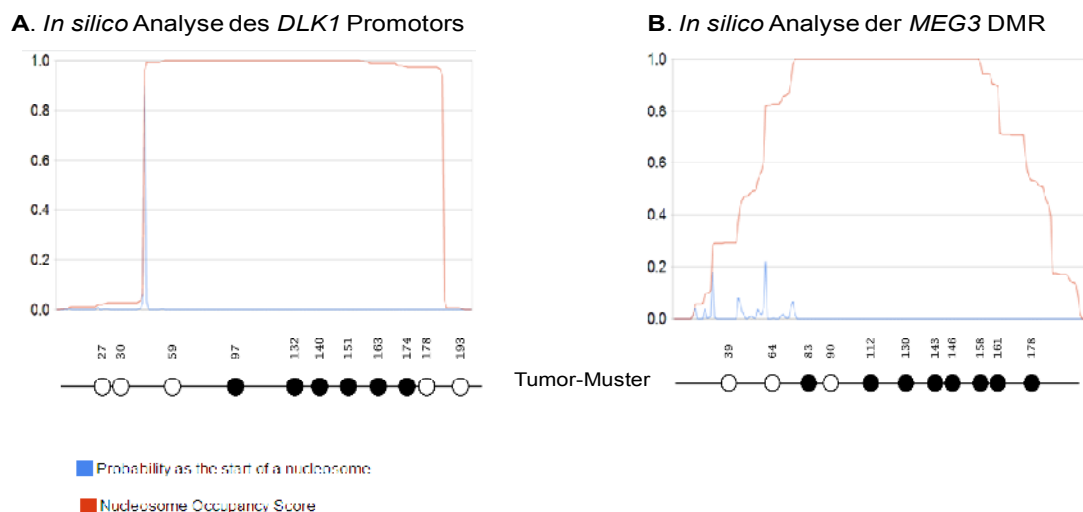
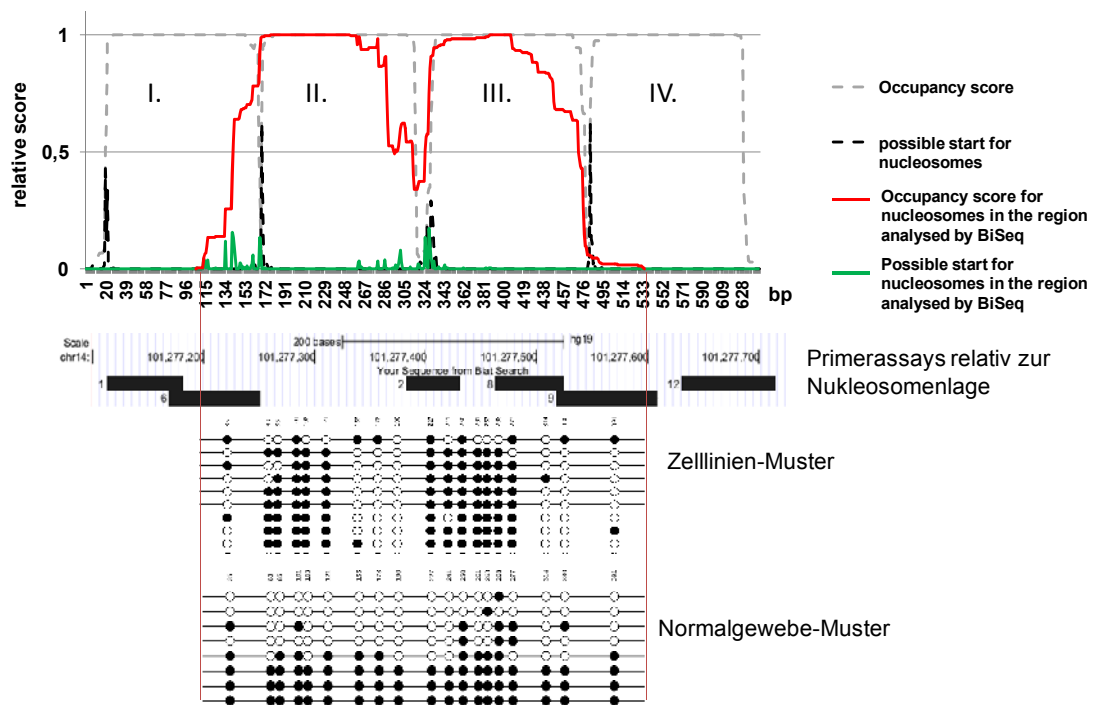


Abbildung IV.2-6 Analysen zur Nukleosomenpositionierung und Überlagerung mit den Methylierungsdaten. *In-silico* Vorhersage zur Präsenz von Nukleosomen in den regulatorischen Regionen mit dem Programm NuPoP (A) im *DLK1* Promotor und (B) in der *MEG3* DMR. Die rote Linie gibt die Wahrscheinlichkeit für ein Nukleosom an, die blaue Linie gibt den vermutlichen Beginn für ein Nukleosom an.

In der 410 bp langen DNA Sequenz im Bereich der IG DMR wurden durch NuPoP zwei Nukleosome vorhergesagt (Abbildung IV.2-7A). Der mögliche Beginn des ersten Nukleosomes erstreckte sich über 85 bp (grüne Linie). Der mögliche Beginn des zweiten Nukleosomes erstreckte sich über die Nukleotide 155-227. Die Nukleosomen waren am wahrscheinlichsten im Bereich zwischen 85-173 bp (rote Linie) und zwischen 230-330 lokalisiert.

Die Zusammenstellung mit den jeweils typischen Methylierungsveränderungen der Zelllinien und Gewebe deutete darauf hin, dass die am stärksten methylierten Bereiche auch denen entsprachen, an denen am wahrscheinlichsten Nukleosomen lokalisiert sein könnten (Abbildung IV.2-7A). Um diesen Aspekt detaillierter experimentell zu untersuchen, wurde ein NuSA (*nucleosome scanning assay*) entworfen. Dieser Assay setzt eine Anreicherung von mononukleosomaler DNA nach MNase Verdau voraus. In MNase zugänglichen Bereichen (beispielsweise Linker-DNA) kann die DNA besser verdaut werden als in MNase unzugänglichen Bereichen, wie beispielsweise die um Nukleosomen gewundene DNA. In einer quantitativen PCR wird diese mononukleosomale DNA mit der unverdauten hochmolekularen DNA hinsichtlich ihrer Effizienz bestimmte PCR Produkte zu bilden, verglichen. Es wurden Primer entworfen, die innerhalb der vorhergesagten Nukleosomen (Primer#1, Primer#8, Primer#12) oder zwischen den Nukleosomen (Primer#6, Primer#2, Primer#9) lagen. Die einzelnen Bereiche der IG DMR wurden durch das Verhältnis der verdauten zu der unverdauten Probe ausgewertet und willkürlich auf die IG DMR#1 normiert.

A. In silico Analyse der IG-DMR



B. NuSA

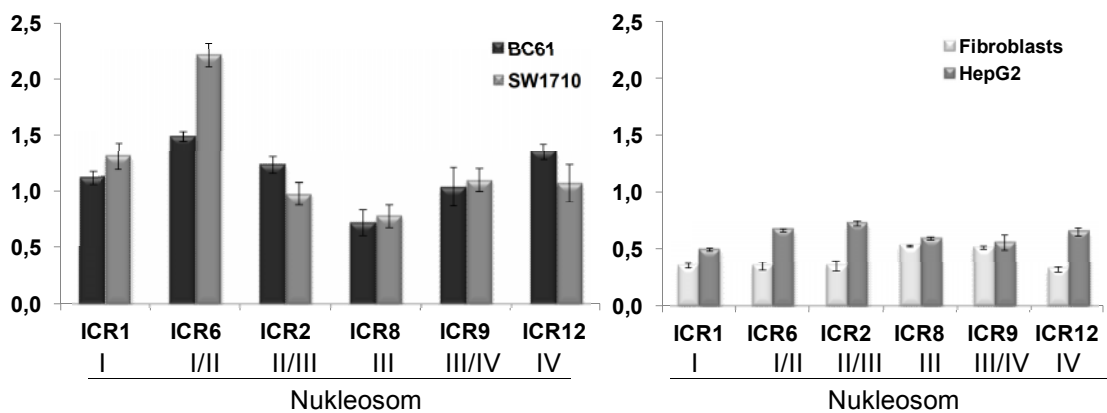


Abbildung IV.2-7 Analyse der IG DMR mit dem Programm NuPoP. (A) in-silico Vorhersage der Nucleosomenpositionierung über vier Nucleosomen, nummeriert als I-IV. Das Methylierungsmuster der IG DMR wurde im Bereich der Nucleosomen II und III analysiert. Diese Nucleosomen sind in rot dargestellt. Für den Nucleosomen scanning assay wurden die Primer (#1-12) entworfen, die innerhalb oder zwischen den Nucleosomen liegen. (B) Ergebnis des NuSA, dargestellt als Balkendiagramme, in den Zelllinien BC61 und SW1710 mit dem gestreiften Methylierungsmuster und in den HepG2 und Fibroblasten mit einem normalem Muster.

Der NuSA wurde in den Urothelkarzinomzelllinien BC61, SW1710, sowie in den Fibroblasten VHF und der Leberkarzinomzelllinie HepG2 durchgeführt (Abbildung IV.2-7B). In der Zelllinie BC61 waren die IG DMR Bereiche #1, #6, #2, #9 und #12 ähnlich gut für die MNase zugänglich, während die IG DMR #8 wesentlich weniger verdaut wurden. In der Urothelkarzinomzelllinie SW1710 war die IG DMR#6 vergleichsweise besser zugänglich, während die IG DMR Bereiche #9 und #12 etwas schwerer zugänglich waren und die Bereiche #2 und #8 noch schwerer zugänglich waren. In den beiden Zelllinien HepG2 und VHF waren alle IG DMR Bereiche vergleichbar gut MNase verdaut. Dieses Experiment wies in SW1710 und BC61 auf positionierte Nukleosomen hin, im Gegensatz zu dynamischeren Nukleosomen in HepG2 und VHF.

Globaler Chromatinstatus der regulatorischen Regionen im Gencluster

Um die Zugänglichkeit des Chromatins in den DMRs und im *DLK1* Promotor in Urothelkulturen und Urothelkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden die Proben mit Nuklease (EpiQ Nuklease) verdaut und mittels quantitativer PCR analysiert. Als Maß für die Chromatinzugänglichkeit einer Region wurde der CT-Shift ermittelt, der als Differenz der PCR Zyklen zwischen der verdauten und der unverdauten Probe definiert war. Zusätzlich wurde eine Sequenz analysiert, die wir für einen endodermalen Enhancer in diesem Gencluster halten.

Der *UCSC genome browser* (version hg19) zeigt in der *ENCODE Chromatin Regulation* Ansicht zwischen der IG DMR und der *MEG3* DMR hypersensitive DNase Cluster an (Abbildung IV.2-8A). Hier fielen insbesondere die drei DNase Segmente 81, 4 und 6 auf, die repetitive Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren HNF4 α , RXR α , FOXA1 und FOXA2 (Abbildung IV.2-8B) zeigten. In HepG2 Zellen wurde eine starke Enhancer Aktivität dieser Segmente vorhergesagt.

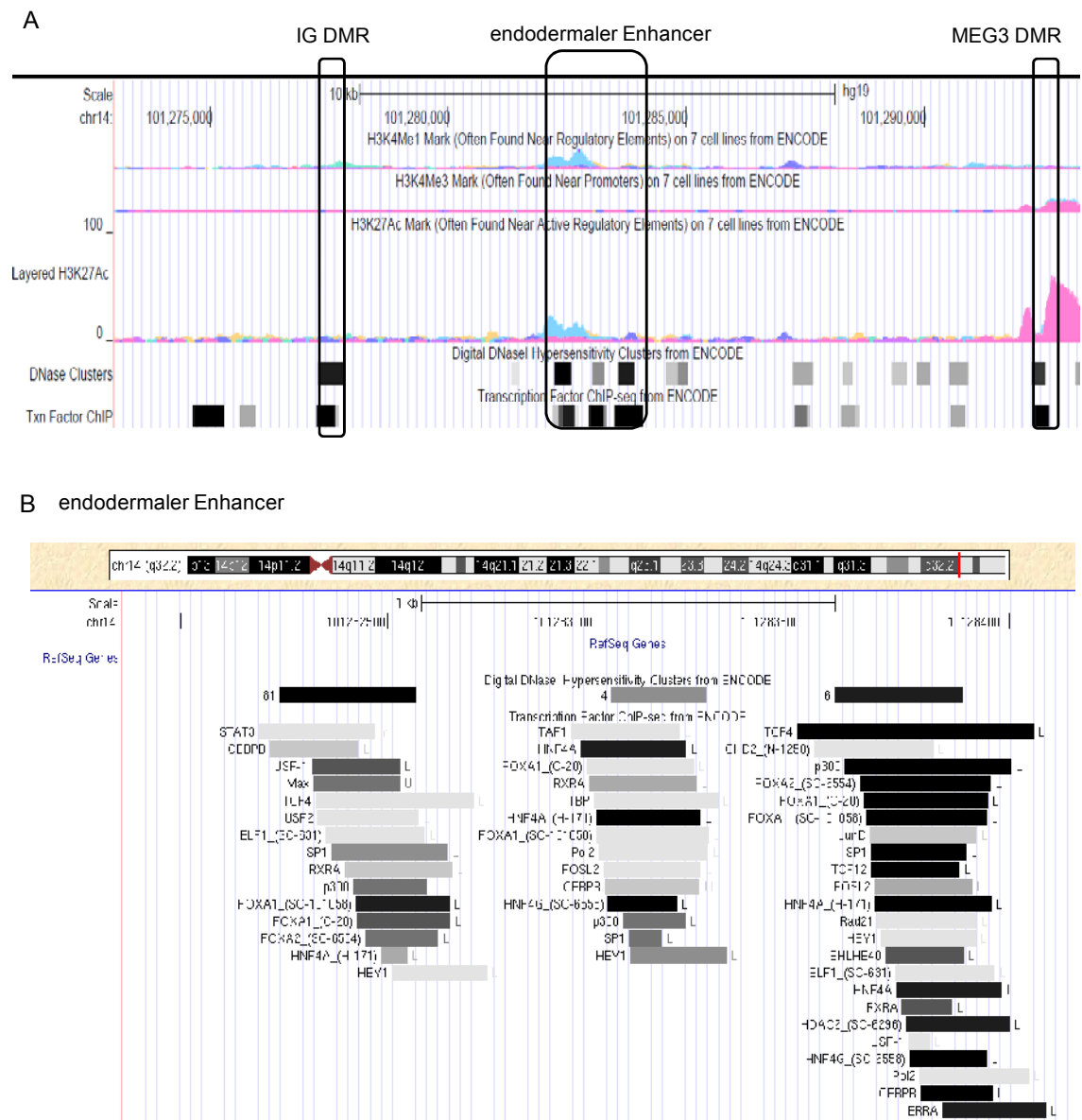


Abbildung IV.2-8 In-silico Analyse dreier hypersensitiver DNase Segmente (A) UCSC genome browser Darstellung der hypersensitiven DNase Segmente innerhalb der IG DMR und MEG3 DMR, sowie eines putativen endodermalen Enhancers mit drei hypersensitiven DNase Segmenten. (B) Detaillierte Darstellung der hypersensitiven DNase Segmente mit den sich wiederholenden Transkriptionsfaktorbindestellen.

Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde der CT-Shift für GAPDH, als Referenz für ein aktives Gen, als 100% gesetzt. Als Referenz für ein inaktives Gen diente *CTCF*, dessen Chromatinzugänglichkeit zwischen 5% in HepG2 und maximal 15% in Caki1 variierte (Tabelle IV.2-1). Die Chromatinzugänglichkeit in den Urothelkarzinomzelllinien war in allen regulatorischen Regionen vergleichbar niedrig mit 4-8%.

Tabelle IV.2-1 Chromatinzugänglichkeit der regulatorischen Regionen in HepG2, Caki1, BC61, SW1710 und einer UP im Vergleich zu GAPDH und CTCFL. In jeder Zelllinie wurden die Werte gegen GAPDH in % normiert.

[%]	GAPDH	CTCFL	DLK1 Promoter	IG DMR	MEG3 DMR	14q32_1	14q32_2	14q32_3
Control cell lines								
HepG2	100	5	40	14	5	47	41	95
Caki1	100	15	10	30	50	23	10	20
Urothelial cancer cell lines								
SW1710	100	7	4	7	4	22	11	7
BC61	100	11	8	3	3	14	7	7
Urothelial cell culture								
UP	100	12	12.5	83	5	25	21	21

Der *DLK1* Promotor war gut zugänglich (40%) in der *DLK1* exprimierenden Leberkarzinomzelllinie HepG2, während die Zugänglichkeit dieser Region in Caki1 und in normalen Urothelzellen mit 10-12% zwischen HepG2 und SW1710 und BC61 lag. In der normalen Urothelkultur blieb die IG DMR, anders als die MEG3 DMR, gut zugänglich (83%), wohingegen diese beiden regulatorischen Regionen in Caki1 und HepG2 vergleichsweise unzugänglich waren. Die Regionen waren in HepG2 Zellen weniger zugänglich (15-7%) als in Caki1 Zellen (30-50%). Die Analyse der Enhancer Segmente zeigte jedoch in HepG2 für alle drei Segmente eine sehr gute Chromatinzugänglichkeit mit bis zu 95%, während in SW1710, BC61, UP und Caki1 alle drei Segmente weniger gut zugänglich waren.

Histonmodifikationen der regulatorischen Regionen

Die Analyse zur Chromatinzugänglichkeit wies auf teilweise unzugängliches Chromatin in den regulatorischen Regionen in den Urothelkarzinomzelllinien, aber auch in Urothelkulturen hin. Daher wurde die Anreicherung reprimierender und aktivierender Histonmodifikationen am *DLK1* Promotor und den beiden DMRs mittels ChIP mit anschließender quantitativer PCR ermittelt. Es wurden Antikörper gegen die reprimierenden Histonmodifikationen H3K27me3 (lies: Trimethylierung von Lysin 27 am Histon 3) und H3K9me3 verwendet, sowie gegen aktivierende Histonmodifikationen H3ac (Acetylierung am Histon 3) und H3K9ac.

Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen H4K16ac, eine Histonmodifikation, die positionierte Nukleosomen markieren kann, verwendet.

Die ChIP Analysen wurden in den beiden Urothelkarzinomzelllinien SW1710 (Abbildung IV.2-9A), BC61 (Abbildung IV.2-9B), und der Leberkarzinomzelllinie HepG2 (Abbildung IV.2-9C) durchgeführt. Als Referenz für ein Gen, das mit aktivierenden Histonmodifikationen assoziiert war, diente *GAPDH*. *CTCF* diente als Referenz für ein inaktives Gen, welches mit reprimierenden Histonmodifikationen assoziiert ist.

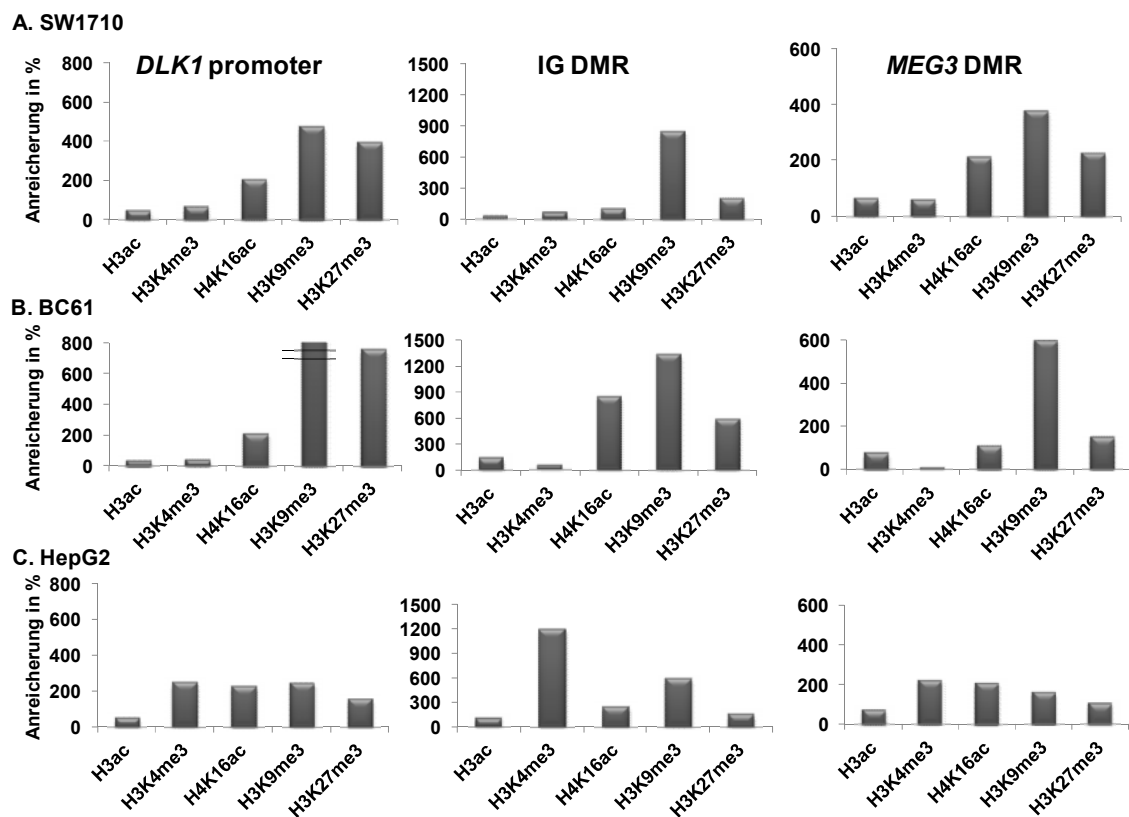


Abbildung IV.2-9 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) mit Antikörpern gegen die aktivierenden Modifikationen H3ac und H3K4me3, sowie H4K16ac und den repressiven Modifikationen H3K9me3 und H3K27me3 an den regulatorischen Regionen DLK1 Promotor (links), IG DMR (mitte) und MEG3 DMR (rechts) in (A) SW1710, (B) BC61 und (C) HepG2.

In den beiden Urothelkarzinomzelllinien waren in allen drei analysierten Regionen die reprimierenden Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 stark angereichert. In SW1710 konnte zudem eine starke Anreicherung von H4K16ac am *DLK1* Promotor und an der *MEG3* DMR gemessen werden. Diese Histonmodifikation war ebenfalls am *DLK1* Promotor und an der IG DMR in BC61 Zellen stark angereichert. Aktivierende Histonmodifikationen H3ac und H3K4me3 waren in allen Regionen vergleichsweise sehr schwach angereichert. Im Gegensatz dazu waren in HepG2 Zellen am *DLK1* Promotor und an der *MEG3* DMR reprimierende und aktivierende Histonmodifikationen ähnlich stark angereichert. Insbesondere an der IG DMR war H3K4me3 sehr stark und H3K9me3 stark angereichert.

Die kaum detektierbare *DLK1* und *MEG3* Expression in Urothelkarzinomzelllinien wird unabhängig von Gendosisverlusten durch Etablierung eines neuen epigenetischen Zustands bewirkt. Die stark variablen Veränderungen in normalen Urothelzellkulturen und normalen immortalisierten Urothelzelllinien (Daten nicht gezeigt) weisen auf epigenetische Veränderungen in diesem Locus hin, die infolge der Kulturbedingungen entstanden sind. Daher eignen sich die normalen Urothelzellkulturen nur sehr bedingt für die Analysen im *DLK1-MEG3* Cluster.

IV.2.2 Der nicht-kanonische Ligand *EGFL7*

Das Gen für den nicht-kanonischen Notch Liganden *EGFL7* liegt benachbart zu *NOTCH1* auf dem Chromosomenabschnitt 9q34. Daher wurde dieses Gen mittels Genexpressionsanalysen untersucht. Verglichen mit acht normalen, proliferativen Urothelkulturen (UPs) war *EGFL7* in einem Großteil (14/20) der Urothelkarzinomzelllinien sehr niedrig exprimiert (Abbildung IV.2-10A). Nur die Urothelkarzinomzelllinien RT112, 5637 und UMUC3 exprimierten *EGFL7* ähnlich stark wie die proliferativen Urothelkulturen. In drei weiteren Zelllinien UMUC6, MGHU4 und 253J war die *EGFL7* Expression höher als in den proliferativen Urothelkulturen.

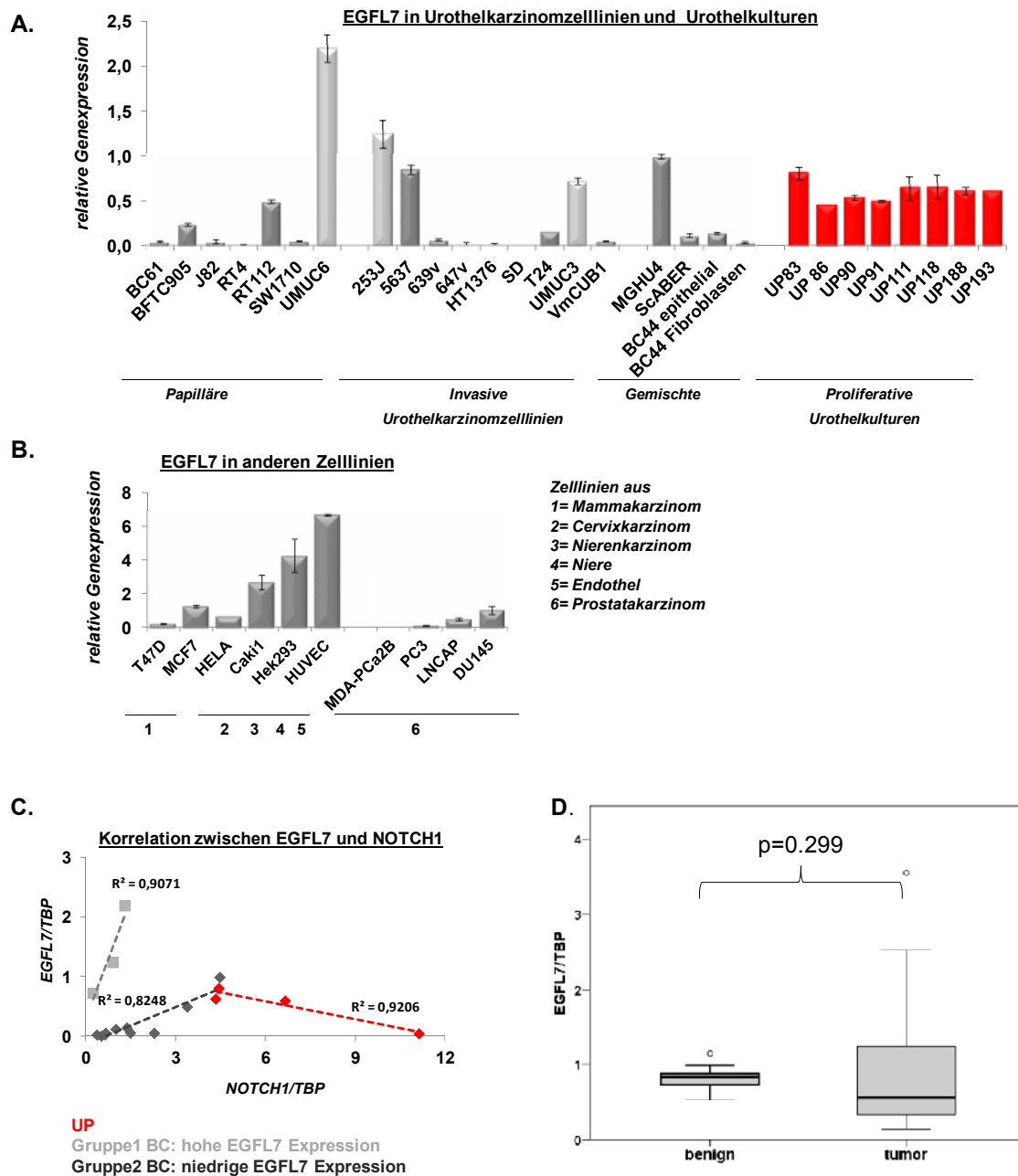


Abbildung IV.2-10 EGFL7 Expressionsanalyse mittels qPCR in (A) Urothelkarzinomzelllinien (hell und dunkel grau) und Urothelkulturen (rot). (B) Genexpressionsanalyse in Zelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten. (C) Korrelationsanalyse zwischen NOTCH1 und EGFL7. Hell grau=Gruppe 1 mit hoher EGFL7 Expression, dunkel grau=Gruppe 2 mit hoher NOTCH1 Expression und rot=normale Urothelkulturen. (D) Expressionsanalyse in 25 Blasentumoren versus 11 normalen Blasengeweben dargestellt als Boxplotdiagramm mit der entsprechenden Statistik (SPSS Version 20).

Die *EGFL7* Expression wurde zusätzlich in Zelllinien aus verschiedenen Tumorentitäten analysiert. *EGFL7* war in den Prostatakarzinomzelllinien MDA-PCa2B, PC3, LNCaP und Du145, in den Mammakarzinomzelllinien MCF7 und T47D, sowie in der Cervixkarzinomzelllinie Hela ähnlich niedrig exprimiert wie in den Urothelkarzinomzelllinien (Abbildung IV.2-10B). Die stärkste Expression konnte in der Endothelzelllinie HUVEC gemessen werden. Verglichen damit betrug die *EGFL7* Expression in HEK293 Zellen und Caki1 nur ein Drittel bis ein Viertel.

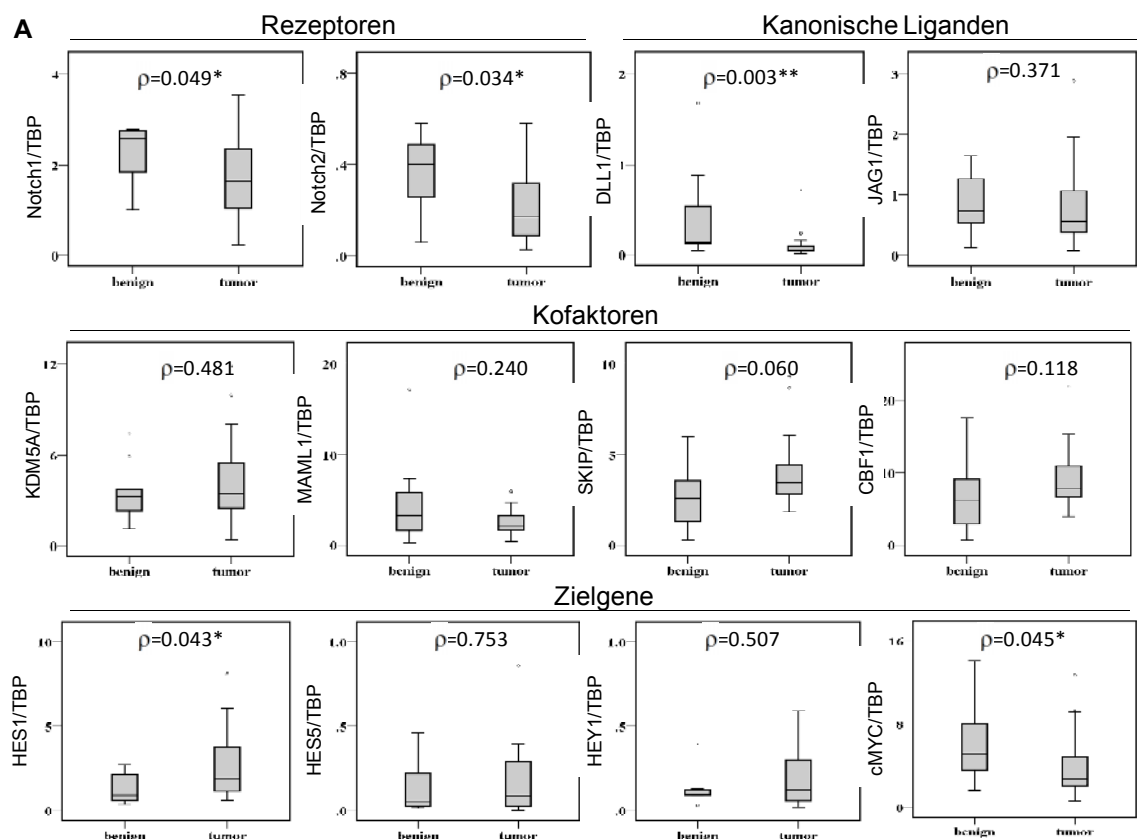
Eine Korrelationsanalyse zwischen *NOTCH1* und *EGFL7* zeigte, dass in den Urothelkarzinomzelllinien eine hohe *EGFL7* Expression mit einer hohen *NOTCH1* Expression korreliert, wohingegen in den Urothelzellkulturen eine hohe *NOTCH1* Expression mit einer sehr niedrigen *EGFL7* Expression korreliert (Abbildung IV.2-10C). In den 11 normalen Blasengeweben war die *EGFL7* Expression in allen Proben ähnlich hoch. In den 24 Blasentumorgeweben variierte die Expression dagegen sehr stark. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney U Test für unabhängige Stichproben zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der *EGFL7* Expression in den Blasengeweben und Blasentumorgeweben (Abbildung IV.2-10D).

IV.3 Liganden und Rezeptoren des Notch Signalwegs im UC

IV.3.1 Expressionsanalysen im Gewebe und in den Zelllinien

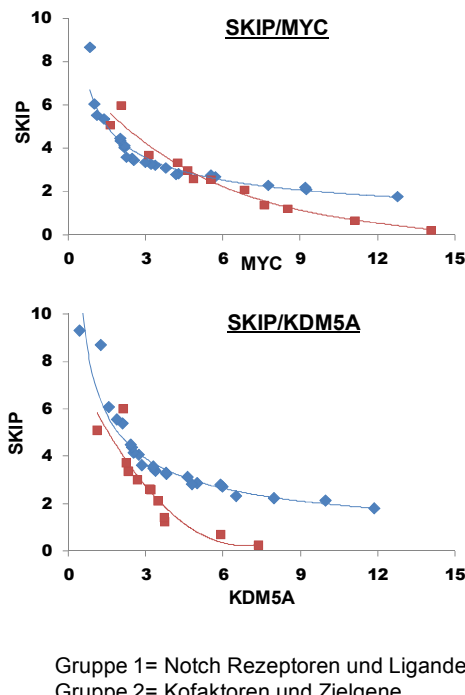
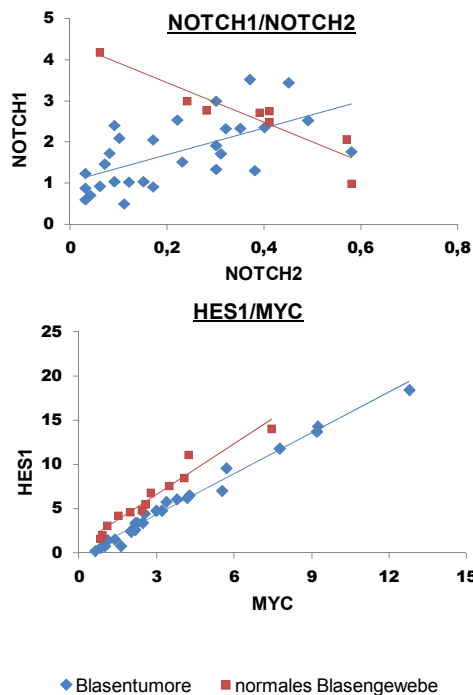
In 11 benignen Blasengewebebeobachten und 25 Blasenmorgewebebeobachten wurden die mRNA Expressionsspiegel der Rezeptoren *NOTCH1*, *NOTCH2*, der Liganden *DELTA1*, *JAGGED1*, sowie der Kofaktoren *CBF1/RBPJk*, *SKIP*, *MAML1*, *KDM5A* und der möglichen Zielgene *HES1*, *HES5*, *HEY1* und *cMYC* gemessen. Die relative Genexpression wurde aus dem Verhältnis dieser Gene zur Referenz *TBP* ermittelt.

In den Blasenmorgewebebeobachten waren *NOTCH1*, *NOTCH2*, *DELTA1* und *cMYC* im Vergleich zu den benignen Blasengewebebeobachten signifikant niedriger exprimiert (Abbildung IV.3-1A, Tabelle IV.3-1). Der mRNA Spiegel der Gene *JAGGED1*, *HES5* und *MAML1* war zwischen den benignen Blasengewebebeobachten und Blasenmorgewebebeobachten kaum verändert. Die Gene *KDM5A*, *SKIP*, *CBF1* und *HEY1* waren in den Blasenmorgewebebeobachten statistisch nicht signifikant stärker exprimiert.



B Beispiel für positive Korrelationen aus Gruppe 1 und Gruppe 2

Beispiel für negative Korrelationen zwischen SKIP und den Genen aus Gruppe 2



*Abbildung IV.3-1 (A) Genexpressionanalysen in normalem Blasengewebe und in Blasentumorgewebe für die Rezeptoren NOTCH1 und NOTCH2, die Liganden DELTA1 (DLL1) und JAGGED1 (JAG1), sowie f für die Transkriptionsfaktoren KDM5A, MAML1, SKIP und CBF1 und die Zielgene HES1, HES5, HEY1 und MYC. Die Daten sind mit SPSS Version 20 ausgewertet und als Boxplotdiagramme dargestellt. Signifikante Veränderungen sind entsprechend mit ** gekennzeichnet. (B) Ausgewählte Korrelationen im Blasengewebe zwischen NOTCH1 & NOTCH2 (Gruppe 1), HES1 & MYC, SKIP & MYC und SKIP & KDM5A (Gruppe 2). Korrelationen mit SKIP waren immer negativ exponentiell. In Rot = normales Blasengewebe und in blau = Blasentumorgewebe.*

Innerhalb der Blasentumorgewebe-Serie war in den pT2 Tumoren die Expression der Transkriptionsregulatoren (*CBF1*, *KDM5A* und *SKIP*) sowie des Zielgens *MYC* gegenüber den pT3 und pT4-Tumoren mit $p=0.0018$ signifikant verändert exprimiert (Tabelle IV.3-1).

Tabelle IV.3-1 Statistik der Expression in Blasengeweben. Der Test auf Ungleichheit der Verteilung wurde mit dem Mann-Whitney U Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Angegeben sind asymptotische Signifikanzen. Das Signifikanzniveau ist 0.05. Für diesen Test wird die exakte Signifikanz angezeigt. ¹ BN= normale Blase, 11 Fälle; BT= Blasen-tumore, 25 Fälle; ² pT2 6 Fälle versus pT3/4 16 Fälle.

<i>Mann-Whitney U Test</i>	<i>BN versus BT¹</i>	<i>pT2 versus pT3-4²</i>
<i>NOTCH1</i>	0.049	0.935
<i>NOTCH2</i>	0.034	0.850
<i>JAGGED1</i>	0.388	0.685
<i>DELTA1</i>	0.027	0.600
<i>CBF1/RBPJk</i>	0.123	0.018
<i>SKIP</i>	0.062	0.018
<i>MAML1</i>	0.251	0.018
<i>KDM5A</i>	0.495	0.018
<i>HES1</i>	0.041	0.495
<i>HES5</i>	0.515	0.738
<i>HEY1</i>	0.773	0.935
<i>MYC</i>	0.045	0.018

Um die Korrelation zwischen den Genen zu analysieren wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho durchgeführt, da eine Normalverteilung der Proben, wie sie bei einer Korrelationsanalyse nach Pearson vorausgesetzt wird, nicht gewährleistet werden kann. Diese Korrelationsanalyse (Tabelle IV.3-2) führte zu einer Gruppierung der analysierten Gene. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit der Kendall-Tau Korrelation erzielt werden. Es bildeten sich zwei distinkte Gruppen, deren Mitglieder untereinander stark korrelierten, jedoch nicht mit den Mitgliedern der anderen Gruppe. Die Gruppe 1 (Tabelle IV.3-2A) bestand aus den Notch Rezeptoren *NOTCH1* und *NOTCH2*, den Liganden *JAGGED1* und *DELTA1*, sowie dem Zielgen *HEY1*. Die stärkste Korrelation wurde zwischen *NOTCH1* und *NOTCH2* (Abbildung IV.3-1B), sowie zwischen den Rezeptoren und *JAGGED1* ermittelt. Einen Sonderfall stellt *HES5* dar, das mit keinem anderen Gen korrelierte. In der zweiten Gruppe korrelierten die Transkriptionsfaktoren *CBF1/RBPJk*, *SKIP*, *KDM5A* und *MAML-1* mit dem nicht-kanonischen Liganden *EGFL7* und den Zielgenen *MYC* und *HES1* (Tabelle IV.3-2B).

Alle Korrelationen zwischen *SKIP* und den Genen dieser Gruppe waren negativ (blau), die anderen untereinander positiv (rot). Besonders stark positive Korrelationen wurden zwischen *CBF1/RBPJK* und *KDM5A*, sowie zwischen *HES1* und *cMYC* gefunden (vergleiche dazu Abbildung IV.3-1B).

Tabelle IV.3-2 Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho. Die Korrelationsanalyse führte zur Unterteilung in zwei distinkte Gruppen. A) Gruppe 1 bestehend aus den Notch Rezeptoren, Liganden und den Zielgenen *HEY1* und *HES5*; B) Gruppe 2 bestehend aus den Transkriptionsfaktoren, *EGFL7* und dem Zielgen *HES1*. Positive Korrelationen sind durch rote markierte Werte gekennzeichnet, negative Korrelationen durch blaue. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS Version 20.

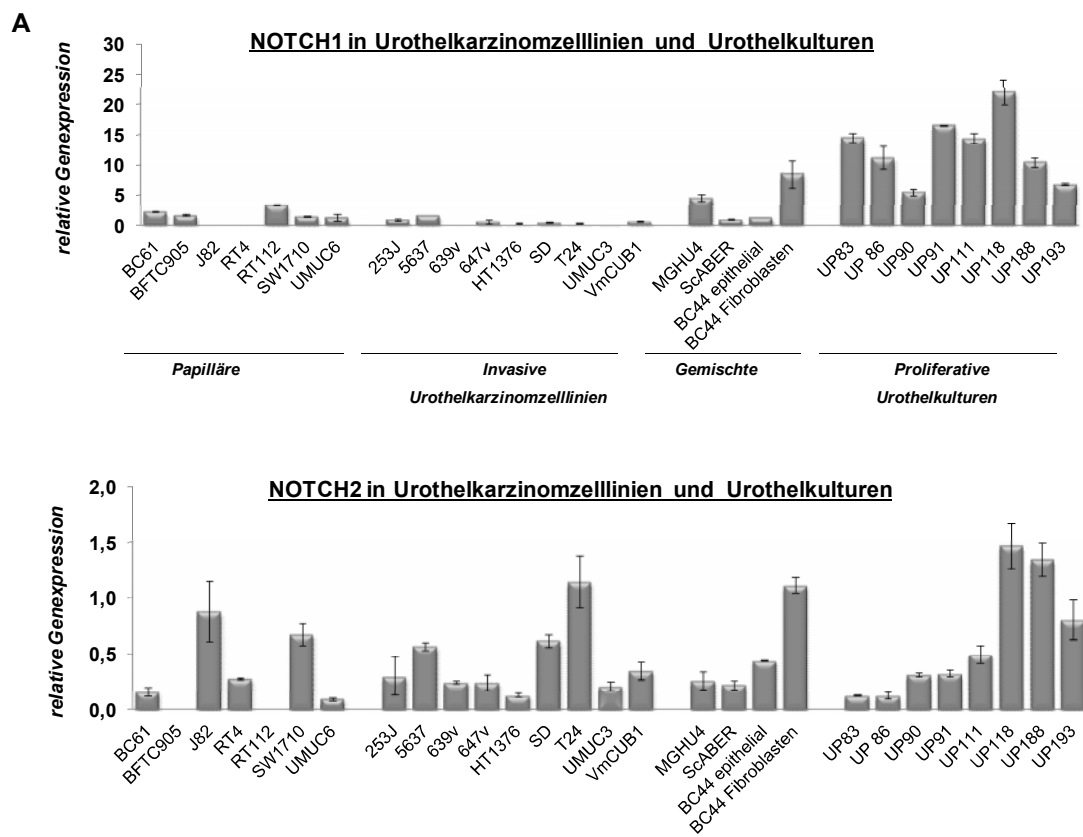
A. Gruppe 1: Rezeptoren und Liganden

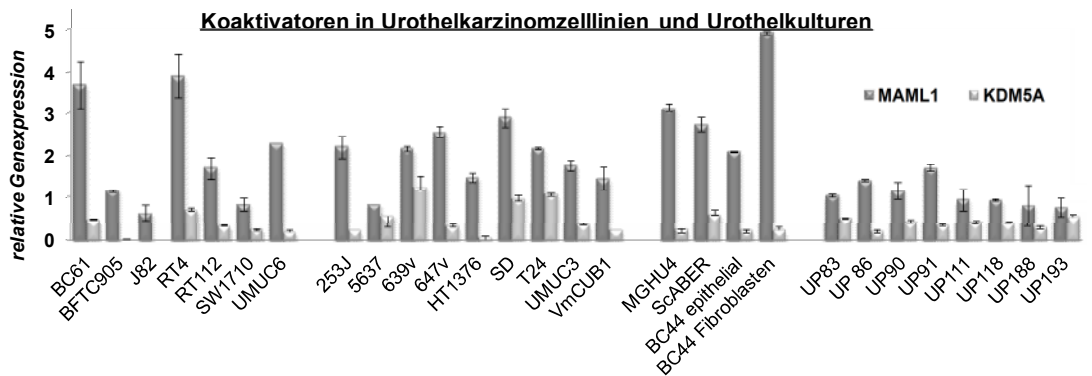
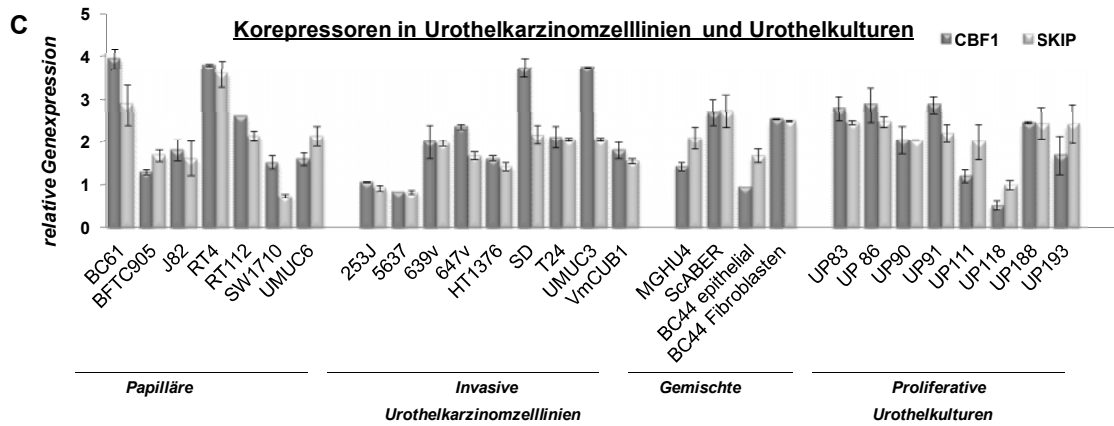
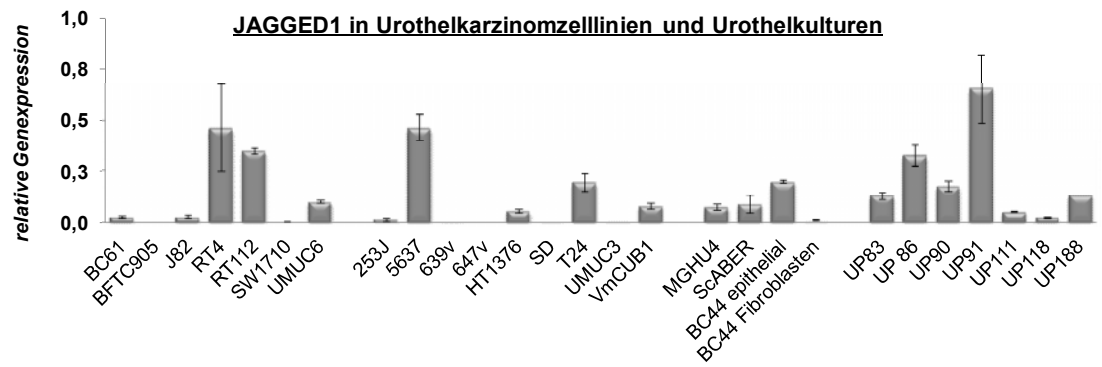
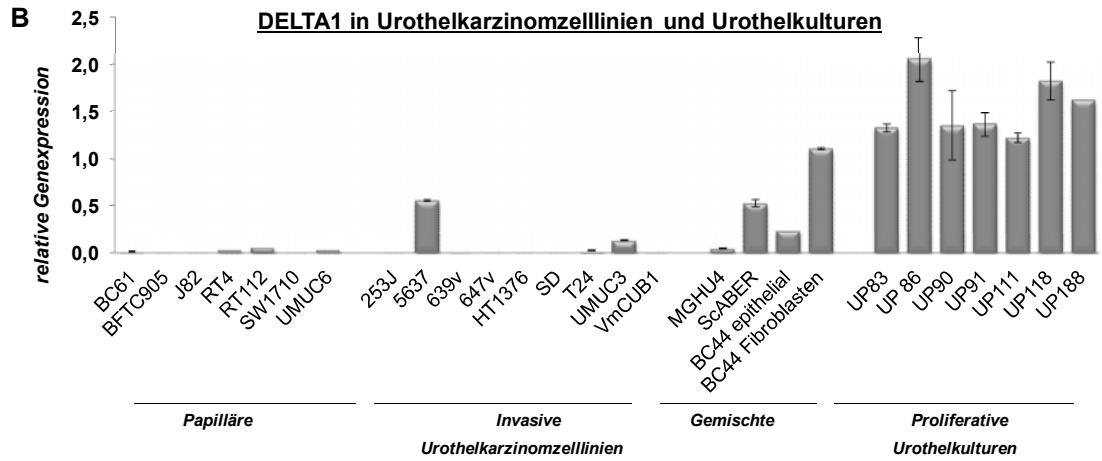
Korrelationen nach Spearman-Rho							
		Notch1/TBP	Notch2/TBP	JAG1/TBP	DLL1/TBP	HEY1/TBP	HES5/TBP
Notch1/TBP	Korrelationskoeffizient	1,000	,667**	,652**	,399	,490**	,123
	Sig. (2-seitig)		,000	,000	,014	,002	,511
	N	38	38	38	37	38	31
Notch2/TBP	Korrelationskoeffizient		1,000	,660**	,453**	,383**	-,010
	Sig. (2-seitig)			,000	,005	,018	,958
	N		38	38	37	38	31
JAG1/TBP	Korrelationskoeffizient			1,000	,511**	,410**	-,173
	Sig. (2-seitig)				,001	,011	,351
	N			38	37	38	31
DLL1/TBP	Korrelationskoeffizient				1,000	,078	-,194
	Sig. (2-seitig)					,645	,295
	N				40	37	31
HEY1/TBP	Korrelationskoeffizient					1,000	,309
	Sig. (2-seitig)						,091
	N					38	31
HES5/TBP	Korrelationskoeffizient						1,000
	Sig. (2-seitig)						
	N						32

B. Gruppe 2: Transkriptionsfaktoren und Zielgene

Korrelationen nach Spearman-Rho								
		SKIP/TBP	CBF1/TBP	MAML1/TBP	EGFL7/TBP	KDM5A/TBP	MYC/TBP	HES1/TBP
SKIP/TBP	Korrelationskoeffizient	1,000	-,814	-,182	-,892	-,858	-,976	-,731
	Sig. (2-seitig)		,000	,288	,000	,000	,000	,000
	N	36	35	36	35	36	36	36
CBF1/TBP	Korrelationskoeffizient		1,000	,103	,811**	,954**	,785**	,936**
	Sig. (2-seitig)			,555	,000	,000	,000	,000
	N		35	35	34	35	35	35
MAML1/TBP	Korrelationskoeffizient			1,000	,564*	,267	,342	,250
	Sig. (2-seitig)				,000	,116	,041	,141
	N			36	35	36	36	36
EGFL7/TBP	Korrelationskoeffizient				1,000	,922**	,936**	,836**
	Sig. (2-seitig)					,000	,000	,000
	N				35	35	35	35
KDM5A/TBP	Korrelationskoeffizient					1,000	,867**	,968**
	Sig. (2-seitig)						,000	,000
	N					36	36	36
MYC/TBP	Korrelationskoeffizient						1,000	,743**
	Sig. (2-seitig)							,000
	N						36	36
HES1/TBP	Korrelationskoeffizient							1,000
	Sig. (2-seitig)							
	N							36

In den Urothelkarzinomzelllinien war die Expression von *NOTCH1* und *DELTA1* gegenüber den proliferativen Urothelzellkulturen (UP) stark vermindert (Abbildung IV.3-2A/B). Im Gegensatz dazu war die Genexpression von *NOTCH2* und *JAGGED1* sehr variabel, in den Urothelkarzinomzelllinien aber ähnlich hoch wie in den UPs (Abbildung IV.3-2A/B). Die Genexpressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren *CBF1/RBPJK* und *SKIP* ergab, dass beide Gene meist ähnlich hoch innerhalb einer Zelllinie exprimiert wurden (Abbildung IV.3-2C). Zwischen den Urothelkarzinomzelllinien und den Urothelzellkulturen gab es keine systematischen Expressionsunterschiede. Auch die Expression von *MAML1* und *KDM5A* korrelierte positiv miteinander in den Zelllinien und Zellkulturen. Allerdings war *MAML1* um ein Vielfaches höher exprimiert als *KDM5A*. Vor allem *MAML1* war in den Urothelkarzinomzelllinien stärker exprimiert als in den UPs (Abbildung IV.3-1C). Ähnlich wie im Tumorgewebe war *HES1* in den Urothelkarzinomzelllinien stärker exprimiert als in den normalen Urothelkulturen und *cMYC* tendenziell vermindert exprimiert (Abbildung IV.3-1D).





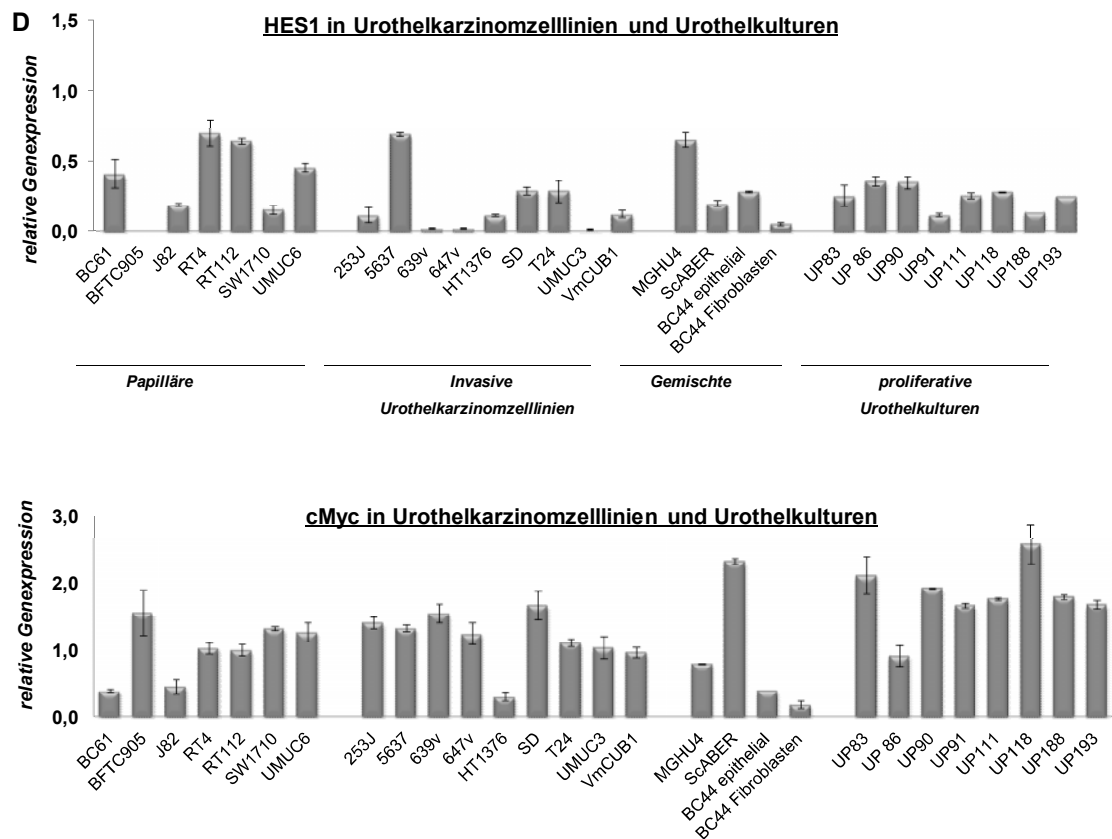


Abbildung IV.3-2 Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mittels qPCR in den papillären (BC61, BFTC905, J82, RT4, RT112, SW1710, UMUC6) und invasiven (253J, 5637, 639v, 647v, HT1376, SD, T24, UMUC3, VmCUB1) Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelkulturen (UP), dargestellt als Balkendiagramme. A = NOTCH1 und NOTCH2, B = DELTA1 und JAGGED1; C = Kofaktoren CBF1 und SKIP, sowie MAML1 und KDM5A; D = HES1 und MYC. Insbesondere NOTCH1 und DELTA1 sind stark vermindert exprimiert, NOTCH2, JAGGED1 und cMYC sind nur in einigen Zelllinien stark vermindert, wohingegen die nukleären Transkriptionsfaktoren MAML, KDM5A, CBF1 und SKIP verstärkt exprimiert sind.

Die Genexpressionsanalysen zeigten sowohl im Blasentumorgewebe, als auch in den Zelllinien eine starke Verminderung wesentlicher Komponenten des Notch Signalwegs. Die Korrelationsanalysen deuteten jedoch auf eine Korrelation zwischen den Genen NOTCH1, NOTCH2 und HEY1 in den Geweben hin, die nicht in Urothelkarzinomzelllinien zu finden war.

Um die Genexpression der Notch Rezeptoren, Liganden und Zielgene vergleichend einschätzen zu können, wurde das Notch-Profil in zwei Mammakarzinomzelllinien (MCF7 und T47D), sowie in der Nierenkarzinomzelllinie Caki1 ermittelt (Abbildung IV.3-3). Laut Literatur ist der Notch Signalweg in allen drei Zelllinien aktiv.

In der Mammakarzinomzelllinie MCF7 war *NOTCH1* etwas stärker exprimiert als *NOTCH2*. Die Expression der Liganden war vergleichsweise sehr gering. *HEY1* war ähnlich hoch exprimiert wie *NOTCH1* und die *HES1* Expression war äquivalent zur *NOTCH2* Expression. In T47D Zellen waren *NOTCH2* und *HES1* stärker exprimiert als *NOTCH1* und *HEY1*. Die Liganden waren ähnlich niedrig exprimiert wie in MCF7 mit einer leicht höheren Expression von *DELTA1* gegenüber *JAGGED1*. In Caki1 Zellen wurden *NOTCH1* und *HES1* stärker exprimiert als *NOTCH2* und *HEY1*. *JAGGED1* war etwas höher exprimiert als *DELTA1*.

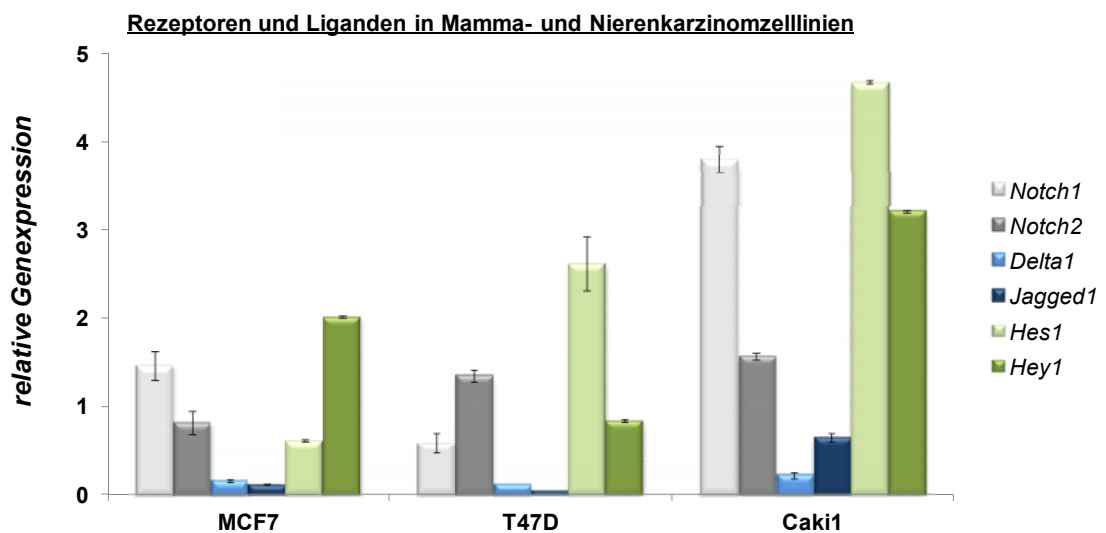


Abbildung IV.3-3 Genexpressionsanalyse der wesentlichen Notch-Komponenten in den Mammakarzinom- und Nierenkarzinomzelllinien MCF7, T47D und Caki1. In grau dargestellt sind die Rezeptoren *NOTCH1* und *NOTCH2*, in blau sind die Liganden *DELTA1* und *JAGGED1* und in grün dargestellt sind die Zielgene *HES1* und *HEY1*. Im Vergleich zu den Urothelkarzinomzelllinien sind die Notch-Zielgene *HES1* und *HEY1* stärker exprimiert, wohingegen die Rezeptoren eine ähnliche Expression aufweisen.

Die Expression von *NOTCH1* in MCF7, T47D und Caki1 war im Vergleich zu den Urothelkarzinomzelllinien ähnlich hoch, wohingegen *NOTCH2* höher exprimiert war als in den Urothelkarzinomzelllinien und Urothelkulturen. Die niedrige Expression der Liganden war mit der in den Urothelkarzinomzelllinien vergleichbar. Die *HES1* und *HEY1* Expression in den Kontrollzelllinien war um ein Vielfaches höher.

IV.3.2 Proteinanalyse im Gewebe und in den Zelllinien

Immunhistochemie

Um die Verteilung der Proteine im Gewebe zu untersuchen, wurden die Bedingungen für eine erfolgreiche IHC Färbung ermittelt. Als geeignete Positivkontrolle für NOTCH1 wurde das Mammakarzinom mit positiver Lokalisation von NOTCH1 im Nukleus, sowie Blasenmuskulatur für DELTA1 und Gallenblase für JAGGED1 identifiziert (Abbildung IV.3-4).



Abbildung IV.3-4 Immunhistochemische Färbungen von NOTCH1, DELTA1 und JAGGED1 in verschiedenen Geweben. Mammakarzinom diente als Positivkontrolle für den Antikörper NOTCH1. Der Antikörper detektiert NOTCH1 Protein im Zytoplasma und im Nukleus der Zellen als Hinweis auf einen überaktiven Signalweg. In der Blasenmuskulatur ist eine homogene braune zytoplasmatische Färbung mit dem verwendeten C-terminalen DELTA1 Antikörper (H-265, Santa Cruz Biotech) detektierbar und Gallenblase für JAGGED1.

In der Normalblase waren NOTCH1 Proteine am stärksten in den Deckzellen im Zytoplasma lokalisiert. In den darunter liegenden Schichten war NOTCH1 eher an der Zellmembran lokalisiert und besonders schwach in den Basalzellen exprimiert (Abbildung IV.3-5A). DELTA1 war mit NOTCH1 kolokalisiert und daher in den Deckzellen zytoplasmatisch und in den basal liegenden Schichten eher an der Zellmembran lokalisiert (B). JAGGED1 war zytoplasmatisch lokalisiert und in den Zelllagen unterhalb der Deckzellen stärker detektierbar als in den Deckzellen selbst (C).

Für die IHC Analysen wurden 29 Blasentumore hinsichtlich ihrer DELTA1 und NOTCH1 Proteinexpression und Lokalisation gefärbt. Die 29 Blasentumoren unterteilten sich in sieben papilläre *low grade*, fünf papilläre *high grade* Urotheltumore, je fünf pT1 *high grade* und pT3 *high grade* Karzinome, je drei pT2 und pT4 *high grade* Karzinome und ein Carcinoma in situ (Tabelle II-1-2).

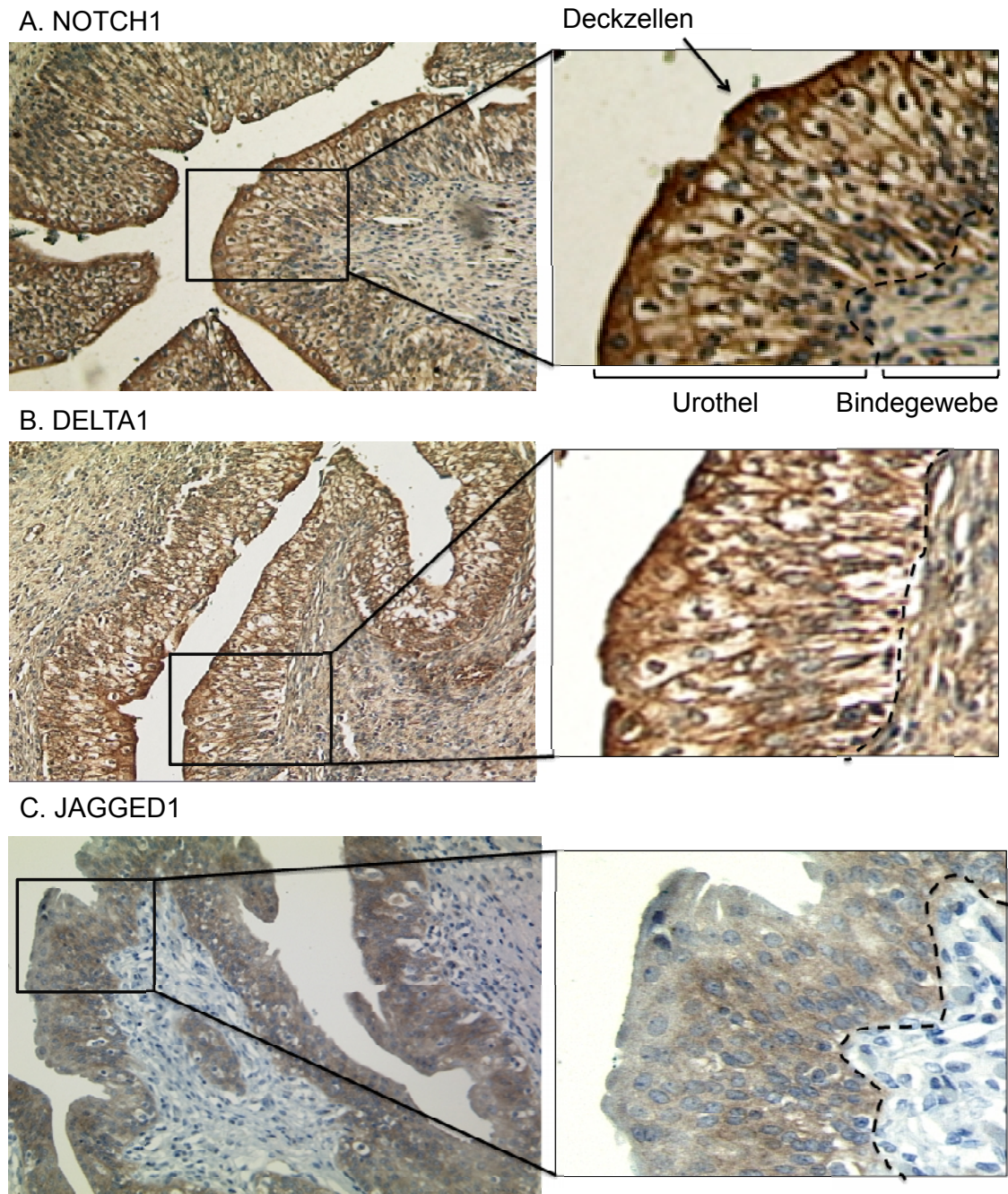
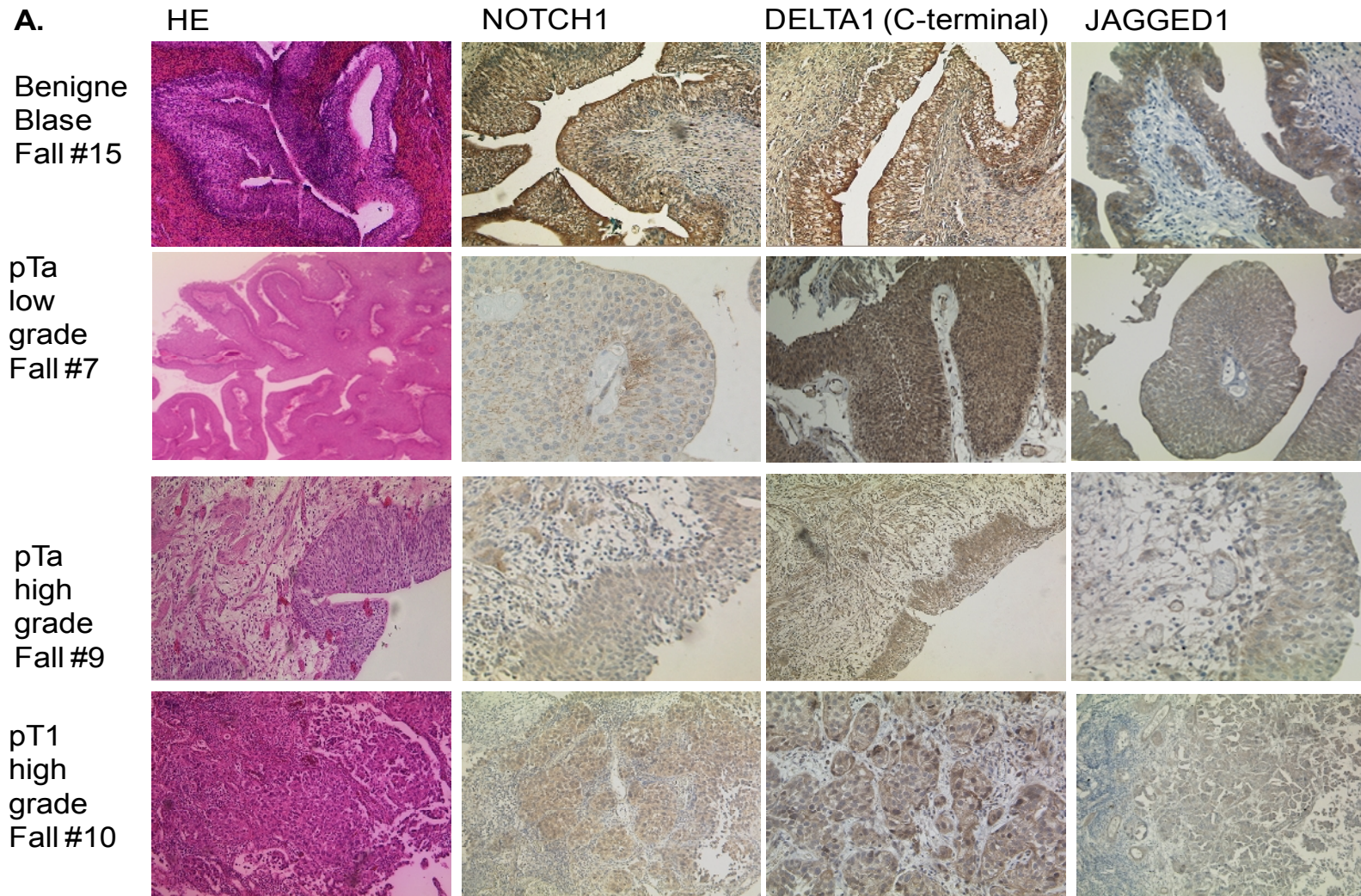
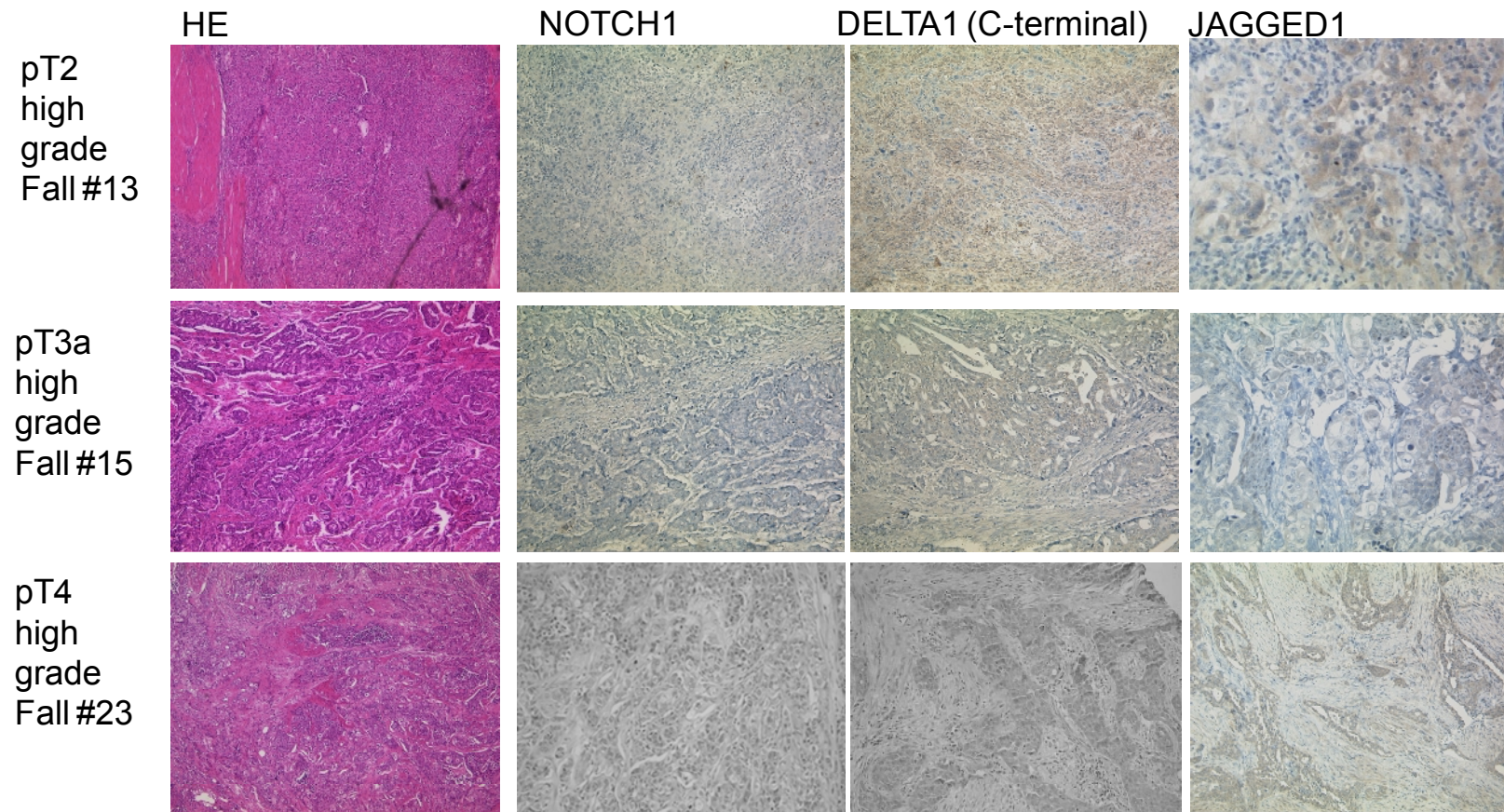


Abbildung IV.3-5 IHC-Färbung von NOTCH1 und seinen Liganden in einer Normalblase Fall #15. Detailausschnitt nach NOTCH1, DELTA1 und JAGGED1 Färbung. A) NOTCH1 ist sehr stark zytoplasmatisch in den Deckzellen des Urothels exprimiert und nimmt graduell ab. B) DELTA1 ist mit NOTCH1 kolokalisiert. C) JAGGED1 ist ausschließlich im Urothel exprimiert und stärker in den unteren undifferenzierten Urothelschichten als in den differenzierten Zellschichten. Die gestrichelte Linie markiert die Basalzellmembran, die das Urothel vom Bindegewebe abgrenzt.





B. DELTA1 intratumorale Heterogenität

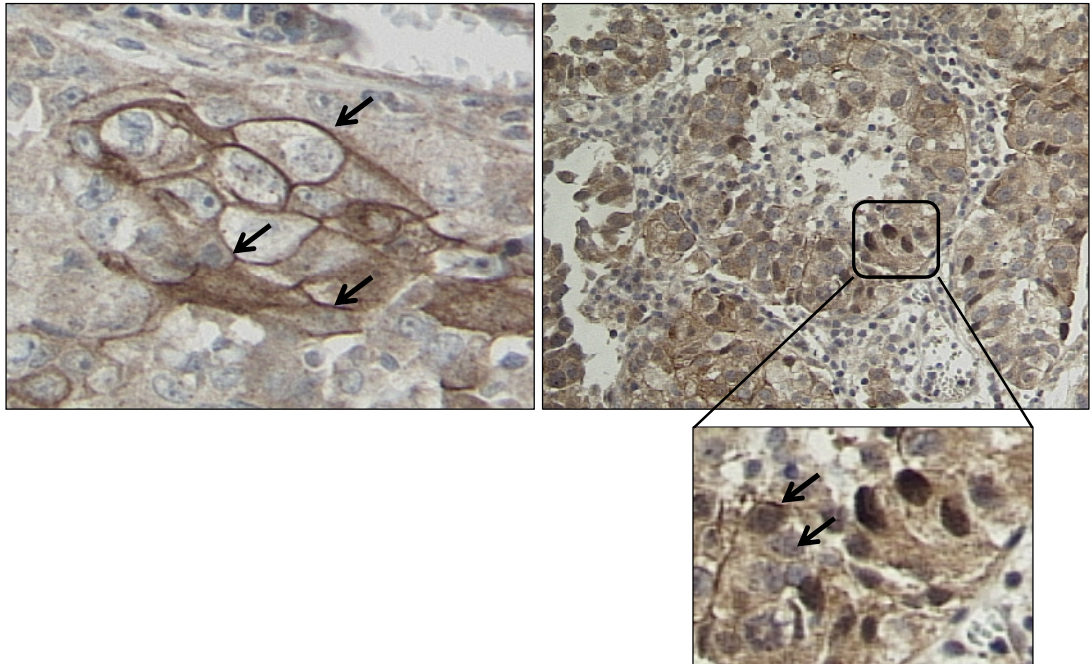


Abbildung IV.3-6 (A) Färbungen in ausgewählten Blasentumoren unterschiedlicher Stadien mit NOTCH1, DELTA und JAGGED1. Zur Unterscheidung der Gewebestrukturen sind auch die HE-Schnitte dargestellt. Lila gefärbte Areale entsprechen dem Urothel und den Urothelkarzinomen, rosa gefärbte Areale sind entsprechend Muskel und Bindegewebe. Braun gefärbte Areale haben mit den Antikörpern reagiert. Mit zunehmender Invasivität sind NOTCH1, DELTA 1 und JAGGED1 vermindert exprimiert und verändert lokalisiert. (B) Beispiele intratumoraler DELTA1 Heterogenität. Areale mit membranständigen oder nukleär lokalisiertem DELTA1 sind durch Pfeile gekennzeichnet.

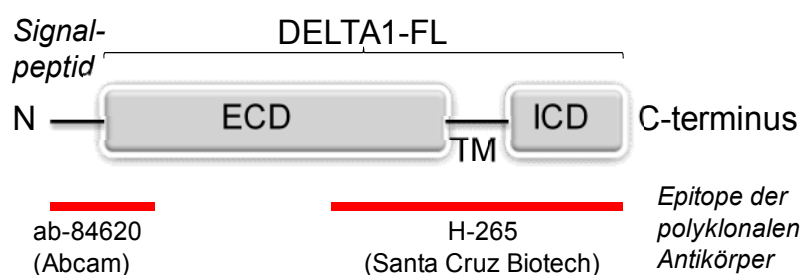
Die Auswertung der IHC ergab eine abnehmende Proteinexpression beider Proteine NOTCH1 und DELTA1 mit zunehmendem Tumorstadium (Abbildung IV.3-6A). NOTCH1 war in den Blasentumoren weniger stark exprimiert als DELTA und in pT3 und pT4 Fällen mit Lymphknotenbefall nicht mehr detektierbar, teilweise in pT1 und pT2 *high grade* Tumoren detektierbar und moderat in pT3 *high grade* ohne Lymphknotenbefall und in den papillären Blasentumoren. Dabei änderte sich die Lokalisation der NOTCH1 Proteine von eher membranständig in papillären *low grade* Tumoren zu eher zytoplasmatisch in *high grade* Tumoren (papillär, pT1, pT2). DELTA1 war in papillären *low grade* Tumore sehr stark zytoplasmatisch lokalisiert und schwächer in den *high grade* Tumoren. DELTA1 Proteine waren auch in den pT4 Fällen noch detektierbar.

Eine Besonderheit war die heterogene Verteilung der DELTA1 Proteine innerhalb der Tumormasse die in 33% der *high grade* Tumoren aller Stadien detektierbar war (Abbildung IV.3-6B). Von JAGGED1 waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit nur die in der Abbildung IV.3-6A dargestellten Tumoren gefärbt. JAGGED1 war in allen Tumoren ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert und nahm mit zunehmender Invasivität deutlich ab.

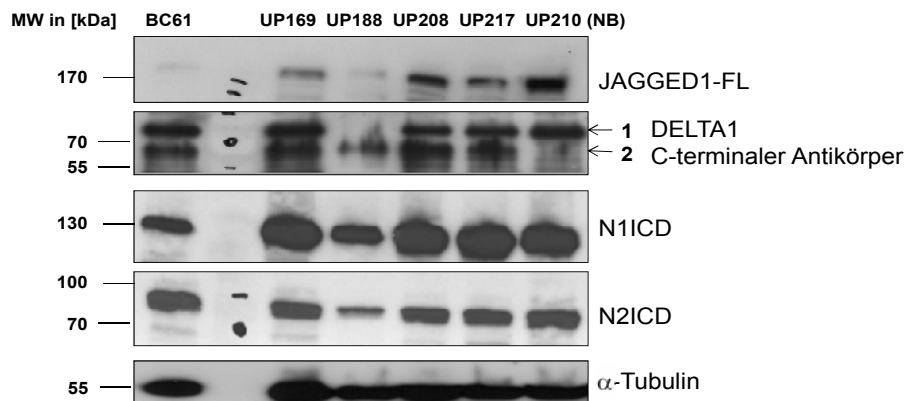
Proteinanalysen in Zelllinien und Urothelkulturen

Von den fünf proliferativen Urothelzellkulturen wurde eine Kultur (UP188) über zehn Passagen kultiviert und eine weitere Urothelkultur (UP210) entstammte dem Nierenkelch. Die Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen die Notch Rezeptoren und Liganden zeigte, dass alle UPs eine vergleichbare Proteinexpression der untersuchten Notch Komponenten hatten, mit Ausnahme der ungewöhnlich langlebigen Kultur UP188, die eine deutliche Verminderung von NOTCH1, NOTCH2, DELTA1 und JAGGED1 Protein aufwies (Abbildung IV.3-7). Die intrazelluläre NOTCH1 Domäne (aktives Fragment) war in allen UPs wesentlich stärker detektierbar als die intrazelluläre NOTCH2 Domäne. Mit Ausnahme von UP188 und UP210 konnten in allen UPs gleiche Mengen DELTA1 mit dem N-terminalen Antikörper (erkennt das Preprotein und Teile der extrazellulären Domäne) wie mit dem C-terminalen Antikörper (erkennt Epitope in den EGF Domänen und in der zytoplasmatischen Domäne, siehe Abbildung IV.3-7A) detektiert werden. Die Menge an JAGGED1 Protein variierte erkennbar zwischen den einzelnen UP-Kulturen.

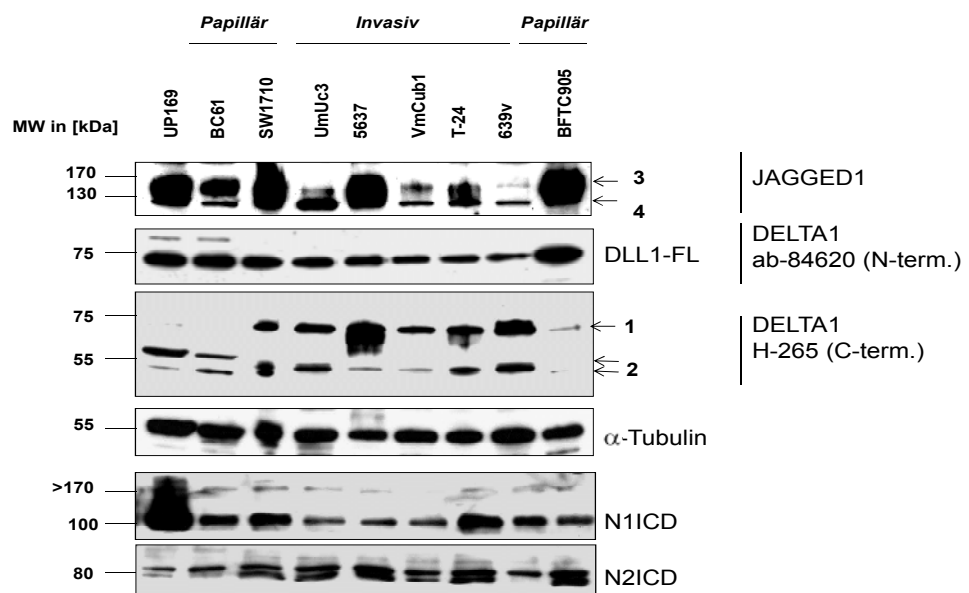
A. Antikörperepitope im DELTA1 Protein



B. Western Blot in Urothelzellkulturen



Western Blot in Zelllinien



FL= Full length; ECD= extracellular domain; ICD= intracellular domain; JAG1= JAGGED1; DLL1= DELTA1

Abbildung IV.3-7 Western Blot Analysen. (A) Graphische Darstellung des DELTA1 Proteins mit den Erkennungsstellen der verwendeten polyklonalen DELTA1 Antikörper. Der Abcam-Antikörper erkennt die Aminosäuren 2-51 des DELTA1 Proteins mitsamt des Signalpeptids. Der Santa Cruz Biotech-Antikörper H-265 erkennt die Aminosäuren 256-725, die zur ECD, TM und ICD von DELTA1 gehören. (B) Western Blot in Urothelkulturen und Urothelkarzinomzelllinien mit Antikörpern gegen NOTCH1 (C-terminal, Epitomics), NOTCH2 (aktiviertes Fragment, Abcam), DELTA1 (N-terminaler Abcam und C-terminaler Santa Cruz Antikörper), JAGGED1 (C-terminal, Santa Cruz), α -Tubulin. Insbesondere mit dem DELTA1 Antikörper H-265 sind zwei Signale detektierbar, bei #1 könnte es sich um das Vollängen DLL1 Protein handeln, bei #2 um ein prozessiertes Fragment. Auch mit dem JAGGED1 Antikörper sind zwei Banden auf 130 und 170 kD detektierbar, bei denen es sich ebenfalls um das Vollängen JAG1 (#3) und ein möglicherweise prozessiertes Fragment (#4) handeln könnte.

Im Vergleich zu den normalen Urothelkulturen war die Menge an aktiviertem NOTCH1 (N1ICD) in den papillären und invasiven Urothelkarzinomzelllinien stark vermindert, wohingegen die Menge an N2ICD Protein in den Urothelkarzinomzelllinien tendenziell höher war als in den UPs. Die beiden Liganden DELTA1 und JAGGED1 zeigten deutliche Unterschiede zwischen gut (z.B. BC61, 5637) und schlecht differenzierten Urothelkarzinomzelllinien (z.B. T24, 639v).

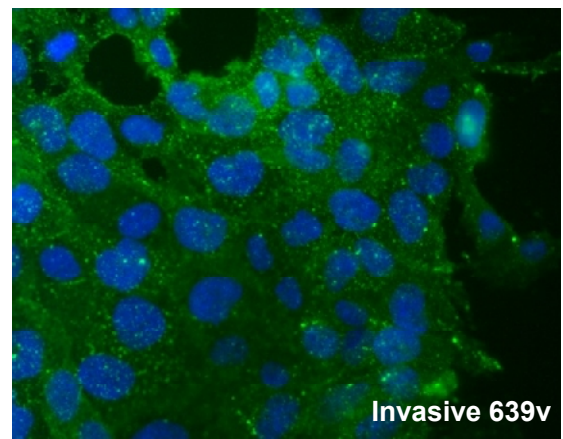
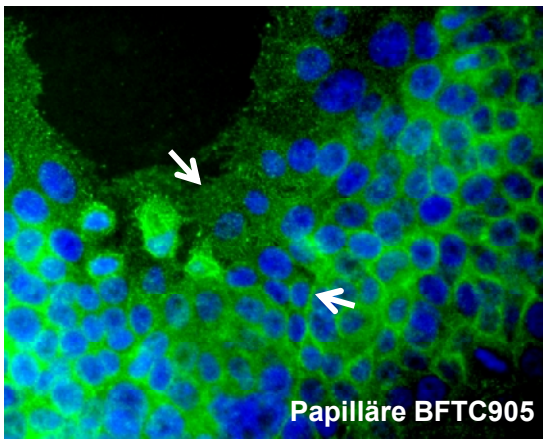
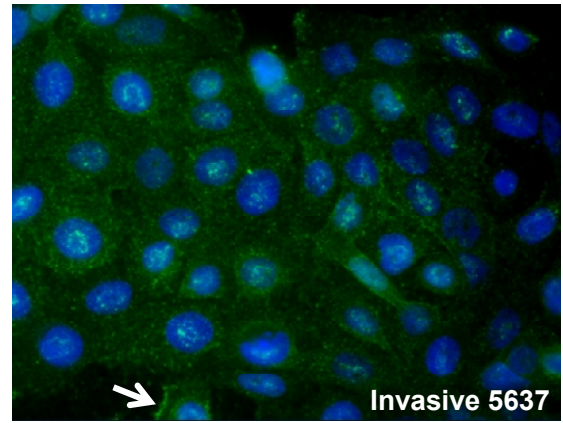
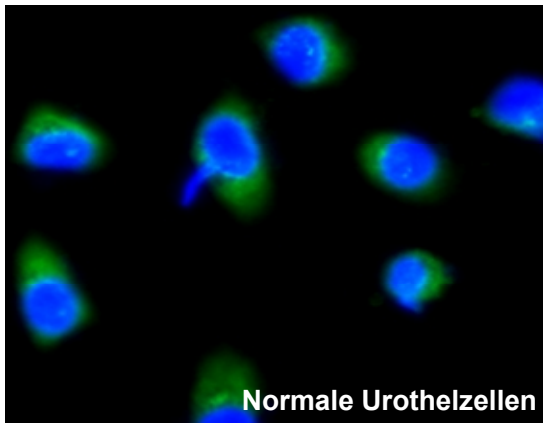
Mit dem N-terminalen DELTA1 Antikörper konnte eine Abnahme der Proteinmenge von UPs über papillären (BC61, SW1710, BFTC905) hin zu invasiven Urothelkarzinomzelllinien (5637, UMUC3, 639v, T24) beobachtet werden. Mit dem C-terminalen DELTA1 Antikörper wurden drei Banden detektiert. Die Bande bei 70 kD wurde als unprozessiertes DELTA1 (DLL1-FL) identifiziert und die beiden Banden bei 55 kD als extrazelluläre Domäne des prozessierten DELTA1 Proteins (DLL1-ECD). Die 70 kD Bande war nur in den invasiven Urothelkarzinomzelllinien vorhanden.

Mit dem JAGGED1 Antikörper wurden zwei Banden zwischen 130-170 kD detektiert, die als unprozessiertes JAGGED1 (170 kD, JAG1-FL) und als prozessiertes JAGGED1 (130 kD, JAG1-ECD) identifiziert wurden.

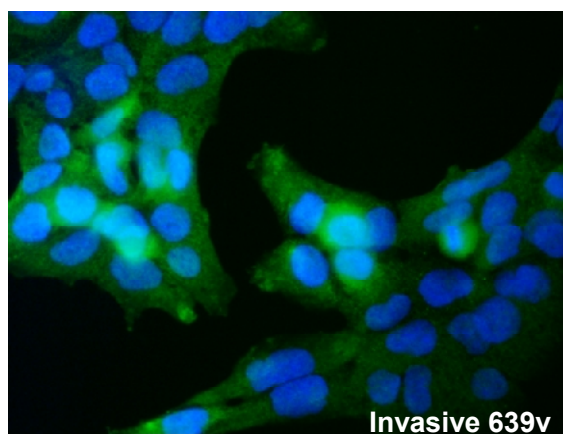
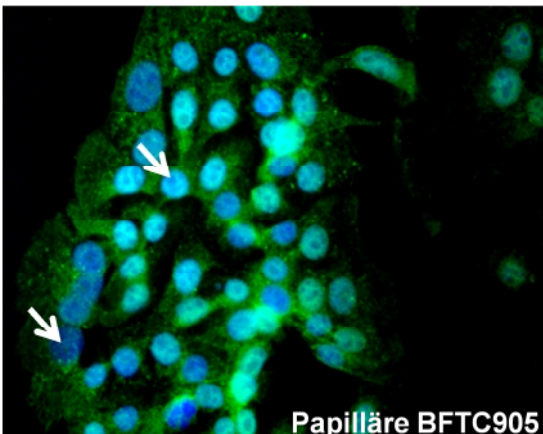
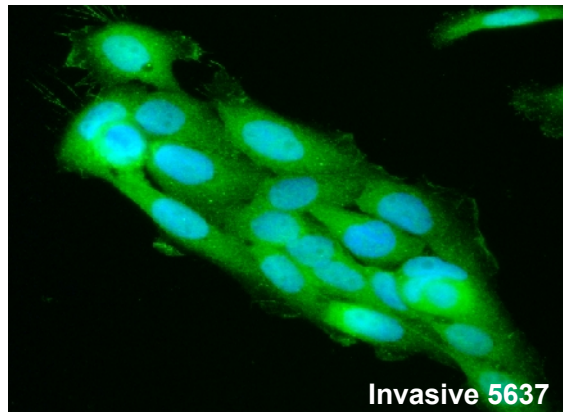
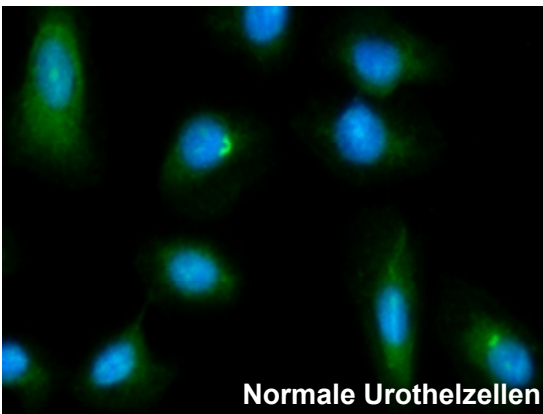
In den normalen Urothelkulturen und den papillären Urothelkarzinomzelllinien war die obere Bande stärker als in den invasiven Urothelkarzinomzelllinien.

Immunocytochemische Färbungen (Abbildung IV.3-3) ermöglichten gegenüber dem Western Blot die Verteilung der Notch Komponenten in der Zelle zu untersuchen. In normalen Urothelzellkulturen (UP220 Passage 1) war das Notch Profil sehr unterschiedlich. In der repräsentativen UP220 waren NOTCH1 (A), NOTCH2 (B) und JAGGED1 (C) im Zytoplasma lokalisiert, während der C-terminale DELTA1 Antikörper Protein im Nukleus und Zytoplasma detektierte (D) und der N-terminale DELTA1 Antikörper Protein im Zytoplasma und an der Zellmembran (E).

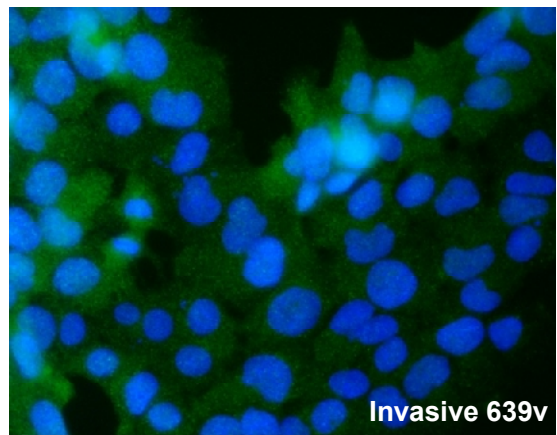
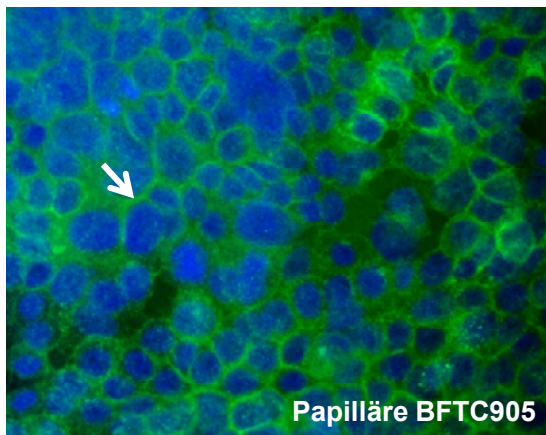
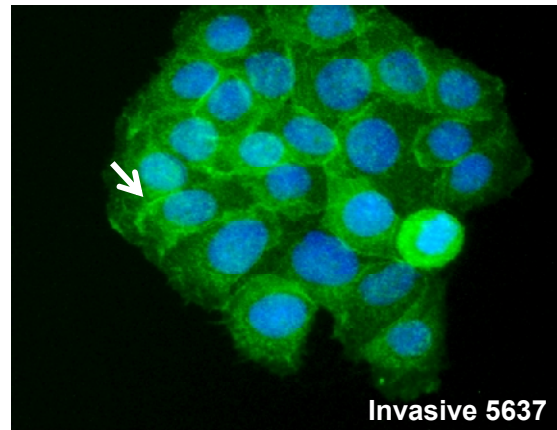
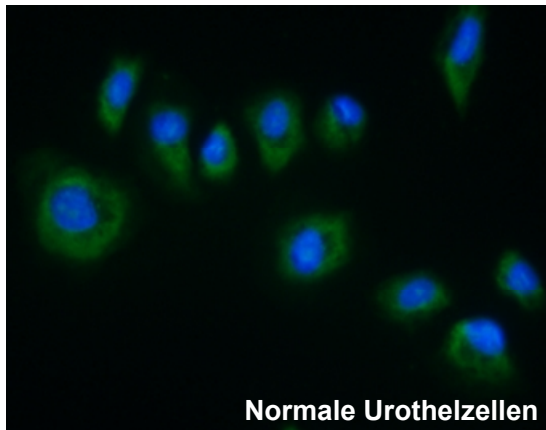
A. NOTCH1



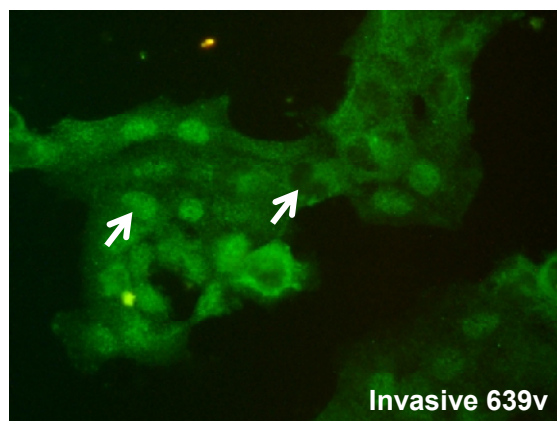
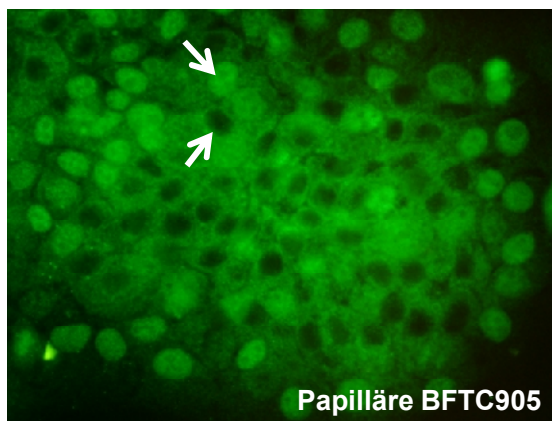
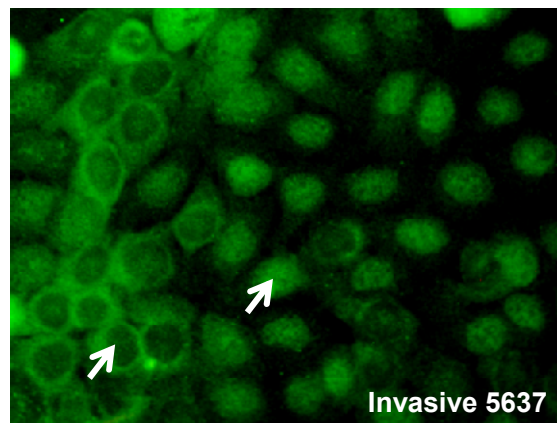
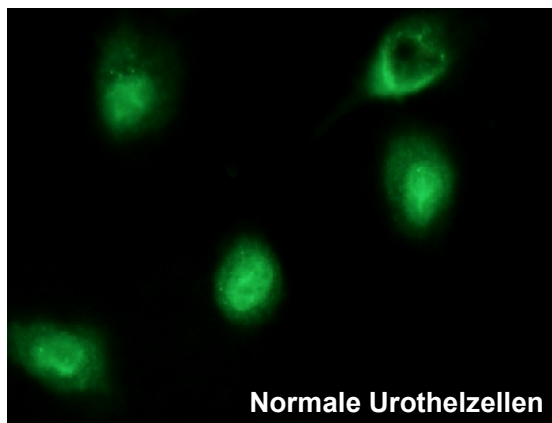
B. NOTCH2



C. JAGGED1



D. DELTA1 (C-term. Antikörper)



E. DELTA1 (N-term. Antikörper)

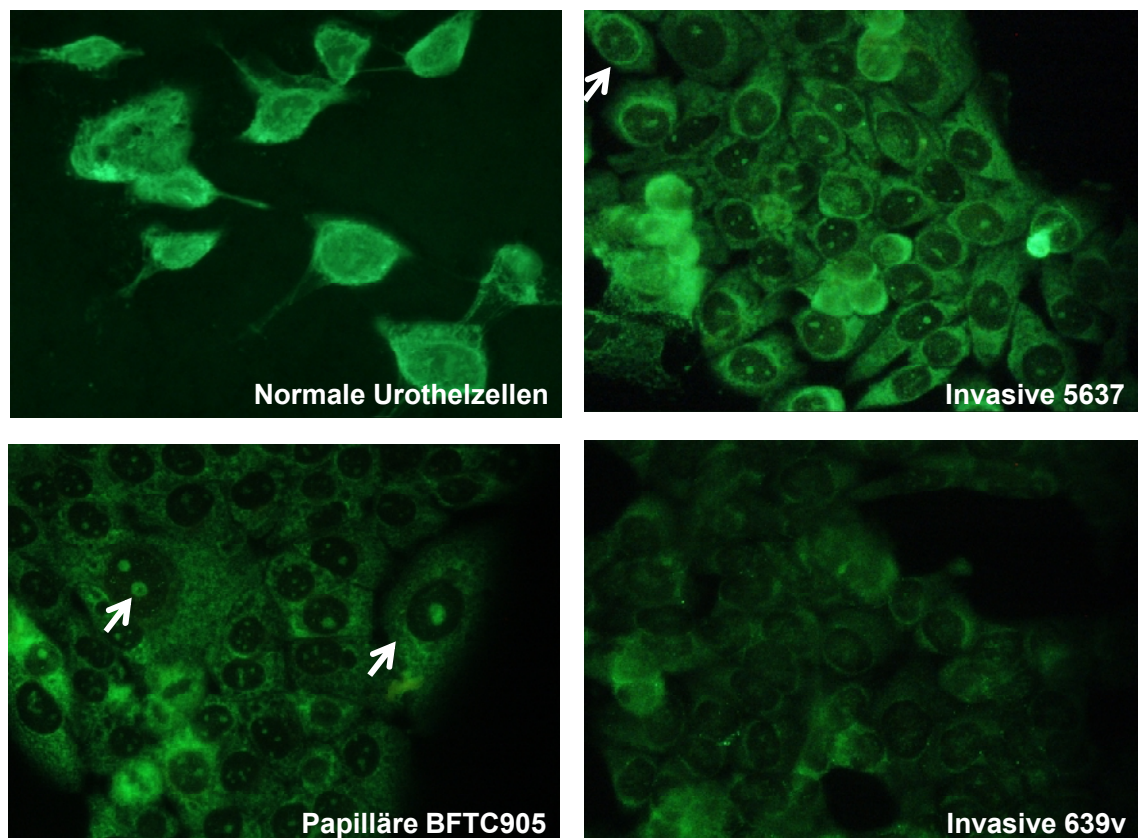


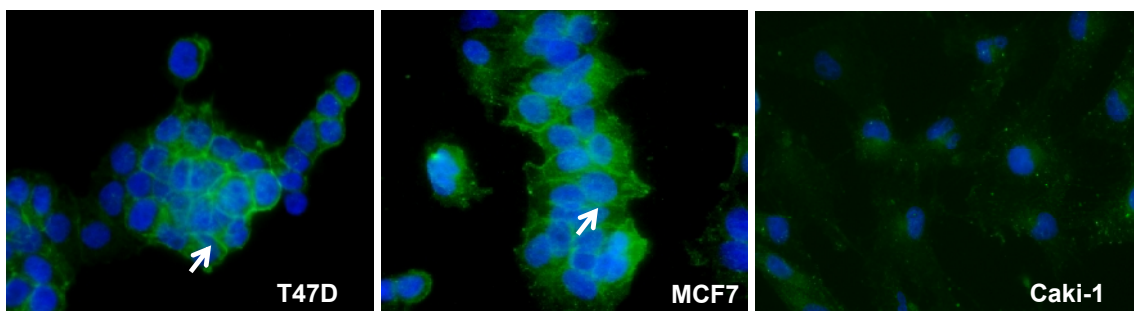
Abbildung IV.3-8 Immunocytochemische Färbungen in einer repräsentativen normalen Urothelzellkultur (UP220 p1), sowie in einer papillären high grade Urothelkarzinomzelllinie BFTC905, einer invasiven low grade Urothelkarzinomzelllinie 5637 und einer invasiven high grade Urothelkarzinomzelllinie 639v. (A) NOTCH1 ist in normalen Urothelzellen zytoplasmatisch lokalisiert, in BFTC905 überwiegend membranständig, aber zytoplasmatisch in randständigen Zellen. In invasiven Zelllinien ist NOTCH1 ausschließlich diffus im Zytoplasma. (B) NOTCH2 ist zytoplasmatisch lokalisiert, in BFTC905 Zellen aber auch nukleär. (C) JAGGED1 ist in den BFTC905 und 5637 membranständig lokalisiert, in 639v und normalen Zellen zytoplasmatisch. (D) Der C-terminale DELTA1 Antikörper erkennt Protein überwiegend im Zytoplasma, aber auch in einigen Nuklei in allen Proben. (E) Der N-terminale DELTA1 Antikörper erkennt Proteine im Zytoplasma und in den Kernkörperchen.

In den untersuchten Urothelkarzinomzelllinien (Abbildung IV.3-8) war NOTCH1 (A) membranständig und zytoplasmatisch in der papillären Urothelkarzinomzelllinie BFTC905 und ausschließlich zytoplasmatisch in den invasiven Urothelkarzinomzelllinien 5637, 639v und VmCub1. JAGGED1 (C) war in den Zelllinien ähnlich lokalisiert wie NOTCH1. Der Ligand war nur an der Zellmembran und im Zytoplasma in den Zelllinien BFTC905 und 5637 detektierbar und ausschließlich im Zytoplasma in 639 und VmCub1.

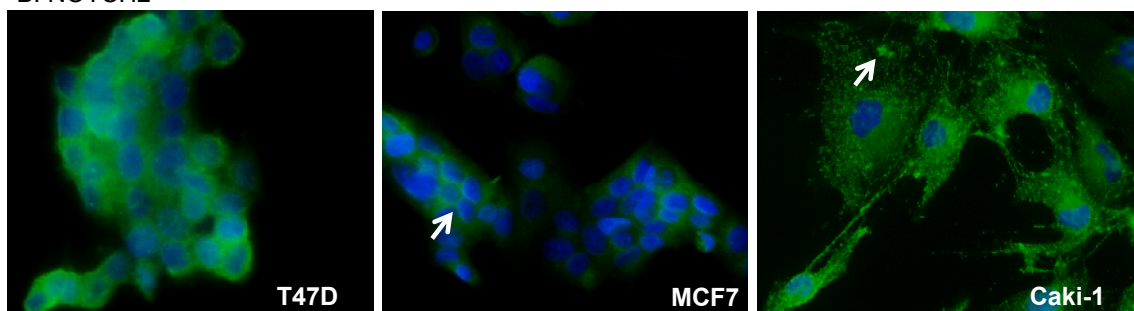
Die N2ICD Färbungen (B) waren vergleichsweise sehr stark; das Protein war zelllinienspezifisch und koloniespezifisch im Nukleus detektierbar. DELTA1 Protein, das mit dem N-terminalen Antikörper (E) detektiert wurde, war in allen Zellen im Zytoplasma und in Nukleoli verteilt. Mit dem C-terminalen DELTA1 Antikörper (D) wurde, ähnlich wie im Blasenmorgewebe, eine heterogene Verteilung gefunden. In 5637 und BFTC905 Zellen wurden Zellgruppen innerhalb einer Kolonie identifiziert, die ausschließlich eine nukleäre oder zytoplasmatische Lokalisation hatten. In 639v Zellen war die Heterogenität weniger stark ausgeprägt, in VmCub1 gar nicht.

Zur Kontrolle wurden drei weitere Zelllinien aus dem Mamma- und Nierenkarzinom immunozytochemisch untersucht. In der Mammakarzinomzelllinie MCF7 (Abbildung IV.3-9D) wurde ebenfalls eine heterogene DELTA1 Verteilung gefunden. In T47D war DELTA1 eher membranständig und in Caki1 Zellen nukleär und zytoplasmatisch. NOTCH1 und JAGGED1 Proteine waren nie im Nukleus detektierbar, wohingegen NOTCH2 in einzelnen Nuklei detektierbar war (Abbildung IV.3-9A-C).

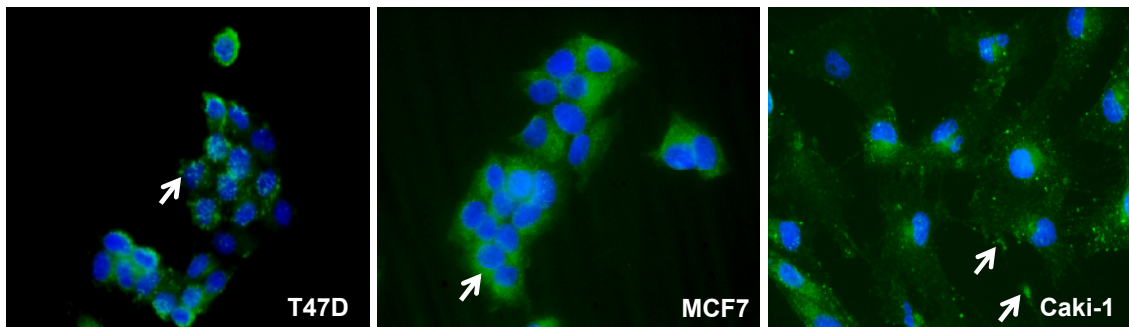
A. NOTCH1



B. NOTCH2



C. JAGGED1



D. DELTA1 (C-term.)

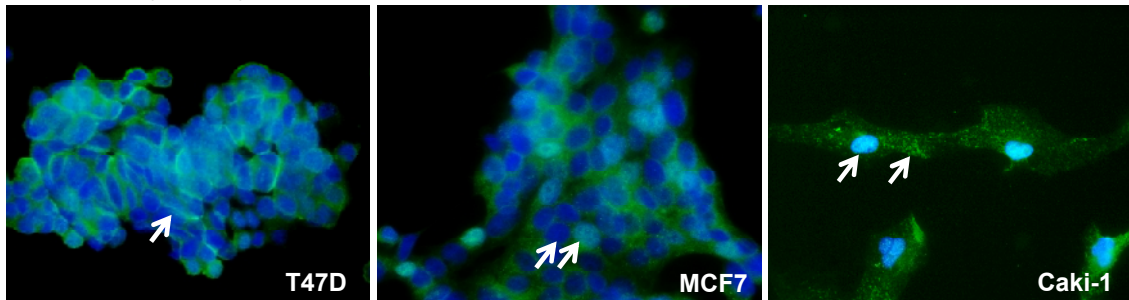


Abbildung IV.3-9 *Immunocytochemische Färbungen in den beiden Mammakarzinomzelllinien T47D und MCF7, sowie in der Nierenkarzinomzelllinie Caki-1. (A) NOTCH1 ist in den Mammakarzinomzelllinien überwiegend membranständig und in der Nierenkarzinomzelllinie Caki-1 sehr schwach diffus im Zytoplasma lokalisiert. (B) NOTCH2 ist zytoplasmatisch lokalisiert. (C) JAGGED1 ist in den Zelllinien diffus zytoplasmatisch lokalisiert. (D) Der C-terminale DELTA1 Antikörper erkennt Protein an der Zellmembran in T47D, sowohl im Zytoplasma als auch in einigen Nuklei in MCF7 und in Caki-1 diffus zytoplasmatisch und nukleär.*

IV.3.3 Funktionelle Analysen zum NOTCH1 Rezeptor

Auswirkungen einer transienten NOTCH1 Überexpression

Da NOTCH1 auf mRNA und Proteinebene stark vermindert war, wurden die Effekte einer transienten Überexpression untersucht. Für die Überexpressionsexperimente wurde die humane intrazelluläre NOTCH1 Domäne (N1ICD) im pIRES2-Vektor verwendet. Der Erfolg der Überexpression wurde auf mRNA Ebene durch eine veränderte Expression von Zielgenen (Abbildung IV.3-10) überprüft sowie auf Proteinebene (Abbildung IV.3-11) und über ein Notch-abhängiges Luciferase-Reporterplasmid (Abbildung IV.3-12).

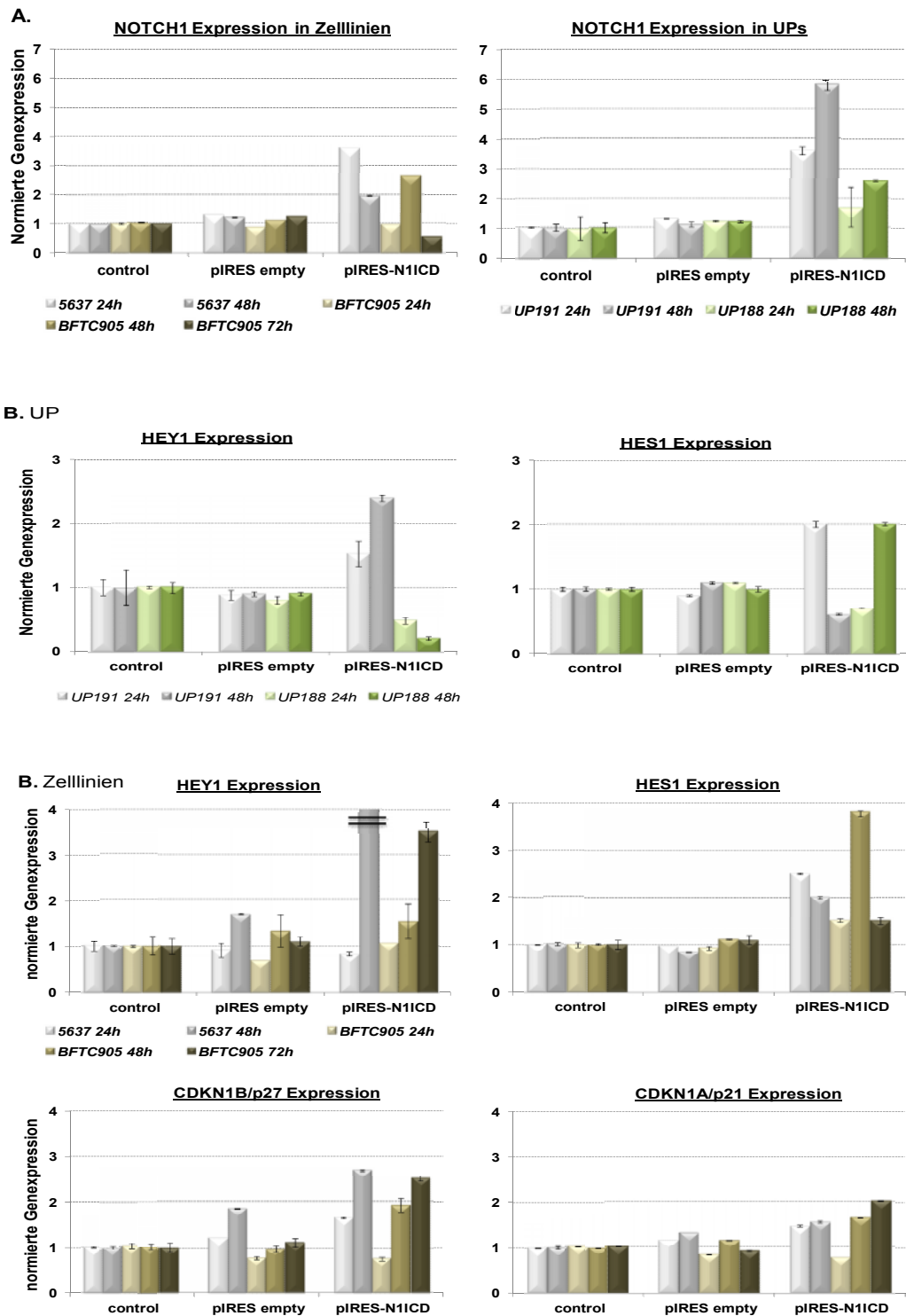


Abbildung IV.3-10 NOTCH1 Überexpression in Urothelkarzinomzelllinien und Urothelkulturen mittels qPCR. (A) Auswirkung auf die NOTCH1 Expression 24-72h nach Transfektion in Zelllinien und normalen Urothelkulturen. Die Stärke der NOTCH1 Überexpression variiert zwischen den Proben. (B) Auswirkung der NOTCH1 Überexpression auf die vermuteten direkten und indirekten Zielgene HES1, HEY1, CDKN1A und CDKN1B. Oben normale Urothelkulturen (UP) und unten UC-Zelllinien. Die Genexpression wurde zum Haushaltsgen TBP ins Verhältnis gesetzt und auf die unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Für die Genexpressionsanalysen nach einer NIICD Transfektion wurden Primer verwendet, die in den vorderen Exons des *NOTCH1* Transkripts binden und nicht direkt die *NIICD* cDNA erkennen. Dadurch können regulatorische Effekte auf die endogene *NOTCH1* Expression nach einer *NIICD* Transfektion detektiert werden.

Die *NIICD* Überexpression führte in den beiden verwendeten Urothelkulturen UP191 und UP188 zu einer erhöhten *NOTCH1* Genexpression, die in der UP191 stärker war als in der UP188 (Abbildung IV.3-10A). In beiden Urothelkulturen nahm die *NOTCH1* Expression bis 48 h zu. Beide Urothelkulturen unterscheiden sich in ihrer Passage. Bei UP191 handelte es sich um eine frühe Passage (p1), während die UP188 ungewöhnlich lange kultiviert wurde. Hier wurde eine späte Passage (p9) analysiert.

In den beiden Urothelkarzinomzelllinien war die Antwort auf eine *NIICD* Transfektion zeitlich verschoben (Abbildung IV.3-10A): in 5637 Zellen war nach 24 h eine erhöhte *NOTCH1* Genexpression gemessen worden, die nach 48 h abnahm. In BFTC905 Zellen wurde dagegen erst nach 48 h eine erhöhte *NOTCH1* Expression gemessen, die nach 72 h abnahm und noch niedriger war als in den Kontrollzellen. Auch die Genexpression der putativen Zielgene *HES1* und *HEY1* änderte sich in Folge der *NIICD* Transfektion sowohl in den Urothelkulturen als auch in den Urothelkarzinomzelllinien (Abbildung IV.3-10B). *HES1* und *HEY1* wurden in den beiden Urothelkulturen unterschiedlich stark aktiviert. In UP191 Zellen führte die *NOTCH1* Überexpression nach 24 h zu einer erhöhten Genexpression beider Gene, die unterschiedlich lang andauerte. Die *HEY1* Expression stieg bis zum zweiten Tag an, während die *HES1* Expression abnahm. Im Gegensatz dazu nahm die *HEY1* Expression über den gesamten Messzeitraum in der UP188 hinweg ab, während die *HES1* Expression anstieg.

In den Zelllinien wurde, ähnlich wie in der UP191, eine kontinuierliche Erhöhung der Genexpression von *HEY1* gemessen, sowie eine abnehmende *HES1* Expression in 5637 und nur nach 48 h eine erhöhte *HES1* Expression in BFTC905. Zusätzlich zu diesen beiden Zielgenen wurde die Genexpression der beiden Zellzyklusinhibitoren *CDKN1A/p21* und *CDKN1B/p27* gemessen, die als mögliche direkte oder indirekte Zielgene aktiviert werden könnten. In beiden Urothelkarzinomzelllinien wurde eine kontinuierliche Zunahme der Genexpression beider Gene über 48 h in 5637 und über 72 h in BFTC905 beobachtet.

Auf Proteinebene wurde die N1ICD Überexpression in den beiden Zelllinien 5637 und BFTC905 verifiziert. Für die weiteren Analysen wurden noch die Urothelkarzinomzelllinien 639v und VmCub1 verwendet. In allen Zelllinien konnte eine deutliche Zunahme der aktiven intrazellulären NOTCH1 Domäne nachgewiesen werden (Abbildung IV.3-11). Unter der Annahme, dass eine Erhöhung der N1ICD Auswirkungen auf die Proteinmenge der Liganden haben könnte, wurden JAGGED1 und DELTA1 in diesen Zellen untersucht. Es gab jedoch keine nachweisbaren Änderungen in der Proteinmenge von JAGGED1 und DELTA1.

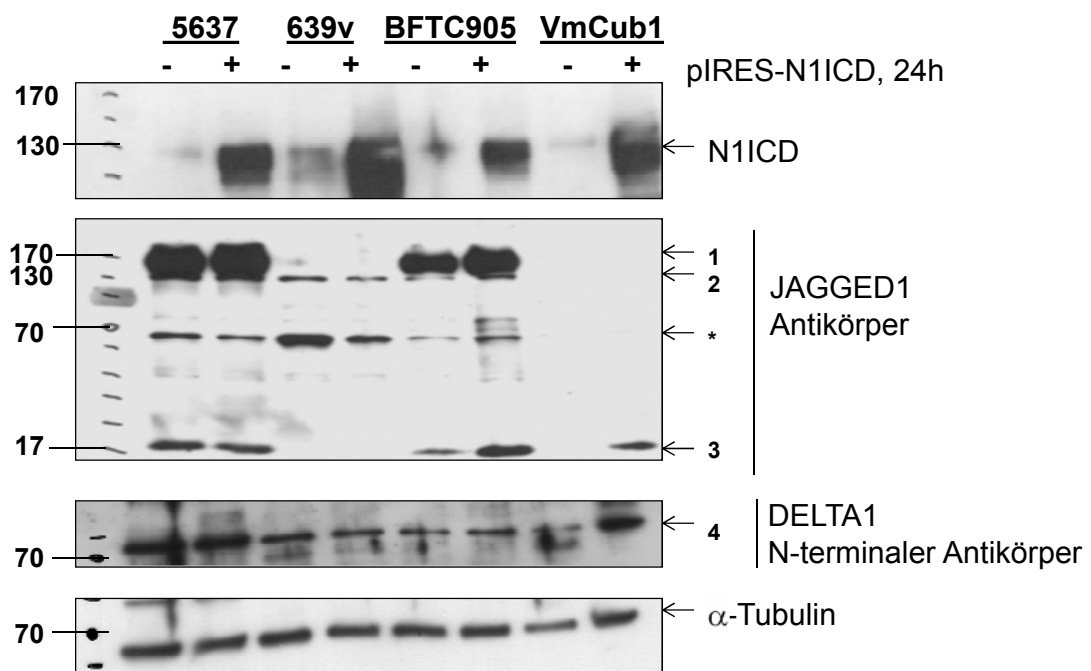
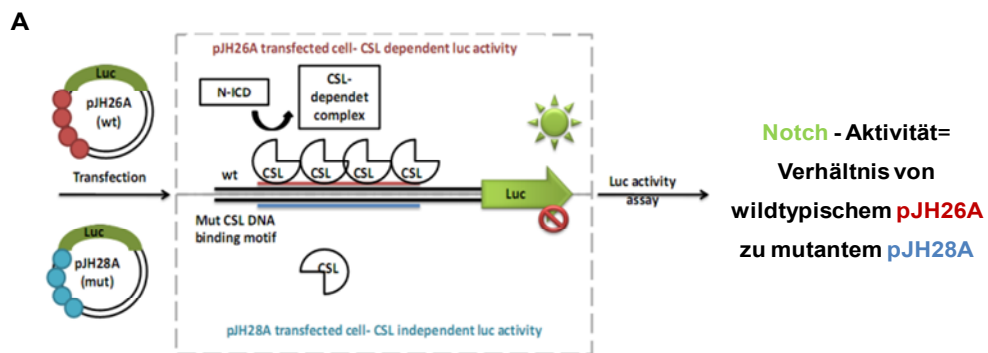


Abbildung IV.3-11 Auswirkungen der pIRES-N1ICD Überexpression nach 24 h auf Proteinebene mit Antikörpern gegen NOTCH1 und die beiden Liganden JAGGED1 und DELTA1 (N-terminal) in den Urothelkarzinomzelllinien 5637, 639v, BFTC905 und VmCub1. In allen Zelllinien konnte NOTCH1 erfolgreich überexprimiert werden auf Proteinebene. Mit dem JAGGED1 Antikörper sind verschiedene Signale sichtbar: 1/2 Vollängen JAGGED1, * vermutlich unspezifisch, 3= J1ICD. Mit dem N-terminalen DELTA1 Antikörper kann bei >70 kD ein Vollängen DELTA1 Signal detektiert werden. Als Referenz diente Tubulin.

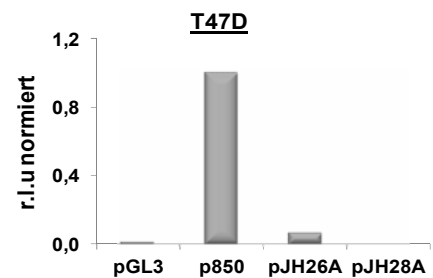
Die Menge an verfügbarem NICD Protein sagt nichts über die Aktivität des Signalwegs aus. Daher wurde ein Luciferase-basierter Assay verwendet, der die Bestimmung der Notch-Aktivität ermöglicht. Die verwendeten CBF1/RBPJ κ -Reportergenplasmide werden üblicherweise verwendet. Um die Aktivität zu bestimmen setzten wir vier Luciferaseplasmide ein (Abbildung IV.3-12A). Die Aktivität wurde jeweils mit einem Luminometer als *relative light units* (r.l.u) gemessen.

Zur Kontrolle der basalen Luciferase-Aktivität verwendeten wir den pGL3 Vektor, umgekehrt p850-Luc mit einem sehr starken Promotor als Anhaltspunkt für eine hohe Luciferaseaktivität. Als wichtigster Indikator der Notch-Aktivität wurde das pJH26A Plasmid verwendet, in dessen Promotorregion vier Bindestellen für den Transkriptionsfaktor CBF1/RBPJκ vorhanden sind. Zum Vergleich diene pJH28A mit vier mutierten Bindestellen. Das Verhältnis der Luciferaseaktivität mit diesen beiden Plasmiden zeigt den Zustand der Notch-Aktivität an.

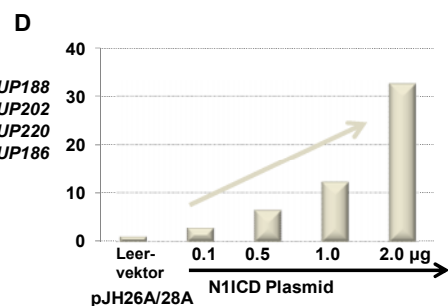
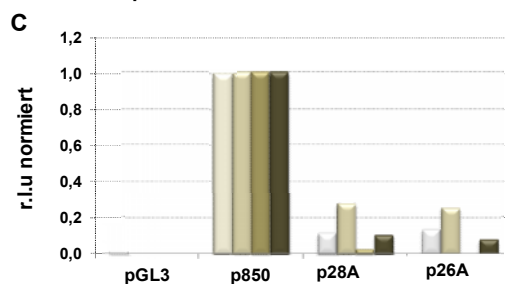


B

Probe	Verhältnis pJH26A /pJH28A
T47D	7:1
Urothelkulturen	3:1 bis 1:2
Urothelkarzinom-zelllinien	1:2 bis 1:5



In normalen proliferativen Urothelkulturen



In Urothelkarzinomzelllinien

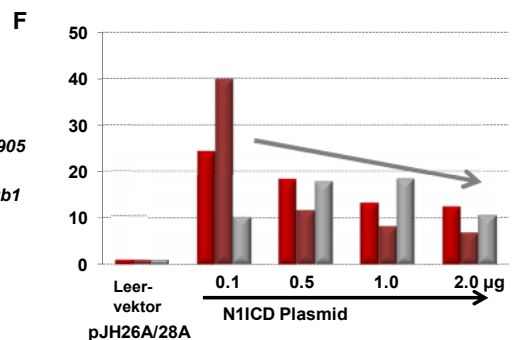
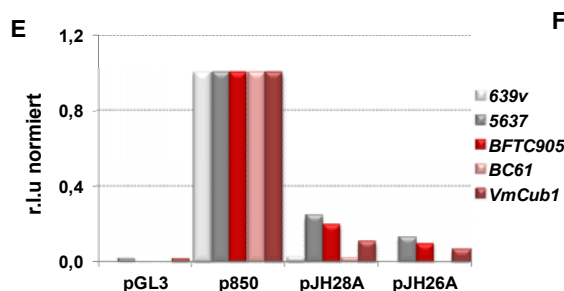


Abbildung IV.3-12 Notch-Aktivität vor und nach NOTCH1 Überexpression (A) Prinzip des Reportertests. Die Notch-Aktivität ist definiert als das Verhältnis des Notch-abhängigen Reporters pJH26A zum Notch-unabhängigen Reporter pJH28A. (B) Die Notch-Aktivität ist auf die hohe Luciferaseaktivität des p850-Luc-Reporters normiert. Die Notch-Aktivität ist besonders hoch in der Mammakarzinomzelllinie T47D, geringer in normalen Urothelzellen und nicht nachweisbar in Urothelkarzinomzelllinien. (C-F) Dosisabhängige Notch-Aktivität vor und nach NOTCH1 Transfektion in (C-D) UPs und (E-F) in Zelllinien. Im Gegensatz zur UP nimmt nach einer initialen Notch-Aktivierung die Notch-Aktivität mit steigender NICD Konzentration in den Urothelkarzinomzelllinien ab. Die Abweichungen betragen unter 20%.

In der Mammakarzinomzelllinie T47D wurde ein basales Verhältnis von 7:1 für den Notch-abhängigen pJH26A Reporter gemessen. Dies gilt als Indiz für einen aktiven Notch Signalweg (Abbildung IV.3-12B). Im Gegensatz dazu variierte das Verhältnis von CBF1-wildtypischem pJH26A zum CBF1-mutierten pJH28A in den normalen Urothelkulturen im Bereich von 3:1 bis 1:2 (Abbildung IV.3-12B/C). In den untersuchten Urothelkarzinomzelllinien war das Verhältnis zum CBF1-mutierten pJH28A hin verschoben und variierte zwischen 1:2 bis 1:5 (Abbildung IV.3-12B/E). Sowohl in Urothelkulturen als auch in den Urothelkarzinomzelllinien konnte das Verhältnis zum wildtypischen pJH26A Reporter durch eine dosisabhängige N1ICD Transfektion umgekehrt werden. In den Urothelkulturen (Abbildung IV.3-12D) nahm die Notch-Aktivität mit steigender N1ICD Konzentration zu. In den Urothelkarzinomzelllinien 5637, BFTC905 und VmCub1 (Abbildung IV.3-12F) nahm jedoch die Notch-Aktivität zunächst zu, aber mit steigender N1ICD Konzentration wieder ab.

Experimente mit einem pIRES-N2ICD Plasmid zeigten keine Effekte auf die Notch-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Daher wurden im Folgenden Unterschiede zwischen der Transfektion einer aktivierten intrazellulären NOTCH1 Domäne (N1ICD), eines vollständigen NOTCH1 Rezeptors (NOTCH1-FL) und einer NOTCH1-FL R2328W Mutante untersucht. Die R2328W Mutation soll zum verzögerten Abbau durch einen Aminosäureaustausch in der PEST-Domäne des Proteins führen [131]. Die drei Plasmide wurden in die vier Zelllinien 639v, BFTC905, VmCub1 und 5637 transfiziert und nach 48 h mittels Western Blot und Reportergenassay ausgewertet (Abbildung IV.3-13).

In allen Zelllinien konnte nach einer N1ICD Transfektion eine starke Zunahme der N1ICD Proteinmenge detektiert werden (Abbildung IV.3-13A, Spuren 2 im Western Blot), die ebenfalls im Reporterassay zu einer hohen Notch-Aktivität führte. Die Transfektion der Zellen mit dem wildtypischen NOTCH1 Rezeptor (Spuren 3) hatte in 639v und 5637 keine Änderung der N1ICD Proteinmenge zur Folge, in VmCub1 und BFTC905 konnte jedoch eine Zunahme von N1ICD und NOTCH1-FL detektiert werden. Im Reporterassay resultierte die Zunahme der N1ICD nach NOTCH1-FL Transfektion in den beiden Zelllinien BFTC905 und VmCub1 entsprechend in einer deutlichen Zunahme der Notch-Aktivität gegenüber untransfizierten Zellen. Diese war jedoch schwächer als die nach der N1ICD Transfektion gemessene Aktivität.

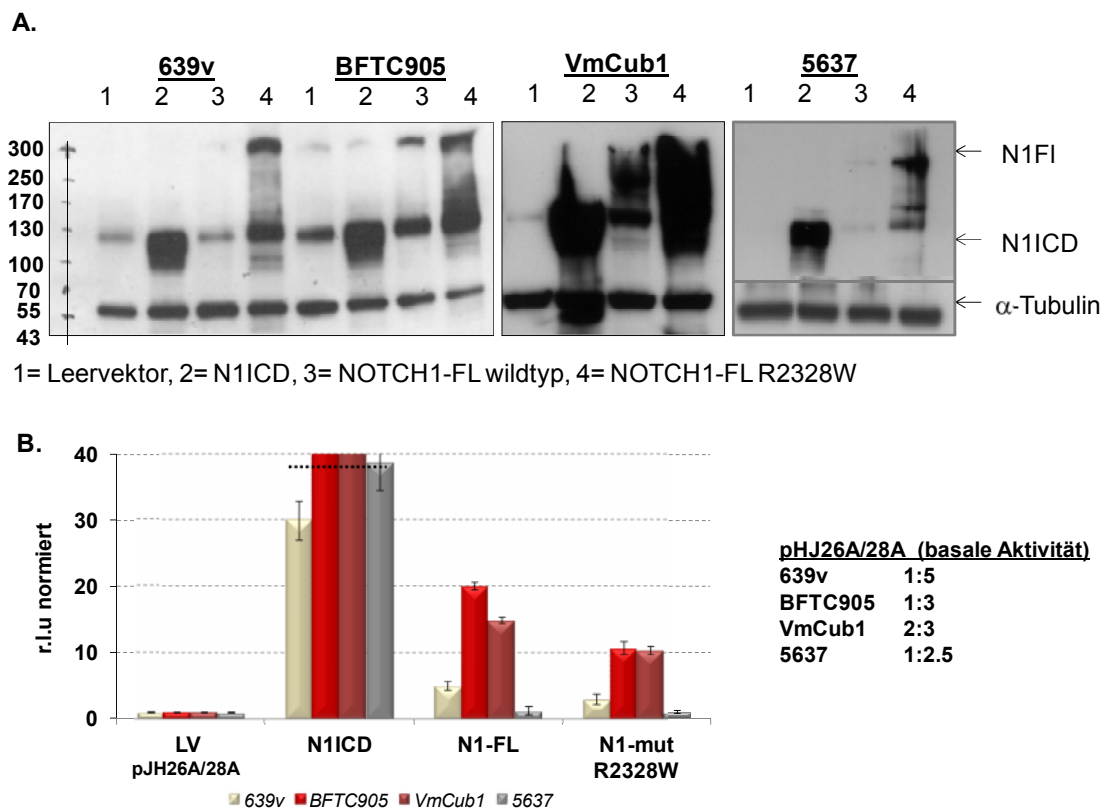


Abbildung IV.3-13 (A) Auf Proteinebene verifizierte Überexpression von NOTCH1 nach 48h mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden hN1ICD, NOTCH1-FL und NOTCH1-FL R2328W. Letzteres soll eine abbauresistente Notch1-Variante darstellen. In allen Zelllinien ist die Überexpression mit der NICD und dem NOTCH1-FL R2328 Plasmid am stärksten. **(B)** Effekte der Überexpression auf die Notch-Aktivität mittels Reporterassay. Parallel zur starken N1ICD-Überexpression kann auch eine entsprechend sehr starke Reporteraktivität gemessen werden. Die NOTCH1-Mutante (R2328) kann am schwächsten die Reporter aktivieren. Alle Werte sind auf die mit dem Leervektor (LV) transfizierten Zellen normiert.

Nach Transfektion der NOTCH1-FL Mutante (Spuren 4) konnte in allen Zelllinien eine - unterschiedlich starke - Zunahme der N1ICD sowie des NOTCH1-FL Proteins detektiert werden. Diese Zunahme war in allen Zelllinien stärker als die Zunahme der Proteinmenge nach wildtypischer NOTCH1-FL Transfektion. Die NOTCH1-FL R2328W Mutante hatte in der Urothelkarzinomzelllinie BFTC905 eine mit dem wildtypischen NOTCH1-FL vergleichbare Wirkung auf die Notch-Aktivität. In den anderen Zelllinien waren die Effekte zum Teil wesentlich geringer als mit dem wildtypischen NOTCH1 Rezeptor.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien unterschiedlich auf eine Transfektion mit den NOTCH1 Rezeptoren reagierten. Während die direkte Transfektion mit der N1ICD starke Effekte auf die Genexpression und Notch-Aktivität ausübte, gab es nur schwache oder moderate Effekte nach einer Transfektion mit dem vollständigen NOTCH1 Rezeptor.

Einfluss von Hemmstoffen der γ -Sekretase

Eine Behandlung der vier Urothelkarzinomzelllinien 639v, 5637, BFTC905 und VmCub1 mit γ -Sekretase Inhibitoren sollte zeigen, ob die Notch-Aktivität, die NOTCH1/2 Proteinmenge und die Zellvitalität beeinflusst werden. Dazu wurden die γ -Sekretase Inhibitoren DAPT, L-685,458, Compound E und Compound W in steigenden Konzentrationen verwendet (Abbildung IV.3-14A-D). Diese Substanzen sollten den Notch Signalweg (unterschiedlich) stark inhibieren. Da Compound W ausschließlich die Bildung des A β -Peptids aus APP hemmen soll, wurde diese Substanz als sogenannter Modulator verwendet, um die Spezifität der gemessenen Effekte einordnen zu können.

Die Zellvitalität wurde mit dem MTT-Assay nach einer 48 h Behandlung mit dem ELISA Reader gemessen. Die gemessenen Absorptionswerte der einzelnen Messreihen wurden gemittelt und auf die Werte nach DMSO-Behandlung normiert.

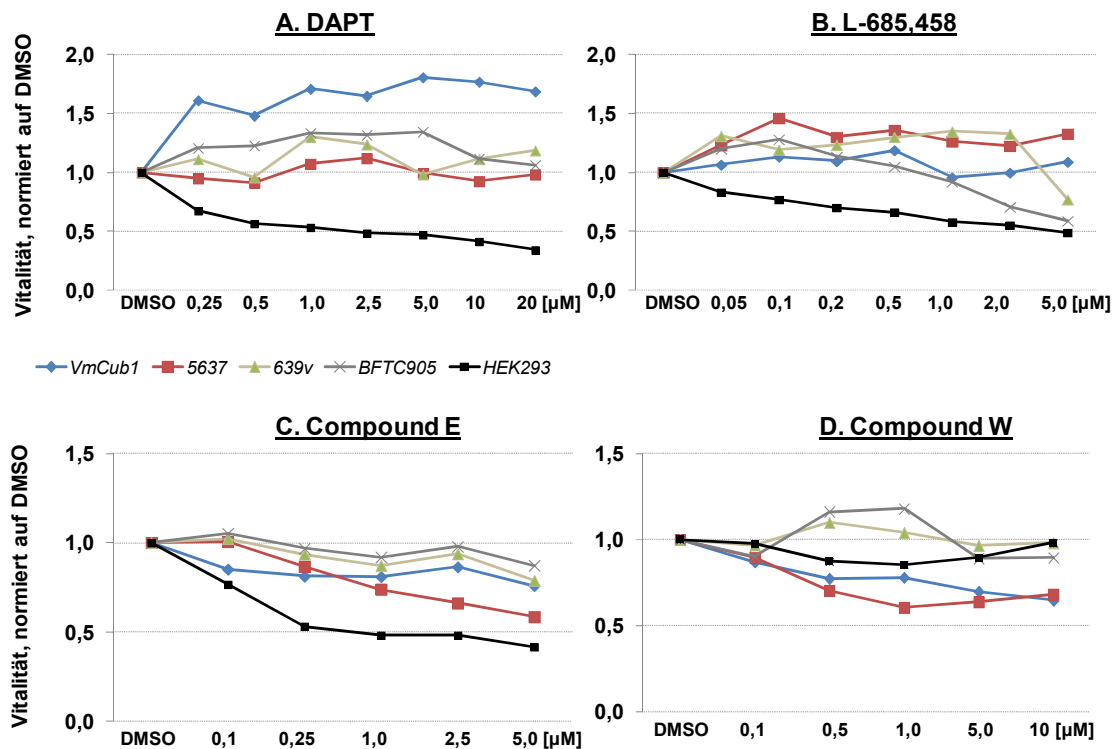


Abbildung IV.3-14 MTT-Assay 48h nach pharmakologischer Inhibition des Notch Signalwegs mit γ -Sekretase Inhibitoren in verschiedenen Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zur Zelllinie HEK293. (A) DAPT, (B) L-685,458, (C) Compound E, (D) Compound W Modulator. Im Gegensatz zur Inhibition des Notch-Signalwegs und entsprechend reduzierter Vitalität in HEK293 Zellen wirken sich die γ -Sekretase-Inhibitoren eher positive auf die Zellvitalität aus.

In allen Urothelkarzinomzelllinien wirkte sich die Zugabe von DAPT in einem Konzentrationsbereich von 0.25 - 20 μ M positiv auf die Zellvitalität aus. In HEK293 Zellen wurde dagegen eine starke Abnahme der Zellvitalität gemessen.

Auch die Substanz L-685,458 wirkte im Bereich von 0.05 - 5 μ M auf die Zelllinien ähnlich wie DAPT. Nur in HEK293 Zellen wirkten sich 2 μ M L-685,458 sehr toxisch aus, in zwei weiteren Zelllinien wurde eine verminderte Zellvitalität bei 5 μ M gemessen. Compound E hatte dagegen in allen Zelllinien einen moderaten bis starken Effekt auf die Zellvitalität. Die Behandlung der Zellen mit Compound W hatte in den Urothelkarzinomzelllinien unterschiedliche Effekte. In 5637 und VmCub1, sowie in HEK293 Zellen wirkte sich Compound W in einem Konzentrationsbereich von 0.1 - 10 μ M negativ auf die Zellvitalität aus, während es die von 639v und BFTC905 nicht wesentlich beeinflusste. Diese Experimente wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit Quadruplikaten ermittelt.

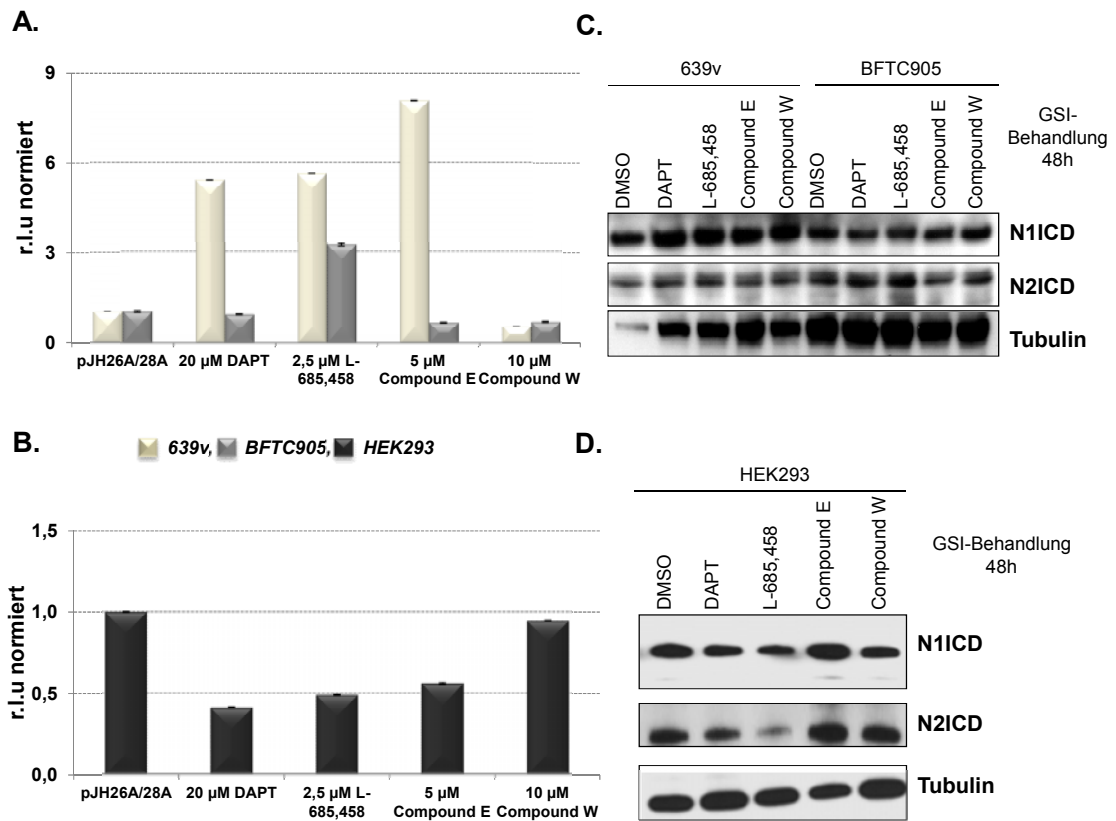


Abbildung IV.3-15 *Pharmakologische Inhibition des Notch Signalwegs mit γ -Sekretase Inhibitoren.* (A-B) *Auswirkung der Substanzen auf die Notch-Aktivität mittels Reportergenassay, sowie (C-D) auf Proteinebene mittels Western Blot in den beiden Urothelkarzinomzelllinien 639v und BFTC905 und in den Kontrollzellen HEK293 mit einem aktiven Notch Signalweg. Die Zellen wurden behandelt mit 0,1% DMSO; 20 μ M DAPT, 2,5 μ M L-685,458; 5 μ M Compound E und 10 μ M Compound W (Modulator). Im Gegensatz zu den HEK293 Zellen mit reduzierter Notch-Aktivität und vermindertem NOTCH1 und NOTCH2 Protein, sind die Effekte in den Urothelkarzinomzelllinien eher variabel und führen zum Teil zu einer verstärkten Notch-Aktivität ohne Veränderung des Notch-Proteinlevels.*

Nur in HEK293 Zellen konnte nach Behandlung mit den γ -Sekretase Inhibitoren DAPT, L-685,458 oder Compound E über den Reportergenassay eine verminderte Notch-Aktivität gemessen werden. Die Modulator Compound W hatte erwartungsgemäß keine wesentlichen Effekte auf die Notch-Aktivität (Abbildung IV.3-15B). Auf Proteinebene konnte nach Behandlung mit DAPT oder L-685,458 eine verminderte N1ICD und N2ICD detektiert werden, jedoch nicht nach Behandlung mit Compound E oder Compound W (Abbildung IV.3-15D).

Da die beiden Zelllinien 639v und BFTC905 am stärksten auf die Behandlung mit den γ -Sekretase Inhibitoren reagierten, wurde in diesen beiden Zelllinien die Auswirkung der Behandlung mit den Inhibitoren auf Proteinebene und auf die NOTCH Aktivität untersucht. Im Gegensatz zur verminderten Aktivität in HEK293 Zellen, war die Notch-Aktivität in 639v nach Behandlung mit DAPT, L-685,458 und Compound E stark erhöht, wohingegen der Modulator Compound W zu einer leicht verminderten Aktivität führte (Abbildung IV.3-15A). Auf Proteinebene wurde nach 48 h keine Änderung in der Proteinmenge der N2ICD detektiert, jedoch eine Zunahme der N1ICD in Übereinstimmung mit der erhöhten Notch-Aktivität des Reporters. Die Behandlung mit den Inhibitoren DAPT und Compound E hatte in BFTC905 keine Auswirkungen auf die Notch-Aktivität und auf Proteinebene (Abbildung IV.3-15C). Nur die Behandlung mit dem Inhibitor L-685,458 hatte eine erhöhte Notch-Aktivität zur Folge.

IV.3.4 Funktionelle Analysen zum kanonischen Liganden DELTA1

Analyse der heterogenen DELTA1 Verteilung

Die immunozytochemischen Analysen zeigten in den analysierten Zelllinien eine heterogene Verteilung von DELTA1 Protein innerhalb einzelner Zellen und innerhalb von Zellkolonien mit dem C-terminalen Antikörper, der Epitope in der zytoplasmatischen Domäne, Transmembrandomäne und in der extrazellulären Domäne erkennt. Daher wurde im Folgenden mittels einer fraktionierten Proteinisolation die Lokalisation von DELTA1 in der Zytoplasma- und Kernfraktion im Western Blot analysiert (Abbildung IV.3-16A).

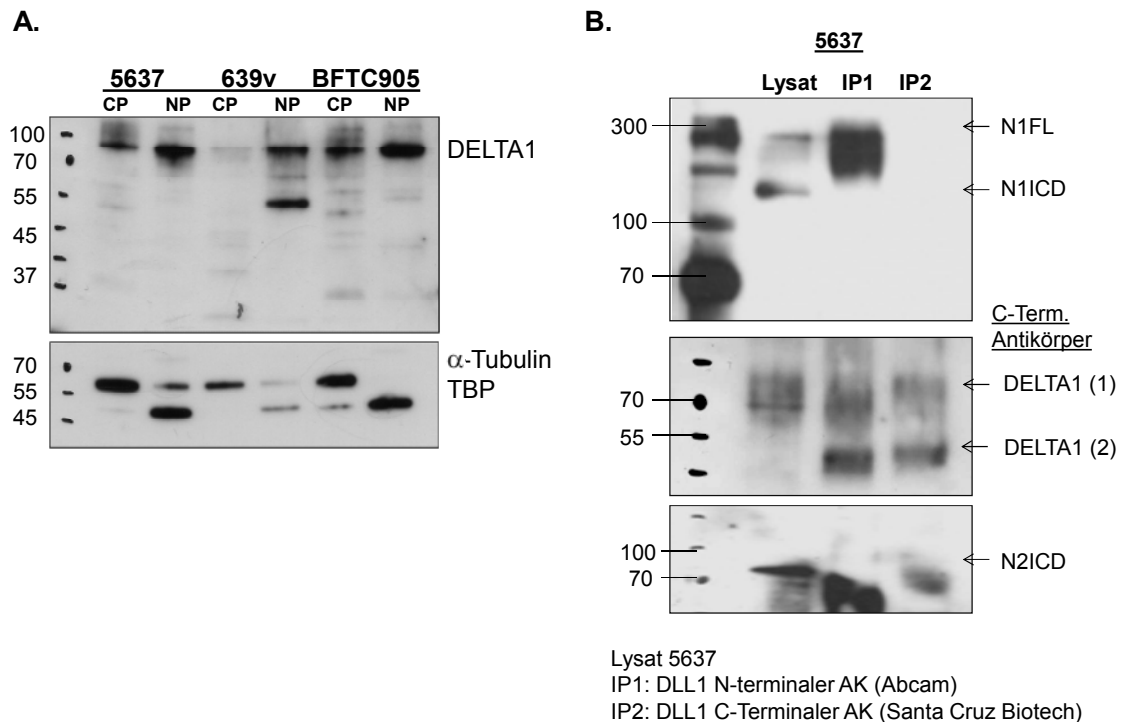


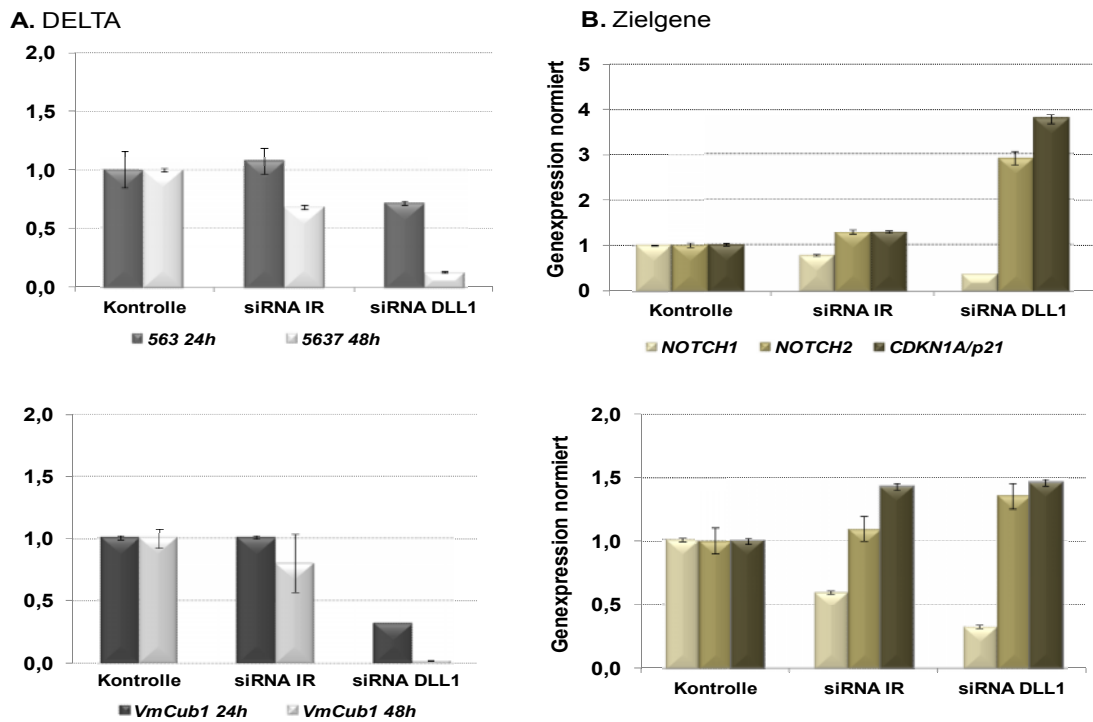
Abbildung IV.3-16 Lokalisation und Interaktion von DELTA1. (A) Fraktionierte Proteinlysate wurden mit dem C-terminalen Antikörper DELTA1 und Tubulin untersucht. Es diente als Referenzprotein für eine zytoplasmatische Anreicherung der Lysate, TBP diente als Referenz für eine nukleäre Anreicherung. (B) Co-IP von DELTA1 in 5637 mit IP1 = N-terminaler DELTA1 Antikörper, IP2 = C-terminaler DELTA1 Antikörper. Beide Immunpräzipitationen wurden mit Antikörpern gegen NOTCH1 und NOTCH2 analysiert und mit dem C-terminalen DELTA1 Antikörper verifiziert. (1) vermutlich das Volllänge DELTA1 Protein, (2) ein prozessiertes DELTA1 Fragment.

In den drei Zelllinien 5637, 639v und BFTC905 wurde sowohl das komplette DELTA1 Protein bei 75 kD als auch die Bande bei 55 kD, die wahrscheinlich die extrazelluläre Domäne von DELTA1 darstellt, mit dem polyklonalen C-terminalen DELTA Antikörper in der Kernfraktion detektiert.

Co-Immunpräzipitation in 5637 Zellen präzipitierte mit beiden DELTA1 Antikörpern (Abbildung IV.3-16B, IP1 und IP2) N2ICD Protein. Mit dem Antikörper gegen das Preprotein DELTA1 (N-terminaler AK) wurde der NOTCH1 Rezeptor (NOTCH1-FL) präzipitiert. Dies war mit dem C-terminalen DELTA1 Antikörper aus IP2 nicht möglich.

siRNA Analysen

Weiterhin wurden die Effekte eines *DELTA1 knock downs* auf die Verteilung der DELTA1 Proteine in der Zelle, auf die Rezeptoren, sowie auf die Notch-Aktivität untersucht. Dazu verwendeten wir eine siRNA gegen DELTA1, die im Exon 6 des Gens bindet. Der *knock down* konnte erfolgreich in 5637 und VmCub1 Zellen nach 24 h und 48 h auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Abbildung IV.3-17A). Die siRNA DELTA1 Transfektion führte in den Zellen auch zu einer Abnahme der Notch-Aktivität anhand der gemessenen Reporterogenaktivität (Abbildung IV.3-17C). Daher wurde untersucht, ob es direkte Auswirkungen auf die Genexpression von *NOTCH1* und *NOTCH2* sowie des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A/p21* gibt (Abbildung IV.3-17B). Tatsächlich war in beiden Zelllinien 48 h nach siRNA DELTA1 Transfektion die Expression von *NOTCH1* leicht vermindert, die von *NOTCH2* und *CDKN1A* erhöht.



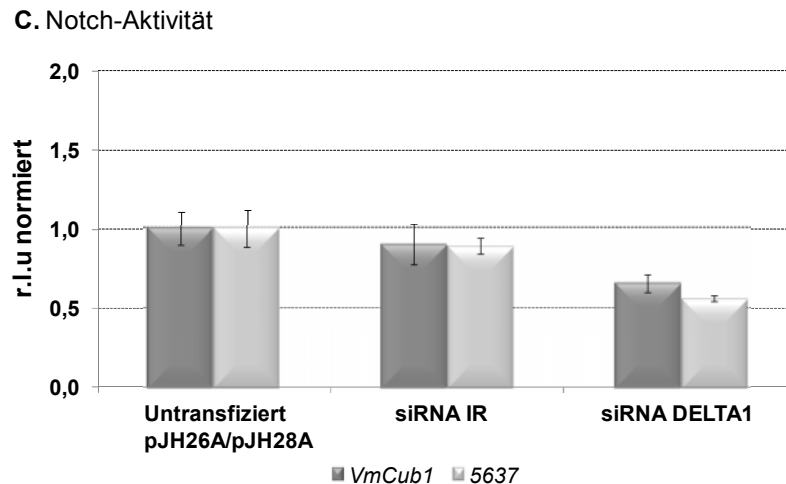


Abbildung IV.3-17 Effekte nach siRNA *DELTA1*-Transfektion auf die Expression von *DELTA1* selbst, und auf die Expression von *NOTCH1*, *NOTCH2* und *CDKN1A* in (A) 5637 und (B) *VmCub1*. (C) Auswirkung einer *DELTA1* siRNA Behandlung auf die Notch-Aktivität ermittelt mit einem Reporterassay. Das basale Verhältnis pJH26A/28A von ca. 2:3 wurde auf 1 normiert. Die *DELTA1* Expression kann in Folge einer siRNA Transfektion in den Zelllinien nach 24-48 h stark reduziert werden. Dies veränderte auch die Expression der Notch-Rezeptoren und des Differenzierungsmarkers *CDKN1A*. Auch die Notch-Aktivität wurde reduziert.

shRNA Analysen

Um diese siRNA-Effekte zu verifizieren wurden die Zellen für 48 h mit shRNA Plasmiden transfiziert. Es wurden drei Plasmide mit unterschiedlichen shRNA Sequenzen verwendet, die jeweils in unterschiedlichen Exons von *DELTA1* binden können. Nachfolgend werden die unterschiedlichen *DELTA1* shRNA-Plasmide als DLL1-sh1, sh2 und sh3 bezeichnet. Die DLL1-sh1 und -sh2 binden an Sequenzen im *DELTA1* Exon 3, wohingegen die DLL1-sh3 eine Sequenz im Exon 7 erkennt. Die *DELTA1*-shRNAs wurde mit den entsprechenden irrelevanten Kontroll-shRNAs verglichen (IR-sh1, sh2, sh4) (Abbildung IV.3-18A). Die Kontroll-shRNA sh4 wurde für die stabilen Transfektion verwendet. Da sich jedoch herausstellte, dass die stabilen Kontroll-sh4 Klone starke morphologische Veränderungen aufwiesen, wurden für die transienten Experimente nur noch die Kontroll-sh1 und -sh2 verwendet.

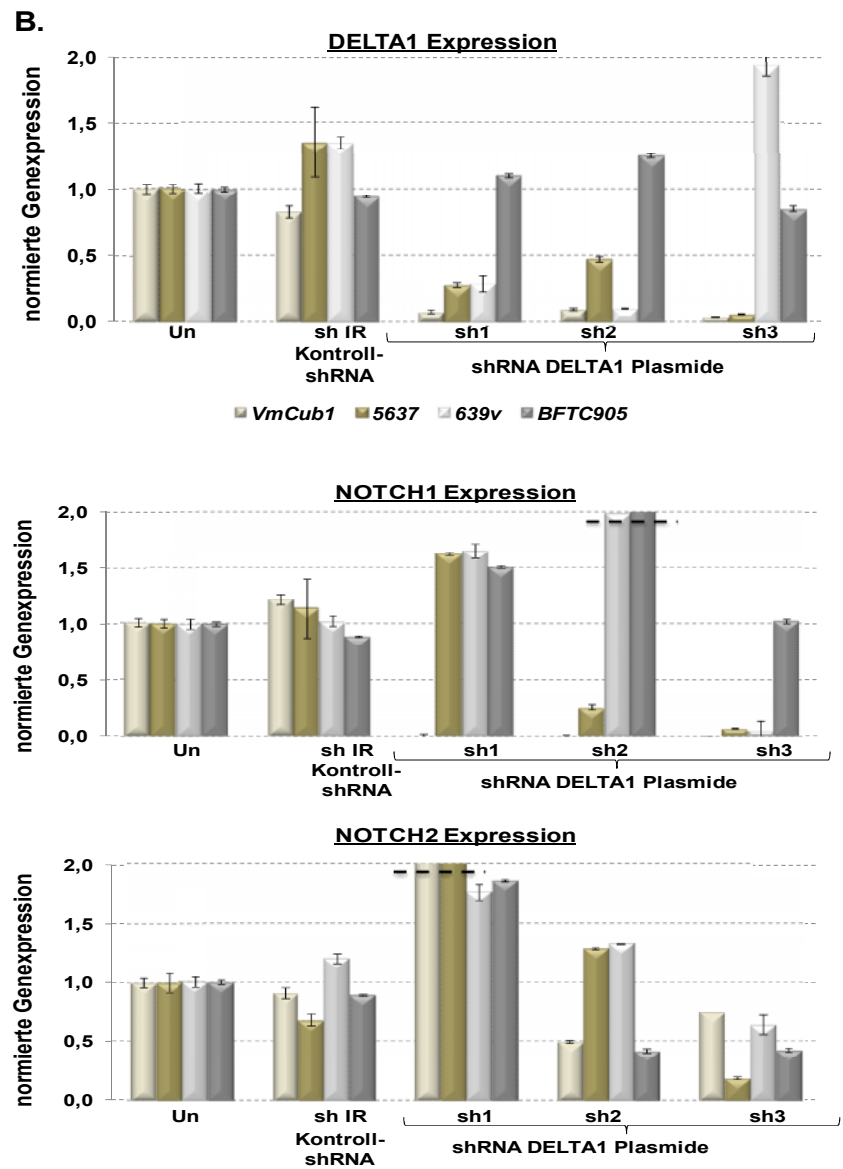
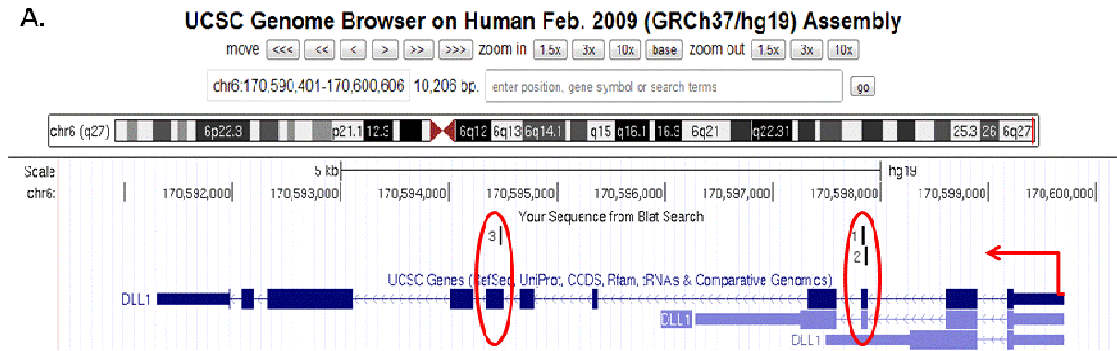


Abbildung IV.3-18 Effekte 48 h nach transienter shRNA Transfektion (A) UCSC genome browser Darstellung zur Lokalisation der DLL1-sh1, sh2 und sh3 Sequenzen im DELTA1 Gen. Der rote Pfeil gibt die Genorientierung an. (B) shRNA Effekte auf die Expression von DELTA1 (oben), NOTCH1 (mittig), NOTCH2 (unten) in den Zelllinien 5637, 639v, VmCub1 und BFTC905 mittels qPCR. Als Kontroll-shRNA wurde IR-sh1 verwendet. Alle Proben wurden ins Verhältnis zum Gen TBP gesetzt und gegen die untransfizierte Kontrolle (Un) normiert.

Die shRNAs hatten in den Zelllinien 5637, 639v, VmCub1 und BFTC905 unterschiedliche Effekte auf ihr Zielgen *DELTA1* (Abbildung IV.3-18B). In 5637, VmCub1 und 639v führten die DLL1-sh1 und sh2 immer zu einer stark verminderten *DELTA1* Expression, wohingegen die Transfektion mit der DLL1-sh3 je nach Zelllinie unterschiedliche Effekte hatte. In der Zelllinie BFTC905 konnte mit keiner shRNA gegen *DELTA1* ein *knock down* erzielt werden.

Da die siRNA Experimente auf eine veränderte Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* hinwiesen, wurde nach shRNA Transfektion in den Zelllinien ebenfalls die Expression der Notch Rezeptoren gemessen. Nach Transfektion mit der DLL1-sh1 wurde in allen Zelllinien eine erhöhte *NOTCH1* und *NOTCH2* Genexpression gemessen. Die *NOTCH1* Expression war nach der Transfektion mit den DLL1-sh2 und sh3 in 5637 und VmCub1 vermindert, jedoch in 639v und BFTC905 erhöht.

Die *NOTCH2* Expression war in allen Zelllinien nach DLL1-sh3 Transfektion vermindert, während die *NOTCH2* Expression nach Transfektion mit der *DELTA1*-sh2 in den Zelllinien eher variabel war.

Die drastischen Effekte auf die Genexpression der Notch Rezeptoren spiegelten sich in der Notch-Aktivität nach shRNA Transfektion in den Zelllinien wieder (Abbildung IV.3-19). Die Notch-Aktivität, die nach der Transfektion gemessen wurde, variierte sehr stark zwischen den verwendeten shRNA Klonen. So bewirkten die DLL1-sh1 und sh3 eine erhöhte Notch-Aktivität, während die DLL1-sh2 in zwei Zelllinien die Aktivität des Reporters erhöhte und in zwei Zelllinien verminderte.

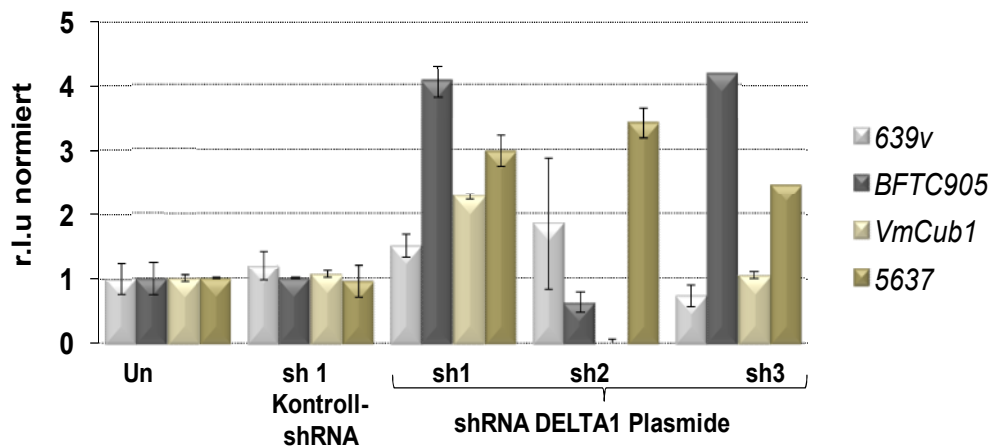
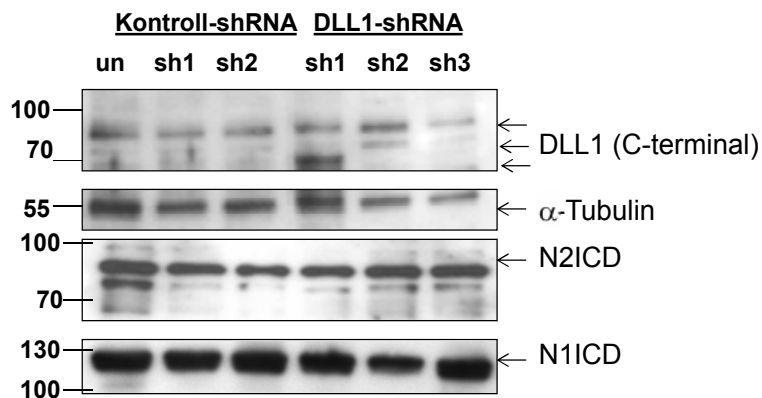


Abbildung IV.3-19 Auswirkung einer *DLL1* shRNA Transfektion mit den *DLL1-sh1*, *sh2* und *sh3* Plasmiden auf die Notch-Aktivität im Vergleich zu untransfizierten und Kontroll-sh1 transfizierten Urothelkarzinomzelllinien 639v, BFTC905, VmCub1 und 5637. Die *DLL1*-shRNAs haben variable Effekte auf die Notch-Aktivität und führen zum Teil zu einer erhöhten Aktivität. Alle Werte sind gegen die untransfizierte Zelle (Un) normiert. Dargestellt ist das Verhältnis pJH26A/pJH28A.

Da insbesondere in 5637 Zellen die Effekte der shRNA Transfektion sowohl auf Genexpressionsebene als auch auf die Reporterogenaktivität enorm waren, wurden die Effekte des *knock downs* auf Proteinebene mittels Western Blot und Immunocytochemie weiter untersucht (Abbildung IV.3-20 A/B). Die *DELTA1* shRNA Transfektion führte nur nach *DLL1-sh3* Transfektion zu einer leichten Reduktion des *DELTA1* Proteins.

Nach Transfektion mit der *DLL1-sh1* wurde in der Zelllinie 5637 eine Bande bei 65 kD detektiert, die in keinem anderen Lysat vorkam. Weitere Western Blot Analysen mit den Antikörpern gegen *NOTCH1* und *NOTCH2* zeigten im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle und den Kontroll-shRNAs keine großen Veränderungen in der Proteinmenge.

A.



B.

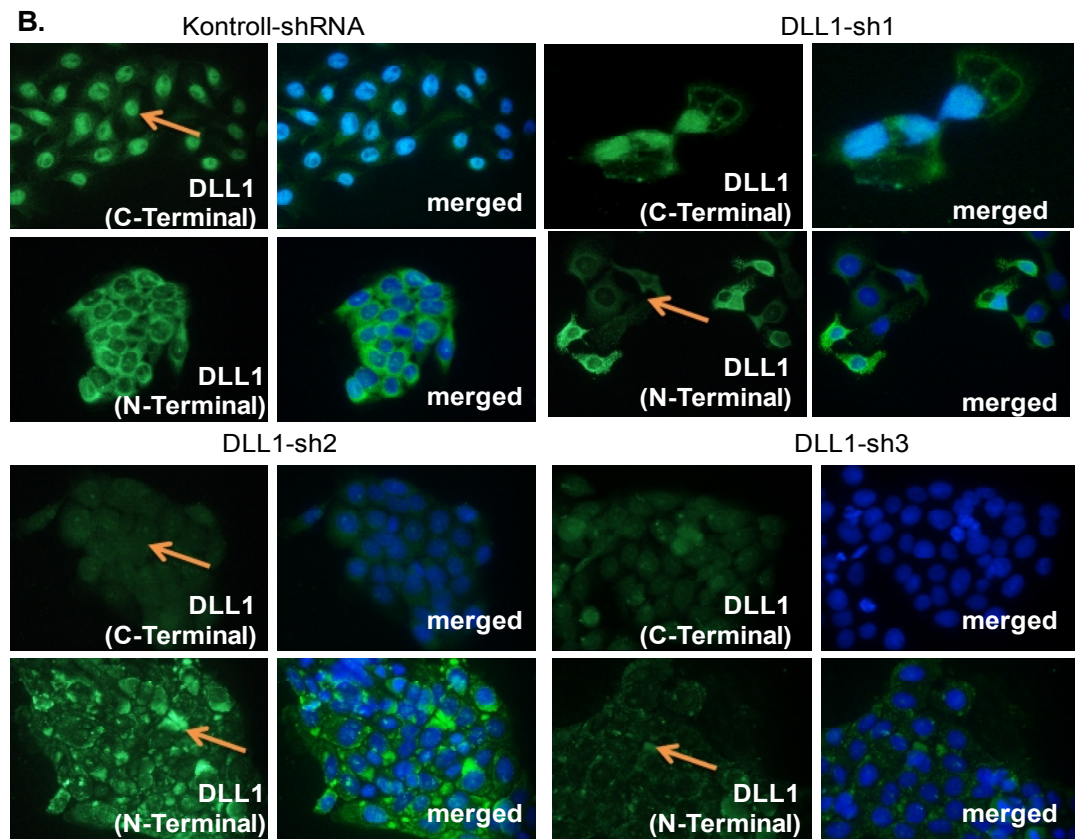


Abbildung IV.3-20 Proteinanalysen 48 h nach DLL1-shRNA Transfektion mit Antikörpern gegen DELTA1 (H-265 C-term. AK), NOTCH1, NOTCH2 in 5637 (A) mittels Western Blot. Die Pfeile zeigen Banden unterschiedlicher Höhe. Die Bande bei 70 kD ist in allen Lysaten vorhanden, die beiden unteren Pfeile zwischen 55-70 kD kommen nur in den DLL1-sh1 und sh3 Klonen im Vergleich zu IR-sh1 und -sh2 vor. (B) Immunocytochemie mit beiden DELTA1 Antikörpern. Die orangenen Pfeile deuten auf die besondere Lokalisation der DELTA1 Proteine hin, die entweder nukleär, diffus im Zytoplasma oder in sehr großen Ansammlungen in der Nähe der Zellmembran vorkommen. Einige DLL1-sh transfizierte Zellen zeigen deutlich weniger Protein als benachbarte Zellen und Kontroll-sh1 transfizierte Zellen.

Im Gegensatz dazu deuteten die immunozytochemischen Färbungen auf eine veränderte Lokalisation der DELTA1 Proteine nach DELTA1 shRNA Transfektion im Vergleich zur Kontroll-shRNA Transfektion hin (Abbildung IV.3-20B). In mit Kontroll-shRNA transfizierten 5637 Zellen wurde mit dem C-terminalen DELTA1 Antikörper Protein überwiegend im Nukleus der Zellen detektiert, während DELTA1 mit dem N-terminalen Antikörper zytoplasmatisch lokalisiert war. Nach Transfektion des DLL1-sh1 war DELTA 1 nicht in jeder Zelle im Zellkern zu finden und die Gesamtmenge des Preproteins DELTA1 war in einzelnen Zellen vermindert. In mit DLL1-sh2 und DLL1-sh3 transfizierten Zellen akkumulierte DELTA1 Protein (detektiert mit dem N-terminalen Antikörper) im Zytoplasma.

Da die shRNA Transfektion offensichtlich eine Verschiebung der DELTA1 Proteinlokalisierung innerhalb der Zelle bewirkte, wurden nachfolgend BF905 Zellen, die eine mit 5637 Zellen vergleichbare heterogene DELTA1 Verteilung haben, stabil mit DELTA1 shRNA transfiziert. Vorherige Analysen hatten auch in dieser Zelllinie auf eine veränderte Lokalisation der DELTA1 Proteine nach transienter Transfektion hingewiesen (Daten nicht gezeigt).

Die shRNA Plasmide besitzen eine Neomycin-Resistenz. Nach einer Transfektion mit diesen Plasmiden wird dadurch eine gezielte Selektionierung mit Neomycin (G418-Sulfat) ermöglicht. Untransfizierte Zellen, die das Plasmid mit der Resistenz nicht tragen, sterben bei einer vorher evaluierten Dosis G418-Sulfat. In diesem Experiment wurden BF905 Zellen über zwei Wochen mit 800 µg G418-Sulfat selektioniert. Dieser Selektionsdruck war ausreichend hoch, um definierte Klone zu erhalten. Die GIEMSA Färbung zeigte deutlich, dass nach der Selektion mehr sh-DELTA1 Klone als sh-Kontroll-Klone vorhanden waren (Abbildung IV.3-21A). Nachdem die Klone weiterkultiviert wurden, zeigten sich weitere morphologische Veränderungen der sh-DELTA1 aber auch der sh-Kontroll-Klone. Es bildeten sich nicht-adhärenente Zellaggregate, die eine Größe erreichten, die mit dem Auge sichtbar waren, sowie sehr große, untypische Zellen.

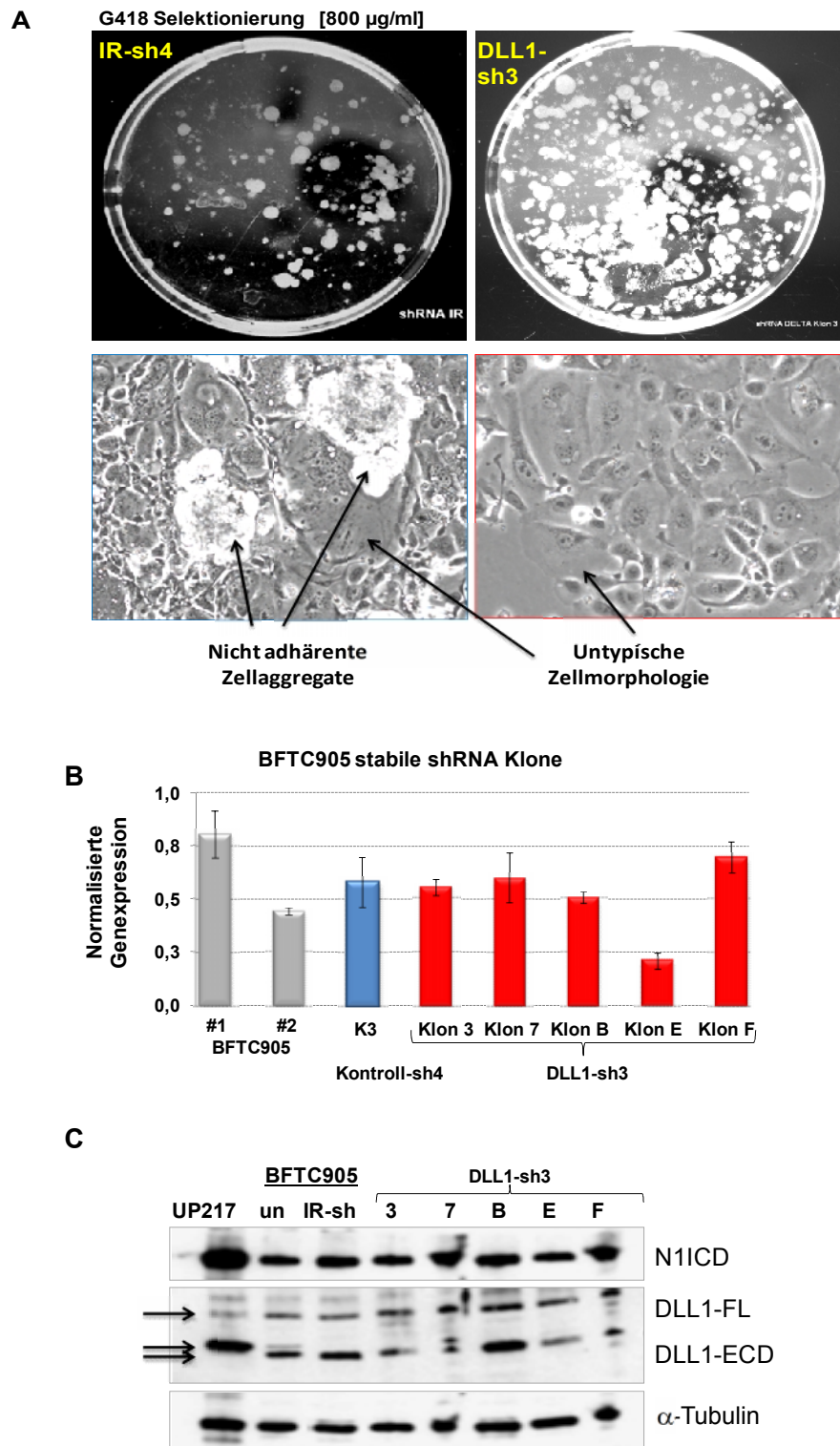


Abbildung IV.3-21 Effekte nach stabiler DLL1-shRNA Transfektion in BFTC905 Zellen. (A) morphologische Veränderungen der Zellen und GIEMSA Färbung nach shRNA Transfektion und Selektion mit 800 µg G418 über zwei Wochen. Im Vergleich zu den Kontroll-sh4 Klonen sind viel mehr Klone nach Selektion von DLL1-sh3 vorhanden. Auffällig sind aberrante Zellmorphologien mit den spezifischen und unspezifischen shRNAs. (B) Effekte auf die Genexpression von DELTA1 mittels qPCR in untransfizierten BFTC905 Zellen (graue Balken), einem Kontroll-sh4 Klon#3 (blau)

im Vergleich zu den DLL1-sh3 Klonen #3, #7, #B, #E, #F (rote Balken). Nur der BFTC905 DLL1-sh3 Klon #E zeigt eine verminderte Expression. (C) Expression der DLL1-sh3 Klone auf Proteinebene im Vergleich zum Kontroll-sh4 Klon #3 mittels Western Blot mit Antikörpern gegen NIICD, C-terminales DELTA1 und Tubulin. Auf Proteinebene ist kein knock down von DELTA1 in den stabilen DLL1-sh3 Klonen zu erkennen.

Es wurden je fünf Kontroll-shRNA Klone (IR-sh4) und DELTA1-Klone erfolgreich expandiert und weiter analysiert. Die Genexpressionsanalysen führten jedoch zu variablen Ergebnissen. *DELTA1* war minimal niedriger exprimiert als in der untransfizierten BFTC905 Zelllinie (Abbildung IV.3-21B). Auf Proteinebene wurde mittels Western Blot keine Veränderung der DELTA1 Proteinmenge detektiert (Abbildung IV.3-20C). Es gab jedoch unterschiedlich starke Signale für die extrazelluläre Domäne von DELTA1 (DLL1-ECD), die zudem auch eine leicht unterschiedliche Höhe hatten (siehe Doppelpfeil in IV.3-21C).

Im Gegensatz dazu zeigten die shRNA Klone in den immunzytochemischen Färbungen deutliche Unterschiede zur untransfizierten BFTC905 Zelllinie und untereinander (Abbildung IV.3-22). DELTA1 war im DLL-sh3-Klon7 sehr stark in den Zellkernen und im Zytoplasma lokalisiert, während DELTA1 im DLL1-sh3-Klon3 viel stärker im Nukleus, als im Zytoplasma lokalisiert war. In den DLL1-sh3-KlonB, E und F war die DELTA1 Verteilung zunehmend diffuser und die Färbung schwächer. In diesen Klonen waren deutlich weniger Zellkerne DELTA1 positiv als in DLL1-sh3-Klon7 und sh3-Klon3.

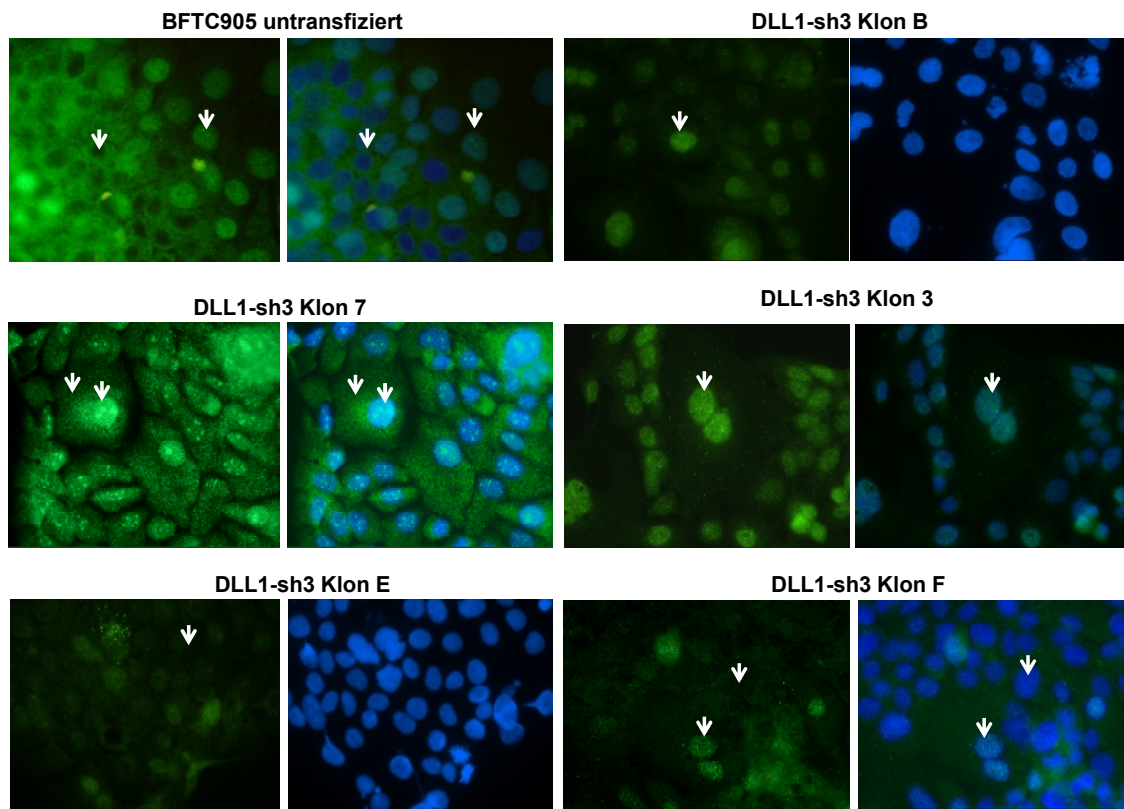


Abbildung IV.3-22 Immunzytochemische Färbungen in stabil transfizierten DLL1-sh3 Klonen im Vergleich zur Ausgangszelllinie BFTC905 (untransfiziert) mit dem C-terminalen DELTA1 Antikörper (grün, Alexa Fluor 488 nm) und Gegenfärbung mit DAPI (blau). Im Gegensatz zur starken DLL1 Heterogenität in der untransfizierten Zelllinie BFTC905 führt die DLL1-sh3 Transfektion in den Klonen B, 7 und 3 im Wesentlichen zu einer einheitlichen starken nukleären, aber auch zytoplasmatischen Lokalisation des DELTA1 Proteins (weiße Pfeile). In den DLL1-sh3 Klonen E und F ist die Färbung im Nukleus schwächer.

Diese Unterschiede hatten keine Aktivierung des Notch Signalwegs zur Folge (Abbildung IV.3-23). Im Reporterassay konnte nur eine leichte Verschiebung hin zum mutierten pJH28A, der für eine Notch/CBF1 unabhängige Luciferaseaktivität steht, gemessen werden.

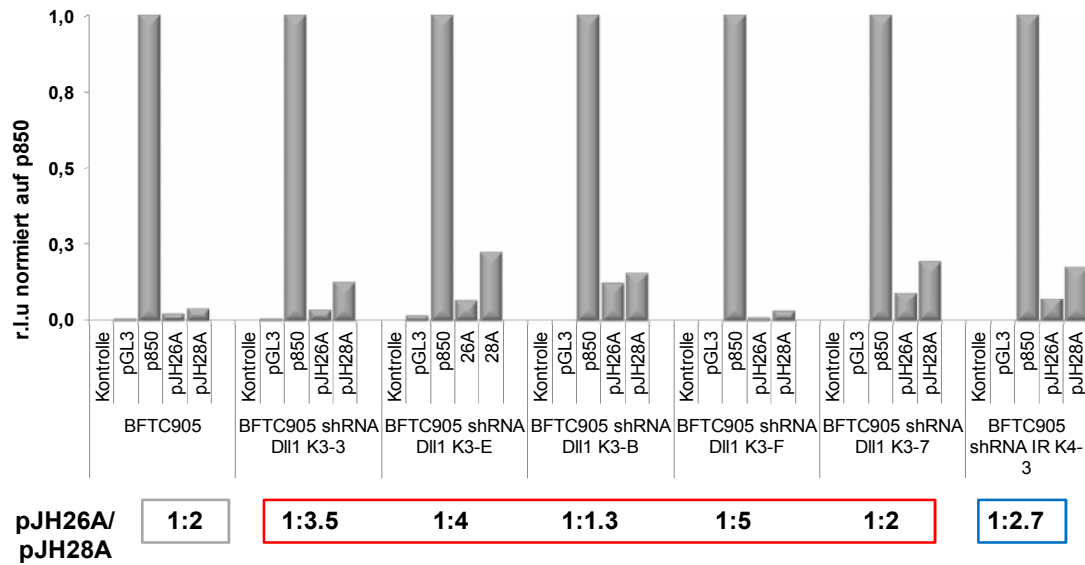


Abbildung IV.3-23 Notch-Aktivität in stabil transfizierten DLL1-sh3 Klonen der Zelllinie BFTC905. In rot sind die DLL1-sh3 Klone dargestellt, deren Notch-Aktivität sich kaum von der Ausgangszelllinie in grau und der Kontroll-shRNA transfizierten Zelllinie in blau unterscheidet. Die Werte sind als Verhältnis von pJH26A zu pJH28A dargestellt und auf p850 normiert.

IV.3.5 Differenzierungsanalysen in normalen und malignen Urothelzellen

Auswirkungen der kalziuminduzierten Differenzierung von UP und BC61 auf die Expression von Notch Komponenten.

Im Abschnitt IV-1 des Ergebnisteils ist die Etablierung von Zellkulturmodellen beschrieben, die die Untersuchung der kalziuminduzierten Differenzierung urothelialer Zellen ermöglichen. Da der Notch Signalweg mit der Differenzierung in Zusammenhang steht, wurde die Veränderung in der Genexpression der Notch Rezeptoren und Liganden in der normalen Urothelkultur und in der papillären Urothelkarzinomzelllinie BC61 analysiert (Abbildung IV.3-24).

Im Verlauf einer kalziuminduzierten Differenzierung der normalen Urothelkultur UP220 (Abbildung IV.3-24A) stieg insbesondere die Genexpression beider Notch Rezeptoren stark an, bis am letzten Messtag die *NOTCH2* Expression achtfach höher war als vor der Kalziumzugabe. *NOTCH2* war zudem stärker exprimiert als *NOTCH1*. Während die *DELTA1* Expression tendenziell abnahm, verdoppelte sich die *JAGGED1* und *EGFL7* Expression über den Messzeitraum von 14 Tagen. Die Genexpression der Notch Zielgene *HES1* und *HEY1* änderte sich moderat, während die Expression des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A/p21* stark zunahm.

Diese Zunahme von *CDKN1A*, als Differenzierungsmarker, war in der papillären Urothelkarzinomzelllinie BC61 (Abbildung IV.3-24B) viel geringer. Stattdessen nahm die Expression aller Zielgene leicht, aber kontinuierlich zu. In Folge der kalziuminduzierten Differenzierung stieg insbesondere die Expression der Liganden *JAGGED1* und *EGFL7*, weniger die von *DELTA1* an. Die Expression der Rezeptoren verdoppelte sich zwar, es gab aber keine Unterschiede zwischen *NOTCH1* und *NOTCH2*.

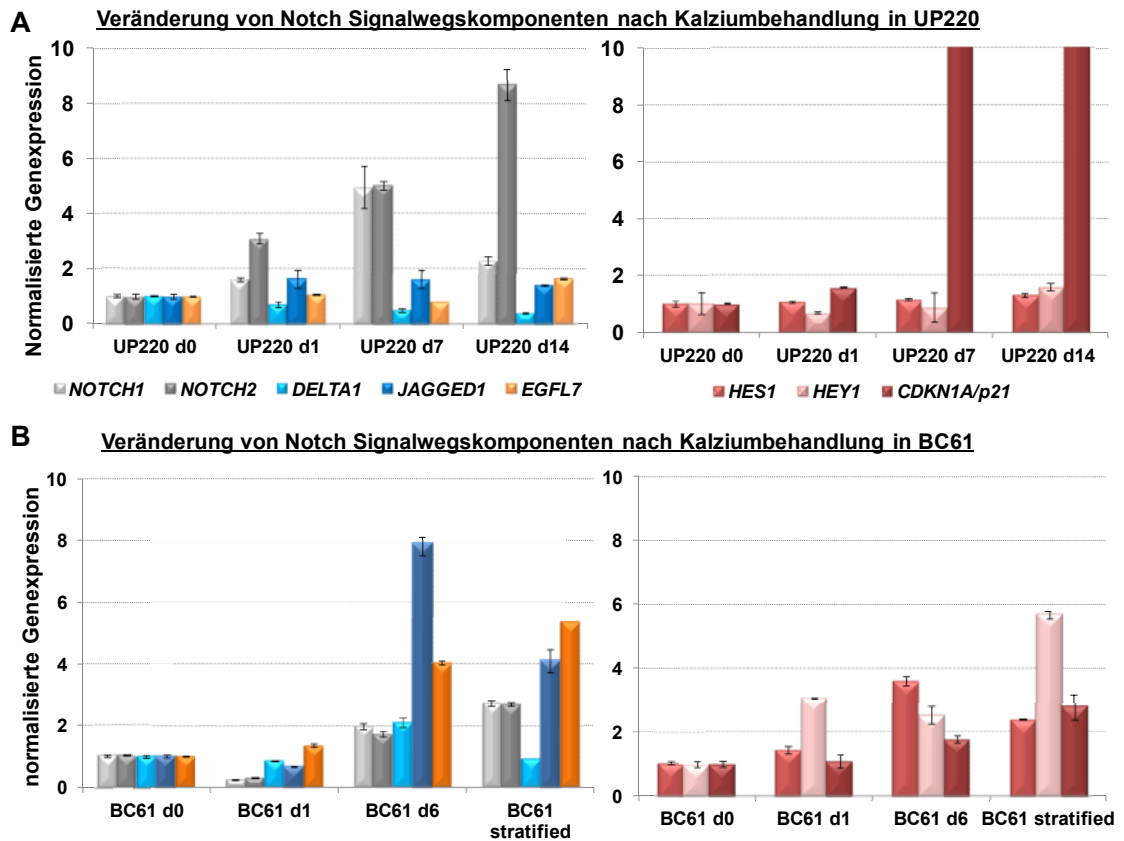


Abbildung IV.3-24 Veränderung des Notch Genexpressionsprofils im Verlauf der kalziuminduzierten Differenzierung mittels qPCR (A) in der Urothelzellkultur UP220 und (B) in der papillären Urothelkarzinomzelllinie BC61. Graue Balken stellen die Notch Rezeptoren dar, blaue Balken die kanonischen Liganden, orange farbene Balken den nicht-kanonischen Liganden EGFL7 und rote Balken die Zielgene HES1, HEY1 und CDKN1A. Erklärungen siehe Text.

Auswirkungen des Kalziumentzugs in den Urothelkarzinomzelllinien HT1376 und BFTC905 auf die Expression von Notch-Komponenten.

In den beiden Urothelkarzinomzelllinien BFTC905 und HT1376 wurden die Auswirkungen auf Kalziumentzug im Hochkalzium-Medium DMEM untersucht. Auf Proteinebene wurden neben Zytokeratinen als Differenzierungsmarkern auch die Rezeptoren NOTCH1, NOTCH2, sowie die Liganden DELTA1 und JAGGED1 untersucht (Abbildung IV.1-12). Die Proteinmengen der aktivierten Notch-Rezeptoren (NICD), sowie des Liganden JAGGED1 änderten sich kaum. Beide Zelllinien enthielten jedoch deutlich mehr DELTA1 Protein, äquivalent zur Zunahme von CK5.

V. Diskussion

V.1 Charakterisierung von zwei neuen papillären Urothelkarzinomzelllinien

Es wurden zwei Zelllinien aus papillären Urothelkarzinomen etabliert und charakterisiert. BC61 und BC44 besaßen typische Karyotypen entsprechend ihres Progressionspotentials. Während der Analyse der beiden Zelllinien wurde außerdem die zusätzliche oder ausschließliche Expression von p53 Δ 133 Isoformen vom alternativen Promotor P2/int4 identifiziert, sowie zwei bekannte p53 Polymorphismen. Diese Charakterisierung liefert somit neue Hinweise zu den Pathomechanismen bei der klinisch besonders problematischen Untergruppe der papillären *high grade* Urothelkarzinome.

Das Urothelkarzinom, als häufigste maligne Entartung der Harnblase, kann zunächst in zwei klar definierte Gruppen unterteilt werden: die genomisch stabilen, papillären *low grade* Urothelkarzinome und die genomisch instabilen, invasiven *high grade* Urothelkarzinome. Weitgehend unklar ist noch, wie sich die papillären, progressiven *high grade* Karzinome von diesen beiden Gruppen unterscheiden und insbesondere durch welche Mechanismen papilläre Urothelkarzinome invasiv werden [9]. Die beiden neu etablierten Urothelkarzinomzelllinien, BC44 und BC61, sind in dieser Hinsicht hilfreiche und einzigartige Tumormodelle.

Die gut differenzierte, papilläre Urothelkarzinomzelllinie BC61 weist viele Merkmale papillärer *low grade* Urothelkarzinome auf, wie die onkogene FGFR3 Mutation G372C, wildtypisches p53 und Verluste von Chromosom 9 mit einer Deletion des Zellzyklusinhibitors *CDKN2A/p16^{INK4A}* im Chromosomenabschnitt 9p21. Insgesamt deuteten die Karyotypenanalyse und die Array-CGH Daten auf ein moderat aneuploides, nahezu tetraploides Genom mit lokal begrenzten chromosomalen Zugewinnen und Verlusten hin. Der BC61 Primärtumor war ein Rezidiv eines multifokal immer wieder auftretenden pTa *low grade* Tumors. Parallel zu den pTa Tumoren und einer chronischen Urocystitis entwickelte sich zudem eine erst *low grade*, dann *high grade* intraurotheliale Neoplasie, und später (2 Jahre) multifokal auftretende muskelinvasive Tumoren (pT1 *low grade*, pT2 *low grade*).

Höglund *et al.* und Richter *et al.* haben argumentiert, dass sich papilläre *low grade* Urothelkarzinome von invasiven *high grade* Urothelkarzinomen insbesondere durch genomische Instabilität, Häufigkeit, Komplexität und zeitliche Abfolge der genomischen Veränderungen unterscheiden [134, 135]. In einer dieser Arbeiten schlagen Höglund *et al.* eine Gruppierung der Urothelkarzinome basierend auf ihren chromosomalen Veränderungen vor (siehe Abbildung V.1-1).

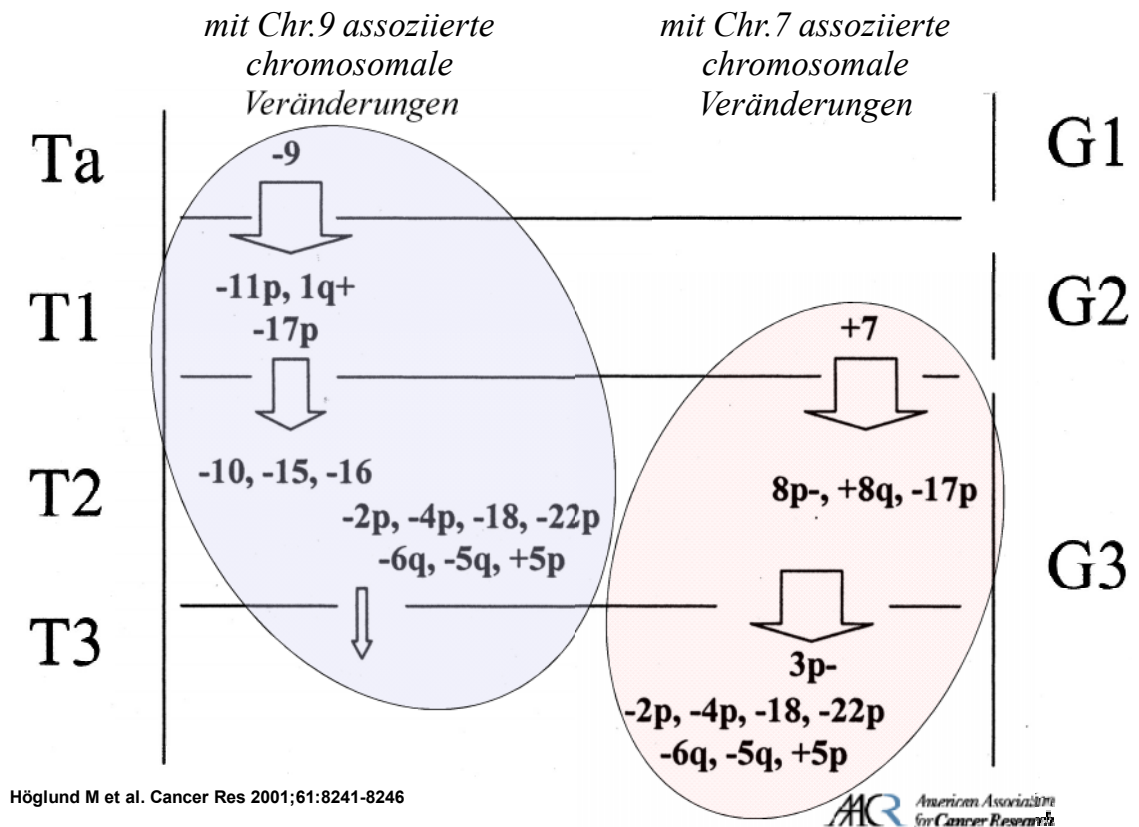


Abbildung V.1-1 Zytogenetische Wege im Urothelkarzinom, modifiziert nach Höglund et al. [136]. Die zytogenetische Analyse deutet auf zwei Gruppen von Urothelkarzinomen hin. Die erste Gruppe zeichnet sich durch Chromosom 9 Verluste aus. Darauf folgen chromosomalen Veränderungen, wie Amplifikation von 1q und Deletion von 11p und 17p. Für die zweite Gruppe, die unabhängig von Chromosom 9 Verlusten auftreten, ist der Zugewinn von Chromosom 7 fundamental; auf sie folgen weitere Veränderungen, wie Veränderungen auf Chromosom 8 und Chromosom 3p Verlust.

Bemerkenswert in diesem Modell ist die Einordnung von Veränderungen von Chromosom 5 (-5q, +5p). Eine detaillierte Studie zur Bedeutung von Deletionen des langen Chromosomenarms 5q und Amplifikation des kurzen Arms 5p, oder Bildung des Isochromosoms 5p, gibt es nicht. Trotzdem wird die Bildung des Isochromosoms 5p mit einem deutlich aggressiveren Phänotyp assoziiert [137].

In beiden Zelllinien, BC61 und BC44, ist ein solches Isochromosom 5p identifiziert worden, genauso wie in den von uns verwendeten Urothelkarzinomzelllinien BFTC905, HT1376, 639v, VmCub1 (vgl. Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkultur), die alle als *high grade* Tumore eingestuft sind. Demnach deuten die Karyotypenanalyse und der Array-CGH der Zelllinie BC61 auf ein noch genomisch relativ stabiles, aber progressives Urothelkarzinom hin, welches der viel diskutierten dritten Gruppe der Urothelkarzinome, den papillären *high grade* Tumoren mit Progressionstendenz, zugeordnet werden kann. Weiterhin deutet die Array-CGH Auswertung darauf hin, dass der Primärtumor der Zelllinie BC61 schlecht auf eine BCG Therapie (*Bacillus Calmette-Guerin*) ansprechen dürfte, da die für die entsprechende Immunantwort wichtigen Gene des *IFNA* Locus homozygot deletiert sind (Abbildung V.1-2). Einer Studie von Cai *et al.* [138] zufolge bekamen zwei Drittel der Patienten mit einem pTa-Tumor und Deletion des Interferon alpha (*IFNA*) Locus ein invasives Urothelkarzinom nach einer erfolglosen Immuntherapie mit BCG.

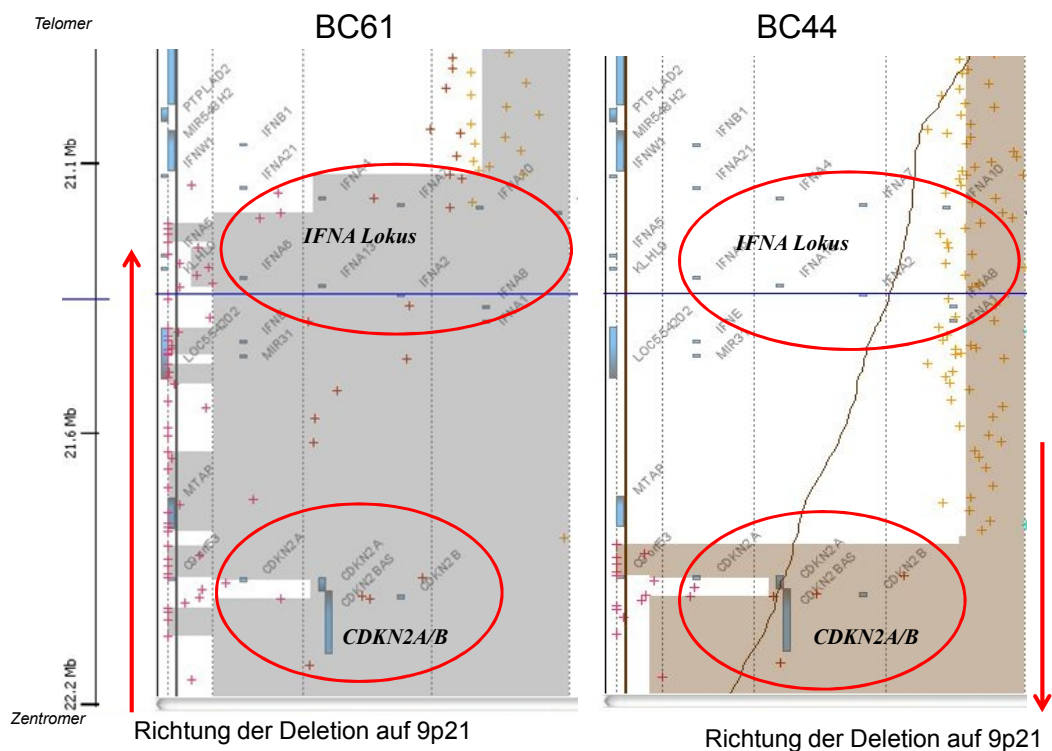


Abbildung V.1-2 Ausbreitung der Deletion auf 9p21 analysiert mittels Array-CGH. In der Zelllinie BC61 umfasst die Deletion (grauer Abschnitt) den *CDKN2A/B* Locus, sowie den Interferon alpha (*IFNA*) Locus, der für eine adäquate Immunantwort infolge einer BCG Therapie notwendig ist. In der Zelllinie BC44 dehnt sich die Deletion (brauner Abschnitt) zentromerisch aus und umfasst *CDKN2A/B*, aber nicht den *IFNA* Locus.

Die Zelllinie BC44, angelegt aus dem papillären Teil eines invasiven pT4 G3 Tumors, weist chromosomale und molekulargenetische Veränderungen auf, die eher für invasive Urothelkarzinome typisch sind. In dem hypertriploiden Genom fehlt durch die Bildung eines Isochromosoms 9q eine Kopie des kurzen Arms 9p (Abbildung IV.1-2). Zusätzlich ist *CDKN2A* homozygot deletiert, der *IFNA* Lokus ist jedoch nicht betroffen. *PIK3CA* und *FGFR3* sind wildtypisch. In diesem deutlich instabileren Genom mit einer Vielzahl chromosomaler Veränderungen sind insbesondere die in Abbildung V.1-1 gezeigten, späten chromosomalen Veränderungen der *high grade* Tumoren hervorzuheben: Zugewinn von Chromosom 7, sowie Deletionen von Chromosom 3p, 4p, 18, 6q, 5q.

Die wahlweise Inaktivierung der Zellzyklusinhibitoren $p14^{ARF}$ mit $p16^{INK4A}$ (*CDKN2A*) oder pRB, die in allen Urothelkarzinomzelllinien nachweisbar ist, scheint eine notwendige Voraussetzung zur Kultivierung dieser und vieler anderer epithelialer Tumore darzustellen [139]. Ein Großteil der verfügbaren Zelllinien hat ebenfalls inaktivierende oder *gain-of-function* Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53*, möglicherweise um die Seneszenz oder Apoptose als Folge einer gestörten Zellzyklusregulation zu umgehen und damit eine Voraussetzung zur Immortalisierung der Zelllinien zu schaffen [140]. Generell sind Mutationen und Deletionen im Gen *p53* mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Urothelkarzinomen assoziiert, obwohl die zugrunde liegenden Studien Diskrepanzen aufweisen [141, 142]. Ein Großteil der Diskrepanzen ist auf die verwendeten diagnostischen Antikörper zurückzuführen [143]. Während der *p53* Analysen mussten wir feststellen, dass die beiden einzigen Antikörper (DO11 und DO12 [144]), die eindeutig *p53*Δ133 Isoformen identifizieren können, nicht mehr kommerziell produziert werden. Daher mussten wir auf den pAB240 Antikörper umsteigen, der Sequenzen in der *p53* DNA Bindedomäne erkennt, aber anders als die DO11, DO12 Antikörper nicht absolut spezifisch für die untersuchten Isoformen ist.

Keine der beiden papillären Urothelkarzinomzelllinien weist die häufig auftretenden Chromosom 17p Verluste auf, die Allelverluste des *p53* Gens anzeigen. Obwohl weder Methylierungsveränderungen im Promotor, noch Gendosisverluste oder Mutationen in der DNA Sequenz von *p53* nachweisbar waren, wurden *p53* Isoformen auf mRNA und Proteinebene identifiziert, die zusätzlich (BC61) oder ausschließlich (BC44) vom alternativen Promotor P2/int4 transkribiert wurden.

Die gebildeten p53 Δ 133 Isoformen waren in der BC44 Zelllinie und im Primärtumor zytoplasmatisch und an der Zellmembran lokalisiert, aber kaum im Zellkern (vgl. Ergebnisteil Abbildung IV.3 ICC und IHC). Im Gegensatz dazu waren in der BC61 Zelllinie und im Primärtumor alle p53 Isoformen ausschließlich im Nukleus lokalisiert. Dies könnte bedeuten, dass die p53 Δ 133 Isoformen in den beiden Zelllinien ein unterschiedliches Zielgenspektrum haben. Nach der gängigen Vorstellung wird die Transkription der p53 Δ 133 Isoformen vom P2/int4 Promotor durch Bindung von TA-p53 Protein an REs (*responsive elements*) im Intron 3, Exon 4 und Intron 4 autoreguliert [145]. Die gebildeten p53 Δ 133 Isoformen bilden mit wildtypischem p53 im Nukleus ein Tetramer und verhindern damit die Aktivierung bestimmter Zielgene, wie beispielsweise *CDKN1A/p21^{CIP1}*, miR34a und *MDM2* [25]. Somit können die p53 Δ 133 Isoformen der von wildtypischem p53 induzierten Seneszenz und Zellzyklusinhibition entgegenwirken. Vor diesem Hintergrund ist die alleinige Expression der p53 Δ 133 Isoformen ohne TA-p53 unerwartet. Weniger überraschend ist dann die Lokalisation der solitären p53 Δ 133 Proteine im Zytoplasma und an der Zellmembran. Da diese Isoformen selber nicht an die DNA binden können, werden sie möglicherweise nicht im Nukleus gehalten. Im Zytoplasma könnten sie mit Proteinen und nicht-kodierenden RNAs interagieren und somit Apoptose und Seneszenz inhibieren [26, 146].

P53 ist in invasiven Urothelkarzinomen häufig durch Gendosisverluste und Mutationen inaktiviert. Insofern kann die hier erstmals beschriebene überwiegende oder ausschließliche Expression der p53 Δ 133 Isoformen eine zusätzliche Möglichkeit zur p53 Inaktivierung darstellen. In papillären Tumoren, in denen p53 (noch) nicht mutiert ist, könnte die Verwendung des alternativen Promotors P2/int4 eine neue Möglichkeit sein, um wildtypisches p53 zu inhibieren und die Tumorprogression zu gewährleisten. Bisher wurden die p53 Δ 133 Isoformen jedoch nur in wenigen Zelllinien und Tumorgewebe analysiert und detektiert.

Obwohl keine p53 Mutationen in BC44 identifiziert wurden, ergab die Sequenzierung zwei bekannte Polymorphismen. Die Zelllinie BC44 hatte eine homozygote 16 bp Deletion im Intron 3, bekannt als *rs17878362* Polymorphismus, dessen Bedeutung im Urothelkarzinom noch unklar ist. Allerdings zeigten *in silico* Analysen, dass die Deletion teilweise eine autoregulatorische p53 Bindestelle im Intron 3 zerstört [25].

Ein weiterer, in beiden Zelllinien detektierter Polymorphismus, R72P, ist gut bekannt und in vielen Tumoren untersucht worden. Im Großteil der Studien (u.a. im Mammakarzinom, Cervixkarzinom und Non-Hodgkin Lymphom) wurde die Arginin-Isoform mit einer schlechteren Prognose assoziiert, während die Prolin-Variante keine oder wenige Auswirkungen hatte [147, 148], so auch im Urothelkarzinom für Menschen europäischer Abstammung. Für die asiatische Bevölkerung sei einer aktuellen Meta-Analyse nach die Prolin-Variante mit einem erhöhten Risiko für Urothelkarzinome verbunden [149]. Beide Polymorphismen scheinen zueinander im Kopplungsungleichgewicht zu stehen [150].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die beiden Zelllinien papillärer Urothelkarzinome typische Karyotypen für bestimmte progressive Subtypen besitzen und hinsichtlich ihres Progressionspotentials an unterschiedlichen Punkten in der Entwicklung von papillären *high grade* Urothelkarzinomen zu invasiven Karzinomen stehen. Die BC61 Zelllinie steht am Anfang dieser Entwicklung und begrenzt möglicherweise die Wirkung ihres wildtypischen p53 Proteins durch zusätzliche Expression der p53 Δ 133 Isoformen, während die invasive, metastasierte BC44 Zelllinie am Ende der Tumorentwicklung steht und ausschließlich nicht-TA-p53 Isoformen bildet. Beide Zelllinien stellen damit neue und einzigartige Modelle zur Analyse von papillären Urothelkarzinomen einerseits und von p53-abhängigen Prozessen andererseits dar.

V.2 Epigenetische Inaktivierung der beiden Notch Regulatoren DLK1 und MEG3

DLK1 und *MEG3* sind zwei im Notch Signalweg involvierte Gene. *DLK1* ist ein nicht-kanonischer Notch Ligand und die nicht-proteinkodierende RNA *MEG3* reguliert die Stabilität von zahlreichen Komponenten dieses Signalwegs direkt oder indirekt [75, 151]. Beide Gene waren signifikant vermindert im Tumorgewebe und in den Zelllinien. Wir haben verschiedene Kontrollregionen identifiziert, die gegenüber normalem Blasengewebe Veränderungen in der DNA-Methylierung, im globalen Chromatinstatus und in Histonmodifikationen zeigten. Diese Ergebnisse lassen sich in folgender These zusammenfassen: „Ein neuer epigenetischer Mechanismus im Urothelkarzinom ist für die gemeinsame Inaktivierung des nicht-kanonischen Liganden *DLK1* und seiner regulatorischen RNA *MEG3* auf 14q32.2 verantwortlich.“

Zu den häufigen chromosomalen Aberrationen im Urothelkarzinom gehören Veränderungen auf dem Chromosomenarm 14q, die verschiedenen Studien zufolge 20-70% (abhängig vom Stadium) aller Urothelkarzinome betreffen und in invasiven Urothelkarzinomen deutlich häufiger auftreten als in papillären [152, 153]. Insbesondere wurden in muskelinvasiven Urothelkarzinomen in 40% der Fälle Verluste und in 31% Zugewinne gefunden [154]. Auch unseren Daten zufolge waren Gendosisveränderungen in fast 60% der Urothelkarzinome zu finden, bei dem größeren Teil (36%) handelte es sich um Zugewinne.

Allelotype Profiling in Urothelkarzinomen zeigte zudem, dass der kombinierte LOH der Chromosomen 9p und 14q mit einer deutlich schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert war und 14q LOH ein spätes Ereignis in der Tumorentwicklung darstellt, das auf Veränderungen von Chromosom 8 oder Chromosom 17 folgt (Abbildung V.2-1). In allen Studien [152-155] ließen die Daten den Schluss zu, dass auf dem Chromosomenarm 14q Tumorsuppressoren lokalisiert sein könnten.

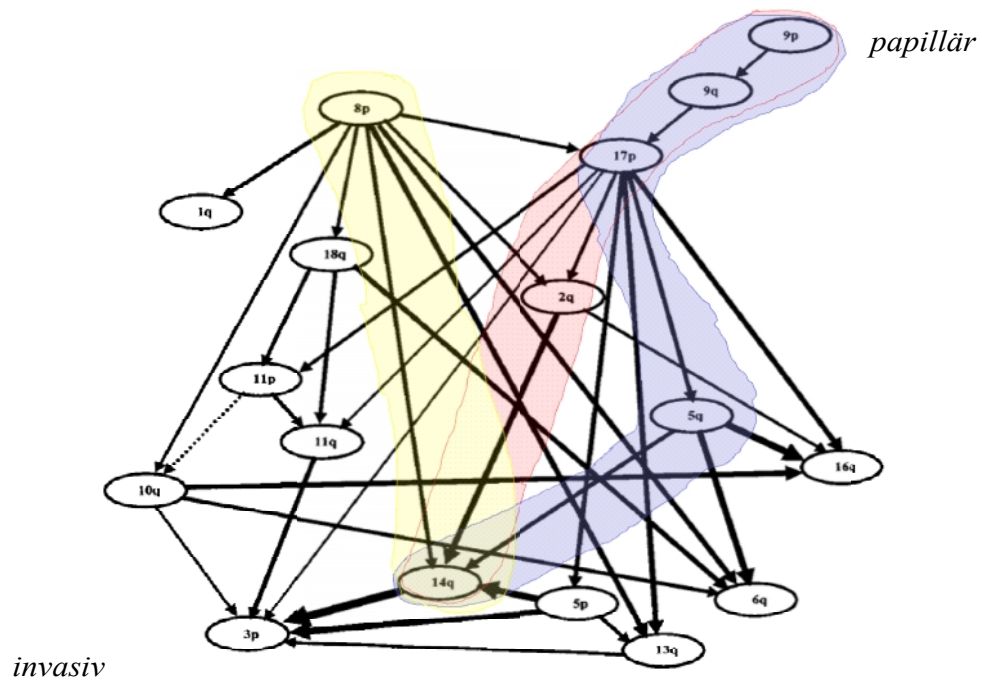


Abbildung V.2-1 Bayesianisches Netzwerk im Urothelkarzinom, modifiziert nach [156]. Diesem Rechenmodell zufolge steht der 14q LOH mit drei typischen Wegen chromosomaler Veränderungen in Beziehung. Der 14q LOH folgt entweder auf 9p-17p-2q Veränderungen (rot), oder auf 9p-17p-5(p/q) Veränderungen (blau) oder auf 17p unabhängigen Veränderungen über 8p Veränderungen (gelb). Gestrichelte Pfeile bedeuten negative Beziehungen, fett gedruckte Pfeile bedeuten positive Beziehungen. Die Dicke der Pfeile symbolisiert die Beziehungsstärke.

Als mögliche Tumorsuppressoren auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2 haben wir die mit dem Notch Signalweg interagierenden Gene *DLK1* und *MEG3* identifiziert und im Detail in der neuen papillären gut differenzierten Urothelkarzinomzelllinie BC61 und in einer weiteren invasiven Urothelkarzinomzelllinie papillären Ursprungs SW1710 untersucht. Entsprechend der Literaturangaben konnten wir 14q Allelverluste nur in SW1710 Zellen mittels Gendosisanalysen detektieren; die Gendosis in BC61 erschien normal (also vier Kopien in dem pseudotetraploiden Genom).

Die beiden Gene *DLK1* und *MEG3* sind Teil des größten bekannten, elterlich geprägten (*imprinted*) Genclusters. Ihre Genexpression wird über die differenziell methylierten Regionen, IG DMR und *MEG3* DMR, kontrolliert. In Tumoren führen Deletionen, Allelverluste und Epimutationen in diesen beiden Regionen dazu, dass entweder *DLK1* oder *MEG3* entsprechend vermindert oder verstärkt exprimiert werden.

So wird *DLK1* in Nierenkarzinomen vermindert exprimiert [81], im Leberkarzinom, AML (Akute Myeloische Leukämie), Kolon-, Pankreas-, Mamma-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs verstärkt exprimiert [132, 157, 158]. *MEG3* wirkt in Tumoren eher tumorsuppressiv [82, 159]. Wir fanden den Literaturdaten entsprechend in HepG2 (Leberkarzinom) *DLK1* sehr hoch exprimiert vor und *MEG3* in Caki1 (Nierenkarzinom) stark exprimiert. Alle Studien haben gemeinsam, dass in den Tumoren nur eines der beiden elterlich geprägten Gene verändert exprimiert wird. Allelverlust (LOH) des maternalen Chromosoms erhält ausschließlich die Expression des paternalen Gens *DLK1*, während Allelverlust des paternalen Chromosoms die maternale *MEG3* Genexpression erhält. In allen beschriebenen Fällen kommt es daher zu einer Homogenisierung des Methylierungsmusters zu dem des paternalen oder maternalen Allels. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass keine bisherige Arbeit die epigenetischen Veränderungen in derartigem Detail untersucht hat wie die jetzige.

Im Gegensatz dazu legen unsere Daten nahe, dass beide Gene, *DLK1* und *MEG3*, als Tumorsuppressoren im Urothelkarzinom in Betracht kommen, da beide in Tumorgewebe und Zelllinien gleichermaßen hoch signifikant vermindert oder gar nicht mehr exprimiert werden. Zusammen mit dem Befund, dass die maternalen in Antisense-Richtung transkribierten miRNAs innerhalb des Gens *RTL1*, sowie im miRNA Cluster zwischen *RTL1* und *DIO3* epigenetisch inaktiviert sind [80, 160], liegt der Schluss nahe, dass sich die Inaktivierung über das gesamte Cluster erstreckt und von mindestens einem gemeinsamen Regulator ausgeht.

Obwohl die transkriptionelle Inaktivierung von *DLK1*, *MEG3* und der miRNAs prinzipiell durch genetische Mechanismen (also Allelverluste durch Deletionen) verursacht sein könnte, legen unsere Daten eine epigenetische Inaktivierung nahe. Basierend auf den folgenden Befunden können wir zeigen, dass die epigenetischen Veränderungen beide Kontrollregionen (IG DMR und *MEG3* DMR) betreffen und sich grundlegend von den in anderen Tumoren beschriebenen Methylierungsveränderungen [78, 132, 157] unterscheiden:

1. In gesundem Blasengewebe waren die Kontrollregionen differenziell methyliert und ermöglichten die schwache Expression des väterlichen Gens *DLK1* von einem mäßig stark methylierten *DLK1* Promotor, sowie eine vielfach stärkere Expression des mütterlichen Gens *MEG3*.

2. Im Urothelkarzinomgewebe und in den Zelllinien zeigten DNA-Methylierungsanalysen ein neues gestreiftes Muster in den Kontrollregionen und im *DLKI* Promotor mit abwechselnd vollständig methylierten und unmethylierten Abschnitten. Anhand der Methylierung lässt sich kein Imprinting mehr nachweisen, trotzdem handelt es sich nicht um LOI (*loss of imprinting* verursacht durch Allelverlust).
3. In den Urothelkarzinomzelllinien prognostizierten *in silico* Analysen zur Nukleosomenpositionierung und die Überlagerung mit den DNA-Methylierungsdaten aus diesen drei Regionen, dass sich die methylierten Sequenzen um Histone winden und die unmethylierten Abschnitte am ehesten in Linkerregionen vorkommen. Analysen zur Nukleosomenpositionierung und zur Chromatinzugänglichkeit bestätigten die Präsenz von fixierten Nukleosomen in der IG DMR, sowie unzugängliches Chromatin und stark angereicherte Histonmodifikationen H3K27me₃, H3K9me₃ und H4K16ac in allen analysierten Bereichen.
4. Die DNA-Methylierungsveränderungen sind unabhängig von den Gendosisveränderungen. Die gefundenen gestreiften Methylierungsmuster wurden unabhängig davon beobachtet, ob 1, 2 oder 3 Genkopien vorliegen (Vergleiche dazu die Zelllinie SW1710 mit nur einem Allel).
5. In keiner anderen Tumorentität wurde bislang die gemeinsame Inaktivierung der beiden elterlich geprägten, aber reziprok regulierten Gene beschrieben. Dies könnte auch darin begründet sein, dass in den anderen Fällen Hypermethylierung oder Hypomethylierung in Folge von Allelverlusten die Expression von nur einem Gen beeinträchtigen und die elterliche Prägung auf andere Weise aufgehoben wird.

Diese Befunde lassen LOH als Mechanismus zum Verlust der Genexpression beider Gene sehr unwahrscheinlich erscheinen. LOH des paternalen Allels würde zum Verlust der differentiellen Methylierung führen und müsste in hypomethylierten Kontrollregionen resultieren. Umgekehrt würde LOH des maternalen Allels zu hypermethylierten DMRs führen. Die Ergebnisse schließen auch den Mechanismus des *parental type switching*, also eine epigenetische Angleichung des DNA-Methylierungsmusters aus, das entscheidend unterschiedlich zu unseren Befunden entweder dem normalen maternalen oder paternalen Muster entspricht.

Tatsächlich zeigten einige Urothelkarzinomgewebe und Zelllinien in Übereinstimmung mit der Literatur Allelverluste [153-155]. Das gestreifte Methylierungsmuster in den DMRs kann aber weder dem väterlichen noch dem mütterlichen Allel zugeordnet werden, sondern bildet ein neues von LOH und Imprinting unabhängiges Methylierungsmuster.

Dieses Methylierungsmuster deutet auf grundlegende Veränderungen des epigenetischen Zustands auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2 hin. Für den benachbarten Chromosomenabschnitt 14q11 wurde im invasiven Urothelkarzinom bereits gezeigt, dass die koordinierte Inaktivierung eines ganzen Chromosomenabschnitts nicht allein von der CpG-Methylierung, sondern vielmehr von H3K9 und H3K27 Hypermethylierung abhängt [161].

Die Tri-Methylierung beider Histonmodifikationen ist charakteristisch für inaktivierte, heterochromatische Bereiche und verhindert die transkriptionelle Aktivierung der Gene in ihrer Umgebung [162]. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Vallot *et al.* [161] zur 14q11 Region konnten wir eine sehr starke Anreicherung dieser repressiven Histonmodifikationen mit Hilfe der ChIP Analysen in allen regulatorischen Regionen des 14q32.2 Genclusters zeigen. Bemerkenswert ist, dass trotz der generellen Hypoacetylierung von H4K16 in Tumoren [163, 164] die ChIP Analysen eine starke Anreicherung von H4K16 Acetylierung zeigten. Diese Modifikation, das gestreifte Methylierungsmuster und die Versuche zur Chromatinzugänglichkeit weisen auf fixierte Nucleosomen hin. Der *Nucleosomen Scanning Assay* (NuSA) deutet auf signifikante Unterschiede in der Nucleosomenpositionierung zwischen Zelllinien mit dem gestreiften Methylierungsmuster (BC61 und SW1710) und Zelllinien (Fibroblasten und HepG2) mit einem homogenen Methylierungsmuster hin.

Bei den bioinformatischen Analysen fiel uns eine weitere regulatorische Region zwischen *DLK1* und *MEG3* auf, die als gewebespezifischer *Enhancer* wirken könnte. Sie war übereinstimmend mit den *ENCODE* Daten im *UCSC genome browser* in HepG2 für Nuklease zugänglich. Diese Region zeichnet sich durch drei repetitive Abschnitte mit Bindestellen für Transkriptionsfaktoren aus, die eine endodermale Spezifizierung bewirken können.

Dieser *Enhancer* erschien durch unzugängliches Chromatin in Caki1 (Niere entwickelt sich aus Mesoderm) inaktiv, in proliferativen Urothelzellen (Blase aus Endoderm) nahezu inaktiv und in Urothelkarzinomzelllinien komplett inaktiv.

In der hepatozellulären Zelllinie HepG2 waren alle regulatorischen Bereiche hypermethyliert. Trotzdem wurde *DLK1* (stark) exprimiert, *MEG3* jedoch nicht. Dies deutet auf einen Verlust des maternalen Allels hin. Nach gängiger Hypothese müssten durch das homogene DNA Methylierungsmuster beide Kontrollregionen inaktiviert sein. In dieser Konstellation könnte die starke *DLK1* Expression durch den endodermalen, aktiven *Enhancer* bestimmt werden. Dieser Zusammenhang muss im Detail noch untersucht werden.

Während differenzielle Methylierung der beiden DMRs in der normalen Blase gefunden wurde, war in Fibroblasten nur die IG DMR differenziell methyliert. Offensichtlich ist Imprinting in den Kontrollregionen gewebespezifisch und auf die epithelialen Kompartimente der Harnblase beschränkt. Das neue gestreifte Methylierungsmuster war in den Urothelkarzinomzelllinien und -geweben besonders stark in der *MEG3* DMR ausgeprägt und war dem *MEG3* DMR Methylierungsmuster in Fibroblasten ähnlicher. Dass die Unterschiede zwischen Epithel und Fibroblasten ebenso wie die Veränderungen in den Karzinomen am ehesten die *MEG3* DMR betreffen, kann dadurch erklärt werden, dass diese DMR nach der Befruchtung im frühen Embryo neu etabliert wird, während die IG DMR in den Gameten angelegt wird und erhalten bleibt [78]. Dies scheint die *MEG3* DMR empfindlicher gegenüber Störungen als die IG DMR zu machen. Der Wechsel des „epithelialen“ Methylierungsmusters zu einem „mesenchymalen“ Methylierungsmuster der *MEG3* DMR lässt sich jedoch auch im Zusammenhang mit epithelialer-mesenchymaler Transition (*EMT*) der Tumorzellen sehen.

Normale, kultivierte proliferative Urothelzellen spiegelten ebenfalls DNA-Methylierungsveränderungen der *MEG3* DMR wieder, sowie eine unzugängliche Chromatinkonstitution, die nur noch eine abgeschwächte *MEG3* Expression, und sehr geringe *DLK1* Expression, ermöglichte. Imprinting in der IG DMR blieb jedoch erhalten. Auffällig war die starke Variabilität dieser Veränderungen von Kultur zu Kultur. Diese lässt sich so interpretieren, dass unter Kulturbedingungen progressive epigenetische Veränderungen in den Kontrollregionen entstehen.

Diese wurden entsprechend in einer Urothelzelllinie entdeckt, die durch Immortalisierung normaler Urothelzellen mittels hTERT erzeugt wurde und einen stabilen diploiden Chromosomensatz aufweist, aber ein von normalen, nicht-immortalisierten Urothelzellen abweichendes Genexpressionsprofil besitzt (Daten nicht gezeigt) [39].

Diese Veränderungen wurden nicht auf dem Chromosomenabschnitt 14q11 beobachtet und scheinen daher spezifisch für das *DLK1-MEG3* Gencluster zu sein. Hinweise für eine veränderte Methylierung durch Kultivierung normaler Zellen liefert die Arbeit von Pantoja *et al.* 2005 [165], die Expressions- und Methylierungsveränderungen von elterlich geprägten Genen wie *Cdkn1c*, *Meg3*, *Igf2*, *H19*, *Ndn1*, *Grb10* und Zellzyklus assoziierten Genen wie *Cdkn2a* aufzeigt. Als zu Grunde liegender Mechanismus wurde *de-novo* Methylierung, ausgelöst durch Zellkulturstress, verantwortlich gemacht. Möglicherweise könnten also die Zellkulturbedingungen die Regulation und Expression des *DLK1-MEG3* Clusters derart verändern, dass die normalen Urothelzellen ebenfalls epigenetische Veränderungen zeigen, die denen in Urothelkarzinomzelllinien ähneln. In der immortalisierten, normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC würden sich diese Veränderungen unter Kultureinfluss progressiv fortsetzen. Die Methylierung im *DLK1-MEG3* Cluster könnte *in vitro* durch Medienzusätze wie Ascorbinsäure beeinflusst werden [166]. Ascorbinsäure ist nach Auskunft der Firma Invitrogen jedoch nicht im *Keratinocyte Serum Free Medium* enthalten. Aus den genannten Gründen eignen sich die kultivierten Urothelzellen jedenfalls nicht als adäquate Normalkontrollen. Dass Veränderungen in UPs auftreten, erklärt möglicherweise auch, warum in den Studien zum *Epigenom-Profiling* im Urothelkarzinom die Veränderungen auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2 nicht auftauchen. Die Experimente beruhen auf Vergleiche zwischen Urothelkarzinomzelllinien und proliferativen Urothelkulturen (UP, in der Literatur auch NUEC) [161, 167].

Die Überlegungen führen zu folgendem Modell (Abbildung V.2-2) für die Regulation des *DLK1-MEG3* Cluster auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2 im Urothelkarzinom. In der normalen Blase (A) wird eine schwache *DLK1* Expression und starke *MEG3* Expression durch die regulatorischen Regionen (Promotor, DMRs) erzeugt. Wie in der Literatur gezeigt, könnte die nicht-proteinkodierende RNA *MEG3* die *DLK1* Expression negativ beeinflussen [168]. Im Urothelkarzinom (D) vermindern das neu gestreifte Methylierungsmuster in der *MEG3* DMR und die Hypermethylierung des Promotors die Expression von *DLK1* und *MEG3*. Das noch bestehende Imprinting der IG DMR könnte eine *MEG3* Restexpression ermöglichen. Ähnliche Veränderungen in kultivierten Urothelzellen (B) könnten auf Zellkulturstress zurückzuführen sein.

In Urothelkarzinomzelllinien (C) ist der gesamte Abschnitt epigenetisch inaktiviert mit entsprechenden Auswirkungen auf die umliegenden Gene und regulatorischen RNAs.

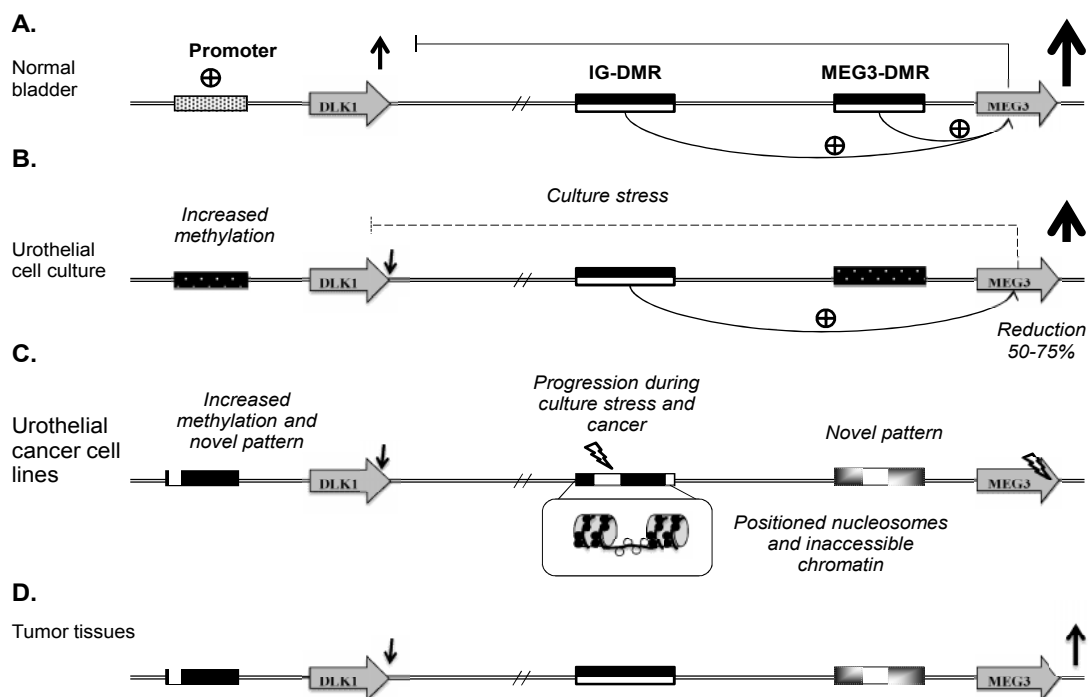


Abbildung V.2-2 Veränderungen auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2. (A) Imprinting in dieser Region ermöglicht eine schwache monoallelische *DLK1* Expression und eine starke *MEG3* Expression. (B) Durch Zellkultur induzierte Methylierungsveränderungen der *MEG3* DMR und des *DLK1* Promotors vermindern die *MEG3* Expression und inaktivieren zunehmend *DLK1*. (C) Progressive epigenetische Veränderungen inaktivieren *DLK1* und *MEG3*. (D) Der Erhalt der IG DMR ermöglicht eine verminderte *MEG3* Expression, trotz aberranter *MEG3* DMR Methylierung. *DLK1* ist nahezu inaktiviert infolge der Promotorhypermethylierung.

V.2.1 Bedeutung einer deregulierten *DLK1*, *MEG3* und *p53* Expression in papillären und invasiven Urothelkarzinomen

Der prognostisch relevante 14q LOH in muskelinvasiven Urothelkarzinomen ist eine Konsequenz der schon in papillären, genomisch stabilen Urothelkarzinomen auftretenden, drastischen epigenetischen Veränderungen der elterlich geprägten Gengruppe *DLK1-MEG3*. Aktuelle Arbeiten weisen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus, der Genexpression und der Gendosis im Urothelkarzinom hin [169]. Äquivalent zur mutationsunabhängigen Inaktivierung der wildtypischen p53 Funktion durch p53 Δ 133 Isoformen können epigenetische Veränderungen ohne notwendige Gendosisverluste eine ganze Gengruppe schon früh in der Tumorentwicklung inaktivieren.

V.3 Die Bedeutung der Differenzierung für Urothelkarzinome

Neben den wesentlichen charakteristischen Merkmalen (*Hallmarks*) [170] einer Tumorzelle ist insbesondere die Fähigkeit zur anhaltenden Proliferation eng mit der Differenzierung einer Tumorzelle assoziiert. Dieser Aspekt wird in der neueren Literatur oft vernachlässigt, er hat aber in dieser Arbeit einen hohen Stellenwert.

Wir konnten zeigen, dass normale Urothelzellen, aber auch papilläre Urotheltumoren *in vitro* durch die Zugabe von Kalzium ein Differenzierungsprogramm starten, das zur Ausbildung mehrschichtiger Epithelstrukturen führt - vergleichbar mit dem Urothel *in vivo*. Dabei wurden die Zytokeratine detektiert, die mit bestimmten Differenzierungszuständen im Urothel assoziiert sind, sowie eine zunehmende Expression der Zellzyklusinhibitoren *p21* und *p27*. Dabei veränderte sich auch die Expression der Notch Rezeptoren, Liganden und der putativen Zielgene unter Kalziumbehandlung. Allerdings unterschieden sich die Veränderungen in der Genexpression im Notch Signalweg zwischen normalen Urothelzellen und papillären Urothelkarzinomzellen, mit einer Verschiebung der Induktion von Rezeptoren zu Liganden. Dies lässt sich in der folgenden Hypothese zusammenfassen: „Gut differenzierte papilläre Urothelkarzinomzellen können mehrschichtige Urothelstrukturen bilden, die Differenzierungsfähigkeit ist jedoch durch Veränderungen in differenzierungsassoziierten Signalwegen beschränkt.“

Das Urothel besteht aus drei unterschiedlichen differenzierten Zelltypen, den einreihigen Basalzellen, den mehrreihig angeordneten Intermediärzellen und einschichtigen Deckzellen (siehe Einleitung). Jedem Differenzierungsgrad können unterschiedliche Zytokeratine zugeordnet werden. So exprimieren stammzellähnliche Populationen innerhalb der Basalzellen CK14, frühe Intermediärzellen CK5 und mit zunehmender Differenzierung wird CK8/18 exprimiert. Terminal differenzierte Zellen exprimieren CK20 und die urothelspezifischen Proteine Uroplakine (UPK) Ia, Ib, II und III, die in die charakteristischen Plaques der Deckzellen eingebettet werden. Mit Ausnahme von Uroplakin Ib sind die Uroplakine in der menschlichen Harnblase auf die Deckzellen beschränkt [171]. Einer aktuellen Arbeit [3] zu Folge können Urothelkarzinome aus jedem der drei Differenzierungszustände hervorgehen (mit dem für sie typischen Zytokeratinprofil) und ihrerseits Tumore mit der gleichen Zellhierarchie oder einem stärker differenzierten Zustand hervorbringen.

So können entartete Basalzellen (gering differenziert) wiederum einen heterogenen Tumor hervorbringen, der CK14, CK5 wie CK18/CK20 positive Zellen enthalten kann (Abbildung V.3-1).

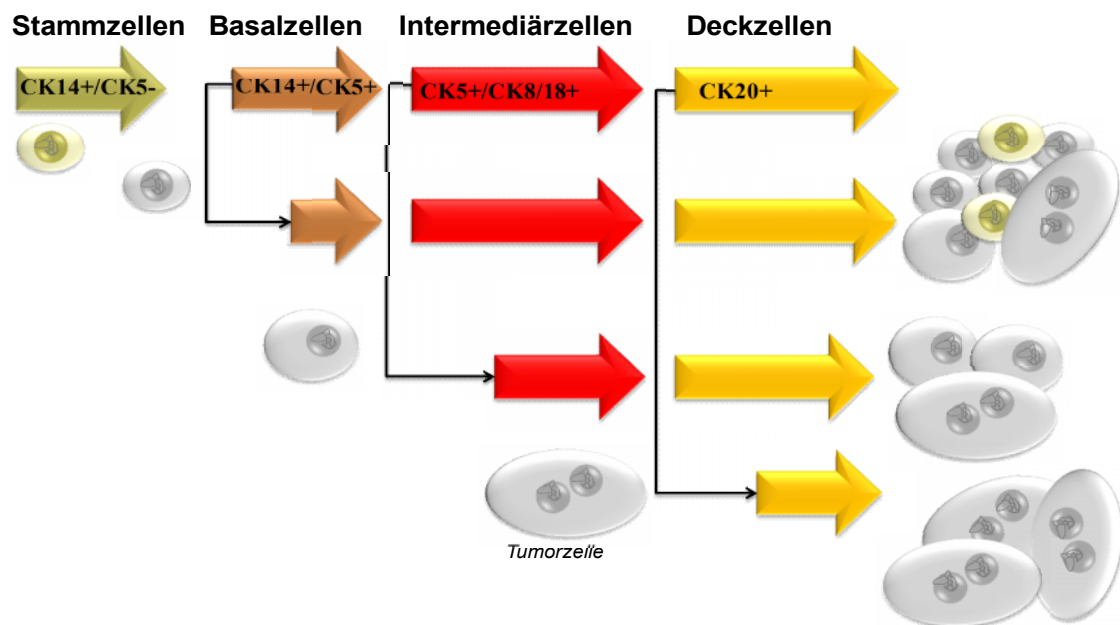


Abbildung V.3-1 Urothelkarzinome können aus verschiedenen Differenzierungsstadien entstehen, modifiziert nach Volkmer et al. [3]. Die Differenzierungsstadien sind durch verschiedene Zytokeratine charakterisiert: CK14, CK5, CK8/18 und CK20. Die Stammzellen als CK14+ Zellpopulation charakterisiert, Basalzellen als CK14+/CK5+, Intermediärzellen als CK5+ und zunehmend auch CK8/18+ und Deckzellen als CK20+ Zellen charakterisiert.

Dieser Befund war unerwartet, da vorherige Arbeiten gezeigt haben, dass ein Differenzierungsblock in vielen Urothelkarzinomen die Ausbildung weiterer differenzierter Phänotypen verhindert, sich das Zytokeratinprofil im Verlauf der Tumorprogression verändern kann und *de-novo* Expression von Zytokeratinen möglich ist, genauso wie eine nicht mehr auf eine Zellschicht beschränkte Zytokeratinexpression [172]. Ein Beispiel dafür ist die aberrante CK20 Expression in v.a. papillären Urothelkarzinomen, die nicht mehr nur auf die terminal differenzierten Deckzellen beschränkt ist [173]. Weiterhin kann eine *de-novo* Expression von CK14 eine plattenepitheliale Dedifferenzierung anzeigen [172, 174, 175]. Letzteres zeichnet sich durch eine Verhornung (Keratinisierung) und Schichtung (Stratifizierung) des Epithels aus [176], die sich von der typischen Stratifizierung des Urothels unterscheidet. Der Wechsel von einem uroepithelialen zu einem mesenchymalen und/oder plattenepithelartigen Phänotypen wird als Transdifferenzierung bezeichnet [177, 178].

Am Beispiel der papillären Urothelkarzinomzelllinie BC61 und der proliferativen Urothelzellkultur UP220 wurden die Zellkulturen und deren Differenzierungspotential analysiert (Abbildung V.3-2). In Übereinstimmung mit publizierten Daten [179] exprimierte die normale Urothelzellkultur überwiegend die Zytokeratine *CK14* und *CK5*, die mit Basal- und Intermediärzellen assoziiert sind, und nur einen sehr geringen Anteil an terminal differenziertem Zytokeratin *CK20*. Der prozentuale Anteil von *Uroplakin 2* und *CK20* war in der papillären Urothelkarzinomzelllinie BC61 und der proliferativen Urothelzellkultur UP220 ähnlich. Auffällig war die kaum detektierbare *CK20* Expression trotz einer spezifischen und sehr starken, nukleären *CK20* Färbung (Daten nicht gezeigt).

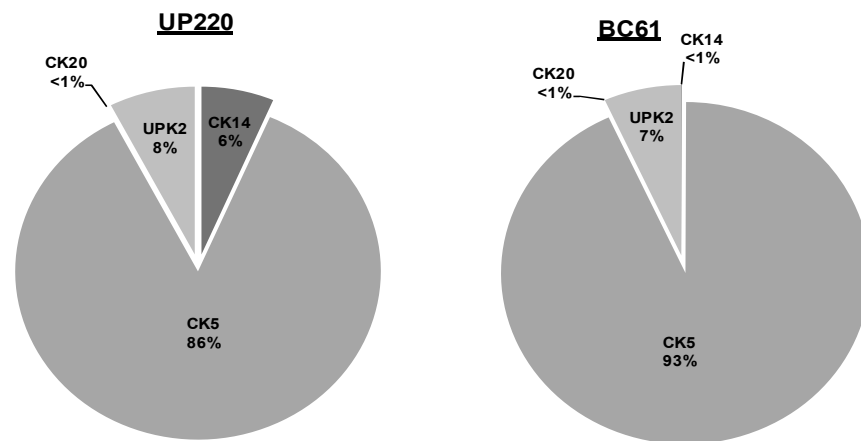


Abbildung V.3-2 Zytokeratinpopulationen in der normalen Urothelkultur UP220 und in der Urothelkarzinomzelllinie BC61, ermittelt aus der relativen Genexpression zum Referenzgen TBP. Die Prozentzahlen spiegeln die Gesamtexpression wider, nicht notwendigerweise den Anteil der Zellen, die das jeweilige Zytokeratin exprimieren.

In Übereinstimmung mit den eigenen Experimenten kann in proliferativen Urothelzellkulturen durch Erhöhung des Kalziumgehalts (1.2 mM Ca^{2+}) ein Differenzierungsprogramm gestartet werden, das zur Ausbildung von flächigen, mehrlagigen Urothelstrukturen führt [180]. Wie von anderen Gruppen [34, 172, 180, 181] beschrieben, konnte eine Zunahme differenzierungsspezifischer Marker (*CK20* und *UPK2*) erreicht werden, sowie eine Abnahme des Markers für undifferenzierte Zellen (*CK14*). Die Expression von *CK5* änderte sich kaum. Die Ausbildung der Urothelstrukturen war unvollkommen, trotzdem war das Differenzierungsprogramm erfolgreich initiiert worden.

Bislang fehlen noch Messungen zur Abnahme des Proliferationsmarkers *Ki67*, sowie eine immunozytochemische oder immunhistochemische Analyse der beobachteten mehrschichtigen Urothelstrukturen. Die Etablierung dieses Zellkulturmodells war notwendig, um die Differenzierungsfähigkeit von papillären Urothelkarzinomzelllinien, die ähnlich wie proliferative Urothelkulturen unter kalziumarmen Bedingungen (0.07 mM Ca^{2+}) kultiviert werden, untersuchen zu können. Dazu wurde die papilläre Urothelkarzinomzelllinie BC61 ausgewählt, die nach Zugabe von Kalzium über einen Zeitraum von minimal 6 bis maximal 12 Tagen (Ergebnisse aus zwei Experimenten) eine mehrschichtige Urothelstruktur ausbildete.

Damit ging eine verstärkte Expression von *CK20* und *UPK2* einher, sowie eine Abnahme von *CK14* und *CK5*. Die Western Blot Analysen zeigten zudem eine Abnahme von *Ki67* und eine Veränderung der exprimierten *CK8/18*-Isoformen.

Ein Versuch, in der schlecht differenzierten papillären Urothelkarzinomzelllinie BC44 das Differenzierungsprogramm zu starten misslang.

Die Daten weisen darauf hin, dass sich papilläre *low grade* Urothelkarzinome ähnlich wie Urothelkulturen noch stratifizieren lassen. *High grade* Urothelkarzinome scheinen dies entsprechend ihrer zu weit fortgeschrittenen Dedifferenzierung oder aufgrund eines Differenzierungsblocks nicht mehr zu vermögen. Weitere Experimente müssen zeigen, ob unter kalziumarmen Bedingungen etablierte papilläre *low grade* Tumorkulturen [32] ihr Differenzierungspotential generell behalten.

Alle anderen im Labor verfügbaren Urothelkarzinomzelllinien werden (unabhängig vom *Grading*) in Medium mit 1.8 mM Ca^{2+} kultiviert und differenzieren trotz der hohen Kalziumkonzentration nicht aus. Um zu testen, ob die Unempfindlichkeit gegenüber Kalzium reversibel ist, wurden zwei Urothelkarzinomzelllinien ausgewählt, die ähnliche Zellhierarchien aufweisen wie BC61 und UP220.

Die Kultivierung der beiden Zelllinien BFTC905 und HT1376 unter kalziumarmen Bedingungen begünstigte die Entstehung von Riesenzellen mit Meganuklei und weitere morphologische Veränderungen, die mit einer Störung kalziumabhängiger Zell-Zell-Kontakte einhergehen können. Obwohl die Kalziumsignaltransduktion in Urothelkarzinomzelllinien gestört ist, reagieren die Zellen auf die drastische Verminderung der Kalziumionenkonzentration möglicherweise mit einer veränderten Expression von Claudinen und der veränderten Bildung von *Adherens Junctions*, die die Haftung der Zellen auf dem Zellkulturflaschenboden und die direkten Zell-Zell-Kontakte vermindert [182-184]. Die intra- und interzellulläre Kalziumsignaltransduktion wurde bisher nur in der Urothelkarzinomzelllinie 5637 untersucht [182]; trotzdem ist davon auszugehen, dass die dort beschriebene Störung in der Kalziumsignaltransduktion auch die anderen Zelllinien betrifft.

Neben den morphologischen Veränderungen konnten auch Veränderungen im Zytokeratinprofil beider Zelllinien festgestellt werden, die insbesondere eine verstärkte Akkumulation von Zytokeratin CK5 (s. ICC, Abbildung IV.1-12B-C) beinhaltete, eine veränderte Lokalisation des Zytokeratins, sowie einen Wechsel der CK5-Isoformen (vgl. WB, Abbildung IV.1-12A). Zusätzlich wurde eine homogene Verteilung und veränderte Lokalisation von CK8/18 zwischen den Zellen beobachtet. Dies kann möglicherweise mit einer veränderten Phosphorylierung des Zytokeratinpaars CK8/18 zusammenhängen. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass zellulärer Stress eine veränderte Phosphorylierung an insgesamt fünf möglichen Serinen (drei Stellen an CK8, zwei an CK18) bewirken kann. Die Stärke der Phosphorylierung beeinflusst die Verteilung des Keratinpaars in einen löslichen zytosolischen Keratin-Pool und in einen unlöslichen filamentösen zytoskelettassoziierten Pool. Weiterhin kann es zu einer nukleär-zytoplasmatischen Relokalisation in Abhängigkeit von der Aktivität des serumabhängigen AKT/mTOR Signalwegs kommen [185-187]. Genau wie für CK8 wurde auch für CK5 eine veränderte Phosphorylierung als Antwort auf Stress gezeigt [188].

Möglicherweise ist auch die Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 auf den kalziuminduzierten Stress und die veränderte Zusammensetzung des Mediums zurückzuführen. Auf eine Erhöhung des Kalziumspiegels, der über 1.8 mM Ca^{2+} liegt, reagieren die BFTC905 Zellen mit einer partiellen Stratifizierung und Ablösung der Zellen. Um nachzuweisen, dass hier auch ein Zellzyklusarrest auftritt, müssten noch andere Gene, u.a. *CDKN1A* (p21) und *CDKN1B* (p27), gemessen werden.

Die Etablierung dieser Zellkulturmodelle und die Modulation der Kalziumkonzentration ermöglichen nun, wie in den vorherigen Abschnitten angesprochen, gezielt Veränderungen und Unterschiede zu untersuchen, die 1. abhängig von der Kalziumsignaltransduktion der normalen Urothelzellen und Urothelkarzinomzellen sind und 2. die mit einer urothelialen Differenzierung zusammenhängen. Daher konnten insbesondere die Differenzierungsversuche mit den BC61 Zellen und den UP220 Zellen Veränderungen in der Expression verschiedener Gene im Verlauf der Differenzierung und Dedifferenzierung aufzeigen. Ein Kandidat, der mit der Differenzierung in normalen Urothelzellen assoziiert sein könnte, ist der Notch Signalweg, der bekanntermaßen das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung gewebe- und zelltypspezifisch reguliert.

V.4 Notch in der Epidermis - ein Modell für den Notch Signalweg in Urothelzellen?

Die Differenzierungsexperimente haben gezeigt, dass sich die Genexpression der Notch Rezeptoren, Liganden und Zielgene während der Kalziumbehandlung verändert. Aufgrund der offensichtlichen Beteiligung dieses Signalwegs in der Modulation der Differenzierung wird der Notch Signalweg vergleichend in der Epidermis betrachtet, wo seine Bedeutung gut erforscht ist (s. Einleitung).

Unter Kulturbedingungen werden Keratinozyten in kalziumarmem Medium (nämlich KSFM mit 0.07 mM Ca^{2+}) gehalten. Die Erhöhung der Kalziumkonzentration auf mindestens 1.5 mM Ca^{2+} induziert das Differenzierungsprogramm und führt erstens zur Ausbildung mehrerer Schichten und zweitens zur Keratinisierung [38]. Als Antwort auf eine Kalziuserhöhung reagiert der Calcineurin/NFAT Signalweg auf einen langanhaltenden Kalziumstimulus und induziert Notch-abhängig die Expression des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A/p21* [189]. Auch in den Differenzierungsexperimenten mit normalen Urothelzellen konnte äquivalent zur Zunahme der Differenzierungsmarker (Zytokeratin und UPK2) eine Induktion von *CDKN1A/p21* als Hinweis auf einen Zellzyklusarrest gemessen werden. Ob die Induktion des Zellzyklusinhibitors mit einer Aktivierung des Calcineurin/NFAT Signalwegs assoziiert ist, wurde noch nicht untersucht. Auch in der Literatur ist die Bedeutung dieses Signalwegs im Urothelkarzinom unklar. Gezeigt wurde jedoch, dass in der normalen Blasenwand (Urothelzellen und mesenchymale Zellen) alle NFAT-Isoformen exprimiert werden und dieser Signalweg prinzipiell in Urothelzellen aktiviert werden kann [190].

Parallel zur erhöhten *CDKN1A* Expression konnte eine Zunahme der *NOTCH1* und *NOTCH2* Genexpression gemessen werden. Dies könnte, wie in der Epidermis, auf eine Induktion des Zellzyklusinhibitors nach Aktivierung des Notch Signalwegs hindeuten. In den papillären Urothelkarzinomzellen war die Induktion von *CDKN1A/p21* wesentlich schwächer, genauso wie die Expression der Notch Rezeptoren. Es konnte dagegen eine erhöhte Expression des kanonischen Liganden *JAGGED1* und des nicht-kanonischen Liganden *EGFL7* gemessen werden.

Dass die Urothelkarzinomzelllinien auf einen veränderten Kalziumspiegel - wenn auch unterschiedlich - reagieren können, wurde durch die Kalziumzugabe zum Medium in BC61 und durch Kalziumreduktion in BFTC905 und HT1376 gezeigt.

Kalzium beeinflusst offensichtlich die Adhärenz der Zellen, moduliert Signalwege und die Genexpression einer Vielzahl von Genen direkt oder indirekt. Daher wurde Kalzium als „*grandmaster cell signaler*“ [190a] beschrieben. Zusammen mit Notch, NFκB und TGFβ-Signalwegen reguliert es die Differenzierung und ist über einen Gradienten von der Basalschicht bis zur *Stratum Granulosum* für die vielschichtige Struktur der Epidermis verantwortlich [191]. Dieser Kalziumgradient funktioniert - äquivalent zu den Keratinozyten in der Epidermis - auch in den Krypten des Dickdarms [192] und im Mammaepithel [193]. Während der Tumorprogression werden die Tumorzellen (Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Prostatakarzinom) kalziumunempfindlich, u.a. durch Inaktivierung von speziellen Kalziumpumpen, und umgehen dessen differenzierungsfördernde Wirkung [192-194].

Obwohl das Urothel einen ähnlichen Aufbau wie die Epidermis hat (Basal-, Intermediär- und Deckschicht) und bereits gezeigt wurde, dass Urothelzellen *in vitro*, genau wie Keratinozyten, durch eine hohe Kalziumkonzentration ausdifferenzieren [180], fehlt eine Untersuchung zur Wirkung von Kalzium in Urothelzellen. Aufgrund des analogen Aufbaus liegt der Schluss nahe, dass im Urothel ein vergleichbarer Kalziumgradient herrschen könnte wie in der Epidermis. Dafür spricht auch, dass kalziumabhängige Transporter und Zell-Zellkontakte in Urothelkarzinomzelllinien ebenfalls verändert exprimiert werden [182]. Nur die in der Epidermis beschriebene Funktion von Kalzium beim Wundverschluss wurde bisher in Urothelzellen untersucht und verifiziert [195].

In der Epidermis kann eine Verminderung der Aktivität des Notch Signalwegs zur Bildung von Basalzelltumoren (BCC) führen [196]. Es wurde gezeigt, dass der kombinierte Verlust von *NOTCH1*, *NOTCH2* und *NOTCH3* am ehesten dem Phänotyp entspricht, der durch Deletion von Komponenten der γ-Sekretase erreicht wird. Die Inaktivierung der γ-Sekretase löst aggressivere Hauttumore (SCC) aus, sowie Zystenbildung der interfollikulären Epidermis [197]. Der Verlust von *NOTCH1* allein reicht aber aus, um die definierten Grenzen zwischen der unteren und der oberen Epidermis aufzuheben, weil die Wachstumskontrolle gestört ist. Dabei nimmt die *CDKN1A/p21* Expression ab, die Expression der Integrine steigt und die Zellen in allen Schichten, in denen *NOTCH1* vorher lokalisiert war, proliferieren übermäßig stark [198]. Daher wirkt der Notch Signalweg innerhalb der unteren Epidermis tumorsuppressiv [91].

Im Vergleich zur Epidermis war NOTCH1 im normalen Urothel besonders stark zytoplasmatisch in den terminal differenzierten CK20 positiven Deckzellen, weniger in den Intermediärzellen und kaum in den Basalzellen lokalisiert. NOTCH1 fand sich jedoch sehr stark (auch nukleär) im Muskel und Bindegewebe. In der Arbeit von Shi *et al.* [126], die sich ebenfalls auf Immunhistochemie stützt, wurde NOTCH1 dagegen gleichermaßen in allen Urothelschichten detektiert. In papillären Tumoren war nach unseren Daten, in Übereinstimmung mit Shi *et al.*, NOTCH1 eher membranständig und mit zunehmender Invasivität diffus zytoplasmatisch lokalisiert und später nicht mehr detektierbar. Diese Befunde sind vergleichbar mit der Lokalisation von NOTCH1 im SCC und BCC der Epidermis [92].

DELTA1 war mit NOTCH1 kolokalisiert. In Urothelkarzinomgeweben war eine sehr starke zytoplasmatische DELTA1 Färbung in papillären Tumoren detektierbar, die mit zunehmender Invasivität abnahm. Auffällig waren distinkte Zellgruppen innerhalb der Tumormasse mit einer nukleären und/oder membranständigen Proteinlokalisierung (vergleiche Abbildung V.3-6B). Dies wurde in der Arbeit von Shi *et al.* nicht erwähnt. Die immunhistochemischen Färbungen von NOTCH2 und JAGGED1 waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit noch nicht komplett durchgeführt. Nach Shi *et al.* waren auch die anderen Rezeptoren NOTCH2, NOTCH3 und NOTCH4, sowie JAGGED1 gleichermaßen im Urothel lokalisiert und in papillären und invasiven Urothelkarzinomen vermindert (Färbungen nicht gezeigt). Nach unseren vorläufigen Daten war JAGGED1 jedoch im normalen Urothel unterhalb der Deckzellen lokalisiert. Desweiteren fanden wir NOTCH4 auf mRNA Ebene in normalen Urothelkulturen und Urothelkarzinomzelllinien schwach oder gar nicht exprimiert, während die Expression im normalen Blasengewebe und Blasentumoren vergleichbar sehr hoch war. Möglicherweise ist NOTCH4 überwiegend im Bindegewebe oder Endothelzellen exprimiert [199] und daher in kultivierten Uroepithelzelllinien nicht detektierbar.

V.5 Verlauf und Wirkung des Notch Signalwegs in normalen und malignen Urothelzellen

V.5.1 Verteilung der Notch Komponenten im Gewebe

Trotz der verminderten NOTCH1 Expression in Urothelkarzinomen und Tumoren der Haut, besteht ein wesentlicher Unterschied in der Verteilung von NOTCH1 in den Zellschichten: Während NOTCH1 insbesondere in den terminal differenzierten Deckzellen des Urothels exprimiert ist, wird es in der suprabasalen Schicht, der *stratum spinosum*, detektiert, die eher mit den Intermediärzellen des Urothels zu vergleichen wäre. DELTA1 ist in der Epidermis nur in den Basalzellen in Stammzellen aktiv, im Urothel ist es mit NOTCH1 kolokalisiert. Weitere Experimente sind notwendig, um herauszufinden, ob DELTA1 auch im Urothel in den seltenen Stammzellen oder in einzelnen Vorläuferzellen vorkommt. Dafür könnte die intratumorale Heterogenität von DELTA1 in den analysierten Blasen Tumoren sprechen. (Die Heterogenität wird im Abschnitt V.5.5 ausführlich diskutiert).

Meine Daten lassen sich von daher nur schwer einordnen, weil es auch in der Literatur Schwierigkeiten bei der Interpretation gibt bezüglich der Bedeutung und Präsenz der NICD im Nukleus, der adäquaten Identifizierung der Zielgene, sowie der Eignung von Zelllinien als Modelle. Das Problem der NICD Detektion ist allgemein bekannt und rührt zum Teil aus der Wahl des Antikörpers her. Die endogene intrazelluläre Domäne (NICD) kann unter normalen Umständen nur schwer im Nukleus detektiert werden [200]. Trotzdem konnte das Modell, wonach ein „C-terminales Notch Segment“ [201] im Nukleus Zielgene aktiviert, in *Drosophila* und anderen Zellkulturmodellen bestätigt werden und wird generell akzeptiert. Die von den Notch Rezeptoren induzierten Zielgene sind häufig die Mitglieder der *HES* und *HEY* Familie. Allerdings wurde auch gezeigt, dass der überwiegende Teil der Zielgene gewebespezifisch reguliert und aktiviert wird und sowohl Zielgene von CBF1/RBPJκ abhängig, als auch unabhängig sein können [55, 202]. Die Expression von *HES* und *HEY* Genen kann zusätzlich oder ausschließlich von Notch unabhängig reguliert sein, insbesondere während der Tumorigenese [203]. Daher ist die Identifizierung der gewebespezifischen Notch Zielgene sehr wichtig. Hierzu gibt es keine Literaturdaten für das Urothel.

Des Weiteren ergeben sich Probleme bei der Bestimmung der Notch-Aktivität *in vivo* in Geweben und *in vitro* in Zelllinien. In vielen Tumoren werden NOTCH1 und JAGGED1 überaktiviert, beispielsweise in Mamma-, Pankreas-, Nieren- und Kolonkarzinomen und in Prostatakazinometastasen [87, 106, 107]. Eine Analyse in den entsprechenden Zelllinien spiegelt jedoch nicht immer den Zustand im Tumorgewebe wieder. So wurde in einigen Nierenkarzinomzelllinien eher eine verminderte Expression der Notch Rezeptoren gefunden. Auch in einigen Zelllinien aus dem Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinom konnte kein überaktiver Notch Signalweg identifiziert werden (siehe Referenz [204] und darin zitierte Referenzen).

Weder im normalen Urothel noch in Blasentumorgewebe oder in den Zelllinien konnte die intrazelluläre Domäne von NOTCH1 im Nukleus detektiert werden. Allerdings war in einigen Nuklei mesenchymaler Zellen die N1ICD detektierbar. Dies schließt aus, dass die fehlende N1ICD Präsenz von der Wahl des Antikörpers abhängt. Weiterhin konnte nach erfolgreicher Überexpression in den Zelllinien die N1ICD im Nukleus detektiert werden.

Ebenfalls unklar sind die urothelspezifischen Notch Zielgene. Die Differenzierungsexperimente zeigten nur eine sehr schwache Zunahme der *HES1* und *HEY1* Expression in normalen Zellen als Antwort auf eine Kalziumerhöhung, obgleich die Rezeptoren *NOTCH1* und *NOTCH2* deutlich induziert wurden. Überexpressionsexperimente mit der hN1ICD in zwei normalen Urothelkulturen bewirkten allenfalls eine moderate Zunahme der Genexpression. Korrelation der Expression im Gewebe wurde nicht gefunden (*HES1*, *HEY5*) oder war eher schwach (*HEY1*). Bedeutet das deshalb, dass der Notch Signalweg in normalen Urothelzellen inaktiv ist oder sind *HES1* und *HEY1* keine Zielgene?

Eine ähnliche Problematik ergibt sich im Ewing's Sarkom, einem sehr aggressiven mesenchymalen Tumor, der durch die Fusionsproteine EWS-FLI oder EWS-ETS charakterisiert ist [203]. In fast allen Tumoren werden die Notch Rezeptoren und Liganden exprimiert und sind auf Proteinebene detektierbar. Immunhistochemische Analysen zeigten jedoch, dass die NICDs nicht in den Kern gelangen und von den EWS-FLI Fusionsproteinen inhibiert werden können (indirekte Hinweise durch EWS-FLI *knock down*). Da trotzdem eine sehr hohe *HES1* Expression messbar war, wurde vermutet, dass der Notch Signalweg aktiv sein müsse [205].

Bennani-Baiti *et al.* zeigten jedoch, dass der Notch Signalweg normalerweise über *HEY1* verläuft und *HES1* unabhängig vom Notch Signalweg reguliert wird. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass der Notch Signalweg im Ewing's Sarkom inaktiv ist und daher tumorsuppressiv wirken könnte.

Eine neuere Arbeit [206] in chinesischer Sprache zum Notch Signalweg im Urothelkarzinom berichtet laut Abstract von einer onkogenen Wirkung des Notch Signalwegs in invasiven Urothelkarzinomen über NOTCH1-HES1. Demnach sei in den invasiven T24 Urothelkarzinomzellen eine N1ICD Überexpression proliferationsfördernd und alle Komponenten des Signalwegs seien stark exprimiert. Tatsächlich war in T24 Zellen im Vergleich zu den anderen Urothelkarzinomzelllinien mehr N1ICD Protein vorhanden, *JAGGED1* und *DELTA1* waren jedoch auf mRNA- und Proteinebene stark vermindert. In meinen Daten gibt es keinen Hinweis auf einen onkogen wirkenden Notch Signalweg in T24 Zellen oder in invasiven Urothelkarzinomen insgesamt.

In einer anderen Arbeit [126] wurde berichtet, dass die Notch Rezeptoren und Liganden in invasiven Urothelkarzinomen stärker exprimiert seien als in papillären Urothelkarzinomen, allerdings schwächer als im Normalblasengewebe. Auch diese Ergebnisse, allesamt mittels Immunhistochemie generiert, stimmen nur bedingt mit unseren Daten überein. Da die zitierte Arbeit [126] nur sehr wenige Originaldaten enthält, ist es schwierig die Ursachen für die Unterschiede zu ermitteln. Theoretisch kämen auch Unterschiede zwischen den Urothelkarzinomen in der chinesischen und mitteleuropäischen Bevölkerung als Erklärung in Frage. Diese dürften sicherlich im Einzelnen bestehen, es ist aber kaum vorstellbar, dass sie fundamentale Unterschiede in der Funktion des Notch Signalwegs betreffen.

Der Notch Signalweg kann in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand, vom Gewebe und vom Zelltyp proliferationsfördernd oder differenzierungsfördernd wirken [99]. Die proliferationsfördernde Wirkung wird in der Literatur weit häufiger beschrieben, als seine differenzierungsfördernde Wirkung. Das vorgestellte Modell (Abschnitt V.4) vom Notch Signalweg in der Epidermis [91] ist eines der Beispiele für die differenzierungsfördernde Wirkung.

Sie wird insbesondere erzeugt durch die positive oder negative Interaktion von NOTCH1 mit dem WNT Signalweg, EGFR Signalweg, MAPK Signalweg, Calcineurin/NFAT Signalweg, sowie mit p63 und p53, NFκB und TGFβ. Der Notch Signalweg, vor allem aber NOTCH1, agiert in einem sehr komplexen Zusammenspiel mit den unterschiedlichen Signalwegen [69]. Dass die Kombination aus kanonischen und nicht-kanonischen Notch Signalen auch in normalen Urothelzellen differenzierungsfördernd wirkt, ist denkbar. Es muss jedoch im Detail geklärt werden, ob und wie die Komponenten des Notch Signalwegs mit Komponenten anderer Signalwege interagieren könnten.

Der Notch Signalweg verhält sich in epithelialen Zellen zum EGFR Signalweg antagonistisch. Im normalen Urothel ist der EGFR Signalweg abhängig von Liganden in den undifferenzierten Basalzellen aktiv, in denen nur eine geringe NOTCH1 und DELTA1 Expression detektierbar war. Im Urothelkarzinom sind EGFR, HER2 und FGFR3 häufig überaktiv [207]. Eine starke Aktivierung von EGFR und den nachgeschalteten Signalwege erfolgt in den kultivierten Urothelzellen durch autokrine und exogene EGF-ähnliche Faktoren. Da unseren Daten zu Folge kanonische Notch Signale kaum oder gar nicht vermittelt werden, könnte dies für eine antagonistische Wirkung von EGFR und den nachgeschalteten Signalwegen sprechen.

Die Aktivität des WNT Signalwegs im Urothel wird kontrovers diskutiert [12]. Fest steht jedoch, dass β-Catenin, das theoretisch direkt mit N1ICD interagieren kann, in einigen Urothelkarzinomen (unabhängig von der Invasivität) exprimiert wird. Zusammen mit onkogen wirkenden H-RAS Mutationen förderte es die Entstehung von Blasentumoren im Mausmodell [208, 209]. Es gibt des Weiteren Hinweise auf eine Interaktion zwischen der NICD und β-Catenin im Nukleus, die die Expression von *HES1*, *DLL1* und *DLL4* ermöglicht [210]. In den meisten Urothelkarzinomzelllinien ist der PI3K/AKT Signalweg konstitutiv aktiv [211] und könnte wie in anderen Zellen (beispielsweise während der Retina-Neurogenese) den Notch Signalweg inhibieren [212]. Die NICD kann wiederum an mehreren Schnittstellen (PTEN-Hemmung, mTORC-Aktivierung, IGF1R und IL-7R Interaktion) den PI3K-Signalweg positiv regulieren [213].

V.5.2 Veränderung des Notch Signalwegs in Urothelkarzinomzelllinien und Gewebe

Insgesamt weisen meine Daten eher auf einen vermindert aktiven, möglicherweise komplett inaktivierten kanonischen Notch Signalweg im Urothelkarzinom hin. Dafür spricht zunächst, dass in den Zelllinien und Blasenmorgeweben auf mRNA Ebene die kanonischen (*JAGGED1* und *DELTA1*) und nicht-kanonische Liganden (*EGFL7* und *DLK1*) mehr oder weniger signifikant vermindert exprimiert werden, ebenso wie die Rezeptoren *NOTCH1* und *NOTCH2*.

Insbesondere die signifikant verminderte *NOTCH2* Expression in den Blasenmorgeweben unterschied sich jedoch von der in den Urothelkarzinomzelllinien. Dieses Gen war wie *JAGGED1* in den Zelllinien stark exprimiert und auch auf Proteinebene im Vergleich zu den normalen Urothelkulturen kaum verändert. Die Detektion des intakten Proteins war mit dem verwendeten Antikörper nicht verlässlich möglich, daher kann noch keine Aussage zur Verteilung und Menge des NOTCH2 Proteins in Geweben getroffen werden. Im Gegensatz zu NOTCH1 war NOTCH2 auch im Nukleus einiger Zelllinien (BFTC905, VmCub1, SW1710) detektierbar. Dies deutet auf unterschiedliche Funktionen der beiden Rezeptoren in den Urothelkarzinomzelllinien hin. Funktionelle Analysen anderer Arbeitsgruppen sprechen einerseits für viele redundante Wirkungen von NOTCH1 und NOTCH2 [214]. Andererseits führen (insbesondere während der Tumorigenese) unterschiedliche Affinitäten der Rezeptoren zu CBF1/RBPJk zu einer differierenden Aktivierung der Zielgene [215]. Festzuhalten ist jedoch, dass in den Urothelkarzinomzelllinien trotz möglicher funktioneller Unterschiede zwischen den Rezeptoren und der starken nukleären Präsenz von NOTCH2 keine Notch-Aktivität gemessen werden konnte.

Ein weiterer Unterschied zwischen Zelllinien und Geweben wurde durch die Korrelationsanalyse deutlich (vergleiche dazu Tabelle IV.3-2). Während die Genexpression *in vivo* eine starke Korrelation zwischen den Notch Rezeptoren, Liganden und *HEY1* einerseits zeigte und zwischen den nukleären Kofaktoren und Zielgenen *MYC* und *HES1* andererseits, war keine solche Korrelation in den Zelllinien vorhanden. Eine Ausnahme war die positive Korrelation zwischen *CBF1* und *SKIP*, die in den Geweben jedoch invers korreliert war. Da die untersuchten Blasenmorgewebe nicht nur aus Urothel, sondern auch anteilig aus Bindegewebszellen bestehen, können solche Korrelationen von mesenchymalen Zellen mit determiniert sein.

Auffällig war weiterhin eine positive Korrelation zwischen *NOTCH1* und *NOTCH2* im Tumorgewebe, die jedoch im normalen Blasengewebe invers war (Abbildung IV.3.1B). Dies könnte auf eine unterschiedliche Regulation der Genexpression und Verteilung von NOTCH1 und NOTCH2 Proteinen innerhalb des normalen Urothels hindeuten, die im Tumorgewebe nicht erhalten bleibt.

Bis auf die genannten Aspekte waren die Genexpressionsveränderungen in den Urothelkarzinomzelllinien mit denen in den Harnblasentumorgeweben vergleichbar. Interessanterweise war in den Urothelkarzinomzelllinien (BFTC905, 5637) das Verhältnis der Notch Rezeptoren, vor allem von *NOTCH2*, zu den Liganden annähernd gleich. *NOTCH1* war stets stärker exprimiert. In T47D, MCF7 und Caki1 war die Expression der Rezeptoren immer höher als die der Liganden. In 639v und VmCub1 waren die Verhältnisse zwischen Liganden und Rezeptoren vergleichbar mit denen in den Kontrollzelllinien. Die Expression der Notch Komponenten ist zwar im Vergleich zu den normalen Urothelkulturen vermindert, es kann jedoch sichtlich aus den Analysen auf mRNA Ebene nicht verlässlich auf die Aktivität des Notch Signalwegs geschlossen werden.

Auch die immunhistochemischen Färbungen im Gewebe sowie die Proteinanalysen in den Zelllinien erbrachten mit den mRNA Daten zumeist übereinstimmende Ergebnisse. Auffällig waren jedoch bestimmte Unterschiede zwischen den Urothelkarzinomzelllinien in den Western Blot Analysen: Die invasiven *high grade* Urothelkarzinome (Umuc3, 639v, VmCub1, T24) unterschieden sich von papillären (BC61, SW1710, BFTC905) und invasiven *low grade* Urothelkarzinomen (5637) am stärksten durch eine Abnahme des membranständigen JAGGED1 Rezeptors (JAGGED1-FL) und einer leichten Zunahme der mutmaßlich prozessierten Form von JAGGED1. Im Gegensatz dazu wurde eine relative Zunahme von unprozessiertem DELTA1 detektiert, einhergehend mit einer Abnahme des gesamten DELTA1 Proteins. Die N1ICD war dagegen in allen Urothelkarzinomzelllinien ähnlich stark vermindert.

Die Prozessierung der Liganden könnte im Rahmen einer trans-aktivierenden Interaktion zwischen den Notch Rezeptoren und JAGGED1 oder DELTA1 stattfinden. Allerdings gibt es Hinweise aus der Literatur, wonach eine Prozessierung der Liganden auch ohne Trans-Interaktion möglich ist [56, 216]. Die zytoplasmatischen Fragmente beider Liganden können mit den Notch Rezeptoren um eine weitere proteolytische Spaltung durch die γ -Sekretase konkurrieren.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Domäne von DELTA1 und JAGGED1 in den Nukleus gelangen kann, um die Notch Zielgene zu regulieren. In einigen Fällen konnte eine inhibitorische Wirkung der Liganden gezeigt werden, beispielsweise hat NOTCH1 einen positiv regulatorischen Einfluss auf die Transkription von AP1, während JAGGED1 einen inhibitorischen Einfluss ausübt [56]. Eine weitere Arbeit zeigte zudem, dass eine physikalische Interaktion zwischen DELTA1 und NOTCH1 möglich ist. Diese Interaktion erfolgte zwischen den beiden intrazellulären Domänen (ICD) und wurde als inhibitorisch beschrieben [217]. Diese Ergebnisse deuten an, dass es ergänzend zu dem schon bekannten cis-inhibitorischen Effekt durch die direkte Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren auf der gleichen Zelle auf eine cis-inhibitorische Wirkung der prozessierten Liganden im Zytoplasma und im Nukleus geben könnte.

Möglicherweise liegen die Notch Rezeptoren in den Urothelkarzinomzelllinien in inhibiertem Zustand vor. Dafür sprechen drei Befunde: Erstens wurde in Co-IP Analysen eine direkte Interaktion von DELTA1 (N-terminaler Antikörper) mit dem NOTCH1 Rezeptor detektiert, sowie eine direkte Interaktion von prozessiertem DELTA1 (C-terminaler Antikörper) mit der N2ICD. Zweitens waren DELTA1 und NOTCH2 Fragmente, möglicherweise die ICDs, zelllinien- und koloniespezifisch im Nukleus detektierbar (BFTC905, 5637). Insbesondere in der Zelllinie 5637 waren NOTCH1 und JAGGED1 membranständig und zytoplasmatisch, NOTCH2 und DELTA1 auch nukleär lokalisiert. Die zelluläre Lokalisation der Rezeptoren und Liganden könnte, je nach Liganden-Rezeptor-Spezifität, zu einer cis-inhibitorischen Hemmung der Notch Rezeptoren führen. Ob dies ein plausibles Szenario *in vivo* sein kann, muss noch untersucht werden. Drittens spricht für einen inhibierten Zustand auch die fehlende Notch-Aktivität in den Urothelkarzinomzelllinien, wohingegen in einzelnen normalen Urothelkulturen eine schwache Notch-Aktivität messbar war.

Eine hohe Aktivität war in der Mammakarzinomzelllinie T47D detektierbar - ein Beweis für einen überaktiven Signalweg. Die Aktivität des Notch Signalwegs ist im Allgemeinen stark dosisabhängig. Minimale Änderungen von Variablen im System können daher zu unproportionalen Konsequenzen führen. Solche Variablen sind kritische Faktoren wie beispielsweise der Zustand der Zelllinien (Konfluenz) und die technische Durchführung (Qualität der Plasmide, Transfektionseffizienz).

Nach Transfektion der hNICD konnte eine dosisabhängige Zunahme der Notch-Aktivität gemessen werden. Während in den Urothelkulturen dieser Zusammenhang positiv linear war, wurde in den Urothelkarzinomzelllinien ein inverser Zusammenhang gefunden: mit weiter steigender hNICD Konzentration nahm die Notch-Aktivität wieder ab. Western Blot Analysen bei der höchsten hNICD Dosis (1 µg Plasmid) deuteten auf eine leichte Zunahme der J1ICD (intrazelluläre JAGGED1 Domäne) hin. Da die beiden putativen Zielgene *HES1* und *HEY1* nach hNICD Transfektion kaum aktiviert wurden, könnte JAGGED1 die Notch-Aktivität durch eine direkte Interaktion mit der NICD vermindern. Obwohl keine Veränderungen des Liganden DELTA1 auf Proteinebene in Folge der NICD Überexpression detektiert wurden, könnte auch DELTA1 durch direkte Interaktion mit der NICD dessen Aktivität vermindern. Diese Interaktionen sind spekulativ und könnten durch Co-IP vor und nach NICD Überexpression nachgewiesen werden. Für eine cis-inhibitorische Wirkung beider Liganden spricht auch, dass weder endogenes nukleäres NOTCH2, noch eine hNICD Überexpression die Notch-Aktivität steigern können (Daten nicht gezeigt).

V.5.3 Funktion der γ -Sekretase im Urothelkarzinom

Für eine Inaktivierung des kanonischen Signalwegs spricht auch die proliferationsfördernde Wirkung der γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) auf die Urothelkarzinomzelllinien. Auch in Reporterassays nach GSI Behandlung war die Notch-Aktivität zum Teil erhöht und die Produktion der intrazellulären NOTCH Domänen war nicht inhibiert. Dass die GSIs als solche wirksam sind, konnte in der Kontrollzelllinie HEK293 bewiesen werden, in der für mindestens zwei Substanzen eine Verminderung der Notch-Aktivität und eine verminderte NICD Produktion detektiert wurde.

Die GSIs DAPT und Compound E sind *non-transition state* Analogons und konkurrieren mit den γ -Sekretase Substraten im aktiven Zentrum der Preseniline, die Hauptbestandteile des Komplexes [218]. L-685,458 ist dagegen ein Aspartyl-Protease *transition state* Analogon und bindet direkt im aktiven Zentrum der Preseniline [219]. Compound W ist dagegen ein *NSAID* (*non-steroidal anti-inflammatory drug*) und wirkt wahrscheinlich nicht-kompetitiv durch direkte Inhibition der A β -Peptide aus APP [220, 221]. Andere Studien haben jedoch gezeigt, dass auch Compound W die Produktion der NICD beeinflussen kann, obwohl der Effekt im Vergleich zu den anderen GSIs gering ist.

Daher werden *NSAIDs*, wie Compound W und Fluorbiprofene, als γ -Sekretase-Modulatoren bezeichnet. Auch in unseren Versuchen hatte Compound W keine großen Auswirkungen auf die Zellvitalität, die Notch-Aktivität und die NICD Produktion.

Es kommen mehrere Ursachen für das fehlende Ansprechen der Urothelkarzinomzelllinien auf die GSIs oder gar proliferationsförderliche Wirkung in Frage:

(1) In Geweben, in denen der Notch Signalweg differenzierungsfördernd wirkt, bewirkt die Inhibition der γ -Sekretase ebenfalls eine gesteigerte Proliferation. Dies gilt beispielsweise für die GSI-Behandlung in der Epidermis. Die Hyperproliferation der Keratinozyten führt zur Bildung des Basalzellkarzinoms [222].

(2) Im Mammakarzinom konnte dagegen gezeigt werden, dass die GSIs nur eingeschränkt wirken und die hauptsächliche Wirkung auf einer Hemmung des Proteasoms beruht [223]. Offensichtlich reagieren Tumoren unterschiedlich auf eine GSI-Behandlung.

(3) Resistenzen gegenüber den GSIs können durch den PI3K/AKT Signalweg aufgebaut werden. Dies wurde in T-ALL Zelllinien gezeigt, in denen der Notch und PI3K Signalweg synergistisch funktionieren [224]. Die Studie zeigte, dass eine konstitutive Aktivierung des PI3K Signalwegs durch PTEN Verlust zu einer Resistenz gegenüber GSI führen kann, auch wenn der Mechanismus unklar ist. In den verwendeten Urothelkarzinomzelllinien konnte keine inhibitorische Wirkung der verwendeten GSIs festgestellt werden. Die vier verwendeten Zelllinien 639v, BFTC905, 5637 und VmCub1 haben zwar keinen PTEN Verlust, jedoch andere Veränderungen im PI3K/AKT Signalweg. Die Aktivität des PI3K/AKT Signalwegs könnte möglicherweise dazu beitragen, dass keine Hemmung des Notch Signalwegs stattfindet.

(4) Es ist möglich, dass sich der γ -Sekretase Komplex im Urothelkarzinom nicht ausreichend bildet oder eine andere Zusammensetzung aufweist. Presenilin, das von den GSIs gehemmt wird, kommt in zwei Isoformen vor, Presenilin 1 (PSEN1) und Presenilin 2 (PSEN2). Des Weiteren gibt es auch zwei verschiedene APH1-Isoformen, sodass es unterschiedliche Zusammensetzungen des γ -Sekretase-Komplexes gibt, bestehend aus Presenilin 1 oder Presenilin 2, Nicastrin, sowie APH-1A oder B und Presenilin Enhancer 2 (PSENEN2) [225].

Die beiden Preseniline werden von den GSIs unterschiedlich effektiv gehemmt, sodass beispielsweise höhere Konzentrationen von L-685,458 eingesetzt werden müssen [226]. Im Urothelkarzinom könnte daher das schwerer hemmbare Presenilin 2 statt Presenilin 1 im γ -Sekretase-Komplex vorhanden sein.

(5) Des Weiteren ist bekannt, dass Preseniline γ -Sekretase unabhängige Funktionen ausüben. Eine in diesem Zusammenhang höchst interessante Funktion ist die Regulation der Kalziumhomöostase. Preseniline können entweder als kalziumabhängige Ionenkanäle wirken oder selber Ionenkanäle regulieren, die Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien transportieren [227, 228]. Unter pathologischen Bedingungen ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration relativ hoch und die Kalziumtransduktion (auch in Folge von deregulierten Presenilinen?) gestört. In einem solchen Kontext sind DAPT und L-685,458 proliferationsfördernd und wirken einer kalziuminduzierten Zytotoxizität entgegen, weil mit den Presenilinen auch das kalziumabhängige, pro-apoptische Protein Calsenilin inhibiert wird [229-231].

Die Datenlage zu Presenilin, Calsenilin und zur Bedeutung von Kalzium im Urothel und Urothelkarzinom ist unzureichend. Es kann – wie oben diskutiert - nur vermutet werden, dass Preseniline und ihre Aktivität im γ -Sekretase-Komplex, genauso wie vermutlich der davon abhängige Notch Signalweg, durch Kalzium beeinflusst und reguliert werden. Datenbank-Analysen (cancer genome workbench [232] und catalogue of somatic mutations in cancer [233]) ergaben keine Hinweise auf Mutationen in Presenilin 1, Presenilin 2, Nicastrin, APH1 und Calsenilin. Allerdings wurden bisher nur wenige (zum Teil nur 2 Tumore oder Zelllinien) Proben untersucht. Demgegenüber konnte in vielen Fällen eine verminderte Gendosis beider Preseniline in den analysierten Urothelkarzinomzelllinien detektiert werden. Auffällig war beispielsweise eine erhöhte Gendosis von Presenilin 1 auf Chromosom 14q24.2 in der Zelllinie ScABER aus einem Plattenepithelkarzinom der Blase, sowie eine sehr stark verminderte Gendosis von Presenilin 2 auf 1q31-42 in der invasiven Urothelkarzinomzelllinie Umuc3. Auch Calsenilin (*KCNIP3*) ist zum Teil vermindert, trotz der häufigen Amplifikation des Chromosomes 1 im Urothelkarzinom.

V.5.4 Veränderungen im Notch Signalweg durch Modulation der Kalziumkonzentration

Es wurde bereits diskutiert, dass Kalzium eine besondere Funktion in epidermalen Zellen durch den Aufbau eines Kalziumgradienten und als „*grandmaster cell signaler*“ [190a] hat. Bekannt ist, dass auch Urothelzellen in Kultur durch Kalziumzugabe ausdifferenzieren, genau wie Keratinozyten [180]. Hier wurde gezeigt, dass papilläre *low grade* Urothelkarzinomzellen ebenfalls auf Kalziumerhöhung mit einer Stratifizierung reagieren und die Expression differenzierungsspezifischer Marker zunimmt. Urothelzellen und papilläre Urothelkarzinomzellen unterscheiden sich jedoch in den Veränderungen im Notch Signalweg. In der Zelllinie BC61 waren durch Kalziumerhöhung insbesondere die Liganden *JAGGED1* und *EGFL7* stärker exprimiert, die Veränderungen der Notch Rezeptoren fiel geringer aus. Kalziumentzug bewirkte auch in den Zelllinien BFTC905 und HT1376 eine starke Veränderung der Liganden (hier *DELTA1*), aber keine auf Proteinebene nachweisbare Veränderung der Rezeptoren.

In beiden Fällen, Kalziumentzug und Kalziumzugabe, wurden die Liganden verstärkt exprimiert und zusätzlich Veränderungen in der Zelladhäsion, sowie im Zytokeratinprofil der Zellen detektiert. Diese Befunde lassen sich in der These zusammenfassen: „Die prominenten Veränderungen der kanonischen und der nicht-kanonischen Liganden des Notch Signalwegs verhindern eine aktive Signalweiterleitung der Notch Signale.“

Es ist bekannt, dass die kanonischen Notch Liganden *DELTA1* und *JAGGED1* die Integrin Expression modulieren und mit ihrer C-terminalen PDZ Domäne direkt die Zelladhäsion und das Zytoskelett beeinflussen können [95]. Diese Interaktion scheint einen wechselseitigen Einfluss zu haben, da beispielsweise das PDZ-Domänen Protein Syntenin auch die Endozytose von *DELTA1* reguliert kann [93]. In der Epidermis führt eine Abnahme der Zelladhäsion zu einer Aktivierung des Notch Signalwegs und damit zur Induktion der Differenzierung. Da auch in unserem Zellkultursystem zusätzlich zur kalziumabhängigen Veränderung der Liganden eine Veränderung der Zell-Zell-Kontakte und der Zell-Matrix Interaktion beobachtet wurde, liegt der Schluss nahe, dass Interaktionen, wie sie für die Epidermis beschrieben wurden, auch für Urothelkarzinomzelllinien möglich sind. Die Zell-Matrix-Adhäsion (wie auch Zell-Zell-Kontakte) kann ferner durch die NICD indirekt über die GTPasen RHO/RAC moduliert werden [234].

Dies ist ein denkbarer Mechanismus für normale Urothelzellen, die eine stark erhöhte Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* während der Kalziumbehandlung zeigten.

V.5.5 Die Funktion von DELTA1 im Notch Signalweg

Ein sehr auffälliger Befund in dieser Arbeit ist die heterogene Verteilung von DELTA1 in den Urothelkarzinomzelllinien und Blasenmorgewebe. Die immunzytochemischen Färbungen, insbesondere der Zelllinien 5637 und BFTC905, deuten auf verschiedene Zellpopulationen innerhalb der Zellkolonien dieser Zelllinien hin (vergleiche Abbildung V.5-1). Dabei war die DELTA1 Lokalisation innerhalb einer distinkten Gruppe bestehend aus mehreren Zellen gleich (entweder membranständig und zytoplasmatisch oder zytoplasmatisch und nukleär). Diese Musterbildung wird vermutlich durch „*cohesiveness*“ bewirkt. Dieser Begriff beschreibt die Tendenz von Zellen in Kontakt miteinander zu bleiben und in allen Zellen dieser Gruppe den gleichen Entwicklungszustand aufrecht zu erhalten. Der Effekt ist abhängig von der wechselseitigen Interaktion des Liganden DELTA1 mit Zytoskelettkomponenten [235]. Im Kontext Epidermis werden dem Liganden DELTA1 verschiedene Funktionen zugesprochen: zum einen erhält eine hohe DELTA1 Expression den Stammzellcharakter, aber induziert Differenzierung in den Nachbarzellen. Zum anderen fördert die hohe DELTA1 Expression den Zusammenhalt der Zellen untereinander (*cohesiveness*). Dies erfordert nicht nur membranständiges DELTA1, sondern vor allem die zytoplasmatische Domäne von DELTA1 [96]. Innerhalb einer Gruppe ist der Notch Signalweg jeweils inaktiv. Durch eine hohe NOTCH1 Expression in der benachbarten Gruppe kann an den Fronten beider Gruppen der Signalweg aktiviert werden.

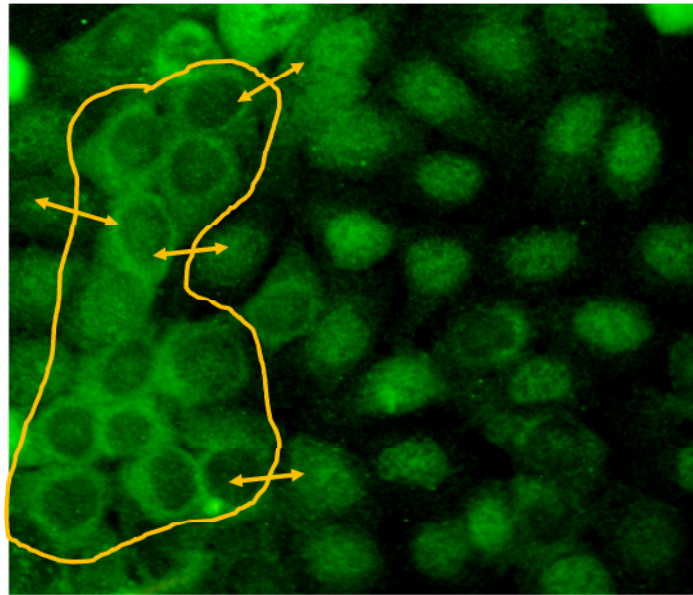


Abbildung V.5-1 Beispiel für „cohesiveness“ in 5637 Zellen. Die umrandete Zellpopulation unterscheidet sich von den umliegenden Zellen durch die Verteilung von DELTA1. Innerhalb dieser Gruppe sind die DELTA1 Proteine überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. In den umgebenden Zellen sind DELTA1 Proteine dagegen überwiegend nukleär lokalisiert.

In unseren Zelllinien war NOTCH1 homogen und vergleichsweise schwach in den Zellen detektierbar. Daher kann vermutet werden, dass eine Aktivierung an den Grenzen der Gruppe nicht über NOTCH1 erfolgt. Ein weiterer Kandidat ist NOTCH2, der Rezeptor konnte auch nukleär detektiert werden. Allerdings hatten Co-IP Experimente auf eine Interaktion von DELTA1 mit der N2ICD hingewiesen, die eher inhibitorisch wirken dürfte. Denkbar ist auch, dass DELTA1 Notch-unabhängig in der Spezifikation der Zellen im Urothelkarzinom wirkt. Auch in Blasenmorgewebe konnte eine intratumorale Heterogenität von DELTA1 detektiert werden, die mit der in 5637 und BFTC905 Zellen vergleichbar ist. Vermutlich ist auch hier der Notch Signalweg inaktiv. Daher scheint DELTA1 im Urothel eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Notch Signalwegs zu besitzen.

In mehreren Experimenten fiel auf, dass der DELTA1 Proteinspiegel weniger variabel ist als der mRNA Spiegel. Dies zeigte sich besonders deutlich bei den siRNA und shRNA Transfektionen, jedoch auch im Vergleich der mRNA und Proteinexpressionsergebnisse in den Urothelkarzinomzelllinien. Demnach könnte die Proteinexpression von DELTA1 posttranskriptionell reguliert sein.

Die Modulierung des Notch Signalwegs nach DELTA1 *knock down* hatte jedoch große, wenn auch variable Effekte auf die Notch-Aktivität und die Genexpression der Rezeptoren. Ein siRNA vermittelter *knock down* von *DELTA* verminderte die Notch-Aktivität deutlich, obwohl auf mRNA-Ebene eine Zunahme der Rezeptoren gemessen wurde und der *knock down* von DELTA1 im Western Blot nicht verifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Dagegen bewirkte die DELTA1 shRNA Transfektion eine veränderte Verteilung der Proteine innerhalb der Zellen. In einigen stabil transfizierten DELTA1-shRNA Klonen war DELTA1 zytoplasmatisch und nukleär verändert verteilt, insbesondere aber auch in den Nukleoli (DLL1-sh3-Klon7), überwiegend im Nukleus (DLL1-sh3-Klon3 und B) oder diffus zytoplasmatisch (DLL1-sh3-Klon E) zu finden. Im Großteil der Klone konnte keine DELTA1 Musterbildung mehr detektiert werden. Eine Ausnahme könnte der DLL1-sh3-Klon F sein. Diese stabilen Klone zeichneten sich durch aberrante Zellmorphologien aus, was für eine Beteiligung von DELTA1 an der Zytoskelettregulation und der Zelladhäsion sprechen könnte. In diesem Zusammenhang müsste die Expression und Verteilung der Zytokeratine ermittelt werden, um die DELTA1 Effekte mit denen nach Kalziumbehandlung und -entzug vergleichen zu können.

Da in den stabil transfizierten DLL1-shRNA Klonen keine Erhöhung der Notch-Aktivität gemessen werden konnte, ist auch davon auszugehen, dass der Signalweg inaktiv bleibt. Allerdings bewirkte der transiente *knock down* von DELTA1 mit shRNAs eine Zunahme der Notch-Aktivität mittels Reporterassay. Hierbei könnte es sich um einen kurzfristigen Effekt handeln. Auch der stabile *knock down* hatte starke Effekte auf die zelluläre DELTA1 Verteilung, die insbesondere das unprozessierte DELTA1 Protein betraf. Dies akkumulierte zwischen benachbarten Zellen (DLL1-sh2) und war mit einer Reduktion der Notch-Aktivität assoziiert. Nur nach Transfektion mit DLL1-sh1 konnten Zellen mit unterschiedlich starker *DELTA1* Expression detektiert werden.

Diese sehr unterschiedlichen und variablen Effekte können zum Teil durch die Verwendung von shRNAs gegenüber siRNAs entstehen. Der Vorteil von shRNAs ist die Möglichkeit eines stabilen *knock downs*, allerdings muss die shRNA noch in eine reife microRNA prozessiert werden. Diese Prozessierung könnte in Tumoren ebenfalls aberrant verlaufen, da auch die miRNA Bildung in Tumoren verändert sein kann [236].

Tatsächlich wurde in Urothelkarzinomzelllinien eine verminderte Expression von *DICER1* und *DROSHA* gefunden, die für die microRNA Biogenese notwendig sind [237]. Des Weiteren bindet die siRNA an einem anderen Abschnitt der *DELTA1* mRNA als die shRNAs. Möglicherweise können die unterschiedlichen Zielsequenzen die Effektivität des *knock downs* und Auswirkung einer siRNA-DELTA1 Interaktion beeinflussen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen shRNAs und siRNAs liegt in der Transfektionseffizienz. Während hohe Transfektionseffizienzen nach einer siRNA Behandlung zu gleichförmigen Veränderungen in den Zellen auf mRNA und Proteinebene führen, ist die Transfektion mit Plasmiden generell variabel und weniger effizient. Möglicherweise bewirkt der shRNA vermittelte *knock down* auf diese Weise eine verstärkte Heterogenität von DELTA1 zwischen den Zellen. Ein großer Unterschied in der Präsentation von DELTA1-Proteinen an der Zelloberfläche zwischen benachbarten Zellen kann zur Entstehung von „Fronten“ führen, die kurzfristig eine Aktivierung des Notch Signalwegs ermöglichen. In stabil transfizierten Zellen können keine „Fronten“ entstehen, da die Variabilität der stabilen Plasmid Transfektion durch Selektionierung entfällt.

V.5.6 Fazit Verlauf und Wirkung des Notch Signalwegs

Zusammenfassend deuten die Daten auf einen schwach aktiven Notch Signalweg in kultivierten proliferativen Urothelzellen und einen noch schwächeren in Urothelkarzinomen hin. Im normalen Urothels könnte der Signalweg differenzierungsfördernd wirken. Basierend auf den dargestellten Ergebnissen aus Kapitel V.3 wird folgendes Modell (Abbildung VI.5-2) vorgeschlagen: DELTA1 und NOTCH1 sind im normalen Urothel und im Stroma koexprimiert, mit der stärksten Expression in Deckzellen innerhalb des Urothels und mit nukleär positiven mesenchymalen Zellen. JAGGED1 ist insbesondere in den Intermediärzellen detektierbar. Daher ergeben sich zwei mögliche Signalrichtungen an den JAGGED1 exprimierenden Grenzen, nämlich zu den terminal differenzierten Deckzellen und zum Stroma. Letztere könnte eine Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym ermöglichen.

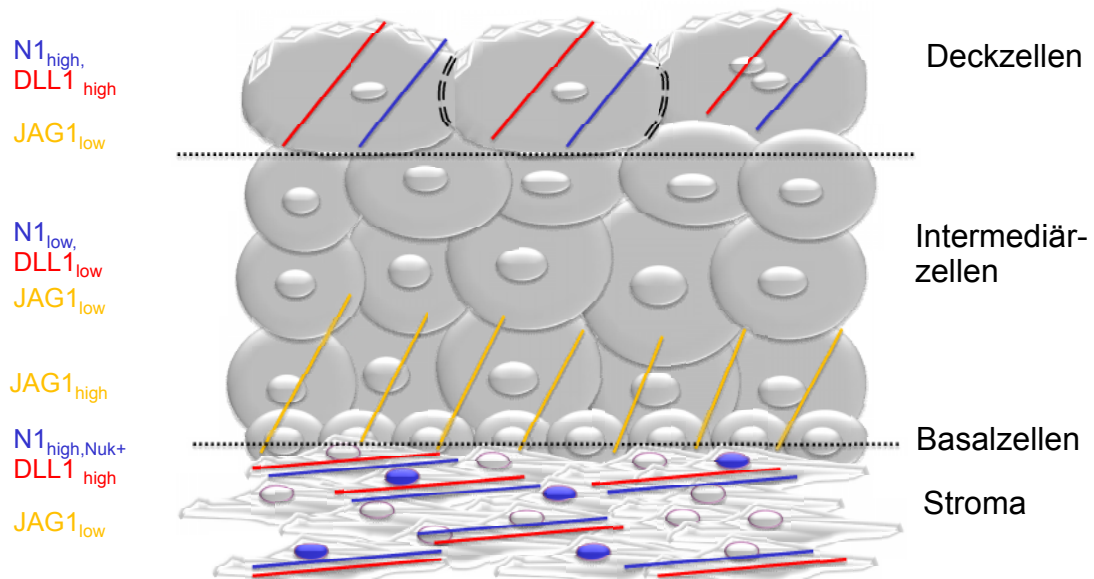


Abbildung V.5-2 Modell für den Notch Signalweg in normalem Urothel. Die JAGGED1 exprimierenden Sendezellen befinden sich möglicherweise in der unteren Hälfte des Urothels und könnten theoretisch mit den NOTCH1^{high} Stromazellen interagieren. DELTA1 ist mit NOTCH1 im Zytoplasma der Deckzellen kolokalisiert und eher membranständig in den Intermediärzellen mit abnehmender Expressionsstärke.

Allerdings sind weder im Blasengewebe noch in kultivierten Urothelzellen die direkten Zielgene bekannt. *HES1*, und wahrscheinlich auch *HEY1*, dürften vom Notch Signalweg weitestgehend unabhängig reguliert werden. Dies betrifft offensichtlich die Urothelkarzinomzelllinien, die auch nach hNICD Überexpression nur eine schwache Induktion beider Gene auf mRNA Ebene zeigten. Auch *CDKN1A* wurde in Überexpressions- und Differenzierungsexperimenten nur mäßig stark induziert, im Gegensatz zur starken Induktion dieses Gens nach Kalziumzugabe in normalen Urothelzellen. Die unterschiedlich starke Induzierbarkeit von *CDKN1A* kann dadurch erklärt werden, dass verschiedene positive Regulatoren von p21, z.B p53, mit zunehmender Invasivität der Tumoren inaktiviert sind und dieses Gen entsprechend zunehmend schwächer exprimiert ist [238]. Dafür spricht auch, dass die starke *CDKN1A* Induktion parallel zur Induktion der Notch Rezeptoren in normalen Zellen stattfindet, aber nicht in Zelllinien ohne markante Genexpressionsveränderung der Notch Rezeptoren.

Insgesamt weisen die Daten in den Urothelkarzinomzelllinien auf eine gestörte Signalweiterleitung in den Nukleus hin, die insbesondere durch eine veränderte Expression und Verteilung der kanonischen Notch Liganden verursacht sein kann. Dabei kommt dem Liganden DELTA1 möglicherweise eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Notch Signalwegs zu. Die Experimente mit diesem Liganden weisen darauf hin, dass seine Regulation posttranskriptionell stattfindet. Western Blot und Immunocytochemie deuten auf Unterschiede in der Prozessierung und intrazellulären Verteilung, die zu verstärkten cis-inhibitorischen Interaktionen führen und eine trans-Aktivierung des Signalwegs verhindert.

Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass der Zusammenhang des Notch Signalwegs mit Kalzium im Urothel einer besonderen Untersuchung bedarf. Ob eine aberrante Kalziumsignaltransduktion zur Inaktivierung der Notch-Aktivität beiträgt muss entsprechend untersucht werden. Dafür spricht die unterschiedliche Sensibilität der Zelllinien auf Kalzium und die veränderte Expression der kanonischen und nicht-kanonischen Notch Liganden DELTA1, JAGGED1 und EGFL7 durch Kalzium. In diesem Zusammenhang wäre auch eine mögliche Deregulation der Preseniline zu untersuchen, die als Modulatoren der Kalziumhomöostase auch die Aktivität des Notch Signalwegs regulieren [227, 239].

Zusammenfassend sind kanonische und nicht-kanonische Notch Signale im Urothelkarzinom verändert reguliert. Einzelne Komponenten des Signalwegs könnten jedoch unabhängig vom Notch Signalweg in einem anderen Kontext aktiv sein.

VI. Abkürzungsverzeichnis

ADAM17	<i>A disintegrin and metalloprotease-17</i>
AS	<i>antisense</i>
BPE	<i>bovine pituitary extract</i> (Rinderhypophysenextrakt)
CBF1/RBPJ κ /RBPSUH	<i>C-promotor binding factor1/recombination signal-binding protein for immunoglobulin kappa J region /recombination signal-binding protein suppressor of hairless, Homolog of Drosophila</i>
CK/KRT	Zytokeratin
COBRA	<i>Combined bisulfite restriction analysis</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
DBD	DNA-Bindedomäne
DIO3	Deiodinase, Iodothyronine, Type III
DLK1	<i>DELTA Homolog 1(=FA1; PREF1)</i>
DLL1	<i>DELTA1 (drosophila delta like homolog)</i>
(IG) DMR	(Intergenische) differentiell methylierte Region (<i>intergenic differentially methylated region</i>)
DMR	differenziell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSL	Delta Serate Lag2
ECD	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EMT	epidermale-mesenchymale Transition
JAG1	JAGGED1 (<i>Drosophila Serrate</i>)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FL	<i>Full length</i>
Fwd (f)	<i>forward</i>
GAG	Glykosaminoglycan
GSI	γ -Sekretase-Inhibitor
H3ac	Histon 3 acetyliert
H3K4me3	Histon 3 Lysin 4 Trimethylierung
H3K9me3	Histon 3 Lysin 9 Trimethylierung

H4K16ac	Histon 4 Lysin 16 Acetylierung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
HES	<i>Hairy/Enhancer-of-split</i>
HEY	<i>Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif</i>
HMT	Histon-Methyltransferasen
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICD	intrazelluläre Domäne
ICR	<i>Imprinting control region</i> (Imprinting Kontrollregion)
JAG1	<i>JAGGED1</i>
K3K27me3	<i>Histon 3 Lysin 27 Trimethylierung</i>
LIMI	<i>lateral inhibition with mutual inactivation</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (Verlust der Heterozygotie)
MAML1	<i>Mastermind-like 1</i>
MEG3	<i>Maternally expressed gene3</i>
miRNA	<i>Micro RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i>
NEAA	<i>non-essential amino acid</i> (Nicht essentielle Aminosäuren)
NFDM	<i>Non-fat dried milk</i> (Fettarme Trockenmilch)
NLS	Nukleusimportsequenz
NRR	Negativ-Regulatorische Region
NuSA	<i>Nucleosome scanning assay</i>
PcG	<i>Polycomb group Protein</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEST	Prolin/Glutaminsäure/Serin/Threonin
piRNA	<i>Piwi interacting RNA</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QUMA	<i>Quantification Tool of Methylation Analysis</i>
RD	regulatorische DNA-bindende Domäne
Rev (r)	<i>reverse</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RTL1	<i>Retrotransposon like1</i>
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	<i>Short hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SNORD (snoRNA)	<i>Small nucleolar RNA</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor α-converting enzyme</i> (=ADAM 17)

TAD	Transaktivierungsdomäne
T-ALL	T-Zell Lymphoblastische Leukämie
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris gepufferte Salzlösung)
TD	Tetramerisierungsdomäne
TNM	<i>tumor, node, metastasis</i> (Tumor, Lymphknoten und Metastasen)
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (internationale Krebsvereinigung)
UPK2	<i>Uroplakin 2</i>

VII. Erklärung

„Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.“

Ferner versichere ich, dass ich weder an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf noch an einer anderen Universität versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ebenso habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf im November 2012

VIII. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W.A. Schulz für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas, das nicht nur meine fachliche Kompetenz, sondern vor allem meine Kreativität erforderte und förderte. Seine Unterstützung und Motivation haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. T. Klein danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft als Korreferent diese Arbeit in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHU zu vertreten.

Ich danke der Jürgen-Manchot Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung mit einem persönlichen Stipendium. Des Weiteren danke ich der Krebshilfe NRW für die Finanzierung des Notch-Projekts.

Meinen Kollegen und Kolleginnen in der Arbeitsgruppe, Frau Dr. A. R. Linnemann-Florl, Frau Dr. M. Hoffmann, Herrn Dr. W. Göring, Frau cand. biol. T. Ribarska, Frau cand. biol. J. Schmidt, Frau cand. biol. J. Knievel, Herrn B.Sc J. Steinbring, Herrn cand. med S. Murday, Frau cand. Med. N. Sadat, Frau Dipl. biol. A. Schlösser und vor allem Frau C. Hader, danke ich für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Die freundliche Atmosphäre im Labor half mir auch die schwierigen Phasen während meiner Arbeit gut zu überstehen.

Allen medizinischen Kollegen und Kolleginnen aus der urologischen Klinik, aber insbesondere Dr. med. Günter Niegisch, gilt mein Dank für die Bereitstellung von Gewebe- und Blutproben, sowie für das stete - fachliche und persönliche - Interesse an meiner Arbeit.

Darüberhinaus möchte ich Herrn und Frau Dr. Jankowiak, Institut für Pathologie, für ihre Bereitschaft ihre fachliche Kompetenz im Urothelkarzinom-Projekt miteinzubringen danken. Mein Dank gilt insbesondere Dr. S. Jankowiak für ihre stete Unterstützung und den hohen Zeitaufwand bei der Evaluierung und Auswertung der IHC Färbungen für das Notch-Projekt.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. H. Rieder und seiner Arbeitsgruppe, Institut für Humangenetik, für die Zusammenarbeit am p53-Manuskript danken, sowie für die Array-CGH und Karyotypenanalysen der beiden neuen Urothelkarzinomzelllinien.

Meiner gesamten Familie und meinen Großeltern möchte ich besonders für den familiären Rückhalt und die Förderung weit über mein Studium hinaus danken. Ohne ihre motivierende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinem Partner Moritz Greife danke ich besonders für seine Geduld und sein Verständnis, welches ich beim Erstellen dieser Arbeit häufig beansprucht habe. Ich möchte mich ebenfalls bei seinen Eltern Fam. Greife für die kritische Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich es nicht versäumen, allen meinen Freunden zu danken. Ihr alle habt die Höhen und Tiefen miterlebt und stets an meinen Erfolg geglaubt.

IX. Referenzen

1. Birder, L.A., *Urothelial signaling*. Auton Neurosci, 2010. **153**(1-2): p. 33-40.
2. Ho, P.L., A. Kurtova, and K.S. Chan, *Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem*. Nat Rev Urol, 2012. **9**(10): p. 583-94.
3. Volkmer, J.P., et al., *Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(6): p. 2078-83.
4. Wu, X.R., et al., *Uroplakins in urothelial biology, function, and disease*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1153-65.
5. Degraff, D.J., et al., *When urothelial differentiation pathways go wrong: Implications for bladder cancer development and progression*. Urol Oncol, 2011.
6. Epstein, J.I., *Diagnosis and classification of flat, papillary, and invasive urothelial carcinoma: the WHO/ISUP consensus*. Int J Surg Pathol, 2010. **18**(3 Suppl): p. 106S-111S.
7. Cheng, L., et al., *Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder*. Mod Pathol, 2009. **22 Suppl 2**: p. S70-95.
8. Seitz, M., et al., *[Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification]*. Urologe A, 2005. **44**(9): p. 1073-86.
9. Goebell, P.J. and M.A. Knowles, *Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium*. Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 409-28.
10. McConkey, D.J., et al., *Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression*. Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 429-40.
11. Niegisch, G., et al., *[Signal transduction in urothelial cancer: how exactly do we know the targets for targeted therapy?]*. Urologe A, 2010. **49**(11): p. 1401-5.
12. Schulz, W.A., *Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways*. Int J Cancer, 2006. **119**(7): p. 1513-8.
13. Billerey, C., et al., *Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 1955-9.
14. Castillo-Martin, M., et al., *Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis*. Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 401-8.
15. Shin, K., et al., *Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 110-4.
16. Prasad, S.M., G.J. Decastro, and G.D. Steinberg, *Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts*. Nat Rev Urol, 2011. **8**(11): p. 631-42.
17. Matsushita, K., et al., *Immunohistochemical biomarkers for bladder cancer prognosis*. Int J Urol, 2011. **18**(9): p. 616-29.
18. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
19. Freed-Pastor, W.A. and C. Prives, *Mutant p53: one name, many proteins*. Genes Dev, 2012. **26**(12): p. 1268-86.
20. Walerych, D., et al., *The rebel angel: Mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer*. Carcinogenesis, 2012.
21. Dong, P., et al., *Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 103.

22. Williamson, M.P., P.A. Elder, and M.A. Knowles, *The spectrum of TP53 mutations in bladder carcinoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994. **9**(2): p. 108-18.
23. Hollstein, M. and P. Hainaut, *Massively regulated genes: the example of TP53*. *J Pathol*, 2010. **220**(2): p. 164-73.
24. Janicke, R.U., et al., *The do's and don'ts of p53 isoforms*. *Biol Chem*, 2009. **390**(10): p. 951-63.
25. Olivares-Illana, V. and R. Fahraeus, *p53 isoforms gain functions*. *Oncogene*, 2010. **29**(37): p. 5113-9.
26. Khoury, M.P. and J.C. Bourdon, *p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?* *Genes Cancer*, 2011. **2**(4): p. 453-65.
27. Marcel, V., et al., *Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(21): p. 4463-8.
28. Magnusson, K.P., et al., *p53 splice acceptor site mutation and increased HsRAD51 protein expression in Bloom's syndrome GM1492 fibroblasts*. *Gene*, 2000. **246**(1-2): p. 247-54.
29. Holmila, R., et al., *Splice mutations in the p53 gene: case report and review of the literature*. *Hum Mutat*, 2003. **21**(1): p. 101-2.
30. Hofstetter, G., et al., *Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(13): p. 1997-2004.
31. Koch, A., et al., *Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2012. **35**(4): p. 243-57.
32. Seifert, H.H., et al., *A new and reliable culture system for superficial low-grade urothelial carcinoma of the bladder*. *World J Urol*, 2007. **25**(3): p. 297-302.
33. Reznikoff, C.A., et al., *Altered growth patterns in vitro of human papillary transitional carcinoma cells*. *Am J Pathol*, 1983. **111**(3): p. 263-72.
34. Southgate, J., et al., *Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification*. *Lab Invest*, 1994. **71**(4): p. 583-94.
35. Lobban, E.D., et al., *Uroplakin gene expression by normal and neoplastic human urothelium*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(6): p. 1957-67.
36. Varley, C., et al., *Autocrine regulation of human urothelial cell proliferation and migration during regenerative responses in vitro*. *Exp Cell Res*, 2005. **306**(1): p. 216-29.
37. Sun, T.T., *Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(1): p. F9-21.
38. Bikle, D.D., et al., *Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **177**(1-2): p. 161-71.
39. Chapman, E.J., G. Kelly, and M.A. Knowles, *Genes involved in differentiation, stem cell renewal, and tumorigenesis are modulated in telomerase-immortalized human urothelial cells*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(7): p. 1154-68.
40. Georgopoulos, N.T., et al., *Immortalisation of normal human urothelial cells compromises differentiation capacity*. *Eur Urol*, 2011. **60**(1): p. 141-9.
41. Petzoldt, J.L., et al., *Immortalisation of human urothelial cells*. *Urol Res*, 1995. **23**(6): p. 377-80.
42. Rossi, M.R., et al., *The immortalized UROtsa cell line as a potential cell culture model of human urothelium*. *Environ Health Perspect*, 2001. **109**(8): p. 801-8.

43. Eblin, K.E., T.G. Bredfeldt, and A.J. Gandolfi, *Immortalized human urothelial cells as a model of arsenic-induced bladder cancer*. *Toxicology*, 2008. **248**(2-3): p. 67-76.
44. Bertagna, A., et al., *The effects of conformational heterogeneity on the binding of the Notch intracellular domain to effector proteins: a case of biologically tuned disorder*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 2): p. 157-66.
45. Andersson, E.R., R. Sandberg, and U. Lendahl, *Notch signaling: simplicity in design, versatility in function*. *Development*, 2011. **138**(17): p. 3593-612.
46. Gordon, W.R., K.L. Arnett, and S.C. Blacklow, *The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 19): p. 3109-19.
47. Fryer, C.J., J.B. White, and K.A. Jones, *Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover*. *Mol Cell*, 2004. **16**(4): p. 509-20.
48. D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster, *The many facets of Notch ligands*. *Oncogene*, 2008. **27**(38): p. 5148-67.
49. Wright, G.J., et al., *Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development*. *Development*, 2004. **131**(22): p. 5659-69.
50. Popovic, M., et al., *The interaction of Jagged-1 cytoplasmic tail with afadin PDZ domain is local, folding-independent, and tuned by phosphorylation*. *J Mol Recognit*, 2011. **24**(2): p. 245-53.
51. Chapman, G., et al., *Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(5): p. 905-16.
52. Ladi, E., et al., *The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(6): p. 983-92.
53. Rana, N.A. and R.S. Haltiwanger, *Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors*. *Curr Opin Struct Biol*, 2011. **21**(5): p. 583-9.
54. Wang, M.M., *Notch signaling and Notch signaling modifiers*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011. **43**(11): p. 1550-62.
55. Borggreffe, T. and R. Liefke, *Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(2): p. 264-76.
56. LaVoie, M.J. and D.J. Selkoe, *The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 34427-37.
57. Dyczynska, E., et al., *Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(1): p. 436-44.
58. Zhou, S. and S.D. Hayward, *Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(18): p. 6222-32.
59. Sprinzak, D., et al., *Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states*. *Nature*, 2010. **465**(7294): p. 86-90.
60. Sprinzak, D., et al., *Mutual inactivation of Notch receptors and ligands facilitates developmental patterning*. *PLoS Comput Biol*, 2011. **7**(6): p. e1002069.
61. Lubensky, D.K., et al., *A dynamical model of ommatidial crystal formation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(27): p. 11145-50.

62. Axelrod, J.D., *Delivering the lateral inhibition punchline: it's all about the timing*. *Sci Signal*, 2010. **3**(145): p. pe38.
63. Cohen, M., et al., *Dynamic filopodia transmit intermittent Delta-Notch signaling to drive pattern refinement during lateral inhibition*. *Dev Cell*, 2010. **19**(1): p. 78-89.
64. Krol, A.J., et al., *Evolutionary plasticity of segmentation clock networks*. *Development*, 2011. **138**(13): p. 2783-92.
65. Poulton, J.S., et al., *The microRNA pathway regulates the temporal pattern of Notch signaling in Drosophila follicle cells*. *Development*, 2011. **138**(9): p. 1737-45.
66. Koto, A., E. Kuranaga, and M. Miura, *Apoptosis ensures spacing pattern formation of Drosophila sensory organs*. *Curr Biol*, 2011. **21**(4): p. 278-87.
67. Andersen, P., et al., *Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism*. *Trends Cell Biol*, 2012. **22**(5): p. 257-65.
68. Foltz, D.R., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability*. *Curr Biol*, 2002. **12**(12): p. 1006-11.
69. Hurlbut, G.D., et al., *Crossing paths with Notch in the hyper-network*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 166-75.
70. Bush, G., et al., *Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1*. *Dev Biol*, 2001. **229**(2): p. 494-502.
71. Berechid, B.E., et al., *Identification and characterization of presenilin-independent Notch signaling*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(10): p. 8154-65.
72. Sanchez-Solana, B., et al., *The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(6): p. 1153-64.
73. Bachmann, E., et al., *Mouse fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of mdlk, pref-1 and SCP-1: isolation, characterization and biology*. *J Reprod Fertil*, 1996. **107**(2): p. 279-85.
74. Minoshima, Y., et al., *Molecular cloning, expression analysis, promoter characterization, and chromosomal localization of the bovine PREF1 gene*. *Anim Genet*, 2001. **32**(6): p. 333-9.
75. Falix, F.A., et al., *Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(6): p. 988-95.
76. Benetatos, L., et al., *The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis*. *Cell Mol Life Sci*, 2012.
77. Hagan, J.P., et al., *At least ten genes define the imprinted Dlk1-Dio3 cluster on mouse chromosome 12qF1*. *PLoS One*, 2009. **4**(2): p. e4352.
78. Kagami, M., et al., *The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(6): p. e1000992.
79. da Rocha, S.T., et al., *Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain*. *Trends Genet*, 2008. **24**(6): p. 306-16.
80. Catto, J.W., et al., *Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(21): p. 8472-81.
81. Kawakami, T., et al., *Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(6): p. 821-30.
82. Zhou, Y., X. Zhang, and A. Klibanski, *MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor*. *J Mol Endocrinol*, 2012. **48**(3): p. R45-53.
83. Nichol, D. and H. Stuhlmann, *EGFL7: a unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease*. *Blood*, 2012. **119**(6): p. 1345-52.

84. Dikic, I. and M.H. Schmidt, *Notch: Implications of endogenous inhibitors for therapy*. Bioessays, 2010. **32**(6): p. 481-7.
85. Meister, J. and M.H. Schmidt, *miR-126 and miR-126*: new players in cancer*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 2090-100.
86. Saito, Y., et al., *Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **379**(3): p. 726-31.
87. Lobry, C., P. Oh, and I. Aifantis, *Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1931-5.
88. Koch, U. and F. Radtke, *Notch signaling in solid tumors*. Curr Top Dev Biol, 2010. **92**: p. 411-55.
89. Ranganathan, P., K.L. Weaver, and A.J. Capobianco, *Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 338-51.
90. Egloff, A.M. and J.R. Grandis, *Molecular Pathways: Context-dependent approaches to Notch targeting as cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2012.
91. Panelos, J. and D. Massi, *Emerging role of Notch signaling in epidermal differentiation and skin cancer*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(21): p. 1986-93.
92. Dotto, G.P., *Notch tumor suppressor function*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5115-23.
93. Watt, F.M., S. Estrach, and C.A. Ambler, *Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 171-9.
94. Williams, S.E., et al., *Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation*. Nature, 2011. **470**(7334): p. 353-8.
95. Massi, D. and J. Panelos, *Notch signaling and the developing skin epidermis*. Adv Exp Med Biol, 2012. **727**: p. 131-41.
96. Lowell, S., et al., *Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters*. Curr Biol, 2000. **10**(9): p. 491-500.
97. Rangarajan, A., et al., *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation*. EMBO J, 2001. **20**(13): p. 3427-36.
98. Ban, J., et al., *EWS-FLII suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma*. Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 7100-9.
99. Roy, M., W.S. Pear, and J.C. Aster, *The multifaceted role of Notch in cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(1): p. 52-9.
100. Armstrong, F., et al., *NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1730-40.
101. Lin, C., et al., *Mutations increased overexpression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Cell Int, 2012. **12**: p. 13.
102. Li, X., et al., *Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2851-61.
103. Robinson, D.R., et al., *Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer*. Nat Med, 2011. **17**(12): p. 1646-51.
104. Tonon, G., et al., *t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway*. Nat Genet, 2003. **33**(2): p. 208-13.

105. Wang, Z., et al., *Tumor suppressor functions of FBW7 in cancer development and progression*. FEBS Lett, 2012. **586**(10): p. 1409-18.
106. Speiser, J., et al., *Notch-1 and Notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer*. Int J Surg Pathol, 2012. **20**(2): p. 139-45.
107. Leong, K.G. and W.Q. Gao, *The Notch pathway in prostate development and cancer*. Differentiation, 2008. **76**(6): p. 699-716.
108. Guessous, F., Y. Li, and R. Abounader, *Signaling pathways in medulloblastoma*. J Cell Physiol, 2008. **217**(3): p. 577-83.
109. Hopfer, O., et al., *The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas*. Br J Cancer, 2005. **93**(6): p. 709-18.
110. Reedijk, M., et al., *Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma*. Int J Oncol, 2008. **33**(6): p. 1223-9.
111. Hsu, K.W., et al., *Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric cancer progression*. Carcinogenesis, 2012. **33**(8): p. 1459-67.
112. Sethi, N. and Y. Kang, *Notch signalling in cancer progression and bone metastasis*. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1805-10.
113. Mathot, L. and J. Steninger, *Behavior of seeds and soil in the mechanism of metastasis: a deeper understanding*. Cancer Sci, 2012. **103**(4): p. 626-31.
114. Wang, Z., et al., *The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(6): p. 745-51.
115. Garcia, A. and J.J. Kandel, *Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis*. Histol Histopathol, 2012. **27**(2): p. 151-6.
116. McGovern, M., et al., *A "latent niche" mechanism for tumor initiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11617-22.
117. Patel, N.S., et al., *Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(16): p. 4836-44.
118. Wang, J., B.A. Sullenger, and J.N. Rich, *Notch signaling in cancer stem cells*. Adv Exp Med Biol, 2012. **727**: p. 174-85.
119. McAuliffe, S.M., et al., *Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012.
120. van Es, J.H., et al., *Dll1(+) secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(10): p. 1099-104.
121. Penton, A.L., L.D. Leonard, and N.B. Spinner, *Notch signaling in human development and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(4): p. 450-7.
122. Wu, Y., et al., *Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1052-7.
123. Pinchot, S.N., et al., *Identification and validation of Notch pathway activating compounds through a novel high-throughput screening method*. Cancer, 2011. **117**(7): p. 1386-98.
124. Platta, C.S., et al., *Valproic acid induces Notch1 signaling in small cell lung cancer cells*. J Surg Res, 2008. **148**(1): p. 31-7.
125. Greenblatt, D.Y., et al., *Valproic acid activates Notch1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells*. Ann Surg, 2008. **247**(6): p. 1036-40.
126. Shi, T.P., et al., *Association of low expression of notch-1 and jagged-1 in human papillary bladder cancer and shorter survival*. J Urol, 2008. **180**(1): p. 361-6.

127. Maple, H. and P. Dasgupta, *The role of 'notch' in urological cancers*. BJU Int, 2009. **104**(1): p. 1-2.
128. Knuechel, R. and J.R.W. Masters, *Bladder Cancer Human Cell Culture*, J.R.W. Masters and B. Palsson, Editors. 2002, Springer Netherlands. p. 213-230.
129. Hsieh, J.J., et al., *Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 952-9.
130. Stylianou, S., R.B. Clarke, and K. Brennan, *Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1517-25.
131. Westhoff, B., et al., *Alterations of the Notch pathway in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22293-8.
132. Huang, J., et al., *Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2007. **28**(5): p. 1094-103.
133. Xi, L., et al., *Predicting nucleosome positioning using a duration Hidden Markov Model*. BMC Bioinformatics, 2010. **11**: p. 346.
134. Hoglund, M., *The bladder cancer genome; chromosomal changes as prognostic makers, opportunities, and obstacles*. Urol Oncol, 2012. **30**(4): p. 533-40.
135. Richter, J., et al., *Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1615-21.
136. Hoglund, M., et al., *Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma*. Cancer Res, 2001. **61**(22): p. 8241-6.
137. Fadl-Elmula, I., *Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas*. Cell Chromosome, 2005. **4**: p. 1.
138. Cai, T., et al., *Loss of heterozygosis on IFN-alpha locus is a prognostic indicator of bacillus Calmette-Guerin response for nonmuscle invasive bladder cancer*. J Urol, 2010. **183**(5): p. 1738-43.
139. Enders, G.H., et al., *p16 inhibition of transformed and primary squamous epithelial cells*. Oncogene, 1996. **12**(6): p. 1239-45.
140. Shaw, N.J., et al., *Effects of loss of p53 and p16 function on life span and survival of human urothelial cells*. Int J Cancer, 2005. **116**(4): p. 634-9.
141. George, B., et al., *p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(34): p. 5352-8.
142. Goebell, P.J., S.G. Groshen, and B.J. Schmitz-Drager, *p53 immunohistochemistry in bladder cancer--a new approach to an old question*. Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 377-88.
143. Schmitz-Drager, B.J., et al., *p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists?* Eur Urol, 2000. **38**(6): p. 691-9;discussion 700.
144. Vojtesek, B., et al., *Conformational changes in p53 analysed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein*. Oncogene, 1995. **10**(2): p. 389-93.
145. Marcel, V., et al., *p53 regulates the transcription of its Delta133p53 isoform through specific response elements contained within the TP53 P2 internal promoter*. Oncogene, 2010. **29**(18): p. 2691-700.

146. Fujita, K., et al., *p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1135-42.
147. Jamshidi, M., et al., *Germ line variation in TP53 regulatory network genes associates with breast cancer survival and treatment outcome*. Int J Cancer, 2012.
148. Havranek, O., et al., *No association between the TP53 codon 72 polymorphism and risk or prognosis of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma*. Leuk Res, 2011. **35**(8): p. 1117-9.
149. Xu, T., et al., *P53 Arg72Pro Polymorphism and Bladder Cancer Risk - Meta-analysis Evidence for a Link in Asians but not Caucasians*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(5): p. 2349-54.
150. Ye, Y., et al., *Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to bladder cancer*. Cancer, 2008. **112**(11): p. 2467-74.
151. Zhou, Y., et al., *Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24731-42.
152. Tzai, T.S., et al., *Clinical significance of allelotyping for urothelial carcinoma*. Urology, 2003. **62**(2): p. 378-84.
153. Rosin, M.P., et al., *Partial allelotyping of carcinoma in situ of the human bladder*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5213-6.
154. Hurst, C.D., et al., *Novel Tumor Subgroups of Urothelial Carcinoma of the Bladder Defined by Integrated Genomic Analysis*. Clin Cancer Res, 2012.
155. Strefford, J.C., et al., *Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2002. **135**(2): p. 139-46.
156. Bulashevskaya, S., et al., *Pathways of urothelial cancer progression suggested by Bayesian network analysis of allelotyping data*. Int J Cancer, 2004. **110**(6): p. 850-6.
157. Khoury, H., et al., *An upstream insulator regulates DLK1 imprinting in AML*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2260-3.
158. Yanai, H., et al., *Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency*. J Biochem, 2010. **148**(1): p. 85-92.
159. Wang, P., Z. Ren, and P. Sun, *Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation*. J Cell Biochem, 2012. **113**(6): p. 1868-74.
160. Saito, Y., et al., *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 435-43.
161. Vallot, C., et al., *A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(1): p. 47-60.
162. Fraser, P. and W. Bickmore, *Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 413-7.
163. Shahbazian, M.D. and M. Grunstein, *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 75-100.
164. Sandoval, J. and M. Esteller, *Cancer epigenomics: beyond genomics*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(1): p. 50-5.
165. Pantoja, C., et al., *Inactivation of imprinted genes induced by cellular stress and tumorigenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 26-33.

166. Stadtfeld, M., et al., *Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells*. Nat Genet, 2012. **44**(4): p. 398-405, S1-2.
167. Dudzic, E., et al., *Integrated epigenome profiling of repressive histone modifications, DNA methylation and gene expression in normal and malignant urothelial cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32750.
168. da Rocha, S.T., et al., *Restricted co-expression of Dlk1 and the reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: implications for cis-acting control*. Dev Biol, 2007. **306**(2): p. 810-23.
169. Lauss, M., et al., *DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status*. Epigenetics, 2012. **7**(8): p. 858-67.
170. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
171. Olsburgh, J., et al., *Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer*. J Pathol, 2003. **199**(1): p. 41-9.
172. Southgate, J., P. Harnden, and L.K. Trejdosiewicz, *Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications*. Histol Histopathol, 1999. **14**(2): p. 657-64.
173. Ye, Y.K., et al., *CK20 and Ki-67 as significant prognostic factors in human bladder carcinoma*. Clin Exp Med, 2010. **10**(3): p. 153-8.
174. Moll, R., et al., *Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines*. Am J Pathol, 1988. **132**(1): p. 123-44.
175. Schaafsma, H.E., et al., *Distribution of cytokeratin polypeptides in human transitional cell carcinomas, with special emphasis on changing expression patterns during tumor progression*. Am J Pathol, 1990. **136**(2): p. 329-43.
176. Ahmad, I., R.J. Barnetson, and N.S. Krishna, *Keratinizing squamous metaplasia of the bladder: a review*. Urol Int, 2008. **81**(3): p. 247-51.
177. Pons, F., et al., *Variant forms of bladder cancer: basic considerations on treatment approaches*. Curr Oncol Rep, 2011. **13**(3): p. 216-21.
178. McConkey, D.J., et al., *Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(3-4): p. 335-44.
179. Romih, R., et al., *Differentiation of epithelial cells in the urinary tract*. Cell Tissue Res, 2005. **320**(2): p. 259-68.
180. Maurer, S., G. Feil, and A. Stenzl, *[In vitro stratified urothelium and its relevance in reconstructive urology]*. Urologe A, 2005. **44**(7): p. 738-42.
181. Cross, W.R., et al., *A biomimetic tissue from cultured normal human urothelial cells: analysis of physiological function*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(2): p. F459-68.
182. Leinonen, P., et al., *Impaired gap junction formation and intercellular calcium signaling in urinary bladder cancer cells can be improved by Go6976*. Cell Commun Adhes, 2007. **14**(4): p. 125-36.
183. Rickard, A., et al., *Characterization of tight junction proteins in cultured human urothelial cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2008. **44**(7): p. 261-7.
184. Brooke, M.A., D. Nitoiu, and D.P. Kelsell, *Cell-cell connectivity: desmosomes and disease*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 158-71.
185. Karantza, V., *Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers*. Oncogene, 2011. **30**(2): p. 127-38.

186. Kim, S., P. Wong, and P.A. Coulombe, *A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth*. *Nature*, 2006. **441**(7091): p. 362-5.
187. Ku, N.O. and M.B. Omary, *A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8*. *J Cell Biol*, 2006. **174**(1): p. 115-25.
188. Toivola, D.M., et al., *Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(6): p. 1857-70.
189. Santini, M.P., et al., *Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): p. 9575-80.
190. Chang, A.Y., et al., *Calcineurin mediates bladder wall remodeling secondary to partial outlet obstruction*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **301**(4): p. F813-22.
- 190a Whitfield, J.F and B. Chakravarthy, *Calcium: The Grand-Master Cell Signaler*. NRC Research Press, 2001 (Buch)
191. Houben, E., K. De Paepe, and V. Rogiers, *A keratinocyte's course of life*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2007. **20**(3): p. 122-32.
192. Rogers, A.C., et al., *Review article: loss of the calcium-sensing receptor in colonic epithelium is a key event in the pathogenesis of colon cancer*. *Clin Colorectal Cancer*, 2012. **11**(1): p. 24-30.
193. Taylor, J.T., et al., *Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(32): p. 4984-91.
194. Lin, J., S. Denmeade, and M.A. Carducci, *HIF-1alpha and calcium signaling as targets for treatment of prostate cancer by cardiac glycosides*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(7): p. 881-7.
195. Shabir, S. and J. Southgate, *Calcium signalling in wound-responsive normal human urothelial cell monolayers*. *Cell Calcium*, 2008. **44**(5): p. 453-64.
196. Pan, Y., et al., *gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis*. *Dev Cell*, 2004. **7**(5): p. 731-43.
197. Reichrath, J. and S. Reichrath, *Notch-signaling and nonmelanoma skin cancer: an ancient friend, revisited*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **727**: p. 265-71.
198. Nicolas, M., et al., *Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin*. *Nat Genet*, 2003. **33**(3): p. 416-21.
199. Hainaud, P., et al., *The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8501-10.
200. Mumm, J.S. and R. Kopan, *Notch signaling: from the outside in*. *Dev Biol*, 2000. **228**(2): p. 151-65.
201. Fortini, M.E., et al., *An activated Notch receptor blocks cell-fate commitment in the developing Drosophila eye*. *Nature*, 1993. **365**(6446): p. 555-7.
202. Johnson, J.E. and R.J. Macdonald, *Notch-independent functions of CSL*. *Curr Top Dev Biol*, 2011. **97**: p. 55-74.
203. Bennani-Baiti, I.M., et al., *Notch signalling is off and is uncoupled from HES1 expression in Ewing's sarcoma*. *J Pathol*, 2011. **225**(3): p. 353-63.
204. Wang, Z., Y. Li, and F.H. Sarkar, *Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy*. *Curr Protein Pept Sci*, 2010. **11**(6): p. 398-408.
205. Baliko, F., et al., *Inhibition of notch signaling induces neural differentiation in Ewing sarcoma*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(5): p. 1686-94.

206. Sima, J., et al., [*Expression analysis of NOTCH1/HES1/PTEN signaling pathway in invasive bladder transitional cell carcinoma*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012. **92**(14): p. 964-7.
207. Grivas, P.D., M. Day, and M. Hussain, *Urothelial carcinomas: a focus on human epidermal receptors signaling*. *Am J Transl Res*, 2011. **3**(4): p. 362-73.
208. Ahmad, I., et al., *Ras mutation cooperates with beta-catenin activation to drive bladder tumourigenesis*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e124.
209. Wang, X., et al., *Methylation and aberrant expression of the Wnt antagonist secreted Frizzled-related protein 1 in bladder cancer*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(2): p. 334-338.
210. Yamamizu, K., et al., *Convergence of Notch and beta-catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors*. *J Cell Biol*, 2010. **189**(2): p. 325-38.
211. Nawroth, R., et al., *S6K1 and 4E-BP1 are independent regulated and control cellular growth in bladder cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27509.
212. Jo, H.S., et al., *Pten coordinates retinal neurogenesis by regulating Notch signalling*. *EMBO J*, 2012. **31**(4): p. 817-28.
213. Bailis, W. and W.S. Pear, *Notch and PI3K: how is the road traveled?* *Blood*, 2012. **120**(7): p. 1349-50.
214. Auderset, F., et al., *Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN γ secretion by T helper 1 cells during infection with Leishmania major*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(3): p. e1002560.
215. Yuan, Z., et al., *Characterization of CSL (CBF-1, Su(H), Lag-1) Mutants Reveals Differences in Signaling Mediated by Notch1 and Notch2*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(42): p. 34904-16.
216. Six, E., et al., *The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7638-43.
217. Jung, J., et al., *Regulation of Notch1 signaling by Delta-like ligand 1 intracellular domain through physical interaction*. *Mol Cells*, 2011. **32**(2): p. 161-5.
218. Kornilova, A.Y., C. Das, and M.S. Wolfe, *Differential effects of inhibitors on the gamma-secretase complex. Mechanistic implications*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16470-3.
219. Shearman, M.S., et al., *L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity*. *Biochemistry*, 2000. **39**(30): p. 8698-704.
220. Okochi, M., et al., *Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(12): p. 7890-8.
221. Borgegard, T., et al., *First and second generation gamma-secretase modulators (GSMs) modulate amyloid-beta (Abeta) peptide production through different mechanisms*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(15): p. 11810-9.
222. Shao, H., Q. Huang, and Z.J. Liu, *Targeting notch signaling for cancer therapeutic intervention*. *Adv Pharmacol*, 2012. **65**: p. 191-234.
223. Han, J., et al., *The cytotoxicity of gamma-secretase inhibitor I to breast cancer cells is mediated by proteasome inhibition, not by gamma-secretase inhibition*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(4): p. R57.
224. Medyouf, H., et al., *Acute T-cell leukemias remain dependent on Notch signaling despite PTEN and INK4A/ARF loss*. *Blood*, 2010. **115**(6): p. 1175-84.

225. St George-Hyslop, P. and P.E. Fraser, *Assembly of the presenilin gamma-epsilon-secretase complex*. J Neurochem, 2012. **120 Suppl 1**: p. 84-8.
226. Lee, J., et al., *Identification of presenilin 1-selective gamma-secretase inhibitors with reconstituted gamma-secretase complexes*. Biochemistry, 2011. **50**(22): p. 4973-80.
227. Honarnejad, K. and J. Herms, *Presenilins: Role in calcium homeostasis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(11): p. 1983-6.
228. Cowburn, R.F., et al., *Presenilin-mediated signal transduction*. Physiol Behav, 2007. **92**(1-2): p. 93-7.
229. Jo, D.G., et al., *Overexpression of calsenilin enhances gamma-secretase activity*. Neurosci Lett, 2005. **378**(1): p. 59-64.
230. Jo, D.G., et al., *Contribution of presenilin/gamma-secretase to calsenilin-mediated apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(1): p. 62-6.
231. Choi, Y.H., et al., *Contribution of gamma-secretase to calcium-mediated cell death*. Neurosci Lett, 2010. **469**(3): p. 425-8.
232. Zhang, J., et al., *Systematic analysis of genetic alterations in tumors using Cancer Genome WorkBench (CGWB)*. Genome Res, 2007. **17**(7): p. 1111-7.
233. Forbes, S.A., et al., *COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D652-7.
234. Dotto, G.P. and G. Cotsarelis, *Developmental biology. Rac1 up for epidermal stem cells*. Science, 2005. **309**(5736): p. 890-1.
235. Estrach, S., J. Legg, and F.M. Watt, *Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 16): p. 2944-52.
236. Chen, P.S., J.L. Su, and M.C. Hung, *Dysregulation of MicroRNAs in cancer*. J Biomed Sci, 2012. **19**(1): p. 90.
237. Wu, D., et al., *Downregulation of Dicer, a component of the microRNA machinery, in bladder cancer*. Mol Med Report, 2012. **5**(3): p. 695-9.
238. Clasen, S., et al., *Frequent and heterogeneous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma*. Br J Cancer, 1998. **77**(4): p. 515-21.
239. Kostyszyn, B., et al., *Distribution of presenilin 1 and 2 and their relation to Notch receptors and ligands in human embryonic/foetal central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 2004. **151**(1-2): p. 75-86.

X. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung I.1-1 Urothel und Urothelkarzinome</i>	3
<i>Abbildung I.1-2 p53 Genaufbau und Isoformen [31]</i>	6
<i>Abbildung I.3-1 Aktivität des kanonischen Notch Signalwegs</i>	11
<i>Abbildung I.3-2 Modell der Musterbildung</i>	15
<i>Abbildung I.3-3 DLK1-MEG3 Gengruppe</i>	18
<i>Abbildung I.3-4 Zielgerichtete Therapien</i>	25
<i>Abbildung II.8-1 Übersicht über die chemische Struktur der -Sekretase-Inhibitoren</i>	42
<i>Abbildung III.2-1 Übersicht über die drei Methoden Bisulfitsequenzierung, Pyrosequenzierung und COBRA</i>	54
<i>Abbildung IV.1-1 Zellbiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Zelllinie BC61</i> ...	65
<i>Abbildung IV.1-2 Zellbiologische und molekulargenetische Charakterisierung der Zelllinie BC44</i> ...	66
<i>Abbildung IV.1-3 p53 Proteinanalysen</i>	68
<i>Abbildung IV.1-4 (A) Immunhistochemische Färbungen im Primärtumor von BC44 und BC61</i>	70
<i>Abbildung IV.1-5 Lage der Primer zur Identifizierung der p53 Isoformen</i>	71
<i>Abbildung IV.1-6 Identifizierung der p53 Isoformen</i>	71
<i>Abbildung IV.1-7 Sequenzierung zur Identifizierung von p53 Polymorphismen</i>	74
<i>Abbildung IV.1-8 morphologische Veränderungen einer repräsentativen normalen Urothelkultur nach Zugabe von Kalziumchlorid zum KSFM Medium</i>	75
<i>Abbildung IV.1-9 Detaillierte Analyse in der Urothelkultur UP220 Passage 1</i>	76
<i>Abbildung IV.1-10 Kalziuminduzierte Differenzierung in der papillären Urothellarzinomzelllinie BC61</i>	78
<i>Abbildung IV.1-11 Veränderungen der Zellmorphologie infolge von Kalziumentzug auf die beiden Zelllinien HT1376 (A) und BFTC905 (B)</i>	79
<i>Abbildung IV.1-12 Proteinanalysen in den Zelllinien HT1376 und BFTC905 nach Kalziumentzug</i>	81
<i>Abbildung IV.1-13 morphologische Veränderungen in der Zelllinie BFTC905 nach Modulation des Kalziumgehalts im Medium nach 48h und 5 Tagen</i>	82
<i>Abbildung IV.2-1 DLK1 und MEG3 Expressionsanalysen mittels qPCR</i>	83
<i>Abbildung IV.2-2 Bisulfitsequenzierung</i>	85
<i>Abbildung IV.2-3 Pyrosequenzierung</i>	87
<i>Abbildung IV.2-4 COBRA-Fragmentlängenanalyse</i>	89
<i>Abbildung IV.2-5 Gendosismessung dargestellt</i>	90
<i>Abbildung IV.2-6 Analysen zur Nukleosomenpositionierung und Überlagerung mit den Methylierungsdaten</i>	91
<i>Abbildung IV.2-7 Analyse der IG DMR mit dem Programm NuPoP</i>	93
<i>Abbildung IV.2-8 In-silico Analyse dreier hypersensitiver DNase Segmente</i>	95
<i>Abbildung IV.2-9 Chromatinimmunopräzipitation</i>	97

<i>Abbildung IV.2-10 EGFL7 Expressionsanalyse mittels qPCR.....</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung IV.3-1 Notch-Genexpressionanalysen im Gewebe.....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung IV.3-2 Notch- Genexpressionsanalysen in den UC-Zelllinien.....</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung IV.3-3 Genexpressionsanalyse der wesentlichen Notch-Komponenten in den Mammakarzinom- und Nierenkarzinomzelllinien.....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung IV.3-4 Immunhistochemische Färbungen von NOTCH1, DELTA1 und JAGGED1 im verschiedenen Geweben.....</i>	<i>109</i>
<i>Abbildung IV.3-5 Immunhistochemie-Färbung von NOTCH1 und seinen Liganden in einer Normalblase.....</i>	<i>110</i>
<i>Abbildung IV.3-6 (A) Färbungen in ausgewählten Blasen Tumoren unterschiedlicher Stadien mit NOTCH1, DELTA und JAGGED1.....</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung IV.3-7 Western Blot Analysen.....</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung IV.3-8 Immunocytochemische Färbungen in UP und UC-Zelllinien.....</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung IV.3-9 Immunocytochemische Färbungen in den beiden Mammakarzinomzelllinien T47D und MCF7, sowie in der Nierenkarzinomzelllinie Caki-1.....</i>	<i>121</i>
<i>Abbildung IV.3-10 NOTCH1 Überexpression in Urothelkarzinomzelllinien und Urothelkulturen mittels qPCR.....</i>	<i>122</i>
<i>Abbildung IV.3-11 Auswirkungen der pIRES-NIICD Überexpression auf Proteinebene.....</i>	<i>124</i>
<i>Abbildung IV.3-12 Notch-Aktivität vor und nach NOTCH1 Überexpression.....</i>	<i>126</i>
<i>Abbildung IV.3-13 Notch-Aktivität mit verschiedenen Plasmiden.....</i>	<i>127</i>
<i>Abbildung IV.3-14 MTT-Assay nach pharmakologischer Inhibition des Notch Signalwegs mit Sekretase Inhibitoren.....</i>	<i>129</i>
<i>Abbildung IV.3-15 Pharmakologische Inhibition des Notch Signalwegs mit Sekretase Inhibitoren auf Proteinebene und Notch-Aktivität.....</i>	<i>130</i>
<i>Abbildung IV.3-16 Lokalisation und Interaktion von DELTA1. t.....</i>	<i>132</i>
<i>Abbildung IV.3-17 Effekte nach siRNA DELTA1-Transfektion.....</i>	<i>134</i>
<i>Abbildung IV.3-18 Effekte 48 h nach transientser shRNA Transfektion.....</i>	<i>135</i>
<i>Abbildung IV.3-19 Auswirkung einer DLL1 shRNA Transfektion.....</i>	<i>137</i>
<i>Abbildung IV.3-20 Proteinanalysen 48 h nach DLL1-shRNA Transfektion.....</i>	<i>138</i>
<i>Abbildung IV.3-21 Effekte nach stabiler DLL1-shRNA Transfektion in BFTC905 Zellen.....</i>	<i>140</i>
<i>Abbildung IV.3-22 Immunocytochemische Färbungen in stabil transfizierten DLL1-sh3 Klonen.....</i>	<i>142</i>
<i>Abbildung IV.3-23 Notch-Aktivität in stabil transfizierten DLL1-sh3 Klonen der Zelllinie BFTC90</i>	<i>143</i>
<i>Abbildung IV.3-24 Veränderung des Notch Genexpressionsprofils im Verlauf der kalziuminduzierten Differenzierung in UP und BC61.....</i>	<i>145</i>
<i>Abbildung V.1-1 Zytogenetische Wege im Urothelkarzinom, modifiziert nach Höglund et al. [136].</i>	<i>147</i>
<i>Abbildung V.1-2 Ausbreitung der Deletion auf 9p21 analysiert mittels Array-CGH..</i>	<i>148</i>
<i>Abbildung V.2-1 Bayesianisches Netzwerk im Urothelkarzinom, modifiziert nach [156].....</i>	<i>153</i>
<i>Abbildung V.2-2 Veränderungen auf dem Chromosomenabschnitt 14q32.2.....</i>	<i>159</i>
<i>Abbildung V.3-1 Urothelkarzinome können aus verschiedenen Differenzierungsstadien entstehen, modifiziert nach Volkmer et al. [3].....</i>	<i>161</i>

Abbildung V.3-2 Zytokeratinpopulationen in der normalen Urothelkultur UP220 und in der Urothelkarzinomzelllinie BC61. 163

Abbildung V.5-1 Beispiel für „cohesiveness“ in 5637 Zellen.. 181

Abbildung V.5-2 Modell für den Notch Signalweg in normalem Urothel.. 184

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle II.1-1 normales und tumorhaltiges Blasengewebe für DNA und RNA Analysen</i>	29
<i>Tabelle II.1-2 Paraffingewebe für immunhistochemische Analysen. t</i>	30
<i>Tabelle II.2-1 Zusammenstellung der Zelllinien</i>	32
<i>Tabelle II.5-1 Primer zur Analyse der DNA-Methylierung</i>	34
<i>Tabelle II.5-2 Primer zur Chromatinanalyse)</i>	35
<i>Tabelle II.5-3 Primer zur Genexpressionsanalyse</i>	37
<i>Tabelle II.5-4 Primer für Sequenzierungs-, Mutations-, Methylierungs- und Genexpressionsanalysen von p53 [31]</i>	39
<i>Tabelle II.5-5 Zusammenfassung der käuflich erworbenen PCR-Assays</i>	40
<i>Tabelle II.10-1 Übersicht über die verwendeten siRNA Sequenzen</i>	44
<i>Tabelle II.10-2 Primärantikörper</i>	44
<i>Tabelle II.10-3 Sekundärantikörper</i>	46
<i>Tabelle II.12-1 Übersicht über die verwendeten Geräte</i>	48
<i>Tabelle II.12-2 Datenbanken: Verwendung und Internetadresse</i>	49
<i>Tabelle III.2-1 Mastermixe und Bedingungen für die Reverse Transkription</i>	52
<i>Tabelle III.2-2 qRT-Bedingungen für die Real Time PCR</i>	53
<i>Tabelle IV.2-1 Chromatinzugänglichkeit der regulatorischen Regionen</i>	96
<i>Tabelle IV.3-1 Statistik der Expression in Blasengeweben</i>	103
<i>Tabelle IV.3-2 Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho</i>	104