HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

Epigenetische Biomarker für die Diagnose und Prognose des Harnblasenkarzinoms

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathmatisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Agnes Beermann
aus Allenstein

Düsseldorf, August 2014

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathmatisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Simeon Santourlidis

Korreferent: Prof. Dr. William Frank Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2014

„Die Naturwissenschaft braucht
der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1.Einleitung 1
1.1 Epigenetik 1
1.1.1 DNA-Methylierung 2
1.1.2 DNA-Methylierung in Tumorzellen 4
1.1.3 Histonmodifikation in Tumorzellen 10
1.2 Transponierbare Elemente 13
1.2.1 LINE-1 Retrotransposons 16
1.2.2 LINE-1 Retrotransposons in Tumoren 19
1.2.3 Retrotransposons und Telomerase 20
1.3 Harnblasenkarzinom 21
1.3.1 Anatomie und Histologie der Harnblase 21
1.3.2 Urin 22
1.3.3 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms 22
1.3.4 Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms 24
1.3.5 Klassifizierung von Blasenkarzinomen 26
1.3.6 Diagnostik, Therapie und Prognose des Harnblasenkarzinoms 28
1.4 Nichtinvasive Diagnostikverfahren für Harnblasenkarzinome 31
1.4.1 DNA-Methylierungsmarker 33
1.4.2 MicroRNAs als potentielle Biomarker für das Urothelkarzinom 35
1.5 Idiolokale Normierung 41
1.6 Fragestellung 44
2. Material und Methoden 46
2.1 Abkürzungen 46
2.2 Material 48
2.2.1 Proben 48
2.2.2 Medien und Antibiotika 50
2.2.3 Lösungen und Puffer 51
2.2.4 DNA-Standards, Enzyme und Substrate 51
2.2.5 Synthetische Primer [Thermo SCIENTIFIC] 52
2.2.6 Bakterienstämme und Vektoren 53
2.2.7 Eingesetzte Kits in der Molekularbiologie 53
2.2.8 Chemikalien 54
2.2.9 Geräte 54
2.2.10 Sonstige Materialien 55

2.2.11 Programme, Computersoftware und –hardware 55
2.3 Methoden 56
2.3.1 Nukleinsäuren 56
2.3.1.1 DNA-Extraktion aus dem Urin mittels Norgen Urine DNA-Isolation Kit (Norgen Biotek) 56
2.3.1.2 DNA-Extraktion aus Urin und Blutplasma mittels QIAamp® Circulating Nucleic Acid (Qiagen) 56
2.3.1.3 DNA-Extraktion aus Vollblut 57
2.3.1.4 DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebestanzen 57
2.3.1.5 RNA-Isolation 57
2.3.1.6 DNA- und RNA-Quantifizierung 58
2.3.1.7 DNA-Bisulfit-Konvertierung 58
2.3.1.8 PCR („Polymerase Chain reaction“) 59
2.3.1.9 Quantitative *real time* PCR 60
2.3.1.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA 63
2.3.1.11 DNA-Isolation aus Agarosegelen 64
2.3.1.12 Sonifizierung der DNA 64
2.3.1.13 Genomweite Methylierungsanalysen 64
2.3.1.14 In vitro Methylierung 67
2.3.1.15 Telomeren-Längenbestimmung mittels „Telomere Length Assay“ 68
2.3.1.16 MIRECAL – “Micrococcus nuclease/*real time* PCR chromatin accessibility assay with lokus specifity” 68
2.3.2 Entparaffinierung von FFPE-Gewebestanzen 69
2.3.3 Bakterien 70
2.3.3.1 Ligation von DNA 70
2.3.3.2 Transformation 70
2.3.3.3 Plasmid-Präparation 71
3. Ergebnisse 72
3.1 Relative Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels idiolokaler Normierung (IDLN) 72
3.1.1 Optimierung der Urinprobenlagerung 73
3.1.2 Optimierung der Primerbedingungen für die LINE-1 MSPCR 75
3.1.3 LINE-1 Methylierung in der zellulären und freien DNA aus Urin 76
3.1.3.1 Methylierung des LINE-1 Retrotransposons im Harnblasenkarzinom 77
3.1.3.2 Methylierung des Alu-Retrotransposon im Harnblasenkarzinom 80
3.1.3.3 Methylierungsanalysen des LINE-1 Promotors mittels Bisulfit-Sequenzierung 81
3.1.3.4 LINE-1 Transkripte im Urin von Harnblasenkarzinompatienten 88

3.1.3.5 MIRECAL (Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity): Direkte und semiquantitative Analyse des Chromatinverpackungsgrads des LINE-1 Promotors 94

3.2 Untersuchungen zur Telomerlänge der Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten 96

3.3 Methylierungsanalysen der Harnblasenkarzinome 104

3.3.1 Globale Methylierungsanalysen im Harnblasenkarzinomgewebe 104

3.3.2 Methylierungsanalysen im Gewebe, Blutplasma und Urin des Harnblasenkarzinoms 109

3.3.3 Globale Methylierungsanalysen der microRNAs im Harnblasenkarzinom 111

3.3.3.1 Methylierungsanalysen der microRNAs im Harnblasenkarzinom 112

3.3.3.2 Methylierungsanalysen der microRNAs in Blutplasma und Urin von Harnblasenkarzinompatienten 114

4. Diskussion 117

4.1 LINE-1 Methylierung und Transkription im Harnblasenkarzinom 117

4.1.1 Optimierung einzelner Parameter und relative Quantifizierung der LINE-1 Methylierung mittels MSPCR in der zellulären und freien DNA aus dem Urin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom 117

4.1.2 Methylierung und Aktivität des LINE-1 Promotors in der urinären DNA von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom 125

4.2 Bestimmung der Telomerenlänge der urinären DNA-Fraktionen von Harnblasenkarzinompatienten-Bedeutung als möglicher Progressionsparameter 130

4.3 Ausblick I 132

4.4 Genomweite Methylierungsanalysen von Gewebe-, Plasma- und Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten 133

4.4.1 Differentielle DNA-Methylierung an microRNA-Loci im Plasma-, Urin- und in Gewebeproben von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom 140

4.5 Ausblick II 145

5.1 Zusammenfassung 148

5.2 Summary 150

6. Literaturverzeichnis 152

7. Anhang 174

Veröffentlichungen 220

Danksagung 221

Eidesstattliche Erklärung 222

1.Einleitung

1.1 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ (Epi = griechisch für obenauf, dazu) wurde bereits 1942 von Conrad Waddington geprägt. Epigenetik ist eine Kombination aus den beiden Wörtern „Genetik“ und „Epigenesis“, wobei letzteres die Differenzierung der Zellen während der embryonalen Entwicklung bezeichnet (Craig und Wong, 2011). Epigenetik wurde früher als der Mechanismus beschrieben, durch den die Gene phenotypische Effekte bewirken (Weddington, 1942). Eine aktuelle Definition lautet: „Die Epigenetik umfasst vererbbare molekulare Modifikationen, die zu einer veränderten Genexpressionen führen, ohne die primäre Basensequenz der DNA zu verändern“ (Paulsen und Ferguson-Smith, 2001).

Diese Veränderungen der Genexpression spielen eine fundamentale Rolle in verschiedenen Aspekten der natürlichen Entwicklung eines neu entstehenden Organismus, angefangen von der ersten Phase der Ontogenese, in der eine „Zurücksetzung“ des epigenetischen Codes stattfindet, bis zur Festlegung der unterschiedlichen Zellschicksale (Reik et al., 2001).

Zu den am besten untersuchten epigenetischen Modifikationen gehört die DNA-Methylierung (1.1.1), die Histonmodifikation (1.1.3) und kleine, nicht-kodierende RNAs (miRNAs, 1.4.2) (Taby und Issa et al., 2010). Diese Modifikationen können sich jedoch im Verlauf der Jahre durch die Alterung, die Tumorgenese sowie äußere Einflüssen wie Stress und Ernährung verändern. Ein extremes Beispiel dafür, wie unterschiedlich sich Organismen einer Art trotz identischen Erbguts durch die genannten epigenetischen Modifikationen entwickeln können, hat die Studie an Honigbienen gezeigt (Lyko et al., 2010). Sie fanden 550 Gene, die eindeutige Methylierungsunterschiede zwischen den Arbeiterrinnen und den Königinnen aufwiesen. Larven, die nach dem Schlüpfen mit dem Gelée Royale gefüttert werden, entwickeln sich zu Königinnen, während diejenigen, die Pollen und Nektar erhalten, zu Arbeiterinnen heranwachsen. Daher dient dieses Bienenmodell vielen Forschern als Beispiel für die Plastizität humaner Zellen in Wechselwirkung mit verschiedenen Umwelteinflüssen. Denn genauso wie bei den Honigbienen besitzen humane gesunde Zellen zwar das gleiche Erbgut, können sich jedoch verschiedenartig entwickeln.

1.1.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist einer der am besten charakterisierten epigenetischen Mechanismen und betrifft mehrere biologische Prozesse. Dazu gehören die Stilllegung der Transposons im Genom, das genetische *Imprinting* und die Inaktivierung des X-Chromosoms. Im Vergleich zu anderen epigenetischen Modifikationen wird angenommen, dass die DNA-Methylierung besonders stabil ist (Wu und Zhang, 2010). Die Cytosinmethylierung erfolgt nach der DNA-Synthese durch den enzymatischen Transfer einer Methylgruppe von dem Methyldonor S-Adenosylmethionin auf das Kohlenstoffatom 5 des Cytosins (Laird, 2003). Dieses befindet sich in 5´-Position unmittelbar vor einem Guanosin, sodass ein so genanntes CpG-Dinukleotid vorliegt.

Die meisten CpG-Dinukleotidpaare sind in Säugerzellen methyliert (Laird und Jaenisch, 1996). Im Menschen sind ca. 70-80% aller CpG-Dinukleotide davon betroffen (Bird, 2002), sodass 2%-5% aller Cytosine als Methylcytosine vorliegen (Paz et al., 2002). In bestimmten Bereichen des Genoms befinden sich CpG-Dinukleotidanhäufungen, die als „CpG-Inseln“ (CGIs) bezeichnet werden. Diese CpG-Inseln sind im Durchschnitt über 1 kb lang und in der 5´ Promotorregion, von etwa 50% aller Gene lokalisiert (Illingworth und Bird, 2009). CGIs machen 1% des Genoms aus (Illingworth et al., 2010). Weitere CpG-Inseln wurden in repetitiven Elementen, Zentromeren und Microsatellit-Sequenzen des Genoms gefunden (Jones und Baylin, 2002; Klose und Bird, 2006). Analysen der Sequenzierung des humanen Genoms deuten auf 29.000 CpG-Inseln im Menschen hin (Lander et al., 2001 und Venter et al., 2001). In früheren Studien wurde geschätzt, dass ca. 60% der humanen Gene mit CGIs assoziiert sind, von denen aber die Mehrheit unmethyliert während allen Entwicklungsstadien und in allen Gewebetypen vorliegt (Antequera und Bird, 1993). Ein kleiner aber signifikanter Anteil aller CGIs wird während der Entwicklung methyliert und wenn das passiert wird der ggf. dazugehörige Genpromotor dauerhaft stillgelegt (Bird, 2002). CpG-Inseln sind jedoch in den Promotoren vieler *housekeeping*- und entwicklungsregulierenden Genen konstitutiv hypomethyliert. Fast die Hälfte der unmethylierten CpG-Inseln, die in Säugern identifiziert worden sind, kommt nicht in annotierten Genpromotoren vor, sodass sie als „Orphan“-CpG-Inseln bezeichnet werden (Smith und Meissner, 2013).

Enzyme, die für die Modifikation der DNA-Methylierung verantwortlich sind, die DNA-Methyltransferasen (DNMTs), sind sehr gut in Säugern charakterisiert und

konserviert (Law et al., 2010). Die Katalysierung einer Methylgruppe in Säugern kann durch drei verschiedene DNMTs (DNMT1, DNMT3A und DNMT3B) erfolgen (Abb. 1). Diese werden in zwei Klassen eingeteilt: *de novo* -und Erhaltungsmethylasen (Goll und Bestor, 2005).

DNMT3A sowie DNMT3B werden als die *de novo* Methyltransferasen bezeichnet und in Säugerzellen dazu verwendet, unmethylierte DNA zu methylieren (Jair et al., 2006). DNMT1, bekannt als die Erhaltungsmethyltransferase, besitzt eine hohe Präferenz für hemimethylierte DNA-Abschnitte und wird von den Zellen hauptsächlich dazu verwendet, die Vererbung des DNA-Methylierungsstatus an Tochterzellen während der Replikation zu gewährleisten (Jones et al., 2009; Pradhan et al., 1999).

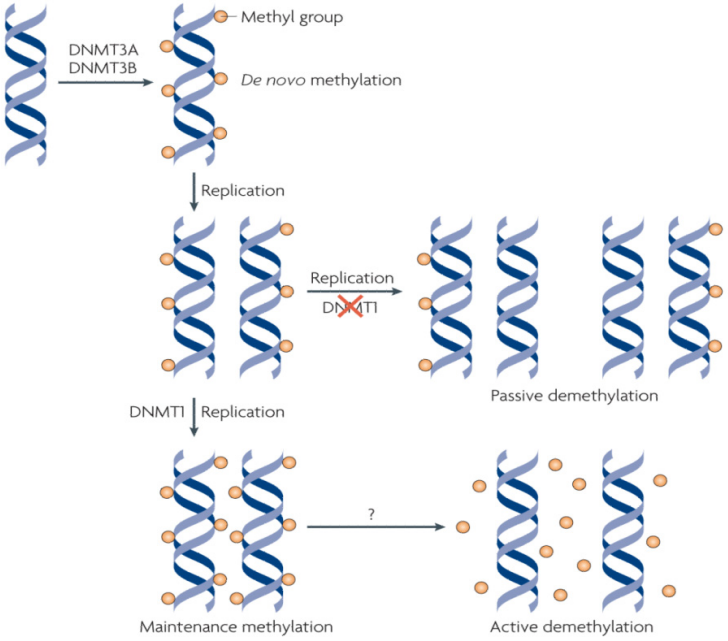


Abb. 1: Mechanismus der DNA-Methylierung und -Demethylierung (Wu und Zhang et al., 2010). Während der frühen Entwicklung werden die Methylierungsmuster initial durch die de novo DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B etabliert. Bei der Replikation und Zellteilung erfolgt das Anbringen der Methylmuster in den Tochterzellen hauptsächlich durch DNMT1. Ist dieses inhibiert oder abwesend, kann die DNA nicht methyliert werden und fortlaufende Zellteilungen haben die passive Demethylierung zur Folge. Aktive Demethylierung dagegen kann durch den enzymatischen Ersatz von 5-Methylcytosin zu C auftreten.

Es wird angenommen, dass die progressive DNA-Methylierungsveränderungen an der zellulären Alterung und an verschiedenen pathologischen Prozessen, einschließlich Krebs, beteiligt ist (Iacobuzio-Donahue, 2009). Dabei erfolgt eine globale Hypomethylierung, wobei dennoch lokal einzelne Genpromotoren hypermethyliert werden. Der Verlust der DNA-Methylierung kann mittels eines aktiven oder passiven Mechanismus erfolgen. Aktive DNA-Demethylierung ist ein enzymatischer Prozess, der auf der Abnahme der Methylgruppe von dem 5-

Methylcytosin durch Brechung der Carbon-Carbon-Bindung beruht. Passive DNA-Methylierung dagegen bezieht sich auf den Verlust der Methylgruppe des 5-Methylcytosins, wenn DNMT1 inhibiert wird oder während der aufeinanderfolgenden Replikationsschritte abwesend ist (Wu und Zhang, 2010).

DNA-Methylierungsmuster werden von der Umwelt, der Lebensweise, dem Alter sowie demographischen und genetischen Faktoren beeinflusst (Christensen und Marsit, 2011; Stepanow et al., 2011). Vor allem aber auch Giftstoffe wie Asbest, Alkohol, Strahlung, Arsen und Luftverschmutzung sind mit der Karzinogenese (Christensen und Marsit, 2011) und gleichzeitig mit DNA-Methylierungs-veränderungen assoziiert. Die DNA-Methylierung von LINE-1 Retrotransposons, sowie die differentiell methylierten inter- und intragenetischen Genombereiche und miRNAs im Gewebe und den Körperflüssigkeiten von Harnblasenkarzinompatienten bilden die Grundlage dieser Arbeit.

1.1.2 DNA-Methylierung in Tumorzellen

Krebszellen weisen genomweit auftretende epigenetische Aberrationen auf. Dazu gehören die Genpromotor-spezifische Hypermethylierung, die globale Hypomethylierung, das *genomic imprinting* (Verlust elterlicher Prägung), die Histon-Methylierung und -Deacetylierung, die Regulierung der miRNAs und anderer Akteure der epigenetischen Maschinerie (Taby und Issa, 2010).

DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen sind zusammenhängende Phänomene, die gemeinsam die Genexpression bestimmen (D´Alessio und Szyf, 2006). Die Fehlregulation der DNA-Methylierung tritt in fast allen Karzinomen auf und gilt als ein etabliertes Merkmal von Krebs (Wilson et al., 2007, Hansen et al., 2011). So können die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, die mit ihrer transkriptionellen Stilllegung einhergeht (Esteller, 2005, Herman und Baylin, 2003), als auch die Hypomethylierung von Protoonkogenen und deren Aktivierung zum Tumor führen.

<u>DNA-Hypermethylierung</u>

Die DNA-Methylierung ist an einer Vielzahl von Aufgaben in verschiedenen Krebsarten und wahrscheinlich in unterschiedlichen Stadien der Onkogenese beteiligt (Laird und Jaenisch, 1996). Sie ist ein frühes Ereignis in der Tumorgenese mit einer wahrscheinlich ursächlichen Bedeutung für die Initiation sowie der Progression (Issa, 2008) und stellt einen weiteren Mechanismus für die Stilllegung

der Tumorsuppressorgene dar (Abb. 2), der auswirkungsmäßig äquivalent zu einer genetischen „nonsense“-Mutation sein kann (Jones und Baylin, 2007).

Für Kolonkarzinome sowie Mammakarzinomzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass Krebs-assoziierte Hypermethylierungen bevorzugt an den CpG-*shores* Regionen, den Flanken der CpG Inseln - stattfinden, als innerhalb der CpG Inseln (Hansen et al., 2011, Ruike et al., 2010).

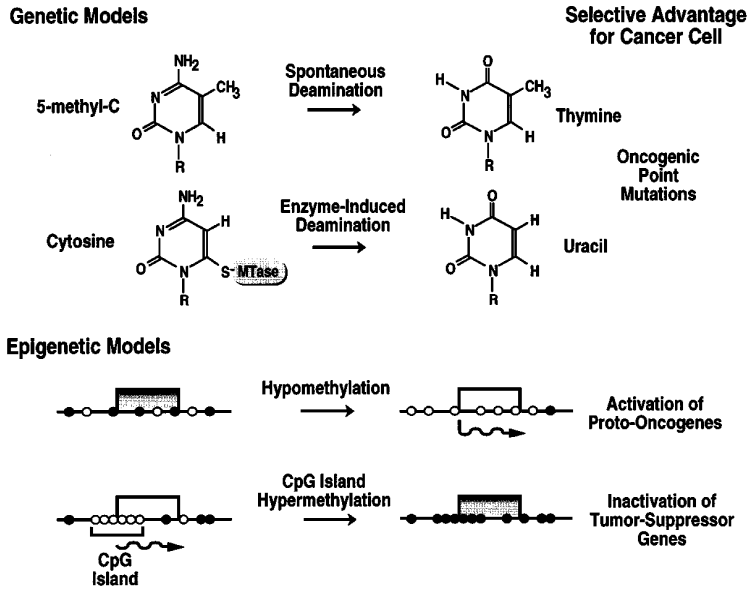


Abb. 2 DNA-Methylierung in Tumoren (Laird und Jaenisch, 1996). Dargestellt sind zwei Modelle zur Desaminierung in der Klasse der Genetik und Epigenetik. Zu der Epigenetik gehören die Hypomethylierung der Protoonkogene sowie die Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene. Weiße Punkte repräsentieren die unmethylierten und die schwarzen Punkte die methylierten CpG-Dinukleotide. Weiße Rechtecke symbolisieren aktive Gene während die schattierten für die inaktiven Gene stehen.

Epigenetische Genstilllegung auf Grund von Hypermethylierung der CpG-Inseln im Genpromotor ist eines der am meist verbreiteten Mechanismen, durch die Tumorsuppressorgene während der Tumorgenese inaktiviert werden (Suzuki et al., 2012). Diese würden unter normalen Umständen von der Methylierung und damit vor der Genrepression bewahrt bleiben. Zu den bekannten Genen mit Promotormethylierung in Blasenkarzinomen zählen z.B. *RASSF1, E-Cadherin, DAPK, h-TERT, BCL2, APC, p14* und *GSTP1* (Rouprét et al., 2008; Yates et al., 2006; Yates et al., 2007; Friedrich et al., 2004).

Die Genaktivität kann auf unterschiedliche Art und Weise mittels der DNA-Methylierung inhibiert werden. So beeinträchtigt die Methylierung der CpG-Regionen die Transkription durch Bindung von Methylgruppen-bindenden Repressoren*, Methyl-CpG-binding proteins* (MeCPs), die als Adaptoren zwischen der methylierten DNA

und Chromatin-modifizierenden Proteinen fungieren (Jones et al., 1998; Ng et al., 1999; Hendrich und Bird, 1998). Vier dieser Proteine -MBD1, MBD2, MBD3 und MeCP2- haben die Methylierungs-abhängige Genrepression der Transkription zur Folge (Bird und Wolffe, 1999). Laut Prokhortchouk et al. hat das unverwandte Kaiso-Protein kürzlich ebenfalls gezeigt, dass es an methylierte DNA binden und so eine Methylierungs-abhängige Repression auslösen kann (Prokhortchouk et al., 2001). MeCPs können mittels ihrer speziellen Domäne (*methyl CpG binding domain*, MBD) an methylierte CpGs binden (Abb. 3).

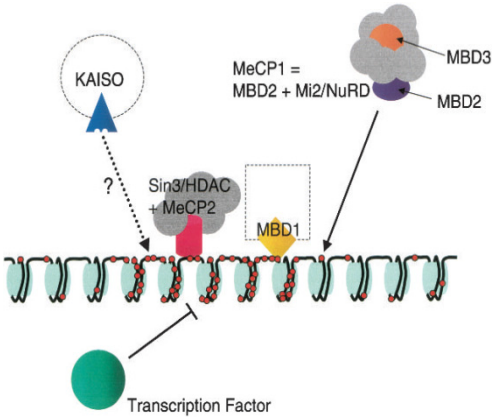


Abb. 3: Transkriptionelle Repression durch DNA-Methylierung (Bird, 2002). Die roten Punkte symbolisieren die methylierten CpGs auf der nukleosomalen DNA, durch die der unten dargestellte Transkriptionsfaktor nicht an die Erkennungsseite binden kann. Proteinkomplexe wie das Methyl-CpG-Bindungsprotein MeCP2 (assoziiert mit dem Histondeacetylase-Komplex), MeCP1 (mit MBD2 und den NuRD Kernrepressor-Komplex), sowie die beiden noch uncharakterisierten Komplexe MBD1 und Kaiso binden an die methylierte DNA. Die Bindung von MeCP2 und MBD1 an das Chromosom erfolgt fester als die von MeCP1.

Eine weitere Möglichkeit der Genaktivität stellt die direkte Interferenz der DNA-Methylierung dar, die eine Bindung der Transkriptionsfaktoren verhindert, wenn ein methyliertes CpG auf der nukleosomalen DNA vorhanden ist (Abb. 3).

DNA-Hypomethylierung

Hypomethylierung war die erste Art der epigenetischen Transition, die mit Krebs assoziiert worden ist (Feinberg und Vogelstein, 1983). Sie kann an einzelnen Loci oder verbreitet auf größeren chromosomalen Regionen auftreten (Allis et al., 2006). Darüber hinaus haben viele Studien gezeigt, dass im Tumor Protoonkogene mit einer Reduktion der DNA-Methylierung einhergehen können. Eine mögliche Konsequenz der hochgradigen Hypomethylierung ist die genomische Instabilität, Begünstigung von Mutationen, Deletionen, Amplifikationen, Inversionen sowie Translokationen (Chen et al., 1998). Die genomweite DNA-Hypomethylierung kann zu einer 70%-

tigen Reduktion des 5-Methylcytosins im Genom führen und ist ebenfalls in den repetitiven DNA-Elementen (1.2) wie z.B. den LINEs, SINEs und HERV-Ks vertreten. Florl et al. haben 1999 mittels ihrer Untersuchungen gezeigt, dass LINE-1 Sequenzen sehr stark methyliert im normalen Gewebe vorliegen, während diese bei 95% der untersuchten Urothelkarzinomroben signifikant hypomethyliert waren. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Hypomethylierung im Blasenkarzinom unabhängig vom Stadium ist, gleichzeitig aber dazu tendiert, mit dem Differenzierungsgrad (*Grade*) anzusteigen. Laut Schernhammer et al., 2010 führt starker Alkoholkonsum zu einem signifikanten Risikoanstieg LINE-1 hypomethylierte Kolonkarzinome zu entwickeln.

Genomic imprinting

Die Gametogenese und die frühe Embryonalentwicklung stellen die zwei Phasen im humanen Lebenszyklus dar, die einer intensiven Methylierungsveränderung unterliegen. Allgemein spricht man von genomischer Prägung („*genomic imprinting“)*, wenn paternale und maternale Allele im Nachkommen unterschiedlich exprimiert werden –obwohl beide elterlichen Gene identische Nukleotidsequenzen besitzen (Knippers, 2006)

Genomic imprinting ist ein epigenetischer Prozess (Macdonald et al., 2013), der definiert ist als eine funktionelle Differenz zwischen zwei Allelen, die durch den elterlichen Ursprung des Allels festgelegt ist (Gold und Pedersen, 1994; Driscoll, 1994). D.h., die geschlechtsspezifische genomische Prägung in der elterlichen Keimbahn ist dafür verantwortlich, dass bestimmte Gene während der Entwicklung des Nachwuchses und/oder im ausgewachsenen Organismus nur von den väterlichen oder mütterlichen Chromosomen exprimiert werden (Lucifero et al., 2004). Prägungen werden während der Gametogenese erworben, wenn die genomweite epigenetische Remodellierung erfolgt (Abb. 4). Diese Prägungen müssen dann während der Präimplantation erhalten bleiben, wenn eine weitere Welle der genomweiten epigenetischen Remodellierung erfolgt (Macdonald und Mann, 2013). Bei der Maus und den meisten anderen Säugertierspezies (einschließlich des Menschen) wird der väterliche Vorkern von der befruchteten Eizelle innerhalb weniger Stunden drastisch demethyliert (Mayer et al., 2000; Haaf, 2005). Es wird angenommen, dass es sich um einen aktiven Prozess handelt, bei dem möglicherweise die Methylgruppen von der DNA abgespalten werden oder es

mittels einer Art Basenexcisionsreparatur die Methylcytosine gegen die Cytosine ausgetauscht werden. Das mütterliche Genom ist vor dieser aktiven Demethylierung geschützt und wird erst ab dem Zweizellstadium durch einen replikationsabhängigen Mechanismus graduell passiv demethyliert (Abb.1), die mit jeder nachfolgenden Zellteilung einher geht (Haaf, 2005, Monk et al., 1987). Das bedeutet, dass nach jeder Zellteilung sowie DNA-Replikation 50% der Methylgruppen verloren gehen. Dieser Prozess ist möglich, weil in frühen Embryonen die Oocyten-spezifische Isoform von DNMT1 im Zytoplasma separiert und aus dem Zellkern ausgeschlossen ist und damit nicht an hemimethylierte DNA im Zellkern binden kann (Cardoso und Leonhardt, 1999; Carlson et al., 1992).

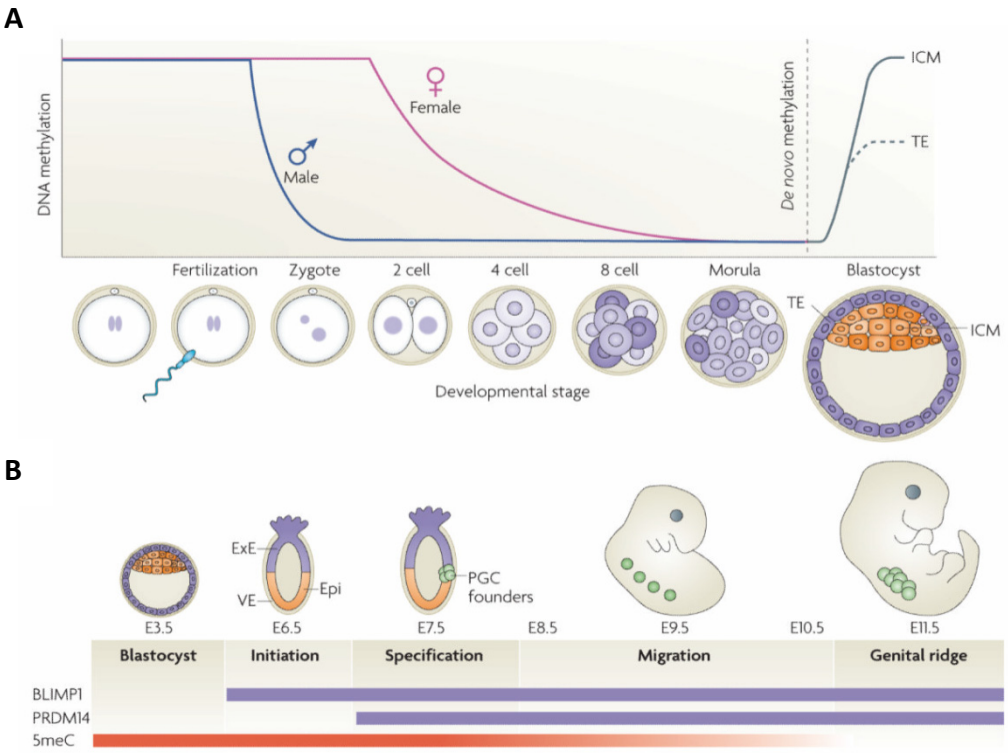


Abb. 4 Dynamik der DNA-Methylierung während der frühen embryonalen Entwicklung (Wu und Zhang, 2010). (A) Aktive Demethylierung des paternalen Genoms in der Zygote. Kurz nach dem ein Spermium das Ei befruchtet hat, wird das paternale Genom einer genomweiten, aktiven DNA-Demethylierung unterzogen und verbleibt unmethyliert in den sich anschließenden Zellteilungen. Während dieser Zeit erfährt das mütterliche Genom eine graduelle, passive Demethylierung. *De novo* Methylierungsmuster werden durch DNMT3A und DNMT3B während der Entwicklung der Blastozyste etabliert. (B) Aktive Demethylierung in primordialen Keimzellen (PGCs). Nach der Implantation der Blastozyste (7,5 d) produziert das extraembryonale Ektoderm (ExE) und das viszerale Endoderm (VE) Signale, die einen Teil der Zellen dazu bestimmen PGCs zu werden. Für diesen Prozess werden 2 Schlüssel-Transkriptionsfaktoren benötigt (BLIMP1 und PDRM14), welche während dieses Entwicklungsstadiums exprimiert werden. In weiteren Spezifikationen teilen sich die PGC-Gründerzellen in Gegenward von der DNA-Methyltransferase 1, DNMT1 und wandern in Richtung Keimleiste. Während der Migration und der Ankunft in der Keimleiste wird das 5-Methylcytosin aktiv gelöscht. ICM=inner cell mass, TE=trophectoderm.

Aber es ist auch aus der Literatur bekannt, dass bestimmte Regionen im Genom von der Demethylierungswelle ausgeschlossen werden. Es wird angenommen, dass in den primordialen Keimzellen ca. 100-200 elterliche Gene von den ca. 30.000 menschlichen Genen vor diesem Prozess der Reprogrammierung geschützt bleiben und das diese Keimzellen das paternale Keimbahnmuster während der weiteren Entwicklung beibehalten. Zu diesen genomischen Regionen gehören *imprinting*-Kontrollregionen, intrazisternale A-Partikel Retrotransposons sowie das zentrische und perizentrische Heterochromatin (Olek und Walter, 1997; Lane et al., 2003; Rougier et al., 1998; Santos et. al, 2002). Der damit verbundene Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Methylierungen in diesen Regionen benötigt werden, damit die transkriptionelle Repression und die chromosomale Stabilität gewährleistet sind (Wu und Zhang, 2010).

Mit Hilfe der DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B werden während der Entwicklung der Blastozyste neue Methylierungsmuster geschaffen (*de novo* Methylierung).

Der Verlust oder die Relaxation der genomischen Prägung von Genen ist eine epigenetische Anomalie in vielen Karzinomen, die mit einem Anstieg der biallelischen Expression verbunden ist. Am besten dokumentiert ist dies für das *H19*- sowie das *insulin-like growth factor 2* (IGF2) - Gen (Laird und Jaenisch, 1996). Der Tandem *Igf2-H19* Lokus befindet sich auf dem Chromosom 11p15 beim Menschen und dem Chromosom 7 bei Mäusen (Ratajczak, 2012). Während der *Igf2* Lokus *insulin-like growth factor 2* (IGF2) kodiert, was ein wachstumsförderndes Peptidhormon ist, das stark in der Embryogenese exprimiert wird, kodiert der *H19* Lokus eine nicht-kodierende RNA (ncRNA), die zu einem Anstieg von mehreren microRNAs führt, die einen entgegengesetzten (negativen) Effekt auf die Zellproliferation besitzen (Gabory et al., 2010). Die *IGF2*-Prägung wird durch die differentiell methylierte Domäne (DMD) in der *imprinting*-Kontrollregion reguliert (Abb.5), die zwischen *IGF2* und *H19* lokalisiert ist (Pan et al., 2013). Die Funktion des *H19* Gens ist nicht genau bekannt, aber es konnte nachgewiesen werden, dass es essentiell für das humane Tumorwachstum ist (Gao et al., 2013). Biallelische Expression des *IGF2* Gens wurde bereits in Wilms´-Tumoren beobachtet (Taniguchi et al., 1995; Steenman et al., 1994). Zusätzlich konnte eine biallelische Expression von beiden Genen, *IGF2* sowie *H19*, in humanen Keimzellentumoren nachgewiesen werden (van Gurp et al., 1994).

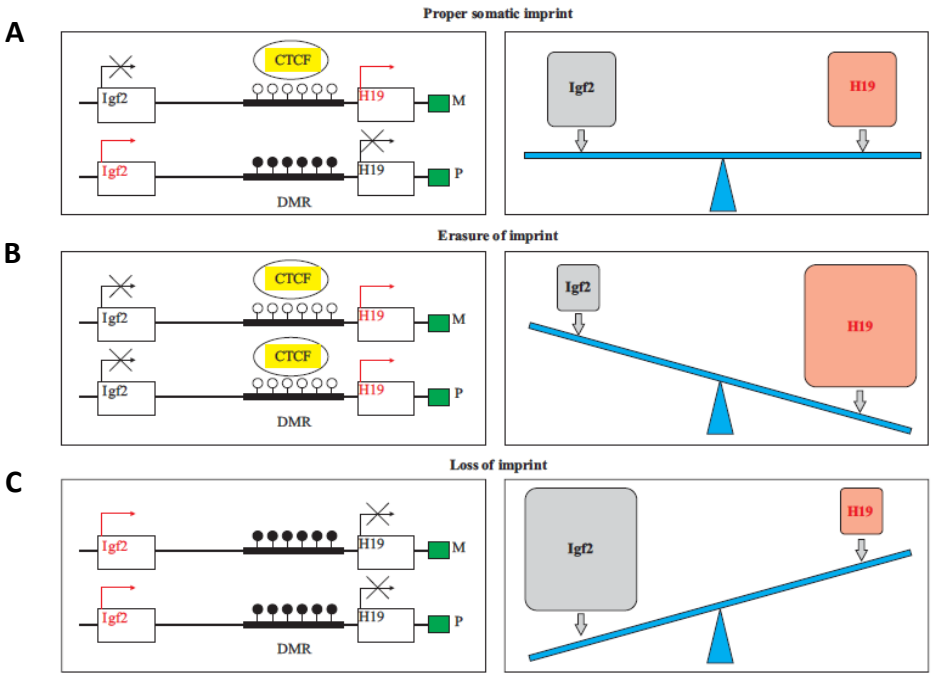


Abb. 5 Methylierungsveränderungen der DMRs und ihre Auswirkungen auf die *Igf2*- und *H19*-Expression. (A) Somatische Prägung in somatischen Zellen, die auf dem exakten Gleichgewicht der *Igf2*- und *H19*-Expression beruht. (B) Löschung der Prägung auf den *Igf2-H19* Lokus in primordialen Keimzellen und pluripotenten Stammzellen. DMRs paternaler (P) und maternaler (M) Chromosomen werden durch das CTCF Insulator Protein erfasst, wodurch nur *H19* mRNA transkribiert wird (rote Pfeile). (C) Verlust der Prägung auf dem *Igf2-H19* Lokus in Tumorzellen verschiedener Krebsarten. Sind beide DMRs methyliert, kann das Insulator-Protein CTCF nicht an die DNA binden, wodurch die Transkription der *IGF2* mRNA auf beiden elterlichen Chromosomen stimuliert wird (rote Pfeile). Zellen mit solchen epigenetischen Veränderungen unterliegen der autokrinen Stimulation (Ratajczak, 2012).

1.1.3 Histonmodifikation in Tumorzellen

Histonmodifikationen können in aktivierende bzw. reprimierende Modifikationen eingeteilt werden, wobei jede Histonmodifikation eine sterische Veränderung der Histonproteine zur Folge hat. Dadurch wird die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen beeinflusst. D.h. einige Modifikationen (z.B. die Methylierung) können durch Bildung von starken Interaktionen der Nukleosomen die Bindung von Transkriptionsfaktoren unterbinden. Im Vergleich dazu führt die chemische Modifikation, die Acetylierung zum „offenen“ Chromatin (Janning und Knust, 2004) und damit zur Transkription.

Erst in den letzten 15 Jahren konnte durch die technische Entwicklung ein großes Wissen über die Histon-Acetylierung (und die damit assoziierten, katalytisch agierenden Acetyltransferasen) generiert werden, obwohl diese bereits 1960 entdeckt worden ist. Histone werden nicht länger als „DNA-Verpackungsproteine“ betrachtet, sondern sind als dynamische Regulatoren der Genaktivität anerkannt, die zusätzlich zu der Acetylierung einer Vielzahl an posttranskriptionellen chemischen

Modifikationen unterzogen werden, wie beispielsweise die Methylierung und die Phosphorylierung (Wang et al., 2004).

Die Histon-Acetylierung beeinflusst hauptsächlich fünf biologische Prozesse: (1.) Aufbau der Histone und DNA in Nukleosomen, (2.) Regulation der genomweiten Chromatinstruktur (z.B. Heterochromation vs. Euchromatin), (3.) Regelung der Gentranskription, (4.) DNA-Synthese und (5.) DNA-Reparaturen (Craig und Wong, 2011; Sanders et al., 2004). Histon-Acetylierungen werden durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) erzeugt und durch Histon-Deacetylasen (HDAC) entfernt (Zylka-Menhorn, 2012). Studien haben gezeigt, dass Veränderungen der genspezifischen Histon-Acetylierung zu Karzinomen führen können (Fraga et al., 2005; Ropero und Esteller 2007).

Die DNA-Methylierung und die Histonmodifikationen haben nicht nur äußerst wichtige Kontrollfunktionen in der Genaktivität und der nukleären Architektur (Esteller, 2007), sondern die DNA-Methylierungsveränderungen sind an aberrante Muster der Histonmodifikationen (Abb. 6) gekoppelt (Nguyen et al., 2001, Fraga et al., 2005).

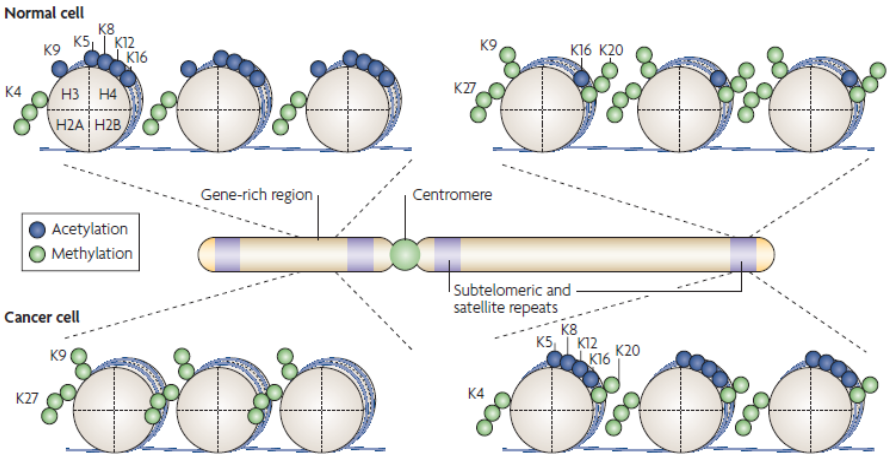


Abb. 6 Histonmodifikation eines typischen Chromosoms in gesunden Zellen und Krebszellen (Esteller, 2007). Nukleosomale Bereiche sind im Kontext zu der chromosomalen Lokalisation und transkriptionellen Aktivität dargestellt. Die Oktamere, bestehend aus den Histon-Proteinen H2A, H2B, H3 und H4, sind als graue Zylinder abgebildet. Die Histon-Acetylierung (blaue Punkte) und die Di- und Trimethylierung (grüne Punkte) sind gezeigt. Gesunde Zellen besitzen in den genomischen Regionen, die die Promotoren von Tumorsuppressorgenen beinhalten, eine Anhäufung von Histon-modifikationen, die mit der aktiven Transkription assoziiert ist. So z.B. die Acetylierung von H3 und H4 Lysin-Enden und die Trimethylierung von K4 des H3. In den gleichen Zellen sind DNA-Wiederholungen und andere Heterochromatin-Regionen charakterisiert durch die Trimethylierung von K27 und Dimethylierung von K9 auf H3 und Trimethylierung von K20 auf H4, welche als repressive Marker fungieren. In transformierten Zellen ist dieses Szenario durch den Verlust der „aktiven" Histon-Marker auf den Promotoren der Tumorsuppressorgene und den Verlust der repressiven Marker wie z.B. die Trimethylierung von K20 auf H4 oder von K27 auf Histon H3 auf der subtelomerischen DNA oder anderen DNA-Wiederholungen gestört. Dies führt zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur in diesen Regionen.

Der Acetylierungs- und Methylierungsstatus spezifischer Lysinreste, die die Enden der nukleosomalen Kernhistone beinhalten, ist dafür bekannt eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der Chromatinstruktur und der Genexpression zu besitzen (Wang, et al., 2004). Eines der wichtigsten transkriptionellen Aktivierungsereignisse ist die Methylierung von Lysin 4 (K4) im Histon H3, welches mono- (K4me1), di- (K4me2) oder tri- (K4me3) methyliert werden kann (Hallgrimsson und Hall, 2011). Aus der Literatur ist bekannt, dass sich H3K4me3 Gruppen dicht am Transkriptionsstart der aktiv transkribierten Gene befinden, während H3K4me2 Gruppen an Genen anliegen, die für die Transkription vorbereitet werden (Bernstein et al., 2006, Pavri et al., 2006, Santos-Rosa et al., 2002, Sims und Reinberg, 2006).

Zusätzlich sind über 50 putative Histon-Methyltransferasen (HMTase) bekannt, von denen viele eine SET-Domäne (oder Zest- bzw. Trithorax-Domain) besitzen. Die SET-Domäne Proteine werden nach ihrer HMTase Substratspezifität unterteilt, die mit unterschiedlichen Enzymen für die Methylierung der verschiedenen Lysin-Enden in H2A, H3 und/oder H4 verantwortlich sind (Lachner et al., 2003). Zu dem nukleären SET-Domain Protein (NSD) gehören drei HMTasen: NSD1, NSD2/MMSET/WHSC1 und NSD3/WHC1L1, die mit mehreren Karzinomen assoziiert werden (Morishita und Luccio, 2011). Am besten untersucht sind die HMTasen, an die ein Trithorax (TrxG) und Polycomb (PcG) – Komplex angeheftet ist, welcher bei der mitotischen Vererbung fungiert, um die Gentranskription zu aktivieren oder stillzulegen (Ringrose und Paro, 2007). Aus der Literatur ist bekannt, dass das Histonmethyltransferase PcG Protein EZH2 die H3K27 Trimethylierung katalysiert, in Melanomen und Lymphomen eine Rolle spielt, sowie auch in Prostata- und Brustkrebs (Kleer et al., 2003, Yu et al., 2007).

In Säugetieren und der Hefe ist die Methylierung des Histons H3 am Lys 9 mit der transkriptionellen Repression assoziiert (Bannister et al., 2001, Nakayama et al., 2001, Noma et al., 2001). Neuere Studien haben den globalen Verlust der Histon H4 Lysin 16 Monoacetylierung und der Histon H4 Lysin 20 Trimethylierung in Krebs nachgewiesen (Esteller, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Modifikationen mit hypomethylierten DNA-Bereichen von repetitiven Sequenzen überlappen. Umgekehrt kann der Verlust der Histon H3 Lysin 9 Acetylierung und Lysin 4 Dimethylierung oder Trimethylierung sowie der Anstieg von Histon H3 Lysin 9 Dimethylierung oder Trimethylierung und Lysin 27 Trimethylierung in spezifischen Genpromotoren detektiert werden und damit ggf. zur Turmorgenese durch Stilllegung

wichtiger Tumorsuppressorgene beisteuern (Esteller, 2007). Die posttranskriptionellen Histonmodifikationen sind somit gut charakterisiert und werden durch die Balance von katalytischen Enzymen, wie z.B. den HMTasen, reguliert. Untersuchungen an Neoplasien in Mäusen und Menschen haben bereits zeigen können, dass eine veränderet Expression oder Funktion der epigenetischen Modifikatoren in Krebszellen das Gleichgewicht der katalytischen Enzymen verlagern können (Taby und Issa, 2010). So katalysiert z.B. die Histonmethyltransferase, das PcG Protein EZH2, die H3K27 Trimethylierung (Cao et al., 2002), dessen Überexpression *in vitro* und *in vivo* mit dem Tumorwachstum korrelieren kann (Kleer et al., 2003).

1.2 Transponierbare Elemente

Als transponierbare Elemente (TEs) bzw. Transposons werden bewegliche DNA-Abschnitte bezeichnet, die an einer neuen Stelle des Genoms, d.h. auf demselben oder einem anderen Chromosom eingefügt werden können. Sie machen ca. 44% des humanen Genoms aus (Zhang, 2013) und wurden von Barbara McClintock und Marcus Rhoades bereits Mitte des 20. Jahrhunderts beschrieben. Diese „springenden Gene“ kommen in Eu- und Prokaryonten vor und wurden über eine lange Zeit als „Junk-DNA“ betitelt. Heute ist bekannt, dass sie eine bedeutende Quelle für die Erzeugung genomischer Variationen einschließlich neuer Mutationen und Umstrukturierungen während der Evolution darstellen (Janning und Knust, 2004 Buch). Einige von ihnen hatten vor langer Zeit eine wichtige Funktion, die sie heute verloren haben. Andere wiederrum besaßen niemals eine Funktion (Kazazian, 2004). Mittels dieser genetischen Elemente ist es möglich transgene Organismen zu erzeugen sowie Mutationen zu induzieren und Gene zu klonieren.

Humane, transponierbare Elemente beinhalten Mitglieder der DNA- und RNA-Familien, wenn auch hier keine Evidenz auf eine derzeitige Aktivität der DNA-Elemente in gesunden Zellen besteht (Lander et al., 2001).

Im Säugergenom können fast alle transponierbare Elemente den DNA-Transposons, LTR-Retrotransposons, LINEs oder SINEs zugeteilt werden (Tabelle 1).

Name	Größe (kb)	Kopien/Genom	% des Genoms
DNA-Transposons	0,08-3	300 000	3
Retrotransposons	1,5-11	450 000	8
LINEs	6-8	850 000	21
SINEs	0,1-0,3	1 500 000	13

Tabelle 1: Vorkommen der im Menschen am häufigsten transponierbaren Elemente (modifiziert nach Janning und Knust, 2004).

Die Transposition der DNA-Transposons (Abb.7) erfolgt über einen „cut and past" – Mechanismus. Dies ist möglich, weil DNA-Transposons selbst eine Transposase kodieren, die an die *„inverted repeats"* der Transposon-Enden bindet und so das Ausschneiden und Einfügen ermöglicht.

Abb. 7 Aufbau eines DNA-Transposon. DNA-Transposons besitzen invertierte Sequenzwiederholungen (*sog. inverted terminal repeats*, ITRs) sowie ein für die Transposase kodierendes offenes Leseraster (ORF); (nach Ostertag und Kazazian, 2001).

Retrotransposons dagegen leiten sich von Retroviren ab, daher erfolgt ihre Transposition im Vergleich zu den DNA-Transposons über reverse Transkription ihrer RNA-Moleküle. Das bedeutet, dass das kopierte Element an seinem Ursprungsplatz lokalisiert bleibt, während nur die Kopie an einer anderen Stelle im Genom eingefügt wird. Diese RNA-Transposons, die auch als Retroelemente bezeichnet werden, sind unterteilt in *long-terminal repeats* (LTR)- und *Non*-LTR- Gruppen (Cordaux und Batzer, 2009, Belanico et al., 2008), die beide sowohl autonome als auch nicht-autonome Retrotransposons beinhalten (Abb. 8).

Autonom bedeutet, dass sie in der Lage sind die notwendigen Proteine, die für ihre Transposition benötigt werden, selbst zu kodieren. Die humanen endogenen Retroviren (HERVs) sind die bestbekanntesten (autonomen) Stellvertreter der LTR-Familie im humanen Genom; derzeit existieren jedoch keine Aufzeichnungen bezüglich ihrer Aktivität (Belancio et al., 2010). Die aktiven, humanen *Non*- LTRs Retrotransposons beinhalten die *long interspersed nucleotide element-1* (LINE-1 oder L1, *long interspersed nuclear element*), die *short interspersed nuclear elements* (SINE) repräsentiert durch Alu und die erst kürzlich charakterisierten SVA Elemente (Ostertag et al., 2003, Schmid und Deininger, 1975, Wang et al., 2005, Woods-Samuels et al., 1989).

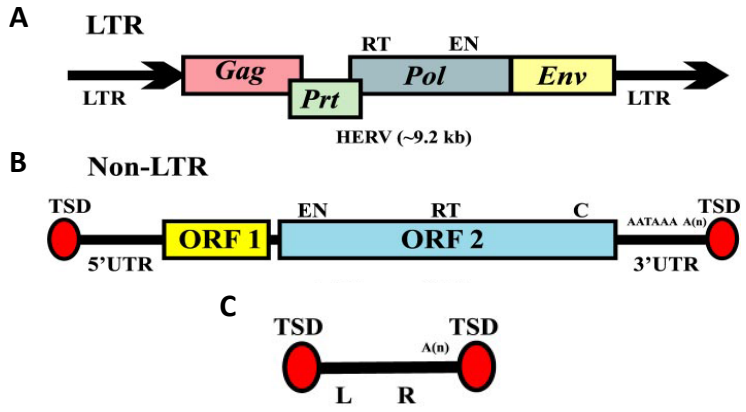


Abb. 8 Aufbau autonomer und nicht autonomer Retrotransposons. (A) Autonome LTR-Retrotransposons (*long terminal repeats)* besitzen überlappende offene Leseraster für ihr Gruppen-spezifisches Antigen (Gag), das Protease (Prt)-, Polymerase (Pol)- und das Envelope (Env)-Gen. Ebenfalls gezeigt ist die reverse Transkriptase (RT)- und Endonuklease (EN)-Domäne. (B) Autonome nicht LTRs wie die LINE-Retrotransposons verfügen über eine 5´ untranslatierte Region (5´UTR), zwei offene Leseraster ORF1 und ORF2 und eine 3´UTR. LINE-1 Elemente werden oft von 7-20 bp großen, sog. *target site duplications* (TSDs) flankiert. (C) Aufbau des Alu Elements als Bsp. für nicht autonome Retrotransposons. Alu Elemente bestehen aus zwei ähnlichen Sequenzen- dem linken (L) und dem rechten Monomer (R) sowie einem Poly-A-Ende (A(n)). Sie werden von TSDs flankiert (nach Ostertag und Kazazian, 2001).

LINE-1 gehört zu der autonomen Familie der non-LTR Retrotransposons und wurde früher als eine sinnlose Sammlung unserer genetischen Vergangenheit betrachtet und damit als *„junk DNA“* bezeichnet (Piskareva et al., 2011). Dabei besteht das humane Genom aus 17% LINE-1 Elementen mit über 500.000 Kopien (Lander et al., 2001). Aber auch wenn die LINE-1 Familie dominant ist, könnten LINE-2 sowie LINE-3 Subfamilien bedeutend sein (Schulz et al., 2006).

SINEs dagegen sind nicht-autonome Elemente (Schulz et al., 2006), die für keine Proteine kodieren (Deininger und Batzer, 2002). Sie sind abhängig von den kodierenden Proteinen der autonomen Retrotransposons. Die Anzahl der kopierten Alu- als auch SVA-Elemente steigt mit der Aktivierung der LINE-1 Maschinerie (Dewannieux et al., 2003, Wallace et al., 2008). Zu dem bekanntesten SINE zählt das ca. 300 bp große Alu Element, das von der 7SL RNA abgeleitet wird. Alu Elemente, von denen es mehrere Familien gibt, sind mit ca. 1,1 Mio. Kopien - das sind geschätzte 11% des Genoms- die am meisten verbreitetsten transponierbaren Elemente im menschlichen Genom (Landers, 2001, Cordaux und Batzer, 2009). Allerdings ist nur eine Teilgruppe (vier eng verwandte Subfamilien Alu Y, Ya5, Ya8 und Yb8) der humanspezifischen Alus zur Retrotransposition fähig (Deininger et al., 1999).

Die bedeutendsten Familien, Alu und LINE, der SINE- und LINE-Klassen sind am besten untersucht und stehen sehr relevant im Kontext mit der humanen Genetik und

erworbenen Krankheiten (Schulz et al., 2006). LINE-1 und Alu Elemente liegen stark methyliert im gesunden somatischen Gewebe vor, jedoch kann Hypomethylierung beider – vor allem von LINE-1- häufig in Tumoren beobachtet werden (Estecio et al., 2007, Suter et al., 2004, Figueiredo et al., 2009).

1.2.1 LINE-1 Retrotransposons

Intakte LINE-1 Retrotransposons sind ca. 6 kb lang und besitzen zwei offene Leseraster ORF1 und ORF2, die beide für die L1 Retrotransposition essentiell sind und sie verfügen über eine terminale Poly-A Sequenz. (Ostertag und Kazazian, 2001; Moran et al., 1996). ORF1 kodiert ein 40 kDa RNA Bindungsprotein (p40), das den Transport und die Translation der Retrotransposon-RNA koordiniert (Schulz et al., 2006). Das L1 ORF2-Protein kodiert ein 150 kDa Protein, das zur Endonuklease und reversen Transkriptase führt (Cost und Boeke, 1998; Cost et al., 2002; Feng et al., 1996; Schulz et al., 2006). Diese sind verantwortlich für das DNA-*„nicking“* (zerschneiden) und die LINE-1 cDNA-Synthese (Belanici et al., 2010).

Am 5´-Ende als auch am 3`-Ende eines intakten LINE-1 Elements ist eine nicht translatierte Region (5´UTR bzw. 3´-UTR) lokalisiert. Während in der 5´UTR der Promotor zu finden ist, befindet sich am terminalen 3´UTR ein Polyadenylierungssignal. *Target site duplications* (TDS) flankieren die LINE-1 Elemente (Abb. 8).

Nach Lander et al., 2001 liegen die meisten der über 500.000 LINE-1 Elemente inaktiv im Genom vor. Die Mehrheit wurde durch Mutation, Trunktion am 5´-Ende sowie Rekombination inaktiviert (Ostertag und Kazazian, 2001; Schulz, 2005).

Zwar existieren ca. 3000-5000 vollständige LINE-1 Elemente, von denen sind jedoch nur 80-100 intakte Kopien zur Retranposition fähig (Kazazian, 2004).

LINE-1 Retrotransposons können das Genom auf positive und negative Art und Weise beeinflussen. Beide Effekte führen zu einer großen Remodellierung des Genoms, mitunter zur Veränderung der Expression. Zu den destruktiven Effekten (Abb. 15) der aktiven LINE-1 Elemente gehören die insertionale Mutagenese, Rekombination sowie DNA-Doppelstrangbrüche (Belancio et al., 2010).

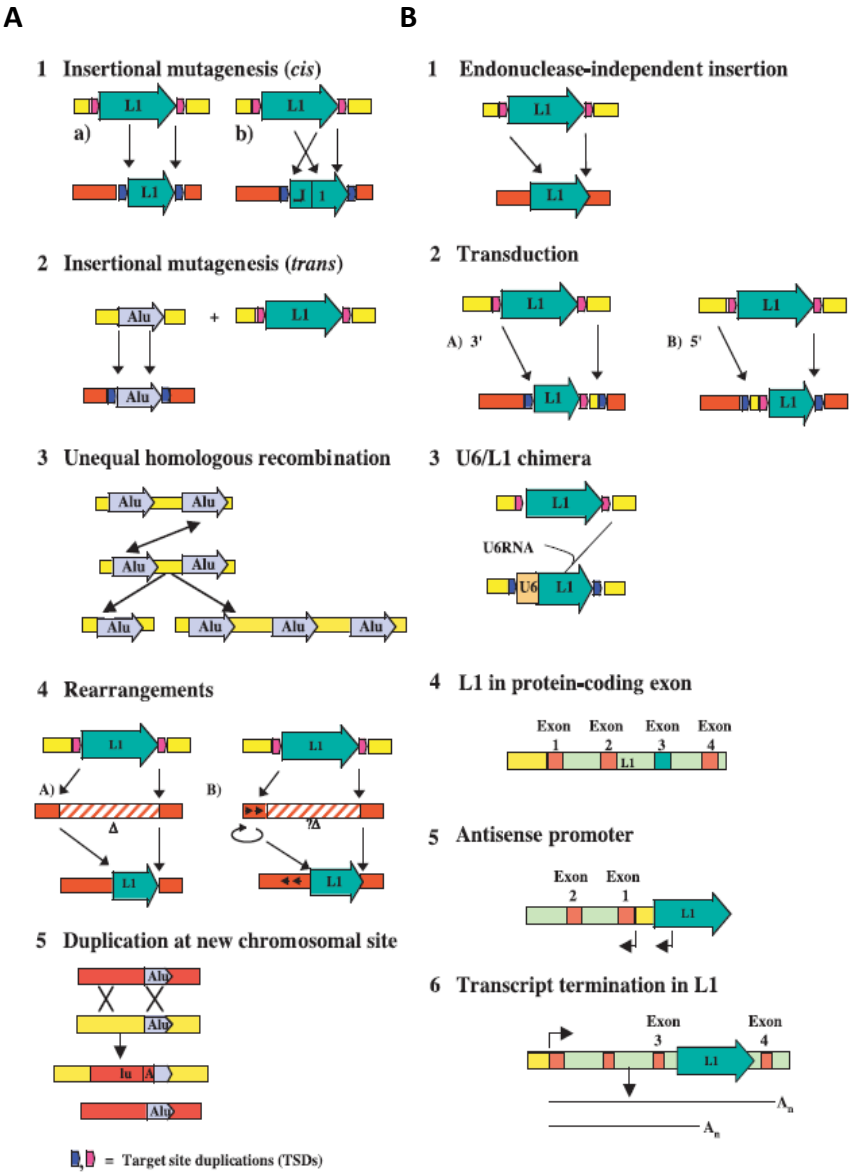


Abb. 9 Destruktive und konstruktive Prozesse durch LINE-1. (A) Destruktive Mechanismen: (1) Durch Ausschneiden eingefügte LINE-1 Elemente, die auch invertiert eingefügt werden können; (2) Trans-gesteuertes Einfügen in prozessierte Pseudogene (Alus und SVAs); (3) Deletion und Duplikation aufgrund unterschiedlicher homologen Rekombination zwischen Alus und LINE-1; (4) Gelegentliches auftreten einer Deletion oder Inversion beim einfügen von LINE-1; (5) Segmentweise Duplikation die zu Deletionen und Duplikationen führen kann. (B) Konstruktive Mechanismen: (1) Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch einfügen von LINE-1; (2) 3´- oder 5´ UTR Transduktion; (3) Bildung von chimären Retrogenen; (4) Einsatz von LINE-1 oder Alu Sequenzen in kodierenden Genregionen; (5) Genexpression in 5´ UTR mittels eines antisense Promotors in LINE-1; (6) unvollständige Teilung der Gentranskripte bei starken Poly-A-Signalen in LINE-1 (nach Kazazian, 2009).

Gasior et al. haben gezeigt, dass DNA-Doppelstrangbrüche durch die Expression von LINE-1 ORF2 erzeugt werden können (Gasior et al., 2006). Darüber hinaus kann mittels der aktiven LINE-1 Elemente die Mobilisierung von autonomen Elementen, z.B. der Alus erfolgen. Solche homologen Rekombinationen zwischen LINE-1 und Alu Elementen können laut Literatur zu Deletionen, Duplizierung von DNA-

Abschnitten sowie chromosomalen Inversionen führen (Kazazian, 2004; Kazazian und Goodier, 2002).
Zu den konstruktiven Mechanismen der LINE-1 wird u.a. die gelegentliche Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Endonuklease unabhängige LINE-1 Insertion sowie die 3´ bzw. 5´ Transduktion (Übertragung benachbarter LINE-1 Sequenzen bei der Retrotransposition) gezählt (Abb. 9). Somit können Exons und regulatorische Sequenzen an andere Bereiche im Genom gebracht werden (Kazazian, 2004). Zusätzlich kann eine LINE-1 Retrotransposition neue chimerische Retrogene bilden, die manchmal exprimiert werden. Es wird angenommen, dass diese Gene durch das *Template-switching* der LINE-1 Retrotransposons von der LINE-1 RNA oder Alu RNA zu anderen kleinen nukleären RNAs entstehen (Kazazian, 2009).

Derzeit sind noch nicht alle Aspekte des Retranspositionsmechanismus bekannt. Die grundlegenden Schritte der Retrotransposition von LINE-1 (Abb. 10) beinhalten die Transkription, RNA-Prozessierung, mRNA Export, Translation, posttranskriptionelle Modifikationen und Formation des Ribonukleoprotein (RNP), Wiedereintritt in den Nukleus sowie die Reverse Transkription und Integration (Ostertag und Kazazian, 2001).
Zu den bekannten Kontrollmechanismen der mobilen Elemente gehört die Co-Suppression, die normalerweise durch siRNA (*small interfering* RNA) oder Methylierung erfolgen kann. Während der Co-Suppression wird sowohl die Expression des eingeleiteten Transgens als auch seiner endogenen Homologe unterdrückt (Kazazian, 2009).

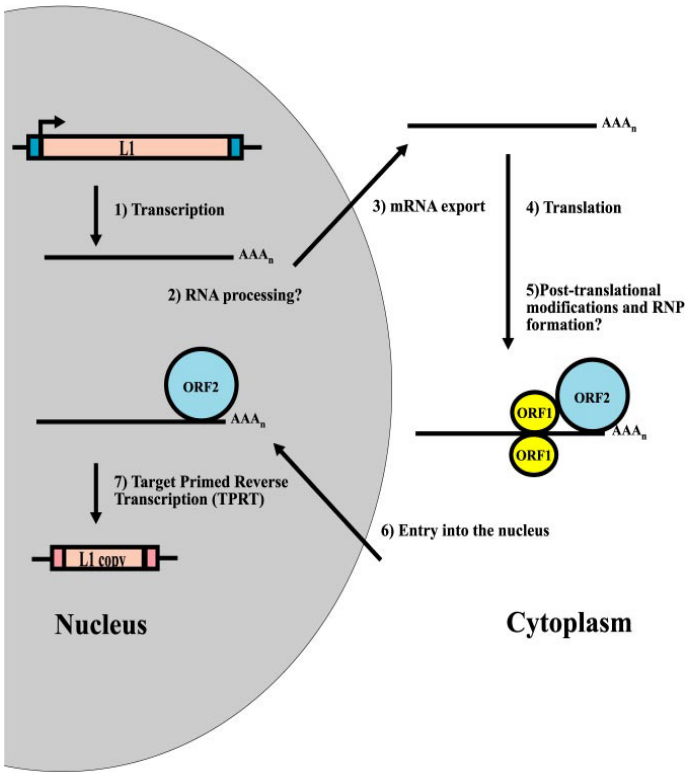


Abb. 10 Prozess der LINE-1 Retrotransposition. LINE-1 Transkription erfolgt durch seinen in 5´ UTR lokalisierten Promotor, sodass eine bicistronische mRNA entsteht. Bislang ist noch nicht bekannt, wie genau die RNA aus dem Zellkern exportiert und ob sie zuvor prozessiert wird. Im Zytoplasma erfolgt die Translation der ORF1 und ORF2 Proteine. Über posttranslationale Modifikationen ist noch nichts bekannt. Es wird vermutet, dass die LINE-1 RNA, das ORF1 und ORF2 Protein ein Ribonukleoprotein-Partikel (RNP)-Komplex bilden, der ein Zwischenprodukt in der Retrotransposition darstellt. Dieser RNP-Komplex gelangt in den Zellkern, wonach anschließender reversen Transkription der LINE-1 RNA, diese mittels des sog. *target primed reverse transcription* (TPRT)-Prozesses in einen neuen Genom-Bereich integriert wird. Trunkierung während des TPRT-Prozesses führt zu inaktiven DNA-Kopien der LINE-1 Elemente (nach Ostertag und Kazazian, 2001).

1.2.2 LINE-1 Retrotransposons in Tumoren

Studien haben gezeigt, dass LINE-1 eine signifikante Rolle in der Karzinogenese spielen können und durch die Nachweisbarkeit ihrer Expression im Genom als potentielle Krebsmarker angesehen werden (Sinibaldi-Vallebona et al., 2006; Sciamanna et al., 2005; Piskareva et al., 2011). Denn LINE-1 Expression kann in Krebszellen zur Fehlregulation der Transkription, Insertionsmutationen und DNA-Brüchen führen und damit zur Instabilität des Genoms beitragen (Schulz, 2006). Inwiefern die LINE-1 Expression durch die Methylierung beeinflusst werden kann, ist noch nicht vollständig untersucht (Kazazian, 2004; Florl et al., 1999).

Allerdings ist die Veränderung des LINE-1 Methylierungsstatus in Karzinomzellen besser erforscht, als die LINE-1 Expression. So konnte die Hypomethylierung der LINE-1 Sequenzen in vielen humanen Karzinomen detektiert werden, obwohl LINE-1 normalerweise stark methyliert im normalen somatischen Gewebe vorliegt (Suter et

al., 2004; Figueiredo et al., 2009). Diese Untersuchungen liefern eine starke Evidenz dafür, dass die globale Hypomethylierung der genomischen DNA in Krebszellen durch die Aktivierung der LINE-1 Elemente erfolgt (Piskareva et al., 2011).
Zusätzlich konnten Phokaew et al. mit ihren Studien bestätigen, dass LINE-1 Methylierungsmuster des gleichen Lokus in unterschiedlichen Krebsarten nicht identisch und damit gewebespezifisch sind (Phokaew et al., 2008). Darüber hinaus variiert die Hypomethylierung der LINE-1 Elemente nicht nur in denselben Krebsarten, sondern auch in verschiedenen Stadien (Schulz et al., 2006). Dies konnte in frühen Stadien von Kolon- als auch Blasenkarzinomen nachgewiesen werden (Florl et al., 1999; Suter et al., 2004). Southern Blot Analysen zeigen sogar eine 70-80%tige Demethylierung der CpGs der LINE-1 Elemente in Krebszelllinien (Schulz, 2006). Aus der Literatur geht damit hervor, dass LINE-1 Hypomethylierung einen indirekten Nachweis für die Aktivität der LINE-1 Elemente darstellt (Kazazian, 2004; Florl et al., 1999). Dies lässt somit die Schlussfolgerung zu, dass die LINE-1 Hypermethylierung als eine Evidenz für inaktive LINE-1 Elemente angesehen werden kann, die in gesunden Zellen stark und in Krebszellen sehr gering ausfällt.
DNA Methylierung schränkt die Aktivität, Transkription sowie Rekombination der Retroelemente ein und wirkt somit der Gefahr entgegen, die Stabilität des Genoms durch Amplifikation und Rekombination zu gefährden (Yoder et al., 1997). Wohingegen die LINE-1 Hypomethylierung mit der chromosomalen Instabilität in verschiedenen Karzinomen korreliert (Schulz et al., 2002; Takai et al., 2000; Florl et al., 2000).
Studien von Cash et al., 2012, Patchsung 2012 sowie Wilhelm et al., 2010 weisen darauf hin, dass die LINE-1 Methylierung besonders bei Harnblasenkarzinomen ein potentieller Biomarker sein könnte. So haben Wilhelm et al. gezeigt, dass LINE-1 Hypomethylierung einen wichtigen Risiko-Biomarker vor allem für Frauen darstellt, da diese im Vergleich zu Männern einen geringeren LINE-1 Methylierungsstatus aufweisen (Wilhelm et al, 2010).
Die Untersuchungen der LINE-1 Methylierung mittels des neuen idiolokalen Normierungsverfahrens sowie die Messung der LINE-1 Transkription an Hand von Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten bilden den ersten Teil dieser Arbeit.

1.2.3 Retrotransposons und Telomerase

Der evolutionäre Verlauf der non-LTR Retrotransposons geht einher mit der sehr frühen eukaryotischen Herkunft bzw. Entstehung der Telomerase (Ostertag und

Kazazian 2001). Phylogenetische Analysen suggerieren eine enge Beziehung zwischen der reversen Transkriptase der non-LTR Retrotransposons und der katalytischen Telomerase (Malik et al., 1999). So besitzt die reverse Transkriptase Domäne des Telomerase Enzyms eine Ähnlichkeit zu der reversen Transkriptase der non-LTR Elemente, wie dem LINE-1 (Nakamura et al., 1997). D.h. mittels eines Prozesses, der dem TPRT *(target primed reverse transkription)*-Mechanismus der non-LTR Elemente ähnelt, fügt die Telomerase Desoxynukleotide an die Chromosomenden an, in dem sie das 3´OH-Ende des DNA-Stanges als *Primer* und eine Telomerase-assoziierte RNA als Template verwendet (Eickbush et al., 1997). Ostertag und Kazazian (2001) favorisieren die Theorie, dass eukaryotische Zellen die reverse Transkriptase der Retrotransposons so zu sagen „rekrutieren“, um Telomerase-Aktivität zu erlangen. Somit ist in humanen Krebszellen die LINE-1 und Alu Aktivität genauso hochreguliert wie die Telomerase-Expression, die in den meisten Karzinomzellen auftritt und damit zu einer unkontrollierten Proliferation beiträgt (Belanico et al., 2010).

1.3 Harnblasenkarzinom

1.3.1 Anatomie und Histologie der Harnblase

Die Harnblase (Vesica Urinaria) des Menschen besitzt im leeren Zustand eine schüsselförmige Form, welche durch Flüssigkeitszunahme eine kugelförmige Gestalt annimmt. Bei Erwachsenen liegt die leere Harnblase als Organ des kleinen Beckens direkt hinter der Symphyse (Hautmann, 2010). Sie wird auch als Hohlmuskel bezeichnet, der in drei Hauptmuskellagen eingeteilt wird. Mittels ihrer glatten Muskelzellen, die eine längs- und ringförmige Muskelschichtanordnung besitzen, bildet sie ein sehr flexibles und dehnungsfähiges Muskelsystem. Dieses ermöglicht bei Erwachsenen eine Speicherkapazität von ca. 400-500 ml.

Darüber hinaus verhindert dieses Muskelsystem nicht nur den Rückfluss des in der Niere entstandenen Urins, sondern ist auch für die Kontrolle der Blasenentleerung zuständig. So kann die Miktion (Urinentleerung) durch zusammenziehen der Blase erfolgen. Die innere Oberfläche der Blase wird vom Übergangsepithel ausgekleidet (Hautmann, 2010), auch Urothel genannt, das aus 3-5 Epithelschichten besteht. Dieses bildet die sog. Mucosa (Schleimhautschicht), die im direkten Kontakt mit dem Urin steht und gleichzeitig die Verbindung zur Blasenmuskulatur gewährleistet. Die

Abgrenzung der Blase nach außen erfolgt mit Hilfe der Adventitia – einer Bindegewebsschicht.

1.3.2 Urin

Der Urin ist das Ultrafiltrat des Blutes, das in den Nieren gebildet wird. Dabei fließt pro Tag ca. ein Liter Blut durch die Niere. Der so entstandene Urin gelangt über das Nierenbecken und durch die beiden Harnleiter in die Harnblase, wo er gesammelt wird, bis er über die Harnröhre ausgeschieden wird. Die tägliche Harnproduktion ist abhängig von der Flüssigkeitszufuhr und beträgt durchschnittlich 1000-1500 ml/24 Stunden. Abweichungen der „normalen Harnmenge“ werden als Anurie (<100 ml/24 h), Oligurie (<500 ml/24 h) und Polyurie (>4000 ml/24 h) bezeichnet (Hautmann, 2010). Der pH-Wert des Urins liegt zwischen 4,6 und 7,5. Darüber hinaus kann eine Veränderung der Urinkonzentration durch Bestimmung der Urinosmolarität bzw. des spezifischen Gewichts bestimmten Krankheitsbildern zugeordnet werden. So kann z.B. die Makrohämaturie ein Anzeichen von Harnwegentzündungen sein oder aber bei Harnblasenkarzinomen auftreten. Hierbei können sogar kleine Blutklumpen (Koagel) mit dem Urin ausgeschieden werden. Zusätzlich kann der Urin zur Untersuchung des Urinsediments sowie der Urinzytologie eingesetzt werden. So kann das Urinsediment z.B. Hinweise auf eine Harnweginfektion liefern durch die Detektion von Bakterien und Leukozyten, aber auch auf eine Urolithiasis (Harnsteine) durch das Vorkommen von Kristallen oder eine Myoglobinurie (Myoglobin im Urin), durch das Fehlen von Erythrozyten. Die Urinzytologie erfolgt mikroskopisch und dient der Ermittlung der diversen zellulären Erscheinungsformen. Dabei wird der Differenzierungsgrad der Urothelzellen begutachtet, der auf einen möglichen Tumor hindeuten könnte.

1.3.3 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom zählt zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit (Rübben, 2009). Es ist der zweithäufigste Tumor des Urotheltrakts und in Deutschland sowie den USA der fünft- bzw. vierthäufigste Tumor bei Männern (Kausch et al., 2003). Die Inzidenz von Blasenkrebs variiert weltweit stark mit den höchsten Erkrankungsraten in hoch entwickelten Ländern (Rübben, 2009).
2008 wurden weltweit ca. 386.000 neue Blasenkarzinomerkrankungen und 150.200 Todesfälle, krankheitsbedingt durch das Harnblasenkarzinom, registriert (Zabolotneva et al., 2013). Für 2013 wird mit einem Anstieg von 72.570

Neuerkrankungen und 15.210 Todesfällen in den USA gerechnet. Laut dem Robert Koch Institut lag 2008 die Anzahl der männlichen Erkrankten mit knapp 77% drei Mal höher, als die der weiblichen Betroffenen mit ca. 23%, von den ca. 386.000 weltweit erkrankten Menschen. Alleine in Deutschland waren 2008 ca. 15.970 Menschen vom Harnblasenkarzinom betroffen. Darunter waren 11.460 Männer und 4.510 Frauen. D.h. ca. 71,8% der Erkrankten waren Männer (Kaatsch *et al*., 2012). Die Mortalität bei den Männern mit ca. 65,3% war ebenfalls höher, als die bei den Frauen mit 34,7%. Neben dem Geschlecht spielt die Herkunft eine wesentliche Rolle. Das Auftreten variiert zwischen den Regionen und den Ländern; in Europa wurde in Spanien die höchste altersstandardisierte Vorkommensrate gemeldet und in Finnland die niedrigste (Ferlay et al., 2008). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die höchste Eintrittswahrscheinlichkeit für Harnblasenkarzinome in Europa, Nord-Amerika und Nord-Afrika (Abb.11) besteht.

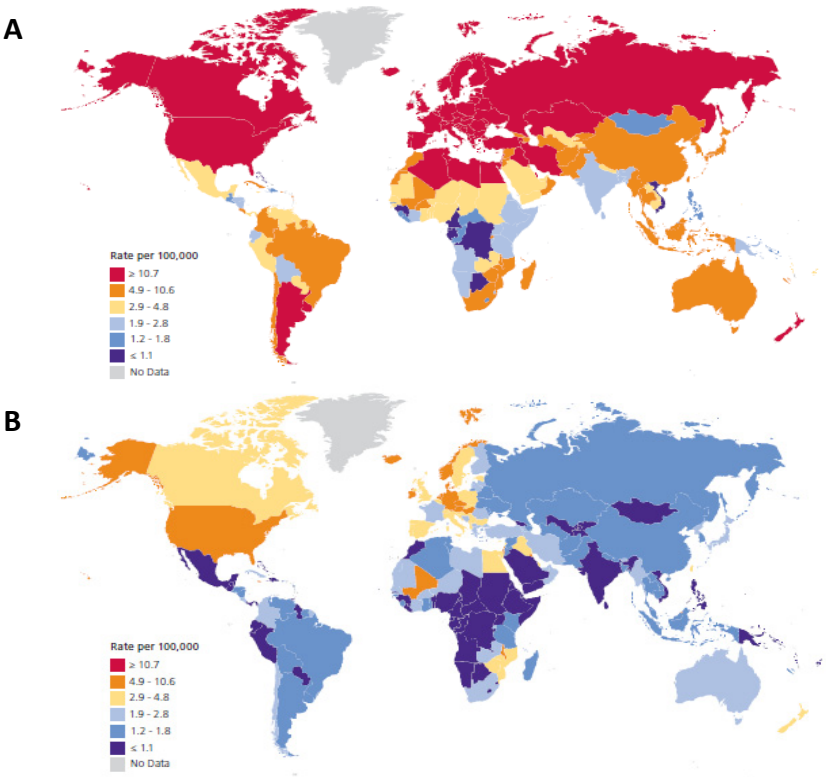


Abb. 11: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate des Harnblasenkarzinoms 2008 bei Männer (A) und Frauen (B) weltweit (GLOBOCAN, 2008).

Die Urothelkarzinome der Harnblase stellen dabei die häufigste Blasenkrebsart in den Industrieländern dar (Jemal *et al*., 2011). Aber auch die ethnische Abstammung hat einen Einfluss auf die Entstehung der Blasenkrebskarzinome. Allerdings konnte bis heute noch nicht geklärt werden, warum bzw. wie die ethnische Herkunft die

Entstehung eines Harnblasenkarzinoms beeinflussen kann. So besteht für männliche Amerikaner mitteleuropäischer Herkunft ein Risiko von 3%, für Amerikanerinnen mitteleuropäischer Herkunft sowie Männer afroamerikanischer Abstammung ein 1% -tiges und für Frauen afroamerikanischer Abstammung ein ca. 0,5%-tiges Risiko an Blasenkrebs zu erkranken (Silverman *et al.,* 1992). Doch neben der Epidemiologie existieren weitere Faktoren, die die Entstehung von Blasentumoren begünstigen.

1.3.4 Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms

Für das Blasenkarzinom sind viele Risikofaktoren bekannt (Zabolotneva et al., 2013). Der bedeutenste Risikofaktor ist das Alter. Das Durchschnittsalter der Männer und Frauen, bei denen ein Blasenkarzinom diagnostiziert wurde, liegt zwischen dem 72- und 74-igsten Lebensjahr (Jemal et al., 2011). Goodison et al. geben in ihrer Veröffentlichung ein durchschnittliches Erkrankungsalter von sogar 65 Jahren an (Goodison et al., 2013).

Doch neben dem fortgeschrittenen Alter gibt es noch weitere Risikofaktoren. Klassischerweise wurde Blasenkrebs mit exogenen und umweltbedingten Risikofaktoren assoziiert (Pasin et al., 2008). Bereits 1895 veröffentlichte Ludwig Rehn eine wissenschaftliche Arbeit über ein erhöhtes Blasenkarzinomrisiko bei Arbeitern in der Farbindustrie, welche berufsbedingt regelmäßig Kontakt mit dem karzinogenen Triphenylmethanfarbstoff Fuchsin hatten. Seitdem folgte eine Vielzahl an Untersuchungen und Veröffentlichungen zu dem Thema der chemischen Karzinogenese. Von vielen Chemikalien wird angenommen, dass sie karzinogen fürs Urothel sind. Dazu gehören Anilinfarbstoffe und aromatische Amine (Vineis und Pirastu, 1997). Für Berufsgruppen, die Anilinfarbstoffen und aromatischen Aminen wie dem 2-Naphtylamin und Benzidin ausgestezt sind, stellen diese Chemikalien den zweit häufigsten Risikofaktor dar, um an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (Clayson, 1981; Droller, 1998). Benzidin, das hauptsächliche karzinogene, aromatische Amin, wurde zuerst in der Farbindustrie und als Härtemittel in der Gummiindustrie verwendet (Pasin et al., 2008). Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass Arylamine, Acrolein und Sauerstoff-freie Radikale ebenfalls zu den Karzinogenen gehören (Yu et al, 2002; Lower, 1982; Cohen et al., 1992). Daher wird seit 1950 das Harnblasenkarzinom als Berufskrankheit anerkannt, wenn eine berufliche Exposition nachgewiesen werden kann.

Besonders gefährdet sind die Berufsgruppen der gummiverarbeitenden-, der Farbstoff- und Kunststoffindustrie, die Kammerjäger, die Friseure sowie die

Mitarbeiter der Gasproduktion und der Kohle-, Textil-, Druck-, Stahl- und Aluminiumindustrie (Rübben und Otto, 2001; McCahy, 1997).

Neben industrielllen Einflüssen spielt das Rauchen eine bedeutende Rolle. So stellt das Rauchen das Hauptrisiko für die Entstehung von Blasenkarzinomen dar (Brennen et al., 2000). Raucher besitzen ein 2- bis 4-mal höheres Harnblasenkarzinomrisiko und starke Raucher ein fünf Mal höheres Risiko als Nichtraucher (Zeegers et al., 2004). Auch Jankovic und Radosavljevic haben 2007 in ihrer Veröffentlichung bestätigen können, dass Rauchen 50% aller Blasenkarzinome in den Entwicklungsländern verursacht hat und damit eine der Hauptursachen für die Entstehung von Blasenkrebs ist. Der genaue Mechanismus, wie der Tabak Blasentumore auslösen kann, ist noch nicht bekannt. Allerdings spielt die Intensität und die Dauer des Tabakkonsums eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Blasenkarzinoms. So ist das Einstellen von Rauchen mit einem fast umgehenden Abfall des Risikos assoziiert (Vineis et al., 1988).

Medikamente wie z.B. das in der Chemotherapie eingesetzte Cyclophosphamid oder der starke Konsum von Phenacetin-haltigen Schmerzmitteln, Strahlentherapie im Beckenbereich (z.B. bei Männern mit Prostatakarzinomen) sowie eine Infektion mit Schistosoma haematobium stellen weitere Risikofaktoren dar (Wu *et al.,* 2008; Jankovic und Radsavlijevic, 2007). Schistosoma-assoziierter Blasenkrebs wurde vermehrt bei Patienten unter 50 Jahre beobachtet. Außerdem ist der Anteil der männlichen Betroffenen 6-mal höher als bei Frauen (Salem und Mahfouz, 2012).

In den letzten 30 Jahren wurden erhebliche Hinweise gefunden, dass mehrere Infektionen insbesondere durch Viren, eine Rolle bei Krebs im Menschen spielen. Aus der Veröffentlichung von Parkin ist bekannt, dass ca. 1,5 Mio. Krebsneuerkrankungen in Entwicklungsländern und ca. 390.000 Krebsneuerkrankungen in den Industrieländern vermieden werden könnten, wenn die Infektionen verhindert worden wären (Parkin, 2006).

Einen erhöhten Risikofaktor für ein Plattenepithelkarzinom stellen auch Harnweginfektionen, chronische Irritationen durch Katheter oder Blasensteinen sowie funktionsbeeinträchtigte Harnblasen dar (Shokeir, 2004). Ebenfalls sollte hier das von Jankovic und Radsavlijevic veröffentlichte potentielle Risiko durch den Konsum von gechlortem und Arsen-haltigem Trinkwasser erwähnt werden (Jankovic und Radsavlijevic, 2007).

1.3.5 Klassifizierung von Blasenkarzinomen

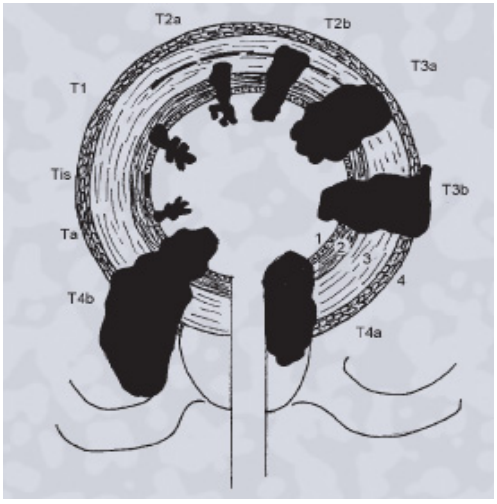
Typing, Staging und *Grading* stellen essentielle Parameter der pathologisch-anatomischen Begutachtung von Urothelkarzinomen dar, die ihrerseits als Grundlage für nachfolgende klinische Entscheidungen und Therapieoptionen dienen (Lehmann *et al*., 2005).

Das Urothelkarzinom ist mit ca. 90% die häufigste Form der Blasenkrebserkrankungen (Chalasani *et al*., 2009). Dagegen sind ca. 5% Plattenepithelkarzinome und weniger als 2% Adenokarzinome (Pasin *et al*., 2008). Die Klassifizierung der Harnblasenkarzinome ist abhängig von der Infiltrationstiefe des jeweiligen Tumors. Diese unterteilen sich in Tis, Ta, T1, T2a+b, T3a+b, T4a+b (Tab. 2 und Abb. 12).

T-Stadium	Infiltrationstiefe des Primärtumors
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	Nichtinvasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ („flacher Tumor“)
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur
T2b	Tumor infiltriert tiefe Muskulatur
T3	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch
T4	Tumorinfiltration von Prostata, Uterus, Vagina, Becken- oder Bauchwand
T4a	Tumorinfiltration von Prostata, Uterus, Vagina
T4b	Tumorinfiltration von Becken- oder Bauchwand

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Primärtumors des Harnblasenkarzinoms (modifiziert nach Babjuk et al., 2013)

In ca. 70% aller Fälle wird bei den Blasenkarzinompatienten ein nichtinvasiver (d.h. oberflächlicher, papillärer) Ta, T1 oder Tis Tumor diagnostiziert, wohingegen die restlichen 30% invasive T2-T4 Tumore sind (Reinert *et al*., 2012; Ro et al., 1992). Der Differenzierungsgrad von Harnblasenkarzinomen sowie die Tumorausbreitung (TNM) erfolgt mittels der Anlehnung an die UICC (*Union Interationale Contre le Cancer*). Die ersten EAU (*European Association of Urology*) Richtlinien für das Blasenkarzinom wurden 2002 publiziert (Oosterlinck et al., 2002).



1 Urothel
2 Subepitheliales Bindegewebe
3 Muskulatur
4 Perivesikales Fettgewebe

Abb. 12: TNM-Klassifizierung von invasiven und nichtinvasive Blasenkarzinom (modifiziert nach Engeler et al., 2005)

Die TNM-Klassifizierung (*Tumour, Node, Metastasis*) berücksichtigt neben der Tumorausdehnung (T) ebenfalls den Lymphknotenbefall (N) (Tab. 3) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (Tab. 4). Es ist das international geläufigste System zur Einschätzung der Prognose und Beschreibung der Stadienbestimmung (*Staging*).

N-Stadium	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten konnten nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre Lymphknotenmetastasen (<2 cm)
N2	Solitäre Lymphknotenmetastasen (>2 cm und < 5 cm) oder multiple Lymphknotenmetastasen (alle < 5 cm)
N3	Lymphknotenmetastasen (> 5 cm)

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Harblasenkarzinoms -Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (modifiziert nach Babjuk et al., 2013)

N-Stadium	Fernmetastasen
MX	Regionäre Lymphknoten konnten nicht beurteilt werden
M0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
M1	Solitäre Lymphknotenmetastasen (<2 cm)

Tabelle 4: TNM-Klassifikation des Harblasenkarzinoms - Vorhandensein von Fernmetastasen (modifiziert nach Babjuk et al., 2013)

2004 wurde eine neue Klassifizierung für das *Grading* von nichtinvasiven Blasenkarzinomen von der *World Healthy Organisation* (WHO) und der *International Society of Urological Pathology* (ISCP) publiziert (Sauter et al., 2004). Diese ergänzt bzw. unterstützt die histopathologischen *Gradings*, bei der die Harnblasenkarzinome

in G1-, G2- und G3-Tumoren eingeteilt werden, die bereits 1973 durch die WHO bestimmt worden sind. Ziel dieser Unterteilung ist die Vereinheitlichung und Vereinfachung der Klassifizierung des Urothelkarzinoms für die zuständigen Onkologen, Urologen sowie Pathologen. Mit Hilfe des *Gradings* kann der Malignitäts- bzw. Differenzierungsgrad wiedergegeben werden (Tab. 5), der einen Anhaltspunkt zur Aggressivität und zur genetischen Integrität des Tumors liefert.

1973 WHO Grading	Differenzierungsgrad des Tumorgewebes
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert

Tabelle 5: Grading nach der WHO von 1973 (modifiziert nach Sauter et al., 2004).

1.3.6 Diagnostik, Therapie und Prognose des Harnblasenkarzinoms

Das häufigste Symptom (85% der Fälle) ist eine schmerzlose Hämaturie. Der Grad der Hämaturie korreliert nicht mit der Ausdehnung der Erkrankung (Engeler et al., 2005). Flankenschmerzen als auch häufiges Wasserlassen mit geringen Urinvolumina können indirekte Symptome darstellen. Fortgeschrittene Harnblasenkarzinome können durch bereits erfolgte Metastasierung Knochenschmerzen auslösen. Neben der klinischen Untersuchung, zu der auch die rektale und vaginale Palpation gehört, zählen die Sonografie des Abdomens/Beckens, die Zystoskopie, Urographie sowie die Zytologie zu den eingesetzten Untersuchungsverfahren. Die Zystoskopie und die Urinzytologie werden derzeit als *„golden standard“* der Diagnostik gesehen (Kausch und Böhle, 2003; Trivedi et al., 2009; Nakamura et al., 2009). Sie dienen der Detektion und Überwachung des Urothelzellkarzinoms (Mengual et al., 2010). Obwohl die Urinzytologie eine sehr hohe Spezifität erzielt (95-100%), erreicht sie eine Sensitivität von nur 30-60% (Pirtskalaishvili et al., 1999). Sie besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektion von *high-grade* Urothelkarzinoma, aber ihr fehlt die Sensitivität um *low-grade* Tumoren zu detektieren (Wiener et al., 1993). Dabei ist in einer breit angelegten Studie von Messing et al., mit mehr als 1500 Probanden gezeigt, dass der Nachweis des frühen Harnblasentumors die Mortalität signifikant senken könnte (Messing et al., 2006).

Die Zystoskopie ist ein minimal traumatisches Verfahren und ist sehr erfolgreich bei der Identifizierung von Blasentumoren (Smith et al., 2013). Aber sie ist auch

unkomfortabel und ein kostenintensives Verfahren, das einer Anästhesie des Patienten bedarf (Goodison et al., 2013). Darüber hinaus hat die Zystoskopie eine falsch-negative Rate, entweder durch Anwendungsfehler oder durch kleine Areale von sessilen Tumoren (*Carcinoma in situ*), die schwer zu detektieren sind (van der Poel und Debruyne, 2001; Herr, 1999).

Im Durchschnitt leiden 70-80% der erkrankten Patienten bei der Erstdiagnose an nicht-muskelinvasiven Blasentumoren, d.h. an oberflächlichen Karzinomen des Stadiums Ta, T1 oder Tis. Wohingegen die übrigen 20-30% an muskelinvasiven Karzinomen des Stadiums T2-T4 leiden. Bei früher Detektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 94% (Goddison et al., 2013). Allerdings haben sich bei den nicht-muskelinvasiven Karzinomen durch die Überlebensrate sowie Progression der Tumore Gruppen herauskristallisiert. So besitzen die pTaG1 Karzinome eine Überlebensrate von bis zu 95%, ein sehr geringes Progressionsrisiko (<10%) und sind oftmals mittels transurethraler Elektroresektion (TUR) therapierbar. Dagegen fällt die Überlebensrate mit 90% der pTaG2 und 75-80% der pT1G1/G2 Tumoren geringer aus als die der pTaG1 und das Risiko der Progression liegt hier mit 20-25% doppelt so hoch. Darüber hinaus muss hier die TUR-Behandlung mittels einer Chemotherapie ergänzt werden.

Die niedrigste 5-Jahres-Überlebensrate mit nur 60-70% wurde bei den pT1G3 und *Carcinoma in situ* (pTis) Tumoren beobachtet, die eine hohe Metastasierung sowie Tumorprogression von 40% bis >50% aufweisen. Das Risiko eines Rezidivs nach der TUR-Behandlung beträgt bei den nicht-muskelinvasiven Tumoren bis zu 70%. Damit sind die nicht-muskelinvasive Blasenkarzinome durch häufiges Wiederkehren charakterisiert und bis zu 30% entwickeln einen aggressiven Phänotyp (Reinert, 2012). Der Einsatz von TUR dient nicht nur der Diagnosefindung durch Gewebeentnahme für die pathologisch-histologische Beurteilung, um so die Tiefenausbreitung des Karzinoms zu bestimmen, sondern hat auch eine therapeutische Bedeutung für die oberflächlichen Harnblasenkarzinome. Denn das Verfahren dient zeitgleich der Entfernung des tumorösen Gewebes. Dennoch erleiden insgesamt 10% der Patienten mit oberflächlichen Tumoren innerhalb der ersten 3 Jahre einen Progress, wobei das Progressionsrisiko vom Tumorgrad und –stadium abhängt (Herr, 2000).

Oberflächliche Karzinome können mittels endoskopischer Resektion und intravesikaler Therapie behandelt werden (Shariat et al., 2008). Mitomycin, Epirubicin

und Doxorubicin können für die intravesikale Chemotherapie eingesetzt werden und haben eine äquieffektive Wirkung. Die Limitierung der intravesikalen zytostatischen Therapie liegt in der geringen Penetration der Zytostatika in die Blasenschleimhaut (Retz und Gschwend, 2010). Ein weiteres Behandlungsverfahren stellt die intravesikale Immuntherapie mit *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) dar, welches normalerweise als Tuberkulose-Impfstoff eingesetzt wird. Auf diese Weise wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen bei der nicht nur die Mykobakterien sondern auch Tumorzellen abgebaut werden.

Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (>pT1G3) weisen eine viel geringere Überlebensrate auf. Bei dieser Gruppe zeigen 50% innerhalb von 2 Jahren weitentfernte Metastasen und 60% sterben innerhalb von 5 Jahren, trotz Behandlung (Stein et al., 1998). Laut Retz und Gschwend sinkt bei Befall nur eines regionalen Lymphknotens die progressionsfreie 5-Jahres-Überlebensrate bereits auf unter 30% (Retz und Gschwend, 2010). Zusätzlich erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eine Tumorprogression zu erleiden auf bis zu 90%, sollten mehrere Lymphknoten befallen sein.

Je nach Tumorausdehnung kann ein durch TUR detektierter Tumor mittels einer Blasenteilresektion oder radikalen Zystektomie entfernt werden, wenn er auf die Blase beschränkt bleibt. Ansonsten ist der gegenwärtige Behandlungsstandard für diese Patienten die neoadjuvante Chemotherapie, gefolgt von einer radikalen Zystoprostatektomie oder einer kombinierten Chemotherapie (Bambury und Rosenberg, 2013). D.h., ist das Karzinom nicht nur auf die Blase beschränkt, was mittels einer Lymphadenektomie (Lymphknotenentfernung - klärt den Lymphknotenbefall mit Hilfe der Schnellschnittuntersuchung) ermittelt wird, so werden bei Männern zusätzlich zu der Blase auch die Prostata und die Samenblasen entfernt. Bei Frauen werden in so einem Fall nicht nur die Blase, sondern ebenfalls der Uterus sowie die Eierstöcke entnommen. Ist die radikale Zystektomie erfolgt, so kann mittels plastischer-rekonstruktiver Operationsverfahren ein Harnblasenersatz aus einem bestimmten Darmstück präpariert werden („Darmneublase“).

Für die Behandlung der Patienten mittels einer Chemotherapie mit fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen (pT3-pT4) wird zwischen den fortgeschrittenen, operablen und den metastasierten, inoperablen Karzinomen unterschieden. Patienten mit operablen Karzinomen werden neoadjuvant (vor) und adjuvant (nach) dem operativen Eingriff mit Strahlentherapie oder Zytostatika wie Cisplatin, Methotrexat

oder Gemcitabin behandelt. Inoperable Karzinome wurden über zehn Jahre mit Hilfe der Kombinationstherapie MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) behandelt.

1996-1998 erfolgte eine Studie, bei der die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin (GC) gegenüber MVAC an 405 Patienten getestet wurde. Obwohl die Fallzahl dieser Studie lediglich für den Nachweis einer Überlegenheit der Überlebenszeit von GC gegenüber MVAC ausgelegt war, haben die nahezu deckungsgleichen Überlebenskurven von jeweils 200 Patienten zu einer allgemeinen Akzeptanz der GC-Kombinationstherapie als neuen Standard geführt, was vor allem auf die geringere Nebenwirkungsrate der Zweifachtherapie gegenüber MVAC zurückzuführen ist (Retz und Gschwend, 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug für GC 13% (Progression 7,7 Monate) und für MVAC 15,3% (Progression 8,3 Monate) (von der Maase et al., 2005). Darüber hinaus können auch Zweitlinientherapien mit Vinflunin - ein bifluoriniertes Vincaalkaloid, das die Apoptose einleitet durch Inhibierung der Mitose- oder der Zweierkombination, bestehend aus Gemcitabine und Paclitaxel, eingesetzt werden. Die mediane Überlebenszeit des unbehandelten metastasierten Urothelkarzinoms beträgt knapp 6 Monate (Retz und Gschwend, 2010).

Die erfolgreiche Behandlung des Blasenkarzinoms stellt eine große ökonomische Belastung für das Gesundheitssystem dar. Einmal diagnostiziert, erfordert das Blasenkarzinom eine lebenslange Überwachung (Smith et al., 2013). Für die Nachsorge wird die Zystoskopie und Urinzytologie alle 3 Monate für die ersten zwei Jahre, dann alle sechs Monate für weitere zwei Jahre und danach (ab dem 5. Jahr) einmal jährlich durchgeführt (Goddison et al., 2013; Shariat et al., 2008). Damit ist das Blasenkarzinom eines der teuersten Krebsarten- von der Diagnose bis zum Tod fallen Kosten pro Patient in Höhe von 96.000$ - 187.000$ in den USA an (Botteman et al., 2003).

1.4 Nichtinvasive Diagnostikverfahren für Harnblasenkarzinome

Zurzeit existiert eine Vielzahl an nichtinvasiven Diagnostikverfahren zur Detektion der Harnblasenkarzinome (Tab. 6). Blasenkarzinome stellen einen Mix aus heterogenen Zellpopulationen dar (Kim und Bae et al., 2008), die ihre DNA in das Lumen freisetzten können. Daher bieten Urin- und Blutproben ein gut zugängliches Untersuchungsmaterial zur Entwicklung neuer minimalinvasiver Testverfahren. Diese sollen den Pathologen, Urologen und Onkologen eine Entscheidungshilfe für die

Diagnose bieten sowie bei der Überwachung unterstützen, die Patienten vor dem Stress der Zystoskopie, Falschdiagnose oder Übertherapie zu bewahren und gleichzeitig die hohen Therapiekosten zu minimieren. Es ist von hohem klinischen Interesse zu wissen, welche Tumore rezidivieren, einen Progress zeigen oder metastasieren werden, um festlegen zu können welche oberflächlichen Tumoren einer aggressiven Therapie und welche invasiven Tumoren zusätzlich zu radikal ablativen Maßnahmen einer adjuvanten Therapie bedürfen (Kausch und Böhle, 2003). Daher ist das Wissen über molekulare Signalwege, die mit der Blasenkarzinomentwicklung assoziiert sind entscheidend, um diagnostische und prognostische Biomarker zu identifizieren (Dip et al., 2013).

Aktuell sind die am häufigsten eingesetzten molekularen Marker für das Blasenkarzinom proteinkodierende Gene und ihre Produkte, die eine differentielle Expression in Tumorzellen versus normalen Zellen zeigen (Zabolotneva et al., 2013). So besitzen *low-stage* Tumore häufig *FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3)* Mutationen (Castillo-Martin et al., 2010; Cappellen et al., 1999) zusammen mit Aberrationen des Chromosoms 9 (Tsai et al., 1990), während für *high-grade* invasiven Blasenkarzinomen *p53*- und *RB1* (*retinoblastoma*) – Mutationen sowie Deletionen des Chromosoms 9- charakteristisch sind (Cairns et al., 1991; Sidransky et al., 1991; Cairns et al., 1993).

Einiger dieser neuen Tumor-Marker-Tests wurden bereits von der FDA (*Food and Drug Administartion*) akzeptiert. Dazu gehört der BTA stat-, BTA TRAK-, FDP-, UroVysion-, ImmunoCyt sowie der NMP22-Test. Jedoch weisen viele der in Tabelle 6 aufgelisteten nichtinvasiven Diagnostikverfahren große Schwankungen bei der Bestimmung der Sensitivität und Spezifität auf. Daher werden neue Testverfahren gesucht, die zuverlässig und konstant die Bestimmung der Sensitivität als auch die der Spezifität erlauben. Eine weitere Diagnostik-Methode könnte hier die Ermittlung der DNA-Methylierung von bestimmten Genen darstellen.

Test	Detektierter-Marker	Methode	Stand des Tests	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
AccuDx (Intracel, Rockville, MD)	Fibrin-fibrinogen degradtion product, fibrin, fibrinogen	Sandwich Immunoassay	Point-of-care	52-81	75-86
BLCA-4	BLCA-4 transcription factor	ELISA	Specialized laboratory	89-96	100
BTA stat (Polymedco, Cortlandt Manor, NY)	Complement factor H-related protein	Colorimetric immunoreaction	Point-of-care	57-83	68-72
BTA TRAK (Polymedco, Cortlandt Manor, NY)	Complement factor H	Sandwich immunoassay	Specialized laboratory	66-72	51-75
Hyaluronic acid, hyaluroinidase	Hyaluronic acid hyaluroinidase	immunoassay	Specialized laboratory	92-100	89-93
ImmunoCyt (DiagnoCure, Quebec City, Quebec, Canada)	Mucins, high-molecular weight carcinoembryonic antigen	Immunofluorescence Zytologie	Specialized laboratory	50-100	69-79
Lewis X antigen	Lewis X blood group antigen	Immunocytology with P12 monoclonal antibody	Specialized laboratory	80	86
Microsatellite markers	Highly polymorphic DNA repeats	PCR	Specialized laboratory	72-97	80-100
NMP22	Nuclear mitotic apparatus	Sandwich immunoassay	Specialized laboratory	47-100	60-70
Quanticyt (Gentian Scientific Software Niawer, The Netherlands)	Nuclear shape, DNA content	Feulgen stained specimen image analysis by dual parameter morphometry	Specialized laboratory	45-59	71-93
Survivin	Survivin antiapoptotic protein	BioDot system	Specialized laboratory	64-100	87-93
Telomerase	Human telomerase messenger RNA	PCR	Specialized laboratory	62-81	80-96
UBC test (IDL Biotech, Bromma Sweden)	Cytokeratins 8 and 18	1-step immunoassay	Specialized laboratory	66-82	83-90
UroVysion (Vysis, Downers Grove, IL)	Aneuploidy chromosome 3,7, and 17 and loss of 9p21 lokus	Multitarget FISH	Specialized laboratory	36-100	89-96

Tabelle 6: Eigenschaften Urin-basierter Blasenkarzinom-Marker. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; BTA, bladder tumor antigen; PCR, polymerase chain reaction; NMP22, nuclear matrix protein 22; DNA, deoxyribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid; FISH, flurenscence in situ hybridization (modifiziert nach Shariat et al., 2008).

1.4.1 DNA-Methylierungsmarker

Einige Studien haben bereits Krebs-assoziierte DNA-Methylierungssignaturen im Blut von Blasen-, Ovarial- und Brustkarzinompatienten identifiziert (Marsit et al., 2011, Teschendorff et al., 2009, Widschwendter et al., 2008). Daher werden diese als potentielle Biomarker für die Diagnose angesehen. Die Hypermethylierung (1.1.2) der

DNA stellt somit ggf. einen weiteren Biomarker zur Detektion des Blasenkarzinoms dar. Sie ist mit der Krebsentwicklung und Progression assoziiert (Li et al., 2012). Neueste Berichte über die DNA-Methylierung in Urinproben beschreiben eine mögliche klinische Anwendung dieses Marker-Typs, welcher eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist (Reiner, 2012).

Aus Studien ist bekannt, dass die Menge der freien DNA in den Körperflüssigkeiten von Karzinompatienten erhöht ist (Szarvas et al., 2007) und es liegen Evidenz dafür vor, dass im Urin-Überstand freie DNA enthalten ist, die hauptsächlich vom Tumor abstammt (Zancan et al., 2005). In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Detektion differentiell methylierter freier DNA als einer der chancenreichsten, zukunftsträchtigsten Ansätze zur Risikoeinschätzung von Krebspatienten angesehen wird (Schwarzenbach et al., 2011).

Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung der aus der Literatur bekannten Methylierungsmarker (modifiziert nach Kim und Bae, 2008; Marsit et al., 2011; Wolff et al., 2010).

Methylierungs-Marker	Methode	Met-Rate (%) im Gewebe	Met-Rate (%) im Urin	Prognostische Einschätzung
RASSF1A	MSP	59	-	High grade, high stage, progression, survival
DAPK		6	-	
DAPK	MSP	58.2	45.5	No association with grade and stage Detection of methylation in urine is more sensitive than urine cytology
RARβ		87.8	68.2	
E-cadherin		63.3	59.1	
p16		26.5	13.6	
APC	MSP	-	69	No association with grade and stage Detection of methylation in urine is more sensitive than urine cytology
RASSF1A		-	51	
p14ARF		-	35	
DAPK	QMSP	-	21.6	High grade, high stage Promising tools for non-invasive detection of bladder cancer
BCL2		52	64.9	
TERT		25.2	51.4	
RUNX3	MSP	73	-	Tumor development, recurrence, progression
CDH1	MSP	36	-	Poor prognosis, survival
RASSF1A		35	-	
APC		35	-	
CDH13		29	-	
FHIT		16	-	
RASSF1A	QMSP	54.2	-	Reliable predictor of tumor progression
E-cadherin		40.6	-	

TNFRSF25 EDNRB APC		75.0 66.7 31.3	- -	
Loci: *ZO2* (Zona occludens 2 or *TJP2*) *MYOD1* and *CDH13*(H-cadherin)	Illumina GoldenGate platform	49 non-invasive urothelial tumors (Ta-T1) 38 invasive tumors (T2-T4) 34 normal appearing tissues	-	functional significance; DNA hypermethylation of *ZO2* is associated with reduced expression
9 CpG loci: NALP4 BDKRB1 C14orf103 COX7C ZNF322B HIGD2A TBCA BRD7 PSME2	Human Methylation 27 Beadarray	-	460 peripheral blood Samples (Tumor and Controll)	harboring signal CpGs that are most associated with bladder cancer represent a wide range of cellular processes

Tabelle 7: Potentielle epigenetische Marker. MSP=methylation-specific polymerase chain reaction (modifiziert nach Kim und Bae, 2008; Wolff et al., 2010; Marsit et al., 2011)

1.4.2 MicroRNAs als potentielle Biomarker für das Urothelkarzinom

MicroRNAs (miRNAs) und Epigenetik sind beide an der Kontrolle der Genexpression beteiligt (Melo und Esteller 2010). Allerdings regulieren die miRNAs die Genexpression durch sequenzspezifische Bindung an mRNAs. Diese Bindung führt zur mRNA-Degradation oder translationaler Repression (Liep et al., 2012). 2001 wurde diese „neue Art“ der RNA zum ersten Mal in Vertebraten beschrieben (Lagos-Quintana et al., 2001). Seitdem wurden viele weitere entdeckt. Derzeit sind über 1400 microRNAs im Menschen identifiziert und es wird angenommen, dass über 30% der Gene durch microRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005). Eine einzelne miRNA kann bis zu 200 unterschiedliche *Target*-mRNAs beeinflussen, wohingegen eine mRNA ebenfalls von verschiedenen miRNAs kontrolliert werden kann (Lim et al., 2005). In Abhängigkeit von ihren entsprechenden Zielgene können sie als Onkogene oder Tumorsuppressorgene fungieren (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Damit spielen sie nicht nur eine große Rolle bei der Tumorentwicklung, sondern sind auch an weiteren metabolischen Abläufen beteiligt. Dazu gehört z.B. die Zellentwicklung, Differenzierung, Gewebe-Homöostase sowie der programmierte Zelltod - die Apoptose. Zurzeit ist jedoch ungeklärt, inwiefern das microRNA-Niveau

vom Alter, Geschlecht oder der Abstammung abhängt, da verschiedene Studien gegensätzliche Ergebnisse gezeigt haben. Die Studie von Häusler hat dennoch gezeigt, dass bei älteren Menschen das microRNA-Profil deutlich varriert (Häusler et al., 2010).

MicroRNAs stellen eine Klasse von kleinen, nicht kodierenden Gen-regulierenden RNA-Molekülen (18-24 Nukleotide) dar, die die mRNA-Translation von Zielgenen negativ regulieren und zur Tumorentwicklung führen können (Kuhlmann et al., 2012; Croce, 2009). Sie sind keine Nebenprodukte des Tumors (wie eine Zeitlang angenommen), sondern sind aktiv in die Biogenese der Malignität involviert (Sun et al., 2012). Ob miRNAs als Onkogene oder Suppressorgene fungieren, hängt von ihren zugehörigen *Targets* ab (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Erst kürzlich wurde differenzielle Expression von mehreren microRNAs in malignem und gesundem Urothel (Abb. 13) beobachtet (Catto et al., 2009; Zabolotneva et al., 2013). Daher werden miRNAs ebenfalls als mögliche Biomarker zur Krebs-Detektion, auch beim Harnblasenkarzinom, betrachtet.

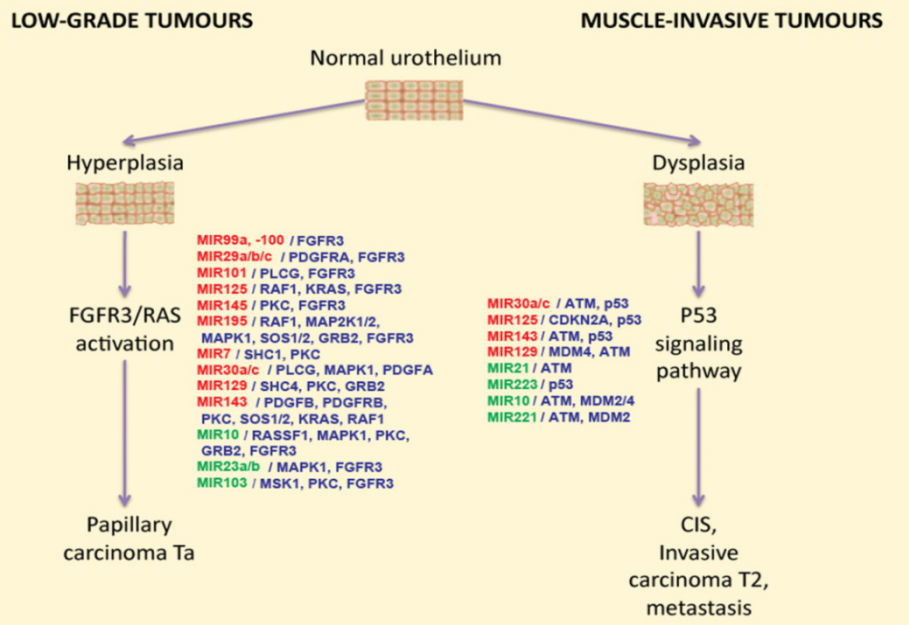


Abb. 13: Modell zweier Entwicklungwege von Urotheltumoren. Dargestellt sind zwei verschiedene Wege der Blasenkrebsentwicklung mit den dazugehörenden microRNAs, die diese Signalwege regulieren. Rot hervorgehoben sind microRNAs die runterreguliert sind. Grün hervorgehoben sind microRNAs die hochreguliert sind (Zabolotneva et al., 2013).

Catto et al. zeigten 2009, dass *high-grade* Urothelkarzinome durch die Hochregulation solcher microRNAs charakterisiert sind, wie beispielsweise die microRNA-21, die die *p53*-Funktion unterdrücken können. Dagegen waren in *low-*

grade Tumoren viele microRNAs runterreguliert. Besonders der Verlust der microRNAs-99a/100 in diesen Tumoren führt zur Hochregulation von *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*), bevor es mutiert (Catto et al., 2009).

Allerdings ist die Biogenese der microRNAs bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Ein anerkannter Signalweg für die microRNA Biogenese folgt einem zentralen Dogma (Abb. 14).

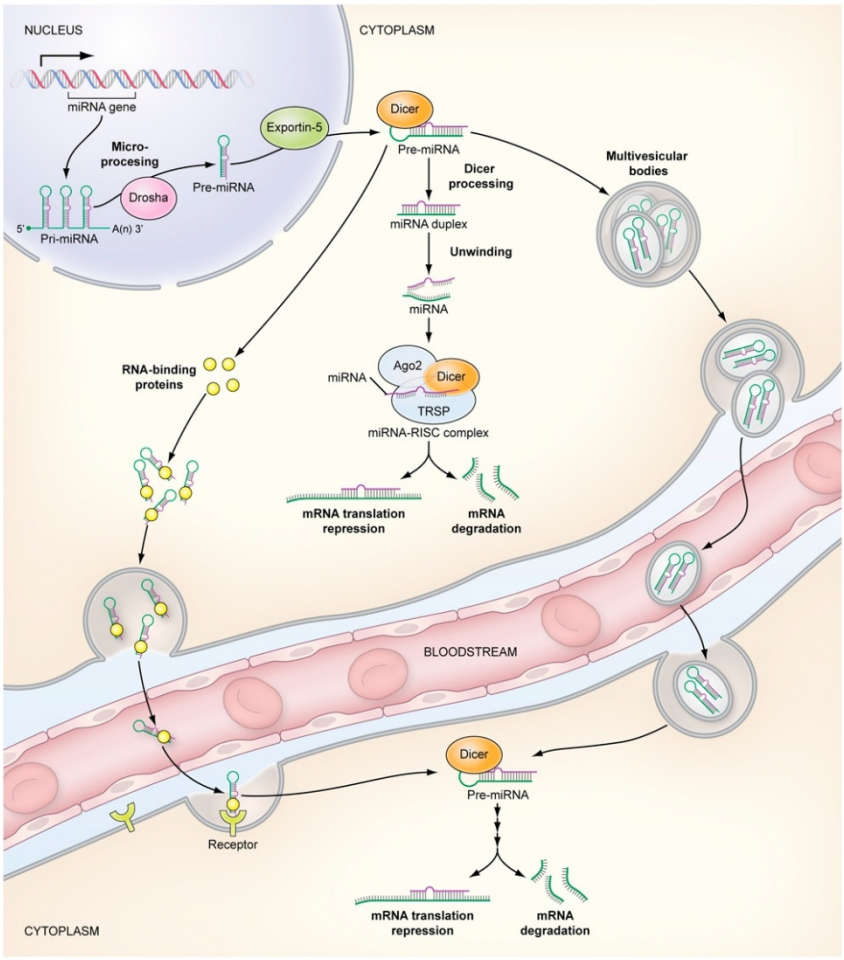


Abb. 14: Zelluläre Biogenese, Export und Zirkulation der microRNAs. Im Zellkern wird die Pri-miRNA durch das Drosha-Enzym in Pre-miRNA umgewandelt, die mittels Exportin-5 in das Zytoplasma gelangt. Hier wird sie entweder durch das Enzym RNA Polymerase Dicer prozessiert, wodurch eine reife miRNA entsteht oder sie wird durch den Blutstrom zu anderen Zellen transportiert. Reife miRNAs binden an den RISC-Komplex, der dann die posttranskriptionelle Expression durch die miRNA-Bindung an spezifische mRNAs reguliert. Für den Zellexport durch den Blutstrom werden die Pre-miRNA in Exosomen und/oder Multivesikel-Bodies verpackt und anschließend von den Empfängerzellen entweder durch Endozytose oder Rezeptorbindung aufgenommen und in reife miRNA umgewandelt, um die Expression von Zieltargets zu inhibieren. Ago2=Argonaute 2; pre-miRNA=precursor microRNA; pri-miRNA=precursor primary microRNA; RISC=RNA-induced silencing complex; TRSP (or TARBP2)=trans-activation-responsive RNA-binding protein (nach Ross und Davis, 2011).

Wie die Protein-kodierenden Gene, werden microRNA-Gene im Zellkern hauptsächlich durch die RNA-Polymerase II in primäre microRNA *hairpins* (pri-miRNAs) mit einer Länge von über 500 Nukleotiden (nt) transkribiert (Huang et al., 2013; Suzuki et al., 2012). Diese pri-miRNAs werden anschließend durch das Kernenzym RNase III Drosha, an das das *DGCR8* (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) gebunden ist, in 65-75 nt lange „Vorläufer"-miRNAs (pre-miRNAs) geschnitten. Danach werden die pre-miRNAs in das Zytoplasma durch *exportin5* transportiert, wo sie durch das RNase III Enzym *Dicer* und seinen Co-Faktor (TAR RNA Bindungsprotein, TRBP) geschnitten werden, um so ca. 20 bp große miRNA-Duplices zu erhalten (Filipowicz et al., 2008). Diese miRNA-Duplices werden von den RNA-induzierten stilllegenden Komplexen RISC (*RNA-induced silencing complex*) gebunden, welche den funktionellen Strang (*mature* miRNA) auf die Ziel-RNA legen. Die Basenpaarbindung zwischen der RNA und der miRNA erfolgt entweder in einer „perfekten" oder „nicht perfekten" Art und Weise, die einige Fehlpaarungen erlaubt. Tritt eine perfekte Bindung ein, so wird die Ziel-mRNA mittels Endonuklease abgebaut, ist sie aber fehlerhaft, so wird an der Ziel-mRNA die Translation inhibiert (Huang et al., 2013).

MicroRNAs können ebenfalls epigenetisch reguliert werden (Abb. 15).

Über die epigenetische Kontrolle der micorRNA in Harnblasenkarzinomen ist jedoch sehr wenig bekannt. Die meisten diesbezüglichen Studien beschäftigen sich mit der Hypermethylierung der CpG-Inseln. So haben Studien von Lujambio et al., 2007 und 2008 an anderen bösartigen Tumoren gezeigt, dass eine aberrante Hypermethylierung der CpG-Inseln mit der Stilllegung von miRNAs verbunden ist. Es wird angenommen, dass ungefähr ein Drittel der miRNA Loci in der Nähe von CpG-Inseln liegen (Dudziec et al., 2011).

Mit Hilfe von 5-Aza-2´-Deoxycytidin und Trichostatin A (Abb. 15) konnten viele miRNAs indentifiziert werden, die empfänglich für eine epigenetische Stilllegung sind.

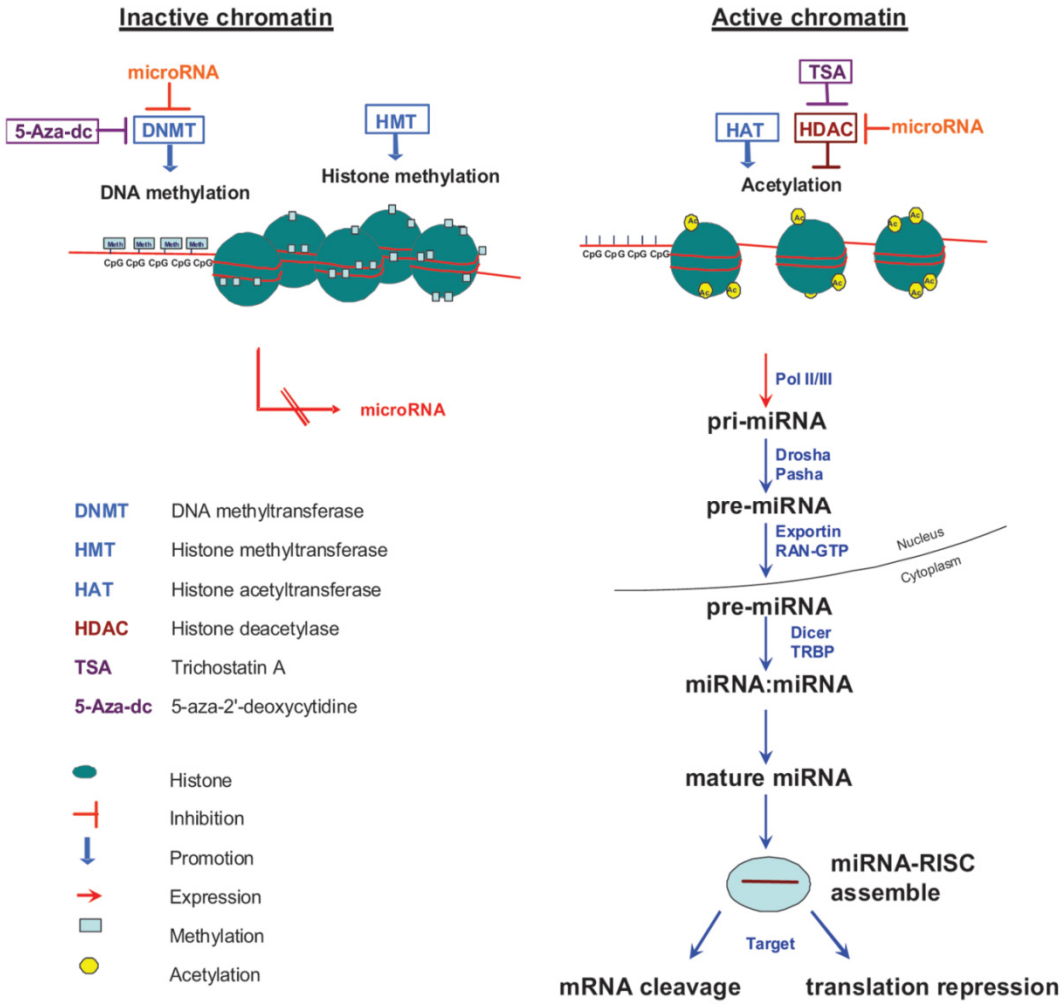


Abb. 15: Epigenetische Regulation der microRNAs. Dargestellt ist der regulatorische Kreislauf in dem sich Epigenetik und microRNAs gegenseitig kontrollieren. Mit Hilfe des Kondensationsstatus des Chromatins, der durch DNA-Methylierung, Histon-Methylierung und -Acetylierung beeinflusst wird, kann die microRNA-Expression reguliert werden. Gleichzeitig unterliegen diese Mechanismen der microRNA-Kontrolle. Störungen in diesem regulatorischem Kreislauf können nicht nur zu Krebs, sondern auch zu anderen Krankheiten führen (nach Liep et al., 2012).

Dudziec et al. entdeckten in ihrer Studie 2010 eine Kohorte an miRNAs sowie Mitrons - eine neue Klasse von RNAs - die anfällig für epigenetische Stilllegungen sind (Tab. 8). DNA-Hypermethylierung wurde in 35 CpG-Regionen, die benachbart zu 20 miRNAs waren, gezeigt. Darüber hinaus wurde die miRNA-152/1224 gefunden, die einen prognostischen und diagnostischen Nutzen in Urothelzell-karzinomen besitzt (Dudziec et al., 2010).

Allerdings sind gerade mal 6% aller aus der Literatur bekannten miRNAs hypermethyliert, während nur 1% hypomethyliert in Blasenkarzinomen vorliegen. Dem gegenüber stehen 48% runter- und 35% hoch regulierte miRNAs (Zabolotneva et al., 2013).

microRNA	Methylierungsstatus in Blasenkarzinom
MIR-9-1	HYPERMETHYLATION
MIR-9-2	HYPER/HYPO
MIR9-3	HYPERMETHYLATION
MIR-24-1	HYPERMETHYLATION
MIR127	HYPERMETHYLATION
MIR34a	HYPERMETHYLATION
MIR34b	HYPERMETHYLATION
MIR126	HYPERMETHYLATION
MIR149	HYPER/HYPO
MIR152	HYPERMETHYLATION
MIR193a	HYPERMETHYLATION
MIR200B	HYPERMETHYLATION
MIR205	HYPERMETHYLATION
MIR210	HYPOMETHYLATION
MIR212	HYPOMETHYLATION
MIR328	HYPERMETHYLATION
MIR503	HYPER/HYPO
MIR516a	HYPER/HYPO
MIR551a	HYPER/HYPO
MIR744	HYPOMETHYLATION
MIR1224	HYPERMETHYLATION
MIR1226	HYPERMETHYLATION
MIR1227	HYPOMETHYLATION
MIR1229	HYPER/HYPO

Tabelle 8: Methylierungsstatus von microRNAs im Harnblasenkarzinom (modifiziert nach Dudziec et al., 2010 und Suzuki et al., 2012)**.**

Während der letzten Jahre bestand ein großes Interesse an der Entwicklung von stabilen, Blut-basierten, zirkulierenden microRNA-Biomarkern für die Krebs-Detektion. Die meisten zirkulierenden microRNAs werden von den zirkulierenden Blutzellen (Abb. 16) entlassen (Sun et al., 2012).

Doch nicht nur Blut stellt ein leicht zugängliches Untersuchungsmaterial zur microRNA Detektion dar, auch der Urin zählt zu den gebräuchlichen Proben. Extrazelluläre RNAs in Urin und Urin-Mikrovesikeln können von urologischen Tumoren (z.B. Blasenkarzinom) oder dem normalen Urothelium abgeleitet werden (Johnstone und Holzmann, 2006). Darüber hinaus ist aus der Literatur bekannt, dass microRNAs in Körperflüssigkeiten wie Speichel und Muttermilch detektiert werden konnten. Auf Grund ihrer relativen Stabilität wird daher angenommen, das extrazelluläre microRNAs aussichtsreiche Biomarkerkandidaten für die Diagnose und Prognose der Krankheit oder sogar als therapeutisches Agens für die Zielbehandlung

sind (Huang et al., 2013). Daher wurden im 2. Teil der Arbeit Methylierungsanalysen der microRNAs, die aus dem Tumorgewebe sowie den Körperflüssigkeiten (Blutplasma und Urin) von Harnblasenkarzinompatienten stammen, als eigene Subgruppe betrachtet und untersucht.

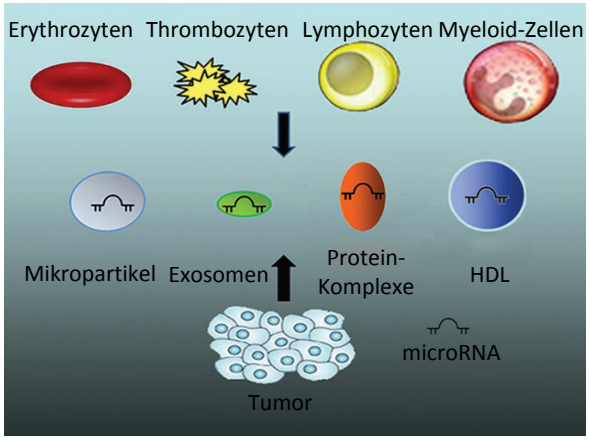


Abb. 16: Quelle und Kompartimentierung zirkulierender microRNAs (Sun et al., 2012).

Nach Möglichkeit sollte der perfekte nichtinvasive Urin- oder Blutmarker für das Harnblasenkarzinom eine hohe Sensitivität (Wahrscheinlichkeit einen Kranken als krank zu detektieren) und Spezifität (Wahrscheinlichkeit einen Gesunden als gesund zu detektieren) besitzen, um falsche Diagnosen zu vermeiden und den Patienten zu entlasten. Minimalinvasive Diagnostikverfahren, die auf epigenetischen Methoden beruhen, könnten eine solche Möglichkeit darstellen.

1.5 Idiolokale Normierung

Krebs wird durch genetische Veränderungen verursacht, die das normale Gleichgewicht zwischen der Zellproliferation, dem Überleben und der Differenzierung zerstören. Bislang wurden klonale Chromosomenveränderungen in allen hauptsächlichen Tumorarten (bei über 54.000 Patienten) entdeckt. Und ihre Identifikationen werden weiter fortgeführt, aufgrund der fortschreitenden Technologie in der konventionellen und molekularen Zytogenetik (Fröhling und Döhner, 2008).
In humanen Karzinomen werden zwei Arten von chromosomalen Veränderungen unterschieden: zum einen die chromosomale Reorganisation bzw. Umgestaltung, zum anderen das chromosomale Ungleichgewicht (Abb. 17).

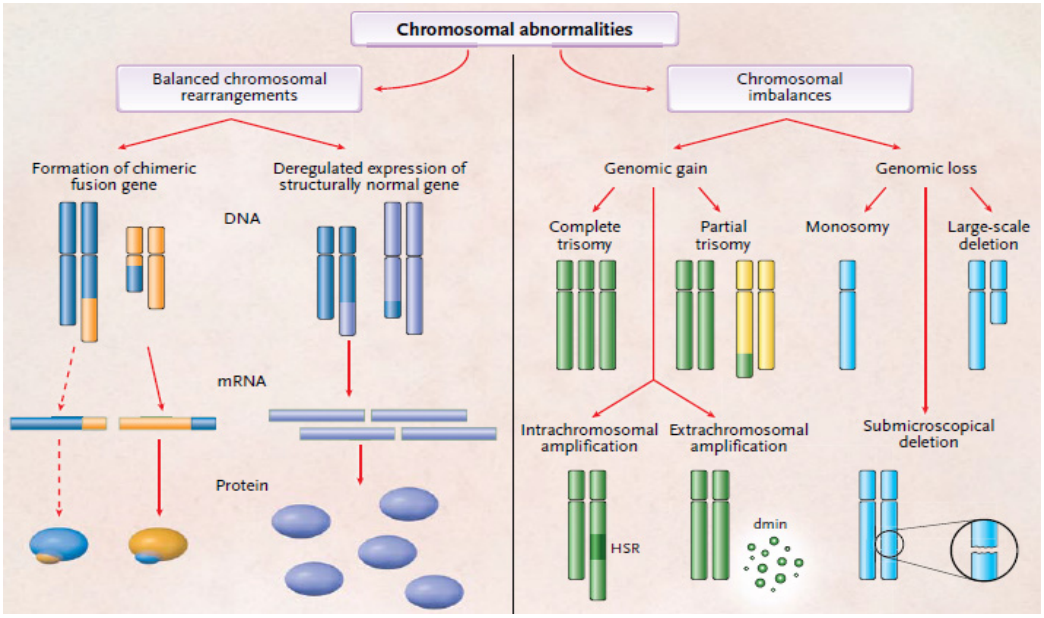


Abb. 17 Chromosomale Anomalien in Karzinomen. Eine der zwei bislang entdeckten Klassen der chromosomalen Anomalien stellt die chromosomale Neugestaltung dar (links). Diese kann in die Gruppe der chimären Fusionsgen-bildenden oder die Gruppe mit aberrant nebeneinanderstehenden, genregulierenden Elementen (zu der kodierenden Sequenz des strukturell intakten Gens) unterteilt werden. Die Bildung eines chimären Fusionsgens führt zur Expression eines chimären Proteins mit neuer oder veränderter Aktivität. In den meisten Fällen wird nur eines der Fusionsgene erzeugt (gestrichelte Pfeile). Die deregulierte Expression eines strukturell normalen Gens dagegen führt zur deregulierten Expression eines normalen Proteins. Die zweite Klasse ist durch das chromosomale Ungleichgewicht charakterisiert. D.h. es können sowohl genomische Zugewinne als auch Verluste erfolgen. Zugewinne beinhalten vollständige oder partielle Trisomien und intrachromosomale oder extrachromosomale Amplifikationen. Genomische Verluste schließen Monosomien, lange Ansätze oder submikroskopische Deletionen ein (nach Fröhling und Döhner, 2008).

Im Harnblasenkarzinom treten chromosomale Anomalien schon in sehr frühen Stadien auf (Simon et al., 1998). So weisen pTa Tumore oft Verluste am Chromosom 9 sowie Zugewinne an Chromosom 17 auf, während in pT1 Tumoren Amplifikationen an 1q, 8q21/22, 5q21, 7q36, 10p14, 10p12, 10q25, 12q12 und 12q14 und Verluste an 11p, 11q, 2q, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 17p und 18q beschrieben sind (Abb. 18).

Im Vergleich zu den frühen Karzinomen sind in fortgeschrittenen Karzinomen pT2-pT4 Zugewinne an 1q, 5p, 6p, 8q, 10p, 17q, 20q sowie Verluste an 2q, 3p, 5q, 8p, 10q, 11q, 13q, 17p und 18q bekannt (Richter et al., 1998, 1999; Simon et al., 2000; Hoglund et al., 2001; Yamamoto et al., 2006). Zusätzlich besteht bei den späten Tumoren pT2-pT4 eine Assoziation zwischen den chromosomalen Veränderungen 3p+, 3q+, 4p-, 5q-, 5p+, 6q-, 7p+, 10q-, -15, -18, 18p+, -22 und der Tumorprogression sowie der Invasivität (Richter et al., 1998,1999; Simeon et al., 2000; Yamamoto et al., 2006).

Darüber hinaus zeigen *low grade* Tumore generell weniger Veränderungen, als Tumore mit erhöhtem *Stage* und *Grade* (Höglund, 2012). Richter et al., 1997 haben

gezeigt, dass T1 Tumore über 3 Mal so viele Veränderungen aufweisen als Ta Tumore. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass G3 Tumore über eine erhebliche Differenz im Vergleich zu den *low grade* Tumoren verfügen. Blaveri et al. konnten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen den genomischen Veränderungen und dem Überleben der Patienten herstellen (Blaveri et al., 2005). Es wurde nachgewiesen, dass Patienten mit weniger genomischen Änderungen in ihren Tumoren eine signifikant bessere Überlebensrate gezeigt haben, als Patienten mit moderaten und hohen Veränderungen im Tumorgenom. Viele dieser Umordnungen sind irreversibel und die Herstellung des ursprünglichen Zustands ist sehr unwahrscheinlich (Höglund, 2012).

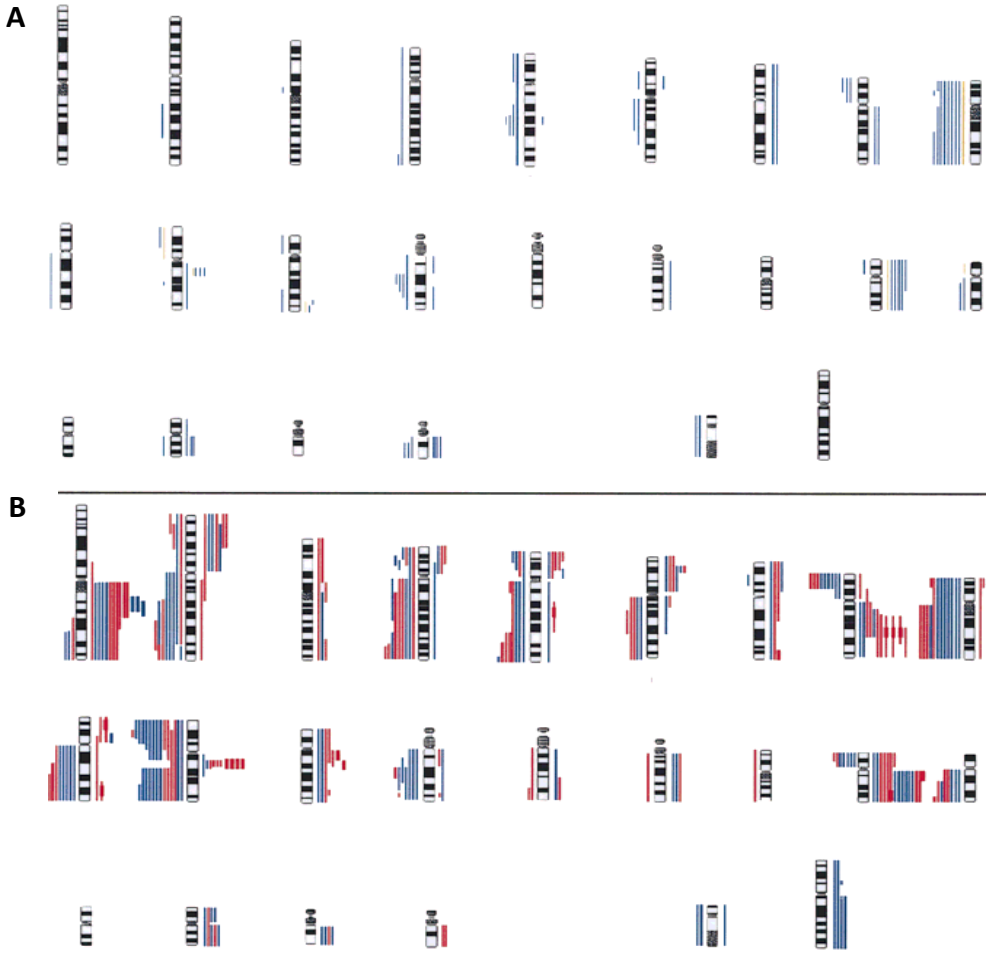


Abb. 18 Chromosomale Imbalancen in frühen Harnblasenkarzinomen. Dargestellt ist das chromosomale Ungleichgewicht in pTa (A) und pT1 (B) Blasentumoren. Die vertikalen Linien linksseitig der Chromosomen stehen für genetische Verluste, während die rechtsseitigen genetische Zugewinne symbolisieren. Eine Linie zeigt die aberrante Veränderung, die in einem einzelnen Tumor detektiert worden ist. Orangefarbige Linien kennzeichnen vertikalen Linien, blaue Grad 2 - und rote Linien Grad 3 Karzinome (nach Simon et al., 1998).

Das erste Ziel der Arbeit sollte die Etablierung eines neuen Normierungsverfahrens für die Methylierungsspezifische PCR sein, die die chromosomalen Anomalien mitberücksichtigt. Mit Hilfe der sogenannten idolokalen Normierung (IDLN) wird eine genauere bzw. verlässlichere relativen Quantifizierung des Methylierungsstatus ermöglicht werden. Im Vergleich zum konventionellen Normierungsverfahren, bei dem *housekeeping*-Gene wie *GAPDH* oder *ACTB* als Normierungsfaktoren eingesetzt werden, wird bei der IDLN der Normierungslokus in nächster Nähe zu dem Ziellokus gewählt. Damit entspricht die Anzahl der Normierungsloci den tatsächlich vorliegenden Zielloci. Erfolgt die Normierung der relativen Quantifizierung jedoch auf konventionelle Art, so kann die unterschiedliche Anzahl der DNA-Fragmente die exponentiell in der PCR amplifiziert worden sind, zu einer Verfälschung der eigentlichen DNA-Methylierung oder zu Einbußen der PCR Effizienz führen. Denn bei Harnblasenkarzinomen kann sowohl das Chromosom 12p als auch 7p chromosomalen Veränderungen unterliegen (Simon et al., 1998, 2000), auf denen die beiden häufig gewählten Normierungsfaktoren *GAPDH* (12p) und *ACTB* (7p) lokalisiert sind. Somit kann mittels der IDLN das Problem der Normierung bei der MS-PCR durch unbekannte chromosomale Zugewinne bzw. Verluste reduziert werden.

1.6 Fragestellung

LINE-1 Retrotransposons spielen eine besondere Rolle für die Karzinogenese und durch ihre epigenetischen Veränderungen und ihrer Reaktivierung werden sie als potentielle Biomarker für Krebs in Betracht gezogen. LINE-1 Aktivität kann mittels Expressionsanalysen bestimmt werden und ist in Krebszellen mit DNA-Brüchen sowie Fehlregulationen der Transkription assoziiert, was zur Instabilität des Genoms führen kann. Darüber hinaus weisen LINE-1 Elemente unterschiedliche Methylierungmuster in verschiedenen Karzinomen und Stadien auf, was bereits für das Blasenkarzinom bewiesen werden konnte. Auf Grund dieser Kenntnisse wurde im ersten Teil der Arbeit die LINE-1 Methylierung zellulärer und freier Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten untersucht, unter Anwendung des neuen idolokalen Normierungsverfahrens. Diese Experimente sollte nicht nur Aufschluss über die LINE-1 Methylierung geben, sondern auch ggf. zeigen, welche urinäre DNA-Fraktion als Untersuchungsmaterial besser geeignet ist.

Zusätzliche Untersuchungen der LINE-1 Promotoraktivität durch Methylierungs- sowie LINE-1 Transkriptionssanalysen sollten ggf. weitere Evidenzen für die Aktivität

des LINE-1 Elements liefern und die Frage beantworten, ob ggf. die LINE-1 Methylierung bzw. LINE-1 Transkription -alleine oder in Kombination- als neuer Biomarker zur Detektion von Harnblasenkarzinomen verwendet werden kann.
Des Weiteren wurde untersucht, ob mittels Urin-DNA verlängerte Telomere in den Tumorproben detektiert werden können, die ggf. eine Evidenz zu dem bestehenden Progressionsstadium liefern könnten.
Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit punktuellen Analysen der genomweiten DNA-Methylierung im Plasma-, Urin- und Gewebeproben von Harnblasenkarzinom-patienten im frühen Tumorstadium. Da Hypermethylierung u.a. an der Onkogenese und an der Stilllegung von Tumorsuppressorgenen beteiligt ist, wurden unter Anwendung der NimbleGen-Plattform neue differentiell methylierten Regionen (DMRs) bestimmt, die als potentielle Biomarker für die Diagnose Anwendung finden könnten. Diese könnten beispielsweise für die Entwicklung eines nichtinvasiven Früherkennungstests aus Urin eingesetzt werden. Dabei wurden die differentiell methylierten microRNAs als eigene Subgruppe betrachtet, da insbesondere hierbei für einige microRNAs ein prognostischer und diagnostischer Nutzen für das Urothelzellkarzinom beschrieben ist (Catto et al., 2009 und Zabolotneva et al., 2013). Gleichzeitig wurde mit Hilfe der DNA-Methylierungsuntersuchungen die epigenetische Verwandtschaft zwischen den Tumorgeweben, Geweben von gesunden Probanden (Kontrollen) und Tumor-benachbarten Arealen untersucht, um ggf. früheintretende Methylierungsveränderungen nachweisen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTB	Beta-Aktin
Amp	Ampicillin
AP	*activator protein*
BLIMP1	PR domain containing 1, with ZNF domain
bp	Basenpaare
BPH	*benign prostatic hyperplasia*
cDNA	*complementary* DNA
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CGIs	CpG-Inseln
CpG	Cytosin/Guanosin-Dinukleotid
CT	*Threshold Cycle*
CTCF	*CCCTC-binding factor (zinc finger protein)*
DGCR8	*DiGeorge syndrome critical region gene 8*
DIG	Digoxigenin
DMRs	Differentiell methylierte Regionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EAU	*European Association of Urology*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EN	Endonuklease
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Etanol
Euv	*Envelope Gen*
EXE	extraembryonale Ektoderm
FDA	*Food and Drug Administartion*
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FGFR3	*fibroblast growth factor receptor 3*
G	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gemcitabin und Cisplatin
h	Stunde
H_2O	Wasser
HERV	humane endogene Retroviren
HMTase	Histon-Methyltransferase
ICM	*inner cell mass*
IDLN	Idiolokale Normierung
IGF2	*insulin-like growth factor 2*
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalaktopyranosid
ITRs	*inverted terminal repeats*
ISCP	*International Society of Urological Pathology*
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LINE	*long interspersed nucleotide element*
Lsg	Lösung
LTR	*long-terminal repeats*

L	Liter
MBD	*Methyl-CpG binding domain protein*
MC	MICRECAL
MeCPs	*Methyl-CpG-binding proteins*
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mM	Millimolar
mRNA	*messenger* RNA
msPCR	Methylierungs-spezifische PCR
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin
ncRNA	*non-coding RNA*
µM	Mikromol
µl	Mikroliter
n	Versuchsanzahl
OD	Optische Dichte
ORF	*Open reading frame*
PBS	*phosphat buffered saline*
PcG	Polycomb
PCR	*polymerase chain reaction*
PGCs	primordialen Keimzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	*rotation per minute*
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	*reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SD	Standartabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SINE	*short interspersed elements*
siRNA	Small interfering RNA
S.O.C. Medium	Super Optimal Broth Medium
SVA-Element	SINE/VNTR/Alu-Element
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA, Trophectoderm
Tm	*melting temperature*
TNM	*Tumour, Node, Metastasis*
TPRT	*target primed reverse transcription*
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TrxG	Trithorax
TSD	*target site duplications*
TUR	transurethraler Elektroresektion
U	Units
ÜN	Über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VE	viszerale Endoderm
WGA	*Whole Genome* Amplification
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid

2.2 Material

2.2.1 Proben

Urin- und Vollblutproben: Pro Patient wurden 30-50 ml Urin und 5-10 ml Blut in EDTA Röhrchen gesammelt und zur Verfügung gestellt.

Herkunft: Universitäts-Spital Zürich, Klinik für Urologie und Hegau-Bodensee-Hospital

Zürich-Proben		
Nr.	**Tumor-Proben ID**	**Histologie**
1	002	TaG1
2	003	TUR-B: Cis
3	004	TaG3
4	005	TaG3
5	006	TaG3
6	007	T2bG3
7	008	TaG3
8	009	T4aG3
9	010	T1G3 + CIS
10	011	T1G3 + CIS
11	013	TaHG
12	015	T1HG
13	016	TaHG
14	017	TaHG
15	018	T1HG
16	020	TaHG
17	021	TaLG
18	022	T1HG, LKn
19	023	T3bHG, LKp
20	026	T1HG
21	024	TaHG
22	027	T1HG,LN0
23	028	TaHG
24	030	TaLG
25	031	TaLG
26	033	T3bHG, LN+
27	035	T2HG
28	036	TaHG
29	037	TaLG
30	039	TaHG
31	041	pT4a, Pn1(1/30), L1, V1, R1, G3
32	043	TaLG
33	044	T1HG
34	045	T1HG
35	046	TUR-B: T2HG
36	047	pT4, pN1 (1/45), PN1, G3, L1
37	048	TaLG

Zürich-Proben		
Nr.	**Tumor-Proben ID**	**Histologie**
43	054	TUR-B: T2G2
44	056	pT3b G3 pN2 (4/14)
45	057	TaHG
46	058	1. TUR-B: pT2 G3 + Cis
47	060	pT2HG
48	061	T1HG
49	062	T1HG + CIS
50	063	T1HG
51	064	T2aHG
52	065	pT3a G3 pN0 (0/15)
53	066	pT3b, G3, pN1 (1/18) L1, V1, pN1, cM1
54	067	pT3b, pN3 (4/12)
55	068	pT3, G3, pN2 (5/13), V1, L1, pN1, M1
56	069	pT2b, pN0 (0/47) HG
57	070	pT3b, pN1 (1/28) cM0, G3
58	071	pT3b, pN3 (19/35), V1, pN1, G3
59	072	pT1, G3, pN0 (0/18)
60	073	pTx, pN0 (0/21)
61	074	TaLG
62	075	T2aHG
63	077	pT3b, pN0 (0/55), G3, V1, PN1
64	079	TaHG
65	080	pT4a, pN2 (4/50), PN1, L1, G3
66	090	pT1, L1, pN1 (1/46), HG
67	091	pT3b, pN0 (0/18), HG, R0
68	112	pT4a, pN0(0/32), L1, V1, R1
69	117	pT3, pN0 (0/24)
70	118	pT3b, pN1 (1/28), G3, L1, Pn1
71	120	pT1, pN0 (0/38), V1, G3
72	121	pT4a, G3, pN0 (0/47) + CIS
73	122	pTa LG
74	124	pTa LG
75	128	pTaHG
76	131	pTa HG
77	133	pT4a, mind. pN2 (10/10), G3, L1, V1, Pn1
78	134	pT4a, pN1 (1/16), V1, L1, G3
79	137	pT1HG + CIS

38	049	T1HG
39	050	TaLG
40	051	pTaLG
41	052	pT1G3(pN2(2/26)
42	053	pT3a, G3, pN0 (0/46)

80	138	pT1 HG
81	144	pT3a, pN0 (0/23), G3
82	149	pTa, G2, LG
83	153	pT1, HG
84	155	pT1, HG
85	158	pTa LG

Nr.	Tumor-Proben ID	Histologie
86	B26	pT2G3
87	B28	pT1G2a
88	B31	pTaG2a
89	B32	pTaG2a
90	B38	mind. pT2, cN1, M1, G3
91	B46	pT1G2a
92	B53	pTaG2a
93	B54	pTaG2a
94	B55	pT1G2a
95	B64	pT3, R0, L1, G3
96	B71	mind.pT3,Nx,Mx,R1, G3
97	B74	pTaG1b
98	B77	pT2,N0,M0, G3
99	B79	mind. pT2,cN0,M0, G2b

Nr.	Kontroll-Proben ID (kein Tumor)	
100	Zürich	012
101		025
102		034
103		055
104		059
105		076
106		301
107		302
108		303
109		304
110		306
111		307
112		308
113		310
114		311
115		312
116		313
117		314
118		315
119		316
120		317
121		319
122		320
123		321
124		322
125		323
126		324
127		325
128	Bodensee	K3
129		K4
130		K8
131		K21

Gewebestanzen: Pro Patient wurden 3 Gewebestanzen (à ca. 3 mm lang) vom Tumorgewebe als auch von nicht Tumorgewebe zur Untersuchung der multi- und unifolkalen Harnblasenkarzinome zur Verfügung gestellt.

Herkunft: Universitäts-Spital Zürich, Institut für Klinische Pathologie

Positiv-/Negativ-Proben Kohorte 1	Proben-Nr.	Histologie
Multifokale Blasenkarzinome	51	pTaLG
	63	T1HG
	84	TaG2
	103	pT1 HG
	148	pTa LG
Unifokale Blasenkarzinome	105	pTa HG (G2)
	108	pTa LG
	111	pTa HG
	136	TaHG
	151	T1, HG
Normales Urothelgewebe (Patienten ohne Urothelkarzinom)	Ac-1	-
	Ac-2	-
	Ac-3	-

Proben-Sets: Pro Patient wurden 4-5 ml Blutplasma, 30-50 ml Urin sowie mind. 3 Gewebestanzen gesammelt und zur Verfügung gestellt, um den globalen Methylierungs-Vergleich zwischen den Körperflüssigkeiten und dem Gewebe zu ermöglichen.

Herkunft: Universitäts-Spital Zürich, Klinik für Urologie und Klinik für Pathologie

Positiv-/Negativ-Proben Kohorte 2	Proben-Nr.	Histologie
Blasenkarzinom	502	pTa, G1 LG
Blasenkarzinom	503	pT1 HG
Blasenkarzinom	505	T4 HG, M1, N1
Blasenkarzinom	507	pTa G3 + CIS
Blasenkarzinom	508	pT1 HG
Blasenkarzinom	509	pTa, LG
Normales Urothelgewebe	401	-
Normales Urothelgewebe	403	-
Normales Urothelgewebe	405	-
Normales Urothelgewebe	506	-

2.2.2 Medien und Antibiotika

LB-Medium wurde nach Angaben des Herstellerst (Invitrogen) hergestellt,d.h. 20 g ad 1 L dH_20, anschließend autoklaviert und abgekühlt auf RT

LB-Agar (Platten) LB-Medium wurde mit Agar versetzt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50-60°C erfolgte die Zugabe des

Antibiotikums. Vor der Ausplatierung der kompetetnen *E.coli* wurden die Platten mit je 40 µl x-Gal (20 mg/ml, gelöst in DMF) und IPTG (100 mM, gelöst in dH_2O) bestrichen und für 1-1,5 h bei 37°C inkubiert.

Antibiotika Ampicillin 100 µg/ml (LB-Medium und LB-Agar Platten)

2.2.3 Lösungen und Puffer

DNA-Auftragspuffer	0,1% [w/v] Bromphenolblau, 0,1% [w/v] Xylenxyanol, 50% [v/v] Glycerol, in 1 x TBE
10 x PCR Buffer	Qiagen
M-MLV RT 5xBuffer	Promega
5 x TBE-Puffer	0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
20xSSC	Roth
50xTAE Puffer	Roth
PBS	SIGMA

2.2.4 DNA-Standards, Enzyme und Substrate

DNA-Standards: 100bp DNA Ladder (Invitrogen)

1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

Enzyme und Substrate:

CpG Methyltransferase	4000 U/ml	(BioLabs)
Micrococcal Nuclease	100 U/µl	(Thermo SCIENTIFIC)
DNaseI, RNase free	1500 Kunitz units	(Qiagen)
Protease	7.5 AU	(Qiagen)
Proteinase K	7.5 AU	(Qiagen)
HotStarTaq	5 U/µl	(Qiagen)
T4 DNA Ligase	4.0 U	(Invitrogen)
RNasin® Plus RNase Inhibitor	40 U/µl	(Promega)
M-MLV Reverse Transkriptase	200 U/µl	(Promega)
dNTPs	10 mM	(Promega)
Oligo (dT) 15 Primer	500 µg/ml	(Promega)
Carrier RNA	0,2 µg/µl	(Qiagen)

2.2.5 Synthetische Primer [Thermo SCIENTIFIC]

	Gen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Größe (Bp)	Tm (°C)
LINE-1/Alu Methylierungs - Primer	Methyliertes LINE	sL1 met	5`-GCG CGA GTC GAA GTA GGG C-3`	193	53
		asL1 met	5`-CTC CGA ACC AAA TAT AAA ATA TAA TCT CG -3`		
	Unmethyliertes LINE	s1CGlosLINE51	5`-AGG TTT TAT TTT TGG GGG TAG GGT ATA-3`	214	60
		as1CGlosLINE51	5`-CCC CTA CTA AAA AAT ACC TCC CAA TTA AAC-3`		
	Alu	s3KontrAlu Yb 51	5`-GGG TGG ATT ATG AGG TTA GGA GAT-3`	175	58
		as3KontrAlu Yb 51	5`-CAT TCT CCT ACC TCA ACC TCC C-3`		
		s2AluYb54	5`- ATT TTA GTA TTT TGG GAG GTC GAG GC-3`	255	61
		as2AluYb54	5`-GCA ATC TCG ACT CAC TAC AAA CTC CG-3`		
Klonierungs-Primer	LINE	sLINEkonv1Ampl	5`-GGT TTA TTT TAT TAG GGA GTG TTA G-3`	436	51
		asLINEkonv1 Ampl	5`-ACA AAA ACA AAC AAA CCT CC-3`		
Sequenzierungs -Primer		Primerseq2-152	5`-TAT GCT TCC GGC TCG TAT GTT-3`	495	56
MIRECAI - Primer	LINE	s1LINEcDNA, MC	5´-CGA CGC AGA AGA CGG TGA TTC–3´	522	62
		as1LINEcDNA, MC	5´-GTC TTT TTG TTT GTC TGT GCC CTG C–3´		
	GAPDH	s1GAPDH Pro 62	5´ GGG ACC TTC TTG CCT TGC TCT TGC T–3´	360	67
		as1GAPDH Pro 62	5´-TGA GTG TGG GAT GGG AGG GTG CT–3´		

Prime zur Detektion der Transkription	GAPDH	S1GAPDHmrna	5´-CAT GAC AAC TTT GGT ATC GTG GA–3´	381	62
		AS1GAPDHmrna	5´-GTG GGT GTC GCT GTT GAA GTC–3´		
	LINE	s1LINEcDNA	5´-TGG AAT AGG TGT GGT GTG GTG CT–3´	246	61
		as1LINEcDNA	5´-TCA CTC AGG ACA GCC CAG ACG–3´		
	Beta-Aktin	s1beta-actin cDNA	5´-GCC CAG TCC TCT CCC AAG TCC ACA CAG –3´	141	59
		as1beta-actin cDNA	5´- GGG GGG GCA CGA AGG CTC ATC ATT–3´		
	BCl-XL	s1BCl-X cDNA	5´- CAT GGC AGC AGT AAA GCA AGC G–3´	295	60
		as1BCl-XLcDNA	5´- AGG CTC TAG GTG GTC ATT CAG G–3´		
	BimEL	s1BimELcDNA	5´- GTA ATC CTG AAG GCA ATC ACG GAG–3´	250	60
		as1BimELcDNA	5´- ATA GTG GTT GAA GGC CTG GCA A–3´		

2.2.6 Bakterienstämme und Vektoren

Es wurden kompetente TOP10 *E.coli* sowie der TA Cloning® Vektor pCR® 2.1 der Firma Invitrogen verwendet.

2.2.7 Eingesetzte Kits in der Molekularbiologie

EpiTect Bisulfit Kit	Qiagen
Experion 1K Reagent Kit	BioRad
Hybridization Kit	Roche
Labeling Kit	Roche
MagMeDip Kit	Diagenode
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini and Blood Kit	Qiagen
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TA Cloning® Kit	invitrogen
Telo TAGGG Telomere Length Assay	Roche
Urine Genomic DNA Isolation Kit	Norgen Biotek
WGA Kit	Sigma
Wasch Kit	Roche

2.2.8 Chemikalien

ABI PRISM®BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits	Applied Biosystems
Agarose Ultra Pure™	Invitrogen
Ampicillin	SIGMA-ALDRICH
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	MERCK
EDTA	Roth
Ethidiumbromidlösung (mg/ml)	Roth
Ethanol	Roth
Glycerol	Roth
IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside)	PEQLAB
LB Broth	Invitrogen
peqGold dNTP-Set	peqLab
Power Sybr Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
2-Propanol	Merck
20xSSC	Roth
50xTAE Puffer	Roth
TrisBase	Roth
HiPerSolv Wasser (HPLC)	VWR
X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta -D-galactopyranoside)	SIGMA-ALDRICH
Xylene	VWR

2.2.9 Geräte

Zentrifugen	Eppendorf, Centrifuge 5424 Eppendorf, Centrifuge 5424R Eppendorf, Concentrator plus Hettich Zentrifugen, ROTINA 46 R
PCR Cycler	Applied Biosystems
Realtime PCR Cycler	StepOnePlus, Applied Biosystems
Heizblock	Eppendorf
Inkubator	WTC binder
Power Supply	Power PAC 300, Bio-Rad
Elektrophorese-Kammer	Separation Systems, Owl
Bakterienschüttler	CERTOMAT®H/MO, B.Braun
Eismaschine	AI 80, Scotsman
Waagen	KERN 440-47 und KERN GS
Vortexer	Heidolph REAX 2000
Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer	Thermo SCIENTIFIC NANODROP 2000
pH-Meter	Schott, BlueLine
Wasserbad	GFL
Rotor	Diagenode, DiaMag Rotator
Vakuumpumpe	QIAvac 24 Plus Vacuum Manifolder und QIAvac Connecting System
NimbleGen Hybridization System 4	Roche
NimbleGen MS 200 Microarray Scanner	Roche
NimbleGen MS 200 Microarray Scanner	Roche

Slide Magazine	
Bioruptor plus	Diagenode
Experion System (mit Priming und Vortex Station)	VLP

2.2.10 Sonstige Materialien

Glasküvetten (50 ml)	Roth
MicroAmp Fast optical 96 well reaction plate	Applied Biosystems
MicroAmp Fast optical Adhesive Film	Applied Biosystems
15 ml konische PS-Röhrchen	CELLSTAR
50 ml konische PS-Röhrchen	CELLSTAR
Objektträger	Roth
Safe Lock Tubes (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Chromatographie-Papier (35x45 cm)	Whatman®
Nylon-Membranen	Roche
Human DNA Methylation 2.1M Deluxe Promoter v2 Array	Roche
HX1 Mixer	Roche
Experion DNA Chip	BioRad

2.2.11 Programme, Computersoftware und –hardware

Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation (Version 2007)
StepOne Software 2.2	Applied Biosystems
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems
Clone Mgr Suite	SECentral
NimbleGen MS 200 Microarray Scanner Operator´s Manual Version 1.0	Roche
NimbleGen DEVASoftware Version 1.0	Roche
GraphPad Prism4	GraphPad Software, Inc.
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
GenCards	http://www.genecards.org/
miRBase	http://www.mirbase.org/
DNA duster	www.soe.ucsc.edu/~kent/dnaDust/dnadust.html
Lalign	www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

2.3 Methoden

2.3.1 Nukleinsäuren

2.3.1.1 DNA-Extraktion aus dem Urin mittels Norgen Urine DNA-Isolation Kit (Norgen Biotek)

Die in 50 ml Falcon-Tubes gefrorenen Urin-Proben wurden vor der DNA-Isolation in kaltem Wasser aufgetaut und 2-3-mal invertiert. Nach dem Auftauen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Mittels des Norgen Urine DNA-Isolation Kits von Norgen Biotek wurden die ersten Extraktionen der im Urin enthaltenden zellulären und freien DNA durchgeführt, um die LINE-1 Methylierung mittels Realtime PCR zu ermitteln. Die zelluläre DNA wurde aus 1,75 ml Probenvolumen isoliert, während die Isolation der freien DNA aus einem Volumen von 3,5 ml erfolgte. Hierfür wurde die Urinprobe 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend in ein sauberes Eppi dekantiert. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Änderungen: Freie DNA wurde nur einmal mit EtOH gewaschen, statt wie vom Hersteller vorgegeben 2-mal und freie sowie zelluläre DNA wurden mit 22 µl Eluationspuffer eluiert, statt mit 10 µl, wie im Herstellerprotokoll angegeben. Nach Zugabe des Eluationspuffers wurden die Micro Spin Columns 1 min bei RT inkubiert und danach zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Reelution der DNA über die gleiche Micro Spin Column bei 20.000 x g für 1 min. Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.3.1.2 DNA-Extraktion aus Urin und Blutplasma mittels QIAamp® Circulating Nucleic Acid (Qiagen)

Um eine höhere DNA-Ausbeute, die gleichzeitig einen höheren Reinheitsgrad besitzt zu erhalten, wurde die DNA Extraktion aus den Urin- sowie Blutplasmaproben auf das QIAamp® Circulating Nucleic Acid von Qiagen umgestellt. Dieses ermöglicht eine DNA Isolierung aus einem Probenvolumen von 4-5 ml.

Die Isolierung der frei zirkulierenden DNA aus Blutplasma sowie der zellulären und freien DNA aus Urin erfolgte nach Angaben des Herstellers. Jedoch wurden die Proben für die Isolierung der freien DNA aus Urin zuvor 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Änderungen für die Extraktion der Urin-DNA beider Fraktionen: die Lyse bei 60°C erfolgte für 40 min statt für 30 min und die QIAGEN® Mini Columns wurden nach Zugabe des AVE-Puffers 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgten die Eluation

und eine Reelution bei 20.000 x g für 1 min. Die Reeluation war vom Hersteller nicht vorgegeben. Je nach Reinheitsgrad wurden die Proben zusätzlich mit dem QIAamp DNA Mini and Blood Kit der Fa. Qiagen nach Angaben der Herstellers aufgereinigt.

2.3.1.3 DNA-Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Isolierung aus Vollblut erfolgte aus je 200 µl Probe mit dem QIAamp DNA Mini and Blood Kit der Fa. Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Änderungen: die Lyse der Proben erfolgte bei 56°C für 30 min statt für 10 min, wie vom Hersteller vorgegeben. Daber hinuas wurden die Proben zusätzlich nach der Eluation reeluiert bei 20.000 x g für 1 min.

2.3.1.4 DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebestanzen

Für die DNA-Extraktion wurden je Probe drei FFPE-Gewebestanzen mit einer Länge von 0,3 cm in einem 1,5 ml Eppi verwendet. Diese wurden nach Entparaffinierung mit 180 µl ATL-Puffer der Fa. Qiagen versetzt und mit dem QIAamp DNA Mini and Blood Kit der Fa. Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.3.1.5 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid der Fa. Qiagen nach Anleitungen des Herstellers. Änderungen: Inkubation mit DNase wurde für 30 min durchgeführt statt für 15 min, wie vom Hersteller vorgegeben. Die Proben wurden zusätlich zur Eluation reeluiert bei full speed für 1 min. Je nach Reinheitsgrad wurden die Proben zusätzlich mit dem RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen nach Angaben der Herstellers aufgereinigt.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der isolierten Gesamt-RNA aus den Urin-Proben um reine RNA handelt, die nicht mit genomischer DNA kontaminiert ist, wurden die Proben in der Realtime PCR mittels *GAPDH* mRNA-Primern getestet. Diese wurden gezielt in das Intron des *GAPDH* Gens gelegt, so dass nach Durchlauf der PCR keine Amplifikate zu erwarten waren. In Abb. 1 ist das Ergebnis der Realtime PCR der gemessenen RNA-Proben der frühen und der gesunden Probanden (Kontrollen) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass keine Amplifikate bei den drei Proben-Fraktionen entstanden sind. Somit konnten die getesteten RNA-Proben in cDNA mittels RT-PCR umgeschrieben und die Transkription ermittelt werden.

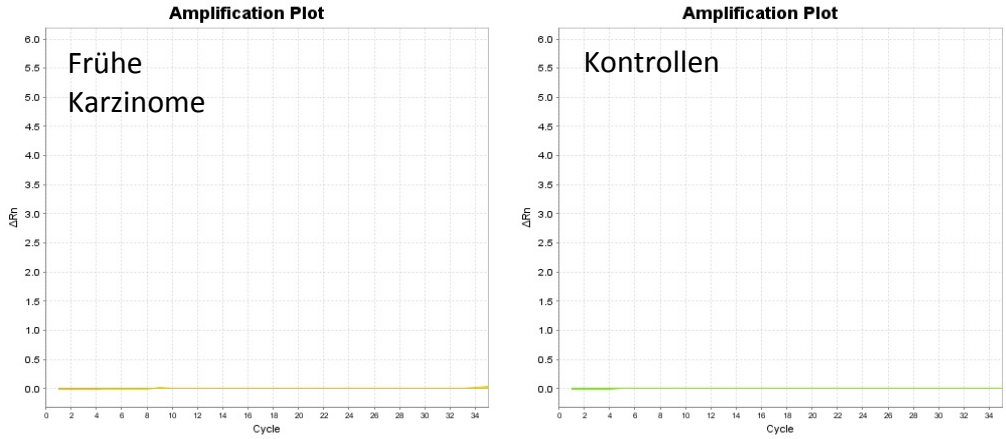


Abb. 1 Nachweis der RNA-Reinheit. Der Nachweis erfolgte mittels *real time* PCR und mit 20 ng RNA je Probe. Hierfür wurden *GAPDH* mRNA-Primer verwendet. Frühe Karzinomproben: 120, 128, 131; Kontrollen: K3, K4, K8, K21. PCR Bedingungen: 30``95°C, 40``62°C, 15``72°C, 40 Zyklen (381 bp).

2.3.1.6 DNA- und RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der DNA sowie RNA erfolgte mit dem Spektrophotometer NANODROP 2000 der Fa. Thermo SCIENTIFIC. Für die Messung wurde die Absorption bei 260 nm (Absorptions-maximum der Basen) und 280 nm (Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) durchgeführt. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgenden Angaben für λ = 260 nm ermittelt: DNA: 1 OD = 50 µg/ml DNA

RNA: 1 OD = 40 µg/ml RNA

Die Reinheit der Nukleinsäuren konnte durch den Quotienten aus 260/280 nm bestimmt werden. Das Verhältnis reiner DNA und RNA liegt zwischen 1,8 und 2.

2.3.1.7 DNA-Bisulfit-Konvertierung

Zur Ermittlung des Methylierungsstatus der DNA ist es notwendig den bestehenden Unterschied zwischen dem Cytosin und dem 5-Methylcytosin zu bestimmen. Dies erfolgt durch die chemische Konvertierung des unmethylierten Cytosins zu Uracil auf der DNA. Optimale Bedingungen für die Bisulfit-Reaktion sind dabei der niedrige pH-Wert, die hohe Bisulfit-Salz Konzentration sowie die hohen Temperaturen, denen die DNA ausgesetzt wird.

Die Konvertierung der isolierten DNA aus Urin wurde mit dem EpiTect Bisulfit Kit Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden mit 30 µl EB-Puffer statt in 20 µl eluiert. Für eine die Bisulfit-Konvertierung wurde von jeder Probe 100 ng DNA eingesetzt.

2.3.1.8 PCR („Polymerase Chain reaction“)

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Diese Methode macht es möglich durch Einsatz geeigneter Primer (synthetische Oligonukleotide), aus einem Gemisch von Nukleinsäuren, gezielt bestimmte Sequenzabschnitte zu amplifizieren. Die Primer hybridisieren gegen die flankierenden Bereiche der zwei komplementären Stränge der Ziel-DNA. Mit Hilfe einer DNA-abhängigen, hitzebeständigen DNA-Polymerase werden die zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenzen in drei sich immer wiederholenden Zyklen synthetisiert. Diese sind: Denaturierung (95°C), Annealing (ca. 45-65°C), abhängig von Primerlänge und GC-Gehalt und Elongation (72°C).
Für die PCR wurde die Taq-Polymerase verwendet. Diese wurde aus *Thermus aquaticus*, einem hitzebeständigen Bakterienstamm, der in 70°C heißen Quellen wächst, isoliert. Das Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase liegt bei 74°C und einem pH von über 8. Die hier verwendete Taq-Polymerase besitzt neben der 5´-3´-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5´-3`-Exonukleasenaktivität. Die Temperatur der Annealing-Phase hängt von der Schmelztemperatur (T_m) der jeweiligen Primer ab und lässt sich nach folgender Formel abschätzen:

$$T_m\ [°C] = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

Die Temperatur der Elongations-Phase ist von dem Temperaturoptimum der eingesetzten Taq-Polymerase abhängig. Bei der Denaturierung wird die Ziel-DNA (Template) erhitzt, um die beiden Stränge zu trennen. In der danach folgenden Annealing-Phase hybridisieren die Primer an die DNA. Als letzter Zyklusschritt folgt die Elongation, bei der die Temperatur auf 72°C erhöht wird, so dass die Taq-Polymerase optimal arbeiten kann. Am Ende des ersten Zyklus ist die DNA-Menge verdoppelt. Es wurde folgender PCR-Ansatz für die Bisulfit-konvertierte DNA für die danach folgende Klonierung verwendet:

Master Mix (1x):	(10x) Puffer	2,5	µl
	dNTP´s (10 mM)	0,5	µl
	Primer 1 (10 pm/µl)	1	µl
	Primer 2 (10 pm/µl)	1	µl
	Taq Polym. (5U)	0,3	µl
	H_2O	17,7	µl
	Template	2	µl
	Σ	25	µl

Program:			
	95°C -	13´	
	95°C -	50´´	36 Zyklen
	51°C -	40´´	
	72°C -	30´´	
	72°C -	3´	
	4°C -	∞	

2.3.1.9 Quantitative *real time* PCR

Die Messungen der Quantitativen *real time* PCR erfolgte mit dem StepOnePlus Gerät und dem SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff der Fa. Applied Biosystems. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green ist in der Lage an doppelsträngige Nukleinsäuren zu binden und bildet daher nach Zugabe der DNA-Probe sofort einen Komplex. Während der Denaturierungs-Phase wird das SYBR Green wieder freigesetzt und die Fluoreszenz rapide reduziert, da einzelsträngige DNA-Fragmente vorliegen. In der darauf folgenden Annealing-Phase wird das Zielgen durch das Anbinden der Primer an die einzelsträgige DNA und die DNA Polymerase amplifiziert. Somit kann der Fluoreszenzfarbstoff wieder an die neu entstandenen doppelsträngigen DNA-Produkte binden. Dies hat einen Anstieg der Fluoreszenzintensität zu Folge, die sich proportional zu den enstanden PCR-Produkten verhält. Daher kann mittels der Quantitativen *real time* PCR („Echtzeit-PCR“) nach jedem durchlaufenen Temperaturzyklus die ansteigende Produktmenge detektiert werden.
Für jede Probe wurde eine dreifach Bestimmung durchgeführt, welche auf Fast optical 96 well Platten durchgeführt wurden. Es wurden je well 18 µl Master-Mix vorgelegt und danach 2 µl Template pro well hinzupipettiert. Für *rea ltime* PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Master Mix (1 x):		
	Power SYBR Green	10 µl
	sense Primer (1,25-10 pm/µl)	1 µl
	antisense Primer (1,25-10 pm/µl)	1 µl
	H_2O (µl)	6 µl
	Template	2 µl
	Σ	20µl

Program:			
	95°C -	10´	
	95°C -	30´´	40 Zyklen
	X °C -	40´´	
	72°C -	15´´	
	72°C -	3´	
	4°C -	∞	

Relative Quantifizierung

Die Analyse der MS *real time* PCR Messungen erfolgte über die relative Quantifizierung. Dabei wurde im ersten Schritt die StepOne Software 2.2 der Fa. Applied Biosystems verwendet, um die Produktmenge mittels der sogenannten C_T-Werte (Threshold Cycle) zu ermitteln. Der Threshold Cycle ist die Zyklenzahl, an dem das Fluoreszenzsignal einer Probe den Threshold schneidet. Hierfür musste zuvor der Threshold bzw. die Grenzlinie festgelegt werden, damit alle gemessenen Proben am gleichen Steigungspunkt abgelesen werden konnten. Der Threshold ist definiert als das Signalniveau, an dem die Fluoreszenz einer Probe einen statistisch signifikanten Anstieg über der kalkulierten Baseline erzielt (Abb. 2). Dieser wurde für jedes eingesetzte Primerpaar bestimmt und in allen nachfolgenden Messungen angewendet. Da die Proben als Triplikate gemessen wurden, konnten die gemessenen C_T-Werte gemittelt bzw. Ausreißer entnommen werden. Anschließend wurde im nächsten Schritt der relativen Quantifizierung bei jeder untersuchten Probe der C_T-Wert der „unmethylierbaren“ Normierungsamplifikation subtrahiert von dem C_T-Wert der „differentiell methylierbaren“ Amplifikation:

$\Delta C_T = C_T$ Zielamplifikat $- C_T$ Normierungsamplifikat

Ist diese Normierung erfolgt, so konnte als nächstes jeder ΔC_T-Wert der gemessenen Proben um den ΔC_T-Wert einer ausgewählten Bezugsprobe vermindert werden (= $\Delta\Delta C_T$). Mit Hilfe dieser $\Delta\Delta C_T$-Methode wurde die unterschiedlich vorkommende Anzahl der relativen Loci in den miteinander zu vergleichenden Proben berücksichtigt. Im letzten Berechnungsschritt wurde über die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ der relative Methylierungsgrad einer Probe – normiert über einen in allen Proben gleicher relativer Menge vorkommenden, nicht differentiell methylierbaren DNA-Abschnitt - ermittelt.

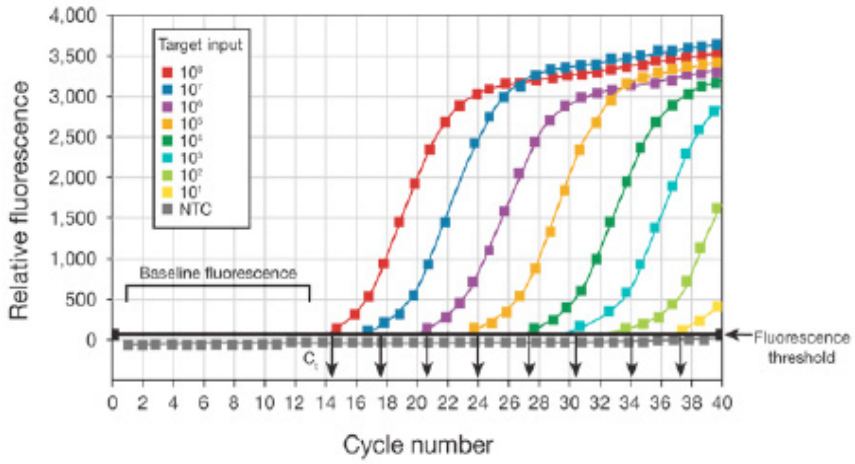


Abb. 2: Amplifikationsplots. Aus dem *real time* PCR Handbuch (Fa. life technologies™). Amplifikationsplots entstehen, wenn das Fluoreszenzsignal der Proben gegen die Zyklenzahl geplottet wird.

Absolute Quantifizierung

Zur genauen Ermittlung der LINE-1 Transkripte wurde die Methode der absoluten Quantifizierung gewählt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die genaue Kopienzahl der amplifizierten Produkte zu ermitteln. Dafür wurde zunächst eine Standardkurve mittels *real time* PCR und einer Verdünnungsreihe der Plasmid DNA erstellt werden. Hierfür wurde das 246 bp große LINE1-Insert in den pCR®2.1 Vektor kloniert und nach der Isolierung die Plasmid-DNA quantifiziert. Mit dieser Quantifizierung konnte die Plasmid-Kopienzahl anhand der Formel:

$$\frac{\text{DNA g/µl}}{\text{(Plasmidlänge in bp x 660)}} \text{ x } 6{,}022 \text{ x } 10^{23} = \text{Y Moleküle/µl}$$

berechnet werden. Anschließend wurde eine aufsteigende Verdünnungsreihe (Kopienzahl 1-30.000) erstellt, die in Triplikaten mittels der *real time* PCR gemessen wurden. In Abb. 3 (A) sind die Amplifikations-Plots der Verdünnungsreihe, bei der die Kopienzahl von links nach rechts abnimmt, sowie die daraus resultierende Standardkurve (Abb. 3 B), dargestellt. Nach Fertigstellung der Standardkurve konnte im letzten Schritt die genaue Kopienzahl der LINE-1 Amplifikate mittels der gemessenen C_T-Werte der Proben bestimmt werden.

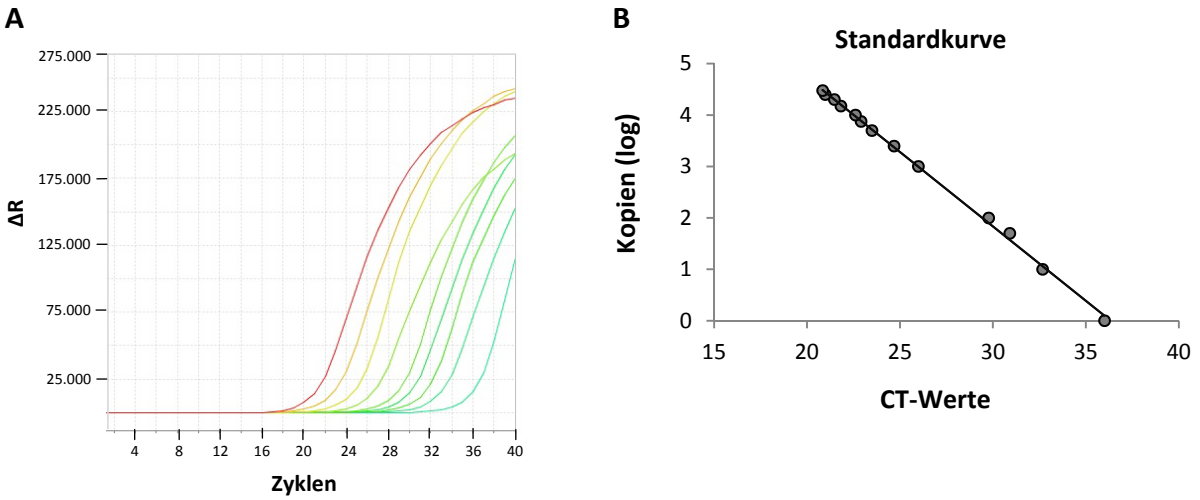


Abb. 3 Standardkurve der absoluten Quantifizierung. Für die absolute Quantifizierung wurden folgende Plasmid-Kopien, die das LINE-1-Insert enthalten haben, in der *real time* PCR eingesetzt: 30.000, 10.000, 2.500, 1.000, 500, 100, 250, 10 und 1. (A) zeigt den linearen Amplifikationsgraphen der Standardkurve. In (B) ist die daraus hervorgehende Standardkurve dargestellt.

2.3.1.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Durch Anwendung der Gelelektrophorese ist es möglich Nukleinsäuren mittels einer Matrix nach ihrer Größe zu trennen. Es ergibt sich für doppelsträngige und nach Denaturierung als einzelsträngig vorliegende Nukleinsäuren eine bestimmte Länge. Daher besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Laufweite im Gel und des Molekulargewichts. Somit wird die Auftrennung nach Molekulargröße auch als „Sieben“ bezeichnet. Zu kleine oder zu große Fragmente können nicht mit einbezogen werden, da sie entweder zu klein für den Siebeffekt sind oder aufgrund ihrer Größe zu sehr gestaucht werden (Southern, 1979).

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA dienten Agarosegele. Diese ermöglichen eine Trennung von ca. 0,1 – 10 kb. Die Agarose besteht aus einem Heteroglucan aus β–D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose in alternierender α-1,3/ β-1,4- Verknüpfung (Ausubel *et al.*, 1999) und wird aus den Rotalgengattungen „*Gelidium“* und „*Gracillaria“* gewonnen. Für das Agarosegel wurden 1 – 2 g Agarose mit 100 – 200 ml 1 x TBE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf Handwärme mittels „unter kaltem Wasser schwenken“ wurden 6 µl EtBr/100 ml Agarosegel hinzu pipettiert und das Gel in die Kammer gegossen. Als Laufpuffer diente der 1 x TBE Puffer, mit dem das Gel nach Festwerden überschichtet wurde. Nach dem die DNA-Proben mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt wurden, erfolgte die Auftragung in die Geltaschen (*„Slots“*). Von den PCR-Produkten wurde das gesamte Probenvolumen von 20-25 µl unverdünnt aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 10-15 min bei 60 V und wurde anschließend auf

150 V für weitere 20 min erhöht. Die Auswertung der Gele erfolgte an einer Geldokumentationsanlage unter UV Licht.

2.3.1.11 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten und nachgewiesenen PCR-Produkte konnten mit Hilfe eines Größenstandards bestimmt und unter UV Licht ausgestanzt werden. Die Aufreinigung der DNA aus den Agarosegelen erfolgte mit dem Gel-Extraktions-Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

2.3.1.12 Sonifizierung der DNA

Für die Methylomanalyse mit Hilfe der NimbleGen Plattform sollte die DNA möglichst gleichgroße DNA-Fragmente aufweisen. Daher wurden von jeder Probe 1,2 µg (in 50 µl TE-Puffer) extrahierte Gewebe-DNA mittels Ultraschall sonifiziert (Abb. 4). Dies erfolgte mit dem Bioruptor plus der Fa. Diagenode mit folgenden Einstellungen: Power Low, *15 sec on/15 sec of, 5 Cycles.* Somit konnte die DNA auf ca. 300-700 bp große DNA-Fragmente geschert werden und so die optimalen Anforderungen für die Immunopäzipitation zu erfüllen. Zelluläre sowie die freie DNA aus Urin musste auf Grund ihrer geringen Fragmentgröße nicht sonifiziert werden und konnten direkt für die Immunopräzipitation eingesetzt werden. Die Bestimmung der DNA-Fragmentgröße erfolgte mit dem Experion System sowie den dazugehörigen Experion DNA Chips und dem Experion 1K Reagent Kit der Fa. BioRad.

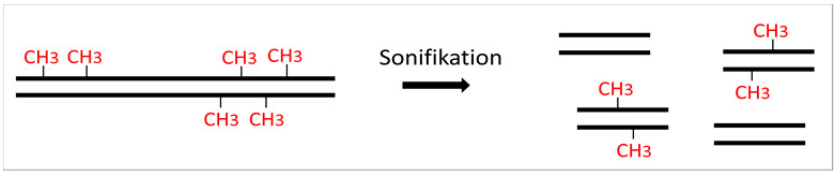


Abb. 4: Sonifikation von Gewebe-DNA-Fragmenten mittels Ultraschall.

2.3.1.13 Genomweite Methylierungsanalysen

Die Untersuchung der methylierten DNA setzt sich aus 4 aufeinander folgenden Schritten zusammen:

- Immunopräzipitation der methylierten DNA (MeDIP)
- Amplifikation des gesamten Genoms (WGA)
- DNA-Markierung (Labeling)
- DNA-Hybridisierung

Für die Immunopräzipitation der DNA aus Blutplasma und Urin wurden je 1,2 µg DNA eingesetzt. Genomische DNA aus FFPE-Gewebe (1,2 µg) wurde zuvor mit dem „Bioruptor plus“ unter den Einstellungen „Power Low, 15 sec ON/15 sec OFF, 5 Cyclen“ sonifiziert. Die Durchführung der Immunopräzipitation der methylierten DNA erfolgte mit dem MagMeDIP Kit nach Angaben des Herstellers der Fa. Diagenode (Abb. 5). Hierfür wurden zuerst 1,2 µg der Urin-DNA bzw. der sonifizierten Gewebe-DNA bei 95°C für 3 min im Inkubations-Mix denaturiert und anschließend 8,3 % des IP-Inkubations-Mixes für die Input-Probe (= interne Kontrolle) entnommen und bis zur DNA-Isolation bei -20°C gelagert. Zusätzlich wurden 83% des IP-Inkubations-Mix für die IP-Probe abgenommen und die Immunopräzipitation ÜN im Antibody-Mix und der darin enthaltenden „5-Methylcytosine Antibodys“ sowie magnetischen Beads (mag beads) bei 4°C im Rotor durchgeführt. Während dieser Inkubation binden die mit magnetischen Beads gekoppelten Antikörper an die CpG-Inseln.
Nach der ÜN Inkubation wurde die präzipitierte, methylierte DNA mit Hilfe von Waschschritten im „magnetic rack“ aufgereinigt und zum Schluss gemeinsam mit der aufgetauten Input- Probe isoliert.
Aufgrund der relativ geringen Ausbeute der methylierten DNA, war es nötig in einem zweiten Schritt die DNA (genomweit) mittels WGA zu amplifizieren. Diese wurde mit dem WGA Kit der Fa. Sigma nach Anleitung des Herstellers ausgeführt. Für die Amplifikation wurden je 10 µl von den IP-Proben und 20 µl von den Input-Proben eingesetzt und die Zyklenzahl von 14 auf 20 heraufgesetzt. Im Anschluss wurden die Proben mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Fa. Qiagen aufgereinigt und quantifiziert.

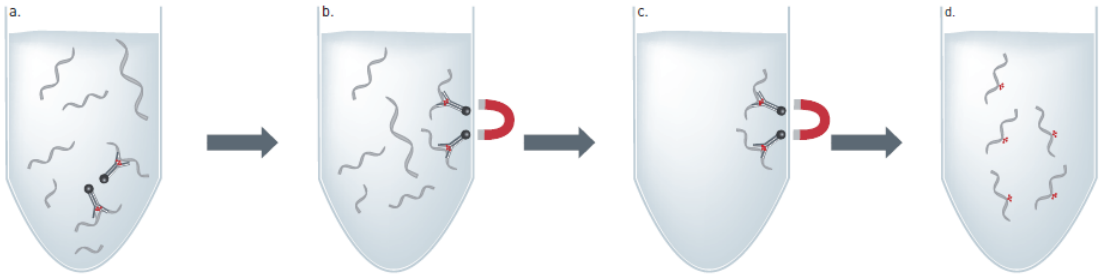


Abb. 5: Immunopräzipitation der methylierten DNA. a) Bindung der 5 mC-Antikörper-behafteten magnetischen Beads an die methylierte DNA, b) magnetisches Einfangen des Antikörper-DNA-Komplexes, c) Entfernung der unmethylierten DNA mittels Waschen und d) isolierte DNA nach Entfernung der magnetischen Beads. Modifiziert nach dem Magnetic Methylated DNA Immunprecipitacion (MagMeDIP) Kit, Fa. Diagenode (Vers. 108.1.0).

In dem darauf folgenden Schritt (DNA-Labeling) erfolgten die Markierung der Input-Proben mit den Farbstoffen Cyanin 3 und die der IP-Proben mit Cyanin 5 mittels des

Labeling Kit der Fa. Roche nach Anleitung des Herstellers. Anschließend wurden je 30 µg der zusammen gehörenden Input- sowie der IP-Probe in einem 1,5 ml Eppi kombiniert, in der Vakuumzentrifuge im Dunkel eingeengt und das Pellet bei -20°C gelagert.

Im letzten Schritt wurden die gelabelten Proben in 12,5 µl HPLC Wasser aufgenommen und im Hybridisierungsmix nach Angaben des Herstellers der Fa. Roche 5 min bei 98°C inkubiert. Nach dem beladen der NimbleGen Human DNA Methylation 2.1M Deluxe Arrays mit der Gilson-Pipette wurden die Arrays ÜN (mind. 16 h) bei 42°C im Hybridization System 4 hybridisiert. Mit Hilfe dieser Arrays können ca. 28.000 humane Promotoren untersucht werden. Diese sind auf bis zu 100 bp langen Oligonukleotid-Sonden (Abb. 6) lokalisiert und werden von 50-75 mer großen, sog. „*Tiled regions*“ abgedeckt. Die *Tiled regions* umfassen jeweils 1.500 bp stromaufwärts und 500 bp stromabwärts eines jeden Transkriptionsstarts.

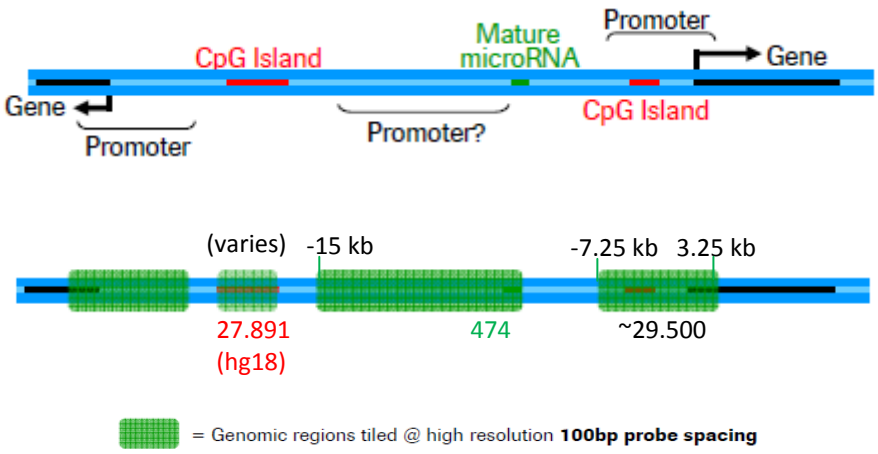


Abb. 6 Design des humanen DNA Methylation 2.1 M Deluxe Arrays. Modifiziert nach NimbleGen Epigenetics overview der Fa. Roche.

Zum Schluss wurden die Arrays nach Protokoll des Wasch-Kits der Fa. Roche gewaschen und im NimbleGen MS 200 Microarray Scanner mittels der MS 200 Data Collection Software eingescannt.

Bioinformatische Analysen

Im ersten Analyseschritt wurden mit der NimbleGen DEVA Software Version 1.0 die sog. „*Methylation Ratios*“ zwischen der immunopräpizitierten Proben-DNA (IP) und der Kontroll-Probe (Input) berechnet, die mittels weiterer bioinformatischer Analysen von Prof. Marcos J. Araúzo-Bravo am Max Planck Institut für Molekulare Biomedizin prozessiert wurden. Neben der am stärksten differentiell methylierten Regionen

(DMRs) wurde zusätzlich die Häufigkeit der jeweiligen DMR in den untersuchten Proben sowie der genaue Genlokus bestimmt. Darüber hinaus konnten globale Analysen angefertigt werden, die die Beziehung bzw. Verwandtschaft der Proben untereinander darstellen.

2.3.1.14 In vitro Methylierung

Als interne Kontrolle für die gleichbleibende Effizienz und Effektivität der *real time* PCR Messungen diente humane DNA (5 µg), die mittels der CpG Methyltransferase (*M.SssI*) vollstängig methyliert wurde. Die DNA-MTase *M.SssI* stammt aus dem *SpiroBlutplasma sp.* Stamm MQ1 M.SssI und ist gleichzeitig die einzige bekannte DNA-Cytosin-C5-MTasa, die Cytosin innerhalb der 5´-CG-3´ Erkennungssequenz methylieren kann (Nur *et al.,*1985). *M.SssI* überträgt CH_3-Gruppen des S-Adenosylmethionins (SAM) auf die unmethylierten CG-Bereiche der DNA, so dass die gesamte DNA methyliert vorliegt (Abb. 7). S-Adenosylmethionin geht aus der Reaktion als S-Adenosylhomocystein hervor (Abb.8).

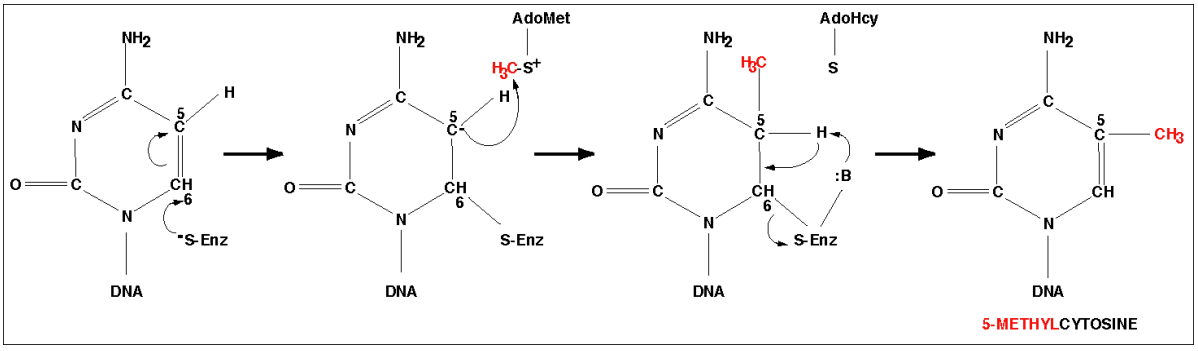


Abb. 7: Mechanismus der C5-Cytosin Methylierung durch DNA Methyltransferasen (modifiziert nach Wu und Santi, 1987). SAM=AdoMet (S- Adenosylmethionin), (AdoHcy) S-Adenosylhomocystein Enz (Enzym – Methyltransferase; B-Base).

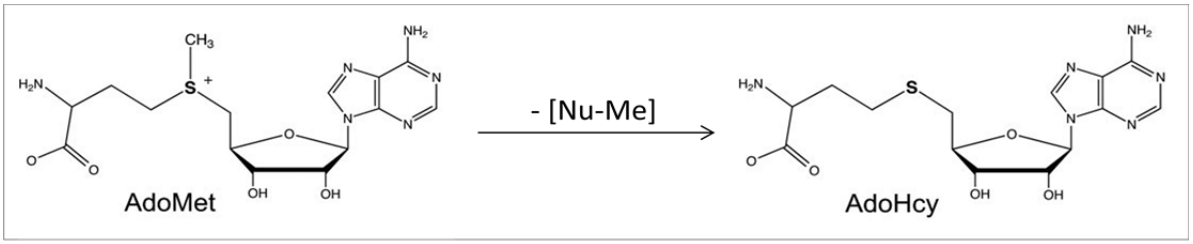


Abb. 8: Der Kofaktor S-Adenosylmethionin (auch AdoMet) dient den DNA Methyltransferasen als CH3-Quelle. Mittels eines nukleophilen Angriffs kann die Methlygruppe aktiviert werden und das S-Adenosylmethionin in S-Adenosylhomocystein (auch AdoHcy) umgewandelt werden (modifiziert nach Hausmann *et al*., 2005).

Der Reaktiontsansatz wurde 2 mal für 1,5 h bei 37°C inkubiert und nach Ablauf der ersten Inkubationsphase erneut 1,5 µl SAM sowie 0,5 µl *M.SssI* hinzupipettiert.

Anschließend wurde die methylierte DNA mit dem QIAamp DNA Mini and Blood Kit von Qiagen aufgereinigt und einer Bisulfit-Konvertierung (500 ng) unterzogen. Für die Methylierung der DNA (1x) wurde folgendes Protokoll verwendet.

10x NEBuffer 2	2 µl
M.SssI (12 U)	3 µl
SAM (160 µM)	1,5 µl
DNA	5 µg
H_2O	ad. 30 µl

2.3.1.15 Telomeren-Längenbestimmung mittels „Telomere Length Assay“

Die Untersuchung der Telomerenlänge erfolgte mit Hilfe der DNA-Analyse nach *Southern,* für die restriktionsverdaute DNA aus Blut bzw. Urin eingesetzt wurde. Der Restriktionsverdau wurde bei 37°C für 2 h mit 1-2 µg DNA durchgeführt. Nach anschließender elektrophoretischer Auftrennung der DNA im 0,8% Agarosegel für ca. 2-3 h bei 110 V wurden die DNA-Fragmente mittels 20x SSC Puffer auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Mit Hilfe der hohen Ionenstärke des Puffers sollte so der Verlust von kleinen DNA-Fragmenten vermieden werden. Die darauf folgende Hybridisierung der Nukleinsäuren wurde mit Telomeren-spezifischen Sonden, die mit Digoxigenin (DIG) markiert waren, durchgeführt. Danach erfolgte die Bindung des F_{ab} Fragment Konjugats, bestehend aus dem hochaffinen, polyklonalen Anti- Digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG-AP) und dem Enzym alkalische Phosphatase, spezifisch an die DIG markierte Sonde. Im darauf folgenden Schritt (Detektion) konnte mittels Katalyse der alkalischen Phosphatase das hinzugegebene Chemilumineszenz Substrat CDP-*Star* gespalten werden, wodurch eine Lichtemission ausgelöst wurde. Die Lichtemission wurde mit der „Intelligent Dark Box LAS-3000“ von FUJIFILMS und dem Programm LAS-3000 detektiert. Dabei betrugen die Expositionszeiten zwischen 30 sec und 60 min.

2.3.1.16 MIRECAL – “Micrococcus nuclease/*real time* PCR chromatin accessibility assay with lokus specifity”

Die Chromatinstruktur hat einen großen Einfluss auf die Gen-Transkription (Bird, 2002). Denn die chemische Modifikation der Chromatinproteine kann den Übergang von „offenem“, transkriptionsaktiven Chromatin in kondensiertes, transkriptionsinaktives Chromatin bewirken (Janning und Knust, 2004). Das „offene“

Chromatin kann mittels Histon-Demethylierung, Histon-Acetyleriung oder dem Verlust von Histonen und Heterochromatin erzielt werden. Wohingegen die DNA-/Histon-Methylierung, Histon-Deacetylierung oder die Einlagerung von Histonen und Heterochromatin-Proteinen zu einem kondensierten - und damit zu einem transkriptionsinaktiven Chromatin - führt. Somit kann nach Bestimmung der Chromatinkondensation eine Aussage über die Aktivität bzw. Inaktivität eines Promotors ermittelt werden. Eine Möglichkeit die Chromatinkompaktheit zu ermitteln stellt der MIRECAL-Assay da. Dieser wurde von PD Dr. S.Santourlidis und N. Graffmann 2006 entwickelt und stellt ein Verfahren zur Bestimmung des relativen Kondensationsunterschieds einer ausgewählten Chromatinregion zwischen mehreren Zellproben dar, die unterschiedlicher Herkunft sein können. Dabei wird mit Hilfe des *Micrococcus* Nuklease Verdaus die Zugänglichkeit des Chromatins mittels der *real time* PCR ermittelt, bei der die Normierung den kosistenten Status der Chromatinzugänglichkeit eines *housekeeping* Gens mitberücksichtigt.

Für den Assay wurden je Probe 4 Ansätze vorbereitet. Dabei wurden für jeden Ansatz 14 ml Urinprobe in ein 15 ml Falcontube pipettiert, bei 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl H_2O resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppi überführt. Anschließend wurden die Proben mit 0,6 U Mnase, 10 µl 0,1 M $CaCl_2$ sowie 10 µl 1 M Tris HCL für 0, 1, 2 und 4 min bei 37°C verdaut und die Reaktion mit 40 µl 0,1 M EGTA auf Eis gestoppt. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit der Fa. Qiagen. Dabei wurde das Probenvolumen auf 200 µl Endvolumen mit PBS aufgefüllt, die Pufferkomponenten auf das Probenvolumen angepasst und statt der Vakuumpumpe (QIAvac 24 Plus Vacuum Manifolder und QIAvac Connecting System) wurden die Zentrifguge verwendet. Die Bindung der DNA an die QIAGEN® Mini columns erfolgte wie das nachfolgende Waschen mit ACW1 für 1 min bei 6000 x g. Das Waschen mit ACW2 sowie das trocken-zentrifugieren wurde bei full speed für 1 min durchgeführt. Nach trocknen der Säulen für 10 min bei 56°C im Thermomixer konnten die Proben bei 6000 x g für 1 min eluiert und anschließend die Proben erneut reeluiert werden bei full speed für 1 min. Die Detektion der Chromatinkondensation erfolgte mit den MIRECAL-Primern mittels *real time* PCR.

2.3.2 Entparaffinierung von FFPE-Gewebestanzen

Je Probe wurden von den Kooperationspartnern 3 FFPE-Gewebestanzen mit einer Länge von 0,3 cm in einem 1,5 ml Eppi zur Verfügung gestellt. Diese konnten mit

Hilfe einer aufeinander folgenden Alkoholreihe entparaffiniert werden. Als erstes wurde 1 ml Xylol zu den Proben gegeben, 15 sec gevortext und 10 bei 37°C sowie 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g und RT konnte der Überstand abgenommen und verworfen werden. Danach wurde erneut 1 ml Xylol zu den Proben pipettiert, diese für 15 sec gevortext und erneut 10 min bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Hiernach erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 12.000 x g bei RT für 5 min mit anschließender Abnahme des Überstandes, der ebenfalls verworfen wurde. Danach wurde je Probe 1 ml EtOH (100%) hinzugegeben, diese kurz gevortext, 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Waschen mittels EtOH wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend musste nach Abnahme des Überstandes das entparaffinierte Gewebe für ca. 30 min bei RT trocknen, bis der gesamte EtOH verdampft war. Die anschließende Lyse wurde mittels des ATL-Puffers gestartet.

2.3.3 Bakterien

2.3.3.1 Ligation von DNA

Mit Hilfe der Ligation können 2 lineare DNA Fragmente miteinander verbunden werden. Dies geschieht über eine Phosphordiesterbindung, die von der T4-Ligase katalysiert wird. Dabei werden 2 Arten der Ligation unterschieden: Ligation von *„sticky end“* und die Ligation von *„blunt end“* Fragmenten. Bei der *„sticky end“* Ligation werden 2 Moleküle, die komplementäre Enden besitzen, ligiert. Im Vergleich dazu, werden bei der Ligation von *„blunt end“* Fragmenten, glatte Enden ligiert. Prinzipiell wird mittels Ligation ein definiertes DNA Fragment in einen Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers ÜN bei RT. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:1.

2.3.3.2 Transformation

Für die Transformation wurden 50 µl One Shot kompetente Zellen (TOP 10) kurz auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 µl von der Ligationreaktion direkt zu den Zellen gegeben und diese erneut für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C. Medium wurden die Zellen bei 37°C für eine 1 h bei 225 rpm inkubiert, anschließend auf LB-Amp Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Für den Erhalt einer Blau-Weiß selektion, wurden vor dem ausplattieren der Zellen die LB-Amp Platten zusätzlich mit

20 µg/ml X-Gal und 200 µM IPTG ausplattiert. Für den Farbumschlag wurden die Platten nach der Inkubation für 2-3 h bei 4°C gelagert.

2.3.3.3 Plasmid-Präparation

Mit den Kulturen, die ÜN in 2,5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angewachsen sind, wurde eine Mini-Präparation nach Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wurde das LINE-1 Retrotransposon in den Urinproben von verschiedenen Harnblasenkarzinompatienten untersucht. Dabei lag der Fokus auf dem Methylierungsstatus des LINE-1-Promotors und auf der LINE-1 Transkription. Im zweiten Abschnitt erfolgte mittels globaler und punktueller Analysen der genomweiten DNA-Methylierung die Ermittlung neuer potentieller, epigenetischer Biomarker aus Gewebe-, Blutplasma- und Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten.

3.1 Relative Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels idiolokaler Normierung (IDLN)

Die idiolokale Normierung ist ein neues Normierungsverfahren, das eine relative Quantifizierung der DNA-Methylierung in Proben mit gleicher und ungleicher genetischer Ausstattung ermöglicht. Dies ist vor allem bei Karzinomen von besonderer Bedeutung, da diese oftmals genetische Aberrationen, einschließlich der gut bekannten chromosomalen Anomalien, aufweisen. Beim Harnblasenkarzinom ist eine chromosomale Unordnung schon in den frühen Stadien (z.B. pTa, pT1) ausgeprägt (Simon et al. 1998). Aber auch fortgeschrittene Tumore (z.B. pT4) weisen chromosomale Zugewinne als auch Verluste auf. Eine konventionelle Normierung über ein *house keeping* Gen wie z.B. das *GAPDH*- oder das *ACTB*-Gen würde ggf. zu Verfälschungen führen. Denn die Messung der DNA-Methylierung, beispielsweise mittels einer methylierungsspezifischen PCR, beruht auf einer Amplifikation von DNA-Fragmenten und das Vorhandensein einer unterschiedlichen Anzahl an DNA-Fragmenten gestaltet die PCR-Effizienz auch unterschiedlich. Dagegen wird bei der IDLN der Normierungslokus stets in nächster Nähe des Ziellokus gewählt. Auf diese Weise entspricht in einer relativ quantifizierenden *real time* MSPCR die Anzahl der Normierungsloci den tatsächlich vorliegenden Zielloci. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die idiolokale Normierung, die bereits 2009 von PD Dr. Santourlidis entwickelt wurde, an Hand von Methylierungsanalysen an Harnblasenkarzinomen angewendet und weiter optimiert. Es sollte zu erst geprüft werden, inwiefern sich das neue Verfahren zur Anwendung für die Diagnostik eignet und ob sich die aus der Literatur bekannten Methylierunganalysen zur LINE-1-Methylierung mittels der IDLN bestätigen lassen. Vor den Messreihen mussten jedoch sowohl die Bedingungen zur

Lagerung der Urinproben ausgetestet, als auch die eingesetzten LINE-1 Primer optimiert werden.

3.1.1 Optimierung der Urinprobenlagerung

Um herauszufinden welche Lagerungsbedingungen einen möglichst geringen Einfluss auf die DNA-Stabilität haben, wurde sowohl der Einfluss des Enzyms Protease als auch der Effekt von unterschiedlichen Lagerungstemperaturen mit und ohne EDTA-Zusatz untersucht. Dafür wurden im ersten Versuch Urinproben mit und ohne Protease für 0, 4, 8 und 16 h bei RT inkubiert, die isolierte DNA mittels Bisulfit konvertiert und die Methylierung der LINE-1 Elemente mit der *real time* MSPCR gemessen. Das dargestellte Ergebnis in der Abb.1 zeigt, dass eine bis zu 8 Stunden lange Inkubation mit oder ohne Protease keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-Methylierung hat, womit davon ausgegangen werden kann, dass die PCR-Effizienz unter diesen Bedingungen unverändert bleibt. Erst im Zeitintervall zwischen der 8 und 16 stündigen Inkubation bei RT führt das Fehlen der Protease in den Urinproben zu einer Abnahme der PCR-Effizienz, wahrscheinlich bedingt durch DNA-Degradation und somit zur Anzeige einer verminderten DNA-Methylierung, die unter Berücksichtigung der Standardabweichung geringer als die der Ausgangsprobe (t=0h) ist.

Dagegen zeigen die Urinproben, die mit Protease für den Zeitraum von 8 bzw. 16 h bei RT inkubiert wurden, dass eine Abnahme der DNA-Methylierung als Folge der Abnahme der PCR-Effizienz mittels der Zugabe des Enzyms reduziert werden kann.

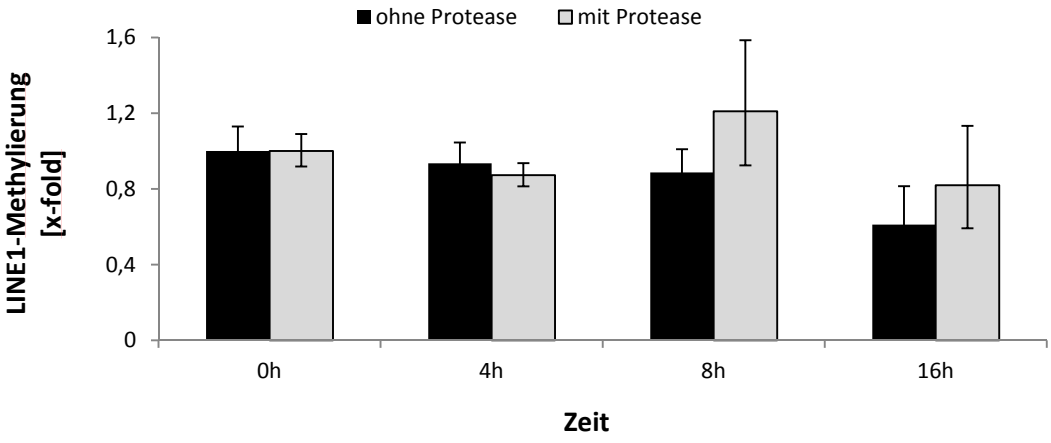


Abb. 1 Einfluss der Protease auf die Stabilität zellulärer DNA aus Urin.
1,75 ml Urin wurden ohne bzw. mit 0,15 AU Protease bei RT für 0, 4, 8 und 16 h inkubiert. Anschließend wurde die isolierte zelluläre DNA aus Urin konvertiert und die Methylierung der LINE-1 Elemente mittels der idiolokal normierten *real time* MSPCR ermittelt (x±SD).

Im zweiten Versuch wurde der Einfluss von EDTA auf die DNA-Degradation in den Urinproben bei drei verschiedenen Lagerungstemperaturen getestet. Im Hinblick auf das Marker-Screening sowie die Methylierungsanalysen der Urin-DNA mittels der *real time* MSPCR ist es von vorrangiger Bedeutung die DNA vor einer vorzeitigen Degradation zu schützen. Durch den Einsatz von Chelatbildnern wie dem EDTA, können die in den Proben enthaltenen zweiwertigen Metallkationen gebunden werden, die für die Wirkung von Nukleasen wichtig sind. Liegen diese Metallkationen im gebundenen Zustand vor, so wird die Nukleaseaktivität inhibiert und die DNA-Degradation kann verhindert werden.

Der Einfluss von EDTA ist in der Abb. 2 dargestellt. Dabei wurden die Urinproben mit bzw. ohne 40 mM EDTA für 14 Tage bei RT, 4°C und -20°C gelagert. Anschließend wurde die zelluläre, sowie die freie Urin-DNA isoliert und die DNA-Konzentration bestimmt. Die Untersuchung der Konzentration der zellulären Urin-DNA (Abb. 2 A) hat ergeben, dass die Zugabe von EDTA in den Proben, die bei RT und 4°C gelagert wurden, kaum einen Einfluss hatte. Der Vergleich beider Urinproben dagegen, die bei -20°C gelagert wurden hat ergeben, dass durch EDTA die DNA-Konzentration um 68 % höher ausfiel.

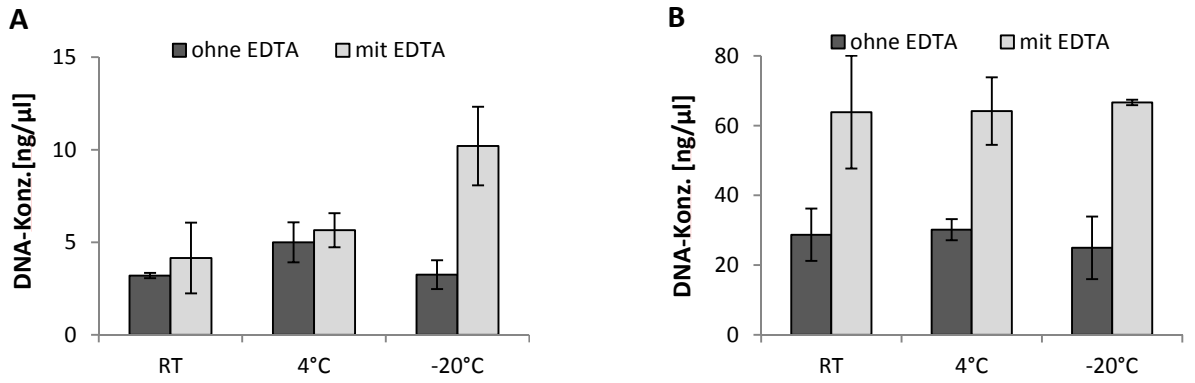


Abb. 2 Einfluss von EDTA auf die Konzentration der DNA aus Urin bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen. Urinproben wurden für 14 Tage ohne und mit 40 mM EDTA bei RT, 4°C und -20°C gelagert. Anschließend wurde die isolierte zelluläre Urin-DNA (A) und die freie Urin-DNA (B) im Spektrophotometer quantifiziert (x±SD).

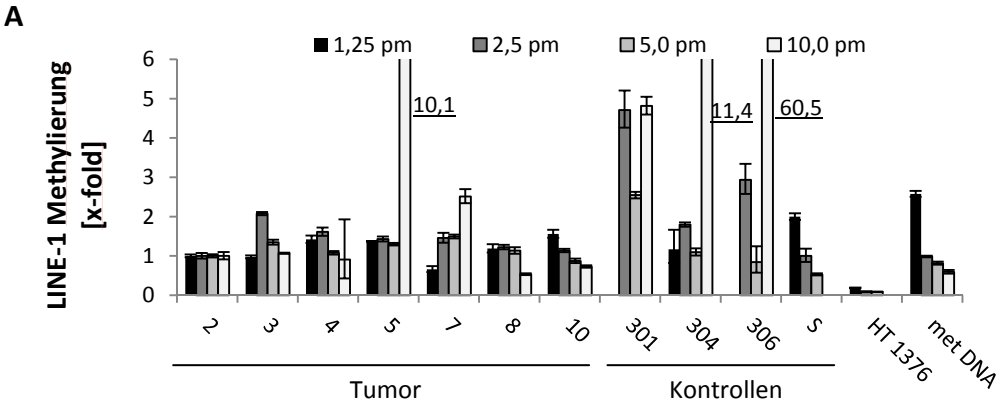
Eine erhöhte DNA-Konzentration durch EDTA konnte ebenfalls bei der Quantifizierung der freien Urin-DNA gezeigt werden. In Abb. 2 (B) ist dargestellt, wie groß der Einfluss von EDTA auf die Degradation der freien Urin-DNA ist. Während sich die DNA-Menge bei den EDTA-losen Urinproben bei allen drei Temperaturbedingungen relativ gleich niedrig verhielt, konnte im Vergleich hierzu ein Anstieg der freien DNA-Menge durch EDTA bei allen Temperaturen um mindestens 53 % erzielt werden. Bei den bei -20°C gelagerten Proben wurden sogar 62,6 %

mehr freie Urin-DNA in den EDTA-enthaltenden Proben gemessen als in den Proben ohne EDTA. Somit konnte vor allem bei der freien Urin-DNA der schützende Effekt des Chelatbildners EDTA nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Urinproben wurden von den klinischen Kooperationspartnern ohne Protease und EDTA gesammelt und gelagert, da diese nicht die Möglichkeiten besaßen die Proben mit den notwendigen Konzentrationen dieser schützenden Wirkstoffe zu versetzen. Die hier erhobenen Daten zeigen jedoch, dass zukünftig gesammelte Urinproben mit Protease und EDTA gelagert werden müssen (Beermann et al., 2011). So ist fortan der Zusatz dieser Substanzen in die Standart Operating Procedure (SOP) der Urinprobengewinnung unserer klinischen Kollaborationspartner aufgenommen.

3.1.2 Optimierung der Primerbedingungen für die LINE-1 MSPCR

Vor der ersten Messreihe der Methylierung des LINE-1 Promotors bei Harnblasenkarzinompatienten sowie gesunden Probanden, wurden die *real time* MSPCR-Bedingungen optimiert. Neben den PCR-Reagenzien und der einzusetzenden konvertierten Template-DNA-Menge wurden auch die am besten geeigneten Primerkonzentrationen ermittelt (Abb. 3). Dadurch sollte eine möglichst hohe Sensitivität als auch Spezifität der Ergebnisse erzielt werden. Abb. 3 (A) zeigt die Methylierung des LINE-1 Retrotransposon in urinärer Gesamt-DNA von Harnblasenkarzinompatienten sowie gesunden Probanden (Kontrollen) in Abhängigkeit zu der jeweiligen, eingesetzten Primerkonzentration. Darüber hinaus wurde zusätzlich die DNA-Methylierung der hypomethylierten Harnblasenzelllinie HT 1376 und einer *in vitro* methylierten Vollblut-DNA gemessen. In Abb. 3. (B) ist das Ergebnis dieser beiden Proben abgebildet.



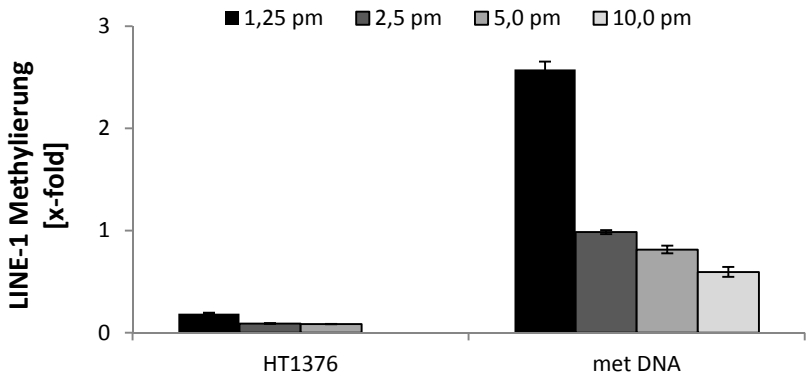


Abb. 3 LINE-1 Methylierung von Urin DNA-Proben in Abhängigkeit zu einer zunehmenden Primerkonzentration. (A) Die LINE-1-Methylierung wurde aus konvertierter Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten (2, 3, 4, 5, 7, 8, 10) und von gesunden Probanden (301, 304, 306, S) sowie (B) aus der konvertierten DNA der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 und einer *in vitro* methylierten Vollblut-DNA (met DNA) mittels der ideolokal normierten *real time* MSPCR ermittelt (x±SD). Eingesetzte Primerkonzentrationen: 1,25 pm, 2,5 pm, 5 pm und 10 pm.

Abb. 3 (A) zeigt, dass die LINE-1 Methylierung der drei Patienten 5, 304 und 306 bei der Messung mit 10 pm hoch ausgefallen ist, während sie umgekehrt in der met DNA und der HT 1376 Zelllinie die niedrigsten Werte bei dieser Primerkonzentration aufwies. In mehreren Proben, besonders ausgeprägt in den gemessennen Referenzproben (HT 1376, met DNA), zeigte sich mit abnehmender Primerkonzentration ein stetiger Anstieg der LINE-1 Methylierung (Abb. 3 B). Zukünftigen Messreihen jedoch mit 1,25 pm durchzuführen erschien ungünstig, da bei mehreren Proben die Messung ausfiel und daher angenommen werden musste, dass kleinere Pipettierungenauigkeiten zu gravierenden Fehlern, bzw. zu Mängeln in der Reproduzierbarkeit führen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Entscheidung gefällt alle zukünftigen LINE-1 Messungen mit diesen Primern mit einer Primerkonzentration von 2,5 pm durchzuführen.

3.1.3 LINE-1 Methylierung in der zellulären und freien DNA aus Urin

Nach der Optimierung der *real time* MSPCR Bedingungen wurde die LINE-1 Methylierung im Urin von Patienten mit einem fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom und von gesunden Probanden untersucht. Zusätzlich wurde auch die Methylierung des nicht autonom replizierenden Alu-Retrotransposons anhand einer kleineren Probenkohorte untersucht, da dessen Retrotranspositionsverhalten mit der Aktivierung des LINE-1 Retrotransposon zusammenhängen kann.

Die Messungen erfolgten mit der zellulären und der freien Urin DNA-Fraktion. Damit wurde eine erste Einschätzung verfolgt, welche DNA-Fraktion für die Entwicklung eines diagnostischen Biomarker-Tests mittels MSPCR ggf. zu bevorzugen ist.

3.1.3.1 Methylierung des LINE-1 Retrotransposons im Harnblasenkarzinom

Für die Untersuchung der LINE-1 Methylierung wurden je 100 ng zellulärer bzw. freier Urin-DNA mittels Bisulfit konvertiert. Die bereits vorhandenen methylierten Cytosine in der DNA sind gegen diese chemische Reaktion inert und bleiben auch nach dieser Behandlung im Gegensatz zu den nicht-methylierten Cytosinen, die zu Uracil umgewandelt werden, erhalten. Auf diesem Prinzip beruht die Unterscheidung der beiden Nukleotide. In Abb. 4 ist die LINE-1 Methylierung der zellulären Urin-DNA in verschiedenen Harnblasenkarzinomstadien (n=52) und Kontrollen (n=24) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bis auf die Ausnahmen 30, 33, 39 und 43 die Kontrollen eine deutlich höhere Methylierung als die Tumorproben aufweisen. Zusätzlich fällt auf, dass die LINE-1 Methylierung der Kontrollproben weniger stark schwankt. Außerdem konnten mehrere Karzinompatienten (z.B. 58, 60, 62, 69 und 75) mit einer besonders ausgeprägten Hypomethylierung festgestellt werden.

Um eine Aussage über die Sensitivität (Anzahl der LINE-1 hypomethylierten Tumorproben/alle Proben der Patienten, die mit einem Tumor diagnostiziert wurden) und Spezifität (Anzahl der LINE-1 nicht-hypomethylierten Proben gesunder Probanden/alle Proben der gesunden Probanden) des Tests zu bekommen, wurde der *cut off* bestimmt. Dieser wurde aus dem Mittelwert der gesunden Probanden berechnet und liegt bei 5,23 für die zelluläre Urin-DNA. Damit lagen 82,9% von den insgesamt 76 untersuchten Proben unter und 17,1% über dem *cut off.* Somit konnte in dieser ersten Messreihe eine Sensitivität von 92,3% und eine Spezifität von 37,5% detektiert werden.

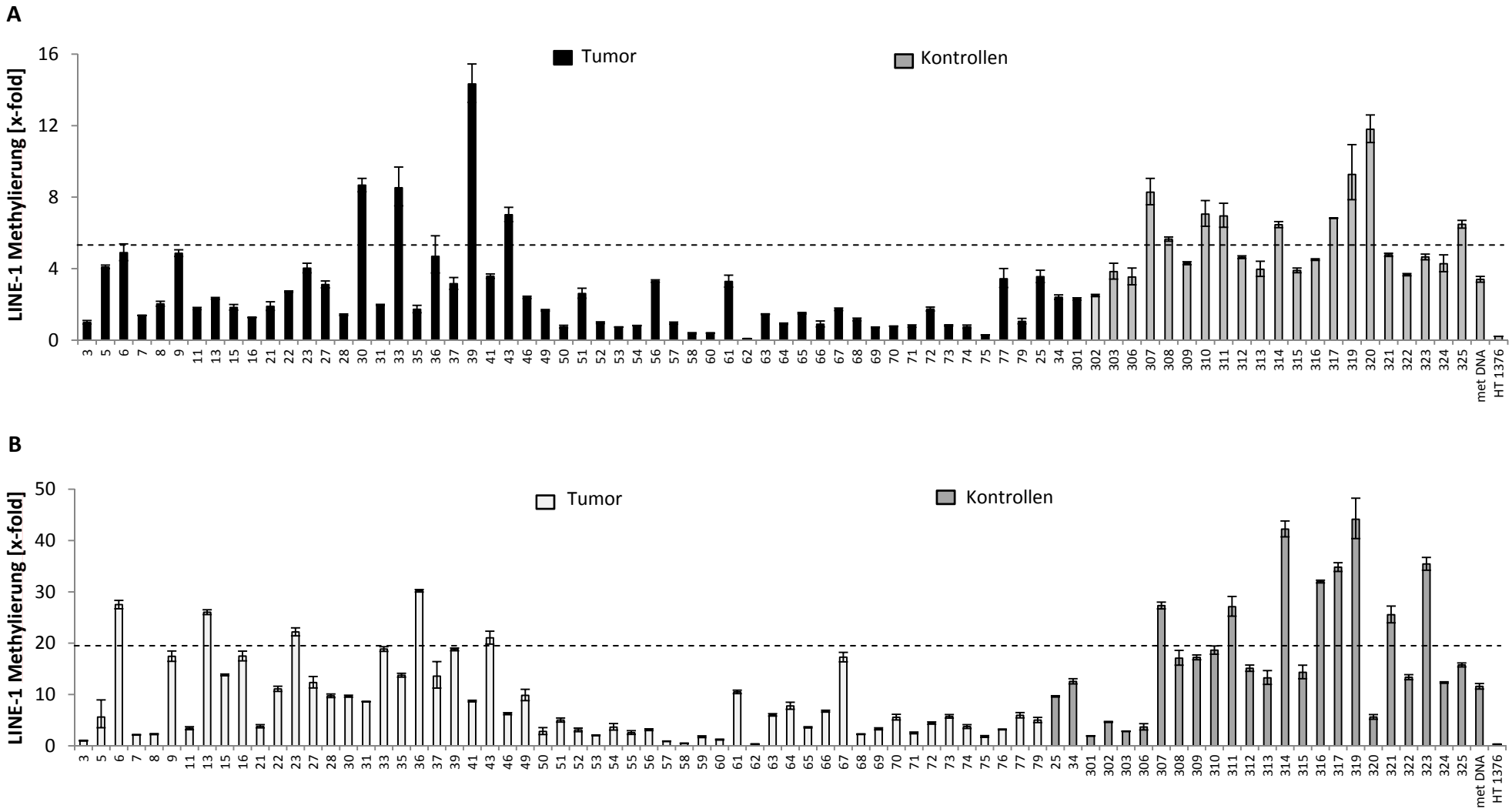


Abb. 4 Methylierung des LINE-1 Retrotransposon in zellulärer und freier Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten (Tumor) und gesunden Probanden (Kontrollen). Die LINE-1 Methylierung wurden mit konvertierter, zellulärer Urin-DNA (A) sowie konvertierter, freier Urin-DNA (B) mittels idiolokal normierter *real time* MSPCR gemessen (x±SD). Alle Proben sind in Bezug zur Probe 3 gesetzt.

Wie in der Messung der zellulären Urin-DNA konnten LINE-1 Methylierungsunterschiede auch in der freien Urin-DNA beobachtet werden (Abb. 4 B). Hier sind ebenfalls einige stark hypomethylierte Patienten (z.B. 58, 60, 62, 69 und 75) detektiert worden, deren geringe Methylierung bereits in der zellulären DNA-Fraktion zu sehen war. Zusätzlich fällt auf, dass die Methylierungsunterschiede innerhalb der Kontrollgruppe mehr schwanken, als die der zellulären Fraktion. Insgesamt jedoch ist zu erkennen, dass bis auf wenige Ausnahmen wie z.B. die Proben 6, 13, 23, 36 und 43 auch hier die Harnblasenkarzinompatienten eine niedrigere LINE-1 Methylierung im Vergleich zu den gesunden Probanden zeigten. Der *cut off* der freien Urin-DNA Fraktion lag bei 18,61. Somit befanden sich von den 76 untersuchten Proben 79 % unter und 21% über den bestimmten *cut off.* Im Vergleich zur Untersuchung der zellulären DNA-Fraktion konnte hier eine Sensitivität von 86,5 % und eine Spezifität von 37,5% ermittel werden. Das Ergebnis der Methylierungsmessung beider DNA-Fraktionen hat keinen Unterschied in der Spezifität des Tests gezeigt. Es wurde jedoch eine geringe Differenz zwischen der Sensitivität der zellulären und der freien DNA beobachtet. Diese ist mit 5,8 % in der zellulären Fraktion höher ausgefallen.

Mit Hilfe einer weiteren statistischen Auswertung, in der eine Unterteilung in frühe (pTa, pT1, pT2) und fortgeschrittene (pT3, pT4) Harnblasenkarzinome gewählt wurde, konnte ein signifikanter Unterschied der LINE-1 Hypomethylierung zwischen den frühen Karzinomen und den Kontrollen, sowie zwischen den fortgeschrittenen Karzinomen und den Kontrollen der zellulären Urin-DNA festgestellt werden (Abb. 5 A).

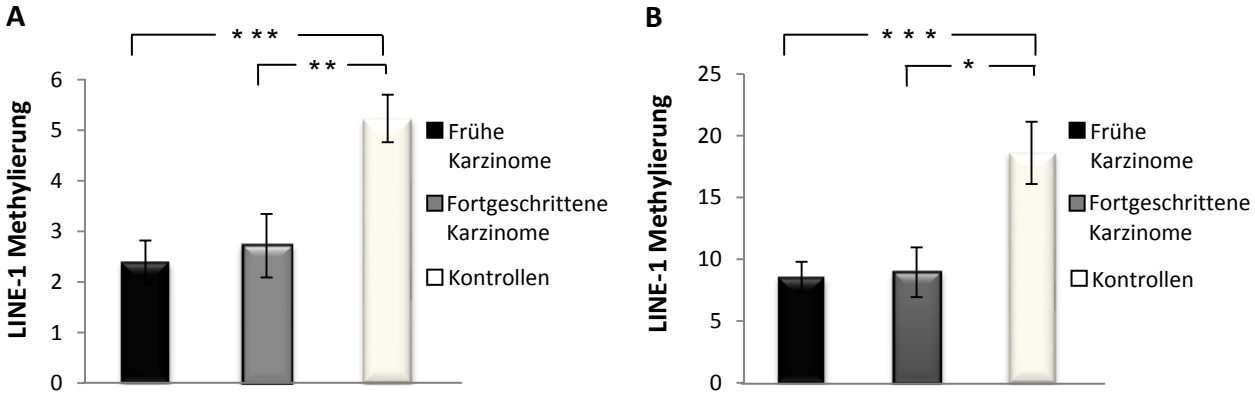


Abb. 5 Statistische Analyse der LINE-1 Methylierung in zellulärer (A) und freier (B) Urin-DNA in den Proben von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden. Frühe (n=39) und fortgeschrittene (n=13) Harnblasenkarzinome wurden mit den Kontrollen (n=24) verglichen (x±SEM, *** p<0,001, ** p <0,01, * p<0,05, signifikant gegen die Kontrollen).

Ein ähnliches Ergebnis ergab die Analyse der freien Urin-DNA (Abb. 5 B). Hier konnte ebenfalls die oben beschriebenen signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

3.1.3.2 Methylierung des Alu-Retrotransposon im Harnblasenkarzinom

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen dem DNA-Methylierungsstatus der nicht autonom replizierenden Alu-Elemente und dem der LINE-1 Retrotransposons in Urin-DNA besteht, wurde an einer kleineren Probengruppe (n=19), bestehend aus verschiedenen Harnblasenkarzinomproben und Kontrollen, die Alu-Methylierung gemessen. Hierfür wurde ebenfalls konvertierte, zelluläre Urin-DNA eingesetzt und die Alu Methylierung mittels MSPCR gemessen. In Abb. 6 ist die Alu-Methylierung der zellulären Urin-DNA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle untersuchten Proben der Tumorpatienten und der gesunden Probanden (Kontrollen), bis auf die Proben 17,18,20,31,12 und 322, nur einen geringfügigen Unterschied in der Alu Methylierung zeigen. Lediglich die Tumorproben 17, 18 und 20 weisen eine Hypomethylierung des Alu Elements auf, während die Proben 31,12 und 322 eine Alu Hypermethylierung erkennen lassen.

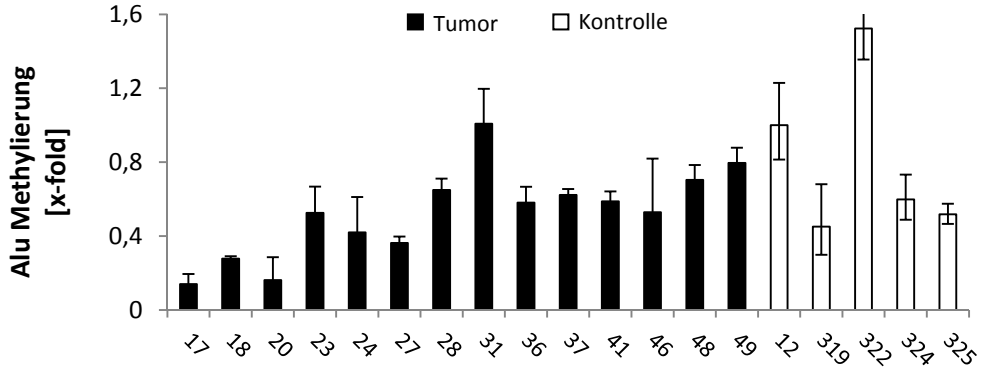


Abb. 6 Methylierung des Alu-Retrotransposons in zellulärer Urin-DNA in Harnblasenkarzinompatienten (Tumor) und gesunden Probanden (Kontrollen). Die Alu Methylierung wurde mit konvertierter, zellulärer Urin-DNA mittels idiolokal normierter *real time* MSPCR ermittelt (x±SD). Alle Proben in Bezug zur Probe 17 gesetzt.

In Abb. 7 ist die LINE-1 Methylierung der zellulären DNA der gleichen Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden dargestellt, bei denen zuvor die Methylierung des Alu Elements bestimmt wurde. Im Vergleich zu der Alu-Methylierungsuntersuchung zeigt die zelluläre Urin-DNA eine höhere LINE-1 Methylierung. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass unter Vernachlässigung der hypermethylierten Tumorproben 17, 20 und 24, nur eine geringfügig niedrigere LINE-1 Methylierung im Bezug zu den Kontrollproben vorliegt.

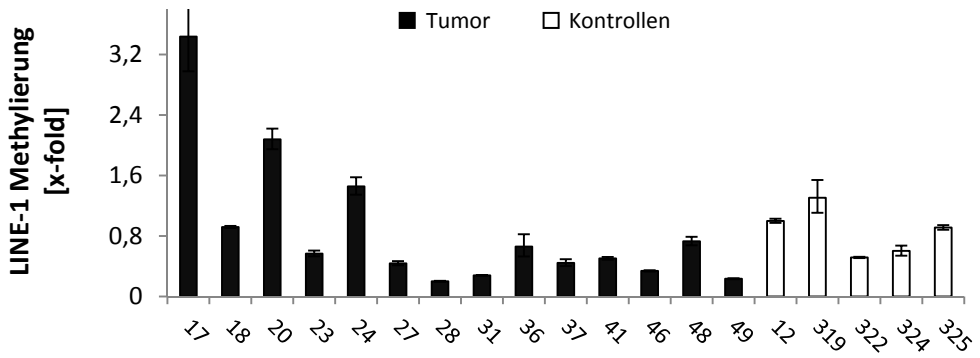


Abb. 7 Methylierung des LINE-1 Retrotransposons in zellulärer Urin-DNA in Harnblasenkarzinompatienten (Tumor) und gesunden Probanden (Kontrollen). Die LINE-1 Methylierung wurde mit konvertierter, zellulärer Urin-DNA mittels idiolokal normierter *real time* MSPCR ermittelt (x±SD). Alle Proben in Bezug zur Probe 17 gesetzt.

Der Vergleich des DNA-Methylierungsstatus zwischen dem Alu- und dem LINE-1 Element in der zellulären Urin-DNA lässt einen Zusammenhang zwischen dem nicht autonomen replizierenden Alu Element und dem LINE-1 Retrotransposon erkennen. Der Vergleich des DNA-Methylierungsstatus zeigt, dass sich die Methylierung der beiden Retrotransposons in mehreren Proben auffällig reziprok zu einander verhält. Besonders deutlich ist der reziproke Methylierungsunterschied in den Tumorproben 17,18,20,23,24,27,28,31,49 und der Kontrollprobe 322 zu sehen. So konnte in den Probe 17,20 und 24 eine erhöhte LINE-1 Methylierung gemessen werden, wohingegen die Alu Methylierung deutlich geringer ausfiel. Alle anderen Proben zeigen im Vergleich dazu eine geringe LINE-1 Methylierung, jedoch eine deutlich höhere Alu Methylierung.

3.1.3.3 Methylierungsanalysen des LINE-1 Promotors mittels Bisulfit-Sequenzierung

Mit Hilfe der Detailanalyse eines 436 bp großen LINE-1 Promotorfragmentes (Abb. 8) sollte die zuvor in der *real time* MSPCR ermittelte Methylierung der zellulären sowie freien Urin-DNA in den Harnblasenkarzinom- und den Kontrollproben mittels einer zweiten, unabhängigen Methode im Detail untersucht werden. Dafür wurden Klone mit Bisulfit-konvertierter DNA erzeugt, die nach der Plasmid-DNA Isolation sequenziert worden sind. Je Probe wurden 18-31 Sequenzen untersucht. Abb. 9 (A) zeigt die Sequenzanalysen der stark hypomethylierten Harnblasenzelllinie HT 1376. Hier konnte nur in 4 von insgesamt 31 analysierten Sequenzen eine Methylierung an den CpG –Positionen des Promotors detektiert werden.

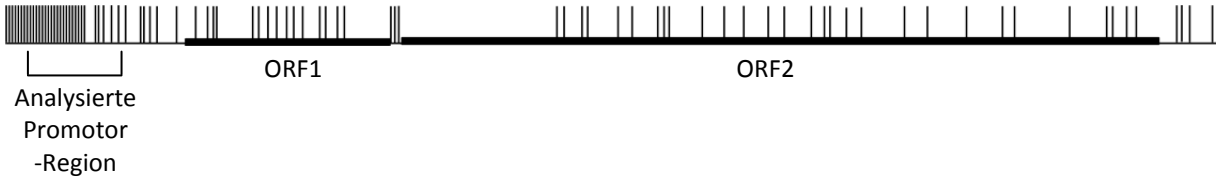
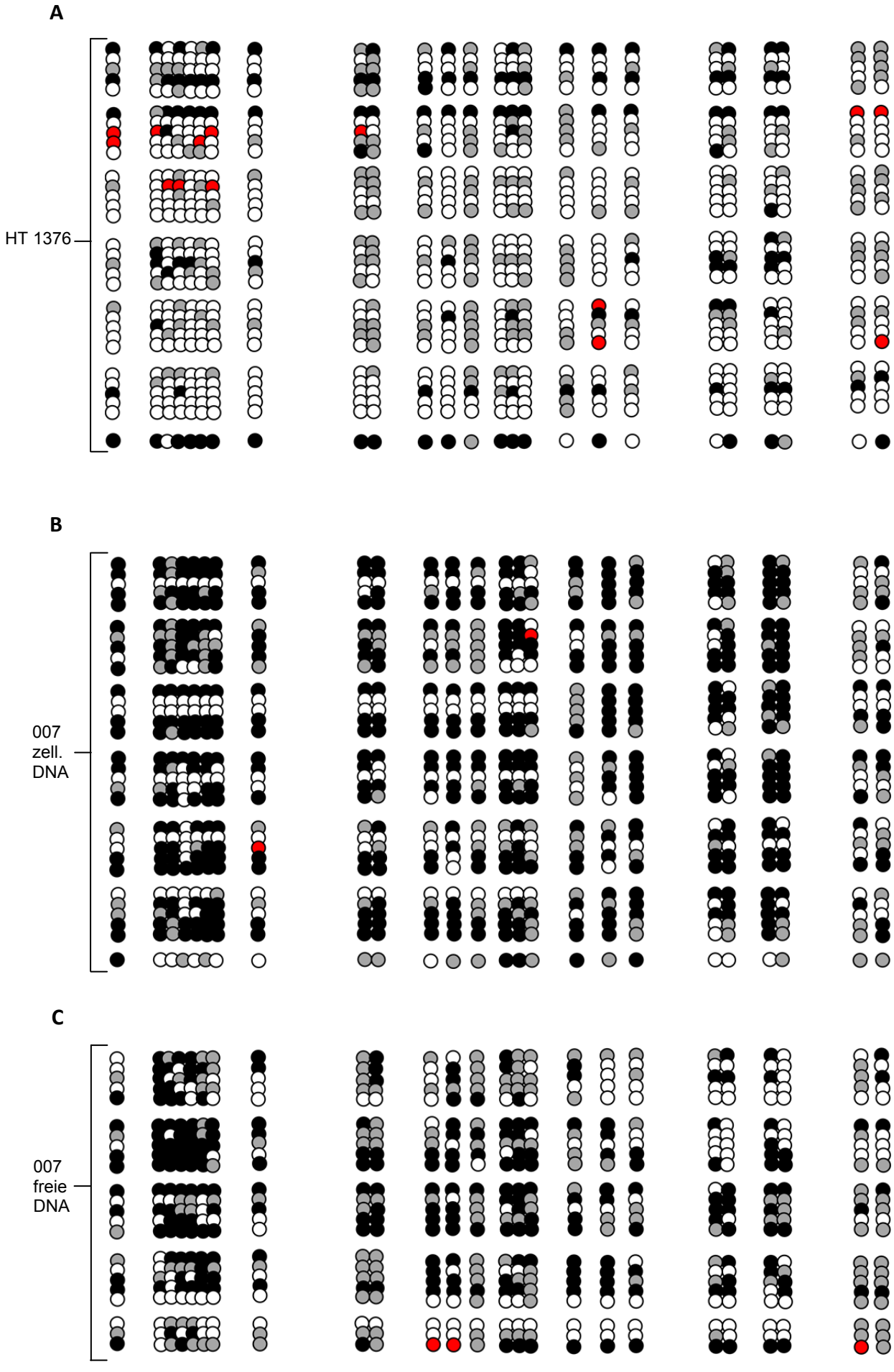
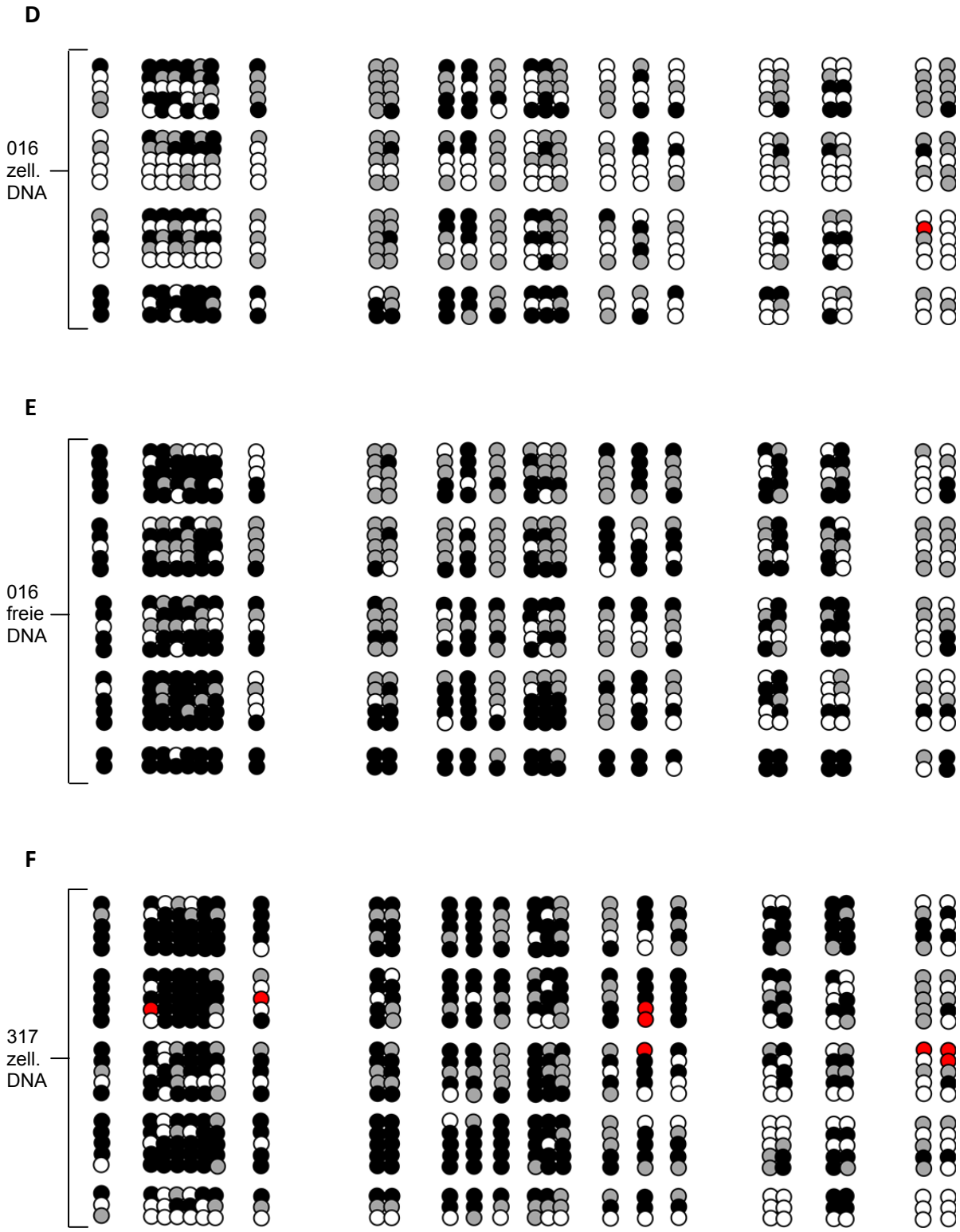


Abb. 8 Genomische Organisation eines full length LINE-1 Elements. Darstellung eines full length LINE-1 Elements mit seinen zwei offenen Leserastern ORF1 und ORF2 (open reading frame) und der analysierten, 436 bp großen Promotorregion. Die kurzen vertikalen Linien zeigen die Verteilung der differenziell methylierbaren CpG-Positionen an.

Im Vergleich zu der Zelllinien-DNA lagen in den untersuchten Sequenzen der Harnblasenkarzinompatienten 007 und 016 sowie die des gesunden Probanden mehr methylierte CpG-Positionen vor. Allerdings erscheint die Methylierung der CpGs des LINE-1 Promotors in beiden DNA-Fraktionen der Probe 007 (Abb. 9 B-C) relativ hoch. Auffällig ist jedoch, dass in der Analyse der zellulären Fraktion 7 Sequenzen ermittelt werden konnten, bei denen über 60 % der CpGs unmethyliert vorlagen. In der freien DNA konnten dagegen zwei fast komplett unmethylierte Sequenzen beobachtet werden.

Die Untersuchung, ob es sich bei den unmethylierten Sequenzen um ein *full length* LINE-Element handelt hat ergeben, dass sowohl in der zellulären (Sequenz Nr. 13) als auch in der freien DNA (Sequenz Nr. 20-22) die gefundenen unmethylierten LINE-1 Sequenzen zu 97-99,4 % identisch mit den *full length* LINE Elementen sind, deren Sequenzen uns freundlicher Weise von Dr. Goodier (Kazazian Lab, Johns Hopkins university school of Medicine) zur Verfügung gestellt worden sind. Die Untersuchung der DNA-Fraktionen des Patienten 016 (Abb. 9 D-E) hat gezeigt, dass der LINE-1 Promotor der freien Urin-DNA eine höhere Methylierung aufweist als der der zellulären DNA. Es konnten sogar 3 komplett hypomethylierte Sequenzen in der zellulären Fraktion beobachtet werden, von denen eine (Sequenz Nr.10) ebenfalls zu 98,3 % sequenzidentisch zu einem *full length* LINE Element ist. Im Vergleich zur Probe 016 konnte in der Urin-DNA des gesunden Probanden 317 (Abb. 9 F-G) eine etwas höhere Methylierung der CpGs in der zellulären, als in der freien DNA-Fraktion festgestellt werden. Jedoch wurde auch in der zellulären DNA eine komplett unmethylierte Sequenz (Sequenz Nr. 23) ermittelt, welche zu 98 % einem *full length* LINE Element entsprach.


A
HT 1376
B
007
zell.
DNA
C
007
freie
DNA


D
016
zell.
DNA
E
016
freie
DNA
F
317
zell.
DNA

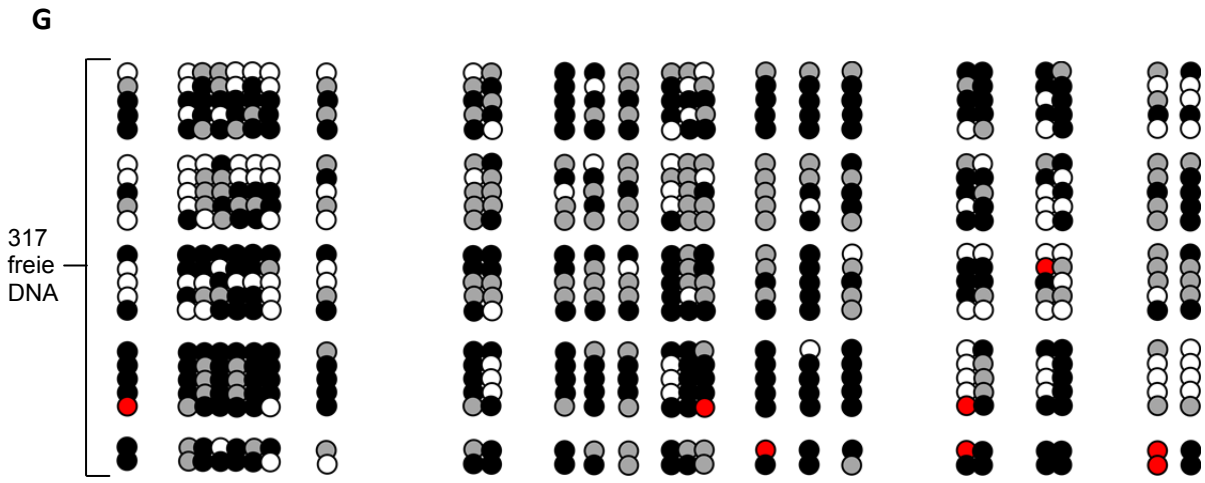


Abb. 9 Detailanalyse der Methylierung der CpG-Positionen eines 436 bp großen LINE-1 Promotorfragmentes aus Urin-DNA. Für die Analyse wurde die zelluläre und die freie Urin-DNA aus Harnblasenkarzinompatienten, gesunden Probanden, sowie die DNA der Zelllinie HT 1376 konvertiert, kloniert und sequenziert. (A) Methylierungsanalyse von HT 1376, (B-E) zelluläre und freie Urin-DNA aus den Harnblasenkarzinompatienten 007 und 016, (F-G) zelluläre und freie Urin-DNA des gesunden Probanden 317. ●=methylierte CpG-Position, ○= unmethylierte CpG-Position, ●=anderes Nukleotid an der CpG-Position, ●= Nukleotid nicht bestimmbar.

Aufgrund dieser Sequenzierungsdaten konnte die repräsentative Häufigkeit der Methylierung an jeder einzelnen CpG-Position bestimmt werden. Abb. 10 fasst die erhobenen Daten übersichtlich in Form von Balkendiagrammen zusammen, wobei jeder einzelne Balken die Anzahl der an dieser Position methylierten Sequenzen in Prozent wiedergibt. In den zellulären Urin-DNA Fraktionen des Harnblasenkarzinompatienten 007 (Abb. 10 A) und des gesunden Probanden 317 (Abb. 10 C) konnten häufiger methylierte CpGs beobachtet werden als in der freien DNA.

Der Patient 016 (Abb. 10 B) zeigte ein umgekehrtes Ergebnis. Hier wurde in der freien Urin-DNA eine stärkere Methylierung der CpG-Positionen festgestellt.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die CpG-Positionen -6, -7, -11, -14, -15, -18, -21, -22 und -23 im Vergleich zu den übrigen CpGs stärker demethyliert vorliegen.

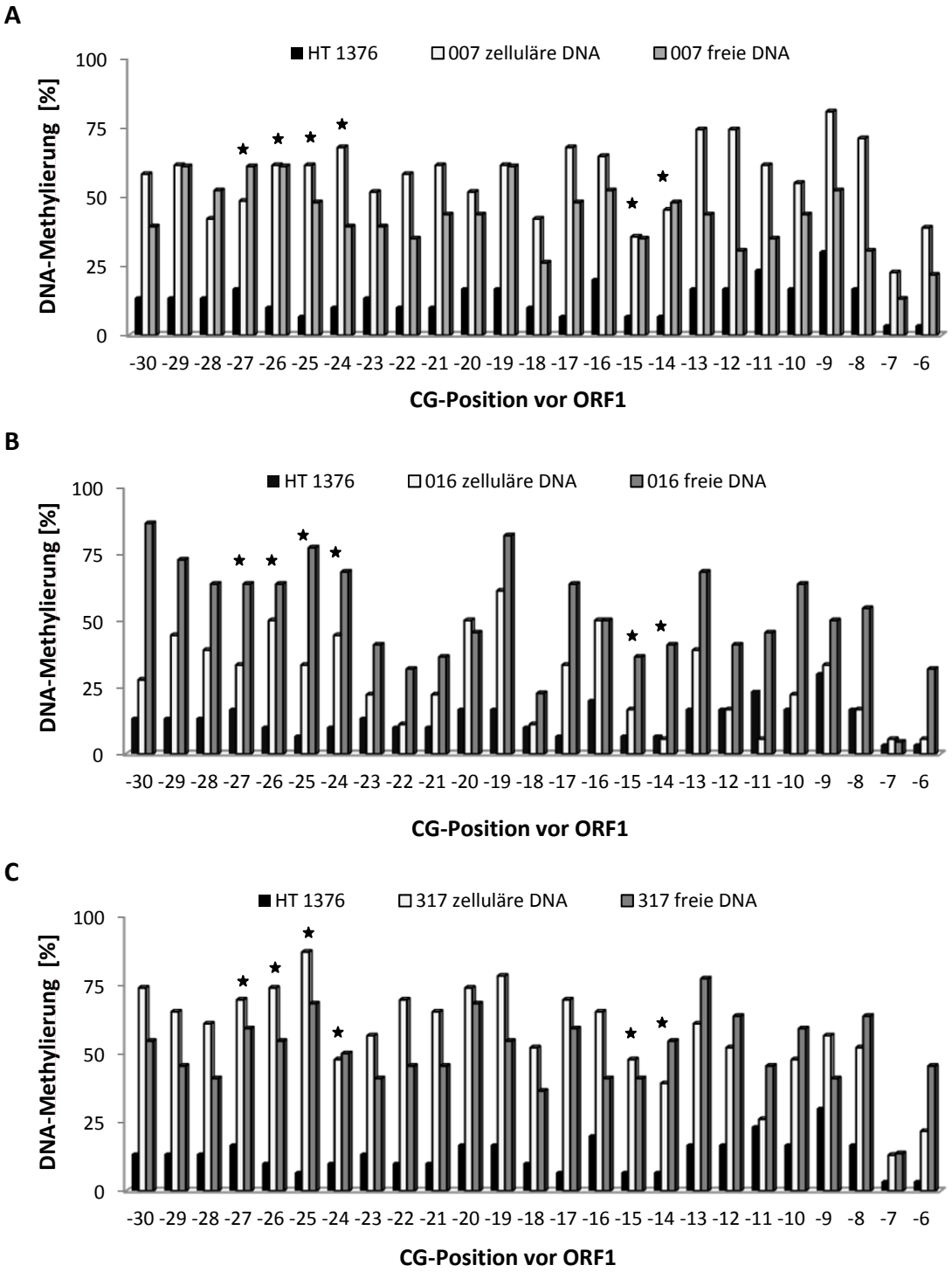


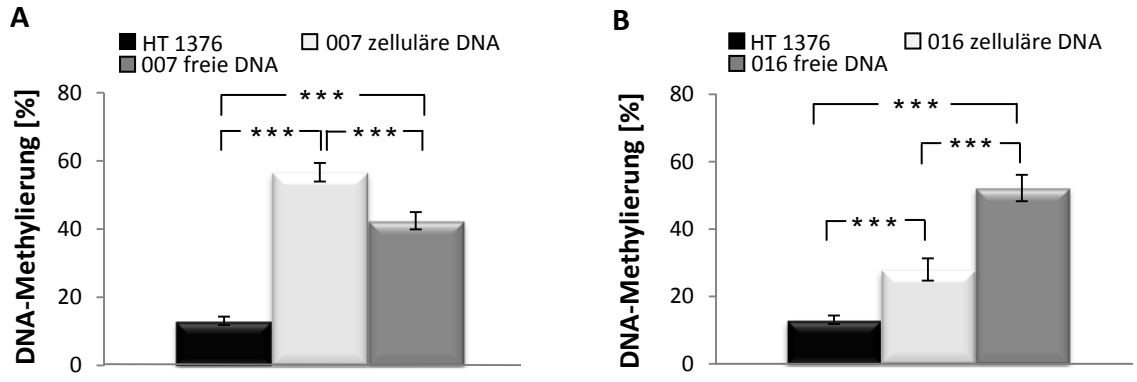
Abb. 10 Detailanalyse der differentiell methylierbaren CpG-Positionen des 436 bp großen LINE-1 Promotors aus Urin-DNA. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit der methylierten CpG-Positionen, wie sie nach einer repräsentativen Sequenzanalyse der zellulären und der freien Urin-DNA aus Harnblasenkarzinompatienten, einen gesunden Probanden, sowie der DNA der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 ermittelt werden konnte. Jede Diagrammsäule zeigt die prozentuale Häufigkeit der methylierten CpGs an. Die Ziffern unterhalb der Balken beziehen sich auf die Position der jeweiligen CpGs relativ zu dem ersten ATG des ersten offenen Leserasters (ORF1). Die schwarzen Sterne markieren die Primerpositionen, welche für die Ermittlung der DNA-Methylierung mittels der *real time* MSPCR verwendet wurden. (A) Analyse der zellulären und freien Urin-DNA des Harnblasenkarzinompatienten 007 (TaG3), (B) Analyse des Harnblasenkarzinompatienten 016 (TaHG) und (C) des gesunden Probanden 317.

In Abb. 11 sind weitere statistische Analysen dieser Sequenzierungsergebnisse dargestellt. Es wurden jeweils beide DNA-Fraktionen gegeneinander sowie gegen die Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 auf Unterschiede geprüft.

Das Ergebnis zeigt, dass sowohl bei dem Patienten 007 (Abb. 11 A) als auch bei dem Patienten 016 (Abb. 11 B) alle DNA-Proben signifikante Unterschiede in der LINE-1 Methylierung aufweisen. Im Unterschied dazu ist in der Kontrolle 317 zwar ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 und der zellulären bzw. der freien Urin-DNA ermittelt worden, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Urin-DNA Fraktionen.

Der Vergleich der statistischen Analysen der Tumorproben 007 (T2bG3) und 016 (TaHG) zeigt zusätzlich, dass sich die Methylierung der beiden urinären DNA-Fraktionen zwischen den beiden Proben reziprok verhält. So weist die zelluläre DNA des Patienten 007, der einen Muskel infiltrierenden Tumor besitzt, eine etwas höhere LINE-1 Methylierung auf, als die freie Urin-DNA. Wohingegen die Methylierung der freien DNA des Patienten 016, der an einen nichtinvasiven papillären Tumor erkrankt ist, fast doppelt so hoch ausfällt. Damit zeigt die zelluläre Urin-DNA der Probe 016 zusammen mit der DNA der Zelllinie HT1376 eine hohe Hypomethylierung des LINE-1 Promotors.

Zwischen den urinären DNA-Fraktionen der Kontrollprobe 317 ist kein wesentlicher Methylierungsunterschied zu erkennen.



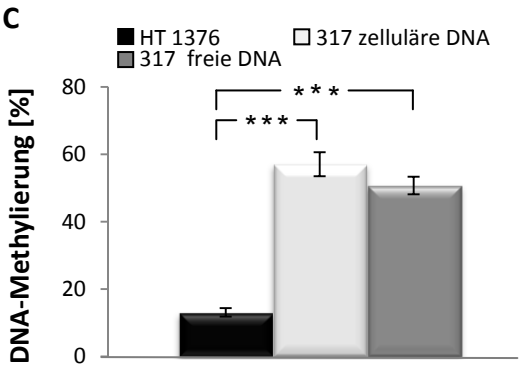


Abb. 11 Statistische Analyse der methylierten CpG-Positionen des 436 bp großen LINE-1 Promotorfragmentes aus Urin-DNA. Gezeigt ist der prozentuale Mittelwert der untersuchten 25 differentiell methylierten CpG-Positionen des LINE-1 Promotors, wie sie nach einer repräsentativen Sequenzanalyse der zellulären und freien DNA aus Urin von Harnblasenkarzinompatienten, eines gesunden Probanden, sowie der DNA der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 bestimmt werden konnten. (A) Vergleichsanalyse der zellulären und freien Urin-DNA des Harnblasenkarzinompatienten 007 gegen die Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 (n=25, x±SEM, ***p<0,001 signifikant gegen jeweilige Probe). (B) Vergleichsanalyse der zellulären und freien Urin-DNA des Harnblasenkarzinompatienten 016 gegen die Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 (n=25, x±SEM, ***p<0,001 signifikant gegen jeweilige Probe). (C) Vergleichsanalyse der zellulären und freien Urin-DNA des gesunden Probanden 317 gegen die Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 (n=25, x±SEM, ***p<0,001 signifikant gegen HT 1376).

3.1.3.4 LINE-1 Transkripte im Urin von Harnblasenkarzinompatienten

Im nächsten Experiment wurde die Transkription der LINE-1 Elemente in den Urin-Proben untersucht. Dafür wurde Gesamt-RNA aus Urinproben von frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien sowie gesunden Probanden verwendet.

Für einen weiteren Nachweis der intakten Urin-RNA wurde zusätzlich zu der LINE-1 Transkription auch die Transkription von zwei weiteren Genen, *BimEL* und *BCL-XL*, ermittelt. *BimEL* und *BCL-XL* gehören zu der BCl-2 Familie, die eine wichtige Rolle in der mitochondrial vermittelten Apoptose spielen und u.a. über die FOXO Transkriptionsfaktoren reguliert werden können. Während BimEL ein pro-apoptotisches Protein ist, gehört BCL-XL zu den anti-apoptotischen Proteinen der BCl-2 Familie.

Die Abb. 12 zeigt die LINE-1 Transkription in frühen und späten Karzinomstadien sowie gesunden Probanden. In (A) ist der Amplifikations-Plot und in (B) die gemittelten C_T-Werte der *real time* PCR Messung abgebildet. Eine vollständige Analyse mittels der relativen Quantifizierung unter Berücksichtigung der Aspekte der idiololaken Normierung (IDLN) war nicht möglich, da keine C_T-Werte mit den LINE-1 Normierungsprimer ermittelt werden konnten, welche hierfür von den C_T-Werten der Zielamplifikationen subtrahiert werden. Ohne IDLN weisen die Tumorproben sowie

die Kontrollen nur geringe Transkriptionsunterschiede innerhalb aller Tumorproben, als auch zwischen den jeweiligen Probengruppen auf (Abb. 12 B).

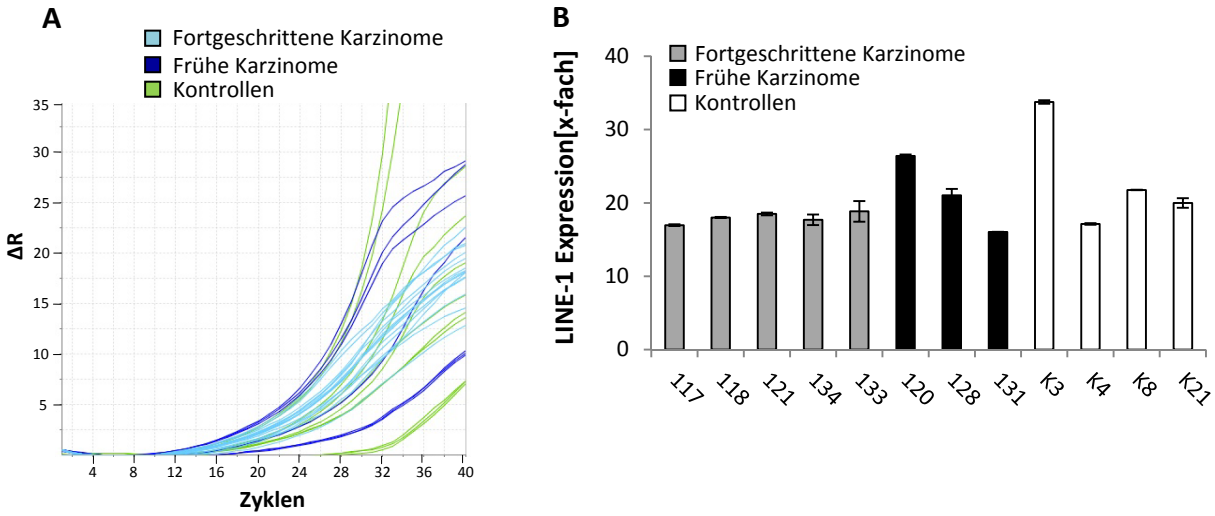


Abb. 12 Transkription von LINE-1 in Urin-DNA Proben.
(A) Die LINE-1 Transkription wurde mittels der *real time* PCR gemessen. (B) Darstellung der C_T-Werte in Form eines Balkendiagramms (n=3, x±SD).

Mit dem Ziel einen geeigneten Normierungsfaktor auszuwählen wurden weitere *housekeeping* Gene getestet. Dabei ist es zwar gelungen *Beta-Aktin* Transkription im Urin im Agarosegel nachzuweisen, jedoch lieferten die dazugehörenden *real time* PCRs keine reproduzierbaren Resultate (Abb. 13 A). Dies war ebenfalls für die Transkription von *BCL-XL* sowie von *BimEL* der Fall. Auch diese konnten nur mittels Auftragung auf ein Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Abb. 13 (A) zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten Produkte der *Beta-Aktin, LINE-1, BCL-XL* und *BimEL* Transkripte. Es ist zu erkennen, dass in der Harnblasenkarzinomzelllinie HT1376 alle vier Transkripte am stärksten exprimiert werden. Darüber hinaus konnten im Vergleich zu *BCL-XL* bzw. *BimEL* die *LINE-1*- und *Beta-Aktin* Transkripte in allen Tumorproben wie auch in den Kontrollen detektiert werden, jedoch mit variierender Intensität. So erscheinen die Banden der *LINE-1*- und *Beta-Aktin* PCR-Produkte der Kontrollen weniger intensiv, als die der Tumorproben. *BCL-XL* Transkription konnte nur in den späten Stadien der Proben 117 und 134, sowie in dem Frühstadium des Patienten 131 detektiert werden. *BimEL* Transkription wurde ebenfalls in denselben fortgeschrittenen Tumorproben beobachtet, sowie in der Kontrollprobe K8. Die densitometrische Auswertung der *LINE-1* Transkription (normiert auf *Beta-Aktin*) ist in Abb. 13 B dargestellt.

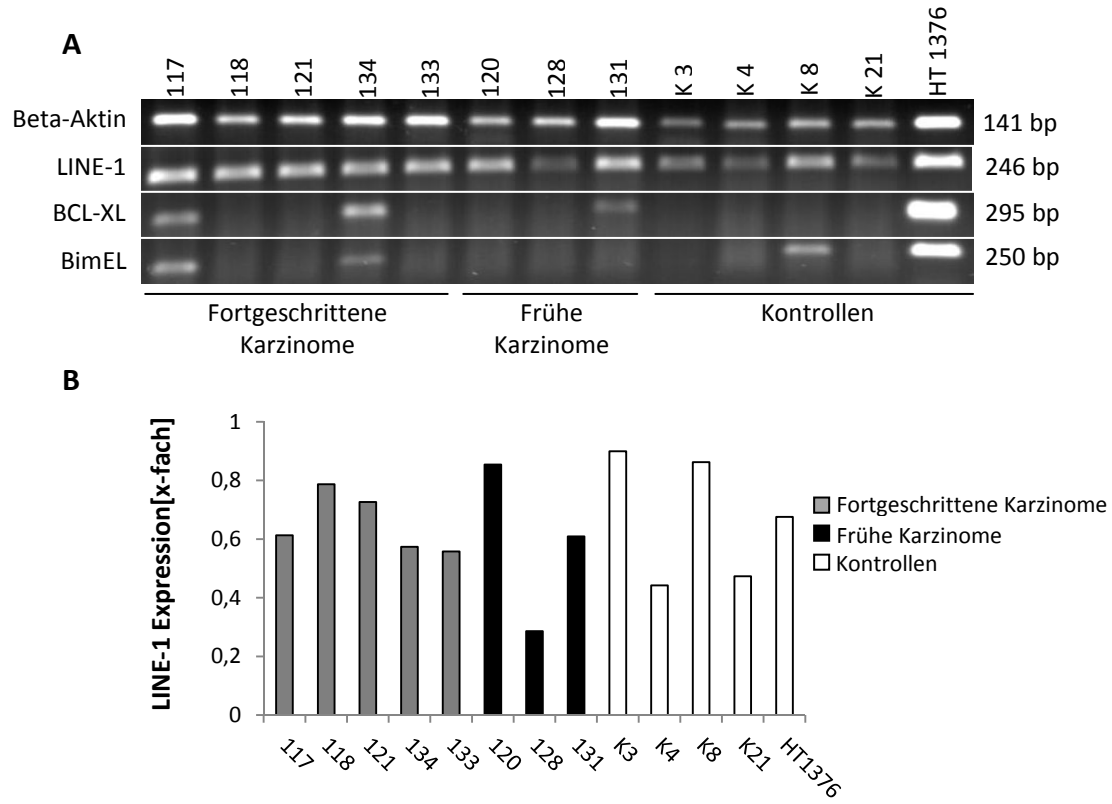


Abb. 13 Transkription von *LINE-1, BCL-XL* und *BimEL* aus urinärer Gesamt-RNA der 1. Probenkohorte. LINE-1-, BCL-XL- und BimEL-Transkription wurden mittels konventioneller PCR ermittelt (A). (B) Densitometrische Auswertung der LINE-1 Transkription in fortgeschrittenen-, frühen Tumoren, sowie Proben von gesunden Probanden (Kontrollen). Als Kontrolle diente Beta-Aktin.

Es ist zu sehen, dass durch die Normierung auf *Beta-Aktin* HT 1376 nicht mehr die höchste *LINE-1* Transkription aufweist, sondern die Probe 120 (frühes Karzinom) und die Proben der gesunden Probanden K3 und K8. Die Probe 128 dagegen zeigt die niedrigste Transkription, was bereits im Gel beobachtet werden konnte. Insgesamt ist deutlich, dass während die fortgeschrittenen Karzinome relativ gleich starke Transkription zeigen, die frühen Stadien und Kontrollen größere Transkriptions-Unterschiede aufweisen. Aufgrund der Variabilität der *Beta-Aktin* Transkription innerhalb der Proben, die in Abb. 13 (A) zu sehen sind, stellt *Beta-Aktin* keinen geeigneten Normierungsmarker dar. Daher wurde im darauffolgenden Experiment mittels einer erstellten Standardkurve die absolute Quantifizierung der *LINE-1* Transkription gewählt. Diese wurde auf der Basis einer Verdünnungsreihe eines klonierten Plasmids, das ein *LINE-1 Template*-Fragment beinhaltete, durchgeführt. Das Ergebnis der absoluten Quantifizierung ist in Abb. 14 dargestellt.

Es veranschaulicht, dass die *LINE-1* Transkription in der Probe 117 aus der Gruppe der fortgeschrittenen Karzinome, der Probe 131 der frühen Tumoren, sowie die Kontrollprobe K4 insgesamt am höchsten ausgefallen ist. Im Vergleich zu der *LINE-1*

Transkription die in den späten Blasentumorproben detektiert worden ist, zeigen alle übrigen Proben der beiden anderen untersuchten Gruppen (unter Vernachlässigung der Proben 131 und K4) eine vielfach niedrigere *LINE-1* Kopienzahl und damit geringere *LINE-1* Transkription, als die fortgeschrittenen Karzinome. So beträgt z.B. die Differenz der *LINE-1* Transkription zwischen der Probe 133 (fortgeschrittene Tumore) und 128 (frühe Tumore) ca. 76,4 %.

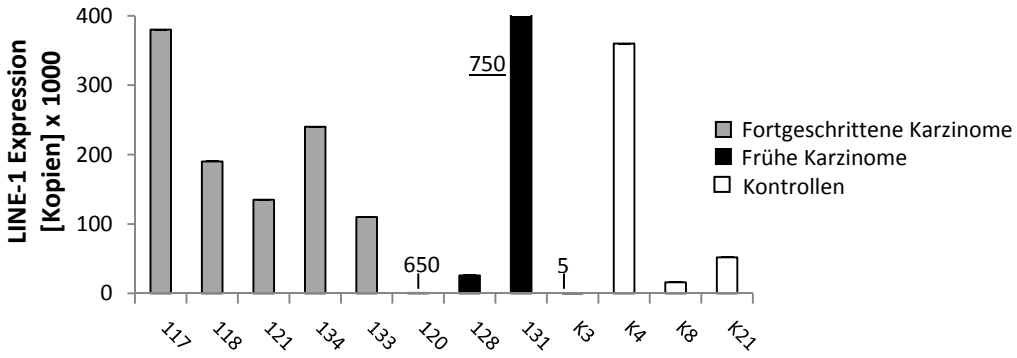


Abb. 14 LINE-1 Transkription mittels absoluter Quantifizierung in der 1. Probenkohorte.
LINE-1 Transkription in der urinären Gesamt-RNA aus fortgeschrittenen und frühen Tumoren, sowie gesunden Probanden (Kontrollen) die mittels der *realtime* PCR gemessen wurde (x±SD).

Auf der Basis dieses Ergebnisses wurde die Hypothese entwickelt, dass die Kombination beider Methoden, die Messung der *LINE-1* Transkription (Kopienzahl) und die der LINE-1 Methylierung einen neuen, ggf. aussagekräftigen, tumorassoziierten Parameter darstellen könnte. Daher wurde im nächsten Schritt die LINE-1 Methylierung derselben Tumor- und Kontrollproben gemessen (Abb.15).

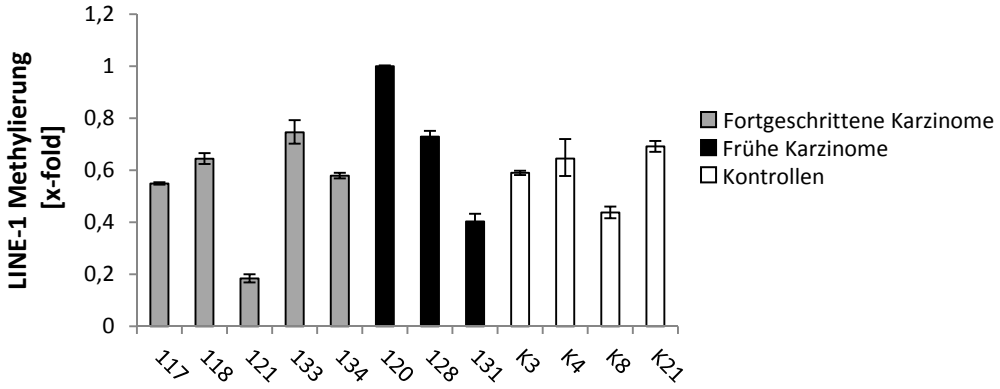


Abb. 15 LINE-1 Methylierung in Gesamt-DNA aus Urin von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden (Kontrollen) der 1. Probenkohorte. Die LINE-1 Methylierung wurden mit konvertierter Urin-DNA mittels der real time MSPCR ermittelt (x±SD).

Hier ist zu erkennen, dass bis auf die Proben 121, 120 und 131 die LINE-1-Methylierung bei allen drei Gruppen relativ gleich ausgefallen ist. Die niedrigste Methylierung konnte bei dem Patienten 121 aus dem Stadium der späten Karzinome beobachtet werden, während die stärkste Hypermethylierung in der frühen Tumorprobe 120 ermittelt werden konnte. Eine inverse Korrelation zwischen der *LINE-1* Transkription und - Methylierung ist stellenweise, z.B. in den frühen Karzinomproben, zu erkennen.

Im nächsten Schritt wurde der Quotient aus den ΔΔCT-Werten der LINE-1 Methylierung und der Kopienzahl der *LINE-1* Transkription berechnet und zur besseren Darstellung mit x 10^7 multipliziert. Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle fortgeschrittenen Karzinome niedrige Werte im Vergleich zu den anderen Probenkohorten aufweisen. In der Fraktion der frühen Tumore sowie der gesunden Probanden zeigten nur zwei weitere Proben (131 und K4) ein ähnliches Ergebnis, während alle weiteren Patientenproben wesentlich höhere Resultate erzielten. Somit konnte bei den Tumoren des frühen Stadiums, bei Vernachlässigung der Probe 131, ein mind. 5,3 fach höherer Wert beobachtet werden (Referenzprobe 128), als in den späten Karzinomen (Referenzprobe 133). Der Vergleich der Probe 133 der fortgeschrittenen Karzinome zu den Kontrollen (Referenzprobe K21) ergab eine Differenz um mind. das 2,5 fache (unter Vernachlässigung der Proben 131 und K4).

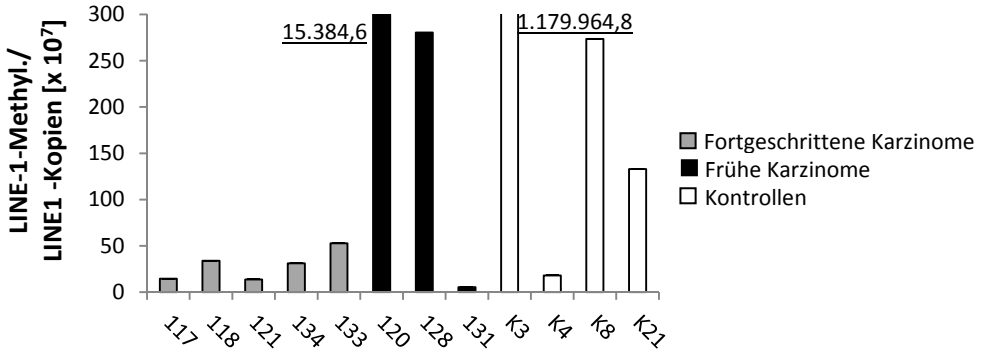


Abb. 16 Quotient aus der LINE-1 Methylierung und LINE-1 Transkription der Probenkohorte 1. Gezeigt ist der Quotient aus den ΔΔCT-Werten der gemessenen LINE-1 Methylierung und der LINE-1 Trankriptzahl aus den Urin-Proben von Patienten mit fortgeschrittenen und frühen Karzinomen, sowie gesunden Probanden (Kontrollen). Zur besseren Darstellung wurde der Quotient mit dem Faktor 10^7 multipliziert.

Um die Bedeutung dieses neu kreierten Parameters, der auf den Quotienten zwischen den ΔΔCT-Werten der LINE-1 Methylierung und der *LINE-1* Transkription

basiert, besser einschätzen zu können, wurden weitere Proben eines anderen Klinikums von gesunden Probanden (K19-K30), als auch frühen (B28-B74) sowie späten Tumorpatienten (B26-B79) nach derselben Vorgehensweise untersucht.
Die Ergebnisse der *LINE-1* Transkription der zweiten Probenkohorte sind in Abb. 1-2 im Anhang hinterlegt. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass in allen Proben sowohl *Beta-Aktin* als auch *LINE-1* unterschiedlich stark exprimiert worden sind.
Im abschließenden Schritt wurden die berechneten Quotienten beider Probenkohorten zusammengefasst (Abb. 17). Durch die Zusammenfassung werden die Unterschiede zwischen den untersuchten Probenfraktionen (fortgeschrittene bzw. frühe Karzinome und Kotrollen) deutlicher als in den Einzelanalysen. Wie bereits bei den Untersuchungen der einzelnen Kohorten, fällt auch hier vor allem ein Unterschied zwischen den fortgeschrittenen Tumorproben und den frühen Tumoren als auch den Kontrollen auf. Der Vergleich beider Karzinomstadien hat gezeigt, dass bei Vernachlässigung der Probe 133 über 60 % der frühen Tumorproben wesentlich höhere Quotienten erzielt haben als die späten Tumorproben. Darüber hinaus verhalten sich die fortgeschrittenen Karzinomproben konstanter, d.h. sie weisen weniger Differenzen innerhalb der Probenkohorte auf, als die beiden anderen untersuchten Probenkohorten. Bei den frühen Karzinomen zeigten 2 Proben (120 und 128) besonders hohe Werte, während bei den gesunden Probanden gleich doppelt so viele Proben (K27, K28, K3 und K8) mit stark erhöhten Quotienten aufgetreten sind. Zusätzlich konnte durch in Bezugsetzung des jeweils niedrigsten mit dem höchsten Quotientenwert innerhalb jeder Probenkohorte ein jeweils max. differenzieller Unterschied berechnet werden. So betrug der größte Unterschied zwischen den fortgeschrittenen Tumorproben nur das bis zu 10-fache, während bei den frühen Karzinomen eine Differenz zwischen den Proben bis zu dem 58.016-fachen und bei den gesunden Probanden weit über das 3.260-fache ermittelt werden konnte.
Der neu kreierte Parameter zeigt, dass fortgeschrittene Karzinome sich von den frühen Karzinomen sowie gesunden Probanden abgrenzen, wodurch dieser Parameter als neuer Biomarker für den Nachweis von fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen bzw. ihren Rezidiven von Bedeutung sein könnte.

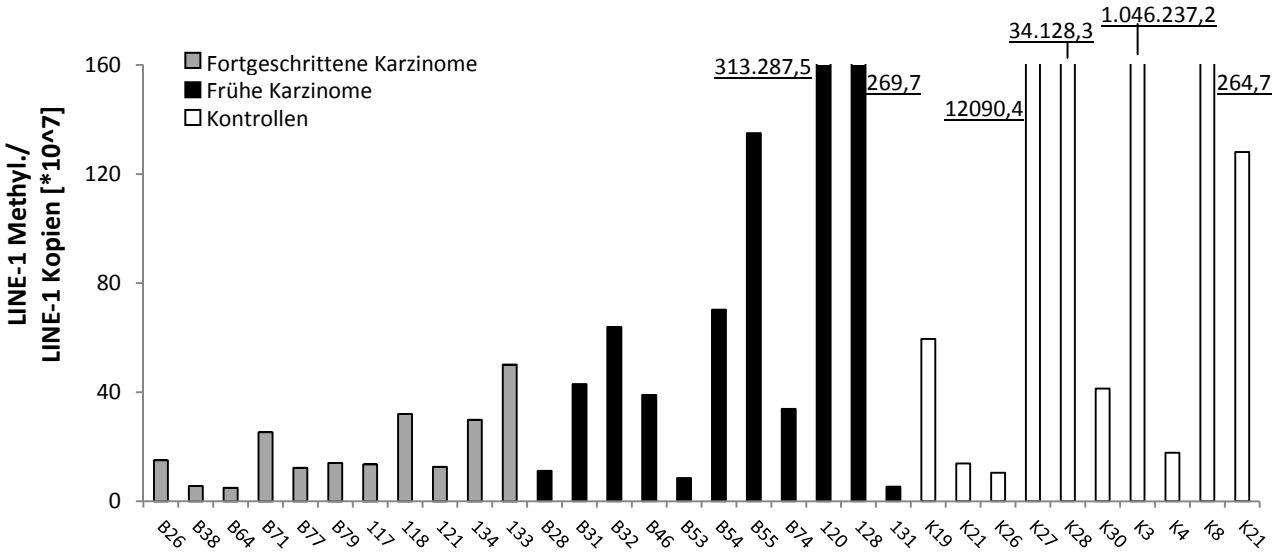


Abb. 17 Quotienten aus der LINE-1 Methylierung und der LINE-1 Transkription der Probenkohorte 1 und 2. Gezeigt ist der Quotient der ΔΔCT-Werte der LINE-1 Methylierung und der LINE-1 Kopienzahl aus den Urin-Proben von Patienten mit fortgeschrittenen und frühen Karzinomen sowie gesunden Probanden (Kontrollen). Zur besseren Darstellung wurde der Quotient mit dem Faktor 10^7 multipliziert.

3.1.3.5 MIRECAL (Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity): Direkte und semiquantitative Analyse des Chromatinverpackungsgrads des LINE-1 Promotors

Im darauf folgenden Versuch wurde untersucht ob in zellulärer DNA aus dem Urin von Harnblasenkarzinompatienten Hinweise für eine Aktivierung bzw. Inaktivierung des LINE-1 Promotors mittels einer Chromatinzugänglichkeitsanalyse erhoben werden können. Hierfür wurde die von PD Dr. S. Santourlidis und Dr. N. Graffmann entwickelte MIRECAL-Methode verwendet, die eine Möglichkeit darstellt die Kompaktheit einer ausgewählten Chromatinregion zu bestimmen. Denn je nach Anordung der Chromatinproteine kann das Chromatin „offen“, kompetent für die Transkription oder kondensiert, also transkriptionsinaktiv, vorliegen. Im ersten Fall wäre die DNA weniger geschützt vor einem nukleolytischen Verdau durch die Micrococcus Nuklease. Für diesen Versuch wurden die Urin-Zellpellets zu Beginn mit der *Micrococcus* Nuklease verdaut und nach der DNA-Isolation die Zugänglichkeit des Chromatins mittels der *real time* PCR ermittelt (Graffmann et al. 2006). Für die Normierung der Messungen wurde der konsistente Status der Chromatinzugänglichkeit eines *housekeeping* Gens verwendet.

In der Abb. 18 (A) ist das Ergebnis der quantitativen Chromatinzugänglichkeits-analyse der ersten Austestung in späten und frühen Tumorstadien dargestellt. Es ist

zu erkennen, dass die Proben 26 und 64 im Vergleich zu den anderen z.T. eine abnehmende LINE-1 Templatemenge aufweisen, die mit der Dauer des Nukleaseverdaus korreliert. Da hier erste Evidenz für eine zunehmende Mnase-Zugänglichkeit zu erkennen war, wurden zusätzliche Urin-Proben von frühen (Abb. 18 B) und späten Karzinomen (Abb. 18 C) untersucht.

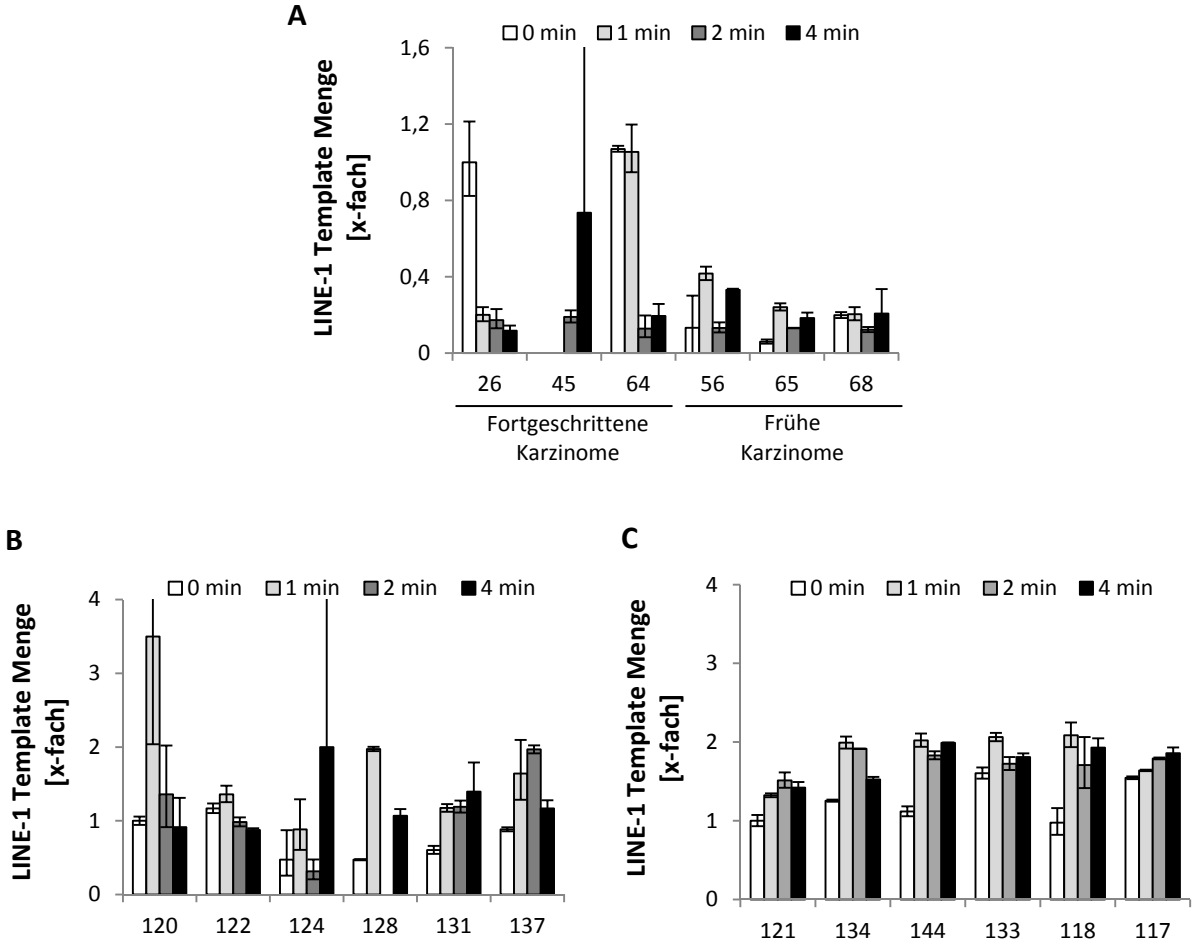


Abb. 18 Semiquantitative Analyse der Chromatinzugänglichkeit der LINE-1-Promotorregion mittels MIRECAL. Urin-Zellpellets von fortgeschrittenen und frühen Karzinom Patienten (A) wurden für 0, 1, 2 und 4 min mit 0,6 U Mnase bei 37°C inkubiert. Die Messung der intakten LINE-1 Promotorfragmente erfolgte mittels der *real time* PCR. Als Kontrolle diente GAPDH. Chromatinzugänglichkeit bei weiteren frühen- (B) und fortgeschrittenen Karzinomen (C).

Die Messungen in frühen Tumorstadien (Abb. 18 B) ergab einen Anstieg der LINE-1 Templatemenge bei fast allen Proben. Eine Abnahme der Templatemenge durch die Mnase-Inkubation konnte nur in Ansätzen in den Proben 120 und 122 beobachtet werden. Dabei führte in diesen Proben die längste Inkubation von 4 min mit dem Enzym zu den geringsten Mengen an Amplifikationsprodukten. Das Ergebnis der fortgeschrittenen Karzinompatienten in Abb. 18 (C) zeigt im Vergleich zu den frühen Tumoren einen Inkubationszeiten-abhängigen Anstieg der LINE-1 Template Menge

in allen untersuchten Proben. Auch hier konnte bereits nach einer einminütigen Mnase Behandlung der Urin-Zellpellets eine Zunahme der Amplifikate von mind. 5,5 % (Probe 117) und max. 53 % (Probe 118) nachgewiesen werden. In keiner der sechs untersuchten Proben führte die Inkubation mit der Mnase zu einem Nachweis einer erhöhten Chromatinzugänglichkeit und damit zu einer Abnahme der Menge des Amplifikationsproduktes. Mittels der statistischen Analysen der frühen Karzinomproben konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen (0´) und der 1- sowie 4-minütigen Inkubation festgestellt werden. Im Vergleich zu dem Ergebnis der frühen Karzinome, konnte bei den fortgeschrittenen Tumoren ein signifikanter Unterschied (Abb. 19) zwischen der Kontrolle und allen anderen Inkubationszeiten beobachtet werden.

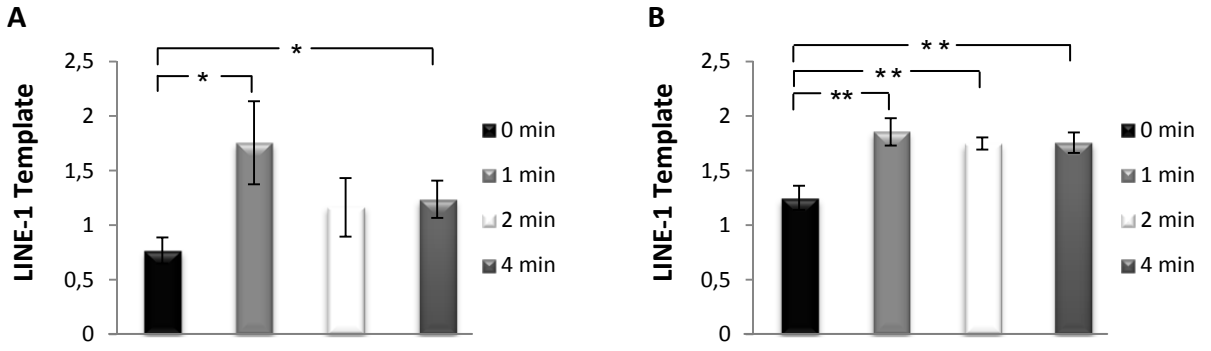


Abb. 19 Statistische Analyse der semiquantitativen Chromatinzugänglichkeitsuntersuchung der LINE-1 Promotorregion. (A) LINE-1 Templatemenge der zellulären DNA aus Urin von Patienten mit einem frühen Harnblasenkarzinom nach unterschiedlich langer Inkubation mit Mnase (n=6, x±SEM, * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle). (B) LINE-1 Templatemenge der zellulären DNA aus Urin von Patienten mit einem fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom nach Mnase Inkubation (n=6, x±SEM, ** p <0,01 signifikant gegen die Kontrolle).

3.2 Untersuchungen zur Telomerlänge der Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten

Telomere bestehen aus tandemartig angeordneten DNA-Sequenzen, welche an beiden Chromosomenenden lokalisiert sind, durch die die Replikation der chromosomalen Enden ermöglicht wird. Sie sind für jede Spezies charakteristisch. Beim Menschen ist es die wiederkehrende DNA-Sequenz 5´-GGGATT-3´. Die Replikation der Telomere erfolgt durch das aktive Enzym Telomerase, das ein kleines RNA-Oligonukleotid besitzt, dessen Sequenz partiell komplementär zu der repetitiven Sequenz der Telomeren ist. Jedoch ist die Telomerase nur in wenigen Zellen aktiv. Dazu gehören neben Keimzellen sowie einigen Stammzellen auch

Tumorzellen. Dies könnte eine Erklärung für die unbegrenzte Teilungsfähigkeit bzw. Lebensdauer der Tumorzellen sein (Janning und Knust, 2004).

Daher wurde im nachfolgenden Experiment untersucht, ob in Vollblut-DNA, zellulärer als auch freier DNA aus Urin Unterschiede in den Telomerenlängen zwischen Patienten mit einem frühen, bzw. fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom und gesunden Probanden zu finden sind. Zur Detektion der Telomeren wurde das *Telo TAGGG Telomere Length Assay*-Kit verwendet. Es ermöglicht eine Darstellung der durchschnittlichen Telomerenlänge einer Zellpopulation in Form von *Terminal Restriction Fragments* (TRF), die aus der telomerischen und subtelomerischen DNA bestehen. Als Kontrollen diente die DNA von immortalen Zelllinien der Fa. Roche und der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376.

In der Abb. 20 ist der Versuch eines Nachweises der Telomere aus zellulärer Urin- und Vollblut-DNA von zwei Tumorpatienten (015, 046) sowie einer Kontrolle (323) dargestellt. Für die Untersuchungen wurde von jeder Probe 1 µg zellulärer Urin- bzw. Vollblut-DNA eingesetzt. Es konnten keine Signale im Southern Blot der zellulären Urin-DNA Proben nachgewiesen werden. Nur die DNA der Vollblutproben zeigte Signale (Abb. 20 A), die anschließend densitometrisch ausgewertet werden konnten (Abb. 20 B).

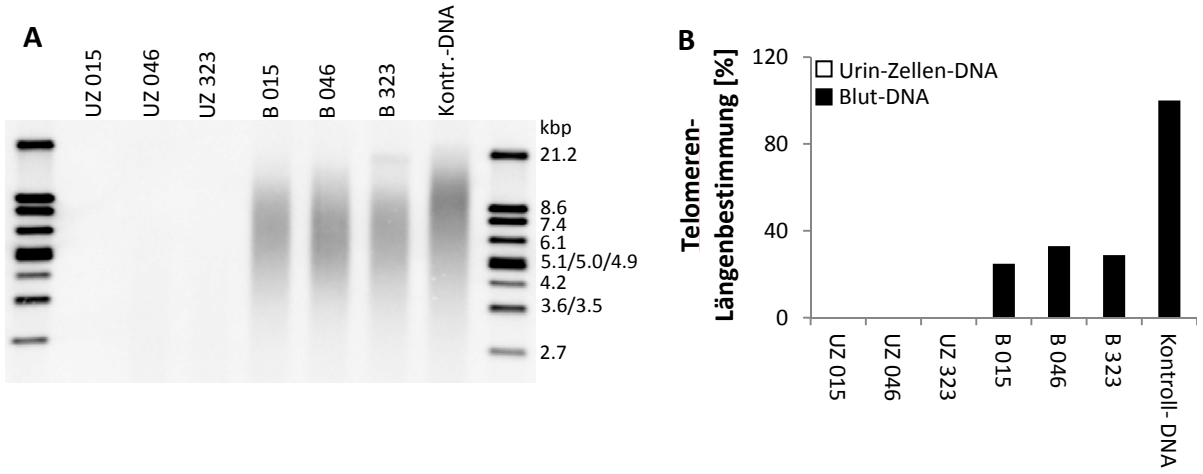


Abb. 20 Telomeren-Längenbestimmung aus zellulärer DNA aus Urin und Vollblut-DNA von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden. Mittels Southern Blot Analyse wurde die Länge der Telomere bestimmt. (A) Southern Blot der aufgetrennten DNA-Proben: UZ015, UZ046 und UZ323=zelluläre DNA-Proben aus Urin; B015, B046 und B232=Vollblut-DNA Proben; Kontr. DNA=DNA von immortalen Zelllinien der Fa. Roche. Es wurde von jeder Probe 1 µg DNA eingesetzt. (B) Densitometrische Auswertung des Blots. UZ=zelluläre Urin-DNA, B=Vollblut-DNA; 015 und 046= Patienten mit frühem Harnblasenkarzinom, 323=gesunder Proband).

Es ist zu erkennen, dass alle untersuchten Proben relativ gleich lange Telomere aufwiesen, die sich in einer Größenordnung zwischen 5.1 bis ca. 15 kbp befanden -

bis auf die Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien (Fa. Roch), die längere Telomeren aufwies. Darüber hinaus konnte eine zusätzliche schwache Bande bei ca. 21.2 kbp nur in der DNA-Probe des gesunden Probanden B323 beobachtet werden.
Aufgrund dieses Ergebnisses wurden weitere Vollblut-DNA Proben von Harnblasenkarzinompatienten sowie gesunden Probanden untersucht (Abb. 21).

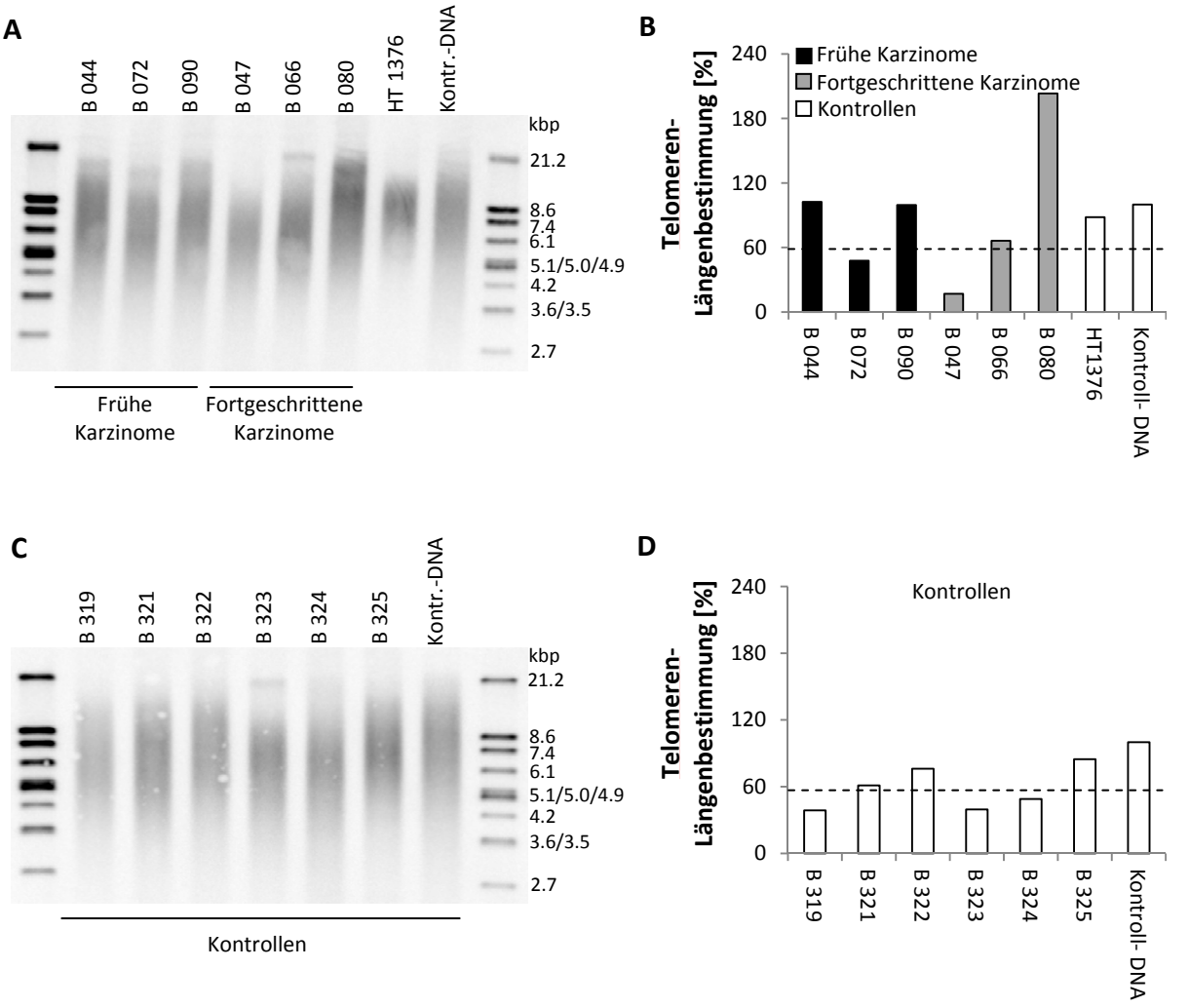


Abb. 21 Telomeren-Längenbestimmung aus Vollblut-DNA Proben früher und fortgeschrittener Harnblasenkarzinomenpatienten sowie gesunder Probanden. Mittels Southern Blot wurden die Telomerenlängen ermittelt. Es wurden je Probe 1,5 µg DNA eingesetzt. (A) Southern Blot der aufgetrennten frühen (B044,B072,B090) und fortgeschrittenen (B047,B066,B080) Karzinomproben, sowie der Zelllinie HT 1376 und der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche. (B) Densitometrische Auswertung des Southern Blots der Karzinomproben und Kontroll-DNA Proben. (C) Southern Blot der aufgetrennten Vollblut-DNA Proben von gesunden Probanden sowie der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche. (D) Densitometrische Auswertung des Southern Blots der untersuchten Vollblut-DNA Proben, der gesunden Probanden und der Kontroll-DNA. *Cut off* (58%) wurde aus den Mittelwerten der Kontrollproben (B319-B325) gebildet.

Die Abb. 21 zeigt den Southern Blot (A) und die dazugehörende densitometrische Auswertung (B) der Telomerenlängen der Vollblut-DNA Proben von 3 Tumorpatienten mit frühen Karzinomen (044, 072, 090), 3 Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen (047, 066, 080) sowie der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376, die auf Grund ihrer langen Telomere als zusätzliche Kontrolle zu der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien (Fa. Roch) diente. Die Größenordnung der Telomerenlängen der frühen Karzinome betrug ca. 5,1-18 kbp, während die der späten Tumorstadien zwischen 4,9 und 21,2 kbp lag. Beide Kontroll-DNAs weisen fast gleich lange Telomere auf, während bei den fortgeschrittenen Karzinomen die größten Unterschiede zu beobachten waren. In beiden Abbildungen ist erkennbar, dass bei dem Patienten 080 die längsten Telomere detektiert werden konnten, die doppelt so lang waren, wie die der Zelllinie HT 1376 und 12-mal länger als die der Probe 047, bei der die kürzesten Telomeren detektiert wurden. Bei den frühen Karzinomproben wiesen zwei (044 und 090) der drei untersuchten DNA-Proben gleich lange Telomere auf, die fast der Teleomerenlänge der Kontrollen entsprachen. Im Vergleich dazu, zeigte die Probe 072 halb so lange Telomere.

Parallel zur Ermittlung der Teleomerenlängen der Vollblut-DNA aus frühen und späten Harnblasenkarzinompatienten wurden 6 Proben von gesunden Probanden sowie die Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien untersucht. Das Ergebnis des Southern Blots und der dazugehörigen densitometrischen Auswertung ist in Abb. 21 dargestellt und zeigt Telomeren mit einer Größenordnung von zwischen 4,9 und ca. 17 kbp. Im Vergleich zu den analysierten Telomerenlängen der Karzinomproben ist zu erkennen, dass die Telomerenlängen aller Kontrollen weniger stark schwanken, als die der Tumorproben. Darüber hinaus zeigen alle DNA-Proben der untersuchten, gesunden Probanden kürzere Chromosomenden als die Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien-DNA (Fa. Roche). Die längsten Telomere konnten bei den Proben B325 sowie B322 detektiert werden, während die restlichen Proben um ca. 35-40 % kürzere Telomeren zeigten.

Um eine konkretere Aussage über mögliche Verlängerungen der Teleomeren in Vollblut-DNA Proben von Harnbalsenkarzinompatienten im Vergleich zu den gesunden Probanden treffen zu können, wurden jeweils 6 weitere Vollblut-Proben von frühen als auch von fortgeschrittenen Karzinomen untersucht (Abb. 22).

Der Southern Blot (A) sowie die densitometrische Auswertung (B) der analysierten Karzinomproben im Frühstadium haben gezeigt, dass alle Proben -bis auf die Probe

137, kürzere Telomeren als die Kontroll-DNA aufwiesen, die eine Größenordnung von 4,2 und 20 kbp besaßen. Ihre Länge war im Vergleich zu der Kontroll-DNA im Durchschnitt um 50-70 % geringer ausgefallen, während bei der Probe 137 über doppelt so lange Chromosomenden beobachtet werden konnten.

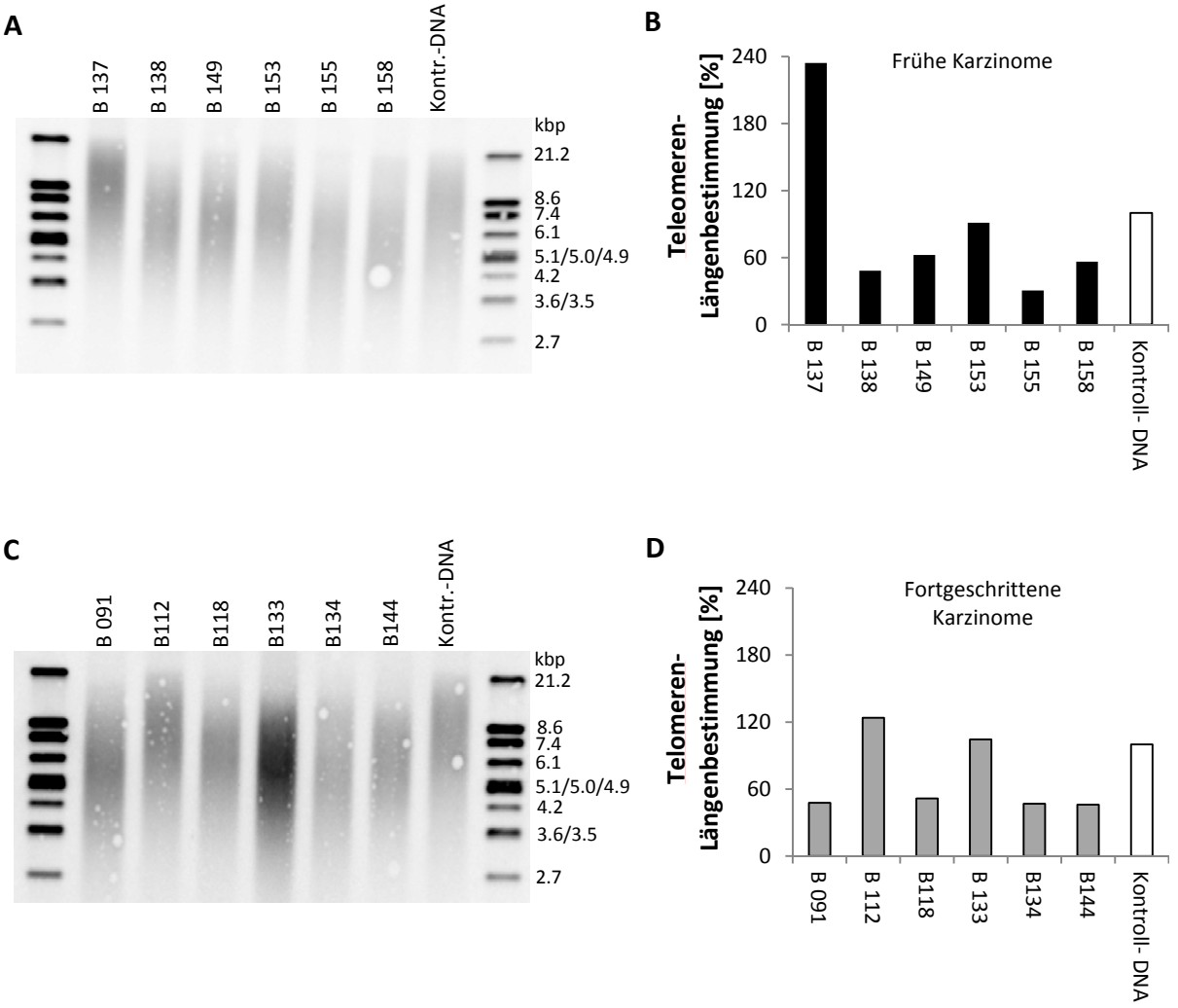


Abb. 22 Telomeren-Längenbestimmung aus Vollblut-DNA Proben früher und fortgeschrittener Harnblasenkarzinomepatienten. Mittels Southern Blot wurden die Telomerenlängen ermittelt. Es wurden je Probe 1,5 µg Vollblut-DNA eingesetzt. (A) Southern Blot der aufgetrennten frühen Karzinomproben und der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa.Roche. (B) Densitometrische Auswertung des Southern Blots der frühen Karzinome und der Kontroll-DNA. (C) Southern Blot der aufgetrennten fortgeschrittenen Karzinomproben und der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa.Roche. (D) Densitometrische Auswertung des Southern Blots der fortgeschrittenen Karzinome und der Kontroll-DNA.

Im Vergleich zu den Telomerenlängen der Vollblut-DNA Proben der frühen Harnblasenkarzinome konnten bei den Patientenproben mit fortgeschrittenen Karzinomstadien (Abb. 22 C,D) bei vier der sechs untersuchten Proben (B091, B118, B134 und B144) relativ gleich lange Teleomere detektiert werden. Diese waren mit

46% bzw. 50% halb so groß, wie die Chromosomenenden der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien-DNA und bewegten sich ebenfalls in der Größenordnung von 4,2 und 20 kbp. Die Proben B112 und B133 zeigten im Bezug zu der Kontrolle mit 25% bzw. 5% nur geringfügig längere Telomere. Die Telomerenlängen-Untersuchung weiterer Karzinomproben verschiedener Stadien wies, wie die erste Telomeren-Längenbestimmung der Tumorproben, eine geringere Größenschwankung bei den fortgeschrittenen Karzinomen auf, als bei den frühen Karzinomen.

Nach der Untersuchung der DNA-Vollblutproben von verschiedenen Harnblasenkarzinomstadien wurde die Telomerenlänge der zellulären DNA aus Urin von 3 frühen (044, 072, 90) und 3 fortgeschrittenen (047, 066, 080) Karzinomen betrachtet, deren chromosomalen Enden bereits in den Vollblutproben ermittelt wurden. Allerdings wurde für die Untersuchung der zellulären DNA aus Urin 2 µg DNA -und damit die doppelte Menge an DNA, die für die Blutproben eingesetzt worden ist, für den Southern Blot verwendet. In Abb. 23 sind der Southern Blot (A) und die densitometrische Auswertung (B) der verschiedenen 6 Blasentumorproben dargestellt. Es konnten nur bei der Patientenprobe 072 (4,2-9 kbp) aus der Gruppe der frühen Tumoren, sowie der zellulären DNA aus Urin des Patienten 080 (6,1-20 kbp), aus der Gruppe der späten Tumoren, Signale im Southern Blot nachgewiesen und damit die Teleomerenlänge bestimmt werden. Die densitometrische Auswertung lässt erkennen, dass die Probe 080 2,4-fach längere Chromosomenden aufweist, als die Proben 072. Eine Längendifferenz zwischen diesen beiden DNA-Proben der Patienten war bereits bei der Telomerenlängen-Untersuchung der Vollblutproben zu sehen. Dort waren die Telomerenlängen der späten Tumorprobe 080 über vier Mal so lang ausgefallen, als die des sich im Frühstadium befindenden Patienten 072. Zusätzlich weist die Untersuchung der zellulären DNA aus Urin der Probe 080 nur halb so lange Telomere auf, als die Kontroll-DNA Proben der mitaufgetragenen Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 und der immortalen Zelllinien-DNA der Fa. Roche. Im Vergleich dazu zeigte die Vollblut-DNA Probe des Patienten 080 (Abb. 21 A) längere Telomeren als die beiden Zelllinien-DNA Kontrollproben.

Desweiteren wurden wie bereits bei den Untersuchungen der Telomerenlängen von Vollblutproben auch die zelluläre DNA aus Urin von 7 gesunden Probanden betrachtet (Abb. 23). Es konnten nur in drei (321, 322, 323) von sieben Proben sehr schwache Signale detektiert werden, die eine Größenordnung zwischen 5.1-15 kbp

zeigten. Das stärkste Signal der Probe 322 betrug gerade mal ca. 4 % im Vergleich zur Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche.

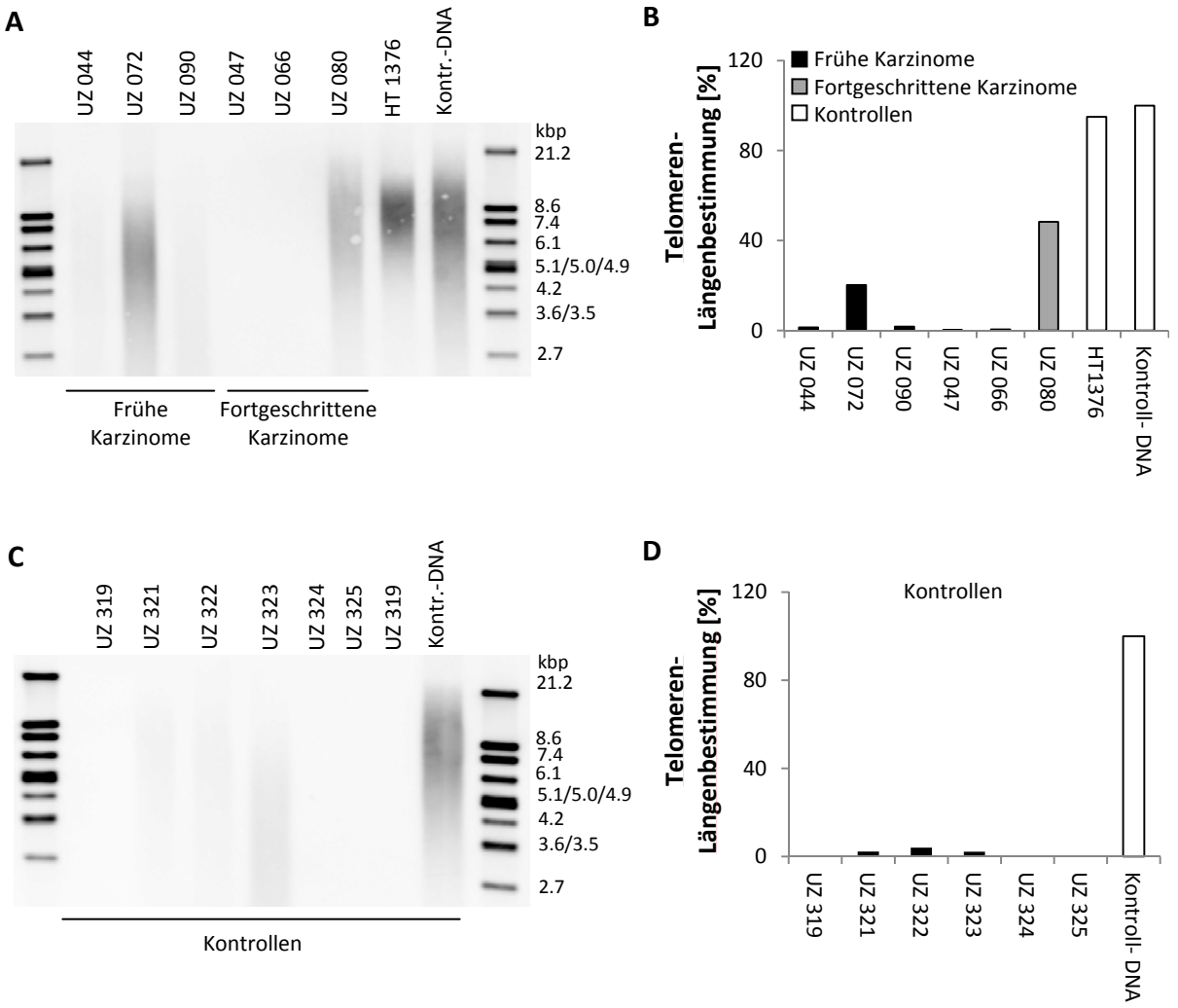


Abb. 23 Telomeren-Längenbestimmung aus zellulärer Urin-DNA früher und fortgeschrittener Harnblasenkarzinomenpatienten sowie gesunder Probanden. Mittels Southern Blot wurden die Telomerenlängen ermittelt. Es wurden je Probe 2 µg zellulärer DNA aus Urin eingesetzt. (A) Southern Blot der aufgetrennten frühen (UZ044,UZ072,UZ090) und fortgeschrittenen (UZ047,UZ066,UZ080) Karzinomproben, sowie der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 und der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche. (B) Densitometrische Auswertung des Southern Blots der frühen und fortgeschrittenen Karzinome sowie der Zelllinien DNA-Proben. (C) Southern Blot der aufgetrennten zellulären DNA aus Urin von gesunden Probanden und der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche. (D) Densitometrische Auswertung des Southern Blots der gesunden Probanden und der Kontroll-DNA.

Nach der Untersuchung zu der Telomerenlänge der DNA-Proben aus Vollblut und zellulärer Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten unterschiedlicher Stadien, wurde die Längenbestimmung der chromosomalen Enden zusätzlich mit der freien DNA aus Urin getestet (Abb. 24). Dafür wurden bis auf die Probe 047 erneut die gleichen Patientenproben von frühen (044, 072, 090) als auch späten (066, 080)

Karzinomen verwendet, die bereits in den vorherigen Telomerenlängen Untersuchungen eingesetzt wurden. Um detektierbare Signale zu erhalten, wurde die Mege der eingesetzten freien DNA aus Urin auf 3 µg erhöht. Allerdings konnte auch nach mehrfacher Wiederholung des Southern Blots kein Signal mit der freien Urin-DNA detektiert werden.

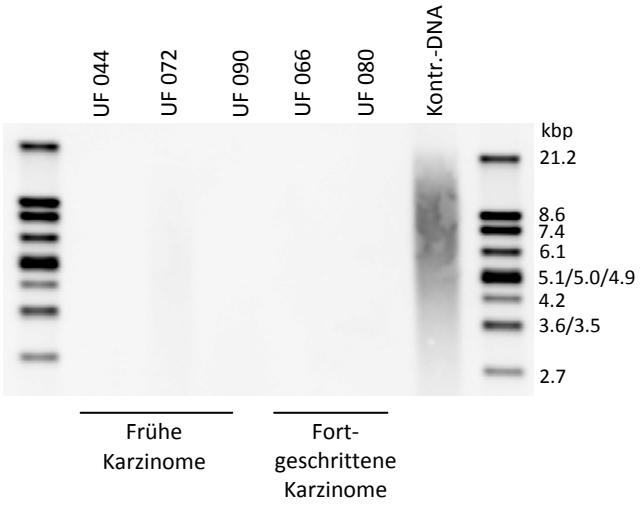


Abb. 24 Telomeren-Längenbestimmung aus freier Urin-DNA früher und fortgeschrittener Harnblasenkarzinompatienten. Mittels Southern Blot wurden die Telomerenlängen ermittelt. Es wurden je Probe 3 µg der zellulären DNA aus Urin eingesetzt. Gezeigt ist der Southern Blot der aufgetrennten frühen (UF044,UF072,UF090) und fortgeschrittenen (UF066,UF080) Karzinomproben und der Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche.

In der Abb. 25 ist die densitometrische Auswertung (in Prozent) der Telomerenlängen zusammengefasst, die mittels der Vollblut-DNA als auch aus der zellulären DNA aus den Urin-Proben der Harnblasenkazinompatienten in verschiedenen Stadien bestimmt werden konnte.

Der Vergleich beider DNA-Fraktionen hat gezeigt, dass mit der Vollblut-DNA sehr viel höhere bzw. stärkere Signale erzielt werden konnten, als mit der zellulären DNA aus dem Urin. Es konnte nur bei 1/3 der untersuchten zellulären DNA-Proben aus dem Urin (Patient 072 und 080) die Telomerenlänge detektiert werden. Zusätzlich ist erkennbar, dass drei der Karzinompatienten (044, 090, 080) mindestens genauso lange, bzw. sogar längere Telomeren besitzen als die Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 und die Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roch. Darüber hinaus unterliegt die Telomerenlänge der DNA gesunder Probanden aus Vollblut geringeren Längenunterschieden als die Telomeren der DNA-Proben der Tumorpatienten.

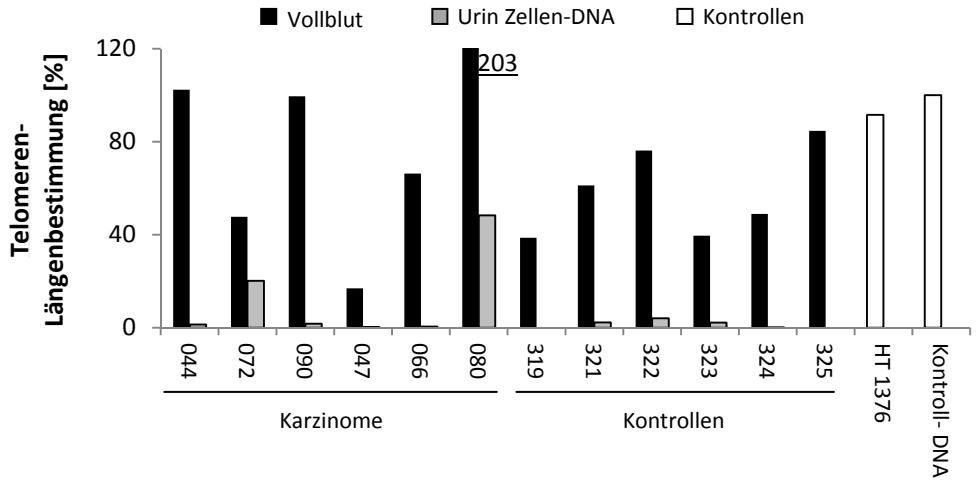


Abb. 25 Densitometrische Auswertung der im Southern Blot bestimmten Telomerenlängen. Dargestellt ist eine Zusammenfassung aller densitometrisch ausgewerteten Southern Blots, die mit Vollblut-DNA, zellulärer sowie freier DNA aus Urin von frühen und fortgeschrittenen Tumorpatienten, als auch gesunden Probanden durchgeführt worden sind. Als Kontrollen dienten die DNA der Harnblasenkarzinomzelllinie HT 1376 und die Kontroll-DNA der immortalen Zelllinien der Fa. Roche.

3.3 Methylierungsanalysen der Harnblasenkarzinome

Im 2.Teil der Arbeit wurden unter der Verwendung der NimbleGen- Array Plattform globale und punktuelle Analysen der genomweiten DNA-Methylierung durchgeführt, die eine Ermittlung neuer potentieller epigenetischer Biomarker aus Tumorgewebe-, Blutplasma- und Urinproben von Harnblasenkarzinompatienten ermöglichen. Zusätzlich wurde die Methylierung der microRNAs aus den ermittelten, differentiell methylierten Regionen (DMRs) in dieser Analyse als eigene Subgruppe betrachtet.

3.3.1 Globale Methylierungsanalysen im Harnblasenkarzinomgewebe

Für die Detektion neuer potentieller epigenetischer Biomarker früher Harnblasenkarzinome wurde die genomweite DNA-Methylierung in zwei unabhängigen Probenkohorten untersucht und analysiert. Diese wurden freundlicherweise von der Pathologie und Urologie des Universitätsspitals Zürich zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchung der ersten Probenkohorte wurden die Urothel-DNA von drei gesunden Probanden (BK11, BK12, BK13) und die Tumorgewebe-DNA von 9 Harnblasenkarzinompatienten mit multi- (BM6T-BM10T) und unifokalen Tumoren (BU1T-BU4T) verwendet. Zusätzlich wurde die DNA des nicht-tumorösen Nachbargewebes (BM6N-BM10N; BU1N-BU4N) der Karzinompatienten untersucht und ebenfalls analysiert. Auf diese Weise sollte festgestellt werden,

(1.) welche Gene eine Hyper- bzw. Hypomethylierung aufweisen und damit als potentielle Biomarker eingesetzt werden könnten,
(2.) ob eine epigenetische Verwandtschaft zwischen den Tumorgeweben bzw. zwischen den Geweben von gesunden Probanden (Negativkontrollen) besteht und
(3.) eine Evidenz für Methylierungsveränderungen in den Tumor-benachbarten Arealen vorliegt.

Abb. 26 (A) zeigt das hierarchische Clustering der untersuchten Tumor- und Kontrollproben der Gewebekohorte 1. Damit ist eine visuelle Darstellung der Ähnlichkeit hinsichtlich der DNA-Methylierung zwischen den einzelnen DNA-Proben der Kohorte 1 gegeben. Das hierarchische Clustering erfolgte mittels bioinformatischer Analysen unter Anwendung der „*correlation metric“* und „*average linkage method“* durch Prof. Marcos Arauzo Bravo (MPI Münster).

Das Ergebnis des hierarchischen Clusterings der 1. Screening-Untersuchung (Abb. 26 (A) zeigt, dass von den insgesamt 10 Tumorproben 4 Tumore (BU 1, BU 3, BU 2 und BM 9) eine enge Verwandtschaft zu ihrem benachbarten gesunden Gewebe besitzen. Darüber hinaus fällt auf, dass die Proben BU1N und BU1T die geringste Ähnlichkeit zu allen übrigen Proben aufweisen. Die engste Beziehung konnte zwischen den Proben BU 2 (N/T), BK 13, BK 12, BU 3 (N/T) und BK 11 detektiert werden. Zwar liegen die Kontrollproben (BK 11, BK 12, BK 13) der gesunden Probanden nicht direkt zusammen, zeigen aber dennoch einen engen Bezug zueinander. Bei den Proben BM 9 (N/T), BM 10 (N/T) sowie BU 4 (N/T) konnte ebenfalls eine zusätzliche Gruppierung beobachtet werden, die eine relativ engere Beziehung zu den Proben BM 6 (N/T), BM 8 T, BM 7 T zeigte, als zu der zuerst beschriebenen Gruppe mit den BK-Kontrollen.

Für die genomweite, globale Methylierunguntersuchung der 2. Probenkohorte wurde zusätzlich zu der Gewebe-DNA auch die DNA aus dem Blutplasma sowie dem Urin der 6 Tumor- (BGT1 – BGT6) und 4 Kontrollproben (BGK1-BGK4) untersucht. Dabei wurde erneut mittels bioinformatischer Analysen unter Anwendung der „*correlation metric“* und „*average linkage method“* ein hierarchisches Clustering für die untersuchten Proben erstellt. Auf diese Weise konnte eine visuelle Darstellung der Ähnlichkeit hinsichtlich der DNA-Methylierung zwischen den einzelnen DNA-Proben ebenfalls für die Kohorte 2 gezeigt werden.

Die visuelle Darstellung der DNA-Methylierungsähnlichkeiten zwischen den Gewebeproben der Kohorte 2 ist in Abb. 26 (B) gezeigt.

Es zeigt, dass 2 der 4 Negativkontrollen (BGK 2 und BGK 4) ein sehr ähnliches Methylierungsmuster besitzen und daher eng zusammen gruppieren. Dies ist auch bei den Tumorproben BGT2 und BGT5 der Fall. Trotz ihrer unterschiedlichen Histologie kann hier eine Beziehung zwischen diesen beiden Gruppierungen beobachtet werden, die in nächster Instanz eine engere Verwandtschaft zu den Tumorproben BGT 3, BGT 1 sowie der zusammen gruppiertenTumorproben BGT 6 und BGK 3 aufweisen. Die Tumorprobe BGT4 als auch die Negativkontrolle BGK1 zeigen im Vergleich zu den anderen Probengruppierungen den entferntesten Beziehungsgrad.

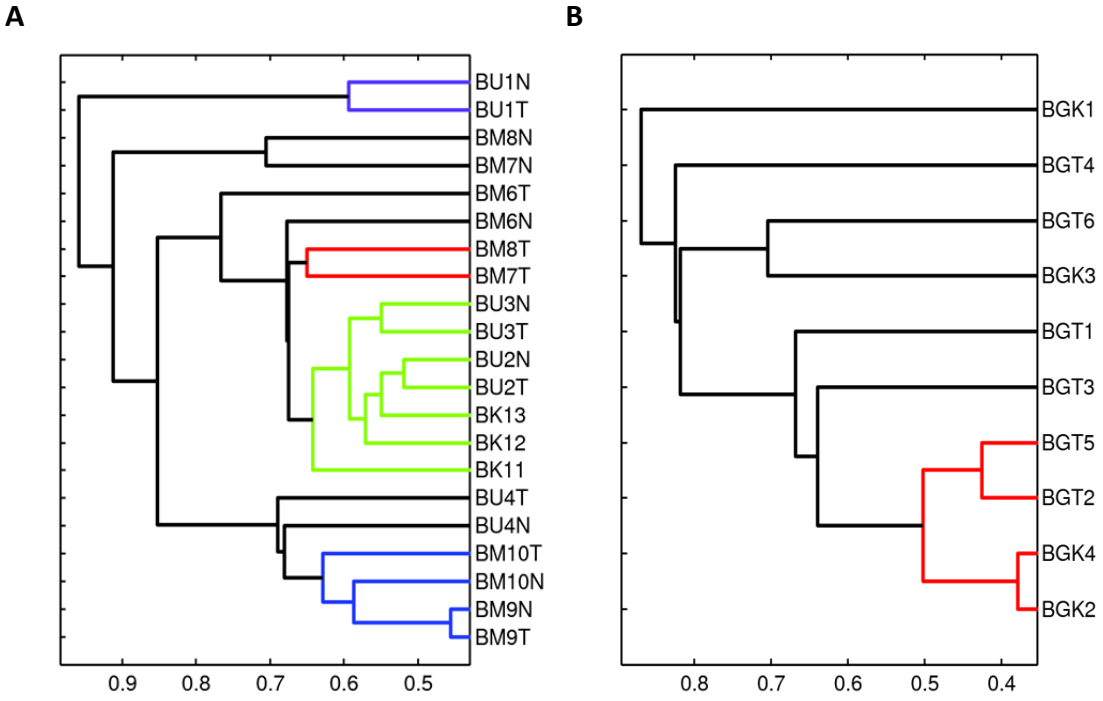


Abb. 26 Hierarchisches Clustering der DNA-Gewebeproben von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden. Gezeigt ist das hierarchische Clustering von zwei Kohorten, das nach der „correlation metric“ und „average linkage“ Methode erfolgte (Al-Quraishy et al., 2013). Die vertikalen Verbindungslinien, die je 2 Abzweigungen verbinden, zeigen die Ähnlichkeit der Proben hinsichtlich der 28.000 analysierten CpG-reichen Regionen. (A) zeigt das hierarchische Clustering der Kohorte 1, bestehend aus multifokalen (BM6T-BM10T) und unifokalen (BU1T-BU4T) Tumorproben, Tumorbenachbarten Arealen (BM6N-BM10N und BU1N-BU4N) und gesunden Probanden (BK11-BK13). (B) zeigt das hierarchische Clustering der Kohorte 2, bestehend aus 6 Tumorproben (BGT1-BGT6) mit unterschiedlichen Tumorarten und 4 gesunden Probanden (BGK1-BGK4).

Mit Hilfe weiterer bioinformatischer Detailanalysen der genomweiten, globalen Methylierungsuntersuchungen wurden differentiell methylierte Regionen (DMRs) in beiden DNA-Gewebekohorten bestimmt. Um diese zu erhalten, wurde jeder Genpromotor in 2 Regionen gesplittet: die Ups- und Cor-Promotorregion.

Die 1 kb große Ups-Promotorregion umfasst einen -1500 bis -500 bp Nukleotidbereich, der sich *upstream* von dem Transkriptionsstart befindet. Die Cor-

Promotorregion dagegen erfasst den 1 kb großen Sequenzabschnitt, der zwischen -500 und +500 bp um den Transkriptionsstart herum lokalisiert ist.

Auf diese Weise wurden in der ersten Kohorte 190 hyper- und 223 hypomethylierte Genpromotoren identifiziert, die aus der Schnittmenge der multi- und unifokalen Tumorproben resultierten (siehe Anhang Tab. 1).

Im Vergleich zu der ersten Kohorte wurden in der zweiten 261 hyper- und 187 hypomethylierte Genpromotoren bestimmt. Dabei erfolgte keine Unterteilung der Tumore in Tumorarten, wie es in der Kohorte 1 der Fall ist. In Abb. 27 ist ein Auszug der erstellten *Heat maps,* die die hyper– und hypomethylierten Cor-Promotor DMRs und Ups-Promotor DMRs visualisieren, abgebildet. Die vollständigen *Heat maps* der bioinformatischen Analysen sind im Anhang (Abb. 5-8) hinterlegt.

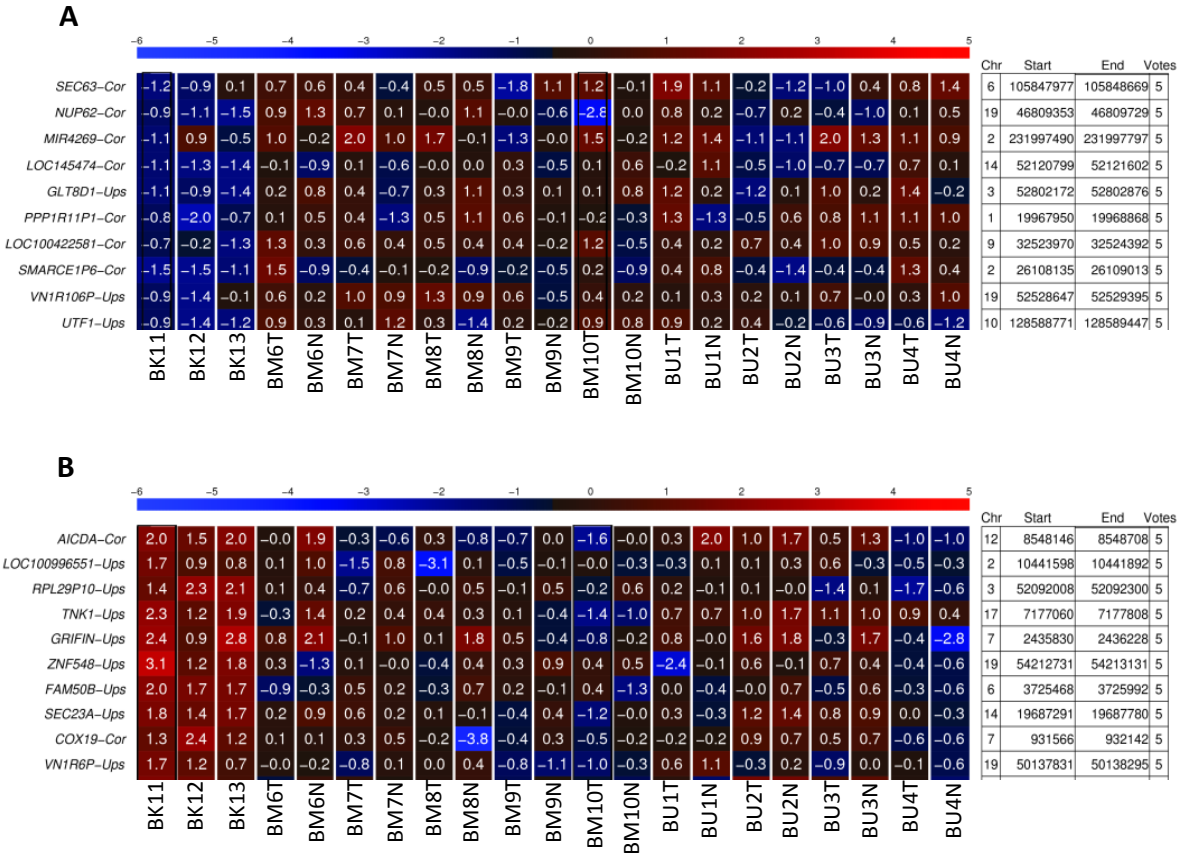


Abb. 27 *Heat maps* - Auszüge aus den globalen Methylierungsanalysen der DNA-Gewebeproben von Harnblasenkarzinompatienten mit multi- und unifokalen Tumoren. (A) zeigt die 10 ersten hypermethylierten Cor- und Ups- Promotor Regionen (DMRs) und (B) die ersten 10 hypomethylierten Cor- und Ups- Promotor Regionen (DMRs) der Kohorte 1. Die rechte Tabelle gibt die Lokalisation der jeweiligen DMR auf dem Chromosom und ihre *Start*- und *End*-Position wieder, sowie die Vorkommenshäufigkeit der DMR in Bezug zu allen analysierten Proben. Der Farb-Code spiegelt die Intensität der Hyper- (rot) und der Hypomethylierung (blau) wieder. Je heller die Rot-Töne, umso stärker ist die Hypermethylierung. Mit dem Anstieg der hellen Blau-Töne wird die Zunahme der Hypomethylierung visualisiert.

Nach der Bestimmung der DMRs wurden diese in den beiden Kohorten miteinander verglichen. Hierfür wurde die Schnittmenge der hyper- bzw. hypomethylierten DMRs zwischen den beiden Kohorten gebildet. Die zusammengefassten Schnittmengen zwischen den Kohorten sind in Tab. 2 im Anhang hinterlegt. Es wurde eine Schnittmenge von 23 hyper- bzw. 12 hypomethylierten Cor- und Ups Genpromotoren zwischen den beiden Kohorten ermittelt. D.h. es konnten fast doppelt so viele hypermethylierte DMRs in beiden Kohorten bestimmt werden, als hypomethylierte DMRs. Basierend auf der gebildeten DMR-Schnittmenge der Proben beider Kohorten wurden die Funktionen der potentiellen hyper- und hypomethylierten Markergene mit Hilfe der UCSC- und GenCards-Datenbank ermittelt und zugeordnet (siehe Tabelle 3, Anhang). Die graphische Zusammenfassung der Genfunktionen ist in Abb. 28 zusammengefasst.

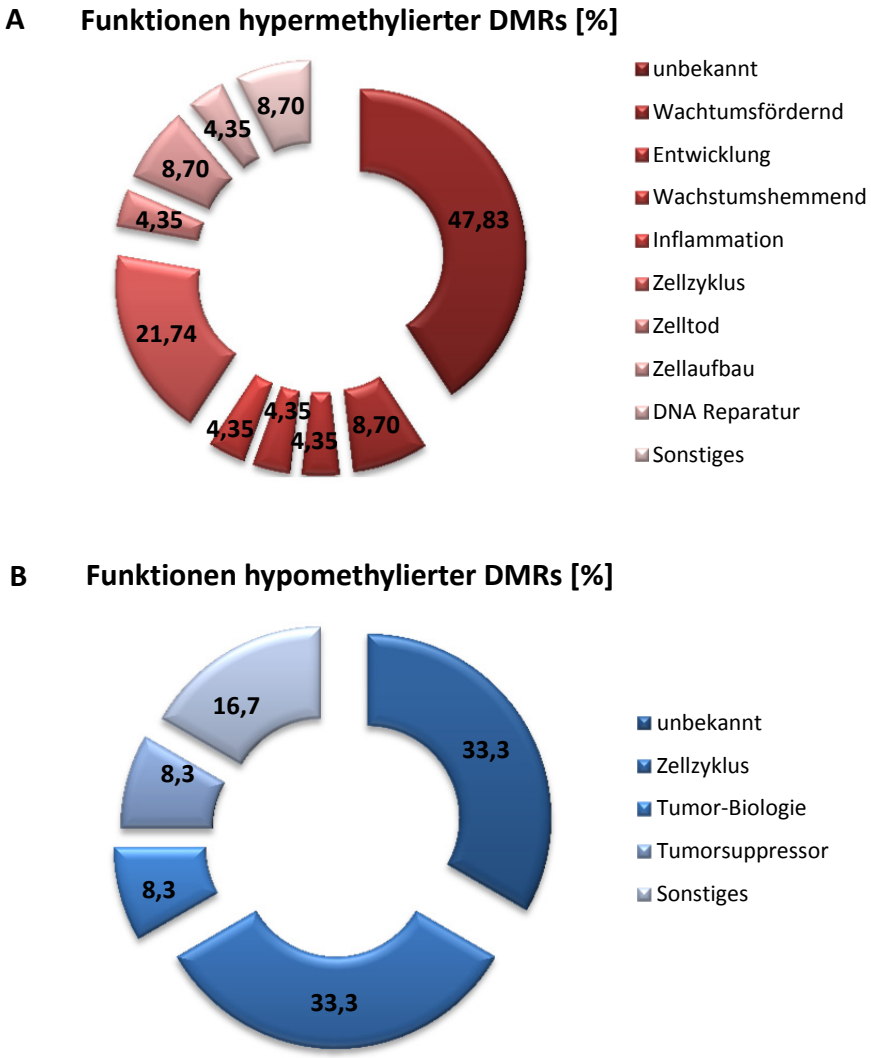


Abb. 28 Funktionsanalyse der hyper- und hypomethylierter DMRs in Gewebeproben von Harnblasenkarzinompatienten. Gezeigt ist die prozentuale Zuordnung der Funktionen für die 23 hyper- (A) sowie die 12 hypomethylierten DMRs (B), die mit Hilfe der UCSC- und GenCards-Datenbank bestimmt wurden. Die DMRs resultieren aus der entstandenen DMR-Schnittmenge beider Kohorten.

Die Analyse der hypermethylierten DMRs zeigt, dass nur bei ca. 52 % der Gene eine Funktion bestimmt werden konnte (Abb. 28 A), während für ca. 48 % der Gene bislang noch keine Funktion bekannt ist. Die meisten Gene sind an wachstumsfördernden Zellprozessen beteiligt.
Die Funktionsbestimmung der hypomethylierten DMRs (Abb. 28 B) zeigt, dass die Menge der Gene mit unbekannter Funktion mit 33 % geringer ausfällt, als die der hypermethylierten DMRs. Darüber hinaus sind die meisten Gene an Zellzyklusprozessen (33 %) beteiligt. Zusätzlich lässt das Ergebnis erkennen, dass genauso viele hypomethylierte Gene (8,3 %) bestimmt werden konnten, die an der Tumorbiologie beteiligt sind bzw. als Tumorsuppressorgene fungieren.

3.3.2 Methylierungsanalysen im Gewebe, Blutplasma und Urin des Harnblasenkarzinoms

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass in DNA-Proben von zwei unabhängigen Gewebekohorten DMR-Schnittmengen zwischen den hyper- als auch den hypomethylierten DMRs existieren, wurde in weiteren globalen Methylierungsuntersuchungen die Frage geklärt, ob diese DMRs und damit potentielle epigenetische Biomarker, ebenfalls in Körperflüssigkeiten wie dem Urin und dem Blutplasma der Blasentumorpatienten auftreten.
Um diese Fragestellung zu beantworten wurde parallel zu der Untersuchung der Gewebeproben der Kohorte 2 die DNA aus präoperativen Blutplasma- sowie Urinproben der gleichen Tumorpatienten und gesunden Probanden mittels der NimbleGen Plattform analysiert. Dabei wurde die Urin-DNA in eine zelluläre und freie DNA-Fraktion unterteilt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tumorzellen in der Lage sind ihre DNA in das Lummen und damit in den Urin zu entlassen.
Durch die Bestimmung der DMRs in den Körperflüssigkeiten konnte geklärt werden, ob in den Urin-Fraktionen bzw. im Blutplasma die gleichen DMRs detektiert werden können wie in den Tumorgeweben. Dies kann eine Evidenz dafür liefern, dass Tumor-DNA im Urin vorhanden ist und für eine nichtinvasive Diagnostik genutzt werden kann.
Nach der bioinformatischen Bestimmung der DMRs im Blutplasma sowie der zellulären und freien DNA aus Urin, wurden erneut DMR-Schnittmengen gebildet. Dabei wurde als erstes die Schnittmenge der hyper- bzw. der hypomethylierten Regionen zwischen den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2 und den Gewebeproben

der Kohorte 1 erstellt. Im zweiten Schritt erfolgte die Bildung der DMR-Schnittmenge zwischen den Gewebeproben der Kohorte 2 und der dazugehörigen Blutplasma- und Urin-Proben. In den Tabellen 4-7 im Anhang sind die beschriebenen detektierten hyper- als auch hypomethylierten DMR-Schnittmengen aufgelistet. Die Abb. 29 zeigt die graphisch zusammengefassten Schnittmengen (%) der ermittelten hypermethylierten Gene, die zwischen der Kohorte 1 (A) sowie der Kohorte 2 (B) und dem Blutplasma bzw. der zellulären und freien Urin-Fraktion bestimmt wurden.

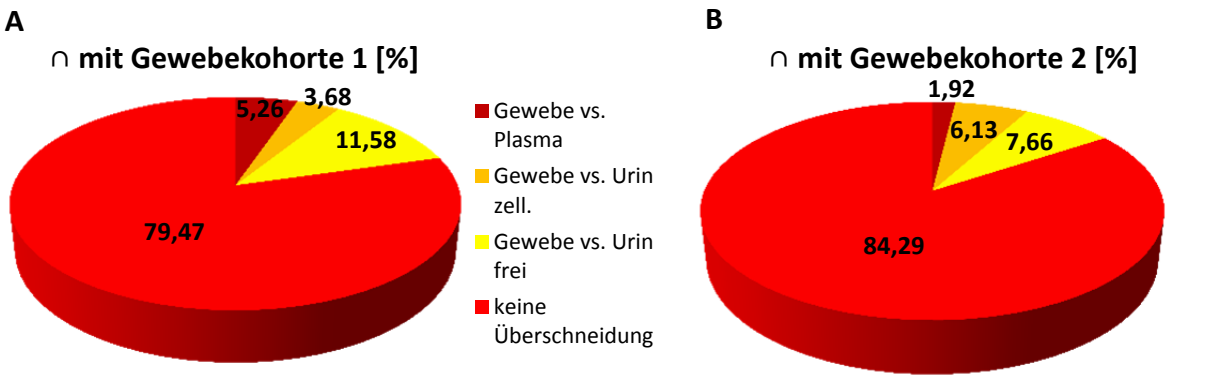


Abb. 29. Schnittmenge der hypermethylierten DMRs zwischen der Gewebe- und Blutplasma-DNA bzw. zellulären und freien DNA aus Urin von Harnblasenkarzinompatienten. (A) zeigt die DMRs–Schnittmenge zwischen der Kohorte 1 und den Körperflüssigkeiten (Blutplasma, zellulärer und freier DNA aus Urin) der Kohorte 2. (B) zeigt die DMRs-Schnittmenge zwischen den Gewebeproben der Kohorte 2 und den dazugehörigen Körperflüssigkeiten (Blutplasma, zellulärer und freier DNA aus Urin).

Es ist zu erkennen, dass die DMR-Schnittmengen beider Gewebekohorten mit denen der Körperflüssigkeiten zu ca. 80 % keine Überschneidung zeigen. Aber es wurden im Blutplasma und den Urin-Fraktionen gemeinsame DMRs identifiziert, die auch in den Gewebeproben ermittelt wurden. Dabei konnte in beiden Schnittmengen (Abb. 29 A und B) beobachtet werden, dass die größte Anzahl der überschneidenden DMRs zwischen dem Gewebe und der freien Urin-Fraktion besteht. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die DMR-Schnittmenge zwischen der Gewebekohorte 1 und dem Blutplasma um 30% höher ausfällt, als die DMR-Schnittmenge mit der zellulären Urin-Fraktion. Im Vergleich dazu, fiel die DMR-Schnittmenge zwischen der Gewebekohorte 2 und dem Blutplasma mit nur 1,92% am geringsten aus, während die DMR-Schnittmenge mit der zellulären Urin-Fraktion mit nur 1,5 % geringer ausfiel, als die der freien Urin-Fraktion.

Parallel zu den Schnittmengen der hypermethylierten Gene, wurden die gleichen Schnittmengenvergleiche für die hypomethylierten DMRs gebildet. D.h. es wurde hier ebenfalls graphisch (Abb. 30) die Schnittmenge zwischen den ermittelten

hypomethylierten Gene der Gewebekohorte 1 und dem Blutplasma bzw. der zellulären und freien Urin-Fraktion der Probenkohorte 2 bestimmt (A). Als auch die DMR-Schnittmenge zwischen dem Gewebe sowie dem Blutplasma und Urin, die alle aus der gleichen Kohorte 2 stammen (B).

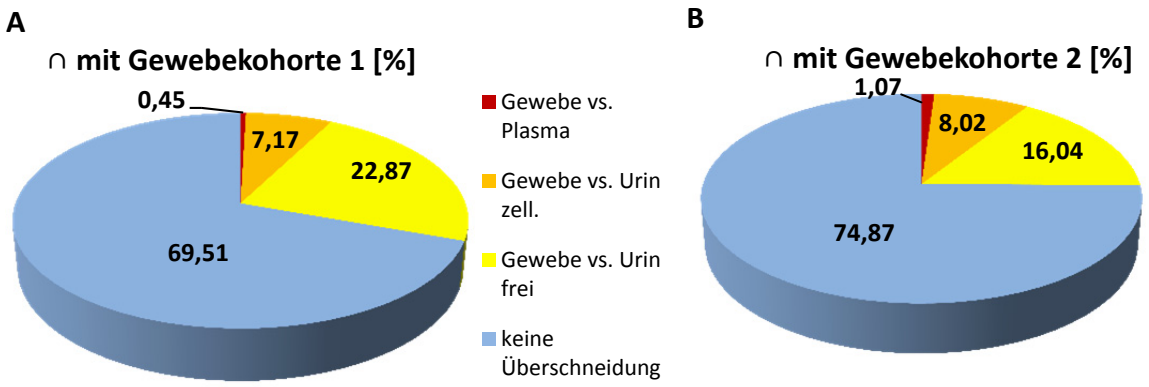


Abb. 30 Schnittmenge der hypomethylierten DMRs zwischen der Gewebe- und Blutplasma-DNA bzw. zellulären und freien DNA aus Urin von Harnblasenkarzinompatienten. (A) zeigt die DMRs–Schnittmenge zwischen der Kohorte 1 und den Körperflüssigkeiten (Blutplasma, zellulärer und freier DNA aus Urin) der Kohorte 2. (B) zeigt die DMRs-Schnittmenge zwischen den Gewebeproben der Kohorte 2 und den dazugehörigen Körperflüssigkeiten (Blutplasma, zelluläre und freier DNA aus Urin).

Der Schnittmengenvergleich der hypomethylierten DMRs (Abb. 30) zwischen den Gewebekohorten und den Körperflüssigkeiten zeigt, dass die größte DMR-Überschneidung zwischen den Gewebeproben und der freien Urin-Fraktion vorliegt. Diese ist sogar um 6,8% in der ersten Kohorte höher, als in der zweiten. Darüber hinaus bildet die DMR-Schnittmenge zwischen den Gewebeproben beider Kohorten und der zellulären Urin-Fraktion die zweithäufigste DMR-Überschneidung, die mit 7 bzw. 8% relativ gleich hoch ausfällt. Die DMR-Schnittmenge zwischen den Gewebeproben und dem Blutplasma fällt im Vergleich zu den Urin-Fraktionen mit 0,5 bzw. 1% am geringsten aus. Zusätzlich zeigt die Analyse, dass in den hypomethylierten DMRs eine ca. 12% höhere Überschneidung zwischen den DMRs der Gewebeproben und den Körperflüssigkeiten vorliegt, als in den der hypermethylierten.

3.3.3 Globale Methylierungsanalysen der microRNAs im Harnblasenkarzinom

Mehrere Studien haben gezeigt, dass viele Krebsarten mit aberranten miRNA-Expressionen assoziiert sind. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass der Verlust oder der Zugewinn von miRNA-Funktionen zur Krebsentwicklung und zum kontinuierlichen Tumorwachstum beisteuern kann (Calin et al., 2004, Shenouda und Alahari, 2009). Darüber hinaus besitzen verschiedene Krebsarten in

unterschiedlichen Stadien individuelle miRNA-Expressionsprofile. Dies lässt den Schluss zu, dass miRNAs das Potential bergen potente Biomarker für die Diagnose, Prognose und Nachsorge zu stellen (Song und Meltzer, 2011, Corsini et al., 2012, Cortez et al., 2012, Qi und Mu, 2012). Allerdings ist über die Hyper- wie auch die Hypomethylierung der miRNAs noch nicht viel bekannt. Lujambio et al. konnten 2007 und 2008 nachweisen, dass eine aberrante Hypermethylierung der CpG-Inseln mit der Stilllegung von miRNAs assoziiert sein kann. Des Weiteren entdeckten Dudziec et al. 2010 eine Kohorte an miRNAs, die anfällig für epigenetische Stilllegungen sind. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit zusätzlich die Methylierung der miRNAs in der Gewebe-, Blutplasma- und Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten als auch gesunden Probanden betrachtet.

3.3.3.1 Methylierungsanalysen der microRNAs im Harnblasenkarzinom

Mit Hilfe der DMR-Liste der untersuchten Gewebeproben der Probenkohorten von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden wurden im ersten Schritt alle ermittelten hyper- und hypomethylierten miRNAs bestimmt. Anschließend wurde die Anzahl der detektierten, differentiell methylierten miRNAs in den Gewebeproben beider Kohorten in Bezug zueinander gesetzt. Die Abb. 31 zeigt die Verteilung der gefundenen hyper- und hypomethylierten miRNAs in den zwei Kohorten.

Von den insgesamt 190 detektierten hyper- bzw. 223 hypomethylierten DMRs der Kohorte 1 sind nur 12 (ca. 2,9%) bzw. 6 (ca. 1,5%) microRNAs. In der.zweiten Kohorte der Blasentumorproben sind in den 261 hyper- bzw. 187 hypomethylierten DMRs 16 (ca. 3,6%) bzw. 6 (1,3%) microRNAs ermittelt worden.

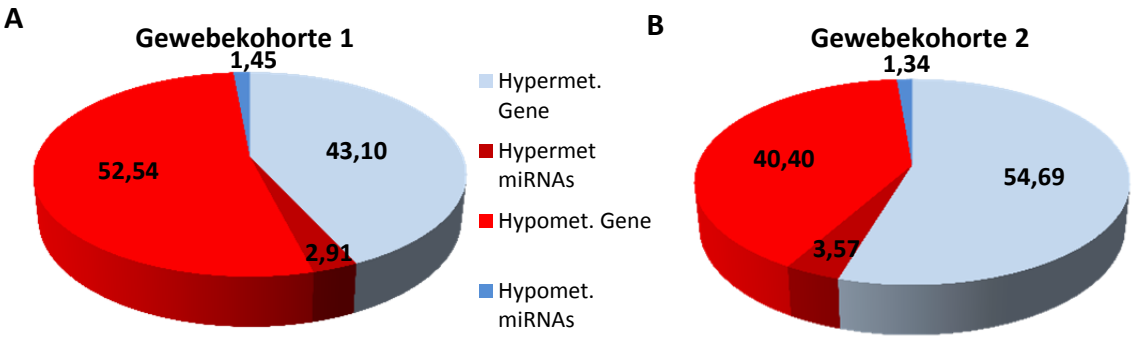


Abb. 31 Häufigkeit der ermittelten differentiell methylierten microRNAs in Gewebe-DNA von Harnblasenkarzinompatienten im Vergleich zu allen detektierten DMRs. Nach Bestimmung der genomweiten hyper- und hypomethylierten DMRs in beiden Kohorten wurde die prozentuale Menge der darin enthaltenen microRNAs bestimmt. In (A) ist die Häufigkeit der differentiell methylierten miRNAs der Kohorte 1 und in (B) die der Kohorte 2 gezeigt.

In der Tab. 1 sind alle bestimmten hypo- und hypermethylierten miRNAs der Kohorte 1 (A) und der Kohorte 2 (B) aufgelistet. Die tabellarische Zusammenfassung der ermittelten miRNAs zeigt, dass in der zweiten Kohorte 25 % mehr hypermethylierte miRNAs detektiert wurden, als in der ersten. Der Vergleich der ermittelten hypomethylierten miRNAs in beiden Kohorten dagegen zeigt, dass in beiden Kohorten jeweils 6 hypomethylierte miRNAs bestimmt wurden.

A

Gewebekohorte 1	
Hypermethylierte miRNAs	MIR4269-Cor
	MIR4780-Ups
	MIR758-Cor
	MIR2115-Cor
	MIR874-Cor
	MIR4302-Ups
	MIR30C1-Cor
	MIR31HG-Cor
	MIR1185-1-Ups
	MIR4493-Ups
	MIR500B-Ups
	MIR4427-Cor
Hypomethylierte miRNAs	MIR4522-Cor
	MIR662-Ups
	MIR645-Ups
	MIR639-Ups
	MIR4518-Ups
	MIR1225-Ups

B

Gewebekohorte 2	
Hypermethylierte miRNAs	MIR30C1-Cor
	MIR4493-Ups
	MIR362-Cor
	MIR330-Ups
	MIR192-Cor
	MIR518B-Ups
	MIR4518-Cor
	MIR4745-Cor
	MIR500B-Ups
	MIR516B2-Ups
	MIR54O2-Cor
	MIR658-Cor
	MIR520B-Cor
	MIR4489-Ups
	MIR516B2-Cor
	MIR506-Cor
Hypomethylierte miRNAs	MIR3162-Cor
	MIR526A2-Cor
	MIR524-Ups
	MIR5703-Cor
	MIR5003-Ups
	MIR4649-Cor

Tab. 1 Hyper- und hypomethylierte miRNAs in Gewebe-DNA Proben von Harnblasenkarzinompatienten. Die Tabelle zeigt alle hyper- und hypomethylierten miRNAs, die in Gewebe von Harnblasenkarzinompatienten der Kohorte 1 (A) und Kohorte 2 (B) bestimmt wurden.

Im nächsten Schritt wurde die Schnittmenge zwischen den hyper- bzw. hypomethylierten miRNAs gebildet, die in beiden Kohorten ermittelt wurden. Dabei wurden insgesamt 3 hypermethylierte miRNAs (30C1, 500B und 4493) ermittelt, die in den beiden analysierten Kohorten vorkommen. Im Vergleich hierzu konnte keine Schnittmenge der hypomethylierten miRNA zwischen den beiden Kohorten beobachtet werden. In Tab. 2 sind die Schnittmengen der hypermethylierten miRNAs

und die Häufigkeit ihres Vorkommens in allen Proben beider Probenkohorten gezeigt.

miRNA	Häufigkeit in Prozent (%) aller Proben	
	Kohorte 1	Kohorte 2
MIR30C1	60	83,33
MIR500B	70	33,33
MIR4493	50	50

Tab. 2 Häufigkeit des Vorkommens der hypermethylierten miRNAs 30C1, 500B und 4493 in allen Proben der beiden Probenkohorten.

Mit Hilfe der Datenbank *miRBase* wurden anschließend die Zieltargets der schnittmengenbildenden miRNAs ermittelt. Die jeweils ersten 20 Zieltargets und ihre Funktionen sind in Tab. 8 im Anhang beigefügt. Der Vergleich der ersten 20 Zieltargets der hypermethylierten miRNAs (30C1, 500B und 4493) beider Kohorten hat ergeben, dass zwischen den drei miRNAs keine Überschneidungen zwischen den Targets der miRNAs besteht. Allerdings ergab der gleichzeitig durchgeführte Sequenzvergleich der miRNAs 30C1, 500B und 4493, dass zwischen der miRNA 500B und 4493 eine ca. 66 %tige Ähnlichkeit existiert, welche in Abb. 32 dargestellt ist.

```
                10        20        30        40        50        60
miRNA 500B      CCCCUCUCUAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGAGUGCUUUCUGAAUGCAGUGCACCCAGGCA
                ::...:  :.::. :..: .::   .::    :.:.:.: ::: ::  . . .:::  .
miRNA 4493      CCUUCCGGUGAUUAUCACAGCC---AUGCCUUUACCUCCAGAAGGC--C-UUUCCA--U-
                  20        30          40        50          60

                70
miRNA 500B      AGGAUUCUGC
                    .:::::.
miRNA 4493      ----CUCUGU
                      70
```

Abb. 32 Alignment der miRNA 500B- und miRNA 4493-Sequenz. Eine Übereinstimmung innerhalb der verglichenen Sequenzen wird mit einem Doppelpunkt angezeigt. Eine Purin-Purin bzw. Pyrimidin–Pyrimidin Übereinstimmung mit einem singulären Punkt.

3.3.3.2 Methylierungsanalysen der microRNAs in Blutplasma und Urin von Harnblasenkarzinompatienten

Da die Methylierung der miRNAs von potentiellem Nutzen für die Diagnose als auch die Nachsorge von Harnblasenkarzinomen sein könnte, war es von Bedeutung zu überprüfen, ob die in der Gewebe-DNA von Harnblasenkarzinompatienten entdeckten, differentiell methylierten miRNAs, ebenfalls im Blutplasma und der zellulären bzw. freien Urin-Fraktion vorkommen. Dies könnte für die Entwicklung eines leicht zugänglichen Diagnostikums, zum Nachweis beispielsweise früher

Harnblasenkarzinomen, von Bedeutung sein. Daher wurden aus den DMR-Listen der Kohorte 2 der Blutplasma- sowie der Urinproben, alle hyper- und hypomethylierten miRNAs separiert. Diese sind im Anhang (Tab. 9) hinterlegt. Darüber hinaus wurde das Verhältnis der vorkommenden hyper- und hypomethylierten miRNAs in den Blutplasmaproben sowie der zellulären bzw. freien Urin-Fraktion bestimmt. In Abb. 33 ist die prozentual angegebene Menge der ermittelten hyper- und hypomethylierten miRNAs in den Blutplasmaproben und den beiden Urin-Fraktionen dargestellt.

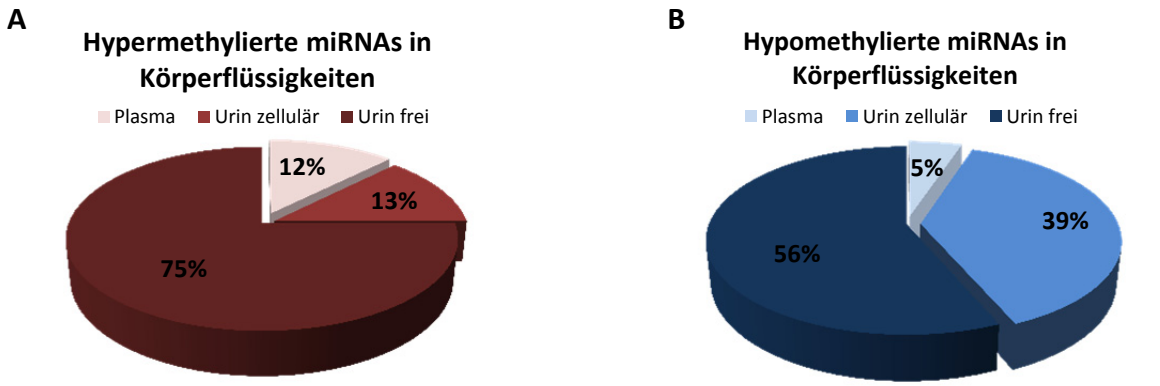


Abb. 33 Häufigkeit der hyper- und hypomethylierten miRNAs in den Blutplasmaproben und in der freien und zellulären DNA des Urins von Harnblasenkarzinompatienten. (A) zeigt die ermittelte Häufigkeit der hyper- und (B) die der hypomethylierten miRNAs in den Blutplasma- und Urinproben der Kohorte 2, die mittels der globalen DMR-Listen bestimmt wurden.

Es ist zu sehen, dass sowohl der Anteil der hyper- als auch der hypomethylierten miRNAs in der freien DNA aus Urin mit 75% bzw. 56% am höchsten ausfällt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Menge der hypermethylierten miRNAs aus dem Blutplasma (12%) und der zellulären DNA des Urins (13%) relativ gleich hoch ausgefallen ist. Im Vergleich dazu fiel der Anteil der im Blutplasma bestimmten hypomethylierten miRNAs mit 5% am geringsten aus. Darüber hinaus betrug der prozentuale Unterschied zwischen den ermittelten, hypomethylierten miRNAs der freien und zellulären DNA-Fraktion 17%. Dagegen wurden in der freien DNA 62% mehr hypermethylierte miRNAs beobachtet als in der zellulären.

Nach der Bestimmung der differentiell methylierten miRNAs im Blutplasma sowie im Urin der 2. Kohorte, erfolgte die Ermittlung der hyper- und hypomethylierten miRNA-Schnittmengen zwischen den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2 und den Gewebeproben beider Kohorten. Die differentiell methylierten miRNA-Schnittmengen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

A

Schnittmenge hypermethylierter miRNAs		
Gewebekohorte	Körperfl.	microRNA
∩ Gewebekohorte 1	Blutplasma	-
	Urin zell.	-
	Urin frei	MIR758-Cor
∩ Gewebekohorte 2	Blutplasma	-
	Urin zell.	MIR516B2-Cor
	Urin frei	MIR506-Cor

B

Schnittmenge hypomethylierter miRNAs		
Gewebekohorte	Körperfl.	microRNA
∩ Gewebekohorte 1	Blutplasma	-
	Urin zell.	-
	Urin frei	MIR662-Ups
		MIR4522-Cor
∩ Gewebekohorte 2	Blutplasma	-
	Urin zell.	MIR526A2-Cor
	Urin frei	MIR524-Ups

Tab. 3 Schnittmenge der hyper- und hypomethylierten miRNAs zwischen den Gewebe-, Blutplasma- und urinären DNA-Proben von Harnblasenkarzinompatienten. Gezeigt sind alle hyper- (A) und hypomethylierten (B) miRNAs, die sowohl in einer der Körperflüssigkeiten als auch in Gewebeproben vorkommen.

Der Schnittmengenvergleich der differentiell methylierten miRNAs zwischen den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2 und dem Gewebe der beiden Probenkohorten zeigt, dass keine Überschneidung der hyper- als auch hypomethylierten miRNAs zwischen den beiden Gewebeproben und dem Blutplasma besteht. Darüber hinaus bildet die hypermethylierte miRNA 758 den einzigen Schnittmengenkandidaten zwischen dem Gewebe der Kohorte 1 und der freien DNA des Urins. Im Vergleich dazu, bilden die hypermethylierten miRNAs 516B2 und 506 die Schnittmenge zwischen der Gewebekohorte 2 und der Urin-DNA.

Die hypomethylierte miRNA 662 und 4522 bilden die einzigen Schnittmengenkandidaten zwischen der Gewebekohorte 1 und der freien Urin-Fraktion. Es konnte ebenfalls keine Schnittmenge zwischen dem Gewebe und der zellulären DNA bestimmt werden. Im Bezug hierzu, ist aus der Schnittmengenbildung zwischen der Gewebekohorte 2 und der zellulären bzw. freien DNA die miRNA 526A2 bzw. miRNA 524 hervorgegangen.

In der abschließenden Analyse wurden Zieltargets der miRNAs bestimmt, die als Schnittmengenkandidaten zwischen den Körperflüssigkeiten und den Gewebkohorten hervorgegangen sind. Die ersten 20 Zieltargets der Schnittmengenbildenden hyper- und hypomethylierten miRNAs aus Tabelle 3 sind im Anhang (Tab. 10-11) beigefügt.

4. Diskussion

4.1 LINE-1 Methylierung und Transkription im Harnblasenkarzinom

4.1.1 Optimierung einzelner Parameter und relative Quantifizierung der LINE-1 Methylierung mittels MSPCR in der zellulären und freien DNA aus dem Urin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom

Eine optimierte Isolationsmethode ist Voraussetzung dafür, dass qualitativ gute DNA in ausreichender Menge aus dem Urin gewonnen werden kann, so dass an ihr Untersuchungen zum DNA Methylierungsstatus erfolgen können (Beermann et al. 2011). Hierbei sollten solche Inhibitoren weitgehend entfernt werden, die in einer späteren DNA-Konvertierung mittels der Bisulfitreaktion und einer PCR stören würden.

Daher wurden vor Beginn der eigentlichen Messreihe verschiedene DNA-Isolations-Kits getestet und zusätzlich die Auswirkungen des Enzyms Protease sowie der Einfluss von EDTA auf die DNA-Integrität bzw. -Degradation zu unterschiedlichen Lagerungstemperaturen des Urins untersucht. Denn neben der freien DNA, den Erythrozyten, Leukozyten, Plattenepithel- und Urothelzellen sind auch Bakterien, Pilze, Salze (z.B. Calciumoxalat) und Kristalle aus Leucin und Thyrosin im Urin vorhanden, die sich negativ auf die DNA-Extraktion und beispielsweise die PCR auswirken können. So führt z.B. mitextrahierte mikrobielle Fremd-DNA zur Hemmung der PCR-Reaktion (Prinz et al., 1993).

Diese Experimente haben gezeigt, dass auf die Zugabe der Protease zu den Urinproben nur dann verzichtet werden kann, wenn zwischen der Abgabe des Urins und dessen Einlagerung bei -20°C weniger als 4 h liegen. Erst ab einer 4 stündigen Inkubationszeit bei RT zeigte die Protease einen schützenden Effekt vor DNA-Degradationsprozessen in den Urinproben. Durch die Zugabe von Protease wird die Effizienz der PCR auch nach einer 8- bzw. 16-stündigen Lagerung des Urins bei RT weitgehend beibehalten, was zu besseren Ergebnissen des Nachweises der DNA-Methylierung mittels der *real time* MSPCR führt. Da jedoch innerhalb der ersten 4 Inkubationsstunden keine starke Beeinträchtigung der PCR-Effizienz beobachtet werden konnte, kann man davon ausgehen, dass während dieses Zeitfensters keine signifikanten DNA-Degradationsprozesse durch DNAsen stattfinden. Diese Experimente erbrachten das Ergebnis, dass eine direkte Zugabe der Protease zu

den abgegebenen Urinproben nicht notwendig ist, solange diese nach Abgabe sofort eingefroren werden und nur für kurze Zeit bei RT verbleiben. Die Rücksprache mit den Klinikern hat ergeben, dass im Alltag nicht immer gewährleistet werden kann, dass die Urinproben zeitnah eingelagert werden können, sodass für die zukünftigen Urinproben Protease direkt nach Abgabe hinzugefügt werden muss, um DNA-Degradationsprozesse zu minimieren.

In weiteren Untersuchungen wurden die Auswirkungen von EDTA auf die Degradation der DNA des Urins zu unterschiedlichen Lagerungszeiten, bei verschiedenen Temperaturen geprüft. Dabei konnte durch das Hinzufügen von EDTA zu den Urinproben vor allem eine Zunahme der freien Urin-DNA bei allen Lagerungstemperaturen beobachtet werden. Dagegen wurde eine erhöhte Ausbeute der zellulären DNA aus Urin nur bei -20°C detektiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Lagerung von Urinproben, die normalerweise bei -20°C erfolgt, nicht unproblematisch ist und besonders Auftauprozesse der Proben zur Degradation führen können. Milde et al. beschrieben bereits 1999 den positiven Effekt des Chelatbildners EDTA im Urin, der zu einer Steigerung der DNA-Ausbeute bei verschiedenen Lagerungstemperaturen führt. Durch die Fähigkeit des Chelatbildners, die im Urin enthaltenden zweiwertigen Metallkationen zu binden, die essentiell für die Aktivität von Nukleasen sind, kann die DNA-Degradation durch die im Urin enthaltenen DNasen inhibiert werden. Der von Milde et al. beschriebene Fall, dass der EDTA-Effekt mit Abnahme der Temperatur stärker wird, konnte hier nur bei der zellulären DNA-Fraktion bestätigt werden, bei der zuvor der Urin bei -20°C gelagert wurde.

Bereits 1987 beschrieben Gustafson et al. und Bomjen et al. im Jahre 1996 den positiven Einfluss von EDTA auf die Lagerung von Blut. Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass EDTA durch die Bindung des Metallkations Calcium ebenfalls mikrobielles Wachstum im Urin hemmen kann, da gramnegative Bakterien dieses zum Aufbau ihrer Zellwände benötigen. Steht das Calcium nicht zur Verfügung, werden die Bakterien lysiert. Somit kann durch die Zugabe von EDTA ein möglicher negativer Effekt durch Fremd-DNA auf die PCR ggf. vermieden werden.

Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass die Zugabe von EDTA zu den Urinproben von großem Vorteil ist, um Abbauprozesse die direkt nach der Harnabgabe einsetzen (Beermann et al. 1999, Pötsch et al., 1992) zu verhindern, konnte dies von den klinischen Kooperationspartnern im Alltag nicht durchgeführt

werden. Dennoch ist es für zukünftige Untersuchungen und Analysen von Urinproben von großer Bedeutung, dass den Urinproben direkt nach der Entnahme das Enzym Protease und EDTA beigefügt wird um DNA-Degradationen zu minimieren und die PCR-Effizienz positiv zu beeinflussen. Im Rahmen der weiteren Kollaboration unserer Arbeitsgruppe mit unseren klinischen Partnern wurden diese in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in die SOP zur Probensammlung aufgenommen.

Im darauf folgenden Optimierungsschritt wurden die optimalen Primer-konzentrationen für die *real time* MSPCR-Messungen der DNA aus Urin ermittelt, die für das neue Normierungsverfahren „ideolokale Normierung“ (IDLN) eingesetzt werden sollten. Es konnte nachgewiesen werden, dass niedrigere Primer-konzentrationen zu höheren ΔΔCt-Werten führen. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Annealing-Temperatur entscheidend für eine spezifische Bindung an die Zielsequenz ist, sondern auch die Optimierung der eingesetzten Konzentrationen der methylierungsspezifischen Primer zu einer effizienteren Amplifikation der spezifischen MSPCR-Produkte führt. Die Auswahl der Primer sowie ihr optimierter Einsatz (Annealing-Temperatur, Primerkonzentration) sind von einer besonderen technischen Bedeutung. Allerdings ist das Finden von geeigneten Primer-Bindungsstellen, besonders derer die innerhalb ihrer Sequenz eine größere Anzahl an CpGs (4-5) besitzen, schwierig und kann manchmal misslingen (Wojdacz und Hansen, 2006).
Es kommt hinzu, dass DNA-Fragmente mit Unterschieden in Ihrer Methylierung nach der Bisulfit-Konvertierung substantielle Unterschiede in ihrem Cytosin-Gehalt aufweisen, so dass stark methylierte DNA-Fragmente zu C-reicher DNA, während unmethylierte DNA-Abschnitte zu T-reichen Sequenzen führen können (Warnecke et al., 1997). Diese Studie untermauerte die Hypothese, dass DNA-Regionen mit zahlreichen CpG-Dinukleotiden eher Sekundärstrukturen ausbilden als unmethylierte Sequenzen. Angesichts der Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten mit Tumoren unterschiedlichen Stadiums kann davon ausgegangen werden, dass die CpGs der zu amplifizierenden Fragmente heterogen methyliert sind, so dass damit gerechnet werden sollte, dass eine unterschiedlich starke Sekundärstruktur-ausbildung durchaus ein Störfaktor sein kann. Diesem wurde jedoch durch die Optimierung der Annealing-Temperatur Rechnung getragen (vgl. Shen et al., 2007).

Auf Grund des erhöhten Vorkommens an Cytosinen nach der Bisulfit-Behandlung der methylierten DNA, besitzt diese im Vergleich zu unmethylierter DNA eine höhere Schmelztemperatur.

LINE-1 ist mit über 520.000 Kopien eine der häufigsten Sequenzen im humanen Genom. Jedoch haben nur etwa 100 davon die Fähigkeit zur Transposition (Sunami et al., 2008, Moran et al., 1996) und können aktiv werden. Störungen von einzelnen Genen durch LINE-1 Insertionen wurden bereits in mehreren humanen Krebsarten wie Brust- (Morse et al., 1988) und Darmkrebs (Miki et al., 1992) sowie anderen genetischen Erkrankungen wie z.B. der Muskeldystrophie (Holmes et al., 1994) und Hämophilie A (Dombroski et al., 1993) gefunden. Verschiedene Studien liefern Evidenz dafür, dass die LINE-1 Hypomethylierung ein frühes Ereignis in der Entwicklung des Urothelkarzinoms ist (Florl et al., 1999, Neuhausen et al., 2006), was die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hierzu unterstreicht.
Allerdings ist über die LINE-1 Methylierung aus Urin noch nicht viel bekannt, während es bereits erste Ergebnisse für Gewebe aus dem Urothel gibt. So haben Studien von Florl et al. sowie Kreimer et al. gezeigt, dass LINE-1 im normalen Urothelgewebe stark methyliert vorliegt, während das Gewebe von Urothelkarzinomen signifikant hypomethyliert ist (Florl et al., 1999; Kreimer et al., 2013). Minimalinvasive Diagnostikverfahren, die auf epigenetischen Untersuchungen von Urin oder Blutplasma beruhen, stellen eine Möglichkeit dar, Patienten vor Biopsien und Übertherapien zu bewahren. Zusätzlich kann der Einsatz minimalinvasiver Testverfahren den psychischen Stress und die kostenintensive Überwachung der Harnblasenkarzinompatienten reduzieren.
Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein geeignetes DNA-Isolationsverfahren aus Urin erarbeitet und ein *real time* MSPCR basiertes Messverfahren zur sensitiven Messung der LINE-1 Methylierung aus Urin DNA-Proben optimiert. Nach der Etablierung des DNA-Isolationsverfahrens aus Urinproben, sowie der MSPCR-Bedingungen, wurde das Biomarkerpotential der LINE-1 Methylierung in zellulärer und freier Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten mittels des IDLN-Verfahrens untersucht. Eine Unterscheidung zwischen der zellfreien DNA, die von zerstörten Zellen freigesetzt wird und der DNA aus intakten Zellen des Urins, könnte einen Mehrwert für die Diagnose darstellen. Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Menge der freien DNA in den Körperflüssigkeiten von Karzinompatienten erhöht ist

(Szarvas et al., 2007). Darüber hinaus liegt Evidenz dafür vor, dass im Urin-Überstand freie DNA enthalten ist, die hauptsächlich vom Tumor abstammt (Zancan et al., 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass in der freien DNA aus Urin ggf. ein höherer Anteil an Tumor-DNA enthalten sein könnte, als in der zellulären Urin-DNA und damit wäre ggf. ein Nachweis der LINE-1 Hypomethylierung aus der freien DNA des Urins ggf. von vorranginger Bedeutung für die Diagnose des Harnblasenkarzinoms. Dies wird auch in der Literatur so beschrieben, wonach die Detektion differentiell methylierter freier DNA als einer der chancenreichsten, zukunftsträchtigsten Ansätze zur Risiko-Einschätzung von Krebspatienten angesehen wird (Schwarzenbach et al., 2011).

Doch obwohl die LINE-1 MSPCR-Messung der freien Urin DNA-Proben im Vergleich zur zellulären DNA aus Urin einen relativ höheren LINE-1 Methylierungsgrad gezeigt hat, wurde in beiden Urin-DNA-Fraktionen eine ähnlich hohe Sensitivität in der zellulären (92%) wie in der freien DNA (86%) ermittelt. Gleichzeitig konnte jedoch eine Spezifität von nur 37,5% in beiden DNA Fraktionen bestimmt werden und damit eine deutliche Tendenz zur LINE-1 Hypermethylierung in den gewählten Kontroll-Urinproben nachgewiesen werden. Aufgrund des geringfügigen Unterschiedes in der Sensitivität und Spezifität konnte die aufgestellte Hypothese, dass eine der beiden DNA-Fraktionen aus dem Urin besser zum Nachweis der LINE-1 Hypomethylierung geeignet ist, nicht bestätigt werden.

Gründe für die leicht erhöhten LINE-1 Methylierungswerte der freien Urin-DNA könnten zu einem in der DNA-Herkunft als auch in der DNA-Fragmentgröße liegen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit Tumoren unterschiedlicher Stadien eine erhöhte Menge an freier DNA aufweisen als gesunde Probanden, was ggf. auf das Vorhandensein der sie freisetzenden Tumorzellen zurückzuführen ist (Schwarzenbach et al., 2011; Wimberger et al., 2011). Darüber hinaus zeigten Bendich et al. bereits 1965, dass doppelsträngige, freie DNA durchaus von größerer Beständigkeit charakterisiert ist, als beispielsweise freie einzelsträngige DNA.

Die Größe der freien DNA variiert dabei zwischen 70 und 200 bp bei kleinen Fragmenten und großen Fragmenten, deren Länge etwa 21 kb betragen kann (Jahr et al., 2001).

Erste Studien mit freier DNA haben gezeigt, dass hieraus die DNA-Methylierung von Retrotransposons wie den LINE-1 Elementen und den Alu-repeats bestimmt werden kann. Studien von Sunami et al., Tangkijvanich et al. und Umetani et al. konnten

nachweisen, dass repetitive DNA-Sequenzen, mit einer Größe von 200-400 bp, bevorzugt von lysierten Tumorzellen freigesetzt werden (Sunami et al., 2008; Tangkijvanich et al., 2007; Umetani et al., 2006), die keinen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod unterliegen und sie ggf. von Nutzen für die Diagnose und Prognose sein könnten (Schwarzenbach et al., 2011). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass LINE-1 Hypomethylierung in freier Serum-DNA als prognostischer Marker für hepatozelluläre Karzinome verwendet werden könnte (Tangkijvanich et al., 2007).

Es wird angenommen, dass die leicht erhöhte LINE-1 Methylierung, die in der freien Urin-DNA im Vergleich zu der zellulären Urin-DNA bestimmt wurde, auf die geringere Fragmentgröße der freien DNA zurückzuführen ist. Da sie um ein Vielfaches kürzer als die hochmolekulare, zelluläre DNA ist, hat das zur Folge, dass die freie urinäre DNA effizienter in der MSPCR amplifiziert wird, so dass sich dieser Effizienzzugewinn in der MSPCR in einer leicht erhöht erscheinenden DNA Methylierung niederschlägt.

Zusätzlich könnten sich Degradationsprozesse während der partiellen Denaturierung, die eine Folge der Bisulfit-Konvertierung ist, stärker auf die kürzeren freien Urin-DNA-Fragmente ausgewirkt haben als auf die hochmolekularen zellulären DNA-Sequenzen aus dem Urin. Dies könnte ebenfalls zu einer weiteren Einflussnahme auf die PCR-Effizienz geführt haben. Darüber hinaus ist eine komplette Konvertierung aller Cytosine in Uracile kritisch (Esteller, 2002), da immer die Möglichkeit besteht, dass einzelne Cytosine in Cytosin-reichen, langen Sequenzen nicht vollständig in Uracile umgewandelt werden. Dies kann ebenfalls zu Anzeige einer erhöhten LINE-1 Methylierung der heterogenen DNA-Proben beitragen.

Zugleich darf angenommen werden, dass in der zellulären Urin DNA-Fraktion anteilsmäßig vermehrt DNA von intakten Zellen wie den Erythrozyten, Leukozyten sowie abgelösten Urothel- bzw. anderen Epithelzellen enthalten ist, die auf Grund ihrer längeren Fragmente die Effizienz der Konvertierung der PCR beeinflussen kann.

Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass mit dem neuen IDLN-Verfahren die LINE-1 Methylierung in beiden Urin DNA-Fraktionen verlässlich bestimmt werden kann. Ferner konnte hier festgestellt werden, dass eine LINE-1 Hypomethylierung im Urin von Harnblasenkarzinompatienten mit unterschiedlichen Tumorstadien vorkommt. Bislang wurde die LINE-1 Hypomethylierung in Studien an Hand von

Zelllinien sowie Tumorgeweben von Harnblasenkarzinompatienten gezeigt (Florl et al., 1998; Wolff et al., 2010; van Bemmel et al., 2012).

Die niedrige Spezifität, die in der Messreihe detektiert worden ist, könnte zum einen durch die Größe der DNA-Fragmente begründet sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass DNA normaler apoptotischer Zellen stärker fragmentiert vorliegen kann, während Tumorzellen längere DNA entlassen können (Casadio et al., 2012). D.h. ein Teil der DNA-Proben von gesunden Probanden (Kontrollen) könnte auf Grund seiner kürzeren DNA-Fragmente effizienter amplifiziert worden sein. Zusätzlich muss die Auswahl der Kontroll-Urinproben, die von den klinischen Partnern gesammelt wurden kritisch betrachtet werden. Zu den Kontrollen wurden alle Patienten gezählt, die negativ auf Urothelkarzinome getestet worden sind. Diese können jedoch trotzdem an einem Harnleiterstein, Nebennierenadenom, einer Urocystitis oder Onkozytom erkrankt sein. Diese Krankheitsbilder könnten den „echten“ LINE-1 Methylierungsstatus maskieren und damit die Spezifität negativ beeinflusst haben. So ist aus der Studie von Fonseca et al. beispielsweise bekannt, dass auch in Nebennierenadenom Methylierungsveränderungen der Gene *CDKN2A, GATA4, BCL2, DLEC1, HDAC10, PYCARD und SCGB3A1/HIN1* zur Entstehung von benignen oder malignen Tumoren beitragen können (Fonseca et al., 2012).

Daher ist es von besonderer Bedeutung, dass der LINE-1 Methylierungsstatus von Urin DNA-Proben gesunder Probanden ermittelt wird, die keines der genannten Krankheitsbilder aufweisen, um eine wirkliche Aussage zum Biomarkerpotential der LINE-1 Methylierung der zellulären bzw. freien DNA aus Urin mittels der IDLN zu treffen. Darüber hinaus sollte versucht werden die Zugabe von EDTA in die Sammlung der Urinproben zu integrieren, um DNA-Degradationprozesse, sowie mikrobielles Wachstum vor dem Einfrieren und während des Auftauens zu verhindern.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der LINE-1 Hypomethylierung aus Urin-DNA und damit zur Einschätzung des LINE-1 Biomarkerpotentials, könnte eine andere Methode ermöglichen. So haben Neuhausen et al. durch Untersuchung von 96 Urothelkarzinomgewebeproben mittels Southern Blot Analysen nicht nur nachgewiesen, dass LINE-1 Hypomethylierung in 90% aller Blasentumorproben detektiert werden konnte, sondern ebenfalls, dass das Fehlen der Hypomethylierung auf eine signifikant bessere klinische Prognose (Rezidiv-freies Überleben) hindeutet (Neuhausen et al., 2006). Doch auch wenn diese Methode es ermöglicht die

abnehmende DNA-Methylierung des LINE-1 mit fast der gleichen Sensitivität wie die MSPCR zu quantifizieren, wird für diese eine große Menge an hochmolekularer DNA benötigt. Dies ist durch die kleinen, isolierbaren DNA-Mengen aus dem Gewebe sowie dem Urin nur eingeschränkt möglich.

Auf Grund jüngster genomweiter Sequenzierstudien, die Evidenz dafür liefern, dass neben LINE-1 auch Alu Elemente substantiell an Retrotranspositionsgeschehen in humanen Karzinomen involviert sind (Lee et al., 2012), wurde parallel zu der LINE-1 Methylierung der Urin-DNA-Proben auch die Methylierung der Alu Elemente in der zellulären DNA aus Urin von Harnblasenkarzinompatienten untersucht. Da aber Alu-Elemente nicht autonom replizierend sind, benötigen sie für ihre Amplifikation *„trans-acting“* Faktoren, die sie nur von der autonomen Familie der Retroelementen erhalten können- den LINE-1 Elementen (Dewannieux et al., 2003). Daher sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der veränderten DNA-Methylierung der LINEs und der Methylierung der Alus vorliegt und damit ggf. ein Indiz für einen kausalen Zusammenhang.

Das Experiment hat gezeigt, dass in der zellulären Urin-DNA stellenweise eine inverse Korrelation zwischen der Methylierung der LINE-1 Elemente und die der Alu Elemente besteht. Dies spiegelt sich in den untersuchten Tumor- und Kontrollproben wider, die z.T. eine reziproke Methylierung dieser beiden Elemente zeigen. So weisen einige Proben, bei denen eine erhöhte LINE-1 Methylierung detektiert wurde, eine niedrige Alu-Methylierung auf, während andere Proben mit einer niedrigen LINE-1 Methylierung eine erhöhte Methylierung an den Alu Elementen zeigen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Transposition der nicht autonomen Alu Elemente an die der autonomen LINEs gekoppelt ist, wobei sich die Alu Elemente für ihre Transposition der freigesetzten LINE-1 Endonukleasen bedienen.Gleichzeitig weist der Versuch darauf hin, dass die stellenweise erniedrigte Alu Methylierung eine Rolle beim Harnblasenkarzinom spielen könnte.

Neuste Daten deuten darauf hin, dass Insertionen von Retroelementen in die Exons und Introns der Gene verschiedene genetische Krankheiten auslösen können- einschließlich Krebs (Kaer und Speek, 2013). Somit könnte angenommen werden, dass Alu Elemente, deren Aktivität durch die Hypomethylierung in einigen Proben bestimmt werden konnte, Mutationen und damit ggf. die Entwicklung von Harnblasentumoren begünstigen könnten. Alu Methylierungsuntersuchungen an einer größeren Probenkohorte mit unterschiedlichen Tumorstadien könnten

Aufschluss darüber geben, ob Alu Hypomethylierung ein frühes Ereignis in der Entstehung bzw. der Aggressivität von Harnblasenkarzinomen ist und diese ggf. fördert.

4.1.2 Methylierung und Aktivität des LINE-1 Promotors in der urinären DNA von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom

Nach der Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades des LINE-1 Retrotransposons in der zellulären und der freien DNA des Urins von Harnblasenkarzinompatienten mittels der MSPCR wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, die einen detailierten Einblick in die vorliegenden LINE-1 DNA-Methylierungsmuster erbrachten. Hierzu wurde die LINE-1 Promotormethylierung mittels der genomischen Sequenzierung nach der Bisulfit-Konvertierung der DNA in der zellulären und der freien Urin-DNA von zwei Blasentumorpatienten (007, 016) und einem gesunden Probanden (317) bestimmt.

Die Bisulfit-genomische Sequenzierung stellt eine effiziente Methode zur Detektion und Quantifizierung des Methylierungsstatus einzelner Cytosine eines gewählten DNA-Abschnitts dar (Clark et al., 1994; Clark und Frommer 1997, 1995). Hierbei stellte sich heraus, dass in beiden DNA-Fraktionen das DNA-Methylierungsprofil eines über 400 bp großen Fragments mit dieser Methode bestimmt werden konnte. Insbesondere ist dies für die freie DNA von Bedeutung, die ja bekannter Weise fragmentiert vorliegt. Dabei zeigten sich einige CpG-Positionen der Promotorregion suszebtibler für eine Demethylierung als andere. Diese detaillierten Erkenntnisse stellen die Voraussetzung dafür dar möglichst gut diskriminierende Primerbindungspositionen ausfindig machen zu können, um DNA-Methylierungs-unterschiede in einer späteren MSPCR effizient messen zu können.

Die geringe LINE-1 Methylierungsdifferenz zwischen den beiden Urin DNA-Fraktionen des gesunden Probanden lassen darauf schließen, dass beide Fraktionen gleicher Herkunft sind, d.h. von epithelialen Zellen und Blutzellen die eine Apoptose durchlaufen haben (van der Vaart und Pretorius, 2007; 2008) bzw. von intakten epithelialen Zellen und intakten Zellen des Blutes, so z.B. Leukozyten, die im Urin nachweisbar sind, abstammen. Es wird angenommen, dass bei Harnblasenkarzinom-patienten genau dieses Gleichgewicht durch eine Zunahme der apoptotischen und nekrotischen als auch abgelösten, intakten Tumorzellen (Seifert et al., 2007) im Urin verändert vorliegt. Auf Grund dessen, dass unmethylierte LINE-1 DNA in

Harnblasenkarzinomzellen vorkommt (Florl et al., 1999; Wolff et al., 2010 und van Bemmel et al., 2012), kann gefolgert werden, dass Patienten mit niedrigerer DNA-Methylierung der freien urinären DNA mit einer erhöhten Freisetzung apoptotischer und nekrotischer DNA aus Tumorzellen behaftet sind. Desweiteren sind Krankheitsbilder bekannt, die durch Ausscheidung von intakten Zellen in den Urin gekennzeichnet sind. Dies könnte für den Methylierungsgrad der zellulären DNA des Urins von Bedeutung sein.

Die niedrige Methylierung der zellulären DNA aus Urin des Patienten 016 könnte auf ein erhöhtes Vorkommen von abgelösten, intakten Tumorzellen hindeuten. Darüber hinaus ist vor allem bei diesem Patienten eine deutliche Anfälligkeit zur Demethylierung der CpG-Positionen -6, -7, -11, -14, -15, -18, -21, -22 und -23 zu erkennen. Da dies bereits auch in anderen Proben beobachtet werden konnte, könnte dies durchaus ein Merkmal der Harnblasenkarzinom-DNA sein (Ghanjati et al., 2014). Ein Abgleich der vollständig unmethylierten LINE-1 Sequenzen aus den Blasenkarzinompatienten ergab, dass es sich hierbei um „full-lenght“ LINE-1 Sequenzen mit intakten offenen Leserastern handelt (die *„full-length“* LINE-1 Sequenzen wurden uns von Dr. Goodier, Kazazian lab, Philadelphia zur Verfügung gestellt). So ist es möglich, dass aktivierte LINE-1 DNA in Harnblasenkrebszellen vorliegt, die im Urin wiederzufinden ist. Eine LINE-1 Aktivierung kann durchaus eine Rolle im Karzinogeneseprozess spielen.

Daher wurde die *LINE-1* Transkription in der urinären DNA gemessen. Es ist denkbar, dass die *LINE-1* Expression einen Marker für die Progression des Harnblasenkarzinoms darstellen könnte. Sunami et al. konnten in seiner Studie aus dem Jahre 2008 bereits zeigen, dass die *LINE-1* Quantifizierung in der freien Serum-DNA einen Biomarker zur Früherkennung von Brustkrebstumoren darstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben an dieser Stelle zusätzlich zeigen können, dass nicht nur die *LINE-1* Transkription aus urinärer RNA mittels einer RT-PCR nachweisbar ist, sondern auch die Transkription des antiapoptotischen Gens *BCL-XL*, des proapoptotischen Gens *BimEL* sowie des *„housekeeping“* Gens *Beta-Aktin.*

Es liegt *LINE-1* Promotoraktivität in den urinären Zellen der Harnblasenkarzinompatienten, aber auch einiger gesunder Probanden vor. Ein erster Normierungsansatz der *LINE-1* Transkription mittels der RNA-Quantifizierung zeigte keinen Unterschied in der *LINE-1* Transkription zwischen den fortgeschrittenen-, den frühen Proben und den Kontrollen. Erst die elektrophoretische Auftrennung der

Amplifikate lieferte erste Evidenz für das Vorliegen von Unterschieden. Eine densitometrische Auswertung konnte ebenso keine Unterschiede zwischen den frühen bzw. späten Tumoren erkennen lassen. Hierfür war sicherlich ausschlaggebend, dass auch die zwecks Normierung gewählte *Beta-Aktin* Transkription vor allem in den Tumorproben schwankend ist.

Bislang beruhen die meisten Studien der *BCL-XL*- als auch *BimEL*-Expression auf Zelllinien-Modellen und einigen Gewebeproben. Vorherige Studien haben gezeigt, dass *BCL-XL* ein antiapoptotisches Mitglied der BCL2-Familie ist, dass die Caspase-Aktivität durch die Inhibierung der Cytochrom C Abgabe aus den Mitochondrien unterdrückt (Brunelle und Letai, 2009). Die Überexpression des *BCL-XL* Gens kann zu einem erhöhten Überleben der Tumorzellen, sowie zur Entwicklung diverser Resistenzen z.B. gegenüber Chemotherapeutika wie Mitomycin C und Cisplatin (Kunze et al., 2013) führen. Zusätzlich wird die *BCL-XL* Expression im Blasenkarzinom mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (Korkolopoulou et al., 2002), wohingegen die Unterdrückung von *BCL-XL* zu einer Sensibilisierung der Blasenkarzinomzellen gegenüber der Chemotherapie führt (Kunze et al., 2012). Allerdings konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, dass tatsächlich eine *BCL-XL*-Transkription vorrangig in den Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumor vorkommt, da *BCL-XL* in fast genauso vielen „frühen“ Proben und sogar einigen Kontrollen nachgewiesen wurde.

Im Vergleich zu BCL-XL ist BimEL ein proapoptotisches Protein, das ebenfalls zu *BCL2*-Familie gehört und durch Phosphorylierung reguliert wird (Paterson et al., 2012). Eine erhöhte BimEL-Expression ist mit einer zunehmenden Apoptose assoziiert (Selimoglu-Buet et al., 2012). Studien von Liu et al. und Gogada et al. haben gezeigt, dass Bim in Prostata- und Brustkrebszellen exprimiert wird (Liu et al., 2002; Gogada et al., 2013). Zusätzlich deuten die Untersuchungen von Gogada et al. darauf hin, dass eine konstitutive Überexpression von Bim das Überleben der epithelialen Krebszellen fördern kann, während die Phosphorylierung mit proapoptotischen Funktionen verbunden ist (Gogada et al., 2013). Dies könnte das Ergebnis erklären, warum in den Urinproben der Harnblasenkarzinompatienten sowie der Harnblasenkarzinomzelllinie HT1376, in denen die Transkription von *BCL-XL* detektiert worden ist, auch die *BimEL*-Transkription nachweisbar gewesen ist. Sollten beide Gene beim Harnblasenkarzinom antiapoptotische Eigenschaften besitzen, so könnten sie ggf. synergistisch das Überleben der Krebszellen fördern.

Nur in wenigen Urinproben konnte die Transkription von einem der beiden Gene bestimmt werden.

Die Transkription von *BimEL* bzw. *BCL-XL* im Urin der Kontrollgruppe könnte damit erklärt werden, dass die Transkription beider Gene auch an andere Krankheitsbilder gekoppelt sein könnte. Allerdings können chromosomalen Anomalien auch durch anderen Krankheitsbilder entstehen. So haben Untersuchungen an BPH *(benign prostatic hyperplasia)*- und Zystisproben gezeigt, dass Entzündungen ebenfalls zu genetischen Veränderungen führen können, wodurch die Sensitivität der Tumordetektion verschlechtert wird (Anker et al., 1999) bzw. die Amplifikation bestimmter Gene. Szarvas et al., 2007 detektierten in ihrer für die Studie eingesetzten Kontroll-Urinproben ebenso Heterozygotie-Verluste. Die Kontrollen stammten von Patienten die auf Urozystis, BPH oder auf Belastungsinkontinenz behandelt wurden. Dies ist auch der Fall für die in dieser Arbeit verwendeten Urin-Kontrollproben und könnte damit die vorhandene Transkription von *BimEL* und *BCL-XL* in den gesunden Probanden erklären.

Die chromosomalen Anomalien der Harnblasenkarzinomzelllinie HT1376, die in diesem Experiment als „Positivkontrolle“ fungierte, wurden bereits von Rasheed et al. 1977 beschrieben. Rasheed et al. konnten bei der Charakterisierung der Zellen nachweisen, dass die Chromosomenzahl der Zelllinie HT1376 zwischen 104 und 121 variieren kann, in Abhängigkeit von der jeweiligen Passage (Rasheed et al., 1977). D.h. von den „normalen“ Chromosomen sind je ca. 3-10 Kopien vorhanden. Des Weiteren konnte kein Y Chromosom detektiert werden. Diese chromosomalen Anomalien könnten zusätzlich zu den unmethylierten Genen wie *BimEL* und *BCL-XL* ein Grund dafür sein, dass alle hier untersuchten Gene von der Harnblasenkarzinomzelllinie HT1376 transkribiert wurden.

Nachdem die densitometrischen Auswertungen der *LINE-1* Transkription in den Urinproben der Blasenkarzinompatienten und gesunden Probanden kein sicheres Normierungsverfahren dargestellt hat, wurde mittels der auf der *real time* PCR-basierenden absoluten Quantifizierung die absolute Kopienzahl der *LINE-1* Transkripte bestimmt. Erst durch dieses Normierungsverfahren war es möglich eine verlässliche Aussage zu der *LINE-1* Transkription in den Urinproben zu treffen. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass *LINE-1* Transkription verstärkt in den fortgeschrittenen Tumoren von Blasentumorpatienten zu finden ist, wohingegen bis auf zwei Ausreißer, die Urinproben der gesunden Probanden und der frühen

Karzinome von Blasentumorpatienten niedrigere *LINE-1* Transkiptionen gezeigt haben. Somit könnte die *LINE-1* Transkriptionsfähigkeit, die mittels Urinproben bestimmt werden kann, ein Indikator für fortgeschrittene Harnblasenkarzinome sein. Zur Optimierung dieses Ergebnis wurde ein neues Nachweisverfahren entwickelt, bei dem der Quotient aus der *LINE-1* Methylierung und der absoluten *LINE-1* Quantifizierung aus den Urinproben bestimmt wird. Dieser fällt klein aus wenn die LINEs hypomethyliert sind und transkribiert werden.
Mittels dieses Verfahrens war es möglich eine noch bessere Diskriminierung zwischen den fortgeschrittenen und damit muskelinvasiven Blasentumoren, den frühen Tumoren und den gesunden Probanden zu erhalten. Um jedoch eine konkrete Aussage darüber treffen zu können, ob *LINE-1* mittels des neuen Nachweisverfahrens als Biomarker für fortgeschrittene Harnblasenkarzinome fungieren kann, müssen weitere Urinproben von Blasentumorpatienten und gesunden Probanden analysiert werden. Dabei ist es von besonderer Bedeutung, dass alle Urin-Kontrollen ausschließlich von gesunden Probanden ohne sonstige Erkrankungen verwendet werden, damit diese Krankheitsbilder das Ergebnis nicht maskieren bzw. verfälschen können.

Mit Hilfe der Chromatinzugänglichkeitsanalyse MIRECAL wurde in der zellulären DNA des Urins von Harnblasenkarzinompatienten mit frühen und fortgeschrittenen Tumoren die Chromatinkompaktheit des LINE-1 Promotors untersucht. Die Chromatinstruktur hat einen wesentlichen Einfluss auf die Gentranskription (Bird 2002; Jenuwein und Allis, 2001; Strahl und Allis, 2000). Je nach Modifikation der Chromatinproteine kann das Chromatin „offen“ und damit transkriptionskompetent oder kondensiert, also transkriptionsinaktiv, vorliegen. Graffmann et al. haben nachgewiesen, dass die MIRECAL-Methode eine direkte, einfache und semi-quantitative Methode zur Analyse der Chromatinzugänglichkeit darstellt (Graffmann et al., 2006). Allerdings hat sich die MIRECAL-Methode für die Untersuchungen der zellulären DNA aus den „Urinzellpellets“ als bedingt geeignet herausgestellt.
Nur in zwei Urinproben (068, 064) zeigte sie die Tendenz einer mit der Inkubationsdauer der *Micrococcus* Nuklease zunehmenden Zugänglichkeit und damit den Hinweis auf einen relaxierten LINE-1 Promotor. Bei allen weiteren Proben lieferte die Methode Evidenz für das Vorliegen einer kompakten Chromatinstruktur des LINE-1 Promotors, trotz einer deutlichen LINE-1 Transkription. Dies ist im

Einklang mit der Hypothese, dass die gemessene LINE-1 Transkription ihren Ursprung in einer kleinen Anzahl aktiver LINE-1 Loci hat. Die Reproduzierbarkeit der Methode ist mit urinärer DNA eingeschränkt.

4.2 Bestimmung der Telomerenlänge der urinären DNA-Fraktionen von Harnblasenkarzinompatienten-Bedeutung als möglicher Progressionsparameter

Telomere sind für den Erhalt der Integrität des Genoms essentiell. Kurze Telomere führen zur replikativen Zellseneszenz, zu einer chromosomalen Instabilität und können auch das Krebsrisiko erhöhen (Willeit et al., 2010). Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass Telomere in Tumorgeweben kürzer sind als im normalen Nachbargeweben (Hastie et al., 1990; Mehle et al., 1994). Aber auch lange Telomere stehen im Zusammenhang mit dem Risiko an Krebs zu erkranken und werden mit der Immortalität der Tumorzellen assoziiert. Daher wurde im Rahmen der Arbeit überprüft, ob die Länge der Telomeren an Hand von Vollblut-DNA, sowie zellulärer und freier Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden mittels Southern-Blot Analysen bestimmt werden kann, um einen möglichen Zusammenhang mit der Prognose zu ermitteln.

Die Bestimmung der Telomerenlängen von Harnblasenkarzinompatienten hat ergeben, dass nicht nur -wie bereits bekannt- die DNA aus Vollblut, sondern auch die zelluläre Urin-DNA gute Ergebnisse liefert. Freie Urin-DNA dagegen war als Untersuchungsmaterial ungeeignet, da trotz mehrerer Wiederholungen und Variation der eingesetzten DNA-Menge keine Telomerensignale nachzuweisen waren. Ein Grund hierfür könnte die starke Fragmentierung dieser urinären DNA-Fraktion sein.

Die Southern Blot-Ergebnisse der Vollblut- und der zellulären Urin DNA-Proben konnten zusätzlich durch die densitometrische Analyse untermauert werden. Dennoch konnte nur in einem einzelnen Patienten (080) mit einem besonders fortgeschrittenen Tumor (pT4a, pN2 (4/50), PN1, L1, G3) in diesen beiden DNA-Fraktionen verlängerte Telomere nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse liefern also durchaus Evidenz dafür, dass Tumor-DNA mit langen Telomeren, aus den beiden genannten DNA-Fraktionen nachgewiesen werden kann. Da aber die Telomerenlängen aus den Urinproben der Blasentumorpatienten und der gesunden Probanden in allen drei Probengruppen (Kontrollen, späte und frühe Blasentumore)

variiert hat, wobei auch in Kontrollproben von gesunden Probanden längere Telomere nachgewiesen wurden, erschien die Methode bezüglich eines möglichen prognostischen Werts ungeeignet und wurde daher nicht weiterverfolgt.

Einer der Gründe warum die Telemerenlänge in den Kontrollproben ebenfalls Schwankungen aufwies, könnte der sein, dass diese Proben von Probanden stammen, die an anderen urologischen Erkrankungen leiden, welche auch mit unterschiedlichen Telomerenlängen assoziiert sind. Beispielsweise ist aus Studien bekannt, dass eine Abnahme der Telomerenlänge durch verschiedene Umweltbedingungen beschleunig werden kann. Dazu gehört das Rauchen (Valdes et al., 2005; Morlà et al., 2006; McGrath et al., 2007), oxidativer Stress (von Zglinicki, 2002; Serra et al., 2003; Sharma et al., 2003), eine schlechte physikalische Gesundheit (Starr et al., 2007; Harris et al., 2006; Epel et al., 2004) und Adipositas (Valdes et al., 2005).

Dennoch könnte die Bestimmung der Telomerenenlänge alleine oder in Kombination mit der LINE-1 Transkription hilfreich für die Prognose sein, wenn sich beispielsweise herausstellen sollte, dass besonders aggressive Harnblasenkarzinome längere Telomeren als weniger aggressive besitzen. Ein Grund für die längeren Telomere könnte die in der Literatur suggerierte enge Beziehung zwischen der reversen Transkriptase der non-LTR Retrotransposons und der katalytischen Telomerase sein (Malik et al., 1999). Es ist denkbar, dass eukaryotische Zellen die reverse Transkriptase der Retrotransposons so zu sagen „rekrutieren“, um Telomerase-Aktivität zu erlangen (Ostertag und Kazazian, 2001).

Somit kann in humanen Krebszellen die LINE-1 und Alu Aktivität genauso hochreguliert sein wie die Telomerase-Expression, die in den meisten Karzinomzellen auftritt und damit zu einer unkontrollierten Proliferation beiträgt (Belanico et al., 2010). Aufgrund der bestimmten LINE-1 Hypomethylierung der urinären DNA von Harnblasenkarzinompatienten wird hier die Annahme favorisiert, dass durch die DNA Hypomethylierung frei werdenden LINE-1 Endunukleasenaktivität ggf. Telomerenverlängerungen zustande kommen können.

Zusätzliche Untersuchungen der Telomerase selbst, die für die Verlängerung der Telomere essentiell ist, könnten dieses Ergebnis bestätigen. Im Jahr 1997 gelang es Yoshida et al. durch Bestimmung der Telomerasenaktivität im Urin von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden, ein PCR-basiertes Messverfahren zu etablieren, das eine Sensitivität von 62% und eine Spezifität von

96,4% erzielte. Somit könnte die Bestimmung der Telomeraseaktivität in Urin-Proben ebenfalls ein nichtinvasives Testverfahren sein, das zur Detektion von Harnblasenkarzinomen geeignet ist.

4.3 Ausblick I

Die Ergebnisse aus dem ersten Teil der Arbeit zeigen, dass die LINE-1 Hypomethylierung eindeutig mit Harnblasentumoren unterschiedlicher Stadien assoziiert und auch im Urin nachweisbar ist. Der Nachweis der LINE-1 Methylierung aus zellulärer und freier DNA aus Urin, als auch der neu kreierte Parameter aus dem Quotienten LINE-1 Methylierung-/LINE-1 Transkription, könnten für die Entwicklung neuer nichtinvasiver Testverfahren zur Diagnose, Prognose und ggf. einem Monitoring dienlich sein. Hierfür sollte eine größere Probenkohorte, der zuvor Protease und EDTA zugefügt worden ist, mit beiden Testverfahren untersucht werden. Gleichzeitig sollten für die Untersuchungen Kontrollproben von tatsächlich gesunden Probanden, ohne andere Erkrankungen, verwendet werden. Die Zugabe der Reagenzien sowie die richtigen Kontrollen sind förderlich für die Verbesserung der Sensitivität und der Spezifität. Darüber hinaus könnte die Untersuchung weiterer Tumorproben mit Hilfe des neuen Parameters es ermöglichen, fortgeschrittene bzw. aggressive Tumore von den frühen zu unterscheiden. Des Weiteren könnte die Messung der LINE-1 Methylierung mittels IDLN und die absolute Quantifizierung der LINE-1 Transkription von postoperativen Urinproben Aufschluss darüber geben, ob dieses Verfahren zur Überwachung des Therapieerfolgs eingesetzt werden kann. So ist beispielsweise vorstellbar, dass die Hypomethylierung und Transkription in den rezidivierenden Patienten wieder messbar ansteigt.

Zusätzlich sollte die Methylierung der Alu-Elemente an einer größeren Urin-Probenkohorte untersucht werden, um die stellenweise beobachtete inverse Korrelation zwischen der LINE-1 und der Alu Methylierung ggf. eindeutiger zu bestimmen. Des Weiteren könnten diese Experimente die Annahme untermauern, dass neben den LINE-1 auch die Alu-Elemente eine Rolle beim Harnblasenkarzinom spielen. Da Alu-Elemente auf Grund ihrer evolutionären Entwicklung bzw. Entstehung in verschiedene Subfamilien eingeteilt werden, wobei die J- und S-Familie die Vorläufer der Y-Familie (*young)* darstellen, sollte vor allem die Methylierung, als auch die Expression der „young“ Alu-Elemente näher untersucht

werden. Denn es gibt Evidenzen dafür, dass nur die „jungen“ Alu Elemente derzeit aktiv sind (Ade et al., 2013).

Die Ergebnisse des ersten Teils der Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass auch die Telomerenlängenbestimmung mittels der Urin-DNA ein Indikator für den Nachweis des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms sein könnte. Daher sollten in weiteren Versuchen die Aktivität der Telomerase sowie die Methylierung des Telomeraselokus in weiteren Urinproben untersucht werden. Denn aus der Literatur sind bereits erste Evidenzen dafür bekannt, dass die Telomeraseaktivität ein Marker für das progrendiente Harnblasenkarzinom sein könnte. Yoshida et al. konnten 1997 mit Hilfe der Bestimmung der Telomerasenaktivität im Urin von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden eine Spezifität von 96% erreichen.

4.4 Genomweite Methylierungsanalysen von Gewebe-, Plasma- und Urin-DNA von Harnblasenkarzinompatienten

Obwohl das derzeitige Klassifikationssystem von Harnblasenkarzinomen durch Tumorstadium und -differenzierungsgrad nützlichen Dienst leistet, kann der natürliche Verlauf der Erkrankung mit oder ohne Therapie nur eingeschränkt prognostiziert werden (Kausch und Böhle, 2003). Darüber hinaus konnten viele der in der Literatur beschriebenen Marker bislang keinen Test ermöglichen, der akurat genug ist, um eine ähnlich gute Sensitivität und Spezifität zu erzielen wie sie die Zystoskopie für die Diagnose des Harnblasenkarzinoms liefert. Zusammen mit der Urinzytologie stellen sie den „Goldstandard“ für die Diagnose und Prognose dar. DNA-Methylierungsbiomarker gelten derzeit als sehr aussichtsreich (Reinert et al., 2012) und könnten das Überleben und die Lebensqualität von Blasenkrebspatienten verbessern. Daher befasst sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Suche nach neuen epigenetischen Biomarkern. Die punktuellen Methylierungsanalysen der untersuchten DNA-Proben von Harnblasenkarzinompatienten und gesunden Probanden dieser Studie sollten dabei helfen neue differentiell methylierte Genomsequenzen im Harnblasenkarzinom aufzufinden, die durch ihr gleichzeitiges Vorkommen im Plasma bzw. im Urin zur Entwicklung bzw. Etablierung eines minimalinvasiven Früherkennungsmarkers Anwendung finden könnten.

Mit Hilfe der hierarchischen Gruppierung *(clustering)* der beiden untersuchten Kohorten wurde die epigenetische Verwandtschaft zwischen den Tumorgeweben

und den Geweben von gesunden Probanden analysiert. Dabei wurde keine einheitliche Gruppierung innerhalb der Tumor-DNA Proben bzw. der DNA Proben der gesunden Probanden beobachtet.

Die Gründe, warum das DNA-Methylierungsmuster des nichttumorösen, benachbarten Gewebes in mehreren Proben eindeutig mit dem tumorösen Gewebe zusammenlagert könnten folgende sein. Die Gewebestanzen des benachbarten gesunden Gewebes könnten anteilig maligne Zellen enthalten. Des Weiteren wäre es auch möglich, dass diese DNA des benachbarten, pathologisch gesund erscheinenden Gewebes, tatsächlich ähnliche Methylierungsmuster aufweist, wie die des benachbarten, pathologisch als tumorös klassifizierten Gewebes. In diesem Zusammenhang sei auch gesagt, dass sicherlich auch die Methylierung der Kontroll-DNA Proben der gesunden Probanden einen besonderen Einfluss auf die bioinformatische Gruppierung (das *Clustering*) hat, zumal diese von BPH-Probanden abstammen, mit ggf. einem spezifischen DNA-Methylierungsmuster, dass anders als das des gesunden Prostatadrüsengewebes sein könnte.

Um herauszufinden ob in der DNA aus Plasma und in der zellulären und der freien DNA aus Urin ähnliche DNA Methylierungsveränderungen wie in den primären Tumorgeweben vorliegen, wurden alle DNA-Fraktionen analysiert und miteinander verglichen. Dabei stand vor allem die freie Urin-DNA im Fokus, da aus der Literatur bekannt ist, dass die Menge der freien DNA in Körperflüssigkeiten von Karzinompatienten erhöht ist (Szarves et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass in der freien urinären DNA weitaus mehr DNA-Methylierungsveränderungen bestimmt werden konnten als in den anderen DNA-Fraktionen. So könnte die urinäre freie DNA ggf. als leicht zugängliches Biopsat-Analogon fungieren und die Tumorgewebebiopsien mittels der Zystoskopie ggf. ersetzen (Schwarzenbach et al., 2011).

Im Vergleich zu den Studien von Salem et al., 2000; Markl et al., 2001; Chan et al., 2002 und Dulaimi et al., 2004, die erfolgreich hypermethylierte Gene im Gewebe detektiert haben, konnten im Rahmen dieses Screenings nicht nur hyper- sondern auch hypomethylierte DMRs in allen vier DNA-Fraktionen (zelluläre und freie Urin-DNA, Plasma-DNA sowie Gewebe-DNA) ermittelt werden. Durch Bildung von Schnittmengen zwischen allen DNA-Fraktionen wurde eine Vielzahl gemeinsamer Methylierungsveränderungen entdeckt. Dabei wurde festgestellt, dass mehrere der

betroffenen Gene mit hyper- als auch hypomethylierten DMRs bisher nicht für das Harnblasenkarzinom beschrieben waren.

So erzielte interessanter Weise das hypermethylierte Protein LOC10013024, dessen Funktion noch nicht benannt ist, mit 81,7 % die höchste Vorkommenshäufigkeit in den beiden untersuchten Gewebekohorten. Für die hypermethylierten Gene *ODC1, ABTB1, TBX3, MC1R, NUP62 und CKAP2* aus den beiden DNA-Gewebekohorten haben erste Studien bereits nachgewiesen, dass sie in verschiedenen Karzinomen eine Rolle spielen. So liefern diese Daten erstmalig Evidenz dafür, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Harnblasenkarzinom und *ODC1 (ornithine decarboxylase 1)* vorliegen könnte.

Der *ODC*-Genpromotor ist ein Target des Aktivierungssignalwegs der *Myc* und *Ras* Ongogene (Pegg, 2006) und wird Östrogen-abhängig durch Aktivierung des cAMP abhängigen Signalwegs reguliert (Qin et al., 2004). Darüber hinaus synthetisiert *ODC1* die limitierende Reaktion in der Polyaminsynthese. Polyamine sind organische Kationen, die die Transkription, Translation und Replikation fördern (Pegg, 1988) und viele zelluläre Prozesse unterstützen. Ihr Erhalt ist essentiell für das Überleben der Zellen und wird für den apoptotischen Kontrollpunkt benötigt (Bettuzzi et al., 1999). Da *ODC1* nach den hier durchgeführten Methylierungsuntersuchungen hypermethyliert in dem Harnblasenkarzinomgewebe der Patienten vorliegt, darf hier postuliert werden, dass *ODC1* in dem Tumorgewebe inaktiv ist. Dies könnte damit die Schlussfolgerung zulassen, dass nur wenige Polyamine synthetisiert werden können.

Darüber hinaus haben weitere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zusätzliche, untermauernde Evidenz für eine differentielle Methylierung des *ODC1* Lokus beim Harnblasenkarzinom geliefert (Erichson, 2013, Masterarbeit). Demzufolge hätte eine transkriptionelle Inaktivierung durch die Hypermethylierung des ODC1-Promotors einen erheblichen Einfluss auf den Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsel und könnte durchaus globale Hypomethylierung, sowie genomische Instabilität zur Folge haben (Erichsen 2013, Masterarbeit).

Bislang war aus der Studie von Martinez et al., 2003 die Hypothese bekannt, dass der *ODC*-Polymorphismus als genetischer Risikomarker für Kolonkarzinome fungieren kann und das *ODC*-Inhibitoren, sowie Aspirin in Kombination, zur Prävention von Darmkrebs eingesetzt werden könnten. Kaul et al. postulierten in ihrer Veröffentlichung von 2010, dass die Korrelation zwischen *ODC1* und *OAZ1*

(ornithine decarboxylase antizyme 1) in Krebszellen zur Bestimmung der Aggressivität des Prostatakarzinoms und damit zur individuellen Behandlungstherapie verwendet werden könnte. Zusätzlich wurde von Hawkins et al., 2008 Evidenz dafür erbracht, dass ODC1-Peptide an der Entwicklung und Progression von Mamakarzinomen beteiligt sind.

ABTB1 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1), auch bekannt als *BPOZ*, kann dagegen als Mediator des PTEN wachstumshemmenden Signalwegs fungieren (Unoki und Nakamura, 2001). Darüber hinaus könnte *BPOZ* an normalen Entwicklungsprozessen als auch an der Entstehung von Leukämie beteiligt sein (Dai et al., 2000).

TBX3 (T-box 3), ein transkriptioneller Repressor, ist ebenfalls in Entwicklungsprozesse involviert. Studien haben gezeigt, dass TBX- Überexpression mit verschiedenen Karzinomen assoziiert ist und einige Hinweise deuten darauf hin, dass ein Anstieg von TBX3 die Zellproliferation inhibieren, aber die Tumormigration und -Invasion fördern kann (Li et al., 2013). Des Weiteren konnte mittels genom-weiten Methylierungsanalysen von Kandimalle et al. neben *TBX3* auch *TBX2, GATA2* und *ZIC4* als pTa-spezifische, prognostische Methylierungsmarker identifiziert werden, wodurch eine Einteilung von Patienten mit personalisierter Überwachung ermöglicht wird (Kandimalle et al., 2012).

Für den *MC1R (melanocortin 1 receptor)* ist aus der Literatur bekannt, dass es ein Schlüsselgen ist, das in die Regulation der Melanin-Synthese involviert ist und dessen Aktivität durch G-Proteine vermittelt wird, die die Adenylat-Cyclase aktivieren. Darüber hinaus werden bestimmte *MC1R* Allele mit einem Melanomrisiko assoziiert (Sánchez et al., 2002). Bemerkenswerterweise ist die *MC1R* Aktivierung an DNA-Reparaturen gekoppelt und könnte auch an der Regulation der Immunantwort mitwirken (Beaumont et al., 2009). Zusätzlich konnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Methylierungsanalysen zum ersten Mal eine Korrelation zwischen den frühen Harnblasenkarzinomen und essentiellen Komponenten des Kernporen-Komplexes wie NUP62 *(nucleoporin 62kDa)* sowie CKAP2 *(cytoskeleton associated protein 2)*, einem Zytoskelett-assoziierten Protein, dass an mitotischen Prozessen beteiligt ist, gezeigt werden. Doch NUP62 spielt auch eine Rolle in der Zentrosomen-Integrität und das Ausschalten von *NUP62* kann unkontrollierte Zentrosomen-Amplifikation und abnormale Zentriolen-Separation induzieren. Des Weiteren ist von

Bedeutung, dass die Deaktivierung von *NUP62* zum Arrest der Zellen in der G2/M Phase und zum mitotischen Zelltod führt (Hashizume et al., 2013).

Über das humane *CKAP2*-Gen ist bereits bekannt, dass es häufig in verschiedenen Tumoren reorganisiert wird (Udina et al., 2001). So konnten Bae et al., 2003 nachweisen, dass *CKAP2* in primären humanen Gastritis-Adenokarzinomen häufig hochreguliert ist und somit nutzvoll für die Diagnose und ggf. Klassifizierung von Adenokarzinomen des Magens sein könnte.

Mittels der Analyse der hypomethylierten Schnittmengengene beider DNA-Gewebekohorten konnte bestimmt werden, dass die meisten gemeinsamen DMRs an Zellprozessen wie der Transkription, der DNA-Synthese oder an diversen Protein-Biosynthesewegen beteiligt sind. Jedoch konnte bislang nur bei drei Genen, *Ran GTPase Activating Protein 1* (RANGAP1), *PDZK1 Interacting Protein* (PDZK1IP1) und *Kallikrein-related peptidase 10* (KLK19) eine Korrelation zu Karzinomen beobachtet werden. Pathria et al. fanden heraus, dass RANGAP1 neben CRM1, RAN (RAN-GTPase) und RANBP1 eines der vier Schlüsselkomponenten der nukleozytoplasmatischen Transportmaschinerie ist, die in humanen Melanommetastasen überexprimiert wird (Pathria et al., 2012). Der nukleozytoplasmatische Transport ist ein wichtiger zellulärer Prozess, der in den Export von Proteinen und RNA-Molekülen aus dem Kernbereich involviert ist und sich gleichzeitig als ein mögliches Target für die Krebstherapie entpuppt hat (Kau et al., 2004). Die verstärkte zytoplasmatische Akkumulation einiger Tumorsuppressorproteine wurde erst kürzlich als ein zusätzlicher Mechanismus vorgestellt. Dieser kann von Krebszellen akquiriert werden, um ein gesteigertes Proliferationspotential zu erzielen (Tuner und Sullivan, 2008). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Hypomethylierung von *RANGAP1* und damit seine Überexpression, in Harnblasenkarzinomen bereits in relativ frühen Erkrankungsphasen zum Erwerb von Zytostatika-Resistenz als auch zu höheren Proliferationsraten führen kann.

PDZK1IP1 dagegen ist in die Onkogenese und Metastasierung vieler Tumore involviert. Guijarro et al. konnten nachweisen, dass das *PDZK1IP1*-Expressionslevel in Tumoren (besonders in Ovarial- und Prostatatumoren) höher ist und die Überexpression von *PDZK1IP1* das Tumorpotential der Krebszellen erhöhen kann (Guijarro et al., 2007a-d). So könnte die *PDZK1IP1*-Expression mit der malignen Progression assoziiert sein (Wang et al., 2012). In darauf folgenden Studien konnte

zusätzlich gezeigt werden, dass *PDZK1IP1* den Tumornekrosefaktor-induzierten Wachstumsarrest umgehen kann (Guijarro et al., 2007 a-d). Dies lässt die Annahme zu, dass durch die Ermittlung des *PDZK1IP1*-Expressionslevels Rückschlüsse auf die Progression von Harnblasentumoren gezogen werden könnten.

KLK10 (kallikrein-related peptidase 10) ist ein Mitglied der Kallikrein-Gen Familie, das auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert ist (Yousef et al., 2005) und eine Tumor-suppressorrolle für *NES1* in Brust- und Prostatakrebs besitzen könnte. Die Expression dieses Gens in hormonalregulierten Geweben (Liu et al., 1996) und seine Regulation durch Steroidhormone (Luo et al., 2000) deuten darauf hin, dass es eine spezifische Rolle in der Entwicklung von Mamma- und Prostatakarzinomen spielen könnte (Bharaj, 2002). Olkhov-Mitsel et al. konnten mittels Methylierungsanalysen an zwei Prostatagewebekohorten nachweisen, dass *KLK10*-Methylierung mit der pathologischen Progression assoziiert ist und damit einen prognostischen Wert besitzen könnte (Olkhov-Mitsel et al., 2012). Im Vergleich dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit eine starke Demethylierung von *KLK10* im Blasentumorgewebe detektiert werden. Infolgedessen könnte der *KLK10*-Methylierungsstatus zusätzlich zu anderen spezifischen Biomarkern als Diskriminierungsmarker zwischen der Prostata- und Blasentumorentität fungieren.

Nach der Ermittlung der gemeinsamen DMRs aus zwei Probenkohorten von Harnblasenkarzinompatienten, konnte in weiteren globalen und genomweiten DNA-Methylierungsanalysen die Frage beantwortet werden, ob in der Plasma-DNA und der DNA aus dem Urin dieser Patienten dieselben DMRs nachweisbar sind, so dass diese ggf. neue Kandidaten für epigenetische Biomarker sein könnten. Mit Hilfe der Studie konnte bestätigt werden, dass nicht nur Plasma-DNA und zelluläre DNA aus Urin zu Methylierungsanalysen eingesetzt werden können, sondern auch freie DNA aus Urin. Die Ergebnisse der Schnittmengenbildung zwischen den beiden DNA-Gewebekohorten und den Körperflüssigkeiten stützen die Theorie, dass Blasentumorzellen vermehrt DNA in das Lummen entlassen und diese für Methylierungsanalysen geeignet sind. Denn es konnten in den Schnittmengen mit der urinären DNA die meisten gemeinsamen DMRs und damit Biomarkerkandidaten beobachtete werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass normale apoptotische Zellen stärker fragmentierte DNA produzieren, während Krebszellen lange DNA-Fragmente entlassen (Casadio et al., 2013). Im Einklang mit den Studien von Diehl et al., die gezeigt haben, dass bis zu 3,3% Tumor-DNA täglich in das Blut eintreten (Diehl et

al., 2005) und die Überlebenszeit der frei-zirkulierenden DNA zwischen 15 min. und mehreren Stunden betragen kann (Fleischhacker und Schmidt, 2007) -wobei doppelsträngige DNA länger in der Zirkulation verbleibt als einzelsträngige DNA (Bendich et al., 1965)- wurde die größte Schnittmenge der hyper- als auch hypomethylierten DMRs zwischen der freien DNA aus Urin- und der Gewebe-DNA ermittelt. Im Vergleich dazu konnte zwischen der Plasma- und Gewebe-DNA, bis auf die Schnittmengen der hypermethylierten DMRs mit der Gewebekohorte 1, die geringste Interferenz nachgewiesen werden.

Das Ergebnis verwundert jedoch nicht unter der Berücksichtigung, dass für das Screening mittels der NimbleGen-Plattform Probenmaterial von Patienten mit frühen Harnblasentumoren verwendet worden ist. Diese sind im Vergleich zu den fortgeschrittenen Karzinomen nicht muskelinvasiv und besitzen damit keinen direkten Zugang zum Blutsystem. Darüber hinaus haben vorherige Studien gezeigt, dass Urin das Wachstum von Harnblasenkarzinomen stimuliert (Kuranami et al., 1991) und als krebsprogressives Agenz fungieren kann (Oyasu et al., 1981), was somit zu einer erhöhten Tumorzellzahl und damit zur vermehrten DNA-Freisetzung führt. Die Stimulierung geschieht u.a. durch Wachstumsfaktoren wie *EGF (epidermal growth factor)*, die im Urin in großen Mengen enthalten sind (Starkey et al., 1977). Neal et al. gelang es in ihrer Studie nachzuweisen, dass invasive Blasenkarzinome mehr EGF-Rezeptoren besitzen als oberflächliche Tumoren (Neal et al., 1985).

Für die Entwicklung eines spezifischen und sensitiven DNA-Methylierungsassays zur nichtinvasiven Detektion von frühen Harnblasenkarzinomen werden mehrere Biomarker benötigt. Potentielle Methylierungsmarker wurden im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet. Ein einzelnes hypermethyliertes Gen z.B. im Urin ist ggf. nicht ausreichend für eine sensitive Detektion von Urothelkarzinomen und selbst die Kombination von verschiedenen Genen könnten unzureichend sein um eine 100% Sensitivität zu erzielen (Neuhausen et al., 2006).

Da im Mittelpunkt der Methylierungsanalysen differentiell methylierte Regionen gesucht wurden, die der Früherkennung von Harnblasenkarzinomen dienen sollen, konnte hier im Vergleich zu den bestehenden Studien keine Aussage zur Tumorprogression gemacht werden. Dennoch ist aus der Literatur bekannt, dass die Hypermethylierung der Gene in Urothelkarzinomen mit einem graduellen Anstieg des Stage und Grade assoziiert ist (Salem et al., 2000; Maruyama et al., 2001; Chan et al., 2002; Tada et al., 2002; Catto et al., 2005).

4.4.1 Differentielle DNA-Methylierung an microRNA-Loci im Plasma-, Urin- und in Gewebeproben von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom

Freie DNA kann tumorspezifische epigenetische Signaturen tragen und wird daher als eine vielversprechende DNA Fraktion zur Erkennung früher Tumorstadien, als auch für die Nutzung in individualisierten Behandlungsentscheidungen angesehen (Boeri et al., 2011; Schwarzenbach et al., 2011). Tumorspezifische, differentielle DNA-Methylierung kann auch einzelne microRNA Loci mit Auswirkungen auf ihre Expression, betreffen. So sind freie miRNAs bemerkenswert stabil in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum sowie Sputum (Lawrie et al., 2008; Mitchel et al., 2008; Turchinovich et al., 2011) und werden in vielen Studien durch ihr Vorkommen im Urin-Sediment sowie im -Überstand als ggf. nützliche Biomarker diskutiert (Snowdon et al., 2012; Puerta-Gil et al., 2012; Wang et al., 2012). Daher wurden im Rahmen der DNA-Methylierungsanalyse zusätzlich die differentiell methylierten miRNA-Loci separat in der Gewebe-, Plasma- und Urin-DNA der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom festgestellt.

So konnte nachgewiesen werden, dass tumorassoziierte hyper- sowie hypomethylierte miRNA-Loci in allen untersuchten Probenkohorten vorkommen. Ihr prozentualer Anteil fiel im Vergleich zu allen DMRs mit 1,3 - 3,5 % gering aus.

Mit Hilfe eines eigens hierfür programmierten Algorithmus konnte die Schnittmenge aus beiden DNA-Gewebekohorten an hypermethylierten und hypomethylierten miRNAs ermittelt werden. Die hypermethylierten Kandidaten waren die MIR30C1, MIR500B, und MIR4493. Wohingegen im Schnittmengenvergleich der hypomethylierten miRNAs keine gemeinsame miRNA bestimmt werden konnte.

Zusätzlich konnte durch ein Alignment nachgewiesen werden, dass die MIR500B eine 66%tige Sequenzhomologie zur MIR4493 aufweist. Weitere *in-silico* Analysen zeigten, dass alle miRNAs unterschiedliche Targets haben. So gehören zu den Targets der MIR30C1 z.B. das *TNRC6A* (*trinucleotide repeat containing 6A*) und das *CELSR3 (cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3)* Transkript.

Studien von Yoo et al. haben gezeigt, dass im Vergleich zu normalen Zellen, eine gesteigerte *TNRC6A* Expression in Prostata- und Ösophaguskarzinomen vorliegt, die mit miRNA-Funktionen zusammenhängen und eine Rolle in der Tumorgenese dieser Tumorarten spielen kann (Yoo et al., 2010). Darüber hinaus konnten Kim et al. einen Zusammenhang zwischen *TNRC6A* und dem Gastritis-und Kolonkarzinom nachweisen (Kim et al., 2010). Mittels SSCP *(single-strand conformation*

polymorphism)- und DNA-Sequenzanalysen konnte hier in 52% der Gastritis- und in 54% der Kolonkarzinome (mit hoher Mikrosatelliteninstabilität) der Verlust der *TNRC6A*-Expression beobachtet werden. Dies führt zu der Annahme, dass Mutationen und der Verlust der *TNRC6A*-Expression durch Fehlregulation der miRNA zur Entstehung von Gastritis- und Kolonkarzinomen beitragen könnte.

Im Vergleich zu TNRC6A ist CELSR3 ein Mitglied der Flamingo-Proteinfamilie, die zu der Cadherin-Subfamilie gehört. Untersuchungen an Pankreassternenzellen, die aus dem Gewebe von Patienten mit duktalen Adenokarzinom des Pankreas isoliert wurden, haben gezeigt, dass neben JAK2 *(Janus kinase 2)* auch CELSR3 in Tumorsternenzellen hochreguliert sein kann (Erkan et al., 2010). Die Hochregulierung von CELSR3 in Pankreastumorsternenzellen könnte einen potentiellen Angriffspunkt für Therapiemöglichkeiten darstellen, da das Protein in der Plasmamembran lokalisiert ist und Signal-übermittelnde Fähigkeiten besitzt (Katoh, 2005). Darüber hinaus könnte CELSR3 als Biomarker für Pankreastumorsternenzellen eingesetzt werden (Erkan et al., 2010). Das Biomarkerpotential von CELSR3 konnte ebenfalls durch *in vivo* Versuche von Scarlett et al. an Mäusen mit chronischer Pankreatitis bzw. mit Pankreaskarzinom bestätigt werden (Scarlett et al., 2011). Es konnte nachgewiesen werden, dass CELSR3 nur von Krebs-assoziierten Pankreassternzellen exprimiert wurde und damit als spezifischer Marker für diese Tumorart fungieren könnte.

Zu den Targets der MIR500B gehören z.B. das *LUC7L3 (LUC7-like 3)*, das *ACE2* (*angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2)* und das *CHSY1 (chondroitin sulfate synthase 1)* Transkript. Aus der Literatur ist bekannt, dass LUC7L3 eine Rolle für Krebserkrankungen des Hals-Nasen-Rachen-Raums spielt. Studien von Zaatar et al. haben an 447 untersuchten Blutproben nachgewiesen, dass *LUC7L3* zusammen mit den Genen *LDLRAP1* und *PHF20* eine auf Blut basierende Gensignatur darstellt, die es ermöglicht NPC-Patienten (*nasopharyngeal carcinoma*) von gesunden Probanden sowie anderen Krankheitsbildern zu unterscheiden (Zaatar et al., 2012). Gleichzeitig konnten Messungen der Expression zeigen, dass LUC7L3 *(cisplatin resistant overexpressed protein (CROP))* am Prozess des RNA-Spleißens beteiligt ist (Zaatar et al., 2012). Es wird angenommen, dass Cisplatin ebenfalls das RNA-Spleißen beeinflusst, indem es die nukleäre Verteilung von CROP ändert (Umehara et al., 2003). Des Weiteren konnten Studien von Nishii et al. zeigen, dass die LUC7L3-Expression in Cisplatin-resistenten

Nierenkarzinomzelllinien ACHN/CDDP höher ist als in nicht resistenten Zellen (Nishii et al., 2000). Daher ist annehmbar, dass die derzeit neoadjuvante, auf Cisplatin-basierende Chemotherapie, die ein Standardverfahren zur Behandlung von Muskel-invasiven Blasenkarzinomen darstellt (Pilmack et al., 2014) und die Kombinations-Chemotherapie mit Cisplatin, die einen Grundstein für die Behandlung von Karzinomen ist, mit dem Problem konfrontiert werden können, dass Krebszellen eine Cisplatin-Resistenz erlangen (Florea et al., 2011). Die Resistenz kann auf eine Vielzahl von zellulären Adaptationen zurückgeführt werden, wozu die reduzierte Aufnahme, Inaktivierung durch Glutathione und andere Antioxidantien, sowie der Anstieg an DNA-Reparaturen zählt (Rabik und Dolan 2007). Biomarker zur Bestimmung von Zytostatikaresistenzen stellen eine Möglichkeit dar, „Übertherapien" durch falsche Medikation zu vermeiden und könnten in Zukunft personalisierte Therapien ermöglichen, um die Behandlung und Überwachung von invasiven als auch nichtinvasiven Harnblasenkarzinomen effizienter zu machen. Darüber hinaus könnte eine vorzeitige Sensitivitätsuntersuchung der Patienten auf Chemotherapeutika mittels der neuen Biomarker wie z.B. das *LUC7L3*, die Ausgaben für die kostenintensive Therapie und Überwachung der Harnblasenkarzinome reduzieren. Gleichzeitig bietet die Entdeckung neuer Gene, die an der Resistenz des Blasentumors beteiligt sind, neue Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Medikamente.

Demzufolge lässt der Nachweis der hypermethylierten MIR500B -die in 50% der untersuchten Proben beider Kohorten vorkommt- die Hypothese zu, dass das Risiko für diese Patienten eine Cisplatin-Resistenz zu erlangen, erhöht sein könnte. Andererseits kann eine gesteigerte Expression des *ACE2* Gens vor Krebserkrankungen, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen schützen (Clarke et al., 2013). Feng et al. konnten nachweisen, dass die Überexpression von ACE2 zu einem antitumor Effekt in NSCLCs *(non-small cell lung cancer)* durch Inhibierung der Angiogenese und der Tumorzellteilung führt (Feng et al., 2011). Studien von Zhou et al., 2011 haben gezeigt, dass ACE2 sehr gering in der Pankreas exprimiert wird und eine Rolle in der Entwicklung von Pankreaskrebs spielt. Durch ACE2-Überexpression konnte in dieser Studie ein verzögertes Wachstum und sogar eine Abnahme der Tumoren erreicht werden. Des Weiteren führte eine Reaktivierung der ACE2-Expression im Pankreaskrebs-Tiermodell zu einer signifikanten Inhibierung des bestehenden Tumorwachstums und zu einer stark erhöhten Antitumoraktivität von

dem Zytostatikum Gemcitabin sowie zu einer verlängerten Überlebenszeit der Tiere. Daher postuliert Zhou et al. ACE2 als einen möglichen Kandidaten zur Behandlung von Pankreaskrebs (Zhou et al., 2011).

Über das potentielle miRNA Zielgen *CHSY1* ist im Zusammenhang mit Karzinomen noch nicht viel bekannt. Allerdings konnten Yin et al. in Tiermodellen nachweisen, dass CHSY1 ein Schlüsselmolekül für die Interaktion zwischen den Myelomzellen und den Osteoklasten ist, dessen Reduzierung mit einer gesteigerten Apoptose assoziiert wird (Yin et al., 2005).

Zu den Targets der MIR4493 gehören z.B. das *CFLAR (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator)* und das *DEK (DEK oncogene)* Transkript. Für CFLAR konnten neuste Untersuchungen von Holubova et al., 2014 zeigen, dass es an der langfristigen Resistenz gegen Zink beteiligt ist. Zinkionen sind wichtige Komponenten von vielen Proteinen und an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Apoptose oder der Medikamentenresistenz, involviert (Holubova et al., 2014). Darüber hinaus ist aus der Literatur bekannt, dass vor allem zwischen dem Prostatakarzinom und den Zinkionen eine besondere Verbindung besteht. Daher postuliert Holubova, dass CFLAR neben NF-κB und KRAS ebenfalls an der Entstehung der Zinkresistenz und damit zur Verschlechterung der Heilbarkeit des Prostatkarzinoms beteiligt ist.

DEK spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung sowie Progression von Krebs (Piao et al., 2014). Studien von Piao et al. haben mit Hilfe von Expressionsuntersuchungen gezeigt, dass eine hohe DEK-Expression mit einer schlechten Prognose für Patienten mit einem Magenkarzinom einhergeht (Piao et al., 2014). Die DEK-Expression konnte in 60% der untersuchten Magengewebeproben nachgewiesen werden und könnte als potentieller und effektiver Biomarker zur prognostischen Einschätzung von Magenkarzinomen fungieren. Des Weiteren konnten Untersuchungen zeigen, dass DEK auch eine Rolle in Kolonkarzinomen spielt (Yu et al. 2014). Gewebeproben von Kolonkarzinompatienten wiesen ebenfalls eine erhöhte DEK-Expression auf, die ggf. als Biomarker eingesetzt werden könnte.

Doch nicht nur die Ziel-Targets der miRNAs sind an Blasenkarzinomen beteiligt, sondern auch die miRNAs selbst. Fehlregulierung der microRNAs werden in Verbindung mit Blasentumoren gebracht, obwohl der Mechanismus noch nicht vollständig bekannt ist (Shimizu et al., 2013).

Für Blasenkarzinome konnte gezeigt werden, dass verschiedene miRNAs in wichtige Signaltransduktionswege eingreifen (Fendler et al., 2011) und das die DNA-Methylierung als auch die miRNA-Expression immer mehr Beachtung als potentielle Biomarkerkandidaten gewinnen (Köhler et al., 2013). Jüngste Studien haben gezeigt, dass die Stilllegung verschiedener miRNAs eng an epigenetische Mechanismen gebunden ist, einschließlich der Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung (Saito et al., 2006; Suzuki et al., 2011). Darüber hinaus ist die Stilllegung der miRNA-Expression in Blasenkarzinomen mit der DNA-Methylierung assoziiert, in die häufig CpG-Inseln und CpG shores involviert sind (Wiklund et al., 2011; Dudziec et al., 2011). Es wird angenommen, dass ca. ein Drittel der miRNA-Loci in der Nähe von CpG-Inseln liegen (Dubziec et al., 2011). Untersuchungen an Harnblasenkarzinomzelllinien zur DNA-Methylierung in MicroRNA-Loci haben ergeben, dass von 664 miRNAs 12 hypermethylierte miRNAs detektiert werden konnten, von denen 4 (miR-137, miR-124-2, miR-124-3 und miR-9-3) häufig und tumorspezifisch in primären Karzinomen methyliert auftraten. Diese vier hypermethylierten miRNAs konnten mit einer Sensitivität von 81% und Spezifität von 89% ebenfalls in den Urinproben von Tumorpatienten nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnten Köhler et al. ebenfalls an Harnblasenkarzinomzelllinien nachweisen, dass die miRNAs miR-152, miR-10a und miR200b hypermethyliert in Blasenkarzinomzellen vorliegen und damit als mögliche epigenetische Blasenkrebs-Biomarker fungieren könnten (Köhler et al., 2013).

Trotz der geringen Anzahl an hypermethylierten miRNAs, die hier im Gewebe von Harnblasenkarzinompatienten ermittelt worden sind, spiegelt das Ergebnis der differentiell methylierten miRNAs das Resultat der zuvor untersuchten DMRs wider. Denn auch hier erwies sich die freie Urin-DNA am wichtigsten, da in dieser DNA-Fraktion die meisten differentiell methylierten miRNAs bestimmt werden konnten.

Auffällig ist jedoch, dass im Vergleich zu dem analysierten Blasentumorgewebe im Plasma zwei bis sechs Mal so viele hypermethylierte sowie fünf bis zehn Mal so viele hypomethylierte miRNAs beobachtet werden konnten. Doch auch in der zellulären Urin-Fraktion konnten im Bezug zu den Gewebekohorten mindestens doppelt so viele hyper- als auch mindestens 5-mal so viele hypomethylierte miRNAs bestimmt werden.

Durch Bildung der miRNA-Schnittmenge zwischen den DMRs der beiden Gewebekohorten und den Körperflüssigkeiten konnten hyper- (MIR758, MIR516B2,

MIR506) als auch hypomethylierte (z.B. MIR526A, MIR524, MIR4522, MIR662) miRNAs in der Urin-DNA ermittelt werden, die somit als potentielle Biomarker zur Detektion von frühen Blasenkarzinomen in Frage kommen.

Über die Beteiligung der MIR526A in Karzinomen ist bis lang nichts bekannt, jedoch gehören *GIPC3 (GIPC PDZ domain containing family, member 3)*, *MYO5A (myosin VA (heavy chain 12, myoxin))* und *GHSR (growth hormone secretagogue receptor)* mit über 90% zu den primären Targets der hier hypomethylierte MIR526A.

GPIC3 bildet zusammen mit GIPC1/GIPC/RGS19IP1 und GIPC2 die humane GIPC Familie und könnte zusammen mit GIPC1 und GIPC2 eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese und Embryogenese durch Modellierung von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsion spielen (Katoh, 2002). In der Studie von Méndez et al. wurde *MYO5A* als eines von vier Genen identifiziert, die gemeinsam die größte Prognose darstellen, um die Entstehung von Lymphknotenmetastasen in Mundhöhlenkrebs nachzuweisen (Méndez et al. 2011). Zusätzlich wird von Galland et al. postuliert, dass eine differentielle MYO5A Expression in NFPAs *(Non-functioning pituitary adenomas)* ein nutzvoller Marker für die Tumorinvasivität sein könnte (Galland et al., 2010).

Ghrelin und GHSR dagegen werden in vielen normalen als auch tumorösen Gewebe exprimiert (Chopin et al., 2012), wobei Ghrelin ein geeigneter Biomarkerkandidat zur Detektion von Prostatakarzinomen sein könnte. Allerdings führt die Stilllegung der GHSR-Expression zur Inhibierung des Zellwachstum des Endometriumkarzinoms *in vitro* und *in vivo* (Fung et al., 2013) und stellt damit ein mögliches Therapeutikum für diese Karzinomart dar. Sollte somit die miRNA 526A durch eine Fehlregulation wie beispielsweise die gefundene Hypomethylierung diese Targets beeinflussen, könnte sie zu ähnlichen Effekten im Harnblasenkarzinom beitragen.

4.5 Ausblick II

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Krebs-assoziierte Hypermethylierung von CpG-Inseln (CGIs) ein nutzvoller Biomarker für die Diagnostik, Prognostik und der Nachsorge sein kann (Kandimalla et al., 2012). Daher werden die in dieser Studie gefundenen hyper- als auch hypomethylierten DMRs als potentielle Biomarker angesehen, mit deren Hilfe ein minimalinvasiver Früherkennungstest zur Detektion von Harnblasenkarzinomen entwickelt werden könnte. Daher sollten im weiteren Schritt die Sequenzen der ausgewählten DMRs auf ihre CpG-Inseln untersucht und nach Möglichkeit Primer definiert und getestet werden, um herauszufinden, welche

der Marker mittels der *real time* PCR unter Verwendung des IDLN-Verfahrens zur Bestimmung von frühen Blasentumoren eingesetzt werden können.
Die anschließende Kombination bestimmter Marker könnte eine höhere Spezifität und Sensitivität ermöglichen. Denn bislang ist kein einzelner Marker bekannt, der beide Kriterien in der Frühdiagnostik als auch Therapieüberwachung zufriedenstellend erfüllt. In einer darauf folgenden Studie, in der Einflussfaktoren wie andere Krankheitsbilder (z.B. Entzündungen und Nierensteine) ausgeschlossen werden, könnten die potentiellen Marker validiert werden. Darüber hinaus könnten weitere globale DNA-Methylierungsanalysen und damit detektierte DMRs von fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen in Gewebe- als auch Urin-DNA bestimmt werden, um so potentielle Biomarker für aggressive, multifokale wie auch unifokale Blasenkarzinome zu erhalten, bzw. invasiven von nichtinvasiven Blasentumoren unterscheiden zu können. Durch Etablierung dieser epigenetischen Biomarker wäre es möglich Ärzte und Pathologen bei der Diagnosefindung zu unterstützen, ohne den Patienten durch Eingriffe wie die Zystoskopien zu belasten. Zusätzlich könnte durch den Nachweis prädiktiver epigenetischer Biomarker in der postoperativen, freien DNA des Urins die Therapieüberwachung sowie eine frühzeitige Entdeckung von Rezidiven gestützt werden.
Des Weiteren könnten die detektierten microRNAs, die als Subgruppe betrachtet worden sind, ebenfalls eine signifikante Rolle zur Entwicklung eines minimaltinvasiven Diagnostikums für Harnblasenkarzinome spielen. Denn eine einzelne miRNA kann bis zu 200 unterschiedliche Target-mRNAs beeinflussen, wohingegen eine mRNA ebenfalls von verschiedenen miRNAs kontrolliert werden kann (Lim et al., 2005). In Abhängigkeit von ihren entsprechenden Zielgenen können sie als Onkogene oder Tumorsuppressorgene fungieren (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).
Erste Studien haben gezeigt, dass die epigenetische Regulation von miRNAs im Blasenkarzinom eine wesentliche Rolle spielen kann (Dudziec et al., 2010; Zabolotneva et al., 2013). Daher wird hier postuliert, dass die in dieser Studie detektierten, differentiell methylierten miRNAs eine fundamentale Rolle in der epigenetischen Ätiologie des Harnblasenkarzinoms spielen könnten. Auf Grund dessen sollte die Methylierung der miRNAs (30C1, 500B und 4493) als auch ihrer Targets weiter untersucht werden.

In weiteren Versuchen sollte die Expression, vor allem der aus der Gewebekohorten-Schnittmenge resultierenden hypermethylierten miRNA 30C1, 500B und 4493 untersucht werden. Das Ergebnis könnte nicht nur die Methylierungsanalysen zusätzlich untermauern, sondern auch eine Aussage darüber ermöglichen, ob die miRNAs selbst (einzeln oder in Kombination) als Biomarker fungieren können.
Sollte die Expression erfolgreich nachgewiesen werden können, kann im Zelllinienmodel (z.B. mit HT1376 oder SW1710) der Effekt der Überexpression bzw. Repression der miRNAs auf ihre Targets und damit auf die Blasenkrebszelle selbst untersucht werden. Somit könnte die Hypothese überprüft werden, ob mittels Hypomethylierung und Reexpression der miRNA 500B das Target LUC7L3, das zu Cisplatin-Resistenz führt, inhibiert werden kann und auf diese Weise die Aufhebung oder Reduzierung der Resistenz bewirkt werden könnte. Darüber hinaus könnte der Nachweis der LUC7L3-Expression selbst eine diagnostische Unterstützung zur Findung der optimalen Chemotherapie des jeweiligen Patienten sein.

5.1 Zusammenfassung

Epigenetische Regulatoren wie die DNA-Methylierung spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Dabei stellen aberrante Methylierungsmuster in Harnblasenkarzinomen eine zentrale Veränderung dar, die die Entwicklung von neuen Diagnostikverfahren und Therapieansätzen ermöglichen können. Daher wurde die Hypothese verfolgt, dass Urin als Untersuchungsmaterial am Geeignetsten zur Entwicklung von nichtinvasiven Diagnostikverfahren ist.

Die Ergebnisse aus dem ersten Teil der Arbeit haben gezeigt, dass DNA aus Urin als Ausgangsmaterial zur Entwicklung von neuen epigenetischen Testverfahren und zum Nachweis der Methylierung in Retrotransposons gut geeignet ist. Darüber hinaus können die Lagerung der Urinproben bei -20°C und die Zugabe von DNA-schützenden Reagezien wie EDTA und Protease, negative Einflüsse (wie DNA-Degradationsprozesse und Einflüsse durch Fremd-DNA) auf die PCR-Effizienz, weitestgehend verhindern. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, wie essentiell die Optimierung der PCR-Bedingungen (Primer-Konzentration, DNA-Templatemenge) für die Ermittlung der Spezifität sowie Sensitivität ist.

Die Annahme, dass freie DNA- die vermehrt von den Tumorzellen freigegeben wird, geeigneter zur Bestimmung des Methylierungsstatus ist als die zelluläre DNA, konnte nicht bestätigt werden. Beide DNA-Fraktionen wiesen eine gleich starke Sensitivität (ca. 90%) und gleichzeitig geringe Spezifität (ca. 37%) auf. Es ist gelungen eine Korrelation zwischen dem autonomen LINE-1 und dem nicht-autonom replizierenden Alu Element nachzuweisen, wobei angenommen wird, dass sich die Alu Elemente der *„trans-acting“* Faktoren der LINEs bedienen.

Methylierungsuntersuchungen des LINE-1 Promotors, die mit Hilfe von Bisulfit-Sequenzierungsanalysen zellulärer und freie Urin-DNA von Blasenkarzinompatienten durchgeführt wurden, sowie der Nachweis der LINE-1 Transkription, haben weitere Evidenzen für die Aktivität des LINE-1 Retrotransposons im Harnblasenkarzinom geliefert. Dabei konnte beobachtet werden, dass bestimmte CpG-Positionen bevorzugt demethyliert werden und dass es sich hier um eine vollständiges „full-length“ LINE-1 Element handelt, das zur Transposition fähig sein kann. Gleichzeitig ist es gelungen einen neu kreierten Parameter, bestehend aus dem Quotienten LINE-1-Methylierung-/LINE-1-Transkription zu ermitteln, der für die Entwicklung neuer nichtinvasiver Testverfahren zur Diagnose, Prognose und ggf. einem Monitoring dienlich sein könnte.

Zusätzliche Promotoranalysen mittels der MIRECAL-Methode, die die direkte und quantitative Analyse der Chromatinzugänglichkeit des LINE-1 Promotors nachweisen sollten, konnten nur in vereinzelten zellulären Urinproben von Patienten gezeigt werden. Die Methode erwies sich für die Urinproben als ungeeignet, auf Grund einer geringen Reproduzierbarkeit.

Southern Blot-Untersuchungen mit deren Hilfe die Telomerenlängen der Urin- und Blut-DNA von Blasenkarzinompatienten bestimmt wurden, führten zu der Annahme, dass zwar die Telomere der Blut- und zellulären Urin-DNA zum Nachweis eingesetzt werden können, jedoch diese Methode zur Bestimmung der Progression von Blasentumoren eher ungeeignet ist.

Der zweite Teil der Arbeit, befasst sich mit der Suche nach neuen differentiell methylierten Regionen. Die in dieser Studie gefundenen hyper- als auch hypomethylierten DMRs können als potentielle Biomarker angesehen werden. Mit deren Hilfe kann ein nichtinvasiver Früherkennungstest zur Detektion von Harnblasenkarzinomen entwickelt werden. Es konnten zahlreiche hyper- und hypomethylierte DMRs sowohl erfolgreich im Gewebe als auch in Urin und Blutplasma von Harnblasenkarzinompatienten bestimmt werden. Darüber hinaus konnten mit Hilfe einer Subgruppenanalyse hyper- und hypomethylierte miRNAs sowie ihre Targets ermittelt werden. Ihre Zielgene (z.B. LUC7L3, ACE2 und CHSY1), aber auch sie selbst, könnten als potentielle Biomarker für einen nichtinvasiven Früherkennungstest eingesetzt werden. Ebenfalls könnten sie als neue Angriffspunkte zur Entwicklung von neuen Therapiebehandlungen dienen.

5.2 Summary

Epigenetic regulators such as DNA methylation play an important role in tumorigenesis. Thereby aberrant methylation patterns represent an essential change in bladder cancer, which can be used for the development of new diagnostic procedures and therapeutic approaches. Therefore the hypothesis was pursued, that urine can be most suitable for the development of noninvasive diagnostic procedures.The results from the first part of the dissertation have shown that DNA from voided urine is well suited to develop new epigenetic assays and can be used for the detection of methylation from retrotransposons. Moreover, the storage of the urine samples at -20 ° C and the addition of DNA-protecting reagents such as EDTA and protease, can prevent the PCR efficiency from negative influences (DNA degradation and influences by foreign DNA). At the same time, the importance of the optimized PCR conditions (primer concentration, template DNA amount) for the determination of specificity and sensitivity was demonstrated.The assumption that free DNA-which is increasingly, released from the tumor cells- is suitable for the determination of methylation status, could not be confirmed. Both DNA fractions show an equally strong sensitivity (80%) and low specificity (about 37%) on. However, it was possible to prove a correlation between the autonomous LINE-1 and the non-autonomous Alu element, that it can be assumed that the Alu elements use the "*trans-actin"* factors of LINE-1.

Methylation analysis of the LINE-1 promotor performed by genomic sequencing of bisulfite-converted cellular and cell-free DNA from bladder cancer patients and the proof of the LINE-1 transcription, show evidences for the LINE-1 activitiy.The data revealed that certain CpG positions appear to be more susceptible to demethylation and it seems to be a full-length LINE-1 element that is able for transposition.

Concurrent a new parameter was created (quotient LINE-1 methylation/LINE-1 transcription), that could be used for the development of noninvasive diagnostic, prognostic or monitoring procedures.

Additionally LINE-1 promoter analysis by MIRECAL, which allow a direct and quantitative analysis of chromatin accessibility, was only possible in few cellular DNA urine samples. Due to the non-reproducibility the method was not suitable in case of urine samples.

Both, DNA from blood and cellular DNA from voided urine can be used successefully to determine the length of the telomeres. This was proofed by the southern blot

analysis. However, this method is not suitable to determine the progression of bladder cancer.

The second part of this dissertation is focused on new differential methylated regions. Those detected hyper- and hypomethylated regions can be considered as new potential biomarkers for the development of noninvasive early diagnosis assay for bladder cancer. Hyper- and hypomethylated DMRs were successfully detected in tissue, blood and urine from bladder cancer patients. Furthermore, hyper- and hypomethylated miRNAs and their targets were also detected in the tissue and body fluids. Their targets (such as LUC7L3, ACE2 and CHSY1), also the miRNAs themselves can be potential biomarkers for noninvasive early diagnosis assay. They can also be used as new approach for the development of new therapy treatments to detect bladder cancer, progression and recurrent.

6. Literaturverzeichnis

Ade C, Roy-Engel AM, Deininger PL. (2013) Alu elements: an intrinsic source of human genome instability. *Curr Opin Virol* S1879-6257(13)00153-3

American Cancer Society. (2011) *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ and Stroun M. (1999) Detection of circulating tumor DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 18: 65-73

Antequera F and Bird A. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci* 90:11995–11999

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1999) Short protocols in *Molecular Biology*, 4th Edition

Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Compérat E, Sylvester RJ, Kaasinen E, Böhle A, Palou Redorta J, Rouprêt M. (2013) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 64(4):639-53

Bae CD[1], Sung YS, Jeon SM, Suh Y, Yang HK, Kim YI, Park KH, Choi J, Ahn G, Park J.(2003)Up-regulation of cytoskeletal-associated protein 2 in primary human gastric adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 129(11):621-30

Bambury RM, Rosenberg JE. (2013) Actionable mutations in muscle-invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol* 23(5):472-8

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120-124

Bartoletti R, Dal Canto M, Cai T, Piazzini M, Travaglini F, Gavazzi A and Rizzo M. (2005) Early diagnosis and monitoring of superficial transitional cell carcinoma by microsatellite analysis on urine sediment. *Oncol Rep* 13:531-537

Beaumont KA, Liu YY, Sturm RA. (2009) The melanocortin-1 receptor gene polymorphism and association with human skin cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 88:85-153

Beermann A, Ghanjati F, Hermanns T, Poyet C, Pereira J, Fischer J, Wernet P, Santourlidis S. (2011) Methods for Separate Isolation of Cell-Free DNA and Cellular DNA from Urine-Application of Methylation- Specific PCR on both DNA Fractions.*The Open Biomarkers Journal* 4, 15-17

Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. (2008) Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res* 18:343-358

Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger PL. (2010) All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Semin Cancer Biol* 20(4):200-10

Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. (1965) Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science* 148:374–376

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315-26

Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, Tiozzo R, Sharrard M, Corti A. (1999) Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 446(1):18–22

Bharaj BB, Luo LY, Jung K, Stephan C, Diamandis EP. (2002) Identification of single nucleotide polymorphisms in the human kallikrein 10 (KLK10) gene and their association with prostate, breast, testicular, and ovarian cancers. *Prostate* 51(1):35-41

Bird A and Wolffe AP. (1999) Methylation-induced repression-Belts, braces and chromatin. *Cell* 99:451-454

Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1):6-21

Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabrò E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G. (2011) MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(9):3713-8

Bomjen G, Raina A, Sulaiman IM, Hasnain SE, Dogra TD. (1996) Effect of storage of blood samples on DNA yield, quality and fingerprinting: a forensic approach. *Indian J Exp Biol* 34:384-386

Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. (2003) The health economics of bladder cancer: A comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 21:1315-1330

Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jöckel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P. (2000) Cigarettesmoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86:289–294

Brunelle JK, Letai A. (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci* 122:437–441

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. (1991) Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 6:2305–9

Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. (1993) Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumoursuppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 8:1083–5

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) HumanmicroRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2999–3004

Cao R[1], Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science 1;298(5595):1039-43

Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. (1999) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature Genetics* 23:18–20

Cardoso MC, Leonhardt H. (1999) DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol* 147:25-32

Carlson LL, Page AW, Bestor TH. (1992) Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev* 6:2536–2541

Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, Bravaccini S, Gunelli R, Martorana G, Bertaccini A, Serra L, Scarpi E, Amadori D, Silvestrini R, Zoli W. (2012) Urine Cell-Free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: Preliminary data. *Urol Oncol* 31(8):1744-50

Cash HL[1], Tao L, Yuan JM, Marsit CJ, Houseman EA, Xiang YB, Gao YT, Nelson HH, Kelsey KT. (2012) LINE-1 hypomethylation is associated with bladder cancer risk among nonsmoking Chinese. *Int J Cancer* 130:1151-9

Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. (2010) Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol* 28:401-8

Catto JW, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudziec E, Larré S, Milo M, Rehman I, Rosario DJ, Di Martino E, Knowles MA, Meuth M, Harris AL, Hamdy FC. (2009) Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res* 69(21):8472-81

Catto JW, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudziec E, Larré S, Milo M, Rehman I, Rosario DJ, Di Martino E, Knowles MA, Meuth M, Harris AL, Hamdy FC. (2011) Hypermethylation of CpG islands and shores around specific microRNAs and mirtrons is associated with the phenotype and presence of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 17:1287-96

Catto JWF, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC. (2005) Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 23:2903-10

Chalasani V, Chin JL, Izawa JI. (2009) Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer*. Can Urol Assoc J.* 3(6 Suppl 4):193-8

Chan MWY, Chan LW, Tang NLS, Tong JHM, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. (2002) Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 8:464-70

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395(6697):89-93

Chopin LK, Seim I, Walpole CM, Herington AC. (2012) The ghrelin axis-does it have an appetite for cancer progression? *Endocr Rev* 33(6):849-91

Christensen BC, Marsit CJ. (2011) Epigenomics in environmental health*. Front Genet* 2:84

Clark SJ and Frommer M. (1995) In Saluz and Wiebauer (eds) DNA and Nucleoprotein Structure In Vivo. R. G. *Landes Company, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany* pp. 123–136

Clark SJ and Frommer M. (1997) In Taylor (ed.) Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*. CRC Press Boca Raton* pp. 151–162

Clark SJ, Harrison J, Paul CL and Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22: 2990–2997

Clarke NE, Belyaev ND, Lambert DW, Turner AJ. (2013) Epigenetic regulation of angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) by SIRT1 under conditions of cell energy stress. Clin Sci (Lond)

Clayson DB. (1981) Specific aromatic amines as occupational bladder carcinogens. *Natl Cancer Inst* 58:15-19

Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA. (1992) Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 52:3577-3581

Cordaux R, Batzer MA. (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10:691-703

Corsini LR, Bronte G, Terrasi M, Amodeo V, Fanale D, Fiorentino E, Cicero G, Bazan V, Russo A. (2012) The role of microRNAs in cancer: diagnostic and prognostic biomarkers and targets of therapies. *Expert Opin TherTargets* 16(Suppl.2):S103– S109

Cortez MA, Welsh JW, Calin GA. (2012) Circulating microRNAs as non invasive biomarkers in breast cancer. *Recent Results Cancer Res* 195:151–161

Cost GJ, Boeke JD. (1998) Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry* 37:18081-18093

Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD. (2002) Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* 21:5899-5910

Croce CM. (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:704–14

Dai KS[1], Wei W, Liew CC. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel human gene containing ankyrin repeat and double BTB/POZ domain. *Biochem Biophys Res Commun* 273(3):991-6

D'Alessio AC, Szyf M. (2006) Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 84:463–76

de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol10* (2):518-27

Deininger PL & Batzer MA. (2002) Mammalian retroelements. *Genome Res* 12:1455-1465.

Deininger PL, Batzer MA. (1999) Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 67:183–93

Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35:41-48

Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16368–16373

Dip N, Reis ST, Srougi M, Dall'Oglio MF, Leite KR. (2013) Expression profile of microrna-145 in urothelial bladder cancer. *Int Braz J Urol* 39(1):95-101

Dombroski BA, Scott AF and Kazazian HH. (1993) Two additional potential retrotransposons isolated from a human L1 subfamily that contains an active retrotransposable element. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6513–6517

Driscoll DJ. (1994) Genomic imprinting in humans. *Mol Genet Med* 4:37–77

Droller MJ. (1998) Alterations of the p53 gene in occupational bladder cancer in workers exposed to aromatic amines. *J Urol* 160:618

Dudziec E, Miah S, Choudhry HM, Owen HC, Blizard S, Glover M, Hamdy FC, Catto JW. (2011) Hypermethylation of CpG islands and shores around specific microRNAs and mirtrons is associated with the phenotype and presence of bladder cancer. *Clin Cancer Res*17(6):1287-96

Dudziec E, Miah S, Choudhry HM, Owen HC, Blizard S, Glover M, Hamdy FC, Catto JW. (2011) Hypermethylation of CpG islands and shores around specific microRNAs and mirtrons is associated with the phenotype and presence of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 17(6):1287-96

Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. (2004) Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 10:1887-93

Ehrlich, M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21:5400-5413

Eickbush TH. (1997) Telomerase and retrotransposons: Which came first? *Science* 277:911–12

Engeler D, Wyler S, Schmid H P. (2005) Das Harnblasenkarzinom (1). Ätiologie, Epidemiologie und Diagnostik. *ONKOLOGIE* 12-14

Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(49):17312–5

Epigenetics, Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. © 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Press

Epigenetics, Craig and Wong, Caister Academic Press Norfolk 2011

Epigenetics, Hallgrimsson B, Hall B K, University of California Press, © 2011

Erichsen L. (2013) DNA Methylierungsveränderungen des Methylgruppenstoffwechselweges beim Harnblasenkarzinom. *Heinrich-heine Universität Düsseldorf*

Erkan M[1], Weis N, Pan Z, Schwager C, Samkharadze T, Jiang X, Wirkner U, Giese NA, Ansorge W, Debus J, Huber PE, Friess H, Abdollahi A, Kleeff J. (2010) Organ-,inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Mol Cancer* doi: 10.1186/1476-4598-9-88

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. (2006) Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-69

Estécio MR, Gharibyan V, Shen L, Ibrahim AE, Doshi K, He R, Jelinek J, Yang AS, Yan PS, Huang TH, Tajara EH, Issa JP. (2007) LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS One* 2(5):e399

Esteller M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21(35):5427-40

Esteller M. (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:629-56

Esteller M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8(4):286-98

Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358(11):1148-59

Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-92

Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Jung K. (2011) microRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors. *Clin Chem* 57:954–968

Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr. Boeke JD. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87:905-916

Feng Y, Ni L, Wan H, Fan L, Fei X, Ma Q, Gao B, Xiang Y, Che J, Li Q. (2011) Overexpression of ACE2 produces antitumor effects via inhibition of angiogenesis and tumor cell invasion in vivo and in vitro. *Oncol Rep* 26(5):1157-64

Ferlay J, Randi G, Bosetti C, Levi F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. (2008) Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int* 101:11–9

Figueiredo JC, Grau MV, Wallace K, Levine AJ, Shen L, Hamdan R, Chen X, Bresalier RS, McKeown-Eyssen G, Haile RW, Baron JA, Issa JP. (2009) Global DNA hypomethylation (LINE-1) in the normal colon and lifestyle characteristics and dietary and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:1041-9

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9(2):102-14

Fleischhacker M & Schmidt B. (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775:181–232

Florea AM, Büsselberg D. (2011) Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3:1351–1371

Florl AR, Franke KH, Niederacher D, Gerharz CD, Seifert HH, Schulz WA. (2000) DNA methylation and the mechanisms of *CDKN2A* inactivation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Laboratory Investigation* 80(10):1513–1522

Florl AR, Löwer R, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA. (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 80(9):1312-21

Fonseca AL[1], Kugelberg J, Starker LF, Scholl U, Choi M, Hellman P, Åkerström G, Westin G, Lifton RP, Björklund P, Carling T. (2012) Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 51(10):949-60

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genet* 37:391–400

Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G. (2004) Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 10(22):7457–65

Fröhling S, Döhner H. (2008) Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 359(7):722-34

Fung JN, Jeffery PL, Lee JD, Seim I, Roche D, Obermair A, Chopin LK, Chen C. (2013) Silencing of ghrelin receptor expression inhibits endometrial cancer cell growth in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(2):E305-13

Gabory A, Jammes H, Dandolo L. (2010) The H19 locus: role of an imprinted non coding RNA in growth and development. *Bioessays* 32:473-480

Galland F, Lacroix L, Saulnier P, Dessen P, Meduri G, Bernier M, Gaillard S, Guibourdenche J, Fournier T, Evain-Brion D, Bidart JM, Chanson P. (2010) Differential gene expression profiles of invasive and non-invasive non-functioning pituitary adenomas based on microarray analysis. *Endocr Relat Cancer* 17(2):361-71

Gao T, He B, Pan Y, Gu L, Chen L, Nie Z, Xu Y, Li R, Wang S. (2013) H19 DMR methylation correlates to the progression of esophageal squamous cell carcinoma through IGF2 imprinting pathway. *Clin Transl Oncol* [Epub ahead of print]

Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. (2006) The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. J Mol Biol 357:1383-1393

Ghanjati F.*, Beermann A. *, Hermanns T. *, Poyet C., Araúzo-Bravo M.J., Seifert H.H., Schmidtpeter M., Goering W., Sorg R., Wernet P., Santourlidis S. (2014) Unreserved application of epigenetic methods to define differences of DNA methylation between urinary cellular and cell-free DNA. (∗ contributed equally) In press by *Cancer Biomarkers*

Gogada R, Yadav N, Liu J, Tang S, Zhang D, Schneider A, Seshadri A, Sun L, Aldaz CM, Tang DG, Chandra D. (2013) Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer. *J Biol Chem* 288(1):368-81

Gold JD, Pedersen RA. (1994) Mechanisms of genomic imprinting in mammals. *Curr Top Dev Biol* 29:227–80

Goll MG & Bestor TH. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481–514

Goodison S, Rosser CJ, Urquidi V. (2013) Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine- and blood-based marker tests. *Mol Diagn Ther* 17(2):71-84

Graffmann N, Santourlidis S, Christ J, Wernet P, Uhrberg M. (2006) Direct and quantitative analysis of chromatin accessibility by MIRECAL-a Micrococcus nuclease/real-time PCR chromatin accessibility assay with locus specificity. Anal Biochem 354(2):308-10

Guijarro MV, Castro ME, Romero L, Moneo V, Carnero A. (2007a) Large scale genetic screen identifies MAP17 as protein bypassing TNF-induced growth arrest. *J Cell Biochem* 101:112–121

Guijarro MV, Leal JF, Blanco-Aparicio C, Alonso S, Fominaya J, Lleonart M, Castellvi J, Ramon y Cajal S, Carnero A. (2007b) MAP17 enhances the malignant behavior of tumor cells through ROS increase. *Carcinogenesis* 28:2096–2104

Guijarro MV, Leal JF, Fominaya J, Blanco-Aparicio C, Alonso S, Lleonart M, Castellvi J, Ruiz L, Ramon Y Cajal S, Carnero A. (2007c) MAP17 overexpression is a common characteristic of carcinomas. *Carcinogenesis* 28:1646–1652

Guijarro MV, Link W, Rosado A, Leal JF, Carnero A. (2007d) MAP17 inhibits Myc-induced apoptosis through PI3K/AKT pathway activation. *Carcinogenesis* 28:2443–2450

Gustafson S, Proper JA, Bowie EJW, Sommer StS. (1987) Parameters affecting the Yield of DNA from human blood. *Anal Biochem* 165: 294-299

Haaf T. (2005) Epigenetische Genomreprogrammierung im frühen Säugerembryo: Mechanismen und Pathologie. *medgen* 17:275-279

Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, Briem E, Zhang K, Irizarry RA, Feinberg AP. (2011) Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 43:768-75

Harris SE[1], Deary IJ, MacIntyre A, Lamb KJ, Radhakrishnan K, Starr JM, Whalley LJ, Shiels PG. (2006) The association between telomere length, physical health, cognitive ageing, and mortality in non-demented older people. *Neurosci Lett* 406 (3):260–4

Hashizume C, Moyori A, Kobayashi A, Yamakoshi N, Endo A, Wong RW. (2013) Nucleoporin Nup62 maintains centrosome homeostasis. *Cell Cycle* 12(24)

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346 (6287):866-8

Häusler SF, Keller A, Chandran PA, Ziegler K, Zipp K, Heuer S, Krockenberger M, Engel JB, Hönig A, Scheffler M, Dietl J, Wischhusen J. (2010) Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer* 103:693-700

Hausmann S, Zheng S, Fabrega C, Schneller SW, Lima CD, Shuman S. (2005) Encephalitozoon cuniculi mRNA cap (guanine N-7) methyltransferase: methyl acceptor specificity, inhibition BY S-adenosylmethionine analogs, and structure-guided mutational analysis. J Biol Chem 280(21):20404-12

Hautmann, Urologie, © Springer Medizin Verlag Heidelberg 2010, 4. Auflage

Hawkins OE, Vangundy RS, Eckerd AM, Bardet W, Buchli R, Weidanz JA, Hildebrand WH. (2008) Identification of breast cancer peptide epitopes presented by HLA-A*0201. *J Proteome Res* 7(4):1445-57

Heisel SM, Ketter R, Keller A, Klein V, Pallasch CP, Lenhof HP, Meese E. (2008) Increased seroreactivity to glioma-expressed antigen 2 in brain tumor patients under radiation. *PLoS One* 3 (5):e2164

Hendrich B and Bird A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18:6538-6547

Herman JG, Baylin SB. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349(21):2042-54

Herr HW. (1999) The natural history of a T1 bladder cancer: life-long tumour diathesis. *BJU Int* 84:1102-3

Herr HW. (2000) Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. *J Urol* 163: 60–62

Hoglund M, Sall T, Heim S, Mitelman F, Mandahl N, Fadl-Elmula I. (2001) Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 61:8241-8246

Höglund M. (2012) The bladder cancer genome; chromosomal changes as prognostic makers, opportunities, and obstacles. *Urol Oncol* 30(4):533-40

Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD and Kazazian HH. (1994) A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nat Genet* 7: 143–148

Holubova M[1], Axmanova M, Gumulec J, Raudenska M, Sztalmachova M, Babula P, Adam V, Kizek R, Masarik M. (2014) KRAS NF-κB is involved in the development of zinc resistance and reduced curability in prostate cancer. *Metallomics*

Huang X, Liang M, Dittmar R, Wang L. (2013) Extracellular microRNAs in urologic malignancies: chances and challenges. *Int J Mol Sci* 14(7):14785-99

Iacobuzio-Donahue CA. (2009) Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:229-49

Illingworth RS, Bird AP. (2009) CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* 583 (11):1713-20

Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP. (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. PLoS Genet 23: 6 (9): e1001134

Issa JP. (2008) Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. *Cancer Prev Res (Phil)* 1(4):219-22

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61:1659–1665

Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. (2006) De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* 66(2):682-92

Janković S, Radosavljević V. (2007) Risk factors for bladder cancer. *Tumori* 93(1):4-12

Janning W, Knust E, Genetik, Allgemeine Genetik- Molekulare Genetik- Entwicklungsgenetik, ® 2004 Georg Thieme Verlag

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69-90

Jenuwein T, Allis CD. (2001) Translating the histone code. *Science* 293(5532):1074-80

Johnstone DB, Holzman LB. (2006) Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:271-282

Jones PA, Baylin SB. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3:415–28

Jones PA, Baylin SB. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128(4):683-92

Jones PA, Liang G. (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10(11):805-11

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187–91

Kaatsch P, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A,Wolf U. (2012) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in

Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI), Hrsg., Krebs in Deutschland. 8. Ausgabe. Berlin, Robert Koch Institut

Kaer K[1], Speek M. (2013) Retroelements in human disease. *Gene* 518(2):231-41

Kandimalla R, van Tilborg AA, Kompier LC, Stumpel DJ, Stam RW, Bangma CH, Zwarthoff EC. (2012) Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers. *Eur Urol* 61(6):1245-56

Katoh M. (2002) GIPC gene family (Review). *Int J Mol Med* 9(6):585-9

Katoh M. (2005) WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*14(6):1583-8

Kau TR, Way JC, Silver PA. (2004) Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer* 4:106–17

Kaul D, Wu CL, Adkins CB, Jordan KW, Defeo EM, Habbel P, Peterson RT, McDougal WS, Pohl U, Cheng LL. (2010) Assessing prostate cancer growth with mRNA of spermine metabolic enzymes. *Cancer Biol Ther* 9(9):736-42

Kausch I, Böhle A. (2003) Nichtinvasive Urindiagnostik des Harnblasenkarzinoms. Was ist gesichert? © Springer-Verlag 2003, *Urologe* [A] 42:912–921

Kazazian HH Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303(5664):1626-32

Kazazian HH, Jr. & Goodier JL. (2002) LINE drive retrotransposition and genome instability. *Cell* 110:277-280

Keen AJ and Knowles MA. (1994) Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder. *Oncogene* 9: 2083-2088

Kim MS[1], Oh JE, Kim YR, Park SW, Kang MR, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. (2010) Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers. *J Pathol* 221(2):139-46

Kim WJ, Bae SC. (2008) Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Sci 99*(4):646-52

Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20):11606-11

Klose RJ, Bird AP. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89–97Knippers R. Molekulare Genetik. Thieme 2006, 9. Auflage

Köhler CU, Bryk O, Meier S, Lang K, Rozynek P, Brüning T, Käfferlein HU. (2013) Analyses in human urothelial cells identify methylation of miR-152, miR-200b and miR-10a genes as candidate bladder cancer biomarkers. *Biochem Biophys Res Commun* 438(1):48-53

Korkolopoulou P, Lazaris A, Konstantinidou AE, Kavantzas N, Patsouris E, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Davaris P. (2002) Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol* 41:274–283

Kreimer U, Schulz WA, Koch A, Niegisch G, Goering W. (2013) HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol* 3:255

Kuhlmann JD, Rasch J, Wimberger P, Kasimir-Bauer S. (2012) microRNA and the pathogenesis of ovarian cancer--a new horizon for molecular diagnostics and treatment? *Clin Chem Lab Med* 50(4):601-15

Kunze D, Erdmann K, Froehner M, Wirth MP, Fuessel S. (2012) siRNA-mediated inhibition of antiapoptotic genes enhances chemotherapy efficacy in bladder cancer cells. *Anticancer Res* 32:4313–4318

Kunze D, Erdmann K, Froehner M, Wirth MP, Fuessel S. (2013) Enhanced Inhibition of Bladder Cancer Cell Growth by Simultaneous Knockdown of Antiapoptotic Bcl-xL and Survivin in Combination with Chemotherapy. *Int J Mol Sci* 7; 14(6):12297-312

Kuranami M, Yamaguchi K, Fuchigami M, Imanishi K, Watanabe T, Abe K, Asanuma F, Hiki Y. (1991) Effect of urine on clonal growth of human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 51(17):4631-5

Lachner M, O´Sullivan RJ, Jenuwein T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116:2117-24

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-8

Laird PW, Jaenisch R. (1996) The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30:441-64

Laird PW. (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3(4):253-66

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, Fitz Hugh W et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921

Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, Reik W. (2003) Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35: 88–93

Law JA & Jacobsen SE. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Rev Genet* 11:204–220

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141(5):672-5

Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ 3rd, Lohr JG, Harris CC, Ding L, Wilson RK, Wheeler DA, Gibbs RA, Kucherlapati R, Lee C, Kharchenko PV, Park PJ; Cancer Genome Atlas Research Network. (2012) Landscape of somatic retro-transposition in human cancers. *Science* 337:967–71

Lehmann J, Retz M,Stöckle M. (2005) Blasenkarzinom. Neue Perspektiven in Diagnostik und Behandlung. Springer Verlag

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 14:120: 15-20

Li J, Weinberg MS, Zerbini L, Prince S. (2013) The oncogenic TBX3 is a downstream target and mediator of the TGF-β1 signaling pathway. *Mol Biol Cell* 24(22):3569-76

Li L, Choi JY, Lee KM, Sung H, Park SK, Oze I, Pan KF, You WC, Chen YX, Fang JY, Matsuo K, Kim WH, Yuasa Y, Kang D. (2012) DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J Epidemiol* 22(5):384-94

Liep J, Rabien A, Jung K. (2012) Feedback networks between microRNAs and epigenetic modifications in urological tumors. *Epigenetics* 7(4):315-25

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-73

Liu JW, Chandra D, Tang SH, Chopra D, Tang DG. (2002) Identification and characterization of Bimgamma, a novel proapoptotic BH3-only splice variant of Bim. *Cancer Res* 62 (10):2976-81

Liu XL, Wazer DE, Watanabe K, Band V. (1996) Identification of a novel serine protease-like gene, expression of which is down regulated during breast cancer progression. *Cancer Res* 56:3371-3379

Lower GM Jr. (1982) Concepts in causality: chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer* 49:1056-1066

Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. (2004) Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 10:3-18

Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67:1424–9

Luo LY, Grass L, Diamandis EP. (2000) The normal epithelial cell-specific 1 (*NES1*) gene is up-regulated by steroid hormones in the breast carcinoma cell line BT-474. *Anticancer Res* 20:981-986

Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R. (2010) The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol* 8(11):e1000506

Macdonald WA, Mann MR. (2013) Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Mol Reprod Dev* doi: 10.1002/mrd.22220

Malik HS, Burke WD, Eickbush TH. (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol Biol Evol* 16:793–805

Mao L, Schoenberg M, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D and Sidransky D. (1996) Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 271: 659-662

Markl IDC, Cheng J, Liang G, Shibata D, Laird PW, Jones PA. (2001) Global and gene-specific epigenetic patterns in human bladder cancer genomes are relatively stable in vivo and in vitro over time. *Cancer Res* 61:5875-84

Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, Karagas MR, Houseman EA, Kelsey KT. (2011) DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J Clin Oncol* 29(9):1133-9

Martinez ME, O'Brien TG, Fultz KE, Babbar N, Yerushalmi H, Qu N, Guo Y, Boorman D, Einspahr J, Alberts DS, Gerner EW. (2003) Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene. *Proc Nat Acad Sci 100:* 7859-7864

Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. (2001) Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 61:8659-63

Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403:501–502

McCahy PJ, Harris CA, Neal DE. (1997) The accuracy of recording of occupational history in patients with bladder cancer. *Br J Urol* 79(1):91-3

McGrath M, Wong JY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I. (2007) Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:815–9

Mehle C, Ljungberg B, Roos G. (1994) Telomere shortening in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 54(1):236-41

Melo SA, Esteller M. (2011) Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett* 585:2087-99

Méndez E, Lohavanichbutr P, Fan W, Houck JR, Rue TC, Doody DR, Futran ND, Upton MP, Yueh B, Zhao LP, Schwartz SM, Chen C. (2011) Can a metastatic gene expression profile outperform tumor size as a predictor of occult lymph node metastasis in oral cancer patients? *Clin Cancer Res* 17(8):2466-73

Mengual L, Burset M, Ribal MJ, Ars E, Marín-Aguilera M, Fernández M, Ingelmo-Torres M, Villavicencio H, Alcaraz A. (2010) Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 16(9):2624-33

Messing EM[1], Madeb R, Young T, Gilchrist KW, Bram L, Greenberg EB, Wegenke JD, Stephenson L, Gee J, Feng C. (2006) Long-term outcome of hematuria home screening for bladder cancer in men. *Cancer* 107(9):2173-9

Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B and Nakamura Y. (1992) Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res* 52: 643–645

Milde A, Haas-Rochholz H, Kaatsch H-J. (1999) Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. *Int J Legal Med* 112:209-210

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(30):10513-8

Monk M, Boubelik M, Lehnert S. (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99:371–382

Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD and Kazazian HH. (1996) High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87: 917-927

Morishita M, di Luccio E. (2011) Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases. *Biochim Biophys Acta*1816(2):158-63

Morlá M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agustí AG. (2006) Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 27:525–8

Morse B, Rothberg PG, South VJ, Spandorfer JM and Astrin SM. (1988) Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* 355: 87–90

Nakamura K, Kasraeian A, Iczkowski KA, Chang M, Pendleton J, Anai S, Rosser CJ. (2009) Utility of serial urinary cytology in the initial evaluation of the patient with microscopic hematuria. *BMC Urol* 9:12

Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955-959

Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292:110-113

Neal DE, Marsh C, Bennett MK, Abel PD, Hall RR, Sainsbury JRC, Harris AL. (1985) Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* I:366-368

Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. (2006) DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther* 5(8):993-1001

Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23:58–61

Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA. (2001) Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res* 29:4598–4606

Nishii Y, Morishima M, Kakehi Y, Umehara K, Kioka N, Terano Y, Amachi T, Ueda K. (2000) CROP/Luc7A, a novel serine/arginine-rich nuclear protein, isolated from cisplatin-resistant cell line. *FEBS Lett* 465:153–156

Noma K, Allis CD, Grewal SI. (2001) Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293: 1150-1155

Nur I, Szyf M, Razin A, Glaser G, Rottem S, Razin S. (1985) Procaryotic and eucaryotic traits of DNA methylation in spiroplasmas (mycoplasmas). *J Bacteriol* 164(1):19-24

Olek A & Walter J. (1997) The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nature Genet* 17: 275–276

Olkhov-Mitsel E, Van der Kwast T, Kron KJ, Ozcelik H, Briollais L, Massey C, Recker F, Kwiatkowski M, Fleshner NE, Diamandis EP, Zlotta AR, Bapat B. (2012) Quantitative DNA methylation analysis of genes coding for kallikrein-related peptidases 6 and 10 as biomarkers for prostate cancer. *Epigenetics* (9):1037-45

Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström P-U, Stöckle M, Sternberg C. (2002) The EAU Working Group on Oncological Urology. Guidelines on bladder cancer. *Eur Urol* 41:105–12

Orntoft TF and Wolf H. (1998) Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res* 26: 223-233

Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH Jr. (2003) SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet* 73:1444-1451

Ostertag EM, Kazazian HH Jr. (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35:501-38

Ostertag EM, Kazazian HH Jr. (2001) Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res* 11(12):2059-65

Oyasu R, Hirao Y, Izumi K. (1981) Enhancement by urine of urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 41:478-481

Pan Y, He B, Lirong Z, Nie Z, Chen L, Gu L, Hoffman AR, Wang S, Hu J. (2013) Gene therapy for cancer through adenovirus vector-mediated expression of the Ad5 early region gene 1A based on loss of IGF2 imprinting. *Oncol Rep* 30(4):1814-22

Parkin DM. (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118(12):3030-44

Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. (2008) Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol* 10(1):31-43

Patchsung M, Boonla C, Amnattrakul P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Tosukhowong P. (2012) Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One* 7:e37009

Paterson A, Mockridge CI, Adams JE, Krysov S, Potter KN, Duncombe AS, Cook SJ, Stevenson FK, Packham G. (2012) Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 119(7):1726-36

Pathria G, Wagner C, Wagner SN. (2012) Inhibition of CRM1-mediated nucleocytoplasmic transport: triggering human melanoma cell apoptosis by perturbing multiple cellular pathways. *J Invest Dermatol* 132(12):2780-90

Paulsen M and Ferguson-Smith AC. (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and diseases. *J Pathol* 195(1):97-110

Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, Reinberg D. (2006) Histon H_2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125:703-17

Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M. (2002) Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 62(15):4519-24

Pegg AE. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 48(4):759–74

Pegg AE. (2006) Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 281 (21): 14529–32

Piao J, Shang Y, Liu S, Piao Y, Cui X, Li Y[1], Lin Z. (2014) High expression of DEK predicts poor prognosis of gastric adenocarcinoma. *Diagn Pathol* doi: 10.1186/1746-1596-9-67

Phokaew C, Kowudtitham S, Subbalekha K, Shuangshoti S, Mutirangura A. (2008) LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. *Nucleic Acids Res* 36(17):5704-12

Pirtskalaishvili G,Konety BR, Getzenberg RH. (1999) Update on urine-based markers for bladder cancer.How sensitive and specific are the new noninvasive tests? *Postgrad Med* 106: 91–94

Piskareva O, Lackington W, Lemass D, Hendrick C, Doolan P, Barron N. (2001) The human L1 element: a potential biomarker in cancer prognosis, current status and future directions. *Curr Mol Med* 11(4):286-303

Plimack ER[1], Hoffman-Censits JH, Viterbo R, Trabulsi EJ, Ross EA, Greenberg RE, Chen DY, Lallas CD, Wong YN, Lin J, Kutikov A, Dotan E, Brennan TA, Palma N, Dulaimi E, Mehrazin R, Boorjian SA, Kelly WK, Uzzo RG, Hudes GR. (2014) Accelerated Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin Is Safe, Effective, and Efficient Neoadjuvant Treatment for Muscle-Invasive Bladder Cancer: Results of a Multicenter Phase II Study With Molecular Correlates of Response and Toxicity. *J Clin Oncol*

Pötsch L, Prager-Eberle M, Penzes L, Schneider PM, Rittner Ch. (1992) Zum Identitätsnachweis an Urinproben mit PCR. *Rechtsmedizin* 3:128-133

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274:33002-33010

Prinz M, Grellner W, Schmitt C. (1993) DNA typing of urine samples following several years of storage. *Int J Legal Med* 106: 75-79

Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation dependent transcriptional repressor. *Genes & Dev* 15:1613-1618

Puerta-Gil P, García-Baquero R, Jia AY, Ocaña S, Alvarez-Múgica M, Alvarez-Ossorio JL, Cordon-Cardo C, Cava F, Sánchez-Carbayo M. (2012) MiR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am J Pathol* 180:1808–1815

Qi J & Mu D. (2012) MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications. *Front Med* 6:134–155

Qin C, Samudio I, Ngwenya S, Safe S. (2004) Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. *Mol Carcinog* 40 (3):160–70

Rabik CA[1], Dolan ME. (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33(1):9-23

Rasheed S, Gardner MB, Rongey RW, Nelson-Rees WA, Arnstein P. (1977) Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *J Natl Cancer Inst* 58(4):881-90

Ratajczak MZ. (2012) Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a regulator of longevity, and a 'passkey' to cancerogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 50(2):171-9

Reik W, Dean W, Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532):1089-93

Reinert T. (2012) Methylation markers for urine-based detection of bladder cancer: the next generation of urinary markers for diagnosis and surveillance of bladder cancer. *Adv Urol* 2012:503271

Retz, Gschwend; Medikamentöse Tumortherapie in der Uronkologie, © Springer Verlag Berlin Heidelberg 2010, 2.Auflage

Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. (1998) Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 153: 1615-1621

Richter J, Jiang F, Görög JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. (1997) Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57:286-4

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

Ringrose L & Paro R. (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134:223-32

Ro JY, Staerkel GA, Ayala AG. (1992) Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 19:435-53Ropero S, Esteller M. (2007) The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncl* 1(1):19-25

Ross SA, Davis CD. (2011) MicroRNA, nutrition, and cancer prevention. *Adv Nutr* 2(6):472-85

Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Pàldi A, Viegas-Péquignot E. (1998) Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* 12:2108–2113

Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, Comperat E, Catto JW, Meuth M, Lackmichi A, Ricci S, Lacave R, Gattegno B, Richard F, Hamdy FC, Cussenot O. (2008) A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. *British Journal of Urology International* 101(11):1448–1453

Rübben H, Otto T: Harnblasenkarzinom. In: Rübben H (ed): Uroonkologie. 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 85-178 (2001)

Rübben, Uroonkologie, © Springer Medizin Verlag Heidelberg 2009, 5.Auflage

Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. (2010) Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics* 11:137

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9:435–43

Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA. (2000) Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer* Res 60:2473-6

Salem HK, Mahfouz S. (2012) Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of schistosoma-associated bladder cancer in Egypt in the past decade. *Urology* 79(2):379-83

Sánchez Más J, Olivares Sánchez C, Ghanem G, Haycock J, Lozano Teruel JA, García-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C. (2002) Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur J Biochem* 269(24):6133-41

Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bähler J, Allshire RC, Kouzarides T. (2004) Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119:603–614

Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172–182

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K_4 of histone H_3. *Nature* 419:407-11

Saran KK, Gould D, Godec CJ and Verma RS. (1996) Genetics of bladder cancer. *J Mol Med* 74: 441-445

Sauter G, Algaba F, Amin M et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, SesterhennI, editors. (2004) WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France *IARCC Press*

Scarlett CJ[1], Colvin EK, Pinese M, Chang DK, Morey AL, Musgrove EA, Pajic M, Apte M, Henshall SM, Sutherland RL, Kench JG, Biankin AV. (2011) Recruitment and activation of pancreatic stellate cells from the bone marrow in pancreatic cancer: a model of tumor-host interaction. *PLoS One* 6(10):e26088

Schernhammer ES, Giovannucci E, Kawasaki T, Rosner B, Fuchs CS, Ogino S. (2010). Dietary folate, alcohol and B vitamins in relation to LINE-1 hypomethylation in colon cancer. *Gut* 59:794–799

Schmid CW, Deininger PL. (1975) Sequence organization of the human genome. *Cell* 6:345-358

Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH, Visakorpi T. (2002) Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes and Cancer* 35(1):58–65

Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. (2006) Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. Current Topics in Microbiology and Immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:211-50

Schulz WA. (2006) L1 retrotransposons in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2006(1):83672

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. 11(6):426-37

Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi-Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C. (2005) Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 24(24):3923-31

Seifert HH, Schmiemann V, Mueller M, Kazimirek M, Onofre F, Neuhausen A, Florl AR, Ackermann R, Boecking A, Schulz WA, Grote HJ. (2007) In situ detection of global DNA hypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer. *Exp Mol Pathol* 82(3):292-7

Selimoglu-Buet D[1], Gallais I, Denis N, Guillouf C, Moreau-Gachelin F.2012 Oncogenic kit triggers Shp2/Erk1/2 pathway to down-regulate the pro-apoptotic protein Bim and to promote apoptosis resistance in leukemic cells. *PLoS One.* 7(11):e49052

Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. (2003) Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 278:6824–30

Shariat SF, Karam JA, Lotan Y, Karakiewizc PI. (2008) Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring. *Rev Urol* 10(2):120-35

Sharma GG, Hall EJ, Dhar S, Gupta A, Rao PH, Pandita TK. (2003) Telomere stability correlates with longevity of human beings exposed to ionizing radiations. *Oncol Rep* 10:1733–6

Shen L, Guo Y, Chen X, Ahmed S, Issa JP. (2007) Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. Biotechniques. 42(1):48, 50, 52

Shenouda SK & Alahari SK. (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 28:369–378

Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M. (2013) Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 63(6):1091-100

Shokeir A A. (2004) Squamouscell carcinomaofthebladder: pathology, diagnosis and treatment. *BJU Int* 93: 216–220

Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton Sr, Frost P,Vogelstein B. (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252: 706-709

Silverman DT, Hartge P, Morrison AS, Devesa SS. (1992) Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 6(1):1-30

Simon R, Bürger H, Brinkschmidt C, Böcker W, Hertle L, Terpe HJ. (1998) Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 185(4):345-51

Simon R, Bürger H, Semjonow A, Hertie L, Terpe HJ, Bocker W. (2000) Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 17: 1025-1029

Sims RJ 3rd & Reinberg D. (2006) Histone H_3 Lys $_4$ methylation: Caught in a bind? *Genes Dev* 20:2779-86

Sinibaldi-Vallebona P, Lavia P, Garaci E, Spadafora C. (2006) A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy. *Genes Chromosomes Cancer* 45(1):1-10

Smith ZD, Meissner A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*14(3):204-20

Smith ZL, Guzzo TJ. (2013) Urinary markers for bladder cancer. *F1000Prime Rep* 1:5-21

Snowdon J, Boag S, Feilotter H, Izard J, Siemens DR. (2012) A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Can Urol Assoc J* 15:1–5

Song JH & Meltzer SJ. (2011) MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers. *Gastroenterology* 143: 35–47.e32

Southern EM. (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 100:319-323

Starkey R H, Orth DN. (1977) Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (Urogastrone*). J Clin Endocrino Metab* 45:1144-1153

Starr JM, McGurn B, Harris SE, Whalley LJ, Deary IJ, Shiels PG. (2007) Association between telomere length and heart disease in a narrow age cohort of older people. *Exp Gerontol* 42:571–3

Steenman MJ, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon IL, Feinberg AP. (1994) Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nat Genet* 7:433–39

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ. (1998) Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 160:645-659

Stepanow S, Reichwald K, Huse K, Gausmann U, Nebel A, Rosenstiel P, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Platzer M. (2011) Allele-specific, age-dependent and BMI-associated DNA methylation of human MCHR1. *PLoS One* 6(5):e17711

Strahl BD, Allis CD. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765):41-5

Sun Y, Zhang K, Fan G, Li J. (2012) Identification of circulating microRNAs as biomarkers in cancers: what have we got? *Clin Chem Lab Med* 50(12):2121-6

Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Giuliano AE, Hoon DS. (2008) Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1137:171-4

Suter CM, Martin DI, Ward RL. (2004) Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int J Colorectal Dis* 19:95101

Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. (2012) DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol 6*(6):567-78

Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. (2011) Genome wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res* 71:5646–58

Szarvas T, Kovalszky I, Bedi K, Szendroi A, Majoros A, Riesz P, Füle T, László V, Kiss A, Romics I. (2007) Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: urine supernatant versus urine sediment. *Oncol Rep* 18(2):405-9

Taby R, Issa JP. (2010) Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 60(6):376-92

Tada Y, Wada M, Taguchi KI, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, Kuwano M. (2002) The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 62:4048-53

Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. (2000) Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 30(7):306–309

Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. (2007) Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 379:127–133

Taniguchi T, Sullivan MJ, Ogawa O, Reeve AE. (1995) Epigenetic changes encompassing the IGF2/H19 locus associated with relaxation of IGF2 imprinting and silencing of H19 in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2159–63

Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, Jones A, Lechner M, Beck S, Jacobs IJ, Widschwendter M. (2009) An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PLoS One* 4(12):e8274

Trivedi D, Messing EM. (2009) Commentary: the role of cytologic analysis of voided urine in the work-up of asymptomatic microhematuria. *BMC Urol* 9:13

Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. (1990) Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Research* 50:44–7

Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39(16): 7223-33

Turner JG, Sullivan DM. (2008) CRM1-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Curr Med Chem* 15:2648–55

Udina IG, Baranova AV, Kompaniĭtsev AA, Sulimova GE. (2001) Evolutionarily-conserved gene CKAP2, located in region 13q14.3 of the human genome, is frequently rearranged in various tumors. *Genetika* 37(1):120-3

Umehara H, Nishii Y, Morishima M, Kakehi Y, Kioka N, Amachi T, Koizumi J, Hagiwara M, Ueda K. (2003) Effect of cisplatin treatment on speckled distribution of a serine/arginine-rich nuclear protein CROP/Luc7A. *Biochem Biophys Res Commun* 301:324–329

Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DS. (2006) Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* 24:4270–4276

Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DS. (2006) Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 52:1062–1069

Unoki M, Nakamura Y. (2001) Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20(33):4457-65

Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J and Junker K. (2002) Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 8:35-40

Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. (2005) Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366:662–4

van Bemmel D, Lenz P, Liao LM, Baris D, Sternberg LR, Warner A, Johnson A, Jones M, Kida M, Schwenn M, Schned AR, Silverman DT, Rothman N, Moore LE. (2012) Correlation of LINE-1 methylation levels in patient-matched buffy coat, serum, buccal cell, and bladder tumor tissue DNA samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21:1143–8

van der Poel HG, Debruyne FM. (2001) Can biological markers replace cystoscopy? An update. *Curr Opin Urol* 11:503-9

van der Vaart M, Pretorius PJ. (2007) The origin of circulating free DNA. *Clin Chem* 53(12):2215

van der Vaart M, Pretorius PJ. (2008) Circulating DNA. Its origin and fluctuation. Ann *N Y Acad Sci* 1137:18-26

van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH. (1994) Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86:1070–75

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351

Vineis P, Esteve J, Hartge P, Hoover R, Silverman DT, Terracini B. (1988) Effects of timing and type of tobacco in cigarette-induced bladder cancer. *Cancer Res* 48: 3849-3852

Vineis,P.,and Pirastu,R. (1997) Aro- matic aminesandcancer. *Cancer CausesControl* 8: 346–355

von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. (2005) Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 23(21):4602-8

von Zglinicki T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27:339–44

Waddington CH. (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41(1):10-3

Wallace N, Wagstaff BJ, Deininger PL, Roy-Engel AM. (2008) LINE-1 ORF1 protein enhances Alu SINE retrotransposition. *Gene* 419:1-6

Wang G, Chan ES, Kwan BC, Li PK, Yip SK, Szeto CC, Ng CF. (2012) Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer*. Clin Genitourin Cancer* 10(2):106-13

Wang H, Xing J, Grover D, Hedges DJ, Han K, Walker JA, Batzer MA. (2005) SVA elements: a hominid-specific retroposon family. *J Mol Biol* 354:994-1007

Wang N, Zhou F, Xiong H, Du S, Ma J, Okai I, Wang J, Suo J, Hao L, Song Y, Hu J, Shao S. (2012) Screening and identification of distant metastasis-related differentially expressed genes in human squamous cell lung carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 295(5):748-57

Wang Y, Fischle W, Cheung W, Jacobs S, Khorasanizadeh S, Allis CD. (2004) Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp* 259:3–17

Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. (1997) Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 25 (21):4422-6

Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, Rothenbacher D, Fiegl H, Menon U, Stegmaier C, Jacobs IJ, Brenner H. (2008) Epigenotyping in peripheral blood cellDNAand breast cancer risk: a proof of principle study. *PLoS One* 3(7):e2656

Wiener HG, Vooijs GP, van't Hof-Grootenboer B. (1993) Accuracy of urinary cytology in the diagnosis of primary and recurrent bladder cancer. *Acta Cytol* 37:163-169

Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjøt L, Ramanathan R, Hansen TB, Villadsen SB, Gao S, Ostenfeld MS, Borre M, Peter ME, Ørntoft TF, Kjems J, Clark SJ. (2011) Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 128:1327–34

Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R, Plaza S, Gagne L, Zens MS, Andrew AS, Morris S, Nelson HH, Schned AR, Karagas MR, Marsit CJ. (2010) Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res* 16:1682-9

Willeit P[1], Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstätter A, Kronenberg F, Kiechl S. (2010) Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA.* 304(1):69-75

Wilson AS, Power BE, Molloy PL. (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775:138–62

Wimberger P, Roth C, Pantel K, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Schwarzenbach H. (2011) Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 128:2572–2580

Wojdacz TK, Hansen LL. (2006) Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *Biotechniques.* 41(3):274, 276, 278

Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, Yang AS, Jones PA, Liang G. (2010) Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genet* 6: e1000917

Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G. (2010) Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res* 70(20):8169-78

Woods-Samuels P, Wong C, Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. (1989) Characterization of a nondeleterious L1 insertion in an intron of the human factor VIII gene and further evidence of open reading frames in functional L1 elements. *Genomics* 4:290-296

Wu JC, Santi DV. (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. J Biol Chem 262(10):4778-86

Wu SC, Zhang Y. (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9):607-20

Xie H, Wang M, de Andrade A, Bonaldo Mde F, Galat V, Arndt K, Rajaram V, Goldman S, Tomita T, Soares MB. (2011) Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res* 39:4099–108

Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, Oga A, Naito K, Sasaki K. (2006) Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res* 12: 2752-2758

Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. (2007) Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 13(7):2046–2053

Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JWF. (2006) Methylational urinalysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 25 (13):1984–1988

Yin L. (2005) Chondroitin synthase 1 is a key molecule in myeloma cell-osteoclast interactions. *J Biol Chem* 280(16):15666-72Yoder JA[1], Walsh CP, Bestor TH. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13(8):335-40

Yoo NJ[1], Hur SY, Kim MS, Lee JY, Lee SH. (2010) Immunohistochemical analysis of RNA-induced silencing complex-related proteins AGO2 and TNRC6A in prostate and esophageal cancers. *APMIS* 118(4):271-6

Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolodeoku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D. (1997) Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 79(2):362-9

Yousef GM, White NM, Michael IP, Cho JC, Robb JD, Kurlender L, Khan S, Diamandis EP. (2005) Identification of new splice variants and differential expression of the human kallikrein 10 gene, a candidate cancer biomarker. *Tumour Biol* 26(5):227-35

Yu J, Yu J, Rhodes DR, Tomlins SA, Cao X, Chen G, Mehra R, Wang X, Ghosh D, Shah RB, Varambally S, Pienta KJ, Chinnaiyan AM. (2007) A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 67(22):10657-63

Yu MC, Skipper PL, Tannenbaum SR, Chan KK, Ross RK. (2002) Arylamine exposures and bladder cancer risk. *Mutat Res* 506-507:21-28

Yu T[1], Lu Q, Ou X, Cao D, Yu Q. (2014) Association of sedentary behavior with the expression levels of biomarkers in colorectal cancer: clinical analysis of 228 patients. *Tohoku J Exp Med* 232(3):167-76

Zaatar AM[1], Lim CR, Bong CW, Lee MM, Ooi JJ, Suria D, Raman R, Chao S, Yang H, Neoh SB, Liew CC. (2012) Whole blood transcriptome correlates with treatment response in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* doi: 10.1186/1756-9966-31-76

Zabolotneva AA, Zhavoronkov A, Garazha AV, Roumiantsev SA, Buzdin AA.(2013) Characteristic patterns of microRNA expression in human bladder cancer. *Front Genet* 3:310

Zancan M, Franceschini R, Mimmo C, Vianello M, Di Tonno F, Mazzariol C, Malossini G and Gion M. (2005) Free DNA in urine: a new marker for bladder cancer? Preliminary data. *Int J Biol Markers* 20:134-136

Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA. (2004) The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21:392-401

Zhang W, Edwards A, Fan W, Fang Z, Deininger P, Zhang K. (2013) Inferring the expression variability of human transposable element-derived exons by linear model analysis of deep RNA sequencing data. *BMC Genomics* 14(1):584

Zhou L, Zhang R, Zhang L, Yao W, Li J, Yuan Y. (2011) Angiotensin-converting enzyme 2 acts as a potential molecular target for pancreatic cancer therapy. *Cancer Lett* 307(1):18-25Zylka-Menhorn V. (2012) Das Epigenom: Der Dompteur der Gene. *Dtsch Aerztebl* 109(20):A-12027/B-884/C-876

7. Anhang

Abb. 1 Transkription von LINE-1, BCL-XL und BimEL aus Urin-Gesamt-RNA der Probenkohorte 2. LINE-1, BCL-XL und BimEL Transkription wurde mittels *real time* PCR ermittelt (A). (B) Densitometrische Auswertung der LINE-1 Transkription in fortgeschrittenen-, frühen Karzinomen sowie gesunden Probanden (Kontrollen). Als Kontrolle diente Beta-Aktin.

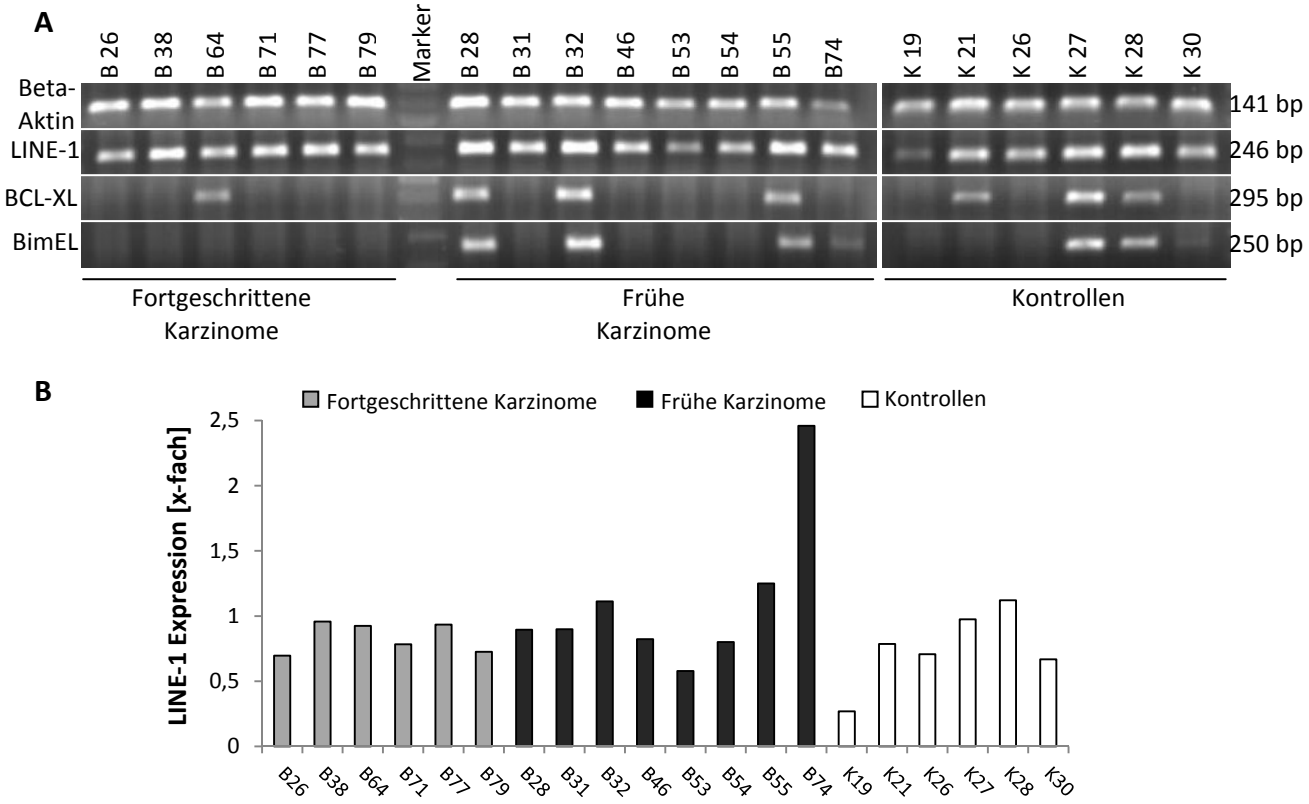


Abb. 2 LINE-1 Transkription im Urin mittels absoluter Quantifizierung in der Probenkohorte 2. Die LINE-1 Transkription aus Urin-Gesamt-RNA von Patientenproben mit fortgeschrittenen und frühen Karzinomen sowie Proben gesunder Probanden (Kontrollen) wurde mittels der *real time* PCR absolut quantifiziert (x±SD), d.h. es wurde die genaue Kopienzahl an LINE-1 Transkripten bestimmt.

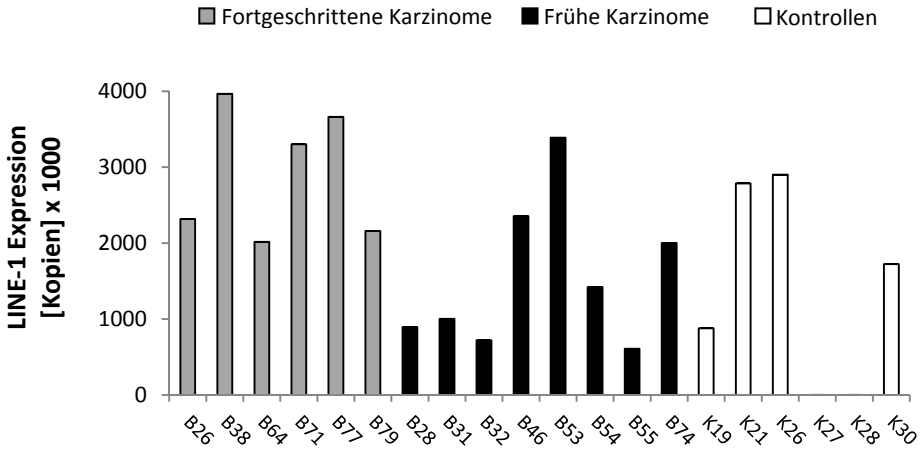


Abb. 3 LINE-1 Methylierung in Urin-Gesamt-DNA aus Harnblasenkarzinomproben und gesunden Probanden (Kontrollen) der 2. Probenkohorte. Die LINE-1 Methylierung wurden mit konvertierter Gesamt-DNA aus Urin mittels *real time* MSPCR ermittelt (x±SD).

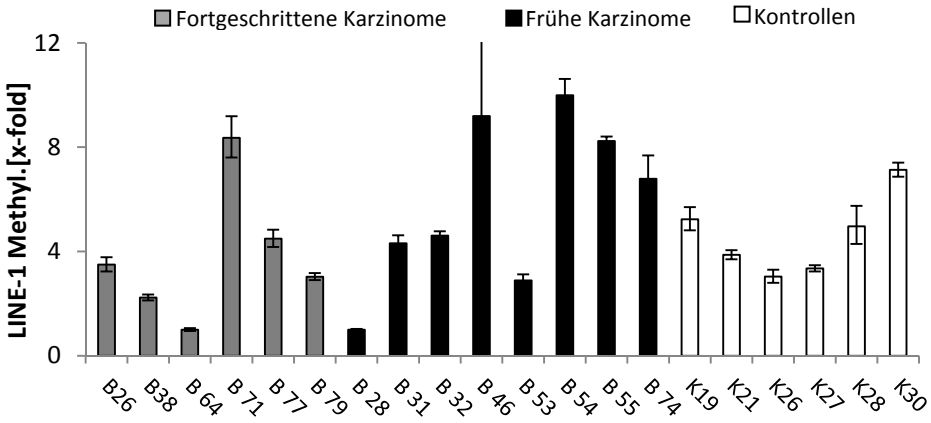


Abb. 4 Quotienten aus der LINE-1 Methylierung und der LINE-1 Transkription der Probenkohorte 2. Gezeigt ist der Quotient der ΔΔCT-Werte der LINE-1 Methylierung und der LINE-1 Transkriptzahl aus den Urin-Proben von Patienten mit fortgeschrittenen und frühen Karzinomen sowie gesunden Probanden (Kontrollen). Zur besseren Darstellung wurde der Quotient mit dem Faktor 10^7 multipliziert.

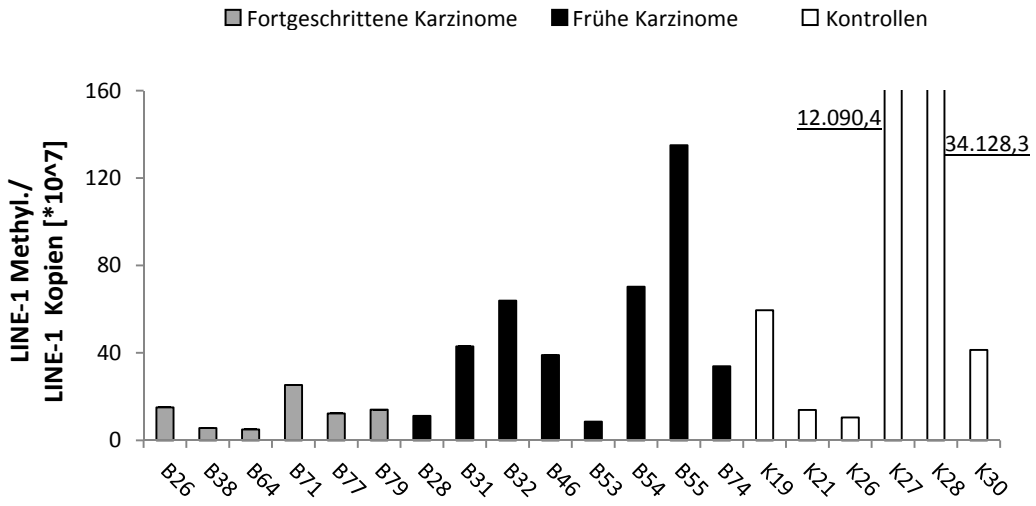


Tabelle 1. DMR-Schnittmenge der hypermethylierten Cor- und Ups Promotorregionen zwischen den multi- und unifokalen Blasenkarzinomproben und Negativ-Kontrollen der Gewebekohorte 1.

∩Hypermethylierte DMRs	∩Hypomethylierte DMRs
SEC63-Cor	AICDA-Cor
NUP62-Cor	LOC100996551-Ups
MIR4269-Cor	RPL29P10-Ups
LOC145474-Cor	GRIFIN-Ups
GLT8D1-Ups	ZNF548-Ups
PPP1R11P1-Cor	FAM50B-Ups
LOC100422581-Cor	SEC23A-Ups
SMARCE1P6-Cor	COX19-Cor
VN1R106P-Ups	VN1R6P-Ups
UTF1-Ups	C19orf38-Cor
NUP50-Cor	ZNF419-Ups
TBX3-Ups	ILVBL-Ups
NR4A1-Ups	GOLGA6L4-Cor
CTGLF12P-Cor	LOC645954-Cor
LOC100129554-Cor	SIX5-Cor
LOC100130241-Ups	NAPSA-Cor
C9orf133-Cor	ARSH-Cor
ST6GAL1-Ups	RPL26P7-Ups
PCDHB8-Cor	MIR4522-Cor
OTP-Cor	MYH9-Cor
OR10H4-Ups	MIR662-Ups
ODC1-Ups	OR7E121P-Ups
ABTB1-Ups	STRBP-Cor
RPL5P34-Cor	RPS2P48-Cor
YRDC-Cor	ABCA7-Ups
LOC101060043-Ups	KIR3DP1-Ups
LRRK1-Ups	SOX15-Ups
LOC100506844-Ups	ZNF599-Ups
IL31-Cor	COX6A1P2-Cor
MIR4780-Ups	LOC654780-Cor
EEF2K-Cor	ADAMTS15-Cor
IFNWP2-Ups	ARGFXP2-Ups
MIR758-Cor	EIF4A1P3-Ups
BRD7P2-Ups	CASC3-Cor
LOC100421695-Cor	FGFRL1-Cor
LOC100505995-Cor	OR52J2P-Ups
CNIH2-Cor	MT1P1-Ups
LOC100506343-Ups	TEAD2-Cor
TLK1P1-Ups	TNK1-Cor
ANKRD52-Cor	LOC390029-Ups
MIR2115-Cor	LOC100506596-Cor
TPM4-Cor	KCNG4-Cor
YWHAZP1-Cor	TMSB4XP2-Cor
LOC100421610-Cor	FAM87A-Ups

EBLN2-Ups	UBAP1-Ups
ZNF512-Cor	NEURL4-Ups
RBMX2P5-Cor	LIN7B-Cor
GIPC1-Ups	ZDHHC4-Cor
MPC1L-Cor	SYT8-Cor
LOC100418848-Cor	TCEB3-Ups
ACRBP-Cor	NTAN1-Ups
TRNAR12-Cor	LOC100996478-Cor
OR51F5P-Cor	ZNF439-Cor
LOC100421361-Cor	CDH13-Cor
LOC645969-Cor	MORN1-Cor
TMUB2-Cor	RPL37AP9-Cor
PLCE1-Ups	LOC100288241-Cor
MLF2-Ups	OR7G15P-Cor
FETUB-Cor	LOC390876-Cor
C1orf122-Cor	NPLOC4-Ups
IFNWP2-Cor	IGF1R-Cor
NTMT1-Cor	CYP4F8-Ups
MCCD1P2-Ups	RRAS-Ups
RPS26P48-Ups	SNX11-Ups
PRRT1-Ups	LPAR5-Cor
WBP11-Cor	LOC730144-Cor
TRNAA2-Ups	LOC100420318-Cor
ART2P-Ups	C19orf44-Cor
MRPL46-Cor	MAT2A-Cor
LOC100420074-Cor	PRPF31-Ups
ASS1P13-Cor	PLGLA-Ups
C7orf65-Cor	LILRA2-Ups
PRKXP1-Cor	LOC390739-Cor
LSM6P2-Cor	PCDHA7-Cor
ELF2P2-Cor	LOC100533627-Ups
KIF17-Cor	CAPN9-Cor
DLGAP1-AS3-Cor	MAPK8IP3-Cor
RPL21P95-Cor	COL18A1-Cor
LINC00675-Ups	LOC100287483-Cor
OR51G1-Ups	LYRM4-Cor
RNU7-74P-Ups	DPP3-Cor
TBX4-Ups	RNY5P6-Ups
TPRG1-Cor	ALDH7A1P3-Cor
FTH1P26-Ups	ALOX15P1-Cor
SLC9A8-Ups	SRP14P1-Ups
MIR874-Cor	LOC100420668-Cor
PELI3-Cor	DENND5A-Cor
DSTNP1-Ups	SOCS1-Cor
SNRNP35-Ups	COX6A1P2-Ups
PRRG1-Cor	SUMO1P4-Cor
FRMPD2-Cor	ADAM5-Ups

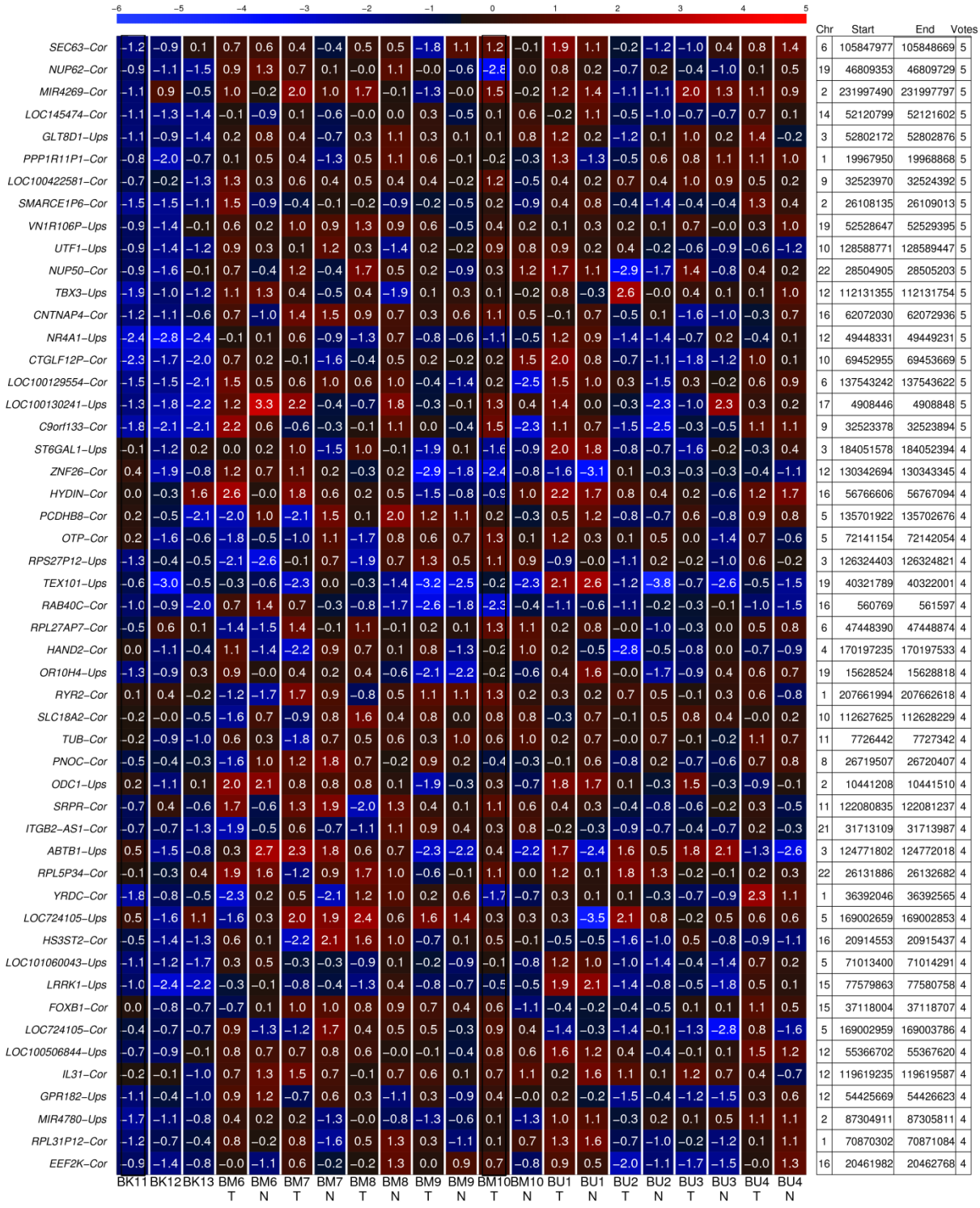
MIR4302-Ups	VTI1BP3-Cor
MRFAP1L1-Ups	ZNF607-Ups
LOC145757-Cor	KLK10-Cor
CLEC4M-Cor	TEX38-Cor
NCR2-Cor	VN1R28P-Cor
SDR16C6P-Cor	GRN-Ups
CHI3L2-Ups	FGFRL1-Ups
SUN1-Cor	DCAF10-Cor
RAD51D-Cor	LOC100419895-Cor
OR52P1P-Ups	LSS-Cor
RPL23AP18-Cor	SLC25A11-Cor
TAC4-Ups	SYDE1-Cor
MAP3K14-Cor	LOC390876-Ups
C11orf42-Cor	TCTN2-Cor
MIR30C1-Cor	GMIP-Ups
NRIP3-Ups	MTL5-Cor
HIST1H3I-Cor	SGSH-Cor
GMNN-Cor	SH3BP2-Cor
NAALAD2-Cor	IZUMO4-Cor
LEUTX-Cor	EIF1AD-Ups
ABCA8-Ups	VN1R10P-Cor
LOC100507511-Cor	LOC100129277-Ups
LOC101060020-Cor	CHST12-Ups
TRIM6-Ups	PIEZO1P1-Ups
ZNF550-Cor	MATK-Cor
MIR31HG-Cor	SYF2-Cor
RRP1B-Cor	ZNF439-Ups
CCDC59-Ups	OR56A5-Cor
HIST1H2BD-Cor	LOC100630918-Cor
PRRT3-Cor	LOC100509638-Cor
ZNF229-Cor	LOC401296-Cor
GPR77-Ups	SUGP1-Cor
CYP3A4-Ups	FADD-Ups
LOC100129476-Ups	PPIAP3-Ups
RNF222-Ups	RPL21P4-Ups
RPL12P13-Cor	ABHD16A-Ups
TRNAI4-Ups	LOC100506314-Cor
LOC100820732-Cor	CARD8-Ups
PLCD3-Ups	POU5F1P6-Cor
LOC100128048-Cor	RANGAP1-Ups
PCNPP1-Ups	PDZK1IP1-Cor
LOC100506305-Cor	LOC100421503-Ups
CKAP2-Ups	LOC729654-Ups
TAF6L-Ups	LDHB-Cor
SEC63-Ups	MIR645-Ups
TPI1-Ups	RPL9P17-Ups
LOC100508227-Cor	RNU5B-4P-Ups

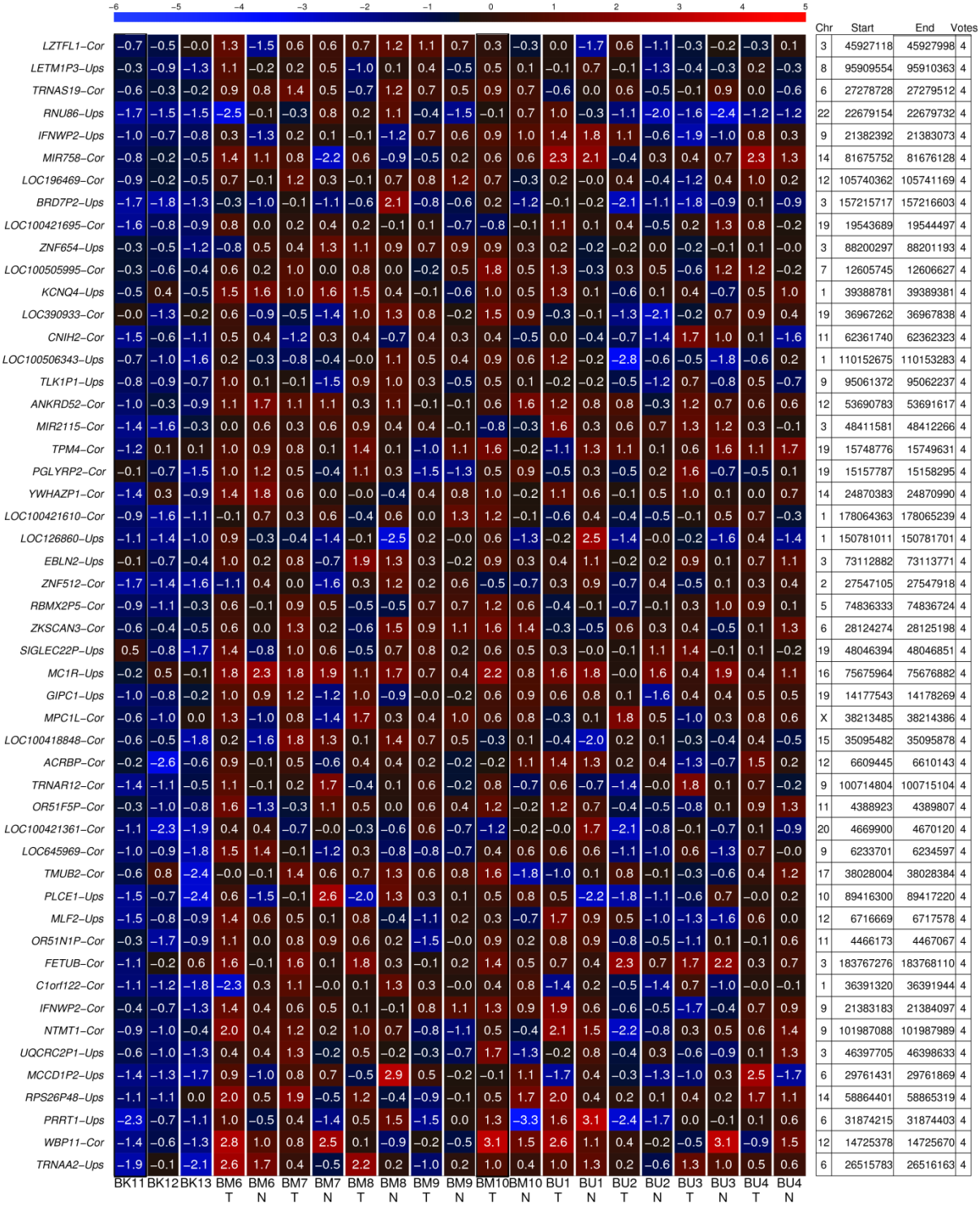
RPP40P1-Cor	WRNIP1-Cor
CCL11-Ups	TMEM216-Cor
SNAR-G1-Cor	NAGLU-Ups
OR7E14P-Ups	CABLES2-Ups
LOC100419512-Cor	KLK8-Ups
CCDC48-Ups	EIF4EP1-Ups
KLHL23-Cor	FAM108A1-Cor
MIR1185-1-Ups	TTC9B-Cor
OR2AG2-Cor	PHLDB3-Cor
AK1-Ups	ABCA3-Cor
USP10-Cor	RPL5P34-Ups
DNAJC22-Ups	RPS12P26-Cor
C11orf74-Cor	CIC-Ups
RAD51D-Ups	FLJ31485-Cor
RAPGEFL1-Ups	LOC100130527-Cor
ATIC-Cor	HSPG2-Ups
TMEM95-Cor	LPP-AS2-Ups
NTMT1-Ups	PIK3CG-Cor
LOC100421404-Cor	LOC100506405-Cor
BTN2A3P-Ups	CARM1-Ups
LOC100420746-Cor	DPP8-Cor
RPL34P11-Cor	LOC100507540-Cor
RPL37AP2-Ups	TP53-Ups
HTR2C-Cor	AOC3-Ups
PCDHAC2-Cor	ZNF776-Ups
LOC100130394-Cor	KIR2DP1-Ups
RSPO2-Ups	RPS18P8-Ups
MIR4493-Ups	OR6C73P-Ups
NKX2-6-Ups	PRKCG-Cor
SMYD2-Ups	FNTA-Cor
RPL21P30-Cor	PDCL3P1-Cor
FRMPD2-Ups	RPL23AP5-Ups
GSS-Cor	MIR639-Ups
HMGN2P2-Ups	KISS1R-Cor
ACTR5-Cor	LOC100421504-Cor
SLC36A3-Ups	NT5C1A-Ups
PPFIA3-Cor	ZNF814-Cor
MORF4L1P3-Ups	ZNF460-Cor
SMCR7L-Ups	KBTBD11-Ups
AK3P3-Ups	ZNFX1-Cor
BBS1-Ups	DEFA6-Ups
SPTY2D1-Cor	UBE2Z-Cor
MIR500B-Ups	SNORD5-Cor
IFT74-Ups	NDEL1-Ups
SKINTL-Cor	LYL1-Cor
TRNAW2-Cor	RFX2-Ups
SCAMP1-Cor	ADC-Ups

ALOX15B-Cor	METTL21A-Cor
RPL15P6-Cor	REP15-Cor
LOC728769-Ups	LYZL2-Ups
MIR4427-Cor	RPL7AP64-Cor
TIMM8BP2-Ups	MIR4518-Ups
	FAM90A11P-Ups
	RPL39P25-Ups
	ALMS1-Ups
	IGHV2OR16-5-Cor
	TRNAQ15-Cor
	ZSCAN5C-Cor
	MIR1225-Ups
	ANKRD16-Cor
	SMYD4-Cor
	TEDDM1-Cor
	LOC100422581-Ups
	PRSS22-Cor
	LOC644449-Cor
	BLVRB-Cor
	SFTPB-Ups
	DESI1-Cor
	FGF11-Cor
	LOC100421087-Ups
	PTP4A2P1-Ups
	YWHAZP9-Cor
	SPATA5L1-Ups
	CLDN9-Ups
	CCDC137-Cor
	NLRP12-Cor
	C16orf46-Ups
	ZNF616-Ups
	PLA2G1B-Cor
	FBLN2-Ups
	COX7BP1-Ups
	USHBP1-Cor
	MYL12B-Cor
	LOC100124402-Cor
	SPN-Cor

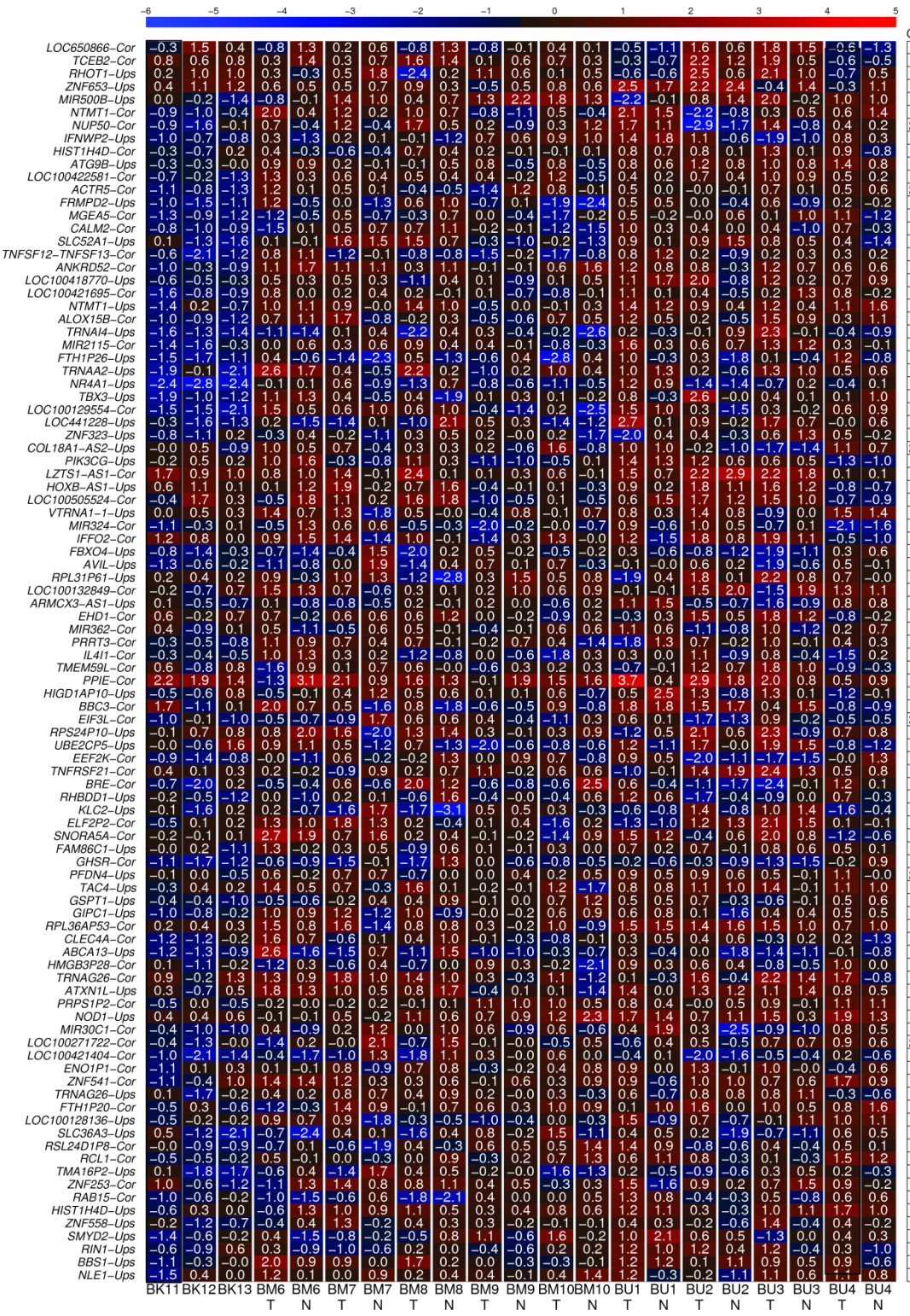
Abb 5. Heat Map der hypermethylierten Cor- und Ups Promotorregionen der (A) multi- und (B) unifokalen Blasenkarzinom-Proben und Negativ-Kontrollen der Gewebe-Kohorte 1.

(A) 102 Gen-Loci




−6 −5 −4 −3 −2 −1 0 1 2 3 4 5
BK11 BK12 BK13 BM6 T BM6 N BM7 T BM7 N BM8 T BM8 N BM9 T BM9 N BM10 T BM10 N BU1 T BU1 N BU2 T BU2 N BU3 T BU3 N BU4 T BU4 N
LZTFL1−Cor −0.7 −0.5 −0.0 1.3 −1.5 0.6 0.6 0.7 1.2 1.1 0.7 0.3 −0.3 0.0 −1.7 0.6 −1.1 −0.3 −0.2 −0.3 0.1
LETM1P3−Ups −0.3 −0.9 −1.3 1.1 −0.2 0.2 0.5 −1.0 0.1 0.4 −0.5 0.5 0.1 −0.1 0.7 −0.1 −1.3 −0.4 −0.3 0.2 −0.3
TRNAS19−Cor −0.6 −0.3 −0.2 0.9 0.8 1.4 0.5 −0.7 1.2 0.7 0.5 0.9 0.7 −0.6 0.0 0.6 −0.5 −0.1 0.9 0.0 −0.6
RNU86−Ups −1.7 −1.5 −1.5 −2.5 −0.1 −0.3 0.8 0.2 1.1 −0.4 −1.5 −0.1 0.7 1.0 −0.3 −1.1 −2.0 −1.6 −2.4 −1.2 −1.2
IFNWP2−Ups −1.0 −0.7 −0.8 0.3 −1.3 0.2 0.1 −0.1 −1.2 0.7 0.6 0.9 1.0 1.4 1.8 1.1 −0.6 −1.9 −1.0 0.8 0.3
MIR758−Cor −0.8 −0.2 −0.5 1.4 1.1 0.8 −2.2 0.6 −0.9 −0.5 0.2 0.6 0.6 2.3 2.1 −0.4 0.3 0.4 0.7 2.3 1.3
LOC196469−Cor −0.9 −0.2 −0.5 0.7 −0.1 1.2 0.3 −0.1 0.7 0.8 1.2 0.7 −0.3 0.2 −0.0 0.4 −0.4 −1.2 0.4 1.0 0.2
BRD7P2−Ups −1.7 −1.8 −1.3 −0.3 −1.0 −0.1 −1.1 −0.6 2.1 −0.8 −0.6 0.2 −1.2 −0.1 −0.2 −2.1 −1.1 −1.8 −0.9 0.1 −0.9
LOC100421695−Cor −1.6 −0.8 −0.9 0.8 0.0 0.2 0.4 0.2 −0.1 0.1 −0.7 −0.8 −0.1 1.1 0.1 0.4 −0.5 0.2 1.3 0.8 −0.2
ZNF654−Ups −0.3 −0.5 −1.2 −0.8 0.5 0.4 1.3 1.1 0.9 0.7 0.9 0.9 0.3 0.2 −0.2 −0.2 0.0 −0.2 −0.1 0.1 −0.0
LOC100505995−Cor −0.3 −0.6 −0.4 0.6 0.2 1.0 0.0 0.8 0.0 −0.2 0.5 1.8 0.5 1.3 −0.3 0.3 0.5 −0.6 1.2 1.2 −0.2
KCNQ4−Ups −0.5 0.4 −0.5 1.5 1.6 1.0 1.6 1.5 0.4 −0.1 −0.6 1.0 0.5 1.3 0.1 −0.6 0.1 0.4 −0.7 0.5 1.0
LOC390933−Cor −0.0 −1.3 −0.2 0.6 −0.9 −0.5 −1.4 1.0 1.3 0.8 −0.2 1.5 0.9 −0.3 −0.1 −1.3 −2.1 −0.2 0.7 0.9 0.4
CNIH2−Cor −1.5 −0.6 −1.1 0.5 0.4 −1.2 0.3 0.4 −0.7 0.4 0.3 0.4 −0.5 0.0 −0.4 −0.7 −1.4 1.7 1.0 0.1 −1.6
LOC100506343−Ups −0.7 −1.0 −1.6 0.2 −0.3 −0.8 −0.4 −0.0 1.1 0.5 0.4 0.9 0.6 1.2 −0.2 −2.8 −0.6 −0.5 −1.8 −0.6 0.2
TLK1P1−Ups −0.8 −0.9 −0.7 1.0 0.1 −0.1 −1.5 0.9 1.0 0.3 −0.5 0.5 0.1 −0.2 −0.2 −0.5 −1.2 0.7 −0.8 0.5 −0.7
ANKRD52−Cor −1.0 −0.3 −0.9 1.1 1.7 1.1 1.1 0.3 1.1 −0.1 −0.1 0.6 1.6 1.2 0.8 0.8 −0.3 1.2 0.7 0.6 0.6
MIR2115−Cor −1.4 −1.6 −0.3 0.0 0.6 0.3 0.6 0.9 0.4 0.4 −0.1 −0.8 −0.3 1.6 0.3 0.6 0.7 1.3 1.2 0.3 −0.1
TPM4−Cor −1.2 0.1 0.1 1.0 0.9 0.8 0.1 1.4 0.1 −1.0 1.1 1.6 −0.2 −1.1 1.3 1.1 0.1 0.6 1.6 1.1 1.7
PGLYRP2−Cor −0.1 −0.7 −1.5 1.0 1.2 0.5 −0.4 1.1 0.3 −1.5 −1.3 0.5 0.9 −0.5 0.3 −0.5 0.2 1.6 −0.7 −0.5 0.1
YWHAZP1−Cor −1.4 0.3 −0.9 1.4 1.8 0.6 0.0 −0.0 −0.4 0.4 0.8 1.0 −0.2 1.1 0.6 −0.1 0.5 1.0 0.1 0.0 0.7
LOC100421610−Cor −0.9 −1.6 −1.1 −0.1 0.7 0.3 0.6 −0.4 0.6 0.0 1.3 1.2 −0.1 −0.6 0.4 −0.4 −0.5 −0.1 0.5 0.7 −0.3
LOC126860−Ups −1.1 −1.4 −1.0 0.9 −0.3 −0.4 −1.4 −0.1 −2.5 0.2 −0.0 0.6 −1.3 −0.2 2.5 −1.4 −0.0 −0.2 −1.6 0.4 −1.4
EBLN2−Ups −0.1 −0.7 −0.4 1.0 0.2 0.8 −0.7 1.9 1.3 0.3 −0.2 0.9 0.3 0.4 1.1 −0.2 0.2 0.9 0.1 0.7 1.1
ZNF512−Cor −1.7 −1.4 −1.6 −1.1 0.4 0.0 −1.6 0.3 1.2 0.2 0.6 −0.5 −0.7 0.3 0.9 −0.7 0.4 −0.5 0.1 0.3 0.4
RBMX2P5−Cor −0.9 −1.1 −0.3 0.6 −0.1 0.9 0.5 −0.5 −0.5 0.7 0.7 1.2 0.6 −0.4 −0.1 −0.7 −0.1 0.3 1.0 0.9 0.1
ZKSCAN3−Cor −0.6 −0.4 −0.5 0.6 0.0 1.3 0.2 −0.6 1.5 0.9 1.1 1.6 1.4 −0.3 −0.5 0.6 0.3 0.4 −0.5 0.1 1.3
SIGLEC22P−Ups 0.5 −0.8 −1.7 1.4 −0.8 1.0 0.6 −0.5 0.7 0.8 0.2 0.6 0.5 0.3 −0.0 −0.1 1.1 1.4 −0.1 0.1 −0.2
MC1R−Ups −0.2 0.5 −0.1 1.8 2.3 1.8 1.9 1.1 1.7 0.7 0.4 2.2 0.8 1.6 1.8 −0.0 1.6 0.4 1.9 0.4 1.1
GIPC1−Ups −1.0 −0.8 −0.2 1.0 0.9 1.2 −1.2 1.0 −0.9 −0.0 −0.2 0.6 0.9 0.6 0.8 0.1 −1.6 0.4 0.4 0.5 0.5
MPC1L−Cor −0.6 −1.0 0.0 1.3 −1.0 0.8 −1.4 1.7 0.3 0.4 1.0 0.6 0.8 −0.3 0.1 1.8 0.5 −1.0 0.3 0.8 0.6
LOC100418848−Cor −0.6 −0.5 −1.8 0.2 −1.6 1.8 1.3 0.1 1.4 0.7 0.5 −0.3 0.1 −0.4 −2.0 0.2 0.1 −0.3 −0.4 0.4 −0.5
ACRBP−Cor −0.2 −2.6 −0.6 0.9 −0.1 0.5 −0.6 0.4 0.4 0.2 −0.2 −0.2 1.1 1.4 1.3 0.2 0.4 −1.3 −0.7 1.5 0.2
TRNAR12−Cor −1.4 −1.1 −0.5 1.1 −0.1 0.2 1.7 −0.4 0.1 0.6 −0.2 0.8 −0.7 0.6 −0.7 −1.4 −0.0 1.8 0.1 0.7 −0.2
OR51F5P−Cor −0.3 −1.0 −0.8 1.6 −1.3 −0.3 1.1 0.5 0.0 0.6 0.4 1.2 −0.2 1.2 0.7 −0.4 −0.5 −0.8 0.1 0.9 1.3
LOC100421361−Cor −1.1 −2.3 −1.9 0.4 0.4 −0.7 −0.0 −0.3 −0.6 0.6 −0.7 −1.2 −0.2 −0.0 1.7 −2.1 −0.8 −0.1 −0.7 0.1 −0.9
LOC645969−Cor −1.0 −0.9 −1.8 1.5 1.4 −0.1 −1.2 0.3 −0.8 −0.8 −0.7 0.4 0.6 0.6 0.6 −1.1 −1.0 0.6 −1.3 0.7 −0.0
TMUB2−Cor −0.6 0.8 −2.4 −0.0 −0.1 1.4 0.6 0.7 1.3 0.6 0.8 1.6 −1.8 −1.0 0.1 0.8 −0.1 −0.3 −0.6 0.4 1.2
PLCE1−Ups −1.5 −0.7 −2.4 0.6 −1.5 −0.1 2.6 −2.0 1.3 0.3 0.1 0.5 0.8 0.5 −2.2 −1.8 −1.1 −0.6 0.7 −0.0 0.2
MLF2−Ups −1.5 −0.8 −0.9 1.4 0.6 0.5 0.1 0.8 −0.4 −1.1 0.2 0.3 −0.7 1.7 0.9 0.5 −1.0 −1.3 −1.6 0.6 0.0
OR51N1P−Cor −0.3 −1.7 −0.9 1.1 0.0 0.8 0.9 0.6 0.2 −1.5 −0.0 0.9 0.2 0.8 0.9 −0.8 −0.5 −1.1 0.1 −0.1 0.6
FETUB−Cor −1.1 −0.2 0.6 1.6 −0.1 1.6 0.1 1.8 0.3 −0.1 0.2 1.4 0.5 0.7 0.4 2.3 0.7 1.7 2.2 0.3 0.7
C1orf122−Cor −1.1 −1.2 −1.8 −2.3 0.3 1.1 −0.0 0.1 1.3 0.3 −0.0 0.4 0.8 −1.4 0.2 −0.5 −1.4 0.7 −1.0 −0.0 −0.1
IFNWP2−Cor −0.4 −0.7 −1.3 1.4 0.4 0.6 0.5 0.1 −0.1 0.8 1.1 1.3 0.9 1.9 0.6 −0.6 −0.5 −1.7 −0.4 0.7 0.9
NTMT1−Cor −0.9 −1.0 −0.4 2.0 0.4 1.2 0.2 1.0 0.7 −0.8 −1.1 0.5 −0.4 2.1 1.5 −2.2 −0.8 0.3 0.5 0.6 1.4
UQCRC2P1−Ups −0.6 −1.0 −1.3 0.4 0.4 1.3 −0.2 0.5 −0.2 −0.3 −0.7 1.7 −1.3 −0.2 0.8 −0.4 0.3 −0.6 −0.9 0.1 1.3
MCCD1P2−Ups −1.4 −1.3 −1.7 0.9 −1.0 0.8 0.7 −0.5 2.9 0.5 −0.2 −0.1 1.1 −1.7 0.4 −0.3 −1.3 −1.0 0.3 2.5 −1.7
RPS26P48−Ups −1.1 −1.1 0.0 2.0 0.5 1.9 −0.5 1.2 −0.4 −0.9 −0.1 0.5 1.7 2.0 0.4 0.2 0.1 0.4 0.2 1.7 1.1
PRRT1−Ups −2.3 −0.7 −1.1 1.0 −0.5 0.4 −1.4 0.5 1.5 −1.5 0.0 1.3 −3.3 1.6 3.1 −2.4 −1.7 0.0 −0.1 0.1 0.6
WBP11−Cor −1.4 −0.6 −1.3 2.8 1.0 0.8 2.5 0.1 −0.9 −0.2 −0.5 3.1 1.5 2.6 1.1 0.4 −0.2 −0.5 3.1 −0.9 1.5
TRNAA2−Ups −1.9 −0.1 −2.1 2.6 1.7 0.4 −0.5 2.2 0.2 −1.0 0.2 1.0 0.4 1.0 1.3 0.2 −0.6 1.3 1.0 0.5 0.6
Chr Start End Votes
3 45927118 45927998 4
8 95909554 95910363 4
6 27278728 27279512 4
22 22679154 22679732 4
9 21382392 21383073 4
14 81675752 81676128 4
12 105740362 105741169 4
3 157215717 157216603 4
19 19543689 19544497 4
3 88200297 88201193 4
7 12605745 12606627 4
1 39388781 39389381 4
19 36967262 36967838 4
11 62361740 62362323 4
1 110152675 110153283 4
9 95061372 95062237 4
12 53690783 53691617 4
3 48411581 48412266 4
19 15748776 15749631 4
19 15157787 15158295 4
14 24870383 24870990 4
1 178064363 178065239 4
1 150781011 150781701 4
3 73112882 73113771 4
2 27547105 27547918 4
5 74836333 74836724 4
6 28124274 28125198 4
19 48046394 48046851 4
16 75675964 75676882 4
19 14177543 14178269 4
X 38213485 38214386 4
15 35095482 35095878 4
12 6609445 6610143 4
9 100714804 100715104 4
11 4388923 4389807 4
20 4669900 4670120 4
9 6233701 6234597 4
17 38028004 38028384 4
10 89416300 89417220 4
12 6716669 6717578 4
11 4466173 4467067 4
3 183767276 183768110 4
1 36391320 36391944 4
9 21383183 21384097 4
9 101987088 101987989 4
3 46397705 46398633 4
6 29761431 29761869 4
14 58864401 58865319 4
6 31874215 31874403 4
12 14725378 14725670 4
6 26515783 26516163 4

(B) 192 Gen-Loci



Chr	Start	End	Votes
5	140255327	140256141	4
16	2794010	2794924	4
17	26656062	26656556	4
19	11192102	11192780	4
X	47244558	47244854	4
9	101987088	101987989	4
22	28504905	28505203	4
9	21382392	21383073	4
6	26131860	26132792	4
7	144534513	144535417	4
9	32523970	32524392	4
20	34113897	34114781	4
10	43630635	43631533	4
10	97208526	97208932	4
2	47140366	47141350	4
17	4827763	4827965	4
17	7333428	7334308	4
12	53690783	53691617	4
2	74271949	74272833	4
19	19543689	19544497	4
9	101986047	101986970	4
17	7836698	7837620	4
6	27462933	27463529	4
3	48411581	48412266	4
6	131567803	131568303	4
6	26515783	26516163	4
12	49448331	49449231	4
12	112131355	112131754	4
6	137543242	137543622	4
7	56168419	56168639	4
6	28111989	28112487	3
21	32206935	32207869	3
7	100863199	100863984	3
8	18673104	18673704	3
17	41988803	41989591	3
11	62549147	62549947	3
5	135234636	135235536	3
17	7018228	7018854	3
1	17526338	17526920	3
5	41876640	41877518	3
12	55247353	55248269	3
19	33860602	33861191	3
2	198950663	198951449	3
X	90687567	90688355	3
11	60972777	60973661	3
X	47243316	47243970	3
3	9930069	9930842	3
19	46808729	46808941	3
19	18285699	18286595	3
1	38322767	38323443	3
11	61241020	61241916	3
19	44171362	44171754	3
22	21211292	21212196	3
3	15109968	15110768	3
19	54689239	54689521	3
16	20461982	20462768	3
6	47000134	47001028	3
2	27854217	27854539	3
2	219542978	219543754	3
11	62348890	62349286	3
6	1385246	1386149	3
7	45027475	45027771	3
11	67791062	67791865	3
3	169536110	169537051	3
20	49569611	49570508	3
17	43291411	43291763	3
16	11927763	11928651	3
19	14177543	14178269	3
X	103408308	103409172	3
12	8087495	8088340	3
7	48121983	48122865	3
18	12403520	12404448	3
17	19142743	19143452	3
16	57647094	57647706	3
9	97524743	97525495	3
7	30401689	30402088	3
1	39340665	39341540	3
22	29384326	29385218	3
2	20248990	20249882	3
1	207101367	207102212	3
19	44486555	44487408	3
7	19141627	19142415	3
2	173593245	173594120	3
9	35831765	35832683	3
5	145829225	145829829	3
10	11782253	11782462	3
9	4747919	4748885	3
1	44429159	44429975	3
19	19538271	19539210	3
14	45607848	45608682	3
6	26133080	26133796	3
19	8511576	8512377	3
1	185128258	185129138	3
11	62429794	62430629	3
11	62604562	62605310	3
17	29654518	29655429	3

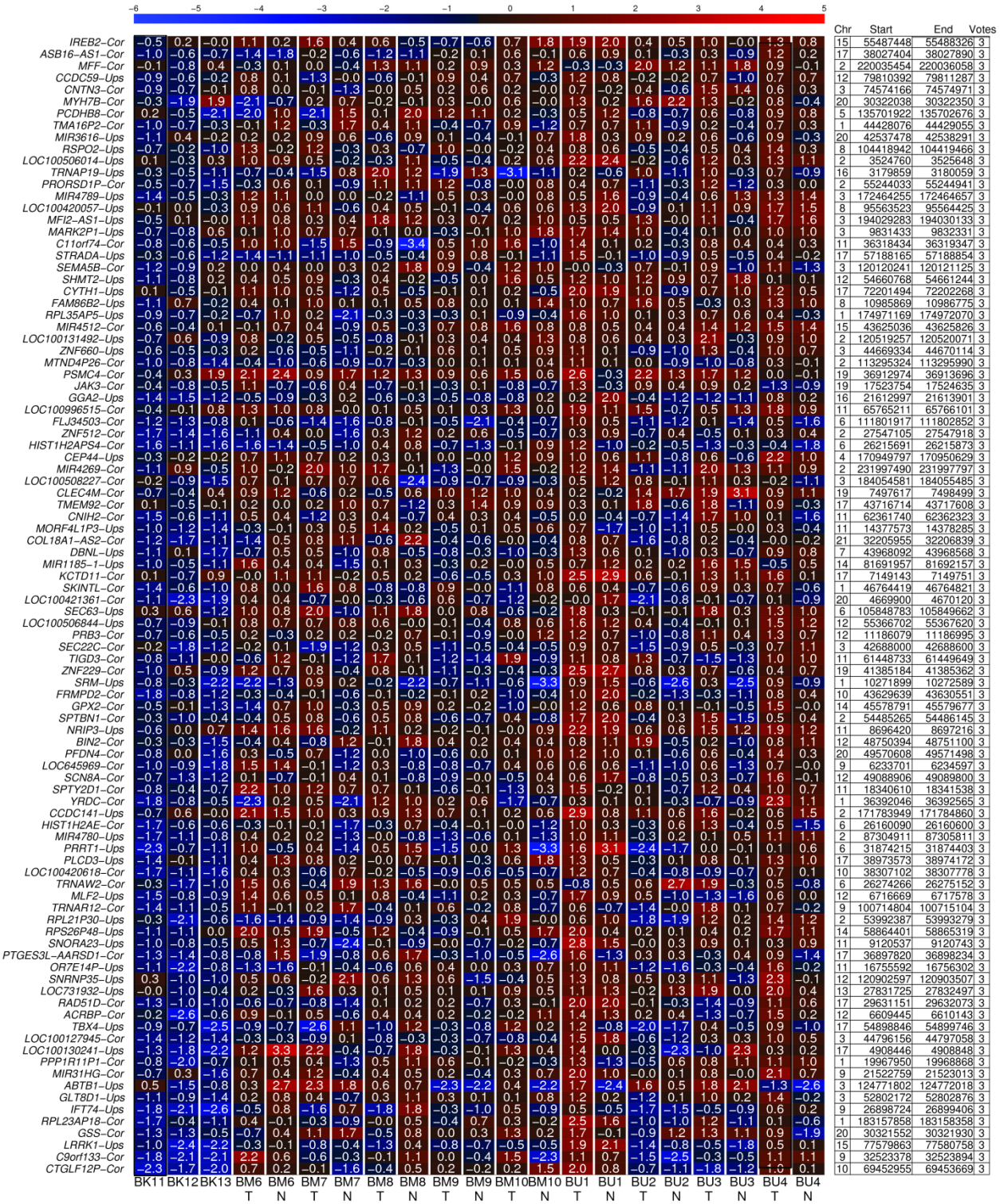
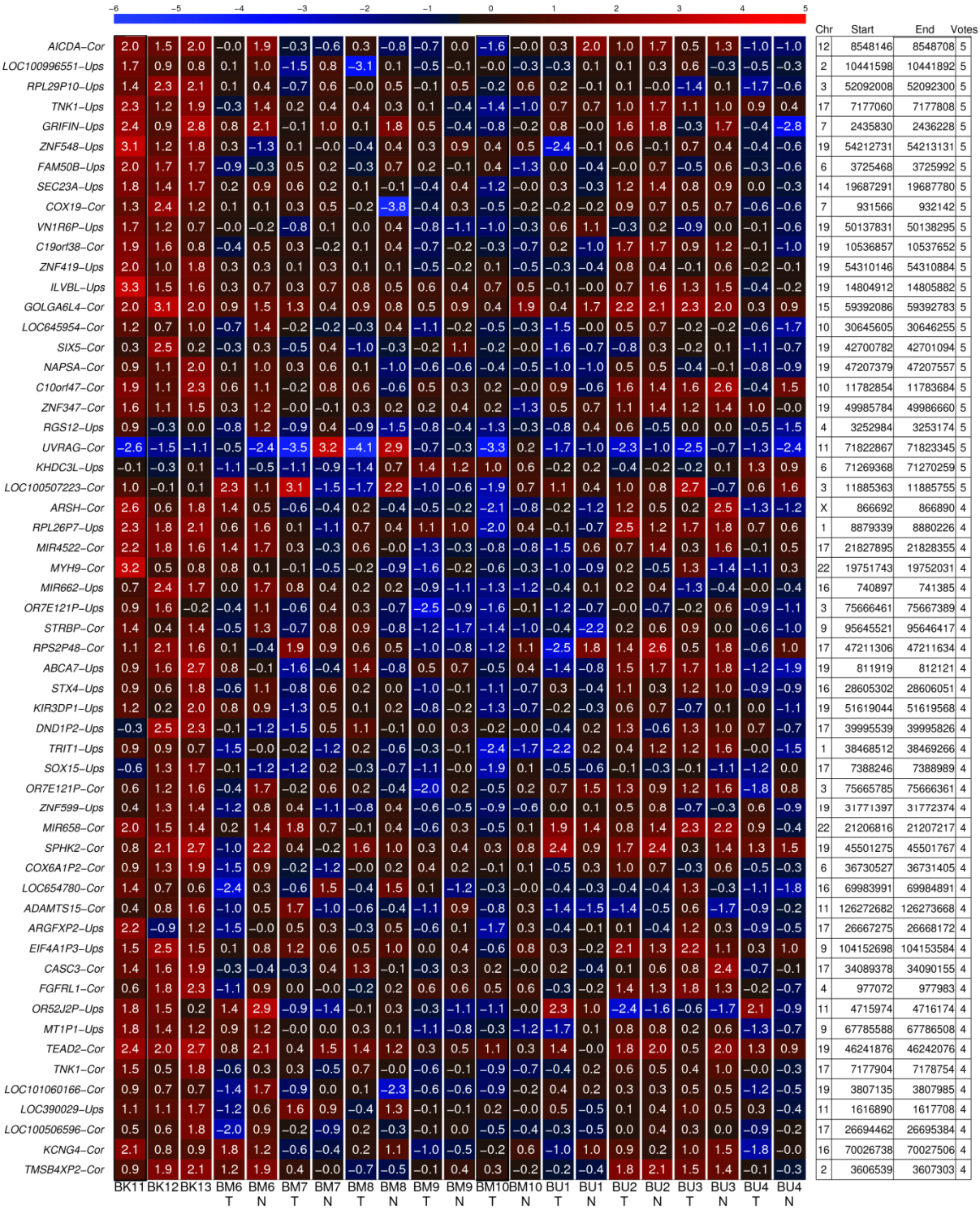
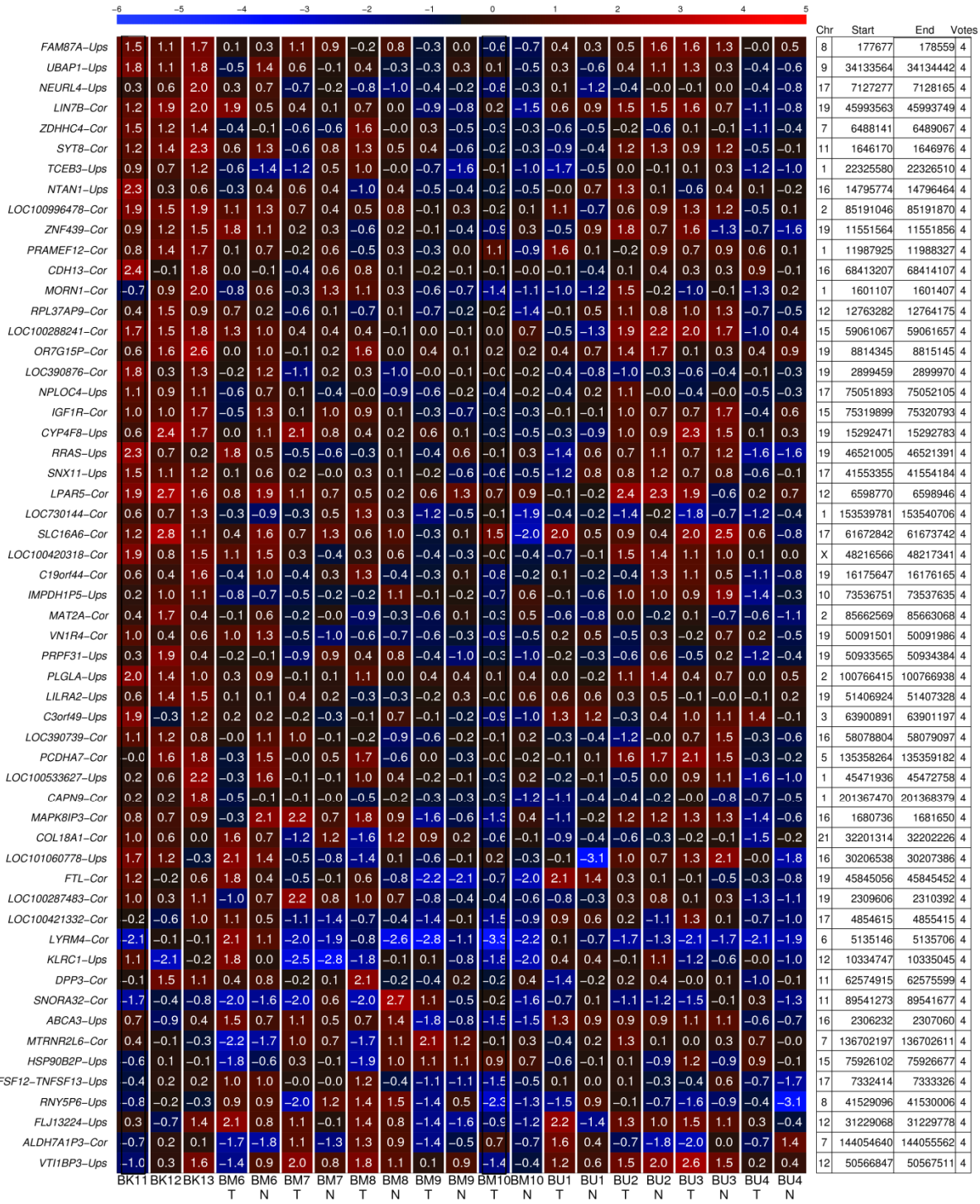

−6 −5 −4 −3 −2 −1 0 1 2 3 4 5
IREB2−Cor
ASB16−AS1−Cor
MFF−Cor
CCDC59−Ups
CNTN3−Cor
MYH7B−Cor
PCDHB8−Cor
TMA16P2−Cor
MIR3616−Ups
RSPO2−Ups
LOC100506014−Ups
TRNAP19−Ups
PRORSD1P−Cor
MIR4789−Ups
LOC100420057−Ups
MFI2−AS1−Ups
MARK2P1−Ups
C11orf74−Cor
STRADA−Ups
SEMA5B−Cor
SHMT2−Ups
CYTH1−Ups
FAM86B2−Ups
RPL35AP5−Ups
MIR4512−Cor
LOC100131492−Ups
ZNF660−Ups
MTND4P26−Cor
PSMC4−Cor
JAK3−Cor
GGA2−Ups
LOC100996515−Cor
FLJ34503−Cor
ZNF512−Cor
HIST1H2APS4−Cor
CEP44−Ups
MIR4269−Cor
LOC100508227−Cor
CLEC4M−Cor
TMEM92−Cor
CNIH2−Cor
MORF4L1P3−Ups
COL18A1−AS2−Cor
DBNL−Ups
MIR1185−1−Ups
KCTD11−Cor
SKINTL−Cor
LOC100421361−Cor
SEC63−Ups
LOC100506844−Ups
PRB3−Cor
SEC22C−Cor
TIGD3−Cor
ZNF229−Cor
SRM−Ups
FRMPD2−Cor
GPX2−Cor
SPTBN1−Cor
NRIP3−Ups
BIN2−Cor
PFDN4−Cor
LOC645969−Cor
SCN8A−Cor
SPTY2D1−Cor
YRDC−Cor
CCDC141−Ups
HIST1H2AE−Cor
MIR4780−Ups
PRRT1−Ups
PLCD3−Ups
LOC100420618−Cor
TRNAW2−Cor
MLF2−Ups
TRNAR12−Cor
RPL21P30−Ups
RPS26P48−Ups
SNORA23−Ups
PTGES3L−AARSD1−Cor
OR7E14P−Ups
SNRNP35−Ups
LOC731932−Ups
RAD51D−Cor
ACRBP−Cor
TBX4−Ups
LOC100127945−Cor
LOC100130241−Ups
PPP1R11P1−Cor
MIR31HG−Cor
ABTB1−Ups
GLT8D1−Ups
IFT74−Ups
RPL23AP18−Cor
GSS−Cor
LRRK1−Ups
C9orf133−Cor
CTGLF12P−Cor
BK11 BK12 BK13 BM6 T BM6 N BM7 T BM7 N BM8 T BM8 N BM9 T BM9 N BM10 T BM10 N BU1 T BU1 N BU2 T BU2 N BU3 T BU3 N BU4 T BU4 N
Chr Start End Votes
15 55487448 55488326 3
17 38027404 38027890 3
2 220035454 220036058 3
12 79810392 79811287 3
3 74574166 74574971 3
20 30322038 30322350 3
5 135701922 135702676 3
1 44428076 44429055 3
20 42537478 42538291 3
8 104418942 104419466 3
2 3524760 3525648 3
16 3179859 3180059 3
2 55244033 55244941 3
3 172464255 172464657 3
12 54660768 54661244 3
17 72201494 72202268 3
8 10985869 10986775 3
1 174971169 174972070 3
15 43625036 43625826 3
2 120519257 120520071 3
3 44669334 44670114 3
2 113295324 113295990 3
19 36912974 36913696 3
17 17523754 17524635 3
16 21612997 21613901 3
11 65765211 65766101 3
6 111801917 111802852 3
2 27547105 27547918 3
6 26215691 26215873 3
4 170949797 170950629 3
2 231997490 231997797 3
3 184054581 184055485 3
19 7497617 7498499 3
17 43716714 43717608 3
11 62361740 62362323 3
11 14377573 14378285 3
21 32205955 32206839 3
7 43968092 43968568 3
14 81691957 81692157 3
17 7149143 7149751 3
1 46764419 46764821 3
20 4669900 4670120 3
6 105848783 105849662 3
12 55366702 55367620 3
12 11186079 11186995 3
3 42688000 42688600 3
11 61448733 61449649 3
19 41385184 41385362 3
1 10271899 10272589 3
10 43629639 43630551 3
14 45578791 45579677 3
2 54485265 54486145 3
11 8696420 8697216 3
12 48750394 48751100 3
20 49570608 49571498 3
9 6233701 6234597 3
12 49088906 49089800 3
11 18340610 18341538 3
1 36392046 36392565 3
2 171783949 171784860 3
6 26160090 26160600 3
2 87304911 87305811 3
6 31874215 31874403 3
17 38973573 38974172 3
10 38307102 38307778 3
6 26274266 26275152 3
12 6716669 6717578 3
9 100714804 100715104 3
2 53992387 53993279 3
14 58864401 58865319 3
11 9120537 9120743 3
17 36897820 36898234 3
11 16755592 16756302 3
12 120902597 120903507 3
2 27831725 27832497 3
17 29631151 29632073 3
12 6609445 6610143 3
17 54898846 54899746 3
3 44796156 44797058 3
17 4908446 4908848 3
1 19967950 19968868 3
9 21522759 21523013 3
3 124771802 124772018 3
3 52802172 52802876 3
9 26898724 26899406 3
1 183157858 183158358 3
20 30321552 30321930 3
15 77579863 77580758 3
9 32523378 32523894 3
10 69452955 69453669 3

Abb. 6 Heat Map der hypomethylierten Cor- und Ups Promotorregionen der (A) multi- und (B) unifokalen Blasenkarzinom-Proben und Negativ-Kontrollen der Gewebe-Kohorte 1.

(A) 113 Gen-Loci

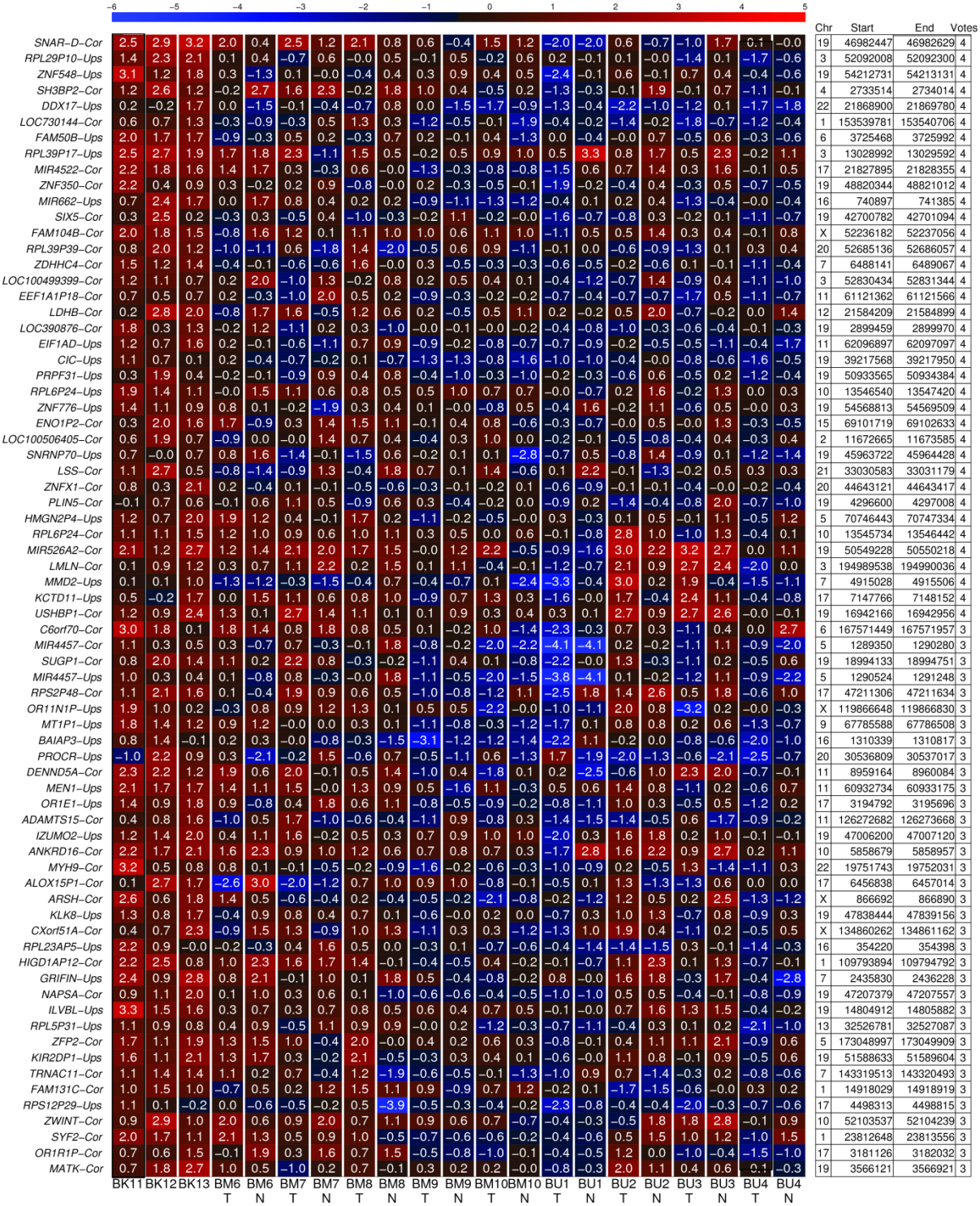


AICDA–Cor	2.0	1.5	2.0	−0.0	1.9	−0.3	−0.6	0.3	−0.8	−0.7	0.0	−1.6	−0.0	0.3	2.0	1.0	1.7	0.5	1.3	−1.0	−1.0	12	8548146	8548708	5
LOC100996551–Ups	1.7	0.9	0.8	0.1	1.0	−1.5	0.8	−3.1	0.1	−0.5	−0.1	−0.0	−0.3	−0.3	0.1	0.1	0.3	0.6	−0.3	−0.5	−0.3	2	10441598	10441892	5
RPL29P10–Ups	1.4	2.3	2.1	0.1	0.4	−0.7	0.6	−0.0	0.5	−0.1	0.5	−0.2	0.6	0.2	−0.1	0.1	−0.0	−1.4	0.1	−1.7	−0.6	3	52092008	52092300	5
TNK1–Ups	2.3	1.2	1.9	−0.3	1.4	0.2	0.4	0.4	0.3	0.1	−0.4	−1.4	−1.0	0.7	0.7	1.0	1.7	1.1	1.0	0.9	0.4	17	7177060	7177808	5
GRIFIN–Ups	2.4	0.9	2.8	0.8	2.1	−0.1	1.0	0.1	1.8	0.5	−0.4	−0.8	−0.2	0.8	−0.0	1.6	1.8	−0.3	1.7	−0.4	−2.8	7	2435830	2436228	5
ZNF548–Ups	3.1	1.2	1.8	0.3	−1.3	0.1	−0.0	−0.4	0.4	0.3	0.9	0.4	0.5	−2.4	−0.1	0.6	−0.1	0.7	0.4	−0.4	−0.6	19	54212731	54213131	5
FAM50B–Ups	2.0	1.7	1.7	−0.9	−0.3	0.5	0.2	−0.3	0.7	0.2	−0.1	0.4	−1.3	0.0	−0.4	−0.0	0.7	−0.5	0.6	−0.3	−0.6	6	3725468	3725992	5
SEC23A–Ups	1.8	1.4	1.7	0.2	0.9	0.6	0.2	0.1	−0.1	−0.4	0.4	−1.2	−0.0	0.3	−0.3	1.2	1.4	0.8	0.9	0.0	−0.3	14	19687291	19687780	5
COX19–Cor	1.3	2.4	1.2	0.1	0.1	0.3	0.5	−0.2	−3.8	−0.4	0.3	−0.5	−0.2	−0.2	−0.2	0.9	0.7	0.5	0.7	−0.6	−0.6	7	931566	932142	5
VN1R6P–Ups	1.7	1.2	0.7	−0.0	−0.2	−0.8	0.1	0.0	0.4	−0.8	−1.1	−1.0	−0.3	0.6	1.1	−0.3	0.2	−0.9	0.0	−0.1	−0.6	19	50137831	50138295	5
C19orf38–Cor	1.9	1.6	0.8	−0.4	0.5	0.3	−0.2	0.1	0.4	−0.7	−0.2	−0.3	−0.7	0.2	−1.0	1.7	1.7	0.9	1.2	−0.1	−1.0	19	10536857	10537652	5
ZNF419–Ups	2.0	1.0	1.8	0.3	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1	−0.5	−0.2	0.1	−0.5	−0.3	−0.4	0.8	0.4	−0.1	0.6	−0.2	−0.1	19	54310146	54310884	5
ILVBL–Ups	3.3	1.5	1.6	0.3	0.7	0.3	0.7	0.8	0.5	0.6	0.4	0.7	0.5	−0.1	−0.0	0.7	1.6	1.3	1.5	−0.4	−0.2	19	14804912	14805882	5
GOLGA6L4–Cor	2.0	3.1	2.0	0.9	1.5	1.3	0.4	0.9	0.8	0.5	0.9	0.4	1.9	0.4	1.7	2.2	2.1	2.3	2.0	0.3	0.9	15	59392086	59392783	5
LOC645954–Cor	1.2	0.7	1.0	−0.7	1.4	−0.2	−0.2	−0.3	0.4	−1.1	−0.2	−0.5	−0.3	−1.5	−0.0	0.5	0.7	−0.2	−0.2	−0.6	−1.7	10	30645605	30646255	5
SIX5–Cor	0.3	2.5	0.2	−0.3	0.3	−0.5	0.4	−1.0	−0.3	−0.2	1.1	−0.2	−0.0	−1.6	−0.7	−0.8	0.3	−0.2	0.1	−1.1	−0.7	19	42700782	42701094	5
NAPSA–Cor	0.9	1.1	2.0	0.1	1.0	0.3	0.6	0.1	−1.0	−0.6	−0.6	−0.4	−0.5	−1.0	−1.0	0.5	0.5	−0.4	−0.1	−0.8	−0.9	19	47207379	47207557	5
C10orf47–Cor	1.9	1.1	2.3	0.6	1.1	−0.2	0.8	0.6	−0.6	0.5	0.3	0.2	−0.0	0.9	−0.6	1.6	1.4	1.6	2.6	−0.4	1.5	10	11782854	11783684	5
ZNF347–Cor	1.6	1.1	1.5	0.3	1.2	−0.0	−0.1	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	−1.3	0.5	0.7	1.1	1.4	1.2	1.4	1.0	−0.0	19	49985784	49986660	5
RGS12–Ups	0.9	−0.3	0.0	−0.8	1.2	−0.9	0.4	−0.9	−1.5	−0.8	−0.4	−1.3	−0.3	−0.8	0.4	0.6	−0.5	0.0	0.0	−0.5	−1.5	4	3252984	3253174	5
UVRAG–Cor	−2.6	−1.5	−1.1	−0.5	−2.4	−3.5	3.2	−4.1	2.9	−0.7	−0.3	−3.3	0.2	−1.7	−1.0	−2.3	−1.0	−2.5	−0.7	−1.3	−2.4	11	71822867	71823345	5
KHDC3L–Ups	−0.1	−0.3	0.1	−1.1	−0.5	−1.1	−0.9	−1.4	0.7	1.4	1.2	1.0	0.6	−0.2	0.2	−0.4	−0.2	−0.2	0.1	1.3	0.9	6	71269368	71270259	5
LOC100507223–Cor	1.0	−0.1	0.1	2.3	1.1	3.1	−1.5	−1.7	2.2	−1.0	−0.6	−1.9	0.7	1.1	0.4	1.0	0.8	2.7	−0.7	0.6	1.6	3	11885363	11885755	5
ARSH–Cor	2.6	0.6	1.8	1.4	0.5	−0.6	−0.4	0.2	−0.4	−0.5	−0.2	−2.1	−0.8	−0.2	−1.2	1.2	0.5	0.2	2.5	−1.3	−1.2	X	866692	866890	4
RPL26P7–Ups	2.3	1.8	2.1	0.6	1.6	0.1	−1.1	0.7	0.4	1.1	1.0	−2.0	0.4	−0.1	−0.7	2.5	1.2	1.7	1.8	0.7	0.6	1	8879339	8880226	4
MIR4522–Cor	2.2	1.8	1.6	1.4	1.7	0.3	−0.3	0.6	−0.0	−1.3	−0.3	−0.8	−0.8	−1.5	0.6	0.7	1.4	0.3	1.6	−0.1	0.5	17	21827895	21828355	4
MYH9–Cor	3.2	0.5	0.8	0.8	0.1	−0.1	−0.5	−0.2	−0.9	−1.6	−0.2	−0.6	−0.3	−1.0	−0.9	0.2	−0.5	1.3	−1.4	−1.1	0.3	22	19751743	19752031	4
MIR662–Ups	0.7	2.4	1.7	0.0	1.7	0.8	0.4	0.2	0.2	−0.9	−1.1	−1.3	−1.2	−0.4	0.1	0.2	0.4	−1.3	−0.4	−0.0	−0.4	16	740897	741385	4
OR7E121P–Ups	0.9	1.6	−0.2	−0.4	1.1	−0.6	0.4	0.3	−0.7	−2.5	−0.9	−1.6	−0.1	−1.2	−0.7	−0.0	−0.7	−0.2	0.6	−0.9	−1.1	3	75666461	75667389	4
STRBP–Cor	1.4	0.4	1.4	−0.5	1.3	−0.7	0.8	0.9	−0.8	−1.2	−1.7	−1.4	−1.0	−0.4	−2.2	0.2	0.6	0.9	0.0	−0.6	−1.0	9	95645521	95646417	4
RPS2P48–Cor	1.1	2.1	1.6	0.1	−0.4	1.9	0.9	0.6	0.5	−1.0	−0.8	−1.2	1.1	−2.5	1.8	1.4	2.6	0.5	1.8	−0.6	1.0	17	47211306	47211634	4
ABCA7–Ups	0.9	1.6	2.7	0.8	−0.1	−1.6	−0.4	1.4	−0.8	0.5	0.7	−0.5	0.4	−1.4	−0.8	1.5	1.7	1.7	1.8	−1.2	−1.9	19	811919	812121	4
STX4–Ups	0.9	0.6	1.8	−0.6	1.1	−0.8	0.6	0.2	0.0	−1.0	−0.1	−1.1	−0.7	0.3	−0.4	1.1	0.3	1.2	1.0	−0.9	−0.9	16	28605302	28606051	4
KIR3DP1–Ups	1.2	0.2	2.0	0.8	0.9	−1.3	0.5	0.1	0.2	−0.8	−0.2	−1.3	−0.7	−0.2	−0.3	0.6	0.7	−0.7	0.1	0.0	−1.1	19	51619044	51619568	4
DND1P2–Ups	−0.3	2.5	2.3	−0.1	−1.2	−1.5	0.5	1.1	−0.1	0.0	0.3	−0.2	−0.0	−0.4	0.2	1.3	−0.6	1.3	1.0	0.7	−0.7	17	39995539	39995826	4
TRIT1–Ups	0.9	0.9	0.7	−1.5	−0.0	−0.2	−1.2	0.2	−0.6	−0.3	−0.1	−2.4	−1.7	−2.2	0.2	0.4	1.2	1.2	1.6	−0.0	−1.5	1	38468512	38469266	4
SOX15–Ups	−0.6	1.3	1.7	−0.1	−1.2	−1.2	0.2	−0.3	−0.7	−1.1	−0.0	−1.9	0.1	−0.5	−0.6	−0.1	−0.3	−0.1	−1.1	−1.2	0.0	17	7388246	7388989	4
OR7E121P–Cor	0.6	1.2	1.6	−0.4	1.7	−0.2	0.6	0.2	−0.4	−2.0	0.2	−0.5	0.2	0.7	1.5	1.3	0.9	1.2	1.6	−1.8	0.8	3	75665785	75666361	4
ZNF599–Ups	0.4	1.3	1.4	−1.2	0.8	0.4	−1.1	−0.8	0.4	−0.6	−0.5	−0.9	−0.6	0.0	0.1	0.5	0.8	−0.7	−0.3	0.6	−0.9	19	31771397	31772374	4
MIR658–Cor	2.0	1.5	1.4	0.2	1.4	1.8	0.7	−0.1	0.4	−0.6	0.3	−0.5	0.1	1.9	1.4	0.8	1.4	2.3	2.2	0.9	−0.4	22	21206816	21207217	4
SPHK2–Cor	0.8	2.1	2.7	−1.0	2.2	0.4	−0.2	1.6	1.0	0.3	0.4	0.3	0.8	2.4	0.9	1.7	2.4	0.3	1.4	1.3	1.5	19	45501275	45501767	4
COX6A1P2–Cor	0.9	1.3	1.9	−1.5	0.9	−0.2	−1.2	−0.0	0.2	0.4	0.2	−0.1	0.1	−0.5	0.3	1.0	0.7	−0.3	0.6	−0.5	−0.3	6	36730527	36731405	4
LOC654780–Cor	1.4	0.7	0.6	−2.4	0.3	−0.6	1.5	−0.4	1.5	0.1	−1.2	−0.3	−0.0	−0.4	−0.3	−0.4	−0.4	1.3	−0.3	−1.1	−1.8	16	69983991	69984891	4
ADAMTS15–Cor	0.4	0.8	1.6	−1.0	0.5	1.7	−1.0	−0.6	−0.4	−1.1	0.9	−0.8	0.3	−1.4	−1.5	−1.4	−0.5	0.6	−1.7	−0.9	−0.2	11	126272682	126273668	4
ARGFXP2–Ups	2.2	−0.9	1.2	−1.5	−0.0	0.5	0.3	−0.3	0.5	−0.6	0.1	−1.7	0.3	−0.4	−0.1	0.1	−0.4	1.2	0.3	−0.9	−0.5	17	26667275	26668172	4
EIF4A1P3–Ups	1.5	2.5	1.5	0.1	0.8	1.2	0.6	0.5	1.0	0.0	0.4	−0.6	0.8	0.3	−0.2	2.1	1.3	2.2	1.1	0.3	1.0	9	104152698	104153584	4
CASC3–Cor	1.4	1.6	1.9	−0.3	−0.4	−0.3	0.4	1.3	−0.1	−0.3	0.3	0.2	−0.0	0.2	−0.4	0.1	0.6	0.8	2.4	−0.7	−0.1	17	34089378	34090155	4
FGFRL1–Cor	0.6	1.8	2.3	−1.1	0.9	0.0	−0.0	−0.2	0.2	0.6	0.6	0.5	0.6	−0.3	−0.2	1.4	1.3	1.8	1.3	−0.2	−0.7	4	977072	977983	4
OR52J2P–Ups	1.8	1.5	0.2	1.4	2.9	−0.9	−1.4	−0.1	0.3	−0.3	−1.1	−1.1	−0.0	2.3	1.0	−2.4	−1.6	−0.6	−1.7	2.1	−0.9	11	4715974	4716174	4
MT1P1–Ups	1.8	1.4	1.2	0.9	1.2	−0.0	0.0	0.3	0.1	−1.1	−0.8	−0.3	−1.2	−1.7	0.1	0.8	0.8	0.2	0.6	−1.3	−0.7	9	67785588	67786508	4
TEAD2–Cor	2.4	2.0	2.7	0.8	2.1	0.4	1.5	1.4	1.2	0.3	0.5	1.1	0.3	1.4	−0.0	1.8	2.0	0.5	2.0	1.3	0.9	19	46241876	46242076	4
TNK1–Cor	1.5	0.5	1.8	−0.6	0.3	0.3	−0.5	0.7	−0.0	−0.6	−0.1	−0.9	−0.7	−0.4	0.2	0.6	0.5	0.4	1.0	−0.0	−0.3	17	7177904	7178754	4
LOC101060166–Cor	0.9	0.7	0.7	−1.4	1.7	−0.9	0.0	0.1	−2.3	−0.6	−0.6	−0.9	−0.2	0.4	0.2	0.3	0.3	0.5	0.5	−1.2	−0.5	19	3807135	3807985	4
LOC390029–Ups	1.1	1.1	1.7	−1.2	0.6	1.6	0.9	−0.4	1.3	−0.1	−0.1	0.2	−0.0	0.5	−0.5	0.1	0.4	1.0	0.5	0.3	−0.4	11	1616890	1617708	4
LOC100506596–Cor	0.5	0.6	1.8	−2.0	0.9	−0.2	−0.9	0.2	−0.3	−0.1	0.0	−0.5	−0.4	−0.3	−0.5	0.0	0.4	0.3	0.0	−0.9	−0.2	17	26694462	26695384	4
KCNG4–Cor	2.1	0.8	0.9	1.8	1.2	−0.6	−0.4	0.2	1.1	−1.0	−0.5	−0.2	0.6	−1.0	1.0	0.9	0.2	1.0	1.5	−1.8	−0.0	16	70026738	70027506	4
TMSB4XP2–Cor	0.9	1.9	2.1	1.2	1.9	0.4	−0.0	−0.7	−0.5	−0.1	0.4	0.3	−0.2	−0.2	−0.4	1.8	2.1	1.5	1.4	−0.1	−0.3	2	3606539	3607303	4

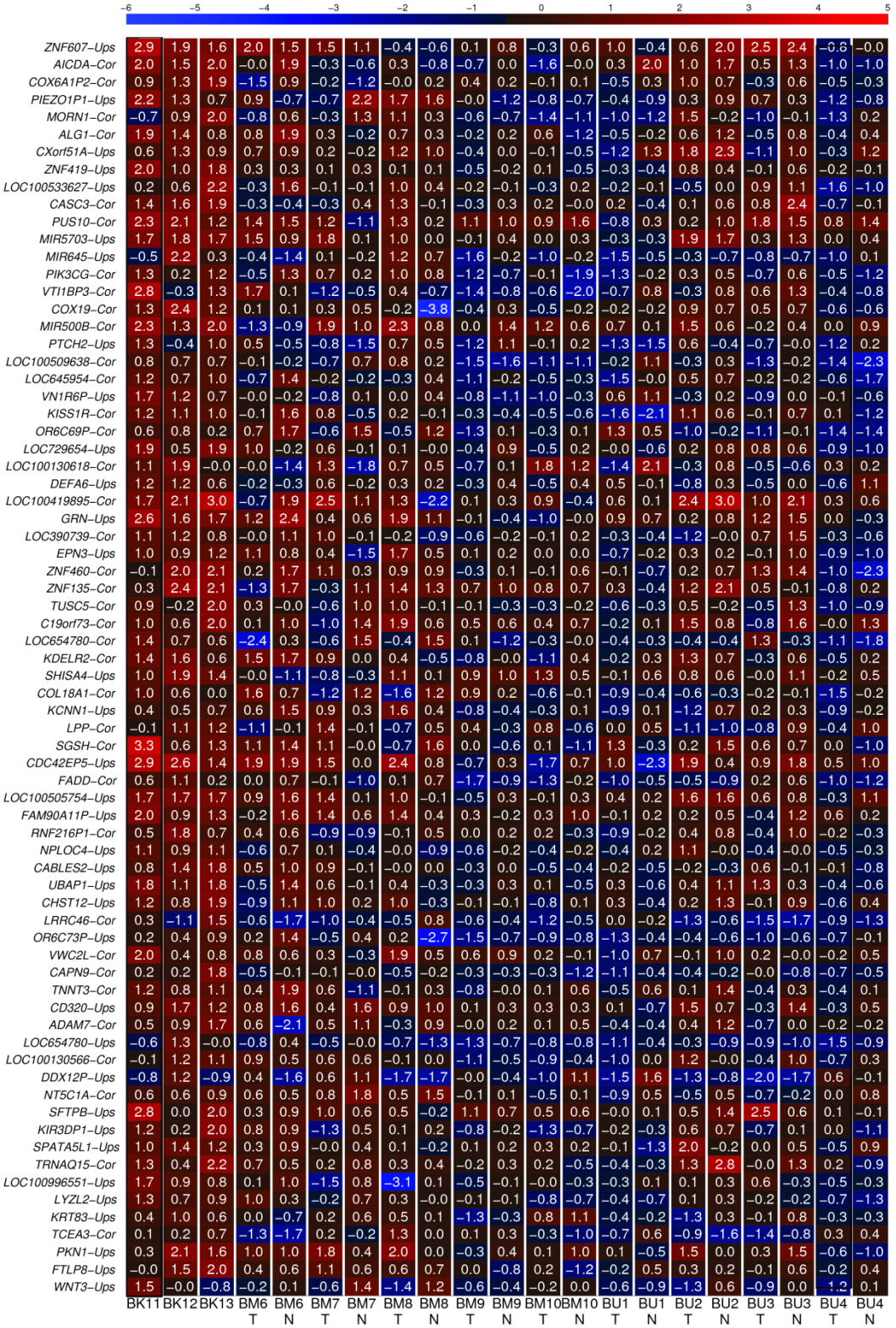


Chr	Start	End	Votes
8	177677	178559	4
9	34133564	34134442	4
17	7127277	7128165	4
19	45993563	45993749	4
7	6488141	6489067	4
11	1646170	1646976	4
1	22325580	22326510	4
16	14795774	14796464	4
2	85191046	85191870	4
19	11551564	11551856	4
1	11987925	11988327	4
16	68413207	68414107	4
1	1601107	1601407	4
12	12763282	12764175	4
15	59061067	59061657	4
19	8814345	8815145	4
19	2899459	2899970	4
17	75051893	75052105	4
15	75319899	75320793	4
19	15292471	15292783	4
19	46521005	46521391	4
17	41553355	41554184	4
12	6598770	6598946	4
1	153539781	153540706	4
17	61672842	61673742	4
X	48216566	48217341	4
19	16175647	16176165	4
10	73536751	73537635	4
2	85662569	85663068	4
19	50091501	50091986	4
19	50933565	50934384	4
2	100766415	100766938	4
19	51406924	51407328	4
3	63900891	63901197	4
16	58078804	58079097	4
5	135358264	135359182	4
1	45471936	45472758	4
1	201367470	201368379	4
16	1680736	1681650	4
21	32201314	32202226	4
16	30206538	30207386	4
19	45845056	45845452	4
19	2309606	2310392	4
17	4854615	4855415	4
6	5135146	5135706	4
12	10334747	10335045	4
11	62574915	62575599	4
11	89541273	89541677	4
16	2306232	2307060	4
7	136702197	136702611	4
15	75926102	75926677	4
17	7332414	7333326	4
8	41529096	41530006	4
12	31229068	31229778	4
7	144054640	144055562	4
12	50566847	50567511	4

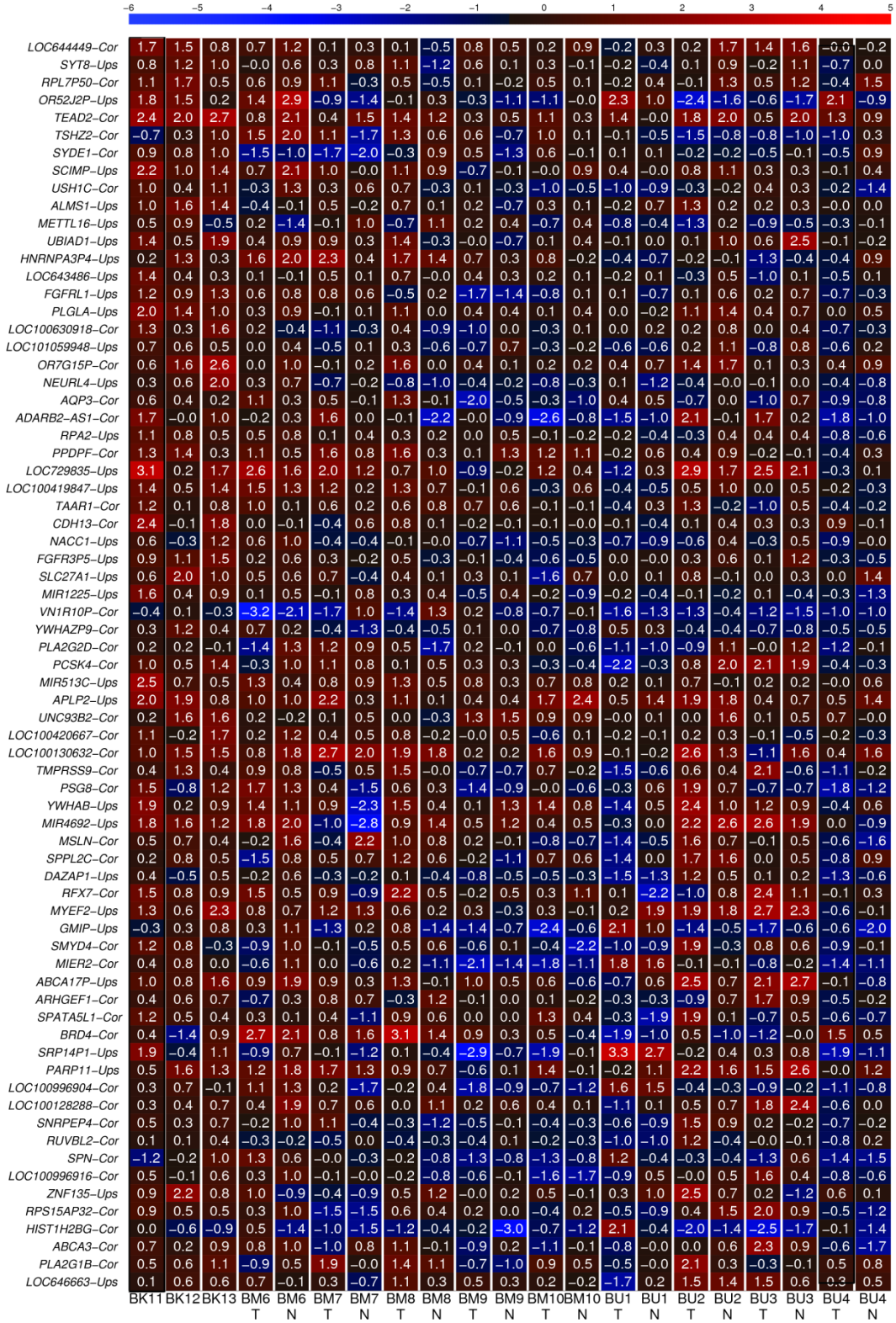
(B) 215 Gen-Loci



	BK11	BK12	BK13	BM6 T	BM6 N	BM7 T	BM7 N	BM8 T	BM8 N	BM9 T	BM9 N	BM10 T	BM10 N	BU1 T	BU1 N	BU2 T	BU2 N	BU3 T	BU3 N	BU4 T	BU4 N	Chr	Start	End	Votes
SNAR−D−Cor	2.5	2.9	3.2	2.0	0.4	2.5	1.2	2.1	0.8	0.6	−0.4	1.5	1.2	−2.0	−2.0	0.6	−0.7	−1.0	1.7	0.1	−0.0	19	46982447	46982629	4
RPL29P10−Ups	1.4	2.3	2.1	0.1	0.4	−0.7	0.6	−0.0	0.5	−0.1	0.5	−0.2	0.6	0.2	−0.1	0.1	−0.0	−1.4	0.1	−1.7	−0.6	3	52092008	52092300	4
ZNF548−Ups	3.1	1.2	1.8	0.3	−1.3	0.1	−0.0	−0.4	0.4	0.3	0.9	0.4	0.5	−2.4	−0.1	0.6	−0.1	0.7	0.4	−0.4	−0.6	19	54212731	54213131	4
SH3BP2−Cor	1.2	2.6	1.2	−0.2	2.7	1.6	2.3	−0.2	1.8	1.0	0.4	−0.5	0.2	−1.3	−0.3	−0.1	1.9	−0.1	0.7	−1.1	−0.1	4	2733514	2734014	4
DDX17−Ups	0.2	−0.2	1.7	0.0	−1.5	−0.1	−0.4	−0.7	0.8	0.0	−1.5	−1.7	−0.9	−1.3	−0.4	−2.2	−1.0	−1.2	0.1	−1.7	−1.8	22	21868900	21869780	4
LOC730144−Cor	0.6	0.7	1.3	−0.3	−0.9	−0.3	0.5	1.3	0.3	−1.2	−0.5	−0.1	−1.9	−0.4	−0.2	−1.4	−0.2	−1.8	−0.7	−1.2	−0.4	1	153539781	153540706	4
FAM50B−Ups	2.0	1.7	1.7	−0.9	−0.3	0.5	0.2	−0.3	0.7	0.2	−0.1	0.4	−1.3	0.0	−0.4	−0.0	0.7	−0.5	0.6	−0.3	−0.6	6	3725468	3725992	4
RPL39P17−Ups	2.5	2.7	1.9	1.7	1.8	2.3	−1.1	1.5	0.5	−0.2	0.5	0.9	1.0	0.5	3.3	0.8	1.7	0.5	2.3	−0.2	1.1	3	13028992	13029592	4
MIR4522−Cor	2.2	1.8	1.6	1.4	1.7	0.3	−0.3	0.6	−0.0	−1.3	−0.3	−0.8	−0.8	−1.5	0.6	0.7	1.4	0.3	1.6	−0.1	0.5	17	21827895	21828355	4
ZNF350−Cor	2.2	0.4	0.9	0.3	−0.2	0.2	0.9	−0.8	−0.0	0.2	−0.3	−0.5	−0.1	−1.9	−0.2	−0.4	0.4	−0.3	0.5	−0.7	−0.5	19	48820344	48821012	4
MIR662−Ups	0.7	2.4	1.7	0.0	1.7	0.8	0.4	0.2	0.2	−0.9	−1.1	−1.3	−1.2	−0.4	0.1	0.2	0.4	−1.3	−0.4	−0.0	−0.4	16	740897	741385	4
SIX5−Cor	0.3	2.5	0.2	−0.3	0.3	−0.5	0.4	−1.0	−0.3	−0.2	1.1	−0.2	−0.0	−1.6	−0.7	−0.8	0.3	−0.2	0.1	−1.1	−0.7	19	42700782	42701094	4
FAM104B−Cor	2.0	1.8	1.5	−0.8	1.6	1.2	0.1	1.1	1.0	1.0	0.6	1.1	1.0	−1.1	0.5	0.5	1.4	0.3	0.4	−0.1	0.8	X	52236182	52237056	4
RPL39P39−Cor	0.8	2.0	1.2	−1.0	−1.1	0.6	−1.8	1.4	−2.0	−0.5	0.6	0.9	−1.1	−0.1	0.0	−0.6	−0.9	−1.3	0.1	0.3	0.4	20	52685136	52686057	4
ZDHHC4−Cor	1.5	1.2	1.4	−0.4	−0.1	−0.6	−0.6	1.6	−0.0	0.3	−0.5	−0.3	−0.3	−0.6	−0.5	−0.2	−0.6	0.1	−0.1	−1.1	−0.4	7	6488141	6489067	4
LOC100499399−Cor	1.2	1.1	0.7	0.2	2.0	−1.0	1.3	−0.2	0.8	0.2	0.5	0.4	0.1	−0.4	−1.2	−0.7	1.4	−0.9	0.4	−1.1	−1.0	3	52830434	52831344	4
EEF1A1P18−Cor	0.7	0.5	0.7	0.2	−0.3	−1.0	2.0	0.5	0.2	−0.9	−0.3	−0.2	−0.2	−0.7	−0.4	−0.7	−0.7	−1.7	0.5	−1.1	−0.7	11	61121362	61121566	4
LDHB−Cor	0.2	2.8	2.0	−0.8	1.7	1.6	−0.5	1.2	0.6	0.2	−0.5	0.5	1.1	0.2	−0.2	0.5	2.0	−0.7	−0.2	0.0	1.4	12	21584209	21584899	4
LOC390876−Cor	1.8	0.3	1.3	−0.2	1.2	−1.1	0.2	0.3	−1.0	−0.0	−0.1	−0.0	−0.2	−0.4	−0.8	−1.0	−0.3	−0.6	−0.4	−0.1	−0.3	19	2899459	2899970	4
EIF1AD−Ups	1.2	0.7	1.6	0.2	−0.1	−0.6	−1.1	0.7	0.9	−0.9	−0.2	−0.8	−0.7	−0.7	−0.9	−0.2	−0.5	−0.5	−1.1	−0.4	−1.7	11	62096897	62097097	4
CIC−Ups	1.1	0.7	0.1	0.2	−0.4	−0.7	−0.2	0.1	−0.7	−1.3	−1.3	−0.8	−1.6	−1.0	−1.0	−0.4	−0.0	−0.8	−0.6	−1.6	−0.5	19	39217568	39217950	4
PRPF31−Ups	0.3	1.9	0.4	−0.2	−0.1	−0.9	0.9	0.4	0.8	−0.4	−1.0	−0.3	−1.0	−0.2	−0.3	−0.6	0.6	−0.5	0.2	−1.2	−0.4	19	50933565	50934384	4
RPL6P24−Ups	1.9	1.4	1.1	−0.0	1.5	1.1	0.6	0.8	0.5	0.5	1.0	0.7	0.7	−0.0	−0.7	0.2	1.6	−0.2	1.3	0.0	0.3	10	13546540	13547420	4
ZNF776−Ups	1.4	1.1	0.9	0.8	0.1	−0.2	−1.9	0.3	0.4	0.1	−0.0	−0.8	0.5	−0.4	1.6	−0.2	1.1	−0.6	0.5	−0.0	0.3	19	54568813	54569509	4
ENO1P2−Cor	0.3	2.0	1.6	1.7	−0.9	0.3	1.4	1.5	1.1	−0.1	0.4	0.8	−0.6	−0.3	−0.7	−0.0	0.5	−0.0	1.3	−0.3	−0.5	15	69101719	69102633	4
LOC100506405−Cor	0.6	1.9	0.7	−0.9	0.0	−0.0	1.4	0.7	0.4	−0.4	0.3	1.0	0.0	−0.2	−0.1	−0.5	−0.8	−0.4	0.4	−0.3	0.4	2	11672665	11673585	4
SNRNP70−Ups	0.7	−0.0	0.7	0.8	1.6	−1.4	−0.1	−1.5	0.6	−0.2	0.1	0.1	−2.8	−0.7	0.5	−0.8	1.4	−0.9	0.1	−1.2	−1.4	19	45963722	45964428	4
LSS−Cor	1.1	2.7	0.5	−0.8	−1.4	−0.9	1.3	−0.4	1.8	0.7	0.1	1.4	−0.6	0.1	2.2	−0.1	−1.3	−0.2	0.5	0.3	0.3	21	33030583	33031179	4
ZNFX1−Cor	0.8	0.3	2.1	0.2	−0.4	0.1	−0.1	−0.5	−0.6	−0.3	−0.1	−0.2	0.1	−0.6	−0.9	−0.1	−0.1	−0.4	−0.0	−0.2	−0.4	20	44643121	44643417	4
PLIN5−Cor	−0.1	0.7	0.6	−0.1	0.6	1.1	0.5	−0.9	0.6	0.3	−0.4	−0.2	0.0	−0.9	0.2	−1.4	−0.4	−0.8	2.0	−0.7	−1.0	19	4296600	4297008	4
HMGN2P4−Ups	1.2	0.7	2.0	1.9	1.2	0.4	−0.1	1.7	0.2	−1.1	−0.2	−0.5	−0.0	0.3	−0.3	0.1	0.5	−0.1	1.1	−0.5	1.2	5	70746443	70747334	4
RPL6P24−Cor	1.1	1.1	1.5	1.2	1.0	0.9	0.6	1.0	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	−0.1	−0.8	2.8	1.0	−1.0	1.3	−0.4	0.1	10	13545734	13546442	4
MIR526A2−Cor	2.1	1.2	2.7	1.2	1.4	2.1	2.0	1.7	1.5	−0.0	1.2	2.2	−0.5	−0.9	−1.6	3.0	2.2	3.2	2.7	0.0	1.1	19	50549228	50550218	4
LMLN−Cor	0.1	0.9	1.2	0.3	0.7	1.1	2.2	0.2	1.5	0.1	1.1	−0.4	−0.1	−1.2	−0.7	2.1	0.9	2.7	2.4	−2.0	0.0	3	194989538	194990036	4
MMD2−Ups	0.1	0.1	1.0	−1.3	−1.2	−0.3	−1.5	−0.4	0.7	−0.4	−0.7	0.1	−2.4	−3.3	−0.4	3.0	0.2	1.9	−0.4	−1.5	−1.1	7	4915028	4915506	4
KCTD11−Ups	0.5	−0.2	1.7	0.0	1.5	1.1	0.6	0.8	1.0	−0.9	0.7	1.3	0.3	−1.6	−0.0	1.7	−0.4	2.4	1.1	−0.4	−0.8	17	7147766	7148152	4
USHBP1−Cor	1.2	0.9	2.4	1.3	0.1	2.7	1.4	1.1	0.1	0.1	0.9	0.3	0.4	0.3	0.1	2.7	0.9	2.7	2.6	−0.0	−0.1	19	16942166	16942956	4
C6orf70−Cor	3.0	1.8	0.1	1.8	1.4	0.8	1.8	0.8	0.5	0.1	−0.2	1.0	−1.4	−2.3	−0.3	0.7	0.3	−1.1	0.4	0.0	2.7	6	167571449	167571957	3
MIR4457−Cor	1.1	0.3	0.5	0.3	−0.7	0.7	−0.3	−0.1	1.8	−0.8	−0.2	−2.0	−2.2	−4.1	−4.1	0.2	−0.2	−1.1	1.1	−0.9	−2.0	5	1289350	1290280	3
SUGP1−Cor	0.8	2.0	1.4	1.1	0.2	2.2	0.8	−0.3	−0.2	−1.1	0.4	0.1	−0.8	−2.2	−0.0	1.3	−0.3	−1.1	0.2	−0.5	0.6	19	18994133	18994751	3
MIR4457−Ups	1.0	0.3	0.4	0.1	−0.8	0.8	−0.3	−0.0	1.8	−1.1	−0.5	−2.0	−1.5	−3.8	−4.1	0.1	−0.2	−1.2	1.1	−0.9	−2.2	5	1290524	1291248	3
RPS2P48−Cor	1.1	2.1	1.6	0.1	−0.4	1.9	0.9	0.6	0.5	−1.0	−0.8	−1.2	1.1	−2.5	1.8	1.4	2.6	0.5	1.8	−0.6	1.0	17	47211306	47211634	3
OR11N1P−Ups	1.9	1.0	0.2	−0.3	0.8	0.9	1.2	1.3	0.1	0.5	0.5	−2.2	−0.0	−1.0	−1.1	2.0	0.8	−3.2	0.2	−0.0	−0.3	X	119866648	119866830	3
MT1P1−Ups	1.8	1.4	1.2	0.9	1.2	−0.0	0.0	0.3	0.1	−1.1	−0.8	−0.3	−1.2	−1.7	0.1	0.8	0.8	0.2	0.6	−1.3	−0.7	9	67785588	67786508	3
BAIAP3−Ups	0.8	1.4	−0.1	0.2	0.3	−0.0	−0.8	−0.3	−1.5	−3.1	−1.2	−1.2	−1.4	−2.2	1.1	−0.2	0.0	−0.8	−0.6	−2.0	−1.0	16	1310339	1310817	3
PROCR−Ups	−1.0	2.2	0.9	0.3	−2.1	−0.2	1.5	−0.6	0.7	−0.5	−1.1	0.6	−1.3	1.7	−1.9	−2.0	−1.3	−0.6	−2.1	−2.5	−0.7	20	30536809	30537017	3
DENND5A−Cor	2.3	2.2	1.2	1.9	0.6	2.0	−0.1	0.5	1.4	−1.0	0.4	−1.8	0.1	0.2	−2.5	−0.6	1.0	2.3	2.0	−0.7	−0.1	11	8959164	8960084	3
MEN1−Ups	2.1	1.7	1.7	1.4	1.1	1.5	−0.0	1.3	0.9	0.5	−1.6	1.1	−0.3	0.5	0.6	1.4	0.8	−1.1	0.2	−0.6	0.7	11	60932734	60933175	3
OR1E1−Ups	1.4	0.9	1.8	0.9	−0.8	0.4	1.8	0.6	1.1	−0.8	−0.5	−0.9	−0.2	−0.8	−1.1	1.0	0.3	−0.5	0.5	−1.2	0.2	17	3194792	3195696	3
ADAMTS15−Cor	0.4	0.8	1.6	−1.0	0.5	1.7	−1.0	−0.6	−0.4	−1.1	0.9	−0.8	0.3	−1.4	−1.5	−1.4	−0.5	0.6	−1.7	−0.9	−0.2	11	126272682	126273668	3
IZUMO2−Ups	1.2	1.4	2.0	0.4	1.1	1.6	−0.2	0.5	0.3	0.7	0.9	1.0	1.0	−2.0	0.3	1.6	1.8	0.2	1.0	−0.1	−0.1	19	47006200	47007120	3
ANKRD16−Cor	2.2	1.7	2.1	1.6	2.3	0.9	1.0	1.2	0.6	0.7	0.8	0.7	0.3	−1.7	2.8	1.6	2.2	0.9	2.7	0.2	1.1	10	5858679	5858957	3
MYH9−Cor	3.2	0.5	0.8	0.8	0.1	−0.1	−0.5	−0.2	−0.9	−1.6	−0.2	−0.6	−0.3	−1.0	−0.9	0.2	−0.5	1.3	−1.4	−1.1	0.3	22	19751743	19752031	3
ALOX15P1−Cor	0.1	2.7	1.7	−2.6	3.0	−2.0	−1.2	0.7	1.0	0.9	1.0	−0.8	−0.1	−0.5	0.1	1.3	−1.3	−1.3	0.6	0.0	0.0	17	6456838	6457014	3
ARSH−Cor	2.6	0.6	1.8	1.4	0.5	−0.6	−0.4	0.2	−0.4	−0.5	−0.2	−2.1	−0.8	−0.2	−1.2	1.2	0.5	0.2	2.5	−1.3	−1.2	X	866692	866890	3
KLK8−Ups	1.3	0.8	1.7	−0.4	0.9	0.8	0.4	0.7	0.1	−0.6	−0.0	0.2	0.0	−0.7	0.3	1.0	1.3	−0.7	0.8	−0.9	0.3	19	47838444	47839156	3
CXorf51A−Cor	0.4	0.7	2.3	−0.9	1.5	1.3	−0.9	1.0	1.3	−1.1	0.3	0.3	−1.2	−1.3	1.0	1.9	0.4	−1.1	0.2	−0.5	0.5	X	134860262	134861162	3
RPL23AP5−Ups	2.2	0.9	−0.0	−0.2	−0.3	0.4	1.6	0.5	0.0	−0.3	0.1	−0.7	−0.6	−0.4	−1.4	−1.4	−1.5	0.3	−0.1	−1.4	−0.3	16	354220	354398	3
HIGD1AP12−Cor	2.2	2.5	0.8	1.0	2.3	1.6	1.7	1.4	−0.1	−0.4	−0.5	0.4	−0.2	−0.1	−0.7	1.1	2.3	0.1	1.3	−0.7	−0.1	1	109793894	109794792	3
GRIFIN−Ups	2.4	0.9	2.8	0.8	2.1	−0.1	1.0	0.1	1.8	0.5	−0.4	−0.8	−0.2	0.8	−0.0	1.6	1.8	−0.3	1.7	−0.4	−2.8	7	2435830	2436228	3
NAPSA−Cor	0.9	1.1	2.0	0.1	1.0	0.3	0.6	0.1	−1.0	−0.6	−0.6	−0.4	−0.5	−1.0	−1.0	0.5	0.5	−0.4	−0.1	−0.8	−0.9	19	47207379	47207557	3
ILVBL−Ups	3.3	1.5	1.6	0.3	0.7	0.3	0.7	0.8	0.5	0.6	0.4	0.7	0.5	−0.1	−0.0	0.7	1.6	1.3	1.5	−0.4	−0.2	19	14804912	14805882	3
RPL5P31−Ups	1.1	0.9	0.8	0.4	0.9	−0.5	1.1	0.9	0.9	−0.0	0.2	−1.2	−0.3	−0.7	−1.1	−0.4	0.3	0.1	0.2	−2.1	−1.0	13	32526781	32527087	3
ZFP2−Cor	1.7	1.1	1.9	1.3	1.5	1.0	−0.4	2.0	−0.0	0.4	0.2	0.6	0.3	−0.8	−0.1	0.4	1.1	1.1	2.1	−0.9	0.6	5	173048997	173049909	3
KIR2DP1−Ups	1.6	1.1	2.1	1.3	1.7	0.3	−0.2	2.1	−0.5	−0.3	0.3	0.4	0.1	−0.6	−0.0	1.1	0.8	−0.1	0.9	−0.5	0.6	19	51588633	51589604	3
TRNAC11−Cor	1.1	1.4	1.4	1.1	0.2	0.7	−0.4	1.2	−1.9	−0.6	−0.5	−0.1	−1.3	−1.0	0.9	0.7	−1.4	−0.3	0.2	−0.8	−0.6	7	143319513	143320493	3
FAM131C−Cor	1.0	1.5	1.0	−0.7	0.5	0.2	1.2	1.5	1.1	0.9	−0.9	0.7	1.2	−0.2	0.1	−1.7	−1.5	−0.6	−0.0	0.3	0.2	1	14918029	14918919	3
RPS12P29−Ups	1.1	0.1	−0.2	0.0	−0.6	−0.5	−0.2	0.5	−3.9	−0.5	−0.3	−0.4	−0.2	−2.3	−0.8	−0.4	−0.4	−2.0	−0.3	−0.7	−0.6	17	4498313	4498815	3
ZWINT−Cor	0.9	2.9	1.0	2.0	0.6	0.9	2.0	0.7	1.1	0.9	0.6	0.7	−0.7	−0.4	−0.3	−0.5	1.8	1.8	2.8	−0.1	0.9	10	52103537	52104239	3
SYF2−Cor	2.0	1.7	1.1	2.1	1.3	0.5	0.9	1.0	−0.5	−0.7	−0.6	−0.6	−0.2	−0.4	−0.6	0.5	1.5	1.0	1.2	−1.0	1.5	1	23812648	23813556	3
OR1R1P−Cor	0.7	0.6	1.5	−0.1	1.9	0.3	1.6	0.7	1.5	−0.5	−0.8	−1.0	−0.1	−0.4	−0.5	1.2	0.0	−1.0	−0.4	−1.5	−1.0	17	3181126	3182032	3
MATK−Cor	0.7	1.8	2.7	1.0	0.5	−1.0	0.2	0.7	−0.1	0.3	0.2	0.2	−0.0	−0.8	−0.3	2.0	1.1	0.4	0.6	−0.1	−0.3	19	3566121	3566921	3

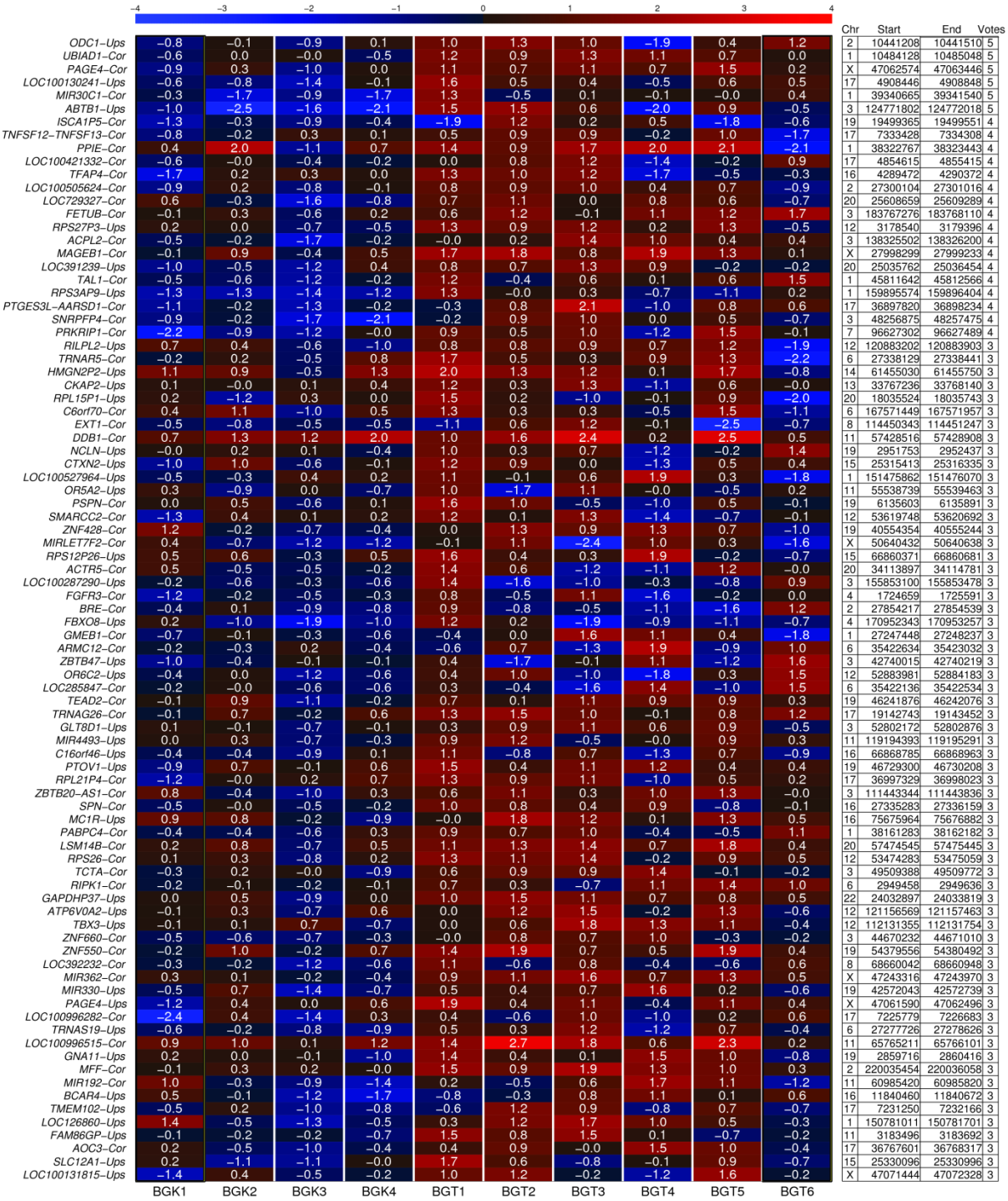


Chr	Start	End	Votes
19	34661476	34662316	3
12	8548146	8548708	3
6	36730527	36731405	3
20	54823899	54824789	3
1	1601107	1601407	3
16	5087525	5088283	3
X	134861262	134862070	3
19	54310146	54310884	3
1	45471936	45472758	3
17	34089378	34090155	3
2	60985856	60986152	3
2	220178289	220179113	3
20	45949593	45950195	3
7	100864358	100865126	3
12	50568221	50568405	3
7	931566	932142	3
X	47245258	47245798	3
1	43421471	43422369	3
9	39603829	39604327	3
10	30645605	30646255	3
19	50137831	50138295	3
19	690557	691057	3
12	52694371	52695333	3
19	15594731	15595310	3
7	116162381	116163283	3
8	6563981	6564882	3
16	31436714	31436928	3
17	38185268	38186242	3
16	58078804	58079097	3
17	43976564	43977490	3
19	54104274	54104626	3
19	54881180	54882096	3
17	1085965	1086565	3
19	45998174	45998674	3
16	69983991	69984891	3
7	6395409	6396084	3
1	173022311	173023136	3
21	32201314	32202226	3
19	17626111	17626809	3
3	185276230	185276730	3
17	73633988	73634190	3
19	51309072	51309668	3
11	66308887	66309479	3
19	44959251	44960159	3
8	6844049	6844960	3
7	4928313	4929147	3
17	75051893	75052105	3
20	57759859	57760760	3
9	34133564	34134442	3
7	2360684	2361649	3
17	41277878	41278398	3
12	52827394	52828318	3
2	207132119	207132705	3
1	201367470	201368379	3
11	1708834	1709724	3
19	8028333	8028743	3
8	22842801	22843609	3
16	69984977	69985875	3
16	2839445	2840126	3
12	9360787	9361709	3
1	38255880	38256674	3
2	85794044	85794346	3
19	51619044	51619568	3
15	22517199	22518008	3
6	26254809	26255403	3
2	10441598	10441892	3
10	30638134	30638981	3
12	49759409	49760239	3
1	22001299	22002205	3
19	14119897	14120129	3
13	79237619	79238228	3
17	40274997	40275399	3

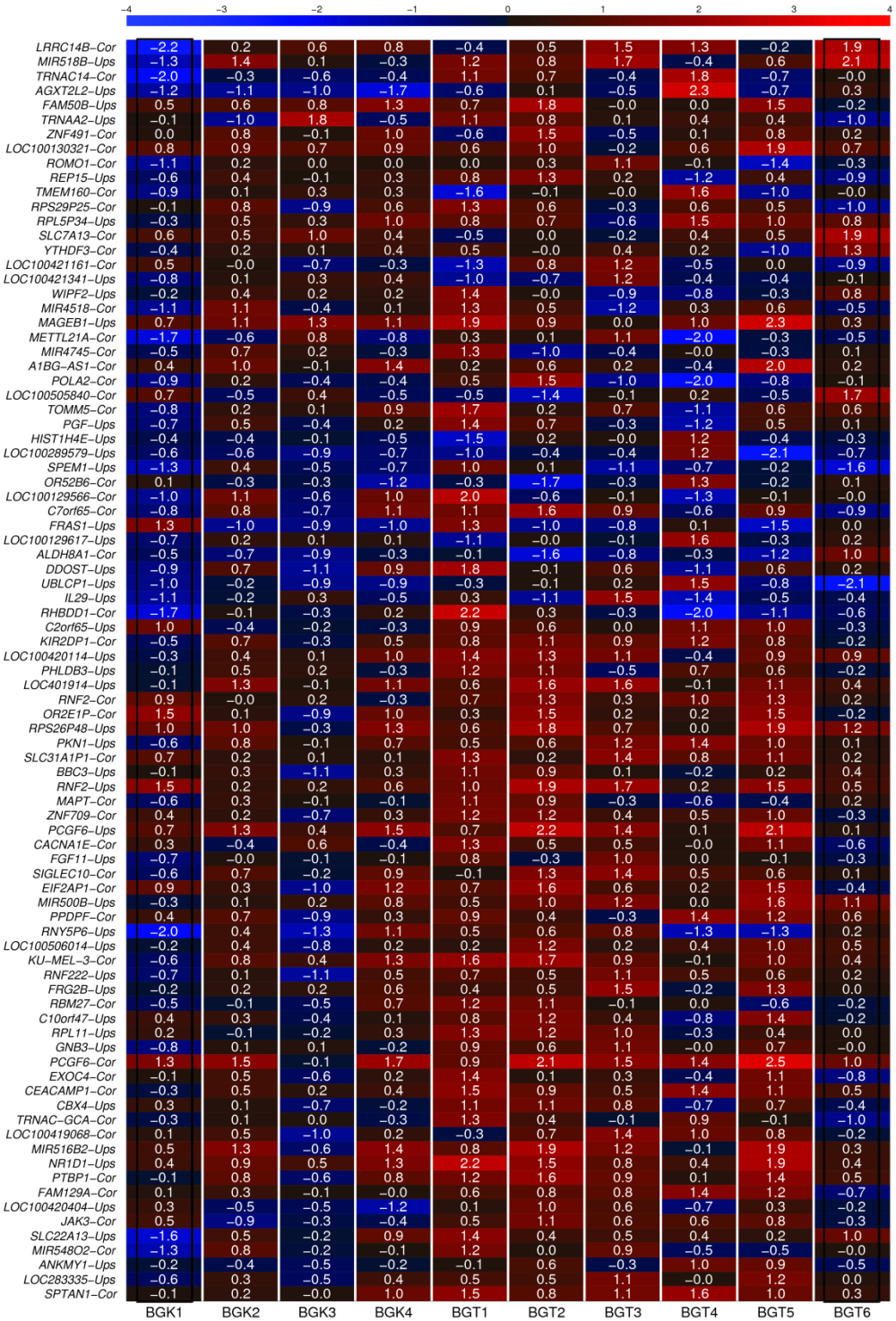


Chr	Start	End	Votes
1	40625651	40626089	3
11	1645175	1646052	3
19	6354237	6354525	3
11	4715974	4716174	3
19	46241876	46242076	3
20	48334675	48335483	3
19	14785655	14786481	3
17	5028704	5029647	3
11	17249585	17250215	3
2	73346942	73347392	3
17	2308807	2309608	3
1	10483106	10484030	3
6	47846148	47846946	3
X	85396725	85397322	3
4	976070	976970	3
2	100766415	100766938	3
2	85662090	85662483	3
19	45901223	45901421	3
19	8814345	8815145	3
17	7127277	7128165	3
9	33403519	33404403	3
10	1506193	1506799	3
1	26497960	26498656	3
20	58881956	58882566	3
17	29890722	29891130	3
19	55044557	55045533	3
6	130541627	130542486	3
16	68413207	68414107	3
19	12816896	12817712	3
16	31221972	31222946	3
19	17145249	17145467	3
16	2065588	2066086	3
6	27100083	27100989	3
11	56191700	56192308	3
1	18691640	18692242	3
19	1264081	1264419	3
X	135232780	135233560	3
11	125890407	125890809	3
7	6747796	6748076	3
2	220355736	220356724	3
19	31633282	31634203	3
19	2160543	2161450	3
19	39699091	39699990	3
20	40254790	40255102	3
11	68788461	68788847	3
16	732423	733409	3
17	39585860	39586469	3
19	1168929	1169109	3
15	33358419	33359315	3
15	25304150	25305048	3
19	19317425	19318317	3
17	1629149	1629561	3
19	114808	115648	3
16	2315214	2316152	3
19	38818443	38819043	3
15	22518128	22518829	3
19	14958938	14959638	3
12	6400359	6400757	3
12	3839217	3840111	3
5	696539	697461	3
17	8158543	8159343	3
19	5337815	5338539	3
19	45873633	45874235	3
16	27335283	27336159	3
3	51970909	51971799	3
19	54880183	54881074	3
12	110504502	110505298	3
6	26159388	26160006	3
16	2305240	2306140	3
12	117773477	117774303	3
19	52599791	52600555	3

Abb. 7 Heat Map der hypermethylierten Cor- und Ups Promotorregionen der Gewebe-Kohorte 2 (261 Gen-Loci).

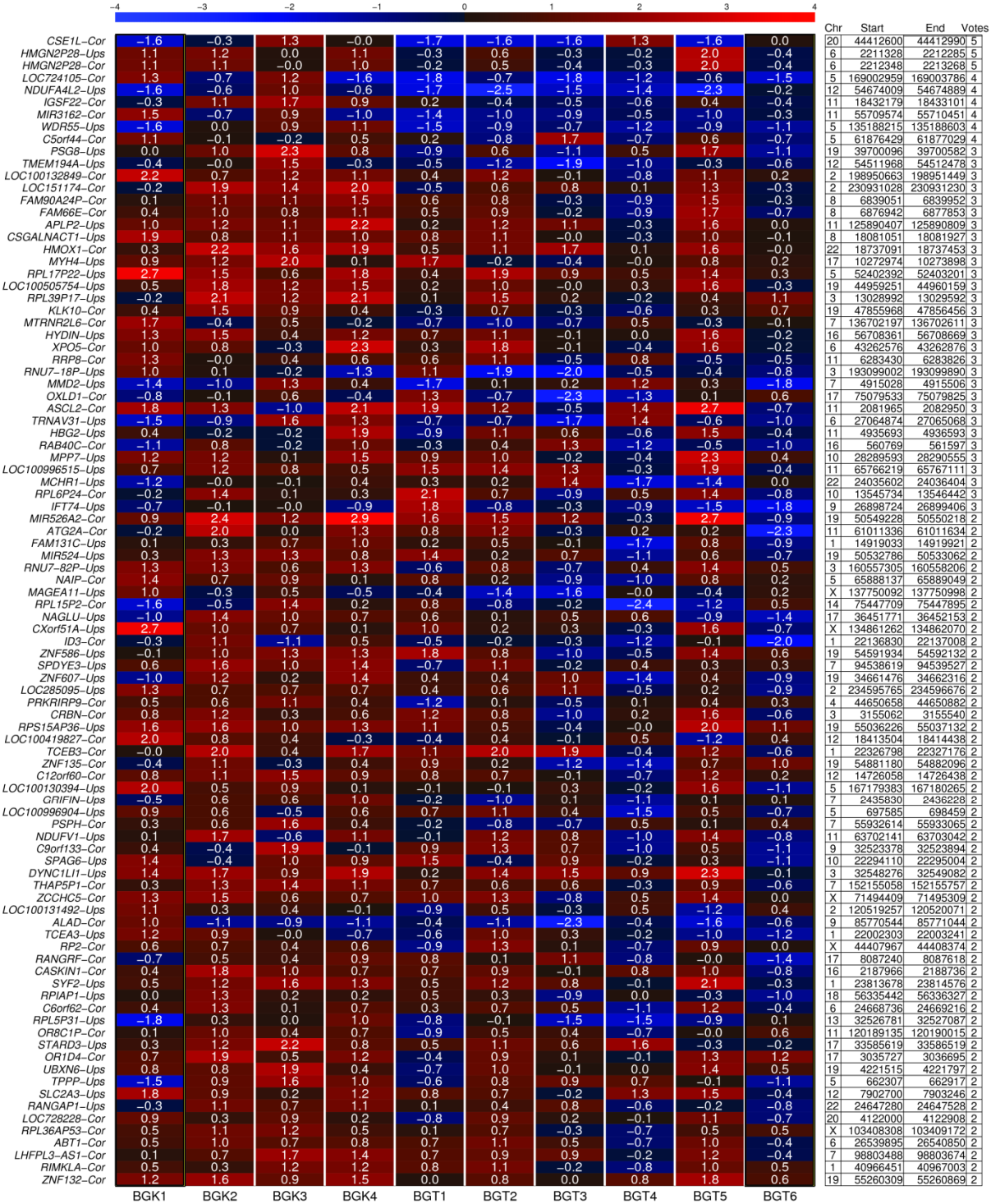


	BGK1	BGK2	BGK3	BGK4	BGT1	BGT2	BGT3	BGT4	BGT5	BGT6	Chr	Start	End	Votes
ODC1–Ups	−0.8	−0.1	−0.9	0.1	1.0	1.3	1.0	−1.9	0.4	1.2	2	10441208	10441510	5
UBIAD1–Cor	−0.6	0.0	−0.0	−0.5	1.2	0.9	1.3	1.1	0.7	0.0	1	10484128	10485048	5
PAGE4–Cor	−0.9	0.3	−1.0	0.0	1.1	0.7	1.1	0.7	1.5	0.2	X	47062574	47063446	5
LOC100130241–Ups	−0.6	−0.8	−1.4	−0.1	1.6	0.5	0.4	−0.5	0.6	0.5	17	4908446	4908848	5
MIR30C1–Cor	−0.3	−1.7	−0.9	−1.7	1.3	−0.5	0.1	−0.1	−0.0	0.4	1	39340665	39341540	5
ABTB1–Ups	−1.0	−2.5	−1.6	−2.1	1.5	1.5	0.6	−2.0	0.9	−0.5	3	124771802	124772018	5
ISCA1P5–Cor	−1.3	−0.3	−0.9	−0.4	−1.9	1.2	0.2	0.5	−1.8	−0.6	19	19499365	19499551	4
TNFSF12–TNFSF13–Cor	−0.8	−0.2	0.3	0.1	0.5	0.9	0.9	−0.2	1.0	−1.7	17	7333428	7334308	4
PPIE–Cor	0.4	2.0	−1.1	0.7	1.4	0.9	1.7	2.0	2.1	−2.1	1	38322767	38323443	4
LOC100421332–Cor	−0.6	−0.0	−0.4	−0.2	0.0	0.8	1.2	−1.4	−0.2	0.9	17	4854615	4855415	4
TFAP4–Cor	−1.7	0.2	0.3	0.0	1.3	1.0	1.2	−1.7	−0.5	−0.3	16	4289472	4290372	4
LOC100505624–Cor	−0.9	0.2	−0.8	−0.1	0.8	0.9	1.0	0.4	0.7	−0.9	2	27300104	27301016	4
LOC729327–Cor	0.6	−0.3	−1.6	−0.8	0.7	1.1	0.0	0.8	0.6	−0.7	20	25608659	25609289	4
FETUB–Cor	−0.1	0.3	−0.6	0.2	0.6	1.2	−0.1	1.1	1.2	1.7	3	183767276	183768110	4
RPS27P3–Ups	0.2	0.0	−0.7	−0.5	1.3	0.9	1.2	0.2	1.3	−0.5	12	3178540	3179396	4
ACPL2–Cor	−0.5	−0.2	−1.7	−0.2	−0.0	0.2	1.4	1.0	0.4	0.4	3	138325502	138326200	4
MAGEB1–Cor	−0.1	0.9	−0.4	0.5	1.7	1.8	0.8	1.9	1.3	0.1	X	27998299	27999233	4
LOC391239–Ups	−1.0	−0.5	−1.2	0.4	0.8	0.7	1.3	0.9	−0.2	−0.2	20	25035762	25036454	4
TAL1–Cor	−0.5	−0.6	−1.2	−0.2	1.2	−0.4	0.6	0.1	0.6	1.5	1	45811642	45812566	4
RPS3AP9–Ups	−1.3	−1.3	−1.4	−1.2	1.3	−0.0	0.3	−0.7	−1.1	0.2	1	159895574	159896404	4
PTGES3L–AARSD1–Cor	−1.1	−0.2	−1.3	−0.2	−0.3	0.8	2.1	−1.0	0.8	0.6	17	36897820	36898234	4
SNRPFP4–Cor	−0.9	−0.2	−1.7	−2.1	−0.2	0.9	1.0	0.0	0.5	−0.7	3	48256875	48257475	4
PRKRIP1–Cor	−2.2	−0.9	−1.2	−0.0	0.9	0.5	1.0	−1.2	1.5	−0.1	7	96627302	96627489	4
RILPL2–Ups	0.7	0.4	−0.6	−1.0	0.8	0.8	0.9	0.7	1.2	−1.9	12	120883202	120883903	3
TRNAR5–Cor	−0.2	0.2	−0.5	0.8	1.7	0.5	0.3	0.9	1.3	−2.2	6	27338129	27338441	3
HMGN2P2–Ups	1.1	0.9	−0.5	1.3	2.0	1.3	1.2	0.1	1.7	−0.8	14	61455030	61455750	3
CKAP2–Ups	0.1	−0.0	0.1	0.4	1.2	0.3	1.3	−1.1	0.6	−0.0	13	33767236	33768140	3
RPL15P1–Ups	0.2	−1.2	0.3	0.0	1.5	0.2	−1.0	−0.1	0.9	−2.0	20	18035524	18035743	3
C6orf70–Cor	0.4	1.1	−1.0	0.5	1.3	0.3	0.3	−0.5	1.5	−1.1	6	167571449	167571957	3
EXT1–Cor	−0.5	−0.8	−0.5	−0.5	−1.1	0.6	1.2	−0.1	−2.5	−0.7	8	114450343	114451247	3
DDB1–Cor	0.7	1.3	1.2	2.0	1.0	1.6	2.4	0.2	2.5	0.5	11	57428516	57428908	3
NCLN–Ups	−0.0	0.2	0.1	−0.4	1.0	0.3	0.7	−1.2	−0.2	1.4	19	2951753	2952437	3
CTXN2–Ups	−1.0	1.0	−0.6	−0.1	1.2	0.9	0.0	−1.3	0.5	0.4	15	25315413	25316335	3
LOC100527964–Ups	−0.5	−0.3	0.4	0.2	1.1	−0.1	0.6	1.9	0.3	−1.8	1	151475862	151476070	3
OR5A2–Ups	0.3	−0.9	0.0	−0.7	1.0	−1.7	1.1	−0.0	−0.5	0.2	11	55538739	55539463	3
PSPN–Cor	0.0	0.5	−0.6	0.1	1.6	1.0	−0.5	−1.0	0.5	−0.1	19	6135603	6135891	3
SMARCC2–Cor	−1.3	0.4	0.1	0.2	1.2	0.1	1.3	−1.4	−0.7	−0.1	12	53619748	53620692	3
ZNF428–Cor	1.2	−0.2	−0.7	−0.4	0.0	1.3	0.9	1.3	0.7	−1.0	19	40554354	40555244	3
MIRLET7F2–Cor	0.4	−0.7	−1.2	−1.2	−0.1	1.1	−2.4	1.0	0.3	−1.6	X	50640432	50640638	3
RPS12P26–Ups	0.5	0.6	−0.3	0.5	1.6	0.4	0.3	1.9	−0.2	−0.7	15	66860371	66860681	3
ACTR5–Cor	0.5	−0.5	−0.5	−0.2	1.4	0.6	−1.2	−1.1	1.2	−0.0	20	34113897	34114781	3
LOC100287290–Ups	−0.2	−0.6	−0.3	−0.6	1.4	−1.6	−1.0	−0.3	−0.8	0.9	3	155853100	155853478	3
FGFR3–Cor	−1.2	−0.2	−0.5	−0.3	0.8	−0.5	1.1	−1.6	−0.2	0.0	4	1724659	1725591	3
BRE–Cor	−0.4	0.1	−0.9	−0.8	0.9	−0.8	−0.5	−1.1	−1.6	1.2	2	27854217	27854539	3
FBXO8–Ups	0.2	−1.0	−1.9	−1.0	1.2	0.2	−1.9	−0.9	−1.1	−0.7	4	170952343	170953257	3
GMEB1–Cor	−0.7	−0.1	−0.3	−0.6	−0.4	0.0	1.6	1.1	0.4	−1.8	1	27247448	27248237	3
ARMC12–Cor	−0.2	−0.3	0.2	−0.4	−0.6	0.7	−1.3	1.9	−0.9	1.0	6	35422634	35423032	3
ZBTB47–Ups	−1.0	−0.4	−0.1	−0.1	0.4	−1.7	−0.1	1.1	−1.2	1.6	3	42740015	42740219	3
OR6C2–Ups	−0.4	0.0	−1.2	−0.6	0.4	1.0	−1.0	−1.8	0.3	1.5	12	52883981	52884183	3
LOC285847–Cor	−0.2	−0.0	−0.6	−0.6	0.3	−0.4	−1.6	1.4	−1.0	1.5	6	35422136	35422534	3
TEAD2–Cor	−0.1	0.9	−1.1	−0.2	0.7	0.1	1.1	0.9	0.9	0.3	19	46241876	46242076	3
TRNAG26–Cor	−0.1	0.7	−0.2	0.6	1.3	1.5	1.0	−0.1	0.8	1.2	17	19142743	19143452	3
GLT8D1–Ups	0.1	−0.1	−0.7	−0.1	0.3	0.9	1.1	0.6	0.9	−0.5	3	52802172	52802876	3
MIR4493–Ups	0.0	0.3	−0.7	−0.3	0.9	1.2	−0.5	−0.0	0.9	0.3	11	119194393	119195291	3
C16orf46–Ups	−0.4	−0.4	−0.9	0.1	1.1	−0.8	0.7	−1.3	0.7	−0.9	16	66868785	66868963	3
PTOV1–Ups	−0.9	0.7	−0.1	0.6	1.5	0.4	1.1	1.2	0.4	0.4	19	46729300	46730208	3
RPL21P4–Cor	−1.2	−0.0	0.2	0.7	1.3	0.9	1.1	−1.0	0.5	0.2	17	36997329	36998023	3
ZBTB20–AS1–Cor	0.8	−0.4	−1.0	0.3	0.6	1.1	0.3	1.0	1.3	−0.0	3	111443344	111443836	3
SPN–Cor	−0.5	−0.0	−0.5	−0.2	1.0	0.8	0.4	0.9	−0.8	−0.1	16	27335283	27336159	3
MC1R–Ups	0.9	0.8	−0.2	−0.9	−0.0	1.8	1.2	0.1	1.3	0.5	16	75675964	75676882	3
PABPC4–Cor	−0.4	−0.4	−0.6	0.3	0.9	0.7	1.0	−0.4	−0.5	1.1	1	38161283	38162182	3
LSM14B–Cor	0.2	0.8	−0.7	0.5	1.1	1.3	1.4	0.7	1.8	0.4	20	57474545	57475445	3
RPS26–Cor	0.1	0.3	−0.8	0.2	1.3	1.1	1.4	−0.2	0.9	0.5	12	53474283	53475059	3
TCTA–Cor	−0.3	0.2	−0.0	−0.9	0.6	0.9	0.9	1.4	−0.1	−0.2	3	49509388	49509772	3
RIPK1–Cor	−0.2	−0.1	−0.2	−0.1	0.7	0.3	−0.7	1.1	1.4	1.0	6	2949458	2949636	3
GAPDHP37–Ups	0.0	0.5	−0.9	0.0	1.0	1.5	1.1	0.7	0.8	0.5	22	24032897	24033819	3
ATP6V0A2–Ups	−0.1	0.3	−0.7	0.6	0.0	1.2	1.5	−0.2	1.3	−0.6	12	121156569	121157463	3
TBX3–Ups	−0.1	0.1	0.7	−0.7	0.0	0.6	1.8	1.3	1.1	−0.4	12	112131355	112131754	3
ZNF660–Cor	−0.5	−0.6	−0.7	−0.3	−0.0	0.8	0.7	1.0	−0.3	−0.2	3	44670232	44671010	3
ZNF550–Cor	−0.2	1.0	−0.2	0.7	1.4	1.9	0.7	0.5	1.9	0.4	19	54379556	54380492	3
LOC392232–Cor	−0.3	−0.2	−1.2	−0.6	1.1	−0.6	0.8	−0.4	−0.6	0.6	8	68660042	68660948	3
MIR362–Cor	0.3	0.1	−0.2	−0.4	0.9	1.1	1.6	0.7	1.3	0.5	X	47243316	47243970	3
MIR330–Ups	−0.5	0.7	−1.4	−0.7	0.5	0.4	0.7	1.6	0.2	−0.6	19	42572043	42572739	3
PAGE4–Ups	−1.2	0.4	0.0	0.6	1.9	0.4	1.1	−0.4	1.1	0.4	X	47061590	47062496	3
LOC100996282–Cor	−2.4	0.4	−1.4	0.3	0.4	−0.6	1.0	−1.0	0.2	0.6	17	7225779	7226683	3
TRNAS19–Ups	−0.6	−0.2	−0.8	−0.9	0.5	0.3	1.2	−1.2	0.7	−0.4	6	27277726	27278626	3
LOC100996515–Cor	0.9	1.0	0.1	1.2	1.4	2.7	1.8	0.6	2.3	0.2	11	65765211	65766101	3
GNA11–Ups	0.2	0.0	−0.1	−1.0	1.4	0.4	0.1	1.5	1.0	−0.8	19	2859716	2860416	3
MFF–Cor	−0.1	0.3	0.2	−0.0	1.5	0.9	1.9	1.3	1.0	0.3	2	220035454	220036058	3
MIR192–Cor	1.0	−0.3	−0.9	−1.4	0.2	−0.5	0.6	1.7	1.1	−1.2	11	60985420	60985820	3
BCAR4–Ups	0.5	−0.1	−1.2	−1.7	−0.8	−0.3	0.8	1.1	0.1	0.6	16	11840460	11840672	3
TMEM102–Ups	−0.5	0.2	−1.0	−0.8	−0.6	1.2	0.9	−0.8	0.7	−0.7	17	7231250	7232166	3
LOC126860–Ups	1.4	−0.5	−1.3	−0.5	0.3	1.2	1.7	1.0	0.5	−0.3	1	150781011	150781701	3
FAM86GP–Ups	−0.1	−0.2	−0.2	−0.7	1.5	0.8	1.5	0.1	−0.7	−0.2	11	3183496	3183692	3
AOC3–Cor	0.2	−0.5	−1.0	−0.4	0.4	0.9	−0.0	1.5	1.0	−0.4	17	36767601	36768317	3
SLC12A1–Ups	0.2	−1.1	−1.1	−0.0	1.7	0.6	−0.8	−0.1	0.9	−0.7	15	25330096	25330996	3
LOC100131815–Ups	−1.4	0.4	−0.5	−0.2	1.0	1.2	−0.2	−1.2	1.6	−0.2	X	47071444	47072328	3


−4 −3 −2 −1 0 1 2 3 4
LRRC14B–Cor −2.2 0.2 0.6 0.8 −0.4 0.5 1.5 1.3 −0.2 1.9
MIR518B–Ups −1.3 1.4 0.1 −0.3 1.2 0.8 1.7 −0.4 0.6 2.1
TRNAC14–Cor −2.0 −0.3 −0.6 −0.4 1.1 0.7 −0.4 1.8 −0.7 −0.0
AGXT2L2–Ups −1.2 −1.1 −1.0 −1.7 −0.6 0.1 −0.5 2.3 −0.7 0.3
FAM50B–Ups 0.5 0.6 0.8 1.3 0.7 1.8 −0.0 0.0 1.5 −0.2
TRNAA2–Ups −0.1 −1.0 1.8 −0.5 1.1 0.8 0.1 0.4 0.4 −1.0
ZNF491–Cor 0.0 0.8 −0.1 1.0 −0.6 1.5 −0.5 0.1 0.8 0.2
LOC100130321–Cor 0.8 0.9 0.7 0.9 0.6 1.0 −0.2 0.6 1.9 0.7
ROMO1–Cor −1.1 0.2 0.0 0.0 0.0 0.3 1.1 −0.1 −1.4 −0.3
REP15–Ups −0.6 0.4 −0.1 0.3 0.8 1.3 0.2 −1.2 0.4 −0.9
TMEM160–Cor −0.9 0.1 0.3 0.3 −1.6 −0.1 −0.0 1.6 −1.0 −0.0
RPS29P25–Cor −0.1 0.8 −0.9 0.6 1.3 0.6 −0.3 0.6 0.5 −1.0
RPL5P34–Ups −0.3 0.5 0.3 1.0 0.8 0.7 −0.6 1.5 1.0 0.8
SLC7A13–Cor 0.6 0.5 1.0 0.4 −0.5 0.0 −0.2 0.4 0.5 1.9
YTHDF3–Cor −0.4 0.2 0.1 0.4 0.5 −0.0 0.4 0.2 −1.0 1.3
LOC100421161–Cor 0.5 −0.0 −0.7 −0.3 −1.3 0.8 1.2 −0.5 0.0 −0.9
LOC100421341–Ups −0.8 0.1 0.3 0.4 −1.0 −0.7 1.2 −0.4 −0.4 −0.1
WIPF2–Ups −0.2 0.4 0.2 0.2 1.4 −0.0 −0.9 −0.8 −0.3 0.8
MIR4518–Cor −1.1 1.1 −0.4 0.1 1.3 0.5 −1.2 0.3 0.6 −0.5
MAGEB1–Ups 0.7 1.1 1.3 1.1 1.9 0.9 0.0 1.0 2.3 0.3
METTL21A–Cor −1.7 −0.6 0.8 −0.8 0.3 0.1 1.1 −2.0 −0.3 −0.5
MIR4745–Cor −0.5 0.7 0.2 −0.3 1.3 −1.0 −0.4 −0.0 −0.3 0.1
A1BG–AS1–Cor 0.4 1.0 −0.1 1.4 0.2 0.6 0.2 −0.4 2.0 0.2
POLA2–Cor −0.9 0.2 −0.4 −0.4 0.5 1.5 −1.0 −2.0 −0.8 −0.1
LOC100505840–Cor 0.7 −0.5 0.4 −0.5 −0.5 −1.4 −0.1 0.2 −0.5 1.7
TOMM5–Cor −0.8 0.2 0.1 0.9 1.7 0.2 0.7 −1.1 0.6 0.6
PGF–Ups −0.7 0.5 −0.4 0.2 1.4 0.7 −0.3 −1.2 0.5 0.1
HIST1H4E–Ups −0.4 −0.4 −0.1 −0.5 −1.5 0.2 −0.0 1.2 −0.4 −0.3
LOC100289579–Ups −0.6 −0.6 −0.9 −0.7 −1.0 −0.4 −0.4 1.2 −2.1 −0.7
SPEM1–Ups −1.3 0.4 −0.5 −0.7 1.0 0.1 −1.1 −0.7 −0.2 −1.6
OR52B6–Cor 0.1 −0.3 −0.3 −1.2 −0.3 −1.7 −0.3 1.3 −0.2 0.1
LOC100129566–Cor −1.0 1.1 −0.6 1.0 2.0 −0.6 −0.1 −1.3 −0.1 −0.0
C7orf65–Cor −0.8 0.8 −0.7 1.1 1.1 1.6 0.9 −0.6 0.9 −0.9
FRAS1–Ups 1.3 −1.0 −0.9 −1.0 1.3 −1.0 −0.8 0.1 −1.5 0.0
LOC100129617–Ups −0.7 0.2 0.1 0.1 −1.1 −0.0 −0.1 1.6 −0.3 0.2
ALDH8A1–Cor −0.5 −0.7 −0.9 −0.3 −0.1 −1.6 −0.8 −0.3 −1.2 1.0
DDOST–Ups −0.9 0.7 −1.1 0.9 1.8 −0.1 0.6 −1.1 0.6 0.2
UBLCP1–Ups −1.0 −0.2 −0.9 −0.9 −0.3 −0.1 0.2 1.5 −0.8 −2.1
IL29–Ups −1.1 −0.2 0.3 −0.5 0.3 −1.1 1.5 −1.4 −0.5 −0.4
RHBDD1–Cor −1.7 −0.1 −0.3 0.2 2.2 0.3 −0.3 −2.0 −1.1 −0.6
C2orf65–Ups 1.0 −0.4 −0.2 −0.3 0.9 0.6 0.0 1.1 1.0 −0.3
KIR2DP1–Cor −0.5 0.7 −0.3 0.5 0.8 1.1 0.9 1.2 0.8 −0.2
LOC100420114–Ups −0.3 0.4 0.1 1.0 1.4 1.3 1.1 −0.4 0.9 0.9
PHLDB3–Ups −0.1 0.5 0.2 −0.3 1.2 1.1 −0.5 0.7 0.6 −0.2
LOC401914–Ups −0.1 1.3 −0.1 1.1 0.6 1.6 1.6 −0.1 1.1 0.4
RNF2–Cor 0.9 −0.0 0.2 −0.3 0.7 1.3 0.3 1.0 1.3 0.2
OR2E1P–Cor 1.5 0.1 −0.9 1.0 0.3 1.5 0.2 0.2 1.5 −0.2
RPS26P48–Ups 1.0 1.0 −0.3 1.3 0.6 1.8 0.7 0.0 1.9 1.2
PKN1–Ups −0.6 0.8 −0.1 0.7 0.5 0.6 1.2 1.4 1.0 0.1
SLC31A1P1–Cor 0.7 0.2 0.1 0.1 1.3 0.2 1.4 0.8 1.1 0.2
BBC3–Ups −0.1 0.3 −1.1 0.3 1.1 0.9 0.1 −0.2 0.2 0.4
RNF2–Ups 1.5 0.2 0.2 0.6 1.0 1.9 1.7 0.2 1.5 0.5
MAPT–Cor −0.6 0.3 −0.1 −0.1 1.1 0.9 −0.3 −0.6 −0.4 0.2
ZNF709–Cor 0.4 0.2 −0.7 0.3 1.2 1.2 0.4 0.5 1.0 −0.3
PCGF6–Ups 0.7 1.3 0.4 1.5 0.7 2.2 1.4 0.1 2.1 0.1
CACNA1E–Cor 0.3 −0.4 0.6 −0.4 1.3 0.5 0.5 −0.0 1.1 −0.6
FGF11–Ups −0.7 −0.0 −0.1 −0.1 0.8 −0.3 1.0 0.0 −0.1 −0.3
SIGLEC10–Cor −0.6 0.7 −0.2 0.9 −0.1 1.3 1.4 0.5 0.6 0.1
EIF2AP1–Cor 0.9 0.3 −1.0 1.2 0.7 1.6 0.6 0.2 1.5 −0.4
MIR500B–Ups −0.3 0.1 0.2 0.8 0.5 1.0 1.2 0.0 1.6 1.1
PPDPF–Cor 0.4 0.7 −0.9 0.3 0.9 0.4 −0.3 1.4 1.2 0.6
RNY5P6–Ups −2.0 0.4 −1.3 1.1 0.5 0.6 0.8 −1.3 −1.3 0.2
LOC100506014–Ups −0.2 0.4 −0.8 0.2 0.2 1.2 0.2 0.4 1.0 0.5
KU–MEL–3–Cor −0.6 0.8 0.4 1.3 1.6 1.7 0.9 −0.1 1.0 0.4
RNF222–Ups −0.7 0.1 −1.1 0.5 0.7 0.5 1.1 0.5 0.6 0.2
FRG2B–Ups −0.2 0.2 0.2 0.6 0.4 0.5 1.5 −0.2 1.3 0.0
RBM27–Cor −0.5 −0.1 −0.5 0.7 1.2 1.1 −0.1 0.0 −0.6 −0.2
C10orf47–Ups 0.4 0.3 −0.4 0.1 0.8 1.2 0.4 −0.8 1.4 −0.2
RPL11–Ups 0.2 −0.1 −0.2 0.3 1.3 1.2 1.0 −0.3 0.4 0.0
GNB3–Ups −0.8 0.1 0.1 −0.2 0.9 0.6 1.1 −0.0 0.7 −0.0
PCGF6–Cor 1.3 1.5 −0.1 1.7 0.9 2.1 1.5 1.4 2.5 1.0
EXOC4–Cor −0.1 0.5 −0.6 0.2 1.4 0.1 0.3 −0.4 1.1 −0.8
CEACAMP1–Cor −0.3 0.5 0.2 0.4 1.5 0.9 0.5 1.4 1.1 0.5
CBX4–Ups 0.3 0.1 −0.7 −0.2 1.1 1.1 0.8 −0.7 0.7 −0.4
TRNAC–GCA–Cor −0.3 0.1 0.0 −0.3 1.3 0.4 −0.1 0.9 −0.1 −1.0
LOC100419068–Cor 0.1 0.5 −1.0 0.2 −0.3 0.7 1.4 1.0 0.8 −0.2
MIR516B2–Ups 0.5 1.3 −0.6 1.4 0.8 1.9 1.2 −0.1 1.9 0.3
NR1D1–Ups 0.4 0.9 0.5 1.3 2.2 1.5 0.8 0.4 1.9 0.4
PTBP1–Cor −0.1 0.8 −0.6 0.8 1.2 1.6 0.9 0.1 1.4 0.5
FAM129A–Cor 0.1 0.3 −0.1 −0.0 0.6 0.8 0.8 1.4 1.2 −0.7
LOC100420404–Ups 0.3 −0.5 −0.5 −1.2 0.1 1.0 0.6 −0.7 0.3 −0.2
JAK3–Cor 0.5 −0.9 −0.3 −0.4 0.5 1.1 0.6 0.6 0.8 −0.3
SLC22A13–Ups −1.6 0.5 −0.2 0.9 1.4 0.4 0.5 0.4 0.2 1.0
MIR548O2–Cor −1.3 0.8 −0.2 −0.1 1.2 0.0 0.9 −0.5 −0.5 −0.0
ANKMY1–Ups −0.2 −0.4 −0.5 −0.2 −0.1 0.6 −0.3 1.0 0.9 −0.5
LOC283335–Ups −0.6 0.3 −0.5 0.4 0.5 0.5 1.1 −0.0 1.2 0.0
SPTAN1–Cor −0.1 0.2 −0.0 1.0 1.5 0.8 1.1 1.6 1.0 0.3
BGK1 BGK2 BGK3 BGK4 BGT1 BGT2 BGT3 BGT4 BGT5 BGT6
Chr Start End Votes
5 181504 181890 3
19 50524886 50525076 3
3 129332969 129333657 3
5 172386638 172387504 3
6 3725468 3725992 2
6 26515783 26516163 2
19 11483957 11484561 2
8 1492834 1493772 2
20 31064137 31064617 2
12 27616873 27617273 2
19 43975604 43976244 2
19 36527859 36528479 2
22 26132794 26133743 2
8 82451399 82451613 2
8 59569407 59570140 2
8 23544184 23545062 2
1 10491223 10492027 2
17 34204397 34204891 2
16 28077621 28078403 2
X 27997901 27998205 2
2 200331585 200332361 2
19 573600 574568 2
19 55172020 55172923 2
11 61356045 61356241 2
1 89436208 89436710 2
9 37544440 37545097 2
14 55591071 55591971 2
6 26146661 26147277 2
6 84141432 84142384 2
17 7216282 7217180 2
11 5259550 5260442 2
5 70879640 70879940 2
7 47580104 47581014 2
4 74728410 74729248 2
16 67451569 67452161 2
6 132835037 132835931 2
1 19234679 19235585 2
5 153782810 153783710 2
19 36232027 36232343 2
2 219543876 219544672 2
2 74613172 74614079 2
19 51589692 51590298 2
9 34959053 34959942 2
19 40439390 40440354 2
19 33457832 33458706 2
1 156249401 156250279 2
6 28229275 28230139 2
14 58864401 58865319 2
19 14119897 14120129 2
3 169692172 169692454 2
19 44171862 44172761 2
1 156248477 156249256 2
17 39634952 39635862 2
19 12168397 12168707 2
10 98742161 98743043 2
1 152684121 152685017 2
17 7235163 7236117 2
19 48252525 48253423 2
7 143997815 143998227 2
X 47244558 47244854 2
20 58881956 58882566 2
8 41529096 41530006 2
2 3524760 3525648 2
6 4486469 4487276 2
17 8196278 8197161 2
10 128982770 128983250 2
5 140729422 140730320 2
10 11781954 11782730 2
1 22267595 22268399 2
12 6801688 6802492 2
10 98741157 98742065 2
7 127252656 127253522 2
19 39567118 39567999 2
17 73258733 73259650 2
1 92102917 92103542 2
10 111964818 111965614 2
19 50546836 50547712 2
17 34051327 34052103 2
19 566447 567043 2
1 156178482 156179383 2
8 8236607 8237387 2
19 17523754 17524635 2
3 38347844 38348744 2
20 33881639 33882445 2
2 233254504 233254803 2
12 50491885 50492775 2
9 100926352 100927155 2

	BGK1	BGK2	BGK3	BGK4	BGT1	BGT2	BGT3	BGT4	BGT5	BGT6	Chr	Start	End	Votes
TMEM95–Cor	−1.4	0.7	−0.5	0.9	−0.2	1.4	1.0	−0.9	0.5	0.4	17	7152061	7152872	2
ENO1P2–Ups	0.2	0.8	0.2	0.8	0.7	1.7	0.9	0.4	1.8	0.2	15	69100739	69101627	2
OR2AG1–Cor	−1.2	−0.2	−0.3	−0.1	0.6	−0.5	−0.5	1.1	−0.4	0.1	11	6464581	6465529	2
SYCP1–Cor	−0.3	0.2	−0.0	−0.5	1.3	0.9	0.8	−0.4	−0.3	−0.1	1	113255397	113256221	2
LOC100996282–Ups	−1.4	−0.2	−0.3	0.5	1.0	0.9	−0.6	−0.1	−0.5	−0.5	17	7224753	7225441	2
LOC100996630–Cor	0.4	0.3	−1.7	1.9	1.8	0.8	0.5	1.3	−0.4	0.4	1	93905863	93906041	2
NANP–Ups	1.0	−0.8	−1.2	−1.1	−0.1	0.6	0.9	−0.8	0.5	−0.7	20	25563176	25563362	2
COX6A1P2–Cor	−1.3	−0.3	0.3	−0.1	−0.0	−0.8	1.0	0.9	−0.2	−0.9	6	36730527	36731405	2
PCDHA7–Cor	0.0	0.7	0.1	0.6	1.1	1.6	0.3	0.4	1.8	0.1	5	135358264	135359182	2
TRNAM18–Ups	−0.5	0.7	−1.3	−0.3	1.1	0.2	−0.2	−0.2	0.8	−0.9	6	27109320	27109718	2
HIST1H3I–Cor	−0.8	−0.7	−0.2	0.2	−0.0	0.6	1.3	−0.7	0.1	−0.1	6	27647570	27648184	2
MIR658–Cor	−0.5	0.3	−1.2	0.3	0.3	0.6	1.0	−0.6	1.1	−0.7	22	21206816	21207217	2
LOC100533627–Cor	−1.6	0.0	−0.2	0.1	0.8	0.3	−0.2	1.1	−0.1	−0.4	1	45472854	45473754	2
NAV2–AS5–Ups	0.3	−0.3	−0.2	0.7	−0.6	1.8	−0.5	0.1	0.4	1.1	11	19213141	19214037	2
NUP160–Ups	−0.2	−0.2	−0.6	0.0	−0.5	0.2	1.3	0.9	−0.2	0.3	11	47576538	47577118	2
MRPL51–Cor	−1.0	−0.2	−0.4	−0.0	0.1	0.9	1.1	−0.5	0.3	0.2	12	6456263	6457077	2
MIR520B–Cor	−0.5	−0.0	−0.3	0.0	1.3	0.4	0.8	−0.4	1.0	0.0	19	50523686	50524582	2
MIR4489–Ups	−0.9	1.1	−0.6	−0.7	0.9	0.7	0.1	1.3	−1.0	0.2	11	61742430	61742906	2
SLC25A39–Ups	0.1	0.2	−0.0	−0.8	−0.8	0.3	1.3	1.1	0.4	0.2	17	38166339	38167275	2
CCDC124–Ups	−1.5	0.2	0.2	0.6	1.4	−0.7	1.1	−0.7	0.0	0.3	19	17607866	17608352	2
RPL17P5–Ups	−0.6	−0.4	−0.1	−0.4	−0.1	0.3	1.0	−0.7	−0.5	1.0	1	85359739	85360573	2
RAI1–Ups	−0.5	−0.3	−1.0	−0.5	1.2	0.4	−1.2	0.1	−0.7	−0.7	17	17378375	17379297	2
MIR516B2–Cor	1.1	0.2	0.3	0.9	0.9	1.8	1.4	0.6	2.3	−0.1	19	50547828	50548732	2
RPL39P7–Cor	−0.5	0.8	−0.2	1.1	0.3	0.7	1.2	2.0	0.8	1.4	1	24470913	24471860	2
CREB3–Ups	−0.3	−0.4	−0.6	−0.9	1.0	0.7	−0.5	0.4	0.1	−0.0	9	35686887	35687384	2
TIGD3–Cor	−1.2	0.1	−0.4	0.1	1.4	0.3	0.5	−0.9	−0.6	0.8	11	61448733	61449649	2
NTAN1–Cor	−1.0	0.2	−0.7	0.5	1.0	0.5	−1.0	1.3	0.1	0.7	16	14794825	14795589	2
TRNAA45P–Ups	−0.2	−0.1	−0.6	0.3	1.5	0.8	0.6	1.1	0.8	−0.7	11	57108423	57109239	2
FLJ39639–Ups	0.2	−1.1	−0.7	−1.2	1.1	−0.7	0.4	−0.9	−0.2	−1.3	16	3282119	3282813	2
LOC100131815–Cor	−0.1	0.4	0.1	−0.3	0.8	0.8	−0.2	1.1	1.8	0.7	X	47070438	47071340	2
FAM27L–Cor	0.3	0.8	−0.7	0.2	0.9	1.4	−0.1	0.2	1.7	0.6	17	21026140	21026750	2
SLC25A11–Cor	−0.9	0.2	−0.8	0.1	0.5	−0.5	−0.4	0.7	−0.6	1.5	17	4730643	4730959	2
NUP62–Cor	−0.9	−1.0	0.0	−0.3	1.2	−0.0	0.6	−0.3	−0.2	0.3	19	46809353	46809729	2
SOCS1–Cor	−1.0	0.7	−0.2	0.9	−0.6	0.6	1.1	2.0	0.4	0.1	16	11267727	11268221	2
MUC16–Cor	−0.5	0.2	−0.8	−0.6	0.6	1.1	0.0	1.0	−0.2	−0.2	19	8673089	8673993	2
SPN–Ups	−1.2	−0.6	−0.0	−1.3	−1.3	−0.9	−0.6	1.1	−1.3	0.3	16	27334257	27334915	2
HIGD1AP12–Cor	−1.5	0.6	−0.1	0.2	−0.1	1.5	1.1	0.4	−0.4	−0.1	1	109793894	109794792	2
SNORA70B–Ups	−0.3	−0.0	−0.9	−0.7	0.8	0.5	0.4	−0.3	1.3	−0.7	2	61385478	61385994	2
ITIH2–Cor	0.9	0.2	−0.8	1.1	1.2	0.7	−0.6	2.1	1.6	−0.2	10	7663145	7664063	2
GPX1–Ups	−1.4	0.6	−0.1	0.1	1.2	1.4	0.2	−0.9	−0.2	0.3	3	49456237	49456713	2
FBLN2–Ups	−1.0	0.7	0.2	0.6	0.6	1.9	1.3	−0.4	0.2	0.0	3	13522614	13523464	2
LOC101060826–Cor	1.2	−1.3	−0.3	−1.2	1.4	−0.7	−0.5	−1.2	0.8	0.2	1	161998395	161999294	2
RPL31P22–Ups	−1.1	−0.8	−0.6	−0.4	−0.7	−0.2	0.5	−0.3	−1.3	1.1	3	192444581	192445479	2
VPS36–Cor	0.3	−1.0	−0.9	−0.3	0.2	0.4	−0.3	1.1	1.0	0.0	13	33763453	33764259	2
ACSM4–Ups	−0.6	0.0	−0.5	−0.4	−0.5	0.0	1.0	1.3	0.1	0.0	12	7268107	7269029	2
RMI2–Cor	−0.7	0.1	0.1	−0.8	1.6	0.5	0.2	−0.8	0.8	0.1	16	11357314	11357906	2
LOC100996324–Ups	−0.1	−1.0	−0.1	−1.0	0.8	−0.0	−0.9	1.2	−0.7	−0.9	18	12703717	12704613	2
MIR506–Cor	−0.6	0.6	−0.3	−0.1	1.5	0.9	−0.4	−0.2	1.4	0.6	X	135272861	135273439	2
ATP7A–Cor	−1.0	−0.4	0.2	−0.2	0.2	−1.1	−1.0	0.1	1.6	0.7	X	70751772	70752670	2
ATP5J2P5–Cor	−0.7	0.3	−0.6	−0.0	0.1	0.8	−0.4	1.8	0.3	−0.2	12	6231434	6232322	2
MRPS15P2–Cor	−1.4	−0.2	−0.9	−1.1	−0.1	0.1	1.2	−0.6	−1.7	−0.5	19	41226307	41227136	2
FAM71E2–Ups	−0.7	0.9	−0.4	0.0	1.4	1.6	0.0	0.9	0.9	−0.7	19	52197314	52198214	2
FAM150B–Ups	0.7	0.4	−0.3	0.5	1.1	1.5	0.1	1.2	2.3	0.7	2	285552	286462	2
LOC100132058–Ups	−1.3	−0.1	−0.1	−0.3	1.5	0.5	0.5	0.8	−0.1	0.4	3	183898639	183899543	2
EPHA10–Cor	−0.7	1.0	−1.4	0.8	0.4	1.0	0.9	2.0	0.4	−0.2	1	36347426	36348334	2
LOC100507254–Ups	−0.9	0.1	−0.9	−0.3	1.1	1.0	−0.1	0.2	−0.6	−0.2	6	130028972	130029770	2
SRM–Ups	−1.7	−1.0	−0.5	−0.7	−1.0	0.1	−0.1	−0.8	−1.5	1.2	1	10271899	10272589	2
RAB1B–Cor	−0.6	0.5	−0.2	−0.8	0.3	0.5	1.5	1.2	−0.1	−0.1	11	62361142	62361624	2
CYP4F8–Ups	−1.3	0.0	−1.0	0.1	−0.4	−1.2	1.5	0.7	−0.2	−0.9	19	15292471	15292783	2
EIF4BP1–Cor	−1.6	−0.2	−0.9	−1.3	−0.1	−0.1	0.1	1.2	−1.6	−0.7	14	24656430	24657346	2
GNAI2–Ups	−2.2	0.5	−0.7	−1.2	1.3	0.2	−0.8	−1.7	−1.4	−0.7	3	50327848	50328831	2
LOC100130632–Ups	0.1	0.5	0.2	0.7	1.2	0.2	2.6	0.1	1.3	1.4	19	31634283	31635183	2
ADIPOQ–Cor	−0.6	−0.6	−0.5	−0.2	1.3	0.3	−0.9	1.1	−0.1	−0.3	3	183969516	183969992	2
KRT18P4–Cor	−0.6	0.2	−0.4	−1.1	1.3	−0.4	−0.6	1.1	−0.2	−0.2	20	45321182	45321876	2
LOC100132058–Cor	−0.6	−0.0	−0.1	0.2	−0.1	1.9	1.2	0.4	0.8	0.7	3	183899661	183900561	2
GUCA1B–Cor	0.3	−0.5	−0.4	−0.2	1.4	0.5	0.8	−0.3	0.1	1.5	6	41880989	41881165	2
MTL5–Ups	−1.8	0.1	−0.7	0.3	0.2	0.8	1.5	−0.5	−0.5	0.1	11	64855762	64856646	2
PKNOX2–Ups	1.1	−1.1	0.8	−0.7	2.4	0.9	−0.6	1.1	0.7	0.1	11	120974974	120975863	2
FAM110D–Cor	−1.6	−0.3	−0.1	−0.6	−1.6	−1.0	1.4	0.7	−1.0	0.2	1	24739447	24740333	2
CXCR6–Ups	−1.1	−0.4	−1.2	−1.2	−0.2	−0.4	1.2	−0.3	−1.5	0.3	3	46027606	46028494	2
MKNK1–AS1–Cor	−1.4	0.1	0.0	1.6	−0.9	0.1	1.7	1.0	−0.2	1.9	1	45120131	45120341	2
PELI3–Cor	0.2	1.5	−0.9	0.2	0.9	1.8	0.5	−0.7	2.1	−0.1	11	62561647	62562145	2
RPL23AP5–Ups	−1.6	0.4	−0.8	−0.2	0.2	1.4	0.9	−0.1	−0.6	0.0	16	354220	354398	2
TRNAW2–Cor	−1.0	−1.6	−1.1	0.5	−0.7	0.5	−1.1	−0.5	1.4	−0.4	6	26274266	26275152	2
ACAD8–Cor	−1.3	0.6	0.1	0.0	1.7	0.6	1.6	0.7	0.1	0.5	11	130078181	130078693	2
METTL25–Cor	−0.1	−1.0	−0.5	−0.7	−0.4	−0.9	−1.1	1.9	−1.4	0.6	12	79809112	79809612	2
LOC100130932–Ups	−1.1	0.8	0.3	0.0	0.8	0.0	1.9	0.9	1.7	0.5	19	14168945	14169621	2
KRT81–Ups	−1.8	−0.4	−0.6	−1.1	1.2	−0.0	0.5	−1.3	−0.4	−1.1	12	49719567	49720069	2
ARHGEF1–Cor	−1.6	0.1	−0.2	0.0	1.1	0.3	0.4	1.8	−0.1	−0.7	19	38818443	38819043	2
CXCR6–Cor	−0.9	−0.9	−1.1	−1.2	0.4	−0.8	−0.5	1.2	−0.4	−0.3	3	46028602	46029496	2
PGAM1P8–Cor	−1.0	−0.7	−0.4	−1.0	1.4	−1.0	−0.0	−0.3	−1.2	0.8	11	61269718	61270604	2
ARL2–SNX15–Ups	−0.9	−0.5	−1.2	−0.6	0.8	−0.2	1.4	−0.4	−1.0	−0.1	11	61107192	61107380	2
HIST1H2APS4–Cor	−0.3	−0.0	−1.4	−1.1	1.3	1.1	−1.6	−1.0	−0.8	−1.1	6	26215691	26215873	2
DDX42–Cor	−0.6	−0.4	−0.5	0.7	−0.2	−1.0	1.5	−0.2	0.5	2.0	17	57219394	57219594	2
SLC9A8–Cor	0.5	−0.1	−0.4	−1.0	0.3	−0.5	−0.8	1.9	1.8	−0.1	20	45177413	45178315	2
ABTB1–Cor	−0.4	−0.9	−1.2	−0.3	0.2	1.2	−0.1	−0.1	1.6	0.3	3	124772112	124773020	2
MCCD1P2–Ups	−0.9	0.2	−2.1	−1.1	2.3	−0.6	−0.3	1.3	−0.1	−1.5	6	29761431	29761869	2

Abb. 8 Heat Map der hypomethylierten Cor- und Ups Promotorregionen der Gewebe-Kohorte 2 (187 Gen-Loci).



	BGK1	BGK2	BGK3	BGK4	BGT1	BGT2	BGT3	BGT4	BGT5	BGT6	Chr	Start	End	Votes
CSE1L–Cor	−1.6	−0.3	1.3	−0.0	−1.7	−1.6	−1.6	1.3	−1.6	0.0	20	44412600	44412990	5
HMGN2P28–Ups	1.1	1.2	0.0	1.1	−0.3	0.6	−0.3	−0.2	2.0	−0.4	6	2211328	2212285	5
HMGN2P28–Cor	1.1	1.1	−0.0	1.0	−0.2	0.5	−0.4	−0.3	2.0	−0.4	6	2212348	2213268	5
LOC724105–Cor	1.3	−0.7	1.2	−1.6	−1.8	−0.7	−1.8	−1.2	−0.6	−1.5	5	169002959	169003786	4
NDUFA4L2–Ups	−1.6	−0.6	1.0	−0.6	−1.7	−2.5	−1.5	−1.4	−2.3	−0.2	12	54674009	54674889	4
IGSF22–Cor	−0.3	1.1	1.7	0.9	0.2	−0.4	−0.5	−0.6	0.4	−0.4	11	18432179	18433101	4
MIR3162–Cor	1.5	−0.7	0.9	−1.0	−1.4	−1.0	−0.9	−0.5	−1.0	−0.3	11	55709574	55710451	4
WDR55–Ups	−1.6	0.0	0.9	1.1	−1.5	−0.9	−0.7	−1.2	−0.9	−1.1	5	135188215	135188603	4
C5orf44–Cor	1.1	−0.1	−0.2	0.5	0.2	−0.8	1.7	−0.7	0.6	−0.7	5	61876429	61877029	4
PSG8–Ups	0.0	1.0	2.3	0.8	−0.9	0.6	−1.1	0.5	1.7	−1.1	19	39700096	39700582	3
TMEM194A–Ups	−0.4	−0.0	1.5	−0.3	−0.5	−1.2	−1.9	−1.0	−0.3	−0.6	12	54511968	54512478	3
LOC100132849–Cor	2.2	0.7	1.2	1.1	0.4	1.2	−0.1	−0.8	1.1	0.2	2	198950663	198951449	3
LOC151174–Cor	−0.2	1.9	1.4	2.0	−0.5	0.6	0.8	0.1	1.3	−0.3	2	230931028	230931230	3
FAM90A24P–Cor	0.1	1.1	1.1	1.5	0.6	0.8	−0.3	−0.9	1.5	−0.3	8	6839051	6839952	3
FAM66E–Cor	0.4	1.0	0.8	1.1	0.5	0.9	−0.2	−0.9	1.7	−0.7	8	6876942	6877853	3
APLP2–Ups	1.0	1.2	1.1	2.2	0.2	1.2	1.1	−0.3	1.6	0.0	11	125890407	125890809	3
CSGALNACT1–Ups	1.9	0.8	1.1	1.0	0.8	1.1	−0.0	−0.3	1.0	−0.1	8	18081051	18081927	3
HMOX1–Cor	0.3	2.2	1.6	1.9	0.5	1.1	1.7	0.1	1.6	−0.0	22	18737091	18737453	3
MYH4–Ups	0.9	1.2	2.0	0.1	1.7	−0.2	−0.4	−0.0	0.8	0.2	17	10272974	10273898	3
RPL17P22–Ups	2.7	1.5	0.6	1.8	0.4	1.9	0.9	0.5	1.4	0.3	5	52402392	52403201	3
LOC100505754–Ups	0.5	1.8	1.2	1.5	0.2	1.0	−0.0	0.3	1.6	−0.3	19	44959251	44960159	3
RPL39P17–Ups	−0.2	2.1	1.2	2.1	0.1	1.5	0.2	−0.2	0.4	1.1	3	13028992	13029592	3
KLK10–Cor	0.4	1.5	0.9	0.4	−0.3	0.7	−0.3	−0.6	0.3	0.7	19	47855968	47856456	3
MTRNR2L6–Cor	1.7	−0.4	0.5	−0.2	−0.7	−1.0	−0.7	0.5	−0.3	−0.1	7	136702197	136702611	3
HYDIN–Ups	1.3	1.5	0.4	1.2	0.7	1.1	−0.1	0.0	1.6	−0.2	16	56708361	56708669	3
XPO5–Cor	1.0	0.8	−0.3	2.3	0.3	1.8	−0.1	−0.4	1.6	−0.2	6	43262576	43262876	3
RRP8–Cor	1.3	−0.0	0.4	0.6	0.6	1.1	−0.5	0.8	−0.5	−0.5	11	6283430	6283826	3
RNU7–18P–Ups	1.0	0.1	−0.2	−1.3	1.1	−1.9	−2.0	−0.5	−0.4	−0.8	3	193099002	193099890	3
MMD2–Ups	−1.4	−1.0	1.3	0.4	−1.7	0.1	0.2	1.2	0.3	−1.8	7	4915028	4915506	3
OXLD1–Cor	−0.8	−0.1	0.6	−0.4	1.3	−0.7	−2.3	−1.3	0.1	0.6	17	75079533	75079825	3
ASCL2–Cor	1.8	1.3	−1.0	2.1	1.9	1.2	−0.5	1.4	2.7	−0.7	11	2081965	2082950	3
TRNAV31–Ups	−1.5	−0.9	1.6	1.3	−0.7	−0.7	−1.7	1.4	−0.6	−1.0	6	27064874	27065068	3
HBG2–Ups	0.4	−0.2	−0.2	1.9	−0.9	1.1	0.6	−0.6	1.5	−0.4	11	4935693	4936593	3
RAB40C–Cor	−1.1	0.8	−0.2	1.0	−0.3	0.4	1.3	−1.2	−0.5	−1.0	16	560769	561597	3
MPP7–Ups	1.2	1.2	0.1	1.5	0.9	1.0	−0.2	−0.4	2.3	0.4	10	28289593	28290555	3
LOC100996515–Ups	0.7	1.2	0.8	0.5	1.5	1.4	1.3	−0.3	1.9	−0.4	11	65766219	65767111	3
MCHR1–Ups	−1.2	−0.0	−0.1	0.4	0.3	0.2	1.4	−1.7	−1.4	0.0	22	24035602	24036404	3
RPL6P24–Cor	−0.2	1.4	0.1	0.3	2.1	0.7	−0.9	0.5	1.4	−0.8	10	13545734	13546442	3
IFT74–Ups	−0.7	−0.1	−0.0	−0.9	1.8	−0.8	−0.3	−0.9	−1.5	−1.8	9	26898724	26899406	3
MIR526A2–Cor	0.9	2.4	1.2	2.9	1.6	1.5	1.2	−0.3	2.7	−0.9	19	50549228	50550218	2
ATG2A–Cor	−0.2	2.0	0.0	1.3	0.8	1.2	−0.3	0.2	0.2	−2.3	11	61011336	61011634	2
FAM131C–Ups	0.1	0.3	0.7	1.0	0.2	0.5	−0.1	−1.7	0.8	−0.9	1	14919033	14919921	2
MIR524–Ups	0.3	1.3	1.3	0.8	1.4	0.2	0.7	−1.1	0.6	−0.7	19	50532786	50533062	2
RNU7–82P–Ups	1.3	1.3	0.6	1.3	−0.6	0.8	−0.7	0.4	1.4	0.5	3	160557305	160558206	2
NAIP–Cor	1.4	0.7	0.9	0.1	0.8	0.2	−0.9	−1.0	0.8	0.2	5	65888137	65889049	2
MAGEA11–Ups	1.0	−0.3	0.5	−0.5	−0.4	−1.4	−1.6	−0.0	−0.4	0.2	X	137750092	137750998	2
RPL15P2–Cor	−1.6	−0.5	1.4	0.2	0.8	−0.8	−0.2	−2.4	−1.2	0.5	14	75447709	75447895	2
NAGLU–Ups	−1.0	1.4	1.0	0.7	0.6	0.1	0.5	0.6	−0.9	−1.4	17	36451771	36452153	2
CXorf51A–Ups	2.7	1.0	0.7	0.1	1.0	0.2	0.3	−0.3	1.6	−0.7	X	134861262	134862070	2
ID3–Cor	−0.3	1.1	−1.1	0.5	−0.5	−0.2	−0.3	−1.2	−0.1	−2.0	1	22136830	22137008	2
ZNF586–Ups	−0.1	1.0	1.3	1.3	1.8	0.8	−1.0	−0.5	1.4	0.6	19	54591934	54592132	2
SPDYE3–Ups	0.6	1.6	1.0	1.4	−0.7	1.1	−0.2	0.4	0.3	0.3	7	94538619	94539527	2
ZNF607–Ups	−1.0	1.2	0.2	1.4	0.4	0.4	1.0	−1.4	0.4	−0.9	19	34661476	34662316	2
LOC285095–Ups	1.3	0.7	0.7	0.7	0.4	0.6	1.1	−0.5	0.2	−0.9	2	234595765	234596676	2
PRKRIRP9–Cor	0.5	0.6	1.1	0.4	−1.2	0.1	−0.5	0.1	0.4	0.3	4	44650658	44650882	2
CRBN–Cor	0.8	1.2	0.3	0.6	1.2	0.8	−1.0	0.2	1.6	−0.6	3	3155062	3155540	2
RPS15AP36–Ups	1.6	1.6	1.0	1.3	1.1	0.5	−0.4	−0.0	2.0	1.1	19	55036226	55037132	2
LOC100419827–Cor	2.0	0.8	0.4	−0.3	−0.4	0.4	−0.1	0.5	−1.2	0.4	12	18413504	18414438	2
TCEB3–Cor	−0.0	2.0	0.4	1.7	1.1	2.0	1.9	−0.4	1.2	−0.6	1	22326798	22327176	2
ZNF135–Cor	−0.4	1.1	−0.3	0.4	0.9	0.2	−1.2	−1.4	0.7	1.0	19	54881180	54882096	2
C12orf60–Cor	0.8	1.1	1.5	0.9	0.8	0.7	−0.1	−0.7	1.2	0.2	12	14726058	14726438	2
LOC100130394–Ups	2.0	0.5	0.9	0.1	−0.1	−0.1	0.3	−0.2	1.6	−1.1	5	167179383	167180265	2
GRIFIN–Ups	−0.5	0.6	0.6	1.0	−0.2	−1.0	0.1	−1.1	0.1	0.1	7	2435830	2436228	2
LOC100996904–Ups	0.9	0.6	−0.5	0.6	0.7	1.1	0.4	−1.5	0.5	−0.7	5	697585	698459	2
PSPH–Cor	0.3	0.6	1.6	0.4	−0.2	−0.8	−0.7	0.5	0.1	0.4	7	55932614	55933065	2
NDUFV1–Ups	0.1	1.7	−0.6	1.1	−0.1	1.2	0.8	−1.0	1.4	−0.8	11	63702141	63703042	2
C9orf133–Cor	0.4	−0.4	1.9	−0.1	0.9	1.3	0.7	−1.0	0.5	−1.1	9	32523378	32523894	2
SPAG6–Ups	1.4	−0.4	1.0	0.9	1.5	−0.4	0.9	−0.2	0.3	−1.1	10	22294110	22295004	2
DYNC1LI1–Ups	1.4	1.7	0.9	1.9	0.2	1.4	1.5	0.9	2.3	−0.1	3	32548276	32549082	2
THAP5P1–Cor	0.3	1.3	1.4	1.1	0.7	0.6	0.6	−0.3	0.9	−0.6	7	152155058	152155757	2
ZCCHC5–Cor	1.3	1.5	0.6	0.7	1.0	1.3	−0.8	0.5	1.4	0.0	X	71494409	71495309	2
LOC100131492–Ups	1.1	0.3	0.4	−0.1	−0.9	0.5	−0.3	0.5	−1.2	0.4	2	120519257	120520071	2
ALAD–Cor	1.0	−1.1	−0.9	−1.1	−0.4	−1.1	−2.3	−0.4	−1.6	−0.6	9	85770544	85771044	2
TCEA3–Ups	1.2	0.9	−0.0	−0.7	−0.6	1.0	0.3	−0.2	−1.0	−1.2	1	22002303	22003241	2
RP2–Cor	0.6	0.7	0.4	0.6	−0.9	1.3	0.1	−0.7	0.9	0.0	X	44407967	44408374	2
RANGRF–Cor	−0.7	0.5	0.4	0.9	0.8	0.1	1.1	−0.8	−0.0	−1.4	17	8087240	8087618	2
CASKIN1–Cor	0.4	1.8	1.0	0.7	0.7	0.9	−0.1	0.8	1.0	−0.8	16	2187966	2188736	2
SYF2–Ups	0.5	1.2	1.6	1.3	0.5	1.2	0.8	−0.1	2.1	−0.3	1	23813678	23814576	2
RPIAP1–Ups	0.0	1.3	0.2	0.2	0.5	0.3	−0.9	0.0	−0.3	−1.0	18	56335442	56336327	2
C6orf62–Cor	0.4	1.3	0.1	0.7	0.3	0.7	0.5	−1.1	1.2	−0.4	6	24668736	24669216	2
RPL5P31–Ups	−1.8	0.3	0.0	1.0	−0.8	−0.1	−1.5	−1.5	−0.9	0.1	13	32526781	32527087	2
OR8C1P–Cor	0.1	1.0	0.4	0.7	−0.9	0.5	0.4	−0.7	−0.0	0.6	11	120189135	120190015	2
STARD3–Ups	0.3	1.2	2.2	0.8	0.5	1.1	0.6	1.6	−0.3	−0.2	17	33585619	33586519	2
OR1D4–Cor	0.7	1.9	0.5	1.2	−0.4	0.9	0.1	−0.1	1.3	1.2	17	3035727	3036695	2
UBXN6–Ups	0.8	0.8	1.9	0.4	−0.7	1.0	−0.1	0.0	1.4	0.5	19	4221515	4221797	2
TPPP–Ups	−1.5	0.9	1.6	1.0	−0.6	0.8	0.9	0.7	−0.1	−1.1	5	662307	662917	2
SLC2A3–Ups	1.8	0.9	0.2	1.2	0.8	0.7	−0.2	1.3	1.5	−0.4	12	7902700	7903246	2
RANGAP1–Ups	−0.3	1.1	0.7	1.1	0.1	0.4	0.8	−0.6	−0.2	−0.8	22	24647280	24647528	2
LOC728228–Cor	0.9	0.3	0.9	0.2	−0.8	0.9	0.2	−0.1	1.1	−0.7	20	4122000	4122908	2
RPL36AP53–Cor	0.5	1.1	1.2	0.5	0.1	0.7	−0.3	−0.7	0.5	0.5	X	103408308	103409172	2
ABT1–Cor	0.5	1.0	0.7	0.8	0.7	1.1	0.5	−0.7	1.0	−0.4	6	26539895	26540850	2
LHFPL3–AS1–Cor	0.1	0.7	1.7	1.4	0.7	0.9	0.9	−0.2	1.2	−0.4	7	98803488	98803674	2
RIMKLA–Cor	0.5	0.3	1.2	1.2	0.8	1.1	−0.2	−0.8	1.0	0.5	1	40966451	40967003	2
ZNF132–Cor	1.2	1.6	0.9	1.5	0.0	0.8	0.0	0.8	1.8	0.6	19	55260309	55260869	2

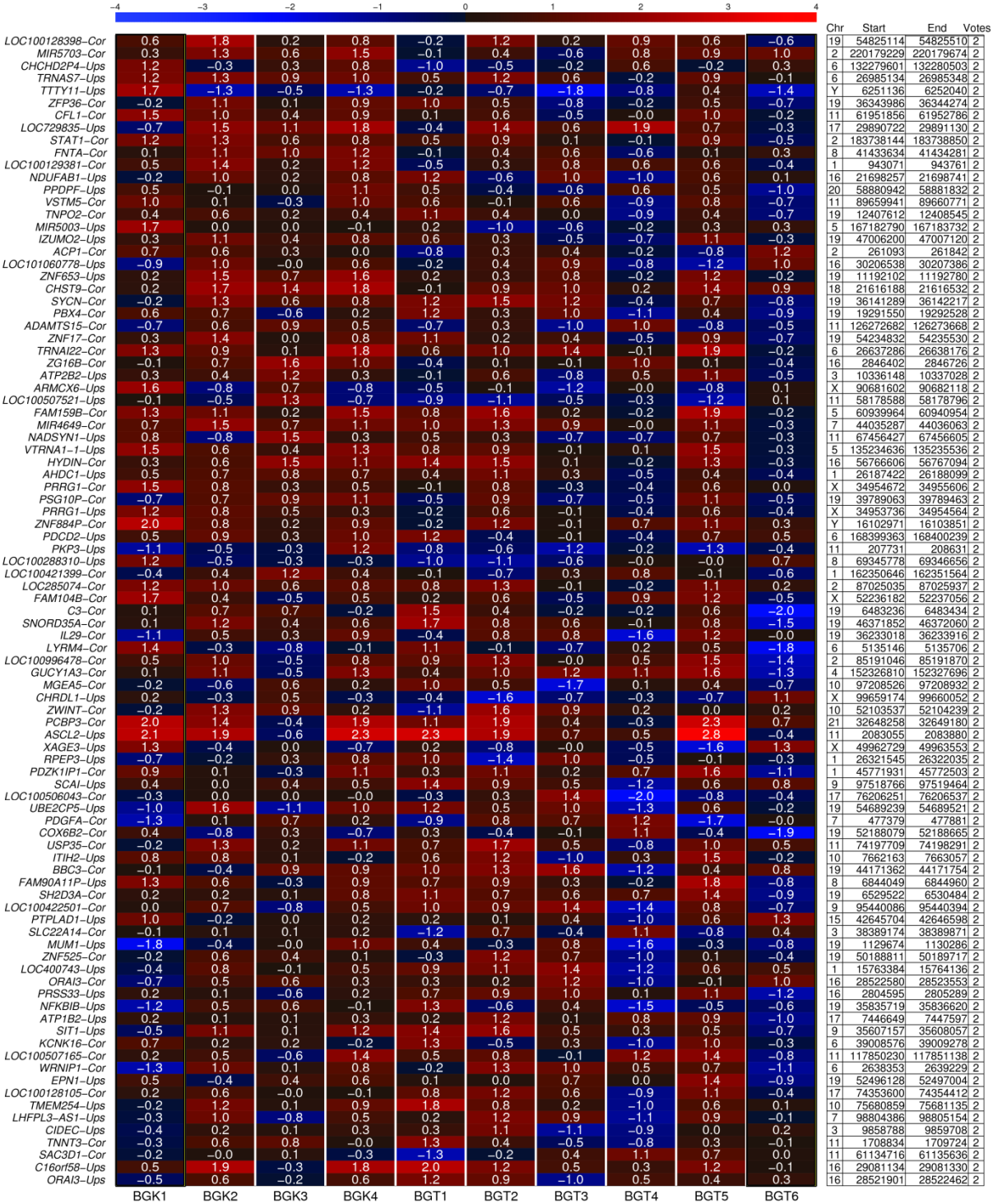

−4 −3 −2 −1 0 1 2 3 4
LOC100128398–Cor 0.6 1.8 0.2 0.8 −0.2 1.2 0.2 0.9 0.6 −0.6
MIR5703–Cor 0.3 1.3 0.6 1.5 −0.1 0.4 −0.6 0.8 0.9 1.0
CHCHD2P4–Ups 1.2 −0.3 0.3 0.8 −1.0 −0.5 −0.2 0.6 −0.2 0.3
TRNAS7–Ups 1.2 1.3 0.9 1.0 0.5 1.2 0.6 −0.2 0.9 −0.1
TTTY11–Ups 1.7 −1.3 −0.5 −1.3 −0.2 −0.7 −1.8 −0.8 0.4 −1.4
ZFP36–Cor −0.2 1.1 0.1 0.9 1.0 0.5 −0.8 −0.2 0.5 −0.7
CFL1–Cor 1.5 1.0 0.4 0.9 0.1 0.6 −0.5 −0.0 1.0 −0.2
LOC729835–Ups −0.7 1.5 1.1 1.8 −0.4 1.4 0.6 1.9 0.7 −0.3
STAT1–Cor 1.2 1.3 0.6 0.8 0.5 0.9 0.1 −0.1 0.9 −0.5
FNTA–Cor 0.1 1.1 1.0 1.2 −0.1 0.4 0.6 −0.6 0.1 0.3
LOC100129381–Cor 0.5 1.4 0.2 1.2 −0.5 0.3 0.8 0.6 0.6 −0.4
NDUFAB1–Ups −0.2 1.0 0.2 0.8 1.2 −0.6 1.0 −1.0 0.6 0.1
PPDPF–Ups 0.5 −0.1 0.0 1.1 0.5 −0.4 −0.6 0.6 0.5 −1.0
VSTM5–Cor 1.0 0.1 −0.3 1.0 0.6 −0.1 0.6 −0.9 0.8 −0.7
TNPO2–Cor 0.4 0.6 0.2 0.4 1.1 0.4 0.0 −0.9 0.4 −0.7
MIR5003–Ups 1.7 0.0 0.0 −0.1 0.2 −1.0 −0.6 −0.2 0.3 0.3
IZUMO2–Ups 0.3 1.1 0.4 0.8 0.6 0.3 −0.5 −0.7 1.1 −0.3
ACP1–Cor 0.7 0.6 0.3 0.0 −0.8 0.3 0.4 −0.2 −0.8 1.2
LOC101060778–Ups −0.9 1.0 −0.0 0.6 −0.2 0.4 0.9 −0.8 −1.2 1.0
ZNF653–Ups 0.2 1.5 0.7 1.6 0.2 0.3 0.8 −0.2 1.2 −0.2
CHST9–Cor 0.2 1.7 1.4 1.8 −0.1 0.9 1.0 0.2 1.4 0.9
SYCN–Cor −0.2 1.3 0.6 0.8 1.2 1.5 1.2 −0.4 0.7 −0.8
PBX4–Cor 0.6 0.7 −0.6 0.2 1.2 0.3 1.0 −1.1 0.4 −0.9
ADAMTS15–Cor −0.7 0.6 0.9 0.5 −0.7 0.3 −1.0 1.0 −0.8 −0.5
ZNF17–Cor 0.3 1.4 0.0 0.8 1.1 0.2 0.4 −0.5 0.9 −0.7
TRNAI22–Cor 1.3 0.9 0.1 1.8 0.6 1.0 1.4 −0.1 1.9 −0.2
ZG16B–Cor −0.1 0.7 1.6 1.0 −0.4 0.1 −0.1 1.0 0.1 −0.4
ATP2B2–Ups 0.3 0.4 1.2 0.3 −0.1 0.6 −0.8 0.5 1.1 −0.5
ARMCX6–Ups 1.6 −0.8 0.7 −0.8 −0.5 −0.1 −1.2 −0.0 −0.8 0.1
LOC100507521–Ups −0.1 −0.5 1.3 −0.7 −0.9 −1.1 −0.5 −0.3 −1.2 0.1
FAM159B–Cor 1.3 1.1 0.2 1.5 0.8 1.6 0.2 −0.2 1.9 −0.2
MIR4649–Cor 0.7 1.5 0.7 1.1 1.0 1.3 0.9 −0.0 1.1 −0.3
NADSYN1–Ups 0.8 −0.8 1.5 0.3 0.5 0.3 −0.7 −0.7 0.7 −0.3
VTRNA1–1–Ups 1.5 0.6 0.4 1.3 0.8 0.9 −0.1 0.1 1.5 −0.3
HYDIN–Cor 0.3 0.6 1.5 1.1 1.4 1.5 0.1 −0.2 1.3 −0.3
AHDC1–Ups 0.5 0.7 0.8 0.7 0.4 1.1 0.3 −0.5 0.4 −0.4
PRRG1–Cor 1.5 0.8 0.3 0.5 −0.1 0.8 −0.3 −0.4 0.6 0.0
PSG10P–Cor −0.7 0.7 0.9 1.1 −0.5 0.9 −0.7 −0.5 1.1 −0.5
PRRG1–Ups 1.2 0.8 0.5 0.3 −0.2 0.6 −0.1 −0.4 0.6 −0.4
ZNF884P–Cor 2.0 0.8 0.2 0.9 −0.2 1.2 −0.1 0.7 1.1 0.3
PDCD2–Ups 0.5 0.9 0.3 1.0 1.2 −0.4 −0.1 −0.4 0.7 0.5
PKP3–Ups −1.1 −0.5 −0.3 1.2 −0.8 −0.6 −1.2 −0.2 −1.3 −0.4
LOC100288310–Ups 1.2 −0.5 −0.3 −0.3 −1.0 −1.1 −0.6 −0.0 −0.0 0.7
LOC100421399–Cor −0.4 0.4 1.2 0.4 −0.1 −0.7 0.3 0.8 −0.1 −0.6
LOC285074–Cor 1.2 1.0 0.6 0.8 0.8 1.3 −0.1 −0.2 1.1 0.2
FAM104B–Cor 1.7 0.4 −0.5 0.5 0.2 0.6 −0.5 0.9 1.2 −0.5
C3–Cor 0.1 0.7 0.7 −0.2 1.5 0.4 −0.2 −0.2 0.6 −2.0
SNORD35A–Cor 0.1 1.2 0.4 0.6 1.7 0.8 0.6 −0.1 0.8 −1.5
IL29–Cor −1.1 0.5 0.3 0.9 −0.4 0.8 0.8 −1.6 1.2 −0.0
LYRM4–Cor 1.4 −0.3 −0.8 −0.1 1.1 −0.1 −0.7 0.2 0.5 −1.8
LOC100996478–Cor 0.5 1.0 −0.5 0.8 0.9 1.3 −0.0 0.5 1.5 −1.4
GUCY1A3–Cor 0.1 1.1 −0.5 1.3 0.4 1.0 1.2 1.1 1.6 −1.3
MGEA5–Cor −0.2 −0.6 0.6 0.2 1.0 0.5 −1.7 0.1 0.4 −0.7
CHRDL1–Ups 0.2 −0.3 0.5 −0.3 −0.4 −1.6 −0.7 −0.3 −0.7 1.1
ZWINT–Cor −0.2 1.3 0.9 0.2 −1.1 1.6 0.9 0.2 0.0 0.2
PCBP3–Cor 2.0 1.4 −0.4 1.9 1.1 1.9 0.4 −0.3 2.3 0.7
ASCL2–Ups 2.1 1.9 −0.6 2.3 2.3 1.9 0.7 0.5 2.8 −0.4
XAGE3–Ups 1.3 −0.4 0.0 −0.7 0.2 −0.8 −0.0 −0.5 −1.6 1.3
RPEP3–Ups −0.7 −0.2 0.3 0.8 1.0 −1.4 1.0 −0.5 −0.1 −0.3
PDZK1IP1–Cor 0.9 0.1 −0.3 1.1 0.3 1.1 0.2 0.7 1.6 −1.1
SCAI–Ups 0.4 0.0 0.4 0.5 1.4 0.9 0.5 −1.2 0.6 0.8
LOC100506043–Cor −0.3 0.0 0.0 −0.0 −0.3 0.3 1.4 −2.0 −0.8 −0.4
UBE2CP5–Ups −1.0 1.6 −1.1 1.0 1.2 0.5 1.0 −1.3 0.6 −0.2
PDGFA–Cor −1.3 0.1 0.7 0.2 −0.9 0.8 0.7 1.2 −1.7 −0.0
COX6B2–Cor 0.4 −0.8 0.3 −0.7 0.3 −0.4 −0.1 1.1 −0.4 −1.9
USP35–Cor −0.2 1.3 0.2 1.1 0.7 1.7 0.5 −0.8 1.0 0.5
ITIH2–Ups 0.8 0.8 0.1 −0.2 0.6 1.2 −1.0 0.3 1.5 −0.2
BBC3–Cor −0.1 −0.4 0.9 0.9 1.0 1.3 1.6 −1.2 0.4 0.8
FAM90A11P–Ups 1.3 0.6 −0.3 0.9 0.7 0.9 0.3 −0.2 1.8 −0.8
SH2D3A–Cor 0.2 0.2 0.1 0.8 1.1 0.7 0.6 0.7 1.4 −0.9
LOC100422501–Cor 0.0 0.7 −0.8 0.5 1.0 0.9 1.4 −1.4 0.8 −0.7
PTPLAD1–Ups 1.0 −0.2 0.0 0.2 0.2 0.1 0.4 −1.0 0.6 1.3
SLC22A14–Cor −0.1 0.1 0.1 0.2 −1.2 0.7 −0.4 1.1 −0.8 0.4
MUM1–Ups −1.8 −0.4 −0.0 1.0 0.4 −0.3 0.8 −1.6 −0.3 −0.8
ZNF525–Cor −0.2 0.6 0.4 0.1 −0.3 1.2 0.7 −1.0 0.1 −0.4
LOC400743–Ups −0.4 0.8 −0.1 0.5 0.9 1.1 1.4 −1.2 0.6 0.5
ORAI3–Cor −0.7 0.5 0.6 0.3 0.3 0.2 1.2 −1.0 −0.1 1.0
PRSS33–Ups 0.2 0.1 −0.6 0.2 0.7 0.9 1.0 0.1 1.1 −1.2
NFKBIB–Ups −1.2 0.5 0.6 −0.1 1.3 −0.6 0.4 −1.5 −0.5 −0.6
ATP1B2–Ups 0.2 0.1 0.1 0.3 0.2 1.2 0.1 0.8 0.9 −1.0
SIT1–Ups −0.5 1.1 0.1 1.2 1.4 1.6 0.5 0.3 0.5 −0.7
KCNK16–Cor 0.7 0.2 0.2 −0.2 1.3 −0.5 0.3 −1.0 1.0 −0.3
LOC100507165–Cor 0.2 0.5 −0.6 1.4 0.5 0.8 −0.1 1.2 1.4 −0.8
WRNIP1–Cor −1.3 1.0 0.1 0.8 −0.2 1.3 1.0 0.5 0.7 −1.1
EPN1–Ups 0.5 −0.4 0.4 0.6 0.1 0.0 0.7 0.0 1.4 −0.9
LOC100128105–Cor 0.2 0.6 −0.0 −0.1 0.8 1.2 0.6 −0.9 1.1 −0.4
TMEM254–Ups −0.2 1.2 0.1 0.9 1.8 0.8 0.2 −1.0 0.6 0.1
LHFPL3–AS1–Ups −0.3 1.0 −0.8 0.5 0.2 1.2 0.9 −1.1 0.9 −0.1
CIDEC–Ups −0.4 0.2 0.1 0.3 0.3 1.1 −1.1 −0.9 0.0 0.2
TNNT3–Cor −0.3 0.6 0.8 −0.0 1.3 0.4 −0.5 −0.8 0.3 −0.1
SAC3D1–Cor −0.2 −0.0 0.1 −0.3 −1.3 −0.2 0.4 1.1 0.7 0.0
C16orf58–Ups 0.5 1.9 −0.3 1.8 2.0 1.2 0.5 0.3 1.2 −0.1
ORAI3–Ups −0.5 0.6 −0.2 0.6 1.2 0.9 −1.0 0.5 0.4 0.3
BGK1 BGK2 BGK3 BGK4 BGT1 BGT2 BGT3 BGT4 BGT5 BGT6
Chr Start End Votes
19 54825114 54825510 2
2 220179229 220179674 2
6 132279601 132280503 2
6 26985134 26985348 2
Y 6251136 6252040 2
19 36343986 36344274 2
11 61951856 61952786 2
17 29890722 29891130 2
2 183738144 183738850 2
8 41433634 41434281 2
1 943071 943761 2
16 21698257 21698741 2
20 58880942 58881832 2
11 89659941 89660771 2
19 12407612 12408545 2
5 167182790 167183732 2
19 47006200 47007120 2
2 261093 261842 2
16 30206538 30207386 2
19 11192102 11192780 2
18 21616188 21616532 2
19 36141289 36142217 2
19 19291550 19292528 2
11 126272682 126273668 2
19 54234832 54235530 2
6 26637286 26638176 2
16 2846402 2846726 2
3 10336148 10337028 2
X 90681602 90682118 2
11 58178588 58178796 2
5 60939964 60940954 2
7 44035287 44036063 2
11 67456427 67456605 2
5 135234636 135235536 2
16 56766606 56767094 2
1 26187422 26188099 2
X 34954672 34955606 2
19 39789063 39789463 2
X 34953736 34954564 2
Y 16102971 16103851 2
6 168399363 168400239 2
11 207731 208631 2
8 69345778 69346656 2
1 162350646 162351564 2
2 87025035 87025937 2
X 52236182 52237056 2
19 6483236 6483434 2
19 46371852 46372060 2
19 36233018 36233916 2
6 5135146 5135706 2
2 85191046 85191870 2
4 152326810 152327696 2
10 97208526 97208932 2
X 99659174 99660052 2
10 52103537 52104239 2
21 32648258 32649180 2
11 2083055 2083880 2
X 49962729 49963553 2
1 26321545 26322035 2
1 45771931 45772503 2
9 97518766 97519464 2
17 76206251 76206537 2
19 54689239 54689521 2
7 477379 477881 2
19 52188079 52188665 2
11 74197709 74198291 2
10 7662163 7663057 2
19 44171362 44171754 2
8 6844049 6844960 2
19 6529522 6530484 2
9 95440086 95440394 2
15 42645704 42646598 2
3 38389174 38389871 2
19 1129674 1130286 2
19 50188811 50189717 2
1 15763384 15764136 2
16 28522580 28523553 2
16 2804595 2805289 2
19 35835719 35836620 2
17 7446649 7447597 2
9 35607157 35608057 2
6 39008576 39009278 2
11 117850230 117851138 2
6 2638353 2639229 2
19 52496128 52497004 2
17 74353600 74354412 2
10 75680859 75681135 2
7 98804386 98805154 2
3 9858788 9859708 2
11 1708834 1709724 2
11 61134716 61135636 2
16 29081134 29081330 2
16 28521901 28522462 2

Tabelle 2: Schnittmengen der hyper- und hypomethylierten Gene zwischen der Tumorgewebeproben der Kohorte 1 und der Kohorte 2.

∩Hypermethylierte DMRs in Kohorte 1 & 2	∩Hypomethylierte DMRs in Kohorte 1 & 2
ODC1-Ups	KLK10-Cor
LOC100130241-Ups	NAGLU-Ups
MIR30C1-Cor	ZNF607-Ups
ABTB1-Ups	GRIFIN-Ups
FETUB-Cor	RANGAP1-Ups
HMGN2P2-Ups	FNTA-Cor
CKAP2-Ups	ADAMTS15-Cor
ACTR5-Cor	LYRM4-Cor
GLT8D1-Ups	LOC100996478-Cor
MIR4493-Ups	PDZK1IP1-Cor
TBX3-Ups	FAM90A11P-Ups
ZNF550-Cor	WRNIP1-Cor
TRNAA2-Ups	
C7orf65-Cor	
RPS26P48-Ups	
MIR500B-Ups	
RNF222-Ups	
TMEM95-Cor	
HIST1H3I-Cor	
NUP62-Cor	
PELI3-Cor	
TRNAW2-Cor	
MCCD1P2-Ups	

Tabelle 3: Funktionen und Zuordnung der potentiellen (A) hyper- und (B) hypomethylierten Markergene, die mit Hilfe der UCSC- und GenCards-Datenbank ermittelt wurden

(A)

Gen	Funktion	Zuordnung
ODC1-Ups	encodes the rate-limiting enzyme of the polyamine biosynthesis pathway which catalyzes ornithine to putrescine. The activity level for the enzyme varies in response to growth-promoting stimuli and exhibits a high turnover rate in comparison to other mammalian proteins	Wachtumsfördernd
LOC100130241-Ups	-	-
MIR30C1-Cor	-	-
ABTB1-Ups	encodes a protein with an ankyrin repeat region and two BTB/POZ domains, which are thought to be involved in protein-protein interactions. Expression of this gene is activated by the phosphatase and tensin homolog, a tumor suppressor. May act as a mediator of the PTEN growth-suppressive signaling pathway. May play a role in developmental processes	Entwicklung, wachtumshemmend
FETUB-Cor	encoded by this gene is a member of the fetuin family, part of the cystatin superfamily of cysteine protease inhibitors. Fetuins have been implicated in several diverse functions, including osteogenesis and bone resorption, regulation of the insulin and hepatocyte growth factor receptors, and response to systemic inflammation. This protein may be secreted by cells	Wachtumsfördernd, Inflamation

ACPL2-Cor	-	-
HMGN2P2-Ups	-	-
CKAP2-Ups	CKAP2 is a cytoskeleton-associated protein involved in mitotic progression. Possesses microtubule stabilizing properties. Involved in regulating aneuploidy, cell cycling, and cell death in a p53/TP53-dependent manner	Zellzyklus, Zelltod
RPS12P26-Ups	-	
ACTR5-Cor	Proposed core component of the chromatin remodeling INO80 complex which is involved in transcriptional regulation, DNA replication and probably DNA repair. Involved in DNA double-strand break repair and UV-damage excision repair	Zellzyklus, DNA-Reparatur
GLT8D1-Ups	member of the glycosyltransferase family	sonstiges
MIR4493-Ups	miRNA	-
MC1R-Ups	receptor protein for melanocyte-stimulating hormone (MSH)	sonstiges
GAPDHP37-Ups	pseudogene	-
TBX3-Ups	transcription factors, repressor	Zellzyklus
ZNF550-Cor	-	-
LOC126860-Ups	pseudogene	-
TRNAA2-Ups	transfer RNA alanine 2 anticodon AGC	Zellzyklus
RPS26P48-Ups	pseudogene	-
C7orf65-Cor	Uncharacterized	-
SLC31A1P1-Cor	pseudogene	-
MIR500B-Ups	unknown	-
RNF222-Ups	unknown	-
PTBP1-Cor	Plays a role in pre-mRNA splicing and in the regulation of alternative splicing events.	Zellzyklus
ANKMY1-Ups	unknown	-
TMEM95-Cor	unknown	-
HIST1H3I-Cor	Core component of nucleosome	Zellaufbau
NUP62-Cor	Essential component of the nuclear pore complex	Zellaufbau
PELI3-Cor	E3 ubiquitin ligase catalyzing the covalent attachment of ubiquitin moieties onto substrate proteins	sonstiges
TRNAW2-Cor	transfer RNA tryptophan 2	Zellzyklus
MCCD1P2-Ups	pseudogene	-

(B)

Gen	Funktion	Zuordnung
PCBP3-Cor	Single-stranded nucleic acid binding protein that binds preferentially to oligo dC	Zellzyklus
RANGAP1-Ups	GTPase activator for the nuclear Ras-related regulatory protein Ran, converting it to the putatively inactive GDP-bound state	Zellzyklus
PDZK1IP1-Cor	May play an important role in tumor biology	Tumorbiologie
WRNIP1-Cor	a modulator for initiation or reinitiation events during DNA polymerase delta-mediated DNA synthesis. Has an intrinsic ATPase activity that functions as a sensor of DNA damage or of arrested replication forks and regulates the extent of DNA synthesis	Zellzyklus
NAGLU-Ups	Involved in the degradation of heparan sulfate	sonstiges

NAIP-Cor	Anti-apoptotic protein which acts by inhibiting the activities of CASP3, CASP7 and CASP9. Can inhibit the autocleavage of pro-CASP9 and cleavage of pro-CASP3 by CASP9 Acts as a mediator of neuronal survival in pathological conditions. Prevents motor-neuron apoptosis induced by a variety of signals. Possible role in the prevention of spinal muscular atrophy that seems to be caused by inappropriate persistence of motor-neuron apoptosis: mutated or deleted forms of NAIP have been found in individuals with severe spinal muscular atrophy	Antiapoptotisch, Zellzyklus
FNTA-Cor	Catalyzes the transfer of a farnesyl or geranyl-geranyl moiety from farnesyl or geranyl geranyl pyrophosphate to a cysteine at the fourth position from the C-terminus of several proteins having the C-terminal sequence Cys-aliphatic-aliphatic-X.	sonstiges
FAM90A11P-Ups	-	-
IGSF22-Cor	-	-
SIT1-Ups	Negatively regulates TCR (T-cell antigen receptor)-mediated signaling in T-cells. Involved in positive selection of T-cells	sonstiges
GRIFIN-Ups	-	-
ADAMTS15-Cor	-	-
LOC100996478-Cor	-	-
LOC101060778-Ups	-	-
LYRM4-Cor	Required for nuclear and mitochondrial iron-sulfur protein biosynthesis	Zellzyklus
MTRNR2L6-Cor	Plays a role as a neuroprotective and antiapoptotic factor	sonstiges, antiapoptotisch
USP35-Cor	-	-
ZNF607-Ups	May be involved in transcriptional regulation	Zellzyklus
KLK10-Cor	Has a tumor-suppressor role for NES1 in breast and prostate cancer	Tumorsuppressor
TMEM254-Ups	-	-

Tabelle 4: Schnittmengen der hypermethylierten Gene zwischen dem Gewebe der Kohorte 1 und den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2.

∩mit der Gewebekohorte 1		
Blutplasma	**Urin zell.**	**Urin frei**
NTMT1-Cor	ODC1-Ups	SEC63-Cor
PRRT1-Ups	EEF2K-Cor	LOC100422581-Cor
C7orf65-Cor	LOC100421361-Cor	PCDHB8-Cor
DLGAP1-AS3-Cor	MCCD1P2-Ups	ODC1-Ups
SLC9A8-Ups	DLGAP1-AS3-Cor	YRDC-Cor
PELI3-Cor	C11orf74-Cor	MIR758-Cor
MRFAP1L1-Ups	LOC100130394-Cor	ZNF512-Cor
ZNF550-Cor		OR51F5P-Cor
TAF6L-Ups		LOC100421361-Cor
RAD51D-Ups		NTMT1-Cor
		WBP11-Cor
		TRNAA2-Ups
		RPL21P95-Cor
		LINC00675-Ups
		SNRNP35-Ups
		RAD51D-Cor
		HIST1H3I-Cor
		ABCA8-Ups

		ZNF550-Cor
		RAD51D-Ups
		BTN2A3P-Ups
		RPL21P30-Cor

Tabelle 5: Schnittmengen der hypermethylierten Gene zwischen dem Gewebe der Kohorte 2 und den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2.

∩mit der Gewebekohorte 2		
Blutplasma	**Urin zell.**	**Urin frei**
PPIE-Cor	ODC1-Ups	ODC1-Ups
MIRLET7F2-Cor	PRKRIP1-Cor	SNRPFP4-Cor
OR6C2-Ups	TRNAR5-Cor	DDB1-Cor
ZNF550-Cor	OR5A2-Ups	OR5A2-Ups
LOC100996515-Cor	LSM14B-Cor	ZNF550-Cor
	FAM86GP-Ups	TRNAA2-Ups
	TRNAC14-Cor	MAGEB1-Ups
	LOC100129566-Cor	LOC100129566-Cor
	NR1D1-Ups	RNF2-Cor
	CCDC124-Ups	RNF2-Ups
	MIR516B2-Cor	PCGF6-Ups
	FLJ39639-Ups	PCGF6-Cor
	ITIH2-Cor	LOC100420404-Ups
	LOC101060826-Cor	HIST1H3I-Cor
	PKNOX2-Ups	FLJ39639-Ups
	MCCD1P2-Ups	MIR506-Cor
		ATP7A-Cor
		SRM-Ups
		CYP4F8-Ups
		METTL25-Cor

Tabelle 6: Schnittmengen der hypomethylierten Gene zwischen dem Gewebe der Kohorte 1 und den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2.

∩mit der Gewebekohorte 1		
Blutplasma	**Urin zell.**	**Urin frei**
TRNAP19-Ups	EIF4A1P3-Ups	AICDA-Cor
	OR52J2P-Ups	GRIFIN-Ups
	ALOX15P1-Cor	C19orf38-Cor
	SRP14P1-Ups	MIR4522-Cor
	LOC100420668-Cor	MIR662-Ups
	DCAF10-Cor	ARGFXP2-Ups
	LOC100419895-Cor	MT1P1-Ups
	GMIP-Ups	LIN7B-Cor
	RPL21P4-Ups	TCEB3-Ups
	NAGLU-Ups	IGF1R-Cor
	LOC100506405-Cor	LOC100420318-Cor

	FAM90A11P-Ups	MAPK8IP3-Cor
	LOC100506405-Cor	SRP14P1-Ups
	CEACAMP1-Cor	LOC100420668-Cor
	LOC100509484-Cor	SOCS1-Cor
	FAM90A11P-Ups	VTI1BP3-Cor
		KLK10-Cor
		SH3BP2-Cor
		IZUMO4-Cor
		PIEZO1P1-Ups
		SUGP1-Cor
		RPL21P4-Ups
		ABHD16A-Ups
		RANGAP1-Ups
		RPL9P17-Ups
		LOC100130527-Cor
		PRKCG-Cor
		KBTBD11-Ups
		RPL7AP64-Cor
		ANKRD16-Cor
		USHBP1-Cor
		LMTK3-Cor
		LOC100130527-Cor
		ZNF221-Ups
		PRKCG-Cor
		KBTBD11-Ups
		CTXN2-Cor
		HMGB3P28-Ups
		RPL7AP64-Cor
		IQCF5-Cor
		ANKRD16-Cor
		FLYWCH1-Cor
		KRTAP5-10-Cor
		TBX3-Cor
		SMARCC2-Cor
		HMGB2P1-Ups
		RPL9P29-Cor
		LOC100420863-Ups
		LOC100190922-Ups
		USHBP1-Cor
		SIT1-Ups

Tabelle 7: Schnittmengen der hypomethylierten Gene zwischen dem Gewebe der Kohorte 2 und den Körperflüssigkeiten der Kohorte 2.

∩mit der Gewebekohorte 2		
Blutplasma	**Urin zell.**	**Urin frei**
TTTY11-Ups	RPL17P22-Ups	LOC724105-Cor
LOC100288310-Ups	MTRNR2L6-Cor	FAM90A24P-Cor
	RAB40C-Cor	APLP2-Ups
	MIR526A2-Cor	HMOX1-Cor
	MAGEA11-Ups	KLK10-Cor
	NAGLU-Ups	XPO5-Cor
	TCEB3-Cor	LOC100996515-Ups
	ZNF135-Cor	MIR524-Ups
	NDUFV1-Ups	ZNF586-Ups
	LOC729835-Ups	TCEB3-Cor
	ZNF653-Ups	LOC100130394-Ups
	ZG16B-Cor	GRIFIN-Ups
	PCBP3-Cor	C9orf133-Cor
	FAM90A11P-Ups	ALAD-Cor
	C16orf58-Ups	SLC2A3-Ups
		RANGAP1-Ups
		ABT1-Cor
		LOC100128398-Cor
		ZFP36-Cor
		TRNAI22-Cor
		VTRNA1-1-Ups
		PDCD2-Ups
		ASCL2-Ups
		PDGFA-Cor
		BBC3-Cor
		LOC400743-Ups
		ATP1B2-Ups
		SIT1-Ups
		TMEM254-Ups
		ORAI3-Ups

Tabelle 8: Zieltargets der hypermethylierten miRNAs aus der Schnittmenge der Gewebekohorte 1 und 2. Erstellt mittels der Datenbank miRBas.

miRNA 30C1

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	100	TNRC6A	trinucleotide repeat containing 6A	Plays a role in RNA-mediated gene silencing by both micro-RNAs (miRNAs) and short interfering RNAs (siRNAs). Required for miRNA-dependent repression of translation and for siRNA-dependent endonucleolytic cleavage of complementary mRNAs by argonaute family proteins. As scaffoldng protein associates with argonaute proteins bound to partially complementary mRNAs and simultaneously can recruit CCR4-NOT and PAN deadenylase complexes
2	100	CELSR3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)	Receptor that may have an important role in cell/cell signaling during nervous system formation
3	99	MIER3	mesoderm induction early response 1, family member 3	Transcriptional repressor
4	99	EED	embryonic ectoderm development	Component of the PRC2/EED-EZH2 complex, which methylates 'Lys-9' and 'Lys-27' of histone H3, leading to transcriptional repression of the affected target gene. Also recognizes 'Lys-26' trimethylated histone H1 with the effect of inhibiting PRC2 complex methyltransferase activity on nucleosomal histone H3 'Lys-27', whereas H3 'Lys-27' recognition has the opposite effect, enabling the propagation of this repressive mark. The PRC2/EED-EZH2 complex may also serve as a recruiting platform for DNA methyltransferases, thereby linking two epigenetic repression systems. Genes repressed by the PRC2/EED-EZH2 complex include HOXC8, HOXA9, MYT1 and CDKN2A
5	99	LHX8	LIM homeobox 8	Transcription factor involved in differentiation of certain neurons and mesenchymal cells
6	99	PPARGC1B	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	Plays a role of stimulator of transcription factors and nuclear receptors activities. Activates transcritional activity of estrogen receptor alpha, nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and glucocorticoid receptor in the presence of glucocorticoids. May play a role in constitutive non-adrenergic-mediated mitochondrial biogenesis as suggested by increased basal oxygen consumption and mitochondrial number when overexpressed. May be involved in fat oxidation and non-oxidative glucose metabolism and in the regulation of energy expenditure
7	99	PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2	May play a role in transcription regulation
8	98	SCN2A	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit	Mediates the voltage-dependent sodium ion permeability of excitable membranes. Assuming opened or closed conformations in response to the voltage difference across the membrane, the protein forms a sodium-selective channel through which Na(+) ions may pass in accordance with their electrochemical gradient
9	98	ANKRA2	ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	May facilitate endocytosis by linking megalin to components of the cytoskeleton or endocytic machinery
10	98	RTKN2	rhotekin 2	May play an important role in lymphopoiesis
11	98	YAF2	YY1 associated factor 2	Binds to MYC and inhibits MYC-mediated transactivation. Also binds to MYCN and enhances MYCN-dependent transcriptional activation. Increases calpain 2-mediated proteolysis of YY1 in vitro. Component of the E2F6.com-1 complex, a repressive complex that methylates 'Lys-9' of histone H3, suggesting that it is involved in chromatin-remodeling
12	98	ELMOD2	ELMO/CED-12 domain containing 2	Acts as a GTPase-activating protein (GAP) toward guanine nucleotide exchange factors like ARL2, ARL3, ARF1 and ARF6, but not for GTPases outside the Arf family. Regulates IFN-

				related antiviral responses
13	98	BRWD3	bromodomain and WD repeat domain containing 3	Plays a role in the regulation of cell morphology and cytoskeletal organization. Required in the control of cell shape
14	98	KLHL28	kelch-like 28 (Drosophila)	is a protein-coding gene. An important paralog of this gene is KLHL17
15	97	PIP4K2A	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	Catalyzes the phosphorylation of phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P) on the fourth hydroxyl of the myo-inositol ring, to form phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P2). May exert its function by regulating the levels of PtdIns5P, which functions in the cytosol by increasing AKT activity and in the nucleus signals through ING2. May regulate the pool of cytosolic PtdIns5P in response to the activation of tyrosine phosphorylation. May negatively regulate insulin-stimulated glucose uptake by lowering the levels of PtdIns5P. May be involved in thrombopoiesis, and the terminal maturation of megakaryocytes and regulation of their size
16	97	B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	plays a key role in the synthesis of lacto- or neolacto-series carbohydrate chains on glycolipids, notably by participating in biosynthesis of HNK-1 and Lewis X carbohydrate structures. Has strong activity toward lactosylceramide (LacCer) and neolactotetraosylceramide (nLc(4)Cer; paragloboside), resulting in the synthesis of Lc(3)Cer and neolactopentaosylceramide (nLc(5)Cer), respectively. Probably plays a central role in regulating neolacto-series glycolipid synthesis during embryonic development
17	96	BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1	May be a transcriptional activator. May be involved in chromatin remodeling (By similarity). Plays a role in the regulation of cell morphology and cytoskeletal organization. Required in the control of cell shape
18	96	SLC5A3	solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3	Prevents intracellular accumulation of high concentrations of myo-inositol (an osmolyte) that result in impairment of cellular function
19	96	HTR1F	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F	This is one of the several different receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin), a biogenic hormone that functions as a neurotransmitter, a hormone, and a mitogen. The activity of this receptor is mediated by G proteins that inhibit adenylate cyclase activity
20	96	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1, U	Catalyzes the covalent attachment of ubiquitin to other proteins. Functions in the selective degradation of misfolded membrane proteins from the endoplasmic reticulum (ERAD)

miRNA 500B

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	94	LUC7L3	LUC7-like 3 (S. cerevisiae)	Binds cAMP regulatory element DNA sequence. May play a role in RNA splicing
2	91	ACE2	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	Carboxypeptidase which converts angiotensin I to angiotensin 1-9, a peptide of unknown function, and angiotensin II to angiotensin 1-7, a vasodilator. Also able to hydrolyze apelin-13 and dynorphin-13 with high efficiency. May be an important regulator of heart function. In case of human coronaviruses SARS and HCoV-NL63 infections, serve as functional receptor for the spike glycoprotein of both coronaviruses
3	90	CHSY1	chondroitin sulfate synthase 1	Has both beta-1,3-glucuronic acid and beta-1,4-N-acetylgalactosamine transferase activity. Transfers glucuronic acid (GlcUA) from UDP-GlcUA and N-acetylgalactosamine (GalNAc) from UDP-GalNAc to the non-reducing end of the elongating chondroitin polymer. Involved in the negative control of osteogenesis likely through the modulation of NOTCH signaling
4	88	RBM27	RNA binding motif protein 27	is a protein-coding gene. GO annotations related to this gene include *RNA binding* and *nucleotide binding*. An important paralog of this gene is RBM26

5	87	ARHGEF3	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	Acts as guanine nucleotide exchange factor (GEF) for RhoA and RhoB GTPases
6	86	SYNC	syncoilin, intermediate filament protein	This gene encodes a member of the intermediate filament family which contains an N-terminal head domain, followed by a central coiled-coil region and a short C-terminal tail. The protein is highly expressed in skeletal and cardiac muscle. The protein links the dystrophin associated protein complex (DAPC) to desmin filaments in muscle and may have a structural role in striated muscle. Multiple transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene
7	86	CTCF	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)	Testis-specific DNA binding protein responsible for insulator function, nuclear architecture and transcriptional control, which probably acts by recruiting epigenetic chromatin modifiers. Plays a key role in gene imprinting in male germline, by participating in the establishment of differential methylation at the IGF2/H19 imprinted control region (ICR). Directly binds the unmethylated H19 ICR and recruits the PRMT7 methyltransferase, leading to methylate histone H4 'Arg-3' to form H4R3sme2. This probably leads to recruit de novo DNA methyltransferases at these sites (By similarity). Seems to act as tumor suppressor. In association with DNMT1 and DNMT3B, involved in activation of BAG1 gene expression by binding to its promoter. Required for dimethylation of H3 lysine 4 (H3K4me2) of MYC and BRCA1 promoters
8	85	EIF3A	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2:GTP:methionyl-tRNAi and eIF-5 to form the 43S preinitiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of post-termination ribosomal complexes and subsequently prevents premature joining of the 40S and 60S ribosomal subunits prior to initiation
9	85	HDAC2	histone deacetylase 2	Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4). Histone deacetylation gives a tag for epigenetic repression and plays an important role in transcriptional regulation, cell cycle progression an developmental events. Histone deacetylases act via the formation of large multiprotein complexes. Forms transcriptional repressor complexes by associating with MAD, SIN3, YY1 and N-COR. Interacts in the late S-phase of DNA-replication with DNMT1 in the other transcriptional repressor complex composed of DNMT1, DMAP1, PCNA, CAF1. Deacetylates TSHZ3 and regulates its transcriptional repressor activity. Component of a RCOR/GFI/KDM1A/HDAC complex that suppresses, via histone deacetylase (HDAC) recruitment, a number of genes implicated in multilineage blood cell development
10	82	ALS2	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)	May act as a GTPase regulator. Controls survival and growth of spinal motoneurons
11	82	RPTN	repetin	Involved in the cornified cell envelope formation. Multifunctional epidermal matrix protein. Reversibly binds calcium
12	82	MERTK	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Receptor tyrosine kinase that transduces signals from the extracellular matrix into the cytoplasm by binding to several ligands including LGALS3, TUB, TULP1 or GAS6. Regulates many physiological processes including cell survival, migration, differentiation, and phagocytosis of apoptotic cells (efferocytosis). Ligand binding at the cell surface induces autophosphorylation of MERTK on its intracellular domain that provides docking sites for downstream signaling molecules. Following activation by ligand, interacts with GRB2 or PLCG2 and induces phosphorylation of MAPK1, MAPK2, FAK/PTK2 or RAC1. MERTK signaling plays a role in various processes such as macrophage clearance of apoptotic cells, platelet aggregation,

				cytoskeleton reorganization and engulfment.
13	81	CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	is a protein-coding gene. Diseases associated with CLMN include *emery-dreifuss muscular dystrophy*, and *muscular dystrophy*. GO annotations related to this gene include *actin binding*. An important paralog of this gene is ACTN4
14	81	TBCCD1	TBCC domain containing 1	Plays a role in the regulation of centrosome and Golgi apparatus positioning, with consequences on cell shape and cell migration
15	80	UHMK1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	Upon serum stimulation, phosphorylates CDKN1B/p27Kip1, thus controlling CDKN1B subcellular location and cell cycle progression in G1 phase. May be involved in trafficking and/or processing of RNA
16	80	CCDC67	coiled-coil domain containing 67	is a protein-coding gene. Diseases associated with CCDC67 include *gastric cancer*. An important paralog of this gene is CEP63.
17	80	SUZ12	suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	Polycomb group (PcG) protein. Component of the PRC2/EED-EZH2 complex, which methylates 'Lys-9' (H3K9me) and 'Lys-27' (H3K27me) of histone H3, leading to transcriptional repression of the affected target gene. The PRC2/EED-EZH2 complex may also serve as a recruiting platform for DNA methyltransferases, thereby linking two epigenetic repression systems. Genes repressed by the PRC2/EED-EZH2 complex include HOXC8, HOXA9, MYT1 and CDKN2A
18	80	SNX18	sorting nexin 18	May be involved in several stages of intracellular trafficking. Plays a role in endocytosis via clathrin-coated pits, but also clathrin-independent, actin-dependent fluid-phase endocytosis. Plays a role in macropinocytosis. Binds to membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and promotes membrane tubulation. Stimulates the GTPase activity of DNM2. Promotes DNM2 location at the plasma membrane
19	80	NIP7	nuclear import 7 homolog (S. cerevisiae)	Required for proper 34S pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit assembly
20	79	GUF1	GUF1 GTPase homolog (S. cerevisiae)	Promotes mitochondrial protein synthesis. May act as a fidelity factor of the translation reaction, by catalyzing a one-codon backward translocation of tRNAs on improperly translocated ribosomes. Binds to mitochondrial ribosomes in a GTP-dependent manner

miRNA 4493

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	87	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Apoptosis regulator protein which may function as a crucial link between cell survival and cell death pathways in mammalian cells. Acts as an inhibitor of TNFRSF6 mediated apoptosis. A proteolytic fragment (p43) is likely retained in the death-inducing signaling complex (DISC) thereby blocking further recruitment and processing of caspase-8 at the complex. Full length and shorter isoforms have been shown either to induce apoptosis or to reduce TNFRSF-triggered apoptosis. Lacks enzymatic (caspase) activity
2	85	DEK	DEK oncogene	Involved in chromatin organization
3	83	IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	Binds to the 5'-UTR of the insulin-like growth factor 2 (IGF2) mRNAs. Binding is isoform-specific. May regulate translation of target mRNAs
4	82	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	Catalyzes the conversion of phosphatidic acid (PA) to diacylglycerol (DG). In addition it hydrolyzes lysophosphatidic acid (LPA), ceramide-1-phosphate (C-1-P) and sphingosine-1-phosphate (S-1-P). The relative catalytic efficiency is LPA = PA > C-1-P > S-1-P. May be involved in cell adhesion and in cell-cell interactions

5	81	ZNF367	zinc finger protein 367	Transcriptional activator. Isoform 1 may be involved in transcriptional activation of erythroid genes
6	81	PRKAA1	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	Catalytic subunit of AMP-activated protein kinase (AMPK), an energy sensor protein kinase that plays a key role in regulating cellular energy metabolism. In response to reduction of intracellular ATP levels, AMPK activates energy-producing pathways and inhibits energy-consuming processes: inhibits protein, carbohydrate and lipid biosynthesis, as well as cell growth and proliferation. Also acts as a regulator of cellular polarity by remodeling the actin cytoskeleton; probably by indirectly activating myosin. Regulates lipid synthesis by phosphorylating and inactivating lipid metabolic enzymes. Regulates insulin-signaling and glycolysis by phosphorylating IRS1, PFKFB2 and PFKFB3. AMPK stimulates glucose uptake in muscle by increasing the translocation of the glucose transporter SLC2A4/GLUT4 to the plasma membrane, possibly by mediating phosphorylation of TBC1D4/AS160. Regulates transcription and chromatin structure by phosphorylating transcription regulators involved in energy metabolism. Acts as a key regulator of glucose homeostasis in liver by phosphorylating
7	81	GOLPH3	golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)	Mediates the cis and medial Golgi localization of mannosyltransferases through direct binding of their cytosolic domains. Involved in modulation of mTOR signaling. Involved in the regulation of mitochondrial lipids, leading to increase of mitochondrial mass. Potential oncogene
8	80	PSKH1	protein serine kinase H1	May be a SFC-associated serine kinase (splicing factor compartment-associated serine kinase) with a role in intranuclear SR protein (non-snRNP splicing factors containing a serine/arginine-rich domain) trafficking and pre-mRNA processing
9	80	ZNF594	zinc finger protein 594	May be involved in transcriptional regulation
10	79	WDR59	WD repeat domain 59	is a protein-coding gene. GO annotations related to this gene include *molecular_function*. An important paralog of this gene is WDR24.
11	79	ZNF780A	zinc finger protein 780A	May be involved in transcriptional regulation
12	77	PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	Likely to represent a ubiquitous endoprotease activity within constitutive secretory pathways and capable of cleavage at the RXXX[KR]R consensus motif
13	77	CXorf30	chromosome X open reading frame 30	is a protein-coding gene
14	77	CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	Catalyzes the formation of aromatic C18 estrogens from C19 androgens
15	76	CHD1	chromodomain helicase DNA binding protein 1	ATP-dependent chromatin-remodeling factor which functions as substrate recognition component of the transcription regulatory histone acetylation (HAT) complex SAGA. Regulates polymerase II transcription. Also required for efficient transcription by RNA polymerase I, and more specifically the polymerase I transcription termination step. Regulates negatively DNA replication. Not only involved in transcription-related chromatin-remodeling, but also required to maintain a specific chromatin configuration across the genome. Is also associated with histone deacetylase (HDAC) activity (By similarity). Required for the bridging of SNF2, the FACT complex, the PAF complex as well as the U2 snRNP complex to H3K4me3. Functions to modulate the efficiency of pre-mRNA splicing in part through physical bridging of spliceosomal components to H3K4me3. Required for maintaining open chromatin and pluripotency in embryonic stem cells
16	76	PSME3	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	Subunit of the 11S REG-gamma (also called PA28-gamma) proteasome regulator, a doughnut-shaped homoheptamer which associates with the proteasome. 11S REG-gamma activates the trypsin-like catalytic subunit of the proteasome but inhibits the chymotrypsin-like and postglutamyl-preferring (PGPH) subunits. Facilitates the MDM2-p53/TP53 interaction

				which promotes ubiquitination- and MDM2-dependent proteasomal degradation of p53/TP53, limiting its accumulation and resulting in inhibited apoptosis after DNA damage. May also be involved in cell cycle regulation
17	76	DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	Involved in the alternative regulation of pre-mRNA splicing; its RNA helicase activity is necessary for increasing tau exon 10 inclusion and occurs in a RBM4-dependent manner. Involved in the alternative regulation of pre-mRNA splicing; its RNA helicase activity is necessary for increasing tau exon 10 inclusion and occurs in a RBM4-dependent manner
18	75	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	is a protein-coding gene. Diseases associated with LONRF2 include *neuroblastoma*. GO annotations related to this gene include *ATP-dependent peptidase activity* and *zinc ion binding*. An important paralog of this gene is LONRF3.
19	75	FBXL20	F-box and leucine-rich repeat protein 20	Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex. Role in neural transmission
20	75	UBR2	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	E3 ubiquitin-protein ligase which is a component of the N-end rule pathway. Recognizes and binds to proteins bearing specific N-terminal residues that are destabilizing according to the N-end rule, leading to their ubiquitination and subsequent degradation. Plays a critical role in chromatin inactivation and chromosome-wide transcriptional silencing during meiosis via ubiquitination of histone H2A. Binds leucine and is a negative regulator of the leucine-mTOR signaling pathway, thereby controlling cell growth

Tabelle 9: (A) Hyper- und (B) hypomethylierte microRNAs im Blutplasma und Urin.

A)

	microRNA	BPK1	BPK2	BPK3	BPK4	BPT1	BPT2	BPT3	BPT4	BPT5	BPT6	Chr	Start	End	Votes
Blutplasma	MIR526A2-Cor	0.45908	0.0346	-0.46563	-0.92351	1.162	-0.090137	10.861	-0.033789	0.79592	14.045	19	50549228	50550218	4
	MIR302E-Ups	0.72959	0.019075	-0.32493	-0.572	0.97863	0.32624	13.066	-0.60163	0.24469	0.43264	11	6913024	6913912	2
	MIR194-2-Cor	-0.51988	-0.059051	-0.83989	-0.29383	-0.10843	-0.7022	0.2109	12.706	0.84827	0.2095	11	60985896	60986420	2
Urin zellulär	microRNA	UZK1	UZK2	UZK3	UZK4	UZT1	UZT2	UZT3	UZT4	UZT5	UZT6	Chr	Start	End	Votes
	MIR516B2-Cor	0.18205	14.503	-0.58608	13.521	-0.98515	15.631	18.994	20.302	0.9735	0.098864	19	50547828	50548732	3
	MIR302E-Ups	0.78182	-0.4494	0.41118	-0.54152	-0.052624	11.613	20.973	14.507	0.10278	-0.022657	11	6913024	6913912	3
	MIR4495-Ups	0.15515	-17.411	0.24188	-0.685	10.147	-0.79211	-1.845	-0.10763	-14.923	0.40042	12	95396565	95397377	2
Urin frei	microRNA	UFK1	UFK2	UFK3	UFK4	UFT1	UFT2	UFT3	UFT4	UFT5	UFT6	Chr	Start	End	Votes
	MIR194-2-Cor	-16.291	0.4298	-0.9711	0.63843	0.74893	-14.123	-10.691	-0.49727	0.96013	22.242	11	60985896	60986420	4
	MIR5003-Ups	-1.335	0.41776	-0.15168	0.027906	0.83966	-0.50484	16.252	-19.124	0.48078	0.72094	5	167182790	167183732	3
	MIR3662-Ups	12.216	-0.21783	-0.84619	0.15408	0.51455	0.75213	-1.956	21.441	0.34551	16.516	6	132865855	132866237	3
	MIR3609-Cor	0.63121	-0.3474	0.5673	0.2022	0.30097	0.85561	13.026	14.994	14.469	0.14611	7	93112097	93112621	3
	MIR609-Ups	10.383	-1.304	0.0005495	-26.932	0.29675	0.26946	-0.17266	-0.29613	0.11705	0.74753	10	99610945	99611861	3
	MIR302E-Ups	0.41933	-12.244	0.11521	0.2628	-0.061895	-0.11241	18.485	16.912	10.307	0.43482	11	6913024	6913912	3
	MIR4270-Ups	-0.24856	-12.043	0.87993	0.17181	0.56718	0.69405	-12.227	-10.269	0.14586	11.911	3	15473665	15474605	2
	MIR548A2-Ups	-0.34908	0.94954	0.67792	0.18787	17.621	0.022082	-0.75576	0.85662	0.69421	0.73428	6	133122741	133123141	2
	MIR101-2-Ups	0.025918	0.29919	-0.03399	0.17263	-11.156	0.55612	0.078612	18.045	0.41139	-0.66325	9	4804396	4804910	2
	MIR513C-Ups	0.48164	0.15924	0.23768	0.068364	0.30244	0.46386	12.545	0.9642	14.137	0.21014	X	135232780	135233560	2
	MIR379-Cor	-0.94278	0.39866	0.49755	-0.29765	10.222	0.069323	0.095583	0.76185	12.813	-0.014374	14	81671595	81672279	2
	MIR758-Cor	-0.37985	-0.57838	-0.84677	0.71903	11.297	-0.12313	0.090578	0.82739	-0.93321	0.29613	14	81675752	81676128	2
	MIR3919-Cor	-0.16049	-0.58061	0.6398	0.34999	0.33145	0.95137	12.807	14.264	-0.13858	0.47	3	156396628	156397552	2
	MIR22HG-Cor	-1.371	17.709	-0.15323	-11.883	11.869	-0.95097	10.043	0.74184	0.37541	0.44984	17	1518784	1519088	2
	MIR548T-Ups	-0.58622	-0.18341	0.31714	-0.024942	12.568	0.23761	1.382	-0.66013	0.24833	0.65925	4	169935688	169936466	2
	MIR548AK-Ups	-0.79367	-0.1891	-0.12945	-0.61904	0.35271	-12.019	0.14507	12.876	0.89093	-0.19207	10	12090629	12090807	2
	MIR30C1-Ups	-0.79481	-16.089	0.17357	-0.098162	0.38806	-0.11185	-0.12891	-0.20849	14.467	0.45663	1	39339665	39340559	2
	MIR506-Cor	0.53398	0.089464	0.33757	-0.17771	0.49123	0.27406	25.623	0.98348	18.895	0.052579	X	135272861	135273439	2

B)

	Gene	BPK1	BPK2	BPK3	BPK4	BPT1	BPT2	BPT3	BPT4	BPT5	BPT6	Chr	Start	End	Votes
Blutplasma	MIR5197-Cor	13.428	0.23065	0.3408	0.062094	-0.83993	0.047635	-0.65446	0.25113	0.036277	0.72639	5	138205988	138206890	2
	MIR376A1-Cor	0.84326	0.25737	-0.24114	0.20735	0.79795	0.15279	0.631	-0.97499	0.57307	13.934	14	81690542	81690740	2
Urin zellulär	Gene	UZK1	UZK2	UZK3	UZK4	UZT1	UZT2	UZT3	UZT4	UZT5	UZT6	Chr	Start	End	Votes
	MIR526A2-Cor	-0.46759	12.502	-0.35668	11.355	-0.97258	-21.493	13.925	0.78748	1.384	-0.15901	19	50549228	50550218	3
	MIR4457-Cor	0.63293	0.94152	-11.604	-13.247	-27.202	-0.12014	-0.49143	-0.81815	-24.852	25.631	5	1289350	1290280	3
	MIR4457-Ups	0.67862	10.542	-11.172	-12.846	-26.563	-0.35836	-0.27681	-0.85855	-21.904	24.687	5	1290524	1291248	3
	MIR3655-Cor	-0.13001	-10.324	-0.62214	0.24185	-0.73178	-0.016372	-17.306	-0.082698	-18.522	12.343	5	135172688	135173166	3
	MIR30C1-Cor	-0.22548	-0.3824	0.48998	0.51565	14.166	-0.65511	-10.538	-10.434	-0.70396	0.52418	1	39340665	39341540	3
	MIR22HG-Cor	0.83336	11.866	0.44472	0.92451	10.489	-0.96534	10.117	0.71891	0.99524	-15.275	17	1518784	1519088	2
	MIR769-Cor	-0.12067	11.784	-0.2764	0.95239	0.2051	-0.40965	-0.055655	-0.60323	0.23277	-2.377	19	42949760	42950305	2
	MIR4300-Cor	0.25391	15.076	0.68931	0.63392	-0.66671	-11.326	0.68491	0.20066	0.14415	-0.14198	11	77897557	77898433	2
	MIR376A1-Cor	-0.27394	0.22265	0.67496	10.735	-0.85608	14.054	-0.43692	-0.81979	-0.37215	0.095983	14	81690542	81690740	2
	MIR658-Cor	1.243	0.40452	0.59174	0.10503	0.35874	-0.59516	0.89409	-0.7558	-0.1	0.14063	22	21206816	21207217	2
	MRFAP1L1-Ups	-0.44645	1.132	0.36437	0.26426	-0.73282	-0.22279	0.98169	-0.027313	0.12884	-0.76151	4	6643797	6644722	2
	MIR324-Ups	-0.19567	0.59151	0.058345	-0.85361	-0.91126	-0.83864	-0.037803	0.73853	12.556	-26.509	17	7019203	7020093	2
	MIR4749-Ups	0.97624	0.000206	-0.4918	-0.73665	11.137	-0.698	-0.74199	-15.454	-0.74816	-0.53485	19	46732782	46733680	2
	MIR4428-Cor	-0.20061	0.12707	-0.11206	0.83216	0.37667	12.092	-0.96901	0.28738	0.8548	10.998	1	208090433	208091409	2
	MIR500B-Ups	-0.4143	0.78456	0.33108	0.14944	-0.97377	0.48392	-0.10307	0.18861	13.635	0.14438	X	47244558	47244854	2

	Gene	UFK1	UFK2	UFK3	UFK4	UFT1	UFT2	UFT3	UFT4	UFT5	UFT6	Chr	Start	End	Votes
Urin frei	MIR4457-Cor	-0.21002	1.159	-0.47084	2.999	-35.871	-14.585	-0.73533	-10.533	-0.98428	-0.81023	5	1289350	1290280	6
	MIR4457-Ups	-0.021765	11.866	-0.39762	27.579	-34.859	-11.116	-0.71645	-10.594	-0.94424	-0.94349	5	1290524	1291248	6
	MIR548O2-Cor	0.22369	10.125	0.085083	-0.051385	-0.81373	-0.90522	-17.243	-0.86137	-0.95986	-0.028081	20	33881639	33882445	5
	MIR596-Cor	21.194	0.38431	-0.37632	0.60149	-0.47977	-10.695	-0.75022	-30.033	0.00833	-0.11339	8	1578966	1579479	4
	MIR662-Ups	0.72564	12.425	-0.54405	0.80296	-24.727	-16.892	-0.40414	0.11087	-0.9012	-0.50092	16	740897	741385	4
	MIR551A-Cor	-0.40005	0.49436	-0.34966	0.44473	-18.032	-0.063706	-18.187	-0.43937	15.862	-11.471	1	2772268	2772648	4
	MIR3972-Ups	-0.49071	0.8809	0.14045	Jan 91	-0.11664	-0.44843	-0.41432	-0.24293	-0.467	-0.065024	1	15846606	15847126	3
	MIR520C-Cor	-0.81225	0.17368	0.27723	-0.60292	-0.639	-0.85326	0.33279	-16.701	-14.258	12.139	19	50530060	50530844	3
	MIR4522-Cor	-0.80058	1.609	-0.64094	16.557	-25.724	-20.167	-0.32427	0.099642	0.28036	-0.46448	17	21827895	21828355	2
	MIR4692-Ups	0.54213	26.559	0.13258	10.637	-0.26266	-14.581	10.239	0.42446	14.307	0.11992	11	68788461	68788847	2
	MIR30C1-Cor	11.666	-0.56249	0.93629	-0.44208	0.34711	-0.77768	-19.449	-0.57806	-0.30593	0.2815	1	39340665	39341540	2
	MIR4667-Ups	0.68335	0.44127	16.672	-0.2528	-0.11799	0.14779	0.019488	0.51772	-0.42457	-14.627	9	35562745	35563221	2
	MIR338-Cor	12.916	0.88548	-13.329	-0.57801	-10.402	-0.84291	-16.372	-0.22017	-0.027551	-0.040204	17	74538045	74538563	2
	MIR4493-Ups	0.53041	10.033	-0.48154	-0.7381	0.70235	-12.427	-13.094	0.31121	-0.78669	-0.10455	11	119194393	119195291	2
	MIR518B-Cor	0.81703	12.607	0.0383	0.75866	-0.4985	-0.41696	10.171	-0.1074	0.69322	0.8092	19	50525184	50526076	2
	MIR2115-Cor	14.962	13.376	0.081074	-0.30264	0.72396	-0.39857	0.89676	-0.16821	-0.51853	0.95265	3	48411581	48412266	2
	MIR524-Ups	0.087695	0.34759	13.965	0.28314	-0.55701	-0.31967	0.96393	-0.59838	0.014648	0.072175	19	50532786	50533062	2
	MIR3911-Ups	0.25792	-0.62922	0.20933	0.42041	-2.087	0.54618	-0.040281	12.504	0.052691	-0.19741	9	100069795	100070371	2
	MRPL10-Cor	0.25176	-0.32385	0.099216	-0.20046	-0.32097	11.275	-0.59384	-21.432	0.27457	-0.40722	17	41277399	41277775	2
	MIR518D-Ups	-0.69838	0.84779	0.12654	-0.58046	0.59227	-0.58344	-20.336	12.084	-0.44473	-0.005206	19	50556236	50556636	2
	MIR520B-Cor	0.58472	0.29775	-0.23753	0.002986	0.6143	-0.40471	-1.567	13.664	0.86059	-0.28629	19	50523686	50524582	2
	MIR621-Ups	0.2124	0.076882	0.088697	-0.22843	-0.38405	0.67373	-14.825	-0.92232	0.21317	14.786	13	22183872	22184758	2

Tabelle 10: Zieltargets und Funktionen der hypermethylierten miRNAs aus der Schnittmenge der freien sowie zellulären Urin-DNA mit beiden Gewebekohorten (miRBase).

miRNA 758

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	97	AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	Binds to regulatory subunit (RII) of protein kinase A. May be involved in establishing polarity in signaling systems or in integrating PKA-RII isoforms with downstream effectors to capture, amplify and focus diffuse, trans-cellular signals carried by cAMP
2	97	USH2A	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)	Involved in hearing and vision
3	93	DGKE	diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa	Highly selective for arachidonate-containing species of diacylglycerol (DAG). May terminate signals transmitted through arachidonoyl-DAG or may contribute to the synthesis of phospholipids with defined fatty acid composition
4	92	ZNF250	zinc finger protein 250	May be involved in transcriptional regulation
5	90	PALM2-AKAP2	PALM2-AKAP2 readthrough	still unknown
6	90	ZNF28	zinc finger protein 28	May be involved in transcriptional regulation
7	89	ZNF761	zinc finger protein 761	May be involved in transcriptional regulation
8	89	RAD18	RAD18 homolog (S. cerevisiae)	E3 ubiquitin-protein ligase involved in postreplication repair of UV-damaged DNA. Postreplication repair functions in gap-filling of a daughter strand on replication of damaged DNA. Associates to the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBE2B to form the UBE2B-RAD18 ubiquitin ligase complex involved in mono-ubiquitination of DNA-associated PCNA on 'Lys-164'. Has ssDNA binding activity
9	88	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	Functions as a sodium-dependent amino acid transporter. Mediates the saturable, pH-sensitive and electrogenic cotransport of glutamine and sodium ions with a stoichiometry of 1:1. May also transport small zwitterionic and aliphatic amino acids with a lower affinity. May supply glutamatergic and GABAergic neurons with glutamine which is required for the synthesis of the neurotransmitters glutamate and GABA
10	88	PRRG1	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1	This gene encodes a vitamin K-dependent, gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing, single-pass transmembrane protein. This protein contains a Gla domain at the N-terminus, preceded by a propeptide sequence required for post-translational gamma-carboxylation of specific glutamic acid residues by a vitamin K-dependent gamma-carboxylase
11	87	ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse)	Regulates intra- and extracellular levels of inorganic pyrophosphate (PPi), probably functioning as PPi transporter
12	87	LRRTM4	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4	May play a role in the development and maintenance of the vertebrate nervous system. Exhibits strong synaptogenic activity, restricted to excitatory presynaptic differentiation
13	86	STK40	serine/threonine kinase 40	May be a negative regulator of NF-kappa-B and p53-mediated gene transcription
14	84	SLC30A8	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8	Facilitates the accumulation of zinc from the cytoplasm into intracellular vesicles, being a zinc-efflux transporter. May be a major component for providing zinc to insulin maturation and/or storage processes in insulin-secreting pancreatic beta-cells
15	84	ADAMTS17	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17	This gene encodes a member of the ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) protein family. ADAMTS family members share several distinct protein modules, including a propeptide region, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, and a thrombospondin type 1 (TS) motif.
16	84	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	In the nervous system, could hydrolyze ATP and other nucleotides to regulate purinergic neurotransmission. Could also be implicated in the prevention of platelet aggregation by hydrolyzing platelet-activating ADP to AMP. Hydrolyzes ATP and ADP equally well
17	81	BMP7	bone morphogenetic protein	Induces cartilage and bone formation. May be the

			7	osteoinductive factor responsible for the phenomenon of epithelial osteogenesis. Plays a role in calcium regulation and bone homeostasis
18	80	PSME4	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	Associated component of the proteasome that specifically recognizes acetylated histones and promotes ATP- and ubiquitin-independent degradation of core histones during spermatogenesis and DNA damage response. Also involved in DNA damage response in somatic cells, by promoting degradation of histones following DNA double-strand breaks
19	80	HRH4	histamine receptor H4	The H4 subclass of histamine receptors could mediate the histamine signals in peripheral tissues. Displays a significant level of constitutive activity (spontaneous activity in the absence of agonist)
20	79	MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	Catalyzes the transfer of a methyl group from methyl-cobalamin to homocysteine, yielding enzyme-bound cob(I)alamin and methionine. Subsequently, remethylates the cofactor using methyltetrahydrofolate

miRNA 516B2

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	95	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1	still unknown
2	91	IVD	isovaleryl-CoA dehydrogenase	IVD is a mitochondrial matrix enzyme that catalyzes the third step in leucine catabolism
3	91	KIAA1467	KIAA1467	still unknown
4	90	CCDC93	coiled-coil domain containing 93	still unknown
5	90	ATF7	activating transcription factor 7	Plays important functions in early cell signaling. Binds the cAMP response element (CRE) (consensus: 5'-GTGACGT[AG][AG]-3'), a sequence present in many viral and cellular promoters. Activator of the NF-ELAM1/delta-A site of the E-selectin promoter. Has no intrinsic transcriptional activity, but activates transcription on formation of JUN or FOS heterodimers. Also can bind TRE promoter sequences when heterodimerized with members of the JUN family
6	89	MRPL34	mitochondrial ribosomal protein L34	Mammalian mitochondrial ribosomal proteins are encoded by nuclear genes and help in protein synthesis within the mitochondrion
7	88	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	Activation of long-chain fatty acids for both synthesis of cellular lipids, and degradation via beta-oxidation. Plays an important role in fatty acid metabolism in brain and the acyl-CoAs produced may be utilized exclusively for the synthesis of the brain lipid
8	88	PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	Cyclic nucleotide phosphodiesterase with a dual-specificity for the second messengers cAMP and cGMP, which are key regulators of many important physiological processes. Has a higher affinity for cGMP than for cAMP
9	87	COMMD9	COMM domain containing 9	still unknown
10	87	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	Carries out a dual function: signal transduction and activation of transcription. Involved in IL12 signaling
11	86	RSU1	Ras suppressor protein 1	Potentially plays a role in the Ras signal transduction pathway. Capable of suppressing v-Ras transformation in vitro
12	86	PLXDC1	plexin domain containing 1	Plays a critical role in endothelial cell capillary morphogenesis
13	86	FXC1	fracture callus 1 homolog (rat)	still unknown
14	85	MRPS7	mitochondrial ribosomal protein S7	MRPS7 are encoded by nuclear genes and help in protein synthesis within the mitochondrion
15	85	VPS53	vacuolar protein sorting 53 homolog (S. cerevisiae)	May be involved in retrograde transport of early and late endosomes to the late Golgi. The GARP complex is required for the maintenance of the cycling of mannose 6-phosphate receptors between the TGN and endosomes, this cycling is necessary for proper lysosomal sorting of acid hydrolases such as CTSD
16	85	KIAA1244	KIAA1244	still unknown

17	84	TMEM164	transmembrane protein 164	still unknown
18	84	OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	This gene encodes a member of the oxysterol-binding protein (OSBP) family, a group of intracellular lipid receptors. Most members contain an N-terminal pleckstrin homology domain and a highly conserved C-terminal OSBP-like sterol-binding domain. The encoded protein is involved in the regulation of cell adhesion and organization of the actin cytoskeleton. Alternative splicing results in multiple transcript variants
19	84	APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	DNA deaminase (cytidine deaminase) which acts as an inhibitor of retrovirus replication and retrotransposon mobility via deaminase-dependent and -independent mechanisms. Exhibits antiviral activity against vif-deficient HIV-1. After the penetration of retroviral nucleocapsids into target cells of infection and the initiation of reverse transcription, it can induce the conversion of cytosine to uracil in the minus-sense single-strand viral DNA, leading to G-to-A hypermutations in the subsequent plus-strand viral DNA.
20	83	DIAPH1	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	Acts in a Rho-dependent manner to recruit PFY1 to the membrane. Required for the assembly of F-actin structures, such as actin cables and stress fibers. Nucleates actin filaments. Binds to the barbed end of the actin filament and slows down actin polymerization and depolymerization. Required for cytokinesis, and transcriptional activation of the serum response factor.

miRNA 506

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	100	QKI	QKI, KH domain containing, RNA binding	RNA-binding protein that plays a central role in myelinization. Binds to the 5'-NACUAAY-N(1,20)-UAAY-3' RNA core sequence. Acts by regulating pre-mRNA splicing, mRNA export, mRNA stability and protein translation. Required to protect and promote stability of mRNAs such as MBP and CDKN1B. Regulator of oligodendrocyte differentiation and maturation in the brain that may play a role in myelin and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. Participates in mRNA transport by regulating the nuclear export of MBP mRNA. Also involved in regulation of mRNA splicing of MAG pre-mRNA. Acts as a translational repressor
2	98	CD164	CD164 molecule, sialomucin	Sialomucin that may play a key role in hematopoiesis by facilitating the adhesion of CD34(+) cells to the stroma and by negatively regulating CD34(+)CD38(lo/-) cell proliferation. Modulates the migration of umbilical cord blood CD133+ cells and this is mediated through the CXCL12/CXCR4 axis. May play an important role in prostate cancer metastasis and the infiltration of bone marrow by cancer cells. Promotes myogenesis by enhancing CXCR4-dependent cell motility. Positively regulates myoblast migration and promotes myoblast fusion into myotubes
3	97	FLOT2	flotillin 2	May act as a scaffolding protein within caveolar membranes, functionally participating in formation of caveolae or caveolae-like vesicles. May be involved in epidermal cell adhesion and epidermal structure and function
4	97	RHOG	ras homolog gene family, member G (rho G)	Required for the formation of membrane ruffles during macropinocytosis. Plays a role in cell migration and is required for the formation of cup-like structures during trans-endothelial migration of leukocytes. In case of Salmonella enterica infection, activated by SopB and ARHGEF26/SGEF, which induces cytoskeleton rearrangements and promotes bacterial entry
5	97	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	Plays a role in cytotoxic granule exocytosis in lymphocytes. Required for both granule maturation and granule docking and priming at the immunologic synapse
6	96	MAGT1	magnesium transporter 1	May be involved in N-glycosylation through its association with N-oligosaccharyl transferase. May be involved in Mg(2+) transport in epithelial cells
7	96	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide,	Integrins alpha-1/beta-1, alpha-2/beta-1, alpha-10/beta-1 and alpha-11/beta-1 are receptors for

			antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	collagen. Integrins alpha-1/beta-1 and alpha-2/beta-2 recognize the proline-hydroxylated sequence G-F-P-G-E-R in collagen. Integrins alpha-2/beta-1, alpha-3/beta-1, alpha-4/beta-1, alpha-5/beta-1, alpha-8/beta-1, alpha-10/beta-1, alpha-11/beta-1 and alpha-V/beta-1 are receptors for fibronectin
8	96	VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	SNARE involved in vesicular transport from the late endosomes to the trans-Golgi network
9	96	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	Binds to activated CDC42 but does not stimulate its GTPase activity. It associates with calmodulin. Could serve as an assembly scaffold for the organization of a multimolecular complex that would interface incoming signals to the reorganization of the actin cytoskeleton at the plasma membrane. May promote neurite outgrowth
10	95	SLITRK4	SLIT and NTRK-like family, member 4	Suppresses neurite outgrowth
11	95	LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	Binding to cells via a high affinity receptor, laminin is thought to mediate the attachment, migration and organization of cells into tissues during embryonic development by interacting with other extracellular matrix components
12	95	STT3A	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A (S. cerevisiae)	Catalytic subunit of the N-oligosaccharyl transferase (OST) complex which catalyzes the transfer of a high mannose oligosaccharide from a lipid-linked oligosaccharide donor to an asparagine residue within an Asn-X-Ser/Thr consensus motif in nascent polypeptide chains. N-glycosylation occurs cotranslationally and the complex associates with the Sec61 complex at the channel-forming translocon complex that mediates protein translocation across the endoplasmic reticulum (ER).
13	94	PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2	RNA-binding protein which binds to intronic polypyrimidine tracts and mediates negative regulation of exons splicing. May antagonize in a tissue-specific manner the ability of NOVA1 to activate exon selection. Beside its function in pre-mRNA splicing, plays also a role in the regulation of translation. Isoform 5 has a reduced affinity for RNA
14	94	SPOPL	speckle-type POZ protein-like	Component of a cullin-RING-based BCR (BTB-CUL3-RBX1) E3 ubiquitin-protein ligase complex that mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins, but with relatively low efficiency. Cullin-RING-based BCR (BTB-CUL3-RBX1) E3 ubiquitin-protein ligase complexes containing homodimeric SPOPL or the heterodimer formed by SPOP and SPOPL are less efficient than ubiquitin ligase complexes containing only SPOP. May function to down-regulate the activity of cullin-RING-based BCR (BTB-CUL3-RBX1) E3 ubiquitin-protein ligase complexes that contain SPOP
15	94	ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide	May supply copper to copper-requiring proteins within the secretory pathway, when localized in the trans-Golgi network. Under conditions of elevated extracellular copper, it relocalized to the plasma membrane where it functions in the efflux of copper from cells
16	94	PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B	Acts as a glycogen-targeting subunit for phosphatase PP1. Facilitates interaction of the PP1 with enzymes of the glycogen metabolism and regulates its activity. Suppresses the rate at which PP1 dephosphorylates (inactivates) glycogen phosphorylase and enhances the rate at which it activates glycogen synthase and therefore limits glycogen breakdown. Its activity is inhibited by PYGL, resulting in inhibition of the glycogen synthase and glycogen phosphorylase phosphatase activities of PP1. Dramatically increases basal and insulin-stimulated glycogen synthesis upon overexpression in hepatocytes
17	93	TMC7	transmembrane channel-like 7	Probable ion channel
18	92	PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	Dephosphorylates cellular tyrosine kinases, including PTK2B/PYK2, and thereby regulates signaling via PTK2B/PYK2
19	91	TRIM45	tripartite motif containing 45	May act as a transcriptional repressor in mitogen-activated protein kinase signaling pathway

20	91	CHIC1	cysteine-rich hydrophobic domain 1	still unknown

Tabelle 11: Zieltargets und Funktionen der hypomethylierten miRNAs aus der Schnittmenge der freien sowie zellulären Urin-DNA mit beiden Gewebekohorten (miRBase).

miRNA 662

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	76	REXO1L1	REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)-like 1	still unknown
2	76	MRPL2	mitochondrial ribosomal protein L2	MRPL2 are encoded by nuclear genes and help in protein synthesis within the mitochondrion
3	75	TOMM40	translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)	Channel-forming protein essential for import of protein precursors into mitochondria
4	72	DCAF7	DDB1 and CUL4 associated factor 7	Involved in craniofacial development. Acts upstream of the EDN1 pathway and is required for formation of the upper jaw equivalent, the palatoquadrate. The activity required for EDN1 pathway function differs between the first and second arches (By similarity). Associates with DIAPH1 and controls GLI1 transcriptional activity. Could be involved in normal and disease skin development. May function as a substrate receptor for CUL4-DDB1 E3 ubiquitin-protein ligase complex
5	72	HSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1	still unknown
6	71	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2	The MCFD2-LMAN1 complex forms a specific cargo receptor for the ER-to-Golgi transport of selected proteins. Plays a role in the secretion of coagulation factors
7	70	MLPH	melanophilin	Rab effector protein involved in melanosome transport. Serves as link between melanosome-bound RAB27A and the motor protein MYO5A
8	69	TLX1	T-cell leukemia homeobox 1	Controls the genesis of the spleen. Binds to the DNA sequence 5'-GGCGGTAAGTGG-3'
9	67	FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	Activates CDC42, a member of the Ras-like family of Rho- and Rac proteins, by exchanging bound GDP for free GTP. Plays a role in regulating the actin cytoskeleton and cell shape
10	66	ZNF418	zinc finger protein 418	Transcriptional repressor
11	65	GDF10	growth differentiation factor 10	The protein encoded by this gene is a member of the bone morphogenetic protein (BMP) family and the TGF-beta superfamily
12	65	C17orf101	chromosome 17 open reading frame 101	still unknown
13	64	CNTNAP2	contactin associated protein-like 2	May play a role in the formation of functional distinct domains critical for saltatory conduction of nerve impulses in myelinated nerve fibers. Seems to demarcate the juxtaparanodal region of the axo-glial junction
14	63	HK2	hexokinase 2	Hexokinases phosphorylate glucose to produce glucose-6-phosphate, the first step in most glucose metabolism pathways. This gene encodes hexokinase 2, the predominant form found in skeletal muscle. It localizes to the outer membrane of mitochondria. Expression of this gene is insulin-responsive, and studies in rat suggest that it is involved in the increased rate of glycolysis seen in rapidly growing cancer cells
15	60	ZNF148	zinc finger protein 148	Involved in transcriptional regulation. Represses the transcription of a number of genes including gastrin, stromelysin and enolase. Binds to the G-rich box in the enhancer region of these genes
16	60	ZNF547	zinc finger protein 547	May be involved in transcriptional regulation
17	59	DCUN1D4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae)	still unknown
18	59	TARSL2	threonyl-tRNA synthetase-like 2	still unknown
19	59	ZMIZ2	zinc finger, MIZ-type containing 2	Increases ligand-dependent transcriptional activity of AR and other nuclear hormone receptors
20	59	GLRA1	glycine receptor, alpha 1	The glycine receptor is a neurotransmitter-gated ion channel. Binding of glycine to its receptor increases the chloride conductance and thus produces hyperpolarization (inhibition of neuronal firing)

miRNA 4522

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	89	CCNT2	cyclin T2	Regulatory subunit of the cyclin-dependent kinase pair (CDK9/cyclin T) complex, also called positive transcription elongation factor B (P-TEFB), which is proposed to facilitate the transition from abortive to production elongation by phosphorylating the CTD (carboxy-terminal domain) of the large subunit of RNA polymerase II (RNAP II)
2	89	SYNJ2	synaptojanin 2	Inositol 5-phosphatase which may be involved in distinct membrane trafficking and signal transduction pathways. May mediate the inhibitory effect of Rac1 on endocytosis
3	88	ADAMTS17	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17	This gene encodes a member of the ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) protein family. ADAMTS family members share several distinct protein modules, including a propeptide region, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, and a thrombospondin type 1 (TS) motif
4	88	RPE	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	Catalyzes the reversible epimerization of D-ribulose 5-phosphate to D-xylulose 5-phosphate
5	85	SYTL4	synaptotagmin-like 4	Modulates exocytosis of dense-core granules and secretion of hormones in the pancreas and the pituitary. Interacts with vesicles containing negatively charged phospholipids in a Ca(2+)-independent manner
6	84	APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	DNA deaminase (cytidine deaminase) which acts as an inhibitor of retrovirus replication and retrotransposon mobility via deaminase-dependent and -independent mechanisms. After the penetration of retroviral nucleocapsids into target cells of infection and the initiation of reverse transcription, it can induce the conversion of cytosine to uracil in the minus-sense single-strand viral DNA, leading to G-to-A hypermutations in the subsequent plus-strand viral DNA.
7	84	APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	DNA deaminase (cytidine deaminase) with restriction activity against viruses, foreign DNA and mobility of retrotransposons. Exhibits antiviral activity against adeno-associated virus (AAV) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and may inhibit the mobility of LTR and non-LTR retrotransposons. Selectively targets single-stranded DNA and can deaminate both methylcytosine and cytosine in foreign DNA. Can induce somatic hypermutation in the nuclear and mitochondrial DNA. May also play a role in the epigenetic regulation of gene expression through the process of active DNA demethylation
8	84	ZNF805	zinc finger protein 805	May be involved in transcriptional regulation
9	83	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Interferon-inducible iron-sulfur (4FE-4S) cluster-binding antiviral protein which plays a major role in the cell antiviral state induced by type I and type II interferon. Can inhibit a wide range of DNA and RNA viruses, including human cytomegalovirus (HCMV), hepatitis C virus (HCV), west Nile virus (WNV), dengue virus, sindbis virus, influenza A virus, sendai virus, vesicular stomatitis virus (VSV), and human immunodeficiency virus (HIV-1).
10	82	ZNF264	zinc finger protein 264	May be involved in transcriptional regulation
11	81	NAA38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	Binds specifically to the 3'-terminal U-tract of U6 snRNA and is probably a component of the spliceosome
12	81	SCAI	suppressor of cancer cell invasion	Tumor suppressor which functions to suppress MKL1-induced SRF transcriptional activity. May function in the RHOA-DIAPH1 signal transduction pathway and regulate cell migration through transcriptional regulation of ITGB1
13	79	NMT2	N-myristoyltransferase 2	Adds a myristoyl group to the N-terminal glycine residue of certain cellular and viral proteins
14	79	LIMD1	LIM domains containing 1	Adapter or scaffold protein which participates in the assembly of numerous protein complexes and is involved in several cellular processes such as cell fate determination, cytoskeletal organization, repression of gene transcription, cell-cell adhesion, cell differentiation, proliferation and migration.

15	79	SPATA5	spermatogenesis associated 5	May be involved in morphological and functional mitochondrial transformations during spermatogenesis
16	78	MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	Catalyzes the transfer of a methyl group from methyl-cobalamin to homocysteine, yielding enzyme-bound cob(I)alamin and methionine. Subsequently, remethylates the cofactor using methyltetrahydrofolate
17	78	ESM1	endothelial cell-specific molecule 1	Involved in angiogenesis; promotes angiogenic sprouting. May have potent implications in lung endothelial cell-leukocyte interactions
18	78	TOR1AIP2	torsin A interacting protein 2	Regulates the distribution of TOR1A between the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope
19	77	SOBP	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)	Implicated in development of the cochlea
20	77	SCML4	sex comb on midleg-like 4 (Drosophila)	Putative Polycomb group (PcG) protein. PcG proteins act by forming multiprotein complexes, which are required to maintain the transcriptionally repressive state of homeotic genes throughout development

miRNA 526A2

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Functions
1	100	GIPC3	GIPC PDZ domain containing family, member 3	Required for postnatal maturation of the hair bundle and long-term survival of hair cells and spiral ganglion
2	92	MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)	Processive actin-based motor that can move in large steps approximating the 36-nm pseudo-repeat of the actin filament. Involved in melanosome transport. Also mediates the transport of vesicles to the plasma membrane. May also be required for some polarization process involved in dendrite formation
3	91	GHSR	growth hormone secretagogue receptor	Receptor for ghrelin, coupled to G-alpha-11 proteins. Stimulates growth hormone secretion. Binds also other growth hormone releasing peptides (GHRP) (e.g. Met-enkephalin and GHRP-6) as well as non-peptide, low molecular weight secretagogues
4	88	AXL	AXL receptor tyrosine kinase	Receptor tyrosine kinase that transduces signals from the extracellular matrix into the cytoplasm by binding growth factor GAS6 and which is thus regulating many physiological processes including cell survival, cell proliferation, migration and differentiation. Ligand binding at the cell surface induces dimerization and autophosphorylation of AXL. Following activation by ligand, ALX binds and induces tyrosine phosphorylation of PI3-kinase subunits PIK3R1, PIK3R2 and PIK3R3; but also GRB2, PLCG1, LCK and PTPN11. Other downstream substrate candidates for AXL are CBL, NCK2, SOCS1 and TENC1
5	88	SLC25A33	solute carrier family 25, member 33	Probable mitochondrial transporter which participates in dendritic cell endocytosis. May associate with mitochondrial oxidative phosphorylation
6	86	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	Activation of long-chain fatty acids for both synthesis of cellular lipids, and degradation via beta-oxidation. Preferentially uses arachidonate and eicosapentaenoate as substrates
7	86	NAA38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	Binds specifically to the 3'-terminal U-tract of U6 snRNA and is probably a component of the spliceosome
8	85	CBX8	chromobox homolog 8	Component of a Polycomb group (PcG) multiprotein PRC1-like complex, a complex class required to maintain the transcriptionally repressive state of many genes, including Hox genes, throughout development. PcG PRC1 complex acts via chromatin remodeling and modification of histones; it mediates monoubiquitination of histone H2A 'Lys-119', rendering chromatin heritably changed in its expressibility
9	84	RB1CC1	RB1-inducible coiled-coil 1	Plays a role as a modulator of TGF-beta-signaling by restricting substrate specificity of RNF111. Involved in autophagy. Regulates early events but also late events of autophagosome formation through direct interaction with Atg16L1. Required for the formation of the

				autophagosome-like double-membrane structure that surrounds the Salmonella-containing vacuole (SCV) duting S.typhimurium infection and subsequent xenophagy. Autophagy positively regulates repair of DNA damage induced by ionizing radiation and negatively regulates apoptosis. Plays an indispensible role in fetal hematopoiesis and in the regulation of neuronal homeostasis (By similarity). Implicated in the regulation of RB1 expression. Functions as a DNA-binding transcription factor. Is a potent regulator of the RB1 pathway and a mediator that plays a crucial role in muscular differentiation. Expression is, thus, a prerequisite for myogenic differentiation. Inhibits PTK2/FAK1 and PTK2B/PYK2 activity and activation of downstream signaling pathways
10	84	ZNF257	zinc finger protein 257	May be involved in transcriptional regulation
11	83	KCTD14	potassium channel tetramerisation domain containing 14	still unknown
12	83	RP1	retinitis pigmentosa 1 (autosomal dominant)	Microtubule-associated protein regulating the stability and length of the microtubule-based axoneme of photoreceptors. Required for the differentiation of photoreceptor cells, it plays a role in the organization of the outer segment of rod and cone photoreceptors ensuring the correct orientation and higher-order stacking of outer segment disks along the photoreceptor axoneme
13	83	NDUFC2-KCTD14	NDUFC2-KCTD14 readthrough	Accessory subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I), that is believed not to be involved in catalysis. Complex I functions in the transfer of electrons from NADH to the respiratory chain. The immediate electron acceptor for the enzyme is believed to be ubiquinone
14	83	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	Cleaves a beta-phosphate from the diphosphate groups in PP-InsP5 (diphosphoinositol pentakisphosphate), PP-InsP4 and [PP]2-InsP4 (bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate), suggesting that it may play a role in signal transduction. Also able to catalyze the hydrolysis of dinucleoside oligophosphate Ap6A, but not Ap5A. The major reaction products are ADP and p4a from Ap6A. Also able to hydrolyze 5-phosphoribose 1-diphosphate. Does not play a role in U8 snoRNA decapping activity. Binds U8 snoRNA
15	82	C7orf33	chromosome 7 open reading frame 33	still unknown
16	81	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	Actin-binding protein. Plays a role in the activation of T-cells in response to costimulation through TCR/CD3 and CD2 or CD28. Modulates the cell surface expression of IL2RA/CD25 and CD69
17	81	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	Cell adhesion, ankyrin-binding protein involved in neuron-neuron adhesion. May play a role in the molecular assembly of the nodes of Ranvier
18	80	ECHDC1	enoyl CoA hydratase domain containing 1	Decarboxylases ethylmalonyl-CoA decarboxylase, a potentially toxic metabolite, to form butyryl-CoA, suggesting it might be involved in metabolite proofreading. Also has methylmalonyl-CoA decarboxylase activityx at lower level
19	80	USP8	ubiquitin specific peptidase 8	Hydrolase that can remove conjugated ubiquitin from proteins and therefore plays an important regulatory role at the level of protein turnover by preventing degradation. Converts both 'Lys-48' an 'Lys-63'-linked ubiquitin chains. Catalytic activity is enhanced in the M phase. Involved in cell proliferation. Required to enter into S phase in response to serum stimulation. May regulate T-cell anergy mediated by RNF128 via the formation of a complex containing RNF128 and OTUB1. Probably regulates the stability of STAM2 and RASGRF1. Regulates endosomal ubiquitin dynamics, cargo sorting, membrane traffic at early endosomes, and maintenance of ESCRT-0 stability. The level of protein ubiquitination on endosomes is essential for maintaining the morphology of the organelle.
20	80	BLVRB	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	Broad specificity oxidoreductase that catalyzes the NADPH-dependent reduction of a variety of flavins, such as riboflavin, FAD or FMN, biliverdins, methemoglobin and PQQ (pyrroloquinoline quinone). Contributes to heme catabolism and metabolizes linear tetrapyrroles. Can also reduce the

				complexed Fe(3+) iron to Fe(2+) in the presence of FMN and NADPH. In the liver, converts biliverdin to bilirubin

miRNA 524

Target Rank	Target Score	Gene Symbol	Gene Description	Function
1	100	TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	Transcription factor which plays a key role in the Hippo signaling pathway, a pathway involved in organ size control and tumor suppression by restricting proliferation and promoting apoptosis. The core of this pathway is composed of a kinase cascade wherein MST1/MST2, in complex with its regulatory protein SAV1, phosphorylates and activates LATS1/2 in complex with its regulatory protein MOB1, which in turn phosphorylates and inactivates YAP1 oncoprotein and WWTR1/TAZ. Acts by mediating gene expression of YAP1 and WWTR1/TAZ, thereby regulating cell proliferation, migration and epithelial mesenchymal transition (EMT) induction
2	99	HOOK3	hook homolog 3 (Drosophila)	Probably serves as a target for the spiC protein from Salmonella typhimurium, which inactivates it, leading to a strong alteration in cellular trafficking (By similarity). Component of the FTS/Hook/FHIP complex (FHF complex). The FHF complex may function to promote vesicle trafficking and/or fusion via the homotypic vesicular protein sorting complex (the HOPS complex). May regulate clearance of endocytosed receptors such as MSR1. Participates in defining the architecture and localization of the Golgi complex
3	99	KLHL23	kelch-like 23 (Drosophila)	still unknown
4	99	PAPOLG	poly(A) polymerase gamma	Responsible for the post-transcriptional adenylation of the 3'-terminal of mRNA precursors and several small RNAs including signal recognition particle (SRP) RNA, nuclear 7SK RNA, U2 small nuclear RNA, and ribosomal 5S RNA
5	98	JAZF1	JAZF zinc finger 1	Potential transcription factor
6	98	ELAVL2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	Binds RNA. Seems to recognize a GAAA motif. Can bind to its own 3'-UTR, the FOS 3'-UTR and the ID 3'-UTR
7	98	ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	Histone methyltransferase specifically methylating 'Lys-36' of histone H3 (H3K36me)
8	97	GATAD2B	GATA zinc finger domain containing 2B	Transcriptional repressor. Enhances MBD2-mediated repression. Efficient repression requires the presence of GATAD2A. Targets MBD3 to discrete loci in the nucleus. May play a role in synapse development
9	97	SEH1L	SEH1-like (S. cerevisiae)	Component of the Nup107-160 subcomplex of the nuclear pore complex (NPC). The Nup107-160 subcomplex is required for the assembly of a functional NPC. The Nup107-160 subcomplex is also required for normal kinetochore microtubule attachment, mitotic progression and chromosome segregation. This subunit plays a role in recruitment of the Nup107-160 subcomplex to the kinetochore
10	97	GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	Glycopeptide transferase involved in O-linked oligosaccharide biosynthesis, which catalyzes the transfer of an N-acetyl-D-galactosamine residue to an already glycosylated peptide. In contrast to other proteins of the family, it does not act as a peptide transferase that transfers GalNAc onto serine or threonine residue on the protein receptor, but instead requires the prior addition of a GalNAc on a peptide before adding additional GalNAc moieties. Some peptide transferase activity is however not excluded, considering that its appropriate peptide substrate may remain unidentified
11	97	GSPT1	G1 to S phase transition 1	Involved in translation termination in response to the termination codons UAA, UAG and UGA. Stimulates the activity of ERF1. Involved in regulation of mammalian cell growth. Component of the transient SURF complex which recruits UPF1 to stalled ribosomes in the context of nonsense-

				mediated decay (NMD) of mRNAs containing premature stop codons
12	97	RSBN1	round spermatid basic protein 1	still unknown
13	97	GIPC2	GIPC PDZ domain containing family, member 2	still unknown
14	97	CDC42BPB	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)	Serine/threonine-protein kinase which is an important downstream effector of CDC42 and plays a role in the regulation of cytoskeleton reorganization and cell migration. Regulates actin cytoskeletal reorganization via phosphorylation of PPP1R12C and MYL9/MLC2. In concert with MYO18A and LURAP1, is involved in modulating lamellar actomyosin retrograde flow that is crucial to cell protrusion and migration. Phosphorylates PPP1R12A
15	96	SBF2	SET binding factor 2	Guanine nucleotide exchange factor (GEF) which may activate RAB28. Promotes the exchange of GDP to GTP, converting inactive GDP-bound Rab proteins into their active GTP-bound form
16	96	CETN3	centrin, EF-hand protein, 3	Plays a fundamental role in microtubule-organizing center structure and function
17	96	ATP8A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	May play a role in the transport of aminophospholipids from the outer to the inner leaflet of various membranes and the maintenance of asymmetric distribution of phospholipids, mainly in secretory vesicles
18	96	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	Promotes matrix assembly and cell adhesiveness (By similarity). Can stimulate endothelial cell proliferation, migration, as well as angiogenesis
19	96	ELK4	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	Involved in both transcriptional activation and repression. Interaction with SIRT7 leads to recruitment and stabilization of SIRT7 at promoters, followed by deacetylation of histone H3 at 'Lys-18' (H3K18Ac) and subsequent transcription repression. Forms a ternary complex with the serum response factor (SRF). Requires DNA-bound SRF for ternary complex formation and makes extensive DNA contacts to the 5'side of SRF, but does not bind DNA autonomously
20	96	PHOSPHO2-KLHL23	PHOSPHO2-KLHL23 readthrough	This lokus represents naturally occurring read-through transcription between the neighboring PHOSPHO2 (phosphatase, orphan 2) and KLHL23 (kelch-like 23) genes on chromosome 2. The read-through transcript includes only non-coding PHOSPHO2 exons, and thus encodes the KLHL23 protein

Veröffentlichungen

Publikationen

Beermann A., Ghanjati F., Hermanns T., Poyet C., Pereira J., Fischer J., Wernet P., Santourlidis S. (2011) Methods for Separate Isolation of Cell-Free DNA and Cellular DNA from Urine-Application of Methylation-Specific PCR on both DNA Fractions. *The Open Biomarkers Journal*: 15-17

Ghanjati F.*, Beermann A. *, Hermanns T. *, Poyet C., Araúzo-Bravo M.J., Seifert H.H., Schmidtpeter M., Goering W., Sorg R., Wernet P., Santourlidis S. (2014) Unreserved application of epigenetic methods to define differences of DNA methylation between urinary cellular and cell-free DNA. (∗ contributed equally) In press by *Cancer Biomarkers*

Posterpräsentationen

Beermann A., Chovolou Y., Wätjen W., Kampkötter A., Kahl R. (2009) Role of Forkhead Transcription Factors on Cytotoxic Effects of Doxorubicin in Human Hepatoma Cells. 50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Beermann A., Ghanjati F., Hermanns T., Poyet C., Araúzo-Bravo M.J., Seifert H.H., Schmidtpeter M., Goering W., Sorg R., Wernet P., Santourlidis S. (2014) Unreserved application of epigenetic methods to define differences of DNA methylation between urinary cellular and cell-free DNA. Cinical Epigenetics International Meeting 2014, Düsseldorf

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn PD Dr. Simeon Santourlidis für die engagierte Betreuung meiner Dissertation danken. Seine tatkräftige Unterstützung, Motivation sowie seine wertvollen Ratschläge und Anregungen habe ich nicht nur sehr geschätzt, sie haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich für die freundliche Aufnahme, seine unermüdliche Geduld und stetige Hilfsbereitschaft bedanken sowie für alles, was ich von ihm lernen durfte.
Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Martin für die Bereitschaft meine Dissertation zu betreuen und Prof. Dr. Adjaye für die Möglichkeit meine Arbeit im Institut für Stammzellforschung und Regenerative Medizin durchführen zu können. Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Ackermann und Prof. Dr. Wernet für den regen Diskussionsaustausch sowie ihre stetige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt den Kooperationspartnern Herrn Dr. Poyet sowie Herrn Prof. Dr. Wild des UK Zürich, Herrn Dr. Braunstein des UKD als auch dem kommissarischen Institutsleiter Herrn Dr. Fischer und dem Team der Apherese für die Bereitstellung der Proben, die diese Arbeit entscheidend vorangebracht haben.

Ferner danke ich PD Dr. Csaba Mahotka, dem gesamten Team der Pathologie als auch Prof. Dr. Markus Uhrberg für ihre konstante Unterstützung bei Geräteengpässen sowie der HLA für all die Sequenzierungen.

Foued, Jens, Robert, Silke und Nina danke ich für die moralische Unterstützung sowie ihre fachliche Hilfestellung. Danke dafür, dass ihr mit mir gefiebert und gelacht habt.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mich während der gesamten Zeit unterstütz und motiviert hat und immer ein offenes Ohr für mich hat. Vor allem danke ich meinem Mann Christian, der immer an mich geglaubt und nie an mir gezweifelt hat. Danke dafür, dass du jeden Weg mit mir gehst.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorgelegte Dissertation wurde von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe unter der Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ angefertigt. Die Dissertation wurde weder in dieser vorgelegten noch in ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht.
Ich erkläre gleichzeitig, dass ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 28.08.2014

Agnes Beermann