

Aus der Urologischen Klinik der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

# **UTX und verwandte chromatinmodifizierende Proteine im Urothelkarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sammy Francis Murday

2016

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

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

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Jorge Frank

*Für meinen Vater Prof. Dr. med. Harri K. Murday  
und meine Familie*

---

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel „*Expression and function of the histone demethylase KDM6A/Utx in urothelial carcinoma cells*“ Murday, S.; Kunz, X.; Koch, A.; Niegisch, G.; Hoffmann, M.; Schulz, W., Düsseldorf, 2014“ als wissenschaftlicher Beitrag beim 66. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. vorgebracht.

---

## Zusammenfassung

Mit modernster Technologie in großem Maßstab durchgeführte internationale Projekte wie das *Cancer Genome Project* erweitern das Wissen über molekulare Grundlagen der Tumorentstehung und stellen die Bedeutung der Epigenetik heraus. Der Nachweis von somatischen Mutationen und anderen Veränderungen von chromatinmodifizierenden Proteinen wie den Histondemethylasen UTX und JMJD3 (Gene: *KDM6A*, *KDM6B*) eröffneten das Arbeitsfeld, mit dem sich die vorliegende Dissertation beschäftigt hat.

In Urothelkarzinomgeweben und –zelllinien wurde die Expression von UTX, JMJD3 und der Histonmethylase EZH2 untersucht, um weiteres Licht in ihre Bedeutung bei der Entstehung des Urothelkarzinoms und die beteiligten molekularen Mechanismen zu bringen. Dazu wurden Zellkultur, quantitative und qualitative PCR, Gen-Sequenzierungen, Western-Blot, funktionelle Versuchen mit siRNA sowie *in silico* Datenbankauswertung eingesetzt.

Die vermutlich als Tumorsuppressoren wirkenden Histondemethylasen UTX und JMJD3 waren im Urothelkarzinom häufig vermindert exprimiert. Für UTX/*KDM6A* konnten zwei somatische Mutationen verifiziert werden. Die Expression der Histonmethyltransferase EZH2 war erwartungsgemäß annähernd durchgehend erhöht. Von den bekannten UTX Zielgenen zeigten *HBP1*, *RBBP4* und *RBBP9* signifikant veränderte Expression im Urothelkarzinom. Die Expressionsveränderungen verliefen allerdings nicht durchgehend gemäß den bisher vermuteten Zusammenhängen. Die Folgen von Expressionsveränderungen und Mutationen dieser epigenetisch relevanten Akteure sind bei weitem noch nicht verstanden. Als erster Schritt dahin wurde eine effiziente Herunterregulation von *UTX* durch siRNA etabliert.

Chromatinmodifizierende Proteine werden in Zukunft nicht nur wegen ihrer pathogenetischen Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren und deren Verlauf von Interesse sein, sondern könnten auch einen Angriffspunkt für neue molekulare Therapien darstellen, die für das Harnblasenkarzinom dringend benötigt werden.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>BCG</b>	Bacillus Calmet-Guérin	<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i>
<b>BN</b>	(Harn-) Blase Normal	<b>HOX</b>	Homöobox
<b>Bp</b>	Basenpaar	<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>BPE</b>	<i>Bovine pituitary extract</i>	<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>BT</b>	(Harn-) Blase Tumor	<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>Ca</b>	<i>Carcinoma</i>	<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>	<b>RKI</b>	Robert-Koch-Institut
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>Rpm</b>	<i>Rotations per minute</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonucleotidtriphosphat	<b>TCGA</b>	<i>The cancer genome atlas</i>
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	<b>TNM</b>	<i>Tumor, nodes, metastasis</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>UP</b>	Normale Urothelzellen in Primärkultur

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	IV
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Harnblasenkarzinom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Grundlagen .....	1
1.1.2 Molekulargenetik und Epigenetik.....	2
<b>1.2 Chromatin-modifizierende Proteine im Harnblasenkarzinom .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Epigenetische Modifikationen .....	3
1.2.2 Histonmethylierung und Genexpression .....	4
1.2.3 Die Histon H3K27me3-Demethylase UTX .....	6
1.2.4 Die Histondemethylase JMJD3 .....	9
1.2.5 Die Histonmethyltransferase EZH2.....	9
<b>1.3 Zielsetzung.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Materialien.....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Gewebeproben .....	11
2.1.2 Zelllinien .....	12
2.1.3 Medien und Zusätze .....	13
2.1.4 Qualitative und quantitative PCR-Reagenzien.....	14
2.1.5 Primer .....	15
2.1.6 Reagenzien für Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Western Blot.....	16
2.1.7 Chemikalien und Antibiotika .....	17
2.1.8 Verwendete Kits, Geräte und Datenbanken.....	18
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.2 Methodik zur RNA-, DNA- und Protein-Extraktion und Analyse.....	22
2.2.3 Funktionelle Versuche .....	30
2.2.4 Statistische Auswertungen .....	31
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen .....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Expressionsanalyse von UTX.....	32
3.1.2 Expressionsanalyse von EZH2 .....	35
3.1.3 Expressionsanalyse von JMJD3 .....	37
3.1.4 Korrelation der Expression von UTX/TBP und JMJD3/TBP .....	40
3.1.5 In-silico Analyse der Expression möglicher UTX-Zielgene.....	41
3.1.6 Analyse der Expression von UTX-assoziierten Genen in den Proben des Urologischen Forschungslabors.....	46
3.1.7 Expressionsprofil epigenetisch relevanter Gene im Urothelkarzinom .....	52
<b>3.2 Analyse der Spleißvarianten von UTX.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Western Blot und Proteinanalysen .....</b>	<b>54</b>
3.3.1. Analyse des UTX-Proteins .....	54
3.3.2. Analyse des EZH2-Proteins .....	58
<b>3.4 Mutationsnachweis.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5 Funktionelle Versuche .....</b>	<b>60</b>

3.5.1 Etablierung eines <i>UTX Knockdown</i> mit siRNA.....	60
3.5.2 <i>UTX knockdown</i> mit der siRNA si32 .....	61
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Ergebnisse im Überblick .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2 <i>UTX</i> im Urothelkarzinom.....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Expression von <i>UTX</i> .....	65
4.2.2 Spleißvarianten von <i>UTX</i> .....	66
4.2.3 Analyse des <i>UTX</i> -Proteins .....	67
4.2.4 Mutationen von <i>KDM6A</i> .....	69
<b>4.3 Expression von <i>EZH2</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>4.4 Expression von <i>JMJD3</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Expression von <i>UTX</i>-Zielgenen .....</b>	<b>73</b>
<b>4.6 Funktionelle Versuche mit siRNA .....</b>	<b>76</b>
<b>5. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>



## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1:** Mechanismen der H3K27-Methylierung und -Demethylierung
- Abb. 2:** Übersicht der Spleißvarianten von *KDM6A*
- Abb. 3:** Der postulierte funktionelle Einfluss von UTX auf die Zellzykluskontrolle
- Abb. 4:** Expression von UTX/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen
- Abb. 5:** Expression von UTX/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen
- Abb. 6:** Expression von UTX/TBP mRNA in Harnblase-Normal- und -Tumorgeweben
- Abb. 7:** Expression von EZH2/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien, normalen Urothelzellen und ausgewählten Geweben
- Abb. 8:** Expression von EZH2/TBP mRNA in Normal- und Tumorgeweben der Harnblase
- Abb. 9:** Expression von JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien u. normalen Urothelzellen
- Abb. 10:** Expression von JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen
- Abb. 11:** Vergleichende Darstellung der Expression von UTX/TBP mRNA mit JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen
- Abb. 12:** Expression von *UTX* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben
- Abb. 13:** Expression von *EZH2* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben
- Abb. 14:** Expression von *HBP1* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben
- Abb. 15:** Korrelation der Expression von *UTX* mit *HBP1* im Harnblasenkarzinom
- Abb. 16:** Expression von *RBBP4* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben
- Abb. 17:** Korrelation der Expression von *UTX* mit *RBBP4* im Harnblasenkarzinom
- Abb. 18:** Expression von *RBBP9* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben
- Abb. 19:** Korrelation der Expression von *UTX* mit *RBBP9* im Harnblasenkarzinom
- Abb. 20:** Expression von HBP1/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien u. normalen Urothelzellen
- Abb. 21:** Expression von HBP1/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien u. normalen Urothelzellen
- Abb. 22:** Korrelation der Expression von *UTX* mit *HBP1* in Urothelkarzinomzelllinien
- Abb. 23:** Expression von HBP1/TBP mRNA in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben
- Abb. 24:** Korrelation der Expression von *UTX* mit *HBP1* im Harnblasenkarzinom
- Abb. 25:** Expression von RBBP4/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen
- Abb. 26:** Expression von RBBP4/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen
- Abb. 27:** Korrelation der Expression von *UTX* mit *HBP1* im Harnblasenkarzinom

**Abb. 28:** Expressionsprofil von epigenetisch relevanten Genen in Urothelkarzinomzelllinien  
**Abb. 29:** Expression von UTX in Urothelzellen und Urothelkarzinomzelllinien  
**Abb. 30:** Westernblot von UTX in Urothelkarzinomzelllinien  
**Abb. 31:** Westernblot von UTX in weiteren Urothelkarzinomzelllinien  
**Abb. 32:** Westernblot von UTX in normalen Urothelzellen und SW1710  
**Abb. 33:** Westernblot von EZH2 in Urothelkarzinomzellen und normalen Urothelzellen  
**Abb. 34:** Mutationsanalyse des UTX Gens *KDM6A* in den UC-Zelllinien RT-112 und KU-19-19  
**Abb. 35:** Effekt verschiedener siRNAs auf die UTX mRNA Expression  
**Abb. 36:** Effekt von siRNA auf die UTX/TBP mRNA Expression in SW1710  
**Abb. 37:** Effekt von siRNA auf die UTX/TBP mRNA Expression in BFTC-905  
**Abb. 38:** Westernblot von UTX in VmCub1 Zellen nach UTX-knock-down  
**Abb. 39:** Lokalisation von *KDM6A* Mutationen im Urothelkarzinom

**Tabelle 1:** Verwendete Normal- und Tumorblasengewebe  
**Tabelle 2:** Übersicht der Tumorzelllinien mit Grading/Staging der Ursprungstumoren  
**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Medien und Zusätze  
**Tabelle 4:** Übersicht der Reagenzien für qualitative und quantitative PCR  
**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Primer für qualitative und quantitative PCR  
**Tabelle 6:** Reagenzien für Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Western Blot  
**Tabelle 7:** Übersicht über die verwendeten Primärantikörper  
**Tabelle 8:** Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper  
**Tabelle 9:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Antibiotika  
**Tabelle 10:** Übersicht über die verwendeten Kits  
**Tabelle 11:** Übersicht über die verwendeten Geräte  
**Tabelle 12:** Datenbanken - Verwendung und Homepage  
**Tabelle 13:** Mastermixe und Bedingungen für die Reverse Transkription  
**Tabelle 14:** Mastermixe für die quantitative und die qualitative PCR  
**Tabelle 15:** Bedingungen für die Real-Time-PCR  
**Tabelle 16:** qRT-Bedingungen für die qualitative PCR  
**Tabelle 17:** Übersicht über die verwendeten *KDM6A* Sequenzierprimer  
**Tabelle 18:** Übersicht über die verwendeten siRNA-Sequenzen

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Grundlagen

Das Harnblasenkarzinom ist eine bösartige Neubildung im Urogenitaltrakt, welche aus dem Urothel entsteht. Dieses hochspezialisierte Epithel kleidet die Harnblase und den Harntrakt vom Nierenbecken bis zur Urethra aus. In den dort am häufigsten entstehenden Tumoren – den Urothelkarzinomen – bleiben morphologische und molekulare Charakteristika von Urothelzellen – wenn auch in wechselndem Ausmaß – erkennbar (Schulz 2011).

Harnblasenkarzinome stellen mit einer weltweiten Inzidenz von 4-40/100000 die insgesamt fünfthäufigste Krebsart dar. Männer haben gegenüber Frauen, ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko zu erkranken. Das durchschnittliche Erkrankungsalter steigt drastisch mit zunehmendem Alter bei einem Maximum in der Altersgruppe der über 70-Jährigen (RKI 2013, Schulz 2011). Neben den seltener vorkommenden Plattenepithel- und Adenokarzinomen bilden Urothelkarzinome mit 90 Prozent den größten Anteil in Industrieländern (Epstein 2010).

Hauptsächliche Ursachen für die Entstehung von Urothelkarzinomen sind in den Körper aufgenommene Chemikalien, die über den Urin ausgeschieden werden. Hierbei sind vor allem aromatische Amine, polyzyklische Aromate, halogenierte Kohlenstoffverbindungen und Nitroverbindungen zu erwähnen, die aus Tabakrauch, beruflicher Exposition oder der industrialisierten Umwelt stammen. Des Weiteren stellt ionisierende Strahlung einen Risikofaktor dar. In selteneren Fällen spielen eine familiäre Prädisposition, häufiger genetische Variationen eine Rolle (Epstein 2010, Schulz 2011, Burger 2013). Prädisponierende genetische Polymorphismen finden sich entsprechend in Genen des Fremdstoffmetabolismus, sowie der Zellzyklus- und Apoptose-Regulation (Golka 2011).

Als klassische Symptome eines Harnblasenkarzinoms treten vor allem Makro- oder Mikrohämaturie auf, welche häufig völlig schmerzlos sind. Schmerzen können zudem durch Knochenmetastasen oder durch eine Verlegung von Blase und/oder

## 1. Einleitung

---

ableitenden Harnwegen mit nachfolgendem Harnrückstau verursacht werden. Zentraler Bestandteil der erforderlichen Diagnostik ist eine Cystoskopie (Eble 2004).

Für die Wahl der Therapie ist vor allem die UICC-Klassifikation maßgeblich. Es werden nicht-invasive, papilläre Tumore (pTa) von invasiven Tumoren (pT1-pT4) mit unterschiedlicher Eindringtiefe unterschieden. Hinzu kommen die Bestimmung eines Lymphknotenbefalls (N0, N1, N2), von Fernmetastasen (M0, M1, M2) und das *Grading* in vier Stufen G1-G4 bzw. Gx (Epstein 2010). Seit 2004 soll das *Grading* vereinfacht mit der Unterscheidung zwischen *low* und *high grade* durchgeführt werden, um die Wahrscheinlichkeit von Progression und Invasivität des Tumors besser zu fassen (Cheng 2009, Seitz 2005). Zur Behandlung von nicht-metastasierten Karzinomen kommen chirurgische Verfahren wie eine transurethrale Resektion für pTa und pT1 Tumore oder eine radikale Cystektomie und ggf. Entfernung von betroffenem Ureter und Niere in Frage. Die Cystektomie ist bei muskelinvasiven Tumoren (ab pT2a) indiziert; sie kommt auch bei hochgradigen pT1 Tumoren in Betracht. Als adjuvante oder neoadjuvante Therapie werden auf Cisplatin basierende Chemotherapien eingesetzt. Harnblasenkarzinome sind durch eine hohe Rezidivrate gekennzeichnet. Um dieses Risiko zu minimieren, wird bei Tumoren im Stadium  $\leq$  pT1 je nach Risiko eine postoperative, intravesikal instillierte Chemotherapie, zumeist mit Mitomycin-C, oder eine intravesikale BCG-Immuntherapie durchgeführt (Schulz 2011, Prasad 2011).

### 1.1.2 Molekulargenetik und Epigenetik

Die papillären *low grade* Urothelkarzinome bilden mit einem Anteil von bis zu 70 Prozent die größte Untergruppe aller Urothelkarzinome. Mit verhältnismäßig wenigen chromosomalen Aberrationen entstehen sie aus einer Hyperplasie des Urothels und sind genetisch zunächst stabil. Cytogenetisch zeichnen sich diese Tumore vor allem durch Verluste von Chromosom 9, sowie durch epigenetische Veränderungen wie DNA-Hypermethylierung und -Hypomethylierung aus. Durch den Verlust eines oder beider Arme von Chromosom 9 und durch Punktmutationen kommt es typischerweise zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *CDKN2A*, *DBCCR1*, *PTCH1*, *TGFBR2* und *TSC1*. Mutationen in den Genen

## 1. Einleitung

---

*FGFR3*, *PIK3CA* und *HRAS* (seltener *KRAS*) in dieser Reihenfolge der Häufigkeit sind ebenfalls typisch und führen zu einer Hyperaktivität von Rezeptor-Tyrosinkinase-abhängigen Signalwegen (Goebell 2010, Niegisch 2010, Schulz 2006, Schulz 2011, di Martino 2012).

Aus einem Carcinoma in situ (CIS) kann sich durch eine Dysplasie ein eher flach und invasiv wachsender *high grade* Tumor entwickeln. Diese Urothelkarzinome sind im Vergleich zu den papillären *low grade* Tumoren genomisch instabil. Deletionen und Mutationen von *p53*, *RB1*, *CDKN2A* und *PTEN* führen zu Störungen der Zellzyklusregulation und der Reaktion auf DNA-Schädigung (Goebell 2010, McConkey 2010). Neue „genomweite“ Analysen der genetischen Veränderung unterstützen diese etablierten Befunde; Veränderungen in weiteren Zellzyklus- und *Checkpoint*-Regulatoren (*E2F1*, *E2F3*, Cyclin D1/*CCND1*, Cyclin E1/*CCNE1*, *p21/CDKN1A*, *ATM*) wurden bestätigt (Gui 2011, Guo 2013, Iyer 2013, The Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Unbekannt waren vorher Mutationen in Komponenten des Chromosomen-Segregationskomplexes und in einer Vielzahl von epigenetischen Regulatoren (The Cancer Genome Atlas Research Network 2014, Gui 2011, Guo 2013). Ebenso neu entdeckt wurden häufige Mutationen und Polymorphismen im hTERT-Promotor über alle Stadien des Urothelkarzinoms hinweg, die offenbar zu einer Überexpression der Telomerase führen (Killela 2013, Rachakonda 2013).

### 1.2 Chromatin-modifizierende Proteine im Harnblasenkarzinom

#### 1.2.1 Epigenetische Modifikationen

In eukaryotischen Zellen liegt die DNA als Trägerin des Erbguts im Chromatin organisiert vor. Die Grundeinheit des Chromatins bilden Nukleosomen, in denen jeweils ein 147 bp langer DNA-Strang um ein Oktamer von Histonproteinen gewunden ist. Das Histon-Oktamer ist zusätzlich über seine N-terminalen Enden mit der DNA über ionische Bindungen in wechselndem Zustand verbunden. Verschiedene Aminosäuren der Histone (Lysine, Arginine, Serine u.a.) tragen post-translationale Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung (Kouzarides 2007). Verschiedene Chromatinkonfigurationen modulieren und

## 1. Einleitung

---

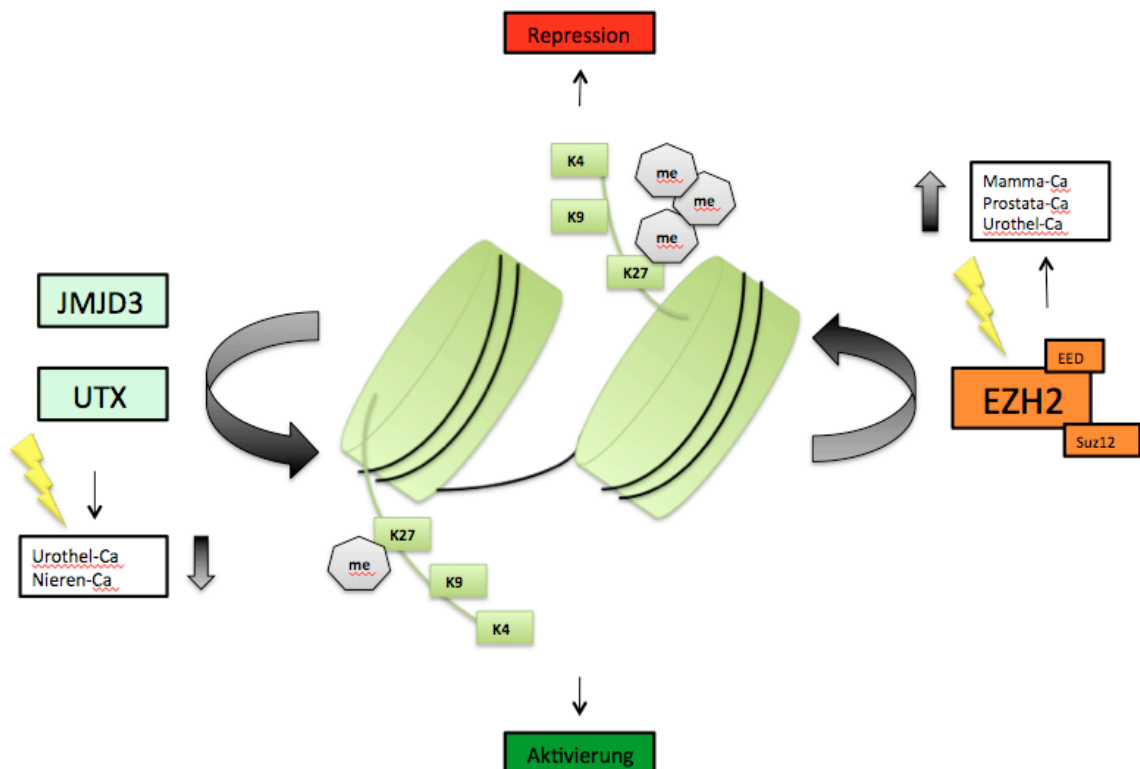
regulieren über einen veränderten Zugang von Proteinfaktoren zur genomischen-DNA die Transkription. Somit können Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod beeinflusst werden. Epigenetische Modifikationen werden durch ein komplexes Zusammenspiel von Enzymen kontrolliert. Zu diesen gehören spezifische Histonmethylasen und Histondemethylasen. Ihre Deregulation kann zu Veränderungen der Chromatinmodifikation und zur Störung der normalen Transkription führen was beides charakteristisch für Tumorzellen ist (Plass 2013). So ergaben systematische Mutationsanalysen, dass in zahlreichen Tumorarten und häufig auch dem Harnblasenkarzinom inaktivierende somatische Mutationen der Histondemethylase UTX zu finden sind. UTX wurde in der Folge als neuer Tumorsuppressor vorgeschlagen (van Haaften 2009, Dalgliesh 2010, Gui 2011). UTX demethyliert H3K27me<sub>3</sub> (trimethyliertes Lysin 27 im Histon 3). Interessanterweise ist die Expression von EZH2, der zu UTX antagonistisch wirkenden H3K27-Methyltransferase, in zahlreichen Tumoren und sehr regelmäßig auch dem Urothelkarzinom hochreguliert (Raman 2005, Simon 2008, Wang 2010, Chase 2011). Eine inaktivierende *UTX*-Mutation und eine Hochregulierung von EZH2 könnten somit theoretisch ähnliche Wirkungen ausüben oder könnten sich gemeinsam auftretend in ihrer Wirkung verstärken. Auch somatische Mutationen von EZH2 sind beschrieben; in bestimmten Leukämien können diese inaktivierend sein. In anderen Tumoren verstärken diese Mutationen alternative Aktivitäten von EZH2, unabhängig von seiner Histonmethyltransferase-Aktivität (Deb 2014). So wurde in Östrogen-Rezeptor-positiven Brustkarzinom-Zelllinien nachgewiesen, dass EZH2 an der Promoterregion von Cyclin-B1 und c-Myc Genen  $\beta$ -Catenin und T-Zell-Faktor (TCF) bindet und die Domäne II von EZH2 die Transkription induziert (Shi 2007). In Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom-Zelllinien aktiviert EZH2 die Transkription der NF- $\kappa$ B-Zielgene TNF $\alpha$  und Interleukin-6, indem es einen Komplex zusammen mit RelA und RelB bildet (Lee 2011).

### 1.2.2 Histonmethylierung und Genexpression

Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, regulieren kovalente Histonmodifikationen wie Methylierungen sowohl die globale, als auch die gewebe- und entwicklungs-spezifische Genexpression (Berger 2007, Kouzarides 2007, Strahl 2000). Die

# 1. Einleitung

Histon-Lysin-Methylierung wirkt sich, je nach spezifisch methyliertem Lysin-(K)-Rest, aktivierend oder reprimierend auf die Genexpression aus. So ist eine Di- oder Trimethylierung von Histon 3 am Lysin-K4 (H3K4me3) mit aktiven Promotoren assoziiert, eine Di- oder Trimethylierung von Histon 3 am Lysin-K27 (H3K27me3) hingegen mit einer Genrepression verbunden (Santos-Rosa 2002, Bernstein 2002, Schuettengruber 2007). Für die H3K27 Methylierung sind spezifische Methyltransferasen verantwortlich, die zum *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) gehören. Diesen bildet EZH2 zusammen mit EED und Suz12 (Wysocka 2005, Cho 2007). Als antagonistisch zum PRC2 wirkende spezifische H3K27me3-Demethylasen wurden die JmjC-Domänen enthaltenden Proteine UTX und JMJD3 (auch KDM6A und KDM6B) identifiziert (Agger 2007, de Santa 2007, Lee 2007, Hong 2007). Abb.1 gibt eine Übersicht über die funktionellen Zusammenhänge.



**Abb.1 : Mechanismen der H3K27-Methylierung und -Demethylierung**

UTX und JMJD3 (links im Bild) demethylieren H3K27me3 und führen somit zu einer Aktivierung der Transkription an entsprechenden Promoterregionen. Somatische UTX-Mutationen finden sich z.B. im Urothelkarzinom. Zudem sind JMJD3 und UTX im Urothelkarzinom niedriger exprimiert. EZH2 (rechts im Bild mit entsprechenden Ko-Faktoren des PRC2) trimethyliert H3K27 und führt somit zu einer Repression von entsprechenden Zielgenen. EZH2 ist in zahlreichen Tumorarten, u.a. dem Urothelkarzinom, überexprimiert. Auch von EZH2 werden somatische Mutationen beschrieben.

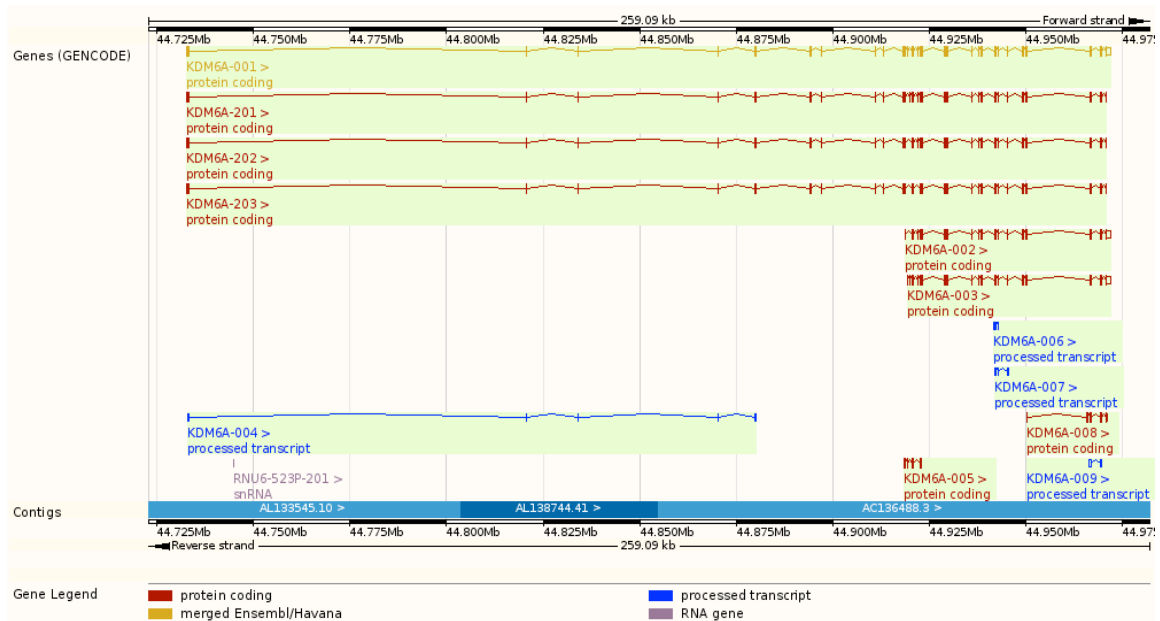
### 1.2.3 Die Histon H3K27me3-Demethylase UTX

UTX steht für *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome* und ist eine spezifische H3K27me3-Demethylase. UTX wird von dem X-chromosomalen Gen *KDM6A* kodiert und enthält sechs TPR (*tetratricopeptide repeat*) Domänen am N-terminalen Ende sowie eine JmjC-Domäne am C-terminalen Ende. Bis 2014 waren zwölf Spleißvarianten beschrieben (Übersicht in Abb. 2). Das UTX-Gen *KDM6A* entgeht der X-chromosomalen Inaktivierung und ist in allen menschlichen Zellen exprimiert (Greenfield 1998, Hong 2007). Die JmjC-Domäne von UTX ist nahezu identisch zu der JmjC-Domäne in der H3K27-Demethylase JMJD3 (Agger 2007). UTX katalysiert die Umwandlung von H3K27me3 und H3K27me2 zu H3K27me1 mit einer Substratpräferenz für H3K27me3 (Agger 2007, Lan 2007, Lee 2007). Die Umwandlung von trimethylierem H3K27 zu H3K27me1 geschieht beispielsweise bei Aktivierung der HOX A und HOX B Genloci in der embryonalen Entwicklung (Agger 2007). Die UTX Besetzung an den HOX Loci findet vor allem in Promoternähe innerhalb von Chromatindomänen statt, die sowohl durch H3K27me3 als auch durch H3K4me2 gekennzeichnet sein können (Lan 2007). Zusätzlich zu seiner Funktion als H3K27me3-Demethylase ist UTX mit dem *Mixed Lineage Leukemia 2-4 (MLL2-4)* H3K4-Methylase-Komplex assoziiert und somit Bestandteil der Trithorax-Protein-Gruppe (Issaeva 2007, Lee 2007). Durch die duale Funktion von UTX kommt eine stabile epigenetische Genaktivierung zustande.

Das paraloge Gen *KDM6C* ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert. Sein Genprodukt wird daher als UTY bezeichnet. Die Demethylaseaktivität von UTY ist vermindert. Beide Proteine können jedoch offenbar in ähnlichem Umfang zu einer Chromatinmodulierung beitragen (Walport 2014).



# 1. Einleitung



**Abb.2 : Übersicht der Spleißvarianten von *KDM6A***

In der Abbildung sind die verschiedenen Spleißvarianten des für UTX kodierenden Gens *KDM6A* auf Chromosom X dargestellt. Es sind zwölf Spleißvarianten bekannt, von denen acht proteinkodierend sind. (Quelle: *Ensembl release 75*: Feb 2014 (GRCh37.p13). Vgl. 2.1.8)

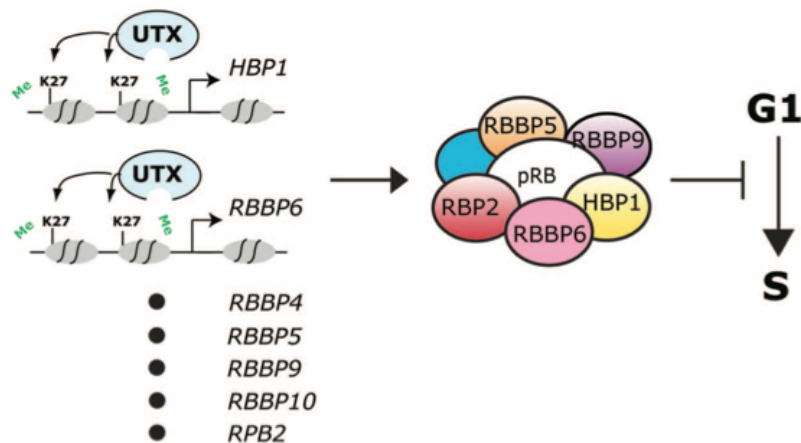
Weitere Zielgene, welche durch UTX auf Transkriptionsebene reguliert werden, sollen außer den erwähnten HOX-Genen ein ganzes Netzwerk umfassen, das für pRB1 bindende Proteine kodiert. Neben *RB1* selbst handelt es sich dabei vor allem um *HBP1* und einige RBBP-Gene (*RBBP4*, *RBBP5*, *RBBP6* und *RBBP9*) (Wang 2010). *HBP1* ist ein HMG-Box-Protein, das mit pRB1 interagiert und den Zellzyklus kontrolliert (Tevosian 1997). Somatische *HBP1*-Mutationen und eine erniedrigte Expression in vielen Tumoren legen nahe, dass *HBP1* selbst ein Tumorsuppressor ist (Paulson 2007).

Das Gen *RBBP4* kodiert für ein ubiquitär gebildetes nukleäres Protein der *WD-repeat* Proteinfamilie, das auch *RBBP4*, *NURF55* oder *RBAP48* genannt wird. Es ist ein weiterer Bestandteil des PRC2, zu dem auch *EZH2* gehört und es gestaltet durch eine direkte Interaktion mit pRB1 die Zellzykluskontrolle. Das UTX-Zielgen *RBBP9* wirkt als pRB1-Interaktionspartner ebenfalls auf die Zellzykluskontrolle und ist in den TGF $\beta$ -Signalweg involviert. Eine *RBBP9* Überexpression kann zu einer Ausschaltung eines durch TGF $\beta$  induzierten Wachstumsarrests führen (Woitach 1998). Außerdem besitzt *RBBP9* eine Serin-Hydrolase Aktivität, die in einigen

# 1. Einleitung

Tumorzelllinien nachgewiesen wurde und unter anderem in Pankreastumoren erhöht ist (Vorobiev 2012). Somit könnte UTX über die Regulation zahlreicher pRB1-Untereinheiten die Zellzykluskontrolle beeinflussen. Ein Verlust oder eine erniedrigte UTX-Konzentration könnte zu einem „*Silencing*“ des RB1-Netzwerks und somit zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle in Tumoren beitragen (siehe auch Abb.3). Die beschriebene enge funktionelle Vernetzung von UTX, HBP1 und anderen wichtigen pRB1-Untereinheiten deutet einen UTX-RB1-HBP1 „*Pathway*“ an (Wang 2009).

Van Haaften et al. beschrieben 2009 somatische Mutationen des UTX-Gens *KMD6A* in den beiden Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und KU-19-19. 2011 berichteten Gui et al. in einer Gesamt-Exon-Sequenzierung von Urothelkarzinomen über einen hohen Prozentsatz (21%) verschiedener somatischer *UTX*-Mutationen. Diese Befunde wurden in einer weiteren umfassenden Studie (The Cancer Genome Atlas Research Network 2014) bestätigt. Damit gehört *UTX* zu den am häufigsten im Urothelkarzinom mutierten Genen.



**Abb.3 : Der postulierte funktionelle Einfluss von UTX auf die Zellzykluskontrolle**

UTX demethyliert H3K27me3 an den Promoterregionen von Genen, die für Untereinheiten des RB-Komplexes kodieren. Durch deren koordinierte Transkription kann UTX den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus beeinflussen. (Entnommen: Tsai 2010)

### 1.2.4 Die Histondemethylase JMJD3

JMJD3 ist ebenso wie UTX eine spezifische Histondemethylase und weist große strukturelle Ähnlichkeiten auf. Das Gen wird als *KDM6B* bezeichnet und ist auf Chromosom 17 gelegen (Ensembl release 75: Feb 2014 (GRCh37.p13)). Vgl. 2.1.8). JMJD3 demethyliert spezifisch di- und trimethyliertes Lysin-27 an Histon H3 und aktiviert an entsprechenden Genloci die Transkription. Durch JMJD3 werden insbesondere Gene der HOX A und B *Cluster* sowie für inflammatorische Prozesse verantwortliche Gene reguliert (Agger 2007, Hong 2007, de Santa 2007, Lan 2007, Lee 2007). JMJD3 wird zudem durch eine Aktivierung des RAS-RAF-Signalwegs induziert und trägt zur Transkriptionsregulation des Tumorsuppressors p16<sup>INK4A</sup> bei (Barradas 2009, Agger 2009).

### 1.2.5 Die Histonmethyltransferase EZH2

EZH2 steht für *Enhancer of zeste*, eine spezifische H3K27 Histonmethyltransferase. EZH2 gehört zu den Polycomb-Proteinen, welche für epigenetisches Gen-„*Silencing*“, insbesondere von HOX-Genen und von Genen der Zellzykluskontrolle, verantwortlich sind (Cao 2004, Schuettengruber 2007). Für die H3K27-Methylierung ist die SET-Domäne von EZH2 verantwortlich und die Reaktion findet unter Anwesenheit der Proteine EED und Suz12 statt (Cao 2002, Nekrasov 2005, Hansen 2008). EZH2, EED und Suz12 sind zusammen mit den Proteinen RBBP4 und RBBP7 die Hauptkomponenten des *Polycomb Repressive Complex 2* (Nekrasov 2005, Schuettengruber 2007). EZH2 ist in verschiedenen Tumoren überexprimiert; in einigen Fällen ist das Gen sogar amplifiziert. Eine erhöhte EZH2-Expression ist mit erhöhter Tumorzellproliferation, Progress zu fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechterer Prognose bei Prostatakarzinom, Brustkarzinom, Endometrialkarzinom und Melanomen assoziiert (Bracken 2003, Kleer 2003, Varambally 2002, Bachmann 2006). Speziell für das Harnblasenkarzinom wurde von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet, dass eine erhöhte EZH2-Expression mit höherem Tumor Stadium und *Grading* sowie einer erhöhten Rezidivrate einhergeht (Arisan 2005, Hinz 2008, Raman 2005).

### 1.3 Zielsetzung

Das Interesse an histonmodifizierenden Proteinen und epigenetischen Mechanismen bei der Entstehung von Tumoren hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen; ihre Bedeutung ist dennoch bei weitem nicht verstanden. Bei der Histondemethylase UTX handelt es sich vermutlich um einen Tumorsuppressor. Sie steht nach bisherigem Wissensstand im Mittelpunkt eines funktionellen Regelkreises, in dem ein dynamisches Wechselspiel zwischen Histonmethylasen (EZH2) und Histondemethylasen (UTX, JMJD3) mit darauf folgender Aktivierung und Deaktivierung von Zielgenen stattfindet. Die Funktion dieser Zielgene wiederum spielt – beispielsweise durch ihren vermuteten Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle – selbst eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Im Urothelkarzinom sind vielfältige Veränderungen der genannten drei Faktoren beschrieben, wenn auch noch nicht umfassend verstanden (Wang 2010, Gui 2011). Die funktionelle Bedeutung von veränderten UTX-Zielgenen beispielsweise ist bisher kaum untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war es, Einblicke in die funktionelle Bedeutung dieser Histondemethylasen und Histonmethylase im Harnblasenkarzinom zu gewinnen mit Schwergewicht auf UTX. Die Experimente und Analysen wurden an Urothelkarzinomzelllinien, normalen Urothelzellen, Urothelkarzinom- und normalen Harnblasengewebeproben des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf durchgeführt, sowie *in silico* an einem publizierten Expressions-Datensatz (Lee 2010). Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen betrachtet:

- Wie verhalten sich die Expressionen von UTX, EZH2 und JMJD3 mRNA im Urothelkarzinom und im normalen Urothelgewebe?
- Welche *UTX*-Spleißvarianten werden in Urothelkarzinomzellen und in normalen Urothelzellen gebildet?
- Wie verhält sich die Proteinexpression von UTX und EZH2 in Urothelkarzinomzellen und normalen Urothelzellen?
- Können die somatischen *UTX*-Mutationen in den Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und KU-19-19 verifiziert werden?
- Wie verändern sich die Expressionen der *UTX*-Zielgene HBP1, RBBP4 und RBBP9 mRNA im Urothelkarzinom gegenüber normalem Urothelgewebe?
- Lässt sich ein *UTX knockdown* in Urothelkarzinomzellen durchführen und welche Auswirkungen hat er?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Gewebeproben

Folgende Gewebeproben aus der Tumorbank des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf wurden verwendet. Das Einverständnis der Patienten wurde durch ein Formblatt eingeholt und die Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität gebilligt (Studiennummer 3223).

**Tabelle 1: Verwendete Normal- und Tumorblasengewebe**

<i>Blasengewebe</i>	<i>Alter &amp; Geschlecht</i>	<i>TNM Klassifikation</i>
<b>BN 18</b>	73 J, m	benigne
<b>BN 273</b>	68 J, m	benigne
<b>BN 274</b>	66 J, m	benigne
<b>BN 275</b>	62 J, m	benigne
<b>BN 363</b>	75 J, m	benigne
<b>BN 365</b>	65 J, m	benigne
<b>BN 369</b>	86 J, m	benigne
<b>BN 373</b>	63 J, m	benigne
<b>BN 374</b>	69 J, m	benigne
<b>BN371</b>	72 J, m	benigne
<i>Blasentumor</i>	<i>Alter &amp; Geschlecht</i>	<i>TNM Klassifikation</i>
<b>BT 3</b>	75 J, m	pT3 G3
<b>BT 6</b>	76 J, m	pT3bii N2 G3
<b>BT 12</b>	60 J, m	pT3a G3
<b>BT 28</b>	68 J, m	pT3b G3
<b>BT 55</b>	74 J, m	pT4a N1 G3
<b>BT 62</b>	80 J, w	pT3b G2-3
<b>BT 67</b>	94 J, w	pT2 G3

## 2. Material und Methoden

<b>BT 69</b>	77 J, m	pT3b G3
<b>BT 111</b>	66 J, m	pT3b G2-3
<b>BT 115</b>	65 J, m	pT3a G3
<b>BT 120</b>	57 J, m	pT2 G2
<b>BT 168</b>	64 J, m	pT3 G3
<b>BT 172</b>	72 J, m	pT3a G3
<b>BT 246</b>	61 J, m	PT4a, G3
<b>BT 320</b>	67 J, m	pT2a N1 G3
<b>BT 322</b>	70 J, m	pT4a G3
<b>BT 354</b>	57 J, w	pT2b G3
<b>BT 360</b>	76 J, m	pT4a, G3
<b>BT 362</b>	75 J, m	pT2a G2
<b>BT 364</b>	65 J, m	pT4a N1 G3

### 2.1.2 Zelllinien

Die für die Experimente und Analysen verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengestellt. TCC steht für *transitional cell carcinoma*.

**Tabelle 2: Übersicht der Tumorzelllinien mit Grading/Staging der Ursprungstumoren**

<b>Zelllinie</b>	<b>Geschlecht &amp; Alter</b>	<b>TNM</b>	<b>Morphologie</b>
<b>Urothelkarzinom</b>			
<b>KU-19-19</b>	M	pT3b	epithelial
<b>BC61</b>	M	pTaG2	epithelial
<b>BFTC905</b>	F, 51 J	pTaG3	epithelial
<b>J82</b>	M	(papillär) G3	mesenchymal
<b>RT4</b>	M, 63 J	(papillär) pT2G1	epithelial
<b>RT112</b>	F	(papillär) G2	epithelial
<b>SW1710</b>	F, 84 J	(papillär) G3	mesenchymal
<b>253J</b>	F, 84 J	Lymphknotenmetastase von TCC, G2	epithelial

## 2. Material und Methoden

<b>5637</b>	M, 68 J	TCC, G2	epithelial
<b>639v</b>	M, 69 J	TCC, G3	mesenchymal
<b>647v</b>	M, 59 J	pT1G2	epithelial
<b>HT1376</b>	F, 58 J	pT2 G3	epithelial
<b>SD</b>	M	TCC	epithelial
<b>T24</b>	F, 81 J	TCC, G3 Rezidivtumor	mesenchymal
<b>UMUC3</b>	M	TCC, G3	mesenchymal
<b>UMUC6</b>	M	TCC	epithelial
<b>VmCUB1</b>	M	TCC	epithelial
<b>MGHU4</b>	M, 57 J	Urotheliale Atypie	epithelial
<b>SCaBER</b>	M	Plattenepithelkarzinom, G3	epithelial

### 2.1.3 Medien und Zusätze

Folgende Medien und Zusätze wurden für die im Labor verwendeten Urothelkarzinomzelllinien verwendet.

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Medien und Zusätze**

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
Trypsin	Sigma
Versene (0.2% EDTA in PBS)	Invitrogen
Fibroblastenüberstand	im Labor hergestellt aus in DMEM-Medium mit 10% FCS kultivierten Vorhautfibroblasten
DMEM-GlutaMAX	Invitrogen
FCS/ FBS	Biowest
Trypsin-Inhibitor	Sigma

### 2.1.4 Qualitative und quantitative PCR-Reagenzien

Folgende in Tabelle 4 aufgelisteten Reagenzien und Kits wurden für die reverse Transkription und für qualitative und quantitative PCR verwendet.

**Tabelle 4: Übersicht der Reagenzien für qualitative und quantitative PCR**

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
100 µM Oligo(dT)18 Primer	Fermentas
0,2 µg/µl Random Hexamer Primer	Fermentas
10 mM dNTP-Mix	Fermentas
40 U/µl RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas
Superscript II Reverse Transkriptase-Kit (200 U/µl)	Invitrogen
QuantiTect Reverse Transcription	Qiagen
SYBR Green PCR Mastermix	Qiagen
HotStarTaq Polymerase Kit (5 U/µl)	Qiagen



## 2. Material und Methoden

### 2.1.5 Primer

Folgende, in Tabelle 5 aufgeführten, Primer wurden in den PCR-Experimenten verwendet.

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primer für qualitative und quantitative PCR**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>	<b>Produkt (bp)</b>
<b>KDM6A</b>	RT-UTX F2	CTGACTCATCACTGCCTACA	57	83
	RT-UTX R2	AGGCTGAGAGACGCTAGG	58	
	RT-UTX F3	TTGCAGCACGAATTAAGTATTTA	54	
	RT-UTX R3-002	TTTCTGTGCTGGATTTAAATTA	51	
	RT-UTX R3-202	GGCCTAATACAGGTTTCAGTA	55	
	RT-UTX F1	CGAAAAACAAGCGGAAACT	52	1254
	RT-UTX R1	TATCAAGATGAGGCGGATG	55	
<b>KDM6B</b>	JMJD3-F1	GACCCCGACTTGTTC AAGA	57	473
	JMJD3-R1	CCCTGGTAAGCGATTTTCT	55	
<b>EZH2</b>	EZH2-F1	AATGTGTCCTGCAAGA ACTG	55	2353
	EZH2-R1	CATTTTTCTGCACAGGATCTTT	55	
<b>HBP1</b>	HBP1_F1	GGACCACCCTTTCTATGTTA	55	873
	HBP1_R1	GTAGACATACATCGCCAATA	53	
<b>RBBP4</b>	RBBP4_F1	CCCAGAACCCTTGTATCATCG	60	473
	RBBP4_R1	TTCTGATGTCCACGGAGACG	59	
<b>TBP</b>	qRT-TBP-F1	CGAAACGCCGAATATAATCC	55	62
	qRT-TBP-R1	CGTGGCTCTCTTATCCTCA	56	
<b>GAPDH</b>	GAPDH F1	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	59	166
	GAPDH R1	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	65	

## 2. Material und Methoden

### 2.1.6 Reagenzien für Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Western Blot

Folgende in Tabelle 6 aufgeführten Reagenzien wurden für die Proteinextraktion, die Proteinbestimmung und die Western Blot-Experimente verwendet.

**Tabelle 6: Reagenzien für Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Western Blot**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-170 kDa	Fermentas
Page Ruler Prestained Plus Protein Ladder 10-250 kDa	Fermentas
RIPA Puffer bestehend aus 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC; 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS); 50 mM Tris, pH 8	
BCA-Protein Assay Kit	Pierce
10xTris/Glycin/SDS Puffer	BioRad
Blotting Puffer 5x, bestehend aus 28,4 mM Tris; 192 mM Glyzin, pH 8.3	
Blocking Puffer abhängig vom jeweiligen Protokoll mit 5% Magermilchpulver (Drogerie) in 0.1% Tween-TBS oder 5% BSA in 0.1% Tween-TBS	
TBS bestehend aus 50 mM Tris, 150 mM NaCl, Millipore H <sub>2</sub> O ad 1 l, pH 7.6	
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Millipore
Mini-Protean4-TGX-Gele	BioRad
ECL™ advanced Western Blotting Detection Kit	Amersham, GE Healthcare
ECL™ Western Blotting Analysis System	Amersham, GE Healthcare
Hyperfilm ECL™ <i>high performance chemoluminescence film</i>	Amersham, GE Healthcare

## 2. Material und Methoden

Folgende in Tabelle 7 aufgeführten Primärantikörper und in Tabelle 8 aufgeführten Sekundärantikörper wurden in den Western-Blot Experimenten verwendet.

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon, Firma und Wirt</b>	<b>Konzentration</b>
KDM6A	A302-374A, Bethyl, Kaninchen	WB 1:2000
EZH2	Ab8926, Abcam, N2ICD, Kaninchen	WB 1:7000,
$\alpha$ -Tubulin	B-512, Sigma, Maus	WB 1:50000
GAPDH	6C5, Abcam, Maus	WB 1:20000

**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon, Firma und Wirt</b>	<b>Konzentration</b>
anti-rabbit HRP	Sc-2004, Santa Cruz, Ziege	1:200000 bis 1:500000
anti-mouse HRP	Sc-2005, Santa Cruz, Ziege	1:200000 bis 1:500000

### 2.1.7 Chemikalien und Antibiotika

Folgende in Tabelle 9 aufgeführten Chemikalien und Antibiotika wurden in den Experimenten verwendet.

**Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Antibiotika**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Methanol	Merck
Ethanol	Merck
Formaldehyd	Merck
DMSO	Sigma
QIAzol	Qiagen
PBS Dulbecco 9.55 g/l	Biochrom AG
GIEMSA Lösung	Merck
Blasticidin S HCl	Invitrogen

## 2. Material und Methoden

Agarose	Sigma
TAE-Puffer 10x	5 Prime
Tris-Base	Merck
Glyzin	Merck

### 2.1.8 Verwendete Kits, Geräte und Datenbanken

Folgende in Tabelle 10 aufgeführten Kits für die RNA-Isolierung, die DNA-Isolierung und -Aufkonzentration, sowie die Kern-Proteinextraktion und -Konzentrationsbestimmung wurden in den Experimenten verwendet.

**Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Micro Kit	Qiagen
QIAshredder Säulen	Qiagen
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Nucleus Extraction Kit	ActiveMotif
BCA Assay Kit	Pierce

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte.

**Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Geräte**

<b>Anwendung</b>	<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Absorptionsmessung</b>	ELISA	SLT Labinstrument Austria
	Nanodrop	Nanodrop Technologies
<b>Filmentwicklung</b>	Curix 60	AGFA
<b>Gelelektrophorese</b>	Gelelektrophoresekammer	Biometra
	Gelelektrophoreseentwicklung	Intas
<b>Mikroskopie</b>	Zellkulturmikroskop Nikon Eclipse200	Nikon
<b>Qualitative PCR</b>	ThermocyclerT3	Biometra
<b>Real Time PCR</b>	LightCycler2.0	Roche

## 2. Material und Methoden

	ABI7900HT	Applied Biosciences
<b>Schüttler &amp; Zentrifugen</b>	Orbitalshaker Avanti <sup>TM</sup> 30/ Allegra 21R Tischzentrifugen Roller	Neolab, Stuart Scientific Beckmann Coulter Eppendorf SLT Labinstruments Austria
<b>Thermomixer und Vortexer</b>	Thermomixer Vortexer	Eppendorf Eppendorf
<b>Western-Blot-Apparatur</b>	TetraCell	Biorad
<b>Zellkultur</b>	Brutschrank	Heraeus, Edison

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Datenbanken. Zitiert wurden unter anderem die COSMIC Datenbank. Diese ist ein Projekt des *Wellcome Trust Sanger Institute, Genome Research Limited* in Cambridge - UK. Als eine der weltweit größten Genomdatenbanken werden nicht nur die Daten des Humangenomprojekts aufgeführt, sondern auch die des „*The Cancer Genome Atlas (TCGA)*“ und des „*The International Cancer Genome Consortium (ICGC)*“ Portals. Die Mutationsdaten bzw. Abb. 39 wurden dankenswerter Weise der „*Sanger Institute Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*“ website, (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>), entnommen (Bamford 2004).

Die Daten sind im Internet unter dem folgenden Link erreichbar: [http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&ln=KDM6A&res\\_type=AA&all\\_data=&sn=urinary\\_tract&seqlen=1402&id=5588&export=html&start=1&end=1381](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&ln=KDM6A&res_type=AA&all_data=&sn=urinary_tract&seqlen=1402&id=5588&export=html&start=1&end=1381).

Die Daten bezüglich der *UTX*-Spleißvarianten und Abb. 2 wurden der Ensembl Datenbank in der Version *Ensembl release 75: Feb 2014 (GRCh37.p13)* entnommen. Diese Datenbank ist ein gemeinsames Projekt des *Wellcome Trust Sanger Institute* und des EMBL-EBI des „*European Bioinformatics Institute*“, welches ein von der Europäischen Union geförderter Bestandteil des „*The European Molecular Biology Laboratory*“ ist (Flicek 2014).

Die Daten sind im Ensembl Archiv unter folgendem Link im Internet auffindbar: [http://Feb2014.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147050;r=X:44873177-45112602](http://Feb2014.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147050;r=X:44873177-45112602).

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 12: Datenbanken - Verwendung und Homepage**

<b>Datenbank</b>	<b>Zweck</b>	<b>Domain</b>
Cancer genome workbench	Sammlung von Mutationen, Gendosisveränderungen, Expressions- und Methylierungsdaten von verschiedenen Projekten; speziell in Zelllinien und Tumorgeweben	<a href="https://cgwb.nci.nih.gov/">https://cgwb.nci.nih.gov/</a>
COSMIC	Datenbank von DNA Veränderungen und Mutationen in Gewebe und Zelllinien	<a href="http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/">http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/</a>
Ensembl	Genomkartierung mit Möglichkeiten zur Analyse von Genmodifikationen, Expressionen, Regulation. Erstellung von DNA und RNA Sequenzen. Spleißvarianten	<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>
pubmed	Literaturrecherche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
Oncomine	Sammlung von Microarrays und Genexpressionsanalysen	<a href="https://www.oncomine.org">https://www.oncomine.org</a>
UCSC genome browser	Genomkartierung, Ausgabe von DNA und RNA Sequenzen, in-silico PCR	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

Die in den Experimenten verwendeten invasiven Urothelkarzinomzelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium jeweils 10% FCS beigefügt. Bei DMEM handelt es sich um ein ergänztes Basal- und Minimalmedium nach Eagle. Das Medium zeichnet sich durch eine stark erhöhte Konzentration von Aminosäuren, Vitaminen und Puffer aus; die Kalziumkonzentration beträgt 1,8 mM. Es wurde jeweils in der Zellkultur in einer sterilen Werkbank gearbeitet.

#### Urotheliale Primärkulturen

Aus der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden regelmäßig Uretern nach Tumornephrektomien an das Forschungslabor überstellt. Aus diesen konnten urotheliale Primärzellen gewonnen werden. Der jeweilige Ureter wurde von Fett und Bindegewebe befreit, der Länge nach aufgeschnitten und mit der Urothelseite nach oben in einer Versene/HEPES/Aprotinin-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag konnten die Urothelzellen vom Ureter abgetrennt und pelletiert werden. Danach erfolgte die Resuspension mit KSFM und Aussaat in mit Kollagen IV beschichtete Zellkulturflaschen. Das Medium *KSFM* zeichnet sich durch serumfreiheit und eine niedrige Kalziumkonzentration (ca. 70 µM) aus. Zusätzlich sind 5 ng/ml EGF (*epidermal growth factor*) und 50 µg/ml BPE supplementiert.

#### Auftauen von Zellen

Um Zellen neu in Kultur anzulegen, wurden sie aus dem Stickstofftank (ca. -196 °C) entnommen, aufgewärmt, in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit Medium aufgefüllt. Zum vollständigen Entfernen des zytotoxischen DMSO wurden die Zellen zweimal bei 1000 rpm für fünf Minuten pelletiert; das Medium wurde abgesaugt, durch frisches ersetzt und die Zellen anschließend in Kulturflaschen überführt. Die Kulturflaschen wurden danach in den Brutschrank mit 37 °C Temperatur und einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre überführt.

### **Kryokonservierung von Zellen**

Zur langfristigen Aufbewahrung im Stickstofftank bei ca.  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen in den Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen, um sämtliche Mediumreste zu entfernen und anschließend durch Zugabe von Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden danach in einem eiskalten Gemisch aus FCS und DMSO (im Verhältnis 9:1) bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  langsam eingefroren und darauf in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **Medienwechsel und Passagieren**

Zur optimalen Kultivierung der Zellen wurden diese regelmäßig, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, passagiert (ca. 1-3x/Woche). Ein Teil der Zellen wurde in diesem Zuge auch kryokonserviert (s.o.). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend wurde je nach Flaschengröße Trypsin-EDTA zugegeben und die Gefäße für circa fünf Minuten in den Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  gestellt. Nach erfolgtem Ablösen der Zellen vom Kulturboden und mikroskopischer Kontrolle wurde frisches Medium (10% FCS) zugegeben, um die Wirkung des Trypsin-EDTA zu neutralisieren und das Gemisch geeignet verdünnt (je nach Zelllinie 1:5 - 1:10) neuen Kulturflaschen zugeführt.

### **2.2.2 Methodik zur RNA-, DNA- und Protein-Extraktion und Analyse**

#### **RNA-Isolation und Reverse Transkriptase PCR**

Für die später durchgeführten Expressionsanalysen wurde RNA mit  $\beta$ -Mercaptoethanol nach einem im urologischen Forschungslabor etablierten Protokoll aus Zellkulturen extrahiert und mit dem RNA-Mini-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Entsprechende Zelllinien wurden in *6-well* Platten kultiviert und bei adäquater Zelldichte mit PBS gewaschen. Anschließend wurden  $350\text{ }\mu\text{l}$  RLT-*Buffer* mit  $\beta$ -Mercaptoethanol beigefügt und die Zellen lysiert. Die RNA wurde entsprechend dem RNEasy Mini Kit (Qiagen) weiterbearbeitet und in RNase-freiem Wasser eluiert. Für geringere Zellmengen wurde das RNA-Micro-Kit von Qiagen verwendet.



## 2. Material und Methoden

Eine quantitative und qualitative Bestimmung der RNA wurde spektralphotometrisch mit dem Nanodrop (Nanodrop Technologies) durchgeführt.

Für die Reverse-Transkription wurden 2 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt; dabei wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten Bestandteile verwendet. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 13: Mastermixe und Bedingungen für die Reverse Transkription**

<b>Mix A</b>	<b>Volumen [µl]</b>	<b>Programm</b>
2 µg RNA	10	
dNTP [10 mM]	1	
OligodT [500 ng/µl]	0.6	
Random Hexamere [200 ng/µl]	0.125	
Wasser (RNase frei)	0.275	
		65°C 5 min

<b>Mix B</b>	<b>Volumen [µl]</b>	<b>Programm</b>
5xFS Puffer	4	
10x DTT	2	
RNase Inhibitor	1	
SIIRT [200 U/µl]	1	
		25°C 10 min

### **Polymerase Kettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Mit Hilfe von Primern für eine spezifische Matrize und der Taq-Polymerase können exakt determinierte PCR-Produkte aus DNA oder cDNA amplifiziert werden. Die klassische (qualitative) PCR wurde eingesetzt, um eine Aussage über

## 2. Material und Methoden

---

das Vorhandensein verschiedener Spleißvarianten von UTX zu treffen. Des Weiteren wurden sämtliche neu entworfene Primer initial so ausgetestet. Die PCR besteht aus drei verschiedenen Schritten. Durch die Denaturierung bei 94-96 °C werden doppelsträngige DNA oder dimerisierte Primer in Einzelstränge getrennt. Bei dem zweiten Schritt der Primerhybridisierung (*primer annealing*) wird die Reaktion auf für das jeweilige Primerpaar spezifischer Temperatur und Dauer gehalten, damit diese sich optimal an die Ausgangssubstanz anlagern können. Die bestimmenden Faktoren für die Anlagerungstemperatur sind Länge sowie Sequenz der Primer. Bei der folgenden Elongation fügt die DNA-Polymerase die entsprechenden Nukleotide komplementär zur Matrize an. Nach einer geeigneten Zahl von Zyklen wird die Amplifikation durch Kühlung auf 4 °C beendet. Die optimale Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase liegt bei 72 °C. Die Elongationszeit hängt von der Produktgröße ab.

### **Quantitative Real-Time-PCR mit SYBR-Green**

Die *Real-Time*-PCR stellt eine Modifikation der herkömmlichen PCR dar und ermöglichte bei hoher Sensitivität quantitative Messungen von cDNA und DNA. Dabei wird die Menge an Amplifikat durch Fluoreszenz-Messungen am Ende jedes PCR-Zyklus fortlaufend erfasst. Bei den durchgeführten quantitativen Experimenten wurde das Roche LightCycler Carousel-Based System in Kombination mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen verwendet. Für die Gewebeserien mit einer großen Anzahl zu messenden Proben wurde der ABI 7900HT verwendet.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 14: Mastermixe für die quantitative und die qualitative PCR**

	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
<b>Mix für Lightcycler (quantitativ)</b>	10
2x Sybrgreen	5
Forward Primer 1:10	1
Reverse Primer 1:10	1
Wasser	2
cDNA 1:10	1
<b>Mix für ABI (quantitativ)</b>	20
SYBR-Green	10
Wasser	8,8
Primer Forward	0,1
Primer Reverse	0,1
cDNA	1

	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
<b>Mix für Thermocycler (qualitativ)</b>	25
dNTP	0,375
Forward Primer 1:10	1
Reverse Primer 1:10	1
Puffer	2,5
Hot Star Taq	0,2
Wasser	18,925
cDNA 1:10	1

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 15: Bedingungen für die Real-Time-PCR**

	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	95	15 min	
Annealing	95 T <sub>m</sub> *	15 sec 20-30 sec	45x
Elongation	72	**	
Schmelzkurvenanalyse	90 60-99	Gradient 0,2°C/sec	
Kühlung	42	20 sec, Ende	

\*Annealingtemperatur \*\*Die Elongationszeit ist abhängig von der Produktgröße und wird folgendermaßen ermittelt: Produktgröße [bp]/25 = Elongationszeit [sec]

**Tabelle 16: qRT-Bedingungen für die qualitative-PCR**

	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Aktivierungsphase	95	10 min	
Denaturierung	95	30 sec	45x
Annealing	T <sub>m</sub> *	20-30 sec	
Elongation	72	1 kb/min	
Kühlung	4		

\*Annealingtemperatur. Die Elongationszeit wurde individuell gewählt, unter der Annahme, dass die Hot Star Taq Polymerase mit 1 kb/min arbeitet.

### **DNA-Isolierung**

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

### **Primerdesign mit der Pyromark-Assay-Software**

Sämtliche für die Arbeit verwendeten Primer wurden manuell und mit Hilfe der Pyromark-Assay-Software von Qiagen selbst entworfen. Die notwendigen Informationen über das Gen und seine Spleißvarianten wurden in entsprechenden Datenbanken eingeholt. Gewöhnlich hat sich dabei die Ensembl-Datenbank bewährt (<http://www.ensembl.org/index.html>, Flicek 2014). Zur Untersuchung der Spleißvarianten wurde ein *Alignment* der verschiedenen Sequenzen durchgeführt um gemeinsame und unterschiedliche Sequenzabschnitte zu identifizieren. Zur Überprüfung der Spezifität wurde für ausgewählte Primerpaare abschließend eine *in-silico* PCR auf dem UCSC Genome Browser durchgeführt (<http://genome.ucsc.edu/>).

### **DNA-Sequenzierung**

Um die in der Literatur beschriebenen Mutationen der Harnblasenkarzinom Zelllinien RT-112 und KU-19-19 zu verifizieren, wurden PCR-Amplifikate aus DNA beider Zelllinien sequenziert. Für jede Zelllinie wurde dazu mit der Pyromarksoftware (Fa. Qiagen) ein Primerpaar entworfen, mit dem sich ein ca. 120 bp großes Produkt bildet, das den Bereich abdeckt, in dem sich die Mutation befindet. Die Sequenzierung der Amplifikate wurde durch den Sequenzierungsservice im Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Universität Düsseldorf mit der klassischen Methode nach Sanger durchgeführt. Anschließend wurde die bestimmte Sequenz mit der bekannten Sequenz verglichen und die Mutationen im Chromatogramm identifiziert. In der Zelllinie KU-19-19 liegt die Mutation an Position GRCh 37 X 44.929.487 in Exon 17 der Spleißvarianten KDM6A-001 und -202, in der Spleißvariante KDM6A-201 auf Exon 18. In der Zelllinie RT-112 liegt die Mutation an Position GRCh 37 X 44.942.836 und somit in den Spleißvarianten KDM6A-001 und -202 in Exon 23 bzw. in der Spleißvariante KDM6A-201 in Exon 24.

## 2. Material und Methoden

Die verwendeten Amplifikations- und Sequenzierprimer sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Übersicht über die verwendeten KDM6A Sequenzierprimer**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Firma</b>
KDM6A	<i>Forward</i>	CTAAACTTCCTGCTTTTGTGC	Sequenzierprimer für KU-19-19	Eurofins MWG Operon
	<i>Reverse</i>	ACAAGATTCTGGCTGTCTTT		
KDM6A	<i>Forward</i>	CATCTTCAGCCATTTCAA	Sequenzierprimer für RT-112	Eurofins MWG Operon
	<i>Reverse</i>	ATTCTGATCATGCCAGTAAGT		

### Proteinextraktion

Um Proteine von Zelllinien zu gewinnen, wurden diese aus praktischen Gründen in Zellkulturschalen ausgesät. Nach erreichter Kultivierung wurden die Zellen zur Ganzzellproteinextraktion mit einer Mischung aus kaltem Proteinlysepuffer, Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren (1% Volumen) behandelt und für 30 Minuten auf Eis geschüttelt. Das entstandene Zelllysat wurde mit einem *Cell Scraper* abgekratzt und in ein Eppendorf Gefäß pipettiert. Anschließend wurde es bei 4 °C und 15000 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand, welcher das Ganzzellproteinextrakt enthielt, wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß überführt und konnte bei -70 °C gelagert werden. Die Extraktion von Proteinen aus der zytoplasmatischen Fraktion und der Kernfraktion erfolgte mit dem Nucleus Extraction Kit von Active Motif nach dem entsprechenden Protokoll.

### Western Blot-Analyse

Der Western Blot ist der Goldstandard zur Detektion von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und Bestimmung ihrer Größe. Von jeder Probe wurde eine einheitliche Proteinmenge von 15 µg aufgetragen. Sie wurden in der Vorbereitung entsprechend mit Lysepuffer auf ein Volumen von 10 µL verdünnt und in 0,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt. Daraufhin wurde jede Probe mit zusätzlichen

## 2. Material und Methoden

---

10 µL bestehend aus 9,5 µL Laemmli-Puffer und 0,5 β-Merkaptoethanol beladen, so dass ein Endvolumen von 20 µL erreicht wurde. Die Proben wurden bei 99 °C in einem Thermoheizblock für fünf Minuten erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Beim nächsten Schritt wurde ein, je nach gewünschter Proteinauftrennung, 8 bis 12-prozentiges Gel in die Vorrichtung der Western-Blot-Kammer eingespannt und diese mit dem Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Kammern mit der Probe beladen und eine zusätzliche Tasche mit einem Molekulargewichtsmarker bestückt. Nach Verschließen der Kammer wurde eine Spannung von konstanten 200 mV angelegt. Die Proteine wurden so über einen Zeitraum von 60 Minuten der Größe nach aufgetrennt. Für das Blotting wurde das Gel in einen Transfer-Apparat überführt. In diesem Apparat werden die Proteine durch eine elektrische Spannung von 180 mA über 90 Minuten aus dem Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Sie sind danach für weitere Arbeitsschritte verfügbar.

Für die Analyse wurde zunächst die unspezifische Bindung blockiert. Dafür wurde die Membran für eine Stunde in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver in 0,1% TBS-Tween auf einer Rüttelmaschine bewegt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für das jeweilig zu detektierende Protein. Je nach Antikörpertyp wurde eine Verdünnung zwischen 1:2000 und 1:10000 in 5% Magermilch in TBST 0,1% oder 0,1% BSA in TBST 0,1% durchgeführt. Die Antikörperinkubation erfolgte ebenfalls je nach Typ entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder zwölf bis 16 Stunden bei 4 °C. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten in einer 0,1%igen TBST-Lösung gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um an HRP-konjugierte *goat-anti-rabbit-* oder *goat-anti-mouse-*Antikörper, welche im Verhältnis zwischen 1:200.000 und 1:500.000 in 1% Magermilch in TBST 0,1% gelöst wurden. Dieser Schritt dauerte eine Stunde und wurde von dreimaligem Waschen der Membran in 0,1%igem TBST für jeweils zehn Minuten gefolgt. Im Anschluss wurde die Detektion mit dem ECL-Advanced-Kit durchgeführt. Die Membran wurde kurz in einer 1xTBS-Lösung gespült und auf eine Schale positioniert, in der zuvor 300 µL Lösung A mit 300 µL Lösung B des Detektionskits vermischt wurden. Nach circa 30 Sekunden wurde die Membran in eine Filmkassette unter eine klare Folie überführt und im Dunkelraum ein Amersham-Spezialfilm zur Belichtung eingelegt. Die Belichtungsdauer variierte von Antikörper zu Antikörper zwischen 15 Sekunden und vier Minuten.

Der Film wurde anschließend in einer AGFA-Entwicklungsmaschine entwickelt. Die Membranen konnten mehrmals mit verschiedenen Antikörpern hintereinander inkubiert werden und zur mittelfristigen Lagerung bei 4 °C in 1xTBS-Lösung aufbewahrt werden.

### 2.2.3 Funktionelle Versuche

#### ***Knock-down Versuche***

Bei der RNA-Interferenz binden kurzsträngige Ribonukleinsäuren (physiologisch mikroRNAs) zusammen mit Proteinkomplexen an die mRNA. Es kommt zu deren Abbau oder zumindest wird die Translation blockiert. Bei den durchgeführten Experimenten wurde eine Herunterregulation von spezifischen Genen mit synthetischer siRNA („*knock-down*“) durchgeführt. Die entsprechende siRNA wurde bei der Firma Invitrogen erworben. Zur Transfektion mit siRNA und anschließendem *knock-down* wurden Zelllinien gewählt, welche das entsprechende Gen möglichst stark auf mRNA- und Protein-Ebene exprimieren. Zusätzlich wurden Linien gewählt, die entweder RB1-Mutationen enthalten oder nicht. Sämtliche Arbeiten wurden in einer sterilen Werkbank im Zellkulturraum durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-*well*-Platten so ausgesät, dass sie am folgenden Tag möglichst eine Bewachung von 30-60% aufwiesen. Pro 6-*well*-Platte wurden zwei *wells* mit der siRNA transfiziert, zwei *wells* mit einer Kontroll-siRNA und zwei *wells* blieben untransfiziert. Die siRNA-Transfektion wurde nach dem *forward transfection* Protokoll von Invitrogen mit dem Transfektionsreagenz RNAiMAX durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit einem 300 µl Reaktionsansatz transfiziert, bestehend aus 4,5 µl RNAiMax in 150 µl Opti-Mem und 5-10 µM siRNA (Zielgen-spezifisch und eine Irrelevante=IR) in 150 µl Opti-Mem. Nach 24 bis 72 Stunden wurde, je nach Fragestellung, RNA oder Protein isoliert und analysiert.



## 2. Material und Methoden

Folgende in Tabelle 18 dargestellte siRNA Sequenzen wurden für die Experimente verwendet.

**Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten siRNA-Sequenzen**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>ID</b>	<b>Firma</b>
KDM6A	Sense	GCAAAUGUCCAGUGUAUAGGUUUA	UTXHSS111232 = si32	Invitrogen
	Antisense	UAAACCUAUACACUGGAACAUUUGC		
KDM6A	Sense	UCAGUUAGCUUUGGUUGACUGUAAU	UTXHSS111234 = si34	Invitrogen
	Antisense	AUUACAGUCAACCAAAGCUAACUGA		
KDM6A	Sense	GAACACAGACUAUGAGUCUUUA	UTHSS 187656 = si18	Invitrogen
	Antisense	UAAACUAGACUCAUAGUCUGUGUUC		
Negativ-kontrolle	unbekannt	silencer select stealth RNAi	Negativkontrolle	Invitrogen
Negativ-kontrolle	unbekannt	siRNA	Negativkontrolle	Dharmacon

### 2.2.4 Statistische Auswertungen

Die in den Experimenten und Recherchen generierten Daten wurden mit Microsoft Excel bzw. Microsoft PowerPoint gesammelt und bearbeitet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen

Um einen Überblick über die Expression der epigenetischen Regulatoren zu gewinnen wurden quantitative PCRs durchgeführt. Dabei standen zunächst die Histondemethylasen UTX und JMJD3, sowie die Histonmethylase EZH2 im Blickpunkt. Zusätzlich wurde die Expression von mutmaßlichen UTX-Zielgenen gemessen.

##### 3.1.1 Expressionsanalyse von UTX

Es sind zwölf Spleißvarianten der Histondemethylase UTX bekannt (vgl. Abb. 2), von denen acht proteinkodierend sind. Um einen Überblick über die Expression der wichtigsten Spleißvarianten zu gewinnen, wurde die Expression von UTX-cDNA in einer Auswahl von Urothelkarzinomzelllinien, normalen Urothelzellen (UP) und der im Urologischen Forschungslabor etablierten Gewebeserie bestehend aus Harnblasen Tumor- und Normalgeweben gemessen.

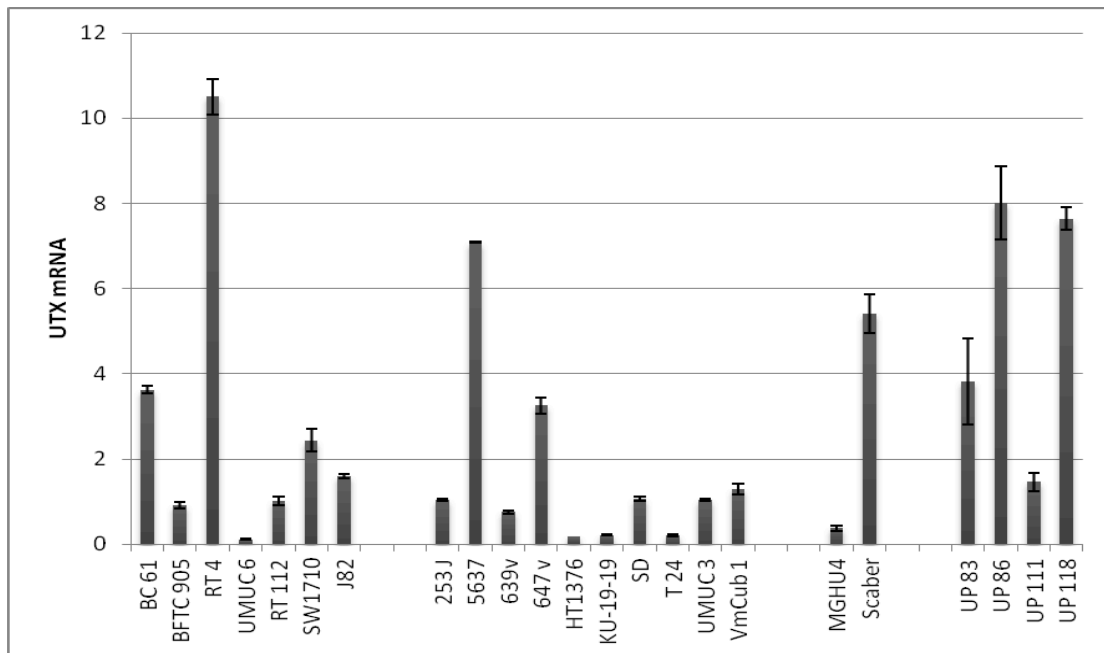
Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. Um in allen Proben vergleichbare und valide Ergebnisse zu erhalten, wurde ein Mittelwert aus der relativen *UTX*-Expression und der Expression des Haushalts-Gens *TBP* berechnet. Um genomische DNA von der Amplifikation auszuschließen, lagen die Oligonukleotid-Primer exon-übergreifend. Das verwendete Primerpaar detektierte zudem alle relevanten Spleißvarianten von *UTX*.

Wie in Abb. 4 dargestellt, ist die Expression von UTX in den Karzinom-Zelllinien und den normalen Urothelzellen (UP) inhomogen, jedoch insgesamt tendenziell niedriger in den Tumorzelllinien. Es fallen Zelllinien auf, in denen UTX sehr niedrig exprimiert ist, nämlich UMUC6, HT1376, T24 und MGHU4. Dem gegenüber stehen die Zelllinien BC61, BFTC-905, RT4, SW1710, J82, 253J, 5637, 639V, 647v, SD, UMUC3, VmCub1 und SCaBER mit etwas höherer Expression von UTX. Eine Aufteilung der Proben nach Ursprung aus Tumorsubentitäten zeigt in der Feinanalyse keine auffälligen Expressionsmuster. Zu den Zelllinien mit der höchsten Expression zählen 5637 und 647v mit RB1-Inaktivierung, jedoch nicht HT1376 mit

### 3. Ergebnisse

dem gleichen Defekt. Im Vergleich war die Expression von UTX in weiblichen Urothelkarzinomzelllinien eher niedriger als in männlichen (Ergebnis nicht dargestellt).

Einen gesonderten Stellenwert unter den gemessenen Proben nehmen die Zelllinien RT-112 und KU-19-19 ein. Beide Zelllinien weisen eine somatische Mutation im *UTX* Gen auf. Dies spiegelt sich offenbar in einer niedrigen Expression in beiden Proben wieder.

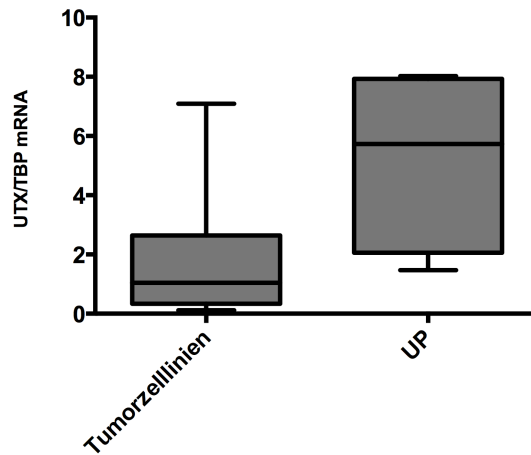


**Abb. 4: Expression von UTX/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen.**

Das Diagramm zeigt die relative UTX-mRNA-Gesamtexpression mit Standardabweichungen. Auf der linken Seite sind die Tumorzelllinien abgebildet. Links Zelllinien aus papillären Tumoren, mittig Zelllinien aus invasiven Tumoren und rechts die Zelllinien aus einer Dysplasie bzw. ganz rechts die vier gemessenen normalen Urothelzellen. Als Referenz wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. UTX wird in allen Proben exprimiert. In den Zelllinien RT112 und KU-19-19, welche somatische *UTX*-Mutationen aufweisen, ist UTX vermindert exprimiert.

### 3. Ergebnisse

Beim statistischen Vergleich der UTX-Expression in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen (Abb. 5) zeigt sich, dass UTX in den Tumorzelllinien signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) exprimiert wird als in den normalen Urothelzellen.



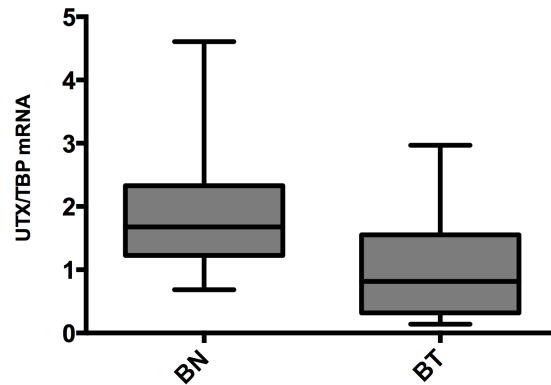
**Abb. 5 Expression von UTX/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

UTX wird in Urothelkarzinomzelllinien signifikant niedriger exprimiert als in normalen Urothelzellen (UP). Statistische Analyse der UTX/TBP-mRNA-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien, N=18 (linker Boxplot), und UP N=4 (rechter Boxplot). *Two tailed p-value* \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney-Test.

Mittels qRT-PCR wurde weiterhin die Expression von UTX in den Tumor- und Normalgewebeproben gemessen. Das Ergebnis zeigt Abb. 6. Hier zeigten sich deutlichere Unterschiede in der Expression von UTX zwischen Tumor- und Normalgewebe. Die UTX-Expression in den Proben aus Tumorgewebe ist signifikant niedriger als im Normalgewebe.

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 6: Expression von UTX/TBP mRNA in Harnblase-Normal- und -Tumorgeweben**

UTX-Expression in den Proben der Harnblasengewebeserie des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf bestimmt mittels qRT-PCR. Der linke Boxplot zeigt die relative UTX-mRNA-Expression in Blasen-Normalgeweben, N=10. Der rechte Boxplot stellt die relative UTX-mRNA-Expression in Blasen-Tumorgeweben dar, N=19. *Two tailed p-value* \* $p < 0,05$  im Mann-Whitney-Test.

Beide Messanordnungen führen zu der Schlussfolgerung, dass der UTX-mRNA-Spiegel im Harnblasenkarzinomgewebe niedriger sein könnte als im gesunden Harnblasengewebe.

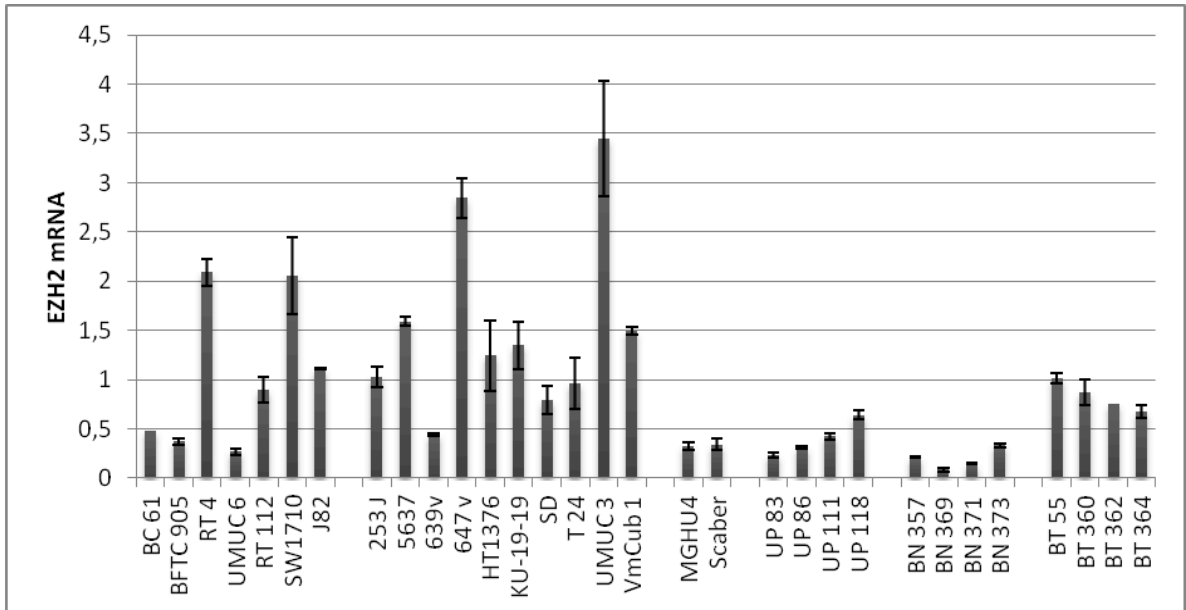
#### 3.1.2 Expressionsanalyse von EZH2

Die Expression der zu UTX antagonistisch wirkenden Histonmethylase EZH2 ist von besonderem Interesse, weil sie in diversen Tumorentitäten erhöht ist (siehe 1.2.5). Daher wurde in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen, sowie an der Gewebeserie des Urologischen Forschungslabors, die EZH2-Expression gemessen. Auch hier wurde das Primerpaar so erstellt, dass es zu keinem Störeinfluss von genomischer-DNA kommen konnte und das Verhältnis aus relativer Expression von EZH2- und TBP-mRNA errechnet.

Konform mit den Ergebnissen aus der Fachliteratur ist in Abb. 7 eine Überexpression von EZH2/TBP in den meisten Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zu den normalen Urothelzellen zu sehen. Bei der Messung der EZH2/TBP-Expression in vier zufällig ausgewählten Proben aus Tumor- und Normalgewebe-Proben zeigte sich im Tumorgewebe ebenfalls eine Überexpression von EZH2. Abb. 8 fasst die Messergebnisse für die gesamte Gewebeserie des urologischen Forschungs-

### 3. Ergebnisse

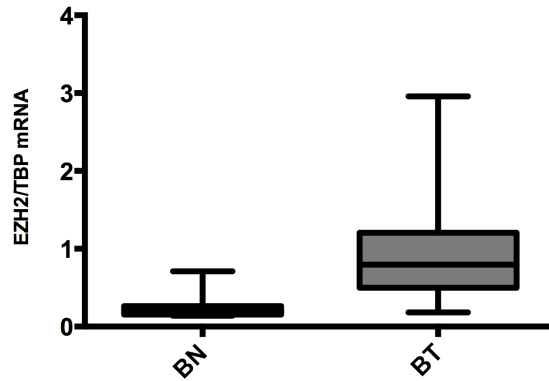
bors zusammen. Die EZH2-Expression ist im Urothelkarzinom gegenüber normalem Harnblasen-Gewebe hochsignifikant erhöht.



**Abb. 7: Expression von EZH2/TBP mRNA in Urothelkazinomzelllinien, normalen Urothelzellen und ausgewählten Geweben**

EZH2 wird in den Tumorzelllinien und im Tumorgewebe meist höher exprimiert als in den UP bzw. im Normalgewebe. Das Balkendiagramm zeigt die relative EZH2-mRNA-Gesamtexpression mit Standardabweichung gemessen per qRT-PCR. Als Standard wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Im linken Bereich wird die Expression in den Urothelkarzinomzelllinien (Anordnung wie in Abb. 4) gefolgt von den normalen Urothelzellen gezeigt. Im rechten Bildbereich wird anhand von jeweils vier Proben exemplarisch die Expression in Blase-Normalgewebe und Blase-Tumorgewebe gezeigt.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 8: Expression von EZH2/TBP mRNA in Normal- und Tumorgewebe der Harnblase**

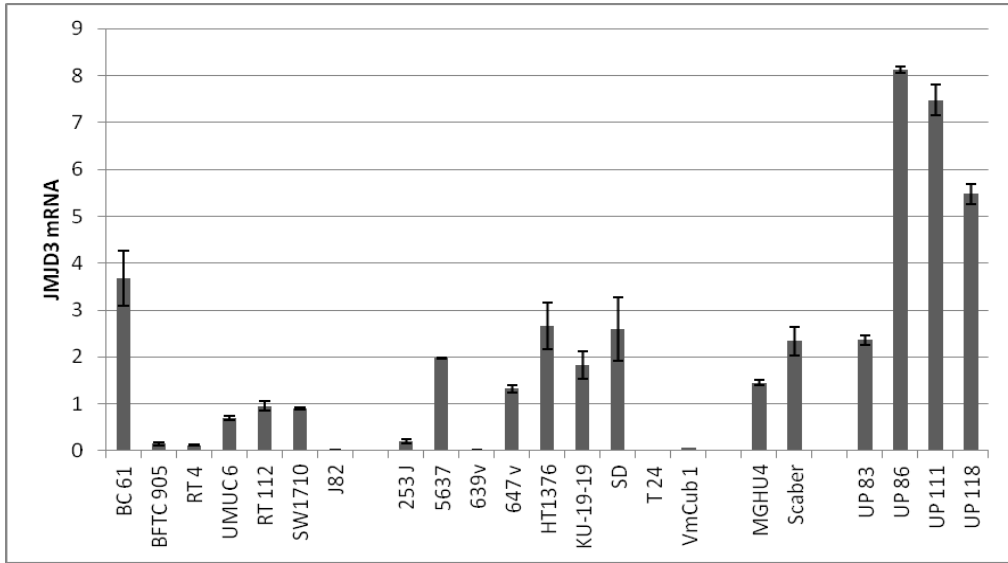
EZH2-mRNA-Expression in den Proben des Harnblasensets des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf. EZH2 wird im Harnblase-Tumorgewebe signifikant höher exprimiert als im normalen Harnblasengewebe. Im linken Boxplot ist die relative EZH2-mRNA-Expression im Blase-Normalgewebe dargestellt, N=11. Der rechte Boxplot stellt die relative EZH2-mRNA-Expression im Blasen-Tumorgewebe dar, N=21. *Two tailed p-value* \*\*\* $p < 0,0001$ , parametrisch getestet.

#### 3.1.3 Expressionsanalyse von JMJD3

Die Expression der Histondemethylase JMJD3 sollte gemessen werden, da sie große funktionelle Ähnlichkeit mit UTX hat. Die JMJD3-Expression wurde ebenfalls mittels qRT-PCR gemessen, in einem ersten Schritt in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen.

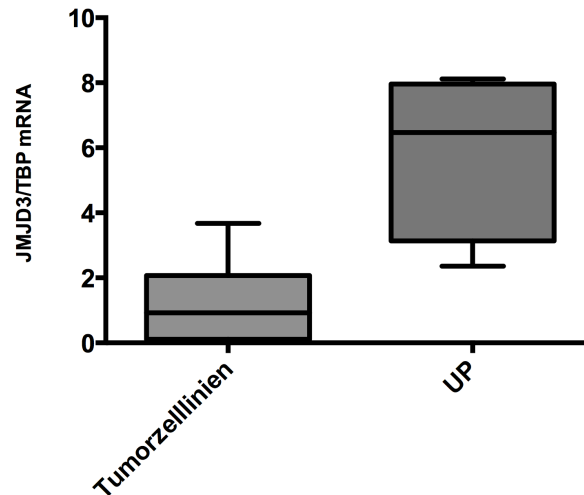
Wie Abb.9 zeigt entsteht zunächst der generelle Eindruck, dass JMJD3 in den normalen Urothelzellen höher exprimiert wird, als in den ebenfalls gemessenen Tumorzelllinien. Bei der Betrachtung der Expression in den Zelllinien fallen solche mit sehr niedriger bis kaum vorhandener Expression und solche mit annähernd normaler JMJD3-Expression auf. Die beiden Zelllinien KU-19-19 und RT112, welche durch somatische *UTX*-Mutationen gekennzeichnet sind, weisen eher hohe JMJD3-Spiegel auf.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 9: Expression von JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

Das Balkendiagramm zeigt die relative JMJD3-mRNA-Gesamtexpression mit Standardabweichung gemessen per qRT-PCR. Als Standard wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Im linken Bereich wird die Expression in den Tumorzelllinien (angeordnet wie in Abb.4), im rechten Bereich die Expression in den normalen Urothelzellen gezeigt.



**Abb. 10 Expression von JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

JMJD3 wird in Urothelkarzinomzelllinien signifikant niedriger exprimiert als in normalen Urothelzellen. Statistische Analyse der JMJD3/TBP-mRNA-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien, N=18 (linker Boxplot), und UP, N=4 (rechter Boxplot). *Two tailed p-value* \*\* $p < 0,01$ , getestet mit dem Mann-Whitney-Test.



### 3. Ergebnisse

---

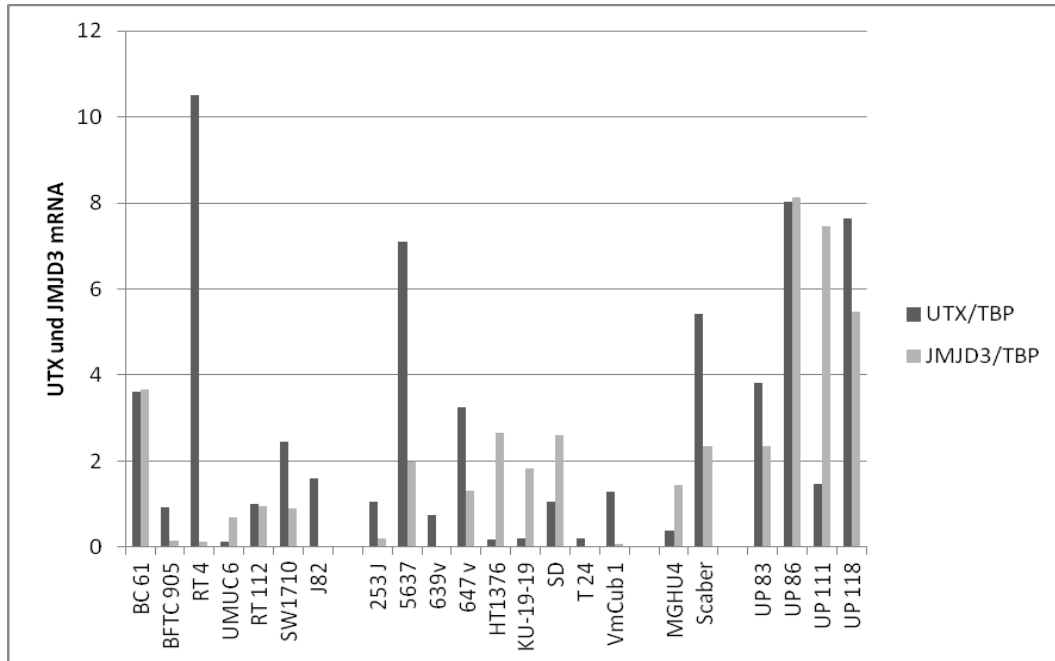
Abb. 10 zeigt den Boxplot der JMJD3-Expression in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen. Mit einem *two tailed p-value* von 0,0019 ist die JMJD3-Expression in den Tumorzelllinien signifikant niedriger als in den gemessenen normalen Urothelzellen.

Eine Messung an den Gewebeproben wurde nicht durchgeführt, da Vorversuche zeigten, dass diese nicht sinnvoll ist. Die gemessenen JMJD3-Expressionen variierten teilweise um ein Vielfaches und lagen - anders als bei UTX und EZH2 - oft weit über den Werten der Zelllinien und normalen Urothelzellen, so dass Störfaktoren, wie z.B. der Einfluss von variabel vorhandenen Lymphozyten mit besonders hoher JMJD3-Expression, in der Gewebeserie nicht ausgeschlossen werden konnten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.4 Korrelation der Expression von UTX/TBP und JMJD3/TBP

Vor dem Hintergrund, dass einige Zelllinien mit niedriger UTX-Expression eine relativ starke JMJD3-Expression aufwiesen und umgekehrt, wurden die Expressionsdaten der Messungen von UTX/TBP und JMJD3/TBP miteinander verglichen.



**Abb. 11: Vergleichende Darstellung der Expression von UTX/TBP mRNA mit JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

Die UTX-Expression scheint sich in einigen Zelllinien invers zur JMJD3-Expression zu verhalten. Das Balkendiagramm zeigt die relative UTX- und JMJD3-mRNA-Gesamtexpression mit Standardabweichung. Als Standard wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Im linken Bereich wird die Expression in den Tumorzelllinien gezeigt. (Vgl. Abb.4) Im rechten Bereich wird die Expression in den normalen Urothelzellen gezeigt. Es fallen Zelllinien mit hoher UTX- und sehr niedriger JMJD3-Expression und umgekehrt auf.

Bei der Betrachtung des Ergebnisses in Abb.11 fällt zunächst auf, dass die relative Genexpression von UTX und JMJD3 in den Zelllinien BC61 und RT-112 einen fast gleichen Wert hat. Bei den anderen Proben unterscheidet sich die Expression dahingehend, dass entweder UTX relativ hoch exprimiert ist und JMJD3 niedrig oder JMJD3 hoch exprimiert ist und UTX niedrig. Bei einer genauen statistischen Analyse der Korrelation ergab sich jedoch, dass es mit einem  $r$  (Pearson) von

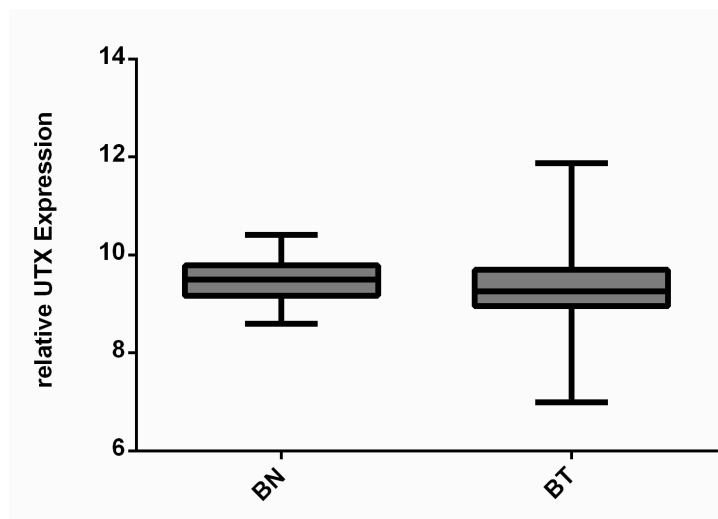
### 3. Ergebnisse

-0,2424 und einem *two tailed p-value* von  $p=0,6861$  keinen signifikanten inversen Zusammenhang zwischen der *UTX*- und der *JMJD3*-Expression gibt.

#### 3.1.5 In-silico Analyse der Expression möglicher *UTX*-Zielgene

Um mögliche *UTX*-Zielgene für die Untersuchung am eigenen Probenatz auszuwählen wurden zunächst die Ergebnisse aus einem größeren Microarray-Genexpressions-Datensatz der Forschungsgruppe Lee (Lee 2010) analysiert. Die Hinzunahme dieses Datensatzes ermöglichte einen unabhängigen Vergleich und Zugriff auf eine größere Anzahl von Proben. Es wurde die Expression der Gene *UTX*, *EZH2*, *HBP1*, *RBBP4* und *RBBP9* untersucht.

Zu Beginn wurde die Expression von *UTX* ermittelt. In Abb. 12 ist das Ergebnis dargestellt. Mit einem *p*-Wert von 0,4032 ist die Expression von *UTX* im Urothelkarzinom nicht signifikant im Vergleich zu normalem Harnblasengewebe verändert. Ein Trend zu einer niedrigeren Expression im Tumorgewebe ist jedoch anhand des Mittelwertes zu erkennen.

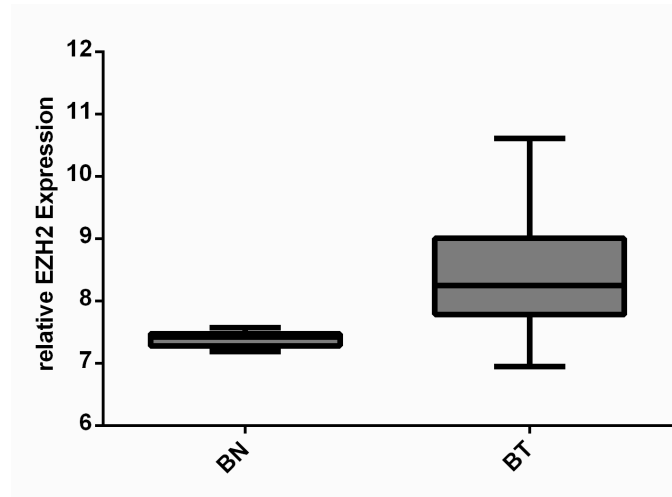


**Abb. 12: Expression von *UTX* in Harnblasen-Normal- und Tumorgewebe**

*UTX*-Expression in den Proben des Harnblasensets der Lee-Forschungsgruppe. Im linken Boxplot ist die relative *UTX*-Expression in Harnblasen-Normalgewebe (N=10) dargestellt. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . Der rechte Boxplot stellt die relative *UTX*-Expression in Harnblasen-Tumorgewebe (N=165) dar. *Two tailed p-value*  $p > 0,05$ , parametrisch getestet.

### 3. Ergebnisse

Wie in Abb. 13 ersichtlich ist die antagonistisch zu UTX agierende Histonmethylase EZH2 mit einem p-Wert von  $<0,0001$  auch in diesem Datensatz im Urothelkarzinom hochsignifikant höher exprimiert als im normalen Harnblasengewebe.

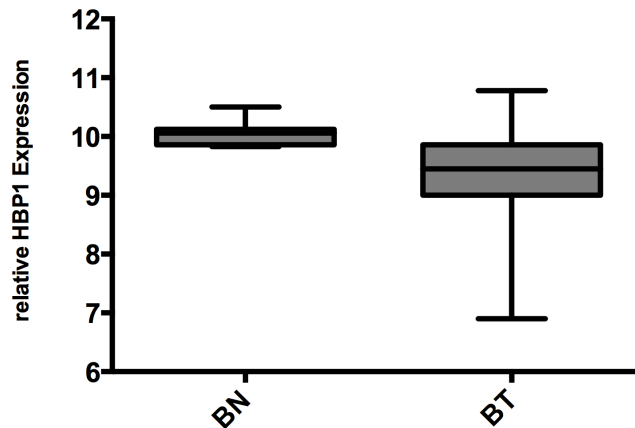


**Abb. 13: Expression von *EZH2* in Harnblasen-Normal- und Tumorgewebe**

*EZH2*-Expression in den Proben des Harnblasensets der Lee-Forschungsgruppe. Im linken Boxplot ist die relative *EZH2*-Expression in Harnblasen-Normalgewebe (N=10) dargestellt. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . Der rechte Boxplot stellt die relative *EZH2*-Expression in Harnblasen-Tumorgewebe (N=165) dar. *Two tailed p-value* \*\*\* $p < 0,0001$ , parametrisch getestet.

Bei der Analyse der Arraydaten der Lee Forschungsgruppe auf die Expression der mit *UTX* assoziierten Gene (siehe 3.6.1) fiel vor allem das mögliche *UTX*-Zielgen *HBP1* auf. Für dieses ist eine verminderte Expression bereits für diverse Tumorentitäten beschrieben (Paulson 2007). Die Analyse der Expression in den Daten der Lee Forschungsgruppe ergab, dass *HBP1* im Urothelkarzinom mit einem two-tailed p-value von  $p < 0,0001$  signifikant niedriger exprimiert wird als in normalem Blasengewebe (Abb. 14).

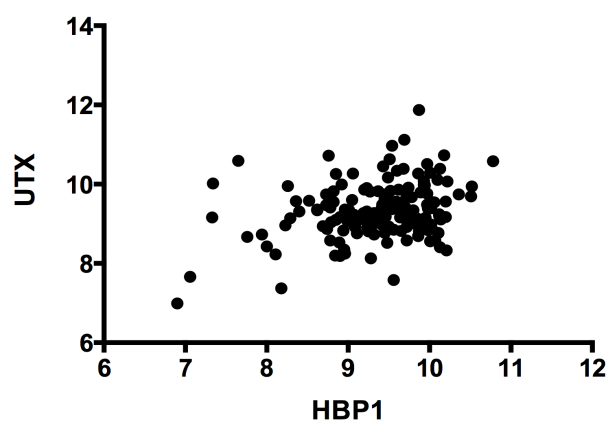
### 3. Ergebnisse



**Abb. 14: Expression von *HBP1* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben**

*HBP1*-Expression in den Proben des Harnblasensets der Lee-Forschungsgruppe. Im linken Boxplot ist die relative *HBP1*-Expression in Harnblasen-Normalgeweben (N=10) dargestellt. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . Der rechte Boxplot stellt die relative *HBP1*-Expression in Harnblasen-Tumorgeweben (N=165) dar. *Two tailed p-value* \*\*\* $p < 0,0001$ , parametrisch getestet.

In einem weiteren Analyseschritt wurde die Korrelation der *UTX*-Expression mit der von *HBP1* untersucht (Abb.15). Mit einem Pearson-Koeffizienten von  $r = 0,2991$  bei einem two-tailed p-value von  $< 0,0001$  korreliert die *UTX*-Expression in dem Microarray-Datensatz schwach positiv, aber hoch-signifikant mit der *HBP*-Expression.

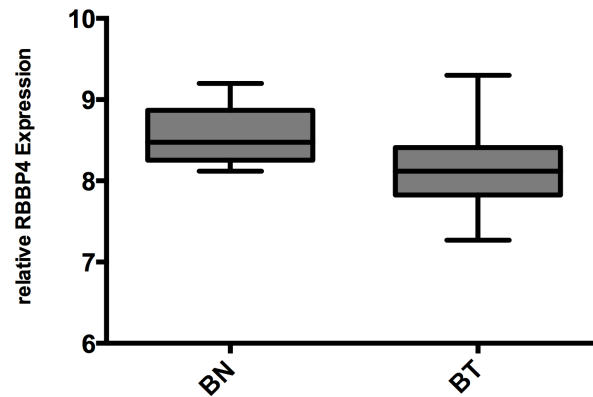


**Abb. 15: Korrelation der Expression von *UTX* mit *HBP1* im Harnblasenkarzinom**

Es wurden die Expressionen der beiden Gene in den Urothelkarzinomproben (N=165) der Lee-Forschungsgruppe miteinander korreliert. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . *Two-tailed p-value* \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $r = 0,2991$ , mit Pearson-Korrelation getestet.

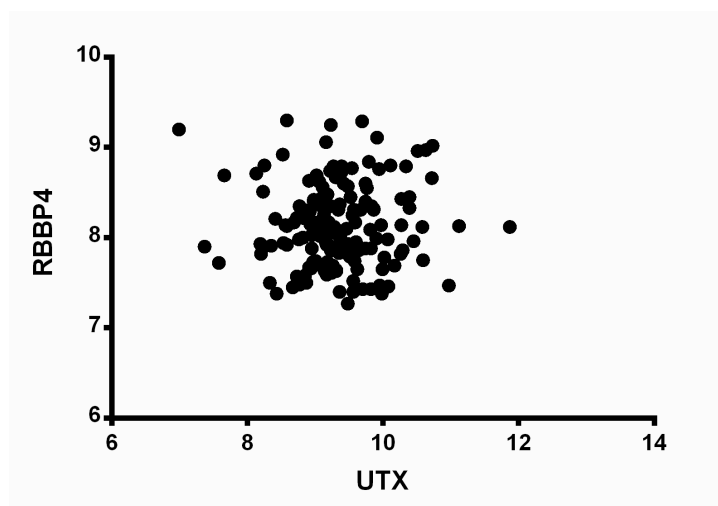
### 3. Ergebnisse

Abb. 16 zeigt dass laut Datensatz von Lee et al. das mutmaßliche *UTX*-Zielgen *RBBP4* mit einem two-tailed p-value von 0,0065 im Harnblasenkarzinom signifikant niedriger exprimiert wird als im Normalgewebe. Seine Expression korreliert jedoch nicht mit der *UTX*-Expression; der r-Wert der Korrelation beträgt 0,004 (Abb. 17).



**Abb. 16: Expression von *RBBP4* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben**

Das *UTX*-Zielgen *RBBP4* wird im Urothelkarzinom signifikant niedriger exprimiert als im Normalgewebe. Die Abb. zeigt die *RBBP4*-Expression in den Proben des Harnblasensets der Lee Forschungsgruppe. Im linken Boxplot ist die relative *RBBP4*-Expression im Blase-Normalgewebe N=10 dargestellt, im rechten die Expression im Blase-Tumorgewebe N=165. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . Two tailed p-value  $**p < 0,01$ , parametrisch getestet.



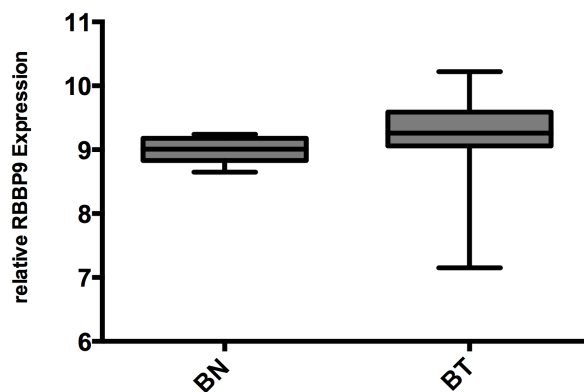
**Abb. 17: Korrelation der Expression von *UTX* mit *RBBP4* im Harnblasenkarzinom**

Es wurden die Expressionen in den Urothelkarzinomproben (N=165) der Lee-Forschungsgruppe miteinander korreliert. Auf der X-Achse sind die Werte der *UTX*-Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden *RBBP4*-Werte aufgetragen. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . Two-tailed p-value  $p > 0,05$ ,  $r = 0,0004$ , mit Pearson-Korrelation getestet.

### 3. Ergebnisse

Die Expression von *RBBP9* ist im Datensatz von Lee et al. mit einem p-Wert von 0,0012 in Harnblasentumorgeweben signifikant höher als in Normalgeweben. Ergebnis siehe Abb. 18.

Zudem ergab die Analyse einer möglichen Korrelation (siehe Abb. 19) zwischen der *UTX*- und der *RBBP9*-Expression einen schwachen, aber statistisch hoch signifikanten, positiven Zusammenhang (Pearson r-Wert 0,2734, two-tailed p-value 0,0004).

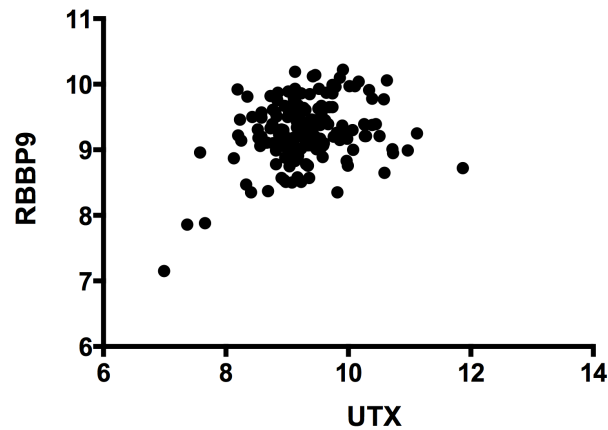


**Abb. 18: Expression von *RBBP9* in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben**

Die Abb. zeigt die *RBBP9*-Expression in den Proben des Harnblasensets der Lee Forschungsgruppe. Im linken Boxplot ist die relative *RBBP9*-Expression im Harnblase-Normalgewebe (N=10) dargestellt. Der rechte Boxplot stellt die relative *RBBP9*-Expression im Harnblase-Tumorgewebe (N=165) dar. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . Two tailed p-value \*\*p < 0,01, parametrisch getestet.

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 19: Korrelation der Expression von *UTX* mit *RBBP9* im Harnblasenkarzinom**

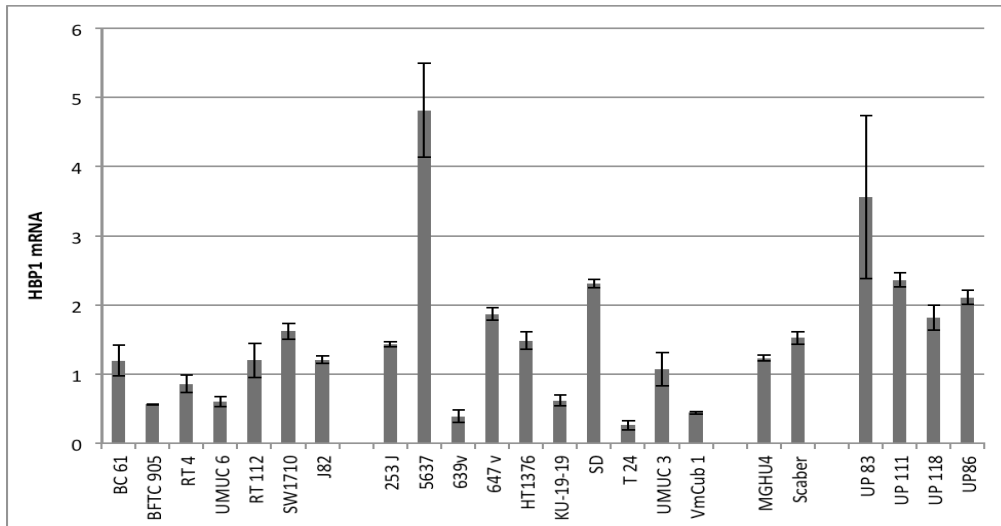
Es wurden die Expressionen in den Urothelkarzinomproben (N=165) der Lee Forschungsgruppe miteinander korreliert. Auf der X-Achse sind die Werte der *UTX*-Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden *RBBP9*-Werte aufgetragen. Der Maßstab entspricht  $\log_2$ . *Two-tailed p-value* \*\*\* $p < 0,001$ ,  $r = 0,2743$ , mit Pearson-Korrelation getestet.

#### **3.1.6 Analyse der Expression von *UTX*-assoziierten Genen in den Proben des Urologischen Forschungslabors**

Die in-silico-Analyse legte nahe, dass besonders *HBP1* und *RBBP4* im Urothelkarzinom im Zusammenhang mit *UTX* verändert sein könnten. Daher wurde im folgenden zunächst die *HBP1*-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen, sowie in den Normal- und Tumorgewebe Harnblasenproben des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf gemessen. Abb. 20 gibt einen Überblick über die relative *HBP1*-Expression in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen. Auffälligkeiten im Verteilungsmuster sind hierbei nicht zu erkennen. Die Expression in den Urothelkarzinomzelllinien ist jedoch eher erniedrigt. In den Zelllinien RT-112 und KU-19-19 mit somatischen *UTX*-Mutationen ist die *HBP1*-Expression im Vergleich zu anderen Urothelkarzinomzelllinien nicht auffällig verringert. Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, wird *HBP1* bei einem two-tailed  $p$ -value von 0,0442 in den Urothelkarzinomzelllinien statistisch signifikant niedriger exprimiert als in den normalen Urothelzellen.

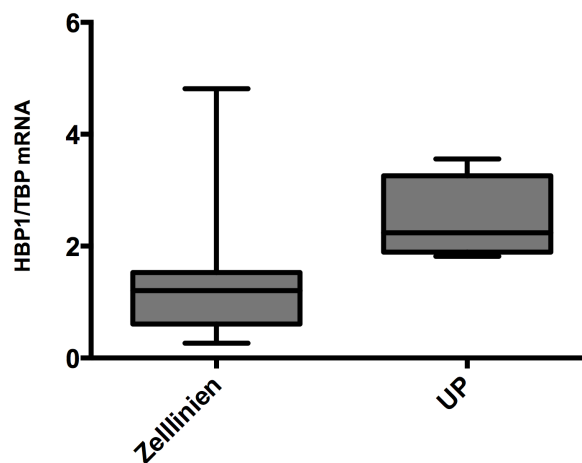


### 3. Ergebnisse



**Abb. 20: Expression von HBP1/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

Das Balkendiagramm zeigt die relative *HBP1*-mRNA-Gesamtexpression mit Standardabweichung gemessen per qRT-PCR. Als Standard wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Im linken Bereich wird die Expression in den Tumorzelllinien (angeordnet wie in Abb.2), im rechten Bereich die Expression in den normalen Urothelzellen gezeigt.

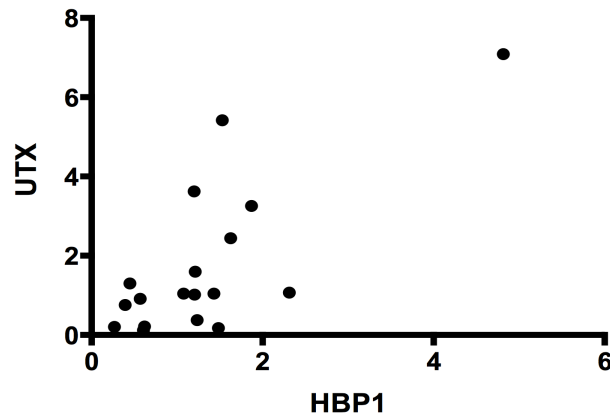


**Abb. 21 Expression von HBP1/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

*HBP1*-Expression in den Tumorzelllinien und normalen Urothelzellen des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf. Als Standard wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Durch den linken Boxplot wird die relative *HBP1*-mRNA-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien (N=18) dargestellt. Der rechte Boxplot zeigt die relative *HBP1*-mRNA-Expression in den normalen Urothelzellen (N=4). *Two tailed p-value* \* $p < 0,05$ , parametrisch getestet. Der Ausreißer bei den Zelllinien ist 5637, die eine vergleichsweise hohe *HBP1*-Expression aufweist.

### 3. Ergebnisse

Weiterhin korrelierte die *UTX*-Expression innerhalb der gemessenen Urothelkarzinomzelllinien stark und signifikant positiv mit der *HBP1*-Expression (Pearson-Koeffizient 0,7481, two-tailed p-value 0,0004). Die Korrelationsanalyse ist in Abb. 22 dargestellt.

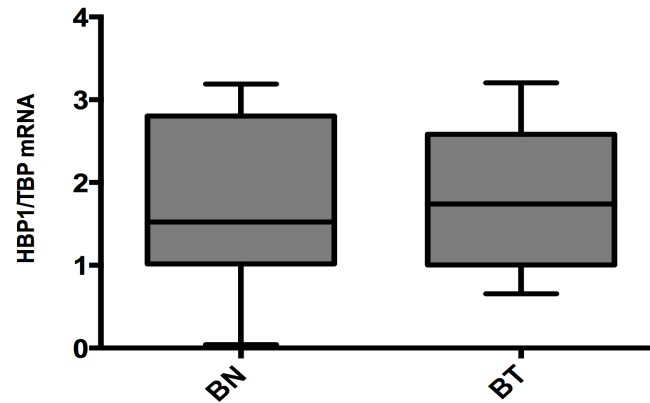


**Abb. 22: Korrelation der Expression von *UTX* mit *HBP1* in Urothelkarzinomzelllinien**

Es wurden die Expressionen in den Urothelkarzinomzelllinien N=18 des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf miteinander korreliert. Auf der X-Achse sind die Werte der *HBP1*-Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden *UTX*-Werte aufgetragen. Pearson Korrelation 0,7481, two-tailed p-value \*\*p < 0,01.

Die Messung der *HBP1*-Expression im Gewebeset des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf ergab im Gegensatz zur Messung an den Zelllinien bei einem p-Wert von 0,79 keinen signifikanten Unterschied in der *HBP1*-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe (Abb. 23). Der Mittelwert im Tumorgewebe ist sogar leicht erhöht.

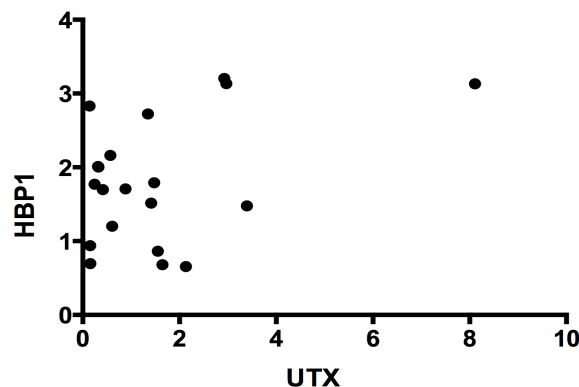
### 3. Ergebnisse



**Abb. 23: Expression von HBP1/TBP mRNA in Harnblasen-Normal- und Tumorgeweben**

Im linken Boxplot ist die relative *HBP1*-mRNA-Expression in Harnblase-Normalgeweben (N=10) dargestellt. Der rechte Boxplot zeigt die relative *HBP1*-mRNA-Expression in Harnblase-Tumorgeweben (N=19). *Two tailed p-value*  $p > 0,05$ , parametrisch getestet.

Auch bei der Korrelation der *UTX*- und *HBP1*-Expression in den Blase Tumor- und Normalgewebeproben des Urologischen Forschungslabors (Abb. 24) ergab sich trotz der angedeuteten moderaten, positiven Korrelation (Pearson-Koeffizient  $r = 0,4419$ ) wegen des  $p$ -Werts von 0,0712 knapp kein signifikanter Zusammenhang.

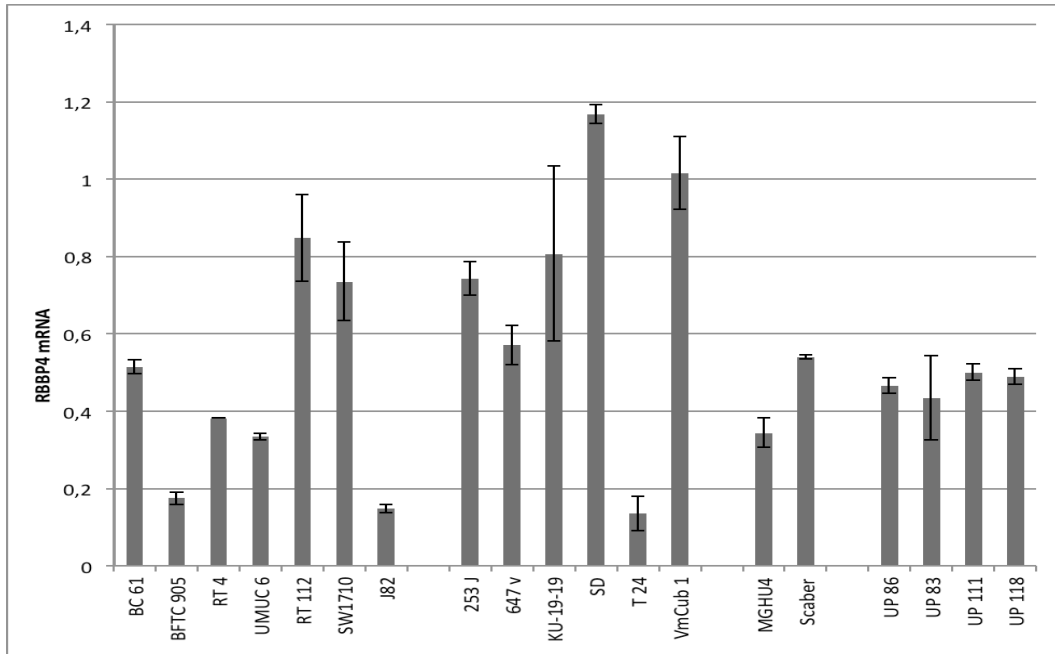


**Abb. 24: Korrelation der Expression von UTX mit HBP1 im Harnblasenkarzinom**

Die Expression von *HBP1* korreliert nicht deutlich mit der *UTX*-Expression. Es wurden die Expressionen in den Urothelkarzinomproben (N=20) des Urologischen Forschungslabors miteinander korreliert. Auf der X-Achse sind die Werte der *UTX*-Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden *HBP1*-Werte aufgetragen. *Two-tailed p-value*  $p > 0,05$ , Pearson Korrelation 0,4119.

### 3. Ergebnisse

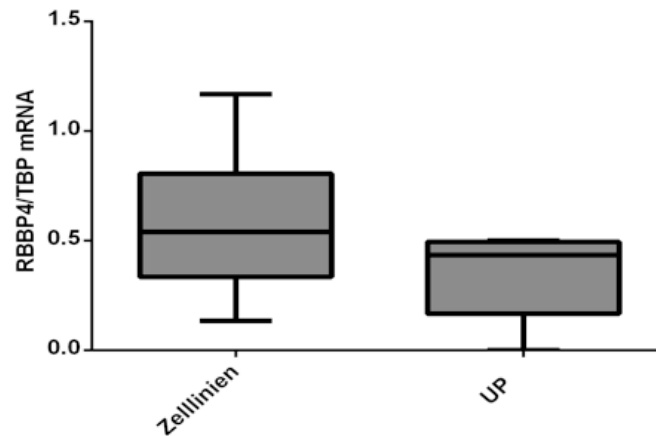
Die Expressionsanalysen von *RBBP4* in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen bietet keine Auffälligkeiten und eher ein heterogenes Bild. Es bestehen keine signifikanten Expressionsveränderungen und keine signifikante Korrelation zwischen der *UTX*- und *RBBP4*-Expression; der Zusammenhang erschien eher invers. Die Daten dazu sind in den Abb. 25 – 27 dargestellt.



**Abb. 25: Expression von RBBP4/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

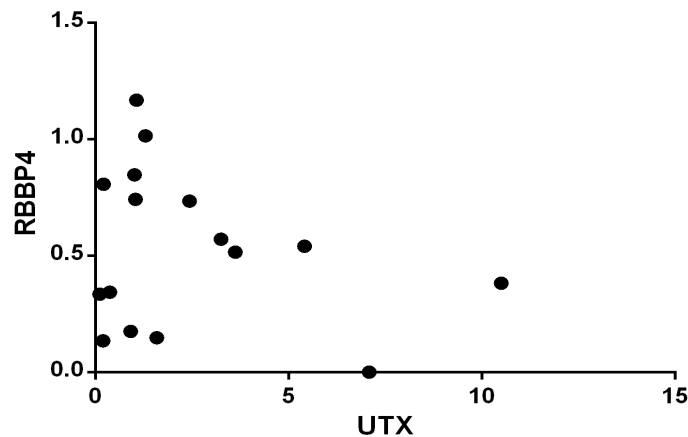
Das Balkendiagramm zeigt die relative *RBBP4*-mRNA-Gesamtexpression mit Standardabweichung gemessen per qRT-PCR. Als Standard wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Im linken Bereich wird die Expression in den Tumorzelllinien (angeordnet wie in Abb.2), im rechten Bereich die Expression in den normalen Urothelzellen gezeigt.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 26: Expression von RBBP4/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen**

*RBBP4*-Expression in den Tumorzelllinien und normalen Urothelzellen des Urologischen Forschungslabors Düsseldorf. Als Referenz wurde das Haushalts-Gen *TBP* verwendet. Durch den linken Boxplot wird die relative *RBBP4*-mRNA-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien (N=16) dargestellt. Der rechte Boxplot zeigt die relative *RBBP4*-mRNA-Expression in den normalen Urothelzellen (N=4). *Two tailed p-value* \* $p < 0,05$ , parametrisch getestet.

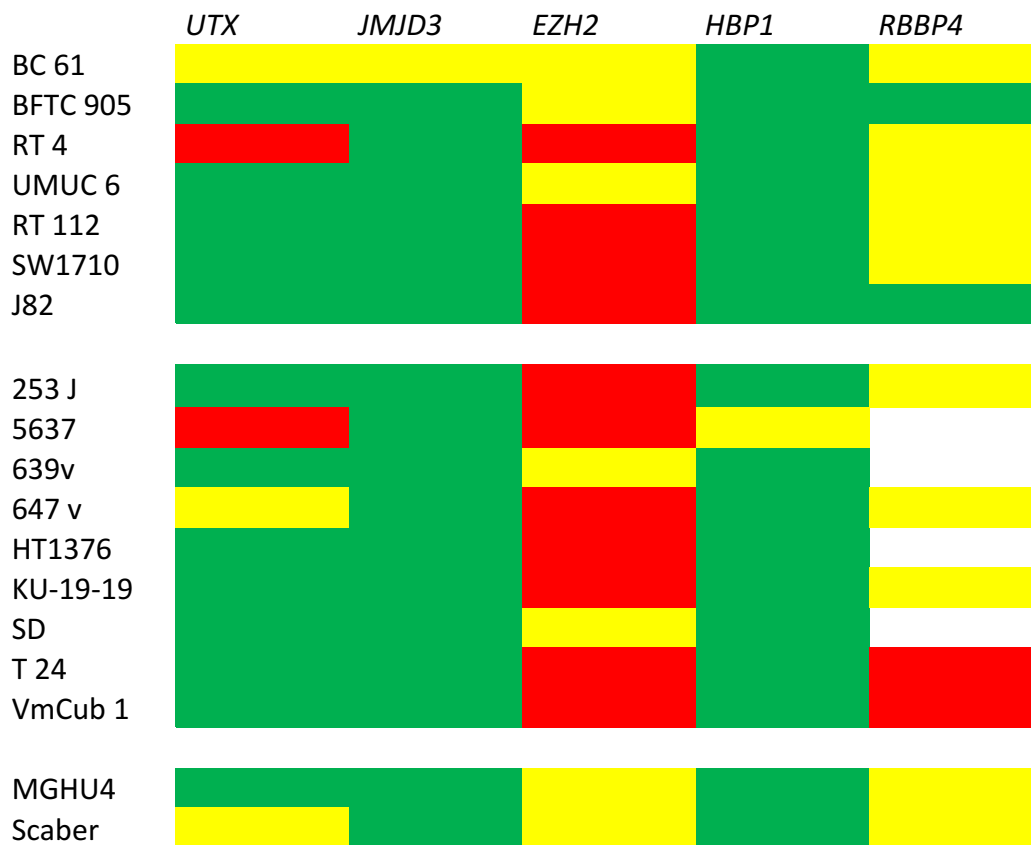


**Abb. 27: Korrelation der Expression von UTX mit RBBP4 im Harnblasenkarzinom**

Die Expression von *RBBP4* korreliert nicht mit der *UTX*-Expression. Es wurden die Expressionen in den Urothelkarzinomproben (N=16) des Urologischen Forschungslabors miteinander korreliert. Auf der X-Achse sind die Werte der *UTX*-Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die entsprechenden *RBBP4*-Werte aufgetragen. *Two-tailed p-value*  $p > 0,05$ , Pearson-Korrelation  $r = -0,2587$ .

#### 3.1.7 Expressionsprofil epigenetisch relevanter Gene im Urothelkarzinom

Zusammenfassend sind in Abb. 26 die gemessenen Expressionen der für die vorliegende Arbeit relevanten Gene *UTX*, *JMJD3*, *EZH2*, *HBP1* und *RBBP4* in den Urothelkarzinomzelllinien des urologischen Forschungslabors Düsseldorf dargestellt. Das Expressionsmuster ist durchaus eindeutig. Die Histondemethylasen *UTX* und *JMJD3* und das *UTX*-Zielgen *HBP1* sind im Urothelkarzinom eher herunterreguliert. Die Histonmethylase *EZH2* ist im Urothelkarzinom deutlich verstärkt exprimiert.

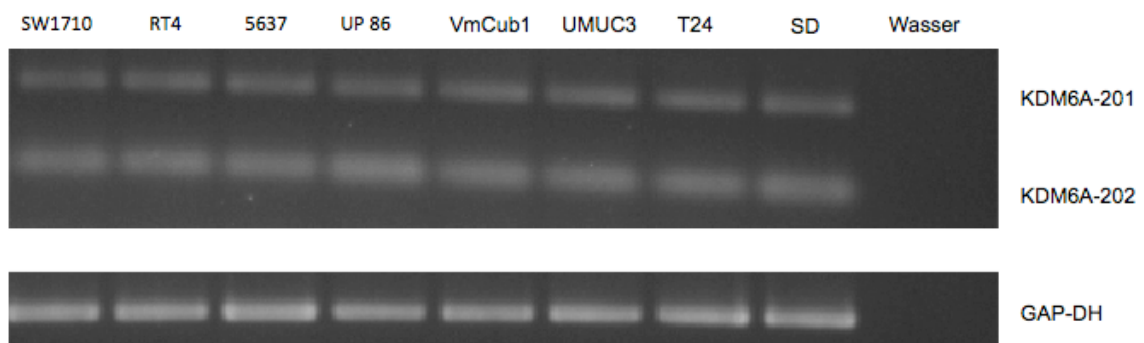


**Abb. 28: Expressionsprofil von epigenetisch relevanten Genen in Urothelkarzinomzelllinien**

Dargestellt ist die relative Expression von *UTX*, *JMJD3*, *EZH2*, *HBP1* und *RBBP4* in Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zum Mittelwert von 4 normalen Urothelzellkulturen. Grün bezeichnet herunterregulierte (mindestens 2-fach) mRNA-Spiegel, Gelb ähnliche Expression und Rot zeigt erhöhte (mindestens 2-fach) mRNA-Spiegel an. Weiss = nicht ermittelt.

#### 3.2 Analyse der Spleißvarianten von *UTX*

Es sind zwölf verschiedene Spleißvarianten von *UTX* beschrieben (siehe 1.2.3.1, Abb. 2). Davon sind acht proteinkodierend, von denen die drei Varianten *KDM6A* (001) 201 und 202 ein Protein mit allen Domänen kodieren. Sie sind daher von besonderem Interesse. Welche der Spleißvarianten im Urothelkarzinom bzw. in der normalen Harnblase vorzufinden sind, wurde mittels qualitativer PCR bestimmt. Diese Messungen wurden an Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen durchgeführt. An einer beispielhaften Auswahl von Zelllinien wurde das Vorhandensein der Spleißvarianten *KDM6A*-201 und -202 gezeigt. Wie Abb. 29 belegt, werden die beiden *UTX*-Hauptprodukte *KDM6A*-201 und -202 sowohl in normalen Urothelzellen, als auch in Tumorzelllinien gebildet. Dieser Nachweis konnte für alle im Urologischen Forschungslabor vorhandenen Urothelkarzinomzelllinien und an mehreren normalen Urothelzellkulturen erbracht werden. *KDM6A* erscheint dabei in allen Proben in gleichem Umfang darstellbar. Die Banden für die Spleißvariante *KDM6A*-202 erscheinen etwas kräftiger als die der Spleißvariante *KDM6A*-201; dies könnte an der besseren Effizienz der PCR bei kleineren Produkten liegen.



**Abb. 29: Expression von *UTX* in Urothelzellen und Urothelkarzinomzelllinien**

Die Hauptspleißvarianten von *UTX* werden sowohl in normalen Urothelzellen als auch in Urothelkarzinomzelllinien in ungefähr gleichem Verhältnis exprimiert. Dargestellt wird das Vorhandensein der *UTX*-Hauptspleißvarianten *KDM6A*-201 und *KDM6A*-202. Sie sind in den Urothelkarzinomzelllinien SW1710, RT4, 5637, VmCub1, UMUC3, T24, SD und der UP86 darstellbar. Als Kontrollgen für die PCR wurde *GAPDH* verwendet. Das Produkt für *KDM6A*-201 ist wie erwartet 204 bp, das Produkt für *KDM6A*-202 69 bp groß.

### 3.3 Western Blot und Proteinanalysen

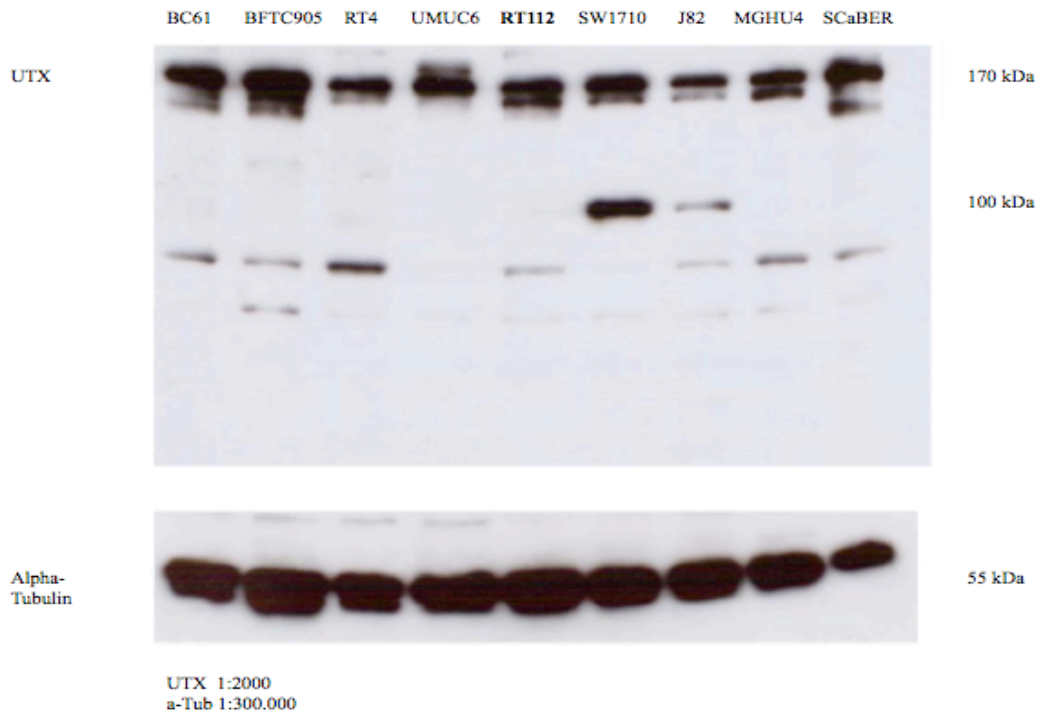
#### 3.3.1. Analyse des UTX-Proteins

Für die Western Blot Untersuchungen wurden die Urothelkarzinomzelllinien unter Standardbedingungen kultiviert und jeweils Protein extrahiert. Bei den durchgeführten Experimenten wurde der Gehalt von UTX im gesamten Zellproteinextrakt untersucht. Der verwendete Primärantikörper wurde durch Literaturrecherche ermittelt (van Haaften 2009) und das Protokoll für die Verwendung im hiesigen Labor optimiert.

Der Western Blot zeigt, dass UTX-Protein in allen Proben darstellbar ist. Im Größenbereich von ca. 156 kDa wird das Hauptprodukt erwartet. In diesem Größenbereich sind in Abb. 30 und 31 in den meisten Zelllinien Doppelbanden zu erkennen. Offensichtlich wird UTX in allen gemessenen Zellen exprimiert. Die Stärke der Banden des Hauptprodukts korreliert nicht mit der UTX-Expression auf mRNA Ebene. Zwei weitere Banden sind in einzelnen Zelllinien bei ca. 100 kDa oder bei ca. 75 kDa zu erkennen. Die Bande bei 75 kDa wurde in der Literatur als unspezifische Bande beschrieben (van Haaften 2009). Abb. 30 zeigt den Western Blot für die Zelllinien BC61, BFTC905, RT4, Umuc6, SW1710, J82, MGHU4, SCaBER sowie die Zelllinie RT-112, welche durch eine somatische UTX-Mutation gekennzeichnet ist. Besonders viel Protein ist in den Tumorzelllinien BC61, BFTC-905 und SCaBER nachweisbar. Die Proteinexpression korreliert jedoch nicht zwingend mit der Menge der entsprechenden UTX-mRNA. So ist letztere in den BFTC-905 Zellen verhältnismäßig niedrig. Die Zelllinie RT-4, welche eine hohe UTX-mRNA Expression aufweist, zeigt umgekehrt relativ wenig UTX-Protein. Abb. 31 zeigt den UTX Western Blot für die Zelllinien 5637, 639v, 647v, HT1376, SD, T24, Umuc3 und VmCub1. UTX-Protein wird besonders stark in den Tumorzelllinien 639v und 647v gebildet. Auch im Fall der Zelllinie 639v korreliert die Höhe der UTX-Proteinexpression nicht direkt mit der mRNA-Expression.



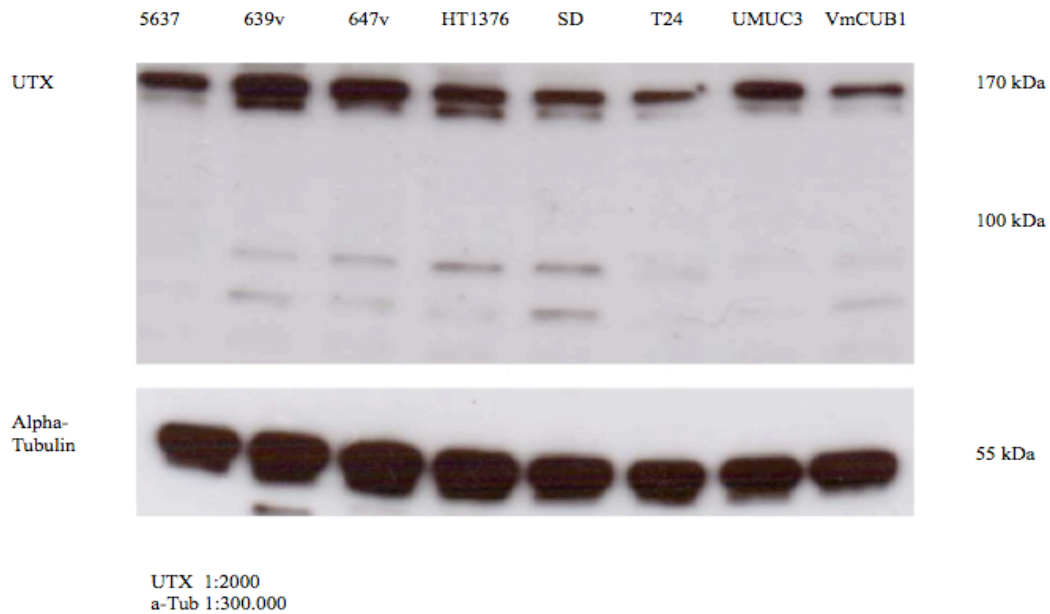
### 3. Ergebnisse



**Abb. 30: Western Blot von UTX in Urothelkarzinomzelllinien**

Dargestellt ist der Western Blot einer Auswahl von Urothelkarzinomzelllinien. Der UTX-Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 verwendet und es lässt sich in allen Proben ein Protein bei einer zu erwartenden Größe von ungefähr 159 kDa darstellen. Bei fast allen Proben sind im Bereich des Hauptprodukts Doppelbanden sichtbar. In den Zelllinien J82 und MGHU4 ist jeweils eine zusätzliche Bande bei 100 kDa zu erkennen. Bei ungefähr 70 kDa ist die bekannte unspezifische Bande zu erkennen. Als Kontrollprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

### 3. Ergebnisse



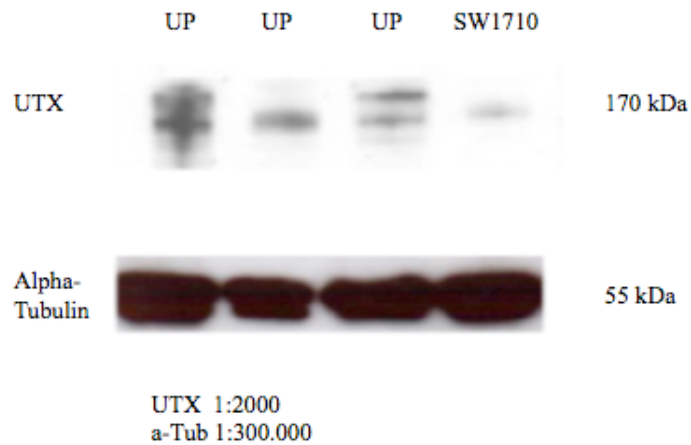
**Abb. 31: Western Blot von UTX in weiteren Urothelkarzinomzelllinien**

Dargestellt ist der Western Blot einer Auswahl von Urothelkarzinomzelllinien. Der UTX-Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 verwendet und es lässt sich in allen Proben das UTX Protein bei einer zu erwartenden Größe von ungefähr 159 kDa darstellen. Bei fast allen Proben sind im Bereich des Hauptprodukts Doppelbanden sichtbar. Besonders in den Zelllinien HT1376 und SD ist jeweils eine zusätzliche Bande bei 100 kDa zu erkennen. Bei ungefähr 70 kDa ist die bekannte unspezifische Bande zu erkennen. Als Kontrollprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

Des Weiteren wurde die UTX-Proteinexpression in normalen Urothelzellen im Vergleich zu Urothelkarzinomzelllinien untersucht. Dafür wurden normale Urothelzellen und eine Tumorzelllinie mit besonders robuster UTX Protein- und mRNA-Expression ausgewählt. Bei dem erstellten Western Blot in Abb. 32 fällt auf, dass der UTX-Protein-Spiegel in der Urothelkarzinomzelllinie SW1710 im Verhältnis zu den UP deutlich vermindert ist. Auch in den normalen Urothelzellen sind Doppelbanden im Bereich des UTX-Proteins zu erkennen.

### 3. Ergebnisse

---



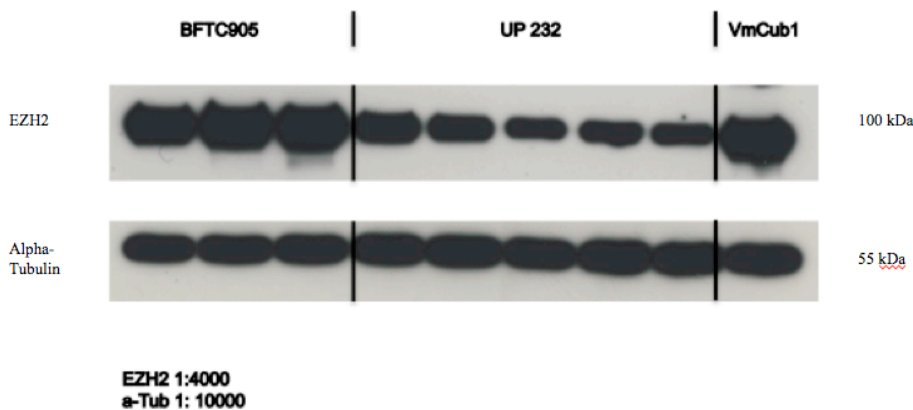
**Abb. 32: Western Blot von UTX in normalen Urothelzellen und SW1710**

Dargestellt ist der Western Blot von mehreren UP-Kulturen und der Zelllinie SW1710. Der UTX-Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 verwendet. In allen Proben lässt sich das UTX-Protein bei einer zu erwartenden Größe von ungefähr 159 kDa darstellen. Außer bei einer UP-Probe sind im Bereich des Hauptprodukts Doppelbanden sichtbar. Als Kontrollprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen.

## 3. Ergebnisse

### 3.3.2. Analyse des EZH2-Proteins

Abb. 33 zeigt exemplarisch einen EZH2 Western Blot mehrerer Proben in BFTC905 und VmCub1 Urothelkarzinomzellen, sowie zum Vergleich in der UP-Kultur 232. EZH2 wird bei der erwarteten Proteingröße von 100 kDa detektiert und in allen Proben robust exprimiert. Das Proteinsignal ist in den Urothelkarzinomzelllinien deutlich stärker zu erkennen als in den normalen Urothelzellen. Das Ergebnis ist somit konform mit unseren Ergebnissen aus der Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene und der internationalen Fachliteratur.



**Abb. 33: Western Blot von EZH2 in Urothelkarzinomzellen und normalen Urothelzellen**

Dargestellt ist der Western Blot einer Auswahl von Urothelkarzinomzelllinien und der UP 232. Der EZH2-Antikörper wurde im Verhältnis 1:4000 verwendet und es lässt sich in allen Proben das EZH2-Protein bei einer zu erwartenden Größe von ungefähr 100 kDa darstellen. EZH2 ist in den Urothelkarzinomzelllinien BFTC905 und VmCub1 deutlich stärker nachweisbar als in der UP 232. Als Kontrollprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin mit einer Antikörperkonzentration von 1:10.000 dargestellt.

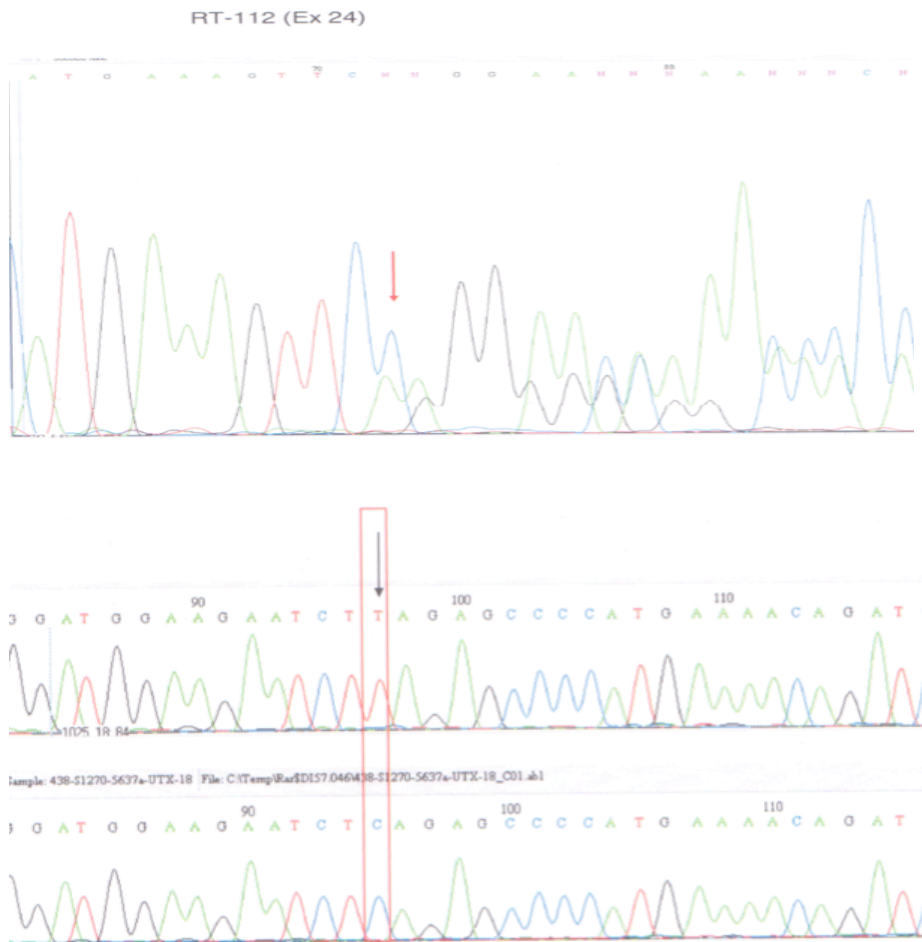
### 3.4 Mutationsnachweis

#### Sequenzierung von *UTX* in den Zelllinien RT112 und KU-19-19

Für die beiden Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und KU-19-19 wurden bereits somatische Mutationen im *UTX*-Gen *KDM6A* beschrieben (van Haaften 2009). Diese beiden somatischen Mutationen sollten verifiziert werden. Die Tumorzelllinie RT-112 war bereits im urologischen Forschungslabor etabliert. Die Zelllinie KU-19-19 wurde von der DSMZ zur Verfügung gestellt. Da das Gen *KDM6A* sehr groß ist und zahlreiche Exone enthält, wurden Primer entworfen, mit welchen der Teil des

### 3. Ergebnisse

Gens amplifiziert werden konnte, auf dem die somatische Mutation erwartet wird. Die darauf folgende Sequenzierung bestätigte die beiden somatischen Mutationen im UTX Gen *KDM6A* der beiden Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und KU-19-19. Abb. 34 zeigt in der Zelllinie RT-112 sehr deutlich eine durch eine heterozygote Deletion eines Cytidins (Het 3416delC) hervorgerufene Verschiebung im Sequenzraster des *UTX*-Gens. In Abb. 34 b) wird die homozygote *UTX*-Transitions-Mutation 2587C>T in der Zelllinie KU-19-19 dargestellt.



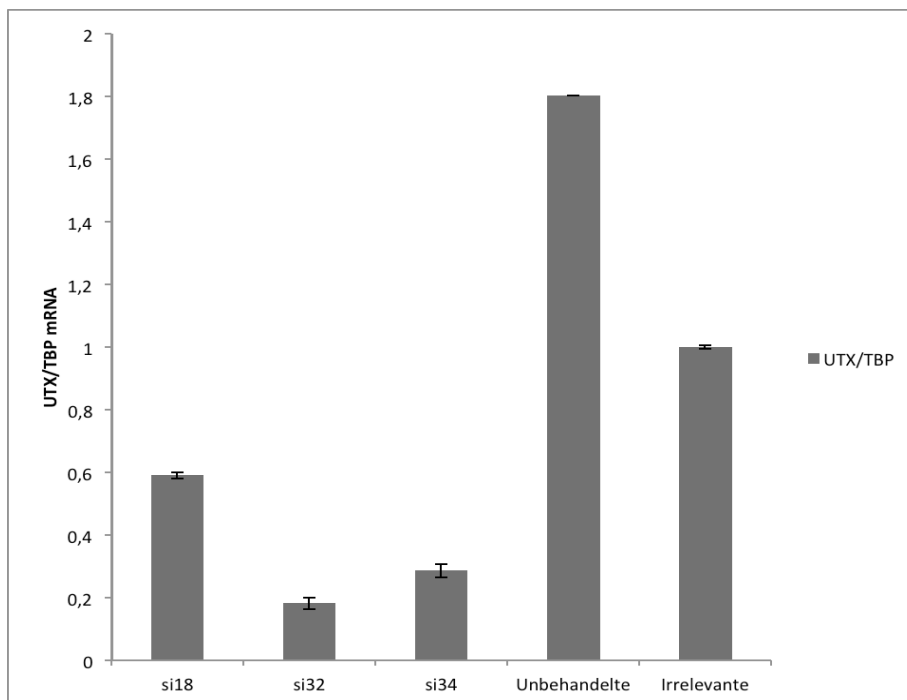
**Abb. 34: Mutationsanalyse des UTX-Gens *KDM6A* in den UC-Zelllinien RT-112 und KU-19-19**

A): In RT-112 liegt auf Exon 24 eine heterozygote Mutation im UTX-Gen *KDM6A* vor: Het 3416delC. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung von *KDM6A* in RT-112 Zellen. Mit dem roten Pfeil ist die Mutation gekennzeichnet. Vor dort an sieht man deutlich durch die Deletion erzeugte unterschiedliche Sequenzraster der beiden Allele. B): In KU-19-19 liegt auf Exon 18 eine homozygote Mutation im UTX-Gen *KDM6A* vor: Hom 2587C>T. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung von *KDM6A* in KU-19-19 Zellen. Mit dem Pfeil im umrandeten Bereich ist die Mutation gekennzeichnet.

## 3.5 Funktionelle Versuche

### 3.5.1 Etablierung eines *UTX Knockdown* mit siRNA

Für die Durchführung von funktionellen Versuchen mit *UTX* wurden drei verschiedene siRNAs von Invitrogen (si18, si32, si34) ausgetestet. Die verwendeten siRNAs wirken spezifisch auf *UTX* und wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt (van Haften 2009). In einem ersten Durchgang wurden die Zellen mit siRNA - wie im Protokoll empfohlen - in einer Konzentration von 5 nM transfiziert und danach für 48 Stunden inkubiert. Alle drei siRNAs regulierten die Expression von *UTX*-mRNA nach 48 Stunden herunter (Abb.35). In mehreren Läufen lieferten alle drei siRNAs gute *knockdown* Ergebnisse, die siRNA si32 jedoch konsistent die besten Resultate. Alle weiteren funktionellen Versuche wurden mit dieser siRNA durchgeführt.

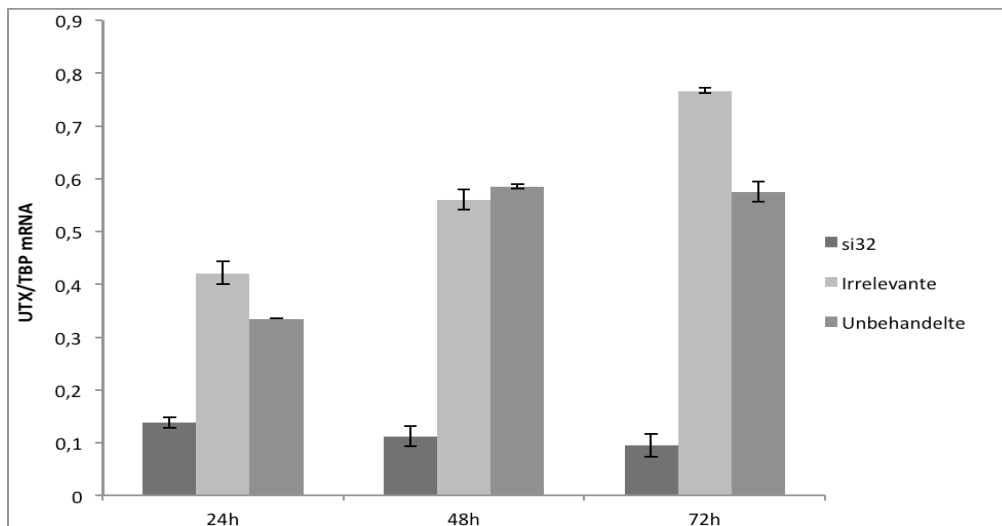


**Abb. 35: Effekt verschiedener siRNAs auf die *UTX* mRNA Expression**

Durch spezifische siRNA kann der *UTX* mRNA Spiegel in der Urothelkarzinomzelllinie BFTC905 suffizient herunterreguliert werden. Dargestellt ist die relative *UTX* mRNA Expression nach der Behandlung mit drei verschiedenen siRNAs (si18, si32 und si34), einer Kontroll-siRNA (Irrelevante) und in unbehandelten Zellen. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 5 nMol/L siRNA für 48 Stunden. Als Referenz bei der anschließend durchgeführten qRT-PCR wurde *TBP* verwendet.

#### 3.5.2 *UTX knockdown* mit der siRNA si32

Für die folgenden funktionellen *knockdown* Versuche mit si32 wurden Urothelkarzinomzelllinien verwendet, die *UTX* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in ausreichendem Maße exprimieren. In einem ersten Experiment wurde der *UTX knockdown* an der Tumorzelllinie SW1710 durchgeführt und der Zeitverlauf nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden verfolgt. Das Ergebnis ist in Abb. 36 dargestellt. Bereits nach 24 Stunden war durch die siRNA si32 die *UTX*-mRNA deutlich herunterreguliert. Dieser Effekt nahm nach 48 Stunden nochmals zu und hatte nach 72 Stunden ein Maximum erreicht. *UTX* lässt sich also durch die siRNA si32 schnell und suffizient in SW1710 Urothelkarzinomzellen auf mRNA-Ebene herunterregulieren.



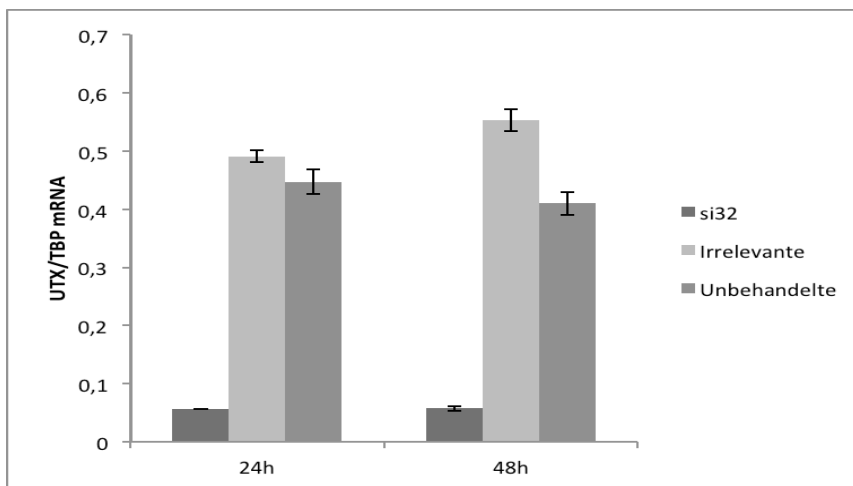
**Abb. 36: Effekt von siRNA auf die *UTX/TBP* mRNA-Expression in SW1710**

Dargestellt ist im Zeitverlauf die relative *UTX*-mRNA-Expression nach 24, 48 und 72 Stunden. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 5 nM siRNA. Es ist zu sehen, dass bereits nach 24 Stunden der *UTX*- mRNA-Spiegel in mit si32 behandelten Zellen deutlich niedriger ist als in den mit Kontroll-siRNA (Irrelevante) oder unbehandelten Zellen (Unbehandelte). Dieser Effekt wird nach 48 Stunden und 72 Stunden stärker. Als Referenzgen bei der anschließend durchgeführten qRT-PCR wurde *TBP* verwendet.

Um die Effizienz des *knockdown* zu überprüfen, wurden weitere Urothelkarzinomzelllinien untersucht. Die Zellen der Linie SD wurden für 48 Stunden mit si32 in einer Konzentration von diesmal 10 nM inkubiert. Die Tumorzellen der Zelllinie BFTC-905 wurden für 24 Stunden und 48 Stunden mit si32 bei einer Konzentration

### 3. Ergebnisse

on von 5 nM inkubiert. Auch diese beiden Tumorzelllinien zeichnen sich durch eine gute UTX mRNA- und Proteinexpression aus. In beiden Fällen konnte *UTX* erfolgreich herunterreguliert werden. Sowohl in den SD- als auch in den BFTC-905 Zellen wurde die UTX-mRNA nach 24 Stunden bzw 48 Stunden unterdrückt. Die Ergebnisse für das Experiment mit den BFTC-905 Zellen sind in Abb.37 dargestellt.



**Abb. 37: Effekt von siRNA auf die UTX/TBP mRNA Expression in BFTC-905**

Dargestellt ist im Zeitverlauf die relative UTX-mRNA-Expression nach 24 und 48 Stunden. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 5 nM siRNA. Es ist zu sehen, dass bereits nach 24 Stunden der UTX-mRNA-Spiegel in mit si32 behandelten Zellen deutlich niedriger ist, als in den mit Kontroll-siRNA (Irrelevante) oder unbehandelten Zellen (Unbehandelte). Dieser Effekt wird nach 48 Stunden relativ stärker. Als Referenzgen bei der anschließend durchgeführten qRT-PCR wurde *TBP* verwendet.

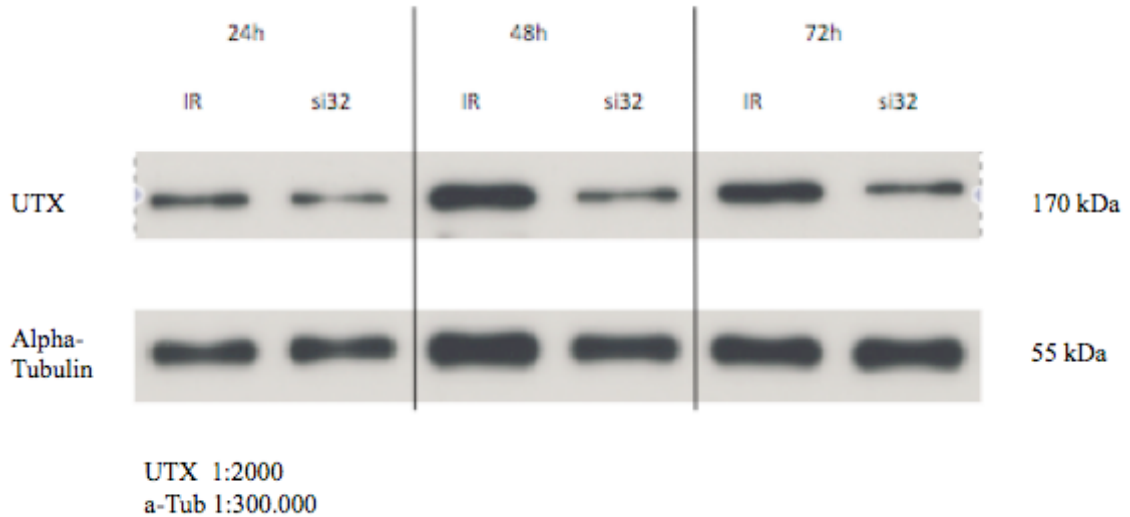
Die etablierte siRNA si32 kann UTX auf mRNA-Ebene sehr effizient herunterregulieren. Der Effekt setzt bereits nach 24 Stunden ein und nimmt weiter zu. Eine siRNA Konzentration von 5 nMol ist sehr geeignet.

Abb. 38 zeigt den Western Blot nach durchgeführtem *knockdown* von *UTX* mit si32. VmCub1 Karzinomzellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit der siRNA si32 oder einer irrelevanten siRNA (IR) behandelt. Es ist ersichtlich, dass es im Vergleich zu den mit der irrelevanten siRNA behandelten Zellen bereits nach 24 Stunden zu einer deutlichen und stabilen Herunterregulierung von UTX auf Pro-



### 3. Ergebnisse

teinebene kommt. Dies konnte auch für weitere Zelllinien gezeigt werden. Mit der si32 lässt sich somit auch auf Proteinebene ein stabiler *knockdown* von UTX in Urothelkarzinomzelllinien durchführen.



**Abb. 38: Western Blot von UTX in VmCub1 Zellen nach UTX-knockdown**

UTX-Protein wird nach si32 Behandlung in VmCub1 Zellen herunterreguliert. Der UTX-Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 verwendet und es lässt sich in allen Proben das UTX-Protein bei einer zu erwartenden Größe von ungefähr 159 kDa darstellen. Dargestellt ist das Ergebnis nach 24, 48 und 72 Stunden. Es wurden jeweils Zellen nur mit einer irrelevanten „IR“ siRNA (jeweils links) oder nur mit si32 siRNA (jeweils rechts) behandelt. Als Kontrollprotein wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

### 4. Diskussion

#### 4.1 Ergebnisse im Überblick

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Expression von *UTX/KDM6A* ist auf mRNA Ebene im Urothelkarzinom eher herunterreguliert.
- *EZH2* ist im Einklang mit der Literaturlage im Urothelkarzinom überexprimiert.
- Die Expression von *JMJD3/KDM6B* ist in Urothelkarzinom-Zelllinien deutlich herunterreguliert; eine Aussage über die Expression im Gewebe kann noch nicht getroffen werden.
- Das *UTX*-Protein ist in Urothelkarzinomzelllinien gut nachweisbar. Es ist jedoch eher niedriger exprimiert als in normalen Urothelzellen.
- Die somatischen *UTX*-Mutationen in den Urothelkarzinomzelllinien RT112 und KU-19-19 können verifiziert werden.
- Ein Zusammenhang zwischen der Expression von *UTX* und der seiner vermutlichen Zielgene *HBP1* und *RBBP9* ist in einigen Analysen erkennbar.
- *HBP1* ist im Urothelkarzinom signifikant herunterreguliert.
- *RBBP9* ist im Urothelkarzinom signifikant überexprimiert.
- *UTX* kann in Urothelkarzinom-Zelllinien durch spezifische siRNA suffizient herunterreguliert werden.

In den folgenden Abschnitten werden diese Ergebnisse im Einzelnen diskutiert.

### 4.2 *UTX* im Urothelkarzinom

#### 4.2.1 Expression von *UTX*

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass *UTX* im Urothelkarzinom niedriger exprimiert wird als in normalem Urothel. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass *UTX* - zumindest im weiteren Sinne - einen Tumorsuppressor darstellt (van Haaften 2009, Wang 2009). Die Expression von *UTX* im Urothelkarzinom ist aber nicht generell erniedrigt und die statistische Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse ist nicht besonders stark. In selbst untersuchten Geweben war sie durch die Anzahl der verfügbaren Proben begrenzt; aus diesem Grunde war auch eine Klärung des Zusammenhangs mit klinischen Parametern nicht möglich. In dem durch eine Microarray-Analyse erstellten recht großen Datensatz von Lee et al. war eine Abnahme der *UTX*-Expression zu erkennen, die aber nicht statistisch signifikant war. In den Urothelkarzinomzelllinien war die Streubreite der *UTX/TBP* mRNA-Expression relativ groß und steht in keinem deutlichen Zusammenhang mit den verfügbaren klinischen Parametern der Ursprungstumoren. Bei den normalen Urothelzellen lag zwar ebenfalls eine gewisse Streubreite in der Expression vor, aber alle Werte lagen im oberen Bereich.

*UTX* wird in den beiden Zelllinien mit somatischen *KDM6A*-Mutationen, wie zu erwarten, vermindert exprimiert. In der Zelllinie RT-112 sind die mRNA und Protein jedoch gut detektierbar (siehe Abb. 4 und 30). Der Ursprungstumor der Tumorzelllinie RT-112 entstammt einem weiblichen Patienten. In der Regel liegt somit der Genotyp XX vor, wobei jeweils nur ein X-Chromosom aktiv ist und das zweite als weitestgehend inaktives Barr-Körperchen vorliegt. Etwa 4% der RT112 Zellen enthalten eine Trisomie des X-Chromosoms (Karyotyp: 47 (44-47)<math><2n>XX/XXX</math> laut Angaben DSMZ). RT-112 enthält eine Leseraster-Mutation in einem Allel. Diese führt wahrscheinlich zu einer Destabilisierung des gebildeten verkürzten Proteins und möglicherweise der mRNA. Da *UTX* der X-Inaktivierung entgeht, wird daher von den beiden möglichen lediglich ein funktionales Allel exprimiert; dies könnte die beobachtete Verminderung von Protein und mRNA erklären.

Die Urothelkarzinomzelllinie KU-19-19 wurde aus dem Tumor eines männlichen Patienten etabliert. Es konnte ebenfalls eine somatische *KDM6A*-Mutation verifi-

## 4. Diskussion

---

ziert werden, welche jedoch homozygot ist; der UTX-mRNA-Spiegel ist deutlich erniedrigt. Da es sich um eine Missense-Mutation handelt, wird offenbar dennoch Protein gebildet.

Eine interessante Spekulation in diesem Zusammenhang ist, dass die Lokalisation eines Tumorsuppressors auf dem X-Chromosom einen gewissen Unterschied für das Tumorrisiko bei Männern und Frauen erzeugt. Speziell erkrankten Frauen seltener an einem Urothelkarzinom als Männer, was allerdings zumeist auf Unterschiede in der Exposition gegenüber Zigarettenrauch und spezifischen Noxen am Arbeitsplatz (vgl. 1.1.1) zurückgeführt wird. Das Vorhandensein von zwei Allelen des UTX-Gens *KDM6A* bei der Frau könnte möglicherweise einen protektiven Effekt haben (van der Meulen 2014).

Für eine umfassende Bewertung von *UTX*-Expression und *KDM6A*-Mutationen muss die Rolle von *UTY* bedacht werden. In männlichen Zellen liegt nur eine *UTX* Version vor; es wird jedoch das Y-Gen codierte Paralog *UTY* exprimiert. *UTY* zeigt bis zu 83% Aminosäuren-Identität mit *UTX*. Es scheint eine im Vergleich zu *UTX* schwache Histondemethylase Aktivität zu haben (Walport 2014), kann dennoch in männlichen Mausembryonen einen *knock-out* von *UTX* in gewissem Umfang kompensieren (Greenfield 1998, Lan 2007, Hong 2007). Van Haaften et al. konnten nachweisen, dass es zu einem signifikanten genomischen Verlust von *UTY* in Zellen mit somatischer *UTX*-Mutation kommt und stellten ein *two-hit* Modell einer *UTX-UTY*-Inaktivierung auf. Demnach kommt es zu einem signifikanten Verlust sowohl von *UTX*, als auch von *UTY* in Tumoren von männlichen Patienten mit somatischer *UTX*-Mutation. In der Arbeit von Guo et al. (Guo 2013) werden ebenfalls einzelne Mutationen in *UTY/KDM6C* beschrieben. Wie bei vielen *UTX*-*Missense*-Mutationen sind deren Auswirkungen auf die Funktion jedoch noch zu klären.

### 4.2.2 Spleißvarianten von *UTX*

Untersuchungen über die Relevanz der verschiedenen Spleißvarianten von *UTX* sind in der verfügbaren Fachliteratur kaum zu finden, die sich vor allem auf die - selbstverständlich wichtige - Gesamtexpression von *UTX*-mRNA und -Protein konzentriert. In den Fachdatenbanken stehen jedoch zahlreiche Informationen

## 4. Diskussion

---

bezüglich der Spleißvarianten bereit. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Spleißvarianten *KDM6A-201* und *KDM6A-202* in allen Urothelkarzinomzelllinien exprimiert werden. Diese beiden Genvarianten sind einander sehr ähnlich, wie aus Abb. 2 in der Einleitung ersichtlich ist. Es könnte sein, dass *KDM6A-202* leicht stärker exprimiert ist als die Variante *KDM6A-201*. Eine vergleichende quantitative RT-PCR der zwei Spleißvarianten wurde jedoch nicht durchgeführt. Beide UTX-Varianten werden offenbar sowohl in Urothelkarzinomzelllinien als auch in normalen Urothelzellen in gleichem Verhältnis gebildet. Die veränderte Gesamtexpression dürfte sich also aus Veränderungen in beiden Varianten ergeben. Die beiden Varianten kodieren nicht für das exakt gleiche Protein: *KDM6A-201* kodiert für ein 1401 Aminosäuren enthaltendes Protein mit einem Molekulargewicht von 154 kDa. Das von *KDM6A-202* kodierte Protein enthält 1356 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 149 kDa. Dieser leichte Unterschied könnte eine Erklärung für die im Western Blot auftretenden Doppelbanden sein. Eine Durchsicht der aktuellsten Ensembl *release* Version 76 von August 2014 hat zudem ergeben, dass mittlerweile 14 Spleißvarianten von *UTX* bekannt sind. Insbesondere die Variante *KDM6A-204* könnte auf Grund seiner Größe und proteinkodierenden Eigenschaft von Interesse sein.

### 4.2.3 Analyse des UTX-Proteins

In den Western Blot Untersuchungen von Urothelkarzinomzelllinien konnte UTX-Protein in allen Proben nachgewiesen werden. Die Methodik und der spezifische Antikörper wurde Versuchen von van Haaften et al. 2009 angepasst. Entsprechend den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalysen wird auch UTX-Protein in allen gemessenen Urothelkarzinomzelllinien gebildet. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression hergestellt werden. Eine Darstellung der UTX-Proteinexpression anhand einer so großen Reihe von Urothelkarzinomzelllinien ist in der internationalen Fachliteratur bisher nicht zu finden. Das UTX-Protein konnte im Zielbereich der erwarteten Proteingröße von etwa 150 kDa detektiert werden. In nahezu allen Proben erscheint das Protein jedoch als Doppelbande. Zusätzlich werden Proteinbanden bei 100 kDa und 75 kDa dargestellt. Die Bande bei 75 kDa wurde von van Haaften et al. 2009 als un-

## 4. Diskussion

---

spezifische Bande klassifiziert. Die detektierte Bande bei 100 kDa ließe sich dagegen gut mit der Spleißvariante *KDM6A-002* erklären. Dieses Protein besteht aus 999 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 109 kDa. Auch die Spleißvariante *KDM6A-003* könnte eine Erklärung für die bei 100 kDa nachweisbare Bande sein. Das zugehörige Protein besteht aus 1044 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 114 kDa. Besonders stark ist diese Bande in der Tumorzelllinie SW1710 nachweisbar. Das Vorkommen dieser Spleißvarianten wurde nicht genauer untersucht. Beide oben genannten UTX-Versionen verfügen über die JmjC-Domäne, jedoch über keine TPR-Domäne, was weitere Fragen bezüglich der Funktion dieser zwei Proteinvarianten aufwirft.

Bezüglich der in allen Proben im Bereich der erwarteten Proteingröße von 150 kDa auftretenden Doppelbanden lässt sich die Hypothese aufstellen, dass es sich um Proteine der unterschiedlichen Spleißvarianten *KDM6A-201* und *-202* mit theoretischen Molekulargewichten von 154 und 149 kDa handelt. Alternativ könnten sie durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen.

Auch eine Detektion von UTY-Protein wäre zu bedenken. UTY hat eine zu erwartende Molekülgröße von circa 154 kDa und 149 kDa, je nach Spleißvariante. Das Protein der Spleißvariante *UTY-204* hat eine zu erwartende Größe von 109 kDa und könnte durch die Bande bei 100 kDa dargestellt sein. Unterstützt wird diese These durch eine Analyse der UTX- und UTY-Aminosäuresequenzen und des Angriffspunktes des verwendeten UTX-Antikörpers. UTX und UTY weisen insgesamt eine große Homologie auf. Der UTX-Antikörper bindet spezifisch in einem Bereich zwischen den Aminosäuren in Position 700 und 750. In diesem Bereich sind die Aminosäuresequenzen von UTX und UTY sehr ähnlich, was ein selbst durchgeführtes *Alignment* bestätigt hat. Die Doppelbanden, wie auch die 100 kDa Bande, sind jedoch in männlichen und in weiblichen Zelllinien zu detektieren. Somit lässt sich keine der oben genannten Hypothesen gänzlich ausschließen. Anzumerken ist, dass die in dieser Arbeit verwendeten RT-PCR Primer selektiv für UTX sind.

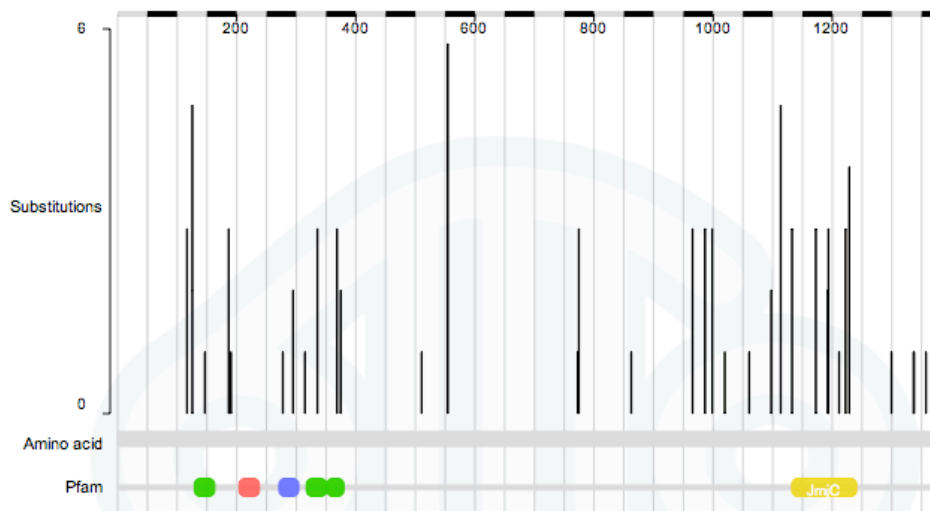
Die Untersuchungen der UTX-Proteinexpression im Vergleich zwischen Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen ergaben, dass UTX Protein in den normalen Zellen stärker nachweisbar ist als in den Tumorzellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der UTX-mRNA-Expressionsanalysen. Auch bei den normalen Zellen sind Doppelbanden des UTX-Proteins im Bereich des Haupt-

produkts nachweisbar. Die Ergebnisse lassen also darauf schließen, dass UTX-Protein im Urothelkarzinom vermindert ist. Kürzlich publizierte immunhistochemische Untersuchungen aus einem europäischen Konsortium unterstützen diese Interpretation (Nordentoft 2014).

### 4.2.4 Mutationen von *KDM6A*

Durch die durchgeführten Sequenzierungen konnten die somatischen *UTX*-Mutationen in den Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und KU-19-19 verifiziert werden. Sie stellen nur einen kleinen Teil der insgesamt gefundenen somatischen *UTX*-Mutationen dar. Im *Catalogue of somatic mutations in cancer* des Wellcome Trust Sanger Instituts werden 334 verschiedene somatische *UTX*-Mutationen aus verschiedenen Tumorentitäten aufgeführt (Stand August 2014, insgesamt 14168 getestete Tumorproben). Allein 100 Mutationen, d.h. rund 30% aller bisher beschriebenen, sind im Urothelkarzinom detektiert worden; innerhalb aller untersuchten Tumorarten stellt dies den größten prozentualen Anteil dar. In 100 von 402 getesteten Urothelkarzinomproben der Datenbank fanden sich *UTX*-Mutationen. Die Mutationen umfassen *Nonsense*-Substitutionen, *Missense*-Substitutionen, Leseraster verändernde Deletionen und Insertionen, sowie stille Mutationen in der kodierenden Region. Zahlreiche dieser Mutationen liegen in der TPR-Domäne und der katalytischen JmjC-Domäne, die für die Funktion von UTX bedeutsam sind (siehe Abb. 39, vgl. 2.1.8). Trotzdem muss vorsichtig festgehalten werden, dass für die meisten Mutanten nicht feststeht, wie weit sie Biosynthese oder Funktion von UTX beeinträchtigen. Ein einfacher Test für die Proteinfunktion ist derzeit nicht verfügbar.

## 4. Diskussion



**Abb. 39: Lokalisation von *KDM6A* Mutationen im Urothelkarzinom**

Somatische Mutationen in Form von Basensubstitutionen (*substitutions*) sind über das gesamte Gen *KDM6A* verteilt. Zahlreiche somatische Mutationen des für UTX kodierenden Gens betreffen die funktionell wichtige katalytische JmjC-Domäne und die TPR-Region. Dargestellt ist ausschließlich die Lokalisation von im Harnblasenkarzinom gefundenen *KDM6A*-Mutationen. (Entnommen: *Catalogue of somatic mutations in cancer*. Vgl. 2.1.8)

### 4.3 Expression von *EZH2*

Mit den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass *EZH2* in den Urothelkarzinom-Zelllinien und in der Urothelkarzinom-Gewebeserie des Urologischen Forschungslabors signifikant höher exprimiert wird als in normalen kultivierten Urothelzellen und im Urothelgewebe. Die statistische Aussagekraft ist sehr hoch. Dies konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die gewonnenen Ergebnisse sind somit völlig konform mit der Fachliteratur (vgl. 1.2.5). Eine erhöhte *EZH2*-Expression wird für verschiedene Tumorarten beschrieben und soll im Harnblasenkarzinom mit höherem Tumor-Stadium und *Grading*, sowie einer erhöhten Rezidivrate einher gehen (Arisan 2005, Hinz 2008, Raman 2005). Die Ergebnisse unterstreichen jedoch, dass die erhöhte Expression keineswegs auf aggressive Tumoren begrenzt ist. Interessant ist ferner, dass auch ein Expressionsunterschied zwischen den Tumorzelllinien und den gleichfalls schnell proliferierenden kultivierten normalen Urothelzellen besteht – die erhöhte Expression von *EZH2* ist also nicht nur eine Folge erhöhter Proliferation.



## 4. Diskussion

---

Über die Auswirkungen der verstärkten Expression von *EZH2* im Harnblasenkarzinom ist bisher wenig bekannt. Für eine Einschätzung muss man daher auf Daten aus anderen Tumorarten zurückgreifen. Es wird angenommen, dass *EZH2* in Tumoren als Transkriptionsrepressor fungiert und zur transkriptionellen Stilllegung („*silencing*“) einer ganzen Reihe von Zielgenen, insbesondere von Tumorsuppressor-Genen führt. Das konnte unter anderem für PRC2-Zielgene im Prostatakarzinom gezeigt werden, wo erhöhte *EZH2*-Spiegel zu einem schlechten klinischen *Outcome* führen (Yu 2007). Genomweite Studien zeigen ferner, dass lediglich ein sehr kleiner Prozentsatz von Genen zeitgleich vom PRC2 und der RNA Polymerase II gebunden wird (Squazzo 2006, Lee 2006). Dem stehen Studien gegenüber, die belegen, dass *EZH2* auch an der Transkriptionsaktivierung von Zielgenen beteiligt sein kann und sogar zur Aktivierung von Kontrollgenen des Zellzyklus führen kann (Kirmizis 2004, Bracken 2003, Shi 2007). Weiter kompliziert wird die Interpretation durch die Beobachtung, dass überexprimiertes *EZH2* Funktionen unabhängig von PRC2 ausüben kann, speziell eine Aktivierung des AKT-Signalwegs (Xu 2012), sowie durch die Entdeckung von inaktivierenden *EZH2*-Mutationen in bestimmten Leukämien (Shih 2012).

Ferner bleibt ungeklärt, wie sich die Menge der anderen PRC2-Komponenten Suz12 und EED in Tumorzellen mit erhöhten *EZH2*-Spiegeln verhält. Wenn man davon ausgeht, dass eine erhöhte Menge *EZH2*, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Urothelkarzinomproben gefunden wurde, zu einem starken *Silencing* von relevanten Zielgenen führt, so müssten auch alle anderen funktionellen Bestandteile des PRC2 in ausreichendem Maße verfügbar sein. Die gemessene Expression des ebenfalls zum PRC2 gehörenden *RBBP4* – interessanterweise auch einem mutmaßlichen Zielgenen von UTX - zeigte keine auffälligen Veränderungen in den Urothelkarzinomzelllinien. Die Analyse des Datensatzes von Lee et al. ergab sogar, dass die *RBBP4*-Expression im Urothelkarzinom signifikant erniedrigt ist (siehe Abb. 16). Das würde eher für eine PRC2-unabhängige Funktion von *EZH2* sprechen, doch gibt es verschiedene Formen des Proteinkomplexes (Margueron 2012). Die Wirkungsweise von *EZH2* in Tumoren bedarf sichtlich noch weiterer Aufklärung.

Dies ist nicht zuletzt unter therapeutischen Aspekten wichtig. Die Erkenntnis, dass Tumorsuppressor-Gene einem epigenetischen *Silencing* unterliegen können, bil-

det die Grundlage neuer therapeutischer Strategien, bei denen Inhibitoren von epigenetischen Regulator-Enzymen eingesetzt werden sollen. Ziel ist es, die Expression von durch epigenetische Fehlsteuerung aus dem Gleichgewicht gebrachten Genen in Tumorzellen zu normalisieren und so einen Wachstumsstopp oder eine Rückbildung von Tumorprozessen zu bewirken. In jüngster Zeit sind daher auch spezifische Inhibitoren für die Histonmethyltransferase EZH2 entwickelt worden (Van Aller 2013, Nakagawa 2014), wie sie für DNA-Methyltransferasen und Histondeacetylasen bereits seit einiger Zeit zur Verfügung stehen (O'Rourke 2013).

### 4.4 Expression von *JMJD3*

In Urothelkarzinomzelllinien war *JMJD3* signifikant niedriger exprimiert als in normalen Urothelzellen. Vorversuche an Proben des Gewebesets des Urologischen Forschungslabors ergaben, dass eine Messung der *JMJD3*-Expression in diesen Proben aus technischen Gründen nicht sinnvoll ist. Die Expression in Normal- wie Tumorgewebe lag um Größenordnungen über der in den Zellkulturen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression im Gewebe von einem anderen Zelltyp dominiert wird. In Frage kommen beispielsweise Makrophagen, Lymphozyten oder andere inflammatorische Zellen (De Santa 2009). Eine Analyse der *JMJD3*-Expression in Harnblasenkarzinomgeweben muss also an sehr sorgfältig mikrodisseziertem Material oder immunhistochemisch vorgenommen werden. Leider gibt es derzeit noch keinen *JMJD3*-Antikörper, der physiologische Spiegel des Proteins ausreichend spezifisch detektieren kann.

In den Urothelkarzinomzelllinien war die Varianz der Expression von *JMJD3* sehr hoch. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen histopathologischen bzw. klinischen Parametern und der *JMJD3*-Expression konnte nicht hergestellt werden. Es ist dennoch auffällig, dass *JMJD3* in einigen Proben gegenüber normalen Urothelzellen sehr niedrig exprimiert wurde. In der Fachliteratur wurden bisher keine signifikanten *JMJD3*-Expressionsveränderungen in Tumoren beschrieben, was auch mit dem Fehlen geeigneter Antikörper zusammenhängen könnte. In einigen Tumoren und auch dem Harnblasenkarzinom wurden interessanterweise somatische *JMJD3*-Mutationen nachgewiesen. Dazu zählen Cervix-Karzinome, Melanome,

## 4. Diskussion

---

Endometrial-Karzinome und Tumore des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und der Ovarien. Es handelt sich allerdings überwiegend um Missense-Mutationen, deren funktionelle Bedeutung ungeklärt ist (*Catalogue of somatic mutations in cancer*). Als funktioneller Agonist von UTX bleibt JMJD3 weiterhin im Fokus.

In den beiden Zelllinien mit somatischer *KDM6A*-Mutation wird *JMJD3* vergleichsweise hoch exprimiert. Dies gilt besonders für die KU-19-19 Zelllinie, welche durch sehr niedrige *UTX*-Expressionen gekennzeichnet ist. Deswegen wurde die Korrelation von *UTX* und *JMJD3* in den Urothelkarzinomzelllinien untersucht. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der *UTX*- und der *JMJD3*-Expression. Die beiden Histondemethylasen sind funktionell agonistisch und es wäre möglich, dass JMJD3 eine somatische *UTX*-Mutation bzw. niedrige *UTX*-Spiegel kompensiert. Die Abb.11 im Ergebnisteil zeigt dieses inverse Verhalten von *UTX* und *JMJD3* näherungsweise. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, müssten molekulare Funktionsweisen von UTX und JMJD3 und besonders ihr Zielgenspektrum genauer geklärt werden. Zwar weisen die beiden Histondemethylasen große strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten auf, doch ob ein Enzym das andere ersetzen kann ist fraglich. Wie in 1.2.4 dargelegt, ist JMJD3 im Gegensatz zu UTX für die Regulation von an inflammatorischen Prozessen beteiligten Genen verantwortlich und in den RAS-RAF Signalweg involviert. Als weiteren Unterschied verfügt JMJD3 im Gegensatz zu UTX nicht über das „Tetratricopeptid-Motiv“, welches für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein soll (Agger 2007). De Santa et al. konnten 2007 zeigen, dass JMJD3 mit dem sog. *Core Complex Protein RBBP5* co-immunpräzipitiert. *RBBP5* ist interessanterweise nicht nur ein Zielgen von UTX, sondern UTX ist auch noch durch die gemeinsame Beteiligung am MLL3/4 Komplex mit *RBBP5* funktionell assoziiert (Lee 2007). Derartige Beobachtungen machen den engen funktionellen Zusammenhang ebenso wie die Komplexität der Funktionen von UTX und JMJD3 ersichtlich.

### 4.5 Expression von UTX-Zielgenen

Die Analyse des Datensatzes von Lee et al. ergab, dass die Expression des UTX-Zielgens *HBP1* im Urothelkarzinom gegenüber normalem Urothelgewebe hoch signifikant vermindert ist. Dies wurde auch schon für andere Tumorarten beschrie-

## 4. Diskussion

---

ben (vgl. 1.2.3) und deckt sich insoweit mit der Fachliteratur. Ein weiterer Analyse-schritt ergab, dass die Expression von *UTX* mit *HBP1* im Urothelkarzinom hoch signifikant korreliert (siehe Abb.15). Die statistische Aussagekraft beider Untersuchungen ist sehr stark. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Wang et al. 2010 überein, welches für humane Fibroblasten zeigen konnten, dass *HBP1* ein *UTX*-Zielgen ist und die Expressionen signifikant miteinander korrelieren.

Messungen an dem Gewebeset des Urologischen Forschungslabors ergaben, dass die *HBP1*-Expression im Urothelkarzinom gegenüber gesundem Urothelgewebe nicht signifikant verändert war. Es konnte zudem keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *UTX* und *HBP1* belegt werden, wobei diese statistisch nur knapp verfehlt wurde. In den Urothelkarzinomzelllinien war hingegen *HBP1* signifikant niedriger exprimiert als in normalen Urothelzellen und seine Expression korrelierte hoch signifikant mit der von *UTX*. Die statistische Aussagekraft dieser Experimente ist stark. Offensichtlich sollte die Expression beider Gene in einer größeren Zahl von Urothelkarzinomgeweben mittels einer genauen quantitativen Technik gemessen werden. Darüber hinaus wäre auch die Expression von *HBP1* in Abhängigkeit vom Mutationsstatus von *UTX* zu untersuchen. Unsere Ergebnisse unterstützen insoweit einen Zusammenhang zwischen *UTX* und *HBP1*; wie dieser in urothelialen Zellen genau aussieht, muss weiter untersucht werden.

Nach dem Datensatz von Lee et al. wird *RBBP4* im Urothelkarzinom signifikant niedriger exprimiert als in normalem Urothelgewebe. Eine signifikante Korrelation von *UTX*- und *RBBP4*-Expression konnte indes nicht nachgewiesen werden. Dies wäre nach der Publikation von Wang et al. 2010 zu erwarten gewesen. Die Untersuchung der *RBBP4*-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen des Urologischen Forschungslabors erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Folgen einer somatischen *KDM6A*-Mutation auf die Funktion des mutmaßlichen *UTX*-Zielgens *RBBP4* bleiben daher unklar. Eine Verminderung von *RBBP4* könnte prinzipiell zu einer negativen Beeinträchtigung der Zellzykluskontrolle beitragen. In den beiden Urothelkarzinomzelllinien RT-112 und KU-19-19 mit *UTX*-Mutationen war die *RBBP4*-Expression sogar erhöht. Eine funktionelle Beeinträchtigung ist somit eher unwahrscheinlich.

Von besonderem Interesse ist der Beitrag von *RBBP4* zum PRC2. *RBBP4* ist funktionell mit der zu *UTX* antagonistisch wirkenden Methyltransferase *EZH2* im

## 4. Diskussion

---

PRC2 assoziiert. Eine Korrelationsanalyse von *EZH2*-Expression und *RBBP4*-Expression im Urothelkarzinom und in Urothelkarzinomzelllinien zeigte keinen Zusammenhang. Sofern *UTX*-Mutationen die *RBBP4*-Expression beeinträchtigen, würde dies sich negativ auf die Funktionstüchtigkeit des PRC2 auswirken. Hinzu käme die oben geschilderte Problematik, dass im Urothelkarzinom erhöht vorliegendes *EZH2* womöglich ebenfalls erhöhte Mengen seines Co-Faktors *RBBP4* benötigt um seine Wirkung voll zu entfalten. Die Bedeutung von niedrig exprimiertem *RBBP4* im Urothelkarzinom und der Zusammenhang mit somatischen *UTX*-Mutationen, sowie die speziellen funktionellen Hintergründe bleiben demnach weiterhin zu klären. Vor allen Dingen eine Messung der Proteinspiegel und der Interaktionen im PRC2-Komplex könnten weiterführen.

*RBBP9* ist als weiteres mutmaßliches *UTX*-Zielgen von besonderem Interesse. Unsere statistischen Auswertungen des Lee Datensatzes ergaben, dass *RBBP9* im Urothelkarzinom signifikant höher exprimiert wird als im normalen Urothelgewebe. Ebenso fanden wir, dass die *RBBP9*-Expression im Urothelkarzinom hochsignifikant mit der *UTX*-Expression korreliert. Letzteres Ergebnis ist konsistent mit den Ergebnissen der Fachliteratur (Wang 2010). Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, resultiert die Bedeutung von *RBBP9* nicht nur von seiner Rolle als *UTX*-Zielgen her, sondern auch von seiner Funktion in der pRB1-abhängigen Zellzykluskontrolle. *RBBP9* verfügt über ein LxCxE-Motiv und bindet darüber pRB1 direkt.

*RBBP9* verfügt zusätzlich über eine Serin-Phosphatase Aktivität, welche in Lungen-, Brust-, Colon- und Ovarial-Karzinomzelllinien nachgewiesen werden konnte. In Pankreastumoren ist diese zusätzliche *RBBP9*-Funktion verstärkt (Shields 2010) und *RBBP9* könnte in diesem Fall ein mögliches therapeutisches Ziel darstellen. Die Serin-Phosphatase Tätigkeit von *RBBP9* vermindert die Phosphorylierung von Smad2/3. Überexprimiertes *RBBP9* kann so zu einem Verlust der Wachstumshemmung durch TGF $\beta$ 1 führen (Woitach 1998). Die Hemmung des TGF $\beta$ -Signals fördert andererseits eine E-Cadherin Expression und könnte somit den epithelialen Phänotyp von Tumoren stabilisieren (Vorobiev 2012, Shields 2010). Es bleiben demnach noch viele Fragen bezüglich der funktionellen Bedeutung von *RBBP9* offen. Auch wird zu klären sein, was die Ursache der erhöhten *RBBP9*-Expression ist, wie sie von uns im Urothelkarzinom gefunden wurde. Sie

könnte u.a. Folge einer zellulären Antwort auf die verbreiteten Veränderungen in der pRB1-abhängigen Zellzykluskontrolle sein (Wang 2010).

### 4.6 Funktionelle Versuche mit siRNA

Um die funktionellen Auswirkungen von *UTX*-Mutationen zu simulieren, wurden *knockdown*-Experimente mit spezifischer siRNA durchgeführt. Mit Standardprotokollen wurden drei unterschiedlich siRNAs getestet und optimiert. Nach umfangreichen Vorversuchen wurde für die weiteren Experimente die in si32 benannte siRNA verwendet. Sie zeichnete sich durch die effizienteste Wirkweise aus. Für die Auswahl der Urothelkarzinomzelllinien waren die native *UTX*-mRNA- und Proteinexpression maßgebend. So wurden nur Tumorzelllinien mit robuster *UTX*-Expression ausgewählt, die gleichzeitig gute Voraussetzungen im Umgang in der Zellkultur boten. Die etablierte siRNA si32 konnte in allen verwendeten Urothelkarzinomzelllinien *UTX* effizient auf mRNA-Ebene herunterregulieren. Auch bei Zeitverlaufsanalysen über drei Tage hinweg konnten gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Die durchgeführten Western Blots zeigten, dass *UTX* auch auf Proteinebene suffizient und bereits nach 24 Stunden von der siRNA si32 herunterreguliert werden kann. In Vorversuchen wurde auch der Effekt eines *UTX*-*knockdowns* auf Zielgene untersucht und erste Ergebnisse generiert. Umfassendere funktionelle Experimente können nun folgen.

### 5. Schlussfolgerungen

Der Nachweis von somatischen Mutationen und anderen Veränderungen von chromatinmodifizierenden Proteinen wie den Histondemethylasen UTX und JMJD3 (Gene: *KDM6A*, *KDM6B*) eröffneten das Arbeitsfeld, mit dem sich die vorliegende Dissertation beschäftigt hat.

In Urothelkarzinomgeweben und –zelllinien wurde die Expression von UTX, JMJD3 und der Histonmethylase EZH2 untersucht, um weiteres Licht in ihre Bedeutung bei der Entstehung des Urothelkarzinoms und die beteiligten molekularen Mechanismen zu bringen. Dazu wurden Zellkultur, quantitative und qualitative PCR, Gen-Sequenzierungen, Western-Blot, funktionelle Versuchen mit siRNA sowie *in silico* Datenbankauswertung eingesetzt.

Die vermutlich als Tumorsuppressoren wirkenden Histondemethylasen UTX und JMJD3 waren im Urothelkarzinom häufig vermindert exprimiert. Für UTX/*KDM6A* konnten zwei somatische Mutationen verifiziert werden. Die Expression der Histonmethyltransferase EZH2 war erwartungsgemäß annähernd durchgehend erhöht. Von den bekannten UTX-Zielgenen zeigten *HBP1*, *RBBP4* und *RBBP9* signifikant veränderte Expression im Urothelkarzinom. Die Expressionsveränderungen verliefen allerdings nicht durchgehend gemäß den bisher vermuteten Zusammenhängen. Die Folgen von Expressionsveränderungen und Mutationen dieser epigenetisch relevanten Akteure sind bei weitem noch nicht verstanden. Als erster Schritt dahin wurde eine effiziente Herunterregulation von UTX durch siRNA etabliert.

Wir konnten die Relevanz von UTX und anderen chromatinmodifizierenden Proteinen im Urothelkarzinom deutlich herausstellen. Die vorliegende Arbeit leistete erste wichtige Grundlagen. Dem können nun weitere vor allem funktionelle Untersuchungen folgen, um die epigenetischen Mechanismen im normalen Urothel und im Urothelkarzinom besser zu verstehen.

Chromatinmodifizierende Proteine werden in Zukunft nicht nur wegen ihrer pathogenetischen Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren und deren Verlauf von Interesse sein, sondern könnten auch einen Angriffspunkt für neue molekulare Therapien darstellen, die für das Harnblasenkarzinom dringend benötigt werden.

## 5. Schlussfolgerungen

---



### 6. Literatur- und Quellenverzeichnis

Agger K., Cloos P.A., Christensen J., Pasini D., Rose S., Rappsilber J., Issaeva I., Canaani E., Salcini A.E. and Helin K. *UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development.* (2007). *Nature* 449, 731–734.

Agger K., Cloos P.A., Rudkjaer, L., Williams K., Andersen G., Christensen J. and Helin K. *The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence.* (2009). *Genes Dev.* 23, 1171–1176.

Arisan, S., Buyuktuncer, E.D., Palavan-Unsal, N. et al. *Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma.* (2005). *Urol. Int.* 75, 252–7.

Bachmann I.M., Halvorsen O.J., Collett K. et al. *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor sub-groups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast.* (2006). *J. Clin. Oncol.* 24, 268–73.

Bamford et al. *The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website.* (2004). *Br. J. Cancer.* 91, 355-358.

Barradas M., Anderton E., Acosta J.C., Li S., Banito A., Rodriguez-Niedenfuhr M., Maertens G., Banck M., Zhou M.M., Walsh M.J. et al. *Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS.* (2009). *Genes Dev.* 23, 1177–1182.

Berger S. *Review Article The complex language of chromatin regulation during transcription.* (2007). *Nature* 447, 407-412.

Bracken A.P., Pasini D., Capra M., Prosperini E., Colli E., Helin K. *EZH2 is down-stream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer.* (2003). *EMBO J.* 22, 5323–5335.

Burger M. et al. *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer.* (2013). *Eur. Urol.* 63, 234-41.

Cao R., Zhang Y. *SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex.* (2004). *Mol. Cell* 15, 57–67.

Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S. and Zhang Y. *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing.* (2002). *Science* 298, 1039–1043.

Cheng, L. et al. *Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder.* (2009). *Mod. Pathol.* 22, Suppl. 2, 70-95.

Dalgliesh G.L., Furge K., Greenman C., Chen L., Bignell G., Butler A., Davies H., Edkins S., Hardy C., Latimer C. et al. *Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes.* (2010). *Nature* 463, 360–363.

Deb G., Singh A.K., Gupta S. *EZH2: Not EZHY (Easy) to Deal.* (2014). *Mol. Cancer Res.* 12, 639-53.

De Santa F., Totaro M.G., Prosperini E., Notarbartolo S., Testa G. and Natoli G. *The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing.* (2007). *Cell* 130, 1083–1094.

De Santa F., Narang V., Yap Z.H., Tusi B.K., Burgold T., Austenaa L., Bucci G., Caganova M., Notarbartolo S., Casola S., Testa G., Sung W.K., Wei C.L., Natoli G. *Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages.* (2009). *EMBO J.* 28, 3341-52.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- di Martino E., Tomlinson D.C., Knowles M.A. *A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges*. (2012). *Adv. Urol.* 429213.
- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterkenn I.A. (Eds.). *World Health Organization Classification of Tumours- Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, Lyon, (2004). S. 90–108.
- Epstein, J.I. *Diagnosis and classification of flat, papillary, and invasive urothelial carcinoma: the WHO/ISUP consensus*. (2010). *Int. J. Surg. Pathol.* 18(3 Suppl.), 106-111.
- Flicek P. et al. *Ensembl 2014*. (2014). *Nucleic Acids Research* 42 Database issue:D749-D755
- Goebell P.J. and Knowles M.A. *Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium*. (2010). *Urol. Oncol.* 28, 409-28.
- Golka K., Selinski S., Lehmann M.L., Blaszkewicz M., Marchan R., Ickstadt K., Schwender H., Bolt H.M., Hengstler J.G. *Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the "wimp SNPs"*. (2011). *Arch. Toxicol.* 85, 539-54.
- Greenfield A., Carrel L., Pennisi D., Philippe C., Quaderi N., Siggers P., Steiner K. et al. *The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans*. (1998). *Hum. Mol. Genet.* 7, 737–742.
- Gui Y., Guo G., Huang Y., Hu X., Tang A. et al. *Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder*. (2011). *Nature Genetics* 43, 875-8.
- Guo G., Sun X., Chen C., Wu S., Huang P., Li Z. et al. *Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation*. (2013). *Nature Genetics* 45, 1459-63.
- Hansen K.H., Bracken A.P., Pasini D., Dietrich N., Gehani S.S., Monrad A., Rappsilber J., Lerdrup M., and Helin, K. *A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark*. (2008). *Nat. Cell Biol.* 10, 1291–1300.
- Hinz S., Kempkensteffen C., Christoph F. et al. *Expression of the polycomb group protein EZH2 and its relation to outcome in patients with urothelial carcinoma of the bladder*. (2008). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 6, 331–334.
- Hong S., Cho Y.W., Yu L.R., Yu H., Veenstra T.D. and Ge K. *Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases*. (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18439–18444.
- Issaeva I., Zonis Y., Rozovskaia T., Orlovsky K., Croce C.M., Nakamura T., Mazo A., Eisenbach L., Canaani E. *Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth*. (2007). *Mol. Cell Biol.* 27, 1889–1903.
- Iyer G., Al-Ahmadie H., Schultz N., Hanrahan A.J., Ostrovnya I., Balar A.V. et al. *Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer*. (2013). *J. Clin. Oncol.* 31, 3133-40.
- Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y., Bettgowda C. et al. *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. (2013). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 6021-6.
- Kirmizis S.M., Bartley A., Kuzmichev R., Margueron D., Reinberg R., Green P., Farnham J. *Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27*. (2004). *Genes Dev.* 18, 1592–1605.
- Kleer C.G., Cao Q., Varambally S. et al. *EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells*. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11606–11.
- Kouzarides T. *Chromatin Modifications and Their Function*. (2007). *Cell* 128, 693–705.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Lan F., Bayliss P.E., Rinn J.L., Whetstone J.R., Wang J.K., Chen S., Iwase S., Alpatov R., Issaeva I., Canaani E. et al. *A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development.* (2007). *Nature* 449, 689–694.
- Lee T.I., Jenner G., Boyer L., Guenther M., Levine S., Kumar R. et al. *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells.* (2006). *Cell* 125, 301–313.
- Lee M.G., Villa R., Trojer P., Norman J., Yan K.P., Reinberg D., Di Croce L. and Shiekhattar, R. *Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination.* (2007). *Science* 318, 447–450.
- Lee J. et al. *Expression Signature of E2F1 and Its Associated Genes Predict Superficial to Invasive Progression of Bladder Tumors.* (2010). *J. Clin. Oncol.* 28, 2660-2667.
- Lee S.T., Li Z., Wu Z., Aau M., Guan P., Karuturi R.K. et al. *Context-specific regulation of NF-kappaB target gene expression by EZH2 in breast cancers.* (2011). *Mol. Cell.* 43, 798–810.
- Margueron R., Reinberg D. *The Polycomb complex PRC2 and its mark in life.* (2011). *Nature* 20, 469, 343-9.
- Melin B.S., Nordfjäll K., Andersson U., Roos G. *hTERT cancer risk genotypes are associated with telomere length.* (2012). *Genet. Epidemiol.* 36, 368-72.
- McConkey D.J. et al., *Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression.* (2010). *Urol. Oncol.* 28, 429-40.
- Nakagawa S., Sakamoto Y., Okabe H., Hayashi H., Hashimoto D., Yokoyama N., Tokunaga R., Sakamoto K., Kuroki H., Mima K., Beppu T., Baba H. *Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells.* (2014). *Oncol. Rep.* 31, 983-8.
- Nekrasov M., Wild B. and Müller, J. *Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2.* (2005). *EMBO J.* 6, 348–353.
- Niegisch G. et al. *Signal transduction in urothelial cancer: how exactly do we know the targets for targeted therapy?* (2010). *Urologe A.* 49, 1401-5.
- Nordentoft I. et al. *Mutational Context and Diverse Clonal Development in Early and Late Bladder Cancer.* (2014). *Cell Reports*, 2211-1247, 00340-4.
- Olumi A.F., Skinner E.C., Tsai Y.C., Jones P.A. *Molecular analysis of human bladder cancer.* (1990). *Semin. Urol.* 8, 270-7.
- O'Rourke C.J., Knabben V., Bolton E., Moran D., Lynch T., Hollywood D., Perry A.S. *Manipulating the epigenome for the treatment of urological malignancies.* (2013). *Pharmacol. Ther.* 138, 185-96.
- Plass C., Pfister S.M., Lindroth A.M., Bogatyrova O., Claus R., Lichter P. *Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer.* (2013). *Nat. Rev. Genet.* 14, 765-80.
- Prasad S.M., et al. *Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts.* (2011). *Nat. Rev. Urol.* 8, 631-42.
- Rachakonda P.S., Hosen I., de Verdier P.J., Fallah M., Heidenreich B., Ryk C., Wiklund N.P., Steineck G, Schadendorf D., Hemminki K., Kumar R. *TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism.* (2013). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 17426-31.
- Raman J.D., Mongan N.P., Tickoo S.K. et al. *Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder.* (2005). *Clin. Cancer Res.* 11, 8570-6.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- RKI (Robert-Koch-Institut). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. (2013). 9. Ausgabe.
- Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M., Leblanc B. and Cavalli G. *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. (2007). *Cell* 128, 735–745.
- Schulz W.A. *Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways*. (2006). *Int. J. Cancer* 119, 1513-8.
- Schulz W.A., *Urothelial Carcinoma*. (2012), in *Encyclopedia of Cancer*, (Editor M. Schwab) 3. Auflage, Springer Verlag, p. 3851-3855.
- Schulz W.A., Ribarska T. *Insights into cancer mechanisms from genomic research on urological cancers*. (2011). *Genome Med.* 3, 20.
- Seitz M. et al. *Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification*. (2005). *Urologe A.* 44, 1073-86.
- Vorobiev S. et al. *Human retinoblastoma binding protein 9, a serine hydrolase implicated in pancreatic cancers*. (2012). *Protein Pept. Lett.* 19, 194–197.
- Shi J. et al. *Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells*. (2007). *Mol. Cell. Biol.* 27, 5105–5119.
- Shields D.J., Niessen S., Murphy E.A., Mielgo A., Desgrosellier J.S., Lau S.K., Barnes L.A., Lesperance J., Bouvet M., Tarin D., Cravatt B.F., Cheresch D.A. *RBBP9: a tumor-associated serine hydrolase activity required for pancreatic neoplasia*. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2189–2194.
- Shih A.H., Abdel-Wahab O., Patel J.P., Levine R.L. *The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies*. (2008). *Nature Reviews Cancer* 12, 599-612.
- Strahl B.D., Allis C.D. *The language of covalent histone modifications*. (2000). *Nature* 403, 41-45.
- Squazzo S. et al. *Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner*. (2006). *Genome Res.* 16, 890–900.
- Tevosian S.G., Shih H.H., Mendelson K.G., Sheppard K.A, Paulson K.E., Yee A.S. *HBP1: A HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family*. (1997). *Genes & Dev.* 11, 383–396.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. (2014). *Nature* 507, 315-22.
- Miao-Chih T. et al. *Tumor suppression by the histone demethylase UTX*. (2010). *Cell Cycle* 9 (11), 2043-2044.
- van Aller G.S., Pappalardi M.B., Ott H.M., Diaz E., Brandt M., Schwartz B.J., Miller W.H., Dhanak D., McCabe M.T., Verma S.K., Creasy C.L., Tummino P.J., Kruger R.G. *Long Residence Time Inhibition of EZH2 in Activated Polycomb Repressive Complex 2*. (2013). *ACS Chem. Biol.*
- van der Meulen J. et. al. *The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease*. (2014). *Epigenetics* 9, 658-68.
- van Haaften G., Dalgliesh G.L., Davies H., Chen L., Bignell G., Greenman C., Edkins S., Hardy C., O'Meara S., Teague J. et al. *Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer*. (2009). *Nat. Genetics* 41, 521–523.
- Varambally S., Dhanasekaran S.M., Zhou M. et al. *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. (2002). *Nature* 419, 624–9.
- Wang J.K., Tsai M.C., et al. *The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control*. (2010). *Genes Dev.* 24, 327-32.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Walport L.J. et al. *Human UTY(KDM6C) Is a Male-specific Nε-Methyl Lysyl Demethylase.* (2014). *J. Biol. Chem.* 289, 18302-18313.

Woitach J.T., Zhang M., Niu C.-H., Thorgeirsson S.S. *A retinoblastoma-binding protein that affects cell-cycle control and confers transforming ability.* (1998). *Nat. Genetics* 19, 371–374.

Xu K., Wu Z.J., Groner A.C., He H.H., Cai C., Lis R.T., Wu X., Stack E.C., Loda M., Liu T., Xu H., et al. *EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent.* (2012). *Science* 338, 1465-9.

Yu J. et al. *A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome.* (2007). *Cancer Res.* 67, 10657–10663.

### **Nicht in einer Druckversion verfügbare Literatur aus dem Internet (vgl. 2.1.8):**

*Ensembl release 75: Feb 2014 (GRCh37.p13)*

[http://Feb2014.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147050;r=X:44873177-45112602](http://Feb2014.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147050;r=X:44873177-45112602)

Stand: März 2014

*The Sanger Institute Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer web site, (http://www.sanger.ac.uk/cosmic), publiziert unter Bamford et al (2004) The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. Br J Cancer, 91,355-358,*

[http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&ln=KDM6A&res\\_type=AA&all\\_data=&sn=urinary\\_tract&seqLen=1402&id=5588&export=html&start=1&end=1381](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&ln=KDM6A&res_type=AA&all_data=&sn=urinary_tract&seqLen=1402&id=5588&export=html&start=1&end=1381)

Stand: September 2014

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz für die Betrauung mit dem spannenden wissenschaftlichen Thema und der unermüdlichen Unterstützung und Hilfe während des gesamten Arbeitsprozesses und darüber hinaus.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Albers für die Möglichkeit an seiner Klinik und dem urologischen Forschungslabor zu arbeiten und zu lernen. Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Annemarie Koch für die Betreuung und dem gesamten Team des urologischen Forschungslabors, insbesondere Frau Christiane Hader.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jorge Frank danke ich für seine Tätigkeit als Korreferent und Frau Priv.-Doz. Dr. med. Julia Reifenberger für ihre Teilhabe an der Promotionskommission.

Nicht genug danken kann ich meinem zu früh verstorbenen Vater, welcher mich zu allen Zeiten bei meinem Medizinstudium und der Promotion unterstützt hat. Ihm möchte ich diese Arbeit widmen.

Vielen Dank an meine Freundin Frau Dr. med. dent. Rosa Faoro für ihre Hilfe und Unterstützung insbesondere in der letzten Phase meiner Doktorarbeit.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, 22.05.2016

  
Unterschrift