

Funktionelle Bedeutung nichtkodierender RNAs in der urothelialen Differenzierung

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Judith Dehn, geb. Heubach
aus Sangerhausen

Düsseldorf, August 2015

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

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

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

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Simon, Institut für Entwicklungsgenetik, Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2015

Publikationen

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht unter dem Titel

„The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells.“; J. Heubach, J. Monsior, R. Deenen, G. Niegisch, T. Szarvas, C. Niedworok, W.A. Schulz, M.J. Hoffmann; Mol Cancer, 2015 Mai 21; 14:108.

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Das Urothelkarzinom	3
3.2	Das HOX-Gen-Cluster	8
3.3	Lange nichtkodierende RNAs	9
3.4	Gene mit Imprinting	12
3.5	Fragestellung	14
4	Material und Methoden	16
4.1	Materialien	16
4.1.1	UC-Gewebe	16
4.1.2	Zelllinien	20
4.1.3	Bakterienstämme	22
4.1.4	Plasmide	23
4.1.5	Enzyme	23
4.1.6	Antikörper	23
4.1.7	Kits und Assays	24
4.1.8	Substanzen	24
4.1.9	Lösungen und Puffer	27
4.1.10	Oligonukleotide	27
4.1.11	Verbrauchsmaterialien	35
4.1.12	Geräte	36
4.2	Methoden	38
4.2.1	Präparation von Plasmiden	38
4.2.2	Kultivierung von humanen Zellen	38
4.2.3	MTT-Test	40

4.2.4	<i>Limited Dilution Assay</i>	40
4.2.5	<i>Soft-Agar Colony Formation Assay</i>	41
4.2.6	<i>Scratch Assay</i>	41
4.2.7	<i>Boyden Chamber Assay</i>	41
4.2.8	DNA-Transfektion	42
4.2.9	siRNA-Transfektion	43
4.2.10	LNA-Transfektion.....	43
4.2.11	RNA-Präparation.....	43
4.2.11.1	Fraktionierte RNA-Präparation.....	43
4.2.12	Reverse Transkriptase PCR.....	44
4.2.13	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR).....	44
4.2.14	mRNA Microarray	47
4.2.14.1	Vergleich der Microarray-Daten mit publizierten Datensätzen.....	47
4.2.15	Protein-Präparation.....	48
4.2.16	Proteinkonzentrationsbestimmung	48
4.2.17	Western Blot Analysen.....	48
4.2.18	Immunfluoreszenz	49
4.2.19	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	49
4.2.20	DNA-Präparation	51
4.2.21	Bisulfit-Umwandlung von DNA	51
4.2.22	Pyrosequenzierung	51
4.2.23	DNA-Methylierungs-Array	52
4.2.24	<i>In silico</i> Analysen öffentlicher Datensätze.....	53
5	Ergebnisse	55
5.1	HOX-Genexpressionsmuster im Urothel	55
5.1.1	HOX-Genexpressionsmuster im normalen Urothel	55
5.1.2	HOX-Genexpressionsmuster im Urothelkarzinom	57
5.2	Expression der lncRNA HOTAIR in verschiedenen Tumorentitäten	63

5.2.1	Expression der lncRNA HOTAIR in Urothelkarzinom-Gewebeproben.....	63
5.2.2	Expression der putativen HOTAIR-Zielgene <i>HOXD10</i> und <i>HOXD12</i> im UC-Gewebeset	66
5.2.3	Expression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien	70
5.3	Vergleich der Expression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien mit Zelllinien anderer Tumorentitäten	71
5.4	Modulation der Expression der lncRNA HOTAIR.....	73
5.4.1	Knockdown der lncRNA HOTAIR.....	73
5.4.1.1	Ein siRNA- oder LNA-vermittelter Knockdown vermindert die Konzentration der lncRNA HOTAIR im Cytoplasma	75
5.4.2	Überexpression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien.....	77
5.5	Auswirkungen einer stabilen HOTAIR-Überexpression in UC-Zelllinien auf den Phänotyp.....	78
5.5.1	Auswirkung einer stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf die Proliferation und die Klonogenität	80
5.5.2	Auswirkungen einer stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf das Migrations- und Invasionsverhalten.....	84
5.5.3	Morphologische Veränderungen nach stabiler HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1	89
5.5.4	Effekte der stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf die Cisplatin-Sensitivität	92
5.6	EZH2, SUZ12 und LSD1 Status der UC-Zelllinien.....	93
5.7	Veränderungen im Genexpressionsprofil der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression	95
5.7.1	Veränderungen im HOX-Genexpressionsprofil der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression	102
5.7.2	Vergleich der eigenen Expressionsdaten mit publizierten Daten zum Ösophagus- und Mammakarzinom nach ektopischer HOTAIR-Expression	111
5.8	Effekte einer stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 auf die Expression von geprägten Genen.....	113

5.9	Effekte einer HOTAIR-Modulation auf die geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i>	116
5.9.1	Effekte einer ektoptischen Expression von HOTAIR auf die Expression von <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in UC-Zelllinien	116
5.9.2	Effekt einer ektoptischen HOTAIR-Expression auf die geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3	120
5.9.3	Effekte ektoptischen HOTAIR-Expression auf die geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in der Prostatakarzinomzelllinie DU-145.....	121
5.9.4	Effekte eines HOTAIR Knockdowns auf die Expression von <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in UC-Zelllinien	122
5.9.5	Effekte eines HOTAIR Knockdowns auf die Expression von <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145.....	125
5.10	Expression der geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in UC-Zelllinien	126
5.10.1	Expression des geprägten Gens <i>PLAGL1</i> in UC-Zelllinien.....	126
5.10.2	Expression des geprägten Gens <i>CDKN1C</i> in UC-Zelllinien.....	127
5.10.3	Expression des geprägten Gens <i>IGF2</i> und der lncRNA <i>H19</i> in UC-Zelllinien.....	128
5.11	Mechanistische Untersuchungen der Histonmethylierung und der DNA-Methylierung an potentiellen HOTAIR-Zielgenen mit elterlicher Prägung	129
5.11.1	Veränderungen der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 an geprägten Genen 129	
5.11.2	DNA-Methylierungsveränderungen an geprägten Genen.....	134
5.12	Veränderungen des DNA-Methylierungsprofils der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	139
5.13	Effekte einer Veränderung der <i>PLAGL1</i> -Expression in UC-Zelllinien auf <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i>	144
6	Diskussion	147
6.1	Die Veränderungen der HOX-Genexpression im Urothelkarzinom	147
6.2	Die Expression der lncRNA HOTAIR im Urothelkarzinom und ihr Einfluss auf die <i>HOXD10</i> -Expression.....	150

6.3	Zelllinienspezifische Effekte einer HOTAIR-Überexpression	152
6.4	Mechanismen der Regulation der Genexpression durch HOTAIR.....	155
6.5	HOTAIR reguliert elterlich geprägte Gene.....	158
6.6	HOTAIR beeinflusst die DNA-Methylierung genomweit.....	164
7	Verzeichnisse	167
7.1	Literaturverzeichnis.....	167
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	181
7.3	Tabellenverzeichnis.....	186
7.4	Abkürzungen	188
8	Erklärung.....	192
9	Danksagung.....	193
10	Anhang	195

1 Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom der Harnblase (UC) zeichnet sich durch eine ausgeprägte Heterogenität aus, die Diagnostik und Therapie erschwert. Für die Heterogenität mitverantwortlich sind aberrante Differenzierungsprozesse, die durch eine Deregulation der homöotischen HOX-Gene hervorgerufen werden könnten, wie eine *in vitro* Analyse dreier unabhängiger Genexpressions-Microarray-Analysen von UC-Geweben ergab. Der genaue Mechanismus der Regulation von HOX-Genen beim Menschen ist bisher nicht bekannt; neu entdeckte potentielle Regulatoren sind lange nichtkodierende RNAs (lncRNAs). Die lncRNA HOTAIR ist im HOXC-Cluster lokalisiert und kann die Expression von Genen, insbesondere posterioren HOXD-Genen, über Vermittlung von repressiven Histonmodifikationen beeinflussen. Eine Überexpression von HOTAIR korreliert in vielen Tumoren mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose. Auch in einer in dieser Arbeit untersuchten großen Serie von UC-Gewebeproben waren die 25 % der Fälle mit der höchsten HOTAIR-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die Effekte einer ektopischen HOTAIR-Überexpression in UC-Zelllinien variierten stark. In VM-CUB1 Zellen wurde durch stabile HOTAIR-Überexpression der erwartete aggressivere Phänotyp mit Markern einer epithelial-mesenchymalen Transition, verstärkter Proliferation und Invasionsfähigkeit induziert. Die Effekte der Überexpression in 5637 waren teilweise entgegengesetzt, mit Anzeichen einer Seneszenz-Induktion. Eine Mikroarray-Expressionsanalyse bestätigte die zelllinienabhängigen Effekte von HOTAIR auf HOX-Gene, Zellzyklusregulatoren und Differenzierung. Auch ein breiterer bioinformatischer Vergleich mit Ösophagus- und Mammakarzinom-Zelllinien erbrachte nur eine sehr kleine Schnittmenge gemeinsamer HOTAIR-Zielgene. Eines davon war PLAGL1, ein Schlüsselregulator eines Netzwerkes von elterlich geprägten Genen (IGN), das - mindestens in Mäusen - das embryonale Wachstum reguliert. Auch weitere Gene des IGN wurden in UC-Zelllinien durch HOTAIR beeinflusst, zum Teil vermittelt über PLAGL1. Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von HOTAIR bei der Regulation von elterlich geprägten Genen. An IGN- und HOX-Genen wurden nach HOTAIR-Überexpression mittels Chromatin-Immunpräzipitation Veränderungen von Histonmethylierungen festgestellt, darunter jedoch auch transkriptionsaktivierende. Dies deutet auf weitere, bisher unbekannte Interaktionspartner von HOTAIR hin. Neu war auch die Beobachtung, dass Überexpression von HOTAIR zu einer verstärkten DNA-Methylierung des PLAGL1-Promotors führt. Ein DNA-Methylierungsarray ergab, dass sich nach HOTAIR-Überexpression die Methylierung an bestimmten CpG-Stellen über das gesamte Genom hinweg verändert. Somit scheint HOTAIR die Expression von Genen nicht nur über die Modulation von Histonmodifikationen, sondern auch der DNA-Methylierung zu regulieren.

2 Summary

Urothelial carcinoma (UC) is characterized by pronounced heterogeneity that complicate diagnosis and therapy. One factor contributing to heterogeneity may be aberrant differentiation as a consequence of deregulated homeotic HOX gene expression. Deregulated HOX gene expression UC was observed in an *in vitro* analysis of microarray gene expression data sets from three independent UC tissue sample sets. While to date, the precise mechanism of HOX gene regulation in human is not completely understood, newly discovered long non-coding RNAs (lncRNAs) are candidate regulators. The lncRNA HOTAIR originating from the HOXC gene cluster regulates gene expression, especially of posterior HOXD genes, by directing repressive histone modifications. In many cancers HOTAIR overexpression is correlated with an aggressive phenotype and poor prognosis. In this study, accordingly, highly increased HOTAIR expression in 25 % of the patients was associated with poor prognosis. The effects of ectopic HOTAIR overexpression differed between UC cell lines. Whereas stably transfected VM-CUB1 cells acquired the expected aggressive phenotype with marker expression for epithelial-to-mesenchymal transition, increased proliferation and invasion, 5637 cells showed partly opposite effects including senescence induction. A microarray expression analysis confirmed cell line dependent effects of HOTAIR on HOX gene expression, cell cycle regulators and differentiation. A bioinformatic comparison with oesophageal and mamma carcinoma cell lines revealed minimal overlaps between HOTAIR target genes. A particularly interesting tissue independent target gene was PLAGL1 a key regulator gene of an imprinted gene network (IGN) regulating embryonic growth – at least - in mice. Additional genes of the IGN were affected by HOTAIR in UC cell lines, partly mediated by PLAGL1. These results suggest a function of HOTAIR in the regulation of imprinted genes. At IGN and HOX genes histone methylation changes were observed after HOTAIR overexpression using chromatin immunoprecipitation. Unexpectedly, at some sites, activating modification increased, suggesting that HOTAIR may have additional unknown interaction partners. Another new observation was that overexpression of HOTAIR led to increased DNA methylation of the PLAGL1 promoter. A DNA methylation array revealed that following HOTAIR overexpression DNA methylation changed at specific CpG sites throughout the genome. Thus HOTAIR seems to regulate expression of genes not only through the modulation of histone modifications, but also through changing DNA methylation patterns.

3 Einleitung

3.1 Das Urothelkarzinom

Mit 429.000 Neuerkrankungen im Jahr 2012 stellt das Urothelkarzinom der Harnblase (UC) die neunthäufigste Tumorerkrankung weltweit dar [1]. Das UC tritt bei Männern dreimal häufiger auf als bei Frauen (Verhältnis 3,5:1) und bildet bei Ersteren sogar die fünfthäufigste Tumorerkrankung. Generell werden maligne Tumore des die ableitenden Harnwege auskleidenden Übergangsepithels als Urothelkarzinome zusammengefasst. Sie beinhalten Tumore des Nierenbeckens, der Harnleiter, der Harnblase und der oberen Harnröhre. Die prominentesten Risikofaktoren für das UC sind Tabakrauch und industrielle, chemische Karzinogene, besonders aromatische Amine [2].

Das UC kann sowohl klinisch, als auch molekular in zwei offensichtliche Unterarten geteilt werden. Etwa zwei Drittel der diagnostizierten UCs sind papilläre, oft gut differenzierte Tumore, die sich selten zu muskelinvasiven Tumoren weiterentwickeln [3, 4]. Sie weisen zwar eine hohe Neigung zur Rezidivierung auf (ca. 70 %) und bedürfen einer kostenintensiven Überwachung und Weiterbehandlung, sind aber mit einer guten Prognose assoziiert (5-Jahresüberleben > 90 %) [5, 6]. Bei bis zu einem Drittel der Patienten werden muskelinvasive, weniger differenzierte Tumore diagnostiziert. Trotz Entfernung der Harnblase (radikale Zystektomie) entwickeln etwa die Hälfte dieser Patienten innerhalb von zwei Jahren Metastasen, so dass das 5-Jahresüberleben auf 50-60 % reduziert ist [7, 8]. Die Erstlinien-Chemotherapie für das metastasierte UC basiert seit vier Jahrzehnten auf Cisplatin-Kombinationen. Die meisten Tumore sprechen auf diese zwar anfänglich an, aber letztendlich gewinnen die Patienten nur einen kleinen Überlebensvorteil von wenigen Monaten [9-11].

Die Klassifizierung von UCs erfolgt nach dem TNM-System (Tab. 1.1) (UICC 2009)[12]. Dabei wird der Tumor anhand seiner Größe und Ausbreitung (T) und dem Vorhandensein von Metastasen in regionären Lymphknoten (N) oder weiter entfernt (M) eingeteilt. Zusätzlich erfolgt eine Einteilung über den Grad der histologischen Entartung des Tumors, dem *Grading*. Dieses ist ein Maß für die Störung der Gewebestruktur in Tumoren und auch genetische Veränderungen werden berücksichtigt. Genomisch stabile Tumore werden als *low grade* und genomisch instabile Tumore als *high grade* eingestuft. Papilläre Tumore werden nach dieser Einteilung in drei Gruppen unterteilt: Die beiden genetisch stabilen Gruppen papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrig malignem Potenzial (PUNLMP) und nicht invasive *low-grade*-Karzinome und das *carcinoma in situ*, welches einzelne Areale mit deutlichen Kernpolymorphismen aufweist. Neben der Einstufung in *low* und *high grade* existiert ein dreistufiges *Grading*: G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 (schlecht bis

undifferenziert). *Low-grade*-Tumore entsprechen G1 und Anteile von G2. Zudem entsprechen *high-grade*-Tumore G2 bis G3 (WHO-Klassifikation).

Tabelle 3.1: Klassifizierung des Urothelkarzinoms der Harnblase nach dem TNM-System.

Tumorausbreitung - T	
TX	Beurteilung nicht möglich
T0	Keine Anhaltspunkte für Primärtumor
Ta	Nicht invasiver papillärer Tumor
TIS	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Infiltration subepithelialen Gewebes
T2	Infiltration der Muskulatur
T2a	Infiltration der oberflächlichen Muskulatur
T2b	Infiltration der äußeren Muskulatur
T3	Infiltration des perivesikalen Fettgewebes
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch (extravesikal)
T4	Infiltration benachbarter Gewebe
T4a	Infiltration der Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Infiltration der Becken- oder Bauchwand
Regionäre Lymphknoten - N	
NX	Beurteilung nicht möglich
N0	Keine Anhaltspunkte
N1	Metastase in solitärem Lymphknoten ≤ 2 cm
N2	Metastase in solitärem Lymphknoten > 2 cm und ≤ 5 cm oder multiple Lymphknoten < 5 cm
N3	Metastasen in Lymphknoten > 5 cm
Fernmetastasen - M	
MX	Beurteilung nicht möglich
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die Harnblase dient der Speicherung von Urin. Sie besteht von außen nach innen aus folgenden Schichten: *Serosa*, *muscularis*, *submucosa*, *muscularis mucosa* und der *lamina propria*. Das Urothel, eine Schicht von Epithelzellen, liegt auf der *lamina propria*. Dieses Übergangsepithel ist für die Barrierefunktion der Harnblase entscheidend. Es geht aus dem Endoderm hervor und ist aus drei Arten von morphologisch klar unterscheidbaren Zellen geschichtet. Die basalen Zellen sind mit 5-10 µm die kleinsten und am wenigsten differenziert. Es folgen die mit 20 µm etwas größeren intermediären Zellen. Dem Lumen zugewandt sind die am stärksten differenzierten Deckzellen, im Englischen als *umbrella cells* treffend benannt. Sie sind hexagonal und verändern ihre Breite ja nach Füllstand der Harnblase, die intermediären Zellen verändern dabei ihre Schichtung durch Übereinandergleiten. Die apikale Membran der Deckzellen ist von einer Plaque-Schicht überzogen. Diese setzt sich aus Uroplakinen (UP1a, UP1b, UP2 und UP3) zusammen, die auch als biochemische Marker dieser Zellschicht dienen [13, 14]. Diese klare Hierarchie ist in geringer differenzierten Urotheltumoren nicht mehr zu finden.

Zur Entstehung von UC tragen molekulare Veränderungen maßgeblich bei. Es wurden vielfältige genetische und epigenetische Veränderungen einschließlich chromosomaler Aberrationen, Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Veränderungen in der Tumormikroumgebung gefunden [4, 15-17]. Ein häufiges frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist ein Verlust von Teilen des Chromosom 9 [18, 19]. Diese betreffen unter anderem das Gen *CDKN2A* im Abschnitt 9p21, das für den Zellzyklusinhibitor p16^{INK4A} und den p53-Aktivator p14^{ARF} kodiert. Papilläre Tumore zeigen häufig aktivierende Mutationen im *HRAS* Gen (bis zu 30 %) [15, 20, 21], besonders aber im *fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)* Gen (70 %) [22-24]. Diese Mutationen führen zur Aktivierung des Rezeptortyrosinkinase (RTK)-RAS-Signalweges, der eine zentrale Rolle in der Proliferation und Erneuerung von epithelialen Zellen spielt [25]. Über 50 % der muskelinvasiven Tumore besitzen strukturelle und funktionelle Defekte des Tumorsuppressors p53, sowie des Retinoblastom-Proteins (pRB1) [26-28]. *RBI* -Mutationen treten alternativ zur *CDKN2A* Inaktivierung auf [29]. P53 ist ein wesentlicher Mediator von Checkpointsignalen und wirkt auf diese Weise an der Kontrolle des Zellwachstums und der genomischen Stabilität mit. Als wesentlicher Faktor bei der Kontrolle des G1/S-Übergangs des Zellzyklus beeinflusst pRB1 Zelldifferenzierung, Zellproliferation und die Einleitung von Seneszenz oder Apoptose.

Neben genetischen Veränderungen sind auch epigenetische Veränderungen an der Bildung und der Progression des UCs beteiligt. Die Methylierung der DNA dient im Zellkern dazu, Bereiche innerhalb des Genoms zu unterscheiden, die transkriptionell aktiv oder inaktiv sind.

Dabei werden Cytidine in Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden („CpG-Stellen“) von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) methyliert. Man unterscheidet zwei Gruppen von DNMTs. Die DNMT1 ist vorrangig dafür verantwortlich, dass die in der Mutterzelle vorhandene DNA-Methylierung an die Tochterzellen weitergegeben wird und die DNMTs 3a und 3b sind besonders für die Etablierung neuer DNA-Methylierung notwendig, zum Beispiel während der Zelldifferenzierung. In Tumoren ist das DNA-Methylierungsmuster häufig gestört. Inaktive Bereiche des Genoms sind normalerweise stark methyliert. Diese dichte Methylierung geht in Tumoren häufig verloren; dieser Prozess wird Hypomethylierung genannt. Im Gegensatz dazu sind aktive regulatorische Bereiche, wie Promotoren und Enhancer, im normalen Gewebe wenig methyliert. In Tumoren kommt es zu einer verstärkten Methylierung solcher Regionen (Hypermethylierung) und somit zu einer Inaktivierung. Im UC tritt häufig eine starke Hypomethylierung über alle Tumorstadien hinweg auf. Am besten lässt sich dieses Phänomen an sogenannten *long interspersed element-1* (LINE-1)-Sequenzen nachvollziehen. Diese gehören zur Gruppe der Retrotransposons und bilden fast 20 % des menschlichen Genoms [30]. In den letzten Jahren wurde über moderne Screeningverfahren die DNA-Methylierung im UC umfassend untersucht. Dabei wurden Hinweise dafür gefunden, dass auch anhand des DNA-Methylierungs-Musters eine Einteilung des UCs in verschiedene Subtypen möglich ist [31-33]. So tritt eine Hypomethylierung von CpG-Stellen außerhalb von CpG-Inseln gehäuft in nicht invasiven UC auf. In muskelinvasiven UC ist dagegen eine erhebliche Anzahl von CpG-Inseln hypermethyliert [32, 34]. Verschiedene Kombinationen von Methylierungsveränderungen werden als mögliche diagnostische und prognostische Biomarker untersucht [35].

Außerdem wirkt sich die DNA-Methylierung auf das humane Genom über die höhere Wahrscheinlichkeit einer Mutation an 5-Methylcytosin aus, dort ist die Wahrscheinlichkeit einer C → T Transition über eine Deaminierung erhöht. Solche Mutationen finden sich verstärkt in Tumoren älterer Patienten.

Eine weitere Gruppe von Genen, die häufig in UC mutiert sind, sind Chromatinregulatoren [36]. Dazu gehören Proteine, die Histone modifizieren oder Chromatin remodellieren. Die Histonmodifikation erfolgt posttranslational über die Modifizierung von Aminosäureresten, insbesondere Methylierung und Acetylierung von Lysinen und Phosphorylierung von Serinen. Diese Modifikationen werden durch sogenannte *Writer* Proteine eingefügt, von *Readern* erkannt und von *Erasern* wieder entfernt. Die Histonmodifikation H3K4me3, die von transkriptionsaktivierenden Komplexen erkannt wird, wird durch Methyltransferasen, maßgeblich MLL-Proteine, etabliert und durch Demethylasen, beispielsweise LSD1

(KDM1A), entfernt [37]. Einen gegenteiligen Effekt bewirkt eine Trimethylierung an H3K27 (H3K27me3), die durch die Methyltransferase EZH2 (Komponente des PRC2) eingebracht wird und durch Demethylasen, wie UTX (KDM6A), JMJD3 und UTY, entfernt wird [38]. Diese Enzyme sind häufig Komponenten größerer Proteinkomplexe. Neben der Methylierung von Histonen spielt auch deren Acetylierung eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkription. Die Acetylierung von Histonen und die damit einhergehende Aktivierung der Transkription wird von Histonacetyltransferasen (HAT) vermittelt. Die Deacetylierung und somit Inaktivierung der Transkription wird von Histondeacetylasen (HDAC) katalysiert [39]. Als Folge der Chromatinmodellierung verändert sich die Anordnung der Nukleosomen auf der DNA und die gesamte Chromatinstruktur, sodass Bereiche schwerer oder leichter für die Transkriptionsmaschinerie erreichbar werden. An diesem Prozess sind spezialisierte Proteinkomplexe beteiligt, wie der SWI/SNF-Komplex [40]. Im UC sind einige Chromatinregulatoren mehr als zufällig häufig mutiert. Insgesamt findet sich in 89 % der muskelinvasiven Tumore eine Mutation in mindestens einem Chromatinregulator-Gen [41]. Am häufigsten mutiert sind die Histondemethylase *KDM6A* oder alternativ dazu die Methyltransferase *MLL2*, sowie die SWI/SNF-Komponente *AT-rich interactive domain 1A* (*ARID1A*). Der Verlust der Funktion dieser Enzyme führt zur Inaktivierung der Gentranskription. Außerdem sind häufig *MLL* und *MLL3* mutiert, sowie die Histonacetyltransferasen *E1A-binding protein p300* (*EP300*) und *CREB-binding protein* (*CREBBP*) und der Corepressor *nuclear receptor co-repressor* (*NCOR1*) [4].

Über den evidenten Unterschied zwischen papillären und invasiven Tumoren hinaus zeichnet sich das UC durch eine ausgeprägte Heterogenität auf klinischer und molekularer Ebene aus. Daher sind die Abschätzung einer individuellen Prognose und die Auswahl individuell sinnvoller Therapieoptionen schwierig. Die Tumorerheterogenität ist auf Störungen der Gewebedifferenzierung zurückzuführen, die auch für die Entstehung des UCs von wesentlicher Bedeutung sind. Daher ist ein Verständnis der urothelialen Differenzierungsmechanismen essentiell, um neue Erkenntnisse zu Verlaufsformen und therapeutischen Angriffspunkten zu generieren. Dazu müsste geklärt sein, in welchem Abstammungsverhältnis die verschiedenen Zelltypen innerhalb des Urothels zueinander stehen und welche regulatorischen Mechanismen einer normalen oder gestörten Zelldifferenzierung zu Grunde liegen. Diese Fragen sind bis heute nicht vollständig beantwortet. Neueste Erkenntnisse deuten unerwartet darauf hin, dass papilläre Tumore aus Zellen der intermediären Schicht hervorgehen. Demgegenüber sind Vorläufer des *carcinoma in situ* (CIS) und muskelinvasiver Tumore Cytokeratin 5 positive Basalzellen [42].

3.2 Das HOX-Gen-Cluster

Ein bekanntes System zur Regulation von Differenzierungsprozessen stellen die klassischen Homöobox-Gene (HOX) dar. Diese Genfamilie umfasst im Menschen 39 homöotische HOX-Gene, die in vier Clustern (HOXA, HOXB, HOXC und HOXD) organisiert und auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren, die an der Festlegung der Körperachse während der embryonalen Entwicklung beteiligt sind. In der Entwicklung des urogenitalen Systems sind die paralogen Gruppen 11 und 13 in der posterioren Region des Embryos aktiv [43, 44]. Im erwachsenen Organismus regulieren die HOX-Gene Gewebemöostase und Differenzierung und legen somit weiterhin Zellschicksale fest [45]. Da jedes adulte Gewebe ein spezifisches HOX-Expressionsmuster besitzt, kann dessen Veränderung zu Störungen der Zellidentität und der Differenzierung führen [46-48]. Somit ist es denkbar, dass eine Deregulation der HOX-Gene auch im UC für aberrante Differenzierungsprozesse ursächlich ist. Allerdings ist die Expression der HOX-Gene im UC kaum untersucht. Im Wesentlichen gibt es nur eine Publikation [49], in der die HOX-Gen-Expression in 15 Paaren von tumorfreien und dazugehörigen UC-Geweben untersucht wurde. Dabei wurde eine Veränderung des gesamten HOX-Expressionsmusters beobachtet, insbesondere eine Reaktivierung der anterioren *HOXC*-Gene und Veränderungen der für die Entwicklung des Urogenitaltraktes wichtigen paralogen Gruppe HOX11.

Die HOX-Cluster kodieren zusätzlich für eine große Anzahl nichtkodierender RNAs (ncRNAs) (Abb. 3.1) [50]. Hierzu zählen einzelne microRNAs, für die zum Teil bereits eine Assoziation mit der Aggressivität von Tumoren gezeigt wurde [51-53] und eine größere Anzahl langer nichtkodierender RNAs (lncRNA). Auch für diese ist zum Teil eine Bedeutung in der Tumorigenese beschrieben [54-56]. Es wird vermutet, dass einige dieser ncRNAs direkt an der Regulation der Transkription von HOX-Genen beteiligt sind.

Wie die Expression von HOX-Genen in Vertebraten gesteuert wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Im Gegensatz dazu ist die transkriptionelle Regulation der HOX-Gene in *Drosophila melanogaster* gut untersucht [57]. Sie erfolgt über das antagonistische Zusammenspiel der Histon-modifizierenden Polycomb (PcG) - und Trithorax (Trx) - Komplexe. Polycomb-Proteine vermitteln die transkriptionsinaktivierenden und Trx-Proteine die transkriptionsaktivierenden Histonmodifikationen [58]. In *Drosophila melanogaster* binden diese Proteine an die DNA über spezifische *cis*-regulatorische Sequenzen, den *polycomb/trithorax group response elements* (PRE/TREs) [59]. In Vertebraten wurden analoge Sequenzen nicht gefunden [60]. Polycomb- und Trithorax-Komplexe werden durch andere Faktoren an die DNA rekrutiert, um dort epigenetische Zustände mit entsprechenden

Histonmodifikationen einzustellen. Für diese Rekrutierungsfunktion sind bestimmte lncRNAs geeignete Kandidaten.

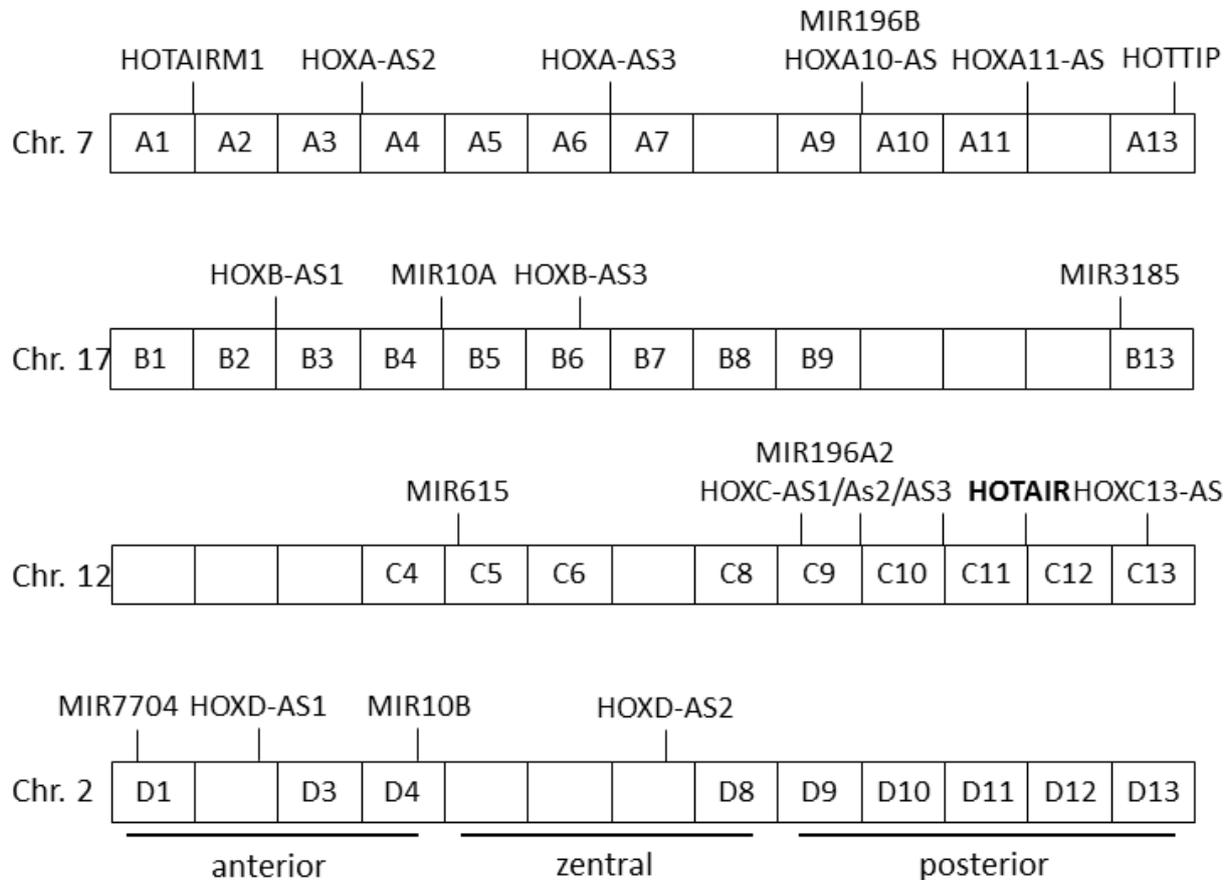


Abbildung 3.1: Die HOX-Cluster mit den Genen für nichtkodierende RNAs im Menschen.

Basierend auf Daten der UCSC-Genom-Datenbank sind schematisch nichtkodierende RNAs und ihre Lage in den HOX-Loci dargestellt.

3.3 Lange nichtkodierende RNAs

Die Entdeckung von lncRNAs ist vor allem auf die Weiterentwicklung von Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden zurückzuführen. lncRNAs sind definiert als mindestens 200 Nukleotide lange RNAs, die nicht für ein Protein kodieren. Sie werden typischerweise durch die RNA-Polymerase II transkribiert, häufig gespleißt und polyadenyliert [61]. Generell sind lncRNAs häufig schwächer als protein-kodierende Gene exprimiert und vorzugsweise im Nukleus lokalisiert. Viele lncRNAs zeichnen sich durch ein Expressionsmuster aus, das stärker gewebespezifisch ist als das von Protein-kodierenden Genen [62]. Obwohl sie als neue Faktoren bisher wenig untersucht wurden, konnte an einzelnen Beispielen gezeigt werden, dass lncRNAs eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen ausüben können. Sie fungieren als Signalmoleküle, Gerüst für Protein-Protein-Interaktionen (*scaffold*) oder über einen

Abfangmechanismus (*decoy*) [63]. Eine sehr interessante Funktion ist die Rekrutierung von Multi-Enzym-Komplexen (z.B. Polycomb-Komplexe), die Chromatinmodifikationen vermitteln, denn lncRNAs können dadurch über den Verpackungszustand des Chromatins und die Expression von Genen mitentscheiden [61, 64]. Die Regulation von Differenzierungsprozessen durch epigenetische Mechanismen wie Chromatinmodifikationen und DNA-Methylierung ist weithin akzeptiert. Vermutlich wird jedoch die Feinregulation bei der Festlegung des Zellschicksals von lncRNAs vermittelt, wodurch sie zu zentralen epigenetischen Faktoren bei der Regulation von Differenzierungsprozessen werden [65, 66].

Die wohl bekannteste und am besten untersuchte lncRNA, die mit Chromatin modifizierenden Proteinen interagiert, ist XIST (*X- inactive-specific transcript*). Sie ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und ist wesentlich an der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in Frauen beteiligt. XIST wird ausschließlich vom inaktiven X-Chromosom transkribiert [67] und wirkt *in cis* auf die Transkription vieler Gene. Sie rekrutiert PRC2 und andere Chromatin verändernde Faktoren und initiiert so die Inaktivierung vieler Gene und eine Kompaktierung des Chromatins, die anschließend durch DNA-Methylierung stabilisiert wird [68].

Auch für einige lncRNAs, die in Clustern elterlich genomisch geprägter Gene liegen, wurde eine Interaktion mit Polycomb-Proteinen beschrieben. So soll die lncRNA H19, wahrscheinlich über die Rekrutierung von Polycomb-Proteinen, andere geprägte Gene *in trans* reprimieren [69]. Weiterhin scheint die vom väterlichen Allel transkribierte lncRNA Kcnq1ot1 über einen ähnlichen Mechanismus wie XIST einige weiter entfernt lokalisierte, vom mütterlichen Allel transkribierte Gene zu inaktivieren. Die Inaktivierung dieser Gene hängt eng mit dem Auftreten von H3K9me_{2/3} und H3K27me_{2/3} Histonmodifikationen zusammen und es wurden Hinweise auf eine Rekrutierung des PRC2 und anderer Chromatin modifizierender Komplexe beschrieben [70, 71].

Für eine weitere lncRNA, ANRIL, wurde eine Interaktion mit CBX7, einer Komponente des PRC1, beschrieben [72]. Über diesen Mechanismus ist sie an der Inaktivierung des *CDKN2A*-Locus beteiligt, der wesentliche Proteine für die Einleitung der zellulären Seneszenz als Antwort auf zellulären Stress kodiert [73].

Eine weitere relativ gut untersuchte lncRNA ist *HOX antisense intergenic RNA* (HOTAIR), deren Gen im *HOXC*-Locus auf Chromosom 12q13.13 lokalisiert ist. Das Besondere an dieser lncRNA ist, dass für sie eine regulatorische Wirkung *in trans* auf die Expression von posterioren *HOXD*-Genen nachgewiesen werden konnte [48]. Die Repression der Genexpression kann über die Rekrutierung des PRC2-Komplexes (Trimethylierung von H3K27) und/oder des LSD1/CoREST/REST-Repressorkomplexes (Demethylierung H3K4)

vermittelt werden [74]. Auch eine aktivierende Wirkung von HOTAIR auf bestimmte Gene wurde beobachtet [75, 76]. Jedoch ist der verantwortliche Mechanismus unklar, da entsprechende Interaktionspartner bisher nicht identifiziert werden konnten.

HOTAIR ist in verschiedenen Tumorarten verstärkt exprimiert. Diese erhöhte Expression korreliert oft mit einer schlechten Prognose und fördert Progression und Metastasierung [75-80]. Dieser Zusammenhang wurde erstmalig von Gupta et al. 2010 in Nature [77] für das Mammakarzinom publiziert. Bei Tumoren des Urogenitaltrakts war HOTAIR zu Beginn meiner Dissertation nicht untersucht. Inzwischen wurde für das papilläre UC eine Überexpression von HOTAIR und deren Korrelation zur Rezidivbildung berichtet [81].

In vielen Tumorentitäten wird eine Korrelation zwischen hoher HOTAIR-Expression und gesteigerter Invasivität und Metastasierung beschrieben [77, 82, 83]. Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein biologischer Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre Zellpolarität und ihre Zell-Zell-Adhäsion vermindern, einen mesenchymaleren Phänotyp annehmen und damit ihr Migrations- und Invasions-Potenzial erhöhen [84]. Dieser Prozess ist ein wichtiger Bestandteil der Tumorinvasion und Metastasierung. HOTAIR fördert offenbar die EMT. So wurde nach siRNA-vermitteltem Knockdown von HOTAIR in Magenkarzinom-Zelllinien (AGS und SGC7901) eine mesenchymal-epitheliale Transition beobachtet [85]. Außerdem konnte ein durch TGF- β ausgelöste EMT in vier verschiedenen Zelllinien durch HOTAIR-Knockdown gestoppt werden [86].

Liu et al. fanden in der humanen Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 einen Zusammenhang zwischen der HOTAIR-Expression und der Sensitivität gegenüber Cisplatin. Eine Überexpression von HOTAIR mittels stabiler Transfektion verringerte die Cisplatin-Sensitivität; mittels siRNA-vermitteltem HOTAIR Knockdown konnte die Cisplatin-Resistenz wieder aufgehoben werden. Wahrscheinlich wird dieser Effekt über die Herunterregulierung von p21 durch HOTAIR bewirkt [87].

Aktuell steht im Blickpunkt der Forschung, welche Faktoren die HOTAIR-Expression beeinflussen und über welche anderen Mechanismen, abgesehen von der Rekrutierung von EZH2 und LSD1, HOTAIR die Expression von Genen beeinflussen kann.

Die Sequenz und Struktur von lncRNAs ist während der Evolution weniger konserviert als die von protein-kodierenden Genen [62, 88]. Die genomische Syntenie wird stärker als die Sequenz konserviert [88]. Wahrscheinlich entwickeln sich lncRNAs sehr schnell. Daher lassen sich in der Maus gefundene Funktionen von lncRNAs nicht hundertprozentig auf den Menschen übertragen; sie geben aber wichtige Hinweise über die möglichen Funktionen.

In einer ersten Analyse von Hotair in der Maus nach Deletion des Maus *HoxC*-Locus wurden nur wenige Veränderungen der *HoxD*-Expression oder des Chromatinstatus beschrieben. Dies führte zu der Interpretation, dass HOTAIR in der Maus und im Menschen verschiedene Funktionen ausübt [89]. Da bei dieser Studie jedoch nicht Hotair allein, sondern auch acht *HoxC*-Gene und weitere ncRNA-Gene deletiert waren, können Aussagen zur Funktion von Hotair nur begrenzt gemacht werden. Daher wurden in einer zweiten Arbeit die Auswirkungen eines selektiven Knockouts von Hotair untersucht [90]. Dieser Knockout resultierte in Expressionsveränderungen von über 100 Genen, davon wurden 80 % erhöht exprimiert. Unter diesen Genen waren die vorher beschriebenen Zielgene *Hoxd10*, *Hoxd11* und *Hoxd13*, während die zu Hotair benachbarten Gene *Hoxc10* und *Hoxc11* unverändert blieben. Diese Expressionsänderungen gingen mit einer genomweiten Veränderung der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 einher. Wie im Menschen konnte eine Interaktion von Hotair mit den Chromatin-modifizierenden Faktoren Ezh2, Suz12 und Lsd1 nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen Hotair und geprägten Genen beschrieben. In den Knockout-Mäusen war die Expression von über 30 geprägten Genen verändert, darunter die väterlich geprägten Gene *Dlk1*, *Igf2*, *Mest* und *Plagl1* und die mütterlich geprägten Gene *H19* und *Meg3*. Da DNA-Methylierung ein gut untersuchter Regulator von geprägten Genen ist, wurden am *Dlk1-Meg3*-Locus die auf den elterlichen Allelen unterschiedlich methylierte *intergenic differentially methylated region* (IG-DMR) untersucht. Dort wurden aber keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Im Menschen ist ein Zusammenhang zwischen HOTAIR und geprägten Genen noch nicht beschrieben.

3.4 Gene mit Imprinting

Elterlich genomisch geprägte Gene (*genomically imprinted genes*), im Folgenden nur kurz „geprägte Gene“ genannt, liegen häufig zu mehreren in Clustern vor. Bei diesen Genen sind beide elterlichen Allele (maternal und paternal) durch epigenetische Modifikationen wie z.B. DNA-Methylierung unterschiedlich markiert. Dadurch werden geprägte Gene nur von einem der elterlichen Gene exprimiert; das zweite Allel ist inaktiv. Solche Markierungen sind vor allem in speziellen CpG-reichen regulatorischen Elementen, bezeichnet als *imprinted control regions* (ICRs), zu finden [91, 92]. Viele Cluster enthalten eine lange nicht für Proteine kodierende RNA, die in der Vergangenheit eher als antisense-Transkript bezeichnet wurde und nun der Definition von lncRNAs entspricht [93]. Die Expression geprägter Gene ist streng reguliert. Dies ist besonders wichtig, da diese eher kleine Gruppe von Genen zentrale

Funktionen bei der Regulation von fötalen Wachstumsprozessen und des Gleichgewichts zwischen Pluripotenz und Differenzierung ausübt [94]. Inzwischen wurde für verschiedene Gene mit Imprinting (*PEG3*, *H19*, *DLK1*) nachgewiesen, dass sie eine wichtige Rolle bei der Erhaltung adulter Gewebestammzell-Populationen spielen, indem sie auch dort das Potenzial zur Selbsterneuerung und Differenzierung beeinflussen [95-97]. Entsprechend sind Störungen des Imprinting-Musters ursächlich für diverse Wachstumsdefekt-Syndrome und werden auch im Zusammenhang mit gestörter Differenzierung und Tumorentstehung untersucht [98].

Geprägte Gene werden vor allem über die DNA-Methylierung an differenziell methylierten Regionen (DMRs) reguliert.

Häufig werden geprägte Gene koordiniert exprimiert. In der Maus wurde ein *imprinted gene network* (IGN) identifiziert, das das embryonale Wachstum reguliert [99]. *Plagl1* scheint ein Masterregulator dieses Netzwerkes zu sein, denn ein Knockout verändert die Expression verschiedener Gene dieses Netzwerkes, wie *Igf2*, *H19*, *Cdkn1c* und *Dlk1*. Dieses Netzwerk war auch in Prostatakarzinomen detektierbar und dort insgesamt vermindert exprimiert [100].

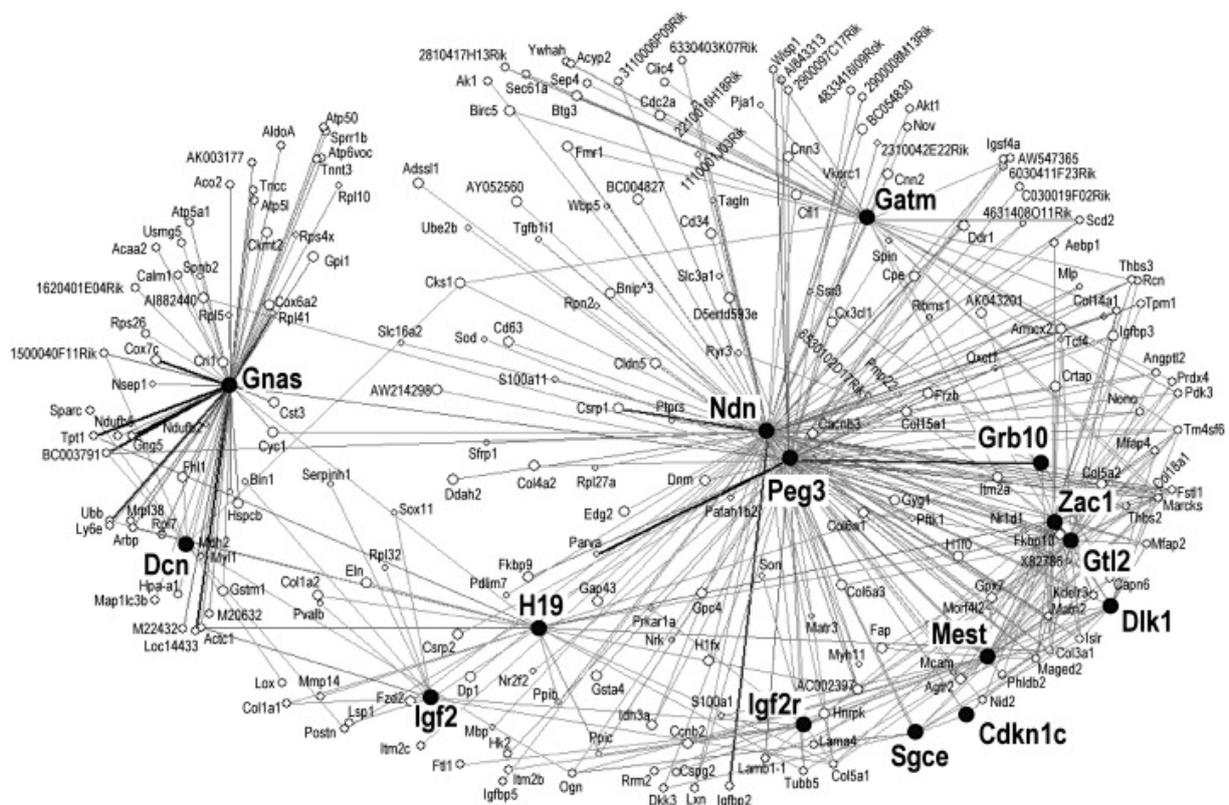


Abbildung 3.2: Netzwerk koregulierter geprägter Gene in der Maus, aus [99].

Im Harnblasenkarzinom sind geprägte Gene bisher nur wenig untersucht. Die meisten Studien betreffen das *IGF2/H19* Cluster [101-103] und wie die veränderte H19-Expression therapeutisch genutzt werden kann [104]. Außerdem wurden die Mechanismen der häufig verminderten Expression des Zellzyklusregulator-Gens *CDKN1C* identifiziert, an der auch eine Reexpression der lncRNA *LIT1/KCNQ1OT1* beteiligt war [105]. Für die geprägten Gene *DLK1* und *MEG3* konnte eine verminderte Expression im UC als Folge einer epigenetischen Inaktivierung nachgewiesen werden [106]. Die aberrante Expression von Genen mit Imprinting scheint also, wie bei anderen Tumorarten [107], auch im UC relevant zu sein.

3.5 Fragestellung

Bisher gibt es kaum publizierte Expressionsdaten für die HOX-Loci im UC. Daher stellte sich die Frage, wieweit eine Deregulation der HOX-Gene im UC stattfindet und ob diese mit einer Tumorprogression einhergeht.

Die im HOXC-Cluster kodierte lncRNA *HOTAIR* wurde in vielen Tumorarten erhöht vorgefunden und diese erhöhte Expression korrelierte oft mit einer schlechteren Prognose. Ob dies auch für das UC gilt, sollte untersucht werden.

Entsprechend war eine *HOTAIR*-Überexpression in vielen Untersuchungen auch mit einem aggressiveren Phänotyp der Tumorzellen assoziiert. Daher sollte untersucht werden, in welcher Weise eine Überexpression von *HOTAIR* im UC Einfluss auf Differenzierungsprozesse und den Phänotyp von UC-Zellen nimmt. Da *HOTAIR* HOX-Gene reguliert, war eine spezielle Fragestellung, welchen Einfluss eine veränderte *HOTAIR*-Expression auf die Expression von HOX-Genen hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden stabil *HOTAIR* überexprimierende Klone der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf Veränderungen von Proliferation, Klonogenität, verankerungsunabhängigem Wachstum, sowie der Invasions- und Migrationsfähigkeit untersucht.

Aus den Untersuchungen ergab sich die Vermutung, dass die Zielgene von *HOTAIR* stark gewebespezifisch sind, im Einklang mit der bekannten Beobachtung, wonach lncRNAs selbst häufig gewebespezifisch exprimiert sind und somit auch gewebespezifische Funktionen ausüben. Daher wurden, im Vergleich von eigenen und publizierten RNA-Expressionsarrays gewebespezifische und allgemeine Zielgene von *HOTAIR* gesucht. Bei dieser Untersuchung wurde ein Zusammenhang zwischen *HOTAIR* und geprägten Genen im UC gefunden und im weiteren Verlauf der Arbeit mechanistisch verfolgt.

Um herauszufinden, ob und wie HOTAIR Einfluss auf mehrere Gene des *Imprinted Gene Networks* (IGN) hat, wurde nach Modulation der HOTAIR-Expression die Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und H19 verfolgt.

Da beschrieben ist, dass HOTAIR über die Rekrutierung der Chromatinmodifizierer EZH2, SUZ12 und LSD1 die Methylierung an H3K27 und H3K4 und somit die Genexpression reguliert [74], stellte sich die Frage, ob HOTAIR im UC die Expression von Zielgenen über Veränderungen der Histonmodifikation reguliert. Daher wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) die Trimethylierung an potentiellen HOTAIR-Zielgenen quantifiziert.

Da geprägte Gene wesentlich mittels DNA-Methylierung reguliert werden, stellte sich die Frage, ob HOTAIR auch die DNA-Methylierung beeinflussen kann. Dazu wurde nach HOTAIR-Überexpression mittels Pyrosequenzierung der DNA-Methylierungsgrad an einzelnen CpG-Stellen in den regulatorischen Regionen von IGN-Genen untersucht. Um Einflüsse von HOTAIR auf das DNA-Methylierungsmuster genomweit zu untersuchen, wurde ein DNA-Methylierungsarray durchgeführt.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 UC-Gewebe

Zuvor war die HOTAIR-Expression in einem Düsseldorfer Probenstet (19 UC-Gewebe, 9 Gewebe aus tumorfreien Harnblasen, Ethikvotum 3836 April 2012) gemessen worden [108]. Auf Grund der geringen Probenanzahl wurde in dieser Arbeit auf ein größeres Probenstet zurückgegriffen. Diese Proben wurden von Dr. rer. nat. Tibor Szarvas und Dr. med. Christian Niedworok (Urologische Universitätsklinik Essen) zur Verfügung gestellt. Die Gewebe wurden in der urologischen Universitätsklinik Essen mit Einverständnis der Patienten gesammelt und aufbereitet. Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen gab ihre Zustimmung mit dem Ethikvotum Nr. 07-3537. Das Set enthält sieben Proben von normalen, tumorfreien Blasen und 108 UC-Proben. In der folgenden Tabelle sind die Bezeichnung der UC-Proben und die Patientencharakteristika aufgelistet.

Tabelle 4.1: Charakteristika der untersuchten UC-Gewebe.

Bezeich- -nung	Alter (Jah- re)	Sex	T	G	N	M	Rau- -cher	Überleben (Monate)	Tod	Karzinom bedingter Tod
T1	67	M	0	1	0		1	189	0	
T2	66	M	0	2	0		0	65	1	1
T3	67	W	0	2	-1		0	100	1	0
T4	69	M	0	2	0		0	9	1	0
T5	56	M	0	1	0		1	63	0	
T6	54	M	0	2	0		1	55	1	0
T7	54	M	0	2	0		1	54	1	0
T8	73	M	0	1	0		1	64	1	1
T9	52	M	0	1	0		1	114	1	0
T10	62	M	0	2	0		1	112	0	
T12	72	M	0	2	0		1	47	0	
T13	48	M	0	1	0		1	41	0	
T14	78	M	0	2	0		1	45	0	
T15	73	M	0	1	0		1	46	0	
T16	64	M	1	1	0		1	37	1	0

Bezeich- -nung	Alter (Jah- re)	Sex	T	G	N	M	Rau- cher	Überleben (Monate)	Tod	Karzinom bedingter Tod
T15	73	M	0	1	0		1	46	0	
T16	64	M	1	1	0		1	37	1	0
T17	65	M	1	2	0		1	166	0	
T18	87	M	1	2	0		0	17	1	1
T19	67	M	1	2	0		1	164	0	
T20	83	W	1	2	0		1	30	1	0
T21	44	W	1	3	0		1	93	1	0
T22	77	M	1	3	0		0	89	1	0
T23	65	M	1	3	-1		1	50	1	1
T24	62	M	1	3	1		0	7	1	1
T25	54	M	1	2	0		1	60	1	0
T26	62	M	1	2	0		1	4	1	0
T27	42	M	1	2	0		1	141	0	
T28	72	M	1	2	0		1	46	1	1
T29	43	M	2	2	0	0	1	16	1	1
T30	72	M	2	2	0	0	0	21	1	1
T31	67	M	2	3	0	0	1	93	1	0
T32	45	W	2	2	0	0	1	166	0	
T33	58	M	2	2	1	1	0	14	1	1
T34	83	W	2	2	-1	0	1	14	1	1
T35	74	M	2	3	0	0		5	1	1
T36	56	W	2	3	-1	0	1	25	1	0
T37	60	M	2	3	0	0	1	57	1	1
T38	61	M	2	3	-1	0		43	1	1
T39	77	M	2	2	-1	0		10	1	1
T40	76	M	2	3	1	1		15	1	1
T41	64	M	2	3	1	1		9	1	1
T42	59	M	2	2	-1	0		67	0	
T43	83	M	2	2	-1	0		1	1	0
T47	63	W	2	3	0	0		2	1	1

Bezeich- -nung	Alter (Jah- re)	Sex	T	G	N	M	Rau- cher	Überleben (Monate)	Tod	Karzinom bedingter Tod
T48	48	M	2	3	1	1		5	1	1
T49	70	W	3	3	0	0	0	186	0	
T50	74	M	3	3	1	1	1	12	1	1
T51	66	M	3	3	0	0	0	181	0	
T52	72	M	3	3	0	0	0	1	1	0
T53	59	M	3	3	1	1	1	1,1	1	1
T54	65	M	3	3	0	0	1	21	1	1
T55	70	M	3	3	0	1	0	0	1	1
T56	82	W	3	2	0	0	0	4	1	0
T57	75	M	3	3	1	1	1	3	1	1
T58	65	W	3	3	0	0	0	14	1	1
T59	65	M	3	2	0	0	1	198	1	0
T60	44	M	3	3	1	1	0	16	1	1
T62	63	W	3	3	1	1	0	42	1	1
T64	65	M	3	3	1	1	1	3	1	1
T65	64	W	3	3	0	0	1	24	1	1
T66	72	W	3	3	0	0	1	94	1	0
T67	84	W	3	3	0	0	1	21	1	1
T68	48	M	3	2	0	0	1	155	0	
T69	36	M	3	3	1	1	1	24	1	1
T70	63	M	3	3	1	1	0	5,1	1	1
T71	60	W	3	3	0	0	1	70	1	1
T72	47	W	3	3	1	1		3	1	1
T73	73	M	3	3	0	0	1	24	1	0
T74	46	M	3	3	-1	0	1	147	0	
T75	71	W	3	3	0	0	1	26	1	1
T76	63	M	3	3	1	1		0	1	1
T77	64	M	3	3	0	0	1	32	1	1
T78	48	M	3	3	0	0	1	128	0	
T79	76	M	3	3	0	0	1	55	1	0

Bezeich- -nung	Alter (Jah- re)	Sex	T	G	N	M	Rau- cher	Überleben (Monate)	Tod	Karzinom bedingter Tod
T80	59	M	3	3	0	0	1	17	1	1
T81	65	M	3	3	0	0	1	11	1	1
T82	58	M	3	2	0	0	1	1	1	0
T83	71	M	3	3	1	1	0	5	1	1
T84	63	M	3	3	0	0	1	3	1	1
T85	68	M	3	3	0	0	1	27	0	
T86	77	M	3	3	-1	0	0	1	1	1
T87	68	M	3	2	0	0	0	119	0	
T88	68	M	3	3	0	0	0	118	0	
T89	71	W	3	3	1	0	0	3	1	1
T90	73	W	3	3	-1	0	1	3	1	1
T91	87	W	3	3	-1	0	1	2	1	1
T92	61	M	3	2	0	0		69	0	
T93	66	M	3	3	1	1		6	1	1
T94	69	W	3	3	1	1		1	1	0
T95	85	M	4	3	-1	0	0	5	1	1
T97	60	M	4	2	1	1	0	5	1	1
T98	66	M	4	3	0	0	1	27	1	1
T99	72	M	4	2	1	1	0	171	0	
T100	59	M	4	3	1	1	1	16	1	1
T101	59	M	4	3	1	1	1	15	1	1
T102	74	W	4	3	1	1	0	12	1	1
T103	45	M	4	3	-1	0	0	46	1	1
T104	53	M	4	3	1	1		7	1	1
T105	63	W	4	3	-1	0	1	137	0	
T106	64	W	4	3	1	1	1	16	1	1
T107	67	W	4	3	1	1	1	1	1	1
T108	60	W	4	3	1	1	0	8	1	1
T109	71	W	4	3	0	0	1	2	1	1
T110	95	W	4	2	-1	0	0	6	1	1

Bezeichnung	Alter (Jahre)	Sex	T	G	N	M	Raucher	Überleben (Monate)	Tod	Karzinom bedingter Tod
T112	61	M	4	3	0	0		51	1	1
T113	58	M	4	3	-1	0		24	1	1
T114	78	M	4	3	1	1	1	9	1	1
T115	53	W	4	3	-1	0		1	1	1
T117	71	M	4	3	-1	0	1	5	1	1

M = männlich, W = weiblich

Das Tumorstadium ist nach dem TNM-System angegeben; G = *Grading* (1-3).

Beim Lymphknotenbefall (N) steht 1 für positiv, 0 für negativ und -1 für unbekannt. In den Kategorien Raucher, Tod und Karzinom bedingter Tod steht 1 für ja und 0 für nein.

4.1.2 Zelllinien

Die verwendeten Urothelkarzinom-Zelllinien wurden von Dr. J. Fogh (Sloan-Kettering Cancer Research Center, Rye, New York USA) und Prof. M.A. Knowles (ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds UK) zur Verfügung gestellt und im urologischen Forschungslabor der Uniklinik Düsseldorf kultiviert. Die verwendeten Ösophaguskarzinom-Zelllinien wurden von Prof. Dr. med. N. Stöcklein (Chirurgisches Forschungslabor, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie) und weitere Zelllinien von der DSMZ (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Urotheliale Primärzellen (UPs) wurden aus Harnleitern von Nephrektomien wie beschrieben gewonnen [109].

Tabelle 4.2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Patient/in Geschlecht, Alter [Jahre]	TNM/Grading	Referenz
Urothelkarzinom			
BFTC-905	F, 51	Ta, G3	Tzeng et al. 1996 [110]
RT-4	M, 63	T2, G1	Rigby et al. 1970 [111]
RT-112	F	G2	Masters et al. 1986 [112]
SW-1710	F, 84	G3	Kyriazis et al. 1984 [113]
J82	M, 58	TCC	O'Toole et al. 1978 [114]
253J	M, 53	T4, G4	Elliott et al. 1974 [115]
5637	M, 68	G2	Fogh 1978 [116]
639-V	M; 69	G3	Elliott et al. 1976 [117]
647-V	M, 69	G2	Elliott et al. 1976 [117]
HT-1376	F, 58	T2, G3	Rasheed et al. 1977 [118]
T24	F, 81	G3	Bubenik et al. 1973 [119]
UM-UC-3	M	TCC	Grossmann et al. 1986 [120]
UM-UC-6	M	TCC	Grossmann et al. 1986 [120]
VM-CUB1	M	TCC	Williams et al. 1980 [121]
SD			
Urothel normal (immortalisiert)			
TERT-NHUC			Chapman et al. 2006 [122]
Mammakarzinom			
T47D	F, 54	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Keydar et al. 1979 [123]
MCF7	F, 69	metastasiertes Mammakarzinom	Soule et al. 1973 [124]
SK-BR3	F, 43		Trempe 1976 [125]
Prostatakarzinom			
PC-3	M, 62	G4	Kaighn et al. 1979 [126]
22RV1	M		Sramkoski et al. 1999 [127]
DU-145	M, 69	Metastase eines Prostatakarzinoms	Mickey et al. 1980 [128]

Zelllinie	Patient/in Geschlecht, Alter [Jahre]	TNM/Grading	Referenz
LNCaP	M, 50	Lymphknotenmetastase	Horoszewicz et al. 1980 [129]
Prostata normal			
PNT2	M, 33	SV40-immortalisiert	
PrEC	M		Sobel et al. 2006 [130]
Ösophaguskarzinom			
KYSE-30	M, 64	Gut differenziert, invasiv, ESCC	Shimada et al. 1992 [131]
KYSE-270	M, 79	Gut differenziert, invasiv, ESCC	Shimada et al. 1992 [131]
KYSE-410	M, 51	Wenig differenziert, invasiv, ESCC	Shimada et al. 1992 [131]
KYSE-520	F, 58	Moderat differenziert, invasiv, ESCC	Shimada et al. 1992 [131]
COLO-680N	F, 57	ESCC	
LN1590		Lymphknotenmetastase	Hosch et al. 2000 [132]
PT1590		Primärtumor, Adenokarzinom	Hosch et al. 2000 [132]
OE19	M, 72	Adenokarzinom	Rockett et al. 1997 [133]
OE33	F, 73	Barrett-esophageal Adenokarzinom	Rockett et al. 1997 [133]
Teratokarzinom			
NCCIT	M		Teshima et al. 1988 [134]
Tera-1	M, 47		Fogh et al. 1978 [116]

ESCC: *esophageal squamous cell carcinoma*

4.1.3 Bakterienstämme

E.coli XL-1 Blue

Agilent (200130)

E.coli Stbl2

Addgene

4.1.4 Plasmide

pLZRS-RfA	Addgene (31601)
pLZRS-HOTAIR	Addgene (26110)
pcDNA4/TO_LACZ	Invitrogen
pcDNA4/TO_ZAC1_DS	ZAC1 Isoform 1 (ENST00000367571) ohne 5'-UTR, original ATG mutiert, aktives ATG an +24 bp vom originalen ATG [135]
pcDNA4/TO_ZAC1_Delta	ZAC Isoform 1 ohne 5'-UTR und größten Teil des ersten proteinkodierenden Exons [135]

4.1.5 Enzyme

HotStar Taq Polymerase	Qiagen
Fast Digest Restriktionsenzyme	Fermentas

4.1.6 Antikörper

Immunfluoreszenz

Vimentin	Abcam (#ab92547), 1:400
E-Cadherin	Cell Signaling (#24E10), 1:100
Alexa Fluor 488 anti-mouse oder -rabbit	Invitrogen

ChIP

H3K27me2/3	Active Motif (#39535)
H3K4me3	Active Motif (#39915)
Normal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology (sc2027)
Normal mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology (sc2025)

Western Blot

EZH2	Cell Signaling (#3147), 1:3000
SUZ12	Abcam (#ab175187), 1:2000
α -Tubulin	T-5168, Sigma-Aldrich, 1:50.000
Goat anti mouse IgG HRP	Santa Cruz (sc-2005)
Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz (sc-2004)

4.1.7 Kits und Assays

QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
ZR Plasmid Miniprep TM -classic	Zymo Research
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen
DNA Clean and Concentrator	Zymo Research
XtremeGENE 9 DNA Transfection Reagent	Roche
DharmaFECT®1	Dharmacon
ChIP-IT Express Kit	Active Motif
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
PyroMark PCR Kit	Qiagen
PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen
HotStarTaq [®] DNA polymerase 1000 units	Qiagen
EZ DNA Methylation-Gold Kit	Zymo Research
WesternBright Chemilumineszenz Substrat	Biozym
Quantum	
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific

4.1.8 Substanzen

PCR und Gelelektrophorese

Aqua ad injectabili	DeltaSelect
DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl)	Thermo Scientific
6x Ladepuffer	Thermo Scientific
dNTPs (10 mM)	Thermo Scientific
50x TAE Puffer	Eppendorf
Agarose	Sigma Aldrich

Medien

Luria Broth Base	Invitrogen
DMEM	GIBCO
DMEM high glucose	GIBCO

RPMI-1640	GIBCO
McCoy 5A	GIBCO
FCS	Biochrom AG
PBS	Biochrom AG
OPTIMEM	GIBCO
10x DMEM	Biochrom AG
Trypsin/EDTA	Life Technologies
L-Glutamin (100x)	GIBCO
Pyruvat (100x)	GIBCO
Vitamine (100x)	GIBCO

Antibiotika und Chemotherapeutika

Ampicillin	Sigma
Puromycin	Invitrogen
Cisplatin	TEVA
Penicillin/Streptomycin	GIBCO

Western Blot

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma
Lämmli Probenpuffer	Biorad
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
10x Tris/Glycin/SDS-Puffer	Biorad
Milchpulver, entfettet	Drogerie
Bovine Serum Albumin	Sigma
<i>High performance chemoluminescence film</i>	GE-Healthcare
<i>Amersham Hyperfilm ECL</i>	
Tertramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
RotiphoreseGel® 30	Roth
Tween®20	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma

H/E-Färbung

Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill	Merck
--	-------

III

Eosin Y-Solution 0,5 % wässrig	Merck
Methanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH
Ethanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH
2-Propanol AnalaR NORMAPUR	VWR International GmbH
Roti®-Histol	Roth
Eukitt	O. Kindler GmbH

Pyrosequenzierung

Streptavidin Sepharose <i>Beads</i>	Amersham
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen
PyroMark Binding Buffer	Qiagen

Sonstiges

Giemsa-Lösung	Merck
NaHCO ₃	GIBCO
Difco™ Agar noble	BD
Natriumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Triton X-100	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz	Merck
NP-40	Merck
DOC	Sigma
Salzsäure 25 %	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Collagen IV C5533	Sigma
Mounting Medium	Dako
Matrigel™ Matrix, phenolrotfrei	Becton Dickinson

4.1.9 Lösungen und Puffer

2x DMEM	10 ml FCS, 10 ml 10x DMEM, 1 ml 100x L-Glutamin, 5 ml 20x NaHCO ₃ (3,7 g in 50 ml H ₂ O), 1 ml Penicillin/Streptomycin, ad 50 ml H ₂ O; steril filtriert
Protein Lysis Puffer RIPA	3 ml 5 M NaCl, 1 ml NP-40, 0,5 g DOC, 1 ml 10 % SDS, 200 µl 0,5 M EDTA, 5 ml 1 M Tris (pH 7,6), ad 100 ml H ₂ O
Transfer Puffer 5x Stocklösung	34 g TRIS, 144 g Glycin, ad 2 l H ₂ O
Transfer Puffer 1x	200 ml 5x Transfer Puffer, 100 ml Methanol, ad 1 l H ₂ O
10 x TBS-Puffer	87,7 g NaCl [1,5 M], 12,11 g TRIS [100 mM], ad 1 l H ₂ O, pH 7,4
Milder Stripping Puffer	15 g Glycin, 1 ml SDS 10 %, 1 ml Tween 20, ad 100 ml H ₂ O, pH 2
RLN-Puffer	50 mM Tris-Cl pH 8, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 % (v/v) Nonidet P-40 (1,06 g/ml)

4.1.10 Oligonukleotide**qRT-PCR Primer 5'-3'**

Für TFPI2 und PON2 wurden QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen verwendet (Hs_TFPI2_1SG #QT00086149; Hs_PON2_1_SG #QT00095690).

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
TBP	WG F	ACAACAGCCTGCCACCTTA	59,3	120
	WG R	GAATAGGCTGTGGGGTCAGT	59	
HOTAIR	QRT fwd	GGTAGAAAAAGCAACCACGAAG C	63,4	170
	QRT rev	ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTG CC	63	
HOXA1	QRT fwd	GCTCACAGAACTTCAGTGCGC	63,6	231
	QRT rev	CAGTTCCGTGAGCTGCTTGG	64,4	
HOXA11	QRT fwd	CAGCAGAGGAGAAAGAGCGG	62,7	146
	QRT rev	TCGGATCTGGTACTTGGTATAGG	59,4	
HOXA13	QRT fwd	CTGGAACGGCCAAATGTACTG	62,7	142
	QRT rev	CTTGGTATAAGGCACGCGCTT	63,6	
HOXB2	QRT fwd	CGAGTTCCTTGGATGAAAGAG	62,3	130
	QRT rev	CGGCAGTCCCAGGCCAT	65,7	
HOXB13	QRT fwd	CTCCCTGTTGCCTGTGGACAG	65,4	154
	QRT rev	GGCGCAGGCGTCAGGAG	66,8	
HOXC6	QRT fwd	CAGGACCAGAAAGCCAGTATC	58,8	118
	QRT rev	TCTGGTACCGCGAGTAGATC	57,9	
HOXC11	QRT fwd2	CCCGGATGCTGAACCTGA	63,2	88
	QRT rev2	AGCCGGTCTCTGCTCAGT	58,6	
HOXC12	QRT fwd	CCGGCAGCTTGGTATCGC	65,1	85
	QRT rev	CGAGAGCGGCTGTTGATCG	65,5	
HOXC13	QRT fwd	TCAGCGGGCACCCGGAG	69,4	185
	QRT rev	CCGGTAGCTGCTCACCTCG	64,4	
HOXD3	QRT fwd	CAATGCTTCTAGCTCCTCAGCC	62,7	122
	QRT rev	TCTTGTCTCGCAGCTCTCTC	62,3	
HOXD9	QRT fwd	CCCAGGCTGTTGCTGAAG	64,4	96
	QRT rev	GCGTGGATCCAGTTCGCG	66,3	
HOXD10	QRT fwd	GAGCTGCCTGGCTGAGG	60,8	102
	QRT rev	GCAGTGAGCCAATTGCTGG	62,9	
HOXD11	QRT fwd	CAGAAGGCAGCGGTGGCG	68,8	116
	QRT rev	GTACTIONGGTATAGGGACAGCGC	60,0	

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
HOXD12	2 QRT fwd	AGCAGATTGCGGAGTTGG	59,9	102
	2 QRT rev	CTTGCTGGTCGCTGAGG	59,2	
HOXD13	QRT fwd	GACATGGTGTCCACTTTCGG	61,4	198
	QRT rev	GTAGACGCACATGTCCGGC	62,7	
E-Cadherin	QRT fwd	ACCAGAATAAAGACCAAGTGAC CA	61,1	172
	QRT rev	AGCAAGAGCAGCAGAATCAGAA T	61,9	
Vimentin	QRT fwd	AATGGCTCGTCACCTTCGTGAAT	66,2	160
	QRT rev	CAGATTAGTTTCCCTCAGGTTCA G	60,5	
ZEB1	QRT fwd	TCACATCAAATCAGGAAGAGATC	58,3	131
	QRT rev	CACTGTGAATTCTTAAGTGCTC	54,4	
GATA2	QRT fwd	GACCCTGTCTGCAACGCC	62,9	123
	QRT rev	GCTCTTCTTGGACTTGTTGGAC	60,3	
GATA3	QRT fwd	ATTAAGCCCAAGCGAAGGCTG	64,8	100
	QRT rev	CATTGGCATTCCCTCCTCCAGA	64,6	
GATA6	QRT fwd	CAGCAAGATGAACGGCCCAG	61,8	146
	QRT rev	TGCACACGGGTTACCCCTC	61	
PCDHB5	QRT fwd	AGGTGTGTTTGACCGGAGAC	60,0	99
	QRT rev	TCCCTATTTCTTCACCAGCGC	63,7	
LAMB3	QRT fwd	CAAGCCTGAGACCTACTGC	56,1	108
	QRT rev	GCCACATTCTCTACTCGGTG	58,3	
KRT5	QPCR fwd	GATGATCCAGAGGCTGAGAGC	61,4	130
	QPCR rev	CTCGGCCAGCTTGTTCCCTG	64,4	
KRT14	QRT fwd	GCGCACCATGCAGAACCTG	66,3	140
	QRT rev	CCTCCACGCTGCCAATCATC	66,2	
KRT13	QRT_F2	CACTCTGTCTAAGACTGACC	49,4	141
	QRT_R2	GTGGCATCCATCTCCACG	61,1	
P21 (CDKN1A)	fwd	GGAAGACCATGTGGACCTGT	59,8	146
	rev	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	60,1	

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
P57 (CDKN1C)	F3	GCGGCGATCAAGAAGCTG	63,2	81
	R3	CGACGACTTCTCAGGCGC	63,3	
P14 (CDKN2A)	QRT fwd	GTGGCCCTCGTGCTGATG	64,0	106
	QRT rev	CAGCAGCTCCGCCACTC	62,0	
P16 (CDKN2A)	Fwd	CAACGCACCGAATAGTTACG	59,3	177
	rev	AGCACCACCAGCGTGTC	59,3	
P15 (CDKN2B)	qPCR-F1	GCGGGGACTAGTGGAGAAGG	63,3	77
	qPCR-R1	GCCTCCCGAAACGGTTGA	64,5	
TP63	TA QPCR F1	AAACCCAGCTCATTTCTCTT	55,6	146
	TA QPCR R1	CAATGGGCTGAACTGAACATA	58,6	
	dN QPCR F1	CGCCATGCCTGTCTACAAAA	62,1	172
	dN QPCR R1	TCTTCCTGTGATGGGATCTTC	59,1	
KDM1A	QRT_F1	CCGTTTCAGTTTGTGCCACC	62,5	150
	QRT_R2	CAGTCGTACTIONGCAACATGC	60,3	
EZH2	F1	AATGTGTCCTGCAAGAACTG	56,3	115
	R1	CATTTTTCTGCACAGGATCTTT	58,4	
DNMT3A	QRT_F1	GAGGACTCCATCACGGTG	57,4	139
	QRT_F1	GGTCATTGCAGGGACTGC	60,2	
H19	F1	CACCAGCTGCCGAAGGCCAA	71,1	122
	R2	CCAGCCTAAGGTGTTTCAGGAAGG	65,4	
PLAGL1	F2	GGCATATGGCTACCCATTCTCCC CA	71,2	70
	R2	TTCGGTTGAACGTCTTCTCACA GT	67,3	
IGF2	F2	CAGTGAGACCCTGTGCGGCG	69,9	88
	R2	GCTTGCGGGCCTGCTGAAGT	69,3	
LIT1	F1	CCCTGCTGTGCCTTCAGCCC	69,8	168
	R1	CCAGGCTGCCTCACCCAACG	70,6	

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
SUZ12	QRT fwd	AGCAAGAGATGACCTGCATTGC	64,0	203
	QRT rev	CAGGTTGGCGATGAATATCCTG	63,8	
MEST	qPCR_F1	TCTGTGGGTGTGGTTGGAAG	62,0	157
	qPCR_R1	TCGGTTTGTCACTGAAGCCA	62,8	
GRB10	qPCR_F1	GTAGCCAAAGTCCCCTCCAC	60,9	150
	qPCR_R1	GGCTGTCACGGAGGAGAAAA	62,6	
PON2	qPCR_F2	TCAGCACTTTCATAGACAACGAA	60,2	156
		T		
PPP1R9A	qPCR_R2	TGGCATAGAAATGTGCCGGT	63,6	70
	F	AGAGGCGCCAGAGAGAGCTGC	68,0	
		ACAGTGTTCCTCGTCATCGTCGGC	70,4	
	R	A		

Der T_M und die Produktlänge wurden mit dem UCSC In-Silico PCR Tool ermittelt.

ChIP-Primer 5'-3'

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
HOXC11	ChIP_F1	AACCAATCGCCTGAACGTCC	64,5	174
	ChIP_R1	GTCTAGCGAGGGGGGAAAAT	61,6	
	ChIP_F2	CGTTCCAGGCGGGGGTCT	68,0	84
	ChIP_R2	GGGGCAGCGCCTTCCACA	70,3	
HOXC12	ChIP_F1	TGTCGGAGTGAGCAGCTAC	57,6	84
	ChIP_R1	GCGGCAGAGAGAAACGCA	63,8	
	ChIP_F2	AATGGGTGACTGGTGCAGATT	61,7	108
	ChIP_R2	CGGGATTCAGGAGATTATGC	59,5	
HOXD10	ChIP_F1	GGGCACTCTGGCTTCCCT	62,7	57
	ChIP_R1	CAGCTCTAGGGGCCTCCA	61,5	
	ChIP_F2	GAGCACGTGACCCGAGAG	60,6	81
	ChIP_R2	CCTCTGCCGACCACATGA	61,9	

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
HOXD13	ChIP_F1	AAACGTCCC GCGATGAGCTA	65,2	123
	ChIP_R1	CCTCCTCTCCTTTCTCTCTG	55,8	
	ChIP_F2	CAGCGTACCGGCCAACGA	66,6	148
	ChIP_R2	GGAGATGTAGGCCTCGTG	56,6	
HOXC6	ChIP_F1	CGATTGTGTTGTCCTGATGTC	59,0	165
	ChIP_R1	CCAGTTCCATTAGCCAAGAGA	59,3	
	ChIP_F2	TCCGAGTACAAACTGGAGACA	58,4	97
	ChIP_R2	AGGAAGGGTTAGTGAAGTAGG	54,3	
HOXA11	ChIP_F1	TCATGTGACCCGATGTTGA	59,4	152
	ChIP_R1	ACACCGAGTGACGATCTGT	56,5	
	ChIP_F2	GGGGTGGTGGTAGACGTT	58,2	99
	ChIP_R2	GAGGAGCTCGTGCACAGA	58,7	
HOXB2	ChIP_F1	GGCCTGGTGGAAAACAGA	59,6	91
	ChIP_R1	TAGGAATGGGGGCTCATG	59,4	
	ChIP_F2	GGTCGCAGATGTCCTCCA	60,8	83
	ChIP_R2	GAAGCACAAGCGGCAGAC	60,7	
CTCFL	Pro_F1	GAACAGCCCATGCTCTTGGAG	64,4	113
	Pro_R1	CAGAGCCCACAAGCCAAAGAC	64,4	
GAPDH	ChIP-FWD	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	62,3	166
	ChIP-REV	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGC GA	70,9	
TBP	ChIP_WGF1	GGAGTGGCAGA AACTGAAT	53,3	104
	ChIP_WGR1	GCAAGAACGCTAGCTGAT	54,2	
GRM6	ChIP_F	GAGAGGGACGCTGGACAC	59,3	85
	ChIP_R	CTCCGTCTCCATCATGGTC	59,0	
ZAC1	DMR ChIP F	TGGGGGCAAAGCCAAGGTCG	71,6	154
DMR	DMR ChIP R	GCGTCCCAGCATCTGTGCGG	71,9	

Gen	Bezeichnung	Sequenz	T_M [°C]	Produktlänge [bp]
H19	ChIP_F1	ATTCGCGGCCACTTTCCT	63,0	110
	ChIP_R1	GGCCTGGGAGAGTCTGTGA	61,4	
	ChIP_F2	CTCCTTGCTGCGCAATGTC	63,1	97
	ChIP_R2	GGGAAGACAGGCAGTGCTC	61,0	
IGF2	ChIP_F1	AACGCCAGTCCGTTGGA	65,0	151
	ChIP_R1	CTAGCGTTGCCCAAACAC	57,8	
KvDMR	ChIP F	TGATGCCACCCGGGCTCAGA	71,7	234
	ChIP R	GCTGTCCTCACGCGGTCACC	68,8	
CDKN1C (p57)	Prom ChIP F	GCTAGCTCGCTCGCTCAGGC	67,2	179
	Prom ChIP R	CGCCAATCGCCGTGGTGTTG	72,1	
GRB10	ChIP_F1	CAACGTTTCGGTGAAAGCA	60,8	165
	ChIP_R1	AACTCTTCGCCTTTGCTGAT	59,1	
	ChIP_F2	GCCCGGCTGCAATACTCA	63,3	119
	ChIP_R2	CGCGTCACATGGGTTTGG	64,6	
MEST	ChIP_F1	CGGTTCTCCGAAACATGG	60,0	181
	ChIP_R1	GCACTTACCTGCCCCTAG	55,9	
	ChIP_F2	TCTGGGCCCTTGCATTGT	62,6	184
	ChIP_R2	GCGGGGCAGGTTTCCTTT	64,6	
PPP1R9A (Neurabin)	ChIP_F1	GCTTTTCGCCCTTCCTTG	60,9	134
	ChIP_R1	AAGGCCGGGGTAACAGGT	61,7	
PON2	ChIP_F1	GTCCCACCTACCTGAGTG	53,5	165
	ChIP_R1	ACCATCGAGCCGGGAAGA	64,1	

Der T_M und die Produktlänge wurden mit dem UCSC In-Silico PCR Tool ermittelt.

Pyrosequenzierung 5'-3'

Gen	Name	Sequenz
PLAGL1 (ZAC1)	Primer F	GAGGAGGGTGTGTTTTTGT
	Primer R	BIO-GTAATTTAGGTAGTTTTAT
	Primer S	AATCTATAAACCTCATAACCAAATAAAC
	Sequence analyse to	CGCGAGTGCCGCCGGACCCCCTGGACGCCGCT
H19	Primer F	GGT ATT TTT GGA GGT TTT TTT TTA GGT TTT ATA GTT TGG ATG GTA
	Primer R	BIO-CCA CCT AAA AAT CTA ATA CCA CTC CCA TAA ATA TCC TAT TCC
	Primer S	GTA GGT TTA TAT ATT ATA GTT TGA GT
	Sequence analyse to	CCGCCCAACTGGGGTTCGCCCGTGGAAACGTCC CGGGTCACCCAAGCCACGCGTCGCAGGGTTCACG GGGGTCATCTG
KvDMR	Primer F	TTA GTT TTT TGY GTG ATG TGT TTA TTA
	Primer R	BIO-CCC ACA AAC CTC CAC ACC
	Primer S	TTG YGT GAT GTG TTT ATT A
	Sequence analyse to	cccCGgggtgacCGCGtgaggacagCGgcCGcaccCGacactgtgtg ggccctCG
7q21 DMR2	Assay	Hs_SGCE_02_PM PyroMark CpG Assay PM00030205
	Sequence analyse to	aCGtgatctttaaaaaaaaaCGtctctacCGcatactcaccaCGCGa

F = forward, R = reverse, S = sequencing

siRNAs 5'-3'

HOTAIR siRNA1 [77]	GAACGGGAGUACAGAGAG
HOTAIR siRNA2 [79]	UUUUCUACCAGGUGGGUAC
Unspezifische Kontrolle	5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUG-3'

LNA-GapmeRs von Exiqon 5'-3'

HOTAIR	GCTTCTAAATCCGT
HOTAIR FAM	GCTTCTAATCCGTT/36-FAM/
Negative control A	AACACGTCTATACGC

4.1.11 Verbrauchsmaterialien**Zellkultur**

Pasteurpipetten	Brand
Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner bio-one
Zellkulturschalen (10 cm, 6 cm)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-, 24-, 12-, 6-Well)	Greiner bio-one
Cryotube	Thermo-Scientific
Cell Scraper	Sarstedt
Culture-Inserts	ibidi
ThinCerts™ TC Einsätze 24-Well,	Greiner
Porengröße 8 µm	
Combitips advanced (0,5 ml-10 ml)	Greiner
Graduated Tip	Starlab

Western Blot

Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
<i>Whatman Paper</i>	Whatman

qRT-PCR

MicroAmp®Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp™ optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Light Cycler Capillaries	Roche

Sonstiges

Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Safe-Lock Tubes (0,5 ml-2 ml)	Eppendorf

Objektträger	Engelbrecht
Cover Glass	VWR
Micro-touch NitraTex [®]	Ansell
Semper care [®]	SATRA

4.1.12 Geräte

PCR

T3 Thermocycler	Biometra
Trio-Thermoblock [™]	Biometra
ABI Prism 7900HT	Applied Biosystems
ABI Prism7500 fast	Applied Biosystems
Lightcycler	Roche
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS
Elektrophoresekammern	Biometra, Biorad

Western Blot

Gelelektrophoresekammer	Biometra
Tube Roller	Benchmark
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa

Schüttler

KS250basic	IKA-Labortechnik
Thermomixer 5436	Eppendorf

Zentrifugen

5415D	Eppendorf
5415C	Eppendorf
Minispin	Eppendorf
5810	Eppendorf
Allegra [™] 2IR	Beckmann Coulter
Allegra [™] 25IR	Beckmann Coulter
Avanti [™] 30	Beckmann Coulter

Mikroskope

Eclipse TE2000-S	Nikon
------------------	-------

Eclipse E400	Nikon
Brutschränke	
CO ₂ -AUTO-ZERO	Heraeus
Heracell™ 150i	Thermo Scientific
Ultraschallgerät	
HTU SONI 130	Heraeus
Pyrosequenzierung	
PyroMark Q24 vacuum Workstation	Qiagen
PyroMark Q24 pyrosequencer	Biotage
Absorptionsmessung	
ELISA Easy Reader EAR 400 AT	SLT-Labinstruments Austria
FluoStar Optima	bmG
Nanodrop	peQlab (Thermo Scientific)
Sonstiges	
Vortexer	Neolab
Pipetus®	Hirschmann
Multipette® stream	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf; Gilson
Heizschrank	Heraeus
Inkubator shaker innova 4200	New Brunswick Scientific

4.2 Methoden

4.2.1 Präparation von Plasmiden

Die Präparation von Plasmiden begann mit der Transformation des Plasmides in *E. coli* XL1-Blue Bakterienzellen nach Herstellerangaben. Die transformierten Bakterien wurden in einer 10 cm-Kulturschale auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikazusatz (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden einzelne Zellklone für eine Übernacht-Kultur in Medium überführt. Nach maximal 16-18 h Inkubation wurde aus 2 ml Bakterienkultur mit dem ZymoResearch Plasmid MiniprepTM-classic Kit die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung der DNA am Nanodrop wurde ein Kontrollrestriktionsverdau nach Herstellerangaben mit Fast Digest Enzymen der Firma Fermentas durchgeführt und durch Elektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Anhand des Ergebnisses dieses Kontrollverdaus wurde der Klon für die endgültige Plasmidpräparation ausgewählt. Mit dem Rest der Minikultur wurde eine Maxikultur (200 ml LB-Medium) angeimpft. Nach maximal 16-18 h Inkubation wurde aus dieser die Plasmid-DNA mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Mittels Nanodrop wurde die Konzentration der in Wasser aufgenommenen Plasmid-DNA ermittelt und diese bei -20 °C gelagert.

4.2.2 Kultivierung von humanen Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Urothelkarzinom-Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (*fetal calf serum*) kultiviert. Für Prostatakarzinom-, Teratokarzinom- und Ösophaguskarzinom-Zelllinien wurde RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Medium mit 10 % FCS verwendet. Die Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF7 wurden in DMEM (Gibco #41966) mit 1x Glutamin, 1x Vitamin, 1x Pyruvat und 10 % FCS und die Zelllinie SK-BR3 in McCoy 5A mit 10 % FCS kultiviert. Die Zellen wuchsen adhärent in 25 cm²-Kulturflaschen in 5 ml oder in 75 cm²-Kulturflaschen in 10 ml Medium bis zu einer Konfluenz von 90 % und wurden alle 2-4 Tage umgesetzt. Dazu wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst und im Verhältnis 1:3-1:20 in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt.

Zur dauerhaften Lagerung der Zellen wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen in einem 15 ml Greiner-Röhrchen 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein 1 ml Kryoröhrchen überführt. Durch die Lagerung für 24 h bei -20 °C und anschließend 24 h bei

-70 °C wurden die Zellen langsam eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zur Inkulturnahme der eingefrorenen Zellen wurden diese kurz bei 37 °C inkubiert, bis sie aufgetaut waren. Danach wurden sie in 10 ml erwärmtem Medium für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenkontamination mittels PCR überprüft. Der Zellkulturüberstand wurde dazu 5 min bei 95 °C inkubiert und 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für eine qualitative PCR verwendet (Tab. 4.3), in der im Falle einer Kontamination die hoch konservierte Region der 16s rRNA im Mykoplasmen-Genom als 500 bp Fragment amplifiziert wird. Als interne Positivkontrolle diente das Plasmid pMyco-GEM-T [136], dass auf dem Agarosegel durch eine Bande bei 1000 bp detektiert wurde.

Tabelle 4.3: Bedingungen der Mykoplasmen-PCR.

Mastermix 50 µl		PCR-Programm		
H ₂ O	39,3 µl	Dauer	Temperatur [°C]	Zyklen
10x PCR-Puffer	5 µl	15'	95	
5'Primer-Mix	1 µl	30''	94	34
3'Primer-Mix	1 µl	45''	65	
dNTP (je 10mM)	0,5 µl	1'	72	
Interne Kontrolle	1 µl	10'	72	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	∞	4	
Zellkulturüberstand	2 µl			

' = Minuten, '' = Sekunden

Tabelle 4.4: Sequenz (5'-3') der Mykoplasmen-PCR-Primer.

5'Primer-Mix (Endkonzentration je 5 pmol)	
Primer 1	CRC CTG AGT AGT ATG CTC GC
Primer 2	TGC CGT RGT AGT ACA TTC GC
Primer 3	CGC CTG AGT AGT ACG TWC GC
Primer 4	CGC CTG GGT AGT ACA TTC GC
3' Primer-Mix	
Primer 1	GCG GTG TGT ACA ARA CCC GA
Primer 2	GCG GTG TGT ACA AAC CCC GA

4.2.3 MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests kann die relative Anzahl lebender Zellen durch den Nachweis der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt werden. Diese setzen das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) in das dunkelblaue Formazan um. Dieses wurde durch DMSO-vermittelte Zelllyse freigesetzt und photometrisch mittels ELISA-Lesegerät (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 620 nm) oder FLUOstar Optima (Testwellenlänge 550 nm, Referenzwellenlänge 750 nm) detektiert. Die Zellen wurden mit 10 % (v/v) 5 mg/ml MTT-Lösung je Well für 1 h bei 37 °C inkubiert, der Überstand abgegossen und 50 µl DMSO je Well zugegeben.

Zur Erstellung von Proliferationskurven wurde eine definierte Anzahl von Zellen (5637 5.000 Zellen/96-Well, T24 1.000 Zellen/96-Well, VM-CUB1 2.000 Zellen/96-Well) in 96-Wells in Vierfachbestimmung je Untersuchungstag ausgesät. Vier Tage lang wurde zur selben Zeit ein MTT-Test durchgeführt. Zur Auswertung wurde zuerst von den Messwerten der Leerwert (nur Medium) subtrahiert. Dann wurde aus den Messwerten des ersten Tages der Mittelwert gebildet und auf diesen alle Messwerte normiert.

Auch die Cisplatin-Sensitivität wurde mittels MTT-Test untersucht. Es wurden Zellen (5637 6.000 Zellen/96-Well, T24 und VM-CUB1 3.000 Zellen/96-Well) in Vierfachbestimmung in 96-Wells ausgesät. Nachdem sich die Zellen über Nacht abgesetzt hatten, wurden sie mit Cisplatin (5637 + VM-CUB1 4 µM und 6 µM, T24 2 µM und 4 µM) für 48 h behandelt und dann die Anzahl lebender Zellen mittels MTT bestimmt. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der unbehandelten Zellen auf 100 % gesetzt und die restlichen Werte auf diesen normiert.

4.2.4 Limited Dilution Assay

Mit dem *Limited Dilution Assay* wurde die Fähigkeit aus Einzelzellen Kolonien bilden zu können studiert. Dafür wurde eine bestimmte Anzahl Zellen (5637 3.000 Zellen, T24 und VM-CUB1 1.000 Zellen) in 10 cm Kulturschalen in Triplikaten ausgesät. Sobald die Kolonien mit bloßem Auge gut erkennbar waren (5637 2-3 Wochen, T24 und VM-CUB1 1-2 Wochen), wurden sie mit Giemsa-Lösung angefärbt. Dafür wurden die Schalen zuerst mit PBS und mit einem Gemisch aus PBS/Methanol (1:1) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol für 10 min fixiert und dann 5 min mit Giemsa-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Schalen 30 min mit Wasser entfärbt.

4.2.5 Soft-Agar Colony Formation Assay

Die Fähigkeit von Zellen zum verankerungsunabhängigen Wachstum wurde mittels *Soft-Agar Colony Formation Assay* untersucht. Frisch angesetztes 2x DMEM und eine zuvor hergestellte und autoklavierte 1,2 %ige Agar-Lösung (1,2 g Noble Agar + 100 ml H₂O, autoklaviert) wurden im Wasserbad auf 40 °C erwärmt. Beide Komponenten wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und mit je 1,5 ml ein 6-Well beschichtet (*Bottom Layer*, 0,6 % Agar). Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurde eine zweite, die Zellen enthaltene Schicht (*Top Layer*, 0,4 % Agar) aufgetragen. Diese bestand aus je einem Drittel 2x DMEM, 1,2 %igem Agar und Zellen. Wiederum wurden die 6-Wells mit 1,5 ml dieser Mischung beschichtet. Von der UC-Zelllinie 5637 wurden 50.000 und von den UC-Zelllinien T24 und VM-CUB1 10.000 Zellen ausgesät. Während einer mehrwöchigen Inkubation (5637 > 6 Wochen, T24 2-3 Wochen, VM-CUB1 3-4 Wochen) im Brutschrank wurde ein Austrocknen durch tropfenweise Zugabe von Medium verhindert und das Wachstum von Kolonien mittels Aufnahme von Fotos (NIS-elements D4, Nikon) unter dem Mikroskop (Nikon eclipse TE2000-S) dokumentiert.

4.2.6 Scratch Assay

Mit dem *Scratch Assay* wurde die Migrationsfähigkeit von Zellen untersucht. In ein 12-Well wurde ein Platzhalter (*Culture Insert* der Firma ibidi) gelegt. Dann wurden in die dafür vorgesehenen Kammern Zellen konfluent ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurden die Platzhalter entfernt und die Wells mit Medium gefüllt. Das Schließen des entstandenen ca. 500 µm breiten Spaltes wurde über 9 h in 3 h Abständen über Fotos verfolgt und die Spaltbreite mittels Fotodokumentations-Software (NIS-elements D, Nikon) ausgemessen. Der Versuch erfolgte in Quadruplikaten. Zur Auswertung wurde der Mittelwert des Zeitpunktes Null auf 100 % gesetzt und die restlichen Werte auf diesen normiert.

4.2.7 Boyden Chamber Assay

Mit Hilfe der *Boyden Chamber* wurde das Invasions- und Migrationsverhalten von Zellen untersucht. Dabei wird die Fähigkeit von Zellen beobachtet, durch Poren von einer Seite einer Membran auf die andere zu wandern. Bevor die Zellen in ThinCerts™ mit einer Porengröße von 8 µm der Firma Greiner Bio-one gesetzt wurden, wurden sie 24 h in einem Hungermedium mit nur 0,5 % FCS kultiviert. 50.000 Zellen wurden jeweils in OPTIMEM in ein Transwell ausgesät und das 24-Well wurde mit DMEM mit 20 % FCS gefüllt. Für die Untersuchung der Migration wurden die Transwells mit Collagen (1:20 in 0,1 % Essigsäure)

beschichtet. Nach einer definierten Inkubationszeit wurden die migrierten Zellen (T24 9-8 h, VM-CUB1 und 5637 12-13 h) mittels H/E-Färbung sichtbar gemacht. Im Unterschied wurden zur Untersuchung der Invasion die Transwells mit 25 µl Matrigel (1:37 verdünnt, 216-270 µg/ml) beschichtet und eine längere Inkubationszeit (T24 und VM-CUB1 24 h, 5637 36 h) verwendet. Für die H/E-Färbung wurden die nicht gewanderten Zellen in den Transwells mit Hilfe eines Q-Tips entfernt und die Zellen, die auf die andere Seite der Membran gewandert waren, durch 10 min Inkubation mit kaltem Methanol fixiert. Dann wurden sie für 5 min mit Hämatoxylin behandelt, 5 min durch Waschen der Membran in Wasser „gebläut“ und mit Eosin 7 min inkubiert. Es wurde einmal kurz in H₂O gespült und anschließend folgten mehrere Waschschrte mit aufsteigender Ethanolkonzentration (2x 70 %, 2x 80 %, 2x 100 %). Zum Schluss wurden die Membranen ausgeschnitten, in Xylol getaucht und mit Eindeckmittel (Eukitt) und einem Deckglas eingedeckelt. Es wurden jeweils fünf Gesichtsfelder je Membran in 40x Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden für die Migration die Zellen in den Poren und für die Invasion die Zellen, die sich auf die Unterseite der Membran gesetzt hatten, gezählt. Zur Dokumentation wurden Fotos der Membranen in 10x und 40x Vergrößerung angefertigt (Nikon Eclipse E400, Software NIS-Elements D3.2).

4.2.8 DNA-Transfektion

Für Transfektionen wurden je nach Zelllinie 100.000 – 250.000 Zellen je 6-Well ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit dem *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* der Firma Roche nach Herstellerangaben transfiziert. Es wurde jeweils 1 µg Plasmid und 3 µl Transfektionsreagenz je Well verwendet. Bei einer transienten Transfektion wurden die Zellen nach 24-72 h geerntet.

Um Langzeit-Effekte untersuchen zu können wurde eine stabile Transfektion durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion in 10 cm Schalen oder 25 cm² Kulturflaschen umgesetzt und zur Selektion mit einem Antibiotikum behandelt. Im Falle des HOTAIR-Plasmids war ein Resistenzgen im Plasmid enthalten, durch das die Zellen, bei denen das Plasmid zufällig stabil in das Genom integriert wurde, eine Resistenz gegenüber Puromycin erwerben (5637 0,1 µg/ml, T24 1 µg/ml, VM-CUB1 4 µg/ml). Nach 1-2 Wochen konnte ein *Pool* von HOTAIR stabil überexprimierenden Zellen generiert werden. Zur Untersuchung von Einzelklonen wurden die Zellen vor der Puromycin-Behandlung als Einzelzellen ausgesät. Nach Bildung von Kolonien konnten diese einzeln abgelöst und so Einzelklone expandiert werden.

Die stabile Überexpression wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. Positive Klone oder *Pools* wurden näher untersucht.

4.2.9 siRNA-Transfektion

Eine Herunterregulation von Zielgenen wurde durch den Einsatz von künstlichen *small interfering RNAs* (siRNA) durchgeführt.

Zuerst wurden Zelllinien-abhängig 100.000-250.000 Zellen in 6-Wells ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit dem Lipofektamin RNAiMAX Transfektionsreagenz der Firma Invitrogen behandelt. Es wurden 10 nM siRNA mit 3 µl Transfektionsreagenz eingesetzt. Nach 24-72 h Inkubation wurden die Zellen weiterverarbeitet.

4.2.10 LNA-Transfektion

Eine andere Technik zur Herunterregulation von Zielgenen nutzt LNA-GapmeRs (LNA) der Firma EXIQON. Diese Transfektion wurde mit dem DharmaFectA Transfektionsreagenz der Firma Dharmacon nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden jeweils 50 nM LNA mit 5 µl Reagenz transfiziert. Die Zellen wurden analog zur siRNA-Transfektion ausgesät und weiterverarbeitet.

4.2.11 RNA-Präparation

Die Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Die Zellyse erfolgte mit β-Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer und darauf folgender Auftragung auf eine QIAshredder-Säule. Die isolierte RNA wurde mittels Nanodrop quantifiziert und bei -70 °C gelagert.

4.2.11.1 *Fraktionierte RNA-Präparation*

Das Ziel der fraktionierten RNA-Präparation ist die Trennung der RNA-Fractionen des Cytoplasmas und des Nukleus.

Nach Transfektion der Zellen in 6-Wells wurden jeweils zwei 6-Wells vereint. Die RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des RNeasy Mini Handbook 06/2001 der Firma Qiagen. Die Zellpellets wurden zuerst mit RLN-Puffer 5 min auf Eis inkubiert, so dass die Zellmembran aufbrach. Nach einer Zentrifugation (2 min, 4 °C, 300 g) wurde die Cytoplasma-Fraktion im Überstand mit RLT/β-Mercaptoethanol-Puffer und Ethanol gemischt und auf eine RNeasy-Säule gegeben. Das Zellkern-Pellet wurde zweimal mit RLN-Puffer

gewaschen. Dann wurden die Zellkerne mit RLT/ β -Mercaptoethanol-Puffer lysiert und über eine QIAshredder-Säule homogenisiert. Das Eluat wurde mit Ethanol gemischt und auch auf eine RNeasy-Säule gegeben. Anschließend wurde nach Herstellerangaben weitergearbeitet.

4.2.12 Reverse Transkriptase PCR

Mit Hilfe der reversen Transkriptase kann RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde nach Herstellerangaben mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde, wie im Handbuch für längere RNAs empfohlen, auf 30 min erweitert. Wenn möglich wurden 1 μ g RNA umgeschrieben. Die cDNA wurden bei -20 °C gelagert und in einer 1:10 Verdünnung in der qRT-PCR eingesetzt.

4.2.13 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Expression auf RNA-Ebene erfolgte über eine qRT-PCR an den Geräten ABI7900HT, ABI7500 fast (Applied Biosystems) und Lightcycler (Roche). Die Zusammensetzung der Ansätze für die Messungen an den einzelnen Geräten ist in Tabelle 4.5 und die verwendeten PCR-Programme in Tabelle 4.6 aufgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurde am Ende jedes Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 4.5: Übersicht über die Zusammensetzung der qRT-PCR Reaktionsansätze [μ l].

Komponente	ABI7900HT 25 μl Ansatz	ABI7500 fast 20 μl Ansatz	Lightcycler 10 μl Ansatz
H ₂ O	10,5	8	3
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix	12,5	10	5
5' Primer (10 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5
3' Primer (10 pmol/ μ l)	0,5	0,5	0,5
cDNA (1:5 oder 1:10)	1	1	1

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der an den drei qRT-PCR-Geräten verwendeten qRT-PCR-Programme.

ABI7900HT			ABI7500 fast			Lightcycler		
Dauer	Temp. °C	Zyklen	Dauer	Temp. °C	Zyklen	Dauer	Temp. °C	Zyklen
15'	95	1	15'	95	1	15'	95	1
15''	94	45	20''	94	40	15''	94	40-50
30''	x		20''	x		20''	x	
30''	72		30''	72		Y	71	
15''	95	1	15''	95	1	0	95	1
15''	x-5		1'	x-5		20''	x-5	
15''	95		30''	95		0	95	

' = Minuten, '' = Sekunden

x= Die Anlagerungstemperatur ist für jedes Primerpaar individuell, sie liegt meisten 5 °C unter dem T_M-Wert (vgl. Tabelle 4.7).

Y= Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Produktes (Elongationszeit in Sekunden = Produktlänge [bp]/25 + 2).

Die Etablierung von PCRs mit neu entworfenen Primern wurde am Lightcycler durchgeführt. Die Primer wurden so entworfen, dass sie in zwei aufeinander folgenden Exonen lokalisiert waren und ein PCR-Produkt von ca. 100 bp bildeten. Dafür wurde mit einer kleinen Anzahl von Proben, für die möglichst in der Literatur eine Expression des Zielgens beschrieben wurde, ein Probelauf gestartet. Dabei wurde die Anlagerungstemperatur der Primer 5°C unter dem von der Firma Eurofins MWG Operon angegebenen T_M festgelegt. Die Bildung eines spezifischen Produktes wurde anhand der Schmelzkurve beobachtet und über ein 2 % Agarosegel verifiziert. Bei komplizierten Sequenzen wurde das PCR-Produkt über eine Sequenzierung validiert. Anschließend wurde die Effizienz der qRT-PCR anhand einer Eichkurve bestimmt. Dabei wurden Triplikate von drei Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) einer Probe mit starker Expression gemessen. Die ermittelten C_t-Werte wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten relativen Menge (*Quantity*) aufgetragen. Dabei wurden fiktive Mengen verwendet, z.B. 1:10 = 100, 1:100 = 10, 1:1000 = 1. Ineffiziente PCRs wurden über die Erhöhung der Anlagerungstemperatur verbessert. Die so optimierten Anlagerungstemperaturen der in dieser Arbeit verwendeten qRT-PCR Primerpaare sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: Übersicht der verwendeten Anlagerungstemperaturen der qRT-PCRs.

Gen	Anlagerungs- temp. [°C]	Gen	Anlagerungs- temp. [°C]	Gen	Anlagerungs- temp. [°C]
TBP	55	CDH1 (E-Cadherin)	60	KDM1A (LSD1)	55
HOTAIR	59	Vimentin	60	EZH2	53
HOXA1	60	ZEB1	55	DNMT3A	55
HOXA11	59	GATA2	59	H19	62
HOXA13	59	GATA3	55	PLAGL1	60
HOXB2	59	GATA6	55	IGF2	62
HOXB13	61	PCDHB5	59	LIT1	62
HOXC6	57	LAMB3	59	SUZ12	55
HOXC11	55	KRT5	59	MEST	55
HOXC12	57	KRT14	59	GRB10	55
HOXC13	61	KRT13	55	PON2	55
HOXD3	59	P21 (CDKN1A)	55	PPP1R9A	62
HOXD9	59	P57 (CDKN1C)	60		
HOXD10	59	P14 (CDKN2A)	60		
HOXD11	64	P16 (CDKN2A)	55		
HOXD12	56	P15 (CDKN2B)	60		
HOXD13	57	TP63	55		
		TP63 dN	55		

Die Expression von Zielgenen wurde in Duplikaten in 96-Well Platten der Firma Applied Biosystems gemessen. Bei jeder Messung wurde eine Standardreihegerade mit drei Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) mitgeführt. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *TATA-box binding protein (TBP)* in jeder Probe gemessen. Zur Auswertung wurde der Quotient aus den quantitativen Werten von Zielgen und *TBP*-Gen gebildet.

Die cDNA-Proben wurden 1:10 oder bei gering exprimierten Genen 1:5 verdünnt eingesetzt. Die Messungen wurden bei einer Abweichung der C_T -Werte der Duplikate von mehr als 0,5 wiederholt.

4.2.14 mRNA Microarray

Die Microarray-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf erstellt.

Dazu wurden je drei unabhängige RNA-Präparationen von VM-CUB1_LV_6, VM-CUB1_HOTAIR_20, 5637_LV_2 und 5637_HOTAIR_4 verwendet. Die Qualität der RNA wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) bestimmt. Für die Microarray-Analyse wurden RNA-Präparationen mit einer *RNA integrity number* (RIN) von über 9 eingesetzt. Die cDNA-Synthese und die Biotin-Markierung (*labelling*) wurde nach Herstellerangaben mit dem 3' IVT Express Kit der Firma Affymetrix durchgeführt. Nach der Fragmentierung der markierten aRNA wurde diese auf einen Affymetrix *PrimeView™ Human Gene Expression Microarray* für 16 h bei 45 °C hybridisiert, dann mittels Streptavidin/Phycoerythrin angefärbt und wie vom Hersteller beschrieben gemessen.

Die Datenanalyse der Affymetrix CEL Dateien erfolgte mit der GeneSpring GX Software Version 12.5 der Firma Agilent Technologies [137]. Die Daten sind in der GEO-Datenbank unter der Zugangsnummer GSE57672 online verfügbar. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den Triplikaten der Leervektor transfizierten und HOTAIR transfizierten Zellklonen innerhalb der Zelllinien. Die berücksichtigten Sonden mussten in allen drei Proben einer Bedingung über dem Hintergrund exprimiert vorliegen, um in den Vergleich eingeschlossen zu werden. Zur statistischen Untersuchung der differentiell exprimierten Gene wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt. Die resultierenden p-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg adjustiert und der signifikante Schwellenwert (*threshold*) wurde auf $p(\text{corr}) = 0,01$ gesetzt.

4.2.14.1 *Vergleich der Microarray-Daten mit publizierten Datensätzen*

Die Affymetrix PrimeView CEL Daten, öffentlich zugänglich in der GEO-Datenbank unter der Zugangsnummer GSE47638 [75], wurden mit dem Programm GeneSpring GX verarbeitet. Dabei wurden die Sonden berücksichtigt, deren Expression über dem Hintergrund mindestens einer Bedingung lagen (Kontrolle oder HOTAIR-Modulation). Es schloss sich ein paarweiser Vergleich an. Sonden, mit wenigstens zweifacher Veränderung wurden als differentiell exprimiert gewertet (GSM1153921 vs. GSM1153920, also KYSE-180 Zellen nach HOTAIR-Transfektion im Vergleich zur Kontrolle). Diese Daten wurden mit den eigenen Daten verglichen, auch dabei wurde eine zweifache Veränderung der Expression vorausgesetzt.

Außerdem wurden eigene Daten mit den öffentlich zugänglichen CHIP Daten nach HOTAIR Transfektion von MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen verglichen [77]. Eine Liste von 674

Genen, die eine erhöhte Trimethylierung an H3K27 in Promotorregionen nach HOTAIR Überexpression zeigten, wurde mit 784 Genen, die sowohl in der UC-Zelllinie VM-CUB1 als auch in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR Überexpression vermindert exprimiert waren ($p \leq 0,01$), mittels Excel verglichen.

4.2.15 Protein-Präparation

Aus subkonfluenten Zellkulturen wurden Totalproteinlysate extrahiert. Dazu wurden die Zellen mit RIPA-Puffer und frisch zugesetztem Protease- sowie Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (1:100) 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Lysat mit einem Zellschaber homogenisiert und bei 15.000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -70 °C gelagert.

4.2.16 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der gewonnenen Zelllysate wurde mittels Pierce BCA Protein Assay der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben bestimmt und am FLUOstar Optima gemessen.

4.2.17 Western Blot Analysen

Es wurden 20 µg Proteinlysate in einem Endvolumen von 20 µl (maximal 25 µl) in Laemmli-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Lysate 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Dann wurden die Lysate auf vorbereitete Polyacrylamidgele (10-12 %) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120-180 V. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese in Transfer-Puffer auf eine Immobilon P polyvinylidene fluoride Membran (Milipore) transferiert. Diese wurde vorher in Methanol aktiviert. Der Transfer erfolgte bei 180 mA für 90 min. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit einer Lösung aus 5 % Milchpulverlösung in TBS-T blockiert. Über Nacht wurde die Membran mit dem Erstantikörper bei 4 °C in der Blockierlösung inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal bei Raumtemperatur mit TBST-Lösung für 10 min gewaschen. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (1:5.000) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1 % Milch in TBS-T inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran zur Detektion mit WesternBright Chemolumineszenz Substrat Quantum (Biozym Scientific) nach Herstellerangaben inkubiert und die Chemolumineszenz auf photosensitiven Filmen (Amersham Biosciences) in der Dunkelkammer detektiert.

4.2.18 Immunfluoreszenz

Zuerst wurden 200.000 Zellen in 6-Well auf Deckgläschen ausgesät. Nach 24-48 h Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 4 % Formaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. An dieser Stelle bestand die Möglichkeit die fixierten Zellen für mehrere Wochen in PBS bei 4 °C zu lagern. Nach jeder Inkubation wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Für die Vimentin-Färbung wurden die Zellen 30 min mit 0,1 % Saponin in PBS permeabilisiert. Die Permeabilisierung für die E-Cadherin-Färbung erfolgte durch eine Inkubation für 10 min bei -20 °C in eiskaltem Methanol. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 min mit 1 % BSA und 0,2 % Tween-20 in PBS (Vimentin) oder 1 h mit 5 % Goat Serum und 0,1 % Triton-X 100 in PBS (E-Cadherin) blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in 1 % BSA in PBS inkubiert (Vimentin 1:400, E-Cadherin 1:100). Die Inkubation mit dem Zweitantikörper Alexa Fluor 488 anti Rabbit (1:500) erfolgte abgedunkelt für 1 h bei Raumtemperatur in 1 % BSA in PBS. Weiterhin wurde die DNA mit einer 1:1000 verdünnten DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)-Lösung (0,5 mg/ml) 2 min bei Raumtemperatur angefärbt. Die Deckgläser wurden auf einem Objektträger eingedeckelt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die Färbung wurde am Nikon Eclipse E400 (Software NIS-Elements D3.2) dokumentiert

4.2.19 Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP)

Die ChIP wurde nach Herstellerangaben mit dem ChIP-IT™ Express Kit der Firma Active Motif durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurden die Zellen in mehreren 75 cm² Kulturflaschen subkonfluent kultiviert und mit Trypsin abgelöst. Die Fixierung fand in 15 ml Greiner-Röhrchen statt. Nach der Homogenisierung der Zellpellets mit einem Handhomogenisierer vom klassischen DOUNCE-Typ auf Eis wurde dieses unter den Bedingungen 7 Zyklen à 20 s bei einer Amplitude von 25 % und 30 s Pausen sonifiziert. Das gewonnene Chromatin wurde bei -70 °C gelagert. Zur Bestimmung der Effizienz der Sonifizierung und der DNA-Konzentration wurde aus 50 µl der Chromatinlösung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion die DNA isoliert. Die DNA-Konzentration wurde am Nanodrop gemessen. Außerdem wurden unterschiedliche Mengen der aufgereinigten DNA auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Erfolgreich gescherte DNA zeigt einen Schmier zwischen 200-1.000 bp.

Bei der eigentlichen Immunopräzipitation wurden jeweils 20 µg Chromatin eingesetzt. Als Kontrolle wurde jeweils eine *INPUT*-DNA mitgeführt. Diese enthielt auch 20 µg Chromatin und wurde nicht mit Antikörpern inkubiert. Generell wurde die Präzipitation mit je 3 µg Antikörper über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Als Negativkontrollen und zur Beurteilung von unspezifischen Bindungen wurde eine Präzipitation mit Isotypkontrollen mitgeführt.

Über eine qRT-PCR wurde die relative Menge von präzipitierten Sequenzen ermittelt. Dabei wurde in Doppelbestimmung jeweils 2 µl Präzipitat eingesetzt. Als Standard diente die *INPUT*-DNA. Die primerspezifischen Anlagerungstemperaturen können der Tabelle 4.8 entnommen werden. Zur Überprüfung einer erfolgreichen H3K4me3 Präzipitation wurde das in UC-Zellen transkriptionell aktive Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (*GAPDH*) gemessen. Für eine erfolgreiche H3K27me2/3 Präzipitation wurde das in UC-Zellen transkriptionell inaktive Gen *glutamate receptor, metabotropic 6 (GRM6)* detektiert.

Tabelle 4.8: Übersicht der verwendeten Anlagerungstemperaturen der qRT-PCR nach Chromatinpräzipitation.

Gen	Anlagerungstemp. [°C]	Gen	Anlagerungstemp. [°C]
HOXC11_1	55	TBP	56
HOXC12_1	57	GRM6	60
HOXC12_2	53	ZAC1 DMR	60
HOXD10_1	57	H19_1	55
HOXD10_2	55	H19_2	55
HOXD13_1	55	IGF2_1	55
HOXD13_2	55	KvDMR	60
HOXC6_1	53	CDKN1C (p57)	60
HOXC6_2	53	GRB10_1	53
HOXA11_1	53	GRB10_2	53
HOXA11_2	55	MEST_1	53
HOXB2_1	53	MEST_2	53
HOXB2_2	55	PPP1R9A	53
CTCF	60	PON2	53
GAPDH	60		

4.2.20 DNA-Präparation

Die Zellen wurden in 25 cm Kulturflaschen bis zu 90 % Konfluenz kultiviert und anschließend die DNA nach dem Standardprotokoll für kultivierte Zellen mit dem QIAamp[®]DNA Mini Kit der Firma Qiagen isoliert. Die Konzentration wurde am Nanodrop gemessen und die isolierte DNA bei 4 °C gelagert.

4.2.21 Bisulfit-Umwandlung von DNA

Nach Herstellerangaben wurden 500 ng DNA mit dem EZ DNA Methylation-Gold Kit der Firma Zymo Research mit Bisulfit behandelt. Die umgewandelte DNA wurde in 25 µl eluiert und bei -20 °C gelagert. Dabei wurden nicht methylierte Cytidine in Uracil umgewandelt.

4.2.22 Pyrosequenzierung

Die zu untersuchende Sequenz wurde zuerst über eine Block-PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Dafür wurde 1 µl der Bisulfit-umgewandelten DNA eingesetzt. Der 7q21 DMR2 Assay wurde nach Herstellerangaben mit dem PyroMark-PCR Kit amplifiziert. Für die anderen Assays erfolgte die PCR nach dem Pipettierschema der Tabelle 4.9 und dem PCR-Programm mit den verwendeten primerspezifischen Anlagerungstemperaturen der Tabelle 4.10. Die erfolgreiche Amplifikation wurde über ein 2 % Agarosegel verifiziert.

Tabelle 4.9: PCR zur Amplifizierung der Sequenz für die Pyrosequenzierung ($\Sigma = 50 \mu\text{l}$).

Komponente	Ansatz [μl]
H ₂ O	38,6
10x PCR-Puffer	5
dNTPs (10mM)	1
Primer fwd 1:10 (10 pmol/ μl)	2
Primer rev 1:10 (10 pmol/ μl)	2
Taq-Polymerase (Qiagen 5U/ μl)	0,2

Tabelle 4.10: Programm und Anlagerungstemperaturen der PCR zur Amplifizierung der Sequenz für die Pyrosequenzierung.

Dauer	Temperatur [°C]	Zyklen	Assay	x = Anlagerungstemp. [°C]
15 [‘]	95	1	PLAGL1 [138]	50
15 [“]	94	45	H19 [139]	56
20 [“]	x		KvDMR [140]	60
20 [“]	72			
5 [‘]	72	1		

[‘] = Minuten, [“] = Sekunden

Das Programm für die Pyrosequenzierung wurde mit der Software PyroMark Q24 1.0.10 erstellt. Die Proben wurden an der *PyroMark Q24 vacuum Workstation* vorbereitet. Je 20 µl der PCR wurden mit 40 µl *Binding Buffer*, 2 µl *Streptavidin Beads* und 18 µl Millipore H₂O gemischt. Die Lösung wurde 10 min schüttelnd inkubiert. In der Sequenzierungsplatte wurden 25 µl Sequenzierungsprimermix (25 µl *Annealing Buffer* mit 0,3 µM Primer) vorgelegt und die mit der amplifizierten Sequenz beladenen *Beads* überführt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 80 °C und anschließenden Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Pyrosequenzierung am PyroMark Q24 durchgeführt. Die Kartusche wurde dafür mit der vom Programm vorgegebene Menge an Substrat-, Enzym- und Nukleotidlösung befüllt.

4.2.23 DNA-Methylierungs-Array

Über die Firma NXT-DX (Gent, Belgien) wurde im Austrian Institute of Technology eine genomweite Analyse der DNA-Methylierung mit dem „450K“ Infinium-DNA-Methylierungsarray durchgeführt. Diese Methode erfasst etwa 2 % der CpG-Stellen im Genom.

Hierfür wurden für jede Probe drei unabhängige DNA-Präparationen durchgeführt. Es wurden DNAs von VM-CUB1_LV6, VM-CUB1_HOTAIR_20, 5637_LV_2 und 5637_HOTAIR_4 analysiert. Die Qualität und Quantität der isolierten DNA wurde über einen *PicoGreen Assay* im GTL-Labor des BMFZ verifiziert. Je 500 ng DNA wurden nach Herstellerangaben auf einen *Illumina Infinium HumanMethylation459 BeadChip* untersucht, dieser betrachtet 485.577 CpG-Stellen. Die Ergebnisse wurden nach dem *Illumina Infinium Assay for Methylation Manual Protokoll Version 11322371* analysiert. Der *BeadChip* misst den Grad der DNA-Methylierung im Vergleich zu einer methylierten und unmethylierten Probe. Es

werden sogenannte β -values erhalten, die zwischen 0 (keine Methylierung) und 1 (vollständige Methylierung) liegen. Diese wurden normalisiert und für die statistische Auswertung verwendet.

Als Qualitätskontrolle für die DNA wurde eine Bisulfit-Umwandlung der DNA mit dem EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) nach dem Illumina Deaminierungsprotokoll durchgeführt. Ein *Assay* für die methylierte Region von DNAJC15 und zwei *Assays* am GNAS-Locus dienten als Qualitätskontrolle und DNA aus Blut als Positivkontrolle. Die Proben bestanden die Qualitätskontrolle, wenn der erreichte C_t -Wert eines der beiden Gene um nicht mehr als 5 von der Kontrolle abwich.

Für die Berechnung des p-Wertes wurde die Intensität des Signals der Sonde mit der Intensität des Hintergrundsignals verglichen. Für die Analyse wurden nur Sonden herangezogen, bei denen ein Unterschied zum Hintergrundsignal mit einer Signifikanz von $p < 10^{-5}$ bestand; dies waren 485.151 CpG-Stellen.

Die statistische Auswertung wurde für verschiedene Vergleiche ausgeführt. Zum einen wurde jeweils innerhalb jeder UC-Zelllinie der HOTAIR-überexprimierende Klon mit dem LV-Klon verglichen. Zum anderen wurden Zelllinien-übergreifend beide HOTAIR-überexprimierenden Klone mit den beiden LV-Klonen verglichen. Die Signifikanz wurde über einen Student's T-Test mit anschließender Korrektur für multiples Testen nach Benjamini-Hochberg berechnet. Der Schwellenwert wurde auf $p(\text{adj}) < 0,05$ festgelegt. Diese Werte wurden als Excel-Tabelle zur Verfügung gestellt.

Außerdem konnten mit dem H2G2 Genome Browser die Daten graphisch dargestellt werden.

4.2.24 In silico Analysen öffentlicher Datensätze

Für die *in silico* Analyse von öffentlichen Datensätzen zu Genexpressionsveränderungen im Urothelkarzinom standen drei Datensätze online zur Verfügung: Set 1 GSE13507 [141] , Set 2 GSE3167 [142] und Set 3 E-TABM-147 [143]. Diese drei Datensätze wurden ausgewählt, weil sie auch Proben von normalen, tumorfreien Harnblasen enthielten. Außerdem wurden für die Erstellung eines HOX-Expressionsprofils der normalen Harnblase Daten des Datensatzes GSE2361 [144] ausgewertet.

Die in der GEO DataSets Datenbank verfügbaren Daten wurden als *Series Matrix Files* in Form einer Text-Datei heruntergeladen und anschließend in Excel importiert. Set 3 ist in der *ArrayExpress Archive of Functional Genomics* Datenbank verfügbar und wurde als Text-Datei heruntergeladen und in Excel importiert.

Für die Zuordnung von Gennamen zu den Sonden konnten entsprechende *Platform*-Dateien heruntergeladen und in Excel importiert werden.

Anhand der so generierten Excel-Dateien wurden die Daten zu den HOX-Genen extrahiert und in SPSS weiterverarbeitet. So wurde die Expression im normalen Gewebe mit dem im Tumorgewebe verglichen und die Signifikanz mittels Mann-Whitney-U berechnet ($p < 0,05$). Auch wurden zur graphischen Veranschaulichung Boxplots erstellt. Enthielt die *Platform* mehr als eine Sonde pro Gen, wurde dieses Gen als signifikant differentiell verändert expremiert gewertet, wenn eine der Sonden signifikant verändert war. Diese Veränderungen wurden zur vereinfachten Darstellung in eine *Heatmap* übersetzt.

5 Ergebnisse

5.1 HOX-Genexpressionsmuster im Urothel

5.1.1 HOX-Genexpressionsmuster im normalen Urothel

Die Erstellung eines HOX-Genexpressionsmusters des normalen Urothels wurde durch eine *in silico*-Analyse eines öffentlich zugänglichen Datensatzes von Ge et al. (GSE2361) [144] bewerkstelligt (Abb. 5.1). Dieser Datensatz basiert auf der Expressionsanalyse von gepoolten RNAs normaler Gewebeproben. Zur Vermeidung individueller Effekte wurden RNA-Proben aus 36 Gewebetypen von zwei bis 84 Spendern gepoolt und auf einen Affymetrix Human Genome U133A Array [HG-U133A] gemessen.

Um die Stärke der Expression der HOX-Gene einschätzen zu können, wurden die gewöhnlich stark exprimierte Haushaltsgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), *Succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA)* und *TATA box binding protein (TBP)* mit aufgetragen (Abb. 5.1). Die relative Expression von *TBP* liegt bei 66. Da üblicherweise *TBP* als Referenzgen für mRNA-Messungen im UC verwendet wird, werden in der folgenden Analyse alle Gene mit einer relativen Expression größer 50 als stark exprimiert gewertet.

Demnach wurden im HOXA-Cluster die Gene *HOXA5*, *A10* und *A11* deutlich exprimiert. Das HOXB-Cluster schien am aktivsten zu sein, besonders stark exprimiert wurden *HOXB1*, *B2*, *B5* und *B7*. Im HOXC-Cluster waren die Gene *HOXC6*, *C10* und *C11* exprimiert. Das HOXD-Cluster ist mit Ausnahme von *HOXD1* nur wenig exprimiert. Die Gene *HOXA13*, *HOXB4*, *HOXC9*, *HOXC12* und *HOXD8* sind nicht im Array repräsentiert.

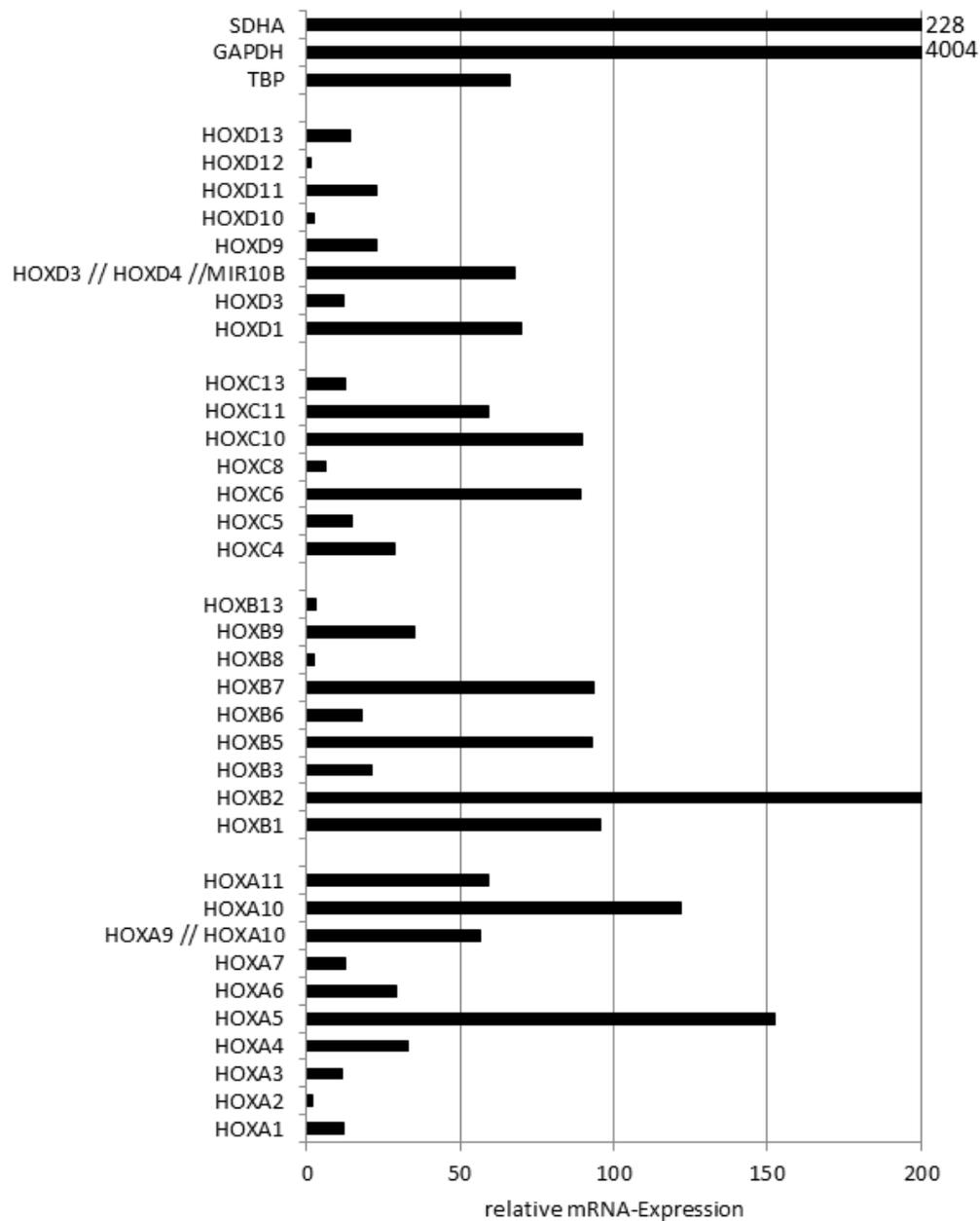


Abbildung 5.1: HOX-Genexpressionsprofil im normalen Urothel.

Das HOX-Expressionsprofil wurde aus dem Datensatz GSE2361 erstellt. Aufgetragen ist die relative RNA-Expression. Beim Vorliegen von mehr als einer Sonde je Gen wurden die Expressionsdaten gemittelt. Die HOX-Gene *HOXA13*, *B4*, *C9*, *C12* und *D8* waren nicht im Datensatz vorhanden. Als Referenzen für stark exprimierte Gene wurden die Haushaltsgene *SDHA*, *GAPDH* und *TBP* einbezogen.

5.1.2 HOX-Genexpressionsmuster im Urothelkarzinom

Um abzuschätzen in wie weit aberrante Differenzierung während der Progression des UCs durch eine aberrante Expression von HOX-Genen verursacht werden könnte, wurden HOX-Genexpressionsprofile auf Grundlage der Daten von drei unabhängigen Microarrays von UCs mittels *in silico*-Analysen erstellt (GSE13507 [141], GSE3167 [142] und E-TABM-147 [143]). Eine Zusammenfassung der Daten war wegen der Verwendung unterschiedlicher Plattformen nicht möglich. Die drei Sets unterscheiden sich sowohl in der Gesamtprobenanzahl als auch in der Verteilung einzelner Tumorstadien (Tabelle 5.1). Als Kontrollen dienten jeweils Proben aus tumorfreien Harnblasen. Im ersten Set wurden überwiegend Gewebe aus Tumoren früherer Stadien untersucht. Im Gegensatz dazu bestand das dritte Set vor allem aus Geweben weiter fortgeschrittener Tumore.

Tabelle 5.1: Probenzusammensetzung der UC-Datensätze, die zur Bestimmung des HOX-Genexpressionsprofils im UC ausgewertet wurden.

Set 1 (GSE13507)		Set 2 (GSE3167)		Set 3 (E-TABM-147)	
GEO <i>Illumina human-6 v2.0 expression beadchip</i>		GEO Affymetrix [HG-U133A]		ArrayExpress Affymetrix [HG U95Av2] + [HG U95A]	
	Anzahl		Anzahl		Anzahl
Kontrolle	10	Kontrolle	9	Kontrolle	10
UC	164	UC	41	UC	93
pTa	23	nicht muskelinvasiv	28	pTa	24
pT1	80	muskelinvasiv	13	pT1	13
pT2	31			pT2	11
pT3	19			pT3	24
pT4	11			pT4	21

Um festzustellen, ob generell in UC-Geweben eine Veränderung des HOX-Expressionsprofils vorlag, wurden zunächst die jeweiligen Kontrollen aus tumorfreien Harnblasen mit den jeweiligen UC-Geweben aller Stadien verglichen. In allen drei Studien war eine Veränderung der Expression von HOX-Genen in den Tumorproben zu beobachten (Abb. 5.2). Überwiegend kam es zu einer Verringerung der Expression. Allerdings waren nur sehr wenige Veränderungen in allen drei Datensätzen konsistent. Eine Ausnahme bildete *HOXA2*, dessen

Expression sich einheitlich in allen drei Datensätzen verringerte. Einige Veränderungen traten in zwei der drei Sets auf, wie die verringerte Expression von *HOXA4*, *HOXA11*, *HOXB13* und *HOXC5* und eine erhöhte Expression von *HOXB7*. Jedoch waren auch Veränderungen in unterschiedlicher Richtung zu beobachten, z. B. von *HOXB6*, *HOXB9*, *HOXC13*, *HOXD1* und *HOXD9*.

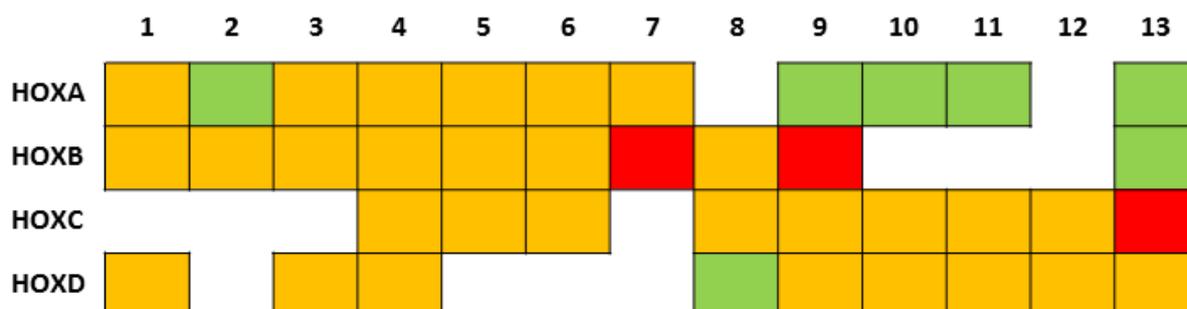
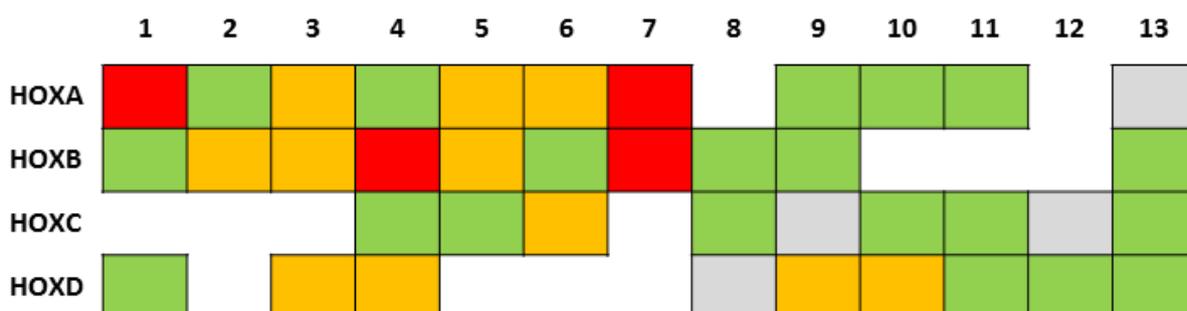
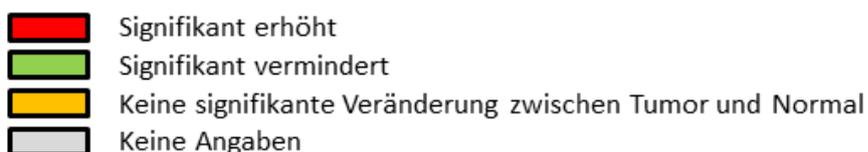
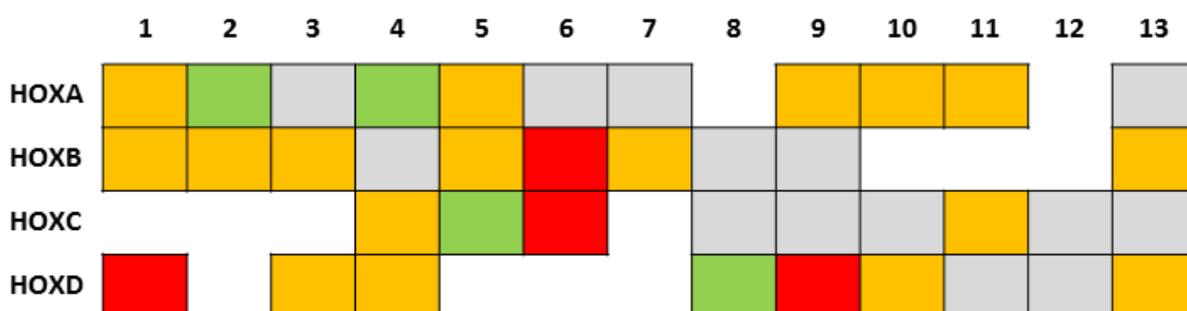
GSE13507**GSE3167****E-TABM-147**

Abbildung 5.2: HOX-Genexpressionsprofil im UC auf Grundlage der Ergebnisse dreier unabhängiger Expressionsstudien.

Der Vergleich zwischen tumorfreiem Gewebe und UC-Proben wurde für die drei Sets einzeln durchgeführt. Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Rot = signifikant erhöhte Expression. Grün = signifikant verminderte Expression. Gelb = keine signifikanten Veränderungen der Expression. Grau = Expressionsdaten zu diesem Gen waren nicht vorhanden.

Um einen Zusammenhang zwischen Tumorprogression und HOX-Genen zu untersuchen, wurden die HOX-Genexpressionsprofile der einzelnen Tumorstadien im Vergleich zu den tumorfreien Proben für die drei Datensätze erstellt.

Allgemein lässt sich sagen, dass Unterschiede im HOX-Expressionsmuster zwischen den einzelnen Tumorstadien existieren. Allerdings sind auch diese zwischen den einzelnen Probeserien wenig konsistent.

Als erstes wurde der Datensatz von Lee et al. analysiert (Abb. 5.3), der besonders viele T1-Tumor-Proben enthielt. Darin konnte eine deutliche Aktivierung der mittleren HOXB-Gene (*HOXB4-9*) in den frühen Stadien (Ta, T1) beobachtet werden. Von diesen blieb in den höheren Stadien nur *HOXB9* erhöht exprimiert. Weiterhin trat eine verminderte Expression der posterioren *HOXD*-Gene *D8*, *D10*, *D11* und *D13* und der *HOXA*-Gene *A11* und *A13* im T1-Stadium auf. In allen Stadien wurden die beiden *HOXA*-Gene *A9* und *A10* vermindert exprimiert. Generell war eine Veränderung der in der urothelialen Embryonalentwicklung wichtigen posterioren Loci 11 und 13 in den fortgeschrittenen Tumoren (ab T1) zu beobachten. Nur in T2-T4 Tumoren traten eine erhöhte Genexpression von *HOXC9* und eine Verminderung von *HOXD1* auf.

Im Datensatz von Dyrskjot et al. war lediglich eine Einteilung der Tumore zwischen nicht muskelinvasiv (< T2) und muskelinvasiv (≥ T2) möglich. Generell wurde in diesem Set eine Inaktivierung zahlreicher HOX-Gene gemessen, insbesondere der posterior gelegenen (Abb. 5.4). In den nicht muskelinvasiven Tumoren wurden nur vier HOX-Gene (*A1*, *A7*, *B5* und *B7*) erhöht exprimiert. Die erhöhte Expression von *HOXA1* zeigten die muskelinvasiven Tumore nicht mehr. *HOXB5* wurde in den muskelinvasiven Tumoren sogar vermindert exprimiert.

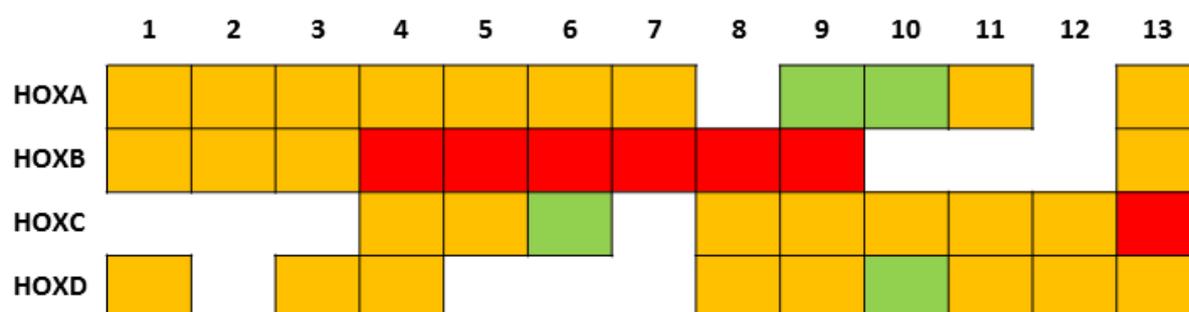
Auch im Datensatz von Stransky et al. zeigten die Tumorstadien unterschiedliche HOX-Genexpressionsprofile (Abb. 5.5). Im Ta-Stadium wurden vier HOX-Gene (*A4*, *C5*, *D8* und *D10*) vermindert exprimiert und vier HOX-Gene (*B6*, *C6*, *D1* und *D9*) verstärkt exprimiert. Im T1-Stadium wurden die HOX-Gene *A4*, *C5* und *C6* wieder normal exprimiert. Die fortgeschrittenen Tumore zeigten eine zusätzliche Expressionsverminderung von *HOXA2* und *HOXA10*. Die erhöhte Expression von *HOXC6* und die verminderte Expression von *HOXA4* traten wieder auf. *HOXD10* wurde wieder normal exprimiert.

Diese Auswertungen zeigten, dass eine aberrante HOX-Expression mit der Entstehung eines UC einhergeht. Besonders die Aktivierung der mittleren HOXB-Gene scheint mit der Entstehung von UCs zusammenzuhängen. In weiter fortgeschrittenen Tumoren scheint die Inaktivierung von posterioren HOX-Genen eine wichtige Rolle zu spielen. Auch wurde die

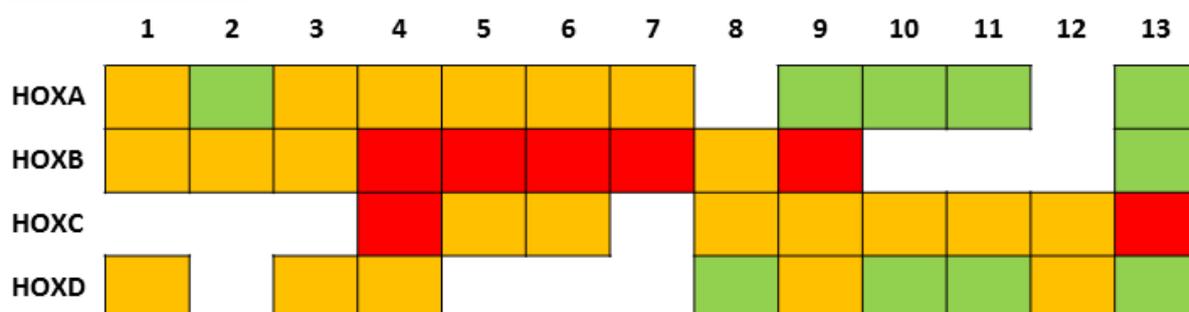
Heterogenität von UCs deutlich, denn die Veränderungen der HOX-Genexpressionen waren zwischen den drei Datensätzen sehr unterschiedlich.

Die Veränderungen der HOX-Genexpression könnten durch Veränderungen von Regulatoren der HOX-Gene entstehen, wie der *HOX transcript antisense intergenic RNA* (HOTAIR).

GSE13507 N vs. Ta



GSE13057 N vs. T1



GSE13057 N vs. T2-T4

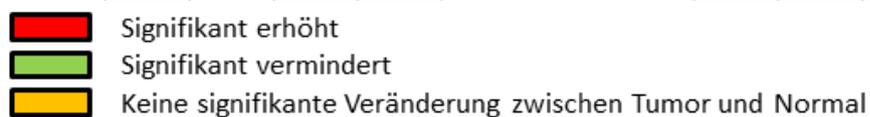
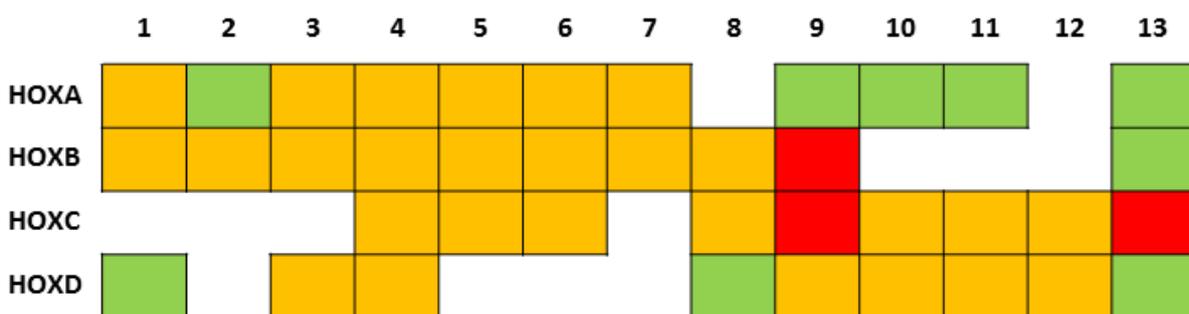
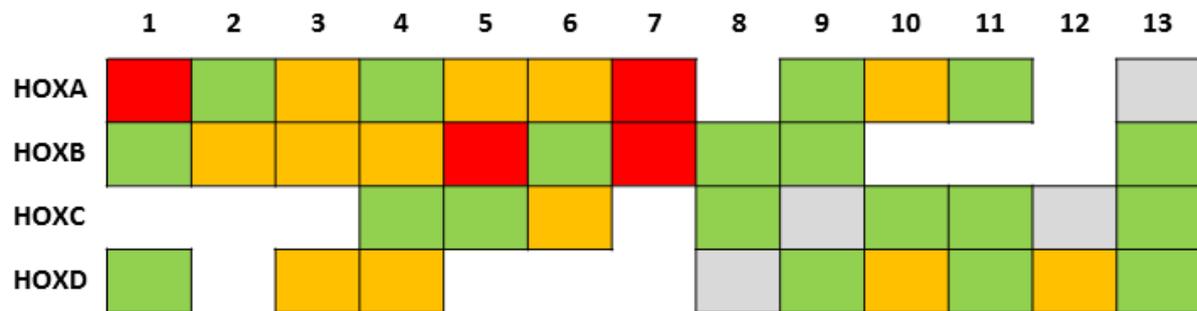
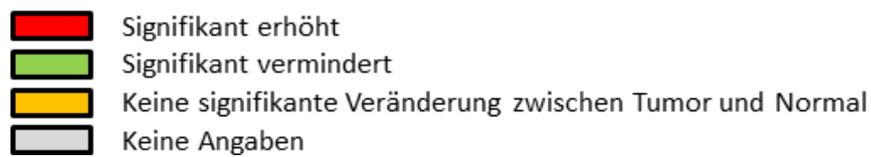
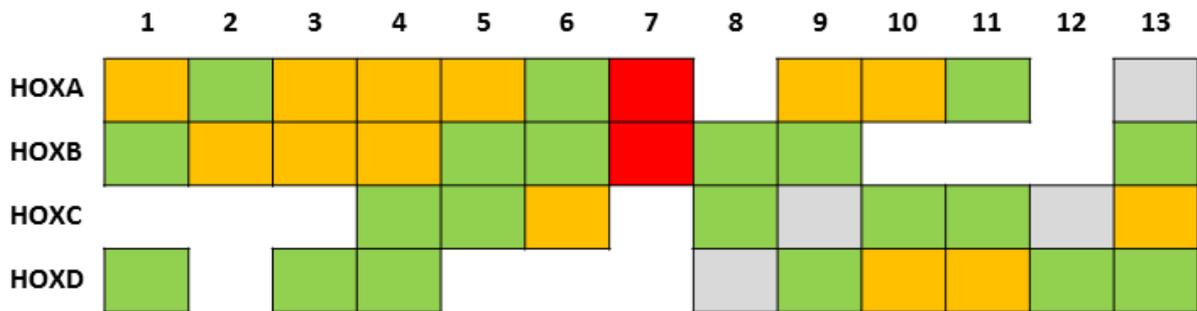
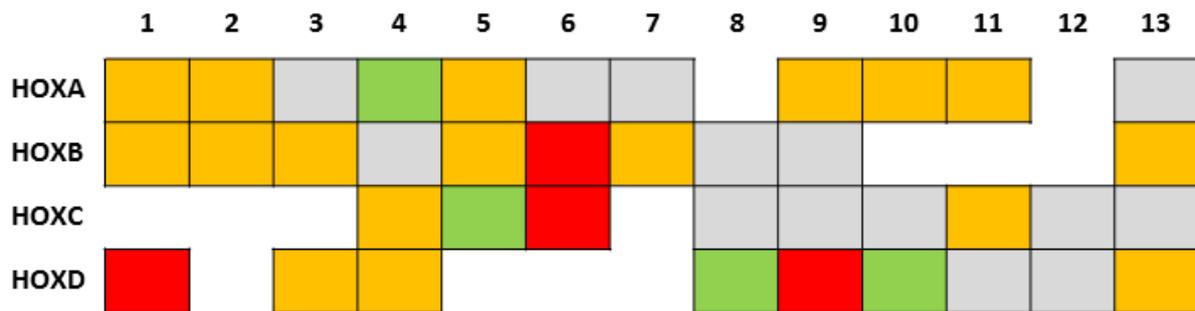
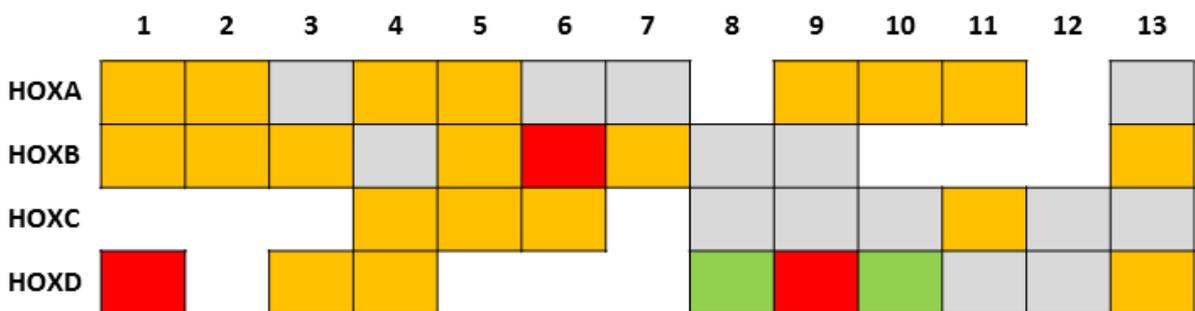
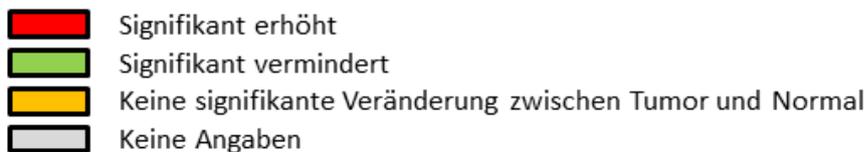
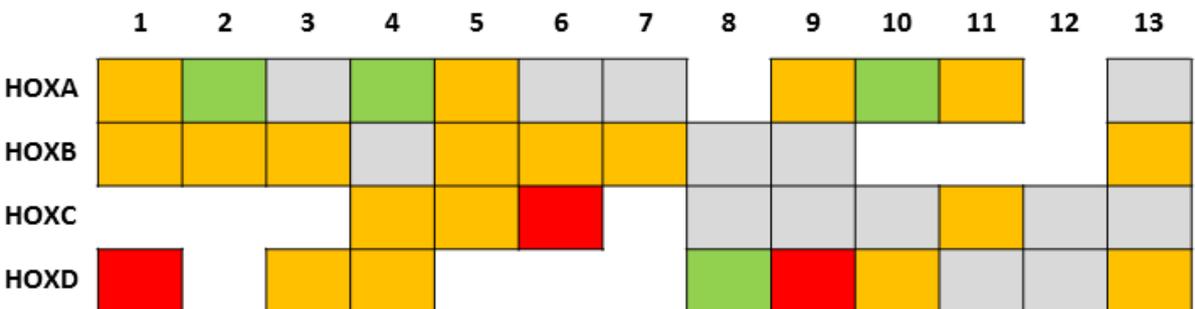


Abbildung 5.3: Veränderung der HOX-Genexpression während der Tumorprogression im Set 1.

Dargestellt ist der Vergleich zwischen den tumorfreien Geweben und den einzelnen Tumorstadien (Ta, T1, T2-4). Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Rot = signifikant erhöhte Expression in den UC-Geweben. Grün = signifikant verminderte Expression. Gelb = keine signifikanten Veränderungen der Expression.

GSE3167 N vs. nicht muskulinvasiv**GSE3167 N vs. muskulinvasiv****Abbildung 5.4: Veränderung der HOX-Genexpression während der Tumorprogression im Set 2.**

Es wurde ein Vergleich zwischen tumorfreien Geweben und nicht-invasiven bzw. muskulinvasiven Tumoren durchgeführt. Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Rot = signifikant erhöhte Expression in den UC-Geweben. Grün = signifikant verminderte Expression. Gelb = keine signifikanten Veränderungen der Expression. Grau = Expressionsdaten zu diesem Gen waren nicht vorhanden.

E-TABM-147 N vs. Ta**E-TABM-147 N vs. T1****E-TABM-147 N vs. T2-4****Abbildung 5.5: Veränderung der HOX-Genexpression während der Tumorprogression im Set 3.**

Der Vergleich zwischen tumorfreien Geweben und den einzelnen Tumorstadien (Ta, T1, T2-4) zeigt, dass sich die HOX-Genexpression während der Tumorprogression verändert. Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Rot = signifikant erhöhte Expression in den UC-Geweben. Grün = signifikant verminderte Expression. Gelb = keine signifikanten Veränderungen der Expression. Grau = Expressionsdaten zu diesem Gen waren nicht vorhanden.

5.2 Expression der lncRNA HOTAIR in verschiedenen Tumorentitäten

5.2.1 Expression der lncRNA HOTAIR in Urothelkarzinom-Gewebeproben

Zuerst wurde die Expression der lncRNA HOTAIR in einem Set aus 108 UC-Geweben im Vergleich zu sieben Geweben aus tumorfreien Harnblasen mittels qRT-PCR untersucht. Davon wurden 14 UCs als pTa, 13 UCs als pT1, 17 UCs als pT2, 44 UCs als pT3 und 20 UCs als pT4 klassifiziert. Weitere Parameter der Patienten- und Tumorkohorte sind in den Tabellen 4.1 und 5.2 zu finden.

Wie für andere Tumorentitäten beschrieben, wurde in einigen UCs eine stark erhöhte HOTAIR-Expression gemessen, doch wurde kein signifikanter Unterschied zum Normalgewebe über alle UC-Proben hinweg gefunden (Abb. 5.6). Auch zwischen den normalen, tumorfreien Geweben und einzeln betrachteten T-Stadien konnten keine signifikanten Veränderungen gemessen werden. Allerdings schien die HOTAIR-Expression mit steigendem Tumorstadium heterogener zu werden.

In 30 UC-Geweben wurde eine über dem Mittelwert der tumorfreien Gewebe (Mittelwert der relativen HOTAIR Expression = 0,048) liegende HOTAIR-Expression gemessen. Deshalb wurden die 25 % der UC-Gewebe mit der höchsten HOTAIR-Expression zur Gruppe HOTAIR-hoch und die restlichen 75 % zur Gruppe HOTAIR-niedrig zusammengefasst.

Außerdem wurde die ermittelte HOTAIR-Expression mit vorliegenden Parametern von Patienten und Tumoren korreliert. Dabei konnten keine signifikanten Korrelationen der HOTAIR-Expression mit Alter oder Geschlecht der Patienten, dem Tumor-Stadium oder Tumor-Grad, dem Vorliegen einer Metastasierung oder dem Rauchverhalten der Patienten beobachtet werden (Tab. 5.2). Allerdings ergab sich ein Zusammenhang zwischen stark erhöhter HOTAIR-Expression und einer schlechteren tumorspezifischen Überlebenszeit bei Aufteilung in die Gruppen HOTAIR-hoch und HOTAIR-niedrig (Abb. 5.7).

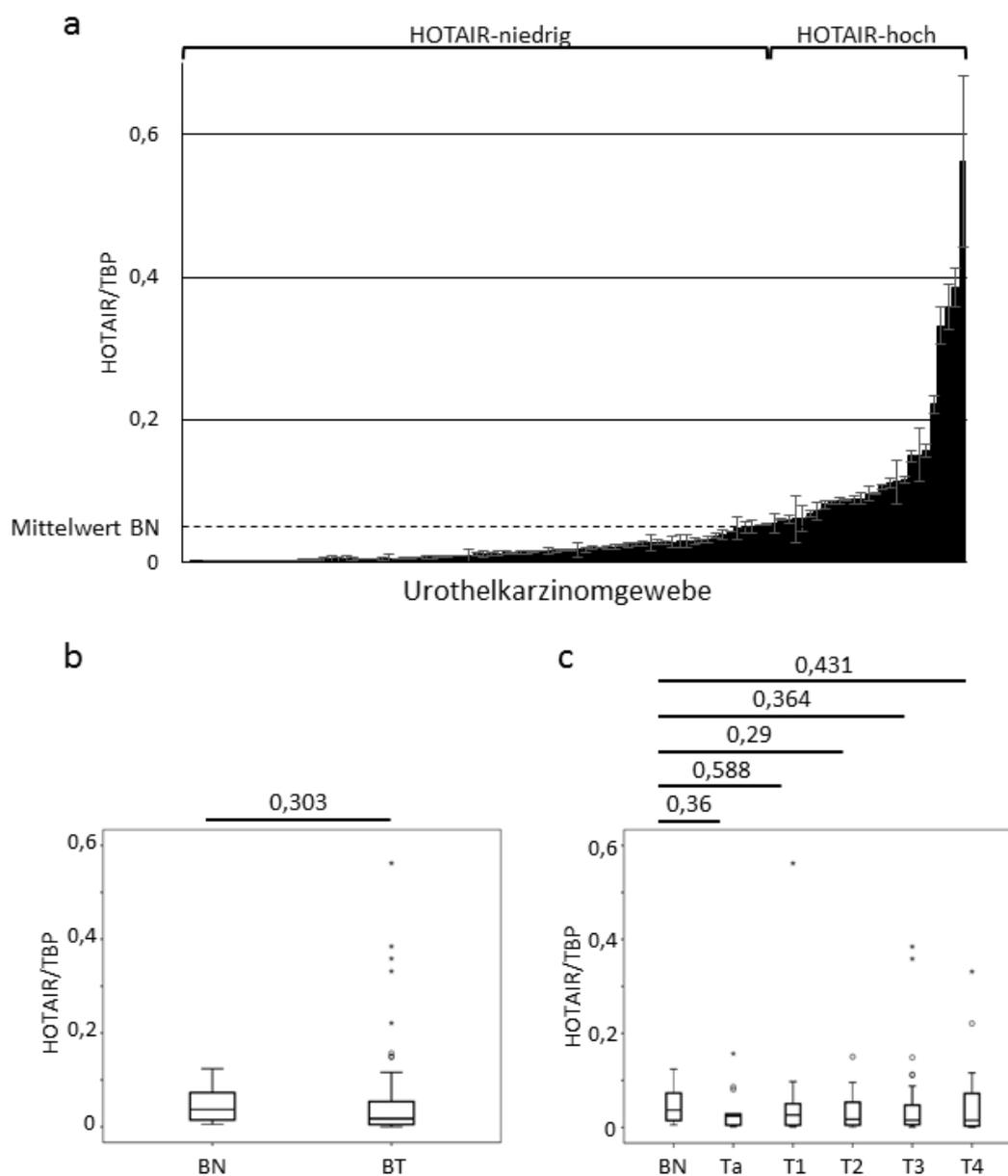


Abbildung 5.6: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR in UC-Geweben im Vergleich zu tumorfreien Geweben.

Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR in normalen, tumorfreien Geweben (BN) und UC-Geweben (BT) gemessen. Die gemessene relative Expression wurde auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Zusammensetzung des UC-Gewebesets ist in Abschnitt 4.1.1 dargestellt. Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet. (a) Aufgetragen ist die relative HOTAIR-Expression der Tumorproben. Der Mittelwert der normalen, tumorfreien Gewebe (0,048) ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die UC-Gewebe wurden in zwei Gruppen eingeteilt: HOTAIR-hoch (25 %) und HOTAIR-niedrig (75 %). In der HOTAIR-niedrig Gruppe liegt die HOTAIR-Expression im Bereich oder unter dem Mittelwert der normalen, tumorfreien Gewebe. (b+c) Auftragung der HOTAIR-Expression der normalen Harnblasen im Vergleich mit den UC-Geweben insgesamt und den einzelnen T-Stadien als Boxplots und p-Werte nach Mann-Whitney-U.

Tabelle 5.2: Korrelation der Patienten-Eigenschaften mit der HOTAIR-Expression in UC-Geweben.

Die statistischen Berechnungen wurden von Dr. T. Szarvas durchgeführt.

Variable	Anzahl	HOTAIR-Expression	Signifikanz
	n	Mittelwert (<i>range</i>)	P
Alter			
≤ 65	54	1,95 (0,00 – 56,20)	0,822
> 65	54	1,70 (0,00 – 35,90)	
Geschlecht			
Mann	79	1,70 (0,00 – 56,20)	0,501
Frau	29	1,80 (0,10 – 14,90)	
Stage			
Ta	14	2,45 (0,10 – 15,70)	
T1	13	2,60 (0,10 – 56,20)	
T2	17	1,70 (0,00 – 15,00)	
T3	44	1,50 (0,10 – 38,50)	
T4	20	1,50 (0,00 – 33,20)	
nicht-invasiv	27	2,50 (0,10 – 56,20)	0,614
invasiv	81	1,60 (0,00 – 38,50)	
Grade			
G1	7	2,50 (0,10 – 15,70)	
G2	33	2,60 (0,00 – 35,90)	
G3	68	1,35 (0,00 – 56,20)	
Low-grade (G 1-2)	40	2,55 (0,00 – 35,90)	0,256
High-grade (G 3)	68	1,35 (0,00 – 56,20)	
Metastasen			
N0/Nx/M0/Mx	80	1,60 (0,00 – 35,90)	0,766
N + / M+	28	1,20 (0,10 – 38,50)	
Raucher			
Ja	61	2,40 (0,00 – 56,20)	0,832
Nein	29	2,10 (0,10 – 35,90)	
unbekannt	18		

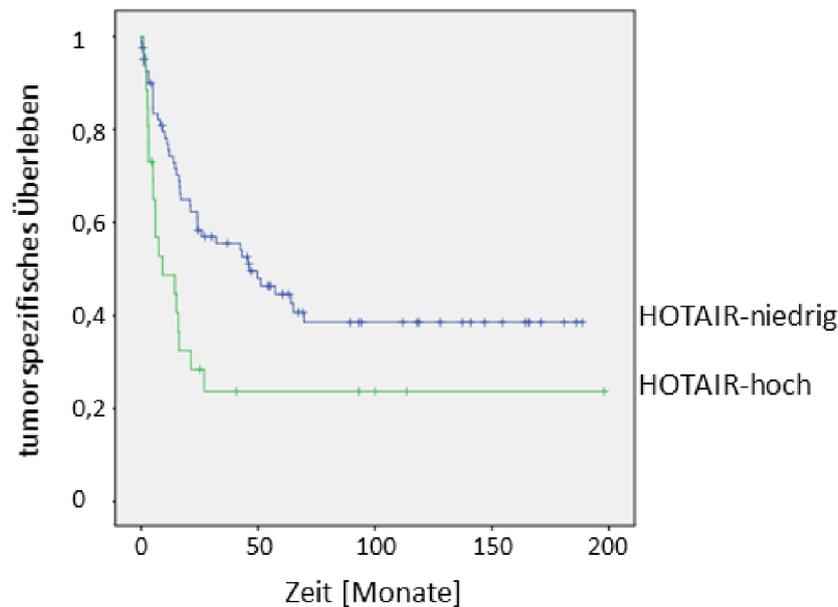


Abbildung 5.7: Kaplan-Meier-Kurve für die Korrelation des tumorspezifischen-Überlebens mit der Expression der lncRNA HOTAIR.

Das Patientenkollektiv wurde auf Grund der HOTAIR-Expression der UC-Gewebeproben in zwei Gruppen geteilt. Die Gruppe HOTAIR-hoch beinhaltet die 25 % der Patienten, deren UC-Gewebeproben die höchste HOTAIR-Expression zeigten. Die Signifikanz der Korrelation liegt bei $p = 0,009$.

5.2.2 Expression der putativen HOTAIR-Zielgene *HOXD10* und *HOXD12* im UC-Gewebeset

Da Rinn et al. eine regulative Wirkung von HOTAIR auf die Expression posteriorer *HOXD*-Gene beschrieben haben, wurde im Gewebeset die *HOXD10*- und *HOXD12*-Expression mittels qRT-PCR bestimmt [48]. Um die Expression mit der HOTAIR-Expression besser vergleichen zu können, wurden die Gewebe nach aufsteigender HOTAIR-Expression aufgetragen.

HOXD10 wurde in Übereinstimmung mit der Analyse in Abschnitt 5.1.1 in den tumorfreien Harnblasen nur gering exprimiert (Mittelwert der relativen *HOXD10*-Expression = 0,23). In den UC-Geweben lag die *HOXD10*-Expression in 44 Patienten über dem Mittelwert der tumorfreien Harnblasen (Abb. 5.8 a), jedoch war der Unterschied zwischen tumorfreien und UC-Geweben nicht signifikant (Abb. 5.8 b). Auch die Aufteilung der UC-Gewebe nach den T-Stadien ergab keine signifikanten Veränderungen (Abb. 5.8 c). Rinn et al. beschrieben eine erhöhte H3K27-Trimethylierung an posterioren *HOXD*-Genen und eine Verminderung der Expression dieser Gene durch HOTAIR [48]. Überraschenderweise wurde in vielen UC-Geweben mit hoher HOTAIR-Expression auch eine hohe *HOXD10*-Expression gemessen.

Eine Korrelation nach Pearson über das gesamte Gewebeset hinweg ergab eine leicht positive Korrelation von 0,33 zwischen HOTAIR- und *HOXD10*-Expression.

Weiterhin wurde auch die *HOXD12*-Expression im UC-Gewebeset untersucht. *HOXD12* war auch in diesem Set in den tumorfreien Harnblasen gering exprimiert (Mittelwert der relativen *HOXD12*-Expression = 0,41). Auch hier zeigten 37 UC-Gewebe eine im Vergleich zum Mittelwert der tumorfreien Harnblasen erhöhte Expression (Abb. 5.9 a). In einigen UC-Geweben mit hoher HOTAIR-Expression wurde unerwartet eine hohe *HOXD12*-Expression gemessen. Über alle Proben des UC-Gewebesets wurde eine positive Korrelation nach Pearson von 0,45 berechnet.

Der Vergleich zwischen tumorfreien Harnblasen und UC-Geweben deutete auf eine Aktivierung der *HOXD12*-Expression in einigen UC-Geweben hin und diese Aktivierung schien mit steigender Progression häufiger aufzutreten (Abb. 5.9 b+c). Allerdings sind diese Veränderungen nach dem Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant.

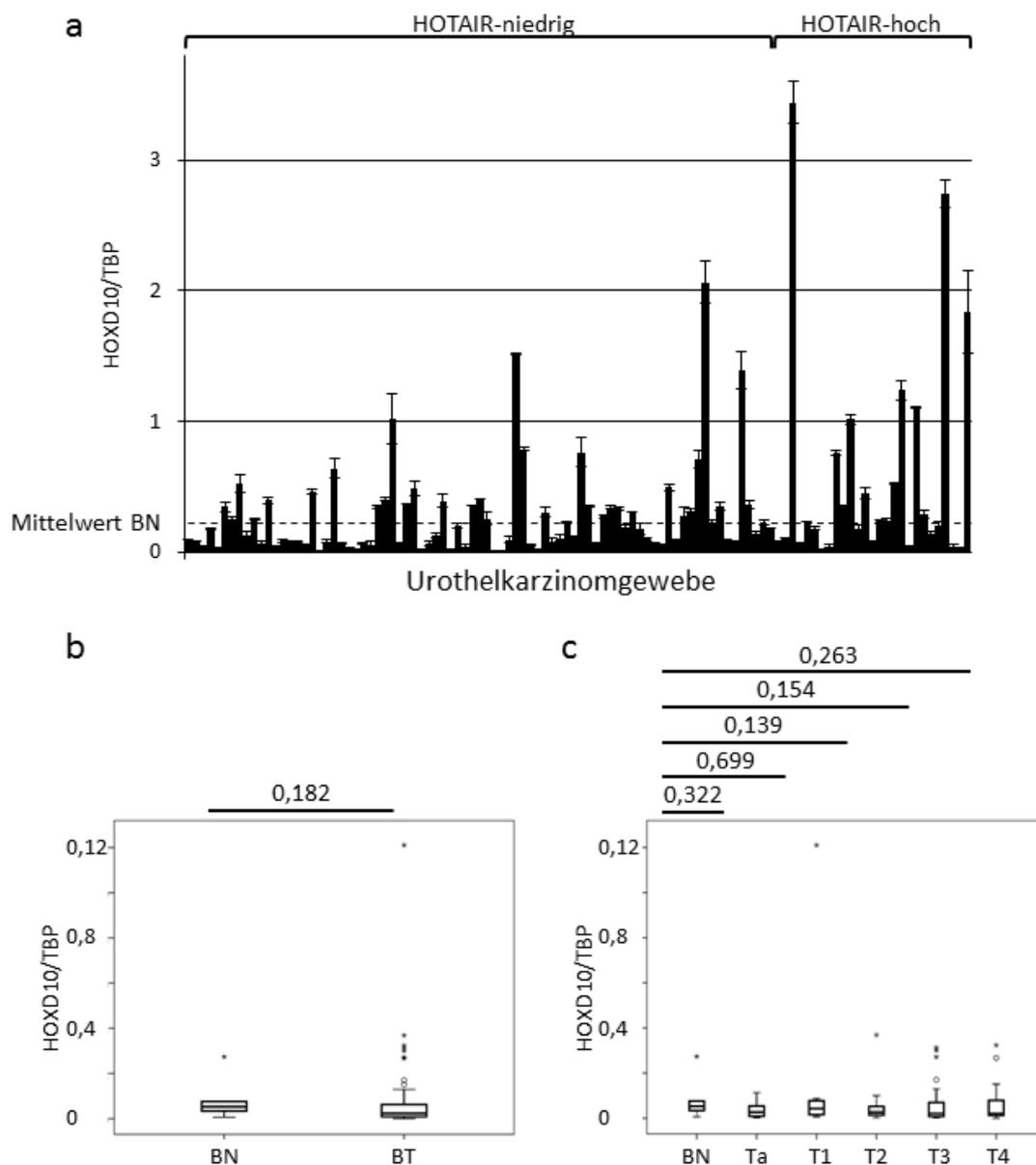


Abbildung 5.8: Expressionsbestimmung von *HOXD10* in UC-Geweben im Vergleich zu tumorfreien Geweben.

Die *HOXD10*-Expression wurde im UC-Gewebeset (Vgl. Abschnitt 4.1.1) mittels qRT-PCR gemessen und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet. (a) Der Mittelwert der tumorfreien Harnblasen (BN) von 0,23 ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die UC-Gewebe (BT) wurden nach aufsteigender HOTAIR-Expression aufgetragen. Die Gruppe HOTAIR-hoch beinhaltet die 25 % der Patienten, deren UC-Gewebeprobe die höchste HOTAIR-Expression zeigten. (b+c) Verteilung der *HOXD10*-Expression zwischen tumorfreien Harnblasen und UC-Geweben insgesamt und den einzelner T-Stadien und p-Werte nach Mann-Whitney-U.

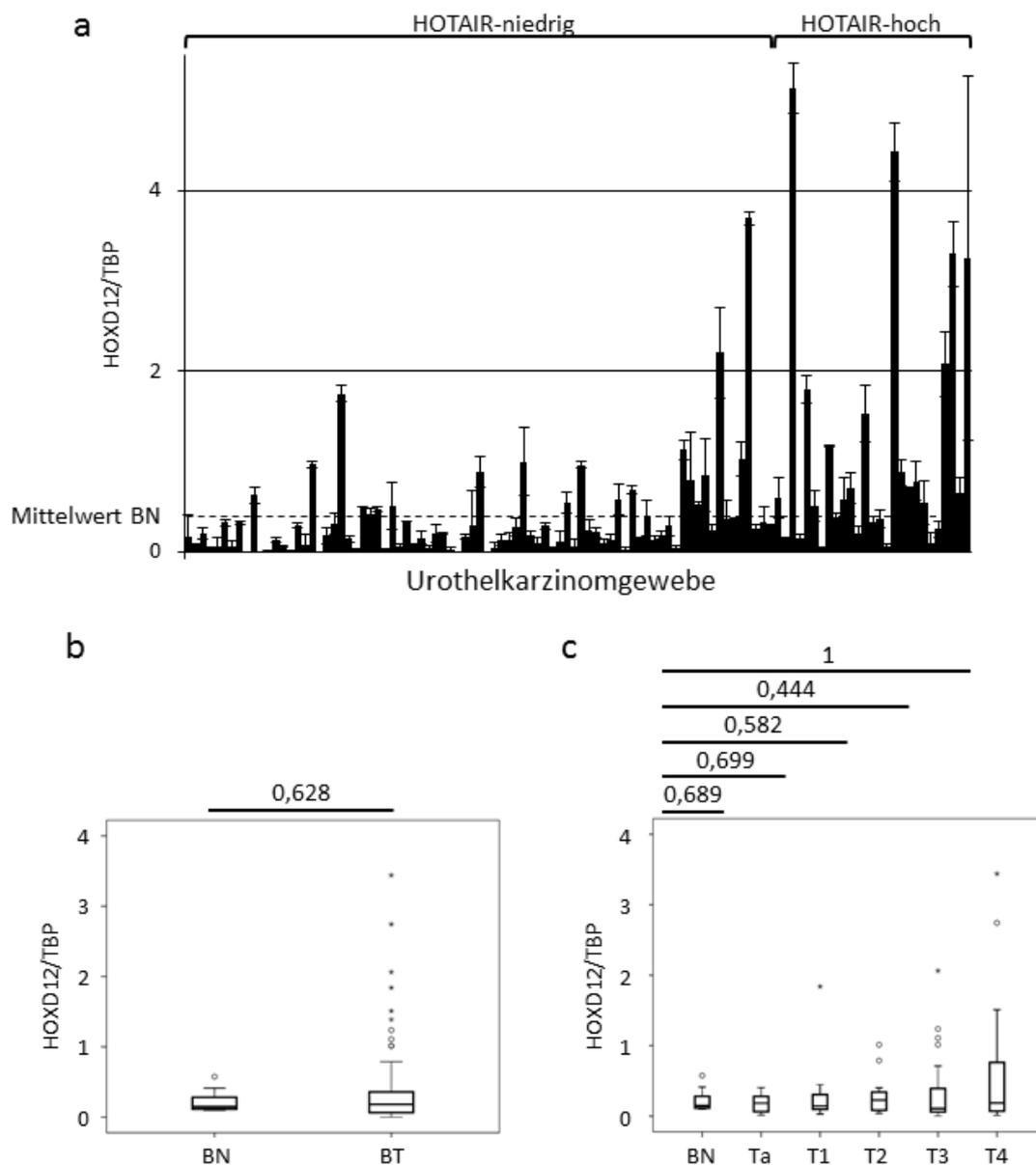


Abbildung 5.9: Expressionsbestimmung von *HOXD12* in UC-Geweben im Vergleich zu tumorfreien Geweben.

Die *HOXD12*-Expression wurde im UC-Gewebeset (vgl. Abschnitt 4.1.1) mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Signifikanz wurde über einen Mann-Whitney-U-Test berechnet. (a) Die UC-Gewebe sind nach aufsteigender HOTAIR-Expression angeordnet. Der Mittelwert der tumorfreien Harnblasen lag bei 0,41 und ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die 25 % der UC-Gewebe mit der höchsten HOTAIR-Expression bildeten die Gruppe HOTAIR-hoch. (b+c) Vergleichende Darstellung der *HOXD12*-Expression zwischen tumorfreien Harnblasen (BN) und UC-Geweben (BT) und der einzelnen T-Stadien als Boxplots und p-Werte nach Mann-Whitney-U.

5.2.3 Expression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien

Ob sich die heterogene Verteilung der HOTAIR-Expression der UC-Gewebeproben auch in etablierten UC-Zelllinien beobachten lässt, wurde mittels qRT-PCR in einem Probensatz aus 15 UC-Zelllinien und drei Kontrollen untersucht. Als Kontrollen dienten uroepitheliale Primärzellkulturen (UP) und die immortalisierte normale Urothelzelllinie TERT-NHUC. Das Zelllinien-Set spiegelte die Bandbreite der HOTAIR-Expressionsniveaus wieder, die auch in Geweben gefunden wurden. Die HOTAIR-Expression war in einzelnen UC-Zelllinien stark erhöht exprimiert, in der Mehrheit der UC-Zelllinien jedoch eher niedrig auf dem Niveau der Kontrollen (Abb. 5.10). Ein Zusammenhang zwischen Morphologie (epithelial vs. mesenchymal) und HOTAIR-Expression war nicht erkennbar.

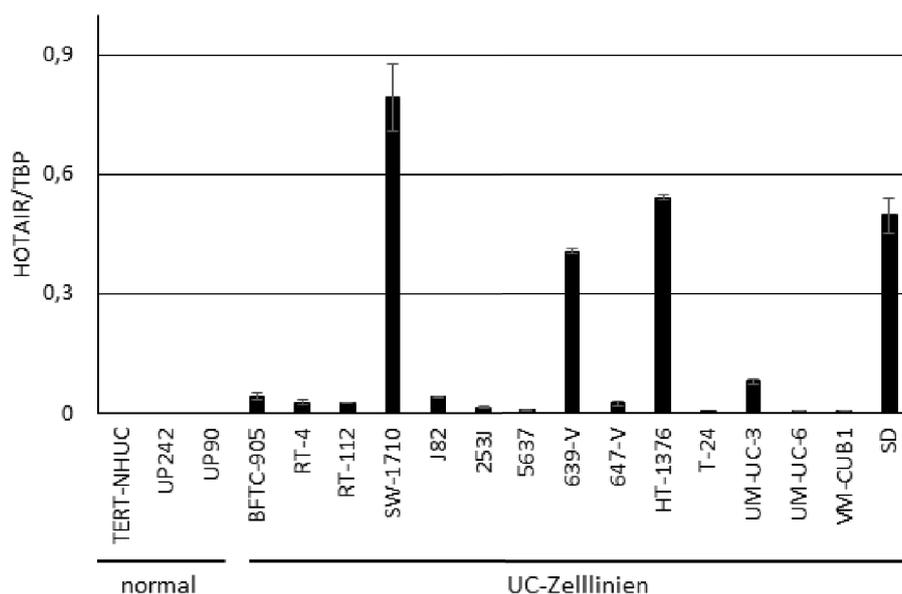


Abbildung 5.10: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.

Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die UC-Zelllinien sind nach ihrer Herkunft aus papillären (BFTC905 - J82) oder invasiven Tumoren angeordnet. Von den stark HOTAIR exprimierenden UC-Zelllinien weisen drei einen mesenchymalen und eine (HT-1376) einen epithelialen Phänotyp auf.

5.3 Vergleich der Expression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien mit Zelllinien anderer Tumorentitäten

Um die Stärke der in den UC-Zelllinien gemessenen HOTAIR-Expression besser einordnen zu können, wurde in verschiedenen weiteren Karzinom-Zelllinien im Vergleich zur UC-Zelllinie 639-V, einer UC-Zelllinie mit starker HOTAIR-Expression, mittels qRT-PCR die HOTAIR-Expression untersucht.

Da eine erhöhte HOTAIR-Expression zuerst für das Mammakarzinom beschrieben worden war [77], wurde die HOTAIR-Expression in den Mammakarzinom-Zelllinien MCF7, T47D und SK-BR3 gemessen. Die ausgewählten Mammakarzinom-Zelllinien besaßen eine höhere HOTAIR-Expression im Vergleich zur UC-Zelllinie 639-V, T47D eine fünffach und MCF7 eine zweifach erhöhte HOTAIR-Expression (Abb. 5.11 a).

Sowohl innerhalb der untersuchten UC-Zelllinien als auch der Mammakarzinom-Zelllinien war die HOTAIR-Expression sehr heterogen. Um zu untersuchen, ob diese heterogene Verteilung auch in anderen Tumorentitäten vorliegt, wurde die HOTAIR-Expression in Serien von Prostatakarzinom- und Ösophaguskarzinom-Zelllinien gemessen.

Zur Verfügung standen die vier Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3, 22Rv1, DU-145 und LNCaP, als Kontrollen dienten die normalen Prostataepithel-Zelllinien PNT2 und PrEC. Die HOTAIR-Expression in den Prostatakarzinom-Zelllinien war gegenüber den normalen Prostataepithel-Zelllinien erhöht. In den drei Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3, 22RV1 und DU-145 war die lncRNA HOTAIR deutlich höher exprimiert als in der UC-Zelllinie 639-V (Abb. 5.11 b). Das HOTAIR-Expressionsniveau lag im Bereich der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.

An Ösophaguskarzinom-Zelllinien waren insgesamt neun verfügbar. Davon hatten fünf ihren Ursprung in einem Plattenepithelkarzinom, drei in einem Adenokarzinom und LN1590 wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms (PT1590) gewonnen. Auch hier war die Verteilung der HOTAIR-Expression sehr heterogen (Abb. 5.11 c). Am stärksten war die Expression in KYSE-270 und PT1590; sie lag im Bereich der Mammakarzinom-Zelllinie T47D. Vier Ösophaguskarzinom-Zelllinien zeigten eine höhere, zwei eine vergleichbare und drei eine geringere HOTAIR-Expression als 639-V.

Da ein Zusammenhang zwischen der HOTAIR-Expression und Differenzierung vermutet wurde, wurden als Modell für undifferenzierte Zellen die Teratokarzinom-Zelllinien NCCIT und Tera-1 untersucht (Abb. 5.11 d). In beiden Zelllinien war die lncRNA HOTAIR sehr gering, kaum messbar exprimiert.

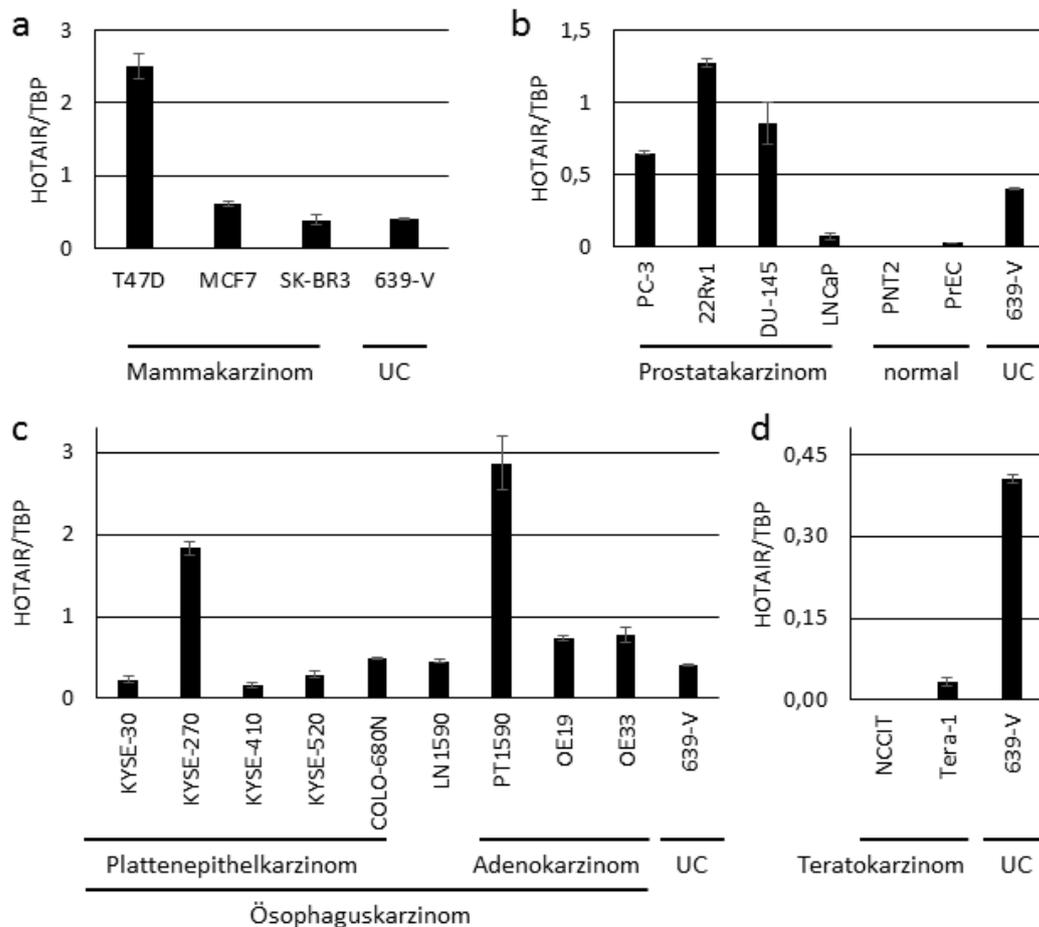


Abbildung 5.11: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten verglichen mit der UC-Zelllinie 639-V.

Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Alle untersuchten Sets wurden mit der UC-Zelllinie 639-V verglichen. (a) Expression in drei Mammakarzinom-Zelllinien. (b) Expression in vier Prostatakarzinom- und zwei Prostataepithel-Zelllinien. (c) Expression in neun Ösophaguskarzinom-Zelllinien, angeordnet nach ihrer Herkunft aus einem Plattenepithelkarzinom (KYSE-30 – COLO-680N), Lymphknotenmetastase (LN1590) oder Adenokarzinom. (d) Expression in zwei Teratokarzinom-Zelllinien.

5.4 Modulation der Expression der lncRNA HOTAIR

5.4.1 Knockdown der lncRNA HOTAIR

Der Knockdown von HOTAIR wurde mit zwei verschiedenen Techniken durchgeführt. Zuerst wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown unternommen. Dabei kamen zwei verschiedene siRNAs zum Einsatz. Die siRNA1 wurde in der Arbeit von Gupta et al. [77] und die siRNA2 von Kogo et al. [79] verwendet. Beide siRNAs wurden an verschiedenen UC-Zelllinien angewendet (Abb. 5.12). Als Kontrolle diente die Behandlung mit einer unspezifischen siRNA. RNA wurde nach 48 h Inkubation geerntet.

Die Effizienz des Knockdowns unterschied sich zwischen den UC-Zelllinien. In RT-112, SW-1710 und 639-V wurde die HOTAIR-Expression signifikant vermindert. In der RT-112 konnte mit beiden siRNAs die HOTAIR-Expression um 80 % (Abb. 5.12 a) und in SW-1710 um 50 % verringert werden (Abb. 5.12 b). In 639-V unterschied sich die Effizienz der beiden siRNAs deutlich (Abb. 5.12 d). Mit siRNA1 wurde eine Verminderung auf 75 % und mit siRNA2 auf 30 % erreicht. Demnach schien die Behandlung mit der siRNA2 insgesamt eine effektivere Herunterregulation zu bewirken. In der UC-Zelllinie J82 konnte keine signifikante Herunterregulation erreicht werden (Abb. 5.12 c). Dort war die endogene HOTAIR-Expression am geringsten. Womöglich kann die HOTAIR-Expression mittels siRNA nicht weiter vermindert werden.

Der siRNA-vermittelte Knockdown der lncRNA HOTAIR bewirkte eine Verminderung der Expression auf bis zu 20 % des Ursprungswertes. Bei Protein-kodierenden Genen kann oft eine stärkere Herunterregulation erreicht werden. In der Literatur ist beschrieben, dass durch die Behandlung mit *locked nucleic acids* (LNAs) eine höhere Effizienz des Knockdowns insbesondere von nukleär lokalisierten ncRNAs erzielt werden kann [145]. Daher wurde ein LNA-vermittelter Knockdown im Vergleich zum siRNA-vermittelten Knockdown der lncRNA HOTAIR in zwei UC-Zelllinien durchgeführt (Abb. 5.13). In der UC-Zelllinie RT-112 wurde mittels LNAs eine Herunterregulation auf 25 % erreicht (Abb. 5.13 a). Hier war der LNA-vermittelte Knockdown genauso effektiv wie der siRNA-vermittelte Knockdown. Bei der UC-Zelllinie SW-1710 lag die HOTAIR-Expression nach Behandlung mit LNAs gegen HOTAIR jedoch noch bei 70 % der Ausgangsexpression (Abb. 5.13 b), die Herunterregulation mittels LNAs war somit deutlich weniger effektiv. Es konnte durch den Einsatz von LNAs keine Steigerung der Knockdown-Effizienz von HOTAIR erreicht werden. Bei Einsatz einer FAM-markierten LNA gegen die lncRNA HOTAIR konnte unter dem Mikroskop bestätigt werden, dass die LNAs tatsächlich in den Nukleus gelangten.

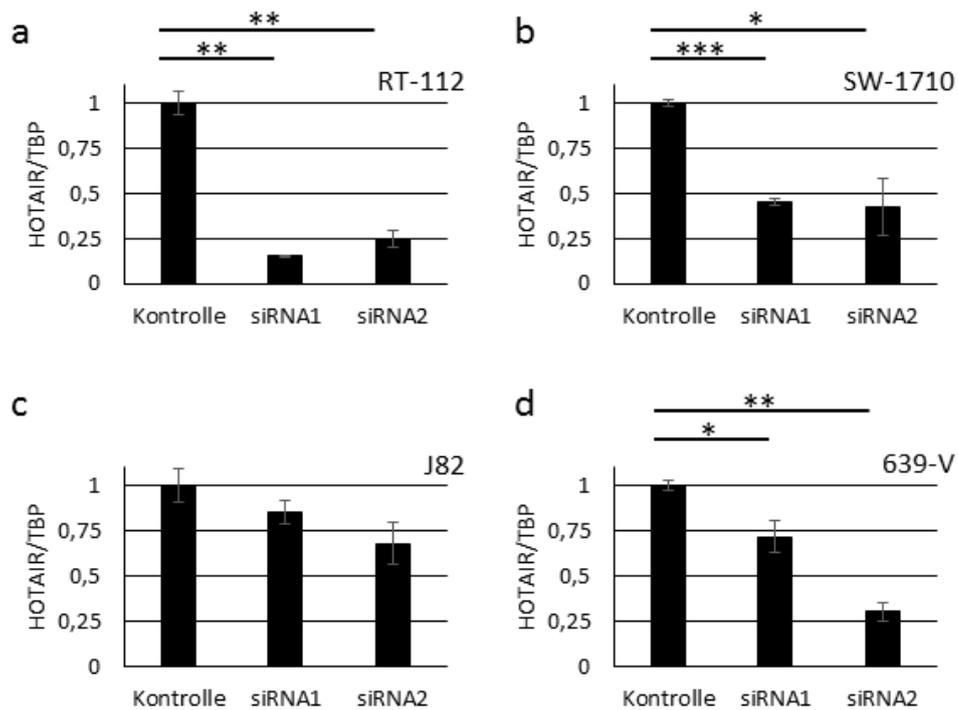


Abbildung 5.12: Expressionsbestimmung von HOTAIR nach siRNA-vermitteltem Knockdown in verschiedenen UC-Zelllinien.

Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Der HOTAIR-Knockdown wurde mit zwei verschiedenen siRNAs durchgeführt. Die Proben wurden nach 48 h Inkubation mittels siRNA geerntet. Als Kontrolle diente die Behandlung mit einer unspezifischen siRNA, welche auch zur Normierung der Expressionsdaten verwendet wurde. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

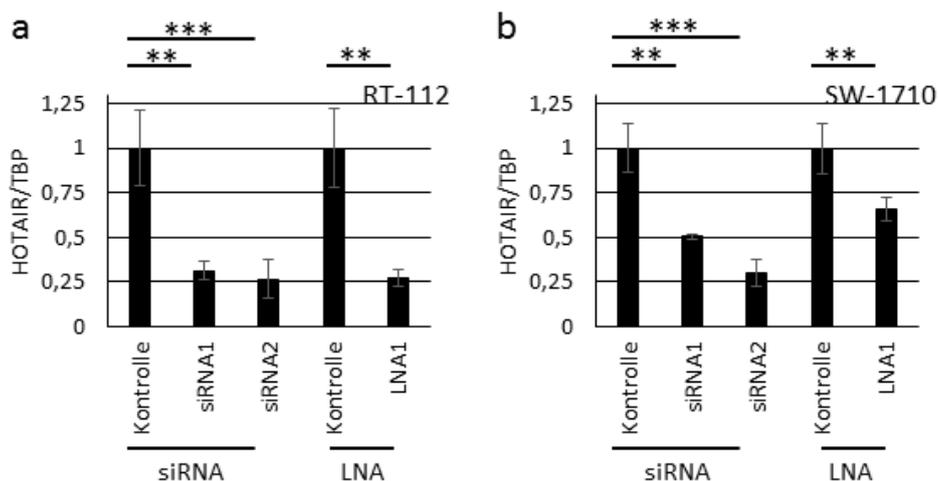


Abbildung 5.13: Vergleich der Effizienz eines siRNA- oder LNA-vermittelten Knockdowns von HOTAIR in den UC-Zelllinien RT-112 und SW-1710.

Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Werte wurde auf die jeweilige Kontrolle normiert Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Der HOTAIR-Knockdown wurde mit zwei siRNAs und einer LNA gegen die lncRNA HOTAIR durchgeführt. Die Proben wurden nach 48 h Inkubation geerntet. (a) RT-112. (b) SW-1710.

5.4.1.1 Ein siRNA- oder LNA-vermittelter Knockdown vermindert die Konzentration der lncRNA HOTAIR im Cytoplasma

Khalil et al. zeigten mittels RNA-FISH, dass die lncRNA HOTAIR nicht nur im Nukleus, sondern auch im Cytoplasma lokalisiert ist [146]. Daher stellte sich die Frage, ob ein siRNA- oder LNA-vermittelter Knockdown die Konzentration von HOTAIR nur im Cytoplasma oder auch im Nukleus verringert. Deshalb wurde eine fraktionierte RNA-Isolierung nach siRNA- bzw. LNA-Knockdown an zwei UC-Zelllinien durchgeführt und anschließend die HOTAIR-Expression mittels qRT-PCR ermittelt.

Als Kontrolle für die saubere Trennung von Cytoplasma- und Nukleus-Fraktion wurde die lncRNA LIT1 gemessen, die nur im Nukleus lokalisiert sein soll [147]. Bei der UC-Zelllinie RT-112 war die Trennung sauber, da im Cytoplasma eine sehr geringe und im Nukleus eine einheitlich hohe LIT1-Expression gemessen wurde (Abb. 5.14 a). Die Trennung schien in der UC-Zelllinie SW-1710 weniger gelungen zu sein, denn die LIT1-Konzentration in der Cytoplasmafraktion war höher als in RT-112 und die Konzentration von LIT1 im Nukleus schwankte zwischen den einzelnen Proben (Abb. 5.14 c). Die HOTAIR-Expression war endogen in beiden UC-Zelllinien im Cytoplasma geringer als im Nukleus (Abb. 5.14 b+d). Nach Behandlung mit siRNA oder LNA sank in beiden UC-Zelllinien die HOTAIR-Konzentration im Cytoplasma. Jedoch schien die HOTAIR-Konzentration nach siRNA-Behandlung in beiden UC-Zelllinien im Nukleus anzusteigen. Nach LNA-Behandlung veränderte sich die HOTAIR-Konzentration im Nukleus nicht signifikant.

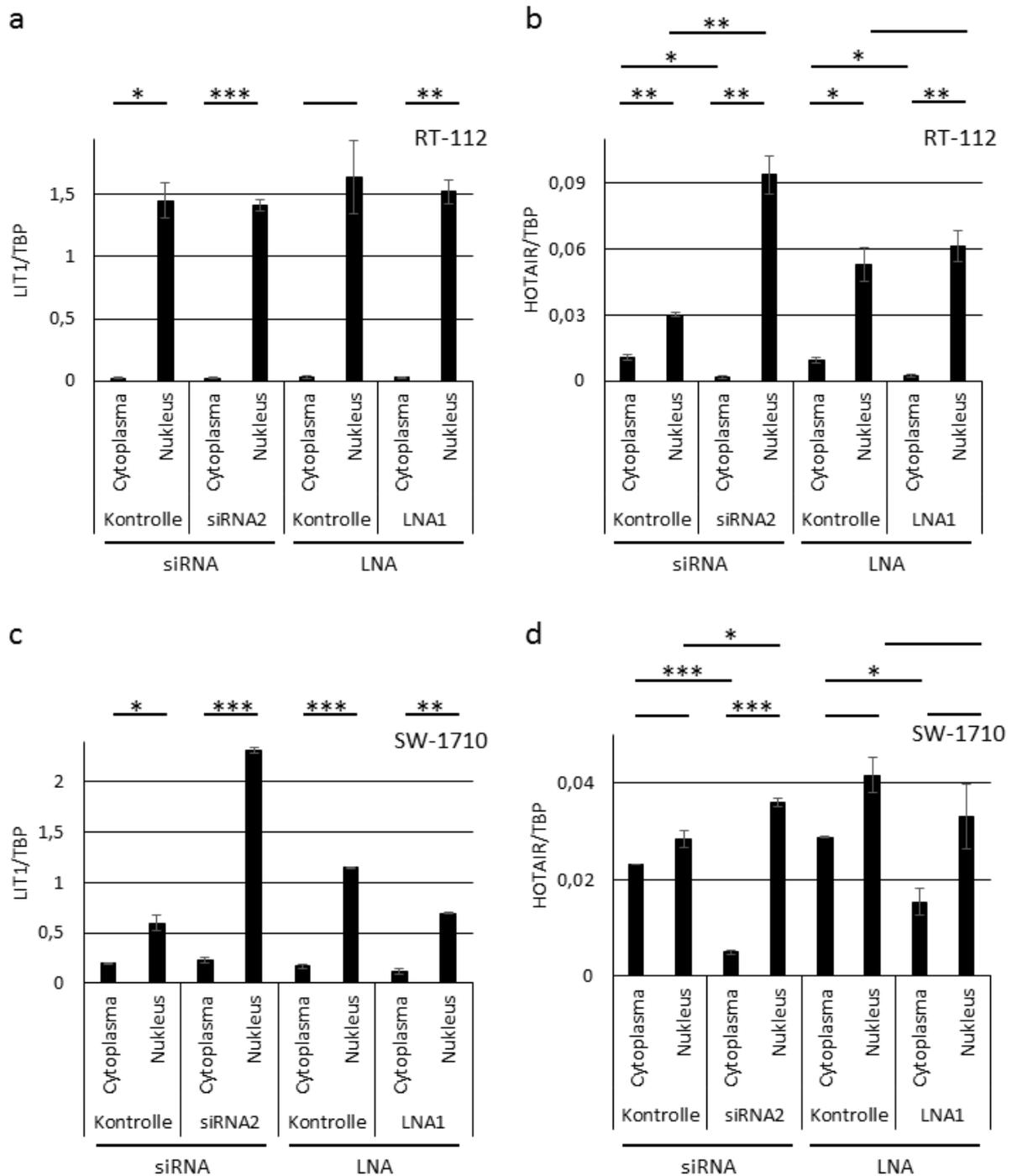


Abbildung 5.14: Expressionsbestimmung der lncRNAs LIT1 und HOTAIR im Cytoplasma und Nukleus nach HOTAIR-Knockdown in den UC-Zelllinien RT-112 und SW-1710.

Im Anschluss an eine fraktionierte RNA-Präparation wurde die HOTAIR- und LIT1-Expression mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Der HOTAIR-Knockdown wurde mit siRNA2 oder einer LNA durchgeführt. Als Kontrollen diente eine unspezifische siRNA bzw. LNA. (a+c) Expression der lncRNA LIT1. (b+d) Expression der lncRNA HOTAIR.

5.4.2 Überexpression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien

Die ektopische Überexpression der lncRNA HOTAIR wurde mit dem Plasmid pLZRS_HOTAIR erreicht, das aus der Arbeit von Gupta et al. stammte [77]. Eine starke transiente Überexpression konnte in vielen UC-Zelllinien erreicht werden. Beispielhaft ist das HOTAIR-Niveau nach transients Transfektion (48 h Behandlung) für vier UC-Zelllinien in Abb. 5.15 dargestellt. Verglichen mit dem endogenen HOTAIR-Niveau wurde eine 6.000- bis 100.000-fache Steigerung der HOTAIR-Expression erreicht.

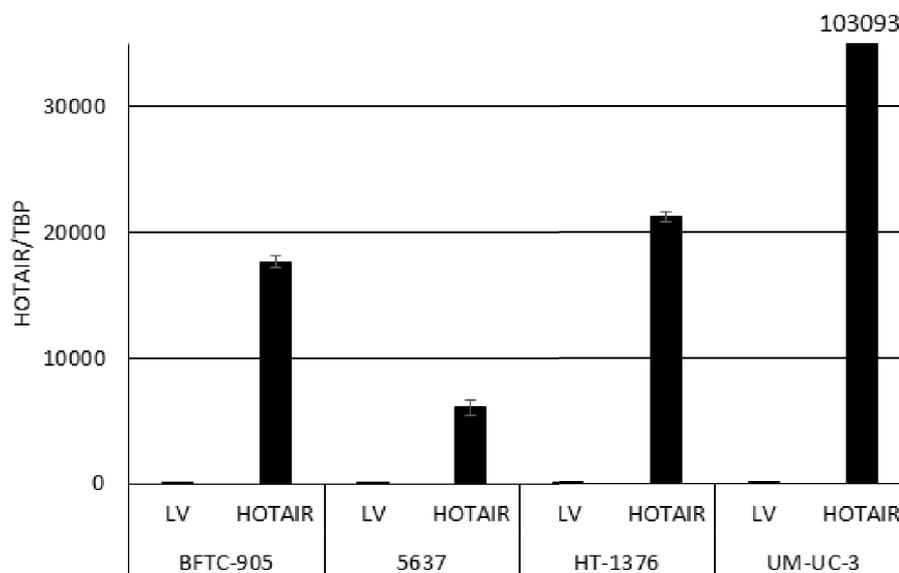


Abbildung 5.15: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR nach transients pLZRS_HOTAIR Transfektion in den UC-Zelllinien BFTC-905, 5637, HT-1376 und UM-UC-3.

Die Transfektion erfolgte mit dem pLZRS_HOTAIR Plasmid (HOTAIR). Als Kontrolle wurde eine Transfektion mit dem Leervektor pLZRS_RfA (LV) durchgeführt, welche auch zur Normierung der Expressionsdaten auf Eins verwendet wurde. Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Proben wurden 48 h nach Transfektion geerntet.

5.5 Auswirkungen einer stabilen HOTAIR-Überexpression in UC-Zelllinien auf den Phänotyp

Da der Knockdown der HOTAIR-Expression offensichtlich nur begrenzt effizient ist und insbesondere der nukleär lokalisierte Anteil der lncRNA HOTAIR durch diese Methodik kaum reduziert wird, wurde die regulatorische Funktion von HOTAIR im Folgenden nach stabiler Überexpression in UC-Zelllinien untersucht. Die stabile Expression wurde einerseits gewählt, um Untersuchungsmethoden mit längeren Inkubationszeiten bei gesicherter Überexpression durchführen zu können, andererseits gab es Berichte, dass einige regulatorische Effekte der lncRNA HOTAIR nur in Langzeitexperimenten zu beobachten sind [75, 77].

Da Xu et al. [85] über Phänotypveränderungen durch Induktion einer mesenchymal-epithelialen Transition (MET) nach siRNA-vermittelten HOTAIR-Knockdown in den Magenkarzinom-Zelllinien AGS und SGC7901 berichteten, stellte sich die Frage, ob im umgekehrten Ansatz durch eine ektopische Überexpression der lncRNA HOTAIR eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) induzieren werden kann. Es wurden die UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 ausgewählt, da sie einen epithelialen Phänotyp zeigen. Als dritte Zelllinie wurde T24 für die stabile Transfektion verwendet; diese zeigt eher einen mesenchymalen Phänotyp. Zudem unterscheiden sich diese Zelllinien im Expressionsmuster der posterioren *HOXD*-Gene (Abb. 5.16), die laut Rinn et al. [48] zu den Zielgenen von HOTAIR gehören. Während die Expression von *HOXD10-HOXD13* in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und T24 kaum detektierbar war, wurden diese Gene in der Zelllinie 5637 deutlich exprimiert.

Die funktionelle Charakterisierung einer stabilen HOTAIR-Überexpression in UC-Zelllinien erfolgte an jeweils zwei Klonen mit unterschiedlich starkem Niveau der HOTAIR-Überexpression und einem Leervektor-Klon (Abb. 5.17). Die erreichte HOTAIR-Expression war in der Zelllinie 5637 am geringsten und in VM-CUB1 am höchsten.

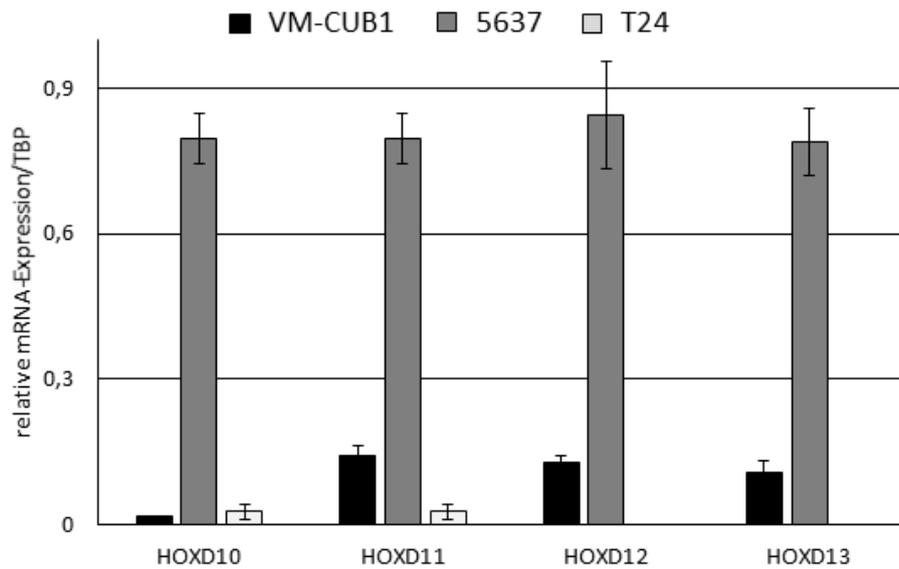


Abbildung 5.16: Expressionsprofil der posterioren *HOXD*-Gene der UC-Zelllinien VM-CUB1, 5637 und T24.

Die Expression der *HOX*-Gene *D10*, *D11*, *D12* und *D13* wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die gemessene Expression in VM-CUB1 ist in schwarz, in 5637 in grau und in T24 in hellgrau dargestellt.

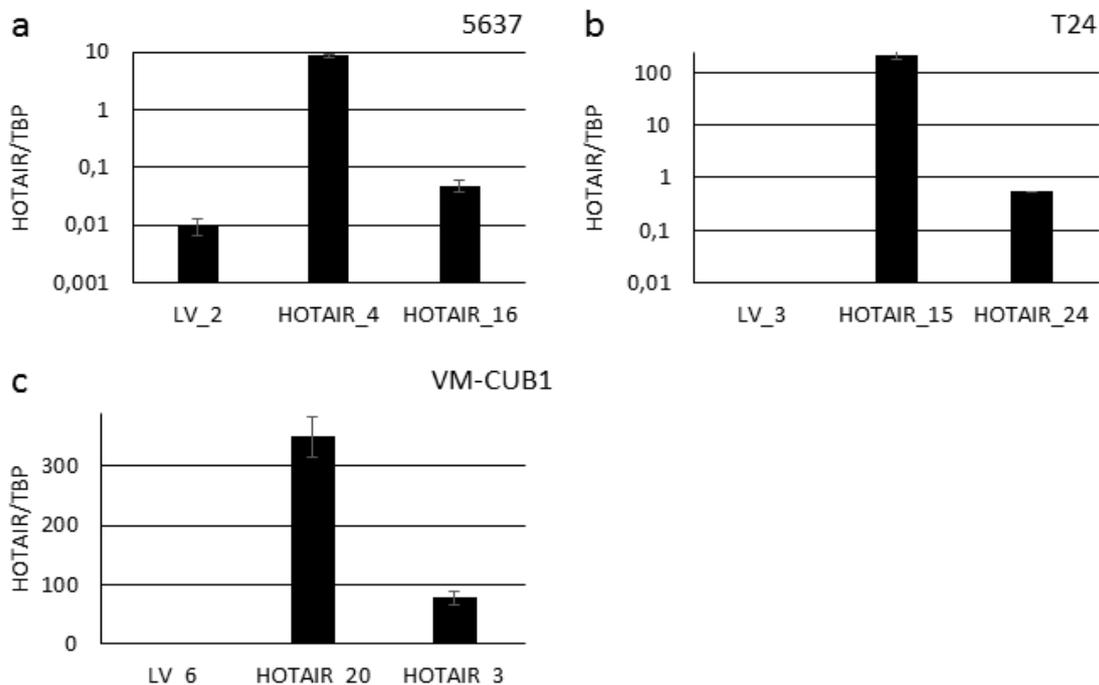


Abbildung 5.17: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR nach stabiler Transfektion in Klonen der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.

Die HOTAIR-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Es wurden jeweils ein repräsentativer Leervektor-Klon (LV) und zwei HOTAIR-Klone mit unterschiedlich starkem HOTAIR-Expressionsniveau ausgewählt. (a) Logarithmische Auftragung der HOTAIR-Expression in den Klonen aus 5637. (b) Logarithmische Auftragung der HOTAIR-Expression in den Klonen aus T24. (c) HOTAIR-Expression in den Klonen aus VM-CUB1.

5.5.1 Auswirkung einer stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf die Proliferation und die Klonogenität

In anderen Tumorentitäten wurde nach ektopischer HOTAIR-Überexpression eine Steigerung der Proliferation beobachtet. Deshalb wurde die Proliferation der drei stabil mit HOTAIR transfizierten UC-Zelllinien mittels MTT-Test über einen Zeitraum von vier Tagen bestimmt. Bei der UC-Zelllinie VM-CUB1 bewirkte die erhöhte HOTAIR-Expression in beiden Klonen eine deutliche Erhöhung der Proliferation (Abb. 5.18 c). Im Gegensatz dazu proliferierten die HOTAIR-Klone der UC-Zelllinien 5637 und T24 langsamer (Abb. 5.18 a+b).

Die Fähigkeit zur Koloniebildung aus Einzelzellen wurde zuerst über einen Klonogenitätstest bestimmt. Dazu wurde eine definierte Anzahl von Zellen in 12 cm Schalen ausgesät und diese nach mehreren Wochen Inkubation mittels Giemsa angefärbt.

Nach stabiler HOTAIR-Überexpression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurden mehr und größere Kolonien gebildet. In der UC-Zelllinie 5637 bewirkte die stabile HOTAIR-Überexpression den gegenteiligen Effekt. Die Fähigkeit Kolonien zu bilden war deutlich schwächer ausgeprägt. In der UC-Zelllinie T24 war die Anzahl der Kolonien unverändert, allerdings waren die Kolonien der HOTAIR überexprimierenden Klone kleiner (Abb. 5.17).

Weiterhin wurde die Klonogenität über einen *Soft-Agar Assay* untersucht. Dieser misst zusätzlich die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum und korreliert oftmals besser mit der Fähigkeit im Xenograft Tumore zu bilden.

Die Zellen der UC-Zelllinie 5637 bildeten im *Soft-Agar* keine Kolonien (Abb. 5.20 a). Dagegen besaß die UC-Zelllinie T24 unbehandelt die Fähigkeit des verankerungsunabhängigen Wachstums. Nach stabiler Überexpression von HOTAIR erhöhte sich dieses Potenzial deutlich (Abb. 5.20 b). Die unbehandelte UC-Zelllinie VM-CUB1 bildete nur sehr langsam Kolonien im *Soft-Agar*. Nach Überexpression von HOTAIR entstanden die Kolonien deutlich schneller (Abb. 5.20 c).

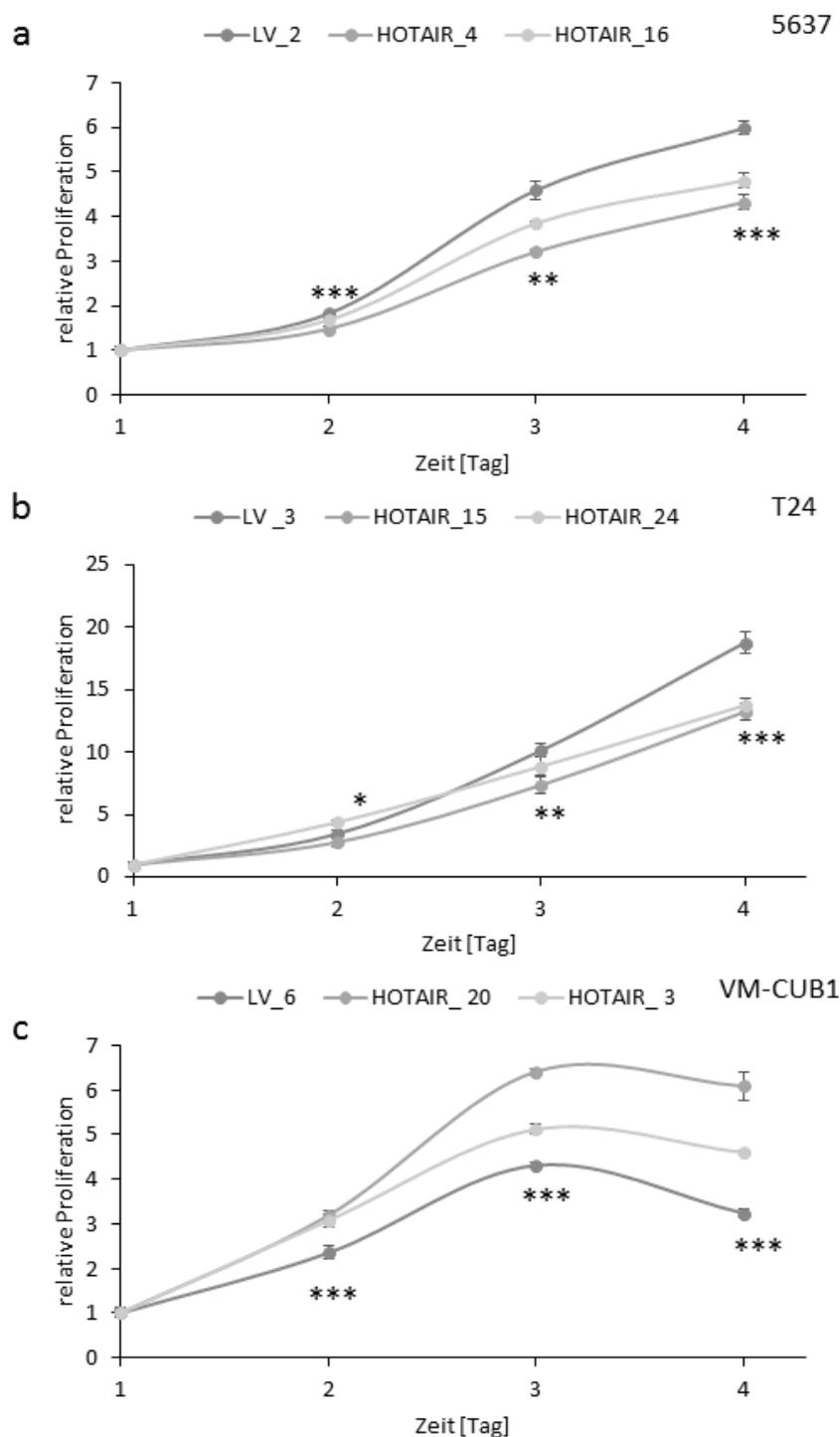


Abbildung 5.18: Proliferation der HOTAIR stabil überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.

Die Proliferation wurde mittels MTT-Test untersucht. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert von vier technischen Replikaten. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und eine repräsentative Messung wurde für diese Abbildung ausgewählt. Alle Messungen wurden auf den jeweiligen Mittelwert der Messung des ersten Tages normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Es wurden ein repräsentativer LV-Klon und zwei HOTAIR-Klone mit unterschiedlichem HOTAIR-Expressionsniveau verglichen. (a) 5637 (b) T24 (c) VM-CUB1.

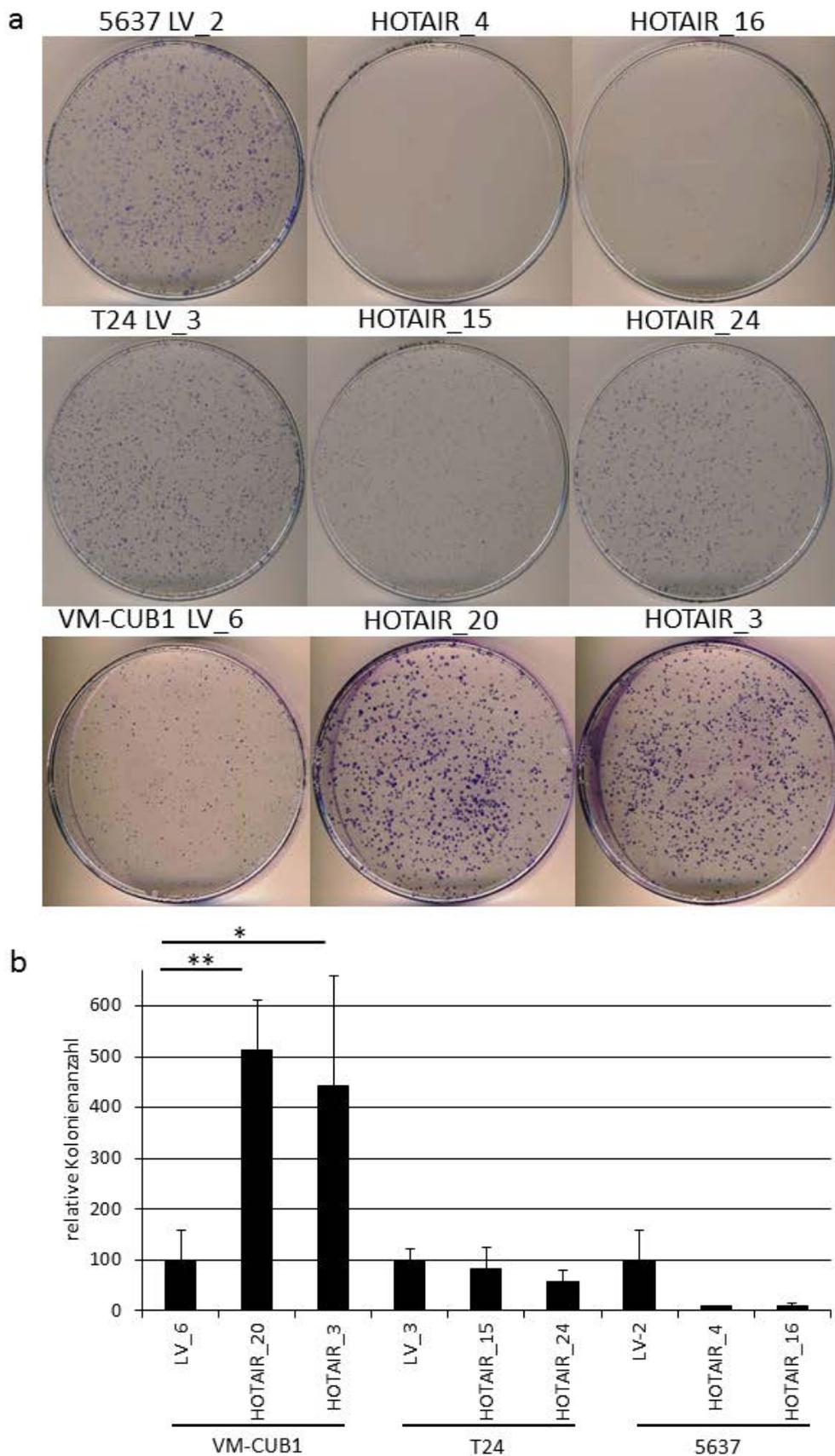


Abbildung 5.19: Klonogenität der HOTAIR stabil überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.

Für diesen Klonogenitätstest wurde jeweils eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät und nach mehreren Wochen Inkubation eine Giemsa-Färbung durchgeführt. (a) Exemplarische Fotos der Giemsa-gefärbten Schalen.

(b) Die Anzahl der Klone wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgezählt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert von drei gefärbten Schalen. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$).

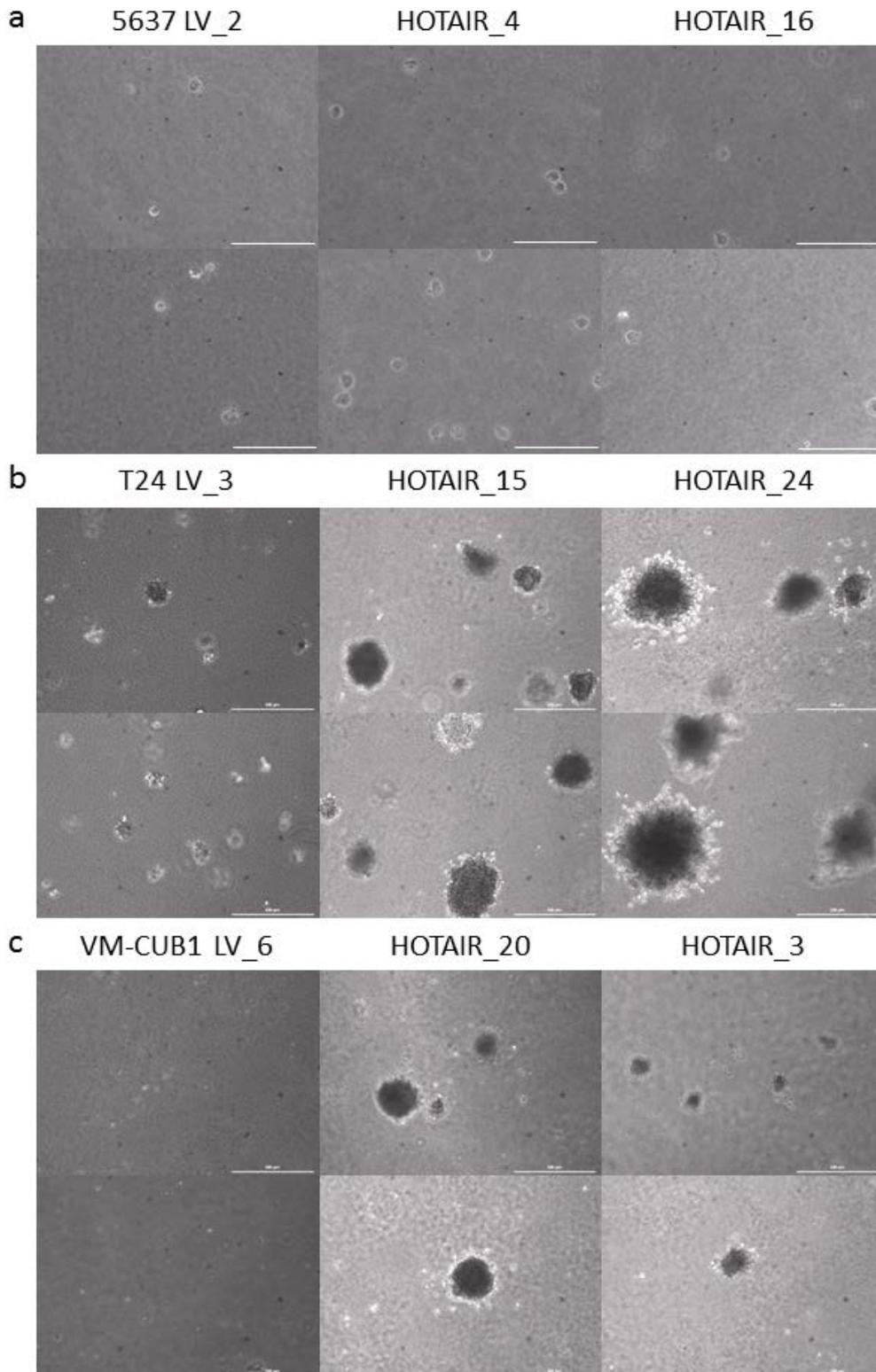


Abbildung 5.20: Verankerungsunabhängiges Wachstum der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Das verankerungsunabhängige Wachstum wurde mittels *Soft-Agar Assay* untersucht. Es wurden 50.000 Zellen von 5637 und 10.000 Zellen von T24 und VM-CUB1 je 6-Well ausgesät. Es wurden Triplikate ausgesät und der Versuch wurde dreimal wiederholt. Dargestellt sind repräsentative Fotos (4x Vergrößerung) nach 6-wöchiger Inkubation. Der angezeigte Maßstab entspricht 500 μm . (a) 5637, (b) T24, (c) VM-CUB1.

5.5.2 Auswirkungen einer stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf das Migrations- und Invasionsverhalten

Da eine gesteigerte HOTAIR-Expression häufig mit gesteigerter Invasions- und Migrationsfähigkeit einhergeht, wurde die Migration und Invasion der UC-Zelllinien jeweils zwischen dem HOTAIR-Klon mit der höheren HOTAIR-Expression und dem entsprechenden Leervektor (LV) verglichen.

Eine gängige Methode zur Messung der Migrationsfähigkeit von Zellen ist der *Scratch Assay*. Dabei wird beobachtet, in welchem Zeitraum die Zellen eine Lücke im Zellrasen schließen können. Diese Lücke wurde durch die Verwendung von Platzhaltern erzeugt und die Spaltbreite nach 0, 3, 6 und 9 h fotografiert und ausgemessen.

Bei allen drei UC-Zelllinien schloss der HOTAIR-Klon die Lücke langsamer. Nach 6 h bzw. 9 h konnte ein signifikanter Unterschied in der Breite der Lücke detektiert werden (Abb. 5.21). Dabei wurde die Lücke nicht gleichmäßig geschlossen (Abb. 5.22). Bei beiden UC-Zelllinien mit einem epithelialen Phänotyp (5637 und VM-CUB1) konnte am Anfang der Messung eine relativ geschlossenen Zellfront erzeugt werden. Diese wurde im Verlauf des Schließens der Lücke immer unregelmäßiger. Die mesenchymalere UC-Zelllinie T24 bildete von Anfang an eine unregelmäßige Zellfront.

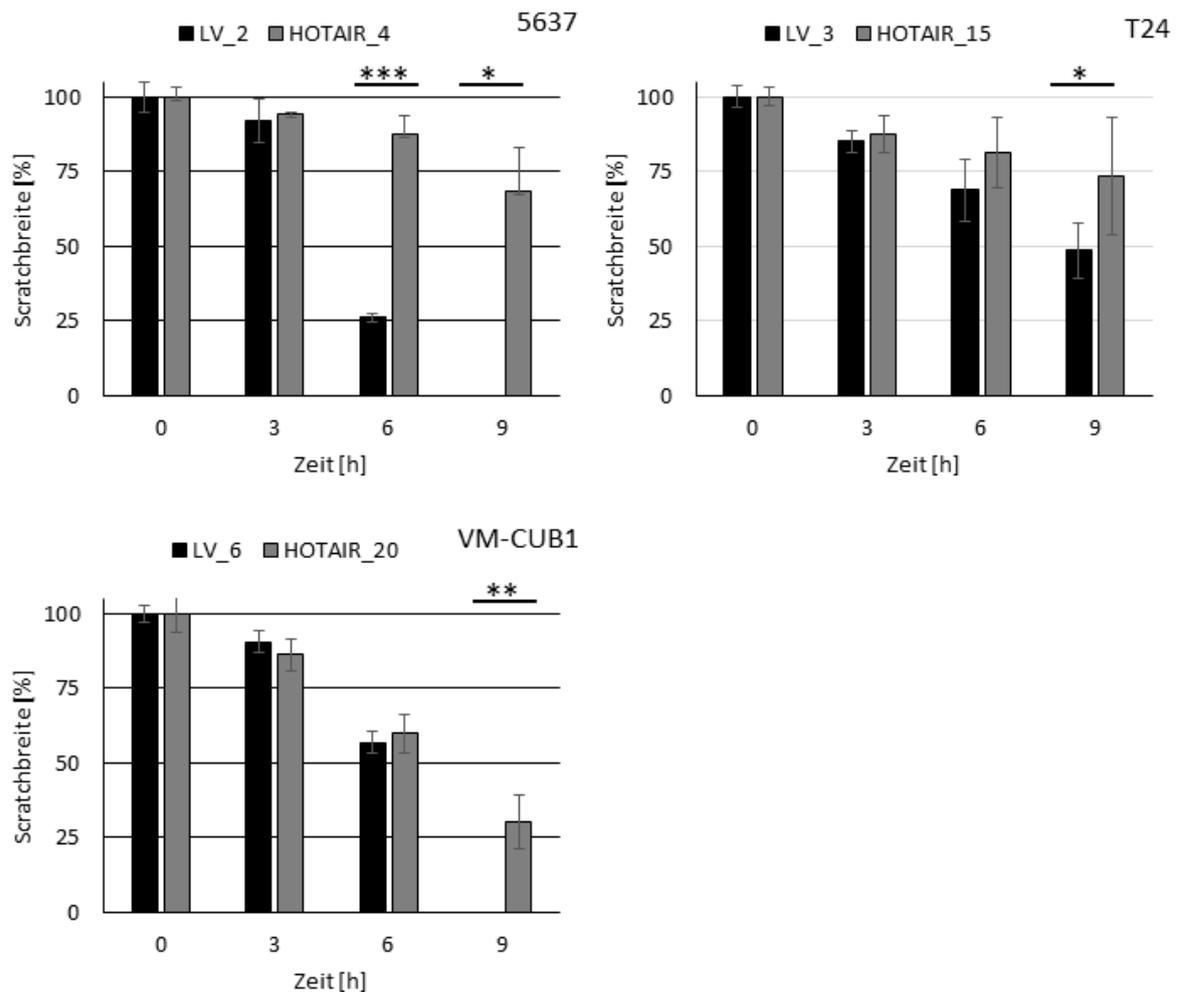


Abbildung 5.21: Graphische Auswertung des Scratch Assays für die UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.

Der HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und der LV-Klon wurden untersucht. Nach 0, 3, 6 und 9 h wurden Fotos aufgenommen und die Spaltbreite bestimmt. Der Versuch wurde in technischen Triplikaten durchgeführt und dreimal wiederholt. Gezeigt ist eine repräsentative Messung. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

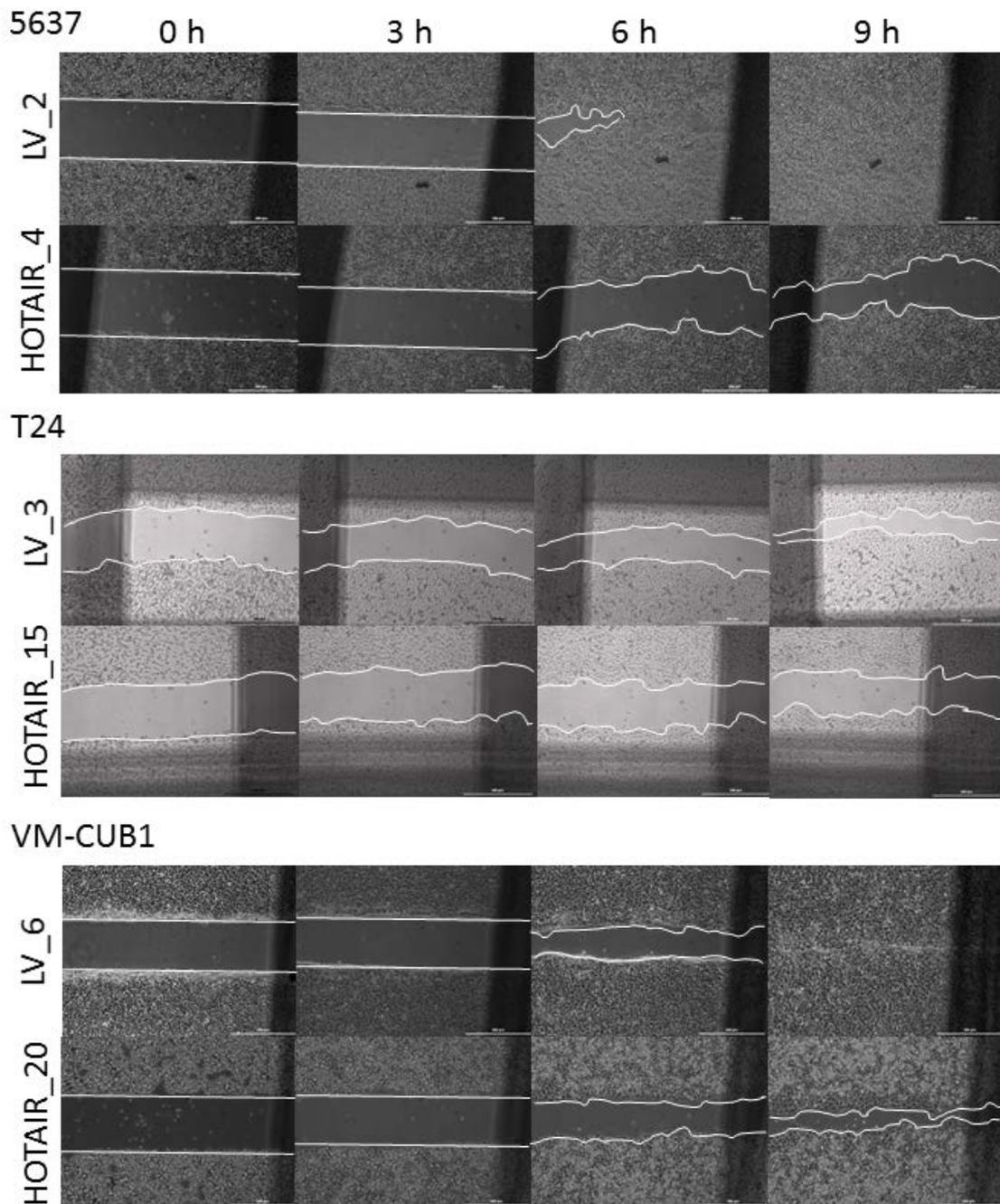


Abbildung 5.22: Exemplarische Bilder der *Scratch Assays* der drei UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Der HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und der LV-Klon wurden untersucht. Nach 0, 3, 6 und 9 h wurden Fotos aufgenommen und die Spaltbreite bestimmt. Die Fotos wurden in 4x Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab entspricht 500 μm . Die Zellfronten wurden mit einer weißen Linie markiert. Der Versuch wurde in technischen Triplikaten durchgeführt und dreimal wiederholt. Gezeigt ist eine repräsentative Messung.

Eine weitere Methode zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen nutzt die *Boyden-Chamber*. Dabei wird die Fähigkeit von Zellen beobachtet, durch Poren von einer Seite einer Membran auf die andere zu wandern. Nach einer Inkubationszeit von 8-9 h für die UC-Zelllinie T24 und 12-13 h für die UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach Aussaat in die mit Collagen beschichteten Transwells wurden die migrierten Zellen mittels H/E-Färbung sichtbar gemacht. Für die graphische Auswertung wurden unter dem Mikroskop mindestens fünf Gesichtsfelder (40x Vergrößerung) je Membran ausgezählt. Ausgezählt wurden die Zellen, die sich in den Poren der Membran befanden.

In den UC-Zelllinien 5637 und T24 war die Migration nach stabiler HOTAIR-Überexpression verringert. Im Gegensatz dazu bewirkte eine erhöhte HOTAIR-Expression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 eine verstärkte Migration (Abb. 5.23).

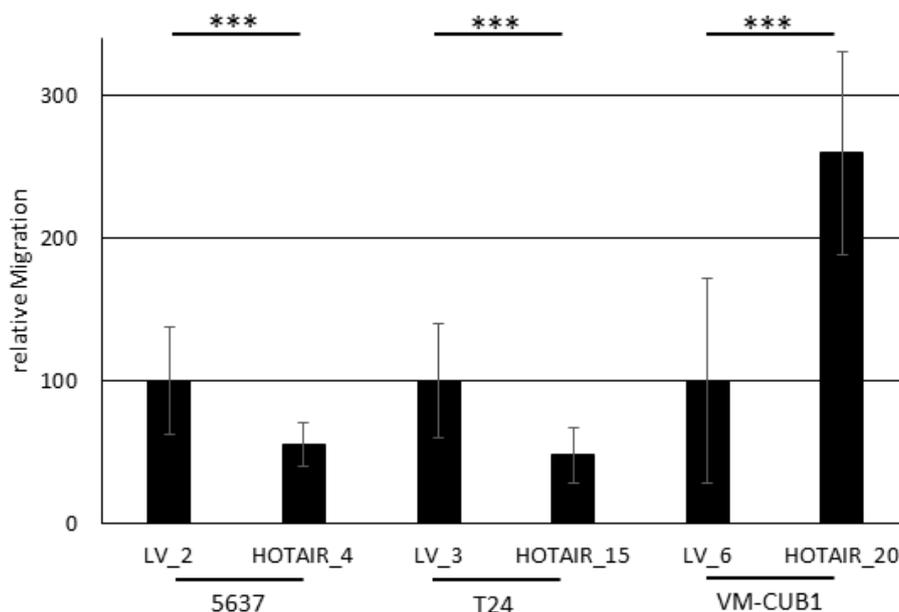


Abbildung 5.23: Migrationsverhalten der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Das Migrationsverhalten wurde durch Nutzung einer *Boyden-Chamber* untersucht. Die migrierten Zellen wurden mittels H/E-Färbung sichtbar gemacht und es wurden je Membran fünf Gesichtsfelder (40x Vergrößerung) ausgezählt. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (***) $p \leq 0,001$. Die Normierung erfolgte auf den jeweiligen LV-Wert.

Auch das Invasionsverhalten von Zellen kann durch Nutzung der *Boyden-Chamber* untersucht werden. Im Unterschied zur Untersuchung der Migration wird die Membran mit Matrigel beschichtet, welches die extrazelluläre Matrix simuliert. Es wird die Fähigkeit der Zellen gemessen durch eine extrazelluläre Matrix und die Poren der Membran hindurch zu wandern. Die Inkubationszeiten sind daher deutlich länger als bei der Untersuchung der Migration (24 h T24 und VM-CUB1 bzw. 36 h 5637). Nach der H/E-Färbung wurden die Zellen gezählt, die sich auf der Unterseite der Membran abgesetzt hatten.

Nach stabiler HOTAIR-Überexpression war die Invasivität der UC-Zelllinien 5637 und T24 verringert, die der UC-Zelllinie VM-CUB1 verstärkt. Die graphische Auswertung zeigte einen deutlich signifikanten Unterschied der Invasivität in allen drei UC-Zelllinien (Abb. 5.24 a). Exemplarisch sind in Abb. 5.24 b Fotos repräsentativer Membranausschnitte (10x Vergrößerung) dargestellt, um die Unterschiede im Invasionsverhalten zu verdeutlichen.

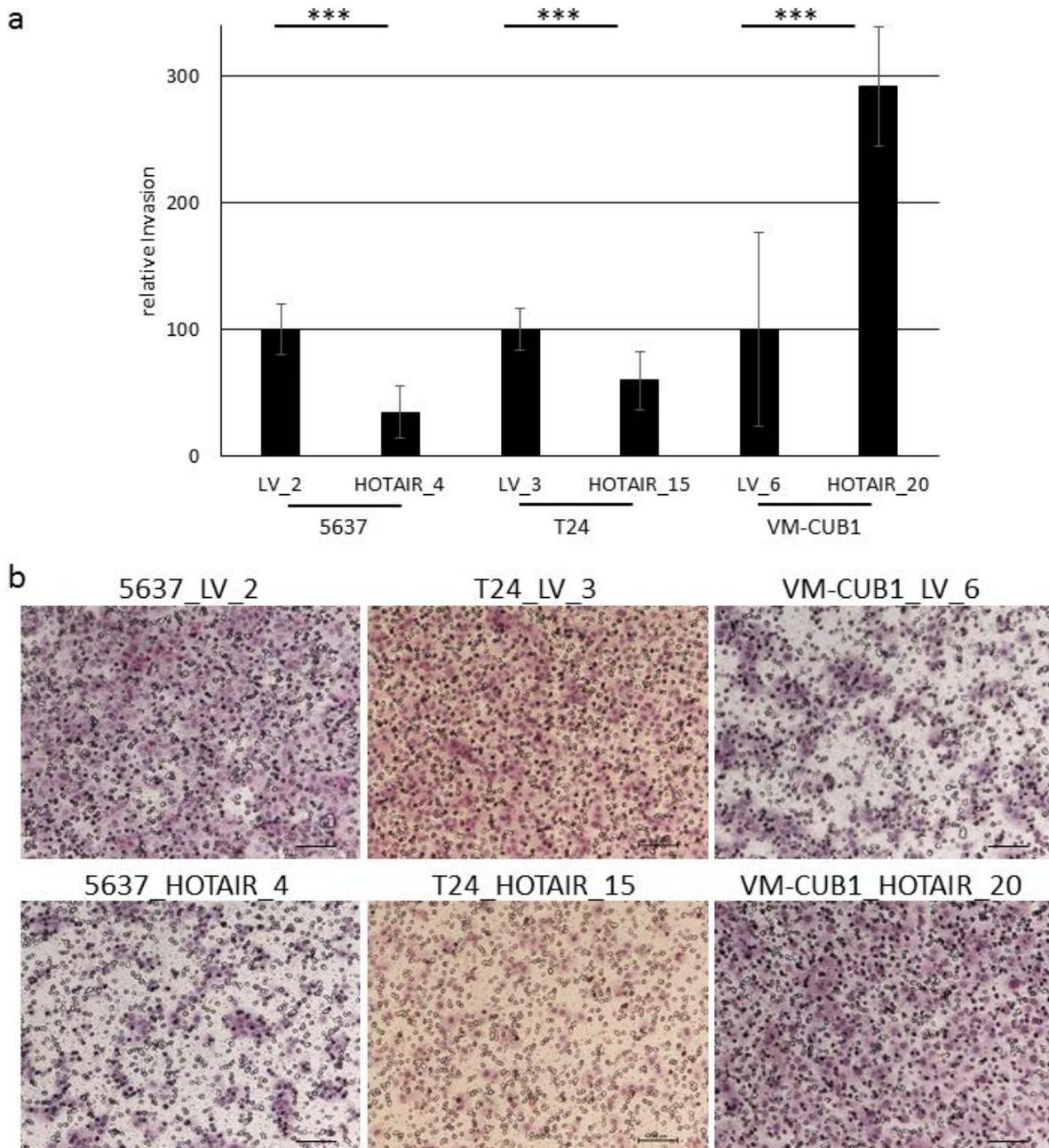


Abbildung 5.24: Invasionsverhalten der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Das Invasionsverhalten wurde mittels Matrigel-beschichteten Boyden-Chambers untersucht. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Normierung erfolgte auf den jeweiligen LV-Wert. (a) Es wurden je Membran fünf Gesichtsfelder (40x Vergrößerung) ausgezählt. (b) Exemplarische Bilder der H/E-gefärbten Membranen (10x Vergrößerung). Der Maßstab entspricht 100 μm .

5.5.3 Morphologische Veränderungen nach stabiler HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1

Überdies wurden morphologische Veränderungen nach HOTAIR-Überexpression in den drei untersuchten UC-Zelllinien durch Fotoaufnahmen dokumentiert.

Die stärksten morphologischen Veränderungen waren bei den VM-CUB1 Klonen zu erkennen. Die Zellverbände waren lockerer und die Zellen länglicher. Sie erschienen insgesamt deutlich mesenchymaler (Abb. 5.25 a).

Der beobachtete mesenchymale Phänotyp der HOTAIR überexprimierenden VM-CUB1-Klone deutete auf eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) hin. Dafür spricht, dass der epitheliale Marker E-Cadherin auf mRNA- und Proteinebene in beiden HOTAIR-Klonen deutlich vermindert exprimiert vorliegt. Zusätzlich wurde in beiden HOTAIR-Klonen der mesenchymale Marker Vimentin erhöht exprimiert (Abb. 5.25 b+c).

In den HOTAIR überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinie 5637 schienen die Zell-Zell-Kontakte lockerer zu sein. Besonders die Zellen des HOTAIR_16 Klons erschienen deutlich abgerundet und weniger pflastersteinartig (Abb. 5.26 a).

Auch die HOTAIR überexprimierenden Klone der UC-Zelllinie T24 wiesen weniger stark ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte auf. Zudem schien der mesenchymale Phänotyp noch markanter zu sein. Die Anzahl von Zellausläufern war erhöht (Abb. 5.26 b).

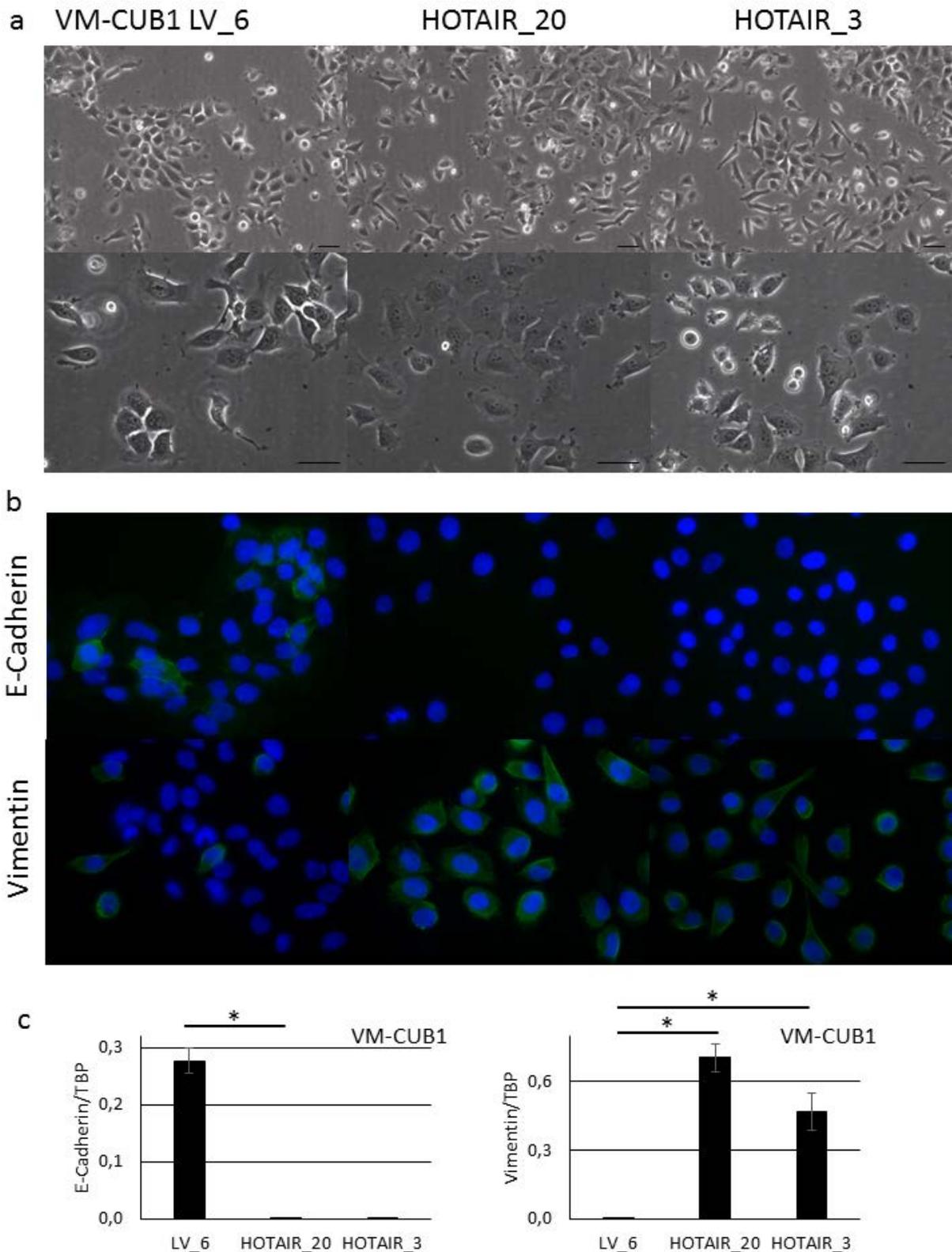


Abbildung 5.25: Beobachtete Veränderungen in der Morphologie der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression deuten auf eine Induktion der EMT hin.

(a) Fotos der VM-CUB1-Klone in 10x (oben) und 20x (unten) Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 100 μ m. (b) Immunfluoreszenz des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Markers Vimentin (jeweils grün) in 40x Vergrößerung. In Blau wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. (c) Die *E-Cadherin*- und

Vimentin-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$).

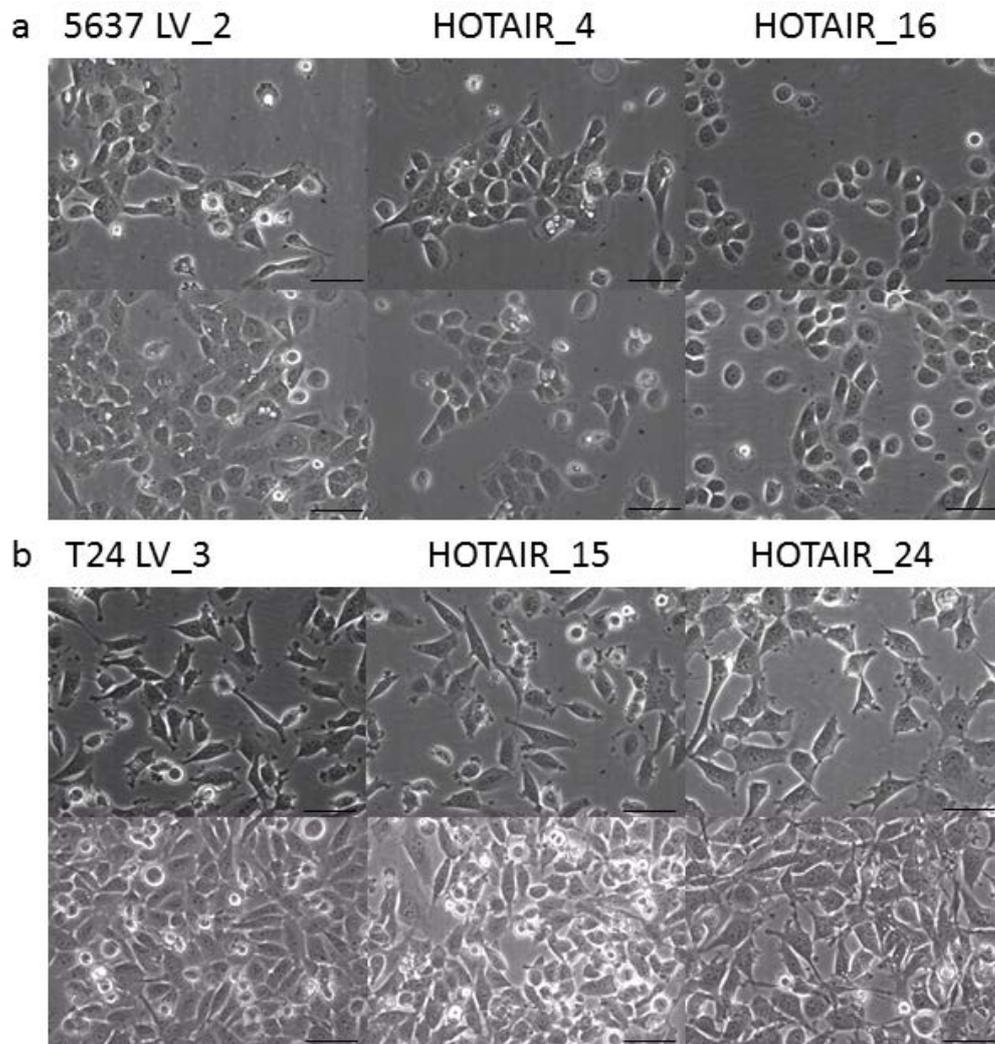


Abbildung 5.26: Morphologie der stabil HOTAIR überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637 und T24.

Gezeigt sind exemplarische Fotos der Klone in einer 20x Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 100 μm. (a) 5637, (b) T24.

5.5.4 Effekte der stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 auf die Cisplatin-Sensitivität

Bei der humanen Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 wurde von Liu et al. [87] ein Zusammenhang zwischen der HOTAIR-Expression und der Cisplatin-Sensitivität beobachtet. Zellen mit einer starken HOTAIR-Expression waren weniger sensitiv gegenüber Cisplatin. Dieser Zusammenhang wurde in den stabil transfizierten UC-Zelllinien über eine Dosiswirkungskurve mittels MTT-Test untersucht.

Überraschend waren die HOTAIR überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 durchweg sensitiver gegenüber Cisplatin (Abb. 5.27 a+b). In der UC-Zelllinie T24 wurde keine Veränderung beobachtet (Abb. 5.27 c).

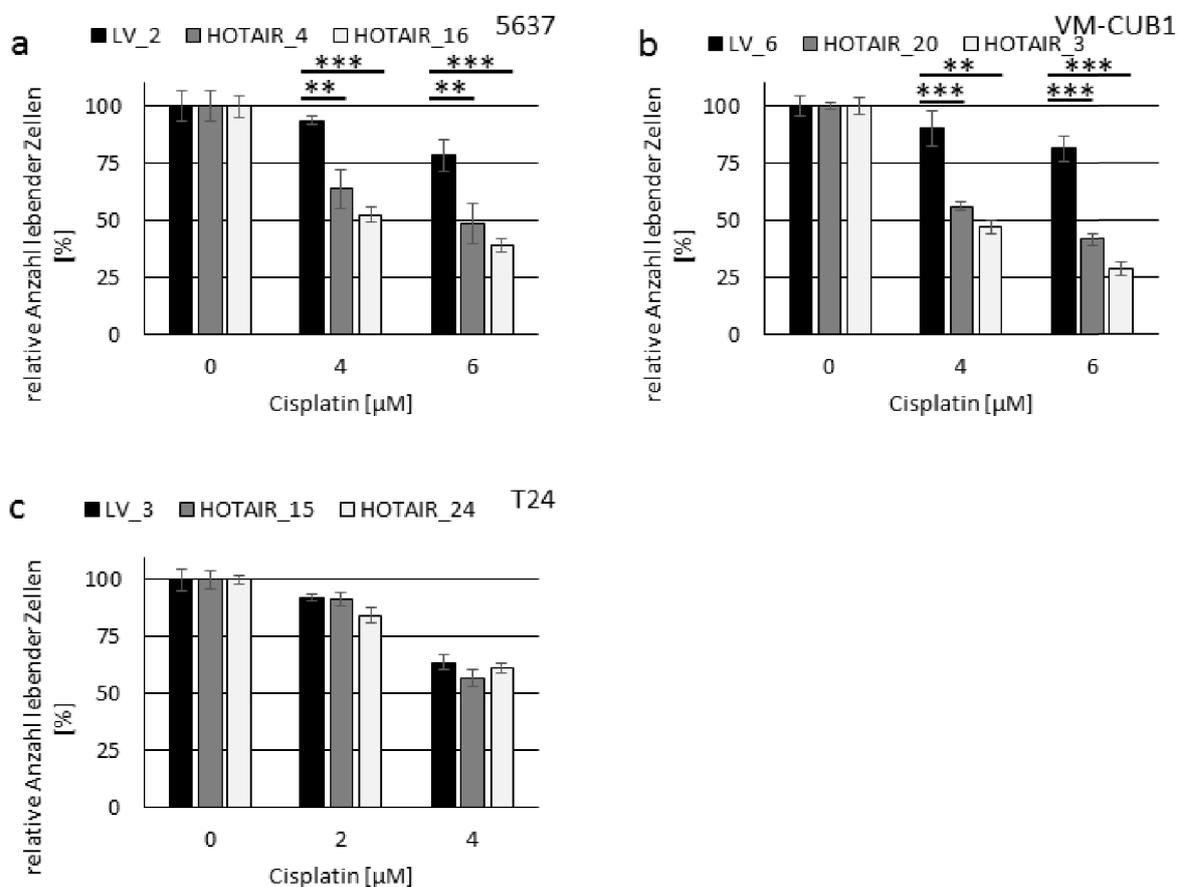


Abbildung 5.27: Veränderung der Cisplatin-Sensitivität in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression.

Mittels MTT-Test wurde die relative Anzahl lebender Zellen nach 48 h Cisplatin-Behandlung gemessen. Es ist der Mittelwert von Quadruplikat-Ansätzen gezeigt. Der Wert der unbehandelten Zellen wurde auf 100 % normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) 5637 (b) VM-CUB1 (c) T24.

5.6 EZH2, SUZ12 und LSD1 Status der UC-Zelllinien

Die lncRNA HOTAIR rekrutiert nach heutigem Stand der Literatur die Chromatin-modifizierenden Komplexe *polycomb repressive complex 2* (PRC2) und *REST corepressor 1/RE1-silencing transcription factor* (CoREST/REST, CoREST wird auch RCOR1 abgekürzt) zu Zielgenen. Tsai et al. beschrieben die PRC2-Komponenten *enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)* (EZH2) und *SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit* (SUZ12) und die CoREST/REST-Komponente *lysine (K)-specific demethylase 1A* (KDM1A oder LSD1) als direkten Interaktionspartner von HOTAIR [74]. Es wäre also denkbar, dass Unterschiede im Expressionsniveau dieser Chromatinregulatoren die Wirkung von HOTAIR modulieren und so die beobachteten Unterschiede zwischen Zelllinien und an einzelnen Genen erklären können. Deshalb wurde die endogene Expression dieser drei Gene mittels qRT-PCR im vorhandenen UC-Zelllinienset untersucht. Das UC-Zelllinienset setzte sich aus 15 UC-Zelllinien und drei normalen Kontrollen zusammen, nämlich zwei uroepitheliale Primärzellkulturen (UP) und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.

Alle drei Gene wurden in allen UC-Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen erhöht exprimiert (Abb. 5.28). Im Ausmaß der Erhöhung existierten zwar Unterschiede, doch waren diese nicht so deutlich, dass sie die beobachteten Unterschiede erklären könnten. Zum Beispiel war die EZH2-Expression in der UC-Zelllinie 5637 höher als in VM-CUB1 und die SUZ12- und LSD1-Expression unterschied sich kaum, obwohl nach HOTAIR-Überexpression teilweise gegensätzliche Effekte auftraten.

Die Protein-Expression der beiden Komponenten des PRC2 (EZH2 und SUZ12) wurde mittels Western Blot in 12 UC-Zelllinien und einer UP als Kontrolle untersucht. Auch auf Proteinebene war die Expression von EZH2 und SUZ12 gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht.

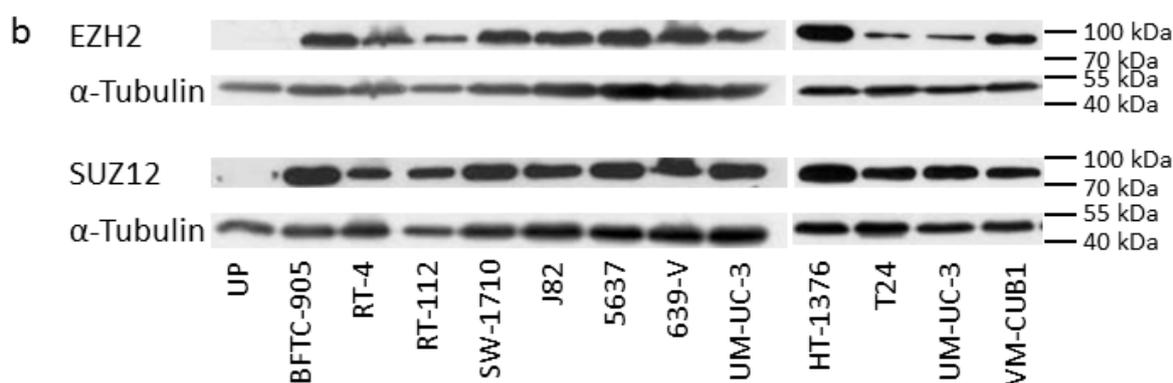
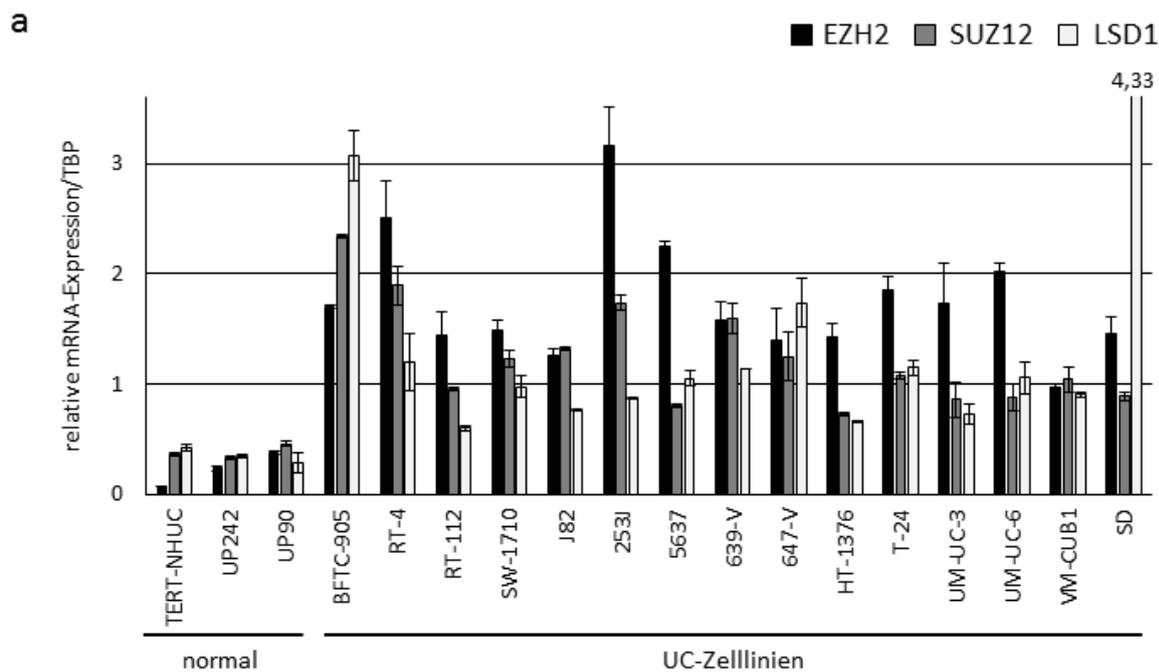


Abbildung 5.28: Expressionsbestimmung der Chromatinregulatoren EZH2, SUZ12 und LSD1 in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.

(a) Die *EZH2*-, *SUZ12*- und *LSD1*-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die UC-Zelllinien sind nach ihrer Herkunft aus papillären (BFTC905 - J82) oder invasiven Tumoren angeordnet. (b) Protein-Expression in Ganzzelllysaten in 12 UC-Zelllinien im Vergleich zu einer uroepithelialen Primärzellkultur (UP).

5.7 Veränderungen im Genexpressionsprofil der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression

Die funktionellen Analysen der HOTAIR stabil überexprimierenden UC-Zelllinien ergaben deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei anderen Tumorentitäten wiesen die HOTAIR überexprimierenden Klone der UC-Zelllinie VM-CUB1 einen aggressiven Phänotyp auf, der sich durch erhöhte Proliferation, Klonogenität, Migrations- und Invasionsaktivität auszeichnet. Außerdem wurden Anzeichen einer EMT beobachtet. Im Gegensatz dazu wiesen die HOTAIR überexprimierenden Klone der UC-Zelllinie 5637 eine verringerte Proliferation und Klonogenität, sowie ein verringertes Migrations- und Invasionspotential auf. Um Erklärungen für diese gegensätzlichen Effekte zu finden, wurde von beiden UC-Zelllinien ein mRNA-Expressionsprofil über eine Microarray-Analyse erstellt. Die Microarray-Analyse wurde jeweils von dem Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und dem Leervektor-Klon (LV) durchgeführt. Drei verschiedene RNA-Präparationen jedes Klons wurden auf einen Affymetrix PrimeView 3'IVT Array hybridisiert. Der Vergleich zwischen LV- und HOTAIR-Klonen offenbarte eine sehr große Anzahl differentiell exprimierter Gene (bei $p < 0,01$ Benjamini-Hochberg-Test). Es wurden 8634 Gene in der UC-Zelllinie VM-CUB1 und 5549 Gene in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression differentiell exprimiert. Davon waren jeweils ca. 50 % vermindert bzw. verstärkt exprimiert. 2835 Gene waren in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression verändert exprimiert (Abb. 5.29 a). Von diesen Genen waren 784 vermindert und 836 erhöht exprimiert. Weiterhin wurden 1215 Gene in den beiden UC-Zelllinien in entgegengesetzter Richtung verändert exprimiert. Davon wurden 589 Gene in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert und in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression vermindert vorgefunden. Der gegenteilige Effekt wurde für 626 Gene beobachtet (Abb. 5.29 b).

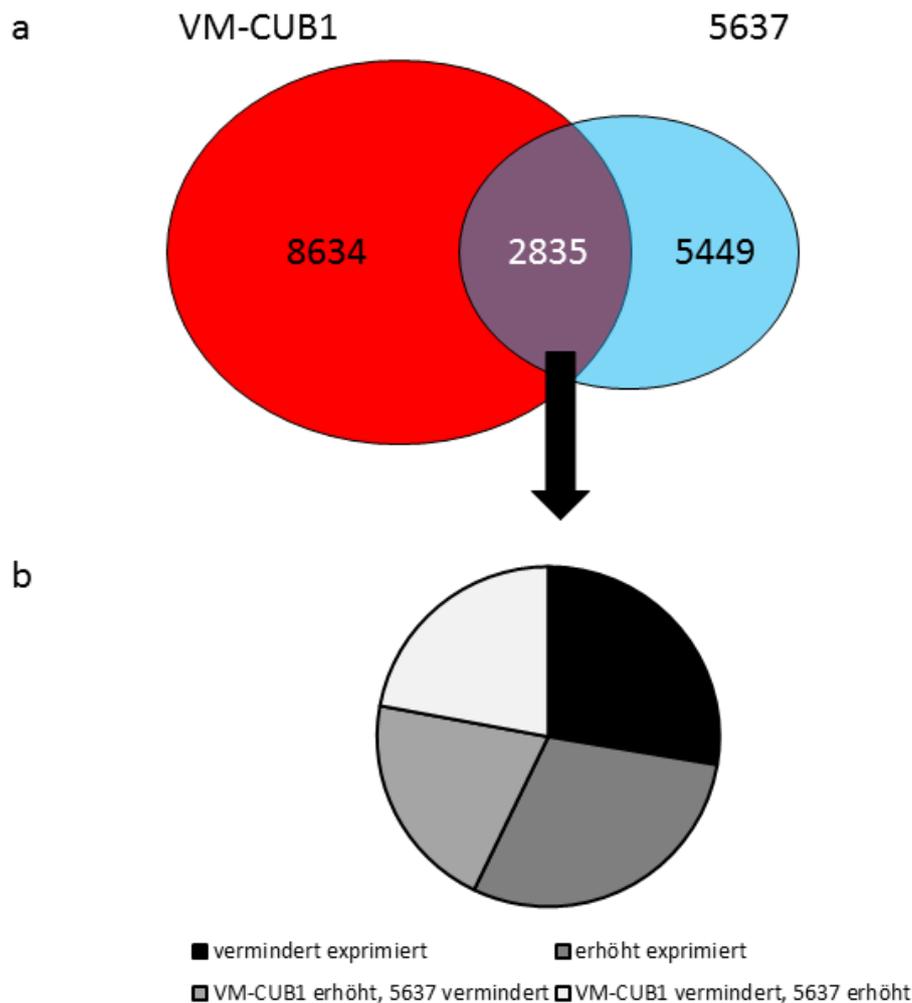


Abbildung 5.29: Ergebnis des mRNA-Expressionsarrays der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

(a) Venn-Diagramm der verändert exprimierten Gene in VM-CUB1_HOTAIR_20 und 5637_HOTAIR_4 verglichen mit den jeweiligen Leervektor-Kontrollen. Drei verschiedene RNAs jedes Klonen wurden auf einen Affymetrix PrimeView 3'IVT Array hybridisiert. Verändert exprimierte Gene mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ (Benjamini-Hochberg-Test) wurden berücksichtigt. (b) Kreisdiagramm der in beiden UC-Zelllinien nach stabiler HOTAIR-Überexpression verändert exprimierten Gene, aufgeteilt in folgende vier Gruppen: Schwarz = in beiden UC-Zelllinien vermindert exprimierte Gene, Dunkelgrau = in beiden UC-Zelllinien erhöht exprimierte Gene, Grau = in VM-CUB1 erhöht und in 5637 vermindert exprimierte Gene, Hellgrau = in VM-CUB1 vermindert und in 5637 erhöht exprimierte Gene.

Um einen Überblick über die Gengruppen zu bekommen, die in den beiden UC-Zelllinien nach stabiler HOTAIR-Überexpression verändert exprimiert wurden, wurde eine *Gene-Ontology* (GO) -Analyse mit der öffentlich zugänglichen GO-Analyse-Software DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp) durchgeführt. Dafür wurden nur nach Benjamini-Hochberg Adjustierung signifikant veränderte Gene mit einem p-Wert $< 0,01$ und einer mindestens

anderthalbfachen Veränderung berücksichtigt. Diese Kriterien erfüllten in der UC-Zelllinie VM-CUB1 5559 und in der UC-Zelllinie 5637 2666 veränderte Gene.

Zunächst wurden die Gene untersucht, die in VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression differentiell exprimiert waren. Diese Gene waren überwiegend an der Regulation des Zelltods, des Zellzyklus und der Zellbewegung beteiligt. Dies stimmt sehr gut mit den beobachteten funktionellen Effekten überein. Weiterhin wurden auch GO-Gruppen wie Intrazellulärer Transport und Protein-Lokalisation als signifikant bewertet. Dies spricht dafür, dass die lncRNA HOTAIR über die Rekrutierung von Proteinkomplexen Einfluss auf die Genexpression nimmt (Abb. 5.30 a).

Anschließend wurden die differentiell veränderten Gene nach der Richtung der Veränderung gruppiert. Dabei ergab die GO-Analyse der Gene, die nach HOTAIR-Überexpression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 vermindert vorlagen, keine signifikanten GO-Gruppen. Die Gene, die nach HOTAIR-Überexpression signifikant erhöht exprimiert wurden, gehörten demgegenüber zu GO-Gruppen wie Regulation der Zellbewegung und Migration, Regulation der Transkription, intrazellulärer Transport und Protein-Lokalisation (Abb. 5.30 b). Somit scheinen die beobachteten funktionellen Effekte überwiegend durch eine Aktivierung von Genen hervorgerufen zu werden.

Als nächstes wurden die differentiell veränderten Gene in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression analysiert. Analog zur Vorgehensweise mit der UC-Zelllinie VM-CUB1 erfolgte zuerst eine GO-Analyse aller differentiell exprimierten Gene. So waren in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression ähnlich wie in der UC-Zelllinie VM-CUB1 Gene differentiell exprimiert, die an der Regulation der Zellproliferation, der Zellteilung und des Zelltods beteiligt waren und die Zellmigration beeinflussen. Zusätzlich wurden auch GO-Gruppen wie Antwort auf Verwundung, Hypoxie und Hormonstimulierung angezeigt (Abb. 5.31 a).

Anschließend wurden die Gene in der UC-Zelllinie 5637 untersucht, die nach HOTAIR-Überexpression verstärkt exprimiert waren. Diese Gene gehören zu GO-Gruppen wie Zellproliferation, Zellmigration und Zelltod, ähnlich wie in VM-CUB1. Außerdem wurden Gene verstärkt exprimiert, die an der Immunantwort, der Antwort auf Verwundung, Hypoxie, Entzündung und Hormonstimulierung beteiligt sind (Abb. 5.31 b). Solche Veränderungen der Genexpression könnten ursächlich für die beobachteten gegensätzlichen funktionellen Effekte sein.

Zuletzt wurden auch in der UC-Zelllinie 5637 Gene betrachtet, die nach HOTAIR-Überexpression signifikant vermindert exprimiert waren. Dies waren vor allem Gene, die an der RNA-Prozessierung beteiligt sind (Abb. 5.31 c). Die GO-Analyse dieser Gene deutet eine Funktion der lncRNA HOTAIR in der Prozessierung von RNA, insbesondere der Translation und des Spleißens an.

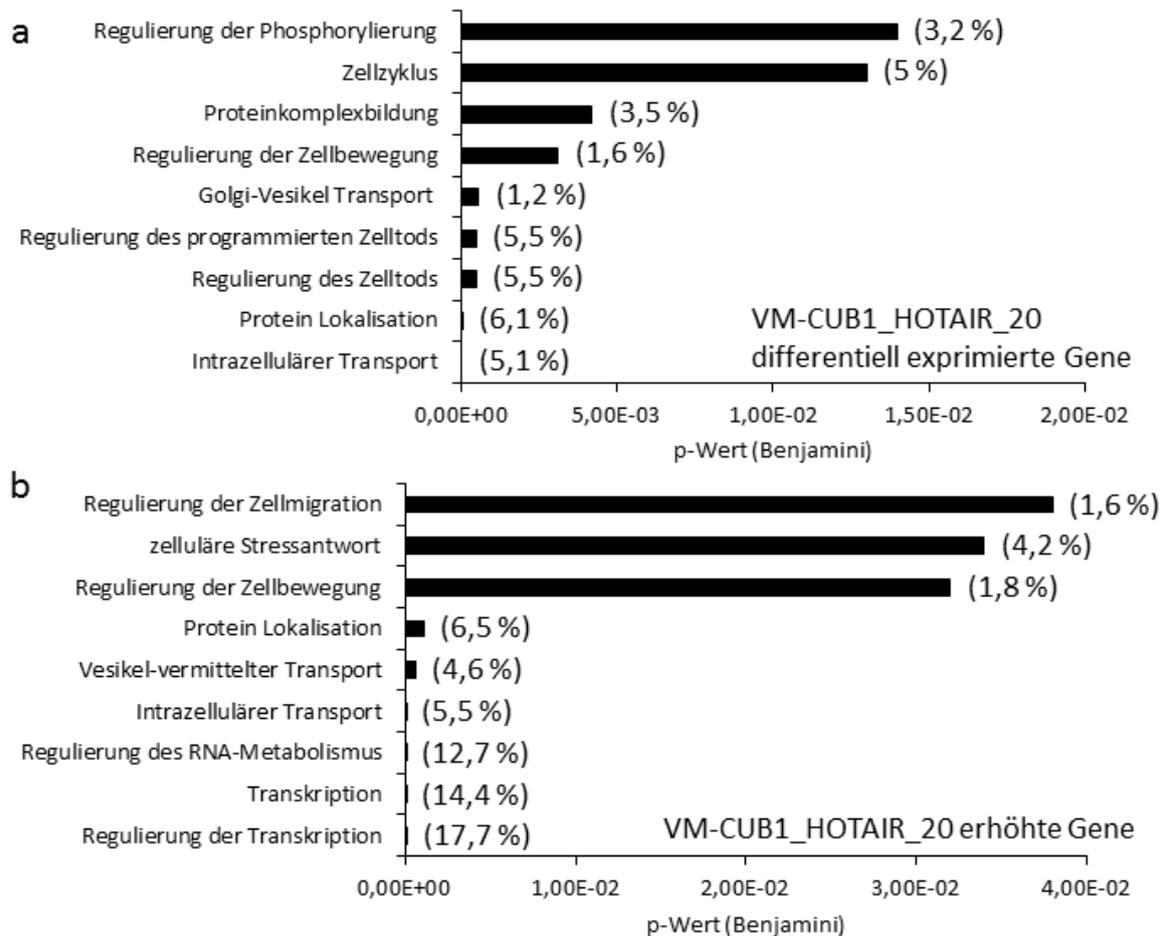


Abbildung 5.30: GO-Analyse der veränderten Gene in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Eine GO-Analyse wurde mit der öffentlich zugänglichen GO-Analyse Software DAVID durchgeführt. Aufgetragen sind die GO-Gruppen, die die höchste Signifikanz nach Benjamini-Hochberg Korrektur besaßen. Dazu wurden zum einen (a) alle Gene, die nach HOTAIR-Überexpression in VM-CUB1 differenziell exprimiert waren, und zum anderen (b) die Gene, die erhöht exprimiert waren, untersucht. Gene mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ und einer mindestens anderthalbfachen Veränderung wurden berücksichtigt. In Klammern ist der Anteil der analysierten Gene, die zu der entsprechenden GO-Gruppe zählen, in Prozent angegeben.

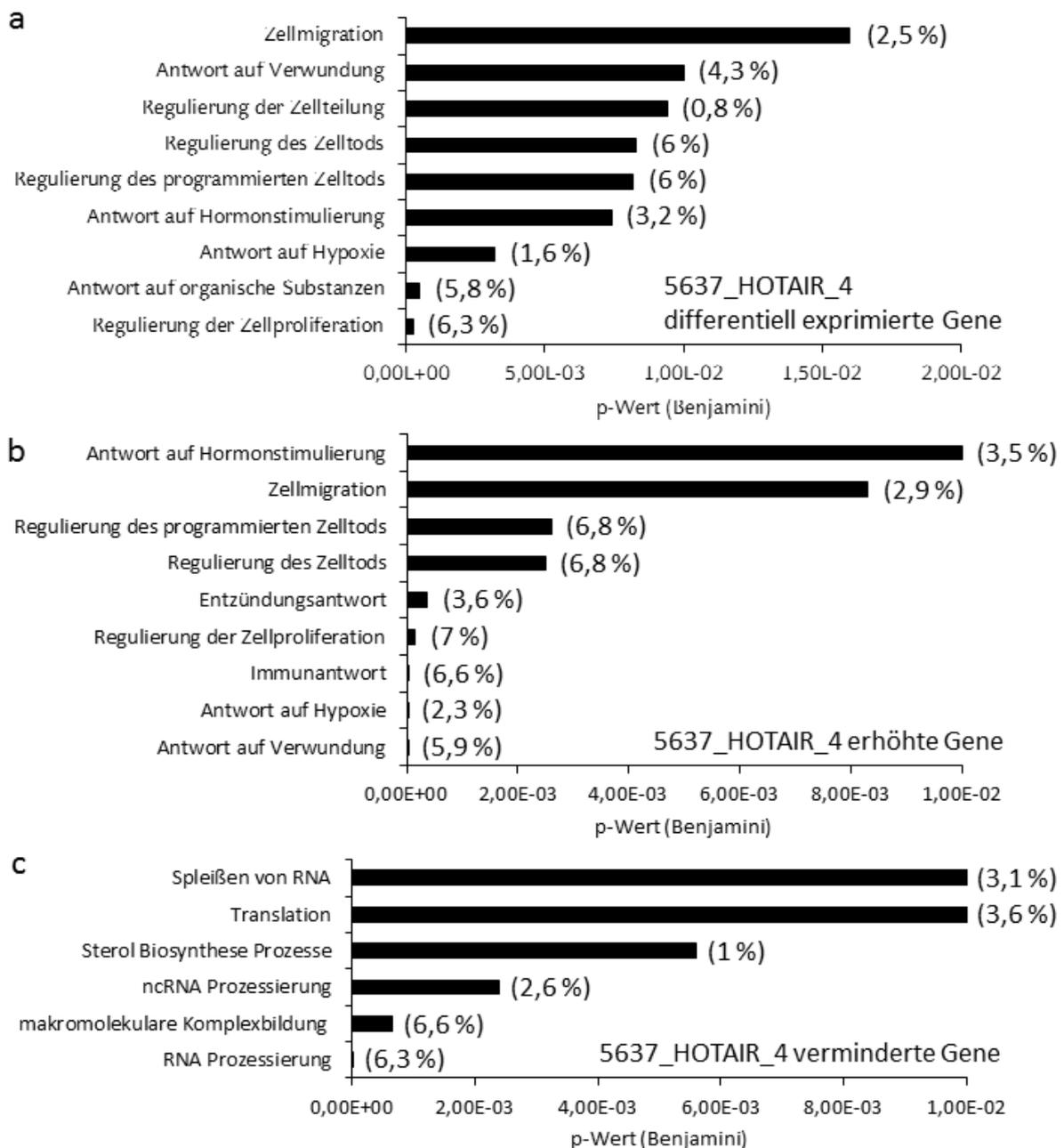


Abbildung 5.31: GO-Analyse der veränderten Gene in der UC-Zelllinie 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Eine GO-Analyse wurde mit der öffentlich zugänglichen GO-Analyse Software DAVID durchgeführt. Nach Benjamini-Hochberg Korrektur signifikante GO-Gruppen wurden dargestellt. Es wurden drei Gengruppen untersucht: (a) alle Gene, die nach HOTAIR-Überexpression in 5637 differenziell exprimiert waren, (b) Gene, die erhöht exprimiert waren, (c) Gene, die vermindert exprimiert waren. Gene mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ und einer mindestens anderthalbfachen Veränderung wurden berücksichtigt. In Klammern ist der Anteil der analysierten Gene, die zu der entsprechenden GO-Gruppe zählen, in Prozent angegeben.

Weiterhin wurden die Gene, die in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression differentiell exprimiert wurden, mittels GO-Analyse Gengruppen zugeordnet. Untersucht wurden die Gene, die mit einer adjustierten Signifikanz von $p \leq 0,01$ in beiden UC-Zelllinien verändert waren.

Als erstes wurden die Gene untersucht, die in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression vermindert vorlagen. Hier waren zum einen Gene vermindert exprimiert, die den Zellzyklus regulieren, zum anderen Gene, die an der Genexpression durch Beeinflussung der RNA Prozessierung und der Translation beteiligt sind (Abb. 5.32 a).

Im Gegensatz dazu waren Gene, die den Proteintransport und generell die zellulären Lokalisation von Proteinen beeinflussen, in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert (Abb. 5.32 b).

Eine große Anzahl von Genen war in beiden UC-Zelllinien differentiell verändert, jedoch in entgegengesetzter Richtung (Abb. 5.32 c). Diese Gene sind Teil der Regulation des Zelltods und des Zellzyklus; ihre entgegengesetzte Veränderung könnte die unterschiedlichen Effekte auf die Proliferation erklären. Weiterhin wurden Gene, die die Bildung von makromolekularen Komplexen regulieren, beeinflusst. Da für HOTAIR beschrieben ist, dass es über die Rekrutierung solcher Komplexe wirkt, könnte die Bildung von unterschiedlichen Komplexen in den jeweiligen Zelllinien zu verschiedenen Funktionen von HOTAIR und somit zu verschiedenen phänotypischen Effekten führen. Um genauere Hypothesen aufstellen zu können, wurden die entgegengesetzt veränderten Gene noch detaillierter analysiert.

Begonnen wurde hier mit der Analyse der Gene, die in der UC-Zelllinie VM-CUB1 erhöht und gleichzeitig in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression vermindert exprimiert waren (Abb. 5.33 a). Die höchste Signifikanz zeigten Gene, die an der Organisation der Untereinheiten von makromolekularen Komplexen beteiligt sind. Dies spricht wieder für die Interaktion von HOTAIR mit verschiedenen Komplexen in den einzelnen Zelllinien. Außerdem waren Gene verändert, die den Zellzyklus regulieren. Zusätzlich fielen Gene auf, die die Translation regulieren.

Gene, die den Zelltod regulieren, waren in der UC-Zelllinie VM-CUB1 vermindert und in 5637 erhöht exprimiert (Abb. 5.33 b). Dies könnte die Ursache für die deutlich verlangsamte Proliferation der 5637-Klone sein.

Zusammenfassend spiegeln sich die phänotypischen Veränderungen auch in Veränderungen der Genexpressionsprofile wieder.

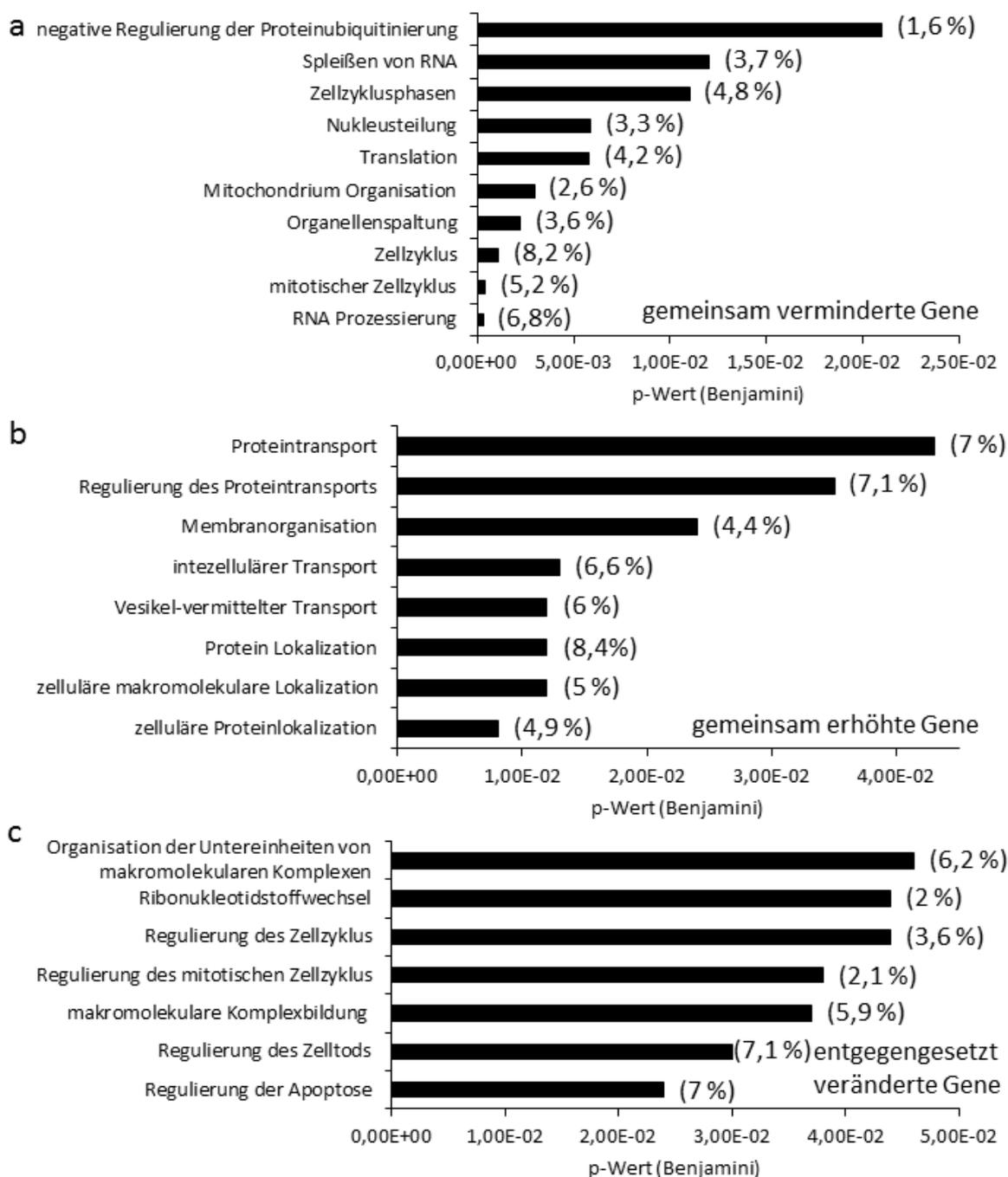


Abbildung 5.32: GO-Analyse der sowohl in der UC-Zelllinie VM-CUB1 als auch in der 5637 differentiell exprimierten Gene nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

Eine GO-Analyse wurde mit der öffentlich zugänglichen GO-Analyse Software DAVID durchgeführt. Die nach Benjamini-Hochberg Korrektur signifikanten GO-Gruppen sind gezeigt. Untersucht wurden die Gene, die in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression differentiell exprimiert waren. Dazu wurden (a) gemeinsam verminderte Gene, (b) erhöhte Gene und (c) entgegengesetzt veränderte Gene untersucht. Gene mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ und einer mindestens anderthalbfachen Veränderung wurden berücksichtigt. In Klammern ist der Anteil der analysierten Gene, die zu der entsprechenden GO-Gruppe zählen, in Prozent angegeben.

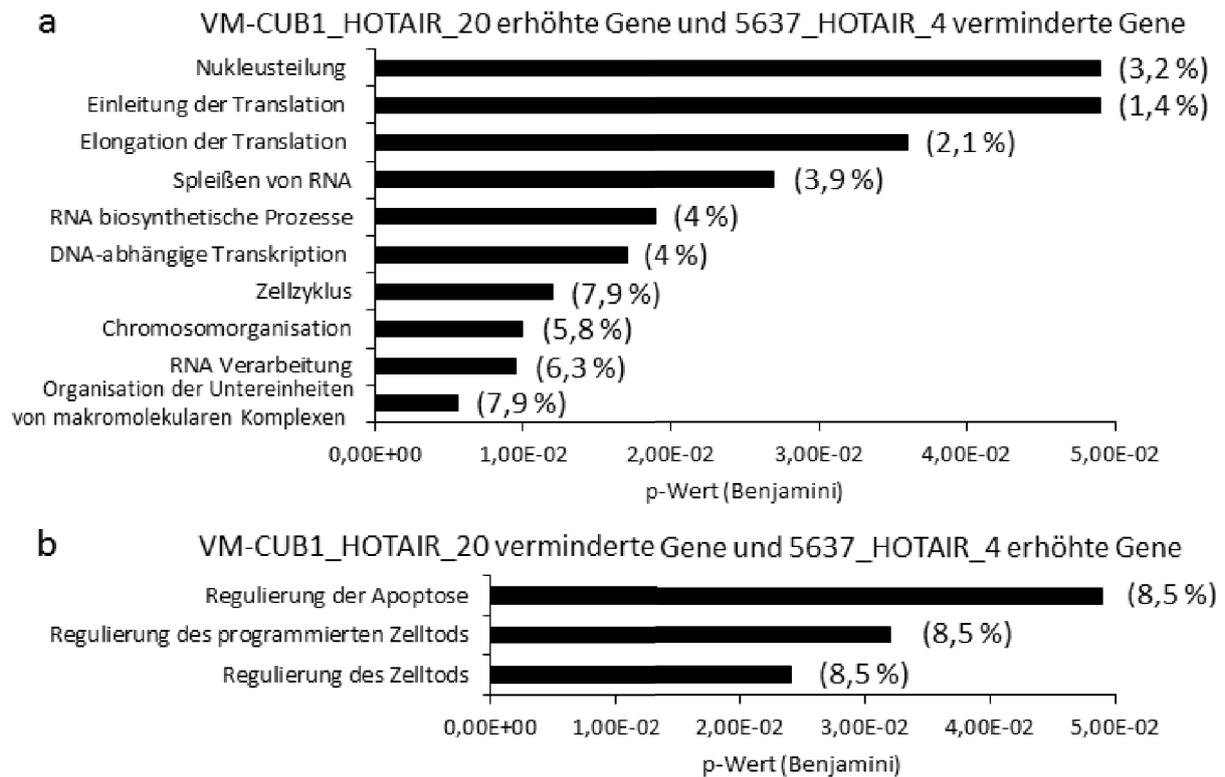


Abbildung 5.33: GO-Analyse der in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5673 nach HOTAIR-Überexpression entgegengesetzt veränderten Gene.

Eine GO-Analyse wurde mit der öffentlich zugänglichen GO-Analyse Software DAVID durchgeführt. Untersucht wurden die Gene, die in beiden Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression gegensätzlich verändert waren. Dazu wurden (a) in VM-CUB1 erhöhte und in 5637 vermindert Gene und (b) umgekehrt veränderte Gene untersucht. Gene mit einer adjustierten signifikanten Veränderung von $p < 0,01$ in beiden UC-Zelllinien wurden berücksichtigt. In Klammern ist der Anteil der analysierten Gene, die zu der entsprechenden GO-Gruppe zählen, in Prozent angegeben

5.7.1 Veränderungen im HOX-Genexpressionsprofil der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression

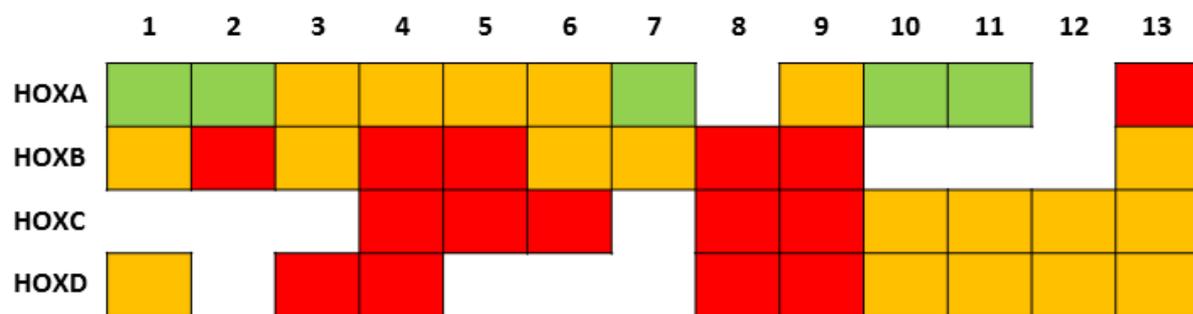
Da das Gen für die lncRNA HOTAIR im HOXC-Cluster lokalisiert ist und Effekte auf posteriore *HOXD*-Gene beschrieben wurden, wurden die Expressionsveränderungen der HOX-Gene nach stabiler HOTAIR-Überexpression in den beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 gesondert betrachtet.

Die RNA-Expressionsanalyse ergab eine signifikant veränderte Expression einiger HOX-Gene ($p < 0,01$) in beiden UC-Zelllinien, die jedoch unterschiedlich stark ausfiel.

Während in der UC-Zelllinie VM-CUB1 20 HOX-Gene signifikant differentiell exprimiert wurden, waren in der UC-Zelllinie 5637 nur sechs HOX-Gene verändert (Abb. 5.34). Gemeinsam in beiden Zelllinien wurde die Expression der Gene *HOXA1* und *HOXA11*

vermindert und die von *HOXB8* erhöht. Die Gene *HOXC6* und *HOXD3* wurden zwar auch in beiden UC-Zelllinien differentiell verändert exprimiert, jedoch in entgegengesetzter Richtung. In beiden Zelllinien wurden je fünf HOX-Gene vermindert exprimiert. In der UC-Zelllinie 5637 wurde ein HOX-Gen und in der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurden 15 HOX-Gene erhöht exprimiert. Für die als HOTAIR-Zielgene beschriebenen posterioren *HOXD*-Gene wurden unterschiedliche Veränderungen beobachtet. Die Gene *HOXD8* und *HOXD9* wurden in der UC-Zelllinie VM-CUB1 erhöht exprimiert. *HOXD10* wurde in der UC-Zelllinie 5637 vermindert exprimiert. Außerdem wurde in der UC-Zelllinie VM-CUB1 eine erhöhte Expression der zentralen *HOXB*-, *HOXC*- und *HOXD*-Gene detektiert.

VM-CUB1 LV_6 vs. HOTAIR_20



5637 LV_2 vs HOTAIR_4

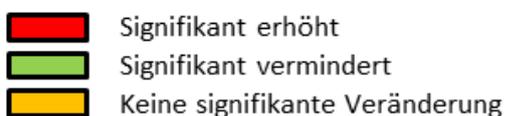
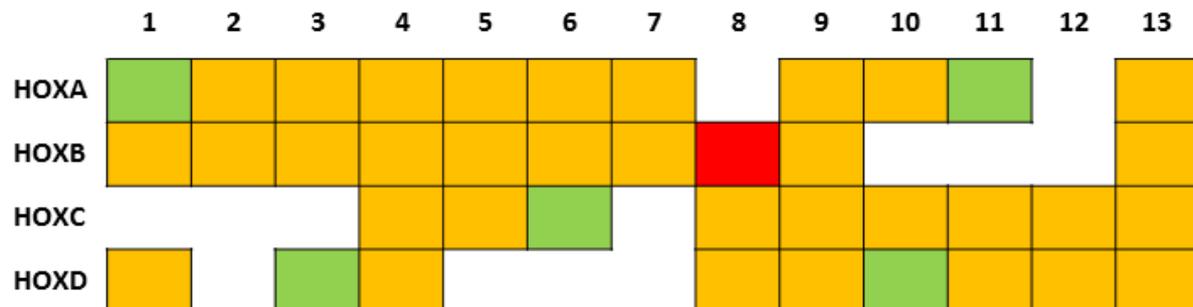


Abbildung 5.34: Veränderung des HOX-Genexpressionsprofils in stabil HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die Expression der HOX-Gene nach HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 wurde mittels RNA-Expressionsarray bestimmt. Verglichen wurden RNAs von VM-CUB1_HOTAIR_20 und 5637_HOTAIR_4 mit den jeweiligen Leervektor-Kontrollen. Drei verschiedene RNAs jedes Klons wurden auf einen Affymetrix PrimeView 3'IVT Array hybridisiert. Die signifikanten Veränderungen wurden mittels Benjamini-Hochberg-Test ($p < 0,01$) ermittelt. Rot: signifikant erhöht exprimierte Gene. Grün: Signifikant vermindert exprimierte Gene. Gelb: Keine signifikante Veränderung der Genexpression.

Zur Validierung der Array-Ergebnisse wurde die mRNA-Expression ausgewählter HOX-Gene mittels qRT-PCR bestimmt, dabei wurde auch die RNA-Expression des zweiten HOTAIR-Klons mit einer weniger starken HOTAIR-Überexpression gemessen, um Hinweise auf eine Dosis-abhängige Regulation zu erzielen. Um darüber hinaus den zugrunde liegenden Mechanismus der differentiellen Genexpression zu identifizieren, wurde mittels Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) an den Genen *HOXA11*, *B2*, *C6* und *D10* jeweils im HOTAIR-Klon mit der stärkeren Expression untersucht, ob die beobachteten HOX-Expressionsveränderungen mit einer Veränderung der Histonmethylierung an H3K27 und H3K4 einhergingen. Im Folgenden werden die Veränderungen der einzelnen HOX-Loci A bis D nacheinander beschrieben.

Die Gene *HOXA1* und *HOXA11* waren im Expressionsarray in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression vermindert exprimiert. Die Verifizierung dieses Ergebnisses mittels qRT-PCR bestätigte dies in beiden VM-CUB1 HOTAIR-Klonen und im 5637 HOTAIR_4-Klon. Im 5637 HOTAIR_16-Klon war *HOXA1* unverändert, aber *HOXA11* signifikant erhöht exprimiert. Somit scheint *HOXA11* in der UC-Zelllinie 5637 Dosis-abhängig reguliert zu werden. Die stark verminderte *HOXA11* Expression in den VM-CUB1-HOTAIR-Klonen korreliert mit einer stark verminderten Trimethylierung an H3K4 und einer Zunahme der Di/Trimethylierung an H3K27. Im 5637 HOTAIR_4-Klon nimmt an *HOXA11* sowohl die Trimethylierung an H3K4 als auch die Di/Trimethylierung an H3K27 zu (Abb. 5.35).

Eine verstärkte Expression von *HOXA13* nach HOTAIR-Überexpression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 konnte verifiziert werden, jedoch wurde im HOTAIR_3-Klon eher ein vermindertes Expressionsniveau festgestellt. Auch in den 5637-Klonen wurden verschiedene *HOXA13* Expressionsniveaus gemessen. So konnte im HOTAIR_4-Klon die unveränderte Expression verifiziert werden, allerdings wurde *HOXA13* im 5637_HOTAIR_16-Klon, wie im VM-CUB1_HOTAIR_20-Klon deutlich erhöht exprimiert. Die Expression von *HOXA13* scheint also in beiden UC-Zelllinien Dosis-abhängig von HOTAIR reguliert zu werden (Abb. 5.35).

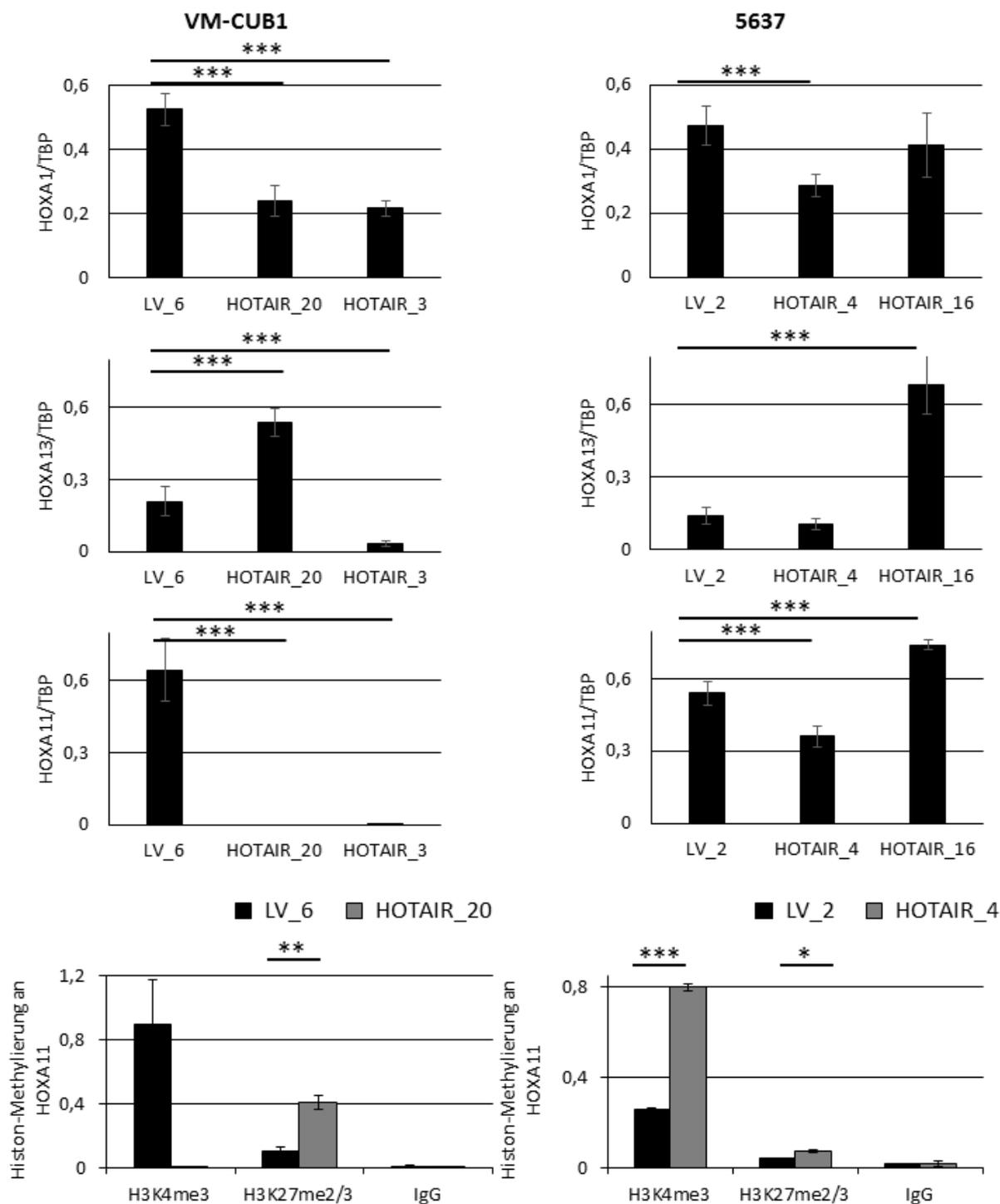


Abbildung 5.35: mRNA-Expression der Gene *HOXA1*, *A11* und *A13* und Analyse der Histon-Methylierung an *HOXA11* in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die Expression von *HOXA1*, *A11* und *A13* wurde mittels qRT-PCR in zwei HOTAIR überexprimierenden Klonen und einem LV-Klon der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die HOTAIR-Überexpression war im HOTAIR_20 bzw. HOTAIR_4 stärker als im HOTAIR_3 bzw. HOTAIR_16-Klon. Die Histonmethylierung an H3K4 und H3K27 wurde jeweils im HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und dem LV-Klon mittels ChIP ermittelt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit einem unspezifischen IgG durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Während *HOXB2* im Expressionsarray in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert wurde, war in 5637 keine signifikante Veränderung zu detektieren. Die Stimulation von *HOXB2* konnte in VM-CUB1 für beide HOTAIR-Klone und damit Dosis-unabhängig verifiziert werden. Überraschenderweise ergab die ChIP-Analyse eine signifikante Abnahme der Trimethylierung an H3K4. Dies spricht eher für eine Inaktivierung der Gentranskription. Zu einer aktiven Transkription passt jedoch die leichte Abnahme der Di/Trimethylierung an H3K27. Die *HOXB2*-Expression veränderte sich in den 5637 HOTAIR-Klonen in entgegengesetzte Richtungen und war somit wieder Dosis-abhängig. So nahm sie im HOTAIR_4-Klon zu und im HOTAIR_16-Klon ab. Die Zunahme der *HOXB2*-Expression im 5637_HOTAIR_4-Klon korreliert mit einer leichten Abnahme der Di/Trimethylierung an H3K27 (Abb. 5.36).

Für *HOXB13* wurde im Expressionsarray für beide UC-Zelllinien keine signifikante Veränderung der Expression festgestellt. Dieser Befund wurde für die 5637-Klone verifiziert. In beiden VM-CUB1 HOTAIR-Klonen wurde *HOXB13* jedoch erhöht exprimiert. In beiden UC-Zelllinien wurde kein Hinweis auf eine Dosis-abhängige Regulation von *HOXB13* gefunden (Abb. 5.36).

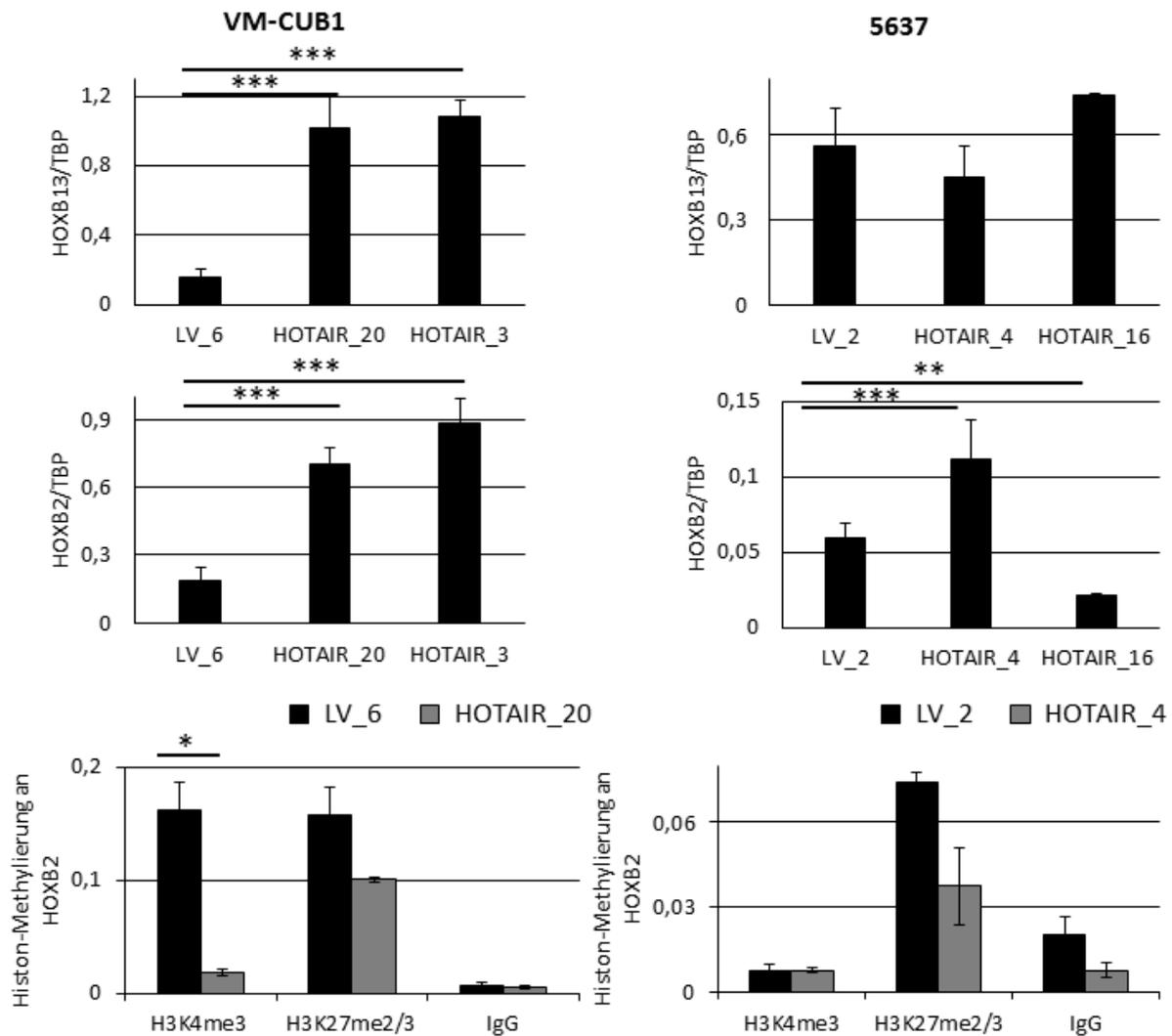


Abbildung 5.36: mRNA-Expression der Gene *HOXB2* und *B13* und Analyse der Histon-Methylierung an *HOXB2* in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die Expression von *HOXB2* und *B13* wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Gemessen wurden jeweils zwei HOTAIR-Klone und der LV. Der Klon HOTAIR_20 bzw. HOTAIR_4 besaß eine stärkere HOTAIR-Überexpression als der Klon HOTAIR_3 bzw. HOTAIR_16. Die Histonmethylierung an H3K4 und H3K27 wurde jeweils im HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und dem LV-Klon mittels ChIP ermittelt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit einem unspezifischen IgG durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Im *HOXC*-Locus konnte eine Steigerung der *HOXC6*-Expression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression festgestellt werden. Im Verifizierungsexperiment wurde diese auch im zweiten HOTAIR-Klon gemessen und war somit Dosis-unabhängig. Die Expressionserhöhung ging im HOTAIR_20-Klon mit einer Verminderung sowohl der Trimethylierung an H3K4 als auch der Di/Trimethylierung an H3K27 einher. Somit korrelierten auch hier die Expressionsveränderungen nicht vollständig mit den Histonmethylierungsveränderungen (Abb. 5.37).

Im Gegensatz zur UC-Zelllinie VM-CUB1 wurde in der UC-Zelllinie 5637 im Microarray eine Verminderung der *HOXC6*-Expression beobachtet. Diese konnte in der qRT-PCR nicht verifiziert werden. Unerwartet war die Trimethylierung an H3K4 erhöht. Diese Veränderung passte zur detektierten erhöhten Expression von *HOXC6* im HOTAIR_16-Klon (Abb. 5.37)

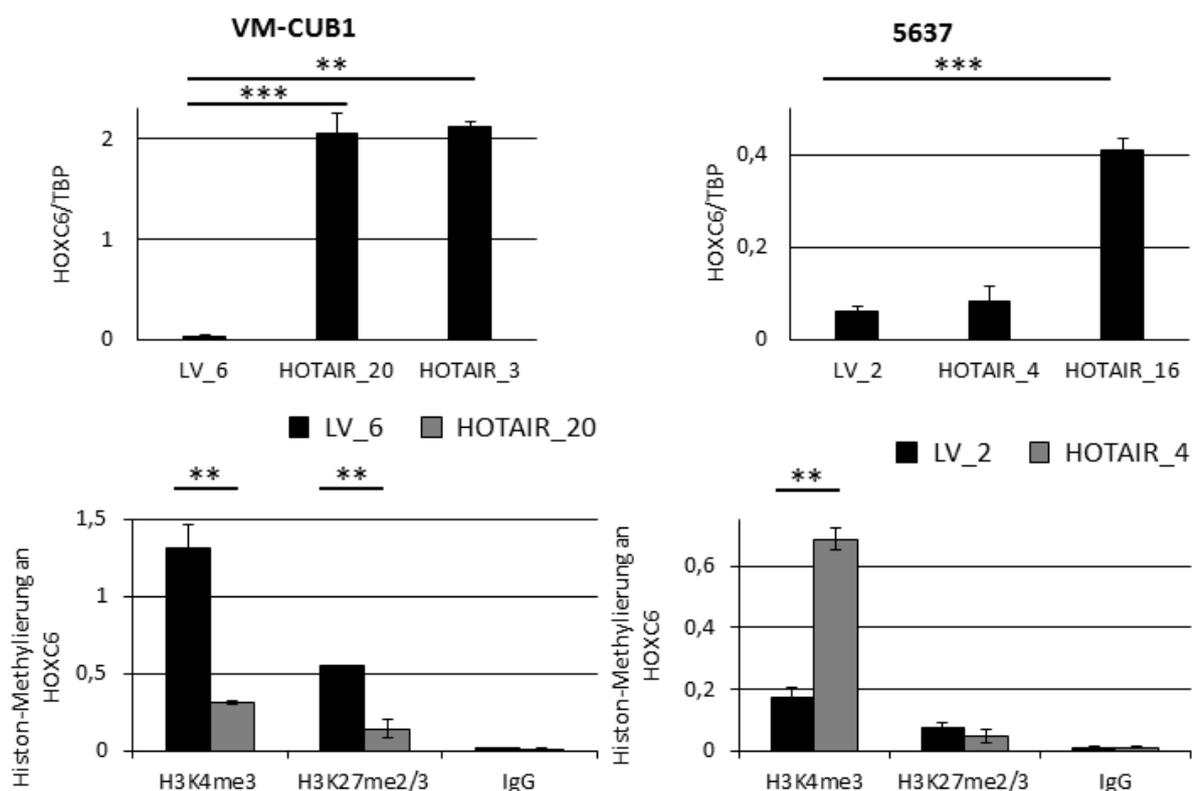


Abbildung 5.37: mRNA-Expression und Analyse der Histon-Methylierung des Gens *HOXC6* in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die *HOXC6*-Expression wurde mittels qRT-PCR in jeweils zwei HOTAIR-Klonen mit unterschiedlich starker HOTAIR-Expression (HOTAIR_20 > HOTAIR_3, HOTAIR_4 > HOTAIR_16) und einem LV bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Histonmethylierung an H3K4 und H3K27 wurde jeweils im HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und dem LV-Klon mittels ChIP ermittelt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit einem unspezifischen IgG durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Zuletzt wurden drei Gene des HOXD-Locus näher untersucht. Das anteriore Gen *HOXD3* wurde in der UC-Zelllinie VM-CUB1 erhöht, aber in 5637 vermindert nach HOTAIR-Überexpression exprimiert. Für die UC-Zelllinie VM-CUB1 konnte diese *HOXD3*-Erhöhung auch im zweiten HOTAIR-Klon verifiziert werden. Die verringerte *HOXD3*-Expression in 5637 war nur als Tendenz verifizierbar (Abb. 5.38).

Auch *HOXD9* wurde in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert und in 5637 wurde keine signifikante Veränderung detektiert. Die Überexpression konnte in VM-CUB1 für beide HOTAIR-Klone verifiziert werden und ist also Dosis-unabhängig. Für die HOTAIR-Klone der 5637 wurde einheitlich eine verminderte *HOXD9*-Expression gemessen (Abb. 5.38).

Schließlich wurde die *HOXD10*-Expression validiert. *HOXD10* war in VM-CUB1 sehr gering exprimiert und wurde nach stabiler HOTAIR-Expression nicht verändert. Da *HOXD10* als HOTAIR-Zielgen beschrieben wurde, wurde trotzdem die Histonmethylierung analysiert. Die Di/Trimethylierung an H3K27 war signifikant erhöht, aber eine daraus resultierende Transkriptionsinaktivierung von *HOXD10* konnte - vermutlich auf Grund der sehr geringen endogenen Expression - nicht detektiert werden. In der UC-Zelllinie 5637 war *HOXD10* endogen gut messbar und so konnte eine Expressionsabnahme nach stabiler HOTAIR-Überexpression in beiden HOTAIR-Klonen verifiziert werden. Die Histonmethylierung änderte sich jedoch nicht (Abb. 5.38).

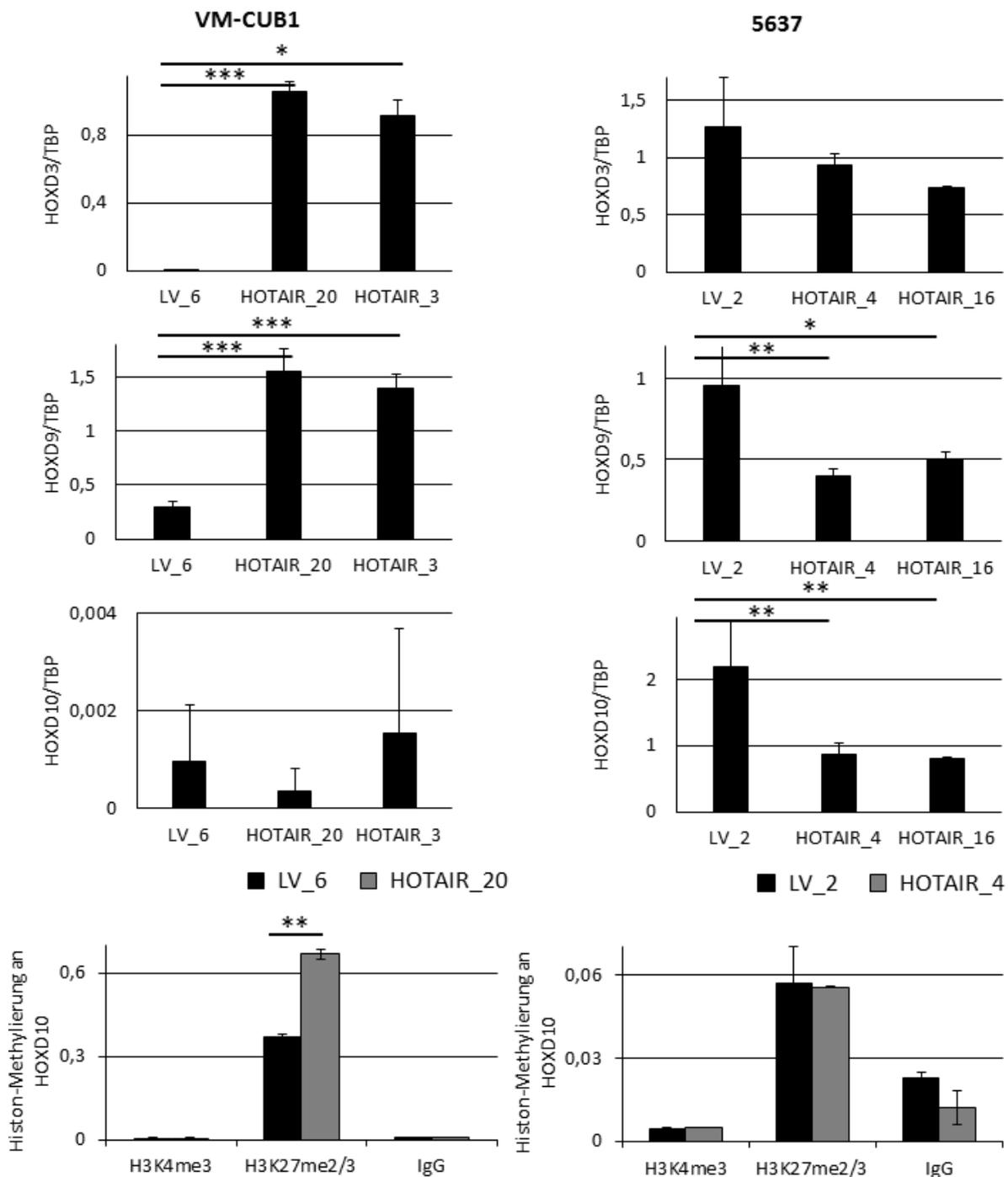


Abbildung 5.38: mRNA-Expression der Gene *HOXD3*, *D9* und *D10* und Analyse der Histon-Methylierung an *HOXD10* in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die Expression von *HOXD3*, *D9* und *D10* wurde mittels qRT-PCR in jeweils zwei HOTAIR-Klonen mit unterschiedlich starker HOTAIR-Expression (HOTAIR_20 > HOTAIR_3, HOTAIR_4 > HOTAIR_16) und einem LV-Klon bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Histonmethylierung an H3K4 und H3K27 wurde jeweils im HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression und dem LV-Klon mittels ChIP ermittelt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit einem unspezifischen IgG durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.7.2 Vergleich der eigenen Expressionsdaten mit publizierten Daten zum Ösophagus- und Mammakarzinom nach ektopischer HOTAIR-Expression

Da die Analyse der UC-Zelllinien auf Zelltyp-abhängige Effekte von HOTAIR deutete, wurden die Ergebnisse des Expressionsarrays der beiden UC-Zelllinien mit dem öffentlich zugänglichen Datensatz GSE47638 verglichen. Er enthält ein Expressionsprofil der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE-180 nach HOTAIR-Überexpression [75]. HOTAIR führt dabei zu einer Steigerung der Proliferation, des verankerungsunabhängigen Wachstums, der Migration und der Invasion, ähnlich wie bei der UC-Zelllinie VM-CUB1. Für den Vergleich wurden nur Gene herangezogen, deren Expression mindestens zweifach erhöht oder erniedrigt war. Die Anzahl von differenziell exprimierten Genen nach HOTAIR-Überexpression war in der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE-180 und in der UC-Zelllinie VM-CUB1 ungefähr gleich groß; trotz der ähnlichen biologischen Effekte wurden aber nur 631 Gene gemeinsam differenziell exprimiert. Davon waren 108 Gene auch in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression verändert. Außerdem waren 165 Gene sowohl in 5637 als auch in KYSE-180 differenziell exprimiert (Abb. 5.39). Von diesen drei Gruppen differenziell exprimierter Gene wurde mittels DAVID eine GO-Analyse durchgeführt.

Die GO-Analyse für die Schnittmenge aller drei Zelllinien ergab nur eine signifikante Gruppe von Genen: Virusantwort (p (Benjamini-Hochberg) = 0,007). Zu dieser Gruppe gehörten acht (7,4 %) Gene. Weitere Gruppen von Genen, die jedoch nach Benjamini-Hochberg-Adjustierung nicht signifikant waren, waren Immun-Antwort (12 Gene), homöostatische Prozesse (12 Gene), Regulation der Zellproliferation (12 Gene) und Regulation der Fortbewegung (5 Gene). In der Schnittmenge von VM-CUB1 und KYSE-180 ergab die GO-Analyse keine nach Benjamini-Hochberg-Korrektur signifikanten GO-Gruppen. Allerdings fielen in der Analyse die Gruppen Zelladhäsion (40 Gene) und Regulation der Fortbewegung (13 Gene) auf, die gut zu den beobachteten biologischen Veränderungen passen. Auch in der Schnittmenge von 5637 und KYSE-180 erbrachte die GO-Analyse nach Benjamini-Hochberg-Adjustierung keine signifikanten GO-Gruppen. Mehrere Gene gehörten jeweils zu Gruppen wie Regulierung der Migration (6 Gene) und Regulation der Proliferation (13 Gene), die zu den biologischen Beobachtungen passten.

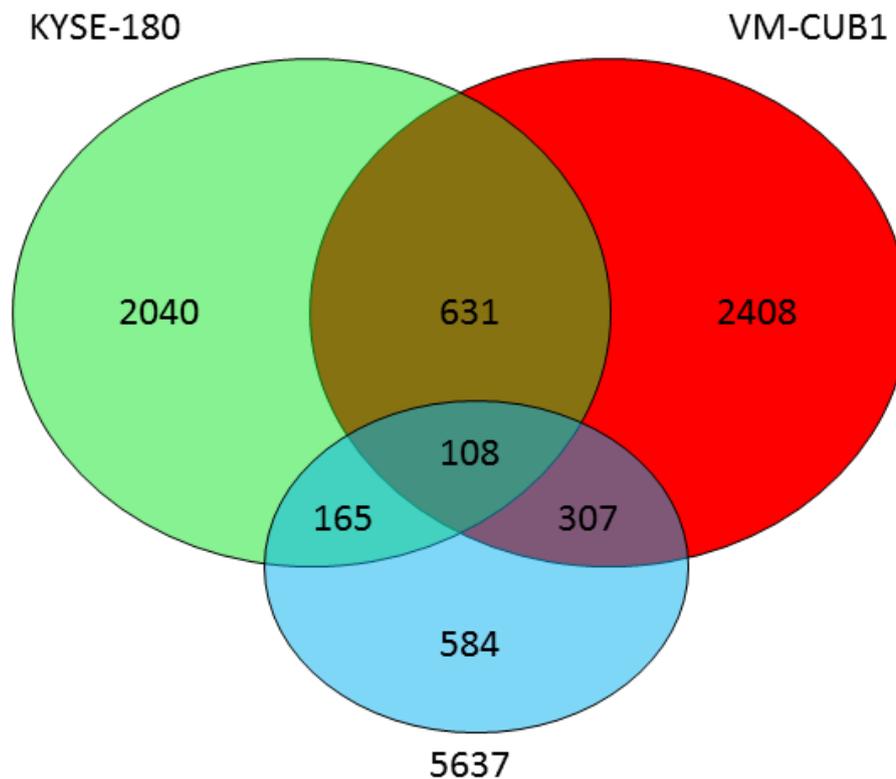


Abbildung 5.39: Vergleich des mRNA-Expressionsprofils nach HOTAIR-Überexpression in der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE-180 [75] und den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene in VM-CUB1_HOTAIR_20 und 5637_HOTAIR_4 verglichen mit den jeweiligen Leervektor-Kontrollen und des GEO-Datensatzes GSE47638, der die Genexpressions-Veränderungen nach HOTAIR-Überexpression in der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE-180 enthält. Gene die zweifach erhöht oder vermindert waren und eine Signifikanz von $p < 0,01$ (Benjamini-Hochberg-Adjustierung) aufwiesen wurden untersucht.

Außerdem wurde ein Vergleich mit der HOTAIR-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 durchgeführt [77]. Auf Grund des unterschiedlichen Studiendesigns und der Verwendung verschiedener Microarray-Plattformen wurden, wie bei Kim et al. [76], die veröffentlichten CHIP-Daten für den Vergleich herangezogen. Es wurden die 784 Gene, die in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression vermindert exprimiert wurden, mit den 686 Genen, die in der Mammakarzinom-Zelllinie nach HOTAIR-Überexpression eine Erhöhung der repressiven Histon-Modifikation H3K27me3 zeigten, verglichen (Abb. 5.40). Dieser Vergleich ergab eine Überlappung von lediglich 12 Genen: *API5*, *CHDIL*, *COG2*, *COX6C*, *CRISPLD1*, *HEATR1*, *KIAA1324L*, *METRNL*, *PCTP*, *PLAGL1*, *RASAL2*, *ZNF287*. Diese könnten gewebeübergreifende Zielgene von HOTAIR sein.

Pleiomorphic adenoma gene-like 1 (PLAGL1, auch ZAC1 oder LOT1) war auch in der Ösophagus-Zelllinie nach HOTAIR-Überexpression differentiell exprimiert. Es ist ein geprägtes Gen, das zu einem Netzwerk geprägter Gene (IGN: *imprinted gene network*) gehört

[99]. Der Einfluss einer HOTAIR-Expressionsveränderung auf Gene dieses Netzwerkes wurde näher untersucht, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben.

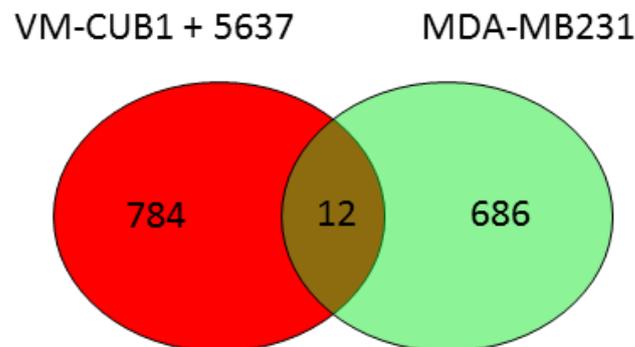


Abbildung 5.40: Vergleich zwischen gemeinsam verringerten Genen der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression und Genen, die eine erhöhte H3K27-Methylierung nach HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 [77] zeigten.

In Rot ist die Anzahl der Gene, die nach HOTAIR-Überexpression in beiden UC-Zelllinien vermindert exprimiert wurden dargestellt und in Grün die Anzahl der Gene, die nach HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 eine erhöhte Trimethylierung an H3K27 aufwiesen.

5.8 Effekte einer stabilen HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 auf die Expression von geprägten Genen

Da Effekte auf das geprägte Gen *PLAGL1* sowohl in der Studie zum Mammakarzinom als auch in der eigenen Studie im UC auftraten, stellte sich die Frage, ob die ektopische Überexpression der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien auch andere geprägte Gene beeinflusst.

Zuerst wurde in den vorhandenen Daten des RNA-Expressionsarrays der beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach geprägten Genen gesucht, die Teil des in der Maus beschriebenen IGNs (vgl. 1.4) sind (Tabelle 5.3) [99]. In der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurden neun geprägte Gene differentiell exprimiert vorgefunden und in der UC-Zelllinie 5637 sieben. In beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression vermindert exprimiert wurden die Gene *PLAGL1*, *mesoderm specific transcript* (MEST, auch PEG1) und *paraoxonase 2* (PON2). Dagegen wurden die drei Gene *protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A* (PPP1R9A, auch Neurabin-1), *insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)* (IGF2) und *growth factor receptor-bound protein 10* (GRB10) in beiden UC-Zelllinien erhöht exprimiert. Nur in der UC-Zelllinie 5637 signifikant erhöht exprimiert war *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)* (CDKN1C). Die Expression drei weiterer geprägter Gene war nur in der UC-Zelllinie VM-CUB1 signifikant erhöht, diese waren *tissue factor pathway inhibitor 2*

(TFPI2, auch PP5 und REF1), *sarcoglycan*, *epsilon* (SGCE, auch DYT11 oder ESG) und *paternally expressed 10* (PEG10).

Tabelle 5.3: Expressionsveränderungen geprägter Gene im RNA-Expressionsarray nach ektopischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die Signifikanz wurde nach Benjamini-Hochberg adjustiert (p(corr)). Einige Gene waren nur in einer UC-Zelllinie signifikant verändert (n.s. = nicht signifikant). Grün unterlegt sind vermindert exprimierte Gene und rot unterlegt erhöht exprimierte Gene.

Gen	VM-CUB1 LV_6 vs. HOTAIR_20		5637 LV_2 vs HOTAIR_4	
	Expressions- Veränderung [x]	Signifikanz p(corr)	Expressions- Veränderung [x]	Signifikanz p(corr)
PLAGL1	65,19	0,0001	1,23	0,006
MEST	93	0,00003	1,4	0,006
PON2	1,63	0,0027	1,38	0,003
PPP1R9A	4,7	0,0004	3,3	0,001
IGF2	82	0,00009	6,05	0,00005
GRB10	6,8	0,001	1,5	0,0006
CDKN1C	n.s.		17,6	0,0005
TFPI2	3,29	0,002	n.s.	
SGCE	1,4	0,003	n.s.	
PEG10	54,7	0,00006	n.s.	

Als nächstes wurden die im RNA-Expressionsarray beobachteten Expressionsveränderungen nach HOTAIR-Überexpression wieder mittels qRT-PCR verifiziert. Hierfür wurden die sechs Gene ausgewählt, die in beiden UC-Zelllinien gleichgerichtet verändert wurden und zusätzlich die Gene *CDKN1C* und *TFPI2*. Außerdem wurde auch die Expression der lncRNA H19 überprüft, da sie ebenfalls zu dem erwähnten Netzwerk geprägter Gene in der Maus gehört.

Die Expressionsverminderung nach HOTAIR-Überexpression konnte in beiden UC-Zelllinien für die Gene *PLAGL1*, *MEST* und *PON2* validiert werden; gleichfalls wurde die erhöhte Expression der Gene *PPP1R9A*, *IGF2* und *GRB10* reproduziert. In diesem Verifizierungsexperiment wurde für *CDKN1C* nicht nur in der UC-Zelllinie 5637, sondern auch in VM-CUB1 eine verstärkte Expression nach HOTAIR-Überexpression gemessen. Der

gleiche Befund wurde umgekehrt für *TFPI2* erhalten. Die lncRNA H19 wurde in beiden UC-Zelllinien nach ektoptischer HOTAIR-Expression differentiell exprimiert, allerdings in entgegengesetzter Richtung, in der UC-Zelllinie VM-CUB1 ergab sich eine Verminderung und in 5637 eine Erhöhung (Abb. 5.41).

Zusammenfassend scheint eine Überexpression von HOTAIR also die Expression von geprägten Genen des IGNs zu beeinflussen, womöglich sogar aktiv zu regulieren.

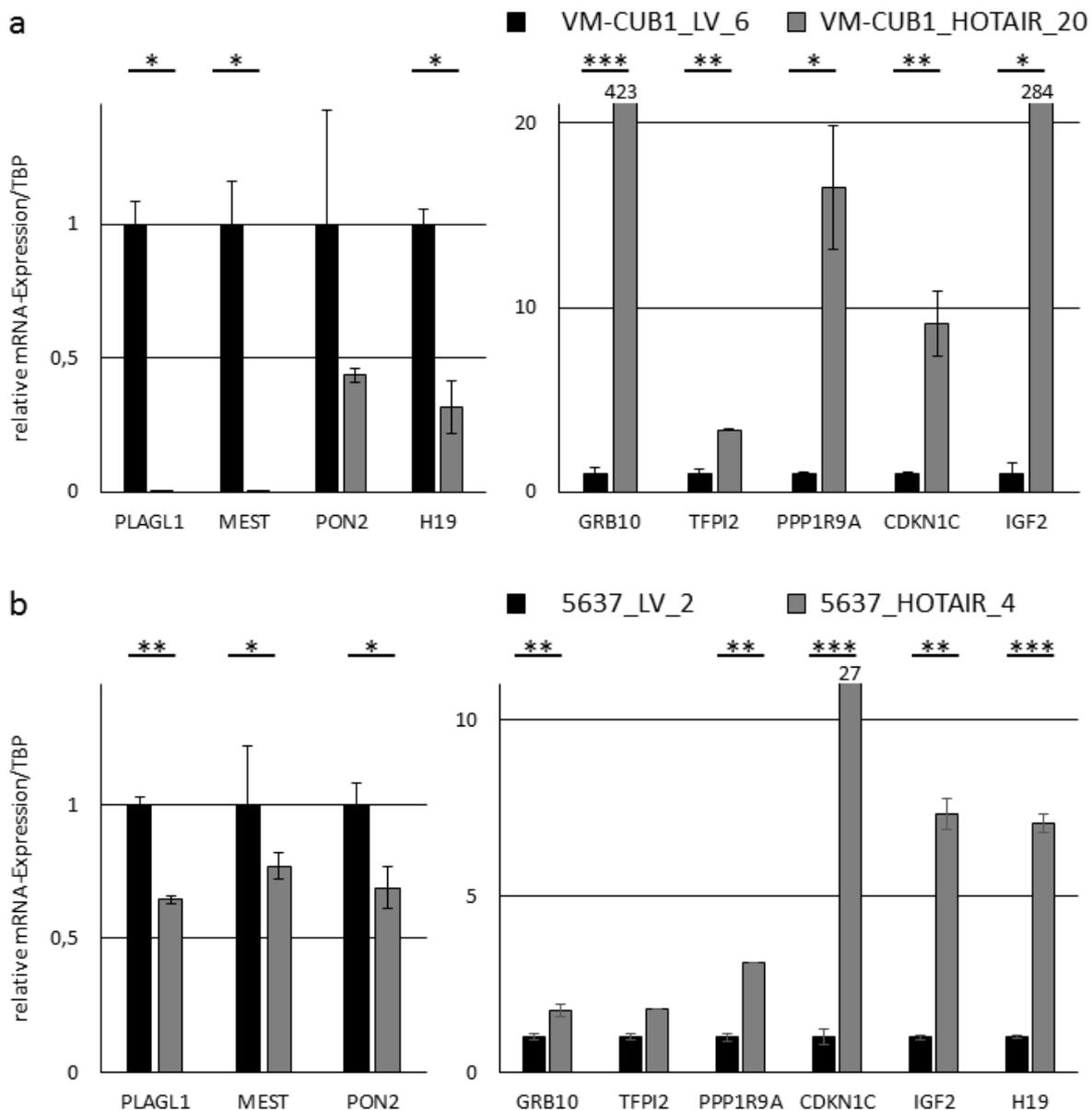


Abbildung 5.41: Expressionsbestimmung ausgewählter geprägter Gene in HOTAIR überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *MEST*, *PON2*, *GRB10*, *TFPI2*, *PPP1R9A*, *CDKN1C*, *IGF2* und H19 bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* sowie den Wert des LV-Klons normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Verglichen wurde der HOTAIR-Klon mit der stärkeren HOTAIR-Expression mit dem jeweiligen LV-Klon. (a) VM-CUB1, (b) 5637.

5.9 Effekte einer HOTAIR-Modulation auf die geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19*

Da *PLAGL1* und die IGN-Gene *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektoptischer HOTAIR-Expression in beiden untersuchten UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 differentiell exprimiert wurden, lag die Vermutung nahe, dass HOTAIR ein Regulator dieser geprägten Gene sein könnte, zumal in Hotaair-Knockout-Mäusen *Plagl1*, *Igf2* und *H19* verstärkt exprimiert werden [90]. Daher wurde die Expression von *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektoptischer Überexpression oder nach siRNA-vermitteltem Knockdown in verschiedenen UC-Zelllinien untersucht.

5.9.1 Effekte einer ektoptischen Expression von HOTAIR auf die Expression von *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in UC-Zelllinien

Begonnen wurde mit der Untersuchung der Effekte auf vier geprägte Gene nach transients und stabiler HOTAIR-Überexpression in sechs weiteren UC-Zelllinien. Im Unterschied zu den vorherigen Experimenten wurden stabil transfizierte *Pools* und nicht einzelne Klone verwendet.

Die erfolgreiche Überexpression der lncRNA HOTAIR in den UC-Zelllinien BF7C-905 und 639-V bewirkte keine signifikanten Expressionsveränderungen der vier geprägten Gene (Abb. 5.42).

In HOTAIR-überexprimierenden RT-112-Zellen wurde eine signifikante Abnahme der *PLAGL1*-Expression detektiert und zusätzlich eine signifikante Zunahme der *IGF2*-Expression, wie in den Klonen aus VM-CUB1 und 5637. Außerdem wurde wie im Klon von 5637 eine erhöhte *H19*-Expression beobachtet. Weiterhin wurden die Gene *IGF2* und *H19* auch nach transients HOTAIR-Transfektion in der UC-Zelllinie HT-1376 signifikant erhöht vorgefunden (Abb. 5.43).

Die *CDKN1C*-Expression war nur in der UC-Zelllinie SW-1710 sowohl nach transients Transfektion als auch im stabilen Pool erhöht, konsistent mit den Beobachtungen in den Klonen von VM-CUB1 und 5637 (Abb. 5.44 a).

Ebenso wurde in der UC-Zelllinie UM-UC-3 eine verminderte *PLAGL1*-Expression nach transients HOTAIR-Überexpression beobachtet. Überraschend wurde aber nach stabil erhöhter HOTAIR-Expression ein Anstieg der *PLAGL1*-Expression gemessen. Des Weiteren wurde im stabilen HOTAIR-Pool wieder die lncRNA *H19* erhöht exprimiert (Abb. 5.44 b).

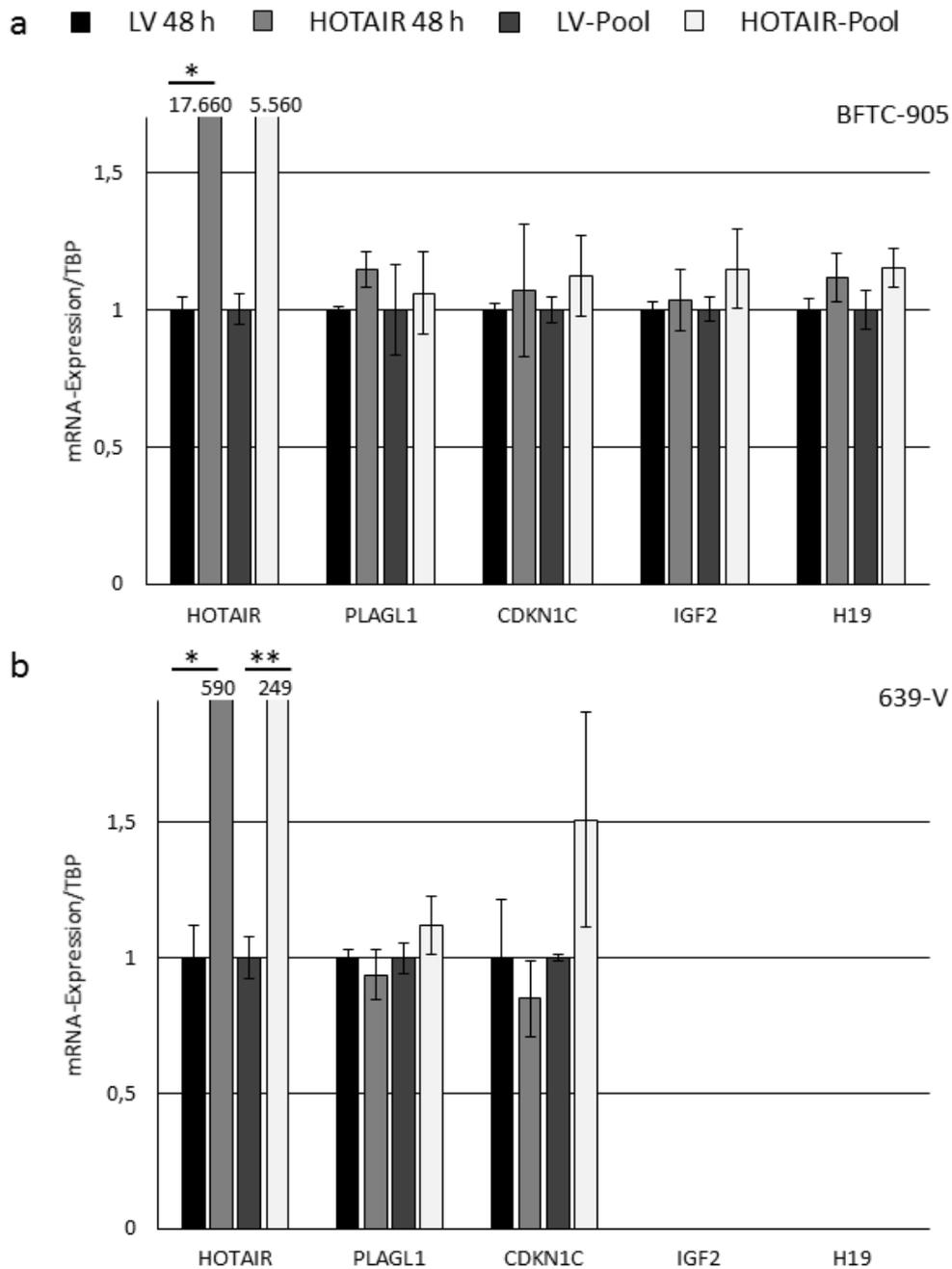


Abbildung 5.42: Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektoischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien BFTC-905 und 639-V.

Die Expression der fünf dargestellten Gene wurde mittels qRT-PCR nach transienter (48 h) und stabiler HOTAIR-Transfektion bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* und auf den jeweiligen Wert des LV-Pools normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) BFTC-905, (b) 639-V.

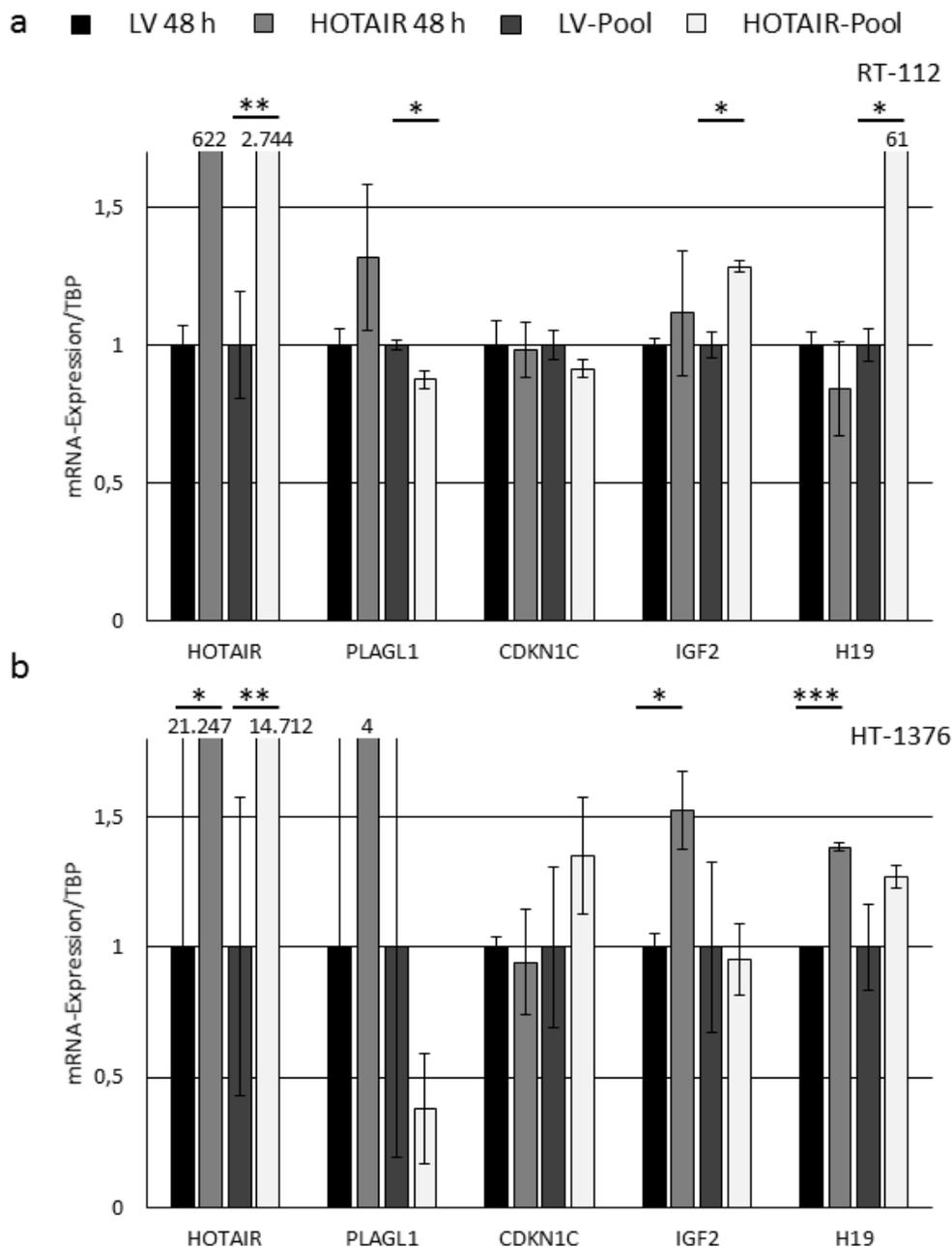


Abbildung 5.43: Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektoischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien RT-112 und HT-1376.

Die Expression der fünf dargestellten Gene wurde mittels qRT-PCR nach transienter (48 h) und stabiler HOTAIR-Transfektion bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* und auf den jeweiligen Wert des LV-Pools normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) RT-112, (b) HT-1376.

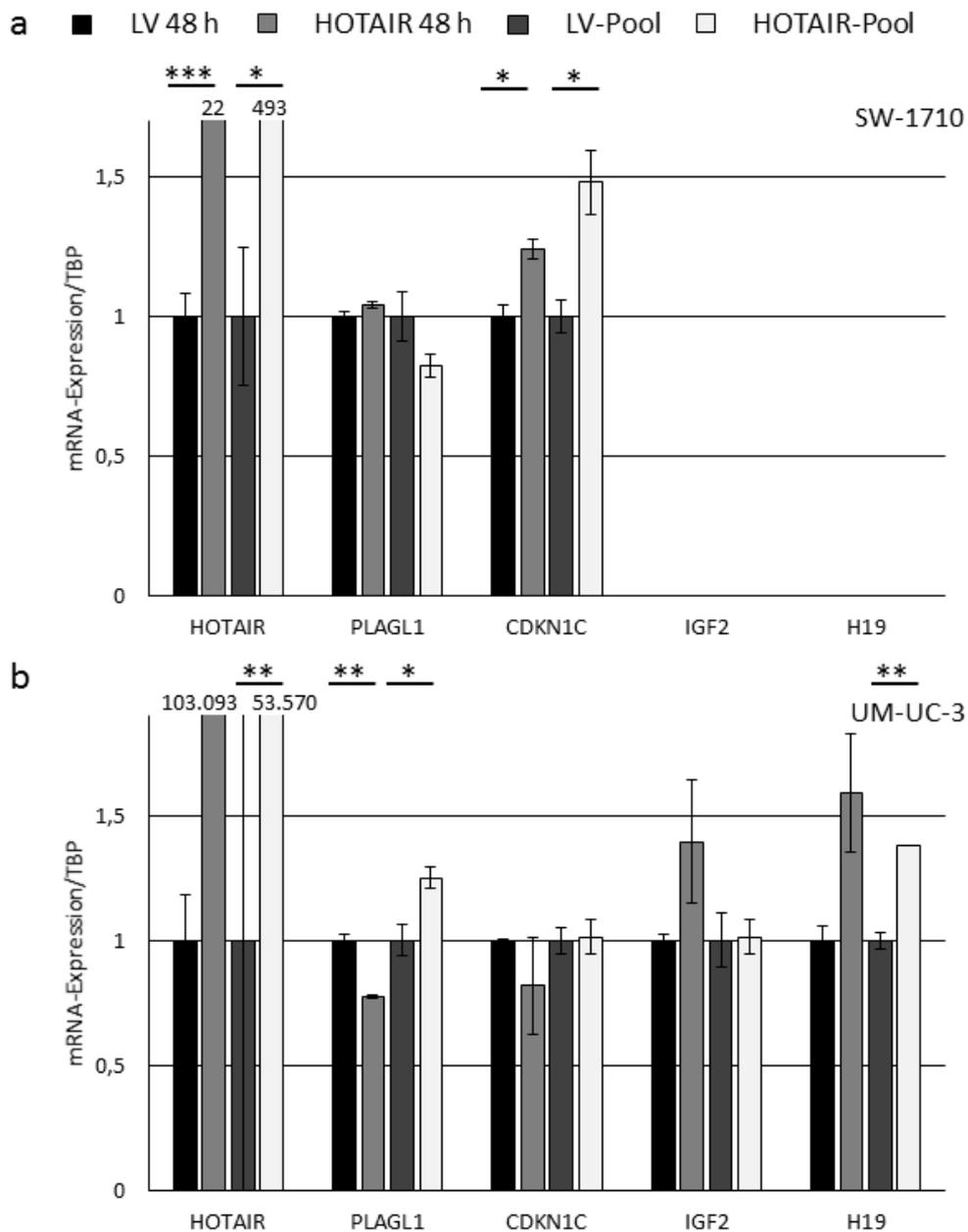


Abbildung 5.44: Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektopischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien SW-1710 und UM-UC-3.

Die Expression der fünf dargestellten Gene wurde mittels qRT-PCR nach transienter (48 h) und stabiler HOTAIR-Transfektion bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* und auf den jeweiligen Wert des LV-Pools normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) SW-1710, (b) UM-UC-3.

5.9.2 Effekt einer ektopischen HOTAIR-Expression auf die geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3

Da eine ektopische HOTAIR-Expression in verschiedenen UC-Zelllinien zu einer Veränderung der Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* führte, stellte sich die Frage, ob diese Effekte Urothelkarzinom-spezifisch oder in Zelllinien anderer Entitäten gleichermaßen zu beobachten sind. Deshalb wurde in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3, die im Vergleich zu den beiden anderen Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF7 die geringste HOTAIR-Expression besaß, eine transiente und stabile HOTAIR-Transfektion durchgeführt.

Nach ektopischer HOTAIR-Expression wurden alle vier untersuchten Gene differentiell exprimiert. Im Einzelnen wurde wieder eine Abnahme der *PLAGL1*-Expression gemessen. Im Gegensatz zu den UC-Zelllinien wurden nach transienter Expression die geprägten Gene *CDKN1C* und *IGF2* vermindert exprimiert. Ferner wurde wie im Klon der UC-Zelllinie VM-CUB1 eine verminderte H19-Expression detektiert (Abb. 5.45).

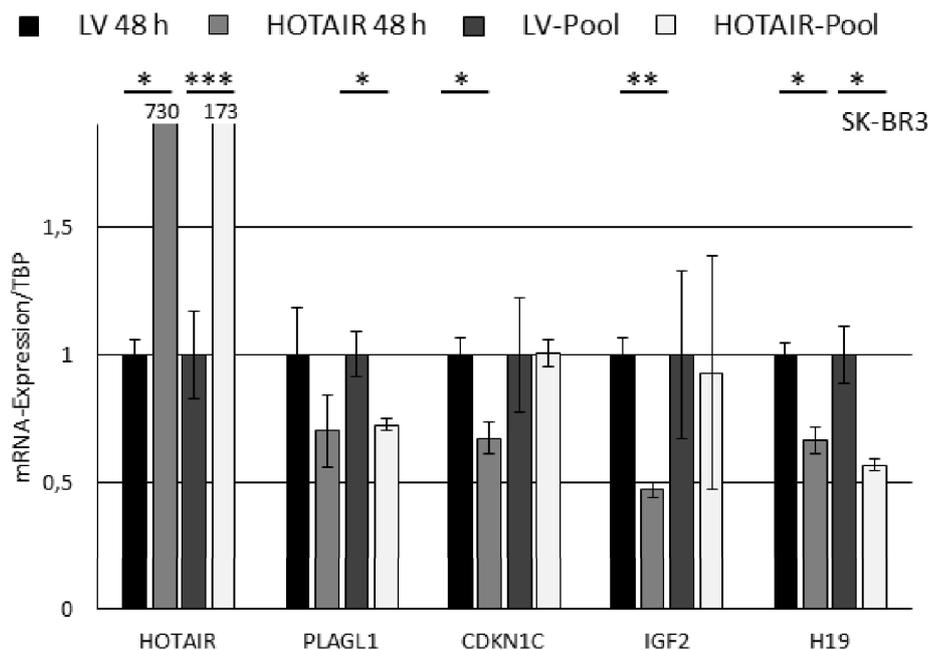


Abbildung 5.45: Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektopischer HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3.

Die Expression der fünf dargestellten Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* und auf den jeweiligen Wert des LV-Pools normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.9.3 Effekte ektopischen HOTAIR-Expression auf die geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in der Prostatakarzinomzelllinie DU-145

Die vier ausgewählten geprägten Gene waren nicht nur in verschiedenen UC-Zelllinien sondern auch in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3 nach ektoptischer HOTAIR-Expression differentiell exprimiert. Daher wurde vermutet, dass diese Gene gewebeübergreifende Zielgene der lncRNA HOTAIR sind. Deshalb wurde zusätzlich der Effekt einer HOTAIR-Überexpression in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 untersucht.

Signifikante Veränderungen wurden in der Expression der Gene *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* beobachtet. Die *CDKN1C*-Expression stieg nach stabiler HOTAIR-Transfektion wie auch in den Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 signifikant an. Weiterhin wurde die lncRNA *H19* im stabilen HOTAIR-Pool erhöht exprimiert. Dies deckte sich mit den Beobachtungen in 5637_HOTAIR-Klonen. Genauso wie nach transientser HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3 verminderte sich die *IGF2*-Expression nach transientser Transfektion in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 (Abb. 5.46). Die endogene *PLAGL1*-Expression ist sehr niedrig, wahrscheinlich konnte daher keine weitere Verminderung detektiert werden.

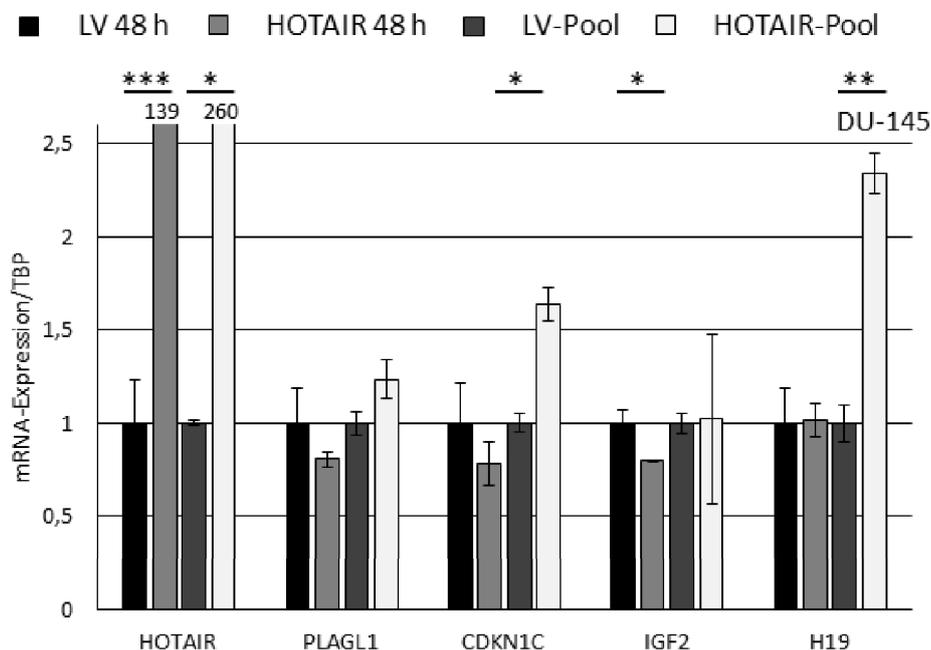


Abbildung 5.46: Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145.

Die Expression der fünf dargestellten Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* und auf den jeweiligen Wert des LV-Pools normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.9.4 Effekte eines HOTAIR Knockdowns auf die Expression von *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in UC-Zelllinien

Wenn HOTAIR die Expression der vier geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* reguliert, sollte eine Verminderung der HOTAIR-Expression auch Effekte auf deren Expression bewirken.

In den vier UC-Zelllinien RT-112, SW-1710, J82 und 639-V wurde mit zwei verschiedenen siRNAs gegen HOTAIR ein Knockdown durchgeführt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit einer unspezifischen siRNA. Die Effekte auf die Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Auch hier wurden wieder Zelltyp-spezifische Veränderungen beobachtet.

Obwohl die Herunterregulation der lncRNA HOTAIR in der UC-Zelllinie RT-112 mit beiden siRNAs gleichwertig effektiv war, wurden unterschiedliche Effekte auf die vier geprägten Gene beobachtet. Die *PLAGL1*-Expression stieg signifikant nach Behandlung mit siRNA2 an. Auch die Expression der Gene *CDKN1C* und *H19* wurde verändert, allerdings wurden diese abhängig von der genutzten siRNA erhöht oder vermindert exprimiert (Abb. 5.47 a).

Da die *IGF2*- und *H19*-Expression in der UC-Zelllinie SW-1710 sehr schwach war, konnten für diese Gene nach HOTAIR-Knockdown keine Veränderungen detektiert werden. Wie in der UC-Zelllinie RT-112 wurde ein Anstieg der *PLAGL1*-Expression gemessen. Außerdem wurde nach Behandlung mit siRNA1 *CDKN1C* vermindert exprimiert (Abb. 5.47 b).

Eine signifikante Reduktion der HOTAIR-Expression konnte mittels siRNAs in der UC-Zelllinie J82 nicht erreicht werden. Allerdings war das endogene HOTAIR-Niveau in dieser UC-Zelllinie schon relativ niedrig. Trotz der geringen HOTAIR-Expressionsverringering konnte eine Erhöhung der Expression aller vier geprägten Gene nach Behandlung mit siRNA1 beobachtet werden (Abb. 5.48 a), allerdings bei teilweise hohen Standardabweichungen.

Die Effizienz des HOTAIR-Knockdowns unterschied sich zwischen den verwendeten siRNAs in der UC-Zelllinie 639-V deutlich. So war die Herunterregulation mittels siRNA2 fast doppelt so effektiv. Deshalb könnten Dosis-abhängige Effekte beobachtet werden. Wie schon für die anderen drei UC-Zelllinien wurde die *PLAGL1*-Expression erhöht. Eine Verminderung der *CDKN1C*-Expression konnte nur nach dem stärkeren Knockdown mit siRNA2 gemessen werden. Ähnlich wie in der UC-Zelllinie RT-112 wurde abhängig von der genutzten siRNA die lncRNA *H19* erhöht oder vermindert exprimiert (Abb. 5.48 b).

Zusammenfassend wurde in allen vier UC-Zelllinien nach HOTAIR-Knockdown das geprägte Gen *PLAGL1* erhöht exprimiert. Das geprägte Gen *CDKN1C* wurde in den UC-Zelllinien RT-112 und J82 induziert, aber in der UC-Zelllinie SW-1710 vermindert exprimiert. Eine

signifikante Induktion des geprägten Gens *IGF2* wurde nur in der UC-Zelllinie J82 beobachtet. Die lncRNA *H19* wurde in den Zelllinien RT-112, J82 und 639-V nach Behandlung mit siRNA1 erhöht exprimiert und nach Behandlung mit siRNA2 in den UC-Zelllinien RT-112 und 639-V vermindert exprimiert.

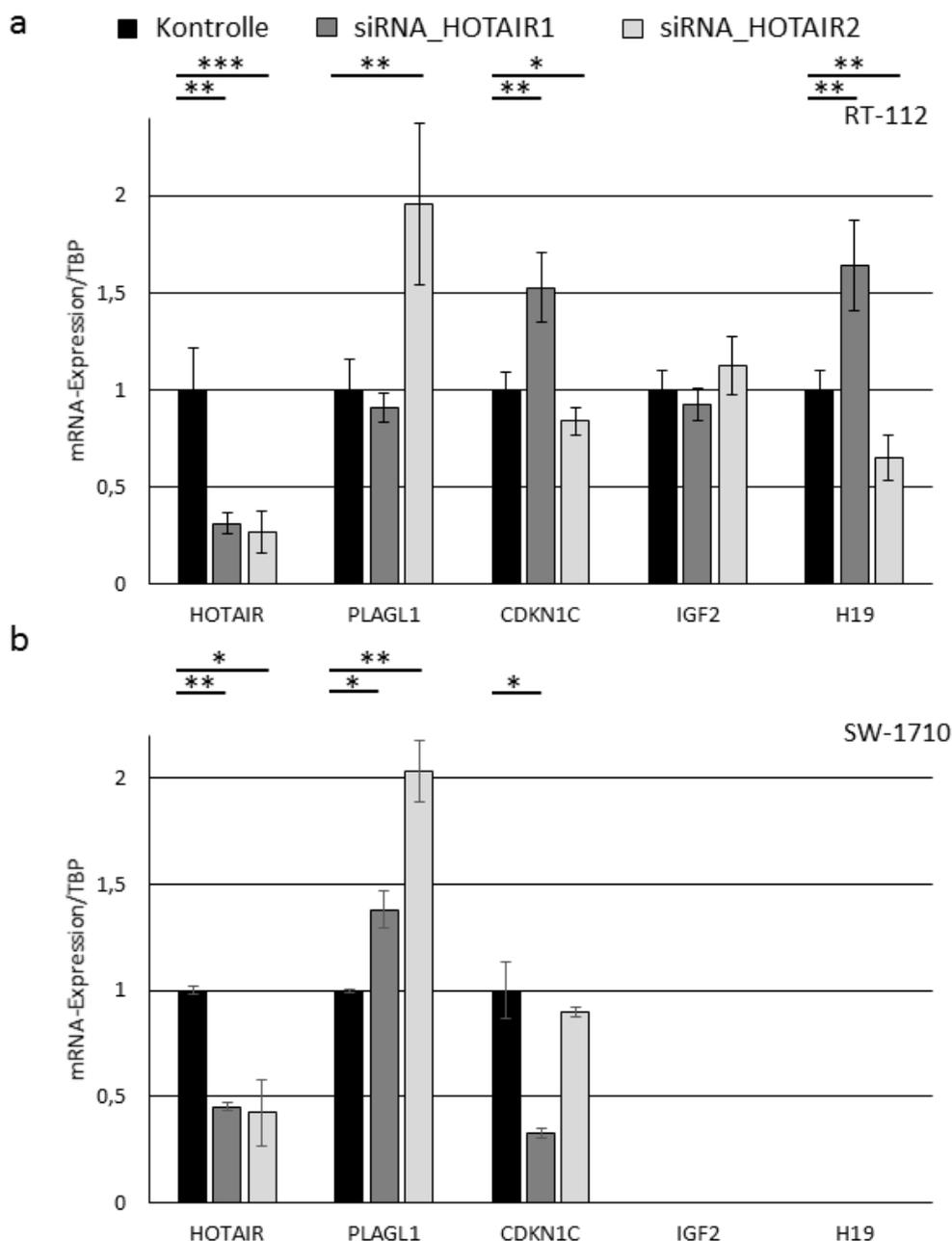


Abbildung 5.47: Effekte eines siRNA vermittelten Knockdowns der lncRNA HOTAIR auf die Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in den UC-Zelllinien RT-112 und SW-1710.

Die Zellen wurden mit zwei siRNAs gegen HOTAIR und einer unspezifischen siRNA für 48 h behandelt. Die Expression der untersuchten fünf Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die ermittelte Expression der Kontrolle wurde auf eins normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) RT-112, (b) SW-1710.

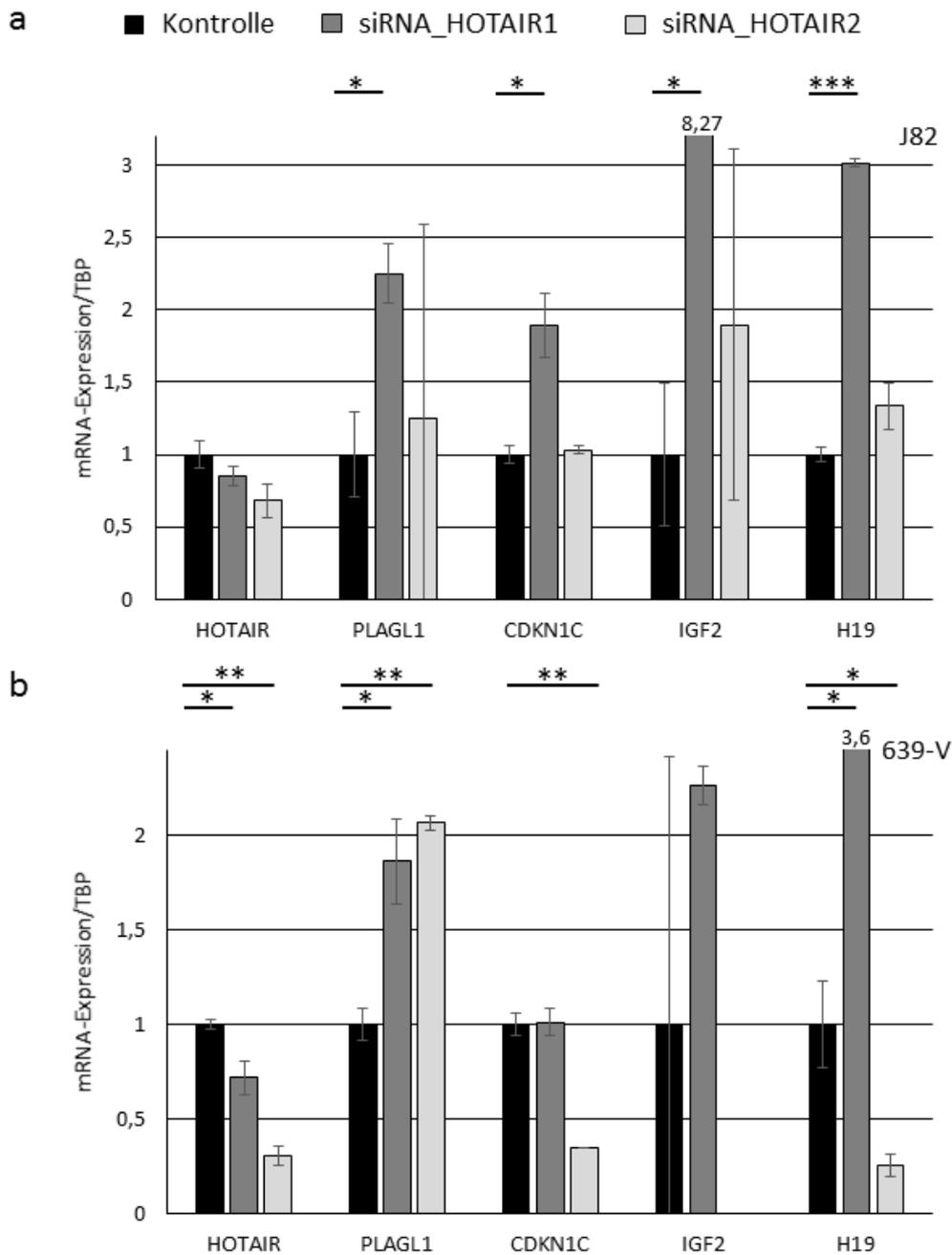


Abbildung 5.48: Effekte eines siRNA vermittelten Knockdowns der lncRNA HOTAIR auf die Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in den UC-Zelllinien J82 und 639-V.

Die Zellen wurden mit zwei siRNAs gegen HOTAIR und einer unspezifischen siRNA für 48 h behandelt. Die Expression der untersuchten fünf Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die ermittelte Expression der Kontrolle wurde auf eins normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) J82, (b) 639-V.

5.9.5 Effekte eines HOTAIR Knockdowns auf die Expression von *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145

Der HOTAIR-Knockdown verursachte in verschiedenen UC-Zelllinien Expressionsveränderungen der vier Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19*. Da auch nach HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3 und der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 diese vier Gene differentiell exprimiert wurden, sollte der Effekt eines HOTAIR-Knockdowns in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 untersucht werden.

Die Effizienz des Knockdowns unterschied sich wieder zwischen den beiden siRNAs. So war die Herunterregulation von HOTAIR mit der siRNA2 auf 40 % des Ausgangsniveaus erfolgreicher als mit der siRNA1 mit einer Verringerung auf 70 %. Wie auch in den UC-Zelllinien wurde unabhängig von der verwendeten siRNA eine erhöhte Expression des *PLAGL1*-Gens detektiert. Die Effekte auf die anderen drei Gene unterschieden sich zwischen den Behandlungen mit den beiden siRNAs. Alle drei Gene *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* wurden nach Knockdown mittels siRNA1 erhöht exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden *IGF2* und *H19* nach Behandlung mittels siRNA2 vermindert exprimiert (Abb. 5.49).

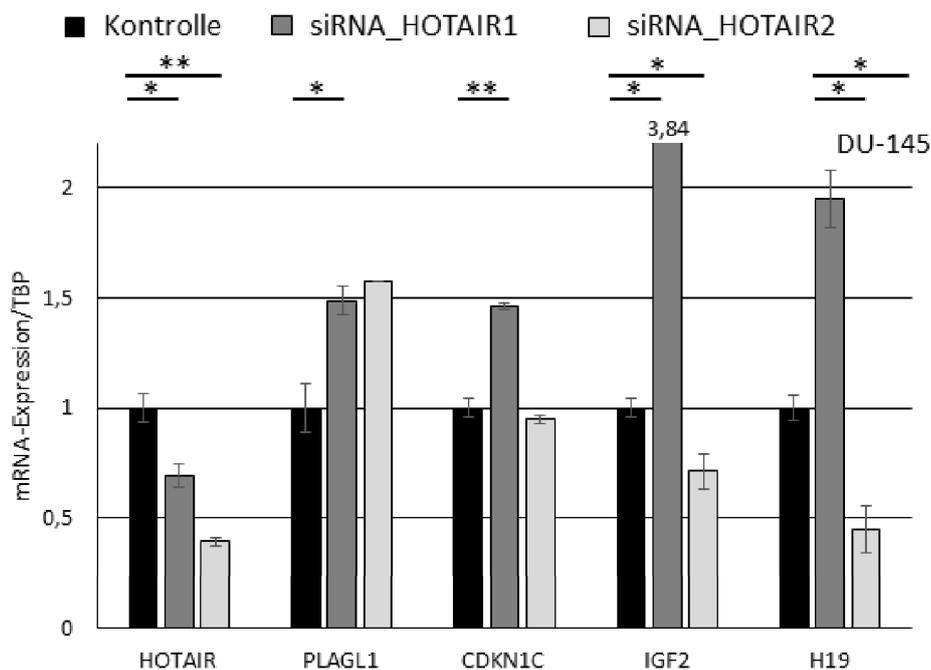


Abbildung 5.49: Effekte eines siRNA vermittelten Knockdowns der lncRNA HOTAIR auf die Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in der Prostatakarzinom-Zelllinie Du-145.

Die Zellen wurden mit zwei siRNAs gegen HOTAIR und einer unspezifischen siRNA für 48 h behandelt. Die Expression der untersuchten fünf Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die ermittelte Expression der Kontrolle wurde auf eins normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.10 Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* in UC-Zelllinien

Die zuvor beobachteten Effekte auf die Expression dieser vier Gene waren zwischen den Zelllinien teilweise sehr unterschiedlich. Da die Möglichkeit der Detektion von Expressionsveränderungen auch vom endogenen Expressionsniveau abhängig ist, wurde die endogene Expression der geprägten Gene *PLAGL1*, *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* im vorhandenen UC-Zelllinienset mittels qRT-PCR untersucht. Das UC-Zelllinienset setzte sich aus 15 UC-Zelllinien und drei normal Kontrollen zusammen. Als Kontrollen dienten uroepitheliale Primärzellkulturen (UP) und die immortalisierte normale Urothelzelllinie TERT-NHUC.

5.10.1 Expression des geprägten Gens *PLAGL1* in UC-Zelllinien

PLAGL1 wurde in den normalen Harnblasenkontrollen schwach exprimiert, aber teilweise in den UC-Zelllinien aktiviert. In der Hälfte der UC-Zelllinien (8/15) wurde *PLAGL1* deutlich stärker exprimiert als in den Kontrollen. Ein Drittel der UC-Zelllinien (5/15) exprimierten *PLAGL1* weiterhin sehr schwach (Abb. 5.50). Zwischen der *PLAGL1*- und *HOTAIR*-Expression wurde eine mittlere positive Korrelation nach Pearson ($r = 0,54$) ermittelt.

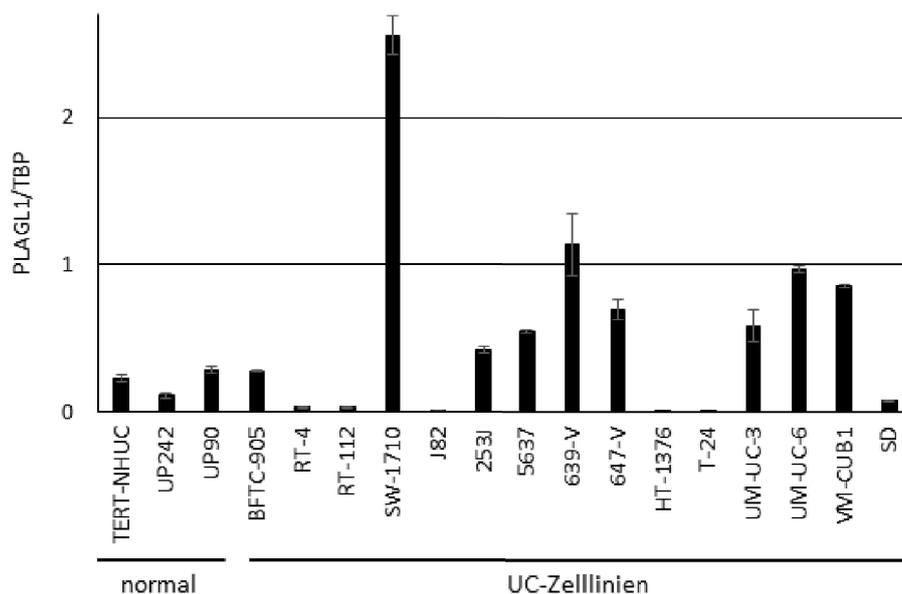


Abbildung 5.50: Expressionsbestimmung des geprägten Gens *PLAGL1* in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.

Die *PLAGL1*-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die UC-Zelllinien sind nach ihrer Herkunft aus papillären (BFTC905 - J82) oder invasiven Tumoren angeordnet.

5.10.2 Expression des geprägten Gens *CDKN1C* in UC-Zelllinien

Sowohl die normalen Kontrollen als auch die UC-Zelllinien zeigten eine heterogene *CDKN1C*-Expression. Im Vergleich zu den normalen Kontrollen TERT-NHUC und UP90 war die Expression von *CDKN1C* in einem Drittel (5/15) der UC-Zelllinien erhöht. Besonders stark wurde *CDKN1C* in den UC-Zelllinien SW-1710 und 5637 exprimiert. Dagegen wurde in einem Drittel (6/15) der UC-Zelllinien *CDKN1C* vermindert exprimiert (Abb. 5.51). Die *CDKN1C*-Expression korrelierte positiv nach Pearson mit der *PLAGL1*-Expression ($r = 0,59$). Auch mit der *HOTAIR*-Expression wurde eine schwache positive Korrelation nach Pearson ($r = 0,37$) festgestellt.

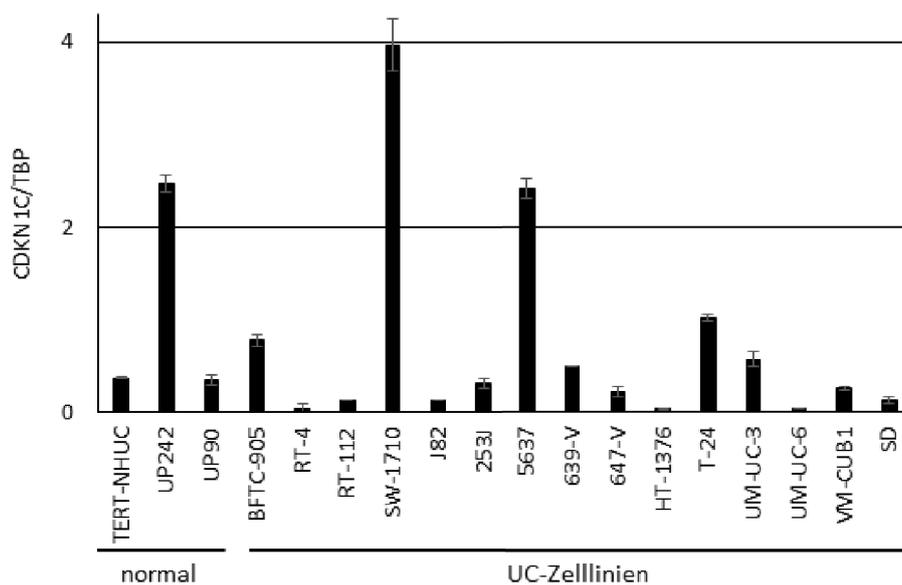


Abbildung 5.51: Expressionsbestimmung des geprägten Gens *CDKN1C* (p57KIP2) in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.

Die *CDKN1C*-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die UC-Zelllinien sind nach ihrer Herkunft aus papillären (BFTC905 - J82) oder invasiven Tumoren angeordnet.

5.10.3 Expression des geprägten Gens *IGF2* und der lncRNA *H19* in UC-Zelllinien

Die Gene *IGF2* und *H19* sind auf Chromosom 11 nah beieinander lokalisiert und werden übergreifend epigenetisch reguliert.

Im untersuchten UC-Zelllinienset wurde *IGF2* schon in den normalen Kontrollen deutlich exprimiert. Nur in den beiden UC-Zelllinien BFTC-905 und 5637 wurde eine noch stärkere *IGF2*-Expression gemessen. Das *IGF2*-Expressionsniveau in der UC-Zelllinie RT-112 war mit dem in den Kontrollen vergleichbar. In den meisten UC-Zelllinien (12/15) wurde *IGF2* vermindert exprimiert (Abb. 5.52). Die *IGF2*-Expression korrelierte weder mit der *PLAGL1*- noch der *HOTAIR*-Expression.

Ähnlich wie bei der *CDKN1C*-Expression wurden unterschiedlich starke Niveaus der *H19*-Expression schon in den drei Kontrollen beobachtet. In den normalen Kontrollen TERT-NHUC und UP90 war *H19* sehr schwach exprimiert und in der UP242 gut detektierbar. Zwischen der *IGF2*- und *H19*-Expression der drei normalen Kontrollen ergab sich eine starke negative Korrelation nach Pearson ($r = -0,95$). Im Gegensatz dazu wurde in den UC-Zelllinien eine starke positive Korrelation zwischen diesen beiden Genen beobachtet ($r = 0,91$). Die *H19*-Expression war in fast der Hälfte (7/15) der UC-Zelllinien sehr schwach. Im Gegensatz dazu wurde *H19* in einem Drittel (5/15) der UC-Zelllinien sehr stark exprimiert (Abb. 5.52).

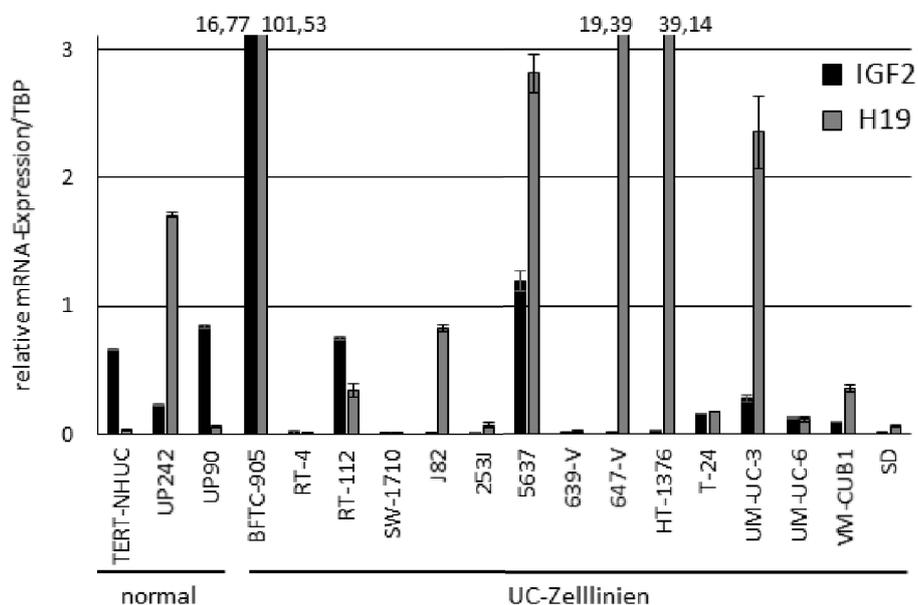


Abbildung 5.52: Expressionsbestimmung von *IGF2* und der lncRNA *H19* in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.

Die *IGF2*- und *H19*-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die UC-Zelllinien sind nach ihrer Herkunft aus papillären (BFTC905 - J82) oder invasiven Tumoren angeordnet.

5.11 Mechanistische Untersuchungen der Histonmethylierung und der DNA-Methylierung an potentiellen HOTAIR-Zielgenen mit elterlicher Prägung

5.11.1 Veränderungen der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 an geprägten Genen

Um zu überprüfen, ob die Expressionsveränderungen an geprägten Genen des IGN mit Veränderungen der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 einhergehen, wurde eine ChIP durchgeführt. Dabei wurde der HOTAIR-Klon mit der stärkeren Überexpression mit dem LV-Klon verglichen.

Als erstes wurden die Histonmethylierungen an *PLAGL1* studiert. Die *PLAGL1*-Expression war konsistent in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression vermindert, allerdings in der UC-Zelllinie VM-CUB1 deutlich stärker. Passend zu dieser verminderten Expression wurden eine verminderte Trimethylierung an H3K4 und eine erhöhte Di/Trimethylierung an H3K27 nachgewiesen. Auch in der UC-Zelllinie 5637 wurde ein Anstieg der Di/Trimethylierung an H3K27 beobachtet, allerdings auch ein Anstieg der Trimethylierung an H3K4 (Abb. 5.53 a).

Eine verminderte Expression nach ektopischer HOTAIR-Expression wurde in beiden UC-Zelllinien vom *MEST*-Gen detektiert, wiederum stärker in der UC-Zelllinie VM-CUB1. In dieser ging die verminderte Expression mit einer Abnahme der Trimethylierung an H3K4 einher. Außerdem wurde auch eine Abnahme der Di/Trimethylierung an H3K27 gemessen. In der UC-Zelllinie 5637 veränderte sich die Trimethylierung an diesen beiden Lysininen nicht (Abb. 5.53 b).

Weiterhin wurden die geprägten Gene *CDKN1C*, *IGF2*, *PPP1R9A* und *GRB10* in beiden UC-Zelllinien nach stabiler HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert.

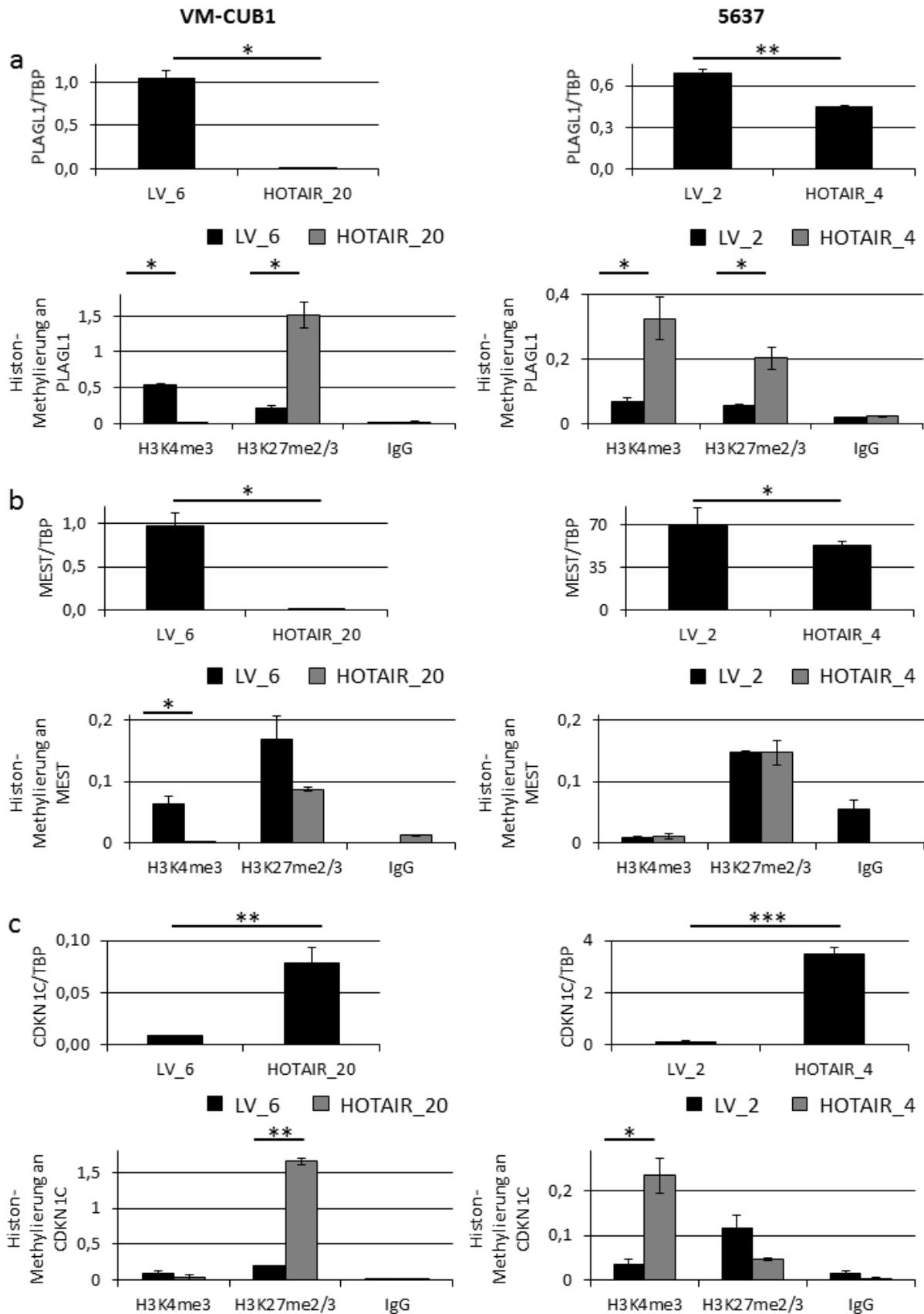
Die Analyse des Trimethylierungsstatus an H3K4 und H3K27 des *CDKN1C*-Locus ergab, dass in der UC-Zelllinie VM-CUB1 trotz Erhöhung der Expression eine deutliche Erhöhung der Di/Trimethylierung an H3K27 vorlag. Dagegen wurde in der UC-Zelllinie 5637 eine klare Zunahme der Trimethylierung an H3K4 und eine leichte Abnahme der Di/Trimethylierung an H3K27 beobachtet (Abb. 5.53 c). Diese Veränderungen passen sehr gut zur detektierten Expressionsverstärkung.

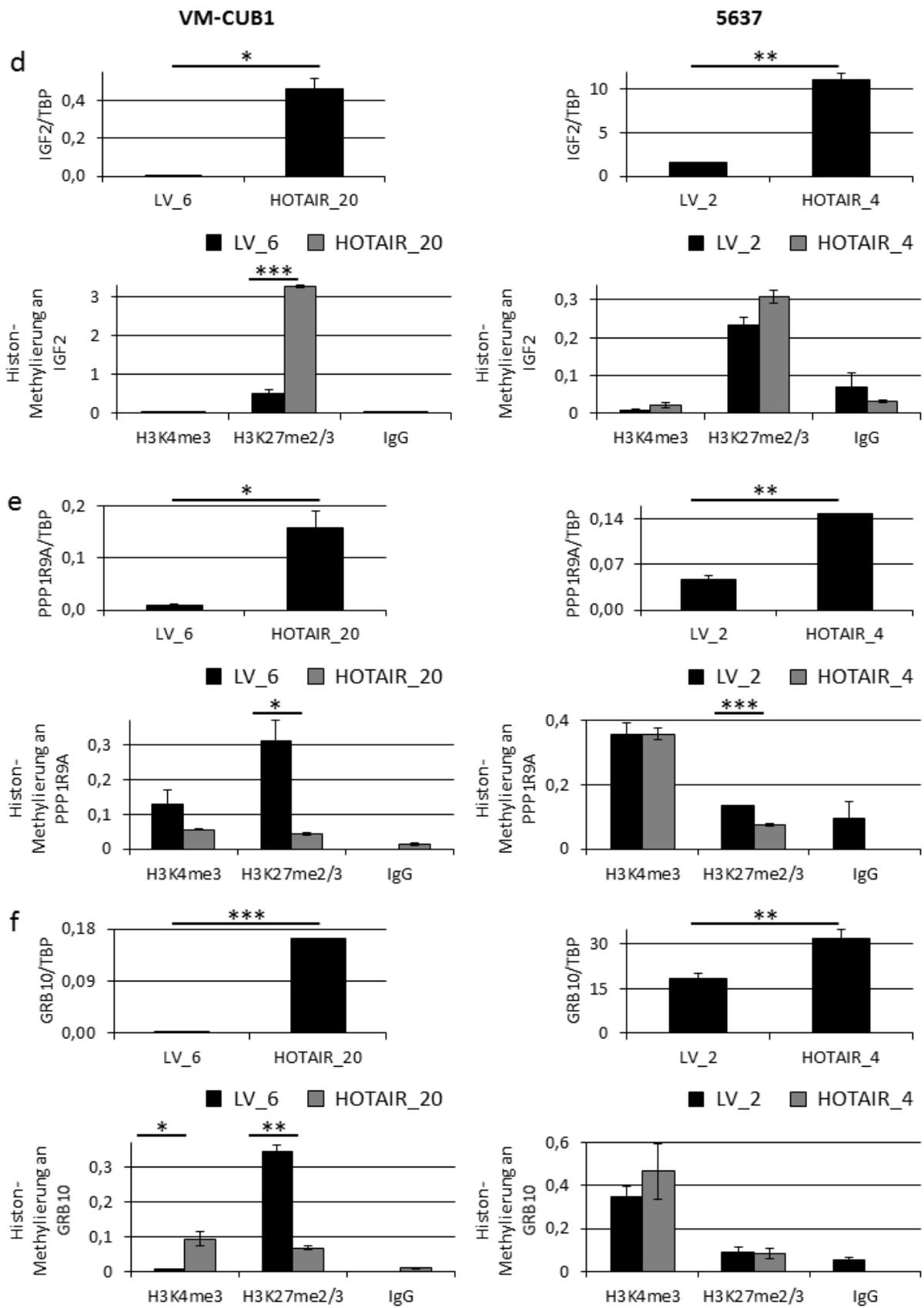
Ähnlich wie am *CDKN1C*-Locus wurde am *IGF2*-Locus in VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression trotz erhöhter Expression eine stark erhöhte Di/Trimethylierung an H3K27 gemessen. An diesem Locus veränderten sich die Trimethylierung an H3K4 und H3K27 in der UC-Zelllinie 5637 nicht signifikant. Allerdings wurde ähnlich wie in der UC-Zelllinie VM-CUB1 eine leichte Zunahme der Di/Trimethylierung an H3K27 beobachtet (Abb. 5.53 d).

Die erhöhte Expression von *PPP1R9A* (Neurabin-1) korrelierte in der UC-Zelllinie VM-CUB1 mit einer stark verminderten Di/Trimethylierung an H3K27. Eine etwas schwächere Verringerung der Di/Trimethylierung an H3K27 wurde in der UC-Zelllinie 5637 beobachtet. Die Trimethylierung an H3K4 verminderte sich in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nur leicht (Abb. 5.53 e).

Die Veränderungen der Histonmethylierung am geprägten Gen *GRB10* unterschieden sich zwischen den beiden UC-Zelllinien. In 5637 wurden keine signifikanten Veränderungen der beiden untersuchten Histonmodifikationen nach stabiler HOTAIR-Überexpression gemessen. Dagegen wurden in VM-CUB1 eine Erhöhung der Trimethylierung an H3K4 und eine Verminderung der Di/Trimethylierung an H3K27 beobachtet (Abb. 5.53 f). Diese Veränderungen korrelieren sehr gut mit der erhöhten Expression.

Zum Schluss wurden die durch eine HOTAIR-Überexpression ausgelösten Effekte auf die lncRNA H19 analysiert. Sie scheint eine Ausnahme zu bilden, denn ihre Expression wurde nach stabiler ektopischer HOTAIR-Expression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 vermindert und in der UC-Zelllinie 5637 erhöht. Passend zu der beobachteten verminderten Expression in VM-CUB1 wurde eine erhöhte Di/Trimethylierung an H3K27 detektiert. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Trimethylierung an H3K4 in der UC-Zelllinie 5637 gemessen (Abb. 5.53 g). Dies korreliert mit der Expressionserhöhung.





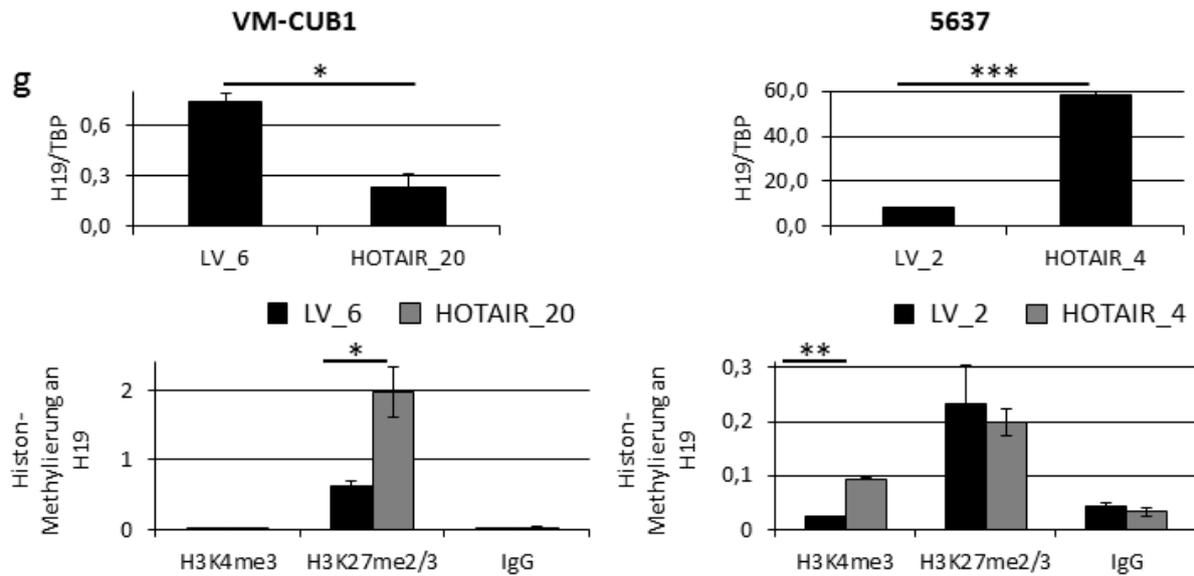


Abbildung 5.53: mRNA-Expression und Analyse der Histon-Methylierung an sieben geprägten Genen in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Die Expression wurde mittels qRT-PCR im HOTAIR stärker exprimierenden Klon und einem LV-Klon bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Die Histonmethylierung an H3K4 und H3K27 wurde in den gleichen Klonen mittels ChIP ermittelt. Als Kontrolle wurde eine Präzipitation mit einem unspezifischen IgG durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test bestimmt (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (a) *PLAGL1*, (b) *MEST*, (c) *CDKN1C*, (d) *IGF2*, (e) *PPP1R9A*, (f) *GRB10*, (g) *H19*.

5.11.2 DNA-Methylierungsveränderungen an geprägten Genen

Da über die Veränderungen der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 nur ein Teil der beobachteten Expressionsveränderungen erklärt werden konnten, wurde vermutet, dass auch andere epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen könnten. Ein wichtiger epigenetischer Mechanismus ist die DNA-Methylierung. Da in den HOTAIR-Klonen beider UC-Zelllinien im Expressionsarray die *de novo* DNMT3A verstärkt exprimiert wurde (VM-CUB1: 1,6x $p = 0,0047$; 5637: 1,87x $p = 0,0015$), wurde vermutet, dass durch die lncRNA HOTAIR die DNA-Methylierung von Zielgenen beeinflusst werden könnte. Daher wurde zuerst eine Sequenz in der differentiell methylierten Region (DMR) des *PLAGLI*-Locus mittels Pyrosequenzierung untersucht.

Das Gen *PLAGLI* besitzt zwei Promotoren, die zu unterschiedlich langen Transkripten führen. Nur der zweite Promotor ist elterlich geprägt und differentiell exprimiert; er führt zur Bildung der kürzeren Transkripte [148]. In diesem Abschnitt lag der verwendete Assay, der sechs CpG-Stellen analysiert (Abb. 5.54 a). In beiden Leervektor-Kontrollen waren ca. 25 % der CpG-Stellen methyliert. In beiden VM-CUB1_HOTAIR-Klonen stieg die Methylierung bis auf 100 % an. Dagegen wurden in der UC-Zelllinie 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression nur kleine Veränderungen detektiert, die zwischen den beiden Klonen nicht konsistent waren (Abb. 5.54 b).

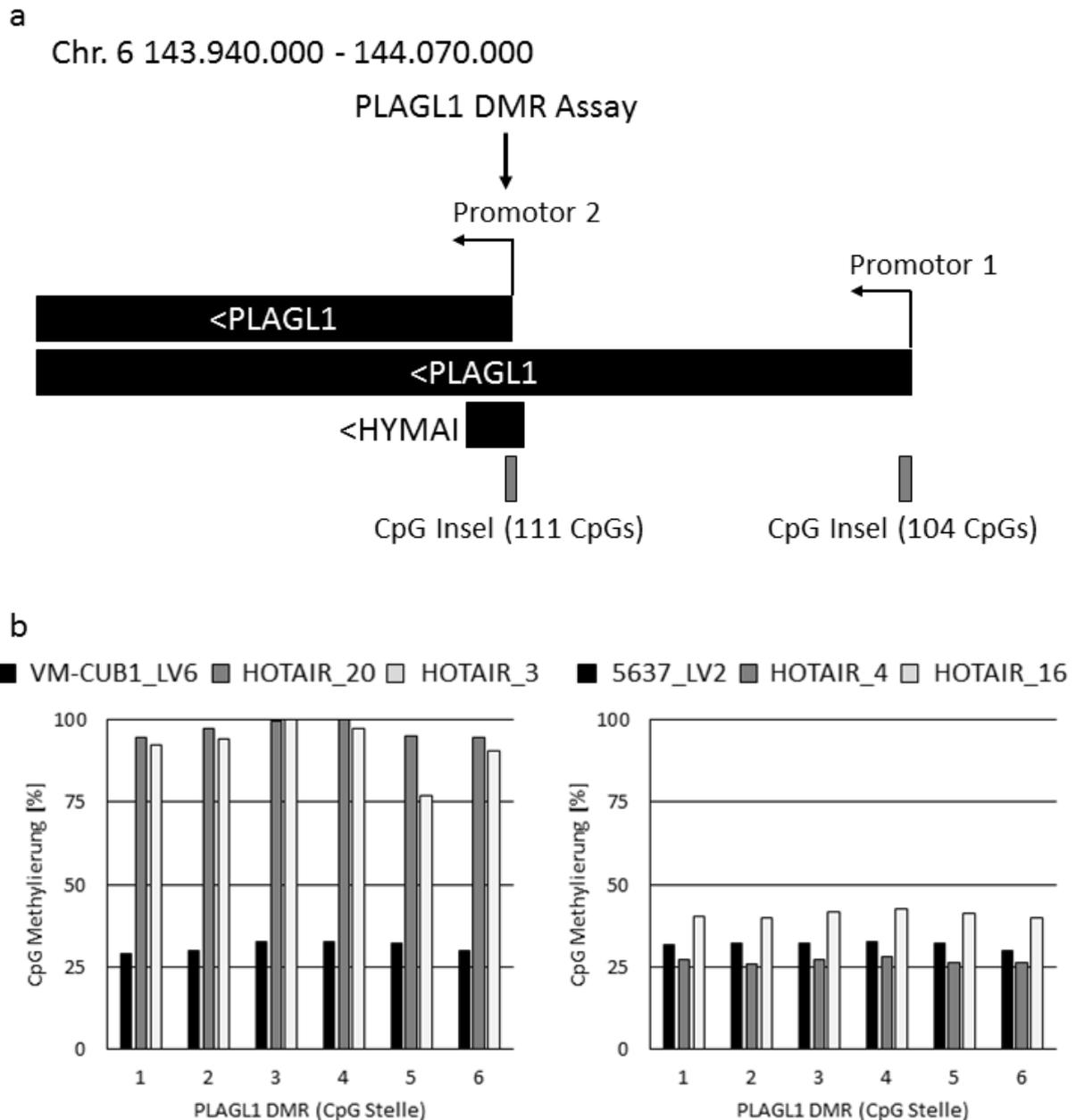


Abbildung 5.54: Lage der *PLAGL1*-DMR auf Chromosom 6 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

(a) Das Schema wurde anhand von Daten des UCSC (*University of California Santa Cruz*) *Genome Browsers* erstellt. (b) Der Grad der DNA-Methylierung wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Es wurde eine Sequenz mit sechs CpG-Stellen auf Chromosom 6 im *PLAGL1*-Promotor 2 in jeweils zwei HOTAIR-Klonen und dem LV-Klon aus VM-CUB1 und 5637 untersucht.

Da die DNA-Methylierungsveränderungen in der untersuchten *PLAGL1*-DMR in den VM-CUB1-Klonen so stark waren, wurden noch drei weitere DMRs untersucht, die in der Nähe von geprägten Genen liegen.

Auf Chromosom 7 wurde in der Promotorregion der Gene *SGCE* und *PEG10* eine Sequenz in der *SGCE*-DMR analysiert (Abb. 5.55 a). In diesem Chromosomenabschnitt liegen außerdem

die geprägten Gene *TFPI2*, *PPP1R9A* und *PONI-3*. Nach stabiler HOTAIR-Überexpression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurden die Gene *TFPI2*, *SGCE*, *PEG10* und *PPP1R9A* verstärkt exprimiert. Die DNA-Methylierung der SGCE-DMR nahm über alle fünf CpG-Stellen hinweg um je 20 % in beiden HOTAIR-Klonen der VM-CUB1 ab. In der UC-Zelllinie 5637 erhöhte sich nach stabiler HOTAIR-Überexpression die Expression von *PPP1R9A*. Hier wurde eine lokalisierte Verminderung der DNA-Methylierung an der zweiten CpG-Stelle nur im stärker HOTAIR-exprimierenden Klon detektiert (Abb. 5.55 b).

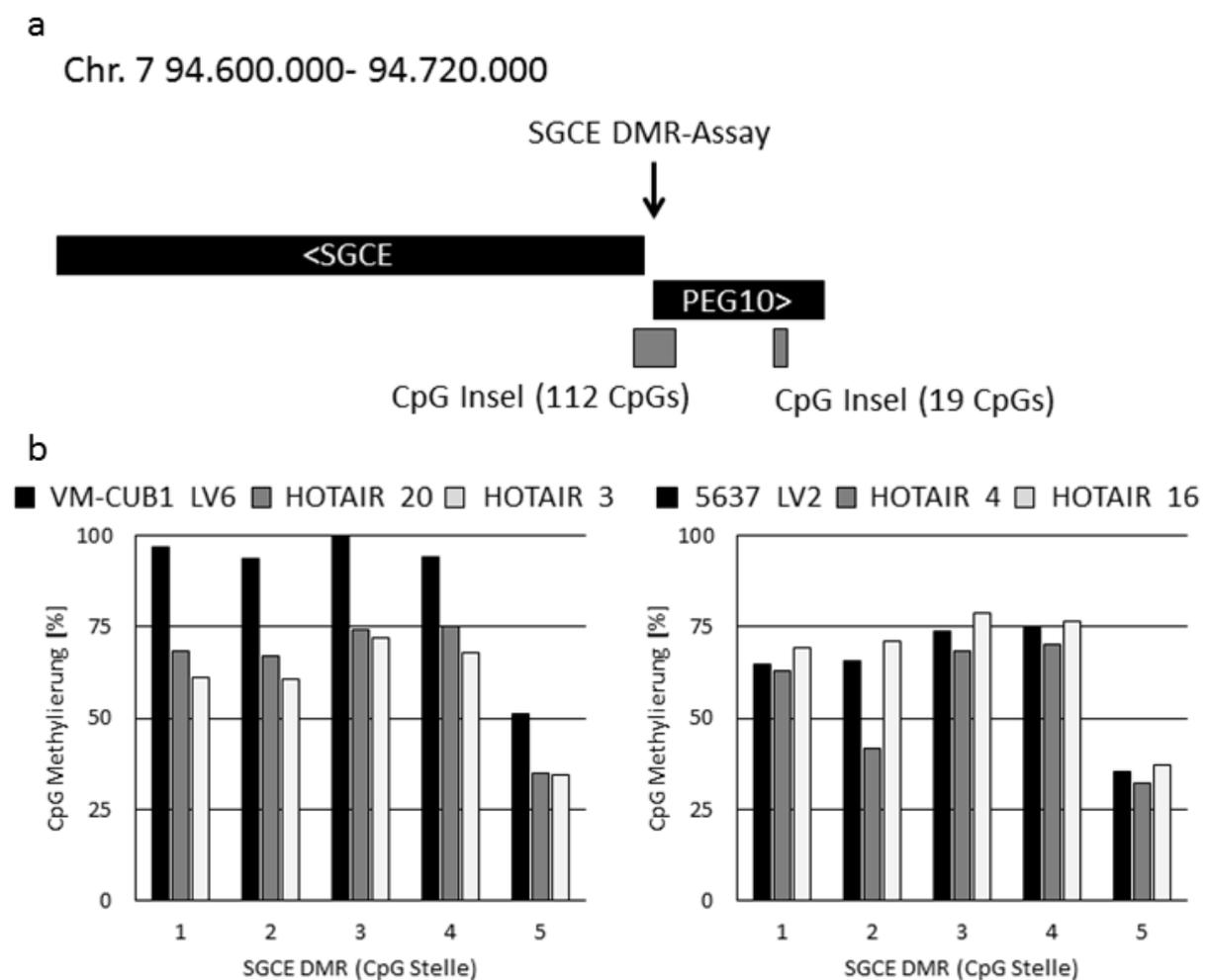


Abbildung 5.55: Lage der SGCE-DMR auf Chr. 7 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

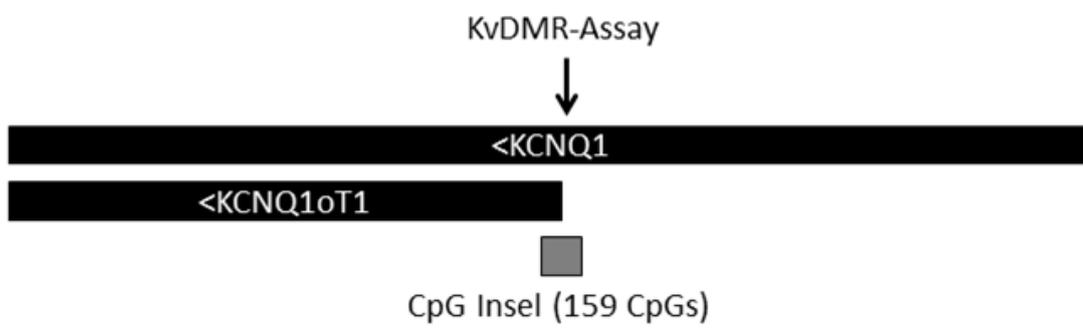
(a) Das Schema wurde anhand von Daten des UCSC (*University of California Santa Cruz Genome Browsers*) erstellt. (b) Der Grad der DNA-Methylierung wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Es wurde eine Sequenz auf Chromosom 7 mit fünf CpG-Stellen im gemeinsamen Promotor der Gene *SGCE* und *PEG10* in jeweils zwei HOTAIR-Klonen und dem LV-Klon von VM-CUB1 und 5637 untersucht.

Zusätzlich wurden zwei Sequenzen auf Chromosom 11 analysiert. Die KvDMR ist im *potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1* (*KCNQ1*)-Gen lokalisiert

und beeinflusst die Expression von *CDKN1C* (Abb. 5.56 a). Das *CDKN1C*-Gen wurde in beiden UC-Zelllinien nach stabiler HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert. Im VM-CUB1_LV-Klon wurde über alle sieben CpG-Stellen eine fast 100 % Methylierung gemessen. Lokalisiert wurde die DNA-Methylierung an der ersten CpG-Stelle im schwächer HOTAIR-exprimierenden Klon und an der siebenten CpG-Stelle im stärker HOTAIR-exprimierenden Klon um 20 % vermindert. Das Ausgangsmethylierungsniveau lag im 5637_LV-Klon mit 40 % deutlich unter dem der UC-Zelllinie VM-CUB1. Nach stabiler HOTAIR-Überexpression wurde eine Zunahme über alle sieben untersuchten CpG-Stellen hinweg um 20 % beobachtet (Abb. 5.56 b).

a

Chr. 11 2.650.000- 2.780.000



b

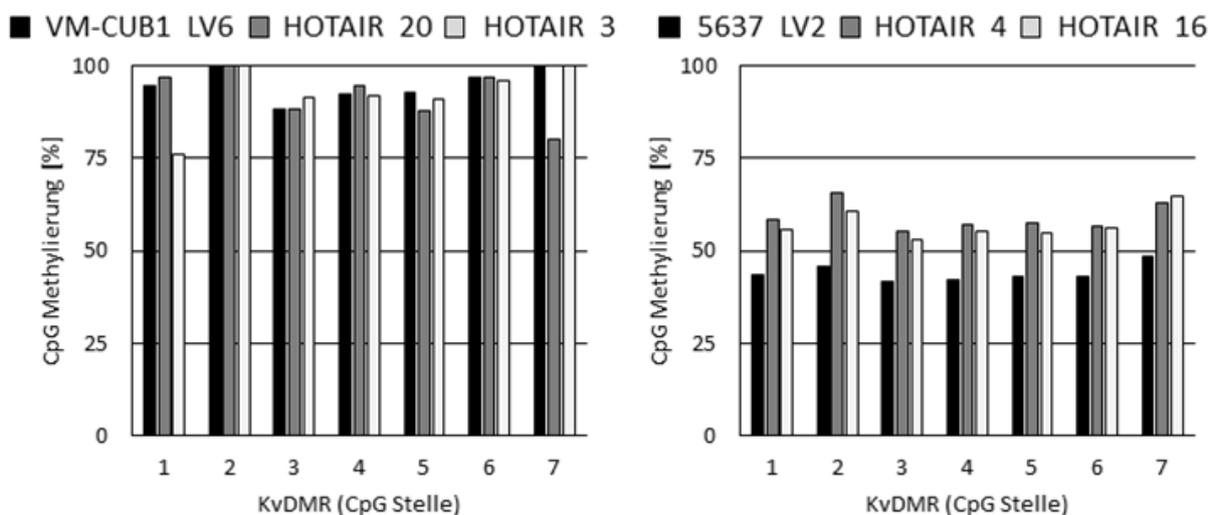


Abbildung 5.56: Lage der KvDMR auf Chr. 11 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

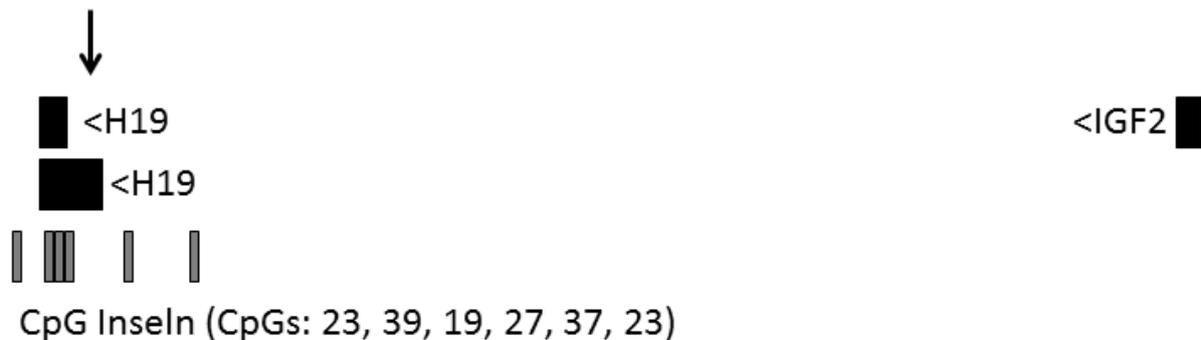
(a) Das Schema wurde anhand von Daten des UCSC (*University of California Santa Cruz*) *Genome Browsers* erstellt. (b) Der Grad der DNA-Methylierung wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Es wurden sieben CpG-Stellen in der Sequenz der KvDMR auf Chromosom 11 in jeweils zwei HOTAIR-Klonen und dem LV-Klon von VM-CUB1 und 5637 untersucht.

Als letztes wurde eine Sequenz analysiert, die in einer DMR des *H19*-Gens lokalisiert ist (Abb. 5.57 a). Dieser Locus war besonders interessant, da nach HOTAIR-Expressionserhöhung unterschiedliche Veränderungen der H19-Expression in den UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 auftraten. Der untersuchte Bereich war im VM-CUB1_LV-Klon an den ersten drei CpG-Stellen zu etwa 25 % methyliert. Nach stabiler HOTAIR-Überexpression sank die DNA-Methylierung auch an diesen drei CpG-Stellen auf fast 0 %. Der untersuchte Bereich war in der UC-Zelllinie 5637 im LV-Klon zu 75 % methyliert. Diese Methylierung sank in beiden HOTAIR-Klonen über den gesamten Bereich hinweg um durchschnittlich 10 % (Abb. 5.57 b).

a

Chr. 11 1.990.000-2.130.000

H19 DMR-Assay



b

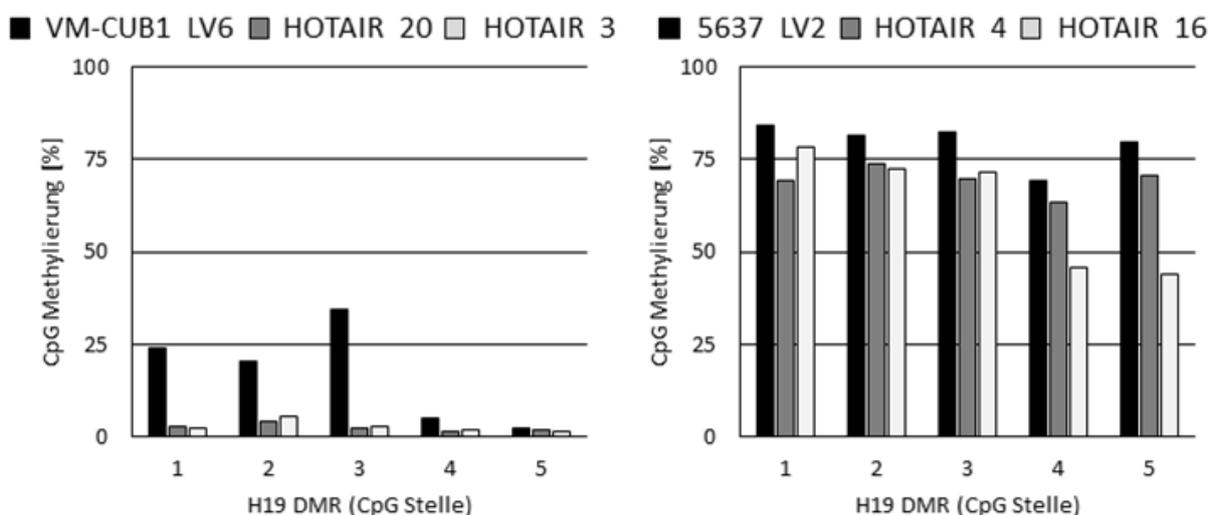


Abbildung 5.57: Lage der H19-DMR auf Chr. 11 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.

(a) Das Schema wurde anhand von Daten des UCSC (*University of California Santa Cruz*) *Genome Browsers* erstellt. (b) Der Grad der DNA-Methylierung wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Es wurden fünf CpG-

Stellen in einer Sequenz am Anfang des *H19* Gens auf Chromosom 11 in jeweils zwei HOTAIR-Klonen und dem LV-Klon aus VM-CUB1 und 5637 untersucht.

Zusammenfassend scheint HOTAIR über ein Zusammenspiel von Histonmethylierung und DNA-Methylierung Einfluss auf die Expression von geprägten Zielgenen zu nehmen.

5.12 Veränderungen des DNA-Methylierungsprofils der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression

Die Beobachtung, dass nach HOTAIR-Überexpression die DNA-Methylierung von vier Sequenzabschnitten auf unterschiedlichen Chromosomen verändert war, warf die Frage auf, in wie weit HOTAIR das DNA-Methylierungsprofil einer Zelle genomweit beeinflusst.

Daher wurde eine globale Untersuchung der DNA-Methylierung durchgeführt. Drei unabhängige DNA-Präparationen jedes Klons wurden mittels Infinium 450K Array untersucht. Analog zum RNA-Expressionsarray wurde der Klon mit der höheren HOTAIR-Expression mit dem jeweiligen LV-Klon aus VM-CUB1 und 5637 verwendet.

Zur statistischen Auswertung wurden drei Gruppen gebildet: VM-CUB1 LV_6 vs. HOTAIR_20, 5637 LV_2 vs. HOTAIR_4 und beide LV zusammen vs. beide HOTAIR-Klone zusammen. Nach Bonferroni-Adjustierung blieben im Vergleich der VM-CUB1 Zellen 284 und innerhalb der 5637 Zellen 45 differentiell methylierte CpG-Stellen übrig. Zelllinienübergreifend wurden 5444 CpG-Stellen signifikant nach Bonferroni-Adjustierung verändert methyliert. Das beim Vergleich innerhalb der Zelllinien nur wenige signifikant differentiell methylierte CpG-Stellen ermittelt wurden, war vor allem ein statistisches Artefakt, da jeweils nur drei Proben mit drei Proben verglichen wurden. Da beim Zelllinien-unabhängigen Vergleich sechs Proben mit sechs Proben verglichen wurden, blieben hier auch mehr CpG-Stellen nach Bonferroni-Adjustierung signifikant differentiell methyliert.

Besonders interessant waren Veränderungen in den HOX-Clustern (Tabelle 5.4). Nach HOTAIR-Überexpression wurden in der UC-Zelllinie 5637 keine HOX-Gene signifikant differentiell methyliert. In der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurde eine CpG-Stelle innerhalb des *HOXA11*-Gens erhöht methyliert. Weiterhin wurde eine CpG-Stelle auf Chromosom 12 signifikant vermindert methyliert. Diese liegt im 5'-UTR des *HOXC4*-Gens und innerhalb des Gens *HOXC5*. Der Zelllinien-unabhängige Vergleich zwischen LV und HOTAIR transfizierten Zellen ergab 14 signifikant differentiell methylierte CpG-Stellen in HOX-Genen. Auf Chromosom 7 wurde eine CpG-Stelle signifikant vermindert methyliert, die in der *transcription start site* (TSS) des *HOXA13*-Gens lokalisiert ist. Auch im HOXB-Cluster wurde eine im 3'-UTR des *HOXB9*-Gens lokalisierte CpG-Stelle signifikant vermindert

methyliert. Außerdem wurden im HOXC-Cluster mehrere CpG-Stellen im Bereich der Gene *HOXC4-C6* differentiell methyliert. Zusätzlich wurde jeweils eine CpG-Stelle im ersten Exon von *HOXC8* vermindert und in der TSS von *HOXC9* erhöht methyliert. Ebenso wurde eine verminderte Methylierung einer CpG-Stelle jeweils in der TSS von *HOXD8* und *HOXD12* gemessen.

Tabelle 5.4: DNA-Methylierungsveränderungen an HOX-Genen.

Rot: erhöht methyliert, Grün: vermindert methyliert, TSS: *transcription start site*, UTR: *untranslated region*.

Chromosom	Position	UCSC_RefGene_Name	UCSC_RefGene_Group	p(Bonferroni)
VM-CUB1 (LV vs. HOTAIR)				
chr7	27223682	HOXA11AS; HOXA11	TSS1500; Body	1,5E-02
chr12	54427293	HOXC4; HOXC5; HOXC5	5'-UTR; Body; 1stExon	2,4E-03
Zelllinien-unabhängig (LV vs. HOTAIR)				
chr7	27240758	HOXA13	TSS1500	8,9E-03
chr17	46698598	HOXB9	3'-UTR	9,5E-06
chr12	54442288	HOXC4	5'-UTR	2,6E-02
chr12	54446576	HOXC4; HOXC4	5'-UTR; TSS1500	6,2E-04
chr12	54410671	HOXC4; HOXC5; HOXC4; HOXC6; HOXC6	5'-UTR; Body; 1stExon; 1stExon ; 5'-UTR	1,4E-02
chr12	54428171	HOXC4; HOXC5; HOXC5	5'-UTR; Body; Body	3,3E-03
chr12	54427528	HOXC4; HOXC5; HOXC5	5'-UTR; Body; Body	1,0E-02
chr12	54427384	HOXC4; HOXC5; HOXC5	5'-UTR; Body; Body	4,1E-02
chr12	54410302	HOXC4; HOXC6; HOXC5	TSS1500; TSS1500; TSS1500	2,1E-02
chr12	54423428	HOXC4; HOXC6; HOXC5; HOXC6	5'-UTR; Body; Body; Body	2,0E-04
chr12	54403314	HOXC8	1stExon	1,7E-02
chr12	54392734	HOXC9	TSS1500	2,6E-02
chr2	176993643	HOXD8	TSS1500	2,4E-04
chr2	176963583	HOXD12	TSS1500	2,5E-05

Über den H2G2 Genome Browser war eine detailliertere Analyse der Daten möglich. Mit diesem Programm wurden die Sequenzen einzelner Gene überprüft. Auffällig war, dass häufig nur einzelne CpG-Stellen isoliert differentiell methyliert waren und nur manchmal die Veränderung über kleine Abschnitte hinweg auftraten. Allerdings waren diese Veränderungen über das gesamte Genom hinweg zu sehen und zwischen den biologischen Replikaten sehr konsistent. Ein gutes Beispiel dafür war die Sequenz des *PLAGL1* Gens (Abb. 5.58). Hier waren besonders in VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression einige CpG-Stellen vermindert oder erhöht methyliert. Zusätzlich wurden in einem Sequenzabschnitt mehrere

benachbarte CpG-Stellen verstärkt methyliert. In diesem Sequenzabschnitt war der verwendete Pyrosequenzierungsassay *PLAGL1* DMR lokalisiert. Damit wurde die in diesem Abschnitt beobachtete Erhöhung des DNA-Methylierungsgrades im VM-CUB1_HOTAIR_20-Klon verifiziert. Interessant war auch, dass einige CpG-Stellen in beiden UC-Zelllinien differentiell methyliert wurden. Dabei traten sowohl gleichgerichtete als auch entgegengesetzte Veränderungen auf.

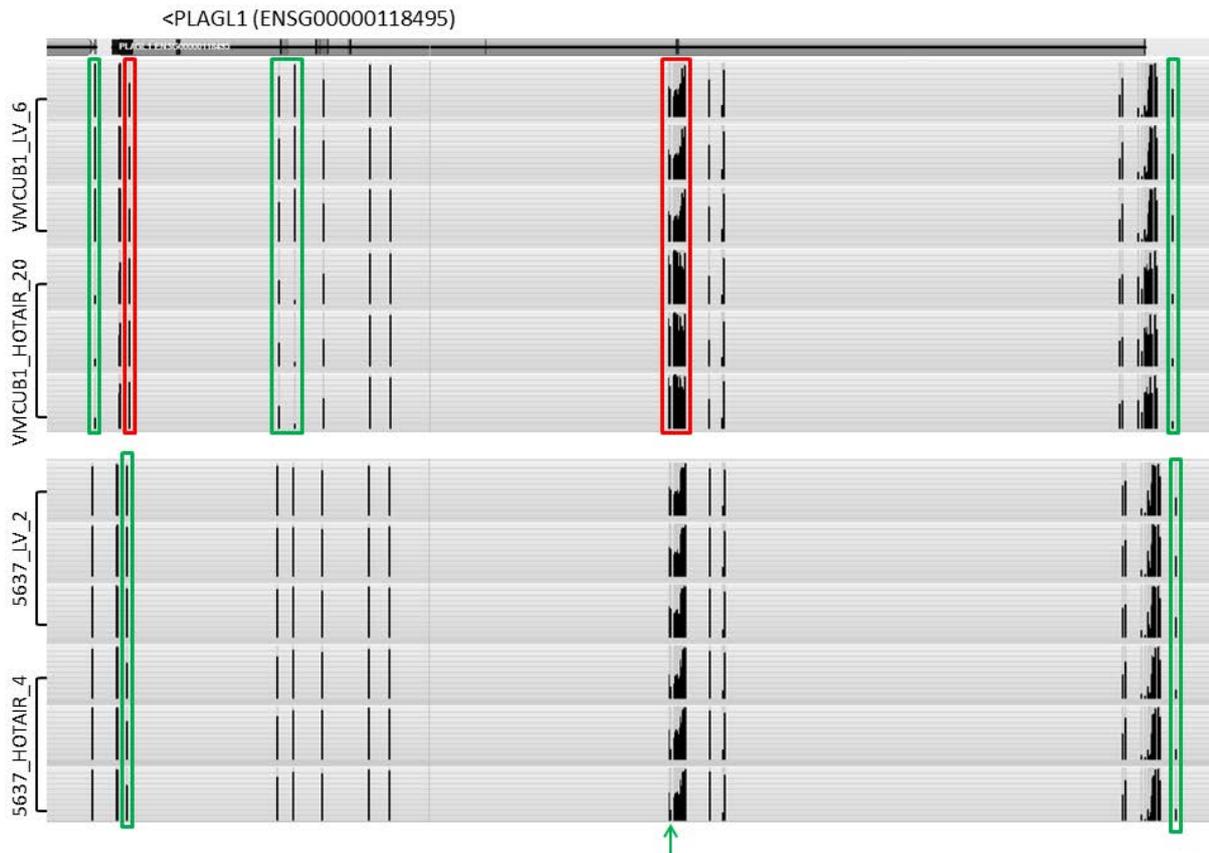


Abbildung 5.58: DNA-Methylierungsprofil des *PLAGL1*-Gens nach stabiler HOTAIR-Überexpression in Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.

Mit Hilfe des H2G2 Genome Browser wurde das Ergebnis des Infinium 450K Array visualisiert. Hier wurde die Sequenz des Gens *PLAGL1* auf Chromosom 7 betrachtet. Untersucht wurden je drei unabhängig isolierte DNAs der Leervektor-Klone und der HOTAIR-Klone mit der höheren HOTAIR-Expression. In den HOTAIR-Klonen vermindert methylierte CpG-Stellen sind grün und erhöht methylierte CpG-Stellen rot umrandet. Eine in 5637 vermindert methylierte CpG-Stelle innerhalb einer CpG-Insel ist mit einem grünen Pfeil hervorgehoben.

Besonders interessant war die Sequenz des *H19*-Gens auf Chromosom 11, denn dessen Expression sank in VM-CUB1 und erhöhte sich in 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression. Im DNA-Methylierungsarray wurden überwiegend unterschiedliche Veränderungen in den beiden UC-Zelllinien beobachtet. Zum Beispiel wurde in der UC-

Zelllinie VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression in einem relativ großen Abschnitt eine Verminderung des DNA-Methylierungsgrades detektiert. Dieser Bereich war in der UC-Zelllinie 5637 unverändert (Abb. 5.72).

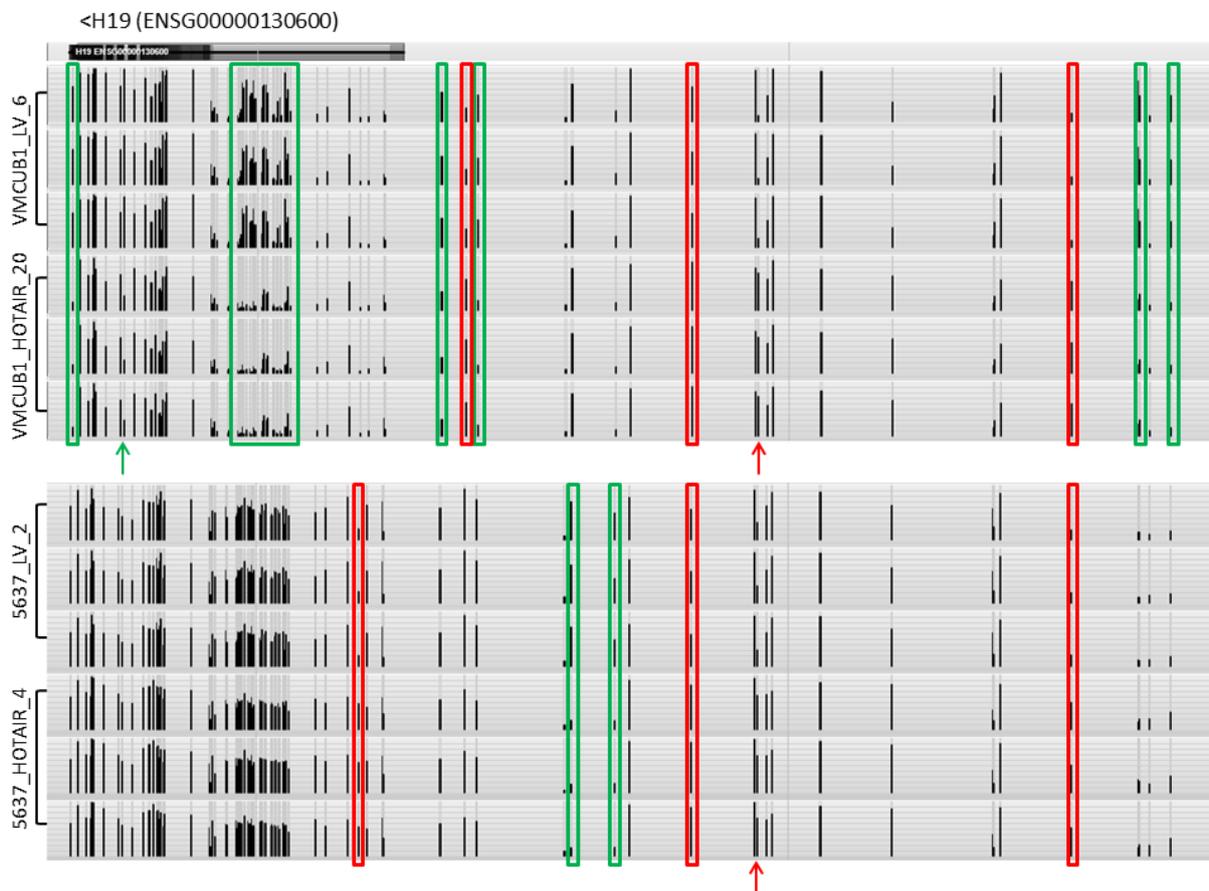


Abbildung 5.59: DNA-Methylierungsprofil des *H19*-Gens nach stabiler HOTAIR-Überexpression in Klonen der UC-Zelllinien VM-Cub1 und 5637.

Mit Hilfe des H2G2 Genome Browser wurde das Ergebnis des Infinium 450K Array visualisiert. Hier wurde die Sequenz des Gens *H19* auf Chromosom 11 betrachtet. Untersucht wurden je drei unabhängig isolierte DNAs der Leervektor-Klone und der HOTAIR-Klone mit der höheren HOTAIR-Expression. In den HOTAIR-Klonen vermindert methylierte CpG-Stellen sind grün und erhöht methylierte CpG-Stellen rot umrandet. Eine in 5637 erhöht methylierte CpG-Stelle innerhalb einer CpG-Insel ist mit einem roten Pfeil hervorgehoben.

Zuletzt wurden die generierten DNA-Methylierungsdaten mit RNA-Expressionsdaten verglichen. Der Vergleich konzentrierte sich auf die Gene, die im DNA-Methylierungsarray über beide UC-Zelllinien hinweg nach Bonferroni-Adjustierung signifikant verändert wurden und die in beiden UC-Zelllinien verändert exprimiert wurden. Die Expressionsdaten wurden nochmals in fünf Gruppen unterteilt: (1) Expression war in beiden UC-Zelllinien erhöht, (2) vermindert, (3) gegensätzlich verändert, (4) in VM-CUB1 erhöht und in 5637 vermindert und

(5) umgekehrt. Der Vergleich ergab Schnittmengen zwischen 30 - 70 Genen (Tab. 5.5). Eine Auflistung dieser Gene ist im Anhang zu finden.

Tabelle 5.5: Anzahl der Gene mit Veränderung der DNA-Methylierung und der Expression.

Es wurden die Gene, deren Methylierung im 450K-Array über beide UC-Zelllinien hinweg nach Bonferroni-Adjustierung signifikant verändert war mit denen verglichen, die im Expressionsarray in beiden UC-Zelllinien verändert exprimiert waren. (1) Expression war in beiden UC-Zelllinien erhöht, (2) vermindert, (3) gegensätzlich verändert, (4) in VM-CUB1 erhöht und in 5637 vermindert und (5) umgekehrt.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Anzahl der gemeinsam veränderten Gene	64	39	68	32	36

Eine GO-Analyse dieser fünf Gensets mit der öffentlich zugänglichen GO-Analyse-Software DAVID ergab keine nach Benjamini-Adjustierung signifikanten Gruppen. Trotzdem können die angegebenen Gengruppen für die Interpretation der Funktion der Gene hinzugezogen werden. So spielten Gene, die nach HOTAIR-Überexpression erhöht exprimiert wurden und eine verändert methylierte CpG-Stelle besaßen, bei der Membranorganisation und der zellularen Homöostase eine Rolle. Dagegen waren Gene vermindert exprimiert und an einer CpG-Stelle verändert methyliert, die an der Chromosomenorganisation, Chromatinmodifikationen, dem Zellzyklus und der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind. Gene im Zusammenhang mit Phosphorylierung waren differentiell methyliert und in der UC-Zelllinie VM-CUB1 erhöht und in 5637 vermindert exprimiert.

5.13 Effekte einer Veränderung der *PLAGL1*-Expression in UC-Zelllinien auf *CDKN1C*, *IGF2* und *H19*

Da der Transkriptionsfaktor *PLAGL1* die Expression anderer geprägter Gene regulieren kann, wurde die *PLAGL1*-Expression in UC-Zelllinien modifiziert.

Zuerst wurde die *PLAGL1*-Expression in den beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und SW-1710 mittels siRNA herunterreguliert und anschließend die Expression der geprägten Gene *CDKN1C*, *IGF2* und *H19* bestimmt. In beiden Zelllinien wurde eine Verringerung der *PLAGL1*-Expression um 50 % erreicht. In der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurden die Gene *IGF2* und *H19* nach *PLAGL1*-Knockdown signifikant erhöht exprimiert. Die *CDKN1C*-Expression veränderte sich nicht. Eine Veränderung der *IGF2*- oder *H19*-Expression konnte in der UC-Zelllinie SW-1710 aufgrund der sehr schwachen Expression dieser Gene nicht detektiert werden. Allerdings wurde *CDKN1C* signifikant verringert exprimiert (Abb. 5.60).

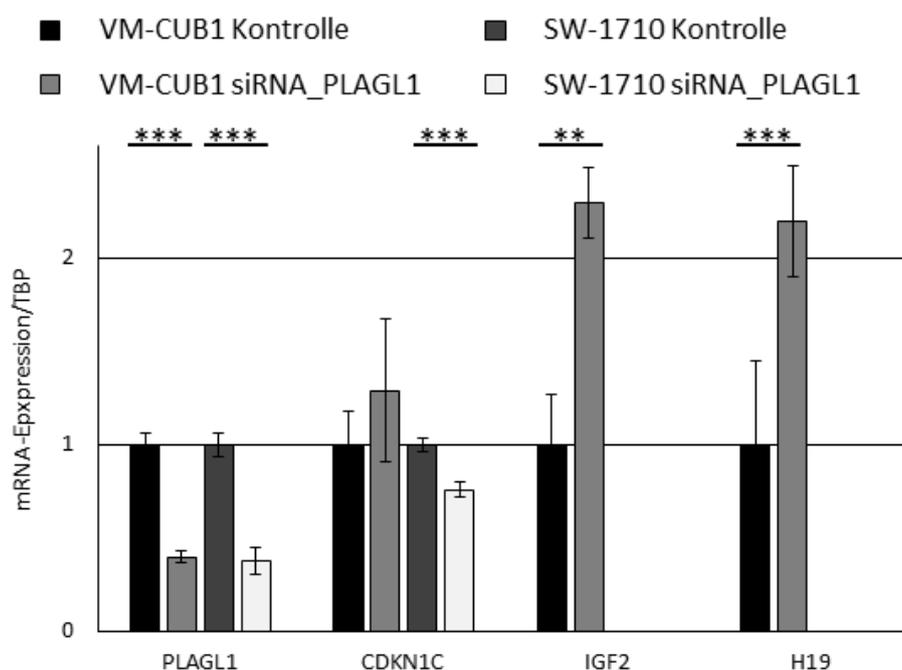


Abbildung 5.60: Effekte eines siRNA-vermittelten *PLAGL1*-Knockdowns in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und SW-1710 auf die Expression der Gene *CDKN1C*, *IGF2* und *H19*.

Die Expression der vier Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Anschließend erfolgte eine Normierung auf die Kontrolle. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Anschließend wurde das *PLAGL1*-Gen ektoptisch in den zwei UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 überexprimiert. Dafür standen zwei verschiedene *PLAGL1*-Konstrukte zur Verfügung. Das pcDNA4/TO_ZAC1_DS Plasmid enthält die kodierende Sequenz des *PLAGL1*-Gens

ohne 5'UTR und es werden drei Isoformen gebildet. Dem zweiten Plasmid fehlte ein Teil des ersten Exons und damit das Start ATG für die Bildung der längeren *PLAGL1*-Isoform, es wird als pcDNA4/TO_ZAC1_Delta bezeichnet. Die kürzere Isoform wird insgesamt verstärkt exprimiert [100].

Die Überexpression war in beiden UC-Zelllinien erfolgreich. Nach ektopischer *PLAGL1*-Expression in der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurde ein Anstieg der *CDKN1C*- und der H19-Expression gemessen. Eine signifikante Verminderung der *IGF2*-Expression wurde nur nach Überexpression mit dem ZAC1_Delta-Plasmid beobachtet (Abb. 5.61 a). Auch in der UC-Zelllinie 5637 wurde nach *PLAGL1*-Überexpression eine erhöhte Expression von *CDKN1C* und der lncRNA H19 detektiert (Abb. 5.61 b).

■ pcDNA4/TO_LACZ ■ pcDNA4/TO_ZAC1_DS □ pcDNA4/TO_ZAC1_Delta

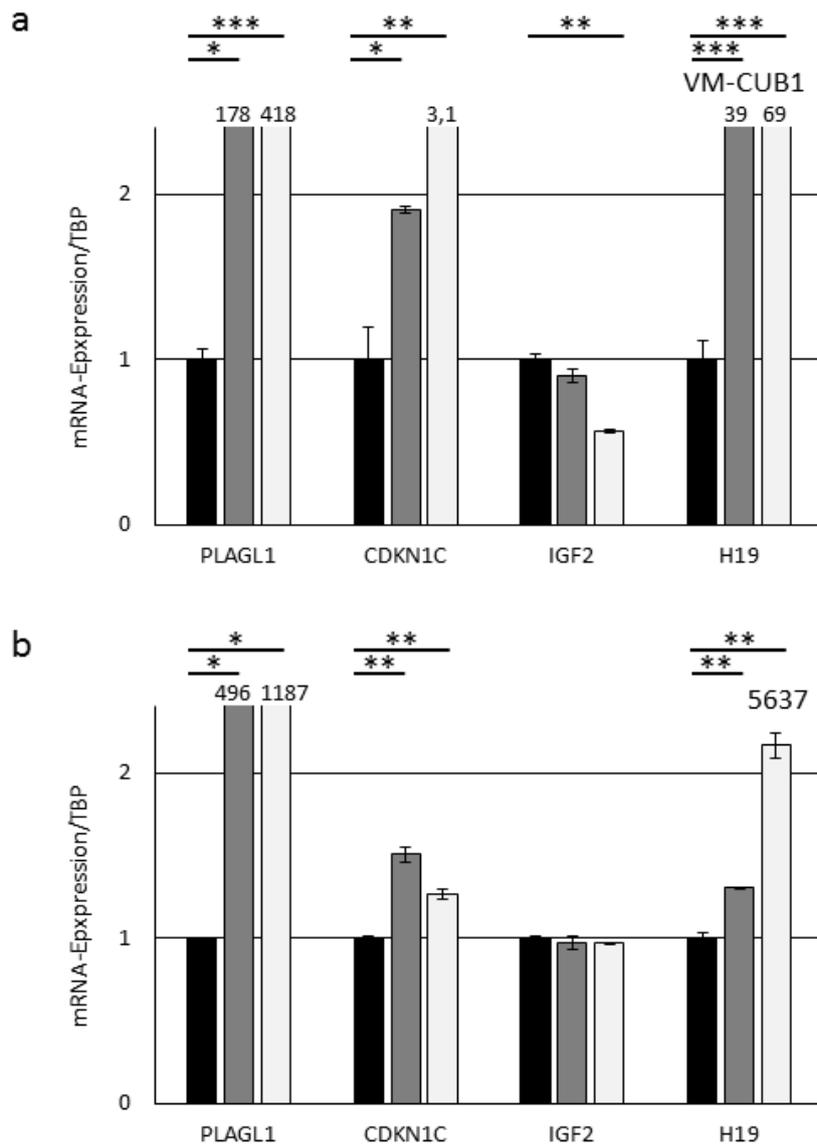


Abbildung 5.61: Effekte einer transienten *PLAGL1*-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 auf die Expression der Gene *CDKN1C*, *IGF2* und *H19*.

Es wurden zwei Plasmide zur Überexpression von *PLAGL1* verwendet, wobei das *ZAC1_Delta* Konstrukt die längere Isoform nicht bilden kann. Die Expression der vier Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen *TBP* normiert. Zur Auswertung wurden die Werte jeweils noch auf den Kontrollvektor pcDNA4/TO_LACZ normiert. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (* $0,01 < p \leq 0,05$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

6 Diskussion

6.1 Die Veränderungen der HOX-Genexpression im Urothelkarzinom

Das Urothelkarzinom (UC) zeichnet sich durch eine starke Heterogenität aus, sowohl klinisch als auch molekular. Vermutlich liegt eine Ursache in aberranten Differenzierungsprozessen. Wichtige Faktoren für die Regulation von Differenzierungsprozessen sind die HOX-Gene. Ob das HOX-Expressionsprofil in UC verändert ist, wurde in einer *in silico* Analyse von drei unabhängigen Datensätzen von UC-Geweben untersucht.

Im UC wurde eine Deregulation von HOX-Genen zuerst im Jahr 2003 von Cantile et al. beschrieben [49]. Der Vergleich von 15 Paaren von Tumorgeweben mit normalen Harnblasengeweben mittels quantitativer PCR ergab eine starke Reexpression der anterioren HOXC-Gene *HOXC4*, *HOXC5* und *HOXC6*. Außerdem waren Expressionsveränderungen der paralogen HOX11 Gene auffällig. Insgesamt lässt sich auch in dieser Untersuchung schon eine gewisse Heterogenität zwischen den Tumorgeweben beobachten.

Auch Vallot et al. beschrieben eine Deregulation der HOX-Genexpression in Urothelkarzinomen [149]. Sie untersuchten 57 UC-Gewebe mittels Microarray und fanden Expressionsveränderungen in den anterioren HOXD-Genen *HOXD1*, *HOXD3* und *HOXD4*, in *HOXA1* und *HOXA5* und den drei HOXB-Genen *HOXB2*, *HOXB3* und *HOXB5*. Interessant ist, dass oftmals eine Expressionsverminderung der *HOXA*- und *HOXD*-Gene mit einer Expressionserhöhung der *HOXB*-Gene einherzugehen schien. Die Autoren konnten mit Hilfe des HOX-Genexpressionsmusters eine Einteilung der Tumorgewebe in molekulare Untergruppen erreichen. Diese könnten zur Verbesserung der Diagnose und Prognose dienen. Auch der DNA-Methylierungsstatus von HOX-Genen könnte zur Diagnostik genutzt werden. Verschiedene DNA-Methylierungsstudien an UC-Geweben ergaben Veränderungen der DNA-Methylierung, insbesondere Hypermethylierung bestimmter HOX-Gene [33, 34, 150]. Wahrscheinlich lassen sich UC anhand des DNA-Methylierungsmusters in Untergruppen aufteilen, sogenannte Epitypen. Für einen dieser Epitypen, der sich durch eine starke EZH2-Überexpression und häufige Hypermethylierung von Entwicklungsprozessen-assoziierten Genen (einschließlich HOX-Gene) auszeichnet, wurde ein epigenetischer Mechanismus postuliert, der auch in anderen Tumorarten beschrieben wurde [151]. Demnach neigen Gene zu einer Hypermethylierung in Tumoren, an denen im Normalgewebe PRC2 gebunden vorliegt und die eine Trimethylierung an H3K27 tragen.

In einer aktuellen Arbeit wurde zudem ein Zusammenhang zwischen der epigenetischen Inaktivierung von HOX-Genen, Differenzierungsstatus und der Prognose beschrieben [152].

In der vorliegenden Arbeit wurde die HOX-Genexpression in drei unabhängigen, öffentlich zugänglichen Datensätzen von Urothelkarzinomgeweben und Geweben aus tumorfreien Harnblasen näher betrachtet. Der Vergleich zwischen den jeweiligen Tumorgeweben und den tumorfreien Harnblasen und auch die Aufteilung nach T-Stadien ergaben einige Veränderungen im HOX-Genexpressionsprofil. Allerdings waren die beobachteten Veränderungen zwischen den drei Datensätzen sehr unterschiedlich. Dies ist wohl auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Gewebeproben zurückzuführen; auch die Qualität der als normal eingestuften Harnblasen könnte eine Rolle spielen.

Einheitlich in allen drei untersuchten Datensätzen wird nur *HOXA2* vermindert exprimiert. Im Set1 und Set3 war *HOXA2* vorwiegend in Tumoren höherer Stadien vermindert exprimiert. Demnach könnte *HOXA2* eventuell als Marker für fortgeschrittene UC dienen. Im Mammakarzinom wurde ebenso einer Herunterregulation von *HOXA2* beschrieben [153] und in Nasen-Rachen-Karzinomen ist *HOXA2* inaktiv auf Grund einer Promotorhypermethylierung. Eine ektopische Reexpression von *HOXA2* verringerte die Invasivität und beeinflusste die RNA-Expression der Matrix Metalloprotease-9, indem *HOXA2* mit dem Transkriptionsaktivator TBP für eine Erkennungssequenz nahe des MMP-9 Transkriptionsstarts konkurriert [154]. Zusammenfassend ist somit eine Beteiligung von *HOXA2* an der Progression des UC wahrscheinlich, insbesondere am Prozess der Metastasierung.

In den Sets 2 und 3 war *HOXA4* gemeinsam bei Betrachtung aller UC-Gewebe vermindert exprimiert. Im Gegensatz dazu ist *HOXA4* in invasiven Ovarialkarzinomen erhöht exprimiert [155]. Allerdings wird von verschiedenen Gruppen eher eine invasionshemmende Wirkung von *HOXA4* im Ovarialkarzinom beschrieben und die beobachtete erhöhte Expression als homöostatische Antwort erklärt [156, 157]. Die gefundene Herunterregulation im UC würde eher für eine Tumorsuppressorfunktion sprechen.

Auch die posterioren *HOXA*-Gene *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXA11* waren in Set1 und Set2 über alle Stadien hinweg vermindert exprimiert. Für *HOXA9* ist in nicht muskelinvasiven UC-Tumoren eine verminderte Expression beschrieben [158]; diese ging mit einer erhöhten Promotormethylierung einher. Diese erhöhte Methylierung korrelierte mit einer schlechten Prognose. *HOXA9* gehört zu den HOX-Genen, die in soliden Tumoren am häufigsten verändert sind [159]. So wirkt *HOXA9* als Onkogen in Leukämien [160, 161], aber inhibiert Tumorwachstum und Metastasierung im Mammakarzinom [162, 163]. In Glioblastomen sind *HOXA9* und *HOXA10* erhöht exprimiert und diese erhöhte Expression korreliert mit einer schlechten Prognose [164, 165]. Auch für das Lungenkarzinom wurde eine erhöhte

Expression von *HOXA10* beschrieben [166]. Alle drei *HOXA*-Gene sind in epithelialen Eierstocktumoren überexprimiert und verändern deren Differenzierung [167].

Im *HOXB*-Cluster war in Set1 und Set2 in den UC-Tumoren *HOXB7* erhöht und *HOXB13* vermindert exprimiert. Auffällig war, dass im Set1 *HOXB4-B9* in nicht muskelinvasiven Tumoren (Ta und T1) erhöht exprimiert waren. Da in diesem Set die zahlenmäßig größte Gruppe von Ta und T1-Tumoren untersucht wurden, könnte dieses Ergebnis darauf hindeuten, dass eine Aktivierung von *HOXB*-Genen wichtig für die Entstehung des UC ist. Eine erhöhte *HOXB7*-Expression ist in Darmtumoren mit erhöhter Proliferation, Metastasierung und einer schlechten Prognose assoziiert. *HOXB7* reguliert den Zellzyklus über eine Hochregulation von Cyclin D und Verminderung von p27^{Kip1} sowie Aktivierung der MAPK- und PI3K-Akt-Signalwege [168]. Auch für Ovarialkarzinome wurde eine erhöhte *HOXB7*- und *HOXB13*-Expression beschrieben, die zu einer Verstärkung der Invasivität führte [169].

Hingegen trat die Inaktivierung von *HOXB13* erst ab dem T1-Stadium im UC-Set1 auf. Somit könnte die Inaktivierung von *HOXB13* entscheidend für die Progression von UC sein. *HOXB13* gehört neben *HOXA9* zu den in soliden Tumoren am häufigsten veränderten HOX-Genen [159]. In Tumoren mit urotheliale Ursprung ist *HOXB13* nicht oder nur schwach exprimiert und daher kann die *HOXB13*-Expression als Marker für die Unterscheidung von urothelialen Karzinomen gegenüber Prostatakarzinomen dienen, in denen *HOXB13* in der Regel sehr stark exprimiert ist [170]. Auch im Leberkarzinom ist *HOXB13* häufig stark exprimiert; dies korreliert mit der Progression und einer schlechten Prognose [171].

Für das *HOXC*-Cluster konnte die von Cantile et al. beschriebene Reaktivierung von anterioren *HOXC*-Genen nur bedingt reproduziert werden [49]. Nur im Set3 wurde eine erhöhte *HOXC6*-Expression beobachtet. In den Sets 2 und 3 wurde dagegen eine verminderte *HOXC5*-Expression gefunden. In einem kleinen UC-Gewebeset (19 UC) wurde in unserer Arbeitsgruppe für die Hälfte der Gewebe eine erhöhte Expression von *HOXC5* und *HOXC6* nachgewiesen [108, 172]. Dies deutet darauf hin, dass molekulare Untergruppen des UC mit und ohne Aktivierung der posterioren *HOXC*-Gene existieren, ähnlich wie im Mammakarzinom. Im Mammakarzinom ist die *HOXC5*-Expression in Tumorgewebe mit mutiertem p53 geringer als in normalen oder Tumorgewebe mit Wildtyp p53 [153]. Im Prostatakarzinom sind *HOXC5* und die benachbarten HOX-Gene *HOXC4* und *C6* vermehrt exprimiert. Dies geht mit einem aggressiveren Phänotyp einher [46, 173].

Auch im *HOXD*-Cluster wurden in den UC-Datensätzen Gene differentiell exprimiert. *HOXD8* war in den Sets 1 und 3 in den UC-Gewebe signifikant vermindert exprimiert. Auch in invasiv-duktalem Mamma- und in Darmkarzinomen ist *HOXD8* im Vergleich zu normalem

Gewebe vermindert exprimiert [153, 174]. Die posterioren *HOXD*-Gene wurden wiederum in einem kleinen UC-Gewebeset (19 UC) von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Generell wurde eine sehr heterogene Verteilung der Expression beobachtet [108, 172]. Diese deutet auf eine Veränderung der Expression und somit eine regulatorische Funktion dieser Gene während der UC-Entstehung hin. Allerdings wird auch hier erst eine Einteilung in molekulare Untergruppen deutlichere Zusammenhänge zu Diagnose und Prognose ergeben.

Die Harnblase besteht aus drei morphologisch unterscheidbaren Zellschichten und wahrscheinlich besitzen diese, ähnlich wie im Darm [175], unterschiedliche HOX-Expressionsmuster. Daher ist es nicht unerwartet, dass sich die HOX-Genexpression in den UC-Tumoren unterschiedlich stark verändern, denn die Tumore gehen aus verschiedenen Zellschichten der Harnblase hervor [42, 176]. Wenn in Zukunft das HOX-Expressionsmuster der einzelnen Zellschichten der Harnblase bekannt ist, könnte geklärt werden, aus welcher Zellschicht der zu untersuchende Tumor stammt und ob der Vergleich der HOX-Expressionsmuster ein gutes diagnostisches Mittel bietet.

6.2 Die Expression der lncRNA HOTAIR im Urothelkarzinom und ihr Einfluss auf die *HOXD10*-Expression

In verschiedenen Tumorarten ist die lncRNA HOTAIR als überexprimiert beschrieben; sie führt häufig zu einem aggressiven Phänotyp (vgl. 1.3). Im Detail wird eine Regulation der posterioren *HOXD*-Gene, insbesondere von *HOXD10 in trans* durch HOTAIR angenommen, sodass durch den Transkriptionsfaktor HOXD10 einige der Effekte von HOTAIR vermittelt werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, in wie weit eine veränderte HOTAIR-Expression zur Veränderung des HOX-Expressionsmusters und zu einem aggressiven Phänotyp im Urothelkarzinom der Harnblase (UC) beiträgt.

Die HOTAIR-Expression war in etwa der Hälfte der untersuchten UC-Zelllinien und der UC-Gewebe erhöht. Am stärksten war die Überexpression in einigen fortgeschrittenen UC-Geweben. Dort bestand ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen einer hohen HOTAIR-Expression und dem UC-spezifischen Überleben. Eine Erhöhung der HOTAIR-Expression in pTa/pT1 UCs, wie kürzlich beschrieben [81], konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde die verwendete Gewebeserie der vorliegenden Arbeit aus Zystektomien gewonnen und enthält daher nur wenige Gewebe dieser Stadien. Im Mammakarzinom wurde eine hohe HOTAIR-Expression ebenfalls überwiegend in

fortgeschrittenen, oft metastasierten Tumoren gefunden [77]. Ebenso wurde eine Überexpression nur in einem Teil von Kolorektalkarzinom-Geweben detektiert [79].

Zusätzlich wurde in einigen der untersuchten UC-Zelllinien eine erhöhte HOTAIR-Expression gemessen; in Zelllinien des Mamma-, Prostata- und Ösophaguskarzinoms war die HOTAIR-Expression ebenfalls stark heterogen. Im Vergleich war das erreichte HOTAIR-Niveau in den UC-Zelllinien am geringsten. Nach der Literatur scheint HOTAIR vorzugsweise in aggressiven Tumoren mit hohem Metastasierungspotential exprimiert zu sein [52, 177]. Dies lässt sich teilweise anhand der untersuchten Zelllinien validieren. So besitzen die invasive Mammakarzinom-Zelllinie T47D und die metastasierte Ösophagus-Adenokarzinom-Zelllinie PT1590 eine sehr starke HOTAIR-Expression.

Initial wurde in Mammakarzinomzellen ein Zusammenhang zwischen einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und einer hohen HOTAIR-Expression beschrieben. Durch HOTAIR werden Adhäsionsmoleküle, besonders Proto-Cadherine, reprimiert und der EMT-Faktor Snail wird induziert. Deshalb wurde eine erhöhte HOTAIR-Expression vor allem in Zelllinien mit einem mesenchymalen Phänotyp erwartet. Dies scheint auch in UC-Zelllinien in gewissem Maße der Fall zu sein, denn gerade in UC-Zelllinien SW-1710 und 639-V mit einem eher mesenchymalen Phänotyp war HOTAIR gut zu detektieren. Als Kontrolle der verwendeten qRT-PCR wurde die beschriebene hohe HOTAIR-Expression in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 validiert.

Da das HOX-Genexpressionsmuster spezifisch für jedes Gewebe ist, wäre es ungewöhnlich, wenn eine HOTAIR-Überexpression in verschiedenen Tumorarten zu gleichen Effekten, die über HOX-Faktoren vermittelt wurden, führte. Die posterioren Gene *HOXD10* und *HOXD12* sind in normalen, tumorfreien Geweben der Harnblase exprimiert, was darauf hindeutet, dass sie an der urothelialen Homöostase beteiligt sind. Trotzdem wurden beide Gene in einigen UC-Geweben erhöht exprimiert. In Fibroblasten wird durch HOTAIR die Expression von *HOXD8-D11* über die Rekrutierung des PRC2 unterdrückt [48]. Eine inverse Korrelation zwischen HOTAIR- und *HOXD10*-Expression wurde im Mammakarzinom beobachtet [77]. Diese Korrelation konnte in den untersuchten UC-Geweben, ähnlich wie für Hirntumore, nicht gefunden werden [178]. Im Gegensatz wurde sogar eine positive Korrelation zwischen HOTAIR- und *HOXD10*- bzw. *HOXD12*-Expression gemessen.

Die meisten Effekte auf Zielgene wurden in Langzeit-Experimenten detektiert [77]. Entsprechend konnten Veränderungen im HOX-Expressionsmuster in stabil transfizierten HOTAIR-Klonen festgestellt werden. Während in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinie 5637 eine verminderte *HOXD10*-Expression gemessen wurde, war in HOTAIR-Klonen der

UC-Zelllinie VM-CUB1 die Expression von *HOXD8* und *D9* erhöht. Dies sind Beispiele dafür, dass sich die HOTAIR-Zielgene im HOXD-Cluster zwischen dem UC und Mammakarzinom unterscheiden und dass diese sogar zwischen den Zelllinien einer Tumorentität variieren können. Da die Faktoren, die für die gewebespezifische Expression von HOX-Genen verantwortlich sind, immer noch wenig verstanden sind, muss in Zukunft untersucht werden, welche Faktoren die Zelltyp-abhängigen Effekte von HOTAIR auf HOX-Gene verursachen. Wahrscheinlich wirkt sich hier maßgeblich der endogene epigenetische Zustand dieser Gene im jeweiligen Gewebe aus.

Die Verwendung der gleichen siRNA-Technik wie bei anderen Arbeitsgruppen [77, 79] ergab eine ähnliche Verminderung der HOTAIR-Expression, aber keine Induktion der *HOXD10*-Expression in UC-Zelllinien. Auch im Ovarialkarzinom wurde *HOXD10* nach HOTAIR-Knockdown nicht induziert [53].

Ein Nachteil von siRNA-basierten Knockdowns ist, dass sie überwiegend die cytoplasmatische Fraktion von lncRNAs erreichen und daher nur wenig Einfluss auf deren Funktionen im Nukleus nehmen. Trotzdem wurden siRNA-vermittelte Knockdowns nicht nur in den anfänglichen Studien zu HOTAIR verwendet, sondern sind weiterhin üblich. Als Alternative wurden in dieser Arbeit Antisense-Oligonukleotide, sogenannte LNAs, verwendet, die auch die nukleare Fraktion herunterregulieren sollen. Allerdings konnte auch damit hauptsächlich eine Verringerung der cytoplasmatischen Fraktion erreicht werden und es wurden keine Effekte auf die *HOXD10*-Expression beobachtet.

6.3 Zelllinienspezifische Effekte einer HOTAIR-Überexpression

Welchen Einfluss eine ektopische Überexpression von HOTAIR auf zelluläre Eigenschaften von Urothelkarzinom-Zelllinien hat, wurde anhand von drei stabil HOTAIR-überexprimierenden UC-Zelllinien untersucht. Dabei wurden gravierende Unterschiede zwischen den Zelllinien deutlich; die Überexpression von HOTAIR wirkte sich auf die Eigenschaften der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 teilweise sogar entgegengesetzt aus. Die HOTAIR-Effekte in der UC-Zelllinie T24 bewegten sich zwischen denen der anderen beiden. Somit stellen die durch HOTAIR in den beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 hervorgerufenen Effekte wahrscheinlich die Extrema der Möglichkeiten dar.

Der Phänotyp der stabil transfizierten HOTAIR-Klone der UC-Zelllinie VM-CUB1 ähnelte sehr dem von Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression aus dem Mammakarzinom [77], Magenkarzinom [80], Lungenkarzinom [179] und Bauchspeicheldrüsenkarzinom [76]. Dieser Phänotyp umfasste eine gesteigerte Proliferation, erhöhtes verankerungsunabhängiges

Wachstum und eine mesenchymalere Morphologie mit gesteigertem Invasions- und Migrationsverhalten. Diesem Phänotyp entsprachen Veränderungen der Expression von Genen in den VM-CUB1-Klonen, die mittels Microarray-Analyse identifiziert und mit qRT-PCR validiert wurden. Denn die GO-Analyse ergab, dass Gene, die Zellzyklus und Zellbewegung positiv beeinflussen, induziert wurden. Die morphologisch erkennbare epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der VM-CUB1 Zellen nach HOTAIR-Überexpression konnte anhand der Marker E-Cadherin und Vimentin nachvollzogen werden. Zudem war nach der Microarray-Analyse der EMT-Regulator ZEB1 verstärkt exprimiert und Δ Np63 vermindert exprimiert. Δ Np63 ist ein bekannter Marker des epithelialen Phänotyps in UC-Zelllinien und hemmt EMT. Auch in anderen Zelltypen wurde ein Zusammenhang zwischen der HOTAIR-Expression und EMT postuliert [86]. Durch HOTAIR verstärkte Invasions- und Migrationsfähigkeit wurde auch in Zelllinien aus dem Ösophaguskarzinom [75, 180] und Lungenkarzinom [82, 179] beobachtet. Diese durch HOTAIR ausgelösten phänotypischen Veränderungen traten in der UC-Zelllinie VM-CUB1 ohne Veränderungen der *HOXD10*-Expression auf, so dass *HOXD10* nicht der Mediator dieser Effekte sein kann.

In stabil mit HOTAIR transfizierten Klonen der UC-Zelllinie 5637 wurden entgegengesetzte phänotypische Veränderungen sichtbar, wie verminderte Proliferation, Klonogenität und Invasion. Nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Genen war in beiden UC-Zelllinien differentiell exprimiert und die Hälfte davon veränderte sich in entgegengesetzter Richtung. Überraschend wurden in 5637 HOTAIR-Klonen Gene der Immunantwort und Hormonantwort differentiell exprimiert. In Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde nach HOTAIR-Modulation ebenfalls ein Effekt auf Interleukine beschrieben [76], die eine Rolle in der Immunreaktion spielen. Die in der UC-Zelllinie 5637 nach HOTAIR-Überexpression veränderten Gene werden in Zusammenhang mit einem *senescent-associated secretory phenotype* (SASP) gebracht [181]; dazu gehören diverse *insulin-like growth factor-binding proteins* (IGFBPs), *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA), 11 Interleukine, acht CXCL Chemokine, Matrix-Metalloproteasen und Laminine. Der SASP wird in seneszenten Zellen induziert und passend dazu wurden Seneszenz-induzierende Zellzyklus-Inhibitoren, wie p21^{KIP1} und p15^{INK4B}, in HOTAIR-überexprimierenden 5637-Klonen verstärkt exprimiert. Auf Grund der Inaktivierung von sowohl pRB1 als auch p53 durch Mutationen in der UC-Zelllinie 5637 können diese Zellen keine reguläre Seneszenz durchlaufen. Eine teilweise Seneszenz-Induktion mit SASP könnte jedoch die beobachtete verlangsamte Proliferation verursachen. Ähnliche Effekte wurden bisher in anderen Tumorarten nicht beschrieben. Allerdings fielen auch anderen Autoren der oben erwähnten Studie zum Pankreaskarzinom

eine deutliche Variabilität der beobachteten phänotypischen Effekte zwischen den verwendeten Zelllinien auf [76]. Neu ist demgegenüber, dass sogar entgegengesetzte Effekte durch HOTAIR-Überexpression ausgelöst werden können.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion um die Differenzierungsstadien im Urothel und Urothelkarzinomen ist die Beobachtung interessant, dass in den HOTAIR-Klonen der VM-CUB1 die Cytokeratine 14 und 5 verloren gingen, die als Marker von Basalzell- und Vorläuferzellen in diesem Gewebe gelten [176]. Auch p63, ein Regulator und Marker basaler Zellen des Urothels [182, 183], war differentiell exprimiert.

Viele Gene, die an der Festlegung des Zellschicksals und der Morphogenese beteiligt sind, wurden in beiden UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR Transfektion differentiell exprimiert, darunter einige HOX-Gene. Dabei waren in der UC-Zelllinie VM-CUB1 deutlich mehr HOX-Gene betroffen. Diese Effekte sind anscheinend gewebespezifisch, da in anderen Tumorarten deutlich weniger HOX-Gene nach HOTAIR-Modulation differentiell exprimiert wurden. Die genaue Betrachtung der publizierten ChIP-Daten von HOTAIR transfizierten Mammakarzinomzellen der Linie MDA-MB-231 [77] ergab nur vier HOX-Gene (*HOXA4*, *C8*, *D10*, *D13*) mit einer veränderten PRC2-Bindung und somit eventuellen Expressionsveränderungen, allerdings wurde an keinem ein Anstieg der Trimethylierung an H3K27 gemessen. In Lungenkarzinomzellen wurde nur eine Veränderung der *HOXA5*-Expression beschrieben [82]. Wahrscheinlich ist, dass weitere gewebespezifische Faktoren an der Regulierung der HOX-Gene beteiligt sind und dass der endogene epigenetische Zustand dieser Gene im jeweiligen Gewebe maßgeblichen Einfluss nimmt. In diesem Zusammenhang stellen besonders Gene mit Imprinting interessante Kandidaten dar.

Generell wurden Effekte auf über 4.000 Gene genomweit nach HOTAIR-Überexpression in den beiden UC-Zelllinien und Zelllinien anderer Tumorarten beobachtet. Chu et al. fanden ein HOTAIR-DNA Bindemotiv. Es liegt gehäuft in der Nähe von Genen, insbesondere in Enhancerregionen und in Intronen vor. Mittels ChiRP identifizierten sie in einer Mammakarzinom-Zelllinie 832 genomweite HOTAIR-Bindestellen [184]. Weiterhin postulierten Chu et al., dass nach HOTAIR-Bindung an die DNA Chromatin-modifizierende Komplexe, wie PRC2, rekrutiert werden und diese ausgehend von dieser Stelle an der DNA entlang wandern und Chromatinmodifikationen etablieren. So werden wahrscheinlich nicht einzelne Gene reguliert, sondern Gruppen von Genen, die benachbart zur HOTAIR-Bindestelle lokalisiert sind. Daher ist es nicht überraschend, dass eine Modulation der

HOTAIR-Expression die Expression so vieler Gene beeinflusst und sich auch die dadurch ausgelösten Effekte zwischen Geweben und Zellen voneinander unterscheiden.

6.4 Mechanismen der Regulation der Genexpression durch HOTAIR

Vorherige Publikationen betonen die Funktion von HOTAIR, Gene durch Interaktion mit Enzymen, die repressive Histonmodifikationen etablieren, wie EZH2 (H3K27 Methylierung) [48, 77] und LSD1 (H3K4 Demethylierung) [74], zu reprimieren. Demnach hängen viele Effekte von HOTAIR von der Expressionsstärke von EZH2 ab, das in vielen Tumorarten, wie dem Prostata-, Mamma-, Ovarial-, Lungen-, Leber-, Magen- und Ösophaguskarzinom, erhöht exprimiert vorliegt [185-190]. Auch im UC ist EZH2 überexprimiert [191] und korreliert mit einem aggressiven Phänotyp [192]. Ebenso exprimieren die meisten der verwendeten UC-Zelllinien EZH2 stark; auch die PRC2-Komponente SUZ12 ist vermehrt. Die erhöhte Expression von SUZ12 wurde bereits für UC-Gewebe beschrieben [193]. Ähnlich wie EZH2 wird SUZ12 eine tumorfördernde Wirkung in verschiedenen Tumorarten zugeschrieben [194-197]. Zusätzlich zu diesen Polycomb-Faktoren ist *LSD1* in den UC-Zelllinien überexprimiert. Auch in UC-Geweben ist *LSD1* erhöht exprimiert [198]. Da diese erhöhte Expression schon in *low grade* Tumoren auftritt, ist die Aktivierung von *LSD1* möglicherweise ein tumorinitiierender Faktor. *LSD1* wird auch in Lungen- und Darmkarzinomgeweben aktiviert [199]. Zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, dass die bekannten Repressoren, die mit HOTAIR zusammenwirken, in vielen UC-Geweben und -Zelllinien vorhanden sind.

Die Veränderungen der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 wurde in den HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 an vier HOX-Genen untersucht. In den Zellen der VM-CUB1 wurden am *HOXA11*-Locus die nach Literaturlage zu erwartenden Histonveränderungen detektiert, nämlich Abnahme der aktiven Modifikation H3K4me3 und Zunahme der repressiven Modifikation H3K27me2/3. Diese Veränderungen passen in diesem Falle hervorragend zu der beobachteten Expressionsabnahme. Da LSD1 vorzugsweise mono- und dimethyliertes H3K4 demethyliert, könnte HOTAIR auch mit Enzymen der JARID1 (KDM5) Familie interagieren, die insbesondere tri- und dimethyliertes H3K4 demethylieren [200]. Ein interessanter Kandidat wäre JARID1B (PLU-1, KDM5B); dieses ist in einigen Tumoren überexprimiert und mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Phänotyp assoziiert [201-203].

An zwei weiteren Genen (*HOXB2* und *HOXC6*) wurde unerwartet eine Abnahme der Trimethylierung an beiden H3-Lysinen beobachtet. Eine Erklärung dafür könnte darin liegen,

dass HOTAIR mit weiteren histonmodifizierenden Proteinen oder Komplexen interagiert, die eine Abnahme der Trimethylierung an H3K27 katalysieren. Hierfür kommen die Demethylasen UTX (KDM6A) und JMJD3 (KDM6B) in Frage, die eine katalytische JmjC-Domäne enthalten. UTX ist in UC relativ häufig durch Mutationen inaktiviert [36, 41, 204] und scheint in einigen Tumoren als Tumorsuppressor zu wirken, denn ein Verlust von UTX kann zu einer Verstärkung der Proliferation führen [205]. Im Mammakarzinom führt eine UTX-Überexpression jedoch zu einer Verstärkung der Invasivität und Proliferation [206]. Die Ursache dafür ist, dass UTX in verschiedenen Geweben und Zelltypen unterschiedliche Zielgene beeinflusst [38]. Eine wichtige Gruppe von Zielgenen von UTX sind HOX-Gene [207-210]. UTX ist Teil eines transkriptionsaktivierenden Komplexes zusammen mit MLL2/MLL3 H3K4 Methyltransferasen [211]. Denkbar wäre also, dass HOTAIR zum einen EZH2 und LSD1 bindet und so eine Inaktivierung der Transkription bewirkt, zum anderen aber auch mit UTX und MLL2/MLL3 interagiert und dadurch die Transkription von Zielgenen aktiviert. Eine Interaktion von HOTAIR mit einem Proteinkomplex, der eine H3K4 Methylase wie MLL2 oder MLL3 enthält, scheint wahrscheinlich, denn in 5637 Zellen steigt an zwei Genen (*HOXA11* und *HOXC6*) die Trimethylierung an H3K4 signifikant.

An *HOXA11* wird in 5637 Zellen nach HOTAIR-Überexpression zusätzlich die Trimethylierung an H3K27 erhöht. Das gleichzeitige Auftreten von inaktivierenden und aktivierenden Histonmodifikationen, insbesondere H3K4me3 und H3K27me3, definiert bivalentes Chromatin. Die so markierten Gene sind transkriptionell inaktiv; die RNA Polymerase II bleibt gebunden, wird aber nicht aktiv [212]. Bivalentes Chromatin tritt vor allem in embryonalen Stammzellen an Promotorregionen von Genen auf, die für die Entwicklung wichtige Transkriptionsfaktoren und Komponenten von Signalwegen kodieren [213]. Während der Zelldifferenzierung wird häufig eine der beiden Modifikationen entfernt, so dass eine schnelle Aktivierung oder Inaktivierung des Gens in Abhängigkeit vom Zellschicksal erfolgen kann. Einige Regionen behalten auch in adulten Zellen beide Modifikationen [214]. Die Etablierung dieser bivalenten Regionen nach HOTAIR-Überexpression könnte darauf hinweisen, dass die Zellen ein weniger determiniertes Differenzierungspotential erwerben.

Durch die Rekrutierung des PRC2 mit EZH2 oder von REST/CoREST mit LSD1 durch HOTAIR lässt sich nur die Inaktivierung von Genen erklären. Jedoch wurden in beiden UC-Zelllinien nach stabiler HOTAIR-Transfektion genauso viele Gene die Expression aktiviert wie inaktiviert. Auch im Mammakarzinom- [77] und Ösophaguskarzinomzellen [75] wurden viele Gene nach HOTAIR-Überexpression hochreguliert. Umgekehrt wurde in

Pankreaskarzinom-Zelllinien nach siRNA Knockdown von HOTAIR eine Inaktivierung von Genen beobachtet [76]. Die Aktivierung einiger Gene erfolgt sicherlich indirekt. Trotzdem stellt sich die Frage, ob HOTAIR auch direkt eine Genaktivierung vermitteln kann. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass durch die Relokalisation der repressiven Komplexe PRC2 und REST/CoREST von reprimierten Genen zu anderen Genloci repressive Marker verloren gehen können und eine Genaktivierung folgt. Da weiterhin neue Interaktionspartner von HOTAIR entdeckt werden, wie weitere Proteinkomplexe [215] und miRNAs [216, 217], besteht auch die Möglichkeit, dass HOTAIR wie oben schon erwähnt mit Transkriptionsaktivierenden Faktoren interagiert.

Wie in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde, ist HOTAIR nicht nur im Nukleus, sondern auch im Cytoplasma lokalisiert [146]. Welche Funktion HOTAIR dort ausübt, ist bisher nicht geklärt. Denkbar wäre eine Interaktion mit Komplexen, die posttranslationale Modifikationen vermitteln. Auch gibt es Hinweise darauf, dass HOTAIR an der Regulation der Proteolyse beteiligt ist, denn die lncRNA kann in HeLa-Zellen und Fibroblasten die E3 Ubiquitinligasen Dzip3 und Mex3b rekrutieren [215]. Möglich wäre auch eine Beteiligung an der Regulation der Proteinlokalisierung, wie sie für die lncRNA NRON (*non-coding repressor of NFAT*) beschrieben ist. Diese bindet den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen, wie zum Beispiel Mitgliedern der Importin-beta Unterfamilie, wird NFAT aus dem Nukleus heraus transportiert und die Genexpression von NFAT-Zielgenen unterbunden [218]. Auf eine Funktion von HOTAIR beim Prozess der Proteinlokalisierung spricht auch die GO-Analyse der differentiell veränderten Gene nach HOTAIR-Überexpression.

Wie die Bindung von HOTAIR an Interaktionspartner reguliert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Ein möglicher Mechanismus ist die Methylierung von Cytosinen einer funktionellen RNA. Dadurch wird sowohl die Stabilität als auch die Struktur der RNA und somit vermutlich auch die Fähigkeit mit Proteinen zu interagieren beeinflusst [219, 220]. In HEK293 Zellen wurden die EZH2 und LSD1 Bindestellen innerhalb der HOTAIR-RNA nach Methylierung untersucht. Eine Cytosin-Methylierung wurde nur in der LSD1-Bindestelle (Position 1683) entdeckt. Auch in der lncRNA XIST wurde die Methylierung mehrerer Cytosine in der PRC2-Bindestelle beschrieben, welche die Bindung von XIST an PRC2 vermindert [221]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre demnach für die Modulation der Bindungseigenschaften zwischen HOTAIR und LSD1 denkbar.

HOTAIR kann auch Einfluss auf die Expression von Genen nehmen, indem es mit anderen Faktoren um Komplexpartner konkurriert. So bindet HOTAIR EZH2 an der gleichen Stelle

wie BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) und nimmt so Einfluss auf die *HOXA9*-Expression. Eine erhöhte HOTAIR-Expression im Mammakarzinom führte zu einer HOTAIR-EZH2 vermittelten *HOXA9* Repression, die durch Überexpression von BRCA1 geblockt werden konnte [222].

HOTAIR kann nicht nur mit Proteinen interagieren, sondern auch mit miRNAs und wirkt so als sogenannte *competitive endogenous RNA* (ceRNA). HOTAIR bindet in Magenkarzinomzellen miR-331-3p und verhindert so den Abbau der HER-2 mRNA [216]. Auch wurden eine Bindestelle in HOTAIR für die miRNA-130a identifiziert über die HOTAIR diese wahrscheinlich negativ beeinflusst [217]. Zielgene von miR-130a würden entsprechend durch HOTAIR vermehrt exprimiert.

6.5 HOTAIR reguliert elterlich geprägte Gene

Eine Reihe von Genen mit elterlicher Prägung waren nach stabiler HOTAIR-Überexpression in beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 verändert exprimiert, daher stellten sich die Fragen, ob diese Gene eine besondere Gruppe von HOTAIR-Zielgenen darstellen und über welche Mechanismen deren Expression von HOTAIR reguliert wird.

Überwiegend sind diese Gene Bestandteil eines Netzwerkes von geprägten Genen (IGN), das zuerst in der Maus beschrieben wurde [99]. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass ein ähnliches Netzwerk auch im Menschen existiert und wahrscheinlich gewebespezifisch reguliert wird [100, 223, 224]. Im Detail sind im Prostatakarzinom die proteinkodierenden Gene *PLAGL1*, *NDN*, *CDKN1C*, *IGF2*, sowie die lncRNA-Gene *MEG3* und *H19* vermindert und *PPP1R9A* sowie die lncRNA LIT1 verstärkt exprimiert. Der DNA-Methylierungsstatus dieser Gene änderte sich jedoch zumeist nicht [100]. Eine Studie von Lee et al. entdeckte das IGN im Osteosarkom, wo eine Deregulation des IGNs in Osteoblasten zu Differenzierungsdefekten und zur Tumorgenese führt. Dabei soll besonders die lncRNA H19 eine wichtige Funktion innerhalb der Osteogenese innehaben [224]. Eine veränderte Expression von Genen des IGN in der humanen Plazenta beeinflusst das fötale Wachstum [223]. Ein Einfluss von HOTAIR auf Gene des IGN wurde bisher in einer Untersuchung in Mäusen beobachtet [90], nämlich Expressionsveränderungen der geprägten Gene *Dlk1*, *Igf2*, *Mest*, *Plagl1*, *H19* und *Meg3* nach HotaIR-Knockout. Für den Menschen ist der in der vorliegenden Arbeit gefundene Zusammenhang noch nicht publiziert.

Expressionsveränderung von mindestens neun Mitgliedern des IGN nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 wurden beobachtet. An sieben dieser Gene wurde der Trimethylierungsstatus an H3K4 und H3K27 untersucht, um

den Mechanismus der Regulation durch HOTAIR näher zu beschreiben. Da geprägte Gencluster häufig über Veränderungen der DNA-Methylierung kontrolliert werden, wurden zusätzlich DNA-Methylierungsveränderungen an vier *imprinting control regions* (ICR) untersucht.

PLAGL1 kodiert für den Transkriptionsfaktor ZAC1, der die Apoptose und den Zellzyklusarrest reguliert und dadurch das Wachstum supprimiert. Die Überexpression von *PLAGL1* während der fötalen Entwicklung führt zu einem *transient neonatal diabetes mellitus* (TNDM) [225]. *PLAGL1* ist auf dem Chromosom 6p24-25 lokalisiert, einer in Tumoren häufig deletierten Region. In einigen Tumoren ist *PLAGL1* tatsächlich vermindert [100, 226, 227]. Eine Reexpression führt zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest [228, 229]. Dies spricht für eine tumorsuppressive Rolle von *PLAGL1* in Tumoren. Etwa die Hälfte der untersuchten UC-Zelllinien wies jedoch eine erhöhte *PLAGL1*-Expression auf und nur in einem Drittel wurde die erwartete Verminderung beobachtet. In Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals (HNSCC)-Zelllinien war die *PLAGL1*-Expression ebenfalls sehr variabel [230]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass *PLAGL1* zellspezifische Funktionen ausübt [231] und daher unterschiedliche Expressionsniveaus je nach herrschenden Bedingungen aufweist. Für eine zellspezifische Funktion von *PLAGL1* spricht auch, dass sich die Expression während der Keratinocyten-Differenzierung verändert. *PLAGL1* ist signifikant exprimiert in basalen Keratinocyten und deutlich niedriger exprimiert in der ersten suprabasalen differenzierten Schicht der Epidermis [232].

Insbesondere in der UC-Zelllinie VM-CUB1 wurde nach ektoptischer HOTAIR-Expression eine deutliche Verminderung der *PLAGL1*-Expression beobachtet. Diese Expressionsabnahme korreliert mit einer starken Zunahme der DNA-Methylierung am *PLAGL1*-Locus. Auch im Ovarialkarzinom ist die Transkriptionsinaktivierung von *PLAGL1* mit einer Hypermethylierung assoziiert [233]. Da HOTAIR in vielen Tumorarten erhöht exprimiert wird, könnte eine Inaktivierung von *PLAGL1* zu den regulären Funktionen von HOTAIR während der Karzinogenese gehören. Ein weiteres Indiz für eine direkte Regulierung der *PLAGL1*-Expression über HOTAIR sind die Veränderungen der Trimethylierung an H3K4 und H3K27 nach ektoptischer HOTAIR-Expression. In beiden untersuchten UC-Zelllinien steigt die Tri/Dimethylierung an H3K27 in der *PLAGL1* Promotorregion deutlich an. Außerdem wurde eine verminderte *PLAGL1*-Expression nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression auch in weiteren UC-Zelllinien und in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3 beobachtet. Umgekehrt wurde nach siRNA-vermitteltem

Knockdown von HOTAIR eine Erhöhung der *PLAGL1*-Expression in verschiedenen UC-Zelllinien und in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 nachgewiesen. Somit scheint *PLAGL1* ein zelllinien- und womöglich auch gewebeübergreifendes Zielgen von HOTAIR zu sein. Dafür spricht auch, dass in den öffentlich zugänglichen Datensätzen verschiedener Tumorzelllinien nach HOTAIR-Modifikation ebenfalls eine Expressionsveränderung von *PLAGL1* erkennbar ist [52, 75, 76]. Ein weiteres Indiz für eine mögliche Repression von *PLAGL1* durch HOTAIR ist, dass *PLAGL1* in Mammakarzinomgeweben und –Zelllinien vermindert exprimiert ist [227]. Für die Mammakarzinom-Zelllinien MCF7, T47D und SK-BR3 konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche HOTAIR-Expression gemessen werden, demnach wäre in diesen Zellen die Expression von HOTAIR und *PLAGL1* negativ korreliert. HOTAIR könnte also über *PLAGL1* Einfluss auf das IGN, das embryonales Wachstum und Differenzierung reguliert, nehmen.

In der Maus reguliert *PLAGL1* den IGF2/H19-Locus direkt positiv über Bindung des H19 3'-Enhancers, sodass die Expression beider Gene ansteigt [99]. Dieser Mechanismus scheint nicht komplett auf die untersuchten UC-Zelllinien übertragbar zu sein. Die Ursache hierfür liegt wohl auch darin, dass die Expression von H19 und *IGF2* in UC-Zelllinien häufig dereguliert ist, beispielsweise wird *IGF2* von einem alternativen Promotor exprimiert [234-236]. Nach transients Überexpression von *PLAGL1* wurde ein Anstieg der H19-Expression beobachtet, nach siRNA-vermitteltem Knockdown wurde sowohl *IGF2* als auch H19 verstärkt exprimiert.

Im Menschen reguliert *PLAGL1* die *CDKN1C*-Expression, indem *PLAGL1* an einer CpG-Insel im Promotor für die lncRNA LIT1 bindet und diese hochreguliert. Anschließend inhibiert LIT1 die Expression von *CDKN1C* [237]. Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass in murinen neuronalen Stammzellen *Plagl1* über *Tcf4* die *Cdkn1c*-Expression positiv reguliert [238]. Sowohl in der Maus [99] als auch im Prostatakarzinom [100] stieg nach Reexpression von *PLAGL1* die *CDKN1C*-Expression, was mit dem zweiten beschriebenen Mechanismus übereinstimmt. Auch in den untersuchten UC-Zelllinien veränderte sich nach *PLAGL1*-Modulation die *CDKN1C*-Expression gleichgerichtet. Allerdings steigt nach HOTAIR-induzierter *PLAGL1*-Expressionsverringerung die *CDKN1C*-Expression in den UC-Zelllinien. Dies spricht eher für den ersten Mechanismus. HOTAIR scheint somit nicht nur die Expression von *PLAGL1*, sondern auch seine Wirkung auf Zielgene beeinflussen zu können.

Die biologische Funktion von *MEST* ist bis heute nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich ist *MEST* an metabolischen Signalwegen, die Wachstum und Erhaltung von mesodermalen

Zellen regulieren, über eine Hydrolaseaktivität beteiligt [239-241] und beeinflusst das embryonale Wachstum über die negative Regulierung des Wnt-Signalweges durch eine verstärkte Ubiquitinierung von β -Catenin [242]. Eine Deregulation von *MEST* wird im Silver-Russell Syndrom, einer Form des Intrauterinen Kleinwuchses, beobachtet [239]. Im Mamma- und Lungenkarzinom wird *MEST* über eine biallelische Expression, verursacht durch *loss of imprinting* (LOI), erhöht exprimiert [243, 244]. Auch im Wilm's Tumor ist *MEST* hochreguliert [245]. Die Verminderung der *MEST*-Expression nach HOTAIR-Überexpression korreliert in VM-CUB1 Zellen mit einer Abnahme der Trimethylierung an H3K4. Somit könnte *MEST* zu den direkten Zielgenen von HOTAIR, vermittelt über die Rekrutierung von LSD1, gehören. HOTAIR könnte über die Herunterregulierung von *MEST* den Abbau von β -Catenin verringern und somit das Wachstum von Zellen positiv beeinflussen.

Interessanterweise sind in embryonalen Tumoren, besonders in Rhabdomyosarkomen, sowohl *PLAGL1* als auch *MEST* erhöht exprimiert [246]. Möglicherweise ist in diesen, wie auch in Embryonalkarzinomen, HOTAIR nicht oder nur sehr gering exprimiert. Einige Messungen ergaben, dass HOTAIR in den Hodentumor-Zelllinien NCCIT und Tera-1 kaum exprimiert war und somit auch nicht an der Repression von *PLAGL1* oder *MEST* beteiligt sein kann.

Die geprägten Gene *GRB10*, *TFPI2*, *PPP1R9A*, *CDKN1C* und *IGF2* waren in HOTAIR stabil exprimierenden UC-Zellen erhöht exprimiert. Das Signaladapterprotein *GRB10* ist an der Wachstumskontrolle über direkte Wirkungen auf die Zellproliferation und Beeinflussung des Insulin-Signalweges beteiligt. *GRB10* ist gewebespezifisch elterlich geprägt. In der Maus wird *GRB10* in Neuronen vom väterlichen Allel exprimiert und in adulten Geweben vom mütterlichen Allel [247]. In Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals ist *GRB10* hochreguliert und ein siRNA-vermittelter Knockdown führt zu einem verlangsamten Wachstum [248]. Die erhöhte *GRB10*-Expression nach ektopischer HOTAIR-Expression in VM-CUB1 Zellen korreliert mit einer Zunahme der Trimethylierung an H3K4 und einer Abnahme an H3K27. Somit könnte über die Zunahme der *GRB10*-Expression die Proliferation beeinflusst werden. In der Maus wird *GRB10* vor allem als negativer Regulator des Wachstums beschrieben [249, 250]. Vielleicht wirkt *GRB10* zellkontextspezifisch entweder positiv oder negativ auf das Wachstum von Tumorzellen und so könnte die *GRB10*-Expression mit den entgegengesetzten Effekten nach HOTAIR-Überexpression in den beiden UC-Zelllinien zusammenhängen.

Die DNA-Methylierung der *SGCE*-DMR auf Chromosom 7 sinkt in der UC-Zelllinie VM-CUB1 deutlich. Die umliegenden und wahrscheinlich von dieser DMR kontrollierten geprägten Gene *SGCE*, *PEG10*, *GRB10*, *TFPI2* und *PPP1R9A* wurden alle erhöht exprimiert.

Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren regulieren die Zellzyklusprogression, Zellproliferation und Differenzierung. Sie sind involviert in der Tumorsuppression und sind daher in vielen Tumorarten über genetische und epigenetische Mechanismen dereguliert. Das Gen für den Zellzyklusinhibitor p57^{KIP2} (*CDKN1C*) ist generell in Tumoren nicht mutiert, sondern wird über epigenetische Mechanismen herunterreguliert. In einigen Tumoren wird *CDKN1C* über eine erhöhte DNA-Promotormethylierung inaktiviert [251, 252], im Mammakarzinom dagegen über eine EZH2 vermittelte Erhöhung der Trimethylierung an H3K27 [253]. Im UC ist *CDKN1C* in vielen Tumoren herunterreguliert (35 % [254], 78 % [105], 70 % [255]). Auch in einigen untersuchten UC-Zelllinien war die *CDKN1C*-Expression vermindert, allerdings in genauso vielen auch erhöht. In Schilddrüsentumoren ist *CDKN1C* teilweise erhöht [256]. Die *CDKN1C*-Expression scheint vom Differenzierungsgrad des Tumors abhängig zu sein, denn gut differenzierte Tumore früher Stadien besitzen eine starke *CDKN1C*-Expression, die in schlecht differenzierten Tumoren deutlich abnimmt. Auch im Mammakarzinom existiert eine Korrelation zwischen *CDKN1C*-Expression und Differenzierung. Sie nimmt deutlich von einer weit verbreiteten Expression im normalen Epithel (95 %) über *carcinoma in situ* (50 %) zu einer geringen Expression in invasiven Karzinomen (28 %) ab [257].

In der UC-Zelllinie 5637 geht die *CDKN1C*-Expressionserhöhung nach ektopischer HOTAIR-Expression mit einer Erhöhung der Trimethylierung an H3K4 einher. Somit könnte *CDKN1C* unter Umständen auch direkt von HOTAIR reguliert werden.

CDKN1C ist auf Chromosom 11 in einem zweigeteiltem Imprinting Cluster lokalisiert. Dieses Cluster wird vorwiegend über zwei *Imprinted control regions* (ICR), der ICR1 oder H19-ICR und der ICR2 oder KvDMR-ICR, reguliert. Die ICR1 reguliert die Gene *H19* und *IGF2* über die Kontrolle der alternativen Interaktion eines Enhancers mit den jeweiligen Promotoren. Die ICR2 kontrolliert die Gene *KCNQ1*, *LIT1*, *PHLDA2*, *SLC22A18* und *CDKN1C*. Die DNA-Methylierung an beiden DMRs änderte sich nach HOTAIR-Überexpression in den beiden UC-Zelllinien nur wenig. Trotzdem könnte die leichte Veränderung der DNA-Methylierung an diesen beiden ICRs zur Veränderung der Expression dieser Gene führen und somit die beobachteten phänotypischen Veränderungen mit verursachen.

Der Wachstumsfaktor IGF2 fördert das Zellüberleben, die Proliferation und die Differenzierung über die hoch affine Bindung an die Rezeptoren IGF1R und IGF2R. Die beobachtete erhöhte *IGF2*-Expression nach HOTAIR-Überexpression könnte somit eine Ursache für die veränderte Proliferation der UC-Zellen sein. *IGF2* ist in Rhabdomyosarkomen [258], Wilm's Tumoren [259] und Hepatoblastomen [260] überexprimiert. Häufig wird diese IGF2-Überexpression über LOI verursacht [261]. Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen erhöhter IGF2-Expression und schlechter Prognose beschrieben [262-264].

In der vorliegenden Arbeit schien die lncRNA H19 insofern eine Ausnahme zu bilden, dass sie nach ektopischer HOTAIR-Überexpression in VM-CUB1-Zellen vermindert und in 5637-Zellen erhöht exprimiert war. Die Expressionsverminderung in VM-CUB1_HOTAIR Zellen korrelierte mit einer erhöhten Trimethylierung an H3K27. Dies spricht für eine direkte Regulierung durch HOTAIR über die Rekrutierung des PRC2. In den 5637_HOTAIR Zellen korrelierte die erhöhte Expression mit einer leichten Erhöhung der Trimethylierung an H3K4 und einer leichten Abnahme der DNA-Methylierung.

Die mütterlich geprägte lncRNA H19 reguliert das embryonale Wachstum und Differenzierungsprozesse, vermutlich über die Kontrolle der IGF2-Expression und anderer geprägter Gene. Außerdem enthält das *H19*-Gen die miR-675. H19 scheint für eine Feinjustierung des Gleichgewichts zwischen das Wachstum aktivierenden und inaktivierenden Faktoren verantwortlich zu sein [69]. Eine Veränderung der H19-Expression durch Überexpression der lncRNA HOTAIR könnte dieses Gleichgewicht beeinflussen und somit für die beobachteten gegensätzlichen phänotypischen Veränderungen verantwortlich sein. Die Funktionen sind offenbar gewebespezifisch, denn es wurde sowohl eine Wirkung als Tumorsuppressor [265, 266] als auch als Onkogen [267-269] beschrieben. Im Mamma- [270], Urothel- [235], Lungen- [271] und Ösophaguskarzinom [272] ist H19 oft überexprimiert.

Die Regulation einiger geprägter Gene verläuft über die Rekrutierung des Methyl-CpG-bindenden Proteins MBD1. In einem Komplex mit H19 rekrutiert es H3K9-Methyltransferasen an die DMRs von *Igf2*, *Slc38a4* und *Peg1* und beeinflusst so die Transkription [273]. Im Detail führt eine Deletion von H19 in der Maus zu einer erhöhten Expression im embryonalen Muskelgewebe von *Igf2*, *Cdkn1c*, *Gnas*, *Dlk1*, *Rtl1* und *Igf2*. Die Expression von *Plagl1* bleibt jedoch unverändert [69]. Somit scheint *Plagl1* in der Hierarchie über H19 und beide scheinen über *Cdkn1c* zu stehen.

Zusammenfassend scheinen einige geprägte Gene eine besondere Gruppe von gewebeübergreifenden Zielgenen von HOTAIR zu bilden. Die Regulation könnte über ein

HOTAIR vermitteltes Zusammenspiel von Histon- und DNA-Methylierung erfolgen. In der Hierarchie des IGN scheint *PLAGL1* eine übergeordnete Rolle zu spielen und auch H19 bildet einen wichtigen Knotenpunkt. Das gesamte Netzwerk scheint unter der Kontrolle von HOTAIR zu stehen, und diese scheint insbesondere *PLAGL1* und H19 direkt zu regulieren.

6.6 HOTAIR beeinflusst die DNA-Methylierung genomweit

An ausgewählten CpG-Stellen, insbesondere am *PLAGL1*-Genlocus, wurden nach HOTAIR-Überexpression deutliche DNA-Methylierungsveränderungen beobachtet. Es stellte sich nun die Frage, ob durch HOTAIR solche DNA-Methylierungsveränderungen genomweit vermittelt werden.

Nach *Hotair*-Knockout in der Maus wurden keine Veränderungen der Methylierung in der intergenischen differentiell methylierten Region des *Dlk1-Gtl2* Locus beobachtet [90]. Allerdings wurde in dieser Arbeit nur dieser eine Locus untersucht und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass an anderen Loci doch eine Veränderung der DNA-Methylierung auftritt.

Bisher existiert für das humane System nur eine Studie zum Einfluss einer stabilen HOTAIR-Überexpression auf die DNA-Methylierung [75]. Sowohl der Knockdown mittels siRNA als auch die stabile Überexpression von HOTAIR in Ösophaguskarzinom-Zelllinien resultierte in einer differentiellen Expression einer großen Anzahl von Genen. Wiederum wurde hier nach siRNA-Knockdown von HOTAIR nicht nur Aktivierung, sondern auch eine Verminderung der Expression von Genen beobachtet. Mit den HOTAIR stabil überexprimierenden Zellen wurde eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse über den Infinium HUMANMethylation450K BeadChip durchgeführt. Sie ergab, dass die Mutterzelllinie KYSE-180 eine Methylierung von 285062 CpG-Stellen aufweist und dass die KYSE-180_HOTAIR Zellen einen Anstieg von 1,4 % der Methylierung zeigen. Daher schlussfolgern die Autoren, dass HOTAIR eine Rolle in der Erhaltung des DNA-Methylierungsstatus dieser CpG-Stellen innehat. Bei der Betrachtung der zwischen Mutterzelllinien und HOTAIR transfizierten Zellen unterschiedlich methylierten CpGs fiel auf, dass 7475 CpG-Stellen (1,54 %) über das ganze Genom hinweg eine differentielle DNA-Methylierung aufwiesen. Davon waren 80 % (5989 CpG-Stellen) verstärkt methyliert und nur 20 % (1486 CpG-Stellen) hypomethyliert. Somit scheint eine Überexpression von HOTAIR vor allem eine Erhöhung des Methylierungsgrades an ausgewählten CpG-Stellen zu bewirken. Die differentiell methylierten CpGs waren vor allem in Promotoren, innerhalb von Genen (*gene bodies*) und in intergenischen Regionen lokalisiert.

Diese Ergebnisse passen gut zu Beobachtungen an UC-Zelllinien. Hier wurden zelllinienübergreifend genomweit Veränderungen der DNA-Methylierung an 5444 CpG-Stellen gefunden. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass entweder einzelne isolierte CpG-Stellen differentiell methyliert waren, oder kleinere Gruppen von benachbarten CpG-Stellen. Da HOTAIR wahrscheinlich die HOX-Expression beeinflusst, wurde überprüft, ob CpG-Stellen in der Nähe von HOX-Genen differentiell methyliert wurden. Auffällig war, dass eine ganze Reihe von Veränderungen der DNA-Methylierung im anterioren *HOXC*-Locus (*HOXC4-C6*) auftrat. Somit könnte HOTAIR auch über die Modulierung der DNA-Methylierung Einfluss auf die HOX-Expression nehmen.

Der Mechanismus für die durch HOTAIR vermittelten Veränderungen der DNA-Methylierung ist noch unbekannt. Zum einen wäre ein indirekter Mechanismus über die Erhöhung der Expression der DNMT3A denkbar, die in beiden UC-Zelllinien nach HOTAIR-Überexpression beobachtet wurde. Zum anderen könnte HOTAIR mit Regulatoren der DNA-Methylierung interagieren und sie zum Ziellocus rekrutieren. Bisher sind drei lncRNAs beschrieben, die mit Regulatoren der DNA-Methylierung interagieren.

Die lncRNA TARID (*TCF21 antisense RNA inducing demethylation*) induziert die Expression von *TCF21* über Demethylierung des Promotors. Dabei rekrutiert TARID GADD45A (*growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*) an den *TCF21*-Promotor, GADD45A wiederum die Thymin-DNA-Glykosylase für *base excision repair*-vermittelte Demethylierung. Diese beinhaltet die Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin über TET (ten-eleven translocation)-Methylcytosindioxygenase Proteine [274].

Zwei weitere lncRNAs interagieren direkt mit DNA-Methyltransferasen. Die lncRNA Dali (*DNMT1-associated long intergenic*) interagiert mit der DNA-Methyltransferase DNMT1 in der Maus und im Menschen und reguliert so *in trans* den DNA-Methylierungsgrad an CpG-Inseln in Promotoren [275]. Die lncRNA Dum (*developmental pluripotency-associated 2 (Dppa2) upstream binding muscle lncRNA*) inaktiviert die Transkription von benachbarten Genen *in cis*, insbesondere *Dppa2*, über die Rekrutierung der DNA-Methyltransferasen Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3b [276].

Der Einfluss von HOTAIR auf die DNA-Methylierung könnte stattdessen sekundär über Polycomb-faktoren vermittelt sein. Die beiden wichtigsten epigenetischen Mechanismen zur transkriptionellen Inaktivierung von Genen, die repressiven Histonmodifikationen über Polycomb-Komplexe und die DNA-Methylierung, sind eng miteinander verknüpft [277]. Dabei interagiert EZH2, im Kontext des PRC2 oder 3, mit DNMTs. Möglicherweise bindet zuerst

PRC2 an den Promotor des zu reprimierenden Gens und über EZH2 wird die repressive Histonmodifikation H3K27me3 eingefügt. Wenn EZH2 weiterhin an diesen Locus gebunden vorliegt, kann er von DNMTs erkannt und eine DNA-Methylierung eingefügt werden. Über diesen Mechanismus scheint insbesondere die Hypermethylierung von Polycomb-Zielgenen in Tumoren verursacht zu werden [278, 279]. Denkbar wäre, dass HOTAIR diesen Prozess durch die Rekrutierung von PRC2 an Zielgene initiiert und eine erhöhte HOTAIR-Expression in Tumoren somit auch eine erhöhte DNA-Methylierung verursachen kann.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Burger, M., et al., *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer*. Eur Urol, 2013. **63**(2): p. 234-41.
3. Knowles, M.A., *Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?* Carcinogenesis, 2006. **27**(3): p. 361-73.
4. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
5. Eble JN, S.G., Epstein JI, Sesterhenn IA (Eds.), *WHO classification 2004: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organ*. France 2004: IARC Press.
6. Babjuk, M., et al., *EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update*. Eur Urol, 2011. **59**(6): p. 997-1008.
7. Stenzl, A., et al., *[Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines]*. Actas Urol Esp, 2012. **36**(8): p. 449-60.
8. Yafi, F.A., et al., *Contemporary outcomes of 2287 patients with bladder cancer who were treated with radical cystectomy: a Canadian multicentre experience*. BJU Int, 2011. **108**(4): p. 539-45.
9. Roberts, J.T., et al., *Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine/cisplatin and methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin in patients with locally advanced and metastatic bladder cancer*. Ann Oncol, 2006. **17** Suppl 5: p. v118-22.
10. Sternberg, C.N., et al., *Seven year update of an EORTC phase III trial of high-dose intensity M-VAC chemotherapy and G-CSF versus classic M-VAC in advanced urothelial tract tumours*. Eur J Cancer, 2006. **42**(1): p. 50-4.
11. von der Maase, H., et al., *Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(21): p. 4602-8.
12. Montironi, R. and A. Lopez-Beltran, *The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary*. Int J Surg Pathol, 2005. **13**(2): p. 143-53.
13. Lewis, S.A., *Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(6): p. F867-74.
14. Khandelwal, P., S.N. Abraham, and G. Apodaca, *Cell biology and physiology of the uroepithelium*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(6): p. F1477-501.
15. Dinney, C.P., et al., *Focus on bladder cancer*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 111-6.
16. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
17. Goebell, P.J. and M.A. Knowles, *Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium*. Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 409-28.
18. Spruck, C.H., 3rd, et al., *Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder*. Cancer Res, 1994. **54**(3): p. 784-8.
19. Cordon-Cardo, C., *Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression*. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2008(218): p. 154-65.
20. Buyru, N., et al., *Ras oncogene mutations in urine sediments of patients with bladder cancer*. J Biochem Mol Biol, 2003. **36**(4): p. 399-402.

21. Zhu, D., et al., *A method to quantitatively detect H-ras point mutation based on electrochemiluminescence*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 964-9.
22. Cappellen, D., et al., *Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 18-20.
23. Rieger-Christ, K.M., et al., *Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection*. Cancer, 2003. **98**(4): p. 737-44.
24. van Rhijn, B.W., et al., *The FGFR3 mutation is related to favorable pT1 bladder cancer*. J Urol, 2012. **187**(1): p. 310-4.
25. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 361-70.
26. Cairns, P., A.J. Proctor, and M.A. Knowles, *Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma*. Oncogene, 1991. **6**(12): p. 2305-9.
27. Cordon-Cardo, C., *Molecular alterations in bladder cancer*. Cancer Surv, 1998. **32**: p. 115-31.
28. Cote, R.J., et al., *Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1090-4.
29. Le Frere-Belda, M.A., et al., *Profiles of the 2 INK4a gene products, p16 and p14ARF, in human reference urothelium and bladder carcinomas, according to pRb and p53 protein status*. Hum Pathol, 2004. **35**(7): p. 817-24.
30. Kreimer, U., et al., *HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 255.
31. Marsit, C.J., et al., *Identification of methylated genes associated with aggressive bladder cancer*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12334.
32. Wolff, E.M., et al., *Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 8169-78.
33. Lauss, M., et al., *DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status*. Epigenetics, 2012. **7**(8): p. 858-67.
34. Reinert, T., et al., *Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(17): p. 5582-92.
35. Niegisch, G., et al., *[Epigenetics in urothelial cancer : Pathogenesis, improving diagnostics and developing novel treatment options]*. Urologe A, 2015. **54**(4): p. 526-32.
36. Gui, Y., et al., *Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder*. Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 875-8.
37. Gu, B. and M.G. Lee, *Histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases in self-renewal and differentiation of stem cells*. Cell Biosci, 2013. **3**(1): p. 39.
38. Ezponda, T. and J.D. Licht, *Molecular pathways: deregulation of histone h3 lysine 27 methylation in cancer-different paths, same destination*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(19): p. 5001-8.
39. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
40. Becker, P.B. and J.L. Workman, *Nucleosome remodeling and epigenetics*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
41. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-22.

42. Van Batavia, J., et al., *Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(10): p. 982-91, 1-5.
43. Hostikka, S.L. and M.R. Capecchi, *The mouse Hoxc11 gene: genomic structure and expression pattern*. Mech Dev, 1998. **70**(1-2): p. 133-45.
44. Scott, V., E.A. Morgan, and H.S. Stadler, *Genitourinary functions of Hoxa13 and Hoxd13*. J Biochem, 2005. **137**(6): p. 671-6.
45. Barber, B.A. and M. Rastegar, *Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease*. Ann Anat, 2010. **192**(5): p. 261-74.
46. Miller, G.J., et al., *Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5879-88.
47. Henderson, G.S., et al., *Expression pattern of a homeotic gene, HOXA5, in normal breast and in breast tumors*. Cell Oncol, 2006. **28**(5-6): p. 305-13.
48. Rinn, J.L., et al., *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
49. Cantile, M., et al., *Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas*. Oncogene, 2003. **22**(41): p. 6462-8.
50. Brock, H.W., et al., *Regulatory noncoding RNAs at Hox loci*. Biochem Cell Biol, 2009. **87**(1): p. 27-34.
51. Dip, N., et al., *Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile*. J Urol, 2012. **188**(5): p. 1951-6.
52. Niinuma, T., et al., *Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Res, 2012. **72**(5): p. 1126-36.
53. Nakayama, I., et al., *Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells*. Int J Oncol, 2013. **43**(1): p. 63-71.
54. Quagliata, L., et al., *Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients*. Hepatology, 2014. **59**(3): p. 911-23.
55. Zhang, J., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(1): p. 1-5.
56. Zhang, X., S.M. Weissman, and P.E. Newburger, *Long intergenic non-coding RNA HOTAIRMI regulates cell cycle progression during myeloid maturation in NB4 human promyelocytic leukemia cells*. RNA Biol, 2014. **11**(6).
57. Bantignies, F., et al., *Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in Drosophila*. Cell, 2011. **144**(2): p. 214-26.
58. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-45.
59. Ringrose, L. and R. Paro, *Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity*. Development, 2007. **134**(2): p. 223-32.
60. Garrick, D., et al., *Polycomb response elements in vertebrates*. Epigenomics, 2009. **1**(2): p. 231.
61. Rinn, J.L. and H.Y. Chang, *Genome regulation by long noncoding RNAs*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 145-66.
62. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
63. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
64. Brockdorff, N., *Noncoding RNA and Polycomb recruitment*. RNA, 2013. **19**(4): p. 429-42.

65. Batista, P.J. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease*. Cell, 2013. **152**(6): p. 1298-307.
66. Ghosal, S., S. Das, and J. Chakrabarti, *Long noncoding RNAs: new players in the molecular mechanism for maintenance and differentiation of pluripotent stem cells*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(16): p. 2240-53.
67. Brown, C.J., et al., *The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus*. Cell, 1992. **71**(3): p. 527-42.
68. Briggs, S.F. and R.A. Reijo Pera, *X chromosome inactivation: recent advances and a look forward*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **28**: p. 78-82.
69. Gabory, A., et al., *H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice*. Development, 2009. **136**(20): p. 3413-21.
70. Lewis, A., et al., *Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation*. Nat Genet, 2004. **36**(12): p. 1291-5.
71. Umlauf, D., et al., *Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes*. Nat Genet, 2004. **36**(12): p. 1296-300.
72. Yap, K.L., et al., *Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a*. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 662-74.
73. Gil, J., et al., *Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(1): p. 67-72.
74. Tsai, M.C., et al., *Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes*. Science, 2010. **329**(5992): p. 689-93.
75. Li, X., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR, a driver of malignancy, predicts negative prognosis and exhibits oncogenic activity in oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2013. **109**(8): p. 2266-78.
76. Kim, K., et al., *HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer*. Oncogene, 2013. **32**(13): p. 1616-25.
77. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
78. Geng, Y.J., et al., *Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression*. J Int Med Res, 2011. **39**(6): p. 2119-28.
79. Kogo, R., et al., *Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers*. Cancer Res, 2011. **71**(20): p. 6320-6.
80. Endo, H., et al., *Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77070.
81. Yan, T.H., et al., *Upregulation of the long noncoding RNA HOTAIR predicts recurrence in stage Ta/T1 bladder cancer*. Tumour Biol, 2014.
82. Liu, X.H., et al., *The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 464.
83. Tang, L., et al., *Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 251098.
84. Lim, J. and J.P. Thiery, *Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development*. Development, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
85. Xu, Z.Y., et al., *Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(6): p. 587-97.

86. Padua Alves, C., et al., *Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines*. Stem Cells, 2013. **31**(12): p. 2827-32.
87. Liu, Z., et al., *The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregulation of p21(WAF1/CIP1) expression*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77293.
88. Ulitsky, I., et al., *Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution*. Cell, 2011. **147**(7): p. 1537-50.
89. Schorderet, P. and D. Duboule, *Structural and functional differences in the long non-coding RNA hotair in mouse and human*. PLoS Genet, 2011. **7**(5): p. e1002071.
90. Li, L., et al., *Targeted disruption of Hotair leads to homeotic transformation and gene derepression*. Cell Rep, 2013. **5**(1): p. 3-12.
91. Bartolomei, M.S., et al., *Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene*. Genes Dev, 1993. **7**(9): p. 1663-73.
92. Sutcliffe, J.S., et al., *Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 52-8.
93. Abramowitz, L.K. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(2): p. 72-8.
94. Plasschaert, R.N. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells*. Development, 2014. **141**(9): p. 1805-13.
95. Besson, V., et al., *PWI gene/paternally expressed gene 3 (PWI/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11470-5.
96. Ferron, S.R., et al., *Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 381-5.
97. Venkatraman, A., et al., *Maternal imprinting at the H19-Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence*. Nature, 2013. **500**(7462): p. 345-9.
98. Peters, J., *The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(8): p. 517-30.
99. Varrault, A., et al., *Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth*. Dev Cell, 2006. **11**(5): p. 711-22.
100. Ribarska, T., et al., *Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer*. Epigenetics, 2014. **9**(5): p. 704-17.
101. Byun, H.M., et al., *Examination of IGF2 and H19 loss of imprinting in bladder cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10753-8.
102. Gallagher, E.M., et al., *Recurrence of urothelial carcinoma of the bladder: a role for insulin-like growth factor-II loss of imprinting and cytoplasmic E-cadherin immunolocalization*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6829-38.
103. Ariel, I., et al., *The imprinted H19 gene is a marker of early recurrence in human bladder carcinoma*. Mol Pathol, 2000. **53**(6): p. 320-3.
104. Gofrit, O.N., et al., *DNA Based Therapy with Diphtheria Toxin-A BC-819: A Phase 2b Marker Lesion Trial in Patients with Intermediate Risk Nonmuscle Invasive Bladder Cancer*. J Urol, 2013.
105. Hoffmann, M.J., et al., *Multiple mechanisms downregulate CDKN1C in human bladder cancer*. Int J Cancer, 2005. **114**(3): p. 406-13.
106. Greife, A., et al., *Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma*. Clin Epigenetics, 2014. **6**(1): p. 29.
107. Murrell, A., *Genomic imprinting and cancer: from primordial germ cells to somatic cells*. ScientificWorldJournal, 2006. **6**: p. 1888-910.

108. Heubach, J., *Die lange nichtkodierende RNA HOTAIR im Urothelkarzinom*. Masterarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2012.
109. Swiatkowski, S., et al., *Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines*. Exp Cell Res, 2003. **282**(1): p. 48-57.
110. Tzeng, C.C., et al., *Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan*. Anticancer Res, 1996. **16**(4A): p. 1797-804.
111. Rigby, C.C. and L.M. Franks, *A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure*. Br J Cancer, 1970. **24**(4): p. 746-54.
112. Masters, J.R., et al., *Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines*. Cancer Res, 1986. **46**(7): p. 3630-6.
113. Kyriazis, A.A., et al., *Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice*. Cancer Res, 1984. **44**(9): p. 3997-4005.
114. O'Toole, C., et al., *Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma*. Br J Cancer, 1978. **38**(1): p. 64-76.
115. Elliott, A.Y., et al., *Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract*. J Natl Cancer Inst, 1974. **53**(5): p. 1341-9.
116. Fogh, J., *Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors*. Natl Cancer Inst Monogr, 1978(49): p. 5-9.
117. Elliott, A.Y., et al., *In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract*. Cancer Res, 1976. **36**(2 Pt 1): p. 365-9.
118. Rasheed, S., et al., *Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(4): p. 881-90.
119. Bubenik, J., et al., *Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen*. Int J Cancer, 1973. **11**(3): p. 765-73.
120. Grossman, H.B., et al., *Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures*. J Urol, 1986. **136**(4): p. 953-9.
121. Williams, R.D., *Human urologic cancer cell lines*. Invest Urol, 1980. **17**(5): p. 359-63.
122. Chapman, E.J., et al., *Expression of hTERT immortalises normal human urothelial cells without inactivation of the p16/Rb pathway*. Oncogene, 2006. **25**(36): p. 5037-45.
123. Keydar, I., et al., *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. Eur J Cancer, 1979. **15**(5): p. 659-70.
124. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
125. Trempe, G.L., *Human breast cancer in culture*. Recent Results Cancer Res, 1976(57): p. 33-41.
126. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.
127. Sramkoski, R.M., et al., *A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(7): p. 403-9.
128. Mickey, D.D., et al., *Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice*. Prog Clin Biol Res, 1980. **37**: p. 67-84.
129. Horoszewicz, J.S., et al., *The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma*. Prog Clin Biol Res, 1980. **37**: p. 115-32.

130. Sobel, R.E., Y. Wang, and M.D. Sadar, *Molecular analysis and characterization of PrEC, commercially available prostate epithelial cells*. In *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006. **42**(1-2): p. 33-9.
131. Shimada, Y., et al., *Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines*. *Cancer*, 1992. **69**(2): p. 277-84.
132. Hosch, S., et al., *Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6836-40.
133. Rockett, J.C., et al., *Five newly established oesophageal carcinoma cell lines: phenotypic and immunological characterization*. *Br J Cancer*, 1997. **75**(2): p. 258-63.
134. Teshima, S., et al., *Four new human germ cell tumor cell lines*. *Lab Invest*, 1988. **59**(3): p. 328-36.
135. Ribarska, T., *Expression and epigenetic regulation of imprintd genes in prostate cancer*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2013.
136. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler, *Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines*. In *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002. **38**(2): p. 79-85.
137. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. *Bioinformatics*, 2003. **19**(2): p. 185-93.
138. Mackay, D.J., et al., *Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57*. *Nat Genet*, 2008. **40**(8): p. 949-51.
139. Bens, S., et al., *Frequency and characterization of DNA methylation defects in children born SGA*. *Eur J Hum Genet*, 2013. **21**(8): p. 838-43.
140. Bourque, D.K., et al., *Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia*. *Placenta*, 2010. **31**(3): p. 197-202.
141. Lee, J.S., et al., *Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(16): p. 2660-7.
142. Dyrskjot, L., et al., *Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 4040-8.
143. Stransky, N., et al., *Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer*. *Nat Genet*, 2006. **38**(12): p. 1386-96.
144. Ge, X., et al., *Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues*. *Genomics*, 2005. **86**(2): p. 127-41.
145. Lee, J.E., C.F. Bennett, and T.A. Cooper, *RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(11): p. 4221-6.
146. Khalil, A.M., et al., *Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(28): p. 11667-72.
147. Murakami, K., M. Oshimura, and H. Kugoh, *Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1*. *J Hum Genet*, 2007. **52**(11): p. 926-33.
148. Valleley, E.M., S.F. Cordery, and D.T. Bonthron, *Tissue-specific imprinting of the ZAC/PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(8): p. 972-81.

149. Vallot, C., et al., *A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(1): p. 47-60.
150. Kandimalla, R., et al., *Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers*. Eur Urol, 2012. **61**(6): p. 1245-56.
151. Easwaran, H., et al., *A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer*. Genome Res, 2012. **22**(5): p. 837-49.
152. Aine, M., et al., *Integrative epigenomic analysis of differential DNA methylation in urothelial carcinoma*. Genome Med, 2015. **7**(1): p. 23.
153. Makiyama, K., et al., *Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma*. Oncol Rep, 2005. **13**(4): p. 673-9.
154. Li, H.P., et al., *Aberrantly hypermethylated Homeobox A2 derepresses metalloproteinase-9 through TBP and promotes invasion in Nasopharyngeal carcinoma*. Oncotarget, 2013. **4**(11): p. 2154-65.
155. Ota, T., et al., *HOXA7 in epithelial ovarian cancer: interrelationships between differentiation and clinical features*. Reprod Sci, 2007. **14**(6): p. 605-14.
156. Klausen, C., P.C. Leung, and N. Auersperg, *Cell motility and spreading are suppressed by HOXA4 in ovarian cancer cells: possible involvement of beta1 integrin*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(9): p. 1425-37.
157. Ota, T., et al., *Expression and function of HOXA genes in normal and neoplastic ovarian epithelial cells*. Differentiation, 2009. **77**(2): p. 162-71.
158. Kim, Y.J., et al., *HOXA9, ISL1 and ALDH1A3 methylation patterns as prognostic markers for nonmuscle invasive bladder cancer: array-based DNA methylation and expression profiling*. Int J Cancer, 2013. **133**(5): p. 1135-42.
159. Bhatlekar, S., J.Z. Fields, and B.M. Boman, *HOX genes and their role in the development of human cancers*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 811-23.
160. Tedeschi, F.A., et al., *Co-expression of HoxA9 and bcr-abl genes in chronic myeloid leukemia*. Leuk Lymphoma, 2010. **51**(5): p. 892-6.
161. Li, D.P., et al., *HOXA9 gene expression in acute myeloid leukemia*. Cell Biochem Biophys, 2013. **67**(3): p. 935-8.
162. Gilbert, P.M., et al., *HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype*. J Clin Invest, 2010. **120**(5): p. 1535-50.
163. Sun, M., et al., *HMG2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9920-5.
164. Murat, A., et al., *Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma*. J Clin Oncol, 2008. **26**(18): p. 3015-24.
165. Costa, B.M., et al., *Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 453-62.
166. Calvo, R., et al., *Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12776-81.
167. Cheng, W., et al., *Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract*. Nat Med, 2005. **11**(5): p. 531-7.
168. Liao, W.T., et al., *HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(11): p. 3569-78.
169. Yamashita, T., et al., *Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells*. Int J Oncol, 2006. **28**(4): p. 931-8.

170. Varinot, J., et al., *HOXB13 is a sensitive and specific marker of prostate cells, useful in distinguishing between carcinomas of prostatic and urothelial origin*. Virchows Arch, 2013. **463**(6): p. 803-9.
171. Zhu, J.Y., et al., *High-level expression of HOXB13 is closely associated with tumor angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(6): p. 2925-33.
172. Heubach, J., et al., *The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells*. Mol Cancer, 2015. **14**(1): p. 108.
173. Vinarskaja, A., et al., *DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer*. Cancers (Basel), 2011. **3**(4): p. 3714-25.
174. Kanai, M., et al., *Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas*. Oncol Rep, 2010. **23**(3): p. 843-51.
175. Freschi, G., et al., *Expression of HOX homeobox genes in the adult human colonic mucosa (and colorectal cancer?)*. Int J Mol Med, 2005. **16**(4): p. 581-7.
176. Volkmer, J.P., et al., *Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(6): p. 2078-83.
177. Yang, Z., et al., *Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(5): p. 1243-50.
178. Chakravadhanula, M., et al., *Expression of the HOX genes and HOTAIR in atypical teratoid rhabdoid tumors and other pediatric brain tumors*. Cancer Genet, 2014. **207**(9): p. 425-8.
179. Nakagawa, T., et al., *Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(2): p. 319-24.
180. Chen, F.J., et al., *Upregulation of the long non-coding RNA HOTAIR promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis*. Mol Carcinog, 2013. **52**(11): p. 908-15.
181. Davalos, A.R., et al., *Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 273-83.
182. Pignon, J.C., et al., *p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(20): p. 8105-10.
183. Papadogianni, D., et al., *Expression of p53 family genes in urinary bladder cancer: correlation with disease aggressiveness and recurrence*. Tumour Biol, 2014. **35**(3): p. 2481-9.
184. Chu, C., et al., *Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions*. Mol Cell, 2011. **44**(4): p. 667-78.
185. Bachmann, I.M., et al., *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast*. J Clin Oncol, 2006. **24**(2): p. 268-73.
186. Matsukawa, Y., et al., *Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer*. Cancer Sci, 2006. **97**(6): p. 484-91.
187. Kondo, Y., et al., *Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas*. Hepatol Res, 2007. **37**(11): p. 974-83.
188. Kikuchi, J., et al., *Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance*. Cancer, 2010. **116**(12): p. 3015-24.

189. Li, H., et al., *Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(12): p. 1610-8.
190. Yamada, A., et al., *Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus*. Int J Oncol, 2011. **38**(2): p. 345-53.
191. Raman, J.D., et al., *Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8570-6.
192. Weikert, S., et al., *Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas*. Int J Mol Med, 2005. **16**(2): p. 349-53.
193. Hinz, S., et al., *Expression parameters of the polycomb group proteins BMI1, SUZ12, RING1 and CBX7 in urothelial carcinoma of the bladder and their prognostic relevance*. Tumour Biol, 2008. **29**(5): p. 323-9.
194. Li, H., et al., *SUZ12 promotes human epithelial ovarian cancer by suppressing apoptosis via silencing HRK*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(11): p. 1462-72.
195. Benoit, Y.D., et al., *Pharmacological inhibition of polycomb repressive complex-2 activity induces apoptosis in human colon cancer stem cells*. Exp Cell Res, 2013. **319**(10): p. 1463-70.
196. Cui, Y., et al., *SUZ12 depletion suppresses the proliferation of gastric cancer cells*. Cell Physiol Biochem, 2013. **31**(6): p. 778-84.
197. Liu, C., et al., *SUZ12 is involved in progression of non-small cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis*. Tumour Biol, 2014. **35**(6): p. 6073-82.
198. Kauffman, E.C., et al., *Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer*. Mol Carcinog, 2011. **50**(12): p. 931-44.
199. Hayami, S., et al., *Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers*. Int J Cancer, 2011. **128**(3): p. 574-86.
200. Lim, S., et al., *Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases*. Int J Cancer, 2010. **127**(9): p. 1991-8.
201. Yamamoto, S., et al., *JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer*. Cancer Cell, 2014. **25**(6): p. 762-77.
202. Wang, L., et al., *Overexpression of JARID1B is associated with poor prognosis and chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(4): p. 2465-72.
203. Wang, Z., et al., *KDM5B is overexpressed in gastric cancer and is required for gastric cancer cell proliferation and metastasis*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(1): p. 87-100.
204. Nickerson, M.L., et al., *Concurrent alterations in TERT, KDM6A, and the BRCA pathway in bladder cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(18): p. 4935-48.
205. van Haaften, G., et al., *Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 521-3.
206. Kim, J.H., et al., *UTX and MLL4 coordinately regulate transcriptional programs for cell proliferation and invasiveness in breast cancer cells*. Cancer Res, 2014. **74**(6): p. 1705-17.
207. Agger, K., et al., *UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 731-4.
208. De Santa, F., et al., *The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1083-94.
209. Lan, F., et al., *A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 689-94.

210. Lee, M.G., et al., *Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination*. Science, 2007. **318**(5849): p. 447-50.
211. Issaeva, I., et al., *Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(5): p. 1889-903.
212. Herz, H.M., S. Nakanishi, and A. Shilatifard, *The curious case of bivalent marks*. Dev Cell, 2009. **17**(3): p. 301-3.
213. Hoffmann, A., C.A. Zimmermann, and D. Spengler, *Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease*. Front Behav Neurosci, 2015. **9**: p. 120.
214. Mikkelsen, T.S., et al., *Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 553-60.
215. Yoon, J.H., et al., *Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2939.
216. Liu, X.H., et al., *Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 92.
217. Ma, M.Z., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR, a c-Myc activated driver of malignancy, negatively regulates miRNA-130a in gallbladder cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 156.
218. Willingham, A.T., et al., *A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1570-3.
219. Baudin-Baillieu, A., et al., *Nucleotide modifications in three functionally important regions of the Saccharomyces cerevisiae ribosome affect translation accuracy*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(22): p. 7665-77.
220. Schaefer, M., et al., *RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage*. Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1590-5.
221. Amort, T., et al., *Long non-coding RNAs as targets for cytosine methylation*. RNA Biol, 2013. **10**(6): p. 1003-8.
222. Wang, L., et al., *BRCAl is a negative modulator of the PRC2 complex*. EMBO J, 2013. **32**(11): p. 1584-97.
223. Iglesias-Platas, I., et al., *Altered expression of the imprinted transcription factor PLAGL1 deregulates a network of genes in the human IUGR placenta*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(23): p. 6275-85.
224. Lee, D.F., et al., *Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells*. Cell, 2015. **161**(2): p. 240-54.
225. Kamiya, M., et al., *The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(3): p. 453-60.
226. Varrault, A., et al., *hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8835-40.
227. Bilanges, B., et al., *Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors*. Oncogene, 1999. **18**(27): p. 3979-88.
228. Spengler, D., et al., *Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2814-25.
229. Bilanges, B., et al., *Alternative splicing of the imprinted candidate tumor suppressor gene ZAC regulates its antiproliferative and DNA binding activities*. Oncogene, 2001. **20**(10): p. 1246-53.
230. Koy, S., et al., *Loss of expression of ZAC/LOT1 in squamous cell carcinomas of head and neck*. Head Neck, 2004. **26**(4): p. 338-44.

231. Hoffmann, A., T. Barz, and D. Spengler, *Multitasking C2H2 zinc fingers link Zac DNA binding to coordinated regulation of p300-histone acetyltransferase activity*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(14): p. 5544-57.
232. Basyuk, E., et al., *The candidate tumor suppressor gene ZAC is involved in keratinocyte differentiation and its expression is lost in basal cell carcinomas*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(9): p. 483-92.
233. Kamikihara, T., et al., *Epigenetic silencing of the imprinted gene ZAC by DNA methylation is an early event in the progression of human ovarian cancer*. Int J Cancer, 2005. **115**(5): p. 690-700.
234. Elkin, M., et al., *The expression of the imprinted H19 and IGF-2 genes in human bladder carcinoma*. FEBS Lett, 1995. **374**(1): p. 57-61.
235. Cooper, M.J., et al., *Developmentally imprinted genes as markers for bladder tumor progression*. J Urol, 1996. **155**(6): p. 2120-7.
236. Ohana, P., et al., *The expression of the H19 gene and its function in human bladder carcinoma cell lines*. FEBS Lett, 1999. **454**(1-2): p. 81-4.
237. Arima, T., et al., *ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(8): p. 2650-60.
238. Schmidt-Edelkraut, U., et al., *Zac1 regulates cell cycle arrest in neuronal progenitors via Tcf4*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(6): p. 1020-30.
239. Kobayashi, S., et al., *Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(5): p. 781-6.
240. Lefebvre, L., et al., *Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 163-9.
241. Ineson, J., et al., *Somatic reactivation of expression of the silent maternal Mest allele and acquisition of normal reproductive behaviour in a colony of Peg1/Mest mutant mice*. J Reprod Dev, 2012. **58**(4): p. 490-500.
242. Jung, H., S.K. Lee, and E.H. Jho, *Mest/Peg1 inhibits Wnt signalling through regulation of LRP6 glycosylation*. Biochem J, 2011. **436**(2): p. 263-9.
243. Pedersen, I.S., et al., *Promoter switch: a novel mechanism causing biallelic PEG1/MEST expression in invasive breast cancer*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(12): p. 1449-53.
244. Nakanishi, H., et al., *Loss of imprinting of PEG1/MEST in lung cancer cell lines*. Oncol Rep, 2004. **12**(6): p. 1273-8.
245. Hubertus, J., et al., *Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors*. Oncol Rep, 2011. **25**(3): p. 817-23.
246. Rezvani, G., et al., *A set of imprinted genes required for normal body growth also promotes growth of rhabdomyosarcoma cells*. Pediatr Res, 2012. **71**(1): p. 32-8.
247. Hikichi, T., et al., *Imprinting regulation of the murine Meg1/Grb10 and human GRB10 genes; roles of brain-specific promoters and mouse-specific CTCF-binding sites*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(5): p. 1398-406.
248. Okino, K., et al., *Up-regulation of growth factor receptor-bound protein 10 in cervical squamous cell carcinoma*. Oncol Rep, 2005. **13**(6): p. 1069-74.
249. Shiura, H., et al., *Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(8): p. 1424-38.
250. Garfield, A.S., et al., *Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted Grb10*. Nature, 2011. **469**(7331): p. 534-8.
251. Pateras, I.S., et al., *Downregulation of the KIP family members p27(KIP1) and p57(KIP2) by SKP2 and the role of methylation in p57(KIP2) inactivation in nonsmall cell lung cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(11): p. 2546-56.

252. Li, Y., et al., *Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2572-7.
253. Yang, X., et al., *CDKN1C (p57) is a direct target of EZH2 and suppressed by multiple epigenetic mechanisms in breast cancer cells*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5011.
254. Oya, M. and W.A. Schulz, *Decreased expression of p57(KIP2)mRNA in human bladder cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(5): p. 626-31.
255. Bozdogan, O., et al., *Significance of p57(Kip2) down-regulation in oncogenesis of bladder carcinoma: an immunohistochemical study*. Tumori, 2008. **94**(4): p. 556-62.
256. Ito, Y., et al., *Expression of p57/Kip2 protein in normal and neoplastic thyroid tissues*. Int J Mol Med, 2002. **9**(4): p. 373-6.
257. Larson, P.S., et al., *CDKN1C/p57kip2 is a candidate tumor suppressor gene in human breast cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 68.
258. Krskova, L., et al., *Rhabdomyosarcoma: molecular analysis of Igf2, MyoD1 and Myogenin expression*. Neoplasma, 2011. **58**(5): p. 415-23.
259. Algar, E.M., et al., *Paternally inherited submicroscopic duplication at 11p15.5 implicates insulin-like growth factor II in overgrowth and Wilms' tumorigenesis*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2360-5.
260. Kim, K.S. and Y.I. Lee, *Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 1997. **119**(2): p. 143-8.
261. Kaneda, A., et al., *Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increased cell proliferation and tumor risk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20926-31.
262. Randhawa, G.S., et al., *Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3144-7.
263. Zhao, R., et al., *Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II (IGF2) gene in esophageal normal and adenocarcinoma tissues*. Carcinogenesis, 2009. **30**(12): p. 2117-22.
264. Kalla Singh, S., et al., *Differential insulin-like growth factor II (IGF-II) expression: A potential role for breast cancer survival disparity*. Growth Horm IGF Res, 2010. **20**(2): p. 162-70.
265. Hao, Y., et al., *Tumour-suppressor activity of H19 RNA*. Nature, 1993. **365**(6448): p. 764-7.
266. Yoshimizu, T., et al., *The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12417-22.
267. Lustig-Yariv, O., et al., *The expression of the imprinted genes H19 and IGF-2 in choriocarcinoma cell lines. Is H19 a tumor suppressor gene?* Oncogene, 1997. **15**(2): p. 169-77.
268. Verkerk, A.J., et al., *Unique expression patterns of H19 in human testicular cancers of different etiology*. Oncogene, 1997. **14**(1): p. 95-107.
269. Berteaux, N., et al., *H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29625-36.
270. Adriaenssens, E., et al., *H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1597-607.
271. Kondo, M., et al., *Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers*. Oncogene, 1995. **10**(6): p. 1193-8.
272. Hibi, K., et al., *Loss of H19 imprinting in esophageal cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(3): p. 480-2.
273. Monnier, P., et al., *H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(51): p. 20693-8.

274. Arab, K., et al., *Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A*. Mol Cell, 2014. **55**(4): p. 604-14.
275. Chalei, V., et al., *The long non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation*. Elife, 2014. **3**: p. e04530.
276. Wang, L., et al., *LncRNA Dum interacts with Dnmts to regulate Dppa2 expression during myogenic differentiation and muscle regeneration*. Cell Res, 2015. **25**(3): p. 335-50.
277. Vire, E., et al., *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 871-874.
278. Schlesinger, Y., et al., *Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer*. Nature Genetics, 2007. **39**(2): p. 232-236.
279. Gal-Yam, E.N., et al., *Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(35): p. 12979-12984.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Die HOX-Cluster mit den Genen für nichtkodierende RNAs im Menschen....	9
Abbildung 3.2: Netzwerk koregulierter geprägter Gene in der Maus, aus [99].....	13
Abbildung 5.1: HOX-Genexpressionsprofil im normalen Urothel.....	56
Abbildung 5.2: HOX-Genexpressionsprofil im UC auf Grundlage der Ergebnisse dreier unabhängiger Expressionsstudien.....	58
Abbildung 5.3: Veränderung der HOX-Genexpression während der Tumorprogression im Set 1.....	60
Abbildung 5.4: Veränderung der HOX-Genexpression während der Tumorprogression im Set 2.....	61
Abbildung 5.5: Veränderung der HOX-Genexpression während der Tumorprogression im Set 3.....	62
Abbildung 5.6: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR in UC-Geweben im Vergleich zu tumorfreien Geweben.....	64
Abbildung 5.7: Kaplan-Meier-Kurve für die Korrelation des tumorspezifischen-Überlebens mit der Expression der lncRNA HOTAIR.....	66
Abbildung 5.8: Expressionsbestimmung von <i>HOXD10</i> in UC-Geweben im Vergleich zu tumorfreien Geweben.....	68
Abbildung 5.9: Expressionsbestimmung von <i>HOXD12</i> in UC-Geweben im Vergleich zu tumorfreien Geweben.....	69
Abbildung 5.10: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.....	70
Abbildung 5.11: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten verglichen mit der UC-Zelllinie 639-V.....	72
Abbildung 5.12: Expressionsbestimmung von HOTAIR nach siRNA-vermitteltem Knockdown in verschiedenen UC-Zelllinien.....	74
Abbildung 5.13: Vergleich der Effizienz eines siRNA- oder LNA-vermittelten Knockdowns von HOTAIR in den UC-Zelllinien RT-112 und SW-1710.....	74
Abbildung 5.14: Expressionsbestimmung der lncRNAs LIT1 und HOTAIR im Cytoplasma und Nukleus nach HOTAIR-Knockdown in den UC-Zelllinien RT-112 und SW-1710.....	76

Abbildung 5.15: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR nach transienter pLZRS_HOTAIR Transfektion in den UC-Zelllinien BFTC-905, 5637, HT-1376 und UM-UC-3.....	77
Abbildung 5.16: Expressionsprofil der posterioren <i>HOXD</i> -Gene der UC-Zelllinien VM-CUB1, 5637 und T24.....	79
Abbildung 5.17: Expressionsbestimmung der lncRNA HOTAIR nach stabiler Transfektion in Klonen der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.....	79
Abbildung 5.18: Proliferation der HOTAIR stabil überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.....	81
Abbildung 5.19: Klonogenität der HOTAIR stabil überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.....	82
Abbildung 5.20: Verankerungsunabhängiges Wachstum der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	83
Abbildung 5.21: Graphische Auswertung des <i>Scratch Assays</i> für die UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1.....	85
Abbildung 5.22: Exemplarische Bilder der <i>Scratch Assays</i> der drei UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	86
Abbildung 5.23: Migrationsverhalten der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	87
Abbildung 5.24: Invasionsverhalten der UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	88
Abbildung 5.25: Beobachtete Veränderungen in der Morphologie der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression deuten auf eine Induktion der EMT hin.....	90
Abbildung 5.26: Morphologie der stabil HOTAIR überexprimierenden Klone der UC-Zelllinien 5637 und T24.....	91
Abbildung 5.27: Veränderung der Cisplatin-Sensitivität in den UC-Zelllinien 5637, T24 und VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression.....	92
Abbildung 5.28: Expressionsbestimmung der Chromatinregulatoren EZH2, SUZ12 und LSD1 in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.....	94
Abbildung 5.29: Ergebnis des mRNA-Expressionsarrays der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	96
Abbildung 5.30: GO-Analyse der veränderten Gene in der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	98

Abbildung 5.31: GO-Analyse der veränderten Gene in der UC-Zelllinie 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.	99
Abbildung 5.32: GO-Analyse der sowohl in der UC-Zelllinie VM-CUB1 als auch in der 5637 differentiell exprimierten Gene nach stabiler HOTAIR-Überexpression.	101
Abbildung 5.33: GO-Analyse der in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach HOTAIR-Überexpression entgegengesetzt veränderten Gene.	102
Abbildung 5.34: Veränderung des HOX-Genexpressionsprofils in stabil HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	103
Abbildung 5.35: mRNA-Expression der Gene <i>HOXA1</i> , <i>A11</i> und <i>A13</i> und Analyse der Histon-Methylierung an <i>HOXA11</i> in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	105
Abbildung 5.36: mRNA-Expression der Gene <i>HOXB2</i> und <i>B13</i> und Analyse der Histon-Methylierung an <i>HOXB2</i> in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	107
Abbildung 5.37: mRNA-Expression und Analyse der Histon-Methylierung des Gens <i>HOXC6</i> in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	108
Abbildung 5.38: mRNA-Expression der Gene <i>HOXD3</i> , <i>D9</i> und <i>D10</i> und Analyse der Histon-Methylierung an <i>HOXD10</i> in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	110
Abbildung 5.39: Vergleich des mRNA-Expressionsprofils nach HOTAIR-Überexpression in der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE-180 [75] und den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	112
Abbildung 5.40: Vergleich zwischen gemeinsam verringerten Genen der UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach HOTAIR-Überexpression und Genen, die eine erhöhte H3K27-Methylierung nach HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 [77] zeigten.	113
Abbildung 5.41: Expressionsbestimmung ausgewählter geprägter Gene in HOTAIR überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	115
Abbildung 5.42: Expression der vier geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien BFTC-905 und 639-V. ...	117
Abbildung 5.43: Expression der vier geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien RT-112 und HT-1376.	118

Abbildung 5.44: Expression der vier geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien SW-1710 und UM-UC-3.	119
Abbildung 5.45: Expression der vier geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie SK-BR3.	120
Abbildung 5.46: Expression der vier geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> nach ektoptischer HOTAIR-Überexpression in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145.	121
Abbildung 5.47: Effekte eines siRNA vermittelten Knockdowns der lncRNA HOTAIR auf die Expression der geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in den UC-Zelllinien RT-112 und SW-1710.	123
Abbildung 5.48: Effekte eines siRNA vermittelten Knockdowns der lncRNA HOTAIR auf die Expression der geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in den UC-Zelllinien J82 und 639-V.	124
Abbildung 5.49: Effekte eines siRNA vermittelten Knockdowns der lncRNA HOTAIR auf die Expression der geprägten Gene <i>PLAGL1</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i> in der Prostatakarzinom-Zelllinie Du-145.	125
Abbildung 5.50: Expressionsbestimmung des geprägten Gens <i>PLAGL1</i> in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.	126
Abbildung 5.51: Expressionsbestimmung des geprägten Gens <i>CDKN1C</i> (p57KIP2) in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.	127
Abbildung 5.52: Expressionsbestimmung von <i>IGF2</i> und der lncRNA H19 in UC-Zelllinien im Vergleich zu uroepithelialen Primärzellkulturen und der immortalisierten normalen Urothelzelllinie TERT-NHUC.	128
Abbildung 5.53: mRNA-Expression und Analyse der Histon-Methylierung an sieben geprägten Genen in HOTAIR-überexprimierenden Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.	133
Abbildung 5.54: Lage der <i>PLAGL1</i> -DMR auf Chromosom 6 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.	135
Abbildung 5.55: Lage der <i>SGCE</i> -DMR auf Chr. 7 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.	136
Abbildung 5.56: Lage der KvDMR auf Chr. 11 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.	137

Abbildung 5.57: Lage der H19-DMR auf Chr. 11 und ihr DNA-Methylierungsgrad in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 nach stabiler HOTAIR-Überexpression.....	138
Abbildung 5.58: DNA-Methylierungsprofil des <i>PLAGL1</i> -Gens nach stabiler HOTAIR-Überexpression in Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.....	141
Abbildung 5.59: DNA-Methylierungsprofil des <i>H19</i> -Gens nach stabiler HOTAIR-Überexpression in Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.....	142
Abbildung 5.60: Effekte eines siRNA-vermittelten <i>PLAGL1</i> -Knockdowns in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und SW-1710 auf die Expression der Gene <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i>	144
Abbildung 5.61: Effekte einer transienten <i>PLAGL1</i> -Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 auf die Expression der Gene <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> und <i>H19</i>	146

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Klassifizierung des Urothelkarzinoms der Harnblase nach dem TNM-System. ...	4
Tabelle 4.1: Charakteristika der untersuchten UC-Gewebe.....	16
Tabelle 4.2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.	21
Tabelle 4.3: Bedingungen der Mykoplasmen-PCR.....	39
Tabelle 4.4: Sequenz (5'-3') der Mykoplasmen-PCR-Primer.....	39
Tabelle 4.5: Übersicht über die Zusammensetzung der qRT-PCR Reaktionsansätze [µl].	44
Tabelle 4.6: Zusammenfassung der an den drei qRT-PCR-Geräten verwendeten qRT-PCR-Programme.	45
Tabelle 4.7: Übersicht der verwendeten Anlagerungstemperaturen der qRT-PCRs.....	46
Tabelle 4.8: Übersicht der verwendeten Anlagerungstemperaturen der qRT-PCR nach Chromatinpräzipitation.....	50
Tabelle 4.9: PCR zur Amplifizierung der Sequenz für die Pyrosequenzierung ($\Sigma = 50 \mu\text{l}$). ...	51
Tabelle 4.10: Programm und Anlagerungstemperaturen der PCR zur Amplifizierung der Sequenz für die Pyrosequenzierung.	52
Tabelle 5.1: Probenzusammensetzung der UC-Datensätze, die zur Bestimmung des HOX-Genexpressionsprofils im UC ausgewertet wurden.	57
Tabelle 5.2: Korrelation der Patienten-Eigenschaften mit der HOTAIR-Expression in UC-Geweben.....	65
Tabelle 5.3: Expressionsveränderungen geprägter Gene im RNA-Expressionsarray nach ektopischer HOTAIR-Überexpression in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637.....	114
Tabelle 5.4: DNA-Methylierungsveränderungen an HOX-Genen.	140
Tabelle 5.5: Anzahl der Gene mit Veränderung der DNA-Methylierung und der Expression.	143
Tabelle 10.1: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 gemeinsam erhöht exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen. ..	195
Tabelle 10.2: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 gemeinsam vermindert exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.	197
Tabelle 10.3: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 entgegengesetzt differentiell exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.....	199

Tabelle 10.4: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 erhöht und 5637 vermindert exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen. 202

Tabelle 10.5: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 vermindert und 5637 erhöht exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen..... 204

7.4 Abkürzungen

ANRIL	<i>antisense non-coding RNA in the INK4 locus</i>
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain 1A</i>
AS	antisense
BN	Blase normal
bp	Basenpaar
BT	Blase Tumor
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDKN1C	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIS	<i>carcinoma in situ</i>
CoREST	REST corepressor 1
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
CREBBP	<i>CREB-binding protein</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
DLK1	<i>delta like 1 homolog</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMR	<i>differentially methylated region</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EP300	<i>E1A-binding protein p300</i>
et al.	<i>et alii</i> (lateinisch: und andere)
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>

G1	<i>gap 1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
H3K27me2/3	Histon 3 Lysin 27 Di/Trimethylierung
H3K4me3	Histon 3 Lysin 4 Trimethylierung
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylasen
HOTAIR	<i>HOX transcript antisense intergenic RNA</i>
HOTAIRM	<i>Homo sapiens HOXA cluster antisense intergenic RNA myeloid1 antisense RNA</i>
HOX	<i>homeotic box</i>
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
ICR	<i>imprinted control region</i>
IG-DMR	<i>intergenic DMR</i>
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor-binding protein</i>
IGN	<i>imprinted gene network</i>
IP	Immunopräzipitation
JMJD3	<i>jumonji domain containing 3</i>
KCNQ1	<i>potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily member 1</i>
KCNQ1OT1	<i>KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1</i>
KDM	<i>lysine (K)-specific demethylase</i>
LB	<i>lysogenic broth</i>
LINE-1	<i>long interspersed element-1</i>
LIT1	<i>long QT intronic transcript 1</i>
LNA	<i>locked nucleic acids</i>
lncRNA	<i>long noncoding RNA</i>
LOI	<i>loss of imprinting</i>
LSD1	<i>lysine-specific demethylase 1</i>
LV	Leervektor
M	männlich
MEG3	<i>maternally expressed 3 (non-protein coding)</i>

MEST	<i>mesoderm specific transcript</i>
miRNA	microRNA
MLL	<i>mixed lineage leukaemia</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
NCOR1	<i>nuclear receptor co-repressor</i>
ncRNA	<i>noncoding RNA</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NRON	<i>non-coding repressor of NFAT</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PcG	<i>polycomb group</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG3	<i>paternally expressed 3</i>
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PLAGL1	<i>pleiomorphic adenoma gene-like 1</i>
PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
PRE	<i>polycomb group response element</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
RB1	Retinoblastom Protein 1
REST	<i>RE1-silencing transcription factor</i>
RISC	<i>RNS induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	<i>synthesis</i>
SASP	<i>senescent-associated secretory phenotype</i>
SDHA	<i>Succinate dehydrogenase complex subunit A</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SUZ12	<i>suppressor of zeste 12 homolog</i>
SWI/SNF	switch/sucrose non fermentable
T	Tyrosin
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TCC	<i>transitional cell carcinoma</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TRE	<i>trithorax group response element</i>
Trx	<i>trithorax group</i>
UC	Urothelkarzinom der Harnblase
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UP	uroepitheliale Primärzellkultur
UP	Uroplakin
UTX	<i>ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein, X chromosome</i>
UTY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
W	weiblich
XIST	<i>X-inactive specific transcript</i>

8 Erklärung

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

Weiterhin versichere ich, dass ich die Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht und bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Judith Dehn

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W.A. Schulz für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, das ständig an Bedeutung gewinnt und sicherlich noch einige Überraschungen für die Zukunft bereit hält. Seine Unterstützung und Motivation haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. R. Simon danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft als Koreferent und Mentor meine Arbeit in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHU zu vertreten.

Ich danke der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät des Heinrich-Heine-Universität für die finanzielle Unterstützung meines Projektes.

Meinen Kollegen und Kolleginnen in der Arbeitsgruppe, Frau C. Hader, Frau M. Lenzen, Frau M.Sc. J. Droop, Frau M.Sc. M. Pinkerneil, Frau M.Sc. M. Skowron, Frau Dr. J. Schmidt, Frau Dr. T. Ribarska, Frau Dr. A.-M. Greife, Herrn Dr. W. Göhring, danke ich für Ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Hervorheben möchte ich Frau Dr. M.J. Hoffmann. Ich möchte Ihnen danken für die Initiierung meines Projektes und die wirklich tolle Unterstützung mit Rat und Tat in allen Belangen meiner Arbeit. Nicht unerwähnt lassen möchte ich die tolle Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Allen medizinischen Kollegen und Kolleginnen aus der urologischen Klinik, aber insbesondere Herrn Dr. med. G. Niegisch, gilt mein Dank für die Bereitstellung von Gewebe- und Blutproben, sowie für den fachlichen Austausch.

Ich danke Herrn Dr. R. Deenen für die Unterstützung bei der Auswertung des RNA-Expressionsarrays.

Weiterhin danke ich auch Herrn Dr. T. Szarvas und Herrn Dr. med. C. Niedworok für die Bereitstellung eines großen Gewebesets von Urothelkarzinomen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für den familiären Rückhalt, sowie die Förderung und Unterstützung weit über mein Studium hinaus. Vielen Dank, dass Sie an mich glauben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann P.-F. Dehn für seine Unterstützung, sowie Geduld und sein Verständnis in den letzten Jahren. Er hat mir besonders in schwierigen Zeiten den nötigen Rückhalt gegeben und so entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Letztendlich möchte ich mich bei allen Freunden und Bekannten bedanken, die diesen Weg mit mir gegangen sind.

10 Anhang

Vergleich der Gene, die in beiden UC-Zelllinien 5637 und VM-CUB1 nach stabiler HOTAIR-Expression differentiell exprimiert waren, mit Genen, deren DNA-Methylierung in diesen Zellen verändert war.

Tabelle 10.1: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 gemeinsam erhöht exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.

In den Spalten 3 und 4 wurde die Differenz des DNA-Methylierungsgrades (HOTAIR-Leervektor) berechnet.

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
ACO1	5'UTR	0,47	0,30
ACTR10	TSS1500	0,32	0,54
ADAMTS12	Body	0,25	0,37
ARID3A	Body	0,46	0,64
ATOX1	TSS1500	-0,39	-0,35
ATP8B2	TSS200	-0,43	-0,27
BCAT1	TSS200	0,15	0,21
BNIP3	Body	-0,34	-0,43
BNIP3L	Body	-0,41	-0,47
CLDN1	Body	-0,77	0,01
CREB3L2	Body	0,39	0,28
DCP1B	TSS200	-0,62	-0,48
DDAH2	Body	-0,41	-0,31
DNAJC6	Body	0,28	0,24
DPY19L1	Body	-0,36	-0,28
EHD1	Body	-0,41	-0,43
ELK3	Body	-0,28	-0,22
EMP2	TSS1500	0,25	0,38
FOXP1	Body	0,50	-0,01
FUZ	TSS200	-0,18	-0,10
GDF15	1stExon	0,25	0,29
GFPT2	Body	0,38	0,39

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
GRB10	TSS1500	-0,43	-0,40
HLA-E	Body	-0,33	-0,28
INHBB	Body	-0,24	-0,24
INHBB	3'UTR	-0,19	-0,29
IRX3	Body	0,35	0,47
ISG20	Body	0,52	0,51
KLHDC2	TSS1500	0,51	0,06
LPIN2	TSS1500	-0,28	-0,19
LRRC6	Body	0,17	0,26
MACF1	5'UTR	0,22	0,17
MACF1	Body	-0,55	-0,47
MAML3	Body	0,22	0,30
MED21	Body	-0,70	-0,53
MERTK	Body	0,37	0,27
MF12	Body	0,08	0,17
MNAT1	TSS1500	-0,37	-0,24
NPLOC4	Body	-0,17	-0,14
NUBPL	Body	0,13	0,15
PARVA	Body	-0,35	-0,31
PAX6	5'UTR	-0,26	-0,29
PDZD2	Body	-0,22	-0,29
PREX1	3'UTR	0,33	0,18
PRKAA2	1stExon	-0,44	-0,35
PRKAA2	TSS200	-0,20	-0,12
PTPRG	Body	0,17	0,50
PXDN	Body	-0,43	-0,29
RAB11FIP3	Body	-0,37	0,00
RNF130	TSS1500	-0,12	-0,11
RNF130	Body	0,73	0,18

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
SDC2	Body	0,29	0,34
SDC2	3'UTR	0,38	0,41
SDC2	TSS200	-0,61	-0,41
SDC2	TSS1500	-0,38	-0,42
SELK	TSS1500	-0,25	-0,36
SH3BGRL3	TSS200	0,24	0,25
SH3PXD2B	Body	0,20	0,20
SLC25A46	TSS1500	0,28	0,33
SNX2	TSS200	-0,27	-0,42
SQRDL	TSS1500	0,51	-0,23
ST3GAL5	Body	-0,27	-0,30
ST3GAL6	5'UTR	0,22	0,21
STC2	3'UTR	0,28	0,13
TCEAL6	TSS1500	0,21	0,34
TNFRSF19	TSS1500	0,71	0,68
UBASH3B	Body	0,44	0,25
UST	Body	-0,55	-0,73
ZNF140	5'UTR	-0,31	-0,51
ZNF420	TSS1500	-0,25	-0,44
ZNF607	5'UTR	0,41	0,28

Tabelle 10.2: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 gemeinsam vermindert exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.

In den Spalten 3 und 4 wurde die Differenz des DNA-Methylierungsgrades (HOTAIR-Leervektor) berechnet.

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
ARHGEF10	5'UTR	-0,19	-0,17
B4GALNT1	5'UTR	0,57	0,49
C17orf79	Body	-0,46	-0,14
CHD4	TSS1500	0,14	0,10
CHD7	Body	-0,17	-0,17

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
CHST11	Body	-0,26	-0,51
CHST11	Body	0,29	0,21
CYP1B1	TSS1500	-0,22	-0,28
DGKZ	Body	-0,29	-0,17
DGKZ	TSS1500	0,65	0,22
GPAA1	Body	-0,28	-0,38
GPR153	Body	0,41	0,34
ID4	TSS1500	-0,52	-0,38
IREB2	TSS1500	-0,25	-0,30
KIAA1324L	Body	0,79	0,01
KIAA1984	TSS200	-0,27	-0,25
KIAA1984	Body	-0,09	-0,13
KIF21A	TSS1500	-0,23	-0,27
LMF1	Body	0,36	0,30
LMF1	Body	-0,26	-0,27
LMF1	Body	-0,15	-0,18
LMF1	Body	-0,22	-0,26
MARCH1	5'UTR	-0,64	-0,50
NRG1	Body	-0,24	-0,22
NRG1	Body	0,13	0,19
OVOL1	Body	-0,20	-0,27
PCOLCE2	Body	0,86	0,01
PDS5B	5'UTR	-0,34	-0,27
PDXK	Body	-0,81	0,00
PDXK	Body	-0,33	-0,26
PHB	Body	0,08	0,08
PHLDA3	TSS1500	-0,37	-0,24
PLEKHF2	TSS1500	0,35	0,28
PPP2R5A	TSS1500	0,45	-0,27

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
PSMB4	Body	-0,28	-0,21
RABGAP1	TSS1500	-0,24	-0,24
SDAD1	TSS1500	-0,40	-0,37
SHANK3	Body	-0,25	-0,49
SHANK3	TSS1500	-0,43	-0,53
SLC7A5	TSS200	-0,12	-0,15
SNAPC5	TSS1500	-0,21	-0,28
TACC1	5'UTR	-0,39	-0,30
TSTA3	Body	-0,18	-0,28
TTC39A	Body	-0,29	-0,25
TTC7A	Body	-0,22	-0,23
VANGL1	Body	0,26	0,30
WDR5	TSS1500	-0,21	-0,38
ZMIZ1	5'UTR	0,17	0,18

Tabelle 10.3: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 und 5637 entgegengesetzt differentiell exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.

In den Spalten 3 und 4 wurde die Differenz des DNA-Methylierungsgrades (HOTAIR-Leervektor) berechnet.

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
AGMAT	1stExon	0,91	-0,31
ANKRD22	Body	-0,32	-0,23
ARL3	3'UTR	-0,47	-0,60
B4GALNT4	TSS1500	-0,23	-0,21
B4GALNT4	TSS1500	0,14	0,17
BAG3	Body	-0,69	-0,41
BIK	TSS1500	0,30	0,21
BTBD11	1stExon	-0,60	-0,41
C10orf137	TSS200	-0,40	-0,43
CACHD1	Body	-0,19	-0,37

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
CACHD1	Body	-0,28	-0,24
CACNA2D3	Body	-0,35	-0,12
CACNA2D3	Body	-0,40	-0,59
CCDC104	Body	-0,33	-0,24
CHST15	Body	-0,65	0,01
COL6A1	Body	0,41	0,31
CXCL5	Body	0,90	0,03
DENND3	Body	0,10	0,18
DHRS3	Body	0,23	0,31
DPP7	Body	-0,53	-0,52
EPHA4	Body	0,28	0,27
FBXO27	Body	0,22	0,21
FSTL3	TSS1500	0,26	0,27
HIBADH	Body	0,25	0,40
HLA-B	Body	-0,21	-0,27
HOOK1	TSS1500	0,84	-0,32
HSPA5	Body	0,26	0,25
IPO7	TSS1500	0,30	0,35
LEPREL2	Body	-0,58	-0,42
LEPREL2	Body	-0,21	-0,25
LRRFIP1	TSS200	-0,37	-0,01
LRRFIP1	1stExon	-0,32	-0,36
LRRFIP1	Body	-0,40	-0,35
MAFK	TSS1500	0,20	0,22
MAML1	Body	-0,41	-0,30
MAP2K2	TSS1500	-0,30	-0,33
MBTPS2	TSS200	0,57	0,06
MFAP3L	5'UTR	-0,34	-0,37
MLLT1	Body	-0,24	-0,31

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
MLXIP	Body	-0,32	-0,21
NDUFS7	Body	0,37	0,36
NFKBIE	TSS1500	-0,32	-0,28
NOTCH2	Body	-0,23	-0,28
OAS3	TSS1500	0,36	0,30
PCDHB8	TSS1500	0,25	0,31
PDXK	Body	-0,81	0,00
PDXK	Body	-0,33	-0,26
PEBP1	TSS1500	-0,67	-0,50
PEBP1	TSS1500	-0,63	-0,53
PER3	Body	0,19	0,18
PION	TSS1500	0,81	-0,03
PMVK	3'UTR	0,15	0,21
PNMA1	1stExon	-0,36	-0,25
POU2F2	TSS1500	-0,23	-0,37
PPL	TSS1500	0,39	0,26
PRKCA	TSS1500	0,30	0,39
PRKCH	Body	0,45	0,43
PRR16	TSS1500	-0,20	-0,24
PRR16	TSS1500	-0,31	-0,26
RASA3	Body	0,63	0,46
RASA3	Body	0,41	0,16
RNF149	TSS1500	0,24	0,27
RPS9	TSS1500	-0,36	-0,41
SIK3	Body	-0,46	-0,30
SMS	TSS1500	-0,24	-0,31
SNCAIP	5'UTR	-0,84	0,01
SORL1	Body	-0,25	-0,25
SORL1	Body	-0,48	-0,51

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
SYTL3	TSS200	-0,29	-0,27
TBC1D1	TSS1500	-0,18	-0,25
TM9SF4	TSS1500	-0,16	-0,48
TMEM216	5'UTR	0,29	0,27
TP53RK	TSS1500	-0,12	-0,15
TSC22D3	1stExon	-0,30	-0,33
TSPAN1	5'UTR	0,26	-0,01
TSPAN31	TSS1500	-0,11	-0,20
VEGFC	TSS1500	-0,53	-0,53
WDR20	Body	-0,17	-0,21
ZNF549	TSS200	-0,53	0,18
ZNF549	Body	-0,12	-0,19

Tabelle 10.4: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 erhöht und 5637 vermindert exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.

In den Spalten 3 und 4 wurde die Differenz des DNA-Methylierungsgrades (HOTAIR-Leervektor) berechnet.

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
ARL3	3'UTR	-0,47	-0,60
B4GALNT4	TSS1500	-0,23	-0,21
B4GALNT4	TSS1500	0,14	0,17
CACNA2D3	Body	-0,35	-0,12
CACNA2D3	Body	-0,40	-0,59
CCDC104	Body	-0,33	-0,24
COL6A1	Body	0,41	0,31
DENND3	Body	0,10	0,18
DPP7	Body	-0,53	-0,52
EPHA4	Body	0,28	0,27
FSTL3	TSS1500	0,26	0,27
IPO7	TSS1500	0,30	0,35
LEPREL2	Body	-0,58	-0,42

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
LEPREL2	Body	-0,21	-0,25
LRRFIP1	TSS200	-0,37	-0,01
LRRFIP1	1stExon	-0,32	-0,36
LRRFIP1	Body	-0,40	-0,35
MAML1	Body	-0,41	-0,30
MAP2K2	TSS1500	-0,30	-0,33
MFAP3L	5'UTR	-0,34	-0,37
MLLT1	Body	-0,24	-0,31
MLXIP	Body	-0,32	-0,21
NDUFS7	Body	0,37	0,36
NOTCH2	Body	-0,23	-0,28
PEBP1	TSS1500	-0,67	-0,50
PEBP1	TSS1500	-0,63	-0,53
PER3	Body	0,19	0,18
PMVK	3'UTR	0,15	0,21
PNMA1	1stExon	-0,36	-0,25
PRKCA	TSS1500	0,30	0,39
PRR16	TSS1500	-0,20	-0,24
PRR16	TSS1500	-0,31	-0,26
RASA3	Body	0,63	0,46
RASA3	Body	0,41	0,16
RPS9	TSS1500	-0,36	-0,41
TM9SF4	TSS1500	-0,16	-0,48
TP53RK	TSS1500	-0,12	-0,15
VEGFC	TSS1500	-0,53	-0,53
WDR20	Body	-0,17	-0,21
ZNF549	TSS200	-0,53	0,18
ZNF549	Body	-0,12	-0,19

Tabelle 10.5: Gene, die in den HOTAIR-Klonen der UC-Zelllinien VM-CUB1 vermindert und 5637 erhöht exprimiert waren und eine veränderte DNA-Methylierung aufwiesen.

In den Spalten 3 und 4 wurde die Differenz des DNA-Methylierungsgrades (HOTAIR-Leervektor) berechnet.

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
AGMAT	1stExon	0,91	-0,31
ANKRD22	Body	-0,32	-0,23
BAG3	Body	-0,69	-0,41
BIK	TSS1500	0,30	0,21
BTBD11	1stExon	-0,60	-0,41
C10orf137	TSS200	-0,40	-0,43
CACHD1	Body	-0,19	-0,37
CACHD1	Body	-0,28	-0,24
CHST15	Body	-0,65	0,01
CXCL5	Body	0,90	0,03
DHRS3	Body	0,23	0,31
FBXO27	Body	0,22	0,21
HIBADH	Body	0,25	0,40
HLA-B	Body	-0,21	-0,27
HOOK1	TSS1500	0,84	-0,32
HSPA5	Body	0,26	0,25
MAFK	TSS1500	0,20	0,22
MBTPS2	TSS200	0,57	0,06
NFKBIE	TSS1500	-0,32	-0,28
OAS3	TSS1500	0,36	0,30
PCDHB8	TSS1500	0,25	0,31
PDXK	Body	-0,81	0,00
PDXK	Body	-0,33	-0,26
PION	TSS1500	0,81	-0,03
POU2F2	TSS1500	-0,23	-0,37
PPL	TSS1500	0,39	0,26
PRKCH	Body	0,45	0,43

Gencode	UCSC_RefGene_Group	VM-CUB1	5637
RNF149	TSS1500	0,24	0,27
SIK3	Body	-0,46	-0,30
SMS	TSS1500	-0,24	-0,31
SNCAIP	5'UTR	-0,84	0,01
SORL1	Body	-0,25	-0,25
SORL1	Body	-0,48	-0,51
SYTL3	TSS200	-0,29	-0,27
TBC1D1	TSS1500	-0,18	-0,25
TMEM216	5'UTR	0,29	0,27
TSC22D3	1stExon	-0,30	-0,33
TSPAN1	5'UTR	0,26	-0,01
TSPAN31	TSS1500	-0,11	-0,20