

Aus dem Forschungslabor der urologischen Klinik Düsseldorf  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz

# Genetische Analyse der Urothelzelllinien BC44 und BC61

Dissertation

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

Vorgelegt von  
Merlin Burkhard Weilandt  
2017

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

gez.

Dekan: Prof. Dr.med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Harald Rieder

Voller Stolz und Dankbarkeit widme ich diese Arbeit meiner Familie



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Weilandt M. , Koch A. , Rieder H. , Deenen R. , Schwender H. , Niegisch G. , Schulz WA.:

"Target genes of recurrent chromosomal amplification and deletion in urothelial carcinoma."  
Cancer Genomics-Proteomics 11.3 (2014): 141-153.

# 1 Zusammenfassung

Das Urothelzellkarzinom (UC) ist durch häufige genetische Instabilität in Form chromosomaler Veränderungen charakterisiert, die mit der Tumorprogression zunimmt. Um Zielgene von chromosomalen Amplifikationen oder Deletionen zu identifizieren, wurden die zwei kürzlich etablierten UC-Zelllinien BC44 und BC61 näher untersucht. Dazu wurden mit Hilfe der *array comparative genomic hybridization* (aCGH) Gene aus Regionen mit evidenten Chromosomenveränderungen herausgesucht. Um Aussagen über deren generelle Bedeutung im UC zu treffen, wurden die Ergebnisse dieser Analyse mit weiteren Datensätzen verglichen. Betrachtet wurde zum einen eine globale Expressionsanalyse von BC61, zum anderen sechs öffentlich zugängliche Datensätze aus Microarray-basierten Expressionsanalysen von UC-Gewebe. In den Expressionsanalysen wurde die differentielle Expression zwischen UC und normalem Urothel bestimmt. Die chromosomalen Veränderungen in BC61 wurden mit Expressionsveränderungen verglichen, um zu bestimmen, inwieweit die Aberrationen Einfluss auf die RNA-Expression haben.

Dabei hat sich ergeben, dass BC44 und BC61 eine homozygote Deletion im Bereich 9p21 und eine Amplifikation im Bereich von 11q13.2 gemeinsam haben. Im Zentrum dieser gemeinsamen Veränderungen stehen die Gene *CDKN2A* bzw. *CCND1*. Weitere Gemeinsamkeiten zeigen sich bei 11 deletierten und 115 zugewonnenen Genen. Auch in den öffentlichen Expressionsdaten von UC fanden sich Übereinstimmungen. Hier waren 230 Gene mit einer gesteigerten und 349 mit einer verminderten Expression gleichsam verändert. Einige dieser Gene gehören wiederum auch zu den in BC44 und BC61 zugewonnenen oder deletierten Genen. Darunter die bereits für das UC wohl bekannte Onkogene und Tumorsuppressorgene *E2F1* und *CCNE1*.

Unter funktionellen Aspekten weisen die Ergebnisse dieser Arbeit zum einen auf typische Veränderungen des UC hin, die den Zellzyklus, die Apoptose oder die epigenetische Regulation beeinflussen. Es finden sich aber auch eher unverstandene bzw. selten beschriebene Veränderungen, wie die häufige Deletion von 8p21-22 oder die Beeinflussung von immunmodulierenden Genen, die einer näheren Untersuchung im Kontext des UC unterzogen werden sollten. Von besonderem Interesse sind in dieser Arbeit auffällig gewordene Gene, die für andere Tumoren gut, jedoch für das UC nicht bzw. nicht hinreichend untersucht wurden. Exemplarisch wären hier *ERGIC*, *NUP155*, *PPP3CC*, *SKP2* oder wie bereits angedeutet Interferon- und Defensin-Gene zu nennen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Urothelkarzinom trotz der Anstrengungen der letzten Jahre noch relativ unerforscht ist und seine weitere Erforschung noch einiges an Potential birgt, um die Therapie und die Prognose zukünftiger Patienten zu verbessern.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

aCGH	array comparative genomic hybridisation (deutsch: array-basierte komparative genomische Hybridisierung)
C44	Urothelkarzinomzelllinie BC44
BC61	Urothelkarzinomzelllinie BC61
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
Bp	Basenpaar
CEL	spezieller Datei-Typ der Affymetrix Analyse Software
Chr	Chromosom
CIS	Carcinoma in Situ
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DM	double minute chromosomes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBI	European Bioinformatics Institute
FC	Fold Change
GEO	Gen Expression Omnibus
HD	homozygote Deletion
HHU Düsseldorf	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
HSR	homogeneously staining regions
K	Kopienzahländerung (in Formeln)
lncRNA	long non-coding RNA
LOH	Loss of heterozygosity
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
N	Normalgewebe
NCI	National Cancer Institute
NHGRI	National Human Genome Research Institute
p	kurzer Arm eines Chromosoms
-pter	Bis zum Ende eines Chromosoms
PUNLMP	Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
q	langer Arm eines Chromosoms
R	freie Programmiersprache für statistische Berechnungen und Grafiken
RNA	Ribonukleinsäure
T	Tumorgewebe
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TUR-BT	Transurethrale Blasen-tumorresektion
UC	Urothelzellkarzinom
UP236	primäre Urothelzellen

### 3 Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	0
2	Abkürzungsverzeichnis .....	1
4	Einleitung .....	4
4.1	Allgemeines über Urothelzellkarzinome .....	4
4.2	Molekularbiologie des UC .....	7
4.3	Vom Modell zur Praxis .....	13
5	Ziele dieser Arbeit .....	15
6	Material und Methoden .....	16
6.1	Zelllinien und Zellkultur .....	16
6.1.1	BC44 .....	16
6.1.2	BC61 .....	16
6.1.3	Primäre Urothelzellen .....	16
6.2	Zytogenetische Charakterisierung - Spektrale Karyotypisierung .....	17
6.3	Extraktion von DNA und RNA .....	17
6.4	Durchführung und Auswertung von Array komparativer genetischer Hybridisierung und Expressionsmicroarrays .....	17
6.5	Gen Expressionsanalyse .....	19
6.6	Analyse öffentlicher Genexpressionsdatensätze .....	20
6.7	Vergleich der aCGH-Daten mit den öffentlichen Expressionsanalysen .....	22
6.8	Funktionelle Annotation mit der DAVID Datenbank .....	22
7	Ergebnisse .....	23
7.1	Spektrale Karyotypisierung .....	23
7.1.1	BC44 .....	23
7.1.2	BC61 .....	24
7.1.3	Vergleich der Karyogramme von BC61 und BC44 .....	25
7.2	Komparative genetische Hybridisierung .....	25
7.2.1	Probe based report .....	26
7.2.2	Interval Based Report .....	27
7.2.3	Graphische Darstellung der homozygoten Deletionen und Amplifikationen .....	30
7.2.4	Gemeinsame Deletionen und Zugewinne von BC44 und BC61 .....	35
7.2.5	Gemeinsame homozygot deletierte und amplifizierte Gene in BC44 und BC61 .....	36
7.3	Genexpression BC61 .....	38
7.3.1	CEL basierte Analyse der Rohdaten .....	38
7.3.2	R basierte Analyse der Rohdaten .....	39
7.4	Öffentliche Expressionsdatensätze .....	39
7.5	Vergleich aller Ergebnisse .....	42
7.5.1	Vergleich der Expressionsdaten von BC61 mit den aCGH-Daten von BC61 .....	43
7.5.2	Vergleich der öffentlichen Expressionsdaten mit den Expressionsdaten von BC61 .....	46
7.5.3	Vergleich der aCGH-Daten und der Expressionsdatensätzen .....	48

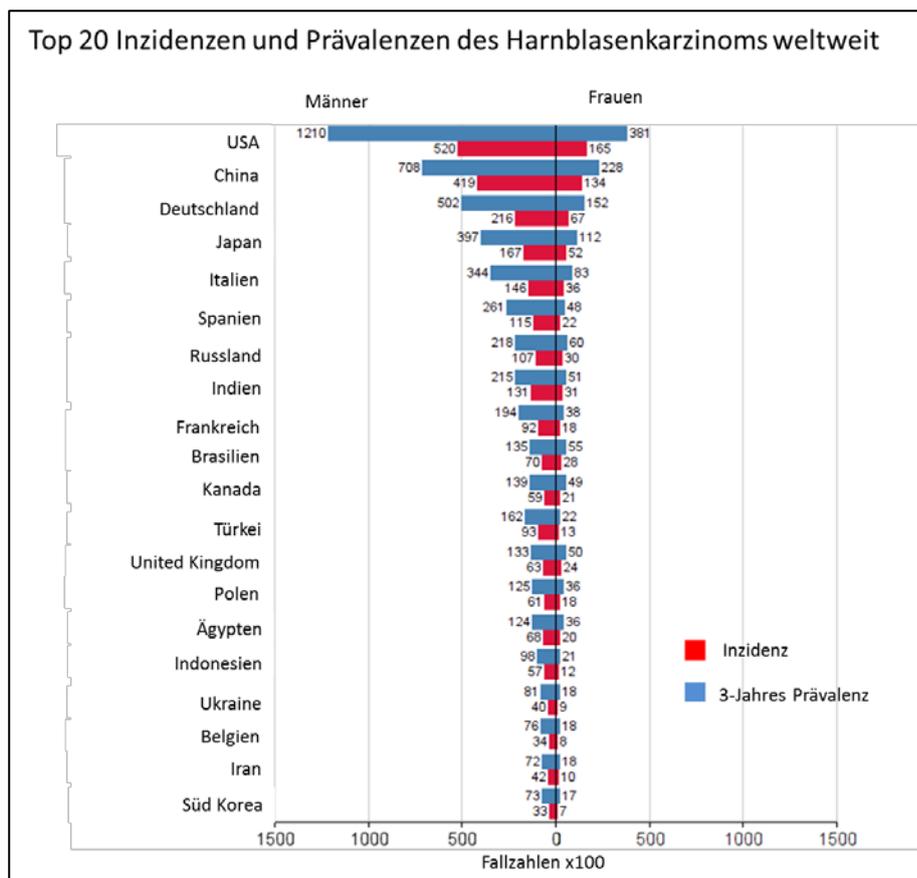
7.6	Analyse aller Ergebnisse mittels der DAVID-Datenbank .....	50
7.6.1	Öffentliche Expressionsdaten .....	50
7.6.2	DAVID Analyse der aCGH-Daten.....	52
7.6.3	DAVID Analyse der Expressionsdaten von BC61 und deren Gemeinsamkeiten mit den aCGH-Daten .....	54
7.6.4	DAVID Analyse der Gemeinsamkeiten zwischen aCGH-Daten und öffentlichen Expressionsdaten ..	55
8	Diskussion .....	56
8.1	Karyotypisierung .....	56
8.1.1	Vermutung über den zeitlichen Ablauf der Chromosomenaberrationen von BC61 und BC44. ....	57
8.2	Array komparative genetische Hybridisierung von BC44 und BC61 .....	58
8.2.1	Ergebnisse der Karyotypisierung und aCGH im Vergleich .....	58
8.3	Gemeinsamkeiten und Unterschiede von BC44 und BC61 anhand der aCGH.....	59
8.3.1	Chromosom 9 .....	59
8.3.2	Chromosom 11.....	62
8.3.3	Chromosom 20.....	65
8.3.4	Chromosom 8 .....	67
8.3.5	Chromosom 3 .....	70
8.4	Expressionsanalyse BC61 .....	71
8.4.1	Vermindert exprimierte Gene.....	71
8.4.2	Gesteigert exprimierte Gene .....	72
8.5	Öffentliche Genexpressionsanalyse.....	75
8.5.1	Gesteigert exprimierte Gene in allen drei Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten .....	75
8.5.2	Vermindert exprimierte Gene in allen drei Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten.....	77
8.6	Vergleich aller Daten.....	79
8.7	Schlussfolgerung .....	84
9	Quellenverzeichnis.....	86
10	Anhang .....	96
10.1	Ergebnisse der Expressionsanalyse der einzelnen Datensätze .....	96
10.1.1	Normalgewebe gegen Tumorgewebe.....	96
10.1.2	Normalgewebe gegen pTa-Tumoren .....	99
10.1.3	Normalgewebe gegen $\geq$ pT2-Tumoren .....	102
10.1.4	pTa-Tumoren im Vergleich zu $\geq$ pT2-Tumoren .....	105
10.2	Deletionen und Zugewinne von BC44 und BC61 .....	108
10.3	Graphische Darstellung der einzelnen Chromosomen. ....	117

## 4 Einleitung

### 4.1 Allgemeines über Urothelzellkarzinome

Der menschliche Körper scheidet täglich zwischen ein und zwei Liter Urin aus. Dieser wird von den Nieren produziert, über die Harnleiter zur Harnblase weitergeleitet, dort gesammelt und in vier bis sieben Portionen am Tag über die Harnröhre ausgeschieden. Alle hieran beteiligten Organe werden als Harntrakt zusammengefasst. Im Urin sind Substanzen wie Harnstoff, Elektrolyte, Kreatinin, Ammoniak, organische Säuren, Urobilinogen und wasserlösliche Abbauprodukte, darunter auch Toxine, stark aufkonzentriert [1]. Urin hat eine Osmolarität von bis zu 1220 *mosmol/kg*, die von Blut liegt konstant zwischen 280 bis 300 *mosmol/kg*. Damit alle harnpflichtigen Substanzen trotz des großen Konzentrationsgefälles im Urin verbleiben, bedarf es eines spezialisierten Epithels, dem Urothel. Dieses kommt nur im urogenitalen System vor und ist ein mehrreihiges Epithel, dessen oberste Zellschicht, die Deckzellen, die Hauptbarriere zum Urin bilden. Diese mehrkernigen Zellen sind bis zu 200  $\mu\text{m}$  groß und spannen sich schirmartig über die darunter liegenden Zellen. Diese auch als Schirmzellen bezeichneten Zellen sind so in der Lage, der wechselnden Volumenbelastung des Urogenitalsystems standzuhalten. Unter ihnen reihen sich bis zu sechs Schichten von intermediären und basalen Urothelzellen. Die Basalmembran bildet die Trennschicht zwischen dem Urothel und der *Lamina propria*, einer Schicht aus Bindegewebe mit Gefäßen und Nerven. Der *Lamina Propria* folgen die *Laminae muscularis*, die aus glatter Muskulatur bestehen und von der *Adventita* und dem angrenzenden Fettgewebe umgeben wird.

Die Harnblase sammelt Urin und ist somit lange Zeit dem teilweise hochkonzentrierten Urin ausgesetzt. So haben potentiell kanzerogene Substanzen gerade dort viel Zeit auf die Urothelzellen einzuwirken. Dies könnte ein Grund sein, warum 90% aller Urothelzellkarzinome (UC) in der Harnblase entstehen, seltener sind das Nierenbecken, der Ureter oder die Urethra betroffen [2]. In Deutschland erkrankten 2010 insgesamt 28.790 Personen an einer malignen Veränderung der Harnblase [3]; in 98% der Fälle lagen Urothelkarzinome vor. Lediglich in 2% der Fälle handelt es sich um andere Tumoren, wie Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome [4]. Somit ist das UC die häufigste maligne Erkrankung des Urothels. Weltweit betrachtet ist der Harnblasenkrebs die fünfthäufigste maligne Erkrankung bei Männern und die 15.-häufigste bei Frauen [5]. Damit gehört er weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen. In der *Abbildung 1* sind die 20 Länder mit den höchsten Inzidenzen und Prävalenzen des UC aufgeführt. Von den 28.790 Personen, die 2010 an einer malignen Veränderung der Harnblase in Deutschland erkrankten, waren rund zwei Drittel Männer. Für diese lag das mittlere Erkrankungsalter bei 72 Jahren und für Frauen bei 74 Jahren. Männer hatten in den Jahren 2009 - 2010 in Deutschland eine 5-Jahres-Überlebensrate von 59% und Frauen von 50% [3].

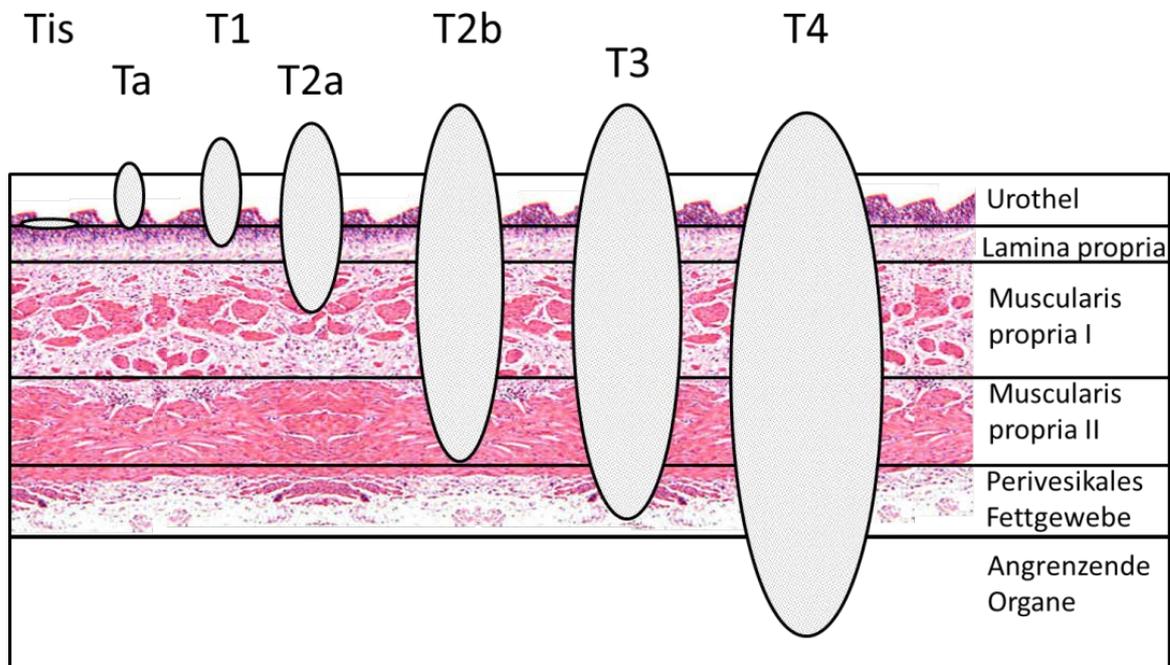


**Abbildung 1: Top 20 Inzidenzen und Prävalenzen des Harnblasenkarzinoms weltweit.**

Abgeänderte Abbildung von *Globocan 2012* [6, 7], einer epidemiologischen online Datenbank über Krebserkrankungen weltweit. Bereitgestellt von der *International Agency for Research on Cancer* der *World Health Organization*.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms zählen nachweislich der Tabakkonsum und die Exposition gegenüber aromatischen Aminen. Raucher haben im Durchschnitt ein bis zu sechsmal höheres Risiko an Harnblasenkrebs zu erkranken als Nichtraucher. Dies zeigt sich auch darin, dass 66% der männlichen Patienten und 30% der weiblichen Patienten einen Nikotinabusus aufweisen [8]. 25% aller UC sind auf eine Exposition mit aromatischen Aminen wie Benzidine, 2-Naphthylamine oder Anilinfarben zurückzuführen [9]. Zu beruflichen Expositionen gegen solche Substanzen kommt es z.B. in der chemischen oder metallverarbeitenden Industrie; UC gelten in solchen Fällen als anerkannte Berufskrankheiten [2]. Der sekundäre Pflanzenstoff Aristolochiasäure der *Aristolochiaceae* (Osterluzeigewächse) fand vor allem in der traditionellen chinesischen Medizin breite Anwendung. Dabei wirkt es nephrotoxisch und kanzerogen auf das urotheliale System [10]. Charakterisierend für Aristolochiasäure induzierte Tumoren ist eine hohe Anzahl von A:T zu T:A Punktmutationen im Genom [11]. In nordafrikanischen Ländern ist eine weitere Ursache für Harnblasentumoren der Parasit *Schistosoma haematobium*. Hierbei handelt es sich um eine Trematode, die sich in die Schleimhaut der Blase einnistet und chronische Entzündungen verursacht. Die Parasiten induzieren meistens das ansonsten seltene Plattenepithelkarzinom [2].

Über die histologische Entität hinaus werden Harnblasenkarzinome durch Staging, basierend auf einer TNM-Klassifikation, und Grading eingeteilt. Für das UC ist aus prognostischer und therapeutischer Sicht vor allem die Eindringtiefe entscheidend. *Abbildung 2* zeigt vereinfacht die Eindringtiefe für das UC in die Harnblasenwand.



**Abbildung 2:** TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.

Histologischer Schnitt durch die Harnblasenwand und vereinfachte Darstellung der Einteilung des Urothelzellkarzinoms anhand der Eindringtiefe nach der WHO-TNM Klassifikation.

Beim UC werden zwei Hauptgruppen unterschieden, die nicht-muskelinvasiven und die muskelinvasiven UC. Bei den nicht-muskelinvasiven Tumoren werden weiterhin das *Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential* (PUNLMP) und das *Carcinoma in Situ* (CIS) von den restlichen nicht-invasiven papillären UC unterschieden. Vor allem die Unterscheidung zwischen muskelinvasiv und nicht-muskelinvasiv ist für das UC therapierelevant. Nicht-muskelinvasive Tumoren können meist durch eine zystoskopische transurethrale Blasentumorresektion (TUR-BT) therapiert werden. Wegen einer hohen Rezidivrate solcher  $\leq pT2$  Tumore ist neben einer regelmäßigen Nachsorge, v. a. bei high grade Tumoren und CIS, noch eine lokale Installation von Mitomycin oder Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) indiziert. Beide Installationen vermindern die Rezidivrate [12]. Für die muskelinvasiven Tumoren bietet meist nur eine Zystektomie, eine radikale Operation der gesamten Harnblase und Teile angrenzender Organe, Aussicht auf Heilung.

Heute gilt als gesichert, dass die nicht-invasiven papillär wachsenden UC aus Hyperplasien entstehen. Eine Hyperplasie wird definiert als eine verdickte Mucosa ohne Atypien. 80% aller UC entwickeln sich aus einer Hyperplasie. PUNLMP werden von den anderen UC unterschieden, da sie etwas seltener rekurren (25-47%) und praktisch nie zu muskelinvasiven Karzinomen fortschreiten [1, 2]. Vor 2004

wurde beim Grading des UC noch in G1, G2 und G3 unterteilt. Heute sollen nur noch Low-Grade Tumoren (G1 und G2) von High-Grade Tumoren (G3) unterschieden werden. Kriterien für die Unterscheidung sind die Zellarchitektur, also der Anzahl der Mitosen, Kernanomalien, abnorme Zellgrößen und die Gewebedifferenzierung. Die papillären Low-Grade Tumoren haben eine Mortalitäts- und Progressionsrate von <5%; rekurren jedoch sehr häufig (48-71% dieser Tumoren). Die nicht-invasiven High-Grade Tumoren sind erheblich problematischer, mit einer Progressionsrate von 15-40% und einer Sterblichkeitsrate von 20%, bei einer Rekurrenz in 70-75% der Fälle [2, 13].

Das CIS ist ein nicht-muskelinvasiver Tumor, der sich grundlegend von den restlichen nicht-muskelinvasiven UC abhebt. Im Gegensatz zu den papillären Tumoren, die aus Hyperplasien hervorgehen, bilden sich CIS wahrscheinlich aus Dysplasien. Eine Dysplasie wird als eine Veränderung des Urothels mit starken zytologischen und architektonischen Veränderungen definiert, die jedoch nicht die Kriterien eines CIS erfüllen. Das CIS wird als Vorstufe der meisten invasiven Tumoren angesehen. Im Gegensatz zu den papillären UC handelt es sich bei den CIS um flache Läsionen des Urothels, die daher während einer Zystoskopie schwerer zu detektieren sind. Meistens findet man CIS zusammen mit anderen Tumorstadien der Harnblase als multifokale Blasen Tumore. Die Sterblichkeit von Patienten mit einem CIS und einem invasiven Tumor liegt bei 45-65%, wohingegen Patienten mit einem CIS und einem nicht-invasiven papillären UC nur eine Sterblichkeit von 7-15% aufweisen. Das CIS ist demnach eine obligate Präkanzerose, die sich in bis zu 80% zu muskelinvasiven Karzinomen weiterentwickelt [2, 13, 14].

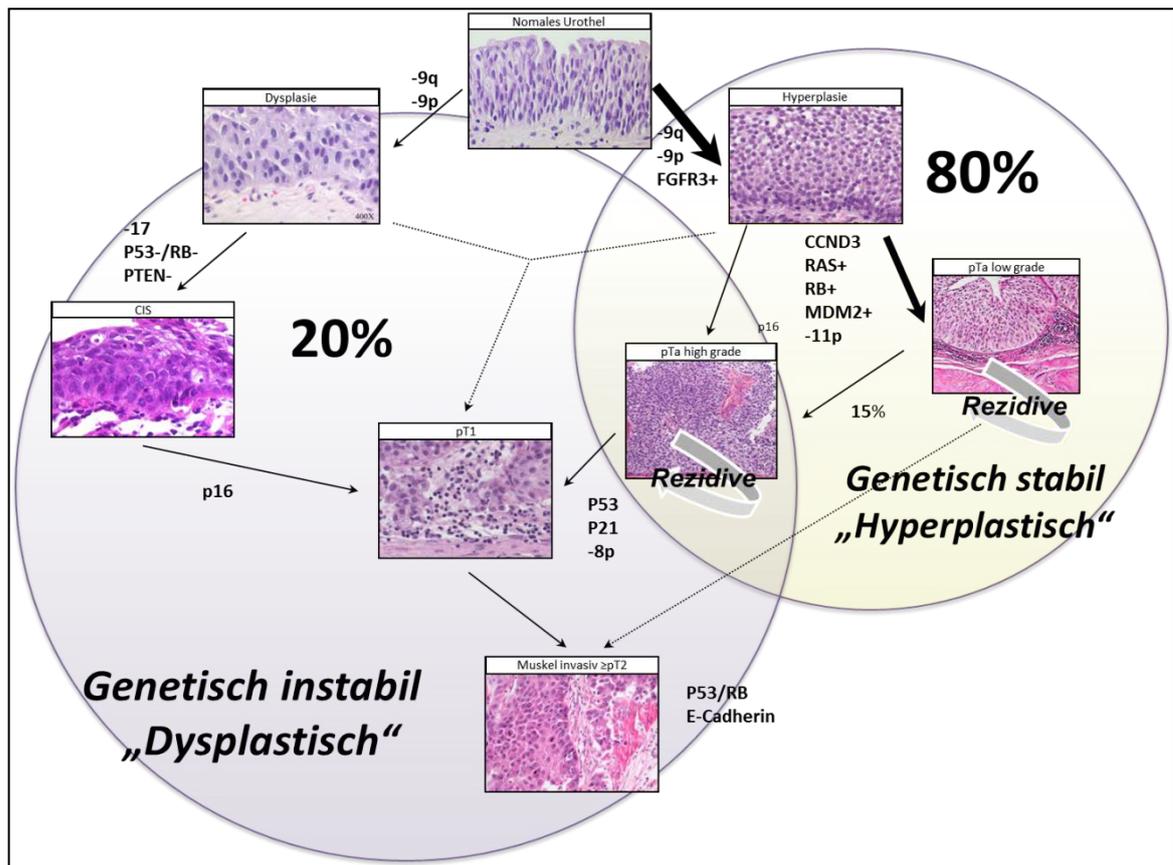
Muskelinvasive Tumoren haben die *Lamina Propria* durchbrochen und infiltrieren die *Lamina muscularis*. Bei der Mehrzahl der muskelinvasiven UC handelt es sich um High-Grade Tumoren. Bei Patienten, die von einem invasiven Tumor betroffen sind, besteht die größte Chance der Heilung in der Durchführung einer Zystektomie. Dabei können neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie die Heilungschancen in begrenztem Umfang verbessern [15]. Muskelinvasive Tumore haben eine Sterblichkeitsrate von 75-80% [16]. Die Prognosekriterien für die muskelinvasiven UC sind Invasionstiefe, Invasionsfront, Infiltration der Ureterostien und das Ausmaß der Metastasierung in Lymphknoten und distale Organe [2, 13].

## **4.2 Molekularbiologie des UC**

Spätestens 2004 mit dem Expertenkonsensus, der in der Arbeit „Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs“ der *World Health Organization Classification of Tumours* festgehalten ist, fanden die molekulargenetischen Erkenntnisse des UC Einzug in den klinischen Alltag. Seit dieser Arbeit werden genetisch stabile, nicht invasive Low-Grade Tumoren (pTa G1-2) von den genetisch instabilen, invasiven (bis auf die nicht invasiven pTa G3 und CIS) High-Grade Tumoren (pTa G3, CIS, pT1-4) unterschieden [2].

Aufgrund der rapiden Entwicklung der technologischen Möglichkeiten in der Molekulargenetik kann man davon ausgehen, dass es in naher Zukunft eine umfassende Wissensbasis zu allen molekulargenetischen Veränderungen in Tumorzellen geben wird, einschließlich des UC [17]. Beispielsweise findet man seit kurzem für das UC große Studien von chinesischen, amerikanischen und europäischen Forschungsgruppen, die eine große Zahl von Tumorproben detailliert auf Mutationen sowie Veränderungen der Genkopienzahl, DNA-Methylierung und RNA-Expression untersucht haben [17-20]. Das Projekt „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) wurde 2006 mit einem Budget von 100.000.000 US-Dollar gegründet und von den US-Amerikanischen *National Cancer Institute* (NCI) und *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) initialisiert. TCGA ist heute das größte und bedeutendste Projekt seiner Art und umfasst Daten von mehr als 200 Tumorentitäten. Es soll so viele molekularbiologische Daten wie möglich über Tumore sammeln, zusammenstellen und öffentlich zugänglich machen. Der Grundgedanke von TCGA ist, dass man Krebserkrankungen umso besser therapieren kann, je mehr man über die damit einhergehenden Veränderungen weiß. Ziel ist, in naher Zukunft jede Krebserkrankung heilen zu können [21]. Da auch Daten vieler anderer Arbeiten der Öffentlichkeit zugänglich sind, ist es möglich sie metanalytisch zu betrachten und oder mit eigenen Daten zu vergleichen. Für das UC haben diese Arbeiten zu erheblichen Fortschritten in den letzten Jahren beigetragen. Dennoch gilt die Erforschung des UC im Vergleich zu anderen Tumoren immer noch als vernachlässigt, obwohl es weltweit zu den häufigsten Tumoren des Menschen gehört [22].

Die zwei Hauptgruppen des UC, auf der einen Seite die weniger malignen, hyperplastischen, papillär wachsenden UC und auf der anderen Seite die dysplastischen, meist muskelinvasiv wachsenden, High-Grade UC, unterscheiden sich neben ihrer Morphologie, Therapie, Prognose und Entstehung insbesondere auf der molekulargenetischen Ebene. *Abbildung 3* zeigt die Stadien des UC, die möglichen Entstehungswege und einige charakteristische damit einhergehende molekulargenetische Veränderungen. Diese typischen molekulargenetischen Veränderungen unterstützen die Einteilung bzw. Unterscheidung von Subtypen des UC. Die beiden Hauptgruppen des UC unterscheiden sich grundlegend in ihrer genetischen Stabilität. So sind muskelinvasive UC genetisch instabiler als nicht-muskelinvasive. Diese Instabilität betrifft dabei das gesamte Genom, angefangen bei den Chromosomenaberrationen, über DNA-Methylierung, bis hin zu aktivierenden oder deaktivierenden Punktmutationen einzelner Tumorsuppressoren oder Onkogene.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der möglichen Entwicklungswege und charakteristische Veränderungen des Urothelzellkarzinoms.

Viele genetisch oder epigenetisch veränderten Gene kann man als Onkogene und Tumorsuppressorgene einordnen. Die Tumorentwicklung schreitet voran, wenn Onkogene eine gesteigerte Aktivität zeigen und Tumorsuppressorgene verminderte oder keine Aktivität zeigen. Zu den typischen Onkogenen zählen G-Proteine der RAS-Familie, die auch im UC aktiviert sein können. Durch definierte Mutationen eines *RAS* Gens kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs, was zu einer unkontrollierten Zellproliferation führt [23]. Tumorsuppressorgene haben im Prinzip eine gegenteilige Aufgabe, nämlich das unkontrollierte Wachstum einer Zelle zu verhindern und gegebenenfalls Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose einzuleiten. Eines der am besten untersuchten Tumorsuppressorgene ist *TP53*, der „Wächter“ des Genoms [24], das ebenfalls im UC häufig verändert vorliegt.

Chromosomenaberrationen, besonders Deletionen und Amplifikationen, gehören zu den am besten untersuchten und typischen Veränderungen des UC. Bei einer Amplifikation handelt es sich um einen Zugewinn von genetischem Material, bei der Deletion um den Verlust von genetischem Material. Generell unterscheidet man die Amplifikationen in *homogeneously staining regions* (HSR) oder *double minute chromosomes* (DM). HSR bestehen aus langen aneinander geketteten Wiederholungen der DNA und finden sich mit einer homogenen Bandenfärbung. DM sind kleine

paarige extrachromosomale Elemente der DNA ohne Zentromere oder Telomere. Wahrscheinlich liegen Amplifikationen verschiedene Mechanismen zugrunde [25].

Wenn es im Rahmen einer Deletion zu einem Verlust von eines von zwei Allelen kommt, wird von *Loss of heterozygosity* (LOH) gesprochen. Sind beide Allele deletiert, handelt es sich um eine homozygote Deletion (HD). Für das UC allgemein gilt, dass bis zu 77% aller UC LOH, teils mit HD von Chromosom 9q und bis zu 70% von 9p aufweisen. Dies sind die häufigsten Deletionen im Harnblasenkarzinom. Deshalb geht man davon aus, dass ein Verlust von einem oder beider Arme des Chromosom 9 zu den initialen Veränderungen im UC gehört [8, 17, 26-28]. Detaillierte Untersuchungen der Deletionen auf Chromosom 9 haben mehrere Regionen ergeben, die signifikant häufig betroffen sind und wahrscheinliche Tumorsuppressorgene enthalten. Dabei handelt es sich um die Gene *CDKN2A* (9p21), *CDKN2B* (9p21), *PTCH1* (9q22.1 – q31), *DBC1* (9q32 - q33) und *TSC1* (9q34) [8, 17, 27-30]. Da es sich hierbei um „Schlüssel-Gene“ des UC handelt, soll deren Funktion und Einfluss im folgendem exemplarisch erläutert werden.

Eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene im UC, *CDKN2A*, findet sich auf 9p21 und kodiert für p16 und p14. Der Zellzyklusinhibitor p16 hemmt den Komplex aus CCND1 und CDK4 oder CDK6. Dieser Komplex hat wesentlich die Aufgabe das Retinoblastom-Protein (RB1) zu phosphorylieren und dadurch Transkriptionsaktivatoren der E2F-Familie freizusetzen. Diese Transkriptionsfaktoren sorgen für die Passage durch die Zellzyklusphase G1 und leiten so die Synthesephase ein. Die wichtigste Funktion von p14 besteht in der Inhibition von MDM2 (*murine double minute oncogene*), welches wiederum den Abbau von P53 fördert. Dieser „Wächter des Genoms“ aktiviert unter anderem p21, welches wiederum die Aktivität von RB1 phosphorylierenden und weiteren CDK-Komplexen hemmt [24, 31].

*TSC1* (9q34) kodiert für Hamartin, einen bekannten Tumorsuppressor. Vererbte Mutationen von *TSC1* und *TSC2* sind mit der Tuberösen Sklerose assoziiert, einer autosomal-dominanten Erbkrankheit. *TSC1* und *TSC2* bilden zusammen einen Komplex, der im Zentrum mehrerer Wachstumssignalwege steht; v. a. nimmt es letztendlich über den PI3K-/AKT-Signalweg, RHEB und mTOR Einfluss auf das Zellwachstum und Überleben der Zelle [32].

*PTCH1* (9q22) kodiert für den Transmembranrezeptor PATCHED1. Dieser kontrolliert den Hedgehog-Signalweg, der an der Morphogenese und Homöostase vieler Organe beteiligt ist. Vereinfacht lässt sich Hedgehog als parakriner Wachstumsfaktor betrachten, der an *Interference Hedgehog* (IHOG) und *Brother of Interference Hedgehog* (BOI) bindet und diese aktiviert. IHOG/BOI deaktivieren nun PATCHED1. Dadurch wird die Hemmung des G-Protein Rezeptors *Smoothed* (SMO) aufgehoben, der seinerseits GLI-Transkriptionsfaktoren aktiviert. Zusammenfassend erfüllt *PTCH1* die Kriterien eines Tumorsuppressorgens [33-35].

*DBC1* (auch als *DBCCR1* oder *BRINP1* bekannt) liegt häufig in Karzinomen deletiert vor (*DBC1=deleted in breast cancer*). Es findet sich auf 9q33 und besitzt eine 5' CpG-Insel, deren Hypermethylierung zum Verlust der Expression des Gens führen kann. Die genaue Funktion des Genprodukts ist nicht verstanden, man weiß jedoch, dass es das Wachstum und Überleben von UC-Zellen inhibiert [36]. Diese fünf Gene aus häufig veränderten Bereichen von Chromosom 9 bieten eine Erklärung, warum im UC so häufig das Chromosom 9 deletiert ist. Jedoch werden weitere Tumorsuppressorgene auf beiden Armen des Chromosoms als mögliche Kandidaten diskutiert; neuerdings beispielsweise *NOTCH1* [37].

Während Verluste von Abschnitten des Chromosoms 9 in allen Unterarten des UC häufig sind, sind die aktivierenden Mutationen von *FGFR3* für Hyperplasien geradezu definierend. Dieses Gen findet sich auf Chromosom 4p16.3 und ist in 80% aller pTa-Tumoren, aber nur in 16% aller  $\geq$ pT2-Tumoren mutiert. *FGFR3* kodiert für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3, welcher die RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade aktiviert und damit die Zellproliferation fördert [2, 38, 39]. So wie die *FGFR3*-Mutation typisch für das hyperplastische UC ist, ist es eine Deletion von Chromosom 17p für die dysplastischen UC und dort auch schon mit den frühen Formen vergesellschaftet. Im Fokus dieser Deletion steht p53. Bis zu 70% aller muskelinvasiven UC weisen eine Deletion oder Mutation von *TP53* auf. Heterozygote Deletionen von *TP53* gehen häufig mit einer inaktivierenden Punktmutation der bestehenden Kopie einher. Dass ein Funktionsverlust von p53, sei es durch Deletion oder Mutation von *TP53*, bereits in den frühen Formen der muskelinvasiven Tumoren nachweisbar ist, lässt darauf schließen, dass er den Weg zu muskelinvasiven Tumoren ebnet. Besonders die dominierende Kontrollfunktion der genomischen Stabilität von p53 wird als entscheidendes Hindernis für die Tumorprogression angesehen [2, 40, 41].

Nachfolgend sollen weitere wesentliche molekulargenetische Erkenntnisse über typische molekulare Veränderungen in hyperplastischen und dysplastischen Formen des UC vorgestellt werden.

Nicht-muskelinvasive hyperplastische UC sind in der Regel papillär wachsend, genetisch stabil und definitionsgemäß  $<$ pT2. Bei den chromosomalen Veränderungen finden sich oft Verluste, die die Chromosomen 9p, 9q, 5q, 10q, 11p und Y betreffen. Zugewinne finden sich auf Chromosom 7, 11q, 17 und 20q. Zielgene, die von solchen Veränderungen betroffen sind bzw. oft differenziell exprimiert vorliegen, sind *STAT1* (2q32.2-q32.3), *ERBB4* (2q33.3-q34), *TGFBR2* (3p22), *PIK3CA* (3q26.3), *PI3K* (5q13.1), *CDKN2A* (9p21), *PTCH1* (9q22.1 – q31), *DBCCR1* (9q32 - q33), *TSC1* (9q34), *MAPK* (11q13.4), *ERBB3* (12q13), *MDM2* (12q14.3-q15) und. Typisch mutierte Gene sind *FGFR3* und alternativ dazu Gene der RAS-Familie, am häufigsten *HRAS* [17-19, 26, 27, 29, 30, 42-45].

Typisch für die muskelinvasiven dysplastischen  $\geq$ pT2-Tumore ist die genetische Instabilität. Diese Instabilität zeigt sich bei der Auswertung von Publikationen zum Thema in Hinblick auf die Chromosomenaberrationen [17-19, 26, 27, 29, 30, 42-45]: Fügt man die Ergebnisse verschiedener

Arbeiten zusammen, so wird fast jedes Chromosom als oft verändert beschrieben. Im Durchschnitt werden am häufigsten Deletionen von 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 15q, 17q, 17p, 18q, 18p und Y aufgeführt. Zugewinne und Amplifikationen finden sich meistens auf Xq, 1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 7p, 10p, 17q, 8q, 11q, 17q, 19q, 20q, 20p und 22q. Die Deletionen, die am konsistentesten in der Literatur aufgezählt werden, betreffen 2q, 6q, 8p, 9p, 9q, 11p, 17p und 18q, auf der Seite der Zugewinne sind es 1q, 8q, 17p und 20q. Typisch differentiell exprimiert und oder von einer Deletion oder Zugewinn betroffen sind - von CDKN2A und TP53 abgesehen - die folgenden Gene: *CDKN1A* (6p21.1), *E2F3* (6p22), *EGFR* (7p12), *MYC* (8q24.21), *PTGS1* (9q32-q33.3), *TSC1* (9q34), *PTEN* (10q23.3), *CDKN1C* (11p15.5), *CCND1* (11q13), *MMP1* (11q21-q22), *CDK4* (12q14), *ERBB2* (17q21.1). Gene, die in besonders vielen muskelinvasiven UC mutiert vorliegen, sind *TP53*, *PIK3CA* und *RB1*.

Bei diesen Erkenntnissen über die unterschiedlichen molekulargenetischen Veränderungen sollte man berücksichtigen, dass es sich hierbei um statistische Häufigkeiten handelt. Die Tumorprogression ist ein dynamischer Prozess; sie durchläuft keine vorgeschriebene Bahn an molekulargenetischen Veränderungen und erreicht auch kein einheitliches Endstadium. Es gibt durchaus UC, die sowohl dysplastische als auch hyperplastische Charakteristika aufweisen und dies nicht nur bei den weit fortgeschrittenen Tumoren. Gerade die UC, die sich zwischen CIS, papillären nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven einordnen, deuten darauf, dass es neben den zwei Hauptentwicklungswegen noch weitere Entstehungswege und Unterteilungen gibt [26]. In *Abbildung 3* sind mit den gestrichelten Linien mögliche Entstehungswege der verschiedenen Stadien dargestellt. Eine andere Besonderheit sind muskelinvasive Tumoren mit einer anteiligen plattenepithelialen Differenzierung [17]. Diese zeigen therapeutisch eine schlechtere Prognose als andere UC [14, 29, 30].

In den neueren Studien und Untersuchungen finden sich immer wieder neue Gene und Gen-Netzwerke, die einen Einfluss auf das UC oder eines seiner Subtypen haben sollen. Die TCGA Studie ergab, dass Mutationen und Chromosomenaberrationen im UC drei Signalwege besonders häufig verändern. Dabei handelt es sich um die Zellzyklus-Regulation (93%), den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg (72%) und die Chromatinregulation, mit Mutationen in Enzymen der Histon-Modifikation (89%) und Komponenten des SWI/SNF Nukleosomen-remodellierenden Komplexes (64%) [17]. Besonders die Epigenetik des UC rückt daher weiter in den Fokus der Forschung [46].

So werden in vielen neueren Arbeiten immer wieder Gene diskutiert, die an der epigenetischen Beeinflussung des Genoms beteiligt sind. Zum Beispiel liegen die Gene *STAG2*, *ESPL1*, *UTX*, *MLL-MLL3*, *CREBBP-EP300*, *NCOR1*, *ARID1A*, *SETDB1* und *CHD6* oft verändert im UC vor und haben einen Einfluss auf die Chromatinstruktur und -aktivität [17-19]. Prinzipiell beschreibt die Epigenetik die Möglichkeit die Eigenschaften von Zellen stabil (aber reversibel) zu verändern ohne dabei die Sequenzabfolge der DNA selbst zu verändern. Beispielsweise sind es die epigenetischen

Mechanismen, die es ermöglichen, dass sich aus einer Stammzelle wechselweise eine Haarzelle, Muskelzelle oder eine andere differenzierte Zelle entwickeln kann, ohne dabei die Menge oder Sequenz der DNA zu verändern. Wichtige molekulargenetische Instrumente der epigenetischen Regulation umfassen Histone, Repressorproteinkomplexe, microRNAs oder die DNA-Methylierung [117]. Die epigenetische Beeinflussung wird seit einiger Zeit als neuer Ansatzpunkt in der Therapie von Tumoren betrachtet. Beispielsweise ist das synthetische Nukleosid Azacytidin, vertrieben unter den Handelsname Vidaza, für die Therapie des myelodysplastischen Syndroms zugelassen. Die Wirkungsweise basiert auf dem Einbau dieses künstlichen Nukleosids in die DNA oder RNA und der darauf folgenden Hemmung der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A/B oder einer RNA-Methyltransferase. Es wird angenommen, dass die so verursachte Demethylierung dafür sorgt, dass durch Hypermethylierungen ausgeschaltete Tumorsuppressorgene wieder exprimiert werden und so bspw. die Apoptose aktiviert wird [118].

Schließlich wurden in der Vergangenheit Gene wie *BCL2L1*, *SETDB1*, *YWHA*, *CCNE1*, *PTCH2*, *CUL3*, *DDB2*, *IFNA1*, *INFE*, *KLHL9*, *TERT*, *miR31*, *miR-145*, *miR-125b*, *miR-100* in mehreren Studien als relevant für das UC genannt und näher untersucht [17-19, 29, 30, 47].

### **4.3 Vom Modell zur Praxis**

Studien wie die der TCGA verdeutlichen, dass momentan die Sammlung von Daten ein sehr bedeutender Baustein der Krebsforschung ist und zudem, welche enormen Fortschritte die Methodik der bioinformatischen Auswertung durchläuft. Dennoch gibt es (noch?) klare Grenzen für die Aussagekraft von bioinformatischen und statistischen Berechnungen auf der Basis von molekulargenetischen Analysen. Letzten Endes müssen die gewonnenen Erkenntnisse am lebendigen Modell bestätigt werden. Für solche Zwecke sind Zelllinien eines der besten und einfachsten Modelle. Einer Zelllinie liegen ursprünglich eine oder mehrere Zellen, z.B. aus einem Tumor, zugrunde, die sich in einer künstlichen Umgebung immer wieder teilen und von Generation zu Generation überführt werden. Obwohl versucht wird, das im ursprünglichen Gewebe vorkommende Umfeld nachzustellen, ist eine gewisse Anpassung der Zellen an diese artifizielle Situation notwendig. Man kann annehmen, dass Zellen mit einem instabilen Genom sich leichter an die neue Umgebung anpassen können als Zellen mit einem stabileren Genom. Das bedeutet für das UC, dass sich dysplastische Tumoren leichter in Kultur bringen lassen als nicht-muskelinvasive hyperplastische Tumoren. Bis heute wurden weltweit ungefähr 40-50 UC-Zelllinien etabliert und publiziert, darunter jedoch nur wenige nicht-invasive UC-Zelllinien [48].

Die beiden Zelllinie BC44 und BC61 bilden eine Grundlage dieser Arbeit. Sie wurden im Zeitraum von 2004 bis 2006 nach TUR-BTs im Forschungslabor der Urologischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf erfolgreich als Zellkulturen etabliert. Mit der Zelllinie BC61 ist es gelungen, eine UC-

Zelllinie von einem gut differenzierten papillären (pTa G2) Tumor zu etablieren. Bei BC44 handelt es sich um eine Zelllinie aus einem exophytischen papillären Teil eines großen, gering differenzierten und hochinvasiven (pT4 G3) Tumors. Anteilig imponierte dieses UC auch mit einer plattenepithelialen Differenzierung. Beide Zelllinien haben sich seit mehr als 30 Passagen als stabil erwiesen. Die Zelllinien wachsen mit Hilfe einer Collagen IV Beschichtung in dem Serum-freien Spezialmedium Epilife, das mit zahlreichen Supplementen versetzt wird. Um beide Zelllinien hinreichend zu charakterisieren, wurden sie ausführlich molekulargenetisch untersucht. Dabei konnten typische Veränderungen von dysplastischen und hyperplastischen UC auch in diesen beiden Zelllinien wiedergefunden werden. Die Zelllinie BC61 besitzt eine onkogene *FGFR3*-Mutation, eine *CDKN2A* Deletion und ist wildtypisch für *PIK3CA*. Die Zelllinie BC44 zeichnet sich insbesondere durch eine *CDKN2A* Deletion und dem Fehlen von wildtypischem p53 Protein aus. Detaillierte Analysen des *TP53* Gens haben ergeben, dass in dieser Zelllinie die Verwendung eines alternativen p53 Promotors (p2/int4) zur Transkription von  $\Delta 133$ -Isoformen führt [46]. Aus der spektralen Karyotypisierung geht hervor, dass es deutliche Unterschiede in der chromosomalen Konstitution der beiden Zelllinien gibt. BC61 hat den Karyotyp 86, XXYY mit wenigen strukturellen chromosomalen Aberrationen. Dagegen hat BC44 64-68 Chromosomen, mit zwei X-Chromosomen und einer hohen Zahl an strukturellen chromosomalen Veränderungen. Für einen detaillierten Einblick in die genetischen Veränderungen von BC44 und BC61 wurden beide mittels aCGH untersucht. So konnten bspw. auch die bereits erwähnte homozygote Deletion von *CDKN2A* sowohl in BC44 als auch in BC61 bestätigt werden. Zusätzliche standen für diese Arbeit noch globale RNA-Expressionsdaten von BC61, im Vergleich zu einer Primärkultur von proliferierenden normalen Urothelzellen, und sechs öffentlich zugängliche Expressionsdatensätze vieler UC-Gewebe zur Verfügung.

## 5 Ziele dieser Arbeit

Um in Zukunft gut mit BC61 und BC44 als Modelle für das UC arbeiten zu können, war ein Ziel dieser Arbeit alle vorhandenen Daten zu BC61 und BC44 zu analysieren und für eine umfassende Charakterisierung zu nutzen. Zudem sollen die so generierten Daten mit öffentlich zugänglichen Expressionsdaten anderer Arbeiten verglichen werden.

Um alle relevanten Chromosomenaberrationen zu identifizieren, wurden die Daten der aCGH-Untersuchung nunmehr im Detail ausgewertet und miteinander verglichen. Mit den aCGH-Daten ist es außerdem möglich, die Kopienzahlveränderungen einzelner Gene zu ermitteln und abzuschätzen, inwieweit sie einen Einfluss auf die Expression haben könnten. Dazu wurden die Ergebnisse der aCGH-Array-Analyse von BC61 mit den Daten der RNA-Expression verglichen. Weiterhin wurden die Daten aus der Expressionsanalyse von BC61 denen der sechs öffentlich zugänglichen Expressionsdatensätze gegenübergestellt. Auch die öffentlich zugänglichen Daten wurden untereinander verglichen, um Gene zu identifizieren, die in den Datensätzen regelmäßig differentiell exprimiert werden und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit haben eine generelle Rolle im UC zu spielen.

Auf diese Art und Weise sollten so die Eigenschaften von BC44 und BC61 definiert werden und Gene identifiziert werden, die in Zukunft, u.a. an den beiden Zelllinien, genauer untersucht werden könnten. Kurz zusammen gefasst waren die Ziele dieser Arbeit also:

1. Eine molekulargenetische Analyse beider Zelllinien mit Hilfe der Karyotypisierungen, aCGH- und Expressionsdaten.
2. Die Identifikationen von Genen, die sowohl in BC44, BC61 als auch in öffentlichen zugänglichen Untersuchungen gleichsinnig verändert sind und zur Pathogenese vieler UC beitragen könnten.

## **6 Material und Methoden**

### **6.1 Ethikvotum**

Am 3.5.2004 wurde ein Ethikvotum mit der Studiennummer 2372 an Herrn Dr. Seifert für die Anlage und Charakterisierung von Tumorprimärkulturen, aus denen die hier analysierten Zelllinien stammen, in der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität im Rahmen der ethischen und rechtlichen Beratung vergeben.

### **6.2 Zelllinien und Zellkultur**

Die Zelllinien BC44 und BC61 wurden 2004 und 2006 im urologischen Forschungslabor der Heinrich-Heine-Universität etabliert und 2012 von A. Koch et al näher beschrieben [49]. Beide Zelllinien stammen aus Tumorgewebe, das in der Urologischen Klinik Düsseldorf bei TUR-BT gewonnen wurde. Beide Zelllinien werden auf einer Kollagen IV Matrix in Epilife Medium kultiviert; dem 0,25 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor, 12.5 µg/ml bovine pituitary Extrakt, 1% nicht-essenzielle Aminosäuren (Invitrogen, Darmstadt, Germany), 1% ITS mix (Invitrogen, Darmstadt, Germany), 3 mM Glycin und 10% Fibroblasten Mediumüberstand zugegeben werden.

#### **6.2.1 BC44**

BC44 wurde 2004 aus Tumorgewebe einer Patientin etabliert. Es handelte sich um den exophytischen Anteil eines gering differenzierten muskelinvasiven High-Grade UC (pT4 G3). Die koloniebildenden Zellen wachsen in Kultur einlagig in einer epithelialen Struktur, in der Zellgrenzen und intrazelluläre Strukturen kaum sichtbar sind.

#### **6.2.2 BC61**

2006 wurde aus einem mäßig differenzierten, papillären Tumor (pTa G2) eines männlichen Patienten BC61 etabliert. Die Zellen wachsen wie BC44 einlagig. In mäßig stark bewachsenden Zellkulturflaschen bilden sich Kolonien, die mehrere hundert Zellen umfassen. In der Mitte dieser Kolonien sind die Zellen klein und dicht gepackt. Am Rand sind die Zellen größer und zeigen eine deutliche Migrationsfront. In dicht bewachsenen Kulturen finden sich stark vergrößerte Zellen mit Meganuklei. Die Anzahl solcher Zellen steigt nach Zugabe von Kalzium, dass eine Differenzierung der Zellen auslösen kann.

#### **6.2.3 Primäre Urothelzellen**

Primäre Urothelzellen (UP) wurden aus gesunden Ureteren gewonnen und dienen der RNA-Expressionsanalyse als Normalprobe. Diese Ureteren stammen aus Nephrektomien der Urologischen Klinik Düsseldorf. Kultiviert werden sie in Keratinozyten Serum freiem Medium (KSFM) mit 25 µg/ml Rinderhypophysen-Extrakt und 2,5 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor[50].

### **6.3 Extraktion von DNA und RNA**

Die gesamte genomische DNA und RNA wurden nach dem jeweiligen Standardprotokoll aus subkonfluenten Zellkulturen mit Hilfe des DNA Midi Kits bzw. RNA Mini oder Micro Kits (Qiagen) isoliert.

### **6.4 Zytogenetische Charakterisierung - Spektrale Karyotypisierung**

Die nahezu konfluenten Zellen von BC44 und BC61 wurden für die Darstellung der Chromosomen mit 0,2 µg/ml Colcemid (KaryoMAX® Colcemid® Solution, GibCo, Germany) bei 37°C für 0,5 - 2 Stunden inkubiert. Mit einer 0,05% Trypsin-; 0,02% EDTA-; Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (Cytogen, Sinn, Germany) wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurden sie für 30 Minuten mit einer hypotonischen Lösung (0,0075 M KCl) behandelt und mit einer Methanol-Essigsäurelösung (3/1,v/v) fixiert. Diese Lösung wurde dann auf eine eisgekühlte feuchte Platte gegeben und an der Luft getrocknet. Die Giemsa-Färbung wurde mit Trypsin und Giemsa (GTG-Färbung) nach dem Standard-Protokoll durchgeführt. Das digitale Karyotypisierungssystem (IKAROS, MetaSystems, Germany) wurde für die Analyse der Chromosomenfärbung genutzt. Mit dem SkyPaint™ DNA Kit und einem Spektral-Karyotypisierungssystem wurde die spektrale Karyotypisierung nach dem Herstellerprotokoll (Applied Spectral Imaging, Israel) durchgeführt [51]. Im Detail wurden 20 Metaphasen von BC61 und BC44 analysiert. Nur chromosomale Veränderungen, die in allen Metaphasen vorhanden waren, wurden in den jeweiligen Karyotyp aufgenommen. Der Karyotyp wurde nach dem Internationalen System für menschliche zytogenetische Nomenklatur dargestellt [52]. Die schematischen Darstellungen der Karyotypen wurden mit dem zytogenetischen Daten-Analyse-System (CyDAS) erzeugt [53].

### **6.5 Durchführung und Auswertung von Array komparativer genetischer Hybridisierung und Expressionsmicroarrays**

Die aCGH (Array komparative genetische Hybridisierung) stellt viele Formen chromosomaler Aberrationen dar, besonders Zugewinne oder Verluste genetischen Materials. Ein Verlust wird als Deletion bezeichnet und ein Zugewinn als Amplifikation. In dieser Arbeit wird weiter zwischen Deletionen, homozygoten Deletionen, Zugewinnen und Amplifikationen unterschieden. Zugewinne kommen dabei durch Vermehrung von ganzen Chromosomen oder Chromosomenarmen zustande, daher ist die Zunahme der Genkopienzahl begrenzt (1-3 Kopien); bei Amplifikationen sind kürzere Abschnitte vermehrt, wodurch sehr viel höhere Zunahmen möglich sind.

Um die Aberrationen darzustellen, wird bei der aCGH die DNA des zu untersuchenden Materials mit der DNA von gesundem Gewebe, üblicherweise von Lymphozyten, verglichen. Man sollte darauf achten, dass beide den gleichen Genotyp haben, da sonst Veränderungen auf den X und Y Chromosomen nicht dargestellt werden können. Als nächstes werden die Zellen in der Mitosephase mittels Colchicin fixiert und die DNA aus den Zellen extrahiert. Die Nick-Translation ist ein Verfahren,

bei der die DNA geschnitten und anschließend zur späteren Detektion mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird [54], üblicherweise mit dem roten Cyanin 5 (Cy5) und dem gelb-grünen Cyanin 3 (Cy3). Als nächstes wird die DNA auf einem Microarray-Chip hybridisiert. Dieser Chip ist ein Objektträger mit vielen tausend Oligonukleotidsonden, denen einzelne Abschnitte des Genoms über das gesamte menschliche Genom hinweg zugeordnet werden können. Ein Laser misst letztendlich die Fluoreszenz der einzelnen Oligonukleotidsonden. Ein Zugewinn von genetischem Material in der Probe äußert sich im Vergleich der beiden Farbstoffe als stärkeres Fluoreszenzsignal und ein Verlust von genetischem Material als schwächeres Signal.

Die aCGH Untersuchung von BC61 und BC44 wurde vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der HHU Düsseldorf durchgeführt. Dabei wurden 60mer DNA-Oligonukleotid-Sonden mit einem medianen Gesamtsondenabstand von 13 kb (SurePrint G3 Human CGH Microarray 180k, Agilent Technologies, Palo Alto) verwendet. Dabei wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt (Protocol 6.2.1, December 2010, Agilent Technologies). Die Hybridisierungsmuster wurden mit einem Microarray-Scanner (DNA Microarray Scanner With SureScan High-Resolution Technology, Agilent) ausgelesen, mit einem Array-Funktions-Extraktionsprogramm (Feature Extraction Software 10.7.1.1, Agilent) und der Datenauswertungssoftware von Agilent verarbeitet (Genomic workbench 6.5, Agilent). Diese Gensequenzanalyse basiert auf dem *Human Genome Browser hg19* [55]. Als Grundeinstellung dient der ADM-2 Algorithmus mit einem Threshold von 6,0. Zur Definition von Deletionen, Zugewinnen, homozygoten Deletionen und Amplifikationen dient das zur Basis 2 logarithmierte Cy5/Cy3-Fluoreszenzverhältnis ( $\log_2ratio$ ). Um aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale die Kopienzahländerung ( $K$ ) zu errechnen, nutzt man folgende Formel:

$$K = \log_2ratio$$

Im Normalfall gehen wir von einem diploiden Chromosomensatz aus. Wenn wir in beiden Proben zwei Chromosomensätze haben, entspricht dies einem Verhältnis von  $\frac{2}{2}$ . Daraus errechnet sich:

$$K = \log_2\left(\frac{2}{2}\right) = 0$$

Demnach wäre  $K = 0$ , da keine Veränderung der Kopienzahl vorliegt. Haben wir einen heterozygoten Verlust, sprich nur noch ein Allel ist vorhanden, entspricht dies:

$$K = \log_2\left(\frac{1}{2}\right) = -1$$

Beim homozygoten Verlust sind beide Allele verloren gegangen, was für die Berechnung folgendes bedeutet:

$$K = \log_2\left(\frac{0}{2}\right) \approx -\infty$$

Auf der Seite der Zugewinne würde ein zusätzliches Allel wie folgt berechnet werden:

$$K = \log_2 \left( \frac{3}{2} \right) \approx 0,59$$

Bei einem Zugewinn von zwei Allelen für einen diploiden Chromosomensatz:

$$K = \log_2 \left( \frac{4}{2} \right) = 1.$$

Für die Definition der Chromosomenaberration in dieser Arbeit gilt es jedoch weitere Faktoren zu berücksichtigen. BC44 und BC61 haben sehr heterogene Chromosomensätze. Beispielsweise hat BC61 sechs Kopien von Chromosom 20 und nur zwei Kopien von Chromosom 9, ist aber im Durchschnitt als tetraploid anzusehen. Deshalb gilt für die Analyse der aCGH-Daten in dieser Arbeit ein Schwellenwert von  $K \geq 2$  für eine Amplifikation. Der Schwellenwert für die Deletionen und Zugewinne wurden so gesetzt, dass einerseits von einer relativ starken Aberration auszugehen ist, andererseits aber nicht zu viele Sonden mit weniger starken Veränderungen verloren gehen.

- Deletion:  $K < -0,5$
- Homozygote Deletion:  $K \leq -1$
- Zugewinn:  $K > 0,5$
- Amplifikation:  $K \geq 2$

Eine wichtige zusätzliche Bedingung für die homozygoten Deletionen und Amplifikationen ist, dass mindestens fünf nebeneinander liegende Sonden den Schwellenwert überschreiten bzw. unterschreiten müssen, um mögliche Artefakte der Messung auszuschließen. Somit gilt ein Gen erst dann als homozygot deletiert, wenn es mindestens fünf nebeneinander liegende Sonden mit einer Kopienzahl von  $< -0,5$  für das Gen gibt. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede feststellen zu können, wurden die Gene, die sowohl in BC44 als auch in BC61 die Kriterien einer signifikanten Veränderung erfüllen, gegenübergestellt und mit einander verglichen. Außerdem wurden alle relevanten Ergebnisse der aCGH-Auswertung mit den relevanten Daten der Expressionsanalyse der öffentlich zugänglichen Daten und denen von BC61 verglichen.

## 6.6 Gen Expressionsanalyse

In dieser Arbeit wurde die RNA-Expression von BC61 mittels der DNA-Microarray Methode gemessen. Diese wurde im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der HHU Düsseldorf durchgeführt.

Konkret wurde hier RNA aus primären Urothelzellen (UP236) mit der RNA von BC61 verglichen. Zuerst wurde die Integrität der zu untersuchenden RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer geprüft. Dabei hat sich gezeigt, dass alle Proben dieser Untersuchung von guter Qualität sind und eine RNA Integritätszahl von zehn (RIN10) haben. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch per NanoDrop™ quantifiziert. Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA), antisense RNA (aRNA),

Biotinylierung und Markierung mit Streptavidin/Phycoerythrin der aRNA wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (3' IVT Express Kit; Affymetrix, Inc.). Im Detail wurden 100 ng RNA in cDNA umgewandelt, dann per in-vitro-Transkription zu aRNA umgeschrieben. Nach der Fragmentierung der biotinylierten aRNA wurde mit Streptavidin/Phycoerythrin Konjugat angefärbt und auf „Human Gene Expression Microarrays“ von Affymetrix PrimeView™ für 16 Stunden bei 45°C hybridisiert. Auf den verwendeten Microarrays befinden sich 49.396 verschiedene Sonden, die mit Hilfe eines Lasers ausgelesen wurden. Die so erzeugten Affymetrix CEL Daten wurden mit der GenSpring GX Software (Version 12.5, Agilent Technologies) ausgewertet. Um die Variabilität zwischen den Sonden zu reduzieren, wurden die Signal-Intensitäten aller Sonden nach der Quantil-Normalisierungs-Methode durch den Algorithmus des *Robust Multi-array Average* (RMA) angeglichen [56]. Zuletzt wurden in der Datenvorbehandlung die Signalintensität aller Proben mittels Nulllinien Transformation auf den Median angeglichen. Um Fehler zu minimieren, wurden jeweils vier unabhängig präparierte RNA-Proben von UP236 und BC61 untersucht, die in der Auswertung wieder in zwei Gruppen zusammengefasst wurden. Damit ein Fluoreszenzsignal zur weiteren Analyse zugelassen wird, muss es das Hintergrundrauschen übertreffen und zudem in allen vier Replikaten in mindestens einer der beiden Hauptgruppen (UP236 und BC61) vorkommen. Zudem muss ein Fluoreszenzsignal einer Sonde innerhalb der 20. und 100. Perzentile der Rohsignal-Verteilung detektiert werden, um zur weiteren Untersuchung zugelassen zu werden.

Die differentielle Genexpression wurde statistisch mit dem moderaten t-Test berechnet. Die so errechneten p-Werte wurden anschließend noch für multiples Testen nach Benjamini-Hochberg adjustiert. Als Grenzwert für die Signifikanz wurde ein adjustierter p-Wert von  $<0,01$  gewählt.

Zusätzlich wurden die erzeugten Daten wie die öffentlichen Expressionsdaten ausgewertet, also mit einem moderaten t-Test mit dem R Packet Limma. Anders als bei den öffentlichen Expressionsdaten, wurden hier die p-Werte jedoch auf multiples Testen mit der Bonferroni Methode adjustiert, da es sich um biologische Replikate einer einzelnen Probe handelte. Als signifikant gelten Gene mit einem adjustierten p-Wert von  $<0,05$ . Die so gefundenen Gene wurden anschließend mit den anderen Ergebnissen tabellarisch über Microsoft Excel verglichen.

## **6.7 Analyse öffentlicher Genexpressionsdatensätze**

Von den Internet Seiten *Gen Expression Omnibus* (GEO) und *European Bioinformatics Institute* (EBI) wurden sechs Genexpressionsdatensätze heruntergeladen [14, 57-62]. Alle sechs Datensätze vergleichen die Genexpression von urothelialen Karzinomen und normalen Urothelzellen. Bei allen Daten handelt es sich um bereits normalisierte Werte. Es wurden teilweise unterschiedliche Arrayplattformen genutzt. Der Datensatz von Lindgreen et al [14] unterscheidet sich von den anderen, indem er noch durch ein Zwei-Farbsystem analysiert wurde und weniger Sonden aufweist.

Dennoch wurde der Datensatz für die Analyse gewertet, da die Ergebnisse mit den anderen Daten gut übereinstimmen. Weitere Angaben zu den Datensätzen finden sich in *Tabelle 1*.

<u>Autor</u>	<u>Manguel et al</u> [60]	<u>Leem et al</u> [61, 62]	<u>Dyrskjot et al</u> [59]	<u>Lindgren et al</u> [14]	<u>Stransky et al</u> [14, 58]	<u>Hansel et al</u> [57]
<u>Geo Acession</u>	GSE7476	GSE13507	GDS1479	GSE19915	E-TABM-147	GSE24152
<u>Proben</u> <u>(Normal/Tumor)</u>	12 (3/9)	265 (68/188)	60 (9/51)	156 (12/144)	57 (5/52)	17 (7/10)
<u>Plattform</u>	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (HG-U133_Plus_2)	Illumina human-6 v2.0 expression beadchip	Affymetrix Human Genome U133A Array (HG-U133A)	Swegene Human 27K RAP UniGene188 array	Affymetrix HG-U95A and HG-U95Av2 microarrays	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Hs_ENTREZG_10)

**Tabelle 1: Öffentliche Genexpressionsdatensätze, die in dieser Arbeit genutzt wurden.**

*Geo Accession*: Identifikationsnummer der Datensätze; *Proben*: Anzahl der Normal und Tumortumoren. *Plattform*: spezifische Arrayplattform.

Um die differentielle Genexpression zu ermitteln wurde ein moderater t-Test mit dem *R* packet *Limma* durchgeführt [63, 64]. *R* ist eine freie Programmiersprache für statistische Berechnungen und Grafiken. Für diese Programmiersprache gibt es eine große Anzahl an öffentlichen Programm-Paketen, wie beispielsweise *Limma*, die eine statistische Auswertung von Daten ermöglichen. Jeder Datensatz wurde zunächst für sich analysiert. Dazu wurden die Daten eines Datensatzes in Tumorgewebe und Normalgewebe aufgeteilt und aus den unterschiedlichen Gruppen der p-Wert berechnet. Die so errechneten p-Werte wurden nicht für multiples Testen korrigiert, um eine höhere Anzahl an Genen zu erhalten. Als nominaler p-Wert wurde die Grenze bei  $<0,05$  definiert. Alle Gene mit einem p-Wert  $>0,05$  wurden für das weitere Verfahren nicht mehr berücksichtigt. Mithilfe des *Fold Changes* konnten die einzelnen Gene nach gesteigerter und verminderter Expression sortiert werden. Vermindert exprimiert sind Gene dann, wenn der logarithmierte *Fold Change* negativ ist. Der *Fold Change* ist negativ, wenn die gemessene Expression der Kontrolle geringer als die der Probe ist. Analog wurde auf diese Weise auch der p-Wert für pTa-Tumore gegen Normalgewebe,  $\geq$ pT2-Tumore gegen Normalgewebe und pTa-Tumore gegen  $\geq$ pT2-Tumore berechnet.

Die in jedem Datensatz identifizierten Gene wurden dann im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010 gegenübergestellt. Einen ersten Eindruck über die Daten sollen dabei die Top 100 vermindert und Top 100 gesteigert exprimierten Gene liefern. Das Ranking der Top 100 ergibt sich aus den jeweils hundert größten *Fold Change* Werten.

Zur weiteren Analyse der insgesamt sechs öffentlich zugänglichen Expressionsdaten wurde geprüft, welche Gene immer wieder gleichgerichtet verändert vorliegen. So wurden die Gene, die in mindestens 60% der Datensätze einen p-Wert  $<0,05$  haben und die in allen Datensätzen in die gleiche Richtung exprimiert werden, als typisch differentiiell exprimiert im UC gewertet. Die so erzeugten Listen von Genen wurden dann wiederum für Vergleiche mit anderen Ergebnissen genutzt.

## 6.8 Vergleich der aCGH-Daten mit den öffentlichen Expressionsanalysen

Alle Gene, die in den einzelnen Untersuchungen als relevant betrachtet wurden, wurden miteinander verglichen. Gene, die sowohl in den aCGH-Daten als auch in den öffentlichen Expressionsdaten und in den Expressionsdaten von BC61 aufgefallen sind, werden als relevant für das UC gewertet. Dabei gab es mehrere Möglichkeiten zu vergleichen. Es wurde unter anderem geschaut, ob die chromosomalen Veränderungen in BC61 auch in den Expressionsdaten von BC61 wiederzufinden sind. Zudem konnten die dabei gefundenen Übereinstimmungen mit den öffentlichen Datensätzen abgeglichen werden. Um dies fehlerfrei und rasch zu bewerkstelligen, wurden alle relevant veränderten Gene aus den einzelnen Daten in eine Excel-Tabelle überführt und mit Hilfe der Funktion „=WENN(ZÄHLENWENNS(X:X;Y1)>0;"1";"0")“ verglichen.

## 6.9 Funktionelle Annotation mit der DAVID Datenbank

Die Internetseite DAVID erreicht man unter dem Link <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>. Sie erlaubt bis zu 3.000 Gene gleichzeitig nach spezifischen Zusammenhängen zu untersuchen. Dabei kann man verschiedene Optionen auswählen. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Funktion *Functional Annotation* genutzt. Hier werden die *Annotations*, also Informationen bezüglich des jeweiligen Gens bzw. des Genclusters, die man ausgewählt hat, in einer Tabelle zusammengefasst. Diese Tabellen kann man direkt online betrachten oder als Excel-Datei herunterladen. Im Detail funktioniert DAVID, indem es auf viele Online-Datenbanken zurückgreift, auf denen Informationen (*Annotation*) zu Genen und Geneinheiten zusammengefasst sind. Insgesamt handelt es sich um 40 verschiedene Datenbanken. Die Datenbanken, die in dieser Arbeit zur Analyse der Daten ausgewählt wurden sind: SP\_PIR\_KEYWORDS; UP\_SEQ\_FEATURE; GOTERM\_BP\_FAT; GOTERM\_CC\_FAT; GOTERM\_MF\_FAT; CHROMOSOME; CYTOBAND; KEGG\_PATHWAY; INTERPRO; PIR\_SUPERFAMILY; SMART.

Alle Gene, die sich als zusammenhängend darstellen, werden in Terme zusammengefasst. Diese Terme finden sich auch in der ausgegebenen Tabelle wieder. Mit dem *EASE Score*, einem abgewandelten konservativeren exakt Test nach Fischer, wird berechnet, ob es mehr als Zufall ist, dass Gene einer bestimmten Gruppe in der Liste vorkommen. Mit dem folgendem Beispiel soll dies näher erläutert werden: Man nehme an, dass das menschlichen Genom 30.000 Gene besitzt. Unter diesen sollen sich 40 Gene finden, die in den p53-Signalweg involviert sind. Durch eine Expressionsanalyse hat man eine Liste von 300 Genen erzeugt, in welcher sich 3 Gene finden, die im p53-Signalweg involviert sind. An dieser Stelle kommt nun die Frage auf, ob es nur Zufall ist, dass von 300 Genen drei Gene Einfluss auf p53 haben. Um dies zu beantworten berechnet die Internetseite mit Hilfe des abgewandelten exakt Test nach Fischer, ob drei von 300 Genen bei einem Hintergrund von 40/30.000 Genen ein Zufall sein kann. In diesem konkreten Beispiel wäre der p-Wert = 0,008 und damit kein Zufall. Dies würde für das Beispiel bedeuten, dass der p53-Signalweg mit hoher

Wahrscheinlichkeit verändert ist. Zusätzlich werden die Ergebnisse noch auf multiples Testen adjustiert. In der Ausgabe der Daten kann man mehrere mögliche Formen der Adjustierung wählen. In dieser Arbeit wurden nur die Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 nach der Benjamini Adjustierung als relevant angesehen. Weitere Angaben finden sich auf der DAVID-Website.

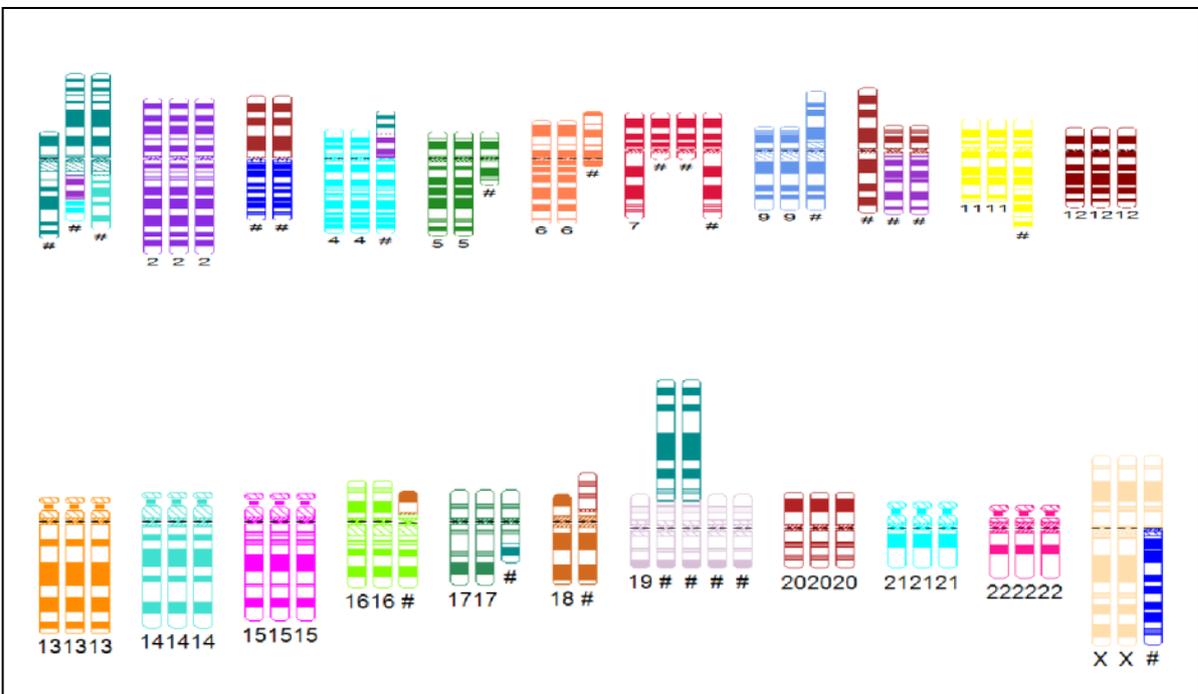
## 7 Ergebnisse

### 7.1 Spektrale Karyotypisierung

Die spektrale Karyotypisierung von BC44 und BC61 ermöglicht einen ersten Einblick in die Beschaffenheit des Genoms und stellt erste Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Zelllinien dar. Die Karyotypisierung ist eine etablierte Methode zur Darstellung der Chromosomen. Im Unterschied zur aCGH erkennt man in der Karyotypisierung nur größere Deletionen oder Amplifikationen, dafür aber strukturelle Veränderungen wie größere Insertionen oder Translokationen.

#### 7.1.1 BC44

Der weibliche Karyotyp von BC44 besteht aus 64-68 Chromosomen und ist damit am ehesten triploid. Wie die *Abbildung 4* zeigt, finden sich im Genom von BC44 ausgeprägte Veränderungen, die typisch für genetisch instabile muskelinvasive Tumoren sind. Im folgenden Abschnitt wird detailliert der Karyotyp von BC44 beschrieben:



**Abbildung 4:** Karyotypisierung BC44. Graphische Darstellung der spektralen Karyotypisierung von BC44. Die Chromosomen sind entsprechend beschriftet. Chromosomen mit # weisen eine Aberration auf.

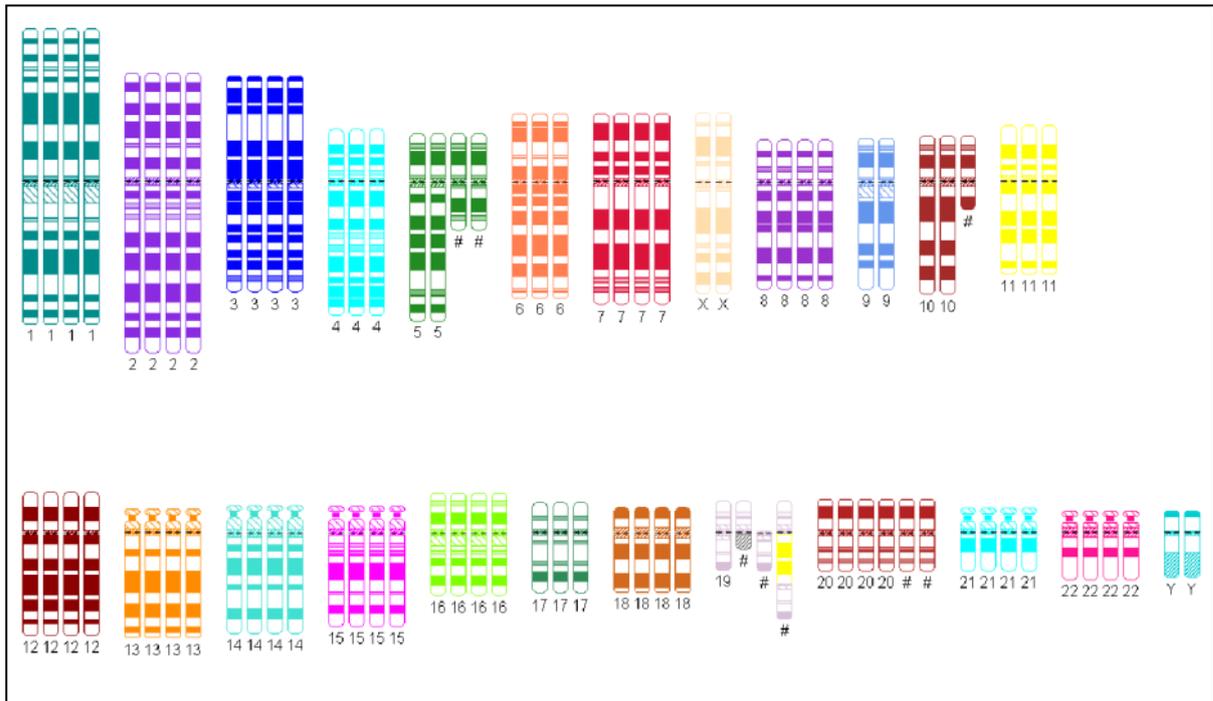
Das X-Chromosom hat zwei homologe Chromosomen und ein dizentrisches Chromosom, welches sich aus Chr3q19 und ChrXp10 zusammensetzt. Chromosom 1 weist verschiedene teilweise nicht balancierte Translokationen und Deletionen auf. Wir finden drei verschiedene Formen von

Chromosom 1. Erstens ein Translokationschromosom von Chr14q11 an Chr1q21, zweitens findet sich an Chr1q21 eine Translokation von Chr8q11-q21, an dem wiederum Chr4p14-pter angehängt ist, und drittens ein Chromosom mit Deletion von Chr1p22. Chromosom 4 hat zwei homologe Chromosomen Paare und ein Derivat. Das Derivat besteht aus dem langen Arm von Chromosom 4; am kurzen Arm hängt ab Chr4p11 das Chr8q11-q21, an dem wiederum Chr1q32-1qter transloziert ist. Das triploide Chromosom 5 besteht aus zwei homologen Paaren und einem Isochromsomen i(5)(p10), was einer Deletion von 5q entspricht. Auch Chromosom 6 besteht aus zwei homologen Paaren und einem dritten veränderten Chromosom 6. Das Derivat setzt sich aus Chr6q13-Chr6p22 und Chr6p12-p22 zusammen. Das Chromosom 7 ist tetraploid mit einem normalen homologen Paar und einem homologen Paar, das ab Chr7q11 deletiert ist. Chromosom 8 ist als solches nicht mehr vorhanden. Es finden sich u.a. Reste am Chromosom 1 und Chromosom 4. Chromosom 9 ist trisom und besitzt zwei homologe Chromosomen 9. Das dritte hat eine Insertion am Zentromer beginnend ab Chr9p10. Das Chromosom 10 ist stärker verändert. Ähnlich wie die Insertion von Chromosom 9 findet sich ein Chromosom mit einer Insertion ab Chr10q10 anstelle des kurzen Arms. Zudem findet sich ein homologes Paar von Chromosom 10. Es sind dizentrische Chromosomen aus Chr3q10 und Chr10q10, zudem findet sich eine Translokation von Chr8q11 an Chr10q11. Neben einem homologen Paar von Chromosom 11 weist das dritte Chromosom eine Duplikation von Chr11q23-q13 auf. Auch Chromosom 16 hat ein homologes Paar und zusätzlich eines mit einer Translokation von Chr18p11 an der Stelle Chr16p11. Chromosom 17 hat zwei homologe Chromosomen und ein Chromosom 17 mit einer Translokation von Chr1q21 auf Chr17q42. Das Chromosom 18 ist diploid. Es besteht aus einem normalen Chromosom 18 und einem mit einer Translokation an der Stelle Chr18p11.2 von Chr20q11. Das Chromosom 19 ist pentaploid, drei homologe Chromosomen 19 sind unverändert und die beiden anderen Chromosomen besitzen jeweils eine Translokation von Chr1q21 an Chr19p13. Die Chromosomen 2, 12, 13, 14, 15, 20, 21 und 22 sind alle triploid und weisen im Karyogramm keine weiteren Veränderungen auf.

### **7.1.2 BC61**

BC61 hat einen in etwa tetraploiden Chromosomensatz mit 86 Chromosomen, mit jeweils zwei X und zwei Y Gonosomen. Die Chromosomen 1, 2, 3, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21 und 22 sind alle tetraploid, weisen jedoch keine weiteren Veränderungen auf. Chromosom 4, 6, 11 und 17 liegen triploid vor. Chromosom 20 ist mit sechs Kopien vertreten. Chromosom 5 hat zwei homologe unveränderte Chromosomen und zwei mit einer Insertion von Chr5p10 am Zentromer, was der Deletion des langen Arms entspricht. Das Chromosom 9 besteht aus einem homologen Paar Chromosomen, genau wie X und Y. Starke Veränderung findet man auf Chromosom 19. Es besteht aus vier Chromosomen mit einem normalen Chromosom, einem bei dem sich ab Chr19p11 eine Deletion findet, einem Chromosom 19 mit dem Zugewinn eines Chromosoms ungewisser Herkunft an

der Stelle Chr9q11 und einem Chromosom 19 mit einer Insertion von Chr11q13-q23. Das Chromosom 10 ist durch ein homologes Paar und ein zusätzliches Chromosom mit einer Deletion ab Chr10q21 vertreten.



**Abbildung 5: Spektrale Karyotypisierung BC61.**

Graphische Darstellung der spektralen Karyotypisierung von BC61.

Die Chromosomen sind entsprechend beschriftet. Chromosomen mit # weisen Aberration auf.

### 7.1.3 Vergleich der Karyogramme von BC61 und BC44

Bereits im Genotyp unterscheiden sich die beiden Zelllinien, abgesehen davon dass BC61 einen männlichen und BC44 einen weiblichen Genotyp hat. Im Gegensatz zu BC44 zeigt das Karyogramm von BC61 weniger Veränderungen und wirkt homogener. BC61 ist weitgehend tetraploid wohingegen BC44 eher als pseudotriploid anzusehen ist. In BC61 sind die Chromosomen 5, 9, 10, 19 und 20 von strukturellen Aberrationen betroffen. BC44 hingegen zeigt deutliche Aberrationen in 15 Chromosomen. Interessanterweise finden sich alle Veränderungen von BC61 auch in BC44, abgesehen von der Überrepräsentation von Chromosom 20. Darunter findet sich auch in beiden Zelllinien das Isochromosom i(5)(p10).

## 7.2 Komparative genetische Hybridisierung

Die Auswertung der aCGH-Daten wurde mit dem Programm *Agilent Genomic Workbench* durchgeführt. Dabei wurde eine Form des Ergebnisberichts gewählt, der mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2010 tabellarisch bearbeitet werden konnte. Als Report stehen im Programm von Agilent zwei Varianten zur Auswahl:

1. *Probe based report*: jede einzelne Sonde mit ihrem Messwert. Dient zur Darstellung einzelner Zugewinne und Deletionen.

2. *Interval based report*: Zusammenliegende Sonden mit ähnlichen Messwerten als Zusammenstellung. Dies eignet sich z.B. zur Darstellung von Amplifikationen und homozygoten Deletionen.

### **7.2.1 Probe based report**

In diesem Report werden alle Sonden mit ihren Messwerten einzeln aufgelistet. Diese Auswertung kann dafür genutzt werden Deletionen und Zugewinne einzelner Gene ausfindig zu machen. Neben der Information über die logarithmierte Signalintensität, finden sich auch die berechneten Kopienzahländerungen. Diese werden vom Programm mit dem Algorithmus ADM-2 aus der Signalintensität berechnet (siehe Kapitel 6.5). Das Programm unterscheidet zwischen Deletionen mit negativer Kopienzahländerung und Amplifikationen mit positiver Kopienzahländerung. Zudem werden Information über die Proben ID, Lokalisation (Chromosom, Cytoband, Start, Stop) und das zugehörige Gen aufgeführt.

#### **7.2.1.1 BC44**

Zuerst wurden die Ergebnisse des Y Chromosoms entfernt, denn BC44 hat einen weiblichen Genotyp und damit kein Y Chromosom. Alle so entfernten Sonden, zeigten wie zu erwarten eine Deletion. Danach bleiben 135.281 Sonden mit Veränderungen übrig, darunter 63.782 Sonden mit Zugewinnen und 71.499 Sonden mit Verlusten. Der kleinste Wert der Zugewinne ist 0,011 und der größte Wert 2,511. Die schwächste angegebene Deletion hat einen Wert von -0,0188 und die stärkste von -5,638. Den Sonden können 78.440 kodierende Genabschnitte zugeordnet werden. Eine Sonde besteht aus rund 60 Nukleotiden, ein Gen kann im Extrem aus Millionen von Basenpaaren bestehen, somit können mehrere Sonden auf einem Gen liegen. Nach dem Entfernen von mehrfach aufgelisteten Genen verbleiben daher noch 14.649 unterschiedliche Gene.

Mit den im Abschnitt 6.5 definierten Kriterien für Deletionen findet man 3.576 Sonden, die einer Deletion entsprechen. Davon verteilen sich 2.166 Sonden auf 307 Gene (*Tabelle 32*). 1.884 Sonden bleiben übrig, wenn man die Kriterien der homozygoten Deletion anwendet, ohne zu berücksichtigen, dass fünf nebeneinander liegende Sonden  $K < -1$  sein müssen. Davon befinden sich wiederum 1.184 Sonden auf 132 Genen. Für die Zugewinne erhält man 15.546 Sonden, denen 8.623 Genen zugeordnet werden können. Unter diesen finden sich 2.001 unterschiedliche Gene (*Tabelle 31*). Die Kriterien einer Amplifikation erfüllen, ohne die Einschränkung, dass fünf Sonden nebeneinander liegen, 124 Sonden, von denen 72 auf Genen zu finden sind. Von diesen bleiben, mit der Einschränkung, 19 einzelne amplifizierte Gene übrig.

#### **7.2.1.2 BC61**

Es werden 95.923 Sonden als verändert aufgelistet. Davon zeigen 8.524 Sonden einen Zugewinn und 87.398 eine Deletion. Als deletiert gelten 10.534 Sonden, davon liegen 1.089 auf Genen und 1.075 bleiben davon übrig, nachdem mehrfach aufgeführte Gene entfernt wurden (*Tabelle 29*). Darunter

erfüllen 165 Sonden die Kriterien einer homozygoten Deletion auf 29 einzelnen Genen (ohne das Kriterium der fünf direkt benachbarten Sonden). 4.141 Sonden weisen  $K > 0,5$  auf und es finden sich 2.464 Sonden auf kodierender DNA, wovon wiederum 552 einzelne Gene betroffen sind (*Tabelle 30*). 306 Sonden weisen die Kriterien einer Amplifikation auf, ohne das fünf Sonden direkt nebeneinander liegen. Davon verteilen sich 180 Sonden auf 49 unterschiedlichen Genen.

### 7.2.1.3 Interval Based Report

Der *Interval Based Report* ist quasi eine Zusammenfassung des *Probed Based Reports*. Hier werden benachbarte Sonden zusammengefasst, die eine ähnliche Kopienzahländerung aufzeigen. Daher eignen sich gerade diese Daten dazu, Amplifikationen und homozygote Deletionen zu identifizieren. Auch im *Interval Based Report* finden sich Angaben über die Lokalisation (Cytoband, Chromosom, Start, Stop), Gene Symbol, Gen-Beschreibung, Amplifikation, Deletion etc.

### 7.2.1.4 BC44

Unter den Kriterien der Deletion werden 124 Intervalle aufgelistet, in denen insgesamt 487 Gene betroffen sind. Die Kriterien einer homozygoten Deletion werden in 15 Genabschnitten erfüllt. Diese finden sich auf Chromosom 3, 7, 8, 9, 15 und X, wovon 187 Gene betroffen sind (*Tabelle 2 und 3*). Hierunter sind auch solche Abschnitte, auf denen keine Gene zu finden sind. Solche Regionen werden als „Gen-Wüsten“ bezeichnet.

Chr.	Cytoband	Start	Stopp	Anzahl Sonden	Amplifikation/Deletion
chr11	q13.2 - q13.3	68336631	70367700	125	2,51
chr3	p12.3	75959654	76218045	21	-3,62
chr7	q31.1	110310931	110421809	10	-1,29
chr8	p23.3-p21.2	176814	24168932	1369	-1,22
chr8	p23.3-p23.2	605784	6079761	329	-1,33
chr8	q11.21	50241670	51310838	54	-1,32
chr9	p21.3	21902814	21967607	6	-4,57
chr9	p21.3	21968041	22008655	6	-1,86
chr9	p21.3	23736783	23818045	7	-4,74
chr9	p21.3	23569089	23676057	7	-4,33
chr9	p21.3	23042305	23257394	8	-4,25
chr9	p21.3	22356407	22606381	10	-4,22
chr9	p21.3	21902814	23818045	83	-3,18
chr15	q11.1-q11.2	20432851	22558756	55	-1,00
chrX	q21.33	96343280	96449666	9	-2,32
chrX	q28	154783535	154908471	8	-2,05

**Tabelle 2: Homozygote Deletionen und Amplifikationen von BC44. Basierend auf den aCGH-Daten von BC44.**

In dieser Tabelle werden die einzelnen homozygoten Deletionen und Amplifikationen von BC44 mit ihrer Lokalisierung und Größe aufgelistet. Chr: Chromosom, Amplifikation/Deletion: Amplifikations- und Deletionswerte.

In BC44 sind 2.838 Gene zugewonnen. Die Kriterien einer Amplifikation werden lediglich auf Chr11q13.2-13.3 erfüllt; die Amplifikation beinhaltet 21 Gene (*Tabelle 2 und 3*). Diese Amplifikation hat eine Länge von 2.031.069 Basenpaaren (Bp) und wird durch 125 Sonden detektiert.

Alle Einzelheiten und auch die aufgelisteten Gene finden sich in den *Tabellen 2* und *3*. Im Durchschnitt sind die Amplifikationen und homozygoten Deletionen 2.395.712 Bp groß. Wie unterschiedlich die einzelnen Intervalle sind, kann man anhand der jeweiligen Sondenzahl sehen. Das kleinste Intervall (Chr9p21.3) wird von sechs Sonden umschrieben, das größte von 1.369 (Chr8). Interessant ist, dass das Programm manche homozygote Deletionen in Subregionen unterteilt. Dabei handelt es sich um die Deletion von Chr8p23.3-p21.2. Sie erstreckt sich von 176.814 bis 24.168.932. Von den insgesamt 1.369 Sonden werden 329 Sonden separat als homozygote Deletion von Chr8p23.3-p23.2 nochmals unterschieden. Hier liegt Start bei 605.784 und der Stopp bei 6.079.761. Ähnliches zeigt sich für das Chromosom 9.

Amplifikation		Homozygote Deletion							
CCND1	11q13	IMMP2L	7q31	KIAA1967	8p22	DEFB134	8p23.1	GATA4	8p23.1-p22
CTTN	11q13	GFRA2	8p21	LPL	8p22	DEFB135	8p23.1	LOC340357	8p23.1-p22
FGF3	11q13	C8orf58	8p21	LZTS1	8p22	DEFB136	8p23.1	CSMD1	8p23.2
MYEOV	11q13	FGF17	8p21	MIR383	8p22	DEFB4	8p23.1	DEFB1	8p23.2-p23.1
SAP53	11q13	NKX3-1	8p21	MSR1	8p22	ERI1	8p23.1	C8orf42	8p23.3
FGF19	11q13.1	SFTPC	8p21	MTMR7	8p22	FAM66A	8p23.1	ERIC1	8p23.3
CPT1A	11q13.1-q13.2	TNFRSF10A	8p21	MTUS1	8p22	FAM66B	8p23.1	KBTD11	8p23.3
GAL	11q13.2	TNFRSF10D	8p21	NAT2	8p22	FAM66D	8p23.1	MIR596	8p23.3
MRGPRD	11q13.2	XPO7	8p21	SGCZ	8p22	FAM66E	8p23.1	MYOM2	8p23.3
MRGPRF	11q13.2	EPB49	8p21.1	SOX7	8p22	FAM86B2	8p23.1	RPL23AP53	8p23.3
MRPL21	11q13.2	ADAM28	8p21.2	TUSC3	8p22	FAM90A10	8p23.1	ZNF596	8p23.3
ORAOV1	11q13.2	HR	8p21.2	VPS37A	8p22	FAM90A13	8p23.1	FBXO25	8p23.3
TPCN2	11q13.2	NKX2-6	8p21.2	ATP6V1B2	8p22-p21	FAM90A14	8p23.1	EGR3	8p23-p21
MTL5	11q13.2-q13.3	PDLIM2	8p21.2	TNFRSF10B	8p22-p21	FAM90A18	8p23.1	AMAC1L2	8p23-p22
MIR548K	11q13.3	SH2D4A	8p21.2	TNFRSF10C	8p22-p21	FAM90A19	8p23.1	BLK	8p23-p22
ANO1	11q13.3	SLC25A37	8p21.2	FGL1	8p22-p21.3	FAM90A20	8p23.1	C8orf12	8p23-p22
FADD	11q13.3	PIWIL2	8p21.3	ASAH1	8p22-p21.3	FAM90A5	8p23.1	FAM167A	8p23-p22
FGF4	11q13.3	BIN3	8p21.3	CNOT7	8p22-p21.3	FAM90A7	8p23.1	MTMR9	8p23-p22
IGHMBP2	11q13.3	BMP1	8p21.3	FGF20	8p22-p21.3	FAM90A8	8p23.1	DEFA5	8pter-p21
PPFIA1	11q13.3	CHMP7	8p21.3	PCM1	8p22-p21.3	FAM90A9	8p23.1	DEFA6	8pter-p21
SHANK2	11q13.3	CSGALNACT1	8p21.3	PDGFRL	8p22-p21.3	FUJ10661	8p23.1	DEFA3	8pter-p23.3
		DOK2	8p21.3	SLC7A2	8p22-p21.3	LOC157627	8p23.1	PSD3	8pter-p23.3
		ENTPD4	8p21.3	ARHGEF10	8p23	LOC349196	8p23.1	SNTG1	8q11-q12
		FAM160B2	8p21.3	CLN8	8p23	LOC392196	8p23.1	POLR3D	8q21
		FLJ14107	8p21.3	DEFA4	8p23	LONRF1	8p23.1	CDKN2A	9p21
		INTS10	8p21.3	DEFB103A	8p23	MCPH1	8p23.1	CDKN2B	9p21
		LGI3	8p21.3	DEFB103B	8p23	MFHAS1	8p23.1	ELAVL2	9p21
		MIR320A	8p21.3	DLGAP2	8p23	MIR124-1	8p23.1	DMRTA1	9p21.2
		MIR548I3	8p21.3	PINX1	8p23	MIR1322	8p23.1	CDKN2BAS	9p21.3
		NPM2	8p21.3	RP1L1	8p23	MIR597	8p23.1	C9orf53	9p21-p22
		NUDT18	8p21.3	DEFB130	8p23.1	MIR598	8p23.1	GOLGA6L6	15q11.2
		PEBP4	8p21.3	FAM86B1	8p23.1	MSRA	8p23.1	GOLGA8C	15q11.2
		PHYHIP	8p21.3	USP17L2	8p23.1	NEIL2	8p23.1	POTEB	15q11.2
		PPP3CC	8p21.3	AGPAT5	8p23.1	PPP1R3B	8p23.1	CXADR2	15q11.2
		R3HCC1	8p21.3	ANGPT2	8p23.1	PRAGMIN	8p23.1	LOC646214	15q11.2
		REEP4	8p21.3	C8orf74	8p23.1	TDH	8p23.1	LOC727924	15q11.2
		RHOBTB2	8p21.3	CLDN23	8p23.1	TNKS	8p23.1	NF1P1	15q11.2
		SLC18A1	8p21.3	DEFA1	8p23.1	T-SP1	8p23.1	OR4M2	15q11.2
		SLC39A14	8p21.3	DEFA10P	8p23.1	XKR5	8p23.1	OR4N3P	15q11.2
		SORBS3	8p21.3	DEFA1B	8p23.1	XKR6	8p23.1	OR4N4	15q11.2
		LOXL2	8p21.3-p21.2	DEFB104A	8p23.1	ZNF705D	8p23.1	BCL8	15q11-q13
		ZDHHC2	8p21.3-p22	DEFB104B	8p23.1	ZNF705G	8p23.1	DIAPH2	Xq21.33
		STC1	8p21-p11.2	DEFB105A	8p23.1	DEFB109P1	8p23.1	TMLHE	Xq28
		C8orf48	8p22	DEFB105B	8p23.1	DEFB109P1B	8p23.1		
		C8orf79	8p22	DEFB106A	8p23.1	SPAG11A	8p23.1		
		CTS5	8p22	DEFB106B	8p23.1	SPAG11B	8p23.1		
		DLC1	8p22	DEFB107A	8p23.1	NAT1	8p23.1-p21.3		
		EFHA2	8p22	DEFB107B	8p23.1	DFDT1	8p23.1-p22		

**Tabelle 3: Amplifizierte und homozygot deletierte Gene von BC44**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC44. In dieser Tabelle werden die einzelnen amplifizierten oder homozygot deletierten Gene mit ihrer Lokalisierung aufgelistet.

### 7.2.1.5 BC61

Es finden sich insgesamt 265 Intervalle mit Veränderungen. Davon sind 57 Amplifikationen und 208 Deletionen. Diese umfassen insgesamt 1.382 einzelne Gene. Von den 208 Deletionen erfüllen 18 die

Kriterien einer homozygoten Deletion, wovon 27 eindeutige Gene betroffen sind. Für 37 Intervalle gilt  $K > 0,5$  und sie enthalten 656 Gene. Als Amplifikationen finden sich acht Intervalle, die entweder auf Chromosom 11 oder 12 zu finden sind. Von diesen Amplifikationen sind 42 Gene betroffen (Tabelle 4-5). Die Amplifikationen verteilen sich in BC61 auf Chromosom 11 und Chromosom 12. Im Mittel haben sie eine Länge von 538.137 BP und werden durchschnittlich von 32 Sonden erfasst. Erwähnt werden muss, dass durch die Berechnung des Programms die Amplifikationen auf Chr.11q13.2-13.3 von Amplifikationen auf Chr.11 q13.3 getrennt wird, obwohl nur 61 Bp dazwischen liegen. Ähnliches gilt für weitere Amplifikationen und homozygote Deletionen, wie in den Tabellen 4 und 5 deutlich wird.

Die homozygoten Deletionen finden sich auf Chr. 1, 2, 3, 4, 9, 11 und X. Sie sind im Durchschnitt 196.657 Bp groß und damit kleiner als die Amplifikationen. So liegt der Mittelwert der Anzahl homozygot deletierten Sonden bei nur ca. 12,55. Sowohl die Amplifikationen als auch die Deletionen haben im Durchschnitt eine Kopienzahländerung von  $K = \pm 2,5$ .

Chr.	Cytoband	Start	Stopp	Anzahl Sonden	Amplifikation/Deletion
chr11	q13.2 -13.3	67768754	68492834	58	2,33
chr11	q13.3	68492895	70298431	106	2,33
chr11	q14.1	77303540	77386325	5	2,99
chr11	q14.1	80215689	80714883	12	2,47
chr11	q14.1	83277858	83429018	12	2,40
chr12	q15	69298660	69546488	10	2,42
chr12	q15	69546489	69970431	36	3,08
chr12	q15	69970432	70341007	22	2,42
chr1	q31.3-32.1	198618159	198817875	16	-1,03
chr2	q21.2	133194005	133355824	11	-2,52
chr3	q13.31	116229141	116831957	29	-1,09
chr3	p26.1	7086321	7236181	12	-1,00
chr3	p26.1	7236242	7639780	30	-1,00
chr3	p26.1	7668960	8306181	28	-1,00
chr4	q13.3	71162798	71283216	10	-1,25
chr9	p21.3	21282036	21409799	9	-2,99
chr9	p21.3	21454717	21512444	9	-4,71
chr9	p21.3	21520414	21708370	11	-2,99
chr9	p21.3	21708371	21872590	10	-3,99
chr9	p21.3	21902814	21967607	6	-4,53
chr9	p21.3	21968041	22009029	7	-1,92
chr9	p21.3	22086858	22356466	8	-2,99
chr9	q21.32	86276560	86309360	5	-3,80
chr9	q21.32	86309361	86468944	11	-2,36
chr11	p13	35941265	36043690	8	-3,94
chrX	q26.2	132513848	132570434	6	-3,52

**Tabelle 4: Homozygote Deletionen und Amplifikationen von BC61**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC61. In dieser Tabelle werden die einzelnen homozygoten Deletionen und Amplifikationen von BC61 mit ihrer Lokalisierung und Größe aufgelistet. Chr.: Chromosom, Amplifikation/Deletion: Amplifikations- und Deletionswerte.

Homozygote Deletion				Amplifikationen			
PTPRC	1q31-q32	KLHL9	9p22	ALDH3B1	11q13	ANO1	11q13.3
GPR39	2q21-q22	GKAP1	9q21.32	C11orf24	11q13	FADD	11q13.3
GRM7	3p26.1-p25.1	KIF27	9q21.32	CCND1	11q13	FGF4	11q13.3
LOC285194	3q13.31	UBQLN1	9q22	CTTN	11q13	IGHMBP2	11q13.3
C4orf35	4q13.3	LDLRAD3	11p13	FGF3	11q13	MIR548K	11q13.3
PROL1	4q13.3	GPC4	Xq26.1	MYEOV	11q13	PPFIA1	11q13.3
SMR3A	4q13.3			NDUFS8	11q13	LRP5	11q13.4
SMR3B	4q13.3			SAPS3	11q13	CLNS1A	11q13.5-q14
CDKN2A	9p21			UNC93B1	11q13	AQP11	11q14.1
CDKN2B	9p21			FGF19	11q13.1	DLG2	11q14.1
MTAP	9p21			CPT1A	11q13.1-2	RSF1	11q14.1
CDKN2BAS	9p21.3			CHKA	11q13.2	YEATS4	12q13-q15
LOC554202	9p21.3			GAL	11q13.2	BEST3	12q14.2-q15
IFNE	9p21.3			MRGPRD	11q13.2	CPM	12q14.3
MIR31	9p21.3			MRGPRF	11q13.2	RAB3IP	12q14.3
C9orf53	9p21-p22			MRPL21	11q13.2	CCT2	12q15
IFNA13	9p22			ORAOV1	11q13.2	CPSF6	12q15
IFNA2	9p22			SUV420H1	11q13.2	FRS2	12q15
IFNA5	9p22			TCIRG1	11q13.2	LRRC10	12q15
IFNA6	9p22			TPCN2	11q13.2	LYZ	12q15
IFNA8	9p22			MTL5	11q13.2-3	MIR1279	12q15

**Tabelle 5: Amplifizierte und homozygot deletierte Gene von BC61**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC61. In dieser Tabelle werden die einzelnen amplifizierten oder homozygot deletierten Gene mit ihrer Lokalisierung aufgelistet.

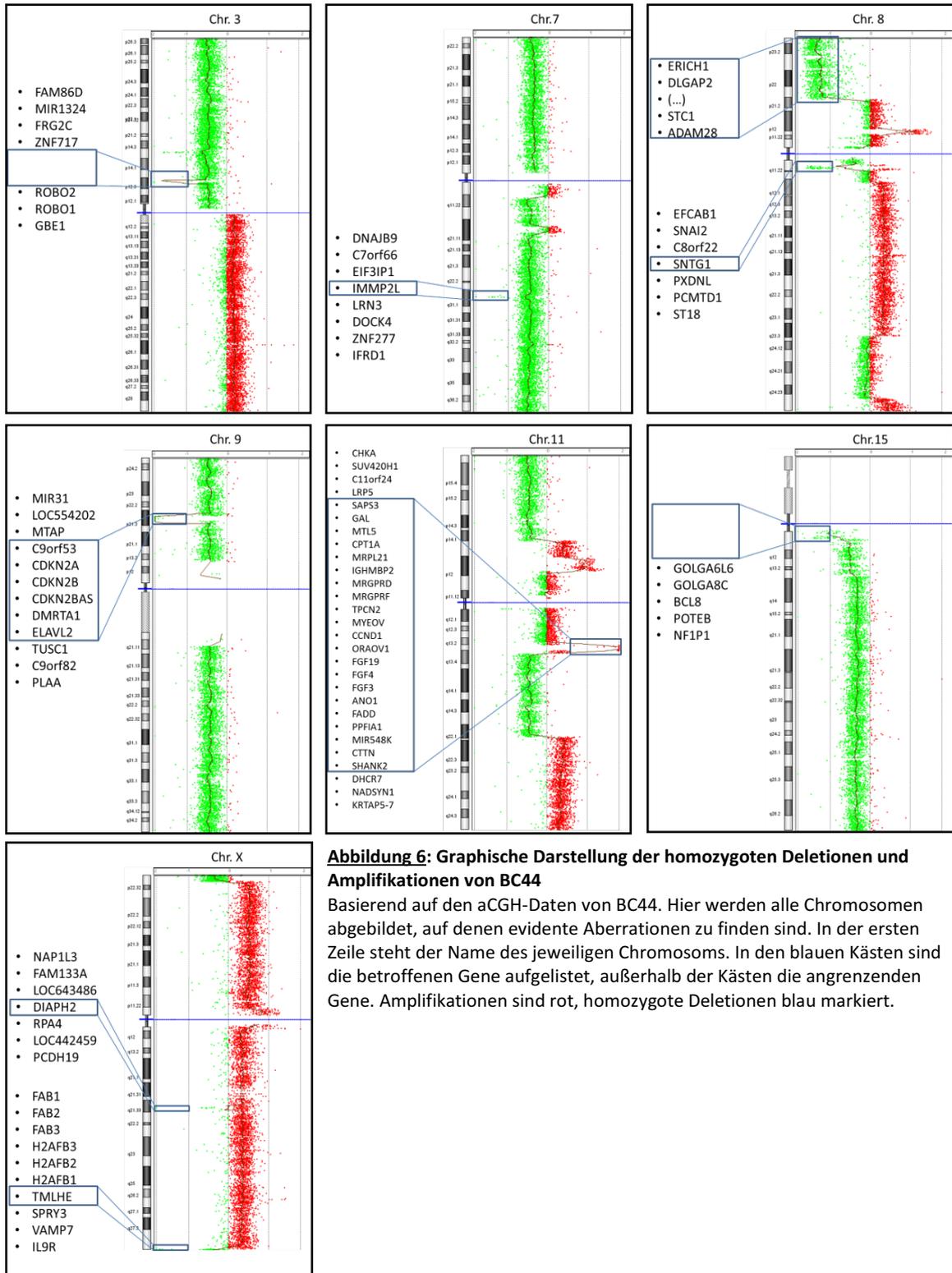
## 7.2.2 Graphische Darstellung der homozygoten Deletionen und Amplifikationen

Die graphischen Darstellungen der homozygoten Deletionen und Amplifikationen wurden mit dem Programm *Agilent Genomic Workbench* erstellt und sind in den *Abbildungen 6 und 8* zu finden. Die Funktion *Chromosome Views* ermöglicht eine nähere Betrachtung der Chromosomen und der dazugehörigen Sonden mit ihren Messwerten. Bei dieser Funktion wird immer nur ein Chromosom abgebildet. Auf der Abszissenachse ist die Kopienzahländerung dargestellt und auf der Ordinatenachse die Position der jeweiligen Sonde. Sonden werden durch einzelne Punkte dargestellt. Grüne Punkte entsprechen dabei einem Verlust und rote einem Zugewinn von genetischem Material. Eine Linie zwischen den Sonden entspricht dem Mittelwert der Sondenmesswerte in ihrem jeweiligen Bereich. Die blauen Kästen wurden nachträglich eingefügt und umranden jeweils den Bereich der homozygoten Deletion oder Amplifikation. Daneben wurden die Gene aufgelistet, welche von der Aberration betroffen sind. Gene, die sich ober- oder unterhalb der blauen Kästen befinden, sind angrenzende Gene und nicht von der Aberration betroffen. Wenn in den blauen Kästen drei Punkte stehen, bedeutet dies, dass so viele Gene von der Veränderung betroffen sind, dass sie nicht einzeln aufgelistet werden konnten. Dies ist zum Beispiel in BC44 auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 der Fall. Befinden sich in einem von einer Deletion oder Amplifikation betroffenen Bereich keine kodierenden Gene (Gen-Wüste), sind dementsprechend auch die blauen Kästen leer.

An dieser Stelle werden nur die Chromosomen dargestellt, die eine homozygote Deletion oder Amplifikation aufweisen. Im Anhang werden die einzelnen Chromosomen von BC44 und BC61 direkt

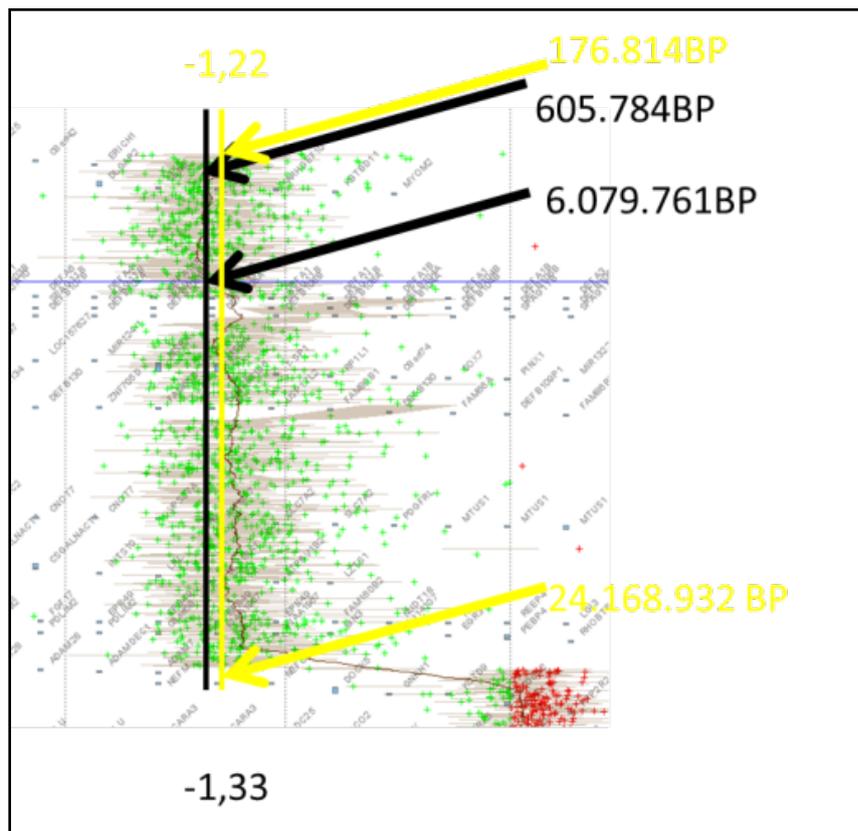
zusammen mit den Ergebnissen der spektralen Karyotypisierung dargestellt. In der *Abbildung 15* findet sich eine genauere Erklärung der *Abbildungen 16-39*.

### 7.2.2.1 Graphische Darstellung der Chromosomenaberrationen von BC44



**Abbildung 6: Graphische Darstellung der homozygoten Deletionen und Amplifikationen von BC44**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC44. Hier werden alle Chromosomen abgebildet, auf denen evidente Aberrationen zu finden sind. In der ersten Zeile steht der Name des jeweiligen Chromosoms. In den blauen Kästen sind die betroffenen Gene aufgelistet, außerhalb der Kästen die angrenzenden Gene. Amplifikationen sind rot, homozygote Deletionen blau markiert.

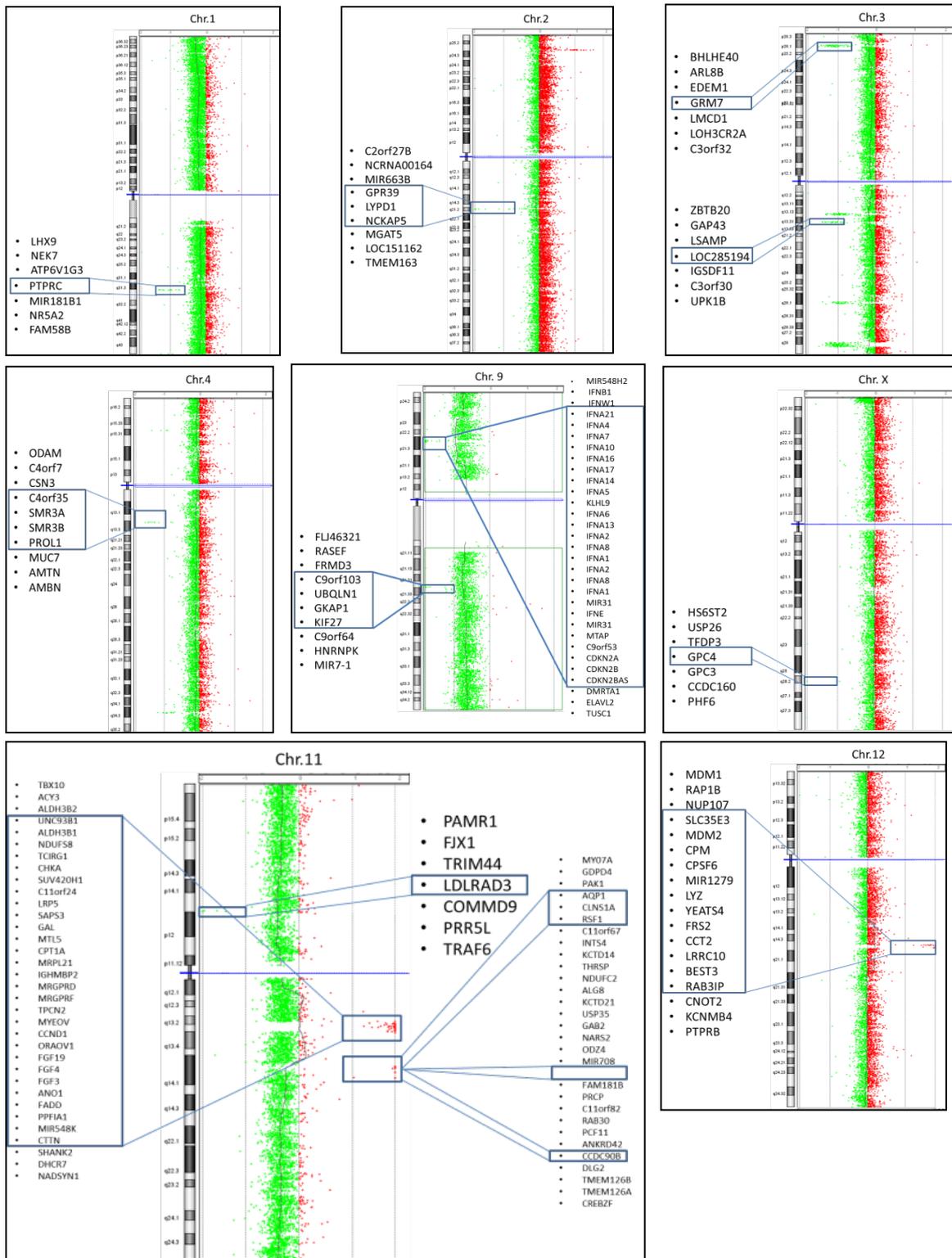


**Abbildung 7: Amplifikation Chr.11 q14.1 BC44.**

Es handelt sich um die Visualisierung der aCGH-Daten von BC44. Dargestellt wird die Region 11q14 in BC44. Mit den gelben Pfeilen ist eine Amplifikation eingekreist, die eine weitere Amplifikation umschließt. Die gelb markierte hat einen LogRatio von -1,22 und die schwarze einen LogRatio von -1,33 und wird deshalb vom Programm als unterschiedliche Deletionen angegeben.

Die Option *Chromosome Views* des Programms ermöglicht es zum einen, einen optischen Eindruck über die Veränderungen der Chromosomen zu gewinnen und so die reinen Zahlenwerte aus dem *Interval Based Report* besser zu verstehen. Indem beispielsweise möglich ist bis auf einzelne Sonden heran zu zoomen. So hilft dieses Werkzeug dabei die oben angesprochene homozygote Deletion im Bereich 8p23.3 - 23.2 besser zu verstehen. Diese wird nämlich vom Programm unterteilt. Wie die *Abbildung 7* zeigt, findet sich in diesem Bereich eine durchgängige Deletion, die sich jedoch in der Kopienzahl um 0,11 unterscheidet und deshalb vom Programm getrennt angegeben wird. Ähnlich verhält es sich mit der Deletion im Bereich 9p21.3.

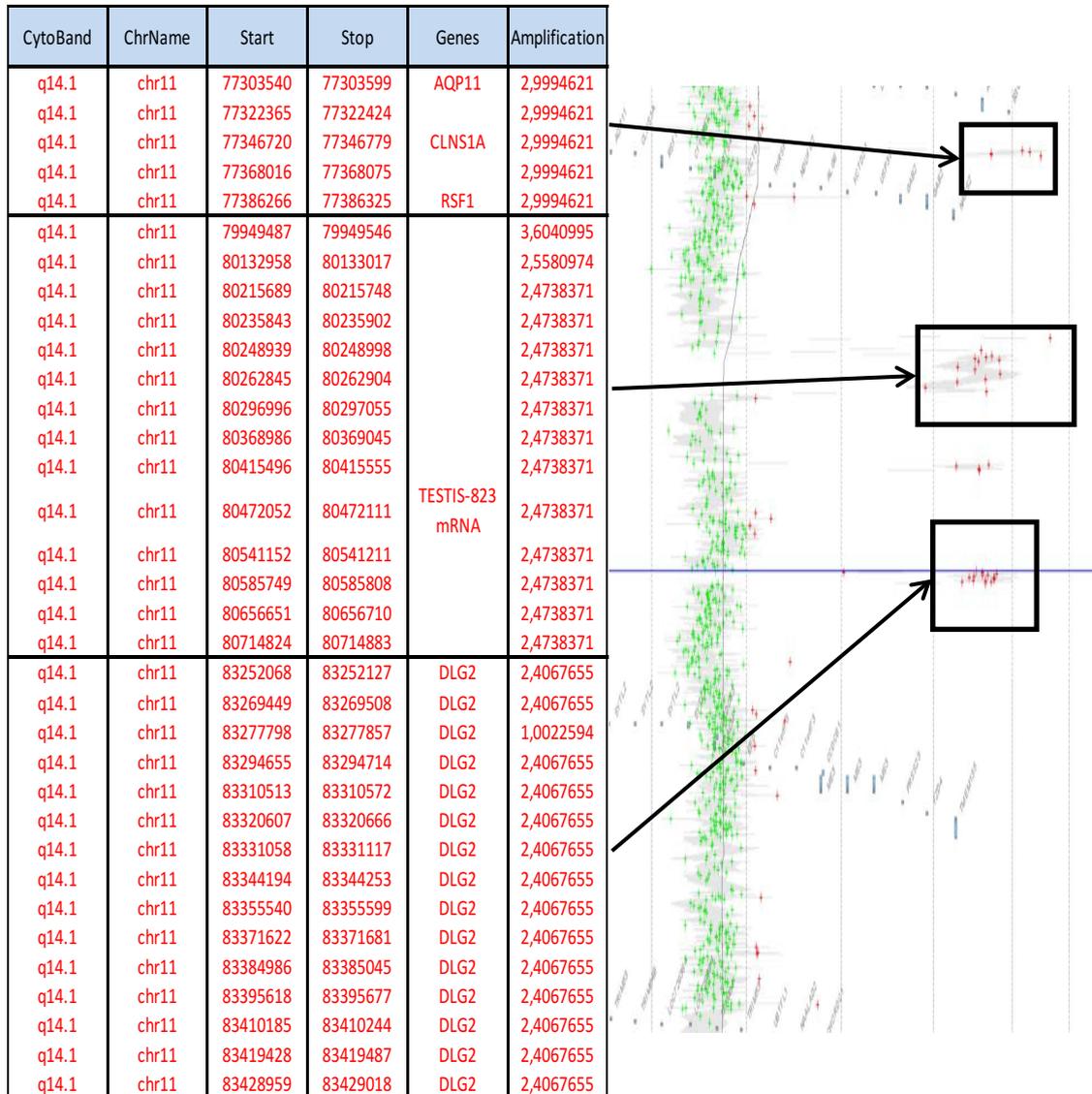
## 7.2.2.2 Graphische Darstellung der Chromosomenaberrationen von BC61



**Abbildung 8: Graphische Darstellung der homozygoten Deletionen und Amplifikationen von BC61**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC61. Hier werden alle Chromosomen abgebildet, auf denen evidente Aberrationen zu finden sind. In der ersten Zeile steht der Name des jeweiligen Chromosoms. In den blauen Kästen sind die betroffenen Gene aufgelistet, außerhalb der Kästen die angrenzenden Gene. Amplifikationen sind rot, homozygote Deletionen blau markiert.

Auch für die Zelllinie BC61 hilft diese Funktion des Programms die homozygoten Deletionen und Amplifikationen besser zu verstehen. Anders als bei den Deletionen in BC44 finden sich im Fall der Amplifikation Chr11q14.1 von BC61 drei distinkte Amplifikationen. Dies wird in der *Abbildung 9* noch einmal verdeutlicht. Auch die Daten aus dem *Probed Based Report* von BC61 zeigen, dass die einzelnen Loci weiter auseinander liegen, als es die Chromosomen-Ansicht in der *Abbildung 8* vermuten lässt.



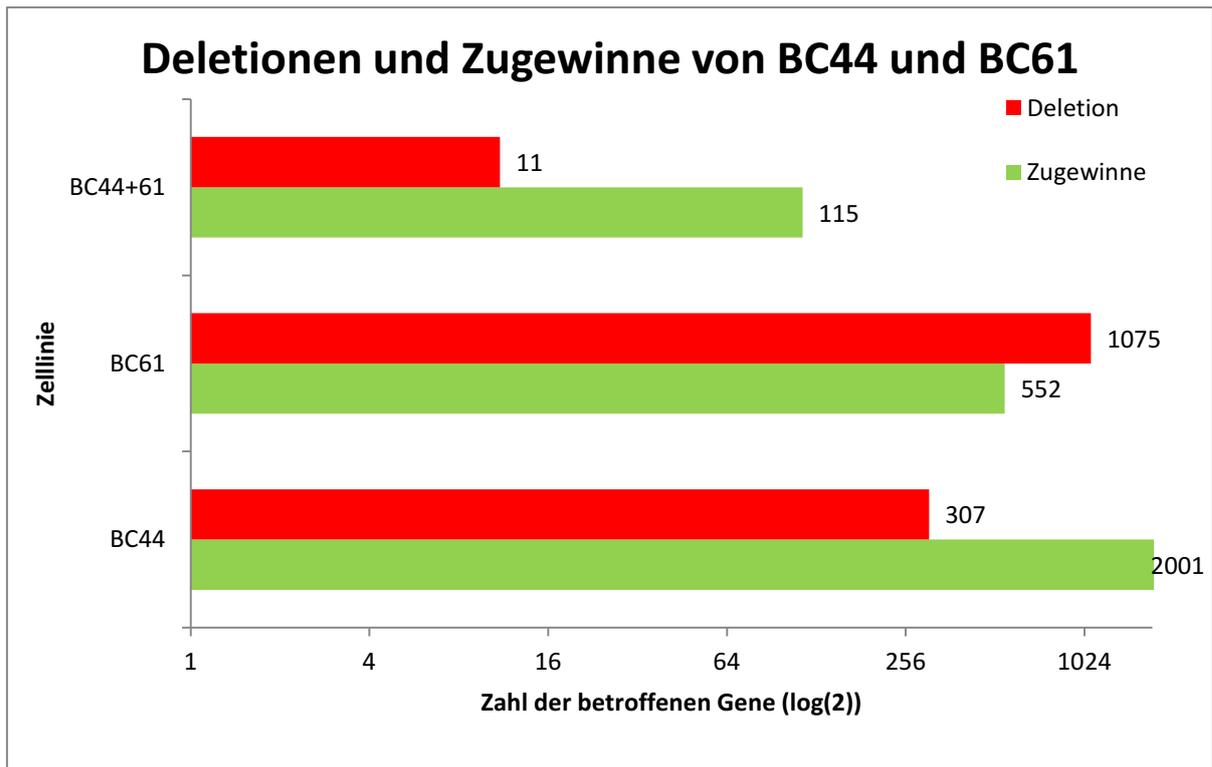
**Abbildung 9: Amplifikationen auf Chr.11q14.1 BC61**

Diese Abbildung basiert auf den Daten der aCGH von BC61. Abgebildet ist zum einen die Tabelle aus dem *Probe Based Report*, in der alle einzelnen Sonden dieser drei Amplifikationen aufgelistet sind. (Legende: CytoBand: Region auf dem Chromosom, ChrName: Name des Chromosom, Start: Beginn der Sonde, Stop: Ende der Sonde, Genes: Name des sondierten Gens, Amplification: Wert der Amplifikation. ). In der anderen Hälfte des Bildes ist der Ausschnitt aus dem *Chromosom View* der Region Chr.11 q14.1 abgebildet. In den schwarzen Kästen befinden sich die Sonden mit den Amplifikationen, die Pfeile verbinden sie mit den entsprechenden Werten des *Probe Based Report*.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Amplifikation auf Chr12q15 eine zusammenhängende ist, die sich nur anhand der Logratio unterscheidet. Die Deletion auf Chr3p26.1 ist dagegen dreigeteilt. Dies kommt dadurch zustande, dass jeweils eine Sonde mit einem Zugewinn zwischen den Abschnitten liegt. Die Deletion im Bereich 9p21.3 ist sehr groß und stellt sich im Detail als durchgängig dar. In dieser Deletion liegen sehr unterschiedliche Kopienzahländerungen ( $K = -1,7 - -6$ ) vor. Diese Messwerte sind auch die Erklärung für die getrennte Auflistung dieser Deletion.

### 7.2.3 Gemeinsame Deletionen und Zugewinne von BC44 und BC61

Von den 305 Genen, die in BC44 und den 1075 Genen, die in BC61 deletiert sind, sind 11 Gene in beiden Zelllinien betroffen. Auf der Seite der Zugewinne sind in BC44 2001 Gene und in BC61 552 Gene betroffen, von denen wiederum 115 in beiden Zelllinien zu finden sind (*Abbildung 10*). Die Gene der gemeinsamen Deletionen und Zugewinne sind in der *Tabelle 9* aufgelistet.



**Abbildung 10:** Darstellung der gemeinsamen Deletionen und Zugewinne von BC44 und BC61. Basierend auf den aCGH-Daten der Zelllinien BC44 und BC61.

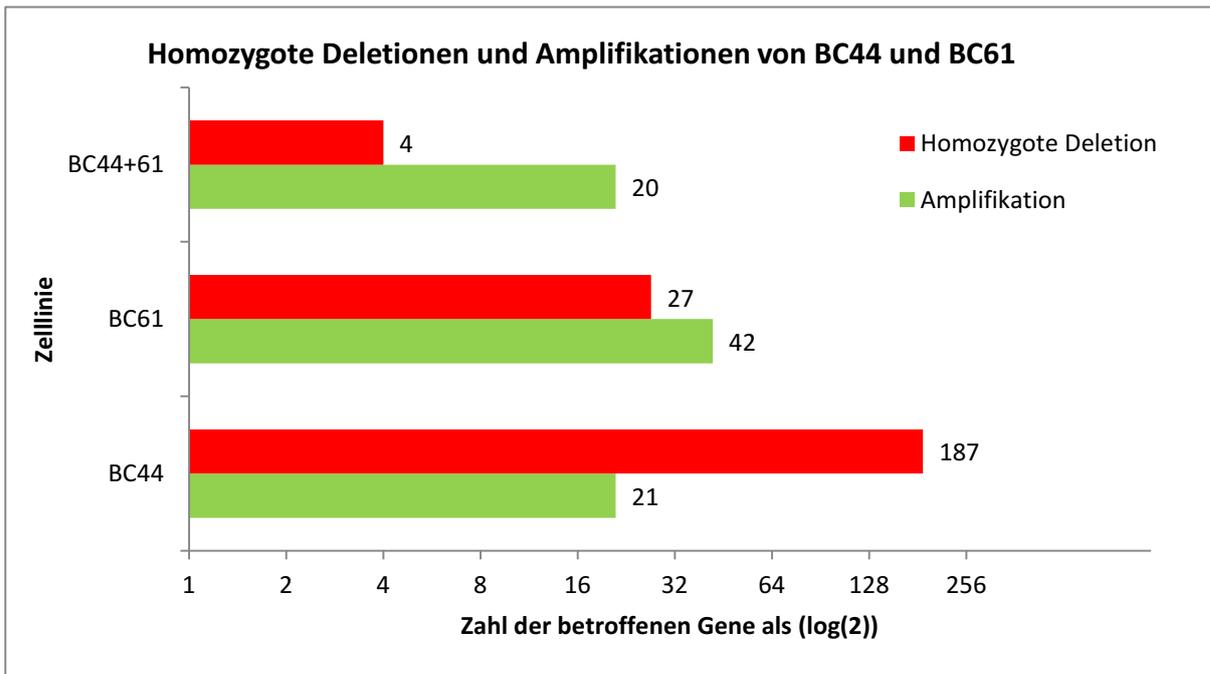
Gemeinsame Zugewinne						Gemeinsame Deletionen
ACSS2	CBFA2T2	EFCAB8	LOC100130264	PET117	SNTA1	AGBL1
AHCY	CCND1	EIF2S2	LOC284805	PIGU	SNX5	C9orf53
ANO1	CDK5RAP1	EIF6	MAP1LC3A	PLAGL2	SUN5	CDKN2A
ASIP	CHMP4B	FADD	MAPRE1	PLK1S1	TM9SF4	CDKN2B
ASXL1	COMMD7	FAM83C	MIR644	PLUNC	TP53INP2	CDKN2BAS
BASE	COX4I2	FGF19	MMP24	POFUT1	TPCN2	CNNM2
BCL2L1	CPT1A	FGF3	MRGPRF	POLR3F	TPX2	ELAVL2
BPIL1	CRNKL1	FGF4	MRPL21	PPFIA1	TRPC4AP	EXD3
BPIL3	CSRP2BP	GAL	MTL5	PROCR	TTL8	SOCS6
C20orf112	CTTN	GGT7	MYEOV	PXMP4	TTL9	SYK
C20orf114	DEFB118	GRM7	MYH7B	RALGAPA2	WNK2	XPNPEP1
C20orf12	DEFB119	GSS	MYLK2	RALY	XKR7	
C20orf160	DEFB121	HCK	NAA20	RBBP9	XRN2	
C20orf185	DEFB123	HM13	NCOA6	REM1	ZNF133	
C20orf186	DNMT3B	HSPC072	NECAB3	RIN2	ZNF341	
C20orf26	DTD1	ID1	NKX2-2	RORA		
C20orf70	DUSP15	IGHMBP2	ORAOV1	SAPS3		
C20orf71	DYNLRB1	INSM1	OVOL2	SEC23B		
C20orf72	E2F1	ITCH	PAX1	SHANK2		
C20orf79	EDEM2	KIF3B	PDRG1	SLC24A3		

**Tabelle 6: Gemeinsame Zugewinne und Deletionen von BC44 und BC61**

Die Daten basieren auf den aCGH-Daten der Zelllinien BC44 und BC61. In der Spalte „Gemeinsame Zugewinne“ finden sich die Gene, die sowohl in BC44 als auch in BC61 die Kriterien eines Zugewinns erfüllen. In der Spalte „Gemeinsame Deletionen“ finden sich die Gene, die sowohl in BC44 als auch in BC61 die Kriterien einer Deletion erfüllen.

#### 7.2.4 Gemeinsame homozygot deletierte und amplifizierte Gene in BC44 und BC61

Die *Abbildung 11* zeigt, dass BC44 187 homozygote Deletionen aufweist und BC61 27. Davon sind vier Gene in beiden Zelllinien betroffen. Auf Seiten der Amplifikationen sind es 20 Übereinstimmungen. Dabei weist BC44 lediglich 21 und BC61 42 Amplifikationen auf. Die Grundlage für die gemeinsam homozygot deletierten oder amplifizierten Gene findet sich in nur zwei Aberrationen der Zelllinien. Einerseits handelt es sich um die Region 11q13- 11q13.3, die ungefähr 2,53 Mbp groß ist und eine Amplifikation darstellt, andererseits um die homozygote Deletion der Region 9p21.3 mit einer Größe von 1,19 Mbp. Beide Aberrationen unterscheiden sich in den Zelllinien in Anfang und Ende. Die Gene, welche sowohl in BC44 als auch BC61 von einer Amplifikation oder homozygoten Deletion betroffen sind, werden in der *Tabelle 7* aufgelistet.



**Abbildung 11:** Darstellung der gemeinsamen homozygoten Deletionen und Amplifikationen von BC44 und BC61. Basierend auf den aCGH-Daten der Zelllinien BC44 und BC61.

Homozygote Deletion		Amplifikation			
CDKN2A	9p21	CCND1	11q13	MRPL21	11q13.2
CDKN2B	9p21	CTTN	11q13	ORAOV1	11q13.2
CDKN2BAS	9p21.3	FGF3	11q13	TPCN2	11q13.2
C9orf53	9p21-p22	MYEOV	11q13	MTL5	11q13.2-q13.3
		SAPS3	11q13	ANO1	11q13.3
		FGF19	11q13.1	FADD	11q13.3
		CPT1A	11q13.1-q13.2	FGF4	11q13.3
		GAL	11q13.2	IGHMBP2	11q13.3
		MRGPRD	11q13.2	MIR548K	11q13.3
		MRGPRF	11q13.2	PPFIA1	11q13.3

**Tabelle 7:** Gemeinsame Amplifikationen und homozygote Deletionen von BC44 und BC61

Die Daten beruhen auf den aCGH-Daten der Zelllinien BC44 und BC61. In der Spalte Amplifikation finden sich die amplifizierten Gene, die sowohl in BC44 als auch BC61 vorkommen. In der Spalte homozygote Deletionen finden sich alle Gene, die sowohl in BC44 als auch in BC61 von einer homozygoten Deletion betroffen sind.

### 7.3 Genexpression BC61

In der Messung der RNA-Expression von BC61 wurden vier Proben aus BC61 mit vier Proben aus einer urothelialen Primärkultur verglichen und deren Ergebnisse gemittelt. Nach der ersten Aufbereitung der Daten bleiben noch 39.368 unterschiedliche Sonden. 39.152 Sonden liegen auf kodierender DNA. Ähnlich wie bei den Sonden der aCGH entsprechen vielen Genen mehrere Sonden. So können insgesamt 17.341 Gene unterschieden werden. Die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Auswertungsmethoden (CEL und R) zeigen Unterschiede. Es werden beide Ergebnisse kurz anhand der 100 Gene mit den stärksten Veränderungen dargestellt. Da jedoch die öffentlichen Genexpressionsdaten mittels R analysiert wurden, wurde für den weiteren Verlauf die Berechnung der Expressionsanalyse von BC61 mittels R wegen der besseren Vergleichbarkeit bevorzugt.

#### 7.3.1 CEL basierte Analyse der Rohdaten

Wenn man den moderaten t-Test durchführt und die Werte nach Benjamini-Hochberg für multiples Testen adjustiert bleiben 21.809 Sonden mit p-Wert <0,01. Davon sind 10.846 Sonden in BC61 gegenüber Urothelzellen vermehrt exprimiert und 10.963 vermindert exprimiert. Die ausgewählten Top 100 Gene mit den größten *Fold Change* (FC) Werten der verminderten und gesteigerten Expressionen bietet einen ersten Eindruck der Daten (*Tabelle 8*).

Top 100 down					Top 100 up				
CCND2	MT1G	FHL1	CCDC8	FN1	MAGEA3	HOXC6	CHKA	PLAC8	CFI
STOM	PLEK1	CA12	ADRB2	MTAP	MAGEA6	NLRP2	PTCHD4	SLC2A12	MMP12
KLHL9	CRCT1	THBS2	DSC3	UGT2B7	CALB1	GPR128	MEIS2	SLC16A7	MPPED2
MSN	EDNRA	TFPI2	TRNP1	PDCD1LG2	LOXL4	IGFBP3	EIF1AY	TNFAIP2	PBX1
BNC1	VIM	RAB31	BNIP3	FADS2	LUM	BMP3	NMNAT2	MDM2	AKR1B1
AREG	UBQLN1	LY6K	COL4A2	FST	C1R	FAM46A	UCA1	NCOA7	OBSL1
AREGB	TM4SF1	LIPG	CD44	PLAGL1	CLEC7A	LXN	HS6ST3	COL3A1	GABBR1
ANGPTL4	EPB41L3	PXDN	THBS1	FKBP10	ZIC2	FRS2	GAL3ST4	AKR1B10	UBD
SERPINE2	TUBB6	PCGF5	XIST	CWH43	DDX3Y	MDK	PPP6R3	AKR1B15	SLC1A3
AKAP2	HMGA2	TNFRSF10D	IGFBP7	KLRC1	LUZP2	SUV420H1	CLNS1A	FBLN1	C3
PALM2-AKAP2	LDLR	GJA1	ERRF1	KLRC2	RNASE1	CEBPA	LY6D	RAB3IP	TGFBR3
DKK3	FKBP5	ZNF826P	FBLIM1	QPRT	BCAS1	OLR1	TXLNG2P	HTR2C	GATA6
NT5E	LRRC8C	INHBA	DSC2	GNG11	PPP2R2B	KCND2	LOC100509121	MMP13	VTCN1
CD200	GOS2	SLC16A4	DUSP5	XDH	WNT10A	ELF3	HCAR2	EPHA4	INPP1
ALDH7A1	KCNMA1	C2orf74	DCBLD2	AHNAK2	BPIFB1	SLC40A1	HCAR3	ITGAM	FOLR1
LOC100653217	LAMC2	KIAA1841	GRB10	AUTS2	IGFBP6	METTL7A	ERP27	COL5A2	DRAM1
NTM	HLA-C	PRTFDC1	DBC1	RGMB	FYB	NMB	GBP2	PPAP2A	LRP5
LOC100132240	CHST2	CDH13	FAM171A1	CDCA7L	AQP11	SIM2	RASSF2	ZNF488	EDIL3
MIG7	MEST	ALOX5AP	LAMA3	SOX9	BST2	LIMCH1	GABRB3	CXCL3	PTPRR
PTHLH	PRSS3	GPC4	C16orf5	D4S234E	DAPK1	LCN2	YEATS4	PITX2	SCPEP1

**Tabelle 8: Top 100 der vermehrt und vermindert exprimierten Gene in BC61 der CEL basierten Analyse**

Basierend auf den RNA-Expressionsdaten von BC61. Dabei wurde der moderate t-Test mit einem p-Wert von <0,01 angewendet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse auf multiples Testen nach Benjamini-Hochberg adjustiert. In der ersten Zeile der ersten Spalte findet sich das Gen mit dem größten *Fold Change* (FC) seiner Gruppe. Der FC nimmt pro Zeile und Spalte ab, so dass der FC von D4S234E der 100 größte ist. Legende: Top 100 down: die 100 vermindert exprimierten Gene mit den größten FC, Top 100 up: 100 gesteigert exprimierte Gene mit den größten FC.

### 7.3.2 R basierte Analyse der Rohdaten

Nachdem der p-Wert mittels moderaten t-Test errechnet und nach Bonferroni auf multiples Testen adjustiert wurde, bleiben 8.755 Sonden mit einem p-Wert  $<0,05$ . Diese teilen sich in 4.193 vermindert exprimierte und 4.550 vermehrt exprimierte Sonden auf. Von diesen sind die 100 Gene mit den größten FC Werten in *Tabelle 9* aufgelistet. Nach dem Entfernen der doppelt aufgelisteten Gene bleiben noch 2.568 vermindert exprimierte und 2.891 gesteigert exprimierte Gene bestehen.

Top 100 vermindert exprimierte Gene von BC61					Top 100 gesteigert exprimierte Gene von BC61				
CCND2	ALDH7A1	PRSS3	ALOX5AP	FADS2	MAGEA3	HOXC6	CHKA	RASSF2	AKR1B1
STOM	CD200	CA12	CDH13	PLAGL1	MAGEA6	NLRP2	PPP6R3	GBP2	INPP1
KLHL9	CRCT1	LIPG	CCDC8	C16orf5	CALB1	FAM46A	LCN2	PLAC8	RCAN1
MSN	EDNRA	LY6K	CD44	PDCD1LG2	LOXL4	IGFBP3	LY6D	NCOA7	ZNF488
AREG	VIM	RAB31	GPC4	FST	C1R	GPR128	MEIS2	SLC16A7	CXCL3
AREGB	UBQLN1	TFPI2	THBS1	UGT2B7	LUM	SUV420H1	PTCHD4	SLC2A12	CFI
BNC1	EPB41L3	THBS2	ERRF1	FKBP10	CLEC7A	MDK	GAL3ST4	AKR1B10	MPPED2
AKAP2	TM4SF1	PCGF5	COL4A2	MTAP	ZIC2	CEBPA	NMNAT2	AKR1B15	VTCN1
PALM2-AKAP2	FKBP5	PXDN	DSC3	AUTS2	RNASE1	FRS2	HS6ST3	HTR2C	TGFBR3
PTHLH	TUBB6	GJA1	IGFBP7	XDH	LUZP2	BMP3	EIF1AY	FBLN1	GATA6
SERPINE2	LRRC8C	TNFRSF10D	DCBLD2	CWH43	DDX3Y	LXN	UCA1	COL3A1	MMP12
MT1G	LAMC2	INHBA	XIST	KLRC1	BCAS1	ELF3	YEATS4	RAB3IP	DRAM1
ANGPTL4	LDLR	ZNF826P	DUSP5	KLRC2	PPP2R2B	OLR1	GABRB3	COL5A2	PTPRR
LOC100653217	HMGA2	SLC16A4	DSC2	SQRDL	WNT10A	KCND2	TXLNG2P	PPAP2A	LRP5
NTM	KCNMA1	PRTFDC1	FBLIM1	QPRT	RYB	METTL7A	HCAR2	ITGAM	SLC1A3
PLEK2	HLA-C	C2orf74	GRB10	AHNAK2	AQP11	NMB	HCAR3	EPHA4	C3
LOC100132240	CHST2	KIAA1841	LAMA3	GNG11	BPIFB1	SIM2	TNFAIP2	MMP13	APOBEC3B
MIG7	GOS2	ADRB2	FAM171A1	SLC16A3	IGFBP6	SLC40A1	LOC100509121	PITX2	GABBR1
DKK3	FHL1	TRNP1	FN1	ZBED2	DAPK1	CLNS1A	ERP27	OBSL1	UBD
NT5E	MEST	BNIP3	DBC1	RGMB	BST2	LIMCH1	MDM2	PBX1	HPGD

**Tabelle 9: Top 100 der vermehrt und vermindert exprimierten Gene in BC61 der R basierten Analyse**

Basierend auf den RNA-Expressionsdaten von BC61. Dabei wurde der moderate t-Test mit einem p-Wert von  $<0,05$  angewendet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse auf multiples Testen nach Bonferroni adjustiert. In der ersten Zeile der ersten Spalte findet sich das Gen mit dem größten Fold Change (FC) seiner Gruppe. Der FC nimmt pro Zeile und Spalte ab, so dass der FC von RGMB der 100 größte ist. Legende: Top 100 down: die 100 vermindert exprimierten Gene mit den größten FC, Top 100 up: 100 gesteigert exprimierte Gene mit den größten FC.

### 7.4 Öffentliche Expressionsdatensätze

Es konnten insgesamt sechs verschiedene öffentlich zugängliche Expressionsdatensätze heruntergeladen und ausgewertet werden. Diese Daten sollten untereinander und im weiteren Verlauf mit den Daten von BC44 und BC61 verglichen werden, mit dem Ziel Gene zu identifizieren, die für das UC von weiterem Interesse sein könnten. Dazu wurden die Daten mit Hilfe von R und der bereits vorgestellten Methoden ausgewertet. Einen kompakten Überblick der Ergebnisse findet sich in der *Tabelle 10 und 11*. Für den Vergleich mit den Daten der Zelllinien Analyse für diese Arbeit festgelegt, dass die entsprechenden differentiell exprimierten Gene in mindestens 60% der Datensätze eine gleichgerichtete Veränderung aufweisen müssen. Hierbei wurden 83 Gene mit einer verminderten und 66 Gene mit einer gesteigerten Expression gefunden (*Tabelle 12*). Zudem finden sich unter den diesen Genen auch solche, die in 80%-100% der Daten vorkommen. Diese Gene sind in der *Tabelle 13* aufgelistet.

	Expression	<u>Mengueal et al</u>	<u>Leem et al</u>	<u>Dyrskjot et al</u>	<u>Lindgren et al</u>	<u>Stransky et al</u>	<u>Hansel et al</u>	Davon in $\geq 60\%$ der Datensätze:
Tumor vs. Normal	↑	7792	1934	4598	932	1887	964	230
	↓	70792	16576	8124	597	1772	1737	349
Ta vs. Normal	↑	7713	2081		748	1952		361
	↓	6149	3782		554	1889		462
$\geq T2$ vs. Normal	↑	7490	859		821	1280		374
	↓	6847	8143		559	1374		667
<b>In allen Konfigurationen</b>							↑	<b>66</b>
							↓	<b>83</b>

**Tabelle10: Ergebnisse der öffentlichen Expressionsdaten Analyse**

Die Daten basieren auf sechs öffentlichen Expressionsdatensätze. Die RNA-Expression von verstärkt oder vermindert exprimierten Genen wurde mit Hilfe des moderaten t-Tests mit einem p-Wert von  $<0,05$  berechnet. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgewebe der Stadien pTa-Tumoren,  $\geq pT2$ -Tumoren und aller Tumorstadien mit urothelialen Normalgewebe verglichen. Diese Gruppen wurden noch einmal in Gene mit einer gesteigerten Expression(↑) und Gene mit einer verminderten Expression (↓) unterteilt. Die Zahlen geben die Anzahl der Gene an, die einen p-Wert  $<0,05$  haben. In der Spalte mit der Überschrift: „Davon in mind. 60% der Datensätze“ finden sich die Gene, die in mindestens 60% aller Datensätze vorkommen. Die Gene, die in allen drei Gruppen gleichermaßen differenziell exprimiert werden, werden unter „in allen Konfigurationen“ aufgeführt.

	Expression	<u>Mangueal et al</u>	<u>Leem et al</u>	<u>Lindgren et al</u>	<u>Stransky et al</u>	<u>Högelund et al</u>	In $> 60\%$ der Daten
pT2 vs. pTa	↑	2415	720	173	1260	6161	1004
	↓	2561	4193	122	1313	7337	732

**Tabelle11: Ergebnisse der öffentlichen Expressionsdaten**

Die Daten basieren auf sechs öffentlichen Expressionsdatensätzen. Die RNA-Expression von verstärkt oder vermindert exprimierten Genen wurde mit Hilfe des moderaten t-Tests mit einem p-Wert von  $<0,05$  berechnet. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgewebe der  $\geq pT2$  –Tumoren gegen pTa-Tumoren verglichen. In der letzten Spalte finden sich die Anzahl der Gene, die in mind. 60% der Fälle gleichsinnig verändert exprimiert vorliegen.

Verminderte Expression			Gesteigerte Expression		
ADARB1	GNB5	PPP3CC	ALG8	NARF	TRIM25
ADD3	GNG7	PTPRS	APH1A	NCSTN	VPS72
AKAP12	GSN	RBPMS	ARD1A	NQO1	WDR18
AKAP13	HAAO	RGS10	BIRC5	NUP155	ZNF3
ALDH1B1	IER2	ROR2	CAD	PAFAH1B3	
AQP1	IGFBP5	SF1	CAMK2N1	PARP1	
ARHGAP25	JMJD1C	SLC16A2	CCNB1	PCK2	
ATP2B4	JUND	SOD3	CDC2	PPARG	
BCL2	KCNH2	SORBS3	CHAF1A	PPFIA1	
C21orf2	LITAF	SPG20	CYB561	PSMB3	
CALD1	MAP3K3	ST5	CYB561D2	RCN2	
CAV2	MBNL1	STAT4	DDOST	RER1	
CCDC69	MGLL	SVIL	DKC1	RNASEH2A	
CCND2	MICAL2	TGFBR2	ELF4	RPN2	
CD44	MYH11	THRA	ERBB3	RUSC1	
CFI	MYL9	TPM1	ESM1	SHMT2	
CKB	NES	VCL	ETV4	SKP2	
CRTAP	NFATC1	WWOX	EVPL	SLC33A1	
CSRP1	NFATC4	WWTR1	EZH2	SLC38A1	
CTDSPL	NFIA	ZAK	FDXR	SLC39A4	
CYBRD1	NFIX	ZFP36L1	FLAD1	SLC5A3	
CYP27A1	NR4A1		FXYD3	SLC5A6	
DKK3	PDE5A		GART	SMARCA4	
EGR1	PDGFRA		GCN1L1	SMARCC1	
ESD	PDLIM5		GGH	SNRPB	
FAS	PER1		KDEL2	SOX4	
FBLN1	PER2		KRT7	STRA13	
FEZ1	PGCP		LSR	TIA1	
FGFR1	PHF1		MCM7	TK1	
FLNC	PPP1R12B		MRPS12	TOP2A	
GADD45B	PPP2R5A		MTX1	TPX2	

**Tabelle 12: Gemeinsame Gene, die vermindert oder vermehrt exprimiert sind**

Diese Tabelle basiert auf den Daten der öffentlichen Expressionsdaten. Die RNA-Expression von verstärkt oder vermindert exprimierten Genen wurde mit Hilfe des moderaten t-Tests mit einem p-Wert von <0,05 berechnet. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgeweben der Stadien pTa-Tumoren, ≥pT2-Tumoren und aller Tumorstadien mit urothelialen Normalgeweben verglichen. In dieser Tabelle finden sich die Gene, die in jeder der drei Gruppen signifikant differentiell exprimiert sind.

T vs N		pTa vs N		≥pT2 vs N		pTa vs ≥pT2	
↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
AP2S1	ABLIM1	ALG8	AKAP12	ALG8	ABLIM1	ABCC4	CCNB1
B4GALT3	ADCYAP1R1	ARD1A	AKAP13	B4GALT3	ABR	AP1G2	CHAF1B
CCNB1	AKAP13	C18orf10	ANXA1	CDK4	ADD3	BMP7	CNN3
CDK4	ARHGAP1	CHAF1A	ARHGAP25	ESM1	AKAP12	CNCSR1	DEGS1
CHAF1A	ATP2B4	COPG2	ATF3	ETV4	AKAP13	DOCK1	ESPL1
COPA	BLVRA	CYC1	ATP2B4	EZH2	ALDH3A2	GPC1	F2R
ERBB3	CA5B	EML2	CCDC69	FAM50A	ARHGAP1	KCNQ1	FYN
FIBP	CD44	EPHB6	CD97	GGH	ATP2B4	LAD1	GADD45B
FLAD1	CDC42EP2	ERBB3	CNN3	NUP155	CCDC69	LETMD1	IL8
FXYD3	FBLN1	ERGIC3	CSF3R	RUSC1	CD44	MAOA	IMPA2
GART	HAAO	ESM1	EGR1	SIM2	CD59	PTK6	KIFC1
GCN1L1	MLL	ETV4	GADD45B	SLC5A6	CDC42EP2	RHOBTB2	NFIL3
GGH	NAB2	FGFR3	GSN	SLC9A3R1	DHRS3	SH3PX2A	NUDT1
GTSE1	NFIX	FIBP	HLA-DPA1	SNRPB	DKK3	SLC9A1	RAP2A
MRPS12	PDLIM5	FLAD1	ICAM1	SOX4	DST	VPS13D	SAC3D1
NQO1	PER1	FXYD3	JUND	STRA13	EGR1		TK1
PAFAH1B3	PHF1	GATA3	LDLR	TMEM106C	EPAS1		TM4SF1
PPARG	PPP3CC	HOXB7	LITAF	TOPBP1	HAAO		TRIP13
RNASEH2A	SPG20	JARID1B	LPIN2	TPX2	IGFBP2		TROAP
RNF128	SPTAN1	KIAA0391	MAP3K7IP2	TRIP13	INPP1		
RPN1	THRA	MAPKAPK3	MCL1		IQGAP1		
RPN2	THSD4	MGAT1	MFAP4		ITM2B		
SLC33A1	VAMP1	MRPS12	MGLL		JMJD1C		
SNRPB	VPS13D	MTIF2	MT1E		KIAA0141		
TMSB10	WWOX	NAT9	NFATC4		LGMN		
TNFRSF21	WWTR1	PAFAH1B3	NFIL3		LITAF		
TOP2A	ZFP36L1	SIM2	NFIX		METTL7A		
TRAM1		SLC5A6	NUCB2		PER1		
UCK2		SP1	PER1		PGCP		
		STRA13	PPP3CC		PHF1		
		STX6	PTP4A1		PITPNA		
		TFAP2A	RABEP1		PJA2		
		TRIM25	RBPMS		PRKD3		
		ZNF513	RGS10		PTP4A1		
			STOM		PTPRS		
			TGFBR2		RANBP2		
			TGM2		RBPMS		
			THRA		RERE		
			TIMP3		SASH1		
			TNFAIP3		SF1		
			TSC22D3		SLC25A12		
			ZFP36L1		SPRY1		
					TGFBR2		
					THRA		
					THSD4		
					TSC22D1		
					TSPAN7		
					TSPYL1		
					VPS13D		

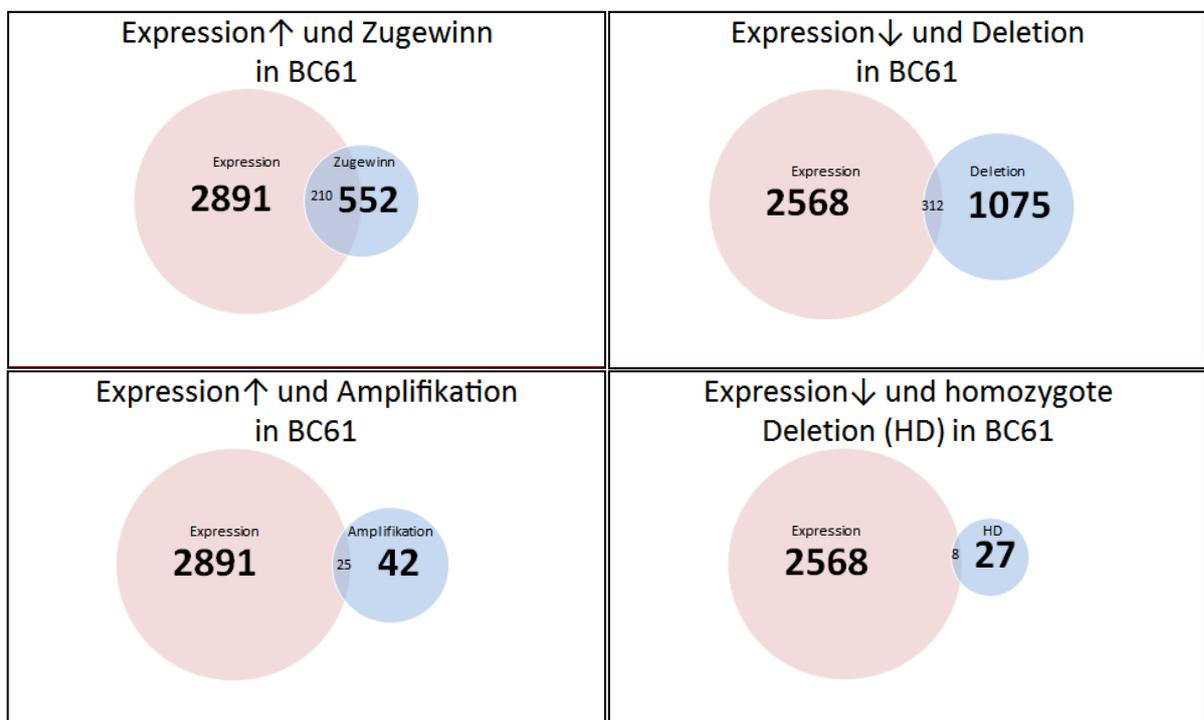
**Tabelle 13: Gene, die in den öffentlichen Expressionsdaten in 80-100% der Fälle signifikant differentiell exprimiert sind**

Die Daten basieren auf sechs öffentlichen Expressionsdatensätzen und zeigen signifikant differentiell exprimierte Gene, die in mindestens 80% der Datensätze gleichsinnig verändert sind. Die RNA-Expression wurde mit Hilfe des moderaten t-Tests mit einem p-Wert von <0,05 berechnet. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgewebe der Stadien pTa-Tumoren, ≥pT2-Tumoren und aller Tumorstadien mit urothelialen Normalgeweben verglichen. T vs N: Tumor gegen Normalgewebe, pTa vs N: pTa Tumoren gegen Normalgewebe, ≥pT2 vs N: ≥pT2 Tumoren gegen Normalgewebe. pTa vs ≥pT2: pTa-Tumoren gegen ≥pT2-Tumoren. ↑: gesteigerte Expression; ↓: verminderte Expression.

## 7.5 Vergleich aller Ergebnisse

### 7.5.1 Vergleich der Expressionsdaten von BC61 mit den aCGH-Daten von BC61

Die grundlegende Überlegung zu diesem Vergleich ist, dass die Genexpression von der Zahl der jeweiligen Genkopien abhängt. Um diesen Zusammenhang zwischen DNA und RNA darzustellen, werden die aCGH-Daten von BC61 mit den Daten der Expressionsanalyse von BC61 verglichen. Es finden sich 210 Gene, die sowohl einen Zugewinn als auch eine gesteigerte Expression aufweisen. Von den 42 amplifizierten Genen zeigen 25 auch eine gesteigerte Expression; 312 von insgesamt 1075 deletierten Genen zeigen eine entsprechende verminderte Expression. Die 27 homozygot deletierten Gene sind mit 8 Genen unter den vermindert exprimierten Genen vertreten (*Abbildung 12*). Alle betroffenen Gene sind in den *Tabellen 14* und *15* aufgelistet.



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der Gemeinsamkeiten der aCGH- und Expressions-Daten von BC61

Die Daten dieser Abbildung basieren zum einen auf den aCGH-Ergebnissen und zum anderen auf den Expressionsdaten von BC61. RNA-Expression: differentiell exprimierte Gene, berechnet mit Hilfe des moderaten t-Test bei einem p-Wert von  $<0,05$  und adjustiert auf multiples Testen nach Bonferroni. Getestet wurde BC61 gegen primäre Urothelzellen. Die roten Kreise beschreiben die Anzahl der differentiell exprimierten Gene und die blauen Kreise die Gene mit chromosomalen Aberrationen. Die Größe der Kreise ist nicht maßstabsgetreu. Die Schnittmenge beider Kreise beschreibt die Anzahl der Gene, die sowohl differentiell exprimiert als auch homozygot deletiert/deletiert/amplifiziert/zugewonnen sind. Expression ↑: gesteigerte Expressionen; Expressionen ↓: verminderte Expressionen

Amplifikation und gesteigerte Expression				Homozygote Deletion und verminderte Expression	
ALDH3B1	11q13	FADD	11q13.3	LDLRAD3	11p13
C11orf24	11q13	IGHMBP2	11q13.3	GPR39	2q21-q22
CCND1	11q13	PPFIA1	11q13.3	CDKN2A	9p21
CTTN	11q13	LRP5	11q13.4	CDKN2B	9p21
NDUFS8	11q13	CLNS1A	11q13.5-q14	MTAP	9p21
UNC93B1	11q13	AQP11	11q14.1	KLHL9	9p22
CHKA	11q13.2	YEATS4	12q13-q15	UBQLN1	9q22
MRPL21	11q13.2	RAB3IP	12q14.3	GPC4	Xq26.1
ORAOV1	11q13.2	CCT2	12q15		
SUV420H1	11q13.2	CPSF6	12q15		
TCIRG1	11q13.2	FRS2	12q15		
TPCN2	11q13.2	LYZ	12q15		
ANO1	11q13.3				

**Tabelle 14: Homozygote Deletionen und Amplifikationen mit entsprechenden differentiellen Expressionen von BC61**

Homozygote Deletionen und Amplifikationen wurde anhand aCGH-Daten von BC61 ermittelt. RNA-Expression: differentiell exprimierten Gene, berechnet mit Hilfe des moderaten t-Tests bei einem p-Wert von <0,05 und adjustiert auf multiples Testen nach Bonferroni. Getestet wurde BC61 gegen primäre Urothelzellen.

Die Gene *C4orf35*, *CDKN2BAS*, *GRM7*, *IFNA13*, *IFNA2*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA8*, *IFNE*, *KIF27*, *LOC285194*, *LOC554202*, *MIR31*, *PROL1*, *PTPRC*, *SMR3A* und *SMR3B* sind homozygot deletiert, werden aber weder bei den vermindert exprimierten noch bei den überexprimierten Genen gefunden. In den Rohdaten hat sich gezeigt, dass die Gene *GKAP1*, *IFNA13*, *IFNA2*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA8*, *KIF27*, *PROL1*, *PTPRC*, *SMR3A* und *SMR3B* in mehreren Sonden nicht detektiert werden konnten. Die anderen Gene werden detektiert, gelangen aber nicht durch die verschiedenen Schritte der recht strengen Datenselektion. Dies bestärkt die Annahme, dass diese Gene tatsächlich homozygot deletiert vorliegen. Unter den amplifizierten Genen fallen *GAL*, *CPT1A* und *CPM* dadurch auf, dass sie trotz einer Kopienzahländerung von  $K > 2$  in BC61 vermindert exprimiert werden.

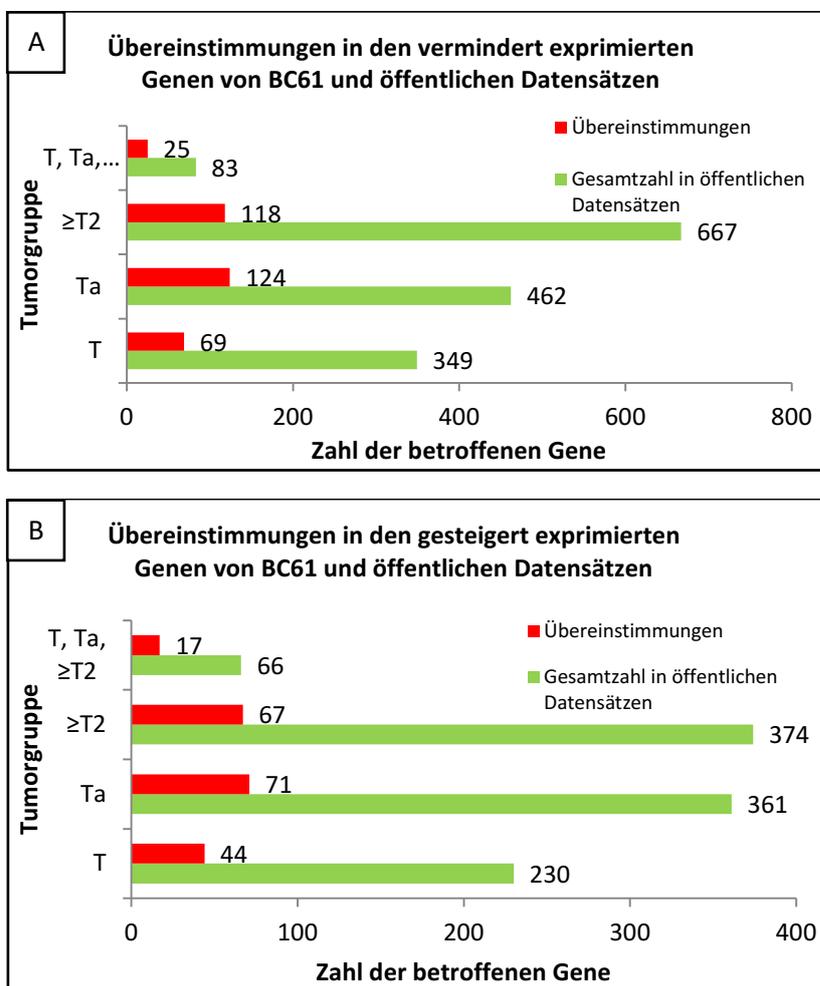
Zugewinn und gesteigerte Expression				Deletion und verminderte Expression					
ABHD12	DSN1	PFDN4	TAF4	ABCA1	DBC1	IDE	OSTF1	SIGMAR1	XPNPEP1
ACOT8	DYNLRB1	PI3	TBC1D20	ABHD10	DCAF10	IFIT5	PALM2	SLC25A28	ZBED2
ACSS1	E2F1	PIGT	TCEA2	ACTR1A	DCTN3	IFNK	PAPSS2	SLC27A4	ZCCHC6
ADA	E2F6	PIGU	TCFL5	AGTPBP1	DDX31	IKBKAP	PBX3	SLC31A1	ZCCHC7
ADNP	EBF4	PKIG	TCIRG1	AKAP2	DENND1A	IL33	PCGF5	SLC35D2	ZDHHC12
ALDH3B1	EDEM2	PLAGL2	TFAP2C	AKNA	DNAJA3	IPPK	PCGF6	SLK	ZDHHC16
ANO1	E1F2S2	PLCB1	TGIF2	ALDH18A1	DNAJB5	ISCA1	PDCD11	SMARCA2	ZFYVE27
AQP11	EPB41L1	PLK1S1	TH1L	ALDH1A1	DNMBP	ITPRIP	PDCD1LG2	SMC2	ZMYND19
ARFGEF2	ERGIC3	POFUT1	THBD	ALDH1B1	DPCD	JAK2	PDCL	SMC5	ZNF462
ASXL1	FADD	PPFIA1	TM9SF4	ALG2	DPM2	KIAA0020	PGAM1	SNAPC3	ZNF484
ATP9A	FAM110A	PPP1R3D	TP53INP2	ANP32B	DUSP5	KIAA0368	PGP	SNRNP25	ZNF598
ATRN	FER1L4	QQLC3	TP53RK	ANXA1	EDF1	KLHL9	PHF19	SORBS1	ZNF75A
B4GALT5	FERMT1	PRIC285	TPCN2	APTX	EGFL7	LDB1	PHLDB2	SPTAN1	
BCAS1	FLRT3	PRPF6	UCKL1	AQP3	ENDOG	LDLRAD3	PIGO	SPTLC1	
BCAS4	FRS2	PSMF1	UNC93B1	ARL3	ENG	LIPA	PKMYT1	SSNA1	
BLCAP	GGT7	PTPRA	VPS16	ARPC5L	EPB41L4B	LPAR1	PKN3	ST6GALNAC6	
BMP2	GINS1	PXMP4	WFDC2	AS3MT	ERP44	LRRC8A	PLAA	STAMBPL1	
BTBD3	GMEB2	RAB22A	XRN2	ASB6	EXOSC2	MAMDC2	PLIN2	STOM	
C11orf24	GNAS	RAB3IP	YEATS4	ATAD1	EXOSC3	MAN1B1	PMPCA	STOML2	
C20orf11	GPCPD1	RAE1	YTHDF1	ATP6V0C	FAM108B1	MAPKAP1	POLR1E	STXBP1	
C20orf111	GSS	RALGAPA2	YWHAB	ATP6V1G1	FAM120A	MED27	POMT1	STXBP5	
C20orf112	GSTP1	RALGAPB	ZBTB46	BICD2	FAM122A	MEGF9	PPP1R3C	SURF4	
C20orf194	GSTT1	RALY	ZGPAT	BTAF1	FAM190B	MELK	PPP6C	SURF6	
C20orf24	GTPBP5	RASSF2	ZMYND8	BTRC	FAM195A	MGEA5	PPRC1	SUSD1	
C20orf3	GZF1	RBBP9	ZNF133	C10orf2	FAM35A	MLLT3	PRPF4	TAGLN3	
C20orf4	ID1	RBM38	ZNF217	C10orf76	FANCC	MMS19	PRSS27	TCTN3	
C20orf43	IFT52	RBM39	ZNF341	C16orf5	FAS	MORN4	PRSS3	TELO2	
C20orf72	IGHMBP2	RIN2	ZNF512B	C16orf91	FBP1	MPDZ	PSIP1	TEX10	
C20orf94	ITCH	RNF114	ZNFX1	C3orf52	FBXW2	MRPL43	PSMB7	TGFB1	
CBFA2T2	JPH2	ROCK2	ZSWIM3	C9orf37	FKBP15	MRPL50	PTAR1	TJP2	
CCND1	KCNK15	ROMO1		C9orf40	FKTN	MRPS2	PTGES2	TLE4	
CCT2	KIF3B	RPN2		C9orf41	FLYWCH2	MRPS34	PTGR1	TLL2	
CDC25B	LAMA5	RRDR1B		C9orf78	FNBP1	MRRF	PTPLAD2	TM9SF3	
CDS2	LRP5	SALL4		C9orf85	FPGS	MTAP	PTPN3	TMEM141	
CEBPB	LSM14B	SAMHD1		C9orf89	FRMD3	MXI1	QSOX2	TMEM2	
CEP250	LYZ	SDC4		C9orf9	GAPVD1	NAA35	RAB32	TMEM204	
CHD6	MAFB	SDCBP2		CA9	GBGT1	NCBP1	RABEPK	TMEM38B	
CHKA	MAVS	SEC23B		CAMSAP1	GHITM	NCKAP5	RAD23B	TNC	
CHMP4B	MCM8	SLC24A3		CARD9	GLDC	NCS1	RASEF	TNFRSF12A	
CLNS1A	MDM2	SLC2A10		CCDC50	GLE1	NDUFA8	RBM18	TOR1A	
COMMD7	MKKS	SLC35C2		CD200	GLIS3	NDUFB10	RCL1	TOR1B	
CPNE1	MRPL21	SLC9A8		CD274	GLUD1	NDUFB6	REXO4	TPM2	
CPSF6	MRPS26	SLMO2		CDC26	GNAQ	NEK6	RGS3	TRAP1	
CRLS1	NANP	SLPI		CDC37L1	GPC4	NFIB	RNLS	TRIM32	
CRNKL1	NCOA3	SNHG11		CDK5RAP2	GPR107	NFX1	RNPS1	TTC39B	
CSRP2BP	NCOA5	SNRPB2		CDK9	GPR39	NIPSNAP3A	RPL12	TTF1	
CST2	NCOA6	SNTA1		CDKN2A	GRHPR	NMRAL1	RPL35	TXN	
CST3	NDUFS8	SNX21		CDKN2B	GSTO1	NOC3L	RPP30	UBAP1	
CST5	NDUFV1	SNX5		CEP55	GSTO2	NOL6	RPS2	UBAP2	
CSTF1	NFATC2	SPATA2		CKS2	GTF3C4	NOLC1	RRP12	UBE2I	
CTNBL1	NPEPL1	SPTLC3		CLTA	HABP4	NPM3	RTTN	UBE2R2	
CTSA	NSFL1C	SRC		CLUAP1	HAUS6	NTHL1	RUSC2	UBQLN1	
CTTN	NXT1	SS18L1		COL17A1	HDHD3	NUBP2	SAMD5	UHRF2	
DDR1	ORAOV1	STAU1		COQ4	HECTD2	NUDT2	SCD	UNC13B	
DDX27	OSBPL2	STK35		COX15	HIATL1	NUP188	SDCCAG3	URM1	
DHX35	OVOL2	STMN3		CTNNA1	HMOX2	NUP214	SEC16A	USMG5	
DIDO1	PANK2	SULF2		CTSL1	HPS1	OBFC1	SEMA4D	VCP	
DNAJC5	PARD6B	SUV420H1		CTSL2	HPS6	ODF2	SFXN2	VLDLR	
DNMT3B	PCIF1	SYCP2		CUEDC2	HSDL2	OLFM1	SH3PXD2A	WAPAL	
DNTTIP1	PCNA	SYS1		CUTC	IARS	OPA1	SHOC2	WDR5	

**Tabelle 15: In BC61 deletierte, zugewonnene und entsprechend differentiell exprimierte Gene.**

Deletionen und Zugewinne wurde anhand aCGH-Daten von BC61 ermittelt. Die RNA-Expression von differentiell exprimierten Genen, berechnet mit Hilfe des moderaten t-Tests bei einem p-Wert von <0,05 und adjustiert auf multiples Testen nach Bonferroni. Getestet wurde BC61 gegen primäre Urothelzellen.

## 7.5.2 Vergleich der öffentlichen Expressionsdaten mit den Expressionsdaten von BC61

Die Zelllinie BC61 stammt von einem exophytischen pTa G2 Tumor und zeigt die meisten Übereinstimmungen mit den pTa-Tumoren der öffentlichen Expressionsdaten. In der *Tabelle 16* finden sich auch die Übereinstimmungen mit den weiteren Gruppen der Expressionsanalyse der öffentlich zugänglichen Datensätze. Die Anzahl der Gene, welche in allen drei Untersuchungen der öffentlichen Expressionsdaten vorkommen und auch in den Expressionsdaten von BC61 dementsprechend verändert sind, sind in der *Abbildung 13* zu finden. Einige Gene, die in den Gruppen T, Ta und  $\geq T2$  gegenüber N beständig differentiell exprimiert vorliegen, finden sich entsprechend auch in BC61 verändert (*Tabelle 16*). Die unterstrichenen Gene in dieser Tabelle weisen zudem eine passende Deletion bzw. einen Zugewinn auf.



**Abbildung 13A/B: Gemeinsamkeiten der Expressionsdaten von BC61 und den öffentlichen Expressionsdaten.**

*Grafik a:* Übereinstimmungen der vermindert exprimierten Gene aus den Expressionsdaten von BC61 und den öffentlichen Expressionsdaten. *Grafik b:* Übereinstimmung der gesteigert exprimierten Gene aus der Expressionsanalyse von BC61 und den öffentlichen Expressionsdaten. Die Daten dieser Abbildung basieren auf den RNA-Expressionsdaten von BC61 und den sechs öffentlichen Expressionsdatensätzen. Die RNA-Expression von über- oder vermindert exprimierten Genen wurde mit Hilfe des moderaten t-Tests mit einem p-Wert von  $<0,05$  berechnet. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgewebe der Stadien pTa-Tumoren,  $\geq pT2$ -Tumoren und aller Tumorstadien mit urothelialen Normalgewebe verglichen. T: Tumor gegen Normalgewebe, Ta: pTa Tumoren gegen Normalgewebe,  $\geq T2$ :  $\geq pT2$  Tumoren gegen Normalgewebe. Rote Balken: Anzahl der Gene mit gleicher differentieller Expression in beiden Datensätzen. Grüne Balken: Anzahl aller signifikant exprimierten Gene der öffentlichen Datensätze.

Verminderte Expression		Gesteigerte Expression	
Gen	Cytoband	Gen	Cytoband
AKAP12	chr6q24-q25	CAMK2N1	chr1p36.12
<u>ALDH1B1</u>	chr9p11.1	ELF4	chrXq26
ARHGAP25	chr2p13.3	ERBB3	chr12q13
CCND2	chr12p13	FDXR	chr17q24-q25
CD44	chr11p13	FXYD3	chr19q13.12
CSRP1	chr1q32	KDEL2	chr7p22.1
DKK3	chr11p15.2	LSR	chr19q13.12
EGR1	chr5q31.1	NQO1	chr16q22.1
ESD	chr13q14.1-q14.2	PPARG	chr3p25
<u>FAS</u>	chr10q24.1	<u>PPFIA1</u>	chr11q13.3
FEZ1	chr11q24.2	<u>RPN2</u>	chr20q12-q13.1
<u>FGFR1</u>	chr8p12	SLC39A4	chr8q24.3
MGLL	chr3q21.3	SLC5A3	chr21q22.12
MICAL2	chr11p15.3	SLC5A6	chr2p23
NFATC4	chr14q11.2	SOX4	chr6p22.3
PPP3CC	chr8p21.3	TIA1	chr2p13
RGS10	chr10q25	ZNF3	chr7q22.1
SLC16A2	chrXq13.2		
SPG20	chr13q13.3		
STAT4	chr2q32.2-q32.3		
SVIL	chr10p11.2		
TGFBR2	chr3p22		
TPM1	chr15q22.1		
WWTR1	chr3q23-q24		
ZAK	chr2q24.2		

**Tabelle 16: Gene, die in T,Ta,≥T2 Tumoren gegen Normalgewebe und BC61 differentiell exprimiert sind**

Die Daten dieser Abbildung basieren auf den Expressionsdaten von BC61 und den Daten der öffentlichen Expressionsdaten. Die RNA-Expression von verstärkt oder vermindert exprimierten Genen wurde mit Hilfe des moderaten t-Test mit einem p-Wert von <0,05 berechnet. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgewebe der Stadien pTa-Tumoren, ≥pT2-Tumoren und aller Tumorstadien mit urothelialen Normalgeweben verglichen. Die aufgelisteten Gene finden sich in jeder getesteten Gruppe (TvsN, Tavsn, ≥T2vsN) der öffentlichen Expressionsdaten signifikant differentiell exprimiert. Die unterstrichenen Gene zeigen zudem eine entsprechende Chromosomenaberration in den aCGH-Daten von BC61.

### 7.5.3 Vergleich der aCGH-Daten und der Expressionsdatensätzen

Im nächsten Schritt werden nun von chromosomalen Aberrationen betroffene Gene von BC44 und BC61 mit den durchgehend differentiell exprimierten Genen der öffentlichen Datensätze verglichen. Die *Tabelle 17* listet die Übereinstimmungen der beiden Zelllinien und der konstant differentiell exprimierten Gene aus der Gruppe Tumor gegen Normalgewebe auf. In der *Tabelle 18* finden sich die Gene, die in den öffentlichen Expressionsdaten in allen Gruppen konstant differentiell exprimiert werden und zudem entsprechende Veränderungen in den aCGH-Daten der beiden Zelllinien aufweisen.

Vergleich der öffentlichen Expressionsdaten (TvsN) mit den aCGH-Daten von BC61 und BC44							
Deletion in BC61		Deletion in BC44		Zugewinn in BC61		Zugewinn in BC44	
Cytoband	Gen	Cytoband	Gen	Cytoband	Gen	Cytoband	Gen
chr1q31.3	PTPRC	chr7q36	PTPRN2	chr11q13.3	<u>PPFIA1</u>	chr1q21	MTX1
chr3p26.1	GRM7	chr7q36	RHEB	chr20 p13	SNRPB	chr1q21	VPS72
chr9p13.2	<u>ALDH1B1</u>	chr7q36.1	KCNH2	chr20q11.2	TPX2	chr1q21.2	APH1A
chr9p13.3	<u>NFX1</u>	chr7q36.1	GIMAP5	chr20q11.21	BCL2L1	chr1q21.3	FLAD1
chr9p22.3	<u>PSIP1</u>	chr8p21.2	ADAM28	chr20q11.22	<u>ERGIC3</u>	chr1q21.3	LASS2
chr9p24.1	<u>NFIB</u>	chr8p21.2	HR	chr20q11.23	<u>RPN2</u>	chr1q21.3	S100A11
chr9p24.3	<u>SMARCA2</u>	chr8p21.2	PHYHIP	chr20q13.13	CSE1L	chr1q21.3	C1orf77
chr9q13-q21	ZFAND5	chr8p21.3	BMP1	chr20q13.2	<u>ZNF217</u>	chr1q21-q22	RUSC1
chr9q21	<u>GNAQ</u>	chr8p21.3	<u>PPP3CC</u>	chr20q13.3	PTK6	chr1q21-q23	SSR2
chr9q21.2	VPS13A	chr8p21.3	SORBS3	chr20q13.31	<u>RAE1</u>	chr1q22	FDP5
chr9q21.31	<u>TLE4</u>	chr8p22	PCM1			chr1q23.2	COPA
chr9q21.33	NTRK2	chr8p22	<u>SLC7A2</u>			chr1q23.2	NCSTN
chr9q22	ROR2	chr8p23.3	<u>KBTBD11</u>			chr1q23.2	PEX19
chr9q22.3	CDC14B	chr16q23.1	WVWOX			chr1q23.3	B4GALT3
chr9q22.3	TMOD1					chr1q24.1	<u>TMCO1</u>
chr9q22.33	<u>TGFBR1</u>					chr1q24.1	UCK2
chr9q33	GSN					chr1q32.1	<u>ELF3</u>
chr9q33.2	<u>CDK5RAP2</u>					chr1q32.2	CD46
chr9q33.3	GOLGA1					chr1q32-q41	CENPF
chr9q33-q34	TRAF1					chr1q42.12	PARP1
chr9q34.1	C9orf16					chr5p13.1	NUP155
chr9q34.11	<u>SPTAN1</u>					chr5p13.2	SKP2
chr9q34.11	USP20					chr5p15.2	DAP
chr10q23.3	PTEN					chr5p15.33	TRIP13
chr10q23.31	<u>FAS</u>					chr10q21.2	CDC2
chr10q23-q24	DNTT					chr11q13.3	<u>PPFIA1</u>
chr10q24.32	<u>ARL3</u>					chr12p11.21	FAM60A
chr10q24.32	<u>BTRC</u>					chr19q12	POP4
chr10q25.2	ADD3					chr19q13.1	ZNF146
chr16p13.3	<u>UBE2I</u>					chr19q13.12	<u>FXVD3</u>
						chr19q13.12	<u>LSR</u>
						chr19q13.2	MRPS12
						chr19q13.2	PAFAH1B3
						chr19q13.2	<u>SPINT2</u>
						chr19q13.2-q13.3	<u>LIG1</u>
						chr19q13.3	RUVBL2
						chr19q13.32	AP2S1
						chr19q13.33	KDELR1
						chr19q13.43	UBE2M
						chr20q11.2	TPX2
						chr20q11.21	BCL2L1
						chr19q13.43	ZNF544

**Tabelle 17: Vergleich zwischen chromosomaler Aberration und Expression in TvsN**

Deletierte oder zugewonnene Gene mit zugehörigen chromosomalen Regionen der Zelllinien BC44 oder BC61, die entsprechende signifikante differentielle Expressionen in den sechs öffentlichen Expressionsdatensätzen aufweisen. Deletionen und Zugewinne wurde anhand aCGH-Daten ermittelt. Die RNA-Expression von verstärkt oder vermindert exprimierten Genen, berechnet mit Hilfe des moderaten t-Tests bei einem p-Wert von <0,05. Dabei wurde die Expression von urothelialen Tumorgeweben aller Stadien mit urotheliale Normalgewebe verglichen. Die unterstrichenen Gene sind in BC61 entsprechend differentiell exprimiert im Vergleich zu urothelialen Primärkulturen.

Vergleich der öffentlichen Expressionsdaten (TvsN, TavsN, ≥T2vsN) mit den aCGH-Daten von BC61 und BC44							
Deletion in BC61		Deletion in BC44		Zugewinn in BC61		Zugewinn in BC44	
Cytoband	Gen	Cytoband	Gen	Cytoband	Gen	Cytoband	Gen
chr10 q23.31	<u>FAS</u>	chr7 q36.1	KCNH2	chr11q13.3	<u>PPFIA1</u>	chr1 q21	VPS72
chr10 q25.2	ADD3	chr8 p21.3	<u>PPP3CC</u>	chr20 p13	<u>SNRPB</u>	chr1 q21	MTX1
chr9 q22	<u>ROR2</u>	chr8p21.3	SORBS3	chr20 q11.2	TPX2	chr1 q21.3	FLAD1
chr9 q33	GSN	chr16 q23.1	WWOX	chr20 q11.23	RPN2	chr1 q21-q22	RUSC1
						chr1 q22-q23	NCSTN
						chr1 q42.12	PARP1
						chr5 p13.1	NUP155
						chr5 p13	SKP2
						chr10 q21.2	CDC2
						chr11 q13.3	<u>PPFIA1</u>
						chr19 q13.2	PAFAH1B3
						chr19 q13.12	<u>LSR</u>
						chr20 q11.2	TPX2

**Tabelle 18: Vergleich zwischen chromosomaler Aberration und Expression in T, Ta und T2vsN**

In BC44 oder BC61 deletierte oder zugewonnene Gene und ihre Lokalisation mit entsprechenden signifikanten differentiellen Expressionen in allen Tumorstadien der sechs öffentlichen Expressionsdatensätze. Die aufgelisteten Gene finden sich in jeder getesteten Gruppe (TvsN, TavsN, ≥T2vsN) der öffentlichen Expressionsdaten signifikant differentiell exprimiert. Die unterstrichenen Gene finden sich zudem auch in BC61 entsprechend differentiell exprimiert.

## 7.6 Analyse aller Ergebnisse mittels der DAVID-Datenbank

Die online Plattform DAVID erlaubt es Genlisten aus Microarray-Expressionsanalysen, aCGH-Untersuchungen und ähnlichen Verfahren auf funktionelle und strukturelle Gemeinsamkeiten hin auszuwerten. Sie ist daher geeignet große Daten, wie die der aCGH-Analyse von BC44 mit mehreren tausend signifikant veränderten Genen, einfacher zu analysieren und Zusammenhänge zu erkennen. Auf der Plattform besteht die Möglichkeit bis zu 3000 Gene auf einmal zu analysieren und Angaben zu den Genen und deren Verteilung in funktionelle sowie weitere Gruppen zu erhalten. Alle Genlisten dieser Arbeit wurden wie im Methodenteil (siehe Kapitel 6.8) beschrieben untersucht; die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt aufgeführt.

### 7.6.1 Öffentliche Expressionsdaten

#### 7.6.1.1 Tumor gegen Normal

##### 7.6.1.1.1 Gesteigerte Expression

Es wurden insgesamt 230 Gene untersucht. Unter den signifikanten Termen findet sich die Lokalisation auf Chromosom 19 (26 Gene). Von insgesamt 76 signifikanten funktionellen Termen beziehen sich 46 auf die Zellteilung (u.a.: „cell division“, „cell cycle process“, „chromosome“, „mitosis“, „spindle“, „Interphase“, „kinetochore“, „chromatin binding). Andere Terme beziehen sich auf Membranbildung, ATP, Organellen, „response to DNA damage stimulus“, „DNA damage checkpoint“, „cellular response to stress“ und „ubl conjugation“.

##### 7.6.1.1.2 Verminderte Expression

Hier wurden insgesamt 349 Gene untersucht. Es findet sich keine signifikante Beziehung zu einer chromosomalen Lokalisation. Funktionell ergaben sich im Gegensatz zu den gesteigert exprimierten Genen drei größere Gruppen, die jeweils aus acht Termen bestehen. Die erste Gruppe bezieht sich auf Apoptose und Zelltod. Die zweite Gruppe bezieht sich auf exogenen Stimulus, darunter Hormone, Östrogene, organische Substanzen und Ionen. Die dritte Gruppe bezieht sich auf die Zelladhäsion und Migration. Unter den anderen beziehen sich zwei auf den MAPK-Signalweg.

#### 7.6.1.2 pTa Tumore gegen Normal

##### 7.6.1.2.1 Gesteigerte Expression

Die 361 untersuchten Gene finden sich in 38 Termen wieder. Eine gesteigerten Expression wiesen 49 Gene auf Chromosom 1, 30 auf Chromosom 12, 33 auf Chromosom 17 und 39 auf Chromosom 19 auf. Bei den funktionalen Termen beziehen sich sechs auf das Mitochondrium und drei auf Homöobox-Gene. Die Gene *HOXB2*, *HOXB7*, *HOXB6*, *HOXB5*, *HOXC4*, *HOXD3* und *HOXD4* werden in diesen Termen wiederholt aufgeführt.

##### 7.6.1.2.2 Verminderte Expression

Für insgesamt 462 untersuchte Genen finden sich 267 signifikante Terme. Die Gene *OGN*, *TGFBR1*, *ROR2*, *NR4A3* und *NFIL3* liegen alle auf 9q22 und ergeben so einen signifikanten Term. Im Term

„proto-oncogene“ werden 19 Gene aufgelistet (*MAF, ZAK, LITAF, AKAP13, NR4A3, MXI1, MEIS1, FOS, PICALM, FCGR2B, FYN, BTG1, ETS1, BCL2, ETS2, MYH11, PDGFRB, JAK2, EVI2B*). Die Jak-Stat-Kaskade ist mit 7 Genen vertreten und der MAPK-Signalweg mit 26 Genen. Viele der Terme lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen. Elf Terme beziehen sich auf den Ionenhaushalt der Zelle, darunter vor allem auf Magnesium und Calcium. Die zweite Gruppe umfasst 30 Terme, die sich alle auf die Interaktion mit internen oder externen Stoffen beziehen (Hormone, Mediatoren, Sauerstoff und Zell-Zell-Interaktion). Die dritte Gruppe umfasst 41 Terme, die sich auf Zelltod, Apoptose, Differenzierung, Zellwachstum, Zelladhäsion und Zellmigration beziehen.

### **7.6.1.3 $\geq$ pT2 Tumore gegen Normal**

#### **7.6.1.3.1 Gesteigerte Expression**

Von den 374 getesteten Genen finden sich 46 auf Chromosom 1, 28 auf Chromosom 12, 27 auf Chromosom 17 und 29 auf Chromosom 19. In 17q25 und 19q13.1 sind je vier Gene lokalisiert, in 1q21.5 und 8q24.3 je 7 Gene. Von den insgesamt 236 signifikanten Termen beziehen sich 158 auf den Zellzyklus, Mitose, DNA-Reparatur und Replikation oder auf die Zellteilung. Unter den signifikanten Termen finden sich zudem zwei mit Bezug zum p53 Signalweg.

#### **7.6.1.3.2 Verminderte Expression**

Die 667 vermindert exprimierten Gene finden sich in 184 signifikanten Termen wieder. Unter den getesteten Genen finden sich 43 allein auf Chromosom 5. In Hinblick darauf, dass es sich hier um RNA von fortgeschrittenen Tumoren handelt, ist es nicht verwunderlich, dass Gene betroffen sind, welche in Terme wie „proto-oncogene“, „pathways in cancer“, „Wnt signaling pathway“ und „MAPK signaling pathway“ eingeordnet sind. Auch finden sich unter den vermindert exprimierten Genen 14, die im Zusammenhang mit der Entwicklung des urogenitalen Systems stehen sollen (*BMP2, TGFBR1, ARID5B, NID1, ZBTB16, WWTR1, AGTR1, ALDH1A2, SPRY1, GPC3, CD44, BCL2, ITGA8, PKD2, PDGFRB, PCSK5*). Weitere funktionelle Terme lassen sich in Gruppen zusammenfassen: 30 Terme beziehen sich auf die Differenzierung und das Zellwachstum. 13 Terme auf die Apoptose und den Zelltod und 25 Terme auf Reaktion auf exogenen Faktoren wie Hormone, Hypoxie, Zytokine, Verletzung, Entzündung inklusive den dazugehörigen Signalkaskaden. Die letzte Gruppe bezieht sich auf Migration, Motilität und Adhäsion.

### **7.6.1.4 Gene, die in T, pTa und $\geq$ pT2 Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe verändert vorliegen.**

#### **7.6.1.4.1 Gesteigerte Expression**

Bei insgesamt 66 verminderten Genen finden sich acht signifikante Terme. Diese beziehen sich vor allem auf Gene, die im Zusammenhang mit der Bildung von Organellen gebracht werden. Des Weiteren sind 11 Gene auf Chromosom 17 zu finden (*STRA13, EVPL, PSMB3, NARF, FDXR, TRIM25, BIRC5, CYB561, TOP2A, ETV4, TK1*).

#### 7.6.1.4.2 Vermindert Expression

Die insgesamt 83 vermindert exprimierten Gene finden sich in 21 signifikanten Termen wieder. Die beiden Terme „MAPK signaling pathway“ und „disease mutation“ sind dabei die auffälligsten.

#### 7.6.1.5 pTa Tumore gegen $\geq$ pT2 Tumoren

Hierbei gilt zu beachten, dass Gene, die in pTa-Tumoren vermindert vorliegen, automatisch in  $\geq$ pT2 Tumoren gesteigert exprimiert sind. Wenn also im folgendem von gesteigerter oder verminderter Expression gesprochen wird, geschieht dies aus der Perspektive der pTa-Tumoren.

##### 7.6.1.5.1 Gesteigerte Expression

Hier wurden 1004 Gene untersucht und 76 signifikante Terme gefunden. Auf Chromosom 4 und 5 finden sich jeweils 63 Gene, auf Chromosom 10 sind es 62, auf Chromosom 15 61 und auf Chromosom 16 sind es 55 Gene. Auf Chromosom 15 sind 14 Gene im Bereich 15q22-23 lokalisiert. Viele Terme fassen Gene zusammen, die in Zusammenhang mit Organellen stehen, vor allem mit Mitochondrien, Ribosomen und Peroxisomen.

##### 7.6.1.5.2 Verminderte Expression

In diesem Fall wurden 732 Gene untersucht, die 362 signifikante Terme darstellen. Unter dem Term „proto-oncogene“ werden 21 Gene aufgelistet und unter „tumor suppressor“ 13 Gene. Auf 6p21.3 finden sich 25 Gene, die aus Sicht der pTa-Tumoren vermindert exprimiert vorliegen. Die hier aufgelisteten Terme lassen sich in drei Gruppen aufteilen. Die größte Gruppe bezieht sich auf den Zellzyklus, die Mitose, die DNA-Replikation und -Reparatur. Hier werden zusammen rund 100 Gene genannt. Eine kleine Gruppe von 10 Termen umfasst Themen wie Adhäsion, Differenzierung und Migration. Eine weitere Gruppe bezieht sich auf die Reaktion auf exogene Einflussfaktoren, dabei vor allem im Zusammenhang mit Immunreaktionen (44 Terme). Interessanterweise wird der Term des Ehlers-Danlos-Syndroms aufgelistet. Dazu passend finden sich weitere Terme der Kollagenbiosynthese.

### 7.6.2 DAVID Analyse der aCGH-Daten

#### 7.6.2.1 BC44

##### 7.6.2.1.1 Deletionen

Im Großen und Ganzen besteht das Ergebnis dieser Analyse nur aus Chromosomen und Cytobands. Neben dem Term, der sich auf *CDKN2A/B* und *CDK5* bezieht, findet sich noch einer mit Bezug auf *AIG1*. Auf Chromosom 7 finden sich 84 Gene, auf Chromosom 8 111 und auf Chromosom 15 33 von insgesamt 305 untersuchten Genen. Die meisten teilen sich auf folgende Cytobands auf: 15q11–q13, 7q35–36.3, 8p21-p23.3. Die restlichen Terme werden von den homozygot deletierten Defensine und CDK-Inhibitoren maßgeblich bestimmt.

#### 7.6.2.1.2 Zugewinne

Von den 2001 Genen, die von einem Zugewinn betroffen sind, liegen 686 auf Chromosom 1, vor allem von 1q12 bis 1q42 - in diesem Intervall liegen die meisten auf 1q22 und 1q32.1. Auf Chromosom 5p12–p15.33 finden sich 138 Gene. Auf Chromosom 10 sind es 105 Gene, die zum größten Teil auf 10p11 zu finden sind. Auf Chromosom 19 sind 705 Gene von einem Zugewinn betroffen und davon die meisten auf 19q13. Auf Chromosom 20 finden sich 90 Gene. Die am stärksten betroffene Region ist 20q11.21. Auf Chromosom X sind 220 Gene betroffen. Da in BC44 318 Zinkfinger-Gene einen chromosomalen Zugewinn aufweisen, finden sich hierzu viele Terme. Ungefähr 20 Gene der Keratinozyten-Differenzierung werden in Terme zusammengefasst. Es sind zudem einige Gene verändert, die einen Einfluss auf Oberflächenantigene haben.

#### 7.6.2.1.3 Homozygote Deletionen

Es gibt 187 Gene, die in BC44 homozygot deletiert vorliegen. Davon liegen allein 147 auf Chromosom 8, und davon die meisten auf 8p23.1 (46) und 8p21.3 (24). Alle funktionalen Terme beziehen sich auf Defensine oder *CDKN2A*, *CDKN2B*, *C9ORF53* und *CDKN2BAS*.

#### 7.6.2.1.4 Amplifikationen

Die einzige Amplifikation von BC44 findet sich auf 11q12–q13. Die Gene *FGF19*, *CCND1*, *FADD*, *FGF3*, *FGF4*, *SAP53* und *MYEOV* werden durch die Terme „hsa05218:Melanoma“ und „hsa05200:Pathways in cancer“ charakterisiert.

### 7.6.2.2 BC61

#### 7.6.2.2.1 Deletionen

1075 Gene wurden mit DAVID analysiert. Neben zahlreichen Termen, die sich auf die Lokalisation der Gene beziehen, finden sich drei weitere. Der erste Term listet Gene auf, die alternativ gespleißt werden, der zweite bezieht sich auf Lipocalin und der dritte auf Steroyl ester-Lipase. Allein auf Chromosom 9 finden sich 634 untersuchte Gene. Die am stärksten betroffenen Regionen sind 9p13.3 9q32 und 9q33–q34. Auf Chromosom 10 finden sich 214 Gene und auf Chromosom 16 149. Außerdem sind 139 Gene auf 16p13.3 lokalisiert.

#### 7.6.2.2.2 Zugewinne

Von den 552 zugewonnenen Genen finden sich 491 auf Chromosom 20, dort vor allem in den Regionen 20p13 (57), 20q11.21 (25), 20q13 (30), 20q13.33 (42). Ansonsten finden sich noch auf 11q13 und 12q15 einige zugewonnene Gene. Außerdem beziehen sich viele Terme auf Protease-Inhibitor-Gene, z.B. Proteinase Inhibitor I25 und *WFDC*-Gene.

#### 7.6.2.2.3 Homozygote Deletionen

Die meisten der 27 homozygot deletierten Gene in BC61 sind auf Chromosom 9 zu finden; dies zeigt auch die DAVID-Analyse. Da hier viele Interferon-Gene betroffen sind, werden hierzu auch viele Terme angezeigt, darunter der Toll-like Rezeptor Signalweg, der RIG-I-like Signalweg und der Jak-

STAT Signalweg. Die zweite Fraktion der Terme bezieht sich auf die CDK-Inhibitor-Gene *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDKN2BAS*.

#### 7.6.2.2.4 Amplifikationen

Die 42 Gene, die in BC61 von einer Amplifikation betroffen sind, verteilen sich auf 11q13.2–q13.3 (19) und 12q15 (6). Sowohl FGF-Gene als auch *MDM2*, *CCND1* und *FADD* erscheinen in den Terme „Melanoma“ und „Pathway in cancer“.

### 7.6.2.3 Gene, die sowohl in BC44 als auch in BC61 einer chromosomalen Veränderung unterliegen

#### 7.6.2.3.1 Deletionen und homozygote Deletionen

Alle Terme aus der Analyse der 11 Gene der Deletionen und homozygote Deletionen beziehen sich auf *CDKN2A*, *CDKN2B*, *ELAVL2* und *C9ORF53*, die alle auf 9p21 liegen.

#### 7.6.2.3.2 Zugewinne

Von den 115 zugewonnenen Genen finden sich zwei Terme, die sich auf *BPI1* (*Bactericidal permeability-increasing protein*) und *BPI2* beziehen. Die restlichen Terme beziehen sich auf die Lokalisation der Gene. Dabei liegen 90 Gene auf Chromosom 20 und 19 auf Chromosom 11.

#### 7.6.2.3.3 Amplifikationen

Alle 20 amplifizierten Gene befinden sich auf 11q13.2–q13.3. Ausschlaggebend für die Terme sind die FGF-Gene, *CCND1*, *SAPS3* und *MYEOV*.

### 7.6.3 DAVID Analyse der Expressionsdaten von BC61 und deren Gemeinsamkeiten mit den aCGH-Daten

#### 7.6.3.1.1 Vermindert exprimierte Gene

2568 Gene wurden hier mit Hilfe von DAVID analysiert und 141 Terme hatten einen adjustierten p-Wert <0,05. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass 287 Gene auf Chromosom 1 zu finden sind, von denen 10 auf 1p22.1 und 16 auf 1q21 liegen. 158 Gene befinden sich auf Chromosom 3, 184 auf Chromosom 5, davon finden sich 21 auf 5q31. Auf Chromosom 9 finden sich 230 der vermindert exprimierten Gene. Diese finden sich dort gehäuft auf 9p13.3 und 9q34. Auf Chromosom 10 finden sich 171 Gene, von denen 10 auf 10q24.32 liegen. Auf Chromosom 11 sind 177 Gene betroffen. Diese finden sich vor allem auf 11p13 und 11q21. 38 vermindert exprimierte Gene finden sich auf 16p13.3. Bei den funktionellen Termen fällt auf, dass sich viele Gene auf die Translation beziehen, hier vor allem auf die Ribosomen. Auch finden sich mehrere Terme mit Genen, die einen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen haben. Die Ribosomen sind jedoch nicht die einzigen betroffenen Organellen, sondern auch die Mitochondrien und der Golgi-Apparat.

Unter den Top 100 vermindert exprimierten Genen von BC61 finden sich 5 Terme, die sich auf extrazelluläre Aufgaben beziehen. Zudem finden sich einige Gene aus diesen Termen in den Termen „signal“, „secreted“ und „disulfide bond“ wieder. *CDH13*, *LDLR*, *FHL1*, *FST*, *HLA-C*, *SPARC* und *TFPI2* werden unter den Term „SP\_PIR\_KEYWORDS duplication“ aufgelistet.

#### 7.6.3.1.2 Gesteigert exprimierte Gene

2891 Gene sind in BC61 verstärkt exprimiert und finden sich in 121 signifikanten Termen. In der Analyse hat sich gezeigt, dass 231 Gene auf Chromosom 2 liegen, davon finden sich 15 auf 2p11.2. Auf Chromosom 12 befinden sich 179 Gene, auf Chromosom 13 73, auf Chromosom 19 215 und auf Chromosom 20 187. Genauer betrachtet, finden sich gehäuft Gene auf 19q13.2 (28), 19q13.31 (20), 20q11.22 (11) und auf 20q13.33 (18). Viele Gene finden sich in Termen, die sich auf die Transkription beziehen. Darunter stellen die Zinkfinger-Gene eine größere Gruppe der insgesamt 787 betroffenen Gene. Es werden auch sechs Terme aufgelistet, die sich auf den Zelltod und die Apoptose beziehen. Außerdem finden sich im Term „tumor suppressor“ 34 Gene.

Unter den 100 stärksten exprimierten Gene in BC61 (gemessen am *Fold Change*), finden sich Transkriptionsfaktoren der *Forkhead Box* Gruppe (*FOX*). Weitere Terme beziehen sich auf die Reaktion auf exogene Stimuli. Ein Beispiel stellen die Defensine („defense response“) dar.

#### 7.6.3.1.3 Vermindert exprimierte Gene, die in BC61 deletiert vorliegen

Hier wurden 312 Gene getestet; dabei wurde nur Terme über die Lokalisation aufgelistet. 31 Gene befinden sich auf Chromosom 9 und 14 Gene befinden sich auf Chromosom 10.

#### 7.6.3.1.4 Gesteigert exprimierte Gene, die in B61 zugewonnen sind

Von 210 Genen, die sowohl einen Zugewinn haben, als auch stärker exprimiert werden, sind insgesamt 25 auch amplifiziert. 179 Gene liegen dabei auf Chromosom 20. 74 Gene werden unter dem Term „nucleus“ zusammengefasst und 107 unter „phosphoprotein“. Die amplifizierten Gene befinden sich alle auf 11q13.2 – q13.3.

### 7.6.4 DAVID Analyse der Gemeinsamkeiten zwischen aCGH-Daten und öffentlichen Expressionsdaten

Hier stellt sich heraus, dass zu wenige Gene ermittelt wurden, um signifikante Ergebnisse nach Adjustierung zu erhalten. Die meisten Ergebnisse mit einem p-Wert von  $<0,05$  beziehen sich auf die Lokalisation. Insgesamt gibt es nur zwei Terme mit funktionalem Bezug, nämlich „Intracellular trafficking and secretion“ und „h\_p27Pathway:Regulation of p27 Phosphorylation during Cell Cycle Progression“. Der erste Term gilt für *STXBP1* und *VPS13A*, die in BC61 deletiert vorliegen und in TvsN vermindert exprimiert werden. Der zweite Term gilt für die Gene *E2F1*, *CCNE1*, *UBE2M* und *SKP2*, die in BC44 zugewonnen sind und in TvsN verstärkt exprimiert werden.

## 8 Diskussion

Diese Arbeit basiert im Wesentlichen auf den Ergebnissen der UC-Zelllinien BC44 und BC61. Was hier für zwei Zelllinien durchgeführt wurde, wird bzw. wurde in aktuellen Studien für die vielfache Zahl an Proben durchgeführt. Dabei gilt das Ziel so viel wie möglich über die Veränderungen in Tumorzellen in Erfahrung zu bringen um das resultierende Wissen letztendlich therapeutisch anzuwenden. Ein Beispiel ist die bereits erwähnte TCGA-Studie. Führt man sich vor Augen, dass alle Daten zu den 402 UC-Proben der TCGA-Studie zusammen 307,584 GB an Daten ausmachen, gelangt man schnell zu einem Problem, nämlich die Auswertung und Anwendung solcher Daten. Diese Probleme finden sich auch in dieser Arbeit wieder, obwohl die Daten hier mit 1,4 GB vergleichsweise gering ausfallen.

Auch wenn man in Zukunft dieses Problem bewältigt haben wird, wird man letzten Endes die neu gewonnenen Erkenntnisse am lebendigen Modell testen müssen, um anwendbare Aussagen zum UC zu erhalten. Es gibt weltweit eine ganze Reihe gut etablierter UC-Zelllinien, in denen aber nicht alle Subtypen gut repräsentiert sind, vor allem nicht die papillären Low Grade Tumoren. So ist vor allem BC61 sehr spannend. Um effektiv mit BC44 und BC61 arbeiten zu können, ist es wichtig so viel wie möglich über sie zu wissen. Deshalb steht in dieser Arbeit die Analyse der beiden Zelllinien im Vordergrund. Dazu wurden beide Zelllinien mit Hilfe der spektralen Karyotypisierung und der aCGH untersucht. Zudem wurde von BC61 die Genexpression bestimmt. Um Veränderungen von Genen besser bewerten zu können, wurden die Ergebnisse mit sechs öffentlichen Expressionsdatensätzen verglichen. Die Erkenntnisse aus den sechs öffentlich zugänglichen Expressionsdatensätzen wurden zusammen mit den Daten der beiden Zelllinien genutzt, um typische veränderte Gene im UC zu identifizieren. Daher soll die Diskussion sich an den folgenden Zielen orientieren:

1. Eine molekulargenetische Analyse beider Zelllinien mit Hilfe der Karyotypisierungen, aCGH- und Expressionsdaten.
2. Die Identifikation von Genen, die in BC44, BC61 und in den öffentlichen Expressionsdaten gleichsinnig verändert sind und so für das UC allgemein gültig sein könnten.

### 8.1 Karyotypisierung

Die spektrale Karyotypisierung bietet einen ersten Eindruck vom genetischen Zustand der beiden Zelllinien. So fällt sofort der abnormale Karyotyp der beiden Zelllinien auf. Wie es von einem nicht-invasiven genetisch stabilen papillären Low Grade Tumor zu erwarten ist, zeigt BC61 neben einer durchgehenden Tetraploidie nur in drei Chromosomen (5, 10, 19) tiefgreifende strukturelle Veränderungen. BC44 ist ein genetisch instabiler muskelinvasiver Tumor mit nur sechs Chromosomen (12, 13, 14, 15, 20, 21, 22), die frei von Aberrationen sind.

Die häufigste und eher initiale Veränderung des UC, der Verlust von einem oder beiden Armen des Chromosoms 9 [8, 17, 26-28], findet sich in beiden Zelllinien. In BC44 ist in einem von drei

Chromosomen 9 der kurze Arm durch eine Insertion von 9q10 deletiert. In BC61 sind nur zwei Chromosomen 9 vorhanden, während der Chromosomensatz insgesamt tetraploid vorliegt. Interessanterweise findet man in beiden Zelllinien ein identisches Isochromosom  $i(5)(p10)$  mit einhergehendem Verlust von 5q und gleichzeitigem Zugewinn von 5p. In BC44 ist nur ein Chromosom 5 von dieser Veränderung betroffen, in BC61 sind es zwei. Es zeigt sich weiterhin, dass sowohl BC44 als auch BC61 Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 10 vorzuweisen haben. In BC61 finden sich nur drei Chromosomen 10, von denen eins eine Deletion ab 10q21 aufweist. Auf Seiten von BC44 finden sich drei stark veränderte Chromosomen 10, eins mit einer Translokation ab Chr10q10 und dem entsprechendem Verlust von 10p. Das andere dizentrische homologe Paar von Chromosom 10 setzt sich aus Chr3q10 und Chr10q10 zusammen. Zudem findet sich eine Translokation von Chr8q11 an Chr10q11. Die Chromosomen 2, 12, 13, 14, 15, 21 und 22 sind in beiden Zelllinien aus Sicht der spektralen Karyotypisierung, abgesehen von der Polyploidie, nicht verändert.

### **8.1.1 Vermutung über den zeitlichen Ablauf der Chromosomenaberrationen von BC61 und BC44.**

In den chromosomalen Veränderungen der Zelllinien finden sich Hinweise, die Rückschlüsse auf die zeitliche Abfolge der Aberrationen zulassen. Die Veränderungen von BC61 lassen vermuten, dass es zuerst zu Veränderungen von Chromosom 5 und 9 gekommen ist, im Anschluss zur Verdopplung des Chromosomensatzes und erst danach zu den weiteren Veränderungen. Begründen kann man diese Theorie damit, dass BC61 für das Chromosom 5 jeweils zwei unterschiedliche homologe Paare aufweist. Davon ist ein Paar unverändert und das andere Paar zeigt zwei Isochromosomen ( $i(5)(p10)$ ). Es ist wahrscheinlicher, dass es vor der Tetraploidisierung zu der Bildung dieses Isochromosoms gekommen ist, als danach zweimal zu einer identischen Aberration. Genau so lässt sich auch die Veränderung von Chromosom 9 deuten. Dies passt sehr gut zu der Annahme, dass Verluste oder Monosomien von Chromosom 9 eine initiale Veränderung im UC darstellen [26]. Auch die Umlagerung  $i5p$  gehört zu den häufigeren Veränderungen im UC [42]. Die weiteren Deletionen, die sich nur in einzelnen Chromosomen (4, 6, 10, 11, 17) finden, würden nach dieser Hypothese erst nach der Tetraploidisierung stattgefunden haben.

Im Fall von BC44 ist es weitaus komplizierter Aussagen über die Abfolge der Veränderungen zu treffen. Fest steht, dass BC44 im Prinzip triploid ist und darüber hinaus eine große Zahl an numerischen und strukturellen Chromosomenveränderungen aufweist. Es bestehen grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten, wie es dazu gekommen ist. Die erste basiert auf einer vorangegangene Tetraploidisierung, die durch zahlreiche nachfolgende Deletionen letztendlich zu einem triploiden Chromosomensatz geführt hat. Der Verlauf wäre dann ähnlich wie in BC61, jedoch weitergehend. Eine andere Erklärung ist eine Art asymmetrische Zellteilung. Dabei muss es nach der Duplikation und vor der Zellteilung zu einer Fehlverteilung gekommen sein, so dass eine Zelle einen monoploiden Chromosomensatz aufweist und die andere einen triploiden Chromosomensatz. Gegen

die erste Annahme spricht, dass es zu viele starke Veränderungen gibt, die nur eines von drei Chromosomen betreffen. Dieser Befund spricht eher dafür, dass ein schon zerstörter Chromosomensatz wieder zusammengesetzt und in ein „gesundes“ Genom integriert wurde. Dazu passen die Veränderungen der Chromosomen 4, 5, 6, 11, 10, 17 und X. Denn diese haben jeweils zwei homologe Chromosomen, die nicht verändert sind, und weisen jeweils eine weitere Kopie auf, welche starke Veränderungen wie Translokationen zeigt. Problematisch wird diese Erklärung bei den Chromosomen 1, 3, 7, 8, 10, 18, 19. Das Chromosom 1 besteht aus drei verschiedenen Chromosomen. Zwei von drei sind komplexe Translokationen eingegangen, das dritte Chromosom 1 nur eine Deletion. Diese Veränderungen lassen sich nicht plausibel in eine zeitliche Reihenfolge bringen. Dasselbe gilt auch für Chromosom 3. Es besteht nur noch aus einem homologen Paar, das sich tatsächlich aus den Chromosomen 10 und 3 zusammensetzt. Es könnte natürlich sein, dass diese Veränderung schon vor der Triploidisierung geschehen ist. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass hier Chromosomen verloren gegangen sind und die jetzt verbleibenden aus der gescheiterten Zellteilung stammen. Es fehlt ein Chromosom 8, dafür finden sich Teile davon an anderen, sehr zerklüfteten Chromosomen, was nach dieser Theorie bedeutet, dass das eigentlich gesunde Chromosom 8 komplett verloren gegangen ist. Den Zustand von Chromosom 18 kann man erklären, wenn man eine Deletion eines gesunden Chromosoms als Erklärung in Betracht zieht. All diese Annahmen sind spekulativ und bei weitem nicht so schlüssig wie im Fall von BC61. Insgesamt lässt sich der Karyotyp von BC44 als Ergebnis erheblicher genetischer Instabilität werten und entspricht somit den Erwartungen für ein high grade invasives UC.

## **8.2 Array komparative genetische Hybridisierung von BC44 und BC61**

Im Gegensatz zur spektralen Karyotypisierung bietet die Untersuchung mit der aCGH eine größere Auflösung, nämlich eine von median 13 kb im Abstand der 60 Nukleotide großen Sonden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass man nur eine Aussage über die Menge von DNA-Abschnitten (Genkopienzahl) machen kann, jedoch nicht über deren Lokalisation. So können z.B. keine Translokationen mit dieser Methode dargestellt werden. Wie im Abschnitt Methoden detailliert, werden in dieser Arbeit Deletionen, homozygote Deletionen, Zugewinne und Amplifikationen unterschieden (siehe Kapitel 6.5).

### **8.2.1 Ergebnisse der Karyotypisierung und aCGH im Vergleich**

In BC44 finden sich 307 Gene, die von einer Deletion betroffen sind. Von diesen sind 187 Gene homozygot deletiert. Von einem Zugewinn sind in BC44 2001 Gene betroffen und von einer Amplifikation 21 Gene. In BC61 finden sich 1075 deletierte Gene und von denen sind 43 homozygot deletiert. Kopien zugewonnen haben in BC61 552 Gene, von denen 42 eine Amplifikation zeigen. Auch in dieser Beziehung weist BC44 größere Veränderungen als BC61 auf, entsprechend den Erwartungen. Interessanterweise sind in BC44 deutlich mehr homozygote Deletionen zu finden,

obwohl BC61 gut ein Drittel mehr Deletionen aufweist. Umgekehrt hat BC44 weitaus mehr Zugewinne, jedoch weniger Amplifikationen als BC61. Die DAVID-Analyse ergibt ebenfalls, dass in BC44 signifikant viele Gene auf Chromosom 7, 8 und 15 deletiert sind. Unter den Genen, die in BC61 von einer Deletion betroffen sind, finden sich signifikant viele auf Chromosom 9, 10 und 16. In BC44 sind von 187 homozygot deletierten Genen allein 147 auf dem Chromosom 8 lokalisiert und dort vor allem auf 8p23.1 und 8p21.3. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der Karyotypisierung überein. Passend zum Karyotyp zeigt BC61 die meisten homozygot deletierten Gene auf Chromosom 9. Genauer finden sich auf dem Chromosom 9 von BC61 11 homozygot deletierte Gene. Von diesen 11 Genen, sind 4 auch in BC44 homozygot deletiert, welche alle auf Chromosom 9p21 lokalisiert sind. Dies entspricht der allgemeinen Annahme, da die Deletion 9p in sehr vielen UC vorkommt. In BC44 finden sich allein 686 Gene mit Zugewinnen auf Chromosom 1, 705 auf Chromosom 19 und 220 auf dem Chromosom X. Im Fall von BC61 finden sich von 552 zugewonnenen Genen 491 auf Chromosom 20. Auch dies entspricht dem Ergebnis der Karyotypisierung. In beiden Zelllinien gemeinsam finden sich 115 Gene mit einer gesteigerten Kopienzahl, darunter 20 amplifizierte Gene; 90 der 115 gemeinsamen Gene sind auf Chromosom 20 lokalisiert. Eine sehr interessante Übereinstimmung zwischen den beiden Zelllinien ist die Amplifikation von Chromosom 11, die einzige Amplifikation von BC44, die sich als solche auch in BC61 wiederfindet. Lediglich Start- und Endpunkt und somit auch die Größe sind unterschiedlich. Alle gemeinsam amplifizierten Gene der beiden Zelllinien stammen aus diesen Amplifikationen. BC61 zeigt noch weitere Amplifikationen, darunter eine auf Chromosom 12.

### **8.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von BC44 und BC61 anhand der aCGH**

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der aCGH-Daten unter Einbeziehung der weiteren Ergebnisse diskutiert werden. Um zu erkennen, inwieweit die Veränderungen der beiden Zelllinien einen Vorteil für sie erbringen, wird die Funktion und die Aufgabe der von den Veränderungen betroffenen Gene näher beschrieben.

#### **8.3.1 Chromosom 9**

BC44 und BC61 vertreten zwei Hauptgruppen der UC und sind dementsprechend recht unterschiedlich. Dennoch zeigen sich Gemeinsamkeiten. So weisen beide eine Veränderung von Chromosom 9 auf, einschließlich einer homozygoten Deletion im kurzen Arm. Im Fall von BC44 beginnt die erste Sonde dieser homozygoten Deletion bei Bp 21.902.814 und die letzte endet bei 23.818.045; sie umfasst somit eine Region von 1,9 Mbp. Im Fall von BC61 ist die Region 1,1 Mbp groß, wobei diese homozygote Deletion bei Bp 21.218.548 beginnt und bei 22.356.466 endet. Demnach liegt eine Überschneidung dieser beiden Aberrationen von Bp 21.902.814 bis 22.356.466 vor. In dieser 0,45 Mbp umspannenden Region finden sich die Gene *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2BAS* und *C9orf53*. Ein Blick auf deren Funktion verrät, warum diese Deletion entscheidend für die Entwicklung von Tumoren ist. Dabei stehen vor allem die gut bekannten und erforschten

Tumorsuppressorgene *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* und *Cyclin dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2B)* im Zentrum. Ihre Genprodukte p16<sup>INK4A</sup> und p15<sup>INK4A</sup> nehmen eine zentrale Stellung in der Zellzykluskontrolle ein und kontrollieren besonders den Durchgang durch die G1-Phase. Ein alternatives Genprodukt des *CDKN2A* Locus ist p14<sup>ARF</sup>, das über MDM2 die Aktivität von p53 reguliert.

Die Kontrolle des Zellzyklus ist für Tumorzellen und im speziellen für das UC entscheidend. So weisen 93% aller UC Veränderungen von Zellzyklusgenen auf [17]. Auch BC44 und BC61 entsprechen diesem Muster, denn in den aCGH-Daten zeigen acht Zellzyklusgene (*CDKN2B*, *CDKN2A*, *ELAVL2*, *BCL2L1*, *PDRG1*, *TPX2*, *E2F1*, *CCND1*) in beiden Zelllinien Kopienzahländerungen. Zudem sind sechs weitere in BC61 (*CKS2*, *GPR39*, *YWHAB*, *MDM2*, *RSF1*, *PTEN*) und elf weitere in BC44 (*TNKS*, *PINX1*, *ZDHHC2*, *LZTS1*, *DLC1*, *RHOBTB2*, *PIWIL2*, *SKP2*, *BTG2*, *CCNE1*, *CDC2*) von signifikanten Aberrationen betroffen. In der Expressionsanalyse von BC61 zeigen viele weitere Gene des Zellzyklus signifikante Veränderungen (insgesamt: *BTG2*, *ELF4*, *TNKS*, *CDKN1B*, *DDB2*, *SKP2*, *CCNB1*, *CKS2*, *ZDHHC2*, *PINX1*, *MYC*, *E2F1*, *CCND1*, *MDM2*, *YWHAB*, *CDKN2B*, *CDKN2A*, *CKS2*, *GPR39*).

Gerade die UC des dysplastischen Entstehungswegs weisen fast alle eine Mutation von mindestens einem Allel von p53 auf. Gleichzeitige Störungen der Zellzykluskontrolle und der Aktivität von p53 sind typisch für muskelinvasive UC [42, 65]. Auch BC44 entspricht diesem Muster, denn neben der beschriebenen Beeinflussung des RB1/p16/CDK4-Systems ist auch p53 verändert. Dabei findet sich in BC44 ein ungewöhnlicher Mechanismus der p53-Inaktivierung. P53 wird hier nämlich nur als Isoform p53 $\Delta$ 133 mit einer fehlenden aminoterminalen Transaktivierungsdomäne transkribiert [49]. Neben der direkten Veränderung von p53 kann dessen Funktion durch Deletionen von *CDKN2A/p14<sup>ARF</sup>*, oder durch eine Amplifikation von *MDM2* [66] (oder vermutlich *MDM4*) beeinträchtigt werden. Beides trifft für BC61 zu. Hier findet sich p53 zwar wildtypisch, aber *MDM2* ist amplifiziert und gesteigert exprimiert.

Zudem ist *CDKN2B-AS* homozygot deletiert. *CDKN2B-AS*, auch bekannt als *ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus)*, ist eine antisense nicht-codierende RNA, die auch in dem Cluster von *CDKN2A/CDKN2B* zu finden ist. *ANRIL* steht im Zusammenhang mit dem Zellzyklus, der Seneszenz und stressinduzierter Apoptose von Tumoren, indem es unter anderem über epigenetische Regulation die Expression von *CDKN2B* beeinflussen kann [67]. In BC44 und BC61 schließt die gemeinsame homozygote Deletion von 9p21 auch *CDKN2B* ein. *CDKN2B* kodiert für p15<sup>INK4B</sup>, welches über die Hemmung von CDK4 die Phosphorylierung von RB1 verhindert und somit auch als Tumorsuppressor auf den G1-Checkpoint wirkt [68]. Das Tumorsuppressorgen *ELAVL2* (9p21) ist ein weiteres Gen, das den G1-Checkpoint beeinflusst und in beiden Zelllinien verändert vorliegt. Es liegt nicht im überlappenden Bereich der homozygoten Deletion, sondern findet sich in BC44 homozygot und in BC61 einfach deletiert. Untersuchungen zu *ELAVL2* wurde bereits für Blasen Tumoren und

andere Tumoren veröffentlicht. Es gehört zu der Hu-Familie der RNA-bindenden Proteine, die an der posttranskriptionellen Regulation und Modifikation der RNA beteiligt sind. Neben vielen anderen mRNAs beeinflusst *ELAVL2* die des CDK-Inhibitors  $p21^{CIP1}$ , wodurch die Deletion von *ELAVL2* das Passieren des G1-Checkpoints fördert [29].

Neben den gemeinsamen homozygot deletierten Genen sind in BC44 noch zwei weitere Gene im Bereich 9p21 von dieser Veränderung betroffen; in BC61 sind es 14 weitere Gene. Nimmt man an, dass eine Kopienzahländerung der DNA ein Indiz für die Lokalisation von Tumorsuppressorgenen bzw. Onkogenen ist, stellt sich die Frage, ob – ungeachtet der bekannten tumorsupprimierenden Wirkung von *CDKN2A* - der kanzerogene Effekt der Deletion 9p21-22 wirklich nur von diesem Gen ausgeht. Diese Fragestellung lässt sich auf andere auffällige aberrante Regionen in den Zelllinien ausdehnen. Um sie besser beantworten zu können, bedarf es einer näheren Betrachtung der jeweils betroffenen Gene.

In BC61 sind neben den schon diskutierten Genen von 9p21 folgende Gene homozygot deletiert: *IFNA2*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA8*, *IFNE*, *IFNA13*, *KLHL9*, *GKAP1*, *KIF27*, *UBQLN1*, *MTAP* und *MIR31*. Die sechs Interferone kodierenden Gene *IFNA2*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA8*, *IFNE*, *IFNA13* liegen direkt beieinander. Interferone sind Glykoproteine, die meist von viral befallenen Zellen gebildet werden und an extrazelluläre Interferon-Rezeptoren binden. Über den JAK-STAT Signalweg haben sie einen vielfältigen Einfluss auf Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung der Zelle und können zu einer Apoptose führen. Weiterhin werden drei Hauptklassen unterschieden: Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$  und Interferon- $\gamma$  [69]. Die in BC61 homozygot deletierten Gene kodieren, bis auf *IFNE*, für den Interferon- $\alpha$  Typ. Wegen ihrer Lokalisierung auf 9p22 gehören sie zu den am häufigsten deletierten Genen im UC. Dennoch finden sich in der Literatur nur wenige bis keine Angaben über ihre Bedeutung im UC [29, 70]. Interferon- $\alpha$  wird oft mit der postoperativen BCG-Installation zusammen gegeben, um die Rezidivrate und die Nebenwirkungen durch eine Dosisreduktion zu senken [71]. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Verlust von Interferon-Genen für das UC tumorfördernd sein könnte.

*KLHL9* kodiert für das Kelch-Protein *kelch-like family member 9*. In einer Metaanalyse für Magenkarzinome hat man *KLHL9* als potentiellen Tumorsuppressor entdeckt. Dieses Gen hat Einfluss auf Ubiquitin-Ligase Komplexe. In Zellen mit einer entsprechenden homozygoten Deletion induzierte eine experimentelle Reexpression von *KLHL9* eine Hemmung der Proliferation [72]. In BC61 ist *KLHL9* zudem vermindert exprimiert. Auch Ubiquillin 1 (*UBQLN1*) ist nicht nur homozygot deletiert sondern auch entsprechend vermindert exprimiert in BC61. Es ist, ebenfalls im Ubiquitin-Proteasom-System, an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt. Sein N-Terminales Ende ist dem des Ubiquitin sehr ähnlich (*Ubiquitin-like Domain*), darauf folgen unterschiedliche Heat-Shock-Chaperon Bindungsstellen und ein C-Terminales Ende, das als Ubiquitin-assoziierte Domäne bezeichnet wird. Es wurde beschrieben, dass *UBQLN1* einen Einfluss auf Cyclin und Cyclin-abhängige Kinasen hat und

bei Überexpression zu einem Stopp der Zellteilung führt [73-75]. Angesichts dieser Beeinflussung des Zellzyklus ist es schwer von der Hand zu weisen, dass der mögliche Einfluss von Ubiquillin 1 im UC wichtig sein könnte. Auch die miRNA *Mir-31* zeigt einen Einfluss auf den Zellzyklus. *Mir-31* findet sich sehr oft im UC und Mammakarzinomen homozygot deletiert oder zumindest vermindert exprimiert. Dieser Verlust korreliert negativ mit dem Überleben und positiv mit der Tumorprogression. Die miRNA nimmt direkten Einfluss auf die Zellproliferation über ein Zusammenwirken mit dem RB/E2F2-Signalweg. Der Einfluss von miR-31 ist jedoch nur vorhanden, wenn der P53/CDKN2A Mechanismus defekt ist, so wie es der Fall in BC61 ist. Für solche Tumoren wird miR-31 sogar als mögliches Therapieziel gehandelt [76, 77].

Eine Deletion bzw. verminderte Expression von *MTAP* wurde bereits häufig im UC beobachtet, so auch in BC61. Die homozygote Deletion von *MTAP* lässt es auch unter den Top 100 vermindert exprimierten Genen in BC61 auftauchen. Dieses Gen kodiert für die S-Methyl-5'-Thioadenosin-Phosphorylase, welche ein Endprodukt der Polyaminbiosynthese entfernt und derart am Metabolismus von Adenin und Methionin beteiligt ist. In den meisten Arbeiten wird *MTAP*-Inaktivierung lediglich als Co-Deletionen von *CDKN2A* gehandelt [78]. In neueren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass *MTAP* auch einen eigenen tumorsupprimierenden Effekt hat, der nicht über seine enzymatische Funktion getriggert wird [79]. Zusammenfassend sind diese Gene wohl nicht so entscheidend wie *CDKN2A* an der Tumorgenese beteiligt; es ist aber denkbar, dass ihre Co-Deletion Einfluss auf die Tumorgenese nehmen könnte.

In der Expressionsanalyse von BC61 fallen weitere vermindert exprimierte mögliche Tumorsuppressorgene aus der Region 9p21-22 auf, die jedoch in der aCGH-Untersuchung unauffällig sind. Dabei handelt es sich um *ALDH1A1* (9q21.13), *CKS2* (9q22), *TGFBR1* (9q22) und *FAM120A* (9q22.31). Auf die Funktion ihrer Genprodukte soll zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden.

### **8.3.2 Chromosom 11**

Die Amplifikation in der Region 11q13.2 bis 11q13.3 ist die zweite Gemeinsamkeit, die die beiden unterschiedlichen UC-Zelllinien teilen. Ähnlich wie bei der gemeinsamen Deletion wird auch diese Amplifikation nicht nur häufig im UC verändert aufgefunden, sondern auch in anderen Tumoren. Im Speziellen findet sie sich sehr häufig in Kopf- und Halstumoren, Speiseröhrenkrebs, Kaposi-Sarkomen, Brustkrebs und Leberkarzinomen [80]. Dabei umfasst die Amplifikationseinheit meistens die Gene *CCND1-ORAOV1-FGF19-FGF4-FGF3-TMEM16A-FADD-PPFIA1-CTTN*. Die meisten dieser Gene sind bereits gut untersuchte und mechanistisch verstandene Onkogene. In BC44 reicht diese Amplifikation von Bp 68.336.631 bis 70.367.700 und ist demnach 2,0 Mbp groß. In BC61 beginnt die Amplifikation bei Bp 67.768.754, endet bei 70.298.431 und umfasst damit 2,5 Mbp. Diese beiden Amplifikationen überschneiden sich in einer Länge von 1,9 Mbp. Die davon betroffenen Gene finden sich in der *Tabelle 7*. Im Zentrum dieser Veränderung steht das Onkogen *Cyclin D1 (CCND1)*. Wie schon

beschrieben, ist es ein gut erforschter Bestandteil des Proteinkomplexes, welcher RB1 phosphoryliert und damit entscheiden am G1-Checkpoint beteiligt ist. *CCND1* zählt im UC zu den am häufigsten amplifizierten Genen; genauer gesagt kommt in 10-21% aller UC eine Amplifikation von *CCND1* vor [17, 19, 29]. Passend zu der Amplifikation von *CCND1* zeigt sich in BC61 eine entsprechende Überexpression dieses Onkogens. Da aber auch viele weitere Gene in dieser Amplifikationsregion zu finden sind, sollte wie im Fall von 9p21 die Frage gestellt werden, ob allein *CCND1* das entscheidende Onkogen dieser Amplifikation ist, oder ob die weiteren amplifizierten Gene auch einen Einfluss auf die Tumorprogression haben? Dazu sollen im folgenden Abschnitt die weiteren betroffenen Gene näher beschrieben werden:

*FGF3*, *FGF4* und *FGF19* kodieren für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Eine gesteigerte Expression von *FGF3* ist im UC eher mit einem malignen Phänotyp assoziiert. Eine Amplifikation von *FGF3* ist der häufigste Mechanismus, der zu einer Überexpression führt [81]. *FGF19*, *FGF4* und *FGF3* wurden bereits in Zusammenhang mit der Embryogenese und Tumorgenese gebracht [82]. Diese Wachstumsfaktoren können parakrin oder autokrin an spezifische FGF-Rezeptoren binden und beeinflussen dadurch unter anderem die Proliferation der Zellen. Unter den Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptoren (FGFR) werden insgesamt vier FGFR unterschieden, die abhängig von ihrer Spleißvariante hochaffine Bindungen mit einzelnen FGF eingehen. An der mesenchymalen Spleißvariante von *FGFR3* bindet neben FGF1 und FGF2 auch das hier amplifizierte FGF4 [83]. *FGFR3* ist in BC61 onkogen mutiert und gesteigert exprimiert [84]. Beachtet man, dass dieser Rezeptor in 12% der UC eine aktivierende Punktmutation zeigt und zu den bekanntesten Onkogenen des UC gehört [17], so könnte eine Amplifikation der spezifischen Liganden eine Alternative bzw. Verstärkung dieses onkogenen Mechanismus darstellen. Aber nicht nur über eine Beeinflussung des Liganden lässt sich eine Verstärkung vorstellen, sondern auch über eine Beeinflussung der Substrate. Eines der Substrate ist *FRS2*, dieses liegt nicht nur amplifiziert vor, sondern gehört auch zu den Top 100 gesteigert exprimierten Genen in BC61. *FRS2* (12q15) kodiert für das *fibroblast growth factor receptor substrate 2*, das von aktivierten FGF-Rezeptoren phosphoryliert und aktiviert wird und die Stimulation der RAS/RAF/MAPK/ERK- und den PI3k/AKT-Signalweg initiiert [85]. Zusammenfassend scheint in BC61 der FGF-Signalweg nicht nur auf der Ebene des Rezeptors, sondern auch auf der des Liganden und des Rezeptorsubstrats tumorgen beeinflusst zu sein.

*Oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1)* findet sich wie die anderen Gene aus dieser Region in Karzinomen häufig amplifiziert. Sein Genprodukt beeinflusst die Reifung der 60S Untereinheit von Ribosomen und beeinflusst die Initiation der Translation unter aeroben Bedingungen. Das liegt unter anderem daran, dass *ORAOV1* Schäden durch freie Sauerstoffradikale am Ribosom verhindert [86]. Im UC ist es eines der häufigsten amplifizierten Gene. Dennoch finden sich in der Literatur nur wenige bis keine genauen Untersuchungen zur Funktion von *ORAOV1* im UC.

Die MicroRNA MiR-548K beeinflusst über die Translation die Zelle. MicroRNAs sind in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Forschung geraten, da sie nachweislich Einfluss auf Entstehung und Progression von Tumoren haben [87]. Sie bestehen aus etwa 20 Nukleotiden und wirken auf die Translation ein, in dem sie unter anderem an mRNA binden und diese blockieren oder destabilisieren [88]. Dabei agiert jede miRNA mit mehreren für sich spezifischen bzw. passenden RNAs. Informationen zu den Zielen der einzelnen miRNAs sind u.a. in der Datenbank „targetScanHuman“ hinterlegt. Hier findet man auch Angaben zu miR-548k, welche mit mehreren hundert Genen interagiert und so den Zellmetabolismus und das Zellüberleben beeinflusst. MiRNAs kann man dennoch durchaus als weiße Flecken auf der Landkarte der Molekularbiologie ansehen, denen in Laufe der nächsten Jahre nachgegangen wird. So ist es auch nicht verwunderlich, dass es speziell zu dieser miRNA noch keine Arbeiten für das UC gibt.

Auch die Gene *CTTN* [89], *GAL* [90, 91], *MYEOV* [92] können die Tumorgenese fördern und gehören zu den gemeinsam amplifizierten Genen. *CTTN* zeigt zudem in BC61 eine entsprechende differentielle Expression; im Experiment beeinflusst das Protein die Zellmigration [89]. Weiterhin ist das Gen *FADD* von der gemeinsamen Amplifikation betroffen. Es kodiert für „Fas-Associated protein with Death Domain“. Wie der Name bereits verrät, interagiert *FADD* mit dem Todesrezeptor FAS-Rezeptor, sowie mit weiteren Todesrezeptoren. Nach Bindung an FAS begünstigt *FADD* im extrinsischen Apoptose-Signalweg die Aktivierung der Procaspase 8 zu Caspase 8, welche über eine Caspasen-Kaskade oder die Spaltung von BID letztendlich den kontrollierten Zelltod einleitet [93]. Es ist von daher fraglich, inwieweit eine Amplifikation von *FADD* für Tumorzellen einen Vorteil bringt. Am ehesten ist daher die Co-Amplifikation von *FADD* eine Folge der räumlichen Nähe zu *CCND1*. Auch die weiteren von der Amplifikation betroffenen Gene scheinen zu dem jetzigen Standpunkt der Literatur für die Tumorgenese keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen. In der englischsprachigen Fachliteratur werden derartige Gene oft als „Bystander“ oder „Passenger“ eingestuft.

Nicht nur bei der gemeinsamen homozygoten Deletion, sondern auch bei der gemeinsamen Amplifikationen im Bereich des Chromosom 11q13 gibt es Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. So weist BC61 in dieser Region mehr veränderte Gene auf als BC44. Im folgendem sollen die potentiellen Onkogene aus der Amplifikation im Bereich 11q von BC61 näher beschrieben werden.

*CHKA* kodiert für das Enzym Cholin kinase- $\alpha$ . Dieses Enzym hat eine Schlüsselrolle in der Synthese von Phospholipiden, findet sich in sehr vielen Tumoren überexprimiert, beeinflusst positiv das Tumorstadium und ist prognostisch relevant [94]. Es ist nicht nur amplifiziert, sondern gehört auch zu den Top 100 überexprimierten Genen in BC61. In einer aktuellen Studie konnte mit einem gut wirksamen und wenig toxischen Inhibitor dieses Enzyms eine antiproliferative Wirkung gegenüber menschlichen Tumoren in Mäusen erzielt werden [95]. In einer weiteren Studie senkte der

spezifische *CHKA*-Inhibitor bei drei muskelinvasiven UC-Zelllinien das Zellwachstum und förderte die Zellmortalität [96].

Auch *SUV420H1* ist in BC61 amplifiziert und gehört auch zu den Top 100 der überexprimierten Gene. Dabei handelt es sich um eine Histon-Lysin-Methyltransferase für H4K20, die besonders wichtig für die Etablierung von perizentrischem Heterochromatin ist [97, 98]. *RSF1* ist ebenfalls von dieser Amplifikation betroffen und beeinflusst die Chromatinstruktur. Es ist ein sog. Chromatin-Remodellierungs-Protein und wird besonders im Zusammenhang mit der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen diskutiert [99]. Dabei kann *RSF1* über den ATM-CHK2-p53-p21 Signalweg die Apoptose induzieren. Wenn der Schutzmechanismus über p53 nicht mehr funktioniert, können DNA-Strangbrüche die Tumorentwicklung beschleunigen [100]. Ein Gen, *YEATS4*, mit ähnlicher Wirkung liegt in der zweiten bedeutenden Amplifikationsregion von BC61, 12q13-q15, und ist in dieser Zelllinie signifikant gesteigert exprimiert. Es ist ebenfalls an der Chromatin-Remodellierung beteiligt und beeinflusst den G1-Checkpoint. Durch eine Inhibition von p14 und p21 wirkt es gegensinnig zu p53 und vermindert so bei gesteigerter Expression die Seneszenz- und Apoptoserate [101]. *YEATS4* konnte zudem mit einer höheren Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht werden. In einer Studie wurden 261 nicht kleinzelligen Lungentumoren mittels aCGH und Expressionsanalyse untersucht. Hier fand man für *YEATS4* in etwa 20% der Fälle einen Zugewinn mit gesteigerter Expression [102].

Zusammenfassend stehen für die beiden gemeinsamen, diskutierten auffälligen Chromosomenveränderungen auf Chromosom 11 bzw. 9 die Gene *CCND1* bzw. *CDKN2A* im Fokus, beide mit zentralen Aufgaben in der Regulation des G1-Checkpoints. Doch enthalten beide Regionen weitere Gene, welche die Entwicklung von Tumoren fördern könnten. Besonders diese etwas weniger wichtig anmutenden Gene sind schlecht bis gar nicht für das UC untersucht, obwohl es sich um lohnende Ziele handeln könnte. Bei den, aus Sicht der Tumoren, eher kontraproduktiven Genen könnten sich interessante Möglichkeiten in der Therapie ergeben. Ein Beispiel hierfür ist *FADD*, mit positivem Einfluss auf die Apoptose und somit tumorsuppressiven Eigenschaften, die therapeutisch nützlich sein könnten.

### 8.3.3 Chromosom 20

Sind es bei den gemeinsam deletierten Genen lediglich elf, finden sich 115 gemeinsame zugewonnene Gene in den Zelllinien. Aus der DAVID-Analyse geht für diese Gene hervor, dass 90 Gene allein auf Chromosom 20 zu finden sind. Außerdem werden in fünf Termen der DAVID-Auswertung die Gene *PLUNC*, *C20ORF114*, *C20ORF71*, *BPIL3*, *C20ORF70*, *C20ORF186*, *BPIL1* und *C20ORF185* als Lipid-bindende Serum-Glykoproteine zusammengefasst, welche alle sehr eng auf Chromosom 20 zusammen liegen. Neben *BPIL1* ist vor allem *PLUNC* (*Palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein*) in der Literatur gut untersucht. Es wird in Tumoren der

Lunge, der oberen Atemwege, Speicheldrüsen und Magenkarzinomen häufig überexprimiert gefunden und als potentieller Tumormarker gehandelt [103]. Bis heute hat man die Funktion dieses Gens nur unzureichend verstanden. Man vermutet, dass es eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr spielen könnte und somit Einfluss auf inflammatorische Prozesse hat [104]. Neben *PLUNC* finden sich zudem noch vier weitere Defensine unter den Genen der gemeinsamen Zugewinne.

An bekannten Tumorgenen fallen besonders *ID1* (20q11), *BCL2L1* (20q11.21), *PDRG1* (20q11.21), *E2F1* (20q11.2), *DNMT3B* (20q11.2), *TPX2* (20q11.2) und *RALGAPA2* (20p11.22) auf. Sie könnten im Zentrum dieser Aberration stehen.

Das antiapoptotisch wirkende Gen *BCL2L1* (Protein: BCL-x<sub>L</sub>) findet sich immer wieder als Zugewinn in urothelialen Tumoren. In dieser Arbeit wurde dieses Gen nicht nur in beiden Zelllinien zugewonnen, sondern auch in den öffentlichen Expressionsdaten signifikant überexprimiert. Zudem hat man in der TCGA-Arbeit in einer Tumorprobe Abschnitte des Humanen Papilloma Virus 16 (HPV16) in *BCL2L1* integriert vorgefunden. Daraus hat man gefolgert, dass es einen kleinen Prozentsatz an UC geben könnte, die durch Viren ausgelöst werden [17, 30, 105]. Die Chemosensitivität gegenüber Mitomycin C und Cisplatin von UC ist erhöht, wenn *BCL2L1* mithilfe von siRNA geblockt wird [106]. Ein weiteres gemeinsam zugewonnenes Gen mit Einfluss auf die Chemosensitivität ist *ID1* (inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein). Wie in BC61 findet sich dieses Gen in vielen Tumoren gesteigert exprimiert. *ID1* beeinflusst die Seneszenzfähigkeit, das Wachstum und die Differenzierung von Tumoren [107, 108]. Zudem reagieren UC-Zelllinien empfindlicher auf Epirubicin, wenn *ID1* vermindert exprimiert wird [109].

Xklp2 (*TPX2*) kodiert ein Mikrotubuli Protein, das sehr wahrscheinlich für die Entwicklung und Progression des UC relevant ist. In BC44 und BC61 findet sich *TPX2* zugewonnen und wird sowohl in BC61 als auch in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten durchweg gesteigert exprimiert. In der Gruppe der ≥pT2-Tumoren findet es sich sogar in 80-100% der Datensätze mit einer gesteigerten Expression. *TPX2* beeinflusst zum einen über eine Interaktion mit dem Spindelapparat die Mitose und zum andern erhöht es die Expression von *CDK1* und *CDK2* und vermindert p21 und die Caspase-3-Aktivität [110]. Damit gehört es zu den Genen, die einen Einfluss auf den G1-Checkpoint haben. Zudem ist bekannt, dass es die Progression von Kolonkarzinomen, Zervixkarzinomen, Pankreastumoren, Speicheldrüsenkarzinomen und Ösophaguskarzinomen beeinflusst und in diesen gesteigert exprimiert vorliegt [110, 111]. Mit dem Gen für den Transkriptionsfaktor *E2F1* findet sich auf Chromosom 20 ein weiteres, welches entscheidend am G1-Checkpoint beteiligt ist. In der Arbeit von Lee et al (2010) zeigt die Überexpression von *E2F1* einen signifikanten Zusammenhang mit der Invasivität von UC [62]. Seine zentrale Rolle im Zellzyklus macht *E2F1* zu einem der besten Kandidaten für das Ziel der Amplifikation auf dem Chromosom 20.

*PDRG1* (*p53 and DNA-damage regulated 1*) wird als Reaktion auf genetischen Stress vermehrt gebildet. So findet es sich bei zahlreichen Erkrankungen überexprimiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von *PDRG1* in Kolonkarzinomzellen einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum hat [112]. Die von dem Gen *DNMT3B* kodierte DNA-Methyltransferase wird für epigenetische Veränderungen in Tumoren mitverantwortlich gemacht. Für das UC speziell wurde eine verminderte Proliferation und eine verstärkte Apoptoserate nach einem *Knockdown* in der UC-Zelllinie T24 berichtet [113].

Mit *RALGAPA2* (*Ral GTPase Activating Protein, Alpha Subunit 2*) zeigt sich wiederum ein Gen, das in Blasen Tumoren eher vermindert exprimiert wird, was mit einem verminderten Überleben der Patienten einhergeht [114]. Deshalb ist seine Amplifikation eher überraschend und legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine Co-Amplifikation eines Bystander-Gens handelt.

### **8.3.4 Chromosom 8**

Bei der DAVID-Auswertung der homozygot deletierten Gene aus BC44 fällt schnell ins Auge, dass insgesamt 25 Defensine von einer homozygoten Deletion betroffen sind. Dies hat jedoch den einfachen Grund, dass diese Defensine alle in der Region um 8p23.1 zu finden sind. In dieser Region finden sich auch eine Vielzahl an weiteren homozygot deletierten Genen mit tumorsuppressiven Eigenschaften. Defensine werden zur angeborenen Immunantwort gezählt. Es handelt sich dabei um kurze (33-47 Aminosäuren) alkalische Peptide mit typischen intramolekularen Disulfidbrücken. Am besten charakterisiert ist ihre Funktion bei der Abwehr bakterieller und viraler Infektionen; u.a. sind Defensine in der Lage Poren in Membranen zu bilden und so einen tödlichen Efflux von Zytoplasma zu erzeugen [115]. Aber es werden auch zahlreiche andere Effekte von Defensinen beschrieben. Beispielsweise konnten für das humane Defensin  $\beta$ 1 (*DEFB1*) tumorhemmende Wirkungen nachgewiesen werden, speziell auch im UC [116, 117]. *DEFB1* ist auch unter den homozygot deletierten Defensinen von BC44 zu finden. Bisher finden sich nur wenige Arbeiten zum Zusammenhang zwischen Tumoren und Defensinen. In der Region 8p23 sind auch Gene für die *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A bis D* (*TNFRSF10A bis TNFRSF10D*) zu finden. Durch diese homozygote Deletion sind somit fast alle Rezeptoren für den Liganden TRAIL betroffen. TRAIL ist ein Zytokin, welches von allen Zellen gebildet wird und über die Aktivierung der sog. Todesrezeptoren (z.B. *TNFRSF10A*) die Apoptose bspw. von Tumorzellen einleitet. Vermindertes Ansprechen auf TRAIL ist für das UC wiederholt beschrieben worden [118]. Beispielsweise wurde in einer Studie mit 229 UC-Proben eine signifikant verminderte Expression von *TNFRSF10A8* (8p21) und *TNFRSF10B* (8p21) nachgewiesen. Außerdem fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der verminderten Expression von TRAIL-Rezeptoren und einer kürzeren rezidivfreien Zeit. Patienten mit einer höheren Expression dieser Rezeptoren sprechen besser auf das Chemotherapeutikum Epirubicin an [119]. Auch BC61 zeigt eine signifikante verminderte Expression von *TNFRSF10B*.

Insgesamt finden sich 187 homozygot deletierte Gene in BC44. Es ist erstaunlich, dass 147 davon aus Region 8p21-23 stammen und darunter auch sehr viele Gene zu finden sind, für die tumorsuppressive Eigenschaften - mehr oder minder gut - belegt sind: *TNFRSF10A* (8p21), *ADAM28* (8p21.2), *RHOBTB2* (8p21.3), *PDLIM2* (8p21.3), *ATP6V1B2* (8p21.3), *SORBS3* (8p21.3), *PHYHIP* (8p21.3), *BMP1* (8p21.3), *PPP3CC* (8p21.3), *PIWIL2* (8p21.3), *PCM1* (8p21.3-22), *SLC7A2* (8p21.3-22), *MTUS1* (8p22), *DLC1* (8p22), *ZDHHC2* (8p22), *LPL* (8p22), *CTSB* (8p22), *LZTS1* (8p22), *NAT1* (8p22), *NAT2* (8p22), *ARHGEF10* (8p23), *PINX1* (8p23), *NEIL2* (8p23.1), *TNKS* (8p23.1), *CSMD1* (8p23.2), *KBTBD11* (8p23.3). All diese Gene sind bereits im UC oder anderen Tumoren näher untersucht worden. Dies liegt daran, dass die Region 8p schon seit geraumer Zeit mit der Progression von UC in Verbindung gebracht wird [120]. Zudem finden sich auch Deletionen von 8p21-23 häufig in Kopf-Hals-, Prostata- und Lebertumoren [121, 122]. Im Gegensatz zu der homozygoten Deletion 9p oder der Amplifikation 11q findet sich hier kein zentrales, sondern eine Vielzahl an plausiblen Tumorsuppressorgenen. Dies unterscheidet die Region von den Veränderungen auf Chromosom 9 oder 11. Auf welche Weise diese Gene interessant für das UC sind, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

*Mitochondrial tumor suppressor 1 (MTUS1)* wurde schon in mehreren Tumorarten als tumorsuppressiv beschrieben und eine verminderte Expression korreliert im fortgeschrittenen UC mit einer schlechten Prognose [123, 124]. Stadienabhängige Veränderungen dieses Gens deuten sich auch in den Ergebnisse dieser Arbeit an. Die *MTUS1* Expression ist in BC61 gesteigert und in den öffentlichen Expressionsdaten findet man einen deutlichen Unterschied zwischen pTa-Tumoren und  $\geq$ pT2-Tumoren, wie auch zwischen BC44 und BC61. Trotz alledem ist die Funktion dieses Gens im UC noch nicht genauer untersucht. Ein weiteres Gen mit unterschiedlicher Ausprägung in den beiden Hauptgruppen der UC ist die *Tankyrase-1 (TNKS)*, ein Mitglied der Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase (PARP) Familie und Komponente des Telomerase-Komplexes [125]. In einer Studie an Urinzytologien war der mRNA Spiegel von TNKS-1 in pTa-pT1 Tumoren höher als in  $\geq$ pT2 Tumoren. Zudem war der TNKS-1 Spiegel im Urinsediment bei Patienten mit einem UC höher als bei gesunden Probanden. In BC61 war es entsprechend, trotz Deletion, gesteigert exprimiert. Bei Patienten mit einer Rekurrenz des UC findet man eine höhere Expression als bei Patienten ohne Rekurrenz [126].

*RHOBTB2* steht für *Rho-Related BTB Domain Containing 2*, auch bekannt unter den Namen *DBC2 (Deleted in Breast Cancer 2)*. Dieses Gen ist häufig im Brustkrebs und anderen Tumorentitäten deletiert und vermindert exprimiert; eine verminderte Expression geht oftmals mit einer schlechteren Prognose einher. *DBC2* wird als Tumorsuppressor eingestuft [127]. Es konnte gezeigt werden, dass in den meisten Fällen eine verminderte Expression von *DBC2* durch eine Deletion verursacht wird, seltener durch Mutationen oder Hypermethylierungen [128, 129]. Ähnliches zeigt sich auch im Brustkrebs [130].

*Leucine Zipper Putative Tumor Suppressor 1 (LZTS1)* ist ein weiteres häufig auf Chromosom 8p22 deletiertes mögliches Tumorsuppressorgen mit verminderter Expression im UC und anderen Tumoren [131]. Über eine Beeinflussung des CDK1/CyclinB1 Komplex beeinflusst LZTS1 den G2-Checkpoint des Zellzyklus und führt zum Zellzyklusarrest [132]. Ähnlich wie *DBC2* ist es nur in sehr seltenen Fällen von einer Mutationen betroffen [128]. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass auch *LZTS1* im UC durch eine Hypermethylierung seines Promotors inaktiviert wird [133]. Im Mausmodell fördert eine verringerte Expression von *LZTS1* die Entstehung von UC [134]. Mäuse mit Deletion oder homozygoter Deletion von *LZTS1* entwickelten zu 82-93% einen Tumor nach Behandlung mit dem Karzinogen BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl), dagegen nur 8% der wildtypischen Mäuse.

Auch *PIN2/TRF1-interacting telomerase inhibitor 1 (PINX1)* ist ein Tumorsuppressor-Kandidat in verschiedenen Tumoren. PINX1 inhibiert die Telomerase und hemmt die Zellproliferation durch Beeinflussung der G1/S Phase. Eine verminderte Expression von *PINX1* korreliert signifikant mit der Rekurrenz, Metastasierung und Proliferation im UC [135]. In BC61 findet sich eine verminderte Expression von *PINX1*. Wie wichtig der Zellzyklus für Tumoren auch als indirektes Ziel ist, zeigt das Gen *ZDHHC2 (Zinc Finger, DHHC-type Containing 2)*. Es kodiert eine Palmitoyl-Acetyltransferase und aktiviert das Zytoskelett assoziierte Protein 4 (CKAP4). CKAP4 dient als hochaffiner Rezeptor für den Antiproliferationsfaktor (APF) [136]. APF wirkt durch Beeinflussung von p53 und *MMP2* und wird unter anderem von Urothelzellen bei interstitiellen Zystitiden sezerniert. Bei einem *Knockdown* von *ZDHHC2* kommt es zur Suppression von *CKAP4* und damit zur Aufhebung der antiproliferativen Eigenschaft von APF. Somit könnte es sich hier um einen in BC44 homozygot deletierten Tumorsuppressor handeln [137, 138]. Das proteinkodierende Gen *PIWIL2 (Piwi-Like RNA-Mediated Gene Silencing 2)* wird vor allem im Hoden exprimiert und trägt zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der Keimzellen bei. Auch dieses Gen kann den Zellzyklus beeinflussen, indem es mit STAT3 und c-Src einen Proteinkomplex bildet, der den Promotor von p53 reprimiert [139]. Interessant ist, dass die Tyrosinkinase Src zu den gesteigert exprimierten und zugewonnen Genen in BC61 gehört. *PIWIL2* wird in urothelialen Zellen jedoch generell nicht exprimiert [140]. *DLC1* kodiert für das *deleted in Liver Cancer 1*, eine Rho-GTPase [141] und wird in die Kategorie der Metastasen-Suppressoren eingeordnet, da sein Verlust in vielen Tumorarten zu verstärkter Zellmotilität und Invasionsfähigkeit führt [142]. Im UC wurde es in vielen Blasenkarzinomzelllinien vermindert exprimiert vorgefunden [120]. Es ist nicht nur in BC44 homozygot deletiert, sondern auch in BC61 und nach den öffentlichen Expressionsdaten vermindert exprimiert.

*PDLIM2* kodiert für *PDZ and LIM Domain 2 (Mystique)*, dessen tumorsuppressive Eigenschaften weniger gut charakterisiert sind, das jedoch ebenfalls die Zellmigration beeinflusst. Nach

erfolgreicher Transfektion von *PDLIM2* zeigten zwei UC-Zelllinien eine Verminderung der Migration und des Tumorwachstums [143].

*SORBS3* kodiert für Vinexin, ein Protein, das an der Zell-Zell Adhäsion beteiligt ist. Bis jetzt wurde es nur für das hepatozelluläre Karzinom näher untersucht und zeigte dort tumorsuppressive Eigenschaften [122]. Es ist in BC44 homozygot deletiert und in den öffentlichen Expressionsdaten durchweg vermindert exprimiert.

*ARHGEF10* (*Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 10*) bildet Komplexe mit G-Proteinen und stimuliert so den Rho-abhängigen Signalweg. Dieser Signalweg spielt in vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. In der Arbeit von Williams et al. war *ARHGEF10* das am häufigsten deletierte Gen in 8p [144]. Ähnlich wie *ARHGEF10* findet sich auch *CSMD1* häufig unter den deletierten Genen in der Region 8p23. Es kodiert für das Protein CUB and sushi multiple domains-1. 8p23 Deletionen finden sich häufig in Kopf-Hals-, Prostata-, und Leberkarzinomen, wie in Harnblasentumoren. Molekulargenetisch zeigt es tumorsupprimierende Eigenschaften [145].

Mit der homozygoten Deletion von N-Acetyltransferase 1 und 2 fehlen BC44 Enzyme, die Hydrazine und Arylamine acetylieren. Sie wirken am Metabolismus verschiedener Substanzen und Medikamente mit. Genpolymorphismen in *NAT1* und *NAT2* beeinflussen die Expression und Aktivität der Enzyme [146]. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen diesen Polymorphismen, Exposition gegenüber aromatischen Aminen und anderen Karzinogenen und dem Auftreten von UC. Vor allem der Verlust von *NAT2* steigert die schon ohnehin vorhandene kanzerogene Wirkung des Zigarettenkonsums auf Urothelzellen erheblich [147].

Alles in allem bestätigen diese Erkenntnisse über die homozygot deletierten Gene von Chromosom 8p in BC44, dass es sich hier um eine relevante Aberration handelt, in der kein einzelnes Gen heraussticht, sondern anscheinend die Masse an co-deletierten Tumorsuppressorgenen den Vorteil für die Tumoren erbringt.

### **8.3.5 Chromosom 3**

Wie bereits erwähnt, finden Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene mit Einfluss auf die Epigenetik immer größere Aufmerksamkeit im UC. Ein weiteres solches Gen findet sich auf Chromosom 3q13.31 und ist in BC61 homozygot deletiert, nämlich *LOC285194*. Es bildet eine sogenannte *long non-coding* RNA. Während miRNAs nur aus 21-23 Nukleotiden bestehen, bestehen lange nicht kodierende RNAs (lncRNA) aus mehr als 200 Nukleotiden. Nur wenige lncRNAs sind bisher gut erforscht, da sie vielfältigere Funktionen als miRNAs ausüben können. Wie miRNAs können sie Transkription und Translation beeinflussen und somit als Tumorsuppressor- bzw. Onkogene auch im UC fungieren [148, 149]. Für die lncRNA *LOC285194* geht eine Deletion bzw. verminderte Expression mit einer schlechteren Prognose einher. Weiterhin wurde berichtet, dass *LOC285194* ein direktes

Transkriptionsziel von P53 ist und ihr *Knockdown* in vitro und in vivo zu einem gesteigerten Zellwachstum führt. Zudem hemmt sie das Onkogen miR-211 [150].

## 8.4 Expressionsanalyse BC61

Im Ergebnis der Expressionsanalyse von BC61 zeigen 2891 Gene eine signifikant gesteigerte und 2568 eine signifikant verminderte Expression. Auf die einzelnen Ergebnisse der Expressionsanalyse kann in dieser Arbeit nur exemplarisch eingegangen werden. Der grundlegende Gedanke ist hier wie bei den aCGH-Daten. Man geht davon aus, dass in Tumoren eine veränderte Expression ein Indiz für Tumorsuppressorgene bzw. Onkogene ist. Einige bereits bekannte Onkogene und Tumorsuppressorgene zeigen in BC61 tatsächlich eine entsprechende differentielle Expression (*Tabellen 19* und *20*). Von größerem Interesse ist jedoch der Vergleich mit den aCGH-Daten. Dabei werden viele Gene konkordant zu ihren Aberrationen fehlexprimiert (*Tabellen 14* und *15*). Einzelne Gene mit relevanten Chromosomenaberrationen zeigen nicht die entsprechende Veränderung ihrer Expression. Homozygot deletierte Gene sind quasi aus dem Genom gelöscht und dürften eigentlich nicht mehr exprimiert werden. Einige dieser homozygot deletierte Gene sind in BC61 lediglich vermindert exprimiert. Dies könnte entweder durch eine Inhomogenität der Zelllinien oder durch eine Messungenauigkeit erklärt werden. Jedoch findet sich keines der homozygot deletierten Gene unter den gesteigert exprimierten Genen. Auf der anderen Seite erwartet man eine gesteigerte Expression von einem amplifizierten Gen. Die Expression der amplifizierten Gene scheint aber durch die Zelle teilweise reguliert werden zu können; so zeigen die amplifizierten Gene *GAL*, *CPT1A* und *CPM* eine verminderte Expression. *GAL* und *CPT1A* werden auf dem Genom örtlich nur durch das Gen *MTL5* voneinander getrennt. Zu dem co-amplifizierten Gen *MTL5* findet sich keine signifikante Veränderung der Expression.

### 8.4.1 Vermindert exprimierte Gene

In der DAVID-Analyse der vermindert exprimierten Gene von BC61 stimmt die Lokalisierungen gut mit der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten überein. Des Weiteren bezieht sich der größte Teil der Terme in der DAVID-Analyse auf die Translation und Zell-Zell-Adhäsion. Um der Vermutung nachzugehen, dass unter den differentiel vermindert exprimierten Genen Tumorsuppressorgene zu finden sind, wurden die 2568 signifikant vermindert exprimierten Genen mit bekannten Tumorsuppressorgenen verglichen. Dabei fanden sich 49 Tumorsuppressorgene (*Tabelle 19*), darunter bereits erwähnte und diskutierte Gene, wie *CDKN2B*, *CDKN2A*, *DLC1*, *PINX1*, *FAS*, *KLHL9*, *MTAP*, *TGFBR2* und *TNFRSF10B*. Zudem finden sich weitere Gene, die bereits im UC untersucht sind und entsprechende Veränderungen in der Expression von BC61 zeigen. Abhängig von ihrem Bekanntheitsgrad im UC, sind diese Gene in der *Tabelle 19* mit einem oder mit zwei Sternen markiert. Dennoch bzw. gerade deshalb sollte den restlichen nicht für das UC als typisch angesehenen Tumorsuppressorgenen Aufmerksamkeit entgegen gebracht werden.

Im weiteren Vergleich der Expressionsdaten mit den aCGH-Daten finden sich 312 Gene, die sowohl vermindert exprimiert werden, als auch eine Deletion bzw. homozygote Deletion aufweisen. *LDLRAD3*, *GPR39*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP*, *KLHL9*, *UBQLN1* und *GPC4* sind Gene mit einer homozygoten Deletion und verminderter Expression. Bis auf *GPC4* und *GPR39* wurden alle diese Gene bereits in dieser Arbeit diskutiert und sind eindeutig für maligne Prozesse im Urothel relevant. Unter den deletierten Genen mit einer verminderten Expression finden sich *FAS*, *ALDH1A1*, *TGFBR1*, *SPTAN1*, *CKS2*, *GLIS3*, *FAM120A* und *RPL35*, die von einem weiteren Interesse für das UC sein könnten. Einige dieser Gene wurden bereits in dieser Arbeit beschrieben.

Vermindert exprimierte Tumorsuppressorgene von BC61			
<u>CDC20*</u>	1p34.1	<u>CDKN2A**</u>	9p21
ERF1	1p36	<u>CDKN2B**</u>	9p21
SPRR1B	1q21-q22	<u>MTAP*</u>	9p21
<u>TAGLN2*</u>	1q21-q25	<u>KLHL9*</u>	9p22
CDC73	1q25	GLIS3	9p24.2
KISS1*	1q32	ALDH1A1**	9q21.13
RPL35	1q43	CKS2**	9q22
RHOB*	2p24	TGFBR1**	9q22
BIN1	2q14	FAM120A	9q22.31
SERPINE2	2q33-q35	SPTAN1	9q33-q34
AP1S3	2q36.1	<u>FAS**</u>	10q24.1
FHIT*	3p14.2	PRKCDBP	11p15.4
<u>TGFBR2</u>	3p22	HRAS**	11p15.5
<u>CCNB1*</u>	5q12	VWA5A	11q23
<u>EGFR</u>	7p12	<u>FEZ1</u>	11q24.2
DFNA5	7p15	KRT6A	12q12-q13
MAD1L1	7p22	KRT6B	12q12-q13
<u>FGFR1**</u>	8p11.2-p11.1	KRT6C	12q12-q13
NRG1**	8p12	ST20	15q25.1
<u>DLC1*</u>	8p22	NME1	17q21.3
MTSS1*	8p22	EPB41L3	18p11.32
<u>TNFRSF10B*</u>	8p22-p21	CDH4	20q13.3
<u>PINX1**</u>	8p23	PHACTR3	20q13.32
		C20orf197	20q13.33

**Tabelle 19: Vermindert exprimierte Tumorsuppressorgene in BC61**

Basierend auf den Daten der Expressionsanalyse von BC61. Berechnet nach dem moderaten t-Test mit dem R Packet Limma und adjustiert auf multiples Testen nach Bonferroni. Unterstreichung: Gene sind bereits an anderen Stellen in dieser Arbeit beschrieben. Stern: Gene sind im UC untersucht worden. Zwei Sterne: Ausführlich für das UC beschrieben.

#### 8.4.2 Gesteigert exprimierte Gene

Die DAVID-Analyse der gesteigert exprimierten Gene von BC61 zeigt, dass unter diesen einige tumorrelevante Gene zu finden sind. Zu diesen gehören sicherlich Gene, die in den Termen zu Apoptose und Zelltod aufgelistet werden. Aber auch Gene der *Forkhead Box Gruppe (FOX)* gehören zu den 100 am stärksten gesteigert exprimierten Genen. Der Term mit den 34 aufgelisteten Tumorsuppressorgenen illustriert, dass die Genexpression von Tumoren auch unerwartete Züge annehmen kann. In der *Tabelle 20* sind bekannte Onkogene mit einer gesteigerten Expression in

BC61 zu finden. Unter den Onkogenen finden sich einige, die in dieser Arbeit bereits diskutiert wurden: *CCND1*, *MDM2*, *SRC*, *ERBB2*, *ERBB3*, *CDKN1B*, *E2F1*, *ORAOV1*, *CHD6*, *STAT1*, *FGFR3*, *MTUS1*, *MLL3*, *DDB2*, *CUL3*, *CREBBP* und *EP300*. Zudem sind bereits im Zusammenhang mit dem UC bekannte Gene in der Tabelle mit einem Stern markiert, ausführlicher beschriebene Gene mit zwei Sternen.

Aus der Expressionsanalyse ergibt sich ein weiterer interessanter Aspekt: In der bereits erwähnten TCGA-Studie wurden 17 Gene als am signifikant häufigsten mutiert im UC aufgelistet. Von diesen 17 Genen finden sich in BC61 acht mit einer gesteigerten Expression (*ELF3*, *RXRA*, *NFE2L2*, *KLF5*, *FOXQ1*, *FOXA1*, *PAIP1*, *BTG2*). Zusammen mit dem Gen *RHOB*, welches zu den signifikant vermindert exprimierten Genen in BC61 gehört, finden sich mehr als 50% der in der TCGA-Studie als häufig mutiert geltende Gene differentiell exprimiert in BC61 [17]. Weiterhin finden sich auch auffällige Gene mit Einfluss auf die Epigenetik in diesen Ergebnissen. Die Gene *MLL3*, *CREBBP* und *EP300* sind sowohl in BC61 als auch in der TCGA-Studie verändert und gehören zu den Chromatin remodellierenden Genen. Aber auch die Gene *NIPBL*, *CHD6* und *PBRM1* gehören zu den Chromatinregulatoren [18, 151, 152] und zeigen eine gesteigerte Expression in BC61. Für sie wurden aber bis jetzt keine Veränderungen im UC beschrieben.

Die beiden Gene *RUNX1* und *ETV1* finden sich in BC61 mit einer gesteigerten Expression. Die beiden Gene bilden zusammen das am häufigsten auftretende Fusionsgen der akuten Leukämie im Kindesalter. Dieses Fusionsgen wird auch *TEL-AML1*-Fusionsgen genannt und entsteht durch eine Translokation von Chromosom 12 auf Chromosom 21. Es findet sich in 22% aller akuten lymphatischen Leukämien im Alter zwischen ein und zehn Jahren, die mit einer sehr guten Prognose einhergehen [153]. In der spektralen Karyotypisierung finden sich keinerlei Hinweise auf das Vorliegen eines solchen Fusionsgens in BC61. Dennoch handelt es sich hier einzeln betrachtet um zwei Onkogene. So kodiert *RUNX1* für einen Transkriptionsfaktor, der bei einer Überexpression mit einer schlechter Prognose für leukämische Erkrankungen, Prostatakrebs, Ovarialtumoren und Brustkrebs assoziiert ist [154]. Der Transkriptionsfaktor *ETV1* zeigt sich im Prostatakarzinom als signifikant erhöht exprimiert und kann als Onkogen wirken [155].

Gesteigert exprimierte Onkogene von BC61					
MYCL1*	1p34.2	<u>MTUS1</u> **	8p22	ZFYVE19	15q15.1
PVRL4*	1q22-q23.2	TUSC3	8p22	<u>CREBBP</u> *	16p13.3
PBX1*	1q23	PCM1*	8p22-p21.3	CDH1*	16q22.1
TPR	1q25	PLAG1*	8q12	WWOX**	16q23.3-24.1
BTG2**	1q32	LYN*	8q13	TBC1D3*	17q12
ELF3*	1q32.2	ANKRD46	8q22.3	FOXO3**	17p11
REL**	2p13-p12	GRHL2	8q22.3	PAIP1*	17p11.2
MEIS1	2p14-p13	ZNF706	8q22.3	SPECC1	17p11.2
NCOA1*	2p23	SCRIB	8q24.3	NF1*	17q11.2
FOSL2	2p23.3	DOCK8	9p24.3	<u>ERBB2</u> **	17q11.2-12
NFE2L2*	2q31	XPA**	9q22.3	WNT3	17q21
<u>STAT1</u> **	2q32.2	DAPK1*	9q34.1	PRKCA**	17q22-q23.2
<u>CUL3</u> **	2q36.2	RXRA*	9q34.3	BCAS3	17q23
PBRM1*	3p21	ELF4	Xq26	TRIM37	17q23.2
TCTA	3p21	MTCP1	Xq28	RNF213	17q25.3
RARB*	3p24	MTCP1NB	Xq28	SH3GL1	19p13.3
PPARG**	3p25	BMI1**	10p11.23	TFPT	19q13
TRAK1	3p25.3-24.1	MAP3K8	10p11.23	CEBPA	19q13.1
MECOM	3q24-28	ANK3	10q21	BCL3*	19q13.1-q13.2
BCL6*	3q27	<u>DDB2</u> **	11p12-11	PCNA**	20pter-p12
<u>FGFR3</u> **	4p16.3	<u>CCND1</u> **	11q13	<u>E2F1</u> **	20q11.2
FBXW7*	4q31.3	<u>ORAOV1</u>	11q13.2	MAFB	20q11.2-13.1
NIPBL*	5p13.2	ARHGEF12	11q23.3	<u>CHD6</u>	20q12
ARHGAP26	5q31	KDM5A*	12p11	<u>SRC</u> **	20q12-q13
DEK**	6p22.3	ETV6	12p13	YWHAB*	20q13.1
SOX4*	6p22.3	<u>CDKN1B</u> **	12p13.1-12	BCAS4	20q13.13
FOXQ1**	6p25	CD9*	12p13.3	GNAS*	20q13.3
AGR2*	7p21.3	<u>ERBB3</u> **	12q13	PPP1R3D	20q13.3
MLL5	7q22.1	<u>MDM2</u> **	12q14.3-15	SYCP2	20q13.33
TRIM24	7q32-q34	BTG1	12q22	RUNX1	21q22.3
<u>MLL3</u> *	7q36.1	MED13L	12q24.21	PATZ1	22q12.2
KAT6A	8p11	KLF5**	13q22.1	PIM3	22q13
TACC1*	8p11.23	MCF2L	13q34	<u>EP300</u> **	22q13.2
GPR124	8p12	FOXA1**	14q12-q13		
ZNF703*	8p12	SYNE2	14q23.2		

**Tabelle 20: Gesteigert exprimierte Onkogene in BC61**

Basierend auf den Daten der Expressionsanalyse von BC61. Berechnet nach dem moderaten t-Test mit dem R Packet Limma und adjustiert auf multiples Testen nach Bonferroni. Unterstreichung: Gene sind bereits an anderen Stellen in dieser Arbeit beschrieben. Stern: Gene sind im UC untersucht worden. Zwei Sterne: Ausführlich für das UC beschrieben.

Auch auf der Seite der Amplifikationen finden sich Gene mit einer entsprechenden gesteigerten Expression, nämlich *CCND1*, *CTTN*, *CHKA*, *ORAOV1*, *SUV420H1*, *FADD*, *YEATS4*, *CCT2* und *FRS2*. Insgesamt finden sich 210 Gene mit einem Zugewinn und der entsprechenden gesteigerten Expression, darunter die für das UC bekannten Gene *MDM2*, *E2F1*, *ORAOV1*, *SRC*, *CCND1*, *PCNA*, *PPP1R3D*, *CHD6*, *YWHAB*, *SYCP2*, *GNAS*, *MAFB* und *BCAS4*. Sehr interessant ist *MDM2*. Im oberen Abschnitt wurde bereits beschrieben, dass ein Zugewinn von *MDM2* und eine damit einhergehende Überexpression eine Alternative zur *TP53*-Mutation im UC darstellt. Die Zelllinien BFTC905 zeigt genau wie BC61 eine Amplifikation von *MDM2* und ein wildtypisches p53. Wie BC61 wurde die

Zelllinie BCTC905 aus einem pTa (High-Grade) UC isoliert [156]. Zudem zeigen die Analysen der öffentlichen Expressionsdaten, dass *MDM2* signifikant nur in der Gruppe der pTa-Tumoren im Vergleich mit dem Normalgewebe gesteigert exprimiert vorzufinden ist. Es gehört zu den Top 100 gesteigert exprimierten Genen in BC61. Eine gesteigerte Expression von *MDM2* wurde auch in anderen Arbeiten spezifisch für pTa- und pT1-Tumoren beschrieben [157-160]. Somit scheint eine derartige Variante die p53-abhängigen Checkpoints zu umgehen bzw. abzuschwächen und eine Alternative zu den typischen *TP53*-Mutationen der muskelinvasiven UC darzustellen. Auch für die Gene *PCNA*, *PPP1R3D*, *CHD6*, *YWHAB* und *SYCP2* wurden bereits in anderen Arbeiten Untersuchungen für das UC durchgeführt und ihre Relevanz beschrieben [18, 29, 161, 162].

## 8.5 Öffentliche Genexpressionsanalyse

Das Hauptziel bei der öffentlichen Genexpressionsanalyse war es, Vergleichswerte für die Ergebnisse der beiden Zelllinien BC44 und BC61 zu erhalten, um Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit die Veränderungen generell für das UC gelten. Dazu wurden insgesamt Daten von 567 Normal- und Tumorgewebeproben miteinander in verschiedenen Gruppen verglichen. Diese Gruppen umfassen das normale Urothel, pTa-Tumoren,  $\geq$ pT2-Tumoren und eine Gruppe aus allen Tumorstadien zusammengenommen (siehe Kapitel 6.6). Besonderes Augenmerk liegt hier auf den Genen, die in allen drei Gruppen gleichsinnig differentiell exprimiert werden.

### 8.5.1 Gesteigert exprimierte Gene in allen drei Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten

Unter den gesteigert exprimierten Genen finden sich *PPARG*, *SOX4*, *ERBB3*, *PARP1*, *EZH2*, *CCNB1*, *TOP2A* und *ELF4*, die als bekannte Onkogene im UC gelten und gesteigert exprimiert vorliegen. Der *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), vom Gen *PPARG* exprimiert, ist einer von drei Subtypen dieser Rezeptorfamilie, der nach seiner Aktivierung ein Dimer mit Retinoid-X-Rezeptor (RXR) bildet und so als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Expression von verschiedenen Genen hat. Dieser Rezeptor ist sehr spannend für die Tumorthherapie, da er bei Aktivierung eine antiproliferative, proapoptische und anti-angiogene Wirkung zeigt. Außerdem liegt *PPARG*, wie auch in BC61, sehr oft überexprimiert vor. Dies gilt nicht nur für das UC, sondern auch für Lungen-, Brust-, Kolon-, Prostata- und Schilddrüsentumoren [163]. Besonders interessant ist, dass in BC61 nicht nur *PPARG* sondern auch sein Dimerisierungspartner *RXRA* gesteigert exprimiert vorliegt. PPAR $\gamma$  wird durch natürliche Liganden wie freie Fettsäuren, Eikosanoide und Prostaglandine, aber auch durch synthetische Liganden wie Thiazolidindione und Glitazone aktiviert. Der Ligand DIM-C zeigt eine noch affinere Bindung zu PPAR $\gamma$  in Tumorzellen. In verschiedenen Arbeiten konnte in vitro und in vivo ein therapeutischer Nutzen für diesen PPAR $\gamma$ -Agonisten nachgewiesen werden [164-166]. Eine Kombination von Troglitazon mit einem EGFR-Hemmer induziert in normalen Urothelzellen eine Differenzierung [167]. Zusammenfassend könnte die Aktivierung von *PPARG* eine vielversprechende

Möglichkeit der UC-Therapie bieten, obwohl die Aktivierung auch mit einer Steigerung der Invasivität und Zellmigration einhergehen kann [163, 168].

Ein Gen mit bereits etabliertem therapeutischem Ansatz ist die Topoisomerase-II- $\alpha$ , die von dem Gen *TOP2A* kodiert wird. In Blasen- und Brustkrebs findet es sich oft zusammen mit ERBB2/HER2 amplifiziert und überexprimiert [169]. Beide Gene befinden sich etwa 700 kb voneinander entfernt auf Chromosom 17. Diese Amplifikationen sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Topoisomerasen entspannen während der Transkription und Replikation die DNA durch transiente, gezielte Doppelstrangbrüche und verhindern so DNA-Schäden. Anthracycline (Doxorubicin, Epirubicin) binden die Topoisomerase-II und induzieren so Schäden an der DNA, welche letztendlich zur Apoptose führen. Anthracycline stellen ein bewährtes Chemotherapeutikum dar und werden auch bereits zur Therapie von UC verwendet [170]. Ein weiteres Gen mit Einfluss auf die DNA-Reparatur ist in dieser Arbeit aufgefallen, *PARP1*. Auf dieses Gen wird an anderer Stelle näher eingegangen (siehe 8.6).

*SOX4* (*SRY-related HMG box transcription factor 4*) liegt auf Chromosom 6p22 in einer Region, die recht häufig im UC amplifiziert vorliegt. In dieser Region finden sich auch *E2F3* und *CDKAL1*, die so wie *SOX4* häufig überexprimiert sind und onkogene Eigenschaften haben. Durch spezifische *Knockdowns* konnte gezeigt werden, dass lediglich *E2F3* einen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen hat [171]. Gesteigert exprimiertes *E2F3* findet sich besonders oft in UC mit mutiertem *RB1* [157, 172]. Die *SOX4* Expression korreliert positiv mit einem schlechterem Outcome von verschiedenen Tumoren und beeinflusst über verschiedene Signalwege und posttranslationale Regulation die Zellproliferation positiv; Ziele sind u.a. TGF $\beta$ - und WNT-Signalwege, P53 und Syntenin-1 [173, 174]. *Enhancer of zeste homolog 2* wird von *EZH2* kodiert; es gehört zu dem *polycomb repressive complex 2* (PRC2) und katalysiert zusammen mit EED und SUZ12 die Mono-, Di- und Trimethylierung von H3K27. Diese Histonmodifikation reprimiert die Genexpression und kann in Tumoren eine Hypermethylierungen von CpG-Inseln begünstigen. Eine gesteigerte *EZH2*-Expression findet sich in vielen verschiedenen Tumortypen und wurde als Marker von aggressiven Blasen- und Prostata Tumoren identifiziert [175-177]. Durch eine Inhibierung von *EZH2* mit NSC745885 konnte das Wachstum von UC in vitro und vivo vermindert werden [178].

Die nächsten beiden Gene haben eine zentrale Stellung im Zellzyklus. Zum einen handelt es sich um das Gen *Cyclin B1* (*CCNB1*). Es fällt in dieser Arbeit nicht nur dadurch auf, dass es in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten gesteigert exprimiert wird, sondern auch dadurch, dass es in  $\geq$ T2-Tumoren gegenüber Normalgewebe in fünf von fünf Datensätzen gesteigert exprimiert vorzufinden ist. Im Detail bildet Cyclin B mit der CDK1 einen Komplex, der den Übergang der Zelle von der G2 in die M-Phase dirigiert. Noch spannender wird das Ganze, da der Komplex Cyclin B1-CDK1 von p53 kontrolliert wird. Weil aber p53 sehr oft im UC in seiner Funktion beeinträchtigt ist, kann der *CCNB1*-

CDK1-Komplex unkontrolliert den Zellzyklus beeinflussen [179]. Zum anderen handelt es sich um den Transkriptionsfaktor *ELF4*. Er gehört zu der ETS-Familie der Transkriptionsfaktoren und hat nicht nur Einfluss auf die Transkription von Zytokinen, sondern auch auf den Zellzyklus. *ELF4* bindet an dem Promotor von *MDM2* und fördert so die Transkription von *MDM2*; andererseits inhibiert es die Wirkung von p53 [178].

Das Gen *ERBB3* ist eines der bekannteren Gene im UC. Es wird häufig differentiell exprimiert und hat einen positiven Einfluss auf die Tumorgenese. So ist es nicht verwunderlich, dass sowohl in BC61, als auch in allen öffentlichen Expressionsdaten *ERBB3* zu den konstant überexprimierten Genen gehört und speziell für die Gruppen Tumor gegen Normalgewebe und pTa-Tumoren gegen Normalgewebe in 80-100% der Daten überexprimiert zu finden ist. Die Rezeptor Tyrosin-Protein Kinase ERBB-3 gehört wie EGFR und ERBB2/HER2 zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren, die auch als *Human epidermal growth factor* Rezeptoren (HER) bekannt sind. Da ERBB3 keine eigene ausreichende Tyrosinkinaseaktivität besitzt, ist es für die Aktivierung der Signalwege MAPK, PI3K/Akt, und PLC $\gamma$  auf eine Heterodimerisierung mit ERBB2 angewiesen. Die Funktion dieses Dimers bei der Tumorgenese ist am besten beim Mammakarzinom untersucht, wo ERBB2 ein Therapieziel darstellt. Beim Urothelkarzinom treten Überexpression von ERBB2 oder aktivierende Mutationen von ERBB3 in einer kleinen, aber nennenswerten Zahl von Fällen (s. z.B. [17]) auf. Interessanterweise findet sich in BC61 nicht nur *ERBB3* sondern auch *ERBB2* unter den überexprimierten Genen [180, 181].

### **8.5.2 Vermindert exprimierte Gene in allen drei Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten**

Auch unter den vermindert exprimierten Genen der öffentlichen Expressionsdaten finden sich solche (*WWOX*, *FAS*, *TGFBR2*, *FGFR1*, *ZFP36L1*), die für das UC oder andere Tumoren als Tumorsuppressorgene bekannt sind.

In dieser Arbeit ist *WWOX* in 80 bis 100% der öffentlichen Expressionsdaten vermindert exprimiert und in BC44 deletiert. Es handelt sich hierbei um ein Gen, dass in vielen Tumoren vermindert exprimiert vorliegt. *WWOX* (*WW-domain containing oxidoreductase*) findet sich auf 16q23.2, einer Region, die sehr häufig in Tumoren deletiert ist und zu der fragilen Region *FRA16D* gehört. In manchen Tumoren ist die Expression von *WWOX* auch durch eine Methylierung seines Promotors vermindert [182]. In vitro und in vivo hat *WWOX* einen tumorsupprimierenden Effekt auf Krebszellen, es interagiert unter anderem mit p73, AP2 $\alpha$ , AP2 $\gamma$ , ErbB4, JUN und RUNX2 [183]. Am besten ist seine inhibitorische Wirkung auf den WNT-Signalweg bekannt. Außerdem findet sich dieses Gen besonders hoch exprimiert in Prostata, Brustdrüsen, Ovarien und Hoden, also in Geweben, die typischerweise unter starkem hormonellen Einfluss stehen [184, 185]. Im UC fällt *WWOX* außerdem durch eine stadienabhängige Expression auf. Denn im Vergleich aller Daten zeigt *WWOX* neben einer Deletion in BC44 eine allgemein verminderte Expression in den öffentlichen

Expressionsdaten. Im Vergleich zwischen Tumor und Normalgewebe gehört *WWOX* sogar zu den Genen, die in 80-100% der Datensätze vermindert exprimiert werden. Gänzlich anders verhält es sich in BC61. Hier findet sich keine Deletion im fragilen Teil von Chromosom 16 (*FRAD16D*), in der Expressionsanalyse findet man es sogar überexprimiert. Dieses gegensinnige Verhalten scheint kein Einzelfall zu sein, denn in einer Studie von Ramos et al. wiesen mehr als 85% der untersuchten PUNLMP und etwa 50% der Low-Grade Tumoren eine gesteigerte Expression von *WWOX* auf. Dagegen zeigten mehr als 45% der  $\geq$ pT2 Tumoren eine verminderte Expression und nur etwa 35% eine gesteigerte Expression von *WWOX* [186]. Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die These, dass eine verminderte Expression von *WWOX* mit einer schlechten Prognose im UC einhergeht.

Auch der Tumornekrosefaktor Rezeptor *FAS* (*TNFRSF6*) gehört in den öffentlichen Expressionsdaten zu den durchweg vermindert exprimierten Genen. Dies bestätigt eine Reihe von Arbeiten, die mittels Immunhistochemie eine Verminderung von *FAS* in UC nachgewiesen haben [187]. Teilweise ist die Verminderung durch Deletionen oder Promotor-Hypermethylierung verursacht. *FAS* gehört in die Gruppe der Todesrezeptoren; seine Aktivierung kann zum Zelltod führen. Im Fall von *FAS* kommt es nach einer Bindung seines Liganden (*FAS-L*) über *FADD* (siehe Kapitel 8.3.2) und Caspase 8 zur Apoptose. Die verminderte Expression von *FAS* könnte also zur Tumorentwicklung und Resistenz des UC beitragen. In Zellmodellen kam es bei Zugabe von *FasL*, einen spezifischen Liganden von *FAS*, zum Absterben der Tumorzellen [188-190].

Zinc finger protein 36, C3H1 type-like 1 wird durch das Gen *ZFP36L1* kodiert. Synonym wird es auch als *BRF1*, *ERF1*, *cMG1*, *ERF-1*, *Berg36*, *TIS11B* oder *RNF162B* bezeichnet. In den öffentlichen Expressionsdaten findet es sich in der Gruppe  $\geq$ pT2-Tumoren gegen Normalgewebe vermindert exprimiert; in der Gruppe Tumor gegen Normalgewebe und pTa-Tumoren gegen Normalgewebe ist es sogar in 80-100% der Fälle vermindert. Zudem wird in der TCGA Studie eine Mutation dieses Gens in 5% der untersuchten UC beschrieben [17]. Dieses Gen ist eines von vier Genen der *ZFP36/TIS11* Familie, die zu den *early responses genes* gehören. Diese Gene beinhalten zwei nebeneinander liegende Zink-Finger Motive, die Adenin-Uridin-reiche Elemente von mRNA binden und so posttranskriptionell die Expression von Genen beeinflussen. Für *ZFP36L1* konnte im speziellen eine Beeinflussung der Gene *TNF*, *GMCSF*, *IL-3*, *VEGF*, *c-IAP2*, *VEGF*, *STAR* und *BCL-2* nachgewiesen werden. Des Weiteren ist es entscheidend an der Embryogenese beteiligt und agiert als Tumorsuppressor [191]. So könnte *ZFP36L1* auch in der Tumorgenese des UC eine nicht unbedeutende Funktion besitzen. Bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren mit Cisplatin konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer geringen bzw. fehlenden *ZFP36L1* Expression resistenter gegenüber der apoptotischen Wirkung von Cisplatin sind. Nachdem man in diese Zellen *ZFP36L1* transferiert hatte, zeigten sie das gewünschte Ansprechen auf Cisplatin [192].

## 8.6 Vergleich aller Daten

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die einheitliche Veränderungen zeigen und somit für das UC typisch sein könnten. Dazu wurden alle relevanten Daten dieser Arbeit zusammengelegt und miteinander verglichen. In den *Tabellen 17* und *18* finden sich diejenigen Gene, die zum einen in BC44 und oder in BC61 von einer Chromosomenaberration betroffen sind und in den öffentlichen Expressionsdaten den Aberrationen entsprechend differentiell exprimiert sind. Zusätzlich wurden diese Ergebnisse mit den Expressionsdaten von BC61 verglichen. Der Unterschied zwischen *Tabelle 17* und *Tabelle 18* ist, dass in der ersten nur die Ergebnisse der öffentlichen Expressionsdaten aus dem Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe eingehen und in der zweiten die Gene zu finden sind, die in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsanalyse die entsprechende differentielle Expression aufweisen. Die hier angewandte statistische Analyse zu den Ergebnissen in *Table 17 und 18* erbringt keine Ergebnisse, die unter stringenten Kriterien als signifikant bezeichnet werden dürfen, die Trends ergeben jedoch durchaus wichtige Gene für das UC. Im Folgenden soll auf die mögliche Bedeutung einzelner Gene im UC näher eingegangen werden. Überschneidungen dieser Gene lassen weitere Rückschlüsse zu. So unterliegen die Gene *TGFBR1*, *TLE4*, *ALDH1B1*, *PSIP1*, *CDK5RAP2*, *SMARCA2*, *NFIB*, *NFX1* und *SPTAN1* in BC61 nicht nur einer Deletion, sondern zugleich ist ihre Expression in den öffentlichen Expressionsdaten von Tumor gegen Normalgewebe und den Expressionsdaten von BC61 zur Deletion passend vermindert. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen Genen um oft im UC vermindert exprimierte Gene handelt, wobei die Verminderung in BC61 durch Deletionen verursacht wurde.

Das Gen *PPF1A1* ist eines der auffälligsten Gene dieser Arbeit. Es kodiert für Liprin  $\alpha$ 1, welches zur LAR-Protein-Tyrosin-Phosphatase interagierenden Proteinfamilie gehört. Dieses Transmembranprotein ist an der Zelladhäsion und -migration beteiligt und beeinflusst so die Tumorzellinvasion. Dennoch ist der exakte Mechanismus mit seinen interagierenden Partnern bis jetzt nicht verstanden [193]. In dieser Arbeit findet es sich sowohl in BC44 als auch in BC61 amplifiziert, zeigt eine gesteigerte Expression in BC61 und ist durchgehend in den öffentlichen Expressionsdaten überexprimiert. Auch in anderen Tumorarten sind Zugewinne und eine gesteigerte Expression von *PPF1A1* beschrieben. Da das Gen in der Amplifikationsregion auf Chromosom 11q13 liegt, könnte es statt oder neben einer eigenen onkogenen Wirkung auch ein "Passagier-Gen" der Co-Amplifikation von *CCND1* darstellen. Die Amplifikation von *PPF1A1* geht in Brusttumoren und Zervixkarzinomen mit einer gesteigerten Invasivität einher, aber entgegengesetzt mit einer verminderten Invasivität in Kopf und Halstumoren. Dennoch verschlechtert sich für alle drei Entitäten die Prognose, wenn es gesteigert exprimiert vorliegt [194-196]. Eine Untersuchung zu *PPF1A1* für das UC findet sich zurzeit nicht.

Ein weiteres, durch seine Funktion auffälliges Gen ist *LSR*. Aus diesem Gen wird der Lipolyse-stimulierende Lipoprotein Rezeptor transkribiert. Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 19q13.12 und wird im UC oft überexprimiert. In dieser Arbeit zeigt *LSR* mit einem Zugewinn in BC44 und einer gesteigerten Expression sowohl in BC61 als auch in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten eher die Charakteristika eines Onkogens. Wenn man *LSR* durch eine spezifische siRNA funktionell ausschaltet, kann man eine starke Zunahme der Beweglichkeit und Invasivität von UC-Zellen beobachten [197]. In Mammakarzinomzellen wirkt es jedoch tumorsuppressiv [198]. Seine Funktion im UC bedarf einer näheren Abklärung.

Zwei weitere Gene zeigen typische Expressionsmuster von Onkogenen. Dabei handelt es sich um *CDC2* und *SKP2*. Beide finden sich in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten gesteigert exprimiert und sind zudem in BC44 von einem Zugewinn betroffen. Funktionell agieren beide regulierend in der späten G1-Phase und leiten die S-Phase des Zellzyklus ein, ähnlich wie der Transkriptionsfaktor *E2F1*. Der Einfluss auf die Progression des UC wurde für *CDC2* bereits gut untersucht [199]. Im Gegensatz dazu wurde das F-Box-Protein *SKP2*, welches die Expression von verschiedenen wichtigen Proteinen wie bspw. des CDK-Inhibitors p27 beeinflusst, noch nicht ausführlich im UC untersucht. Für andere Tumoren ist *SKP2* als wichtiges Onkogen etabliert [200]. Die Veränderung beider Gene gibt einen Hinweis darauf, dass nicht nur Regulationsprozesse in der frühen G1-Phase durch Cyclin D1 und p16<sup>INK4A</sup> verändert sind, sondern auch die späte Phase gestört verläuft. *SKP2* findet sich auf dem Chromosom 5p, welches häufiger im UC zugewonnen ist. Häufig werden im UC Duplikationen von Chromosom 5p beobachtet, die gleichzeitig mit einem Verlust des langen Arms von Chromosom 5 einhergehen. Solch ein Isochromosom 5 findet sich sowohl in BC44 als auch in BC61. Chromosom 5p beinhaltet weitere Gene, die bekanntermaßen das UC beeinflussen, darunter das Telomerase-Gen *TERT*, eins der prominentesten und am häufigsten mutierten Onkogene im UC [201]. Für BC61 konnte inzwischen eine typische aktivierende Promotormutation von *TERT* nachgewiesen werden (unpubliziertes Ergebnis der Arbeitsgruppe). Eine daraus resultierende Überexpression der Telomerase könnte vielleicht einen Grund für die Häufung von i5p in papillären Tumoren darstellen. In dieser Arbeit finden sich jedoch Hinweise, dass diese chromosomale Veränderung nicht nur durch den Zugewinn von *TERT* einen Vorteil für das Karzinom darstellt, sondern auch von anderen Genen wie *SKP2*. Ein weiteres Gen auf Chromosom 5p mit einer Amplifikation in BC44 ist *NUP155*. Passenderweise ist es wie *SKP2* in allen Gruppen der Expressionsdaten überexprimiert. Nucleoporin 155 ist als Bestandteil der Nukleosporen an dem bidirektionalen Transport von mRNA, Proteinen und anderen Zellbestandteilen zwischen Nukleus und Zytoplasma beteiligt [202]. Zurzeit stehen Nucleoporine nicht im Fokus der Tumorforschung. Sehr interessant ist aber der aktuelle Befund, wonach besonders Nucleoporin 155 an der Organisation des Chromatins im Zellkern entscheidend beteiligt sein soll [203].

Drei weitere auffällige Gene mit einer Beteiligung an interzellulären Transportsystemen sind *FXYD3*, *ERGIC3* und *TPX2*. Der onkogene Einfluss von *TPX2* wurde bereits an anderer Stelle diskutiert (siehe Kapitel 8.3.3). *FXYD3* zeigt in allen Fragestellungen dieser Arbeit eine Überexpression, wie man es von einem Onkogen erwartet. Im Detail ist es in BC44 zugewonnen; in BC61 und auch in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten ist es gesteigert exprimiert. Zudem findet es sich in 80-100%, also in mindestens fünf von 6 Datensätzen der öffentlichen Expressionsdaten in den Gruppen Tumor gegen Normalgewebe und pTa-Tumor gegen Normalgewebe gesteigert exprimiert. *FXYD3* reguliert den Transport zwischen zellulären Membranen und ist in der Mehrzahl der UC des oberen Harntrakts überexprimiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus dieser Arbeit schien in einer anderen Arbeit die Überexpression eher typisch für High-Grade Tumoren (80%) als für Low-Grade UC (40%) [204]. Auch *ERGIC3* kodiert für ein Protein eines intrazellulären Transportsystems und zeigt differentielle Expression in den verschiedenen Stadien des UC. Das Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 20; das Protein ist für den Transport von zellulären Bestandteilen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat verantwortlich. Es ist nachweislich an der Entstehung und Progression von Lungen- und hepatozellulären Karzinomen beteiligt und findet sich in diesen überexprimiert [205, 206]. *ERGIC3* ist nur in BC61 zugewonnen und wird dort gesteigert exprimiert. In den öffentlichen Expressionsdaten ist es in der Gruppe Tumor gegen Normalgewebe gesteigert exprimiert und zeigt in 80-100% der pTa-Tumoren eine erhöhte Expression. Dies führt zur Vermutung, dass eine Überexpression von *ERGIC3* spezifisch für Low-Grade Tumoren sein könnte. Leider ist *ERGIC3* noch wenig untersucht, vor allem im UC. Dennoch könnte es ein lohnendes Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Auch *GSN* zeigt Tendenzen stadienabhängig exprimiert zu werden. Es befindet sich auf dem Chromosom 9q33 und kodiert für Gelsolin, ein Aktin-bindendes Protein, das derart die Zellmigration kontrolliert. Eine verminderte Expression von Gelsolin hat man bereits für einige Tumoren beobachtet, so auch für das UC. Dabei korrelierte die verringerte Expression von *GSN* mit dem Stadium und der Prognose von UC und förderte im Experiment die Migration von Tumorzellen [207]. Die Einstufung von *GSN* als mögliches Tumorsuppressorgen wird auch in dieser Arbeit bestätigt. *GSN* ist in BC61 deletiert, wird in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten vermindert exprimiert, ist aber lediglich im Vergleich zwischen pTa-Tumoren und Normalgewebe in 80-100% der Datensätze vermindert exprimiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich um ein Tumorsuppressorgen besonders von Low-Grade Tumoren handelt.

*PPP3CC* ist sowohl unter den von homozygoten Deletionen in BC44 betroffenen Genen zu finden als auch in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten mit einer verminderten Expression vertreten. *PPP3CC* ist zudem in BC61 vermindert exprimiert und wird in der Gruppe von Tumor gegen Normalgewebe und pTa-Tumoren gegen Normalgewebe in 80-100% vermindert exprimiert.

Somit findet sich *PPP3CC* unter den am konstantesten veränderten Genen dieser Arbeit. *PPP3CC* kodiert die regulatorische Untereinheit der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin. Calcineurin limitiert das Entwicklungspotential von Stammzellen in der Epidermis [208]. Inwieweit diese Funktion auf das UC übertragbar ist, wurde bislang noch nicht untersucht. Das einzige experimentelle Indiz dafür ist eine Verminderung von Calcineurin während der Blasenhypertrophie [209]. Allein wegen seiner Rolle als Ziel der Immunsuppressionstherapie wird *PPP3CC* Gegenstand umfassender Forschung bleiben. Denn obwohl man mit Tacrolimus und Ciclosporin-A gut funktionierende und alltäglich verwendete Medikamente für die Immunsuppression hat, ist die Funktion von Calcineurin und seinen Substraten noch unvollständig verstanden, nicht zuletzt in UC-Zellen. Daher ist derzeit keine Aussage darüber möglich, welchen Vorteil es für einen Tumor hat, wenn durch eine Deletion von *PPP3CC* kein Calcineurin produziert wird, und ob dies im Zusammenhang mit dem Immunsystem steht. Eine Aktivierung von Calcineurin könnte jedoch einen völlig neuen therapeutischen Ansatz in der Tumorthherapie darstellen. Mit dem DNA-Reparatur Gen *PARP1* findet sich ein weiteres Gen, welches ein interessantes Ziel der UC-Therapie sein könnte. Dieses Gen kodiert für die Poly(ADP-ribosyl)-Polymerase 1, die an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist. Als Kofaktor der DNA-Reparatur ist sie ein bekanntes und bewährtes therapeutisches Ziel in bestimmten Tumoren [210, 211]. Neben seiner gesteigerten Expression in den öffentlichen Datensätzen findet sich *PARP1* auch in BC44 unter den zugewonnenen Genen und gehört damit zu den zentralen Genen dieser Arbeit.

So wie *PARP1* ist auch *NCSTN* auf dem Chromosom 1q22-24 in BC44 zugewonnen. In allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten zeigt *NCSTN* eine gesteigerte Expression und wurde auch in anderen Arbeiten als im UC amplifiziert und oder zugewonnen beschrieben [27, 157, 212]. *NCSTN* kodiert für Nicastrin, einen Bestandteil der  $\gamma$ -Sekretase. Diese ist u.a. an der Bildung des Amyloid-Precursor-Protein beteiligt, welches maßgeblich an der Entstehung von Morbus Alzheimer beteiligt ist. Für Tumoren ist vermutlich seine Beteiligung am Notch-Signalweg wichtiger. Notch ist ein Protein mit einer Zelltyp-abhängigen tumorsuppressiven bzw. onkogenen Wirkung [213]. Für die Mehrzahl der UC gilt, dass der Notch-Signalweg inaktiv ist. Dies gilt umso mehr, je weiter fortgeschritten das UC ist [214]. Mit dem Gen *ALDH1B1* findet sich ein weiteres Gen, dem ein Einfluss auf den Notch-Signalweg zugeschrieben wird. Dabei handelt es sich um eine mitochondriale Aldehyddehydrogenase, die besser aus dem Alkoholmetabolismus bekannt ist. Im Adenokarzinom des Kolons findet es sich häufig gesteigert exprimiert. Ein *Knockdown* von *ALDH1B1* in den Kolonkarzinomzelllinien SW480 führte zu einer verminderten Expression des NOTCH-Liganden JAG1 und der aktiven Form von NOTCH1 [215]. Anders als im Kolonkarzinom ist die *ALDH1B1* Expression in BC61 und in den öffentlichen Expressionsdaten (Tumor gegen Normalgewebe) vermindert. Zudem gehört es in BC61 zu den deletierten Genen. Dies könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass der Notch-Signalweg im UC anders agiert als bspw. im Kolonkarzinom. Auch *ALDH1A1* unterliegt in BC61 einer Deletion und die Expression ist entsprechend vermindert. Diese Aldehyddehydrogenase ist vor

allem am Vitamin-A bzw. Retinoid-Stoffwechsel beteiligt, welcher Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Zellwachstum hat. Gegensätzlich fanden sich in einer Untersuchung von 216 UC-Proben 56 mit einer erhöhten Expression dieser Aldehyddehydrogenase. Des Weiteren wird *ALDH1A1* als Marker für Tumorstammzellen verwendet und mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [216]. In manchen Stammzellen induziert der Notch-Signalweg *ALDH1A1*. In Adenokarzinomzellen aus der Lunge, in denen *ALDH1A1* durch siRNA geblockt wurde, zeigte sich andererseits ein deutlich signifikanter Anstieg von NOTCH1, NOTCH2 und NOTCH3 [217]. Ob und inwieweit diese Zusammenhänge für das UC zutreffen, benötigt genauere Untersuchungen.

Auf Chromosom 3 findet sich das Gen *TGFBR2*. Es kodiert für den Transforming Growth Factor Receptor- $\beta$ 2, einen von zwei Rezeptoren, an denen der Transformationswachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) bindet. Dieses Zytokin beeinflusst Wachstum, Differenzierung und Apoptose verschiedener Zellen. Dabei bindet TGF- $\beta$  an ein *TGFBR2*-Dimer, welches wiederum ein *TGFBR1*-Dimer phosphoryliert. Zusammen aktivieren sie SMAD Transkriptionsfaktoren und beeinflussen so die Genexpression und viele Zelleigenschaften. Eine verminderte Expression von *TGFBR2* und dessen Auswirkung auf die Tumorgenese sind bereits für das Prostatakarzinom und das Kolonkarzinom belegt [218, 219]. Auch für das UC ist bekannt, dass der TGF- $\beta$  Signalweg verändert ist [220]. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass nicht nur das deletierte und vermindert exprimierte *TGFBR1* Gen in BC61 betroffen ist sondern auch die zweite Rezeptorkomponente *TGFBR2*. Anders als *TGFBR1* ist diese in BC61 nicht deletiert, sondern nur vermindert exprimiert. Beide Gene fallen auch in den öffentlichen Expressionsdaten durch eine verminderte Expression in der Gruppe Tumor gegen Normalgewebe auf. Weiterhin findet sich für *TGFBR2* auch in allen Gruppen der öffentlichen Expressionsdaten und zudem auch in der Gruppe pTa-Tumore und in der Gruppe  $\geq$ pT2-Tumore gegen Normalgewebe eine verminderte Expression in 80-100% der Datensätze. Somit scheint dieser Signalweg in BC61 und in vielen Tumoren der öffentlichen Expressionsdaten stark eingeschränkt zu sein. Ein interessanter Teilaspekt ist, dass das bekanntere und oft durch eine Deletion betroffene Gen *TGFBR1* nicht so konstant in den Daten dieser Arbeit reprimiert wird wie *TGFBR2*. Konträr finden sich in der Literatur mehr Arbeiten, die sich mit *TGFBR1* beschäftigen und diesem einen tumorsupprimierenden Effekt zusprechen [23, 221]. Dass *TGFBR1* intensiver als *TGFBR2* untersucht ist, basiert wahrscheinlich auf der Lokalisation auf Chromosom 9q und dessen häufigem Verlust, so wie im Fall von BC61. *TGFBR2* ist weder in BC44 noch in BC61 von einer Deletion betroffen, womit sich die Frage stellt, auf welche Art und Weise seine Expression vermindert wird. Beispielsweise konnte man für Magen- und Darmtumoren zeigen, dass es dort sehr häufig mutiert vorliegt [222]. Für das UC finden sich keine Arbeiten, die dies näher untersucht haben.

## 8.7 Schlussfolgerung

Die Zelllinie BC44 stammt aus einem hoch invasiven pT4 High-Grade UC, dessen triploider Karyotyp die Instabilität des Genoms anzeigt; in 15 Chromosomen weist BC44 numerische oder strukturelle Aberrationen auf. Der tetraploide Karyotyp der pTa High-Grade UC-Zelllinie BC61 wirkt deutlich homogener und stabiler. Größere Veränderungen betreffen lediglich die Chromosomen 5, 9, 10, 19 und 20. Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass BC44 eine atypische p53-Inaktivierung aufweist und BC61 eine onkogene *FGFR3* Mutation mit einer gesteigerten Expression des Rezeptors zeigt. Weiterhin ist BC61 wildtypisch für *PIK3CA* und p53.

Aus der aCGH geht hervor, dass in BC44 insgesamt acht Chromosomenabschnitte homozygot deletiert sind und nur ein Bereich amplifiziert ist. In diesen Abschnitten liegen 188 homozygot deletierte Gene und 21 amplifizierte Gene. BC61 weist insgesamt 43 Gene in acht homozygoten Deletionen und 42 Gene in drei Amplifikationen auf. Die homozygote Deletion 9p21 und die Amplifikation 11q13 finden sich in beiden Zelllinien mit 20 gemeinsamen amplifizierten und 4 gemeinsamen homozygot deletierten Genen (siehe Tabelle 7). Bei diesen häufig im UC vorkommenden Aberrationen stehen die Gene *CDKN2A* und *CCND1* im Zentrum. Es scheint kein Zufall zu sein, dass es sich hierbei um zwei Gene der Zellzyklusregulation handelt. Auch die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Beeinflussung des Zellzyklus entscheidend in der Entstehung und Progression des UC ist. Hierbei gibt es bei den einzelnen Tumoren vielfältige Möglichkeiten. Ein für das UC seltener Befund ist die Amplifikation und gesteigerte Expression von *MDM2* in BC61, was wahrscheinlich eine alternative Möglichkeit zur Umgehung der p53-abhängigen Checkpoints darstellt. In BC44 und BC61 sind viele weitere UC-typische Onkogene ohne Bezug zum Zellzyklus amplifiziert und überexprimiert. So fallen mit einer gesteigerten Expression in BC61 und in den öffentlich zugänglichen Expressionsanalysen die ein Protein-Heterodimer bildenden Gene *ERBB2* und *ERBB3* auf. Diese epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren sind im Mammakarzinom detailliert untersucht und stellen dort ein gut etabliertes Therapieziel dar, sind jedoch erst neuerdings wieder Gegenstand der UC-Forschung.

Von besonderem Interesse sind in dieser Arbeit Gene, die immer wieder in den verschiedenen Untersuchungen aufgefallen sind, aber im UC bisher wenig Beachtung gefunden haben. *GSN*, *PARP1* und *LSR* sind wichtige Beispiele dafür. Sie gehören zu den am beständigsten veränderten Genen über verschiedene Analysen hinweg. Obwohl ihre Funktionen für Tumoren im Allgemeinen sichtlich relevant sind, weiß man über ihre genaue Funktion und Relevanz im UC recht wenig. Zum Beispiel ist *PARP1* ein Kofaktor der DNA-Reparatur und ein bewährtes therapeutisches Ziel in einigen anderen Tumorarten.

Auf die gleiche Weise ist die kombinierte verminderte Expression der Gene *TGFBR2* und *TGFBR1* in BC61 aufgefallen. Sie ist bis jetzt kaum für das UC beschrieben, aber auch aus Daten anderer Microarrayanalysen zufolge öfter im UC vertreten. Ob diese Veränderung die Entstehung oder

Progression des UC beeinflussen kann, ist bisher nicht untersucht. An dieser Stelle ist auch die potentielle Beeinflussung des FGF-Signalwegs in BC61 zu nennen. Eine *FGFR3* Mutation ist sehr häufig im UC zu finden. Eine zusätzliche Amplifikation seines Liganden *FGF4* und seines Substrats *FRS2*, welches zu den Top 100 gesteigert exprimierten Genen in BC61 gehört, ist in dieser Form noch nicht beschrieben worden. Es finden sich in der Analyse der Ergebnisse noch viele weitere robust veränderte Gene, die das UC beeinflussen können. Dazu gehören einige immunmodulierende Gene, wie *TIRC7*, *PPP3CC*, *PLUNC*, Interferon- und Defensin-Gene. Aber auch *PPFIA1*, *SKP2*, *NUP155* oder *ERGIC3* sind womöglich relevant für das UC. Beispielsweise wird *SKP2* durch seinen Einfluss auf p27<sup>KIP1</sup> in vielen Tumoren für ein wichtiges Onkogen gehalten, für das bereits *small molecule* Inhibitoren entwickelt wurden [223]. *ERGIC3* ist nachweislich an der Entstehung und Progression von Lungen- und hepatozellulären Karzinomen beteiligt und findet sich in diesen oft überexprimiert. Sowohl im Hinblick auf die Pathogenese als auch auf die Therapie des UC, scheinen sich zukünftige Untersuchungen zu den oben genannten Genen zu lohnen.

Die genauere Untersuchung der Amplifikationseinheiten in BC44 und BC61 ergibt andere interessante Aspekte. Allgemein illustriert sie die Heterogenität dieser Veränderung, führt aber auch zu der speziellen Frage, ob man die Co-Amplifikation von Tumorsuppressorgenen wie *FADD* oder *RALGAPA2* für die Therapie des UC nutzen könnte.

Obwohl das UC zu den häufigsten malignen Veränderungen gehört, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass diese Tumorart trotz der Anstrengungen der letzten Jahre noch relativ unerforscht ist. Die UC-Forschung birgt noch einiges an Potential, um die Therapie und die Prognose zukünftiger Patienten zu verbessern.

## 9 Quellenverzeichnis

1. Sjudahl, G., et al., *Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma*. Am J Pathol, 2013. 183(3): p. 681-91.
2. J.N. Ebele. G.Sauter, J.I.E.a.I.A.S., *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 2004, Lyon: IARCPress. 360
3. Kaatsch, D.P., *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013, Germany: Rober Koch-Institut.
4. Rubin, R., *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins. 2008. 1341.
5. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): p. 69-90.
6. Ferlay, J., et al., *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]*. International Agency for Research on Cancer, 2010.
7. Bray, F., et al., *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. International Journal of Cancer, 2013. 132(5): p. 1133-1145.
8. Cancer, I.A.f.R.o., *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. World Health organization Classification of Tumours, ed. L.H.S. Paul Kleihues. 2004, Lyon, France: IARC Press. 354.
9. Burger, M., et al., *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer*. European Urology, 2013. 63(2): p. 234-241.
10. Lai, M.-N., et al., *Population-based case-control study of Chinese herbal products containing aristolochic acid and urinary tract cancer risk*. Journal of the National Cancer Institute, 2010. 102(3): p. 179-186.
11. Hoang, M.L., et al., *Mutational signature of aristolochic acid exposure as revealed by whole-exome sequencing*. Science translational medicine, 2013. 5(197): p. 197ra102-197ra102.
12. Higuchi, T., et al., *A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth*. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(8): p. 1245-55.
13. Lindemann-Docter, K. and R. Knuchel-Clarke, *Histopathologie des Harnblasenkarzinoms*. Der Urologe, 2008. 47(5): p. 627-36; quiz 637.
14. Lindgren, D., et al., *Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome*. Cancer Res, 2010. 70(9): p. 3463-72.
15. Park, J.C., et al., *Multimodal management of muscle-invasive bladder cancer*. Current problems in cancer, 2014. 38(3): p. 80-108.
16. Malkowicz, S.B., et al., *Muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder*. Urology, 2007. 69(1 Suppl): p. 3-16.
17. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature, 2014. 507(7492): p. 315-22.
18. 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.
19. Guo, G., et al., *Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation*. Nat Genet, 2013. 45(12): p. 1459-63.
20. Fehrman, R.S., et al., *Gene expression analysis identifies global gene dosage sensitivity in cancer*. Nat Genet, 2015.
21. Chin, L., J.N. Andersen, and P.A. Futreal, *Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine*. Nature medicine, 2011. 17(3): p. 297-303.
22. Kunath, F., et al., *Bladder cancer--the neglected tumor: a descriptive analysis of publications referenced in MEDLINE and data from the register ClinicalTrials.gov*. BMC Urol, 2013. 13: p. 56.
23. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
24. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. 358(6381): p. 15-16.
25. Matsui, A., et al., *Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer*. Biomolecular concepts, 2013. 4(6): p. 567-582.

26. Hoglund, M., *The bladder cancer genome; chromosomal changes as prognostic makers, opportunities, and obstacles*. Urol Oncol, 2012. 30(4): p. 533-40.
27. Knowles, M.A., *Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?* Carcinogenesis, 2006. 27(3): p. 361-73.
28. Mhawech-Fauceglia, P., R.T. Cheney, and J. Schwaller, *Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review*. Cancer, 2006. 106(6): p. 1205-16.
29. Hurst, C.D., et al., *Novel tumor subgroups of urothelial carcinoma of the bladder defined by integrated genomic analysis*. Clin Cancer Res, 2012. 18(21): p. 5865-77.
30. Lindgren, D., et al., *Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e38863.
31. Schmitz-Drager, B.J., et al., *p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer*. European Urology, 1997. 32(4): p. 487-93.
32. Pymar, L.S., et al., *Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms*. Hum Mol Genet, 2008. 17(13): p. 2006-2017.
33. Chen, M., et al., *Genetic variations in the sonic hedgehog pathway affect clinical outcomes in non-muscle-invasive bladder cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. 3(10): p. 1235-1245.
34. Petrova, R. and A.L. Joyner, *Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair*. Development, 2014. 141(18): p. 3445-3457.
35. Fei, D.L., et al., *Hedgehog signaling regulates bladder cancer growth and tumorigenicity*. Cancer Res, 2012. 72(17): p. 4449-4458.
36. Shim, U.J., et al., *Decreased DBC1 expression is associated with poor prognosis in patients with non-muscle-invasive bladder cancer*. Korean journal of urology, 2013. 54(9): p. 631-637.
37. Greife, A., et al., *Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma*. BMC Cancer, 2014. 14(1): p. 628.
38. L'Hote, C.G. and M.A. Knowles, *Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis*. Exp Cell Res, 2005. 304(2): p. 417-31.
39. Lindgren, D., et al., *Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q*. Oncogene, 2006. 25(18): p. 2685-96.
40. Maas, S., et al., *Decreased Fas expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status*. Urology, 2004. 63(2): p. 392-7.
41. Gonzalez-Campora, R., et al., *BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma*. Cancer Lett, 2007. 250(2): p. 292-9.
42. Schulz, W.A., *Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways*. International Journal of Cancer, 2006. 119(7): p. 1513-8.
43. Wu, X.R., *Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(9): p. 713-25.
44. Epstein, J.I., et al., *The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee*. Am J Surg Pathol, 1998. 22(12): p. 1435-48.
45. Blaveri, E., et al., *Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization*. Clin Cancer Res, 2005. 11(19 Pt 1): p. 7012-22.
46. Schulz, W.A., et al., *Epigenetics of urothelial carcinoma*, in *Cancer Epigenetics*. 2015, Springer. p. 183-215.
47. *TERT Promoter Mutations Reactivate Telomerase in Urothelial Carcinoma*. Cancer Discov, 2015.
48. Hatina, J., et al., *Harnblasenkarzinomzelllinien als Modellsysteme zur Pathobiologie des Harnblasenkarzinoms*. Der Urologe, 2008. 47(6): p. 724-34.
49. Koch, A., et al., *Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines*. Cellular Oncology, 2012. 35(4): p. 243-57.
50. Southgate, J., et al., *Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification*. Lab Invest, 1994. 71(4): p. 583-594.

51. Schrock, E., et al., *Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes*. Science, 1996. 273(5274): p. 494-7.
52. Brothman, A.R., D.L. Persons, and L.G. Shaffer, *Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition*. Cytogenet Genome Res, 2009. 127(1): p. 1-4.
53. Hiller, B., et al., *CyDAS: a cytogenetic data analysis system*. Bioinformatics, 2005. 21(7): p. 1282-3.
54. Rigby, P.W., et al., *Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I*. J Mol Biol, 1977. 113(1): p. 237-51.
55. Fujita, P.A., et al., *The UCSC genome browser database: update 2011*. Nucleic Acids Res, 2010: p. gkq963.
56. 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.
57. Zhang, Zhongfa, et al. *Comparative gene expression profiling analysis of urothelial carcinoma of the renal pelvis and bladder*. BMC medical genomics 3.1 (2010).
58. Stransky, N., et al., *Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer*. Nat Genet, 2006. 38(12): p. 1386-96.
59. 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.
60. Mengual, L., et al., *DNA microarray expression profiling of bladder cancer allows identification of noninvasive diagnostic markers*. J Urol, 2009. 182(2): p. 741-8.
61. Kim, W.J., et al., *Predictive value of progression-related gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer*. Mol Cancer, 2010. 9: p. 3.
62. 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.
63. RStudio, *RStudio: Integrated development environment for R (Version 2.15.3) [Computer software]*. Boston, MA. Retrieved November 2013, 2012. Available from <http://www.rstudio.org/>.
64. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(1): p. 1-13.
65. 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.
66. Zhao, Y., H. Yu, and W. Hu, *The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2014. 46(3): p. 180-189.
67. Congrains, A., et al., *ANRIL: Molecular Mechanisms and Implications in Human Health*. Int J Mol Sci, 2013. 14(1): p. 1278-92.
68. Rual, J.F., et al., *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature, 2005. 437(7062): p. 1173-8.
69. Pitha, P.M., *Interferon: The 50th Anniversay*. 2007.
70. Cairns, P., et al., *Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction*. Cancer Res, 1994. 54(6): p. 1422-4.
71. Lamm, D., et al., *Interferon alfa in the treatment paradigm for non-muscle-invasive bladder cancer*. Urol Oncol, 2014. 32(1): p. 35 e21-30.
72. Lee, B., et al., *Homozygous deletions at 3p22, 5p14, 6q15, and 9p21 result in aberrant expression of tumor suppressor genes in gastric cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2015. 54(3): p. 142-55.
73. Zhang, C. and A.J. Saunders, *An emerging role for Ubiquilin 1 in regulating protein quality control system and in disease pathogenesis*. Discov Med, 2009. 8(40): p. 18-22.
74. Rothenberg, C., et al., *Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy*. Hum Mol Genet, 2010. 19(16): p. 3219-32.
75. Ozaki, T., et al., *Overexpression of DA41 in v-Ha-ras-3Y1 cells causes growth suppression*. Jpn J Cancer Res, 2000. 91(10): p. 987-93.

76. Wang, S., et al., *Decreased expression of microRNA-31 associates with aggressive tumor progression and poor prognosis in patients with bladder cancer*. Clin Transl Oncol, 2013. 15(10): p. 849-54.
77. Creighton, C.J., et al., *Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers*. Cancer Res, 2010. 70(5): p. 1906-15.
78. Christopher, S.A., et al., *Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16cdkN2a/ARF, acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line*. Cancer Res, 2002. 62(22): p. 6639-6644.
79. Tang, B., et al., *Expression of MTAP Inhibits Tumor-Related Phenotypes in HT1080 Cells via a Mechanism Unrelated to Its Enzymatic Function*. G3: Genes| Genomes| Genetics, 2015. 5(1): p. 35-44.
80. Katoh, M. and M. Katoh, *Comparative genomics on mammalian Fgf3-Fgf4 locus*. Int J Oncol, 2005. 27(1): p. 281-5.
81. Zhang, Y.H., et al., *The clinical significance of expression and amplification of FGF3 in bladder transitional cell carcinoma*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2006. 86(36): p. 2556-9.
82. Katoh, M. and M. Katoh, *Evolutionary conservation of CCND1-ORAOV1-FGF19-FGF4 locus from zebrafish to human*. Int J Mol Med, 2003. 12(1): p. 45-50.
83. di Martino, E., D.C. Tomlinson, and M.A. Knowles, *A decade of FGF receptor research in bladder cancer: past, present, and future challenges*. Advances in urology, 2012.
84. Koch, A., et al., *Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines*. Cellular Oncology, 2012. 35(4): p. 243-257.
85. Valencia, T., et al., *Role and expression of FRS2 and FRS3 in prostate cancer*. BMC Cancer, 2011. 11(1): p. 484.
86. Zhai, C., et al., *The function of ORAOV1/LTO1, a gene that is overexpressed frequently in cancer: essential roles in the function and biogenesis of the ribosome*. Oncogene, 2014. 33(4): p. 484-94.
87. Sikand, K., et al., *Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin are targets of miR-644a*. PLoS One, 2012. 7(10): p. e47510.
88. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. 435(7043): p. 834-8.
89. Luo, M.L., et al., *Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance*. Cancer Res, 2006. 66(24): p. 11690-9.
90. Rauch, I. and B. Kofler, *The galanin system in cancer*. EXS, 2010. 102: p. 223-41.
91. Sugimoto, T., et al., *The galanin signaling cascade is a candidate pathway regulating oncogenesis in human squamous cell carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. 48(2): p. 132-42.
92. Lawlor, G., et al., *MYEOV (myeloma overexpressed gene) drives colon cancer cell migration and is regulated by PGE2*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. 29: p. 81.
93. Lee, E.W., et al., *The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis*. BMB Rep, 2012. 45(9): p. 496-508.
94. Glunde, K., Z.M. Bhujwala, and S.M. Ronen, *Choline metabolism in malignant transformation*. Nature Reviews Cancer, 2011. 11(12): p. 835-848.
95. Lacal, J.C. and J.M. Campos, *Preclinical Characterization of RSM-932A, a Novel Anticancer Drug Targeting the Human Choline Kinase Alpha, an Enzyme Involved in Increased Lipid Metabolism of Cancer Cells*. Mol Cancer Ther, 2015. 14(1): p. 31-9.
96. Hernando, E., et al., *A critical role for choline kinase- $\alpha$  in the aggressiveness of bladder carcinomas*. Oncogene, 2009. 28(26): p. 2425-2435.
97. Tsang, L.W., N. Hu, and D.A. Underhill, *Comparative analyses of SUV420H1 isoforms and SUV420H2 reveal differences in their cellular localization and effects on myogenic differentiation*. PLoS One, 2010. 5(12): p. e14447.
98. Liu, L., et al., *Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer*. Oncotarget, 2014.

99. Helfricht, A. and H. van Attikum, *Remodeling and spacing factor 1 (RSF1): a rising star in DNA repair*. Epigenomics, 2014(6): p. 261-265.
100. Sheu, J.J., et al., *Rsf-1, a chromatin remodeling protein, induces DNA damage and promotes genomic instability*. J Biol Chem, 2010. 285(49): p. 38260-9.
101. Tao, K., et al., *Knockdown of YEATS4 inhibits colorectal cancer cell proliferation and induces apoptosis*. American Journal of Translational Research, 2015. 7(3).
102. Pikor, L.A., et al., *YEATS4 is a novel oncogene amplified in non-small cell lung cancer that regulates the p53 pathway*. Cancer Res, 2013. 73(24): p. 7301-12.
103. Vargas, P., et al., *Expression of PLUNC family members in benign and malignant salivary gland tumours*. Oral diseases, 2008. 14(7): p. 613-619.
104. Bartlett, J.A., et al., *PLUNC is a secreted product of neutrophil granules*. J Leukoc Biol, 2008. 83(5): p. 1201-6.
105. Pinto-Leite, R., et al., *Genomic characterization of three urinary bladder cancer cell lines: understanding genomic types of urinary bladder cancer*. Tumour Biol, 2014.
106. Kunze, D., et al., *siRNA-mediated inhibition of antiapoptotic genes enhances chemotherapy efficacy in bladder cancer cells*. Anticancer Res, 2012. 32(10): p. 4313-8.
107. Fong, S., R.J. Debs, and P.-Y. Desprez, *Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy*. Trends in molecular medicine, 2004. 10(8): p. 387-392.
108. Ling, F., B. Kang, and X.-H. Sun, *Id proteins: small molecules, mighty regulators*. Curr Top Dev Biol, 2014. 110: p. 189-216.
109. Hu, H., et al., *The role of Id-1 in chemosensitivity and epirubicin-induced apoptosis in bladder cancer cells*. Oncol Rep, 2009. 21(4): p. 1053-9.
110. Yan, L., et al., *Target protein for Xklp2 (TPX2), a microtubule-related protein, contributes to malignant phenotype in bladder carcinoma*. Tumour Biol, 2013. 34(6): p. 4089-100.
111. Huang, Y., W. Guo, and H. Kan, *TPX2 is a prognostic marker and contributes to growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma*. Int J Mol Sci, 2014. 15(10): p. 18148-18161.
112. Jiang, L., et al., *PDRG1, a novel tumor marker for multiple malignancies that is selectively regulated by genotoxic stress*. Cancer Biol Ther, 2011. 11(6): p. 567-73.
113. Zhang, S., et al., *Effects on biological behavior of bladder carcinoma T24 cells via silencing DNMT1 and/or DNMT3b with shRNA in vitro*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009. 29(2): p. 215-9.
114. Saito, R., et al., *Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer*. Oncogene, 2013. 32(7): p. 894-902.
115. Wilson, S.S., M.E. Wiens, and J.G. Smith, *Antiviral mechanisms of human defensins*. J Mol Biol, 2013. 425(24): p. 4965-4980.
116. Sun, C.Q., et al., *Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma*. Cancer Res, 2006. 66(17): p. 8542-9.
117. Droin, N., et al., *Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules*. J Proteomics, 2009. 72(6): p. 918-27.
118. Voelkel-Johnson, C., *TRAIL-mediated signaling in prostate, bladder and renal cancer*. Nature Reviews Urology, 2011. 8(8): p. 417-427.
119. Li, Y., et al., *Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in bladder cancer: correlation with response to adjuvant therapy and implications of prognosis*. Urology, 2012. 79(4): p. 968 e7-15.
120. Williams, S.V., et al., *High-resolution analysis of genomic alteration on chromosome arm 8p in urothelial carcinoma*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2010. 49(7): p. 642-659.
121. Williams, Sarah V., et al. *High-resolution analysis of genomic alteration on chromosome arm 8p in urothelial carcinoma*. Genes, Chromosomes and Cancer 49.7 (2010): 642-659.
122. Roessler, S., et al., *Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival*. Gastroenterology, 2012. 142(4): p. 957-966. e12.
123. Xiao, J., et al., *Reduced expression of MTUS1 mRNA is correlated with poor prognosis in bladder cancer*. Oncol Lett, 2012. 4(1): p. 113-118.

124. Rogler, A., et al., *Loss of MTUS1/ATIP expression is associated with adverse outcome in advanced bladder carcinomas: data from a retrospective study*. BMC Cancer, 2014. 14(1): p. 214.
125. Cook, B.D., et al., *Role for the related poly (ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres*. Molecular and cellular biology, 2002. 22(1): p. 332-342.
126. Gelmini, S., et al., *Tankyrase-1 mRNA expression in bladder cancer and paired urine sediment: preliminary experience*. Clin Chem Lab Med, 2007. 45(7): p. 862-6.
127. Hamaguchi, M., et al., *DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(21): p. 13647-13652.
128. Knowles, M.A., et al., *Mutation analysis of the 8p candidate tumour suppressor genes DBC2 (RHOBTB2) and LZTS1 in bladder cancer*. Cancer Lett, 2005. 225(1): p. 121-30.
129. Shi, Y., et al., *DBC2 gene is silenced by promoter methylation in bladder cancer*. Urol Oncol, 2008. 26(5): p. 465-9.
130. Tang, W., et al., *RhoBTB2 gene in breast cancer is silenced by promoter methylation*. Int J Mol Med, 2014. 33(3): p. 722-8.
131. Vecchione, A., et al., *FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells*. Am J Pathol, 2002. 160(4): p. 1345-52.
132. Ishii, H., et al., *FEZ1/LZTS1 gene at 8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. 98(18): p. 10374-10379.
133. Chen, L., et al., *Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis*. Breast Cancer Res Treat, 2009. 116(3): p. 471-8.
134. Baffa, R., et al., *Fez1/Lzts1-deficient mice are more susceptible to N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2008. 29(4): p. 846-8.
135. Liu, J.Y., et al., *PinX1 suppresses bladder urothelial carcinoma cell proliferation via the inhibition of telomerase activity and p16/cyclin D1 pathway*. Mol Cancer, 2013. 12(1): p. 148.
136. Yan, S.-M., et al., *Reduced expression of ZDHHC2 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in gastric adenocarcinoma*. PLoS One, 2013. 8(2): p. e56366.
137. Planey, S.L., et al., *Palmitoylation of cytoskeleton associated protein 4 by DHHC2 regulates antiproliferative factor-mediated signaling*. Mol Biol Cell, 2009. 20(5): p. 1454-63.
138. Shahjee, H.M., et al., *Antiproliferative factor decreases Akt phosphorylation and alters gene expression via CKAP4 in T24 bladder carcinoma cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. 29: p. 160.
139. Lu, Y., et al., *Piwil2 suppresses p53 by inducing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 in tumor cells*. PLoS One, 2012. 7(1): p. e30999.
140. Nikpour, P., et al., *Absence of PIWIL2 (HILI) expression in human bladder cancer cell lines and tissues*. Cancer Epidemiol, 2009. 33(3-4): p. 271-5.
141. Liao, Y.C. and S.H. Lo, *Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(5): p. 843-7.
142. Xue, W., et al., *DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma*. Genes & development, 2008. 22(11): p. 1439-1444.
143. Xiao, J., et al., *Construction of a recombinant eukaryotic expression plasmid containing human PDLIM2 gene and its biological activity*. Plasmid, 2011. 66(2): p. 106-11.
144. Dou, H., S. Mitra, and T.K. Hazra, *Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(50): p. 49679-49684.
145. Sun, P.C., et al., *Transcript map of the 8p23 putative tumor suppressor region*. Genomics, 2001. 75(1-3): p. 17-25.
146. Okkels, H., et al., *Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1997. 6(4): p. 225-231.
147. Sanderson, S., G. Salanti, and J. Higgins, *Joint effects of the N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis*. Am J Epidemiol, 2007. 166(7): p. 741-51.

148. Niegisch, G., et al., *Epigenetik des Urothelkarzinoms*. Der Urologe, 2015. 54(4): p. 526-532.
149. Martens-Uzunova, E.S., et al., *Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer*. European Urology, 2014. 65(6): p. 1140-1151.
150. Liu, Q., et al., *LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor*. Nucleic Acids Res, 2013. 41(9): p. 4976-87.
151. Zuin, J., et al., *A cohesin-independent role for NIPBL at promoters provides insights in CdLS*. PLoS Genet, 2014. 10(2): p. e1004153.
152. Ibragimova, I., et al., *Aberrant promoter hypermethylation of PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A and other chromatin-modifying genes is absent or rare in clear cell RCC*. Epigenetics, 2013. 8(5): p. 486-93.
153. Shurtleff, S., et al., *TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t (12; 21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis*. Leukemia, 1995. 9(12): p. 1985-1989.
154. Ferrari, N., et al., *Expression of RUNX1 correlates with poor patient prognosis in triple negative breast cancer*. PLoS One, 2014. 9(6): p. e100759.
155. Baena, E., et al., *ETV1 directs androgen metabolism and confers aggressive prostate cancer in targeted mice and patients*. Genes & development, 2013. 27(6): p. 683-698.
156. Tzeng, C., et al., *Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan*. Anticancer Res, 1996. 16: p. 1797-1804.
157. Lindgren, D., et al., *Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e38863.
158. Goebell, P.J. and M.A. Knowles. *Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium*. in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2010. Elsevier.
159. Simon, R., et al., *Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer*. Oncogene, 2002. 21(16): p. 2476-2483.
160. Schmitz-Dräger, B., et al., *p53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer*. European Urology, 1996. 32(4): p. 487-493.
161. Stone, R., 2nd, et al., *Identification of genes correlated with early-stage bladder cancer progression*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. 3(6): p. 776-86.
162. Nord, H., et al., *Focal amplifications are associated with high grade and recurrences in stage Ta bladder carcinoma*. Int J Cancer, 2010. 126(6): p. 1390-402.
163. Mansure, J.J., R. Nassim, and W. Kassouf, *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in bladder cancer: a promising therapeutic target*. Cancer Biol Ther, 2009. 8(7): p. 575-584.
164. Han, S. and J. Roman, *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : a novel target for cancer therapeutics?* Anti-cancer drugs, 2007. 18(3): p. 237-244.
165. Houseknecht, K.L., B.M. Cole, and P.J. Steele, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and its ligands: a review*. Domestic animal endocrinology, 2002. 22(1): p. 1-23.
166. Wang, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in malignant diseases*. Critical reviews in oncology/hematology, 2006. 58(1): p. 1-14.
167. Varley, C.L. and J. Southgate, *Effects of PPAR agonists on proliferation and differentiation in human urothelium*. Experimental and Toxicologic Pathology, 2008. 60(6): p. 435-441.
168. Yang, D.R., et al., *Higher expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma or its activation by agonist thiazolidinedione-rosiglitazone promotes bladder cancer cell migration and invasion*. Urology, 2013. 81(5): p. 1109 e1-6.
169. Panvichian, R., et al., *TOP2A Amplification and Overexpression in Hepatocellular Carcinoma Tissues*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 381602.
170. Simon, R., et al., *HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer*. Int J Cancer, 2003. 107(5): p. 764-72.
171. Shen, H., et al., *6p22.3 amplification as a biomarker and potential therapeutic target of advanced stage bladder cancer*. Oncotarget, 2013. 4(11): p. 2124-34.
172. Hurst, C.D., et al., *Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification*. Oncogene, 2008. 27(19): p. 2716-2727.

173. Vervoort, S.J., R. van Boxtel, and P.J. Coffey, *The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe?* *Oncogene*, 2013. 32(29): p. 3397-409.
174. Wu, Q., et al., *Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer.* *Mol Cancer*, 2005. 4(1): p. 16.
175. Ezponda, T. and J.D. Licht, *Molecular Pathways: Deregulation of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Cancer—Different Paths, Same Destination.* *Clinical Cancer Research*, 2014. 20(19): p. 5001-5008.
176. Gui, Y., et al., *Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder.* *Nat Genet*, 2011. 43(9): p. 875-878.
177. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.* *Nature*, 2002. 419(6907): p. 624-629.
178. Tang, S.H., et al., *Pharmacologic down-regulation of EZH2 suppresses bladder cancer in vitro and in vivo.* *Oncotarget*, 2014. 5(21): p. 10342-55.
179. Yuan, J., et al., *Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo.* *Oncogene*, 2006. 25(12): p. 1753-62.
180. Forster, J.A., et al., *Expression of NRG1 and its receptors in human bladder cancer.* *Br J Cancer*, 2011. 104(7): p. 1135-43.
181. Citri, A., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3.* *Exp Cell Res*, 2003. 284(1): p. 54-65.
182. Iliopoulos, D., et al., *Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer.* *Oncogene*, 2005. 24(9): p. 1625-1633.
183. Aldaz, C.M., B.W. Ferguson, and M.C. Abba, *WWOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2014. 1846(1): p. 188-200.
184. Salah, Z., R. Aqeilan, and K. Huebner, *WWOX gene and gene product: tumor suppression through specific protein interactions.* *Future Oncol*, 2010. 6(2): p. 249-59.
185. Płuciennik, E., et al., *Alternating expression levels of WWOX tumor suppressor and cancer-related genes in patients with bladder cancer.* *Oncol Lett*, 2014. 8(5): p. 2291-2297.
186. Ramos, D., et al., *Low levels of WWOX protein immunoexpression correlate with tumour grade and a less favourable outcome in patients with urinary bladder tumours.* *Histopathology*, 2008. 52(7): p. 831-839.
187. Maas, S., et al., *Decreased Fas expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status.* *Urology*, 2004. 63(2): p. 392-397.
188. Li, W., et al., *Relationship between aberrant methylation of FAS promoter and biological behavior of bladder urothelial carcinoma.* *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011. 31(6): p. 794-8.
189. Sudarshan, S., et al., *In vitro efficacy of Fas ligand gene therapy for the treatment of bladder cancer.* *Cancer Gene Ther*, 2005. 12(1): p. 12-18.
190. Ewald, F., et al., *The role of c-FLIP splice variants in urothelial tumours.* *Cell death & disease*, 2011. 2(12): p. e245.
191. Nasir, A., et al., *ZFP36L1 negatively regulates plasmacytoid differentiation of BCL1 cells by targeting BLIMP1 mRNA.* 2012.
192. Baou, M., A. Jewell, and J.J. Murphy, *TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation.* *J Biomed Biotechnol*, 2009. 2009: p. 634520.
193. Asperti, C., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between liprin- $\alpha$ 1 and GIT1: implications for the regulation of cell motility.* *PLoS One*, 2011. 6(6).
194. Dancau, A.M., et al., *PPFIA1 and CCND1 are frequently coamplified in breast cancer.* *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2010. 49(1): p. 1-8.
195. Tan, K.D., et al., *Amplification and overexpression of PPFIA1, a putative 11q13 invasion suppressor gene, in head and neck squamous cell carcinoma.* *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. 47(4): p. 353-62.
196. Choi, E.J., et al., *Prognostic significance of TMEM16A, PPFIA1, and FADD expression in invasive ductal carcinoma of the breast.* *World journal of surgical oncology*, 2014. 12(1): p. 1-7.

197. Herbsleb, M., et al., *Increased cell motility and invasion upon knockdown of lipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR) in SW780 bladder cancer cells*. BMC medical genomics, 2008. 1(1): p. 31.
198. Reaves, D.K., et al., *The role of lipolysis stimulated lipoprotein receptor in breast cancer and directing breast cancer cell behavior*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e91747.
199. Chao, J.-I., W.-C. Su, and H.-F. Liu, *Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT*. Mol Cancer Ther, 2007. 6(11): p. 3039-3048.
200. Wang, G., et al., *Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis*. Chin J Cancer, 2012. 31(4): p. 169.
201. Borah, S., et al., *TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer*. Science, 2015. 347(6225): p. 1006-1010.
202. Franz, C., et al., *Nup155 regulates nuclear envelope and nuclear pore complex formation in nematodes and vertebrates*. The EMBO journal, 2005. 24(20): p. 3519-3531.
203. Breuer, M. and H. Ohkura, *A negative loop within the nuclear pore complex controls global chromatin organization*. Genes & development, 2015. 29(17): p. 1789-1794.
204. Zhang, Z., et al., *FXVD3: a promising biomarker for urothelial carcinoma*. Biomark Insights, 2011. 6: p. 17.
205. Wu, M., et al., *Suppression subtractive hybridization identified differentially expressed genes in lung adenocarcinoma: ERGIC3 as a novel lung cancer-related gene*. BMC Cancer, 2013. 13: p. 44.
206. Zhang, L.-y., et al., *miR-490-3p modulates cell growth and epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by targeting endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 (ERGIC3)*. Journal of Biological Chemistry, 2013. 288(6): p. 4035-4047.
207. Yuan, X., et al., *ATF3 suppresses metastasis of bladder cancer by regulating gelsolin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton*. Cancer Res, 2013. 73(12): p. 3625-3637.
208. Dotto, G.P., *Calcineurin signaling as a negative determinant of keratinocyte cancer stem cell potential and carcinogenesis*. Cancer Res, 2011. 71(6): p. 2029-2033.
209. Chang, A.Y., et al., *Calcineurin mediates bladder wall remodeling secondary to partial outlet obstruction*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2011. 301(4): p. F813-F822.
210. Wang, Z., et al., *The role of PARP1 in the DNA damage response and its application in tumor therapy*. Front Med, 2012. 6(2): p. 156-64.
211. Gibson, B.A. and W.L. Kraus, *New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(7): p. 411-24.
212. Mhawech-Fauceglia, P., R.T. Cheney, and J. Schwaller, *Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma*. Cancer, 2006. 106(6): p. 1205-1216.
213. Ranganathan, P., K.L. Weaver, and A.J. Capobianco, *Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time*. Nature Reviews Cancer, 2011. 11(5): p. 338-351.
214. Greife, A., M.J. Hoffmann, and W.A. Schulz, *Consequences of Disrupted Notch Signaling in Bladder Cancer*. European Urology, 2015.
215. Singh, S., et al., *ALDH1B1 Is Crucial for Colon Tumorigenesis by Modulating Wnt/ $\beta$ -Catenin, Notch and PI3K/Akt Signaling Pathways*. PLoS One, 2015. 10(5).
216. Su, Y., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2010. 19(2): p. 327-337.
217. Li, Z., et al., *ALDH maintains the stemness of lung adenoma stem cells by suppressing the Notch/CDK2/CCNE pathway*. PLoS One, 2014. 9(3).
218. Mishra, S., et al., *Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) expression in prostate cancer*. Oncogene, 2014. 33(31): p. 4097-106.
219. Shima, K., et al., *TGFB2 and BAX mononucleotide tract mutations, microsatellite instability, and prognosis in 1072 colorectal cancers*. PLoS One, 2011. 6(9): p. e25062.

220. Hung, T.T., et al., *Molecular profiling of bladder cancer: involvement of the TGF-beta pathway in bladder cancer progression*. *Cancer Lett*, 2008. 265(1): p. 27-38.
221. Castillejo, A., et al., *TGFB1 and TGFBR1 polymorphic variants in relationship to bladder cancer risk and prognosis*. *Int J Cancer*, 2009. 124(3): p. 608-13.
222. Katz, L.H., et al., *Targeting TGF- $\beta$  signaling in cancer*. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2013. 17(7): p. 743-760.
223. Wu, L., et al., *Specific small molecule inhibitors of Skp2-mediated p27 degradation*. *Chemistry & biology*, 2012. 19(12): p. 1515-1524.

## 10 Anhang

### 10.1 Ergebnisse der Expressionsanalyse der einzelnen Datensätze

#### 10.1.1 Normalgewebe gegen Tumorgewebe

- Hansel et al [57]
  - Hier werden sieben Normalgewebe Proben mit zehn Tumorgewebe Proben verglichen. Von den insgesamt 17.589 Sonden bleiben nach dem moderaten t-Test noch 2.705 Sonden mit einem p-Wert  $<0,05$  übrig. Von denen sind 964 stärker exprimiert und 1.737 vermindert exprimiert.
- Dyrskjot et al [59]
  - Hier gibt es neun Normalgewebe Proben und 51 Tumorgewebe Proben. Insgesamt gibt es 22.284 Sonden. Von diesen haben 12.721 einen moderaten p-Wert  $<0,05$ . 4.598 Sonden sind davon im Tumor stärker und 8.124 vermindert exprimiert.
- Lindgren et al [14]
  - Hier können 12 Normalgewebe gegen 144 Tumorgewebe getestet werden. Dieser Datensatz weist 2.506 Sonden auf. 597 Sonden sind hier vermindert exprimiert und 932 gesteigert exprimiert, damit haben 1.529 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Stransky et al [14, 58]
  - Es werden in diesem Datensatz insgesamt 12.626 Sonden angegeben, die genutzt werden um die Expression von 10 Normalgewebe Proben mit 93 Tumorgewebe Proben zu vergleichen. 1.887 Sonden zeigen im Tumor eine höhere und 2.257 eine kleinere Expression mit einem p-Wert  $<0,05$ .
- Leem et al [61, 62]
  - Hier werden 68 Kontrollen mit 188 Tumoren verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 48.701 Sonden. 16.576 Sonden zeigen eine geringere Expression und 1.934 eine gesteigerte Expression. Somit haben 18.519 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Mangueal et al [60]
  - Hier werden drei Normalgewebe Proben mit neun Tumorgewebe Proben verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 54.675 Sonden. Von diesen errechnet der moderate t-Test 14.871 Sonden mit einem p-Wert  $<0,05$ . Diese teilen sich in 7.792 überexprimierte und 7.079 unterexprimierte Sonden auf.

In den Top 100 Genen dieser sechs Datensätze finden sich einige Gene, die in mehreren Datensätzen vorkommen. Bei den Top 100 vermindert exprimierten Genen sind es: *LUM*, *MFAP4*, *MYH11* und *EGR1*, die in drei von fünf Datensätzen vorkommen. Bei den Top 100 gesteigert exprimierten Genen kommen *PAFAH1B3* und *EVPL* in drei von fünf Datensätzen vor.

Unter allen Genen, die einen p-Wert <0,05 haben, gibt es bei den vermindert exprimierten Genen 35 Gene, die in fünf von sechs Datensätzen vorkommen und 330, die in vier von sechs Datensätzen vorkommen. Bei den überexprimierten Genen findet sich *PPARG* in allen Datensätzen mit einem p-Wert <0,05. In fünf von sechs Datensätzen finden sich 19 Gene und in vier von sechs Datensätzen 191 Gene mit einer stärkeren Expression.

Top 100 down T vs N											
Stransky et al		Mengual et al		Lindgren et al		Leem et al		Dyrskjot et al		Hansel et al	
CACNB2	KPNA6	AFF3	PDZRN3	FLNC	GSN	MGLL	KLHDC1	AU145354	YSK4	NSUN5C	UBFD1
ASS1	UTP18	PGR	ADAMTS5	CTGF	CKB	MFAP4	MYH11	TRIM15	AQP5	PTMA	TMEM180
RPP38	CEBPZ	SCARA5	PTGS1	GFPT2	ANXA6	CFD	TCF21	SLC11A1	DDC	NSUN5B	NMRAL1
PTRF	UGCG	TMEM100	SRPX	CCL2	PCOLCE	FGF9	FBLN5	AK024568	BC000772	C7ORF47	PIGC
KLK6	BRAF	LOC399959	MFAP4	AKAP12	MEIS2	LAMC3	LPPR4	APC	CEACAM3	BUB3	SEMA4C
TRADD	ATP5G3	FAM107A	PTPRD	TNC	EGR1	PAMR1	AMICA1	MPZ	EFNA5	CPNE1	LG12
UGT2B7	CXCR2	EPHA7	EGR1	CYR61	EPB41L2	LRRC3B	GLT8D2	TMCO6	ABCG4	CHTF18	GANAB
UPK1A	KCNMA1	SYNPO2	FBLN5	MFAP4	C1R	MOXD1	GNG11	ST8SIA2	KRT37	TRAF7	PASK
RPA3	MYL7	BHMT2	KCNT2	MGP	AXUD1	PDGFRA	EGR1	IGL@	SPEG	REEP4	LIG1
KIAA0020	LYN	CLEC3B	ZNF521	ALDH1A1	SMOC2	CYTL1	ENPP2	ATP1A2	CTDSPL	PRPF19	CSK
LCK	IFI30	TNC	FGL2	MT1E	THMP2	MOXD1	TCF21	PTCRA	E2F4	RHBDL1	FANCC
MUC1	LOC100507424	DKK3	MSRB3	FGFR1	AOC3	GULP1	PTHR1	CSPG4P1Y	DNAJC16	NAPE-PLD	C18ORF22
SACS	WIF1	CFD	CACNB2	RBP1	DOPYL2	LOC221091	CASP12	SNX15	ANGPTL7	SOX12	FLJ39660
FHL2	DENND4A	MRGPRF	COL6A2	AEBP1	PTRF	NR2F1	C2ORF32	SCN4A	CAMKV	UNG	ELL3
PER2	NPPB	LRFN5	MYH11	MYADM	ZAK	OLFM1	CD302	PCDHA3	CLDN18	C20ORF72	POLR2J
MFAP5	GANAB	NFASC	RECK	MYL9	THSD4	HS.491292	ADAMTS8	CDH20	ADCY1	BARD1	MORC2
PLEKHG3	DDX18	OLFM1	PLCB4	SERPINF1	TPM1	FCER1A	HS.49265	ECE2	LOC647081	MRLP28	BAZ1B
NEFL	SLC6A9	QCXL12	RBP7	IGFBP5	SETBP1	DCN	LRRK2	MAPK8IP1	AVP	TMEM44	ZNF691
NCDN	GLMN	DPT	ZCCHC24	GATA6	COL6A1	NOPE	LHFP	C7orf69	RAPGEF3	MARCKSL1	PRKRIP1
HOXD8	C6orf54	ADH1B	CSRP1	PPP1R12B	GPX3	LOC221091	FAM107A	SYT2	BNIP1	ZNF133	TMSB10
MUC1	SPAG8	SORBS2	FOSB	CAV1	SVIL	GPR15	PGCP	HSPB6	BLVRA	STK36	CDC42EP1
SLC1A3	APOM	SAMD4A	SLC9A9	TM45F1	GNG11	RECK	TSC22D1	TMPRSS15	MYBPC3	ZFP14	MND1
PPP1R12A	PAK2	COL14A1	PID1	PMP22	STC1	FOXF1	MGLL	CD40LG	SLC28A1	ARS2	MGC3196
EIF1AY	PECAM1	LPPR4	NR2F1	CRYAB	HBB	C1QTNF7	HHIP	SLC12A3	PAX4	SH2B2	TGIF2
MTCP1	LUM	MAMDC2	MAP1B	CYBRD1	C16orf45	DPT	NOVA1	LOC100130955	STK38	PIF1	ANKIB1
MTCP1NB	CDC27	SORBS1	BAG2	SAMD4A	GFRA1	HS.31588	HS.582213	ZNF280B	ARL3	ZNF280B	CTNNBIP1
DRD2	PLEKHM2	ZNF483	ATXN1	MYH11	NFATC1	HS.197018	RNASE4	PAPPA	Z25437	KNTC1	EPHB4
ZFC3H1	FOXG1	NEGR1	HSPB6	EMP3	ICAM1	C4ORF31	PLAGL1	PTPRN2	DLEC1	PTPRN2	NABP3
GNG5	MDH1	CFL2	LOC728264	FBLN2	TIMP3	MAT2B	PDGFC	MYO9A	CAMKK2	MYO9A	KIAA0406
EXTL1	LMO7	LOC730057	ZAK	LUM	LGALS1	PID1	LAMA2	PTCRA	KRT31	PTCRA	CAD
RAB5B	CALCR1	CDH19	C5orf41	DKK3	SOD3	HS.526470	PPAP2B	PKLR	HOXC5	HOXC5	CALML4
ATP5G2	RPL28	HLF	CCL14	EDNRB	CYB5D1	HS.574453	CYBRD1	SYNGR1	UBOX5	SYNGR1	DDX41
PTPRC	EP58	JAM2	CCL15	PDE5A	FSTL3	NTRK3	ITGA8	HTR1B	PRDM13	HTR1B	TXNRD3
ARPC5	TNP2	PRDM6	GPR133	CSRP1	NUPR1	LUM	HS.563682	CHERP	MMP16	CHERP	SPRYD5
PON1	YWHAB	OLFM1	LOC100128178	FOXF1	LTBP1	DLG2	BMP5	NPR2	AK022219	NPR2	SIX4
SOLH	IL6ST	PLN	EPB41L2	PDLM4	A2M	OLFM1	DCN	SLC11A2	SLC11A2	SLC11A2	MYO19
EFNB1	RER1	BNC2	FHL1	DSCR1	PNMA1	SCN4B	CLEC10A	SCARA3	OPCML	SCARA3	DKFZP434K1815
TBC1D12	PTPN11	C21orf63	BMP5	NFIL3	ANTXR2	ACTA2	PAP2D	MYL3	ALOX5	MYL3	GGA1
ECRP	BNIP2	SNCA	MYOT	LMCD1	CTNNA1	PAM	HS.88156	ZNF202	TAZ	ZNF202	SASS6
ACAA1	PGF	ANK2	SLMAP	C9orf19	LAMA4	COL16A1	GNG10	AL049244	L25664	AL049244	TADA2L
AKAP8	FLRT2	SLIT2	GPM6B	TSPAN7	IL8	ACTG2	HS.547458	PIGO	SAP30	PIGO	TNPO3
SLC33A1	NR1H3	LIFR	LOC284454	APOLD1	FST	ADCY5	NCAM1	TBXA2R	GRIA1	TBXA2R	C16ORF55
MAOA	LRP1	NTRK3	NAV3	PPAP2B	TNS1	ELA2	KLHL13	LOC91316	BC006361	LOC91316	CIT
NR4A3	MLE4	GHR	PRUNE2	GADD45B	PER2	GLI1	ASPA	RPS11	SMR3B	RPS11	ATAD5
MTR	NFKBIE	C16orf89	NR4A3	CALD1	NFIA	CRISPLD2	PCDH18	ZNF747	HOXA11	ZNF747	NUBP2
IRF2BP1	CD4	LOC143381	C7orf58	OGN	PDGFRA	OLFML3	HS.570988	GP2	ETV3	GP2	C1ORF35
FOLR1	PRPH2	TCEAL2	CUGBP2	STEAP4	PAM	AFF3	PDZRN3	NEFL	KIR3DX1	NEFL	VARS2
UQCRI1	TRIM31	RIXDC1	HHIP	SGCE	TNFAIP3	PDGFD	RCSDB1	DCT	TCL6	DCT	DAZAP1
STARD7	SSB	RYR3	ALF	CREM	ACTN1	SCARA5	EDNRB	LOC727787	TREX2	LOC727787	RCC2
GTF2H3	BTF3	MOXD1	PTGIS	ALDH2	NES	C10ORF72	ACVRL1	KIAA1609	RBM12B	KIAA1609	TBC1D24

**Tabelle 21: Top100 Down T vs N**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermehrt exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen Tumoren und Normalgewebe. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

Top 100 up T vs N											
Stransky et al		Mengual et al		Lindgren et al		Leemet al		Dyrskjot et al		Hansel et al	
INPP4B	STX10	DPP3	SMUG1	PAFAH1B3	LAO1	FASN	SLC25A39	HSPA8	VEGFA	CYP3A5	ETFDH
NR2C1	CAST	TIMM13	ADAM10	OCIA2	TK1	LOC100008589	P4HB	SUMO2	HSP90AA1	CLIC6	ADORA3
UMOD	GNAQ	PAFAH1B3	CD24	AP1M2	AP1G2	GPR172A	LOC653562	SRSF3	PAPD7	TMEM50B	RGL1
CXCL2	ITGAD	DPP3	ATP6V0B	GCS1	CLDN7	ETV4	FLAD1	ACTG1	GNAI3	TSPAN7	TMEM59
TRIM38	PTPRR	RANGAP1	RANGAP1	FLAD1	C20orf52	C20ORF151	PRSS8	ACTG1	HSP90AA1	FBP1	NAP1L5
SPIN2A	UNC119	KRT7	RRM2	SERINC2	AKR1A1	SIM2	SAMD1	MORF4L2	SEC31A	TIPARP	TSC2D1
CDV3	E2F6	PDK1	CDC2	RBM35A	MRPL14	IQGAP3	C9ORF140	ACTG1	LASP1	AKR1C2	MGC14376
HCLS1	EXOSC10	SHMT2	STAT1	ITGB4BP	CDH1	CDC20	PODXL2	CPSF7	SRSF1	ZFAND5	RCAN1
PDLIM5	CSPG5	IGFBP3	LSR	EDG4	EHMT2	MIF	CDC43	ACTG1	RAN	ALOX5	MDN
GLI2	BTBD2	KRT7	ATP13A1	PPP1CA	SYNR2	C19ORF46	LOC727741	ACTG1	SFPQ	GABARAPL1	LILRB5
HMG20B	F2RL1	MTP18	TBC1D7	SMUG1	ARHGFEF16	LOC401115	C17ORF53	RAB7A	GOSR1	ZDHHC2	TLR4
DNAJC8	AMFR	IGFBP3	CNPY2	GIPC1	SMARCC1	MRPS26	KHSRP	LOC100127922	CCT8	TLE4	PLCG2
LEFTY2	XPC	NFATC2IP	KRT8	TMEM54	KDEL1	PPP1R14B	CHAF1A	PTBP1	WIPI2	SDHD	CLDN11
WDR18	MYLPF	PGK1	SEC61A1	FAM96A	GRHL1	ESM1	FLJ43855	LOC643790	PTMAP7	ANKRD57	YPEL5
PRF1	FAS	PVRL4	S100A14	SAMD10	TMEM41A	PAFAH1B3	SHMT2	ARF1	EIF4A1	FUCA1	CD163L1
MVK	HNRNP2	TOX3	TDP1	RAB25	ZNHIT3	LSR	GPT2	DDX3X	HSP90B1	CECR1	C10ORF54
TYRO3	ITSN1	LOC100133109	STAP2	LOC19orf25	CAMK2N1	C8ORF30A	C8ORF30A	U2AF1	RBM12	EAF2	CPM
XPOT	MAP1LC3B	TOX3	IRAK1	KIAA1522	MAPBP1P	HOOK1	LOC400879	EWSR1	PPRC1	FAM3B	PPP1R15B
SERP1	CSE1L	CCT5	EVPL	FXYD3	C11orf48	CDT1	TOP2A	OAZ1	#NAME?	ABCA6	SPHAR
SPINK1	JUN	GIPC1	F11R	LENG4	JMJD2A	MTP18	FLJ39632	DKC1	ADAR	FBLN1	VSIG4
CAD	SEPHS1	PPP4C	SYNR2	ERBB3	MTIF2	SBK1	MCM7	ANAPC5	PRR11	ITM2B	ABCA8
HYOU1	SRSF7	RBM35A	HMG83	SLC37A4	MCM4	C19ORF48	CCNF	PTMA	UBE2D3	TMEM45B	NTN4
CAPG	SERPING1	MAGEA9B	BOLA2	TSSC1	CYB561D2	LOC284837	TUBB	TMEM189	DDX27	ATP5L	CREBL2
CAMK2A	SLC39A14	ZWINT	GAPDH	GSS	RICS	PRPF19	CDC45L	LRRFP1	STK24	UGT1A8	NDN
WHSC2	CDH11	TFPT	MARCKS	AGRN	ARMC6	MED25	LOC642477	ACTG1	NOP56	MTRR	HSPA2
MEGF6	IZUMO4	SPINT1	AP3D1	C17orf56	SLC39A4	FGF11	CCDC34	HNRNPA1	UBE3A	MAGEH1	HNMT
CST6	RBP4	JTB	BSG	HN1	PSMB3	GFDOD2	GNL3L	KHDRB51	EIF4A3	C6ORF66	APOLD1
CSRP1	RHOD	GAPDH	C20orf46	TIMM17B	MRPL4	BOLA2B	SDC1	HMG1N1	RAB5A	ASPA	LTB4DH
ELL	PIK3R3	C6orf115	PLXNA1	TSTA3	EFTUD2	LRRCA5	EVPL	SUMO4	DBT	GPX2	KCNJ15
TCF7	MST1R	UMPS	CDH1	ETV4	SRPK1	MARVELD3	HS.481502	TOP1	LARP1	GPR137B	FXC1
MYB	ARID4B	BID	KRT19	CKAP2	CCNB1	RANGAP1	KIAA1543	SRRT	ELAVL1	KBTBD11	CORO2B
FAM179B	PRPSAP1	SDHC	CSNK1E	BID	LMNB2	CKAP2L	LOC440160	SHFM1	TMED2	ZNF331	AKR1C1
PTRF	JAM3	VEGFA	UCA1	RPUSD3	MVK	KIF2C	EBP	ACTG1	WDR45L	KIAA1826	TMEM9B
PSG1	IDH1	GCS1	PKM2	FIBP	ADCK2	PFKFB4	CCNB1	PTGES3	EWSR1	FEM1B	NID1
SEC24C	KIF3A	SMARCC1	SHMT2	C3orf23	SMG7	RAD54L	KRT7	MAPK1IP1L	IVNS1ABP	ABCA1	IDH1
MRPL40	GOT1	TET3	CSTF1	RNF128	NQO1	MARVELD3	CDC25A	SEC31A	MYD88	GSPT2	ZEB2
SH3GL1	NUP88	LMIF	GRHL1	APEH	BAX	HIG2	KRT8	CAPZA1	SF3B2	HSPA12A	FEZ1
ENG	ZNF282	PRRC1	ARL6IP1	S100A11	COX6B1	SLC39A4	LOC731049	PTBP1	SERBP1	LOC162993	DAP
SNAPC3	DAXX	F11R	BOLA2B	HOOK2	MMP15	PDIA4	UBE2C	KPNB1	PDIA6	LOC439992	ADHFE1
MAK16	IQCE	DCTPP1	STXBP2	FDXR	GPR56	GINS2	TPX2	EIF2B4	HNRNPA3	WN75A	S100P
MTHFD2	APRT	TOX3	DNM2	TNFRSF21	TRIM11	LOC650803	C20ORF149	SRSF2	CARS2	RNF11	PEX19
AFF3	CRYBB2	CAMK2N1	VDAC1	EVPL	PCK2	LOC653635	PLXNA1	HNRNPA2B1	BAT1	CCNDBP1	GNAI1
LECT2	AIM1	RBM35A	SPAG4	CYB561	PPAP2C	MTA2	DKFZP762E1312	ARC1N1	HSPA9	TB3	BCL6B
VIM	TMEM123	CDC2	HMG83	NARF	TCF3	GSK3B	ATAD3A	EIF4H	RAB1A	CARD6	EDG2
SIRPA	SART1	JTB	ZMYND8	NR2F6	SMARCB1	C18ORF24	C12ORF48	BRD2	H2AFZ	FAM122A	EIF4E3
ADRBK1	PTP4A1	MAGEA9	AP1M2	STRA13	VPS25	NTSDC2	MGC2408	YWHAZ	CHFR	IFNAR1	PRKAB1
MPV17	TCEA2	GGCX	ORMDL2	MRPS34	ZNF588	C16ORF59	PA2G4	RPN1	HNRNPAB	BCL6	GPR177
UQCRC2	RECK	KIAA0101	FAM83A	HOXB7	CNKS1R	ESPL1	MCM7	RNF4	ACTG1	PDGFRA	ZNF222
COX17	UBXN4	POLR3K	SEC61A1	NUP37	MOSP3	FBXL6	MGC15523	POM121C	CSNK1A1	UGT1A6	AKR1C3
TRRAP	SLC30A9	CLDN7	RAB25	C11orf10	PTPRF	FAM83H	TROAP	HNRNPU	SRSF7	FABP4	ETV3

**Tabelle 22: Top 100 Up T vs N**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermehrt exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen Tumoren und Normalgewebe. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

### 10.1.2 Normalgewebe gegen pTa-Tumoren

- Lindgren et al [14]
  - Hier können 12 Normalgewebe gegen sieben pTa-Tumorgewebe getestet werden. In diesem Datensatz gibt es 2.506 Sonden. 554 Sonden sind hier vermindert und 748 gesteigert exprimiert, somit haben 1.302 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Stransky et al [14, 58]
  - Es werden in diesen Datensatz insgesamt 12.626 Sonden angegeben, die genutzt werden um die Expression von 10 Normalgewebe Proben mit 24 pTa-Tumorproben zu vergleichen. 2.173 Sonden zeigen im Tumor eine höhere und 2.121 eine geringere Expression mit einem p-Wert  $<0,05$ .
- Leem et al [61, 62]
  - Hier werden 68 Kontrollgewebe Proben mit 23 pTa-Tumoren verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 48.701 Sonden. 3.782 Sonden zeigen eine geringere Expression und 2.081 eine gesteigerte Expression. Somit haben 5.862 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Mangueal et al [60]
  - Hier werden drei Normalgewebe Proben mit neun Tumorgewebe Proben verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 54.675 Sonden. Nach Berechnung des moderaten t-Test, haben 13.862 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ . Diese teilen sich in 7.713 überexprimierte und 6.149 vermindert exprimierte Sonden auf.

Auch hier haben sich in Top 100 Genen Übereinstimmungen gefunden; diese sind bei den vermindert exprimierten Genen *MYH11*, *CALD1*, *CDH11* und *PTRF*. Diese Gene finden sich in drei von vier Datensätzen unter den Top 100 Genen. Bei den vermehrt exprimierten Genen ist es *CAMK2N1*, das in drei von vier Datensätzen der 100 Gene mit den größten *Fold Change* auftaucht.

Unter allen Genen, die einen p-Wert  $<0,05$  haben, sind 411 Gene in den pTa-Tumoren gesteigert exprimiert. Davon sind 36 Gene in vier von vier und 294 in drei von vier Datensätzen auffällig. Bei den gesteigert exprimierten Genen sind es 462, davon 52 in vier von vier und 410 in drei von vier Datensätzen mit einem p-Wert  $<0,05$ .

Top 100 up Ta vs N							
Stransky et al		Leem et al		Lindgren et al		Mengual et al	
NR2C1	MYL4	HS.306410	PROM2	PAFAH1B3	SLC37A4	TMEM23	KRTCAP3
TCF7	UMOD	HOXB5	ITGA3	NQO1	SMG7	KRT7	AP1S1
TRIM38	PRF1	KRTAP5-2	PPFIBP2	ETV4	HECTD3	WDR72	SDC1
HYOU1	CST6	LOC653479	MAPK13	CD46	SPCS1	GSTM2	PLEKHA7
AMFR	WHSC2	LOC729049	MED25	NR2F6	DGKA	GSTM1	UGT1A1
INPP4B	MAP1LC3B	MST1R	TMEM54	GCS1	DNMT3A	PDE10A	UGT1A10
TXNDC9	SF3A2	LMTK3	BATF	TETRA	ZNF436	PAFAH1B3	UGT1A3
PRMT1	GNAQ	SPOCD1	EPHB6	GIPC1	C1orf58	CDC2	UGT1A4
RPS9	RECK	SLC4A11	SULT1A2	PPP1CA	AP1M2	CTSE	UGT1A5
NDUFV2	E2F6	ETV4	SEZ6L2	SLC39A4	TNK2	GJB6	UGT1A6
ELL	HNRNP2	LOC284837	C19ORF46	FGFR3	BID	FAM83A	UGT1A7
CSR1	STX10	KRT7	PRSS16	COMT	POLM	BUB1B	UGT1A8
PEPD	LYZ	SIM2	CLSTN3	SAMD10	ETHE1	APOL1	UGT1A9
HLTF	DNAJC8	ABCG1	C10ORF65	TMEM54	ITGB4BP	FAM108C1	SPOCD1
IGHG1	NSL1	MGC26718	SLC37A4	AEPH	PFKL	PLA2G2A	SLC4A11
IGHG2	FAM3A	LOC401115	SSH3	ARHGFEF16	C1orf35	C8orf55	PVRL4
IGHG3	COL4A3	CAPS	HS.473255	MMP15	TMCO1	LY6D	C3orf23
IGHG4	KLHL18	SEMA6A	SH2D4A	ERBB3	TRPT1	DPP3	MCM2
IGHM	FXN	SNORD33	TBX6	LGALS3BP	PCBD1	DTL	BID
IGHV4-31	C7	HOXB6	FAAH	EDG4	OSBP2	OCD1	C10orf116
DCT	NSFL1C	LAD1	TYSND1	ACY1	MAOA	TCN1	TOP2A
CAPG	TYRO3	LOC642299	CNKS1	SERINC2	GSS	LAD1	C6orf115
SLC12A4	TP53TG5	CCDC24	IGSF9	OCD1	RPUSD3	NUSAP1	PVT1
ZFR	GIGYF2	CAMK2N1	HS.97910	LENG4	MRPL4	KIAA1324L	F12
BTBD2	XPC	PTPN6	D45234E	PTK6	DBI	C4orf48	AIM2
MBNL2	TTL12	SNORD55	LOC388610	TRIM11	PLEKHH3	FAM83H	KRT17
C2CD2	F2RL1	MRPS26	HS.536451	PSD4	KIAA0556	CCNB2	MGC39900
CYP2F1	CKMT1A	B3GALT3	SCAMP5	AGRN	EHMT2	PGK1	MAPK13
PPP1R11	CKMT1B	LOC651957	ITGB4	DNM2	LRBA	CCNB1	PPP1R14B
PKP4	TIE1	CCND1	RPL13	IRF3	QARS	MRPS12	CAPN1
DICER1	ABCC5	LOC100008589	PRKCZ	CLN3	ZNF561	CDC20	GKN1
EXOSC10	COX17	BHLHB3	HS.547712	TSSC1	JARID1B	FAM60A	RNASEH2A
SFXN3	CAMK2A	CDH3	PKM2	CYB5F1	CAMK2N1	ZWINT	BTBD16
CD9	TH	PAX8	SDC1	CNKS1	MVK	LOC284889	KRT20
DDT	STX4	TBX3	LOC653562	PPAP2C	MRPS34	MIF	GRSF1
TRRAP	KRT10	HOXB8	C3ORF54	AP1G2	EV1	UNC93B1	GEMIN7
DCTN3	LOC100507397	LENG4	PRSS8	SMYD2	SCCPDH	PTK6	RICS
SLC17A7	TNFAIP3	MARVELD3	THOC3	C17orf56	C17orf28	FAM152B	FGFR3
N4BP3	DNAJC4	CTSE	SPAG4	FLAD1	MGAT1	SHMT2	CAMK2N1
ADAM2	PDLIM5	SNORD32A	FASN	TP53	GRSF1	STX6	DEC1
CY5A	LOC100287119	LOC162427	ALKBH4	STAP2	NARF	ITGB6	IGF2
NPR1	MALL	GSTO2	CELSR2	HN1	MGST1	IGFBP3	INS-IGF2
ACVRL1	HIBCH	LOC643373	RANGAP1	EVPL	GSTP1	NQO1	TOX3
MEGF6	PAQR3	LOC644695	HOXB4	APH1A	KDELRL1	SLC39A4	MDK
SYNGR1	IRX5	CRTAC1	MCM7	FDXR	C3orf23	EGLN3	KRT8
DOC2B	KHDRBS2	NUDT14	DLX3	PTPRU	ZNHIT1	ASPM	FXD3
IL11	RBP4	TBX1	ANXA10	MGST2	SLC37A1	NME1	UCHL3
PSG1	PRUNE	LOC400451	HS.15338	RICS	ST3GAL4	NME2	ATP6V0B
RAF1	TMEM123	FLJ40125	H2AFY2	SMARCC1	ERBB2	PTPRR	CSNK1E
MSTN	SLC30A9	C20ORF149	CLIC1	RAB25	TMEM101	TBX1	GALNT14

**Tabelle 23: Top 100 up Ta vs N**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermehrt exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen pTa-Tumoren und Normalgewebe. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

Top 100 down Ta vs N							
Stransky et al		Leem et al		Lindgren et al		Mengual et al	
EFNB1	TECPR2	ACTA2	TAGLN	CAV1	MFAP4	CFD	OLFML1
KIAA0020	NQO2	ACTG2	PLAC9	DKK3	TPM1	ACTC1	GPR124
PI4KA	CLP5	MFAP4	HS.526470	CYR61	LGALS1	PCP4	LIFR
PI4KAP1	PPP1R12A	NR2F1	NOVA1	LTBP1	MYL9	SYNM	MRGPRF
PI4KAP2	PEX11B	MYH11	COL16A1	ACAT1	LAMA4	CNN1	NR2F1
DYRK2	NCDN	HS.31588	MOXD1	CALD1	NRP1	LOC399959	HEPH
KLK6	PHLDA2	PRICKLE1	CPVL	C9orf19	LUM	ENAH	SELM
CACNB2	PTOV1	DCN	KLRK1	AKAP12	SMO	ANXA1	AREG
PTRF	PNO1	CFD	PAPPA	MYADM	PPAP2B	PGR	AREGB
RNF113A	SACS	A2M	CYTL1	FLNC	ANGPTL2	FOSB	GHR
PSIP1	PER2	EYA4	EMP3	CTGF	LRRFIP2	AFF3	LOC730057
UPK1A	MFAP5	ELA2	F10	CRYAB	GFPT2	SCARA5	DUSP1
TRADD	MAGOH	FBLN1	AMPH	SGCB	GALNAC4S-6ST	IGDCC4	MGC39821
ASS1	LOC100505643	LAMC3	FGF9	SPIRE1	PCOLCE	NFIB	COL6A1
ATP6V1F	HOXD8	ESR1	HS.503590	SGCE	PKIG	DES	ALDH2
RPP38	SMARCA2	MGLL	PTRF	EDNRB	EPB41L2	ZNF521	PRDM6
RBBP4	UTP18	LUM	FOXF1	ALDH1A1	NID1	CXCR4	EDNRA
DRD2	CD4	DKFZP586H2123	OLFML1	ITPR1	ARL4C	CLEC3B	TMEM100
MTR	RUNX1	PDGFRA	OLFML3	ALDH2	ACTN1	FAM107A	PLN
ACSM2A	REL	NOPE	MOXD1	WWTR1	PMP22	MYH11	MYLK
OCM2	UGT2B7	FOS	KIAA1345	CYBRD1	IGFBP5	SORBS1	RHOJ
MRPL3	IFI30	OSR2	DZIP1	CORO1C	CTNNA1	LDB2	STON1
CHGB	FLT1	EGR1	TRPA1	PTRF	UACA	EGR1	GABARAPL1
EPS8	PON1	AMICA1	EDIL3	FGFR1	CERK	C6orf204	GABARAPL3
FLRT2	MRPS31	PRR16	LOC653521	THRA	GSN	OSR2	PTGIS
GLMN	MYH11	MGLL	C2ORF32	ANTXR2	GNG11	PLCB4	FILIP1L
NEFL	SLC1A3	ARHGAP28	CDH11	PNMA1	PDLM4	SYNP2	OLFML1
EXTL1	STMN1	NAALAD2	AOAH	AEBP1	MTIE	SLIT2	PRKAR2B
MOAP1	KCNA3	COL1A2	RAB31L1	ANXA6	CAV2	LOC387763	LOC728264
PLEKHG3	NRG1	GPR15	DUSP1	TIMP2	PDGFRB	MXRA8	ADH1B
UGCG	ZFC3H1	MYOZ3	PLA2G4C	TNC	RBP1	EBF1	C14orf139
JAK3	ATXN3	PTHR1	C1S	MGLL	LAMB2	MAP1B	PALM2-AKAP2
MUC1	LRP1	ARHGAP28	GULP1	MPDZ	ADARB1	PTGS1	SNCA
RPN2	YWHA8	CRISPLD2	HS.580577	NUPR1	MGP	COL16A1	PTN
PPP3CB	PTK2B	COL5A1	AEBP1	TIMP3	TACC1	MYL9	PLSCR4
YTHDC1	GANAB	GNA14	PLAGL1	CNN3	SORBS3	REEP1	MRV11
AKAP8	CEBP2	RORB	FAM43A	SAMD4A	TSC22D1	NFASC	F3
MET	SOLH	MMP23A	RECK	NES	KIAA1949	GULP1	BDKRB2
STAC	HSPA2	NTRK3	ARHGAP28	PJA2	NBL1	ZNF483	STC1
S100A2	KPNA6	HYMAI	CALD1	TMEMPAI	PPP1R12B	BOC	PMP22
DDX18	IL2RA	GIMAP8	HOM-TES-103	EMP3	MRC2	TIMP2	EPHA7
KCNMA1	CASP2	TPM2	LOC221091	NFIA	NFATC4	GAS6	C16orf89
NR4A3	COL8A1	SRPX	FBLN5	CSRP1	TMEM38B	LOC100133684	TAGLN
CALCRL	TLE4	LRRC3B	HS.552282	COL6A1	NRP2	FHL1	C21orf63
SERBP1	ATP5G2	PRRT2	GLT8D2	ZAK	FBLN2	ATP8B2	LOC440944
ELK1	MKI67	ITGA8	SCN4B	GATA6	CDH11	DKK1	DKK3
RPA3	CEBPD	DPT	COL6A3	MBNL1	PDE5A	CALD1	SETBP1
MTCP1	OLFML2A	EYA4	FUT4	C1R	TNS1	BNC2	DCHS1
MTCP1NB	STK38	GPR68	MS4A6A	CCL2	TLN1	TNC	CDH11
LCK	BRD4	ACVRL1	LOC646588	DPYSL2	C16orf45	SOBP	KCNMB1

**Tabelle 24: Top100 Down Ta vs N**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermindert exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen pTa-Tumoren und Normalgewebe. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

### 10.1.3 Normalgewebe gegen $\geq$ pT2-Tumoren

- Lindgren et al [14]
  - Hier können 12 Normalgewebe gegen 45  $\geq$ pT2-Tumorgewebe getestet werden. Dieser Datensatz weist 2.506 Sonden auf. 872 Sonden sind hier vermindert exprimiert und 596 gesteigert exprimiert; somit haben 1.468 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Stransky et al [14, 58]
  - Es werden in diesen Datensatz insgesamt 12.626 Sonden angegeben, die genutzt werden um die Expression von 10 Normalgewebe Proben mit 63  $\geq$ pT2-Tumorproben zu vergleichen. 2.164 Sonden zeigen im Tumor eine höhere und 2.175 eine geringere Signalintensität mit einen p-Wert  $<0,05$ .
- Leem et al [61, 62]
  - Hier werden 68 Kontrollen mit 62 Tumoren verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 48.701 Sonden. 1.824 Sonden zeigen eine geringere Expression und 13.020 eine gesteigerte Expression. Somit haben 18.519 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Mangueal et al [60]
  - Hier werden drei Normalgewebe Proben mit neun Tumorgewebe Proben verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 54.675 Sonden. Von diesen errechnet der moderate t-Test 14.337 Sonden mit einem p-Wert  $<0,05$ . Diese teilen sich in 7.490 überexprimierte und 6.847 vermindert exprimierte Sonden auf.

*MYH11*, *A2M*, *MFAP4* und *PTRF* sind in drei von vier Datensätzen unter den Top 100 vermindert exprimierten Genen und bei den gesteigert exprimierten Genen sind *TOP2A*, *SOX4* und *MIF* in drei von vier Datensätzen unter den Top 100 Genen.

Unter allen Genen, die bei den  $\geq$ pT2-Tumoren im Gegensatz zu den normale Geweben vermindert exprimiert sind, finden sich 71, die in vier von vier und 596 die in drei von vier Datensätzen einen p-Wert  $<0,05$  haben. Es finden sich 29 Gene, die in vier von vier, und 344, die in drei von vier Datensätzen gesteigert exprimiert werden.

Top 100 up $\geq T2$ vs N							
Stransky et al		Leem et al		Lindgren et al		Mengual et al	
NPRL2	BHLHE40	IQGAP3	PRR11	PAFAH1B3	NUDT1	CCNB2	APOL6
INPP4B	AIM1	CDC20	CCNB2	TPX2	SERINC2	CCNB1	SOX4
CCL18	PKMYT1	CKAP2L	OIP5	CCNB1	RPN2	BIRC5	HIST1H2BH
EXT2	PSD4	CDT1	UBE2C	MCM5	NFE2L3	MACROD2	CEP55
CPNE6	NKRF	KIF2C	EZH2	BUB1	TCF3	UBE2C	KLHL7
ZNF428	PQBP1	EXO1	KIF4A	BAX	MCM6	NUSAP1	FANCD2
NR2C1	SPOP	TOP2A	C9ORF100	TK1	C20orf24	TPX2	PAFAH1B3
PYGB	PGRMC1	TPX2	CENPA	FLAD1	BID	PBK	ZWINT
TRIM38	EXT1	CDC43	MELK	TSSC1	RRM2	CDC20	NME1
ACSL3	SLC30A9	C1ORF135	MCM2	HN1	RNF34	CDC2	NME2
YY1	POLR2G	MCM10	DTL	WDR51A	SMG7	CDC43	TK1
CSE1L	MALL	RAD54L	C18ORF24	TMEM41A	TRIM11	FOXM1	FCRLB
UBE2E3	BTBD2	LOC731049	C13ORF3	BIRC5	FIBP	PRC1	CCNE2
PDCD6	SNAPC3	FAM64A	CDC2	OClAD2	CCNE1	FAM72A	ANLN
HNRNP2	ARID4B	SAC3D1	CDC7	MCM4	VPS25	FAM72B	PGK1
KIAA0427	PTRF	NCAPG	CHAF1B	NUP37	GSS	GCUD2	MAGEA9
MPV17	PSG1	CDC45	CENPF	SAC3D1	TMEM54	CDC6	MAGEA9B
IL1RL1	GSTT2	CCNB1	ESM1	CDT1	UMPS	KPNA2	UHRF1
CCKBR	GSTT2B	ASP1	TTK	EDG4	FANCA	LOC728860	FAM54A
GOT1	RPS9	C17ORF53	FOXM1	KIFC1	GGH	RNASEH2A	CLIC3
RECK	PLCG2	CBX2	FASN	TOP2A	CDC48	PTTG1	LOC284889
TXNDC9	SLC2A3	E2F1	STIL	C7orf24	RAB3IP	APOBEC3B	MIF
PRPF6	SULT2A1	GPR172A	SIM2	CDC2	RPN1	TYMS	KIF14
MYOZ3	EPHA5	GIN52	ZWINT	CELSR3	CCDC21	MKI67	CDC25A
TYRO3	TP53TG5	C18ORF56	CCNE2	CDC3	MSH2	MCM10	CCDC99
XPC	INTS1	AURKA	UHRF1	PCNA	C17orf56	GIN52	HDFG
TRIM27	KIF3A	KIF14	BUB1	COMTD1	PRSS8	CDKN3	RRM2
PIK3R3	MYB	DCC1	BRI3BP	PPP1CA	AGRN	KIF2C	C13orf34
ATRN	HLTF	GIN54	CDC48	GCS1	AP2S1	AURKA	GIN51
ANXA7	RASSF2	PRC1	GPRIN1	CKAP2	HM13	TOP2A	TTK
STAT1	CXCL2	NUF2	SGOL1	FAM83D	GALNT1	PVRL4	HIST2H2BE
CDV3	NUP88	KIF15	RECQL4	CHAF1B	CCNA2	UBE2T	PCNA
RAF1	ENPP2	C15ORF42	TMPO	GIPC1	KIF11	RACGAP1	MRS2
UMOD	LSP1	KIF20A	BIRC5	RNASEH2A	SPINT2	MCM2	DDX39
DPT	STX6	FANCB	E2F2	ETV4	DDOST	KIF4A	ESPL1
PRF1	KLC1	ESPL1	ORC6L	EZH2	SLC27A4	FEN1	GGH
CBLN1	CTAGE5	EBP	GPC2	SLC39A4	CDC6	TET3	C21orf45
CAMK2B	GHITM	CEP55	AURKB	TCF19	MCM7	KIF20A	FANCI
FBP1	MST1R	CDC25C	CCNA2	TRIP13	FAM96A	C15orf23	KIF18B
CLIC2	KIAA1107	C16ORF59	SBK1	TIMM17B	AP1M2	BLM	BUB1B
RYR3	SCRIB	TROAP	NDC80	KDELR1	LMNB2	HN1	RANGAP1
PAIP1	COX7A2	CDC45L	BUB1B	TROAP	MTIF2	HIST1H2BC	DBI
UBXN7	LYZ	SPAG5	DLG7	DTX3L	GALE	HIST1H2BE	PAICS
DCT	DNASE1L3	C9ORF140	HOMER2	TSTA3	LY6K	HIST1H2BF	HIST2H2AA3
COL4A3	ICT1	NUSAP1	RAD51AP1	FOXM1	PSMB3	HIST1H2BG	HIST2H2AA4
CSF2RB	KLHL20	C12ORF48	STMN1	BLM	SLC37A4	HIST1H2BI	CKS1B
FAM179B	MXI1	DKFZP762E1312	C9ORF48	STRA13	ITGB4BP	KIF11	PDK1
ELL	AP2M1	PAQR4	DEPDC1	S100A11	APH1A	ECT2	SHMT2
ITPKC	GAS7	POLQ	BRCA1	SMUG1	NXT2	GRHL1	CCL18
SART1	CAST	CDC25A	LMNB1	MVK	FISJ1	TRIP13	RFC3

**Tabelle 25: Top100 Up  $\geq T2$  vs N**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermehrt exprimierte Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen pT2-Tumoren und Normalgewebe. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

Top 100 down $\geq T2$ vs N							
Stransky et al		Leem et al		Lindgren et al		Mengual et al	
ACSM2A	AKAP8	LOC652668	CASP12	FLNC	CTGF	LOC572558	PRDM6
PEX11B	LYN	KRT13	HS.583210	FGFR1	PHF1	FOXF1	PRICKLE2
LCK	STAC	ID3	PLA2G4A	AKAP12	LAMB2	CFD	C5orf4
RNF126	RBBP4	LOC651149	AR	CYR61	GNG11	SOBP	MAP1B
CACNB2	TTC1	ATOH8	CCNDBP1	MYADM	CBX7	SRPX	FCER1A
KIAA0020	TBC1D12	LTBP4	MCC	NFIA	RBPMS	SCARA5	LHFP
KLK6	PI4KA	HS.583903	ADAM28	GATA6	MX11	ABI3BP	LOC730057
LOC100507804	PI4KAP1	DKFZP586H2123	HS.459903	GFPT2	LIX1L	AFF3	ADAMTSS
TPSAB1	PI4KAP2	RIC3	LOC51149	NES	DKK3	CXCL12	A2M
TPSB2	ANXA8	BTF3	NR2F1	CYBRD1	PMP22	MOXD1	ZNF483
EFNB1	ANXA8L1	LAMC3	ADK	APOLD1	PKIG	SYNPO2	SAMD4A
WIF1	ANXA8L2	CAT	HS.88156	GSN	PGCP	ACTC1	SLIT2
TECPR2	APOC1	PTPRN2	HS.561801	PPAP2B	PNMA1	GULP1	PRKCB
ZFC3H1	RASGRF1	ARPC2	HS.356079	PTRF	CRTAP	TCF21	SORBS1
SLC10A3	ASS1	SLFN5	CAB39L	TNS1	FREQ	LEPR	C21orf63
NEB	TRADD	ABCA5	KLHDC1	CSRP1	SPOP	NR2F1	BMP5
CEBPZ	PRPSAP2	C9ORF125	LOC641705	PJA2	CCDC69	PCP4	FAM107A
NR4A3	PTPN18	HS.31290	DDX19B	EPB41L2	AMOTL1	LOC399959	KCND3
PER2	TCF20	LOC649150	C10ORF61	ALDH1A1	SDC3	OLFM1	FOSB
TPO	JAK3	LOH11CR2A	PDGFRA	PER2	EFEMP2	ASPA	TMEM100
RPL6	CTNNA1	RPL15	PRC1	SAMD4A	MPDZ	C4orf31	ABC8
RPA3	UOCR11	RCBTB2	NMES	MYH11	PAM	PLCB4	JAM2
UPK1A	CD38	DHRS12	FBXO38	PPP1R12B	EDG2	PGR	ACOX2
PTRF	NEFL	LOC730051	C10ORF59	MEIS2	NFIL3	LOC728264	RCAN2
SSB	TNNT1	GLT25D2	LOC643493	ZAK	DPYSL2	OLFML1	FGL2
SLC1A3	ERCC2	SNRPN	HSPC047	PTHRI	NRP2	AQP1	NFIA
RFK	MUC1	GPR177	RTN4	SMARCD3	DLC1	CLEC3B	FAM13B1
RPP38	IFI44L	RPL17	FLJ45803	TLN1	TOR1AIP1	ENAH	ANTXR2
NPPB	COASY	ISL1	FBXL17	TIMP3	CCL2	MYH11	LRFN5
PAK2	UGCG	APCDD1	LOC401677	PDE5A	SERPINF1	LPAR1	C1orf21
SACS	NCDN	C14ORF44	EPHX2	WWTR1	ALDH1A2	CNN1	SLC9A9
TUBB2A	TSN	MGLL	PTCH1	CRYAB	IGFBP5	PGM5	MRGPRF
SFI1	PTPN11	CDC14B	HS.445414	MFAP4	KCNH2	MFAP4	SNCA
GAD2	NAGA	ALS2CR8	HS.572642	AOC3	CTNNAL1	PDK4	ADH1B
FAM102A	SERINC3	AMY2B	FBXO3	COL6A2	PHF20	SORBS2	CREBL2
ATP5G3	RB1	AKAP7	MOXD1	THSD4	VCL	ZAK	COL14A1
DENND4A	CCNT2	PHYHD1	MOXD1	NFIX	TPM1	NFASC	RHOJ
CALCLRL	EIF5	HS.571047	MMRN2	ADAMT59	SPRY1	C14orf139	EBF1
FRY	VAMP1	C8ORF42	NAALAD2	TACC1	PDLM4	DKFZP586H2123	SYNM
SLC33A1	IFI30	HS.574453	ATP5F1	TSPAN7	THRA	CPE	KLHDC1
TNFRSF17	ACAA1	C10ORF73	HOXA13	SVIL	MYL9	GPR124	MYOCD
PTK2B	CD44	LOC388559	PHKB	COLEC12	SOD3	CUGBP2	PDE4D
PGF	ADH6	MAT2B	ABCC5	C16orf45	GADD45B	C16orf89	PTGS1
NR1H3	FOXP1	LOC731777	MFAP4	CALD1	CAV1	FHL1	MRV11
DRD2	CCNC	FCER1A	RPS4X	TPST1	OGN	TPSAB1	OLFML3
CNTN5	ZNF189	CIRBP	HHIP	FOXF1	UACA	WFDC1	ACACB
PLEKHM2	YWHAB	WHDC1L2	UST	REV3L	ZNF331	SNED1	LOC143381
CD2	KPNA6	FGF9	CYP39A1	AXUD1	C7orf41	RPS6KA2	PELI2
GLMN	GLI3	CFD	LOC731557	TGFBR2	ERG	MEF2C	EPHA7
ATP2B3	CTAG1A	RORB	KBTBD3	EDNRB	FZD7	HSPB6	REEP1

**Tabelle 26: Top 100 Down  $\geq T2$  vs N**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermindert exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen Normalgewebe und pT2-Tumoren. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

#### 10.1.4 pTa-Tumoren im Vergleich zu $\geq$ pT2-Tumoren

Wenn im Vergleich der  $\geq$ pT2- mit pTa-Tumoren ein Gen aus Sicht der  $\geq$ pT2-Tumoren vermindert exprimiert ist, bedeutet dies zugleich, dass es im pTa-Tumor gesteigert exprimiert wird.

- Högelung et al [30]
  - Es werden 40 pTa-Tumoren und 38  $\geq$ pT2-Tumoren gegeneinander getestet. Insgesamt gibt es 48.792 Sonden. Unter diesen sind 13.498 mit einem p-Wert  $<0,05$ . 6.161 Sonden sind bei den  $\geq$ pT2-Tumoren gesteigert exprimiert und 7.337 vermindert.
- Lindgren et al [14]
  - Hier können 12 pTa-Tumorgewebe gegen 89  $\geq$ pT2-Tumorgewebe getestet werden. Dieser Datensatz weist 2.506 Sonden auf. 122 pT2 Sonden sind hier vermindert exprimiert und 172 gesteigert exprimiert; somit haben 294 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Stransky et al [14,49]
  - Es werden in diesen Datensatz insgesamt 12.626 Sonden angegeben, die genutzt werden, um die Expression von 24 pTa-Tumorproben mit 56  $\geq$ pT2-Tumorproben zu vergleichen. 1.346 Sonden zeigen im  $\geq$ pT2-Tumor eine höhere und 1.313 eine kleinere Expression mit einem p-Wert  $<0,05$ . Insgesamt sind damit 2.659 Gene differentiell exprimiert.
- Leem et al [2,3]
  - Hier werden 23 pTa-Tumoren mit 61  $\geq$ pT2-Tumoren verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 48.701 Sonden. 4.913 Sonden zeigen eine geringere Expression der pTa-Tumoren und 720 eine gesteigerte Expression. Somit haben 5.633 Sonden einen p-Wert  $<0,05$ .
- Mangueal et al [51]
  - Hier werden drei pTa-Tumorgewebe Proben mit drei  $\geq$ pT2-Tumorgewebe Proben verglichen. Insgesamt gibt es in diesem Datensatz 54.675 Sonden. Von diesen errechnet der moderate t-Test 7.140 Sonden mit einem p-Wert  $<0,05$ . Diese teilen sich in 3.551 überexprimierte und 3.589 unterexprimierte Sonden auf.

Unter den Top 100 vermindert und vermehrt exprimierten Genen finden sich Gene, die in mehreren Datensätzen auftauchen. *ECT2* und *KIF23* findet sich in drei von fünf Datensätzen mit gesteigerter Expression. Bei den vermindert exprimierten Genen kommen *SPOCD1* und *TESC* in vier von fünf Datensätzen vor und in drei von fünf kommen *TMPRSS4*, *ABCC3*, *FGFR3*, *CRTAC1*, *VSIG2*, *SYT8*, *FABP4*, *BTBD16*, *ANXA10*, *D4S234E* und *ST3GAL5* vor.

Im Vergleich aller Gene, die einen P-Wert von <0,05 aufweisen, finden sich insgesamt fünf Gene (*CCNB1*, *FYN*, *CHAF1B*, *GADD45B*, *NFIL3*), die in den pT2 Tumoren stärker exprimiert werden und in

fünf von fünf Datensätzen vorkommen. 50 Gene kommen in vier von fünf und 476 in drei von fünf Datensätzen vor. Unter den schwächer exprimierten Genen finden sich drei Gene (*LAD1*, *GPC1*, *OGT*), die in fünf von fünf Datensätzen vorkommen, 88, die in vier von fünf und 747, die in drei von fünf Datensätzen zu finden sind.

Top 100 up Ta vs T2									
Högelund et al		Leem et al		Lindgren et al		Mengual et al		Stransky et al	
CENPN	CTHRC1	CDKN2C	SYNGR3	PLXND1	F2R	CCL18	BIRC5	UPK3A	DNAH17
CDCA5	AURKB	CDX1	HS.364630	NMT1	TGM2	SULF1	CTGF	MDK	PKD2
MTHFD2	CORO1A	HIST1H4D	HS.579355	SURF4	TWISTNB	OCC-1	C1QA	HIST1H2AD	FGF1
MMMD	TRIP13	F2RL2	HS.406106	PCNX	SS18L2	APOBEC3B	ACTN4	HIST1H3D	DDC
BIRC5	KPNA2	HS.559564	ARHGAP11A	MAPKAP2	ARMET	MCM10	GIN51	ACAN	H1FX
C6ORF173	CCNA2	LRRCS50	KIFC1	ALKBH1	SMPD1	KLHL7	SOX9	AIRE	SSX3
C17ORF53	GPSM2	KIF24	ADAM11	EIF2S1	DNAJB11	FLJ22536	FANCD2	TRIOBP	PTPN1
FOXM1	CEP55	HS.163346	HAPLN4	FN3KRP	BLMH	PFKFB3	DOCK4	GTF2I	UBFD1
NCAPG	TUBA1B	HOXC11	HIST1H2BF	ESPL1	UACA	KPNA2	IFFO2	GTF2IP1	CTSO
FOXM1	POLA2	RASSF5	BRCA2	GLRX5	PRDX4	LOC728860	INHBA	LOC100093631	PLEKHB1
OIP5	CLIC4	CCDC80	CDGAP	HIF1A	UCK2	RACGAP1	ZNF331	ERBB3	CYHR1
SGOL1	SNX10	PSMD4	LOC643233	AHSA1	AVEN	FN1	CLIC4	REPS2	SPAST
C1ORF135	PSMB3	LOC652492	DZIP1	CHST10	PDCL	TK1	LAPTM5	MAN2A1	CASK
CLCC1	PLEKHO1	IGSF10	PDIA2	DDHD1	ARPC5L	CEP55	FNIP2	S100A11	ACACA
TXNRD1	MCM10	RCOR1	LOXL3	TUBB6	SLC3A2	CKS1B	C15orf23	GRM3	INSL3
MELK	CKS1B	KIF23	HS.4892	SP110	ZAK	KIF14	PTN	TBR1	PPAP2B
MELK	PTTG3	PCDHGB1	NTRK2	PRPF31	SAC3D1	TMPO	CD163	RABGAP1L	HTRA4
MTHFD2	CDCA8	HS.195347	NFASC	CSTF2	MAP3K3	FEN1	CDKN3	COL19A1	GPM6B
RAD51AP1	ECT2	C9ORF47	DEPDC1B	NUP153	DEGS1	TTK	CCNB2	SULT1B1	RG57
RACGAP1	LOC606724	LMO3	NT5M	LEPRE1	CCDC21	RFC3	POIQ	CD302	SRPX
TK1	COL5A2	PDE4B	ADARB1	RIOK1	YWHAH	NID2	FZD2	FAM91A1	ALPI
YARS	PLK4	IL17RD	GLI2	TEX2	RPA3	GMNN	KIF18B	FAM91A2	ATF6B
CCNB2	FAM54A	ALOX15	PSCD3	TTF2	NUDT1	TEAD2	KIF11	THRA	THOP1
CDC20	PTTG1	HS.555255	LOC652002	MAPKAP1	BAX	C1S	FAM54A	MTAP	DDX6
KIF2C	C16ORF59	LOC653764	PCDH12	RHOF	FANCA	CDC6	SAMHD1	NDUFS6	SLC25A14
OIP5	MED8	HS.150298	ASAM	FAM96A	CORO1C	FAP	HN1	MUC4	GULP1
ANLN	TTK	KHK	CENPI	DPM2	DYNLL2	PMEP1	NCAPG2	DLX5	AMD1
KIAA1524	PRRX1	GNLY	DONSON	LRRFIP2	TIPARP	ANLN	COL5A2	ANXA1	NTNG1
TUBA1A	C9ORF19	GUCY1B3	HS.579513	MNAT1	ELP4	ECT2	STRBP	RUVBL1	PVALB
PRR11	H2AFZ	LOC646082	NFKBIL2	ZNF410	H2AFX	MGC39900	KCNG1	SCAMP1	INSL4
SULF1	C5ORF34	ADAMTS2	MRAS	ADAM15	STRA13	TMSB15A	COL5A1	DYNC112	PTGER1
WDR51A	KIF23	LOC285216	HLXB9	HLA-F	STAMBPL1	GJC1	FCER1G	MYBPC1	ATG14
CENPA	MITF	KIAA1345	KIRREL	CCDC16	SMC2	KIF20A	CDC20	AP3D1	MYH11
CENPE	DOCK11	HUS1B	SLC26A10	IFT52	NMI	MTHFD2	MCM2	SPRR1A	IARS
GCUD2	BIRC5	KHK	CCL11	WWTR1	TSPAN3	TOP2A	TMEM194A	40787	GUCY2D
C16ORF61	CENPA	LASS1	NID2	HSPBP1	CENPB	SULT1E1	LMNB1	ATP10D	MASP2
MAD2L1	PHF19	DCDC5	ATF3	ZNF226	ALDH5A1	HIST1H2BC	OLFML2A	VILL	ZNF76
CCDC109B	TPX2	B3GNT4	LOC401089	WDR53	KIAA1949	HIST1H2BE	PTP4A1	ZNF142	OTUD3
SGOL1	BCL2L12	KAZALD1	HS.569303	SORBS3	ECE1	HIST1H2BF	NDC80	SEC31A	ZNF804A
STIL	CDC45L	CSPG5	HS.571814	CPD	NOS3	HIST1H2BG	PREX1	ENTPD3	SKIV2L
UBE2C	NDC80	GJA7	APOBEC3A	MAD1L1	PFDN2	HIST1H2BI	TIMP2	NAIP	SLK
UBE2C	COL1A1	SLC2A14	ECT2	MRE11A	PON2	MAFF	SOC53	C4orf6	HSD3B1
BUB1	CNN3	HIST2H3C	NEI3	RELL1	PSCD3	NUP210	SPNS2	ACACB	SLC4A7
PTTG1	CKS2	HS.571317	FANCB	SFRS10	PSMB8	KIF23	PCNA	DGKG	TAZ
CDT1	TUBA1C	CYP46A1	AFAP1L1	C20orf24	MCM4	CCNB1	FAM72A	ZNF85	C17orf91
CDCA3	AURKA	LOC286076	IGSF1	RAP2A	LRRC8A	NNMT	FAM72B	SIM2	EMX1
FEN1	NUF2	C1ORF215	LOC401101	POLR2I	ITPR1	LOX	GCUD2	PSMD11	SP140
CLIC4	NEK2	ADAM22	CASC5	TES	SGCB	RNASEH2A	HMG2	PDHA2	SLC18A1
LOC653820	GLT2SD1	HBQ1	RBL1	PSMB7	NFIL3	KIF2C	FADS2	C12orf24	EXD2
RFC4	CKS1B	DKFZP451A211	RSPO3	RAD51C	FYN	CASC5	LATS2	CADM4	PMPCA

**Tabelle 27: Top 100 Up Ta vs T2**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermehrt exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen pTa-Tumoren und pT2-Tumoren. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

Top 100 down Ta vs T2									
Högelund et al		Leem et al		Lindgren et al		Mengual et al		Stransky et al	
CRTAC1	CYP4F12	KRT13	FABP4	TESC	TUSC3	AKR1B10	TESC	VLDLR	PRDM2
ANXA10	LOC400451	SPINK1	QARS	SPOCD1	PLXNB1	CES1	GPR98	UBE2M	RPL35
BTBD16	BTG2	GPX2	LOC220433	FGFR3	HERC4	FABP4	CFH	NAGA	HIST1H2BM
CLCA4	C15ORF52	TXNIP	ABCC3	IGFBP2	ZNF266	PLA2G2A	AZGP1	PLA2G2A	GNAI1
PLCH2	RAPGEFL1	CRTAC1	PRDX5	BMP7	DNM2	MYBPC1	DAPL1	CPA1	ABCB4
C10ORF99	SSH3	TMPRSS4	CNDP2	GSTT1	TP53INP1	CTSE	CYP3A5	DLGAP2	GPR12
HMGCS2	MSMB	S100P	RPL26	ABCC4	DGKQ	SLC7A11	CYP3A5	ATP2B3	MAGEA1
CTSE	LOC388743	VSIG2	LOC649447	GPR126	ZNF282	CRTAC1	HOXB6	CA1	FAM161A
D4S234E	HSD17B2	LOC651767	BTBD16	ZNF692	KIAA0907	CLCA2	NQO1	NR1H3	ATP2A2
CYP3A5	UGT1A1	TESC	RPL27A	PLA2G4F	ARFGF2	CLCA2	ST3GAL5	ABCA5	PCDH8
SPINK1	UGT1A6	UPK1A	COX7C	GOLT1A	SLC25A16	SLC7A11	SORL1	SYMPK	AGTR1
TNNI2	AKR1C2	CST3	ALDH1L1	ZNF175	SMYD2	D4S234E	ENTPD3	RPL6	HR44
KRT13	ID3	C10ORF116	CDKN1A	TLE2	SLC2A10	LGALS4	TSPAN7	TUB	CALM1
FAM3B	EVI1	LOC649150	EEF2	SLC9A1	MGC5139	BTBD16	ABHD2	SCH1	HIST1H2BN
LOC644151	C10ORF33	RPL12	FOXQ1	CHD3	CNKSR1	MSMB	NQO1	RBM	RNASE3
GPX2	ANKRD50	LOC643433	CTSD	GMFG	JMJD1B	ALDH3A1	STON2	EVX1	TM95F2
DHRS2	HOXB2	LOC402251	FBP1	RHOBTB2	LRBA	TCN1	LOC389023	MDH1	GABRA1
BCAS1	DUOX1	FGFR3	LOC388610	DGKH	SFRS14	CLCA2	MAPK10	RPS25	KLK3
ALDH1L1	LOC644844	PPFIBP2	LOC127295	C1orf63	MIA3	ARL14	CYP4F11	SOLH	ZNF124
CAPNS2	ST3GAL5	LOC644029	ANXA10	KCNQ1	TOLLIP	ANXA10	SIGLEC15	SLC1A2	MIOS
DHRS2	TMC4	PROM2	RPS4X	SAMD10	ZNF561	CLCA2	C11orf1	FLT3	PPY
VSIG2	SORL1	LOC283412	CYB5A	C10orf33	TIA1	MSMB	HOXB2	FOXG1	NDUFS2
PLA2G2A	MSMB	ALOX5	LOC645688	GPC1	ZFAND1	CNTN3	ABHD2	XC1L	GK
HS.554203	SNX31	RPL13A	CIRBP	CD46	ECHDC2	GKN1	HOXB3	XC1L2	TULP3
HOXB5	CAPN9	ID1	LOC729416	SH3PX2A	ARHGEP16	FABP6	CHP2	ROCK2	CAP2B
CTSE	CDH23	C17ORF45	SLC9A1	PLEKHH3	MECP2	D4S234E	C10orf57	AK4	IMPDH2
SPOCD1	HOXB3	CD81	RPL10A	SLC38A2	XPC	NQO1	C10orf58	PSME2	FCGR3B
LOC339766	SLITRK6	TEGT	EVA1	DGKA	BCL2L2	ARHGAP6	GSTA1	LAGE3	MTG1
FGFR3	PTK6	RXRA	LAMA5	FER1L3	TELO2	UGT1A6	UGT1A6	LAG3	AIF1
HOXB8	WNT7B	RPS9	GPX1	P4HA1	HK1	UGT1A8	CAPN8	TRIM52	EDEM1
ST3GAL5	UPK1A	DHRS2	LOC285900	USP40	AFF1	UGT1A9	SYT8	GP5	PPIA
FABP6	FABP4	ITM2B	LOC284230	ZNF84	DDX17	CYP4F3	ABCC3	HTR7	KIF1C
HAS3	CYP2J2	SYT8	UQCRCQ	PTK6	ZNF76	CAPNS2	RASSF6	CDH22	COL1A2
FABP6	ABCC5	LOC158345	LOC642989	ZNF436	NUDCD3	SLITRK6	C11orf1	MARCH7	TCTA
PSCA	TMPRSS4	HIGD2A	CDC42EP5	CDRT4	MAFK	AKR1C1	SPOCD1	PPP2R5E	RXRA
HPGD	TMEM178	HMGCS2	D4S234E	PSD3	EARS2	ABHD2	DUOX1	ANXA13	LRIG2
C21ORF81	AMY2A	RPS17	PDLLIM1	SLC23A2	DOCK1	SORL1	GDPD2	IQCC-SCHIP1	GORASP2
SLC14A1	MGC26718	RPS9	LOC400451	CLCN3	EXOC1	PLA2G4A	SLC7A11	SCHIP1	RG516
BCAS1	IRS1	PFDN5	LOC731251	AP1G2	SF3B1	WDR72	VWASA	CDH12	DDX27
HOXD1	CTSE	GLTSCR2	LOC649682	LAD1	KIAA1026	TMPRSS4	SMAD3	NFASC	OXA1L
TESC	SYTL1	LOC644972	HS.99785	ZNF513	ZNF3	D4S234E	SRPX2	CHRNA2	IRS4
PROM2	LOC388610	LOC389787	TBX2	TRIP6	KIAA0556	LSP1	C10orf99	GM2A	PAK4
ABCC3	UGT1A6	LOC728481	MGST2	NDFIP1	MGC27345	CYP3A5	AGR2	ZFC3H1	RAF1
SOX15	GKN1	DHRS3	ST3GAL5	MAOA	SUDS3	FAM3B	CYP4B1	PCGF3	TMEM97
SYT8	MST1R	FLOT2	RPL14	RGL2	HOOK2	SLITRK6	C10orf99	SF11	CAPN9
TP73L	HS.580308	SPOCD1	CYBA	ZNF83	AMPD2	HPGD	ADAM28	GRPR	SSB
FER1L4	ID1	RPL4	GPR56	CXorf45	PUM2	VSIG2	KCND3	HNRNPC	S100A5
LAMB3	HS.445414	HSD17B2	TNFRSF14	RUTBC1	TMEM144	IGFBP2	ABHD2	PIK3CB	RTN4
PPP2R2B	CDC42EP5	RPL23	LDHB	LETMD1	RBM19	SLITRK6	PCP4L1	CAPN7	SAA1
SMAD6	PLA2G10	TSPO	LOC644511	MAN2C1	HNRPH1	KRT15	AKR1C3	PRSS2	LYGG6D

**Tabelle 28: Top 100 Down Ta vs T2**

Grundlagen dieser Tabelle sind die öffentlichen Expressionsdaten. In dieser Tabelle sind die 100 stärksten vermindert exprimierten Gene, gemessen am *Fold Change*, aufgelistet. Untersucht wurde die differentielle Expression zwischen pTa-Tumoren und pT2-Tumoren. Jede Spalte ist nach dem jeweiligen Datensatz benannt. Die Gene sind nach absteigenden *Fold Change* Werten sortiert.

## 10.2 Deletionen und Zugewinne von BC44 und BC61

Deletion BC61 Teil 1						
A2BP1	ATP6VOC	C9orf16	CDC26	DCI	FAM78A	GOLGA7B
ABCA1	ATP6V1G1	C9orf163	CDC37L1	DCTN3	FAM86A	GOLM1
ABCA17P	AUH	C9orf167	CDK20	DDX31	FANCC	GOT1
ABCA2	AVPI1	C9orf170	CDK5RAP2	DDX58	FANCG	GPC4
ABCA3	AXIN1	C9orf171	CDK9	DEC1	FAS	GPC5
ABCC2	B4GALT1	C9orf21	CDKN2A	DECR2	FBP1	GPC6
ABHD10	BAAT	C9orf23	CDKN2B	DENND1A	FBP2	GPR107
ABL1	BAG1	C9orf24	CDKN2BAS	DENND4C	FBXL16	GPR120
ABO	BAIAP3	C9orf25	CEL	DFNB31	FBXO10	GPR144
ACER2	BARHL1	C9orf27	CENPP	DHDPSL	FBXW2	GPR21
ACO1	BARX1	C9orf3	CEP110	DIRAS2	FBXW4	GPR39
ACTA2	BAT2L1	C9orf30	CEP55	DMRT1	FCN1	GPSM1
ACTL7A	BICD2	C9orf37	CEP78	DMRT3	FCN2	GRHRP
ACTL7B	BLNK	C9orf4	CER1	DNAI1	FGD3	GRID1
ACTR1A	BLOC152	C9orf40	CERCAM	DNAJA1	FGF12	GRIN1
ADAMTS13	BMPR1A	C9orf41	CFLP1	DNAJA3	FGF8	GRIN3A
ADAMTS19	BNC2	C9orf43	CH25H	DNAJB5	FGFBP3	GRM1
ADAMTSL1	BRD3	C9orf44	CHMP5	DNAJC25	FIBCD1	GRM7
ADAMTSL2	BSPRY	C9orf45	CHSY3	DNASE1	FKBP15	GSN
ADCY9	BTAF1	C9orf46	CHTF18	DNM1	FKTN	GSTO1
ADD3	BTBD12	C9orf47	CHUK	DNMBP	FLJ35024	GSTO2
ADRA2A	BTRC	C9orf5	CIZ1	DNTT	FLJ37201	GTF3C4
AGAP11	C10orf116	C9orf50	CKS2	DOCK8	FLJ40292	GTF3C5
AGBL1	C10orf129	C9orf53	CLCN7	DOK6	FLJ44082	HABP4
AGPAT2	C10orf131	C9orf64	CLDN6	DOLK	FLJ46321	HAGH
AGTPBP1	C10orf2	C9orf68	CLTA	DOLPP1	FLYWCH1	HAUS6
AIF1L	C10orf26	C9orf7	CLUAP1	DPCD	FLYWCH2	HDHD3
AK1	C10orf28	C9orf71	CNNM1	DPM2	FNBP1	HECTD2
AK3	C10orf32	C9orf72	CNNM2	DPP7	FOXE1	HELLS
AKAP2	C10orf4	C9orf75	CNTFR	DUSP22	FPGS	HEMGN
AKAP2	C10orf62	C9orf78	CNTLN	DUSP5	FRAT1	HHEX
AKNA	C10orf75	C9orf79	CNTNAP3	E4F1	FRAT2	HIATL1
ALAD	C10orf76	C9orf80	COBRA1	ECM2	FREM1	HIATL2
ALDH18A1	C10orf78	C9orf82	COL15A1	EDF1	FRMD3	HIF1AN
ALDH1A1	C10orf79	C9orf84	COL17A1	EGFL7	FRMPD1	HINT2
ALDH1B1	C10orf99	C9orf85	COL27A1	EHMT1	FSD1L	HMOX2
ALDOB	C16orf35	C9orf86	COL5A1	ELAVL2	FUBP3	HN1L
ALG1	C16orf42	C9orf89	COQ4	ELOVL3	FXN	HNRNPK
ALG2	C16orf5	C9orf9	CORO2A	ENDOG	GABBR2	HPS1
AMBP	C16orf59	C9orf91	CORO7	ENG	GADD45G	HPS6
AMDHD2	C16orf71	C9orf93	COX15	ENTPD1	GALNT12	HPSE2
ANAPC2	C16orf73	C9orf95	CPEB3	ENTPD2	GALT	HRASLS
ANGPTL2	C16orf89	C9orf96	CPN1	ENTPD7	GAPVD1	HS3ST6
ANKRD1	C16orf91	C9orf98	CRAMP1L	ENTPD8	GARNL3	HSD17B3
ANKRD18A	C1QTNF8	CA9	CRAT	EPB41L4B	GAS1	HSDL2
ANKRD19	C21orf94	CACNA1B	CRB2	ERLIN1	GBA2	HSPA5
ANKRD2	C3orf52	CACNA1H	CREB3	ERMFP1	GBF1	HTR7
ANKRD22	C3orf59	CALHM2	CREBBP	ERP44	GBGT1	HYDIN
ANKS3	C4orf35	CALHM3	CRTAC1	EXD3	GCET2	IARS
ANKS6	C5	CAMSAP1	CTNNAL1	EXOC6	GCNT1	IDE
ANP32B	C6orf103	CARD9	CTSL1	EXOSC2	GDA	IFIT1
ANXA1	C6orf35	CASKIN1	CTSL2	EXOSC3	GFER	IFIT1L
APBA1	C9orf100	CC2D2B	CTSL3	FAHD1	GF11B	IFIT2
APTX	C9orf102	CCBL1	CUEDC2	FAM100A	GGTA1	IFIT3
AQP3	C9orf103	CCDC102B	CUTC	FAM102A	GHITM	IFIT5
AQP7	C9orf11	CCDC147	CWF19L1	FAM108B1	GKAP1	IFNA2
ARHGAP19	C9orf114	CCDC154	CYLC2	FAM120A	GLDC	IFNA8
ARID1B	C9orf117	CCDC50	CYP17A1	FAM120AOS	GLE1	IFNB1
ARID3C	C9orf119	CCDC78	CYP26A1	FAM122A	GLI1PR2	IFNE
ARL3	C9orf125	CCIN	CYP26C1	FAM125B	GLIS3	IFNK
ARPC5L	C9orf129	CCL19	CYP2C18	FAM129B	GLT6D1	IFNW1
ARRDC1	C9orf130	CCL27	CYP2C19	FAM154A	GLUD1	IFT140
AS3MT	C9orf135	CCNF	CYP2C8	FAM173A	GLYR1	IFT74
ASB6	C9orf139	CCNJ	CYP2C9	FAM178A	GNA14	IGFBPL1
ASPN	C9orf142	CD200	DAB2IP	FAM189A2	GNAQ	IKBKAP
ASS1	C9orf144B	CD226	DAPK1	FAM190B	GNE	IL11RA
ASTN2	C9orf150	CD274	DBC1	FAM195A	GNG10	IL32
ATAD1	C9orf152	CD72	DBH	FAM35A	GNPTG	IL33
ATP13A4	C9orf153	CD96	DCAF10	FAM69B	GOLGA1	INA
ATP13A5	C9orf156	CDC14B	DCAF12	FAM73B	GOLGA2	INPP5E

**Deletion BC61 Teil 2**

INSL6	LOC342346	NAT15	PANK1	PSMD5	SCAI	ST6GALNAC4
INVS	LOC389705	NCBP1	PAPPA	PTAR1	SDCCAG3	ST6GALNAC6
IPPK	LOC389765	NCKAP5	PAPSS2	PTCH1	SEC14L5	STAMBPL1
ISCA1	LOC415056	NCRNA00032	PAQR4	PTEN	SEC16A	STOM
ISOC1	LOC440173	NCRNA00081	PAX2	PTENP1	SEC31B	STOML2
ITFG3	LOC554202	NCRNA00093	PAX5	PTGDS	SEC61B	STRBP
ITPRIP	LOC652276	NCRNA00113	PBX3	PTGES	SECISBP2	STX17
JAK2	LOC92973	NCS1	PCA3	PTGES2	SEMA4D	STXBP1
KANK1	LOXL4	NDOR1	PCDH21	PTGR1	SEMA4G	STXBP5
KAZALD1	LPAR1	NDUFA8	PCGF5	PTGS1	SEPX1	SUFU
KCNIP2	LPPR1	NDUFB10	PCGF6	PTPDC1	SESTD1	SUGT1P1
KCNT1	LRIT1	NDUFB6	PCSK5	PTPLAD2	SET	SURF4
KCNV2	LRIT2	NDUFB8	PDCD11	PTPN3	SETX	SURF6
KCTD5	LRRRC19	NEK6	PDCD1LG2	PTPRC	SFRP5	SUSD1
KDM4C	LRRCA8	NELF	PDCD4	PTPRD	SFXN2	SUSD3
KIAA0020	LRSAM1	NEURL	PDCL	PYROXD2	SH2D3C	SVEP1
KIAA0368	LTBP1	NFIB	PDE6C	QSOX2	SH3GL2	SYK
KIAA0649	LUC7L	NFIL3	PDIA2	RAB11FIP3	SH3GLB2	SYNGR3
KIAA1045	LYPD1	NFKB2	PDLIM1	RAB14	SH3PXD2A	TAF5
KIAA1432	LZTS2	NFX1	PDPK1	RAB26	SHB	TAGLN3
KIAA1529	Magmas	NINJ1	PDZD7	RAB32	SHC3	TAL2
KIAA1539	MAMDC2	NIPSNAP3A	PGAM1	RAB40C	SHOC2	TBC1D12
KIAA1797	MAMDC4	NIPSNAP3B	PGM5	RABEPK	SIGMAR1	TBC1D13
KIAA1958	MAN1B1	NKX2-3	PGP	RABGAP1	SLC16A12	TBC1D2
KIAA1984	MANEA	NLRC3	PHF19	RAD23B	SLC1A1	TBC1D24
KIAA2026	MAPK8IP3	NME3	PHF2	RALGDS	SLC24A2	TCEB2
KIF11	MAPKAP1	NME7	PHLDB2	RALGPS1	SLC25A25	TCTN3
KIF12	MARCH5	NMRAL1	PHYHD1	RAPGEF1	SLC25A28	TDRD7
KIF20B	MARVELD1	NOC3L	PI4K2A	RASEF	SLC27A4	TEK
KIF24	MCART1	NOL6	PIGO	RBM18	SLC27A6	TELO2
KIF27	MED22	NOL8	PIGQ	RBM20	SLC28A3	TESK1
KLF4	MED27	NOLC1	PIK3AP1	RBP4	SLC2A8	TESSP1
KLF9	MEFV	NOTCH1	PIP5K1B	RC3H2	SLC31A1	TEX10
KLHL32	MEGF9	NOXA1	PIP5K1L	RCL1	SLC31A2	TFAP4
KLHL9	MELK	NPM3	PITX3	RECK	SLC35D2	TGFBR1
KREMEN2	METTL11A	NPR2	PKD1	REXO4	SLC44A1	THOC6
LAMC3	MGC2889	NR4A3	PKD2L1	RFK	SLC46A2	TIGD7
LBX1	MGC3771	NR5A1	PKMYT1	RFX3	SLC9A10	TJP2
LCN1	MGEA5	NR6A1	PKN3	RG9MTD3	SLC9A3R2	TLE1
LCN12	MGRN1	NRARP	PLAA	RGR	SLIT1	TLE4
LCN6	MINPP1	NRG3	PLCE1	RGS11	SLK	TLL2
LCN8	MIR548H2	NT5C2	PLCXD2	RGS3	SMARCA2	TLN1
LCOR	MIR548H3	NTHL1	PLIN2	RHBDF1	SMC2	TLR4
LDB1	MIR548Q	NTN3	PMPCA	RHOT2	SMC3	TLX1
LDB3	MLANA	NTNG2	PNPLA7	RMI1	SMC5	TLX1NB
LDLRAD3	MLLT3	NTRK2	POLL	RNF151	SMNDC1	TM9SF3
LG11	MMP25	NBP2	POLR1E	RNF183	SMR3A	TMC1
LHX2	MMRN2	NUDT16L1	POMT1	RNF20	SMR3B	TMEFF1
LHX3	MMS19	NUDT2	PPAPDC3	RNF38	SMU1	TMEM141
LHX6	MOBKL2B	NUDT9P1	PPL	RNLS	SNAPC3	TMEM180
LINGO2	MORN4	NUP188	PPP1R3C	RNPS1	SNAPC4	TMEM2
LIPA	MORN5	NUP214	PPP2R4	ROD1	SNCG	TMEM20
LIPF	MPDZ	NXNL2	PPP3R2	ROGDI	SNRNP25	TMEM204
LIPJ	MRPL43	OBFC1	PPP6C	ROR2	SNX30	TMEM38B
LIPK	MRPL50	ODF2	PPRC1	RORB	SOC56	TMEM8B
LIPN	MRPS2	OGN	PRDM12	RPL12	SOHLH1	TMEM8C
LMF1	MRPS34	OLFM1	PRKACG	RPL35	SOLH	TMOD1
LMX1B	MRRF	OLFML2A	PROL1	RPL3L	SORBS1	TMPPRS7
LOC100128788	MSLN	OMD	PRPF4	RPP30	SORCS1	TMPPRS8
LOC100129066	MSLNL	OPA1	PRR25	RPS2	SORCS3	TNC
LOC100134368	MTAP	OPALIN	PRRX2	RPUSD1	SOX8	TNFRSF12A
LOC100188947	MUSK	OPN4	PRSS21	RRAGA	SPAG8	TNFSF15
LOC146336	MXI1	OR1J1	PRSS22	RRP12	SPIN1	TNFSF8
LOC158376	MYOF	OR2C1	PRSS27	RTTN	SPINK4	TNKS2
LOC158381	NAA35	OR2T10	PRSS3	RUSC2	SPSB3	TOPORS
LOC169834	NACC2	ORM2	PRUNE2	RXRA	SPTAN1	TOR1A
LOC253039	NAGPA	OSTF1	PSAT1	S1PR3	SPTLC1	TOR1B
LOC26102	NAIF1	OSTN	PSD	SAMD5	SRL	TOR2A
LOC285194	NANS	PAEP	PSIP1	SARDH	SRRM2	TPD52L3
LOC286359	NARFL	PALM2	PSMB7	SCAI	SSNA1	TPM2

Deletion BC61 Teil 3			
TPSD1	UBAP2	WDR34	ZNF169
TPSG1	UBE2I	WDR5	ZNF174
TRAF1	UBE2R2	WDR85	ZNF189
TRAF2	UBN1	WDR90	ZNF200
TRAF7	UBQLN1	WNK2	ZNF205
TRAP1	UBTD1	WNT8B	ZNF213
TRIM14	UCK1	XPA	ZNF263
TRIM32	UGCG	XPNPEP1	ZNF367
TRIM8	UHRF2	ZBED2	ZNF434
TRPM3	UNC13B	ZBTB26	ZNF462
TRPM6	UNKL	ZBTB34	ZNF483
TRUB2	URM1	ZBTB43	ZNF484
TSC1	USMG5	ZBTB5	ZNF500
TSC2	USP20	ZBTB6	ZNF510
TSTD2	UTS2D	ZCCHC6	ZNF518A
TTC16	VAC14	ZCCHC7	ZNF597
TTC39B	VASN	ZDHHC12	ZNF598
TTF1	VAV2	ZDHHC16	ZNF618
TTLL11	VCP	ZDHHC21	ZNF75A
TXN	VLDLR	ZER1	ZNF782
TXNDC8	VPS13A	ZFAND5	ZNF79
TYRP1	WAPAL	ZFP37	ZSCAN10
UBAC1	WDR24	ZFYVE27	
UBAP1	WDR31	ZMYND19	

**Tabelle 29 Teil 1-3: Deletierte Gene BC61**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC61. Eine Deletion gilt ab einer Kopienzahländerung <-0,5.

Zugewinne BC61							
ABHD12	C2orf20	CTSA	GNRH2	MYBL2	PPP4R1L	SIRPG	TP53INP2
ACOT8	C2orf200	CTSZ	GPCPD1	MYEOV	PQLC3	SLA2	TP53RK
ACSS1	C2orf24	CTTN	GRM7	MYH7B	PREX1	SLC12A5	TP53TGS
ACSS2	C2orf26	CYP24A1	GSS	MYL9	PRIC285	SLC13A3	TPCN2
ACTR5	C2orf27	DDR GK1	GSTP1	MYLK2	PRND	SLC17A9	TPD52L2
ADA	C2orf29	DDX27	GSTT1	MYT1	PRNP	SLC23A2	TPX2
ADAM33	C2orf3	DEFB118	GSTTP2	NAA20	PRNT	SLC24A3	TRIB3
ADIG	C2orf30	DEFB119	GTPBP5	NANP	PRO0628	SLC2A10	TRMT6
ADNP	C2orf4	DEFB121	GTSF1L	NAPB	PROCR	SLC32A1	TRPC4AP
ADRA1D	C2orf43	DEFB123	GZF1	NCOA3	PROKR2	SLC35C2	TSH22
ADRM1	C2orf46	DHX35	HAO1	NCOA5	PRPF6	SLC35E3	TTL8
AHCY	C2orf54	DIDO1	HAR1B	NCOA6	PSMA7	SLC4A11	TTL9
ALDH3B1	C2orf7	DLG2	HCK	NCRNA00029	PSMF1	SLC9A8	TPAL
ANGPT4	C2orf70	DLGAP4	HM13	NDRG3	PTGIS	SLCO4A1	TUBB1
ANKRD5	C2orf71	DNAJC5	HNF4A	NDUFS8	PTK6	SLMO2	UBE2C
ANO1	C2orf72	DNMT3B	HRH3	NDUFV1	PTPN1	SLPI	UBE2V1
APCDD1L	C2orf79	DNTT1P1	HSPA12B	NECAB3	PTPRA	SMOX	UBE2V1
AQP11	C2orf85	DOK5	HSPC072	NEURL2	PTPRT	SNAI1	UBOX5
ARFGAP1	C2orf94	DPH3B	ID1	NFATC2	PXMP4	SNAP25	UCKL1
ARFGEF2	C2orf95	DPM1	IFT52	NFS1	PYGB	SNHG11	UCKL1A5
ARFRP1	C2orf96	DSN1	IGHMBP2	NINL	R3HDML	SNPH	UNC93B1
ASIP	C2orf50	DSTN	INSM1	NKAIN4	RAB22A	SNRPB	UQCC
ASXL1	CASS4	DTD1	ISM1	NKX2-2	RAB3IP	SNRPB2	VAPB
ATP5E	CBFA2T2	DUSP15	ITCH	NNAT	RAD21L1	SNTA1	VPS16
ATP9A	CBLN4	DYNLRB1	ITPA	NOP56	RAE1	SNX21	VSTM2L
ATR	CEND1	E2F1	JAG1	NPEPL1	RALGAPA2	SNX5	VSX1
AURKA	CCT2	E2F6	JPH2	NRSN2	RALGAPB	SOX12	WFDC10A
AVP	CD40	EBF4	KCNB1	NSFL1C	RALY	SOX18	WFDC10B
B4GALT5	CD93	EDEM2	KCNG1	NTSR1	RASSF2	SPAG4	WFDC11
BANF2	CDC25B	EDN3	KCNK15	NXT1	RBBP9	SPATA2	WFDC12
BASE	CDH22	EEF1A2	KCNQ2	OGFR	RBCK1	SPEF1	WFDC13
BCAS1	CDH26	EFCAB8	KCNS1	OPRL1	RBL1	SPINLW1	WFDC2
BCAS4	CDH4	EIF2S2	KIAA0406	ORAOV1	RBM12	SPO11	WFDC3
BCL2L1	CDK5RAP1	EIF6	KIAA1755	OSBPL2	RBM38	SPTLC3	WFDC6
BEST3	CDS2	ELMO2	KIF16B	OTOR	RBM39	SRC	WFDC8
BFSP1	CEBPB	EMILIN3	KIF3B	OVOL2	RBPJL	SS18L1	WFDC9
BLCAP	CENPB	ENTPD6	L3MBTL	OXT	REM1	STAU1	WISP2
BMP2	CEP250	EPB41L1	LAMA5	PABPC1L	RGS19	STK35	WNK2
BMP7	CHD6	ERGIC3	LBP	PAK7	RIMS4	STK4	XXR7
BPI	CHGB	ESF1	LOC100130264	PANK2	RIN2	STMN3	XRN2
BPIL1	CHKA	EYA2	LOC100240726	PARD6B	RNF114	STX16	YEATS4
BPIL3	CHMP4B	FADD	LOC284749	PAX1	RNF24	SULF2	YTHDF1
BTBDB3	CHRNA4	FAM110A	LOC284788	PCIF1	ROCK2	SUN5	YWHAB
C11orf24	CLNS1A	FAM113A	LOC284798	PCK1	ROMO1	SUV420H1	ZBP1
C2orf103	COL20A1	FAM65C	LOC284805	PCMTD2	RORA	SYCP2	ZBTB46
C2orf106	COL9A3	FAM83C	LOC339568	PCNA	RPN2	SYS1	ZFP64
C2orf108	COMMD7	FAM83D	LOC388796	PCSK2	RPRD1B	DBNDD2	ZGPAT
C2orf111	COX4I2	FASTKD5	LPIN3	PDRG1	RRBP1	TAF4	ZHX3
C2orf111	CPM	FER1L4	LRP5	PDYN	RSF1	TASP1	ZMYND8
C2orf112	CPNE1	FERMT1	LRRN4	PET117	RSPO4	TBC1D20	ZNF133
C2orf114	CPSF6	FGF19	LSM14B	PFDN4	RTEL1	TCEA2	ZNF217
C2orf117	CPT1A	FGF3	LYZ	PHACTR3	SALL4	TCF15	ZNF334
C2orf118	CPXM1	FGF4	MACROD2	PHF20	SAMD10	TCFL5	ZNF335
C2orf12	CRLS1	FKBP1A	MAFB	PI3	SAMHD1	TCIRG1	ZNF337
C2orf123	CRNKL1	FLRT3	MANBAL	PIG1	SAPS3	TFAP2C	ZNF341
C2orf132	CSE1L	FOXA2	MAP1LC3A	PIGU	SDC4	TGIF2	ZNF343
C2orf141	CSNK2A1	FRS2	MAPRE1	PKIG	SDCBP2	TGM2	ZNF512B
C2orf152	CSRP2BP	GAL	MATN4	PLAGL2	SEC23B	TGM3	ZNF831
C2orf160	CST11	GALNTL6	MAVS	PLCB1	SEL1L2	TGM6	ZNFX1
C2orf165	CST2	GATA5	MC3R	PLCB4	SEMG1	TH1L	ZSWIM1
C2orf166	CST3	GCNT7	MCM8	PLCG1	SEMG2	THBD	ZSWIM3
C2orf173	CST5	GDAP1L1	MDM2	PLK1S1	SERINC3	TM9SF4	
C2orf177	CST7	GDF5	MIR644	PLTP	SFRS6	TM2C	
C2orf185	CST8	GFRA4	MKKS	PLUNC	SGK2	TMEM189	
C2orf186	CST9L	GGT7	MMP24	PMEPA1	SHANK2	TMEM90B	
C2orf194	CSTF1	GHRH	MMP9	POFUT1	SIGLEC1	TMX4	
C2orf195	CSTL1	GINS1	MRGPRF	POLR3F	SIRPA	TNNC2	
C2orf196	CSTT	GMEB2	MRPL21	PPFIA1	SIRPB1	TOMM34	
C2orf197	CTCF	GNAS	MRPS26	PPP1R16B	SIRPB2	TOP1	
C2orf199	CTNBNL1	GNASAS	MTL5	PPP1R3D	SIRPD	TOX2	

**Tabelle 30: Zugewinne BC61**

Basierend auf den aCGH-Daten von BC61. Ein Zugewinn gilt ab einer Kopienzahl > 0,5.

### Zugewinne BC44 Teil 1

A1CF	ARHGAP12	BPIL3	C1orf85	CCDC7	CHI3L1	CXorf23
ABCB10	ARHGAP22	BPNT1	C1orf9	CCDC8	CHIT1	CXorf27
ABCD2	ARHGAP30	BRD9	C1orf92	CCDC9	CHMP2A	CXorf30
ABL2	ARHGAP6	BRF2	C1orf95	CCDC97	CHMP4B	CXorf36
ACBD3	ARHGEF1	BRIX1	C1orf96	CCL28	CHRN2	CXorf38
ACE2	ARHGEF11	BRP44	C1orf97	CCNB3	CHST7	CXorf48
ACOT9	ARHGEF2	BRSK1	C1QTNF3	CCND1	CHST8	CXorf58
ACP6	ARHGEF9	BSPH1	C2orf112	CCNE1	CIC	CXorf59
ACPT	ARID5B	BTG2	C2orf114	CCNY	CILP2	CXorf67
ACSS2	ARL8A	C1orf10	C2orf12	CCT3	CISD1	CYB5R1
ACTA1	ARNT	C1orf107	C2orf160	CCT5	CKM	CYBB
ACTN4	ARSD	C1orf11	C2orf185	CD160	CKS1B	CYP2A13
ADAM15	ARSE	C1orf128	C2orf186	CD177	CLC	CYP2A6
ADAMTS12	ARSF	C1orf25	C2orf26	CD1A	CLCN4	CYP2B6
ADAMTS16	ARSH	C1orf53	C2orf70	CD1B	CLCN5	CYP2B7P1
ADAMTSL4	ARX	C1orf68	C2orf71	CD1C	CLDN2	CYP2F1
ADAR	ASAH2	C1orf71	C2orf72	CD1D	CLEC11A	CYP2S1
ADCK4	ASAH2B	C1orf72	C2orf79	CD1E	CLIP3	CYTH2
ADCY10	ASB11	C12orf35	C4BPA	CD22	CLK2	DAB2
ADCY2	ASB9	C12orf40	C4BPB	CD244	CLPTM1	DACT3
ADIPOR1	ASH1L	C12orf72	C5AR1	CD247	CLPTM1L	DAP
ADO	ASIP	C19orf12	C5orf22	CD33	CMBL	DAP3
ADORA1	ASPM	C19orf18	C5orf23	CD34	CNFN	DARC
AGT	ASTN1	C19orf2	C5orf28	CD37	CNIH3	DARS2
AGXT2	ASXL1	C19orf40	C5orf33	CD3EAP	CNIH4	DBP
AHCY	ATF3	C19orf41	C5orf34	CD46	CNKSR2	DCAF6
AHRR	ATF5	C19orf46	C5orf42	CD48	CNOT3	DCAF8
AIDA	ATF6	C19orf47	C5orf49	CD55	CNTD2	DCST1
AIM2	ATP13A1	C19orf48	C5orf51	CD5L	CNTN1	DCST2
AKAP4	ATP1A2	C19orf51	C6	CD79A	CNTN2	DDR2
AKT1S1	ATP1A3	C19orf54	C7	CD84	COG2	DDX3X
AKT2	ATP1A4	C19orf55	C9	CDC2	COMMD7	DDX53
ALAS2	ATP1B1	C19orf61	CA11	CDC42BPA	COPA	DDX59
ALDH16A1	ATP2B4	C19orf63	CA14	CDC42EP5	COX4I2	DEDD
ALDH9A1	ATP4A	C19orf73	CA5B	CDC42SE1	COX6B1	DEDD2
ALG10B	ATP5L	C19orf75	CA5BP	CDC73	COX6B2	DEFB118
ALKBH6	ATP6AP2	C1orf104	CABC1	CDH10	CPNE8	DEFB119
ALOX5	ATP6V1G3	C1orf105	CABP5	CDH12	CPT1A	DEFB121
AMACR	ATP8B2	C1orf106	CACNA1S	CDH18	CPT1C	DEFB123
AMELX	ATXN3L	C1orf107	CACNG6	CDH6	CR1	DEGS1
AMN1	AURKC	C1orf110	CACNG7	CDH9	CR1L	DENND1B
ANGEL2	AXL	C1orf111	CACNG8	CDK1	CR2	DENND4B
ANGPTL1	B3GALT2	C1orf112	CACYBP	CDK16	CRABP2	DENND5B
ANK3	B4GALT3	C1orf114	CADM3	CDK18	CRB1	DGKK
ANKH	BASE	C1orf115	CADM4	CDK5RAP1	CRCT1	DHDH
ANKRD27	BASP1	C1orf116	CALM3	CDKL5	CREB3L4	DHX34
ANKRD30A	BAT2L2	C1orf129	CAMK1G	CEACAM1	CREG1	DISP1
ANKRD33B	BATF3	C1orf156	CAMSAP1L1	CEACAM16	CREM	DKK1
ANKRD35	BAX	C1orf157	CAPN12	CEACAM19	CRNK1	DKKL1
ANKRD36BL1	BBC3	C1orf182	CAPN2	CEACAM20	CRNN	DLL3
ANKRD45	BCAM	C1orf186	CAPN8	CEACAM21	CRP	DMD
ANO1	BCAN	C1orf198	CAPN9	CEACAM3	CRTC2	DMKN
ANP32E	BCAT2	C1orf204	CAPNS1	CEACAM4	CRX	DMPK
ANTXR1	BCKDHA	C1orf220	CAPSL	CEACAM5	CSGALNACT2	DMRTC2
ANUBL1	BCL2L1	C1orf227	CARD6	CEACAM7	CSR1	DMWD
ANXA9	BCL2L12	C1orf230	CARD8	CEACAM8	CSR2BP	DNAH14
AP1S2	BCL3	C1orf35	CASK	CEBPA	CSTF2T	DNAH5
AP2A1	BCL9	C1orf43	CASQ1	CEBPG	CTNNA3	DNAJC21
AP2S1	BCOR	C1orf49	CATSPERG	CENPF	CTNND2	DNM1L
APEX2	BEND2	C1orf51	CBFA2T2	CENPL	CTPS2	DNM3
APH1A	BICC1	C1orf54	CBLC	CEP72	CTSE	DNMT3B
APLP1	BICD1	C1orf55	CCDC106	CFH	CTSK	DPF1
APOA2	BLVRB	C1orf56	CCDC114	CFHR1	CTSS	DPRX
APOC1	BLZF1	C1orf58	CCDC123	CFHR2	CTTN	DPT
APOC1P1	BMP15	C1orf61	CCDC127	CFHR3	CTU1	DPY19L3
APOC2	BMS1	C1orf65	CCDC152	CFHR4	CUL2	DRGX
APOE	BMX	C1orf66	CCDC155	CFHR5	CXCL12	DSTYK
APOO	BNIP1	C1orf69	CCDC19	CGN	CXorf15	DTD1
AQP10	BOLA1	C1orf74	CCDC6	CHAT	CXorf21	DTL
ARF1	BPIL1	C1orf77	CCDC61	CHD1L	CXorf22	DUSP10

## Zugewinne BC44 Teil 2

DUSP12	FAM187B	FMO5	GPR173	IKBKE	KIF21A	LILRB3
DUSP15	FAM189B	FMO6P	GPR34	IL10	KIF21B	LILRB4
DUSP21	FAM20B	FMO9P	GPR37L1	IL11	KIF3B	LILRB5
DUSP23	FAM47A	FMOD	GPR4	IL19	KIF5B	LILRP2
DUSP27	FAM47C	FOSB	GPR52	IL1RAPL1	KIFAP3	LIM2
DUSP5P	FAM5B	FOXA3	GPR64	IL20	KIR3DX1	LIN37
DUXA	FAM5C	FOXR2	GPR77	IL24	KIRREL	LIN7B
DYNLRB1	FAM60A	FPR1	GPR82	IL29	KIRREL2	LIN9
DYRK1B	FAM63A	FPR2	GPR89A	IL4I1	KISS1	LIPE
DYRK3	FAM71A	FPR3	GPR89B	IL6R	KLC3	LIX1L
E2F1	FAM71E1	FRMPD2	GPRIN2	IL7R	KLF8	LMBRD2
ECH1	FAM78B	FRMPD4	GRAMD1A	ILDR2	KLHDC8A	LMNA
ECM1	FAM83C	FTL	GRIK5	ILF2	KLHDC9	LMOD1
EDEM2	FAM83E	FUNDC1	GRIN2D	INE1	KLHL12	LMTK3
EFCAB8	FAM98C	FUT1	GRLF1	INSM1	KLHL15	LMX1A
EFHC2	FAM9A	FUT2	GRM7	INSRR	KLHL20	LOC100128675
EFNA1	FAM9B	FUZ	GRPR	INTS3	KLHL34	LOC100130264
EFNA3	FAM9C	FXYD1	GRWD1	INTS7	KLK10	LOC100131691
EFNA4	FANCB	FXYD3	GSK3A	IPMK	KLK11	LOC100132111
EGFL6	FASLG	FXYD4	GSPT2	IPO9	KLK12	LOC100132163
EGFLAM	FBL	FXYD5	GSS	IQGAP3	KLK13	LOC100133308
EGR2	FBXL7	FXYD7	GUK1	IQSEC2	KLK14	LOC148696
EHD2	FBXO17	FYB	GYG2	IRF2BP1	KLK2	LOC148709
EID2	FBXO27	FZD8	GYS1	IRF3	KLK3	LOC255167
EID2B	FBXO28	G0S2	H3F3A	IRF6	KLK4	LOC284440
EIF1AX	FBXO4	GABPB2	HAMP	IRGC	KLK5	LOC284441
EIF2S2	FBXO46	GAGE10	HAPLN2	IRGQ	KLK6	LOC284688
EIF2S3	FCAMR	GAL	HAS1	IRX1	KLK7	LOC284805
EIF3K	FCAR	GALNT2	HAUS5	IRX2	KLK8	LOC285692
EIF6	FCER1A	GALP	HAX1	IRX4	KLK9	LOC285696
ELF3	FCER1G	GAPDHS	HCCS	ISG20L2	KLKP1	LOC340094
ELK4	FCGBP	GATAD2A	HCK	ISOC2	KPTN	LOC349408
ELSPBP1	FCGR1C	GATAD2B	HCN1	ITCH	LAD1	LOC400794
EML2	FCGR2A	GBA	HCST	ITGA10	LAIR1	LOC401588
EMP3	FCGR3B	GBAP1	HDGF	ITGB1	LAMA3	LOC440926
ENAH	FCGRT	GDF10	HDHD1A	ITIH5L	LAMB3	LOC550643
ENSA	FCRL1	GDF2	HEATR7B2	ITLN1	LANCL3	LOC642502
EPC1	FCRL2	GDNF	HFE2	ITLN2	LASS2	LOC645166
EPHX1	FCRL3	GEMIN7	HHAT	ITPKB	LAX1	LOC645676
EPN1	FCRL4	GEMIN8	HHIPL2	ITPKC	LBR	LOC646982
EPRS	FCRL5	GGT7	HIF3A	IVL	LCE1C	LOC728411
EPS8L1	FCRL6	GHR	HIPK4	IZUMO1	LCE1E	LOC728613
ERCC1	FCRLA	GIPR	HIST2H2AB	JMJD1C	LCE2A	LOC728989
ERCC2	FCRLB	GJA5	HIST2H2AC	JMJD4	LCE2B	LOC729991
ERCC6	FDPS	GJA8	HIST2H2BE	JOSD2	LCE2C	LOC729991
ERF	FFAR2	GJC2	HKR1	JTB	LCE3E	LOC80054
ERLIN2	FGD1	GJD4	HM13	KAL1	LCE4A	LOC84856
ESRRG	FGD4	GK	HMGCS1	KCNA7	LCE5A	LOC84989
ETFB	FGF10	GLRA2	HNRNPA3P1	KCNH1	LEFTY2	LOC92249
ETHE1	FGF19	GLRX2	HNRNPF	KCNJ10	LELP1	LPCAT1
ETNK2	FGF21	GLTSCR1	HNRNPL	KCNJ14	LEMD1	LPGAT1
ETV3	FGF3	GLTSCR2	HNRNPUL1	KCNJ9	LENEP	LRFN1
ETV3L	FGF4	GMIP	HORMAD1	KCNK2	LENG1	LRFN3
EXOC3	FIGF	GNL3L	HPN	KCNK6	LENG8	LRRC14B
EXOC3L2	FIZ1	GNRHR2	HRC	KCNN3	LEUTX	LRRC18
EXOSC5	FKRP	GOLPH3	HSD11B1	KCNN4	LGALS13	LRRC4B
F11R	FLAD1	GOLPH3L	HSD17B10	KCNT2	LGALS4	LRRC4C
F13B	FLG	GOLT1A	HSD17B14	KCNU1	LGI4	LRRC52
F5	FLG2	GON4L	HSPBP1	KCTD15	LGR6	LRRK2
FAAH2	FLJ13224	GORAB	HSPC072	KCTD3	LGTN	LRRN2
FADD	FLJ26850	GP6	HUWE1	KDELR1	LHX9	LRRTM3
FAIM3	FLJ33360	GPA33	IARS2	KDM5B	LIFR	LSM14A
FAM104B	FLJ40125	GPATCH1	ID1	KDM5C	LIG1	LSR
FAM105A	FLJ41856	GPATCH2	IFI16	KDM6A	LILRA2	LTBP4
FAM105B	FLT3LG	GPATCH4	IGFL2	KIAA0040	LILRA3	LY9
FAM120C	FLVCR1	GPI	IGFL4	KIAA0355	LILRA4	LYPD3
FAM134B	FMO1	GPM6B	IGFN1	KIAA0892	LILRA5	LYPD4
FAM13C	FMO2	GPR124	IGHMBP2	KIAA0907	LILRA6	LYPD5
FAM173B	FMO3	GPR143	IGSF8	KIAA0947	LILRB1	LYPLAL1
FAM177B	FMO4	GPR161	IGSF9	KIF14	LILRB2	MAEL

### Zugewinne BC44 Teil 3

MAG	MRPL55	NLRP8	PBX1	PNPLA4	PTOV1	RHO
MAGEB1	MRPL9	NLRP9	PBX4	POFUT1	PTPN14	RHPN2
MAGEB10	MRPS12	NME7	PBXIP1	POGK	PTPN7	RIBC1
MAGEB16	MRPS14	NNT	PCDH15	POGZ	PTPRC	RICTOR
MAGEB18	MRPS21	NOS1AP	PCP4L1	POLA1	PTPRH	RIN2
MAGEB3	MRPS30	NOSIP	PCYT1B	POLD1	PTPRV	RINL
MAGEB4	MSL3	NOTCH2NL	PDCD2L	POLR2I	PVR	RIT1
MAGEB6	MSMB	NOVA2	PDCD5	POLR3C	PVRL2	RNASEN
MAGED1	MSTO1	NPAS1	PDCD6	POLR3F	PVRL4	RNF115
MAGED2	MSTO2P	NPHS1	PDE4DIP	POLR3GL	PXMP4	RNF187
MAGEH1	MTL5	NPR1	PDHA1	POP4	PYCR2	RNPEP
MAMSTR	MTMR11	NPR3	PDK3	POU2F1	PYGO2	ROBLD3
MAOA	MTMR12	NR0B1	PDRG1	POU2F2	PYHIN1	ROBO2
MAOB	MTMR8	NR1H2	PDZD2	PPEF1	QPCTL	ROPN1L
MAP1LC3A	MTRR	NR13	PDZK1	PPFIA1	RAB11FIP1	RORA
MAP3K10	MTX1	NR2C2AP	PEA15	PPFIA3	RAB13	RORC
MAP3K15	MUC1	NR5A2	PEAR1	PPFIA4	RAB25	RP2
MAP3K7IP3	MXRA5	NRBF2	PEG3	PPOX	RAB3GAP2	RPGR
MAP4K1	MYADM	NRP1	PEPD	PPP1R12B	RAB4A	RPL13A
MAP7D2	MYBPC2	NSL1	PET117	PPP1R12C	RAB4B	RPL13AP5
MAPK8	MYBPH	NSUN2	PEX11B	PPP1R13L	RAB7L1	RPL18
MAPKAPK2	MYEOV	NTN5	PEX19	PPP1R14A	RAB9A	RPL37
MAPRE1	MYH14	NTRK1	PFDN2	PPP1R15A	RABAC1	RPRD2
MARCH11	MYH7B	NUAK2	PFKFB1	PPP1R15B	RABGAP1L	RPS11
MARCH6	MYLK2	NUCB1	PFKFB2	PPP1R3F	RABIF	RPS16
MARCH8	MYO10	NUCKS1	PGBD2	PPP2R1A	RAD1	RPS19
MARK1	MYOC	NUDT10	PGBD3	PPP2R5A	RAG1AP1	RPS27
MARK4	MYOG	NUDT11	PGBD5	PPP5C	RAI14	RPS5
MBL2	MZF1	NUDT19	PGLYRP1	PPYR1	RAI2	RPS6KA3
MBOAT7	NAA20	NUF2	PGLYRP3	PRCC	RALGAPA2	RPS6KC1
MBTPS2	NANOS2	NUMBL	PGLYRP4	PRDM9	RALGPS2	RPS9
MCL1	NAPA	NUP133	PHEX	PRDX4	RALY	RPTN
MDM4	NAPSB	NUP155	PHF16	PRDX6	RALYL	RRAGB
MED10	NAT14	NUP210L	PHF8	PRELP	RANBP3L	RRAS
MED14	NAV1	NUP62	PHKA2	PREP	RASAL2	RRP15
MED25	NCAN	NVL	PHLDA3	PRKAA1	RASGEF1A	RS1
MED29	NCCRP1	NYX	PHLDB3	PRKAB2	RASGRP4	RSPH6A
MEF2B	NCOA4	OAZ3	PHYHIPL	PRKCG	RASIP1	RTKN2
MEF2D	NCOA6	OBSCN	PI4KB	PRKD2	RASSF4	RTN2
MEGF8	NCRNA00085	OFD1	PIAS3	PRKG1	RASSF5	RUSC1
MEIS3	NCSTN	OGDHL	PIGA	PRKX	RBBP5	RUVBL2
METTL11B	NDP	OLFML2B	PIGC	PRLR	RBBP7	RXFP4
METTL13	NDUFA13	OPA3	PIGM	PRMT1	RBBP9	RXRG
MFSD4	NDUFA3	OPTC	PIGR	PROCR	RBM10	RYR1
MGC2752	NDUFB11	OR10J1	PIGU	PRODH2	RBM8A	S100A10
MGC42105	NDUFS2	OR10J5	PIK3C2B	PROSC	RBP3	S100A11
MGC4473	NDUFS6	OR13A1	PIPSK1A	PROX1	RC3H1	S100A12
MGST3	NECAB3	OR2T10	PIR	PRPF3	RCN3	S100A13
MIA3	NEK2	OR6Y1	PKLR	PRPF31	RCOR3	S100A14
MID1	NEK7	ORAOV1	PKP1	PRPS2	RCSL1	S100A5
MID1IP1	NENF	OSCAR	PKP2	PRR12	RD3	S100A7
MIMT1	NES	OSMR	PLA2G4C	PRRG1	RDH13	S100A7A
MIR518A2	NFASC	OTC	PLAGL2	PRRG2	REEP3	S100A8
MIR519E	NFKBIB	OTUD7B	PLAUR	PRRX1	RELB	S100A9
MIR644	NFKBID	OVOL2	PLCXD3	PRSS38	REM1	S100G
MIR765	NHLH1	OXCT1	PLD3	PRUNE	REN	SAE1
MIXL1	NHS	PAF1	PLEKHA4	PRX	REPS2	SAMD4B
MLL4	NIPBL	PAFAH1B3	PLEKHA6	PSEN2	RET	SAPS1
MLLT11	NKD2	PAGE1	PLEKHF1	PSG11	RFWD2	SAPS3
MMMP24	NGK7	PAGE4	PLEKHG2	PSG2	RFXANK	SARS2
MNDA	NKPD1	PAIP1	PLEKHG4B	PSG5	RGN	SAT1
MOSC1	NKX2-2	PAK4	PLEKHO1	PSG7	RGS1	SCAF1
MOSC2	NLGN4X	PAPD7	PLK1S1	PSG8	RGS13	SCAMP3
MOSPD2	NLRP11	PAPL	PLUNC	PSMB4	RGS18	SCML1
MPZ	NLRP12	PAPPA2	PLXNA2	PSMD4	RGS2	SCML2
MPZL1	NLRP13	PAQR6	PM20D1	PSMD8	RGS21	SCN1B
MRGPRF	NLRP2	PARD3	PMF1	PTCHD1	RGS4	SCNM1
MRPL21	NLRP4	PARG	PMVK	PTGER4	RGS5	SCYL3
MRPL24	NLRP5	PARP1	PNKP	PTGIR	RHBG	SDHA
MRPL36	NLRP7	PAX1	PNMAL1	PTH2	RHOBTB1	SDHAP3

### Zugewinne BC44 Teil 4

SDHC	SLC30A10	SYT11	TNNI1	USF2	ZNF134	ZNF480	ZNF682
SEC1	SLC39A1	SYT14	TNNI3	USH2A	ZNF135	ZNF485	ZNF687
SEC16B	SLC41A1	SYT2	TNNT1	USP11	ZNF14	ZNF486	ZNF692
SEC22B	SLC45A2	SYT3	TNNT2	USP21	ZNF146	ZNF487	ZNF701
SEC23B	SLC45A3	SYT5	TNR	USP29	ZNF155	ZNF488	ZNF702P
SELE	SLC6A16	SYTL5	TNRC4	USP9X	ZNF157	ZNF497	ZNF71
SELENBP1	SLC6A18	TADA1	TOMM40	VAMP4	ZNF160	ZNF506	ZNF749
SELL	SLC6A19	TAF1A	TOMM40L	VANGL2	ZNF175	ZNF507	ZNF761
SELP	SLC6A3	TAF5L	TOR3A	VASH2	ZNF180	ZNF524	ZNF765
SELV	SLC7A10	TAGLN2	TP53BP2	VASP	ZNF181	ZNF525	ZNF766
SEMA4A	SLC7A9	TARM1	TP53NP2	VENTXP1	ZNF211	ZNF527	ZNF773
SEMA5A	SLC8A2	TARS	TPCN2	VN1R1	ZNF22	ZNF528	ZNF776
SEMA6C	SLC9A11	TARS2	TPM3	VN1R2	ZNF221	ZNF529	ZNF780A
SEPP1	SLC9A3	TATDN3	TPPP	VPS45	ZNF222	ZNF530	ZNF780B
SEPW1	SLC9A7	TBC1D17	TPX2	VPS72	ZNF223	ZNF534	ZNF781
SERPINC1	SMC1A	TBCB	TRAF3IP3	VRK3	ZNF224	ZNF536	ZNF787
SERTAD1	SMCP	TBL1X	TRAF5	VSIG10L	ZNF225	ZNF540	ZNF790
SERTAD3	SMEK3P	TBX19	TRAPPC2	VSTM1	ZNF226	ZNF541	ZNF792
SERTAD4	SMG5	TCEANC	TRAPPC6A	VSTM2B	ZNF227	ZNF542	ZNF793
SETDB1	SMPX	TCHH	TRIM11	WDFY4	ZNF229	ZNF543	ZNF8
SF3B4	SMS	TCHHL1	TRIM17	WDR26	ZNF230	ZNF544	ZNF805
SF4	SMYD2	TDRD10	TRIM28	WDR62	ZNF233	ZNF546	ZNF808
SFRS16	SNAP47	TDRD12	TRIM46	WDR70	ZNF234	ZNF547	ZNF813
SFT2D2	SNAPIN	TDRKH	TRIO	WDR87	ZNF235	ZNF548	ZNF814
SGMS1	SNRNP70	TEAD2	TRIP13	WDR88	ZNF239	ZNF549	ZNF816A
SH2D1B	SNRPA	TERT	TRO	WNK2	ZNF253	ZNF551	ZNF829
SH2D2A	SNRPD2	TEX101	TROVE2	WNK3	ZNF256	ZNF552	ZNF83
SH3BP5L	SNRPE	TFAM	TRPC4AP	WNT3A	ZNF260	ZNF565	ZNF837
SH3KBP1	SNTA1	TFPT	TRPM4	WNT9A	ZNF264	ZNF566	ZNF841
SHANK1	SNX26	TGFB1	TSEN34	WTIP	ZNF274	ZNF567	ZNF845
SHANK2	SNX27	TGFB2	TSHZ3	WWC3	ZNF28	ZNF568	ZNF880
SHC1	SNX5	THAP8	TSKS	XAGE3	ZNF281	ZNF569	ZNF90
SHE	SOX13	THBS3	TSPAN7	XAGE5	ZNF283	ZNF570	ZNF93
SHISA4	SPACA4	THEM4	TSPYL2	XCL1	ZNF284	ZNF571	ZRSR2
SHISA7	SPANXN5	THEM5	TSR2	XG	ZNF30	ZNF573	ZSCAN1
SHKBP1	SPATA17	TIMM17A	TTC13	XK	ZNF304	ZNF574	ZSCAN18
SHROOM2	SPEF2	TIMM23	TTC23L	XKR7	ZNF32	ZNF576	ZSCAN22
SHROOM4	SPHK2	TIMM50	TTC33	XRCC1	ZNF320	ZNF577	ZSCAN4
SIGLEC10	SPIB	TIPRL	TTC9B	XRN2	ZNF321	ZNF578	ZSCAN5A
SIGLEC11	SPIN3	TLR5	TTL8	YARS2	ZNF324	ZNF579	ZXDA
SIGLEC12	SPINT2	TLR7	TLL9	YIF1B	ZNF329	ZNF580	ZXDB
SIGLEC14	SPRED3	TLR8	TTYH1	YJEFN3	ZNF331	ZNF581	
SIGLEC16	SPRR1A	TM6SF2	TUFT1	YOD1	ZNF33B	ZNF582	
SIGLEC5	SPRR1B	TM9SF4	TULP2	YY1AP1	ZNF341	ZNF583	
SIGLEC6	SPRR2C	TMC4	TXNIP	ZAN	ZNF345	ZNF584	
SIGLEC7	SPRR3	TMCC2	TYROBP	ZBTB32	ZNF347	ZNF585A	
SIGLEC8	SPRR4	TMCO1	U2AF1L4	ZBTB37	ZNF350	ZNF585B	
SIGLEC9	SPTA1	TMEM143	U2AF2	ZBTB41	ZNF365	ZNF586	
SIPA1L3	SPTBN4	TMEM147	UAP1	ZBTB45	ZNF37A	ZNF587	
SIRT2	SRD5A1	TMEM149	UBA1	ZBTB7B	ZNF37B	ZNF599	
SIX5	SRGAP2	TMEM150B	UBA2	ZC3H11A	ZNF382	ZNF606	
SKP2	SRP9	TMEM160	UBAP2L	ZC3H4	ZNF383	ZNF607	
SLAMF1	SRPX	TMEM183A	UBE2D1	ZDHHC11	ZNF404	ZNF610	
SLAMF6	SSC5D	TMEM183B	UBE2M	ZEB1	ZNF41	ZNF611	
SLAMF7	SSR2	TMEM190	UBE2Q1	ZFP112	ZNF415	ZNF613	
SLAMF8	STEAP2	TMEM206	UBE2QL1	ZFP14	ZNF416	ZNF614	
SLAMF9	STRN4	TMEM26	UBE2S	ZFP28	ZNF417	ZNF615	
SLC12A7	STS	TMEM27	UBE2T	ZFP30	ZNF418	ZNF616	
SLC16A9	SUB1	TMEM47	UBQLN2	ZFP36	ZNF419	ZNF622	
SLC17A7	SULT2A1	TMEM63A	UBQLN4	ZFP82	ZNF420	ZNF628	
SLC19A2	SULT2B1	TMEM72	UCHL5	ZFR	ZNF428	ZNF645	
SLC1A3	SUN5	TMEM79	UCK2	ZFX	ZNF432	ZNF649	
SLC1A5	SUPT5H	TMEM86B	UFC1	ZIK1	ZNF444	ZNF665	
SLC24A3	SUSD4	TMEM9	UGT3A1	ZIM2	ZNF45	ZNF667	
SLC25A44	SUV420H2	TMEM91	UGT3A2	ZIM3	ZNF460	ZNF671	
SLC26A9	SV2A	TMOD4	UHMK1	ZNF101	ZNF461	ZNF672	
SLC27A3	SYAP1	TNFAIP8L2	UPK1A	ZNF114	ZNF468	ZNF673	
SLC27A5	SYMPK	TNFSF18	UQCRF51	ZNF131	ZNF470	ZNF674	
SLC2A13	SYNGR4	TNFSF4	URB2	ZNF132	ZNF471	ZNF677	
SLC30A1	SYT10	TNN	USF1	ZNF133	ZNF473	ZNF678	

**Tabelle 31 Teil 1-4: Zugewinne BC44**

Basierend auf den cGH-Daten von BC44. Ein Zugewinn gilt ab einer Kopienzahl > 0,5.

Deletionen BC44					
ABCB4	CKMT1A	FGF20	LOXL2	PHYHIP	SSPO
ABCB8	CLN8	FGL1	LRRC61	PINX1	STC1
ABCF2	CNNM2	FHIT	LZTS1	PIWIL2	SYK
ABP1	CNOT7	FILIP1	MAGEL2	POLR3D	TDH
ACTR3B	CNPY1	FLJ10661	MAPT	PPP1R3B	TJP1
ACTR3C	CNTNAP2	FLJ14107	MBTPS2	PPP3CC	TMEM121
ADAM28	CPSF6	GABRA5	MCPH1	PRAGMIN	TMEM176A
AGAP3	CRYGN	GABRB3	MFHAS1	PRKAG2	TMEM176B
AGBL1	CSGALNACT1	GABRG3	MFRP	PSD3	TMLHE
AGPAT5	CSMD1	GALNT11	MIR548F3	PTPRN2	TMUB1
ANGPT2	CTSBS	GALNTL5	MIR548I4	PWRN1	TNFRSF10A
APBA2	CUL1	GATA4	MLL3	PXT1	TNFRSF10B
ARHGEF10	CWF19L2	GBX1	MNX1	R3HCC1	TNFRSF10C
ASAH1	CYFIP1	GFRA2	MSR1	RAD52	TNFRSF10D
ASB10	DEF5	GIMAP1	MSRA	RARRES2	TNKS
ATG9B	DEFB1	GIMAP2	MTMR10	RBM33	TPTE
ATOH8	DEFB107A	GIMAP4	MTMR15	REEP4	TRPM1
ATP10A	DEFB107B	GIMAP5	MTMR7	REPIN1	TRRAP
ATP6V1B2	DEFB135	GIMAP6	MTMR9	RHD	T-SP1
AUTS2	DEFB4	GIMAP7	MTUS1	RHEB	TUBGCP5
BAGE	DENND1B	GIMAP8	MYOM2	RHOBTB2	TUSC3
BAGE2	DIAPH2	HERC2	MYT1L	RNF144B	UBE3A
BAGE3	DLC1	HIC1	NAT1	RNF32	UBE3C
BAGE4	DLGAP2	HR	NCAPG2	RP1L1	VIPR2
BAGE5	DMBT1	HTR5A	NDN	RPL23AP53	VPS37A
BCL8	DMD	IGF2	NDNL2	SCRIB	WBSCR17
BIN3	DNAJB6	IMMP2L	NEIL2	SEC63	WDR60
BLK	DOK2	INSIG1	NEUROG2	SEMA6A	WDR86
BMP1	DOK5	INS-IGF2	NF1P1	SERHL	WHAMML1
C14orf80	DPP6	INTS10	NIPA1	SERPINA7	WWOX
C15orf2	EFHA2	IPW	NIPA2	SFTPC	XKR5
C1QTNF5	EGR3	IRAK3	NKX3-1	SGCZ	XKR6
C7orf13	ELAVL2	KBTD11	NOM1	SH2D4A	XPNPEP1
C7orf29	EN2	KCNH2	NOS3	SHH	XPO7
C7orf33	ENTPD4	KCNJ6	NPM2	SLC18A1	XRCC2
C7orf50	EPB49	KCTD20	NUB1	SLC25A37	ZDHHC2
C8orf12	ERI1	KIAA1324L	NUDT18	SLC38A2	ZNF14
C8orf42	ERICH1	KIAA1967	OCA2	SLC39A14	ZNF212
C8orf48	ESYT2	KLF13	OFD1	SLC4A2	ZNF282
C8orf58	ETS1	KRBA1	OR8U8	SLC7A2	ZNF398
C8orf74	EXD3	LGJ3	OTUD7A	SMARCD3	ZNF425
C8orf79	EZH2	LMBR1	OXR1	SNORD115-15	ZNF467
C9orf53	FABP5L3	LOC100128542	OXT	SNORD115-21	ZNF596
CALN1	FAM160B2	LOC100132707	PAXIP1	SNRPN	ZNF746
CDH18	FAM167A	LOC154822	PC	SNTG1	ZNF767
CDK5	FAM189A1	LOC340357	PCM1	SNURF	ZNF775
CDKN2A	FAM19A5	LOC646214	PDGFRL	SOCS6	ZNF777
CDKN2B	FAM66B	LOC727924	PDIA4	SORBS3	ZNF783
CDKN2BAS	FBXO25	LONRF1	PDLIM2	SOX2	ZNF786
CHMP7	FDFT1	LOR	PEBP4	SOX2OT	ZNF862
CHPF2	FGF17	LOXL2	PHYHIP	SOX7	

**Tabelle32: Deletierte Gene von BC44**

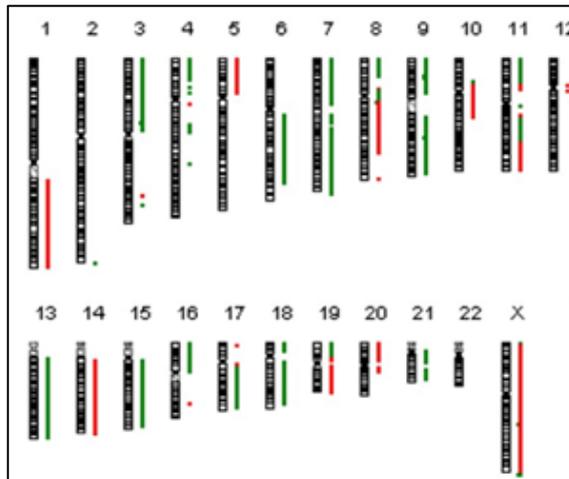
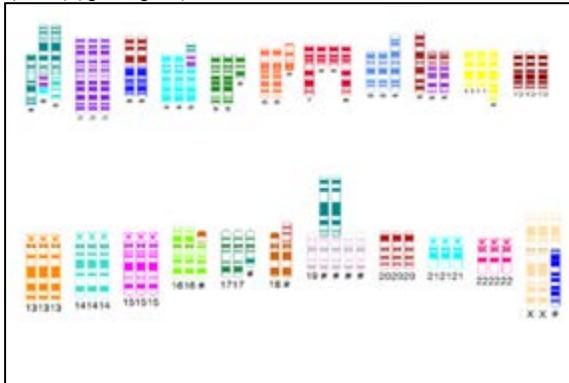
Basierend auf den aCGH-Daten von BC44. Eine Deletion gilt ab einer Kopienzahländerung <-0,5.

### 10.3 Graphische Darstellung der einzelnen Chromosomen.

**BC44**

Karyotyp

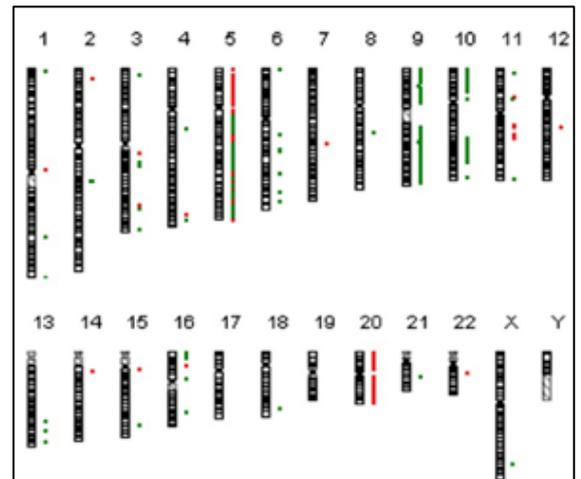
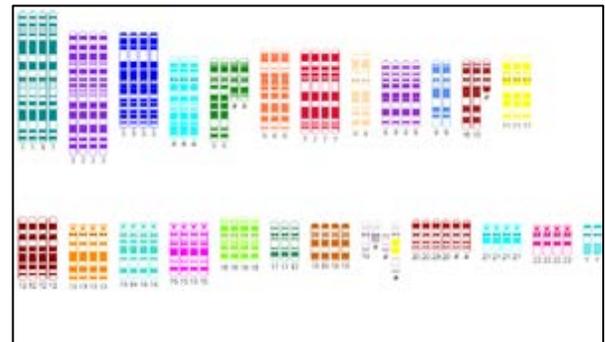
64-68, XX, dic(X;3)(p10;q19), der(1)t(1;14)(q21;q11),der(1)(1pter->1q21::8q11->8q21::4p14->4pter),del(1)(p22),der(4)(1qter->1q32::8q11->8q21::4p64-68, XX, dic(X;3)(p10;q19), der(1)t(1;14)(q21;q11),der(1)(1pter-1q21::8q11->8q21::4p14->4pter),del(1)(p22),der(4)(1qter->1q32::8q11->8q21::4p11->4qter),i(5)(p10),der(6)(:6q13-6p22::6p12->6p22:),del(7)(q11)x2,+7,-8x3,i(9)(q10),+der(10)t(8;10)(q11;q11)x2,dic(3;10)(q10;q10)x2,i(10)(q10),dup(11)(q23q13),der(16)t(16;18)(p11;p11),der(17)t(17;1)(q21;q42),-18,der(18)t(18;20)(p11.2;q11),+19,+19,+19,der(19)t(1;19)(q21;?p13)x211->4qter),i(5)(p10),der(6)(:6q13->6p22::6p12->6p22:),del(7)(q11)x2,+7,-8x3,i(9)(q10),+der(10)t(8;10)(q11;q11)x2,dic(3;10)(q10;q10)x2,i(10)(q10),dup(11)(q23q13),der(16)t(16;18)(p11;p11),der(17)t(17;1)q21;q42),-18,der(18)t(18;20)(p11.2;q11),+19,+19,+19,der(19)t(1;19)(q21;?p13)x2



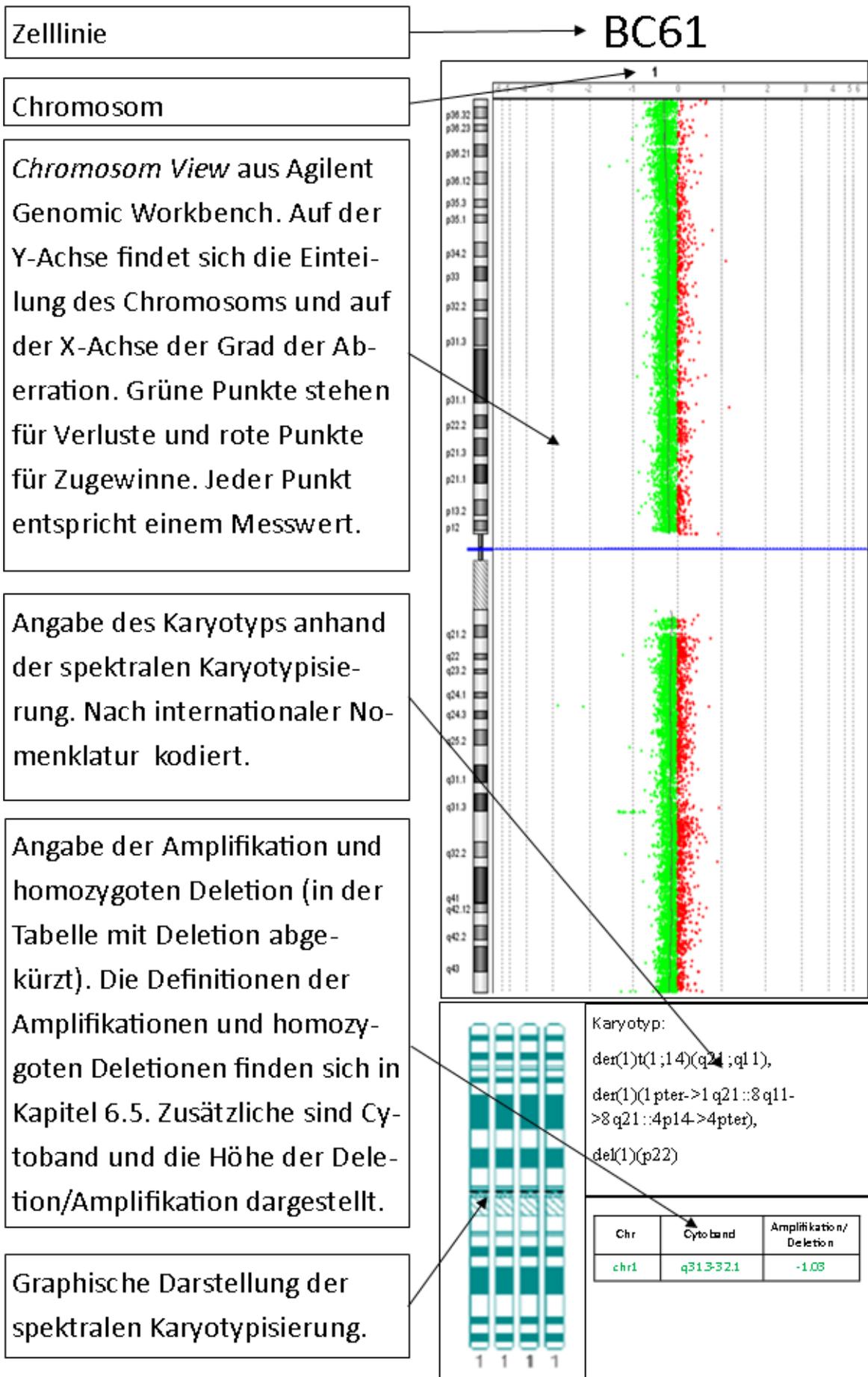
**BC61**

Karyotyp

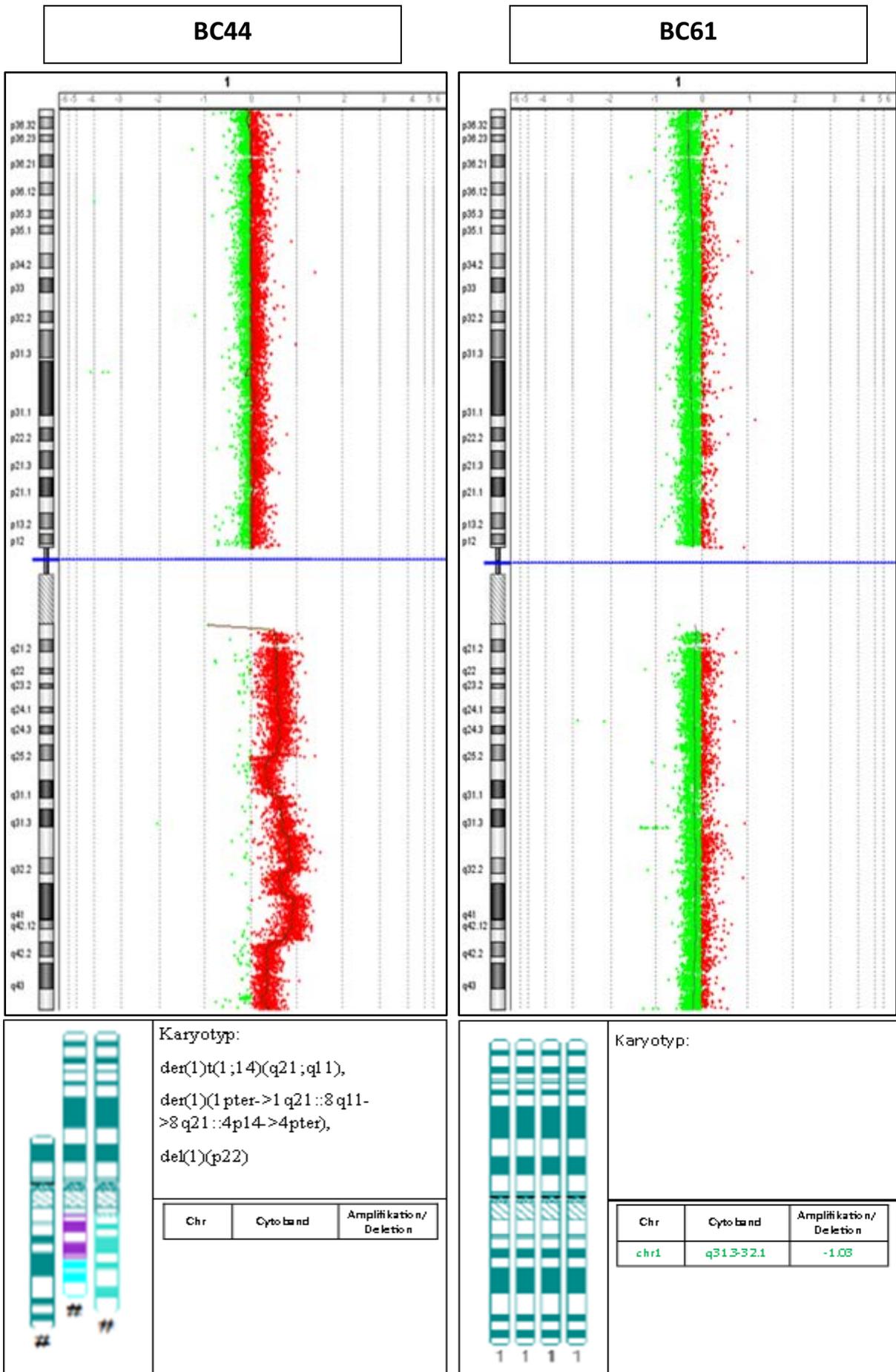
86,XXYY,-4,i(5)(p10)x2,-6,-9x2,del(10)(q21),-10,



**Abbildung 14:** Zusammenstellungen der chromosomalen Veränderungen von BC44 und BC61 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



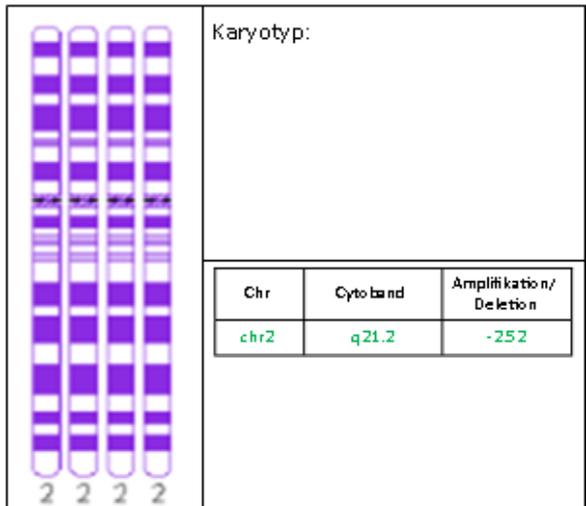
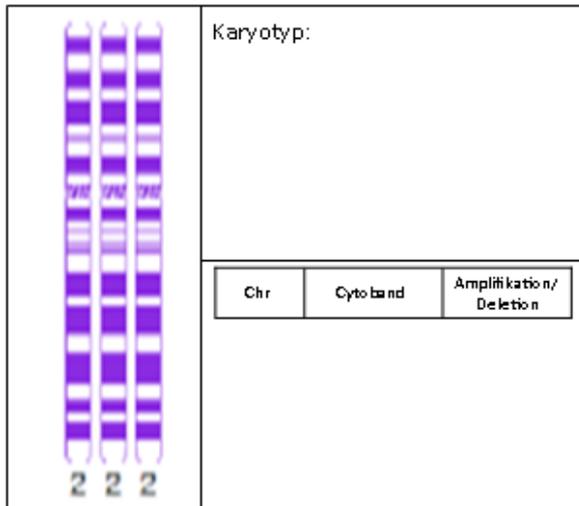
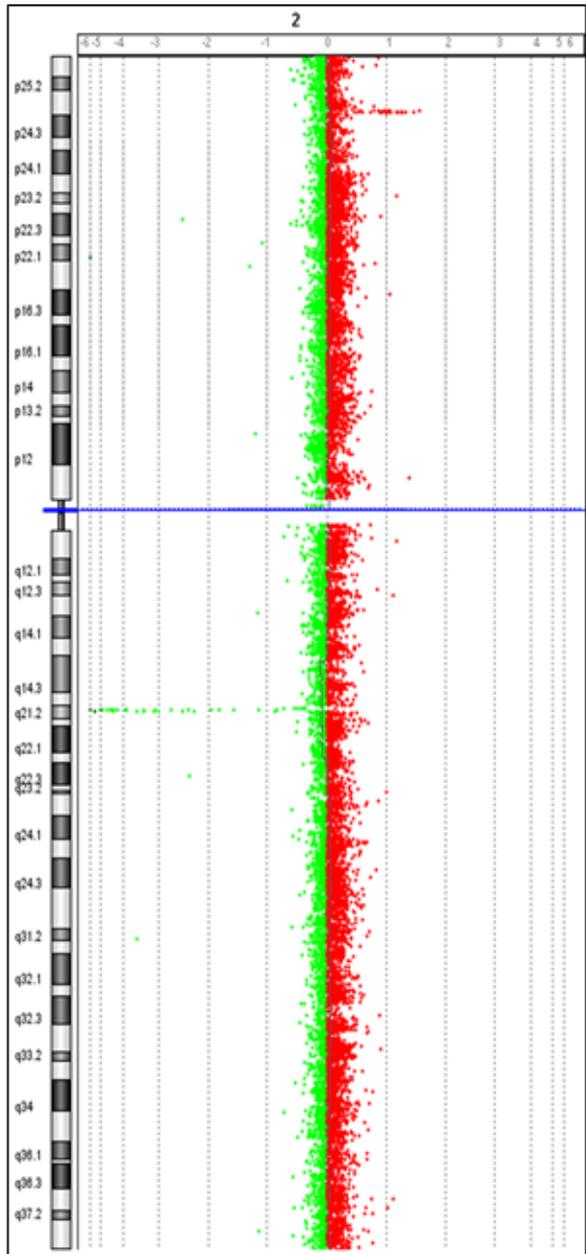
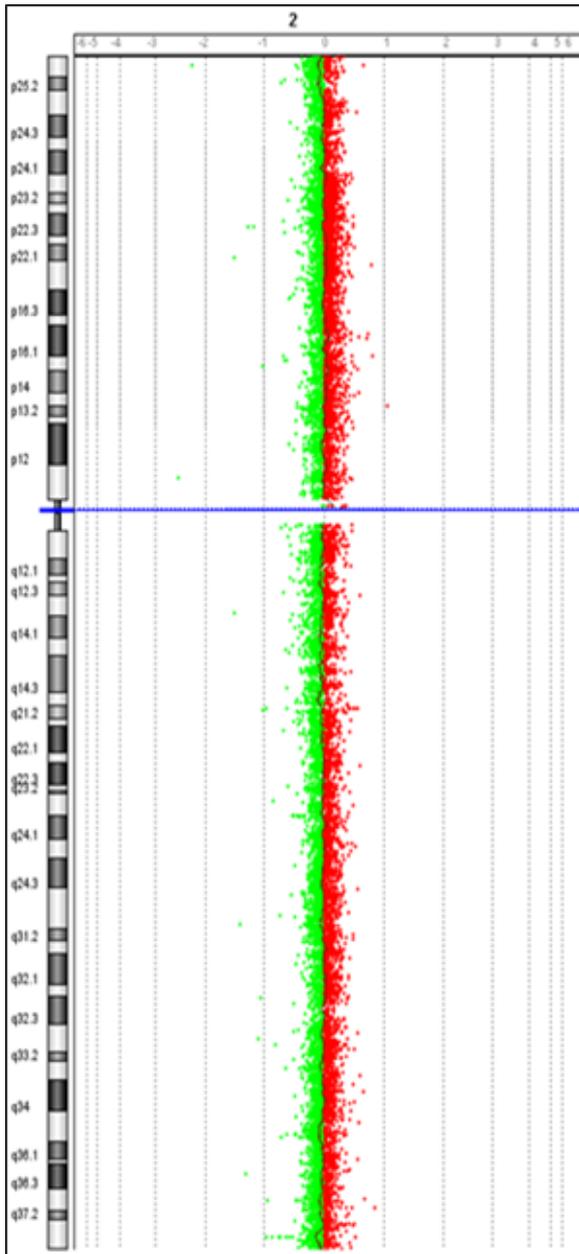
**Abbildung 15:** Erklärung der Abbildungen 16-39  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 16: Chromosom1 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

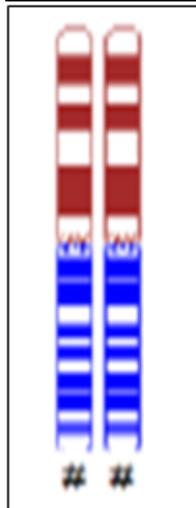
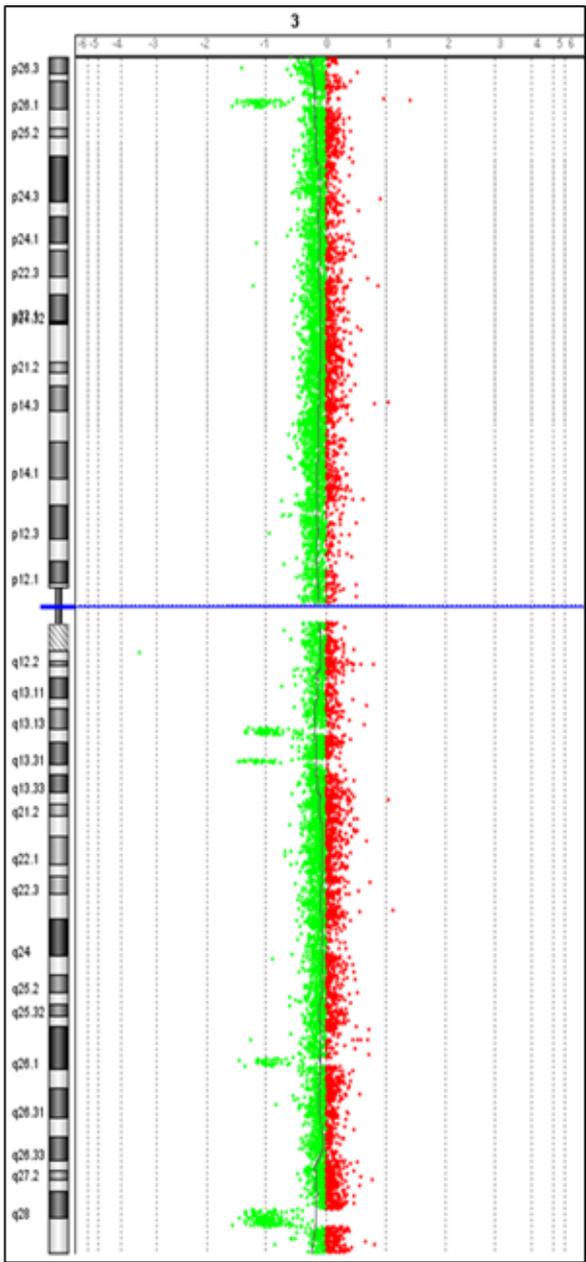
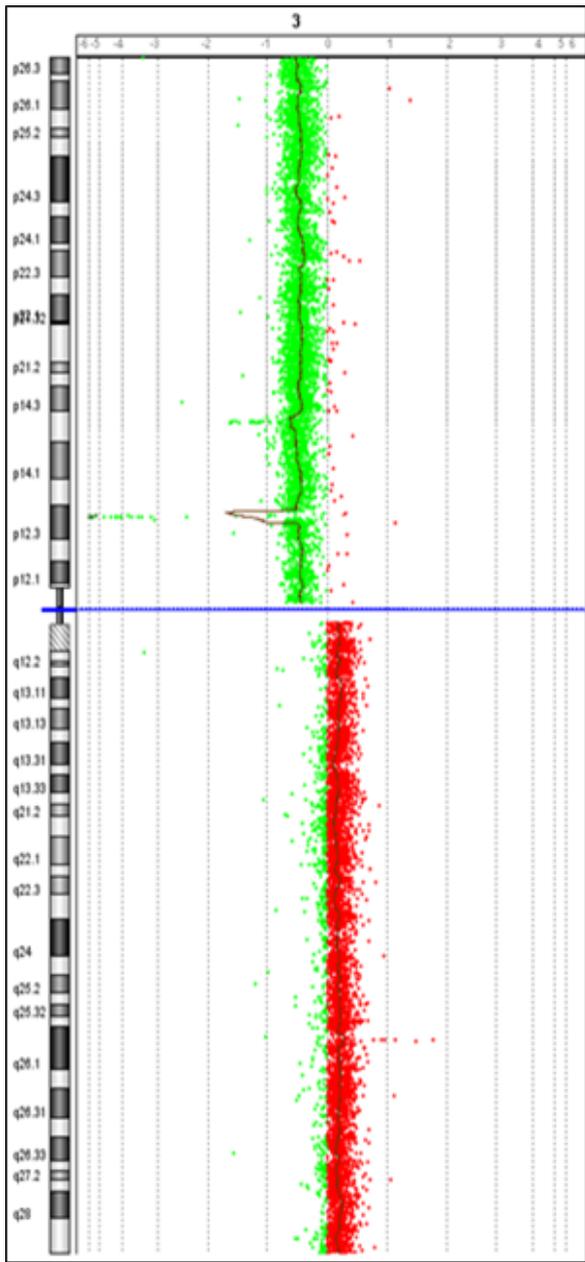
**BC61**



**Abbildung 17: Chromosom2 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

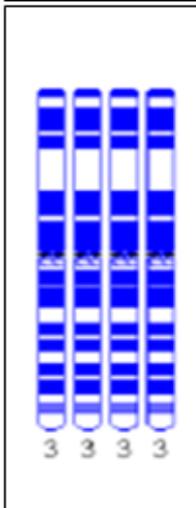
**BC44**

**BC61**



Karyotyp:  
dic(3;10)(q10;q10)x2

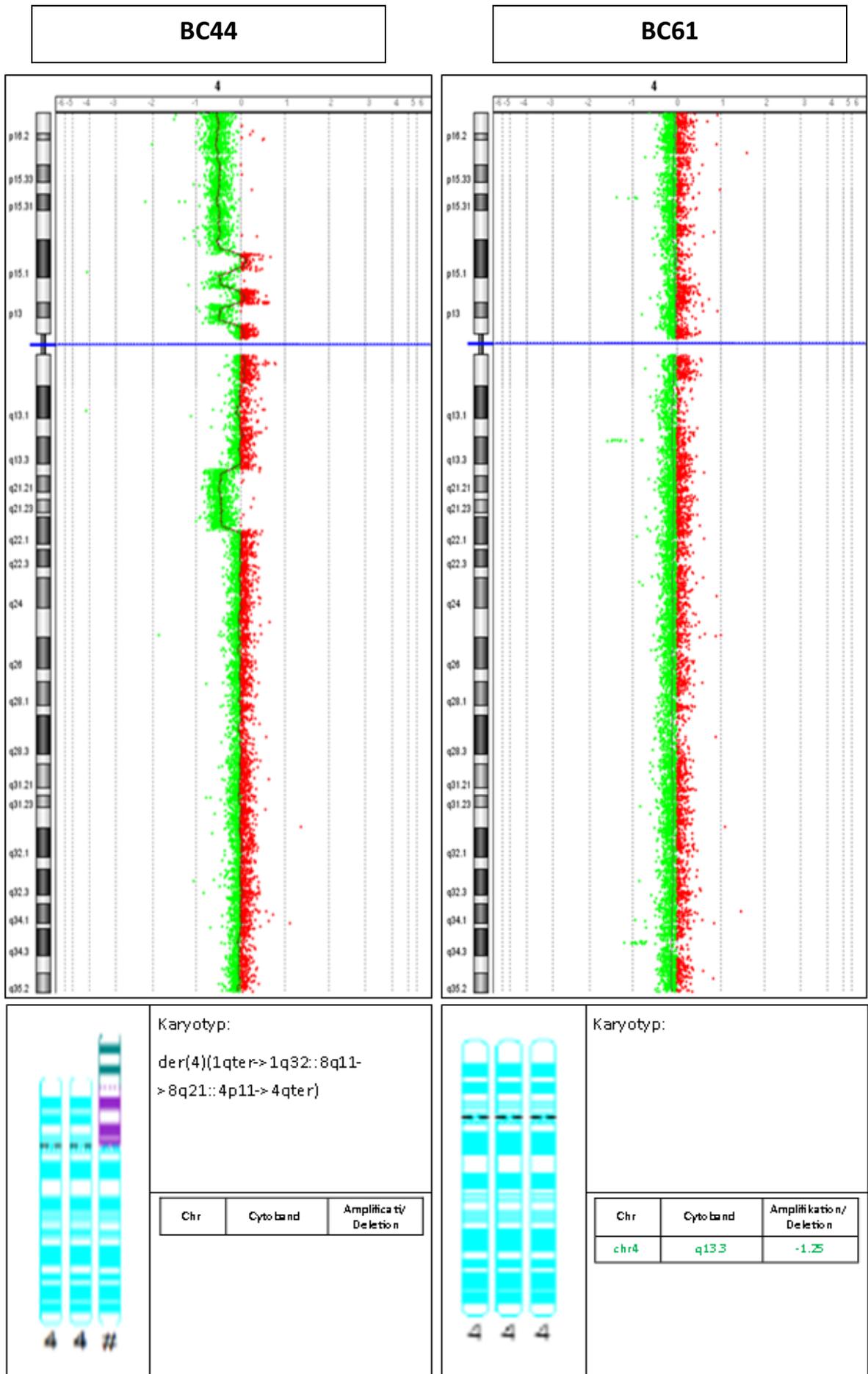
Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
chr3	p12.3	-3,62



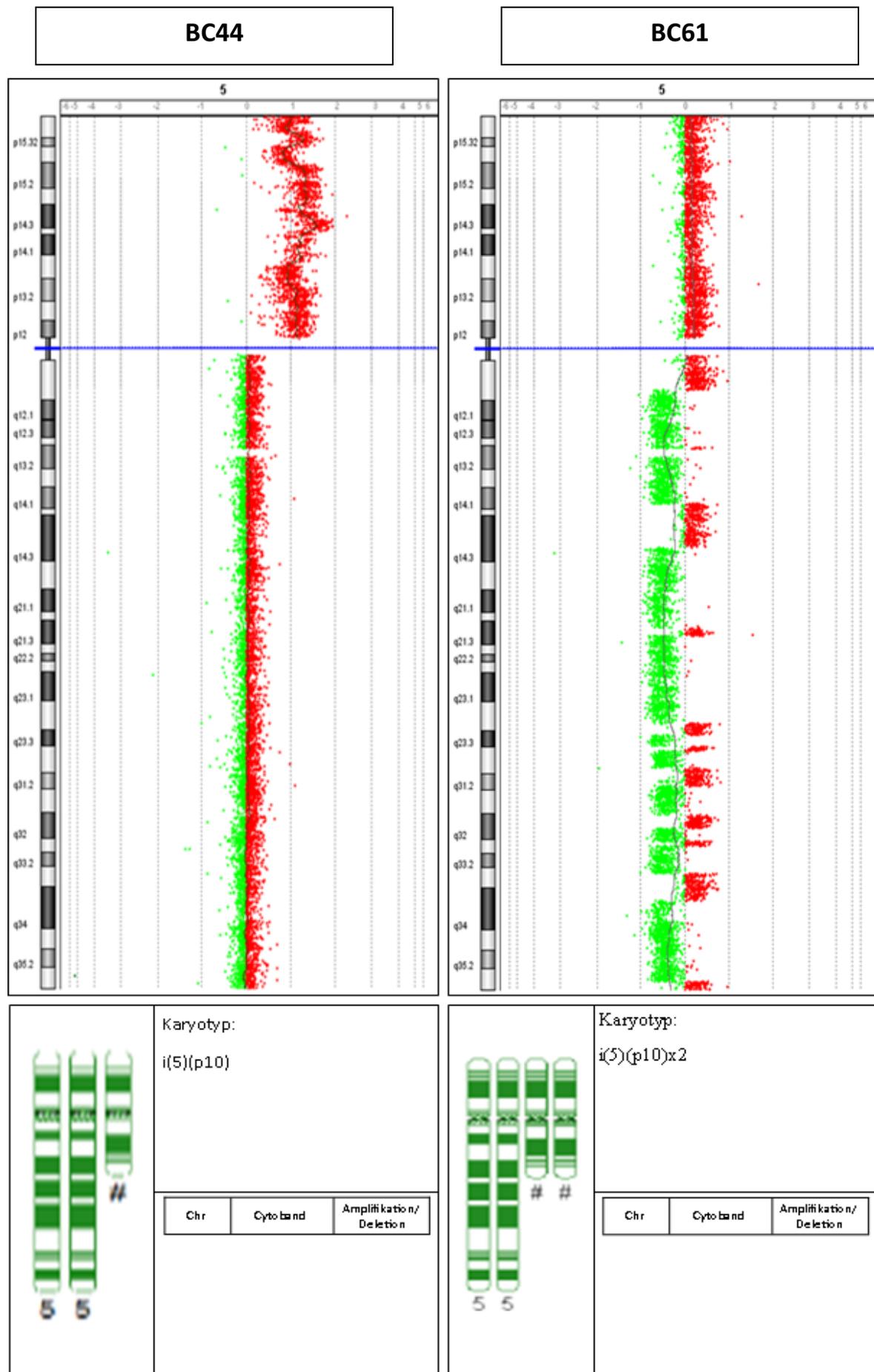
Karyotyp:

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
chr3	q13.31	-1,09

**Abbildung 18: Chromosom3 BC44 und BC61**  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



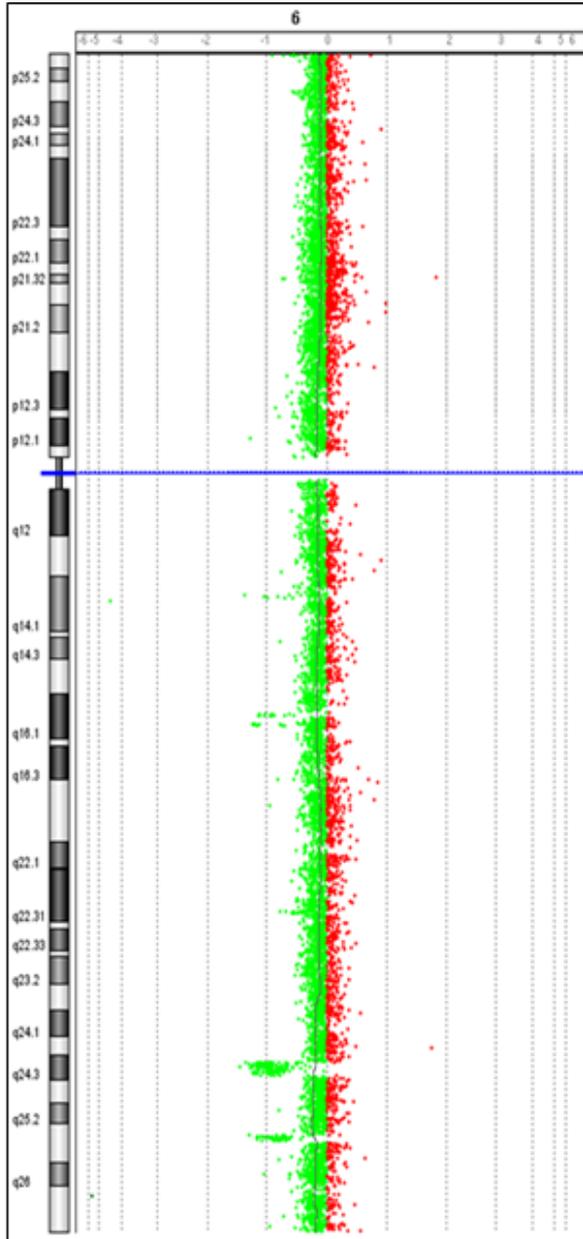
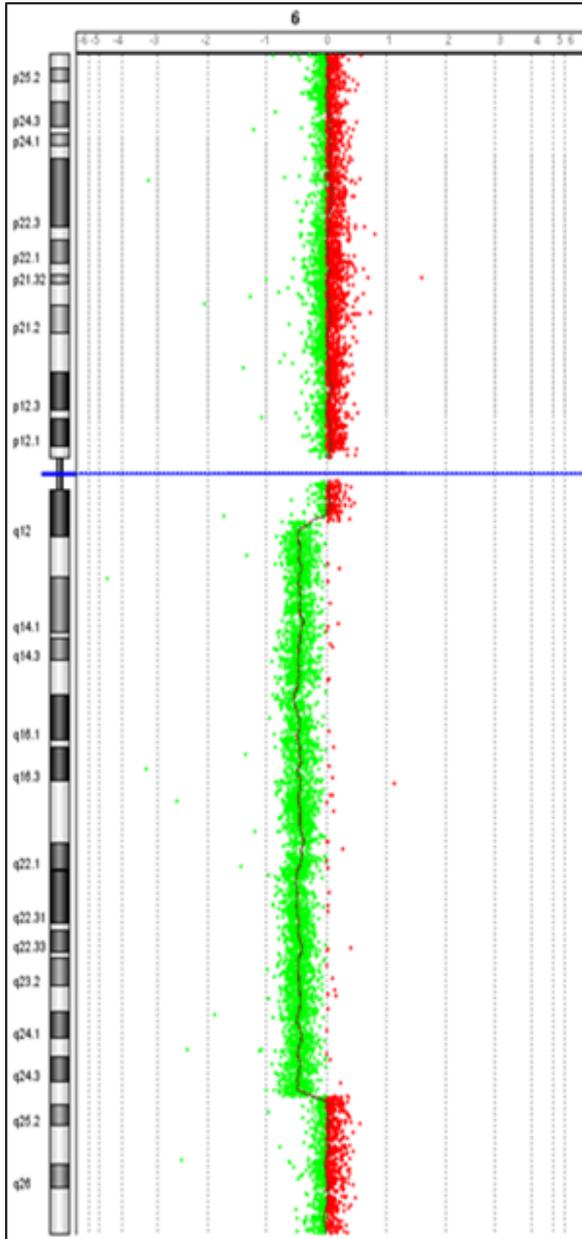
**Abbildung 19: Chromosom4 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 20: Chromosom5 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

**BC61**



Karyotyp:  
 $der(6)(6q13 \rightarrow 6p22::6p12 \rightarrow 6p22:)$

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
-----	-----------	----------------------------



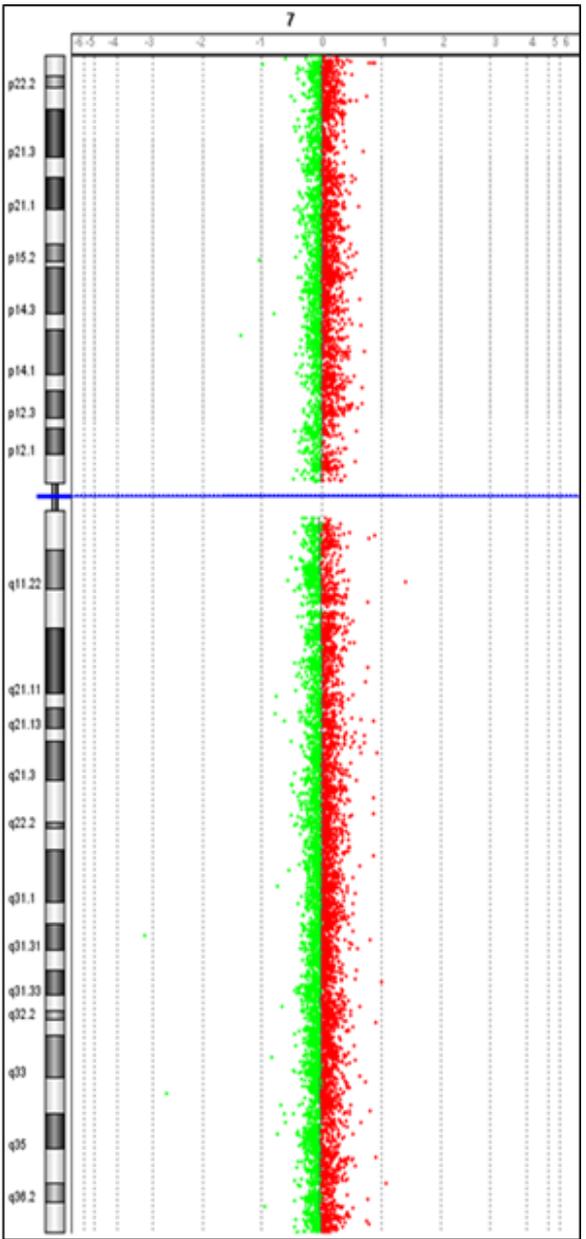
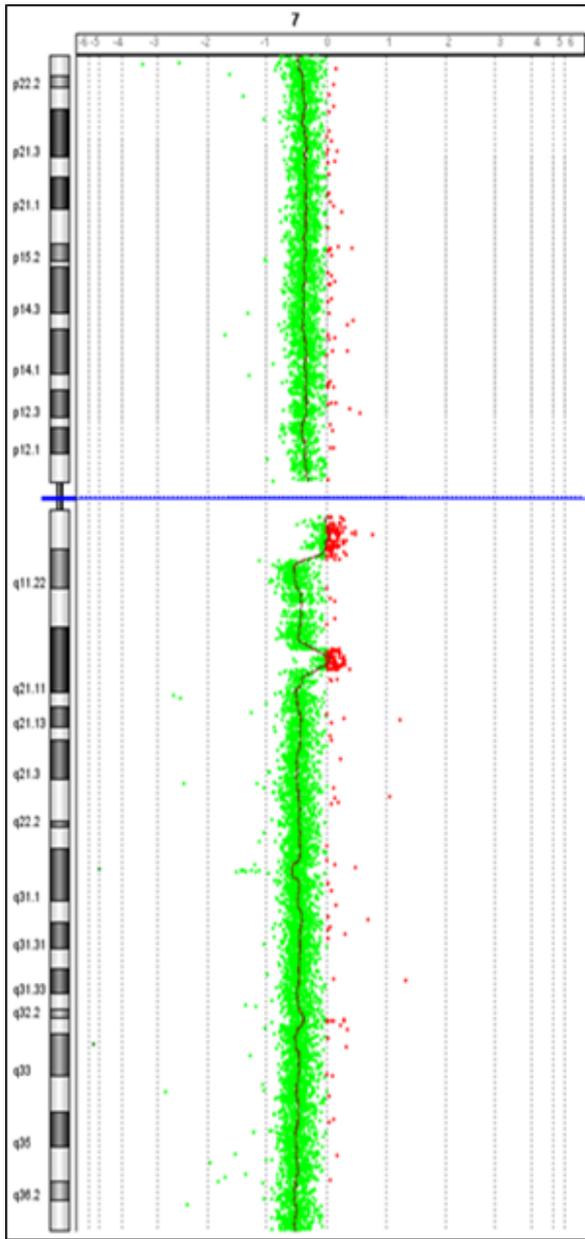
Karyotyp:  
 -6

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
-----	-----------	----------------------------

**Abbildung 21: Chromosom6 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

**BC61**



Karyotyp:  
del(7)(q11)x2,+7

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
chr7	q31.1	-1,29



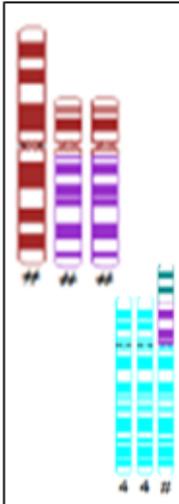
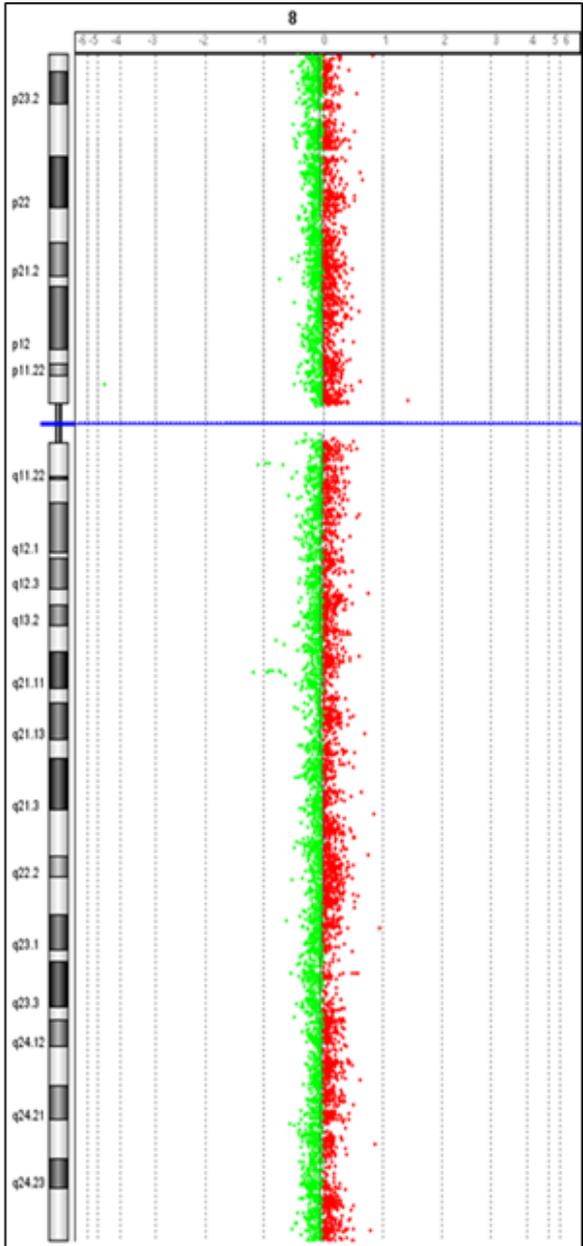
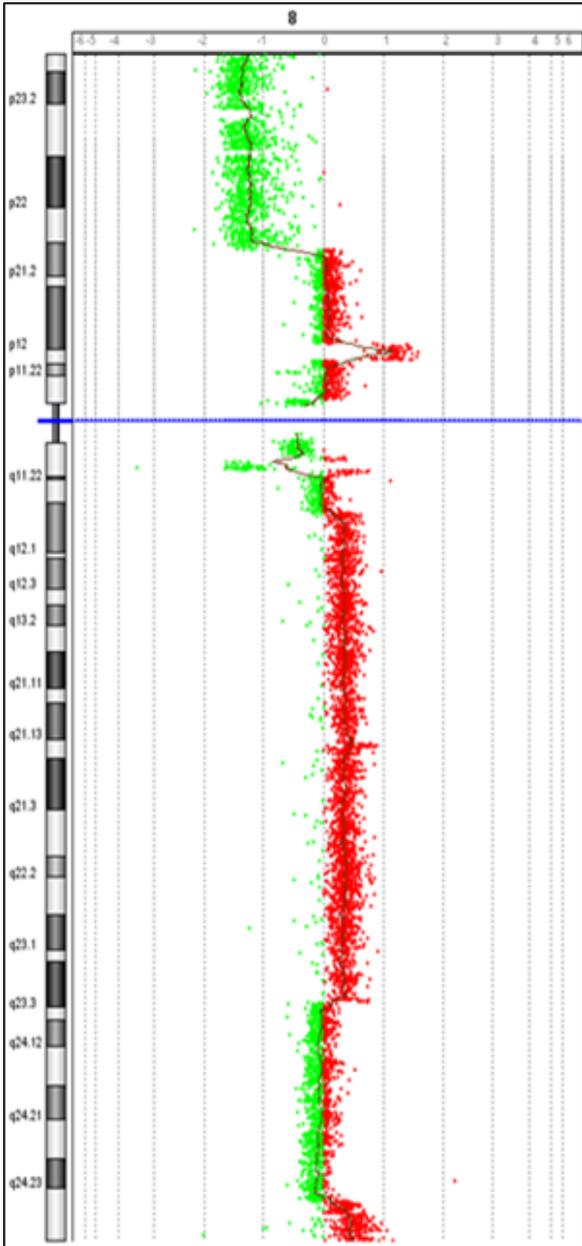
Karyotyp:

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
-----	-----------	----------------------------

**Abbildung 22: Chromosom7 BC44 und BC61**  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

**BC61**



Karyotyp:  
-8x3, Verteilt auf Chr, 10  
und 4

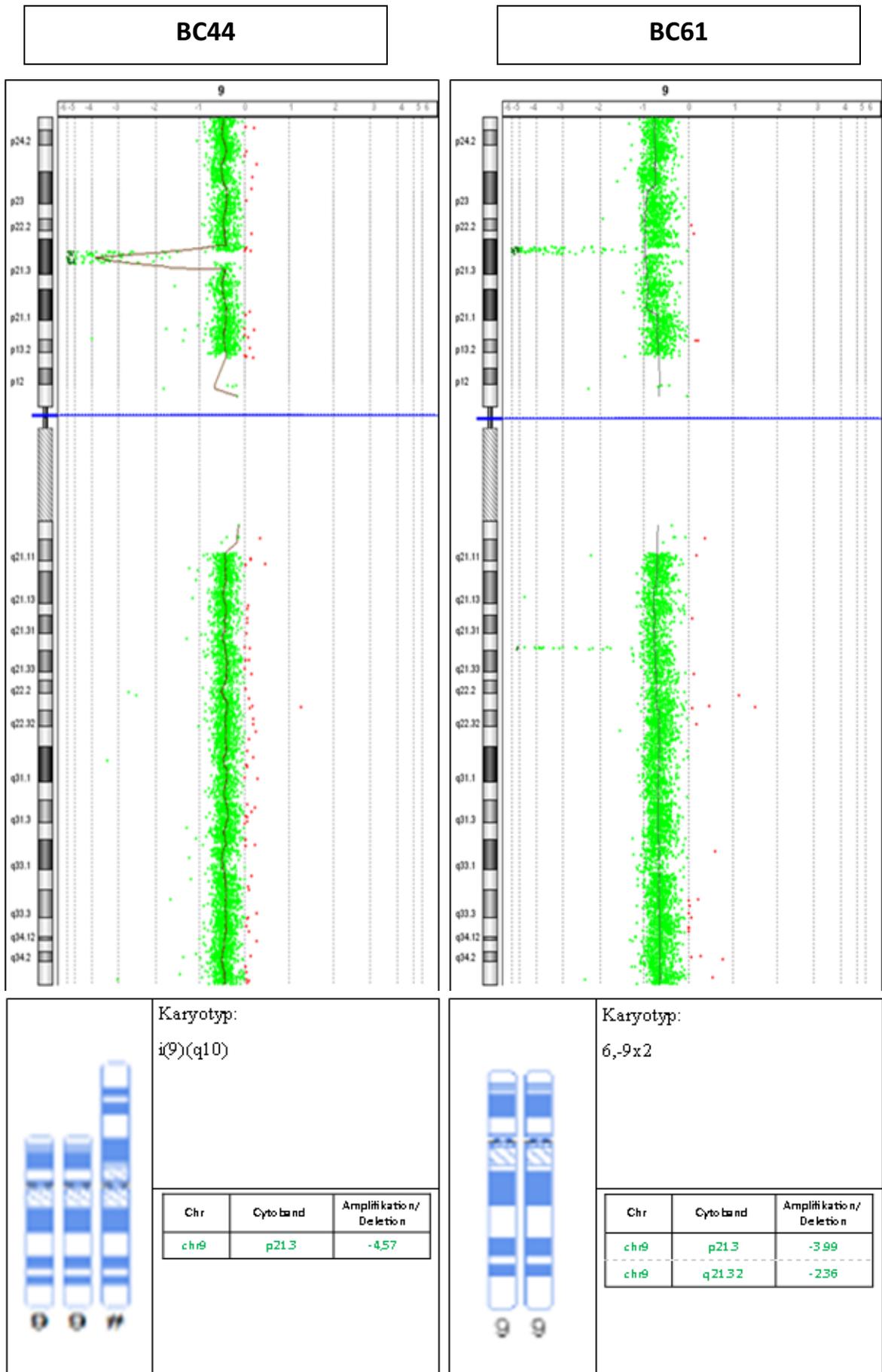
Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
chr8	p23.3-p23.2	-1,33
chr8	q11.21	-1,32



Karyotyp:

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
-----	-----------	----------------------------

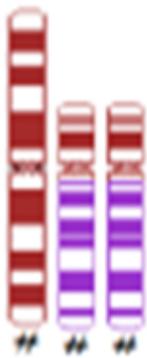
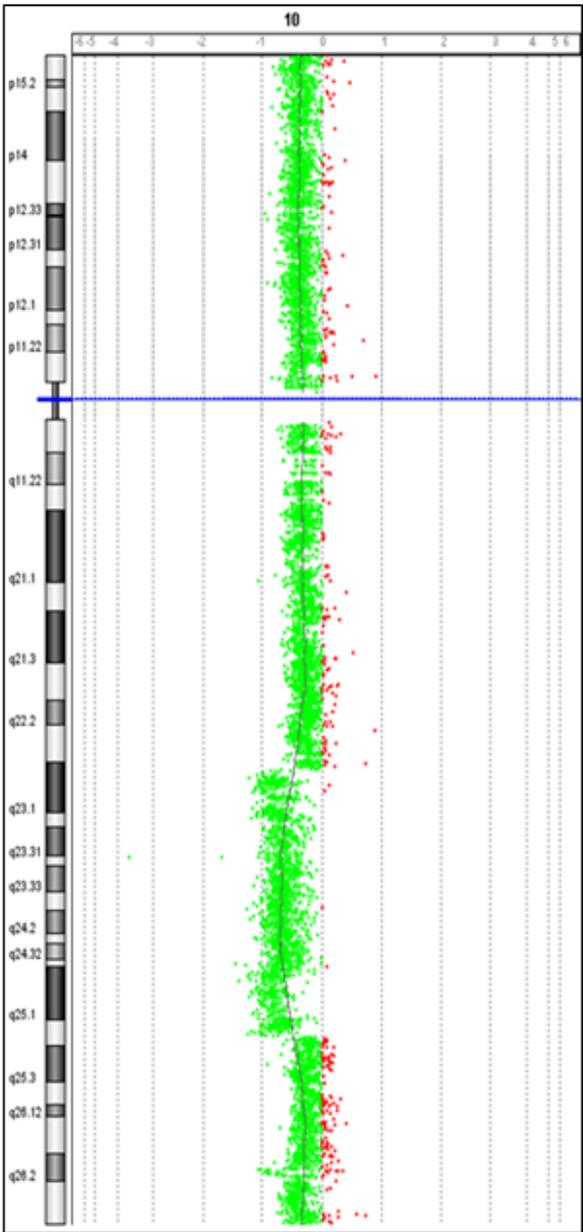
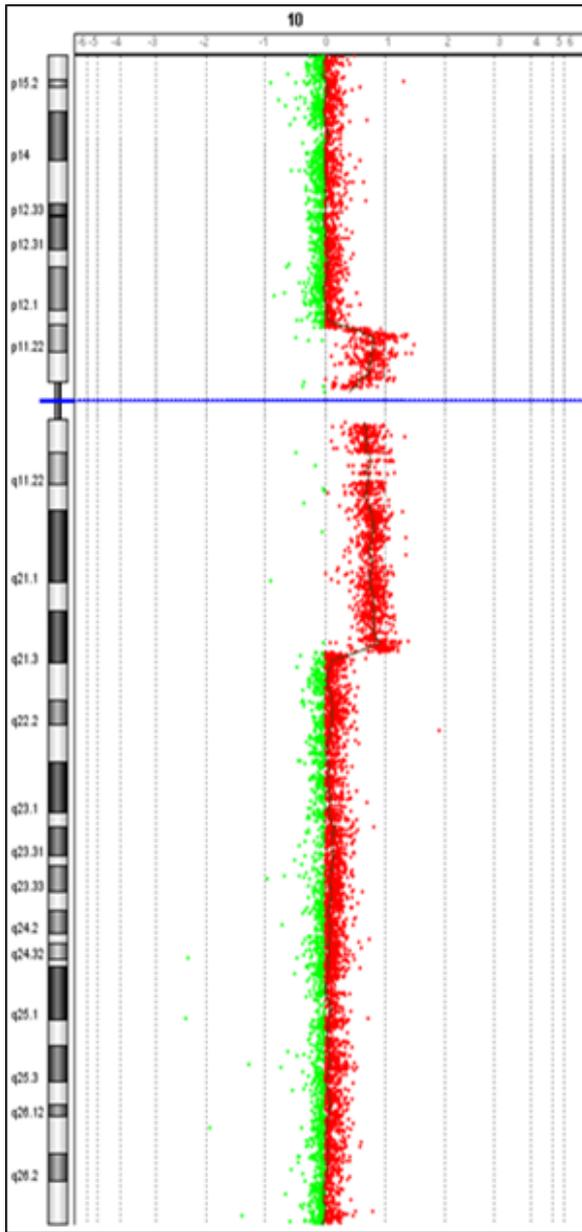
**Abbildung 23: Chromosom8 BC44 und BC61**  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 24:** Chromosom9 BC44 und BC61  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

**BC61**



Karyotyp:  
 +der(10)t(8;10)  
 (q11;q11),  
 dic(3;10)(q10;q10)x2,  
 i(10)(q10)

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
-----	-----------	----------------------------



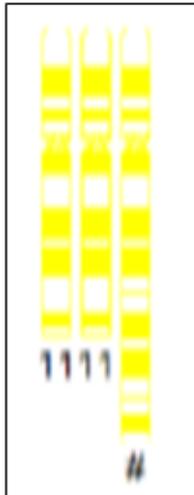
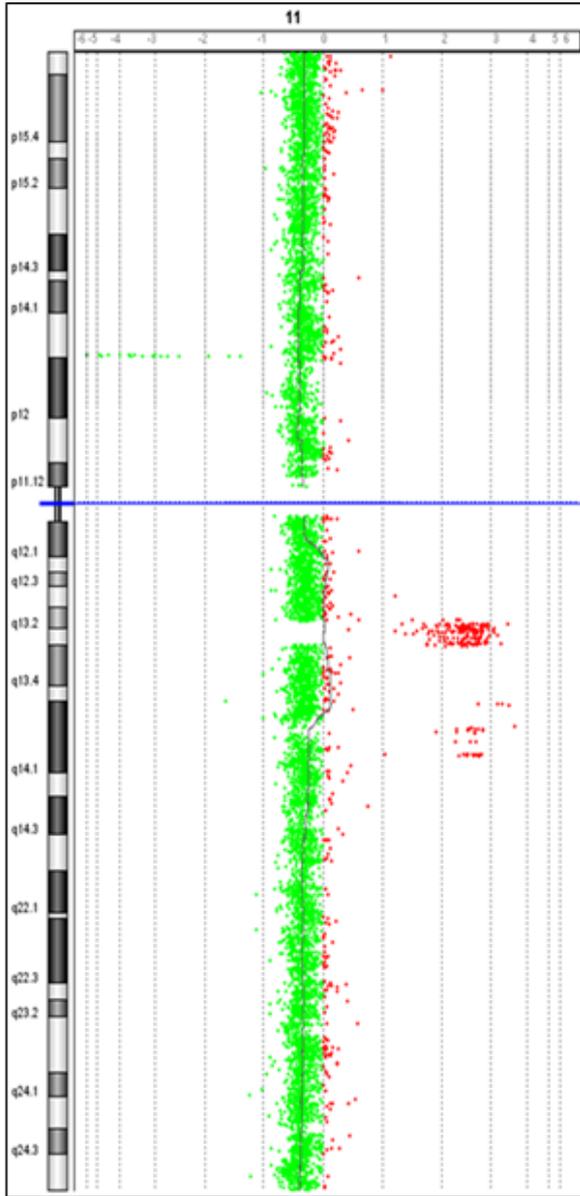
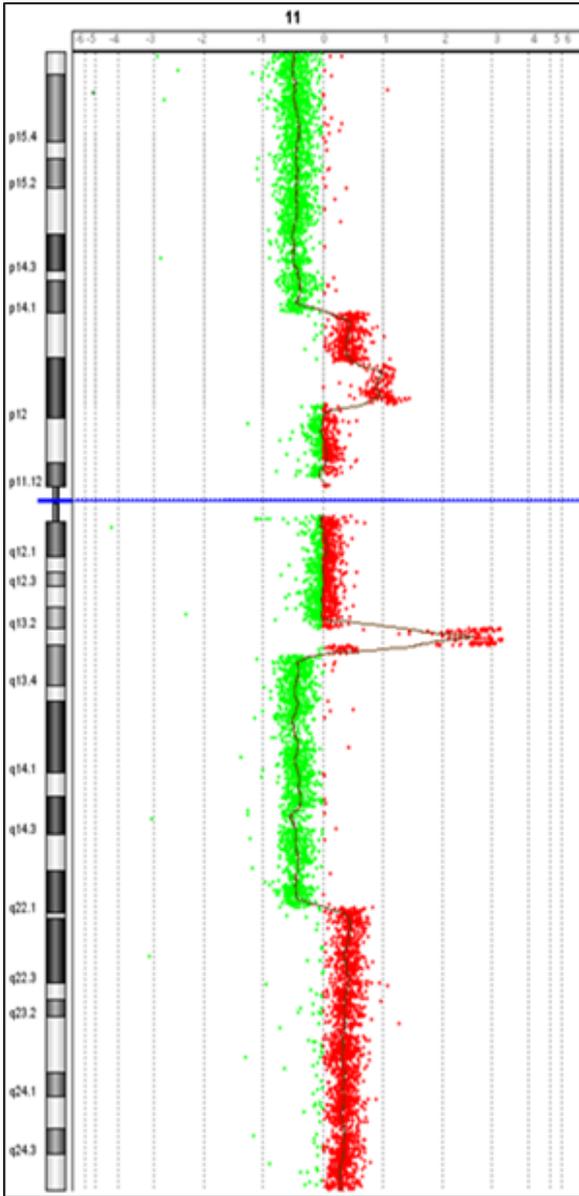
Karyotyp:  
 del(10)(q21), -10

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
-----	-----------	----------------------------

**Abbildung 25: Chromosom10 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

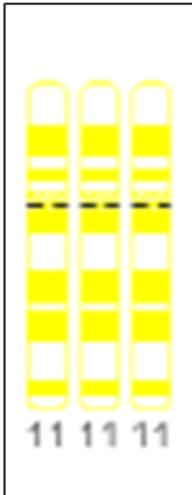
**BC44**

**BC61**



Karyotyp:  
dup(11)(q23q13)

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
chr11	q13.2-q13.3	251



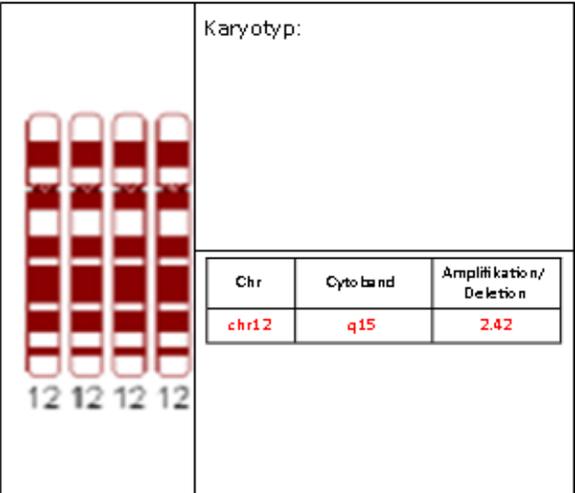
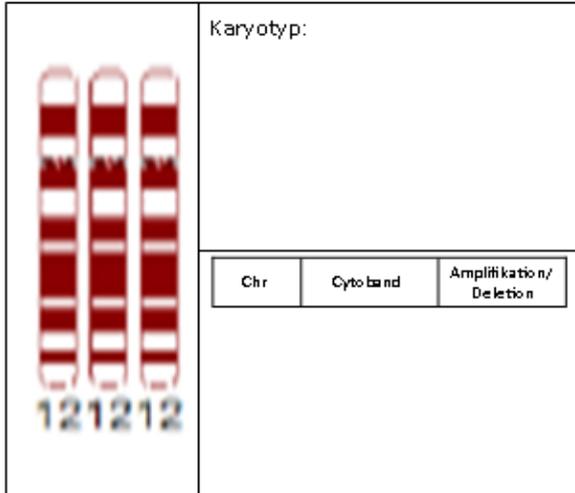
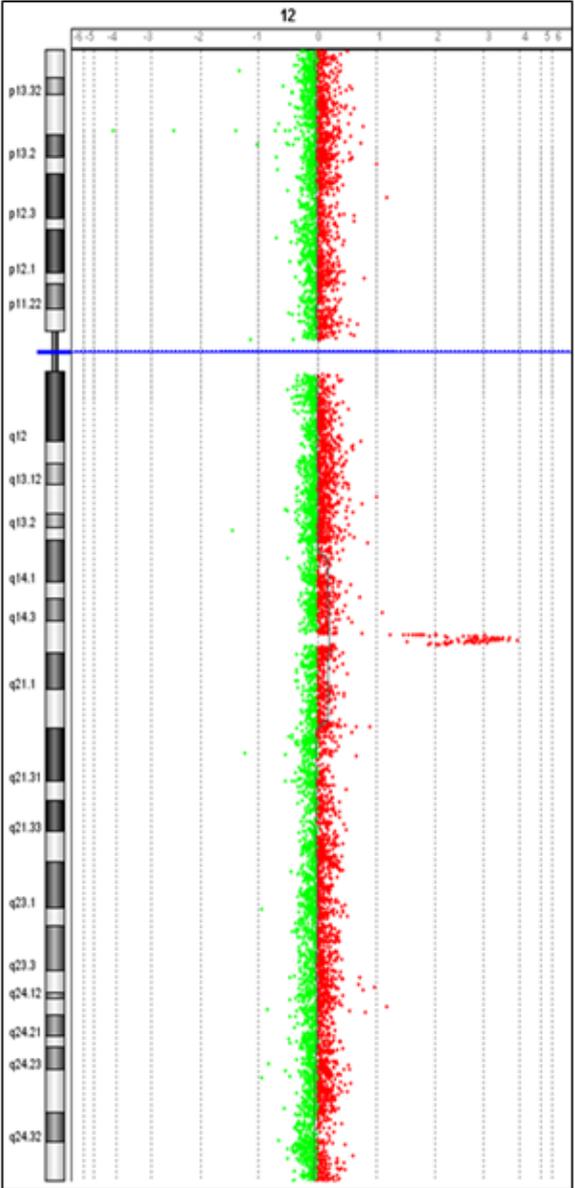
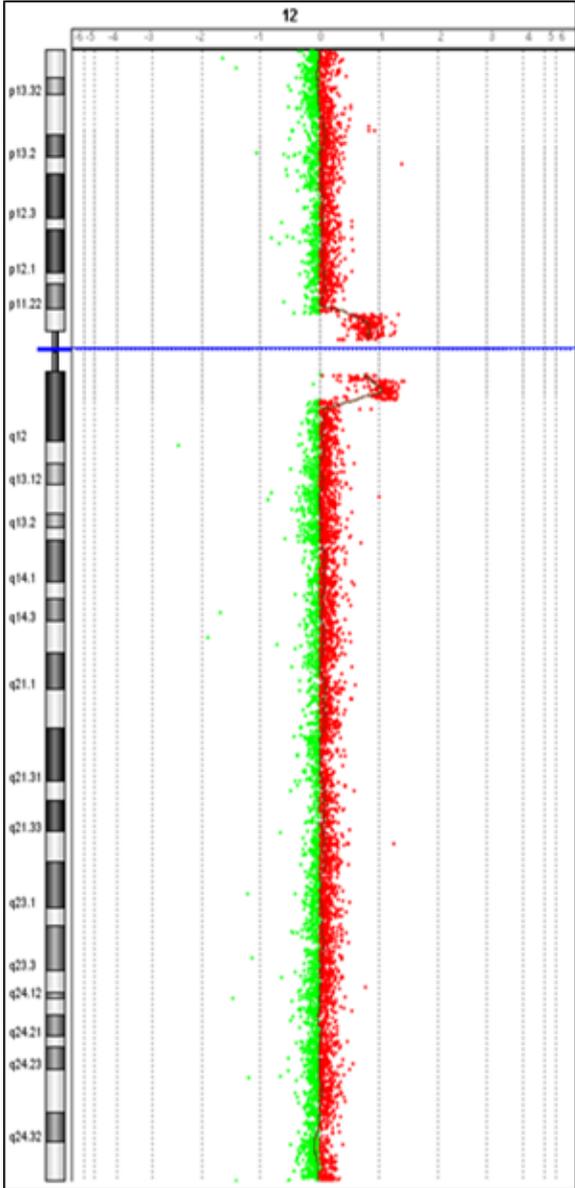
Karyotyp:  
-11

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion
chr11	q13.2-13.3	233
chr11	q14.1	2.47
chr11	p13	-3.94

**Abbildung 26: Chromosom11 BC44 und BC61**  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

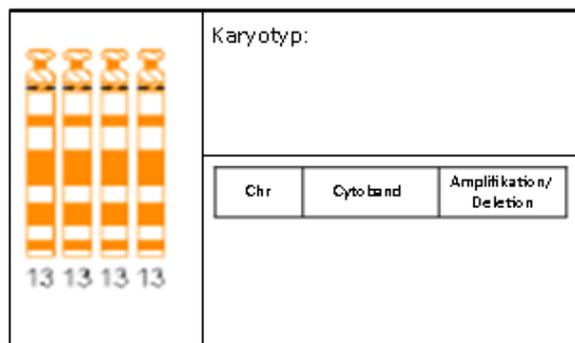
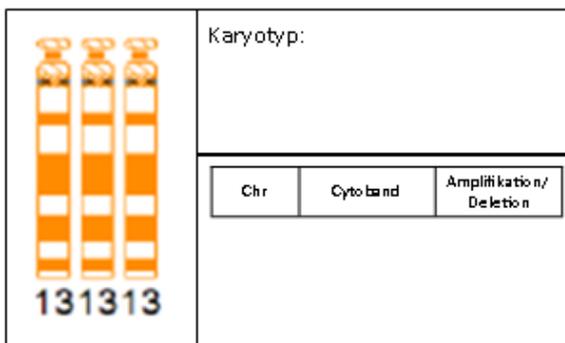
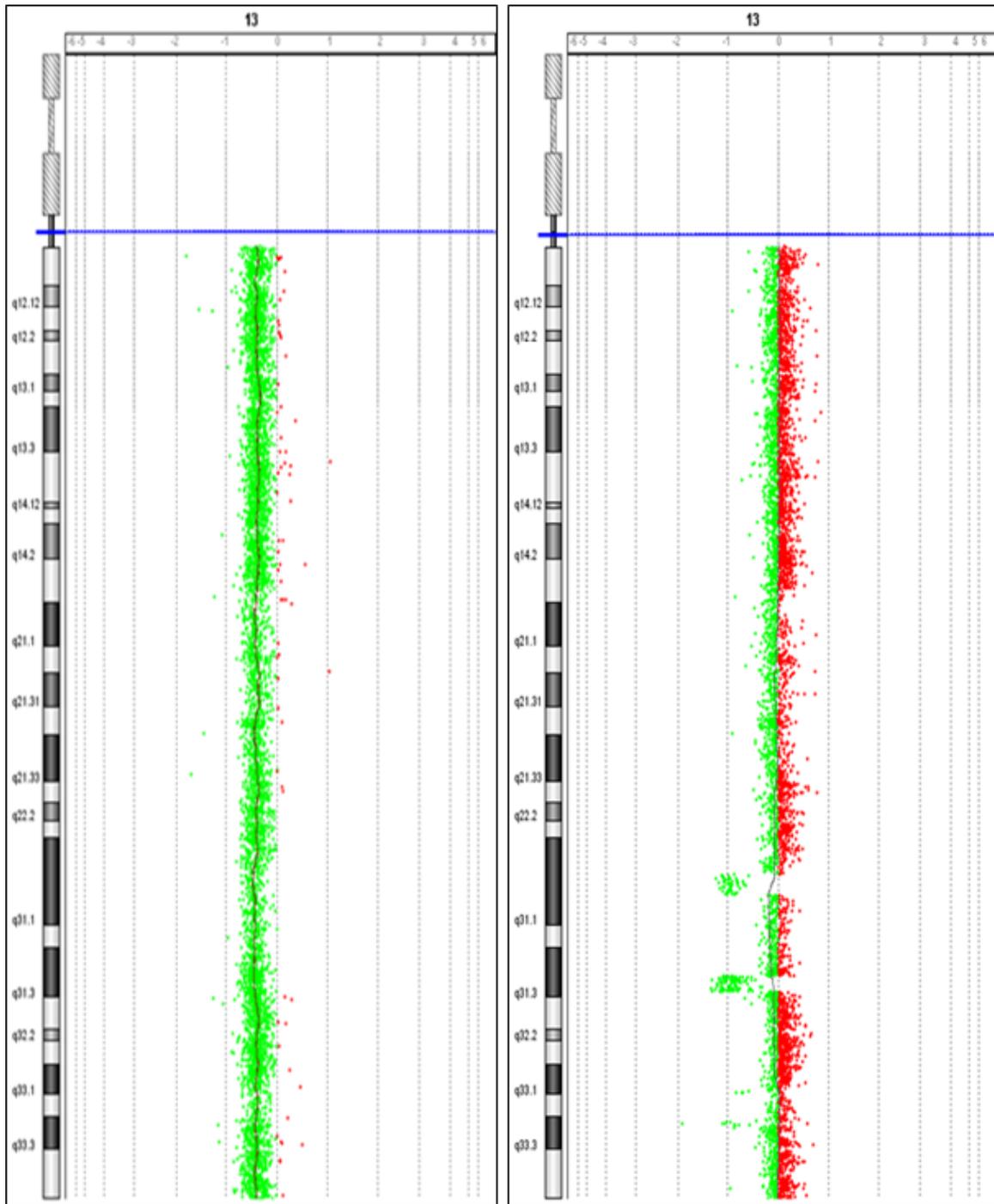
**BC61**



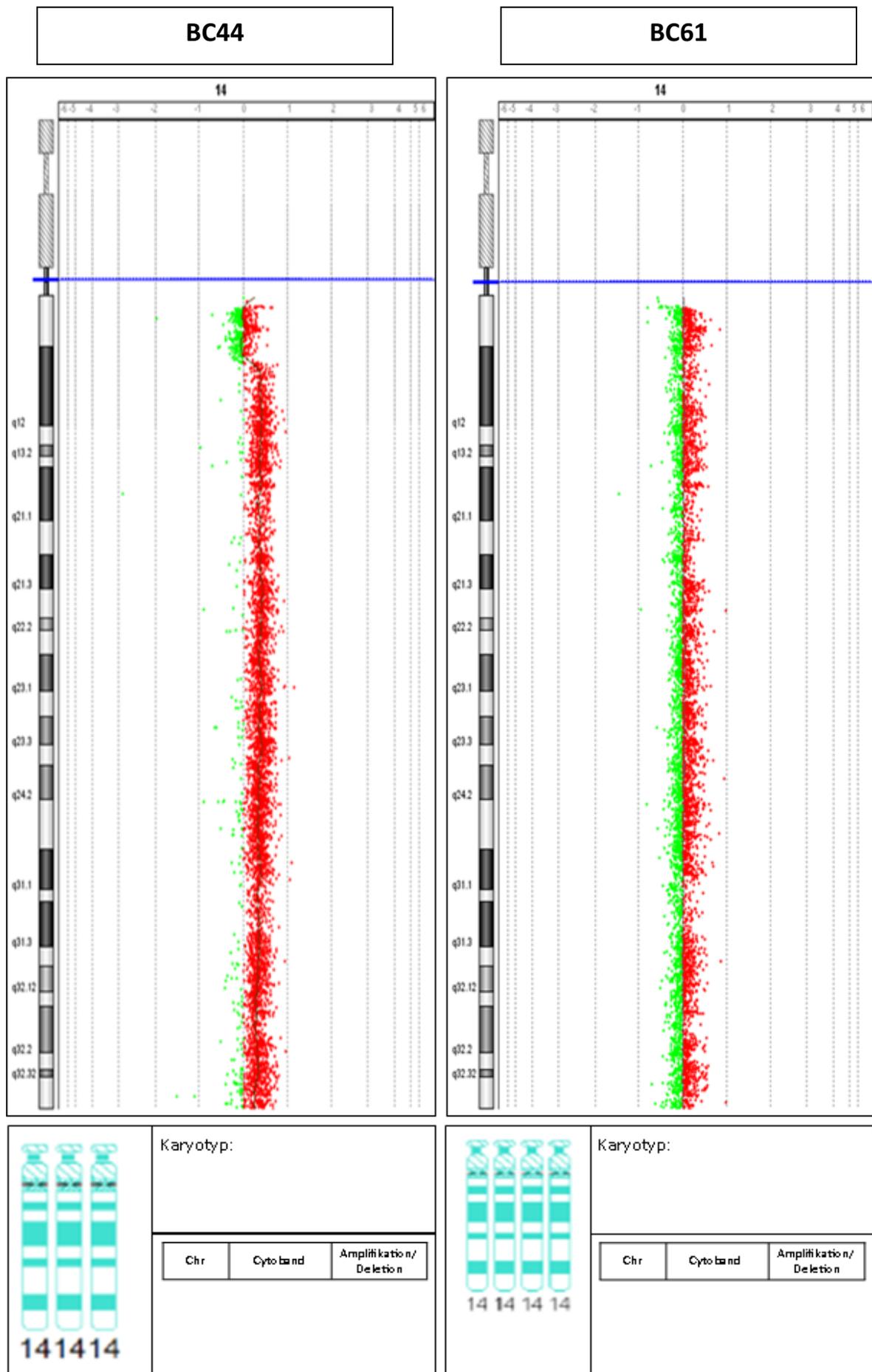
**Abbildung 27: Chromosom12 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

BC44

BC61



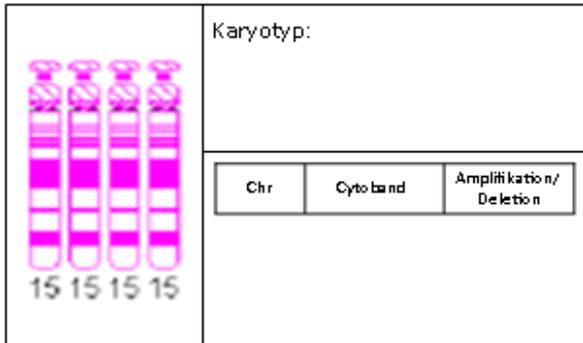
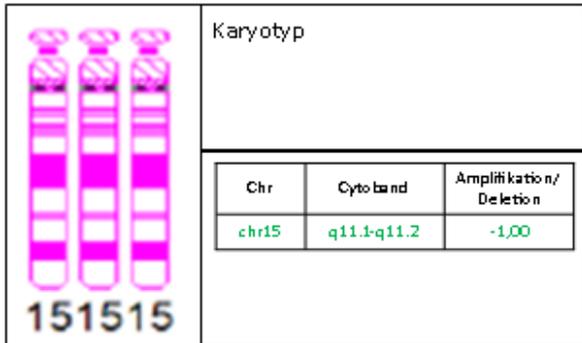
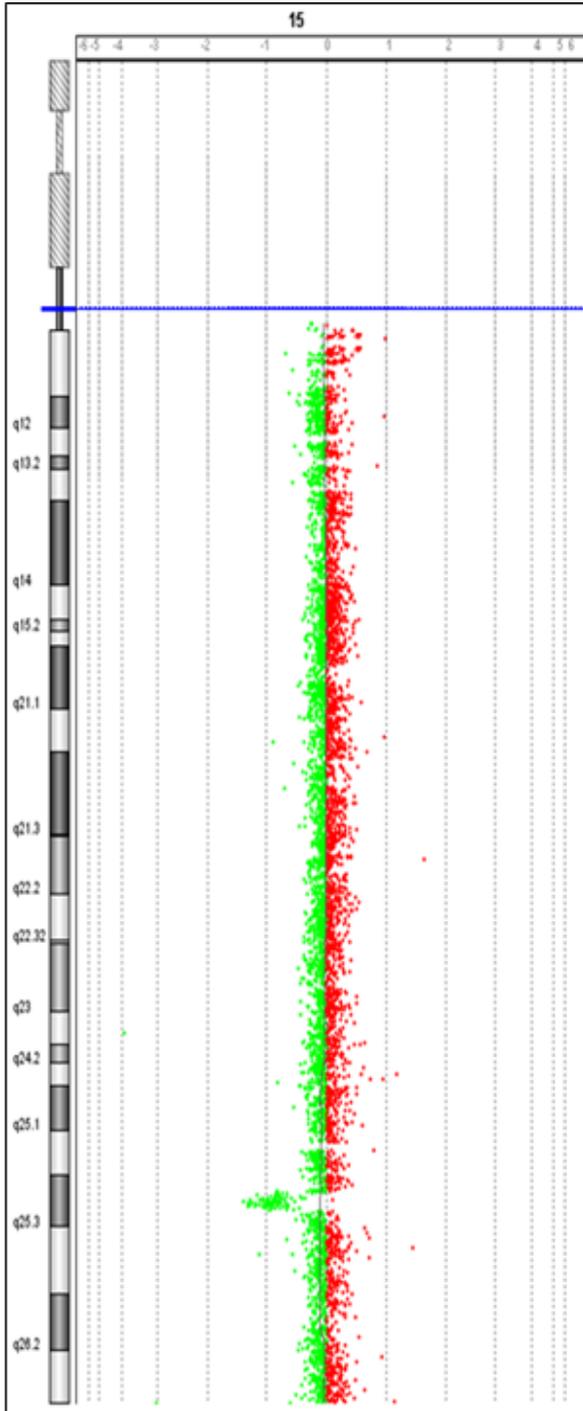
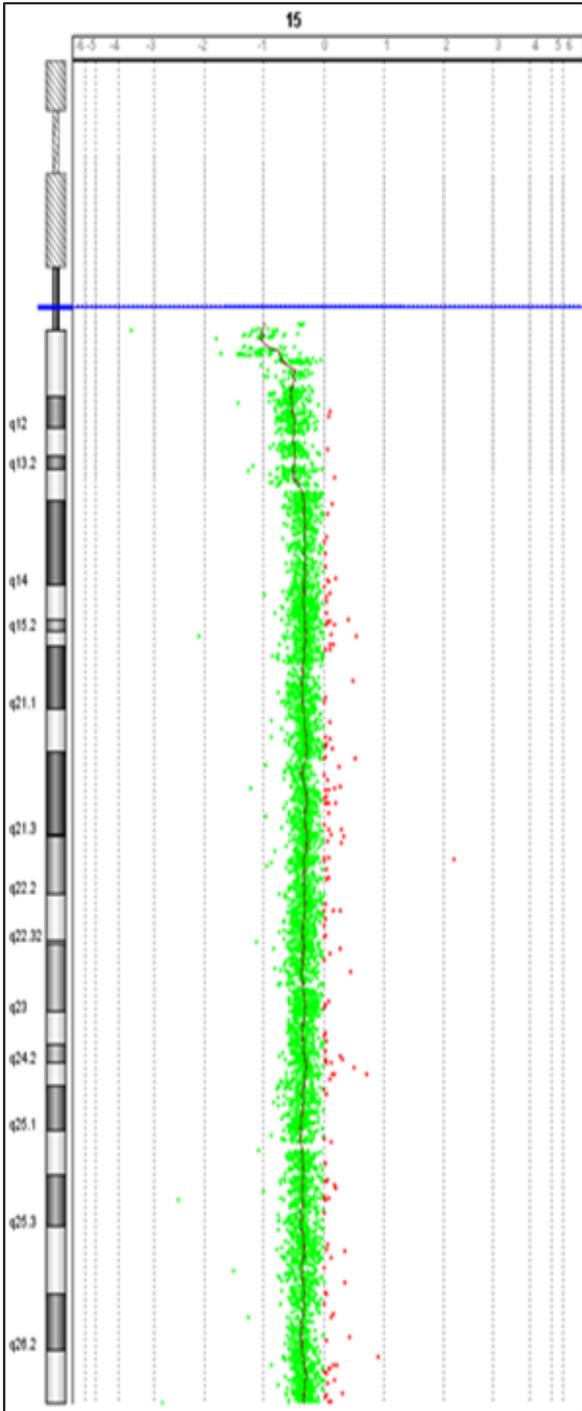
**Abbildung 28:** Chromosom13 BC44 und BC61  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



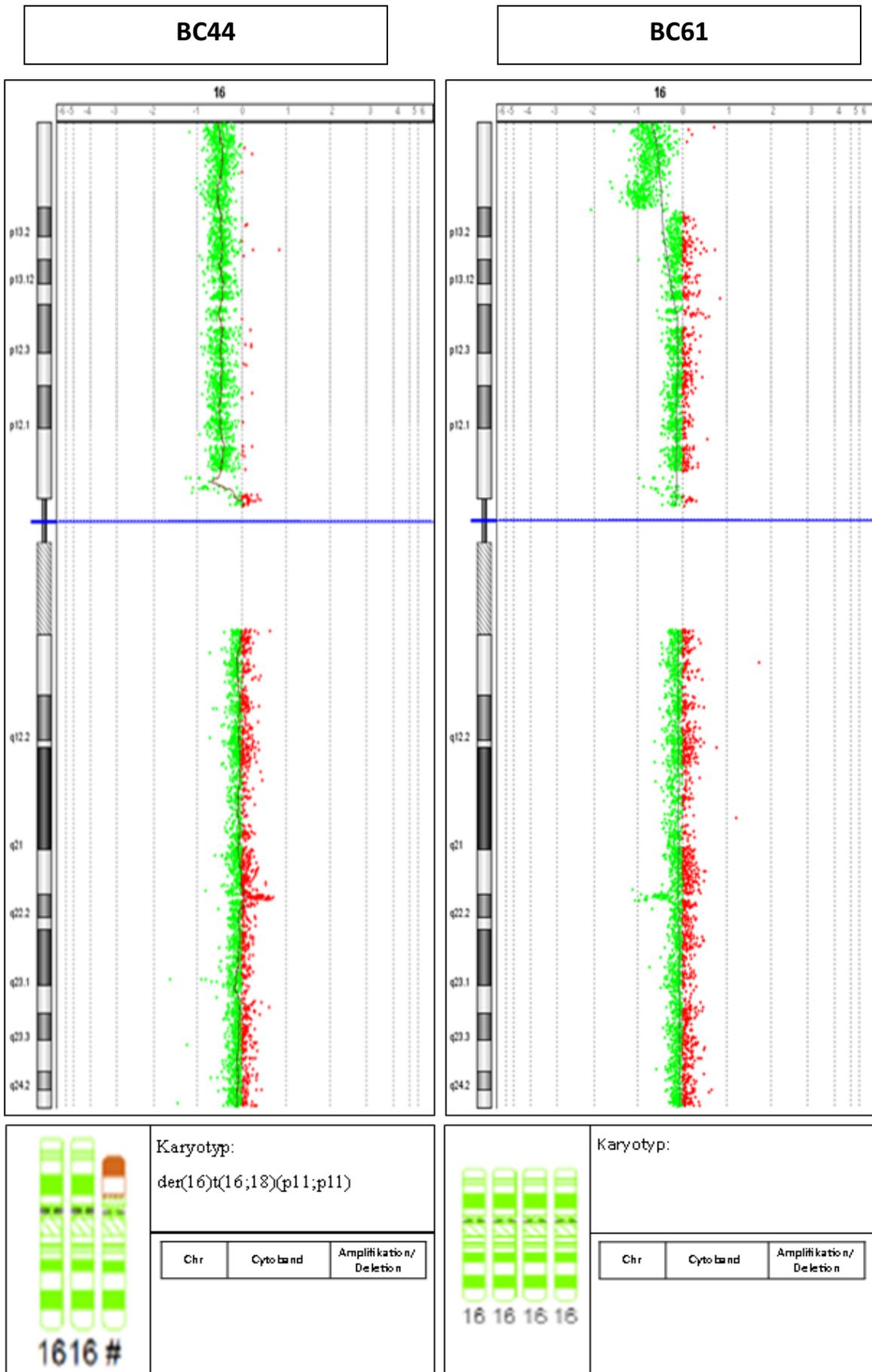
**Abbildung 29: Chromosom14 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

**BC44**

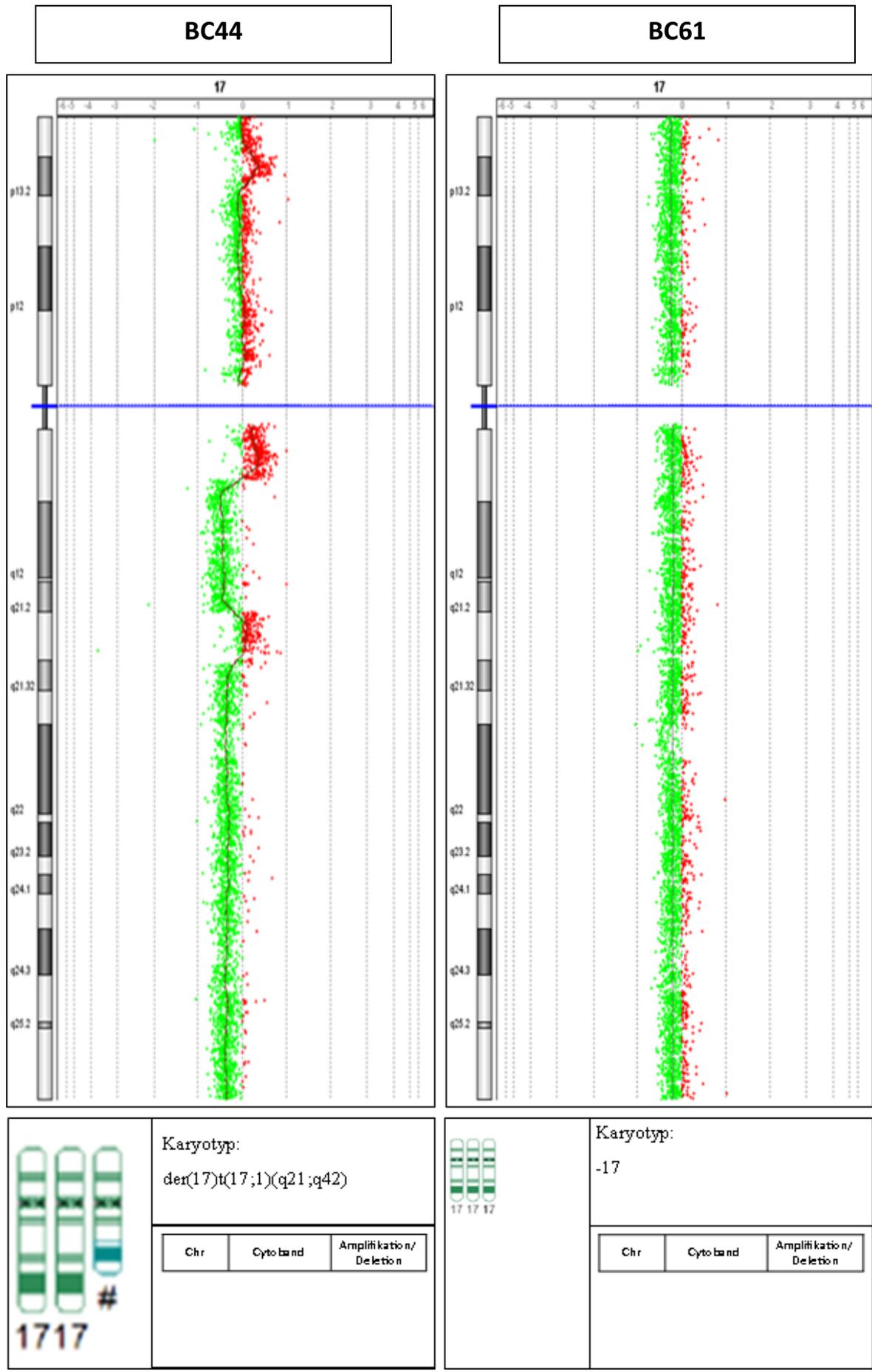
**BC61**



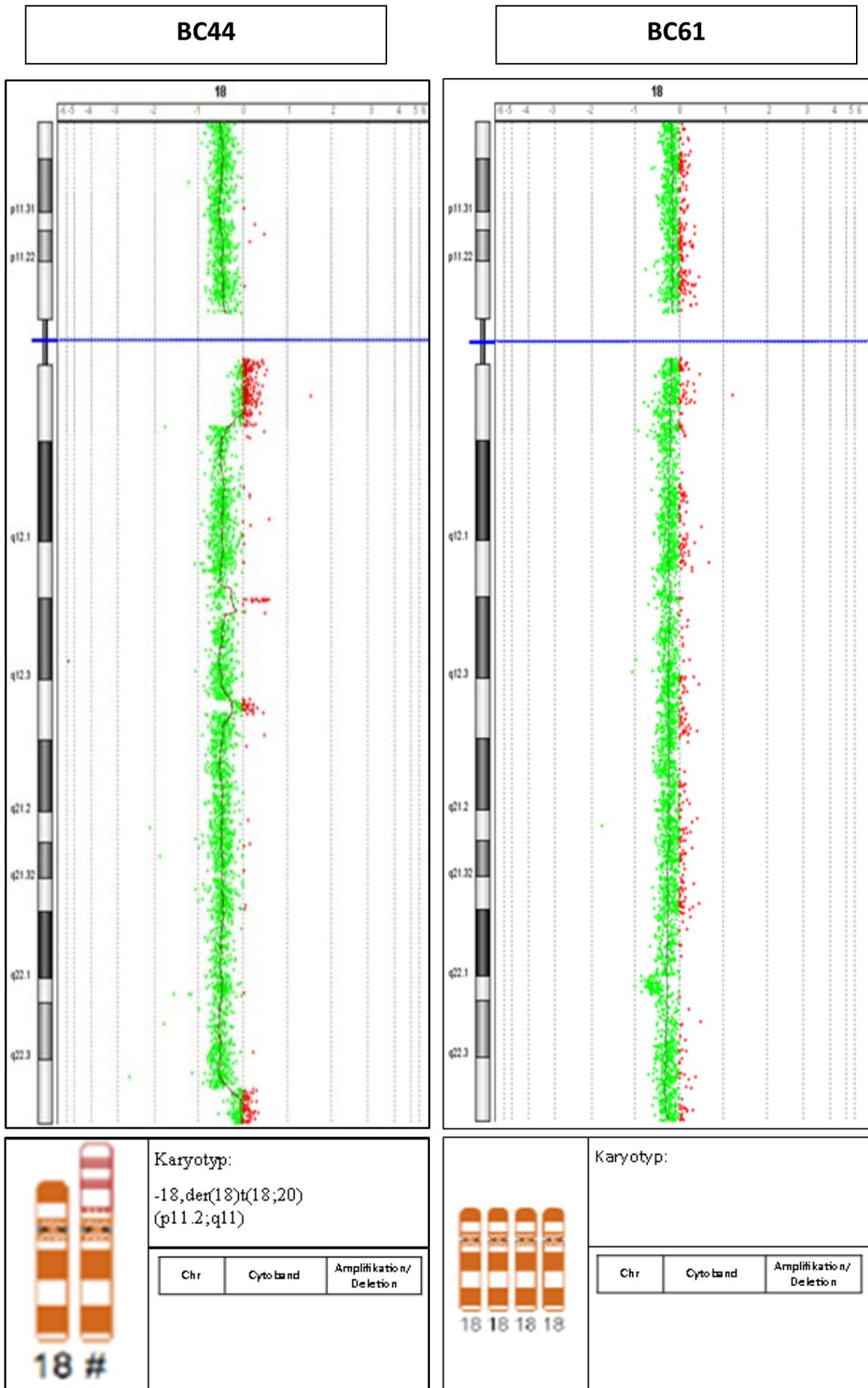
**Abbildung 30 Chromosom15 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



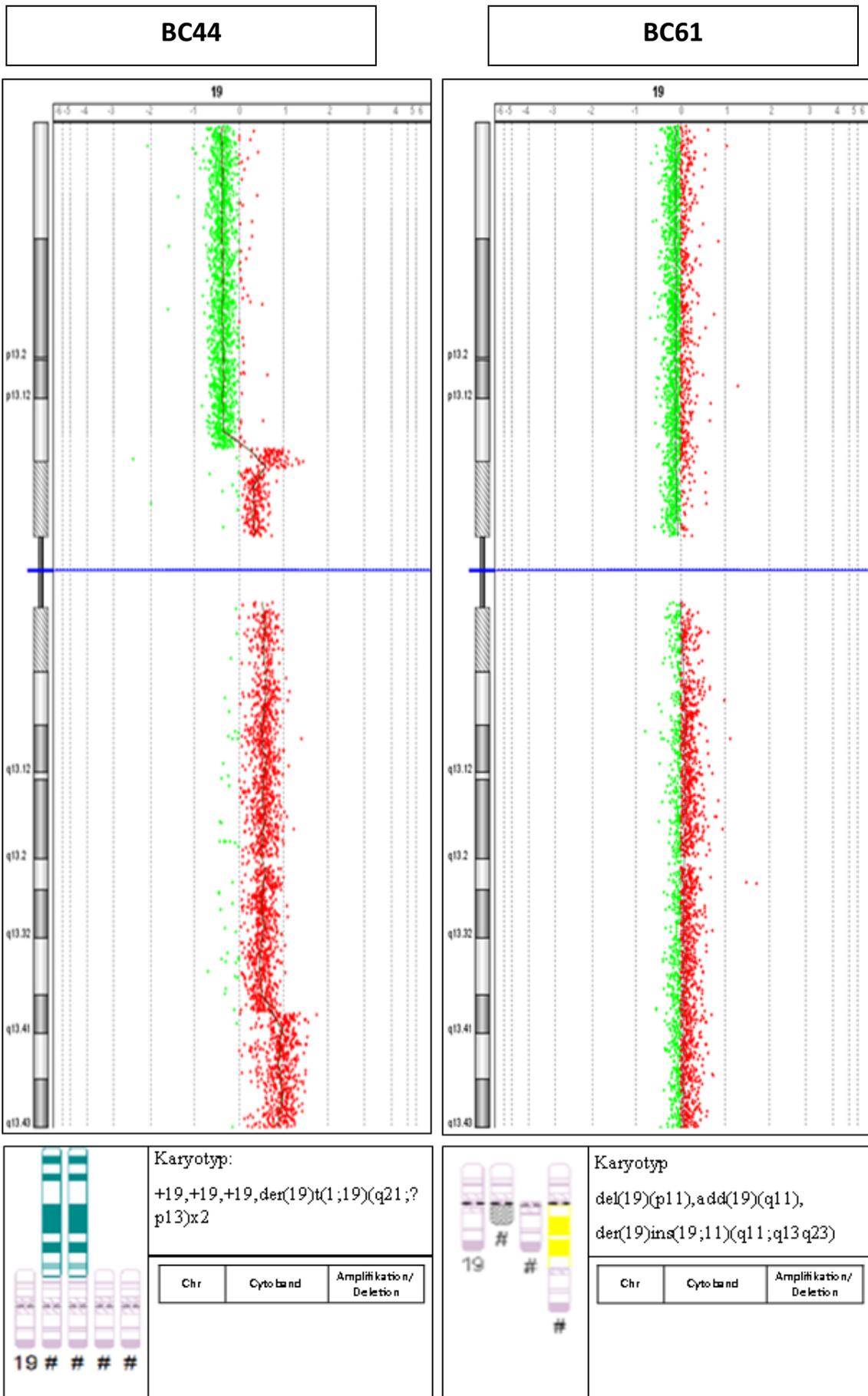
**Abbildung 31: Chromosom16 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 32: Chromosom17 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



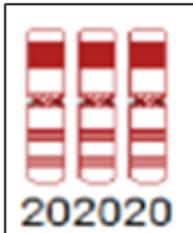
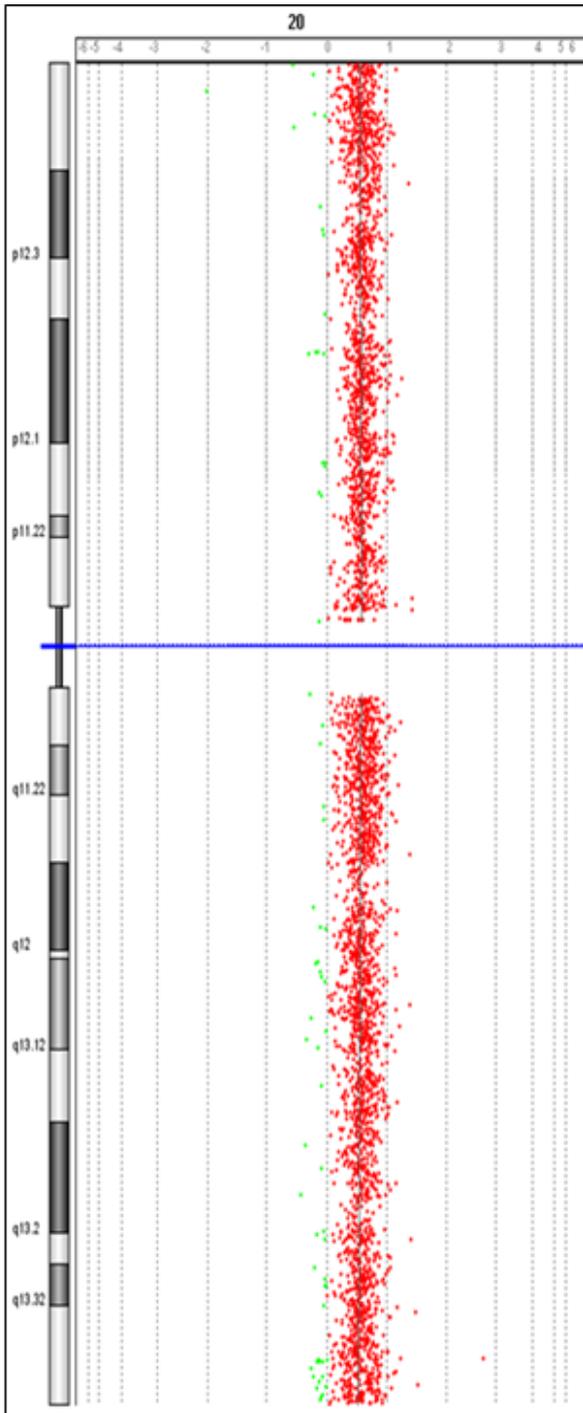
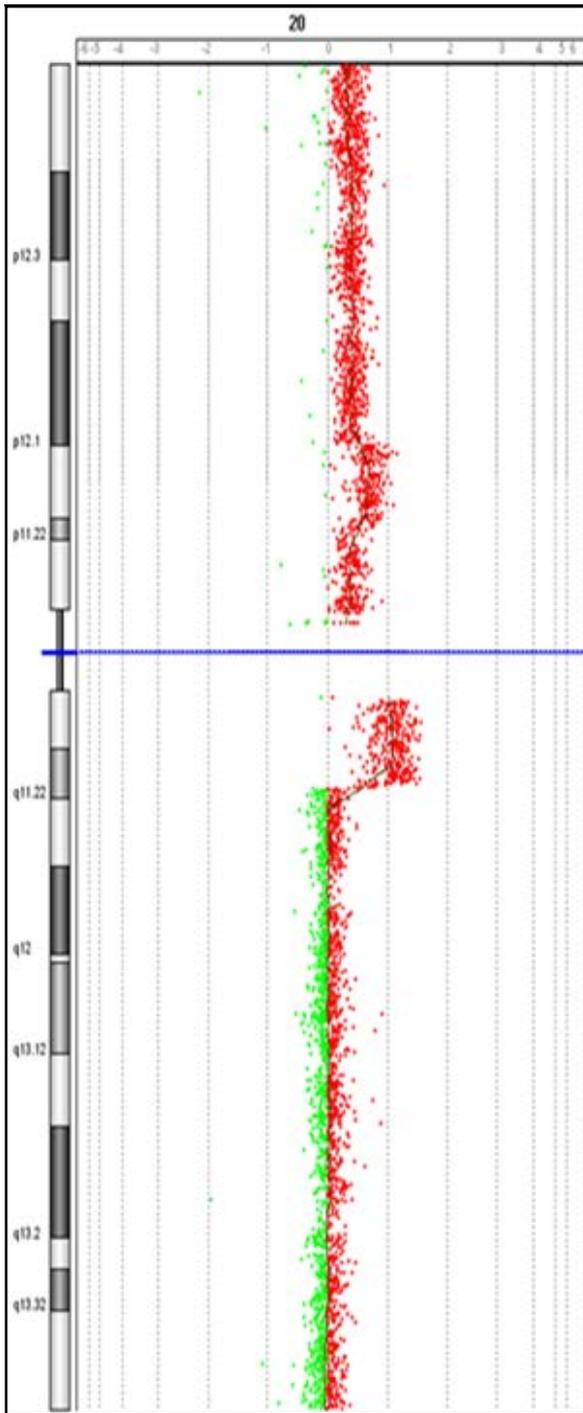
**Abbildung 33: Chromosom18 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 34: Chromosom19 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

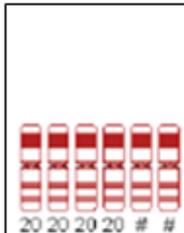
**BC44**

**BC61**



Karyotyp:

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion

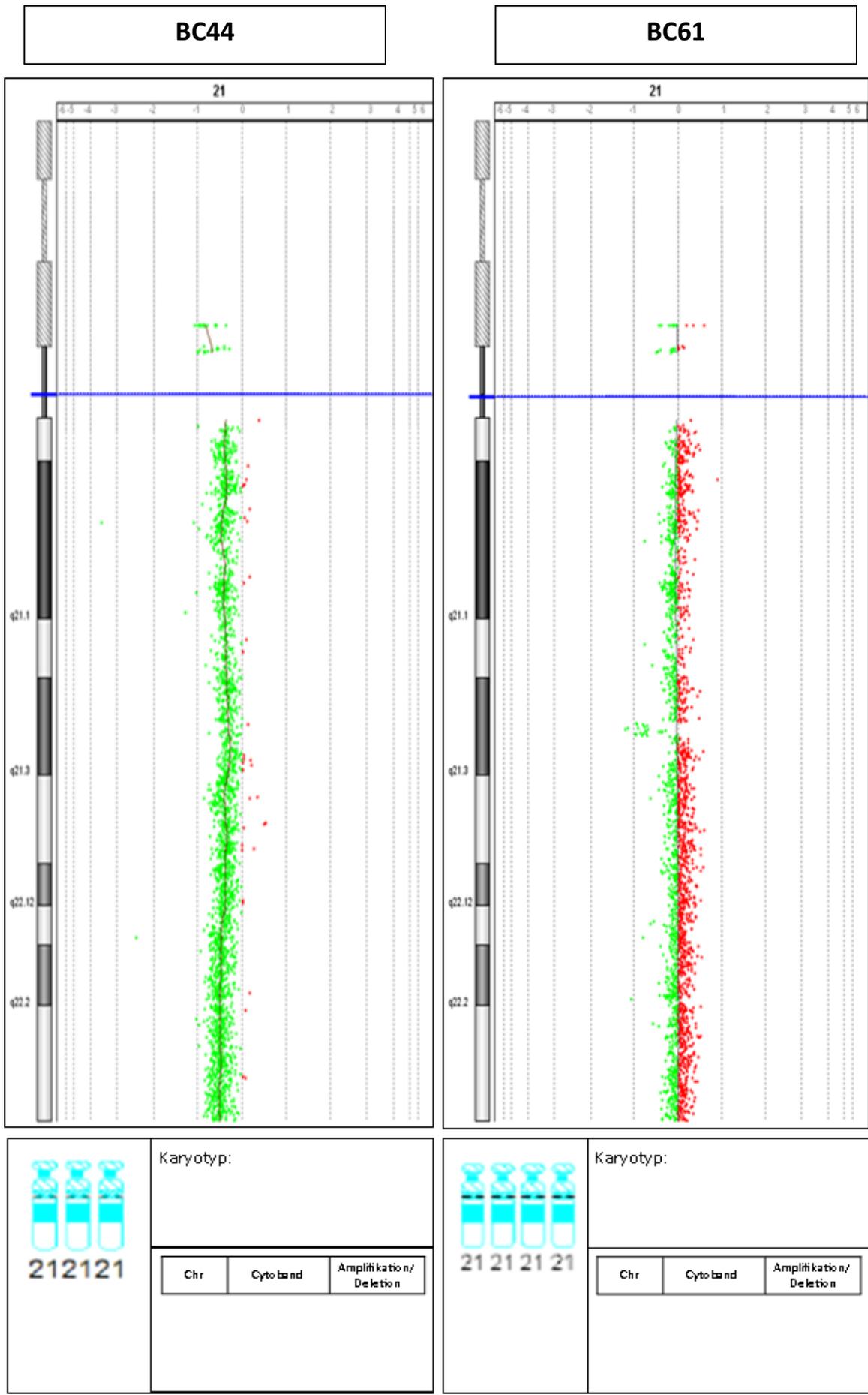


Karyotyp:

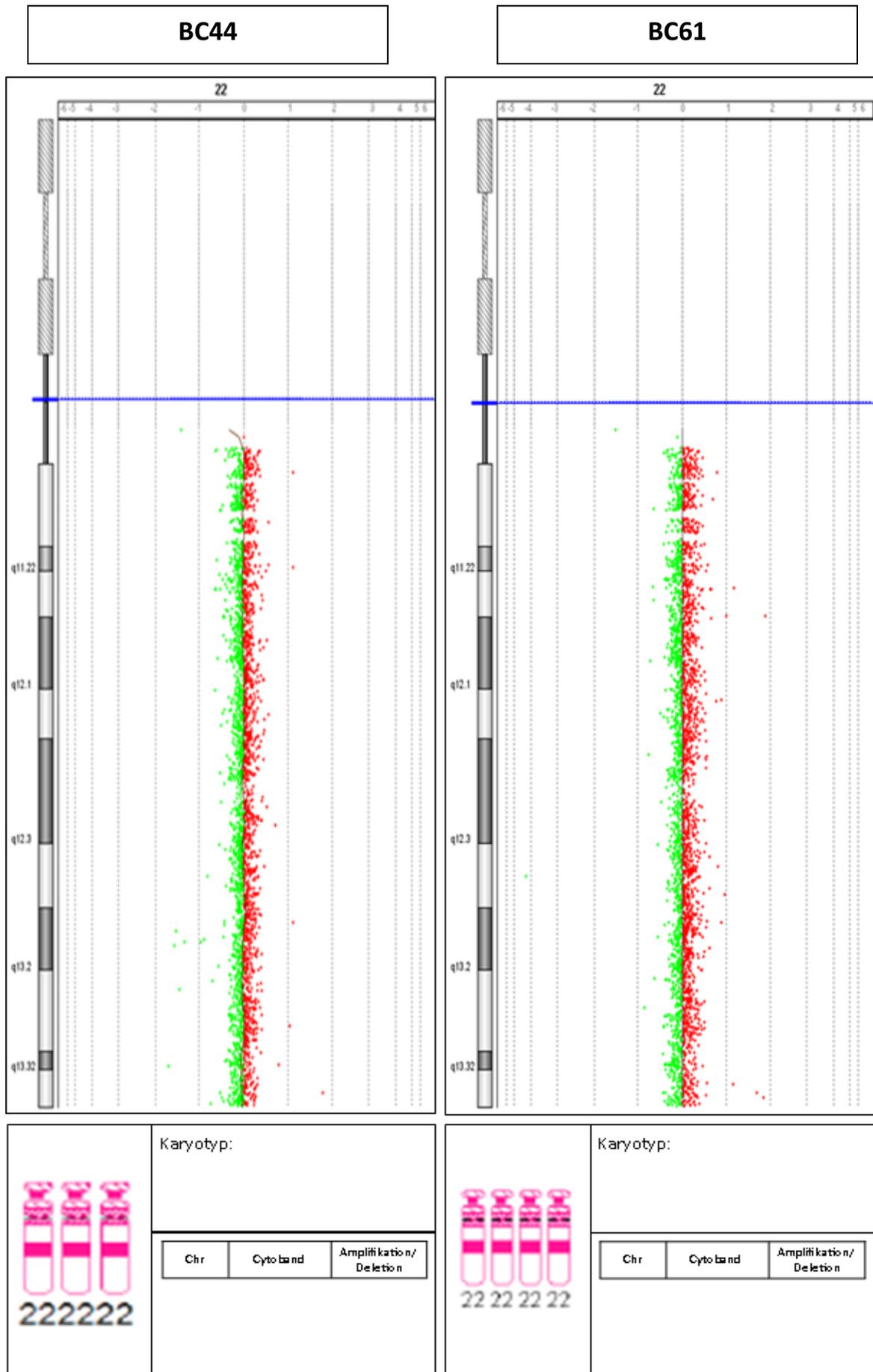
+20x2

Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion

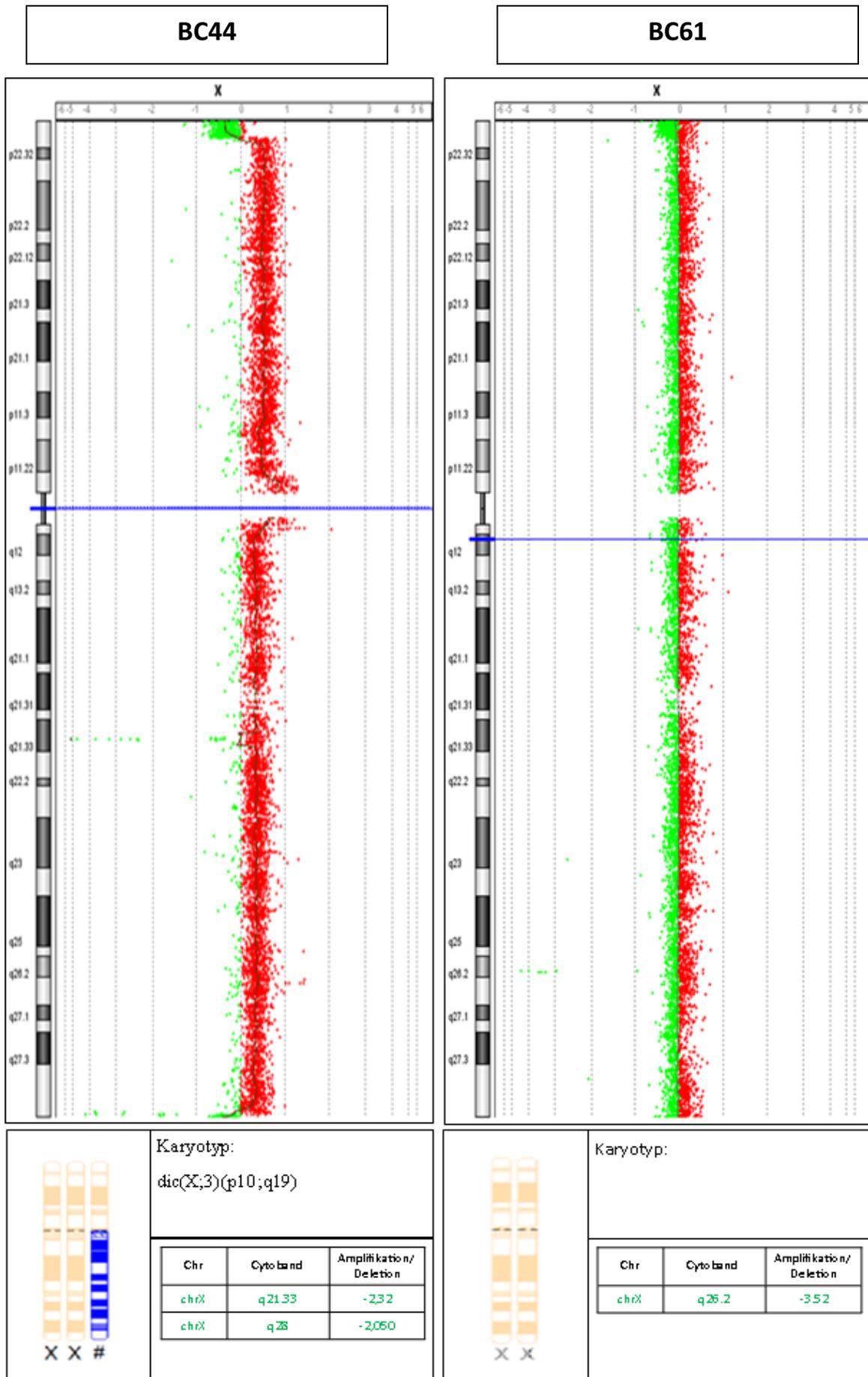
**Abbildung 35: Chromosom20 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 36: Chromosom21 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

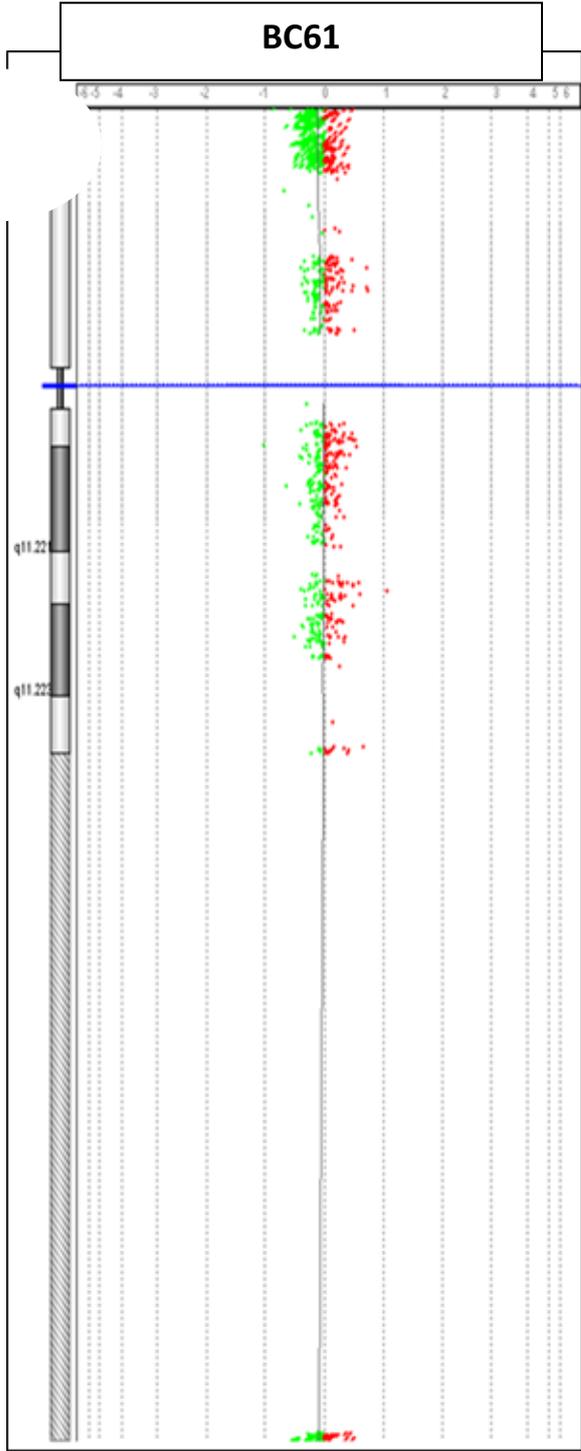


**Abbildung 37: Chromosom22 BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.



**Abbildung 38: ChromosomX BC44 und BC61**  
 Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.

BC44



 Y Y		
Karyotyp:		
Chr	Cyto band	Amplifikation/ Deletion

**Abbildung 39: Chromosom Y BC44 und BC61**  
Basierend auf der spektralen Karyotypisierung und den aCGH-Daten.