Aus der Klinik für Urologie der Heinrich–Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Albers

Bedeutung der Histondemethylasen UTX und JMJD3 im Harnblasenkarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Xenia Kunz

2018

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Dekan

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

Korreferent: Prof. Dr. med. Dagmar Wieczorek

Zusammenfassung

Die Bedeutung der Epigenetik bei der Entstehung von Karzinomen wurde insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten durch viele wissenschaftliche Arbeiten unterstrichen. So konnten beim Harnblasenkarzinom durch umfassende Sequenzierungsanalysen häufige Mutationen in bis dahin wenig bekannten Genen festgestellt werden, von denen viele für posttranslationale Modifikationen von Histonen zuständig sind. Das am häufigsten mutierte Gen war dabei UTX; eine Histondemethylase.

In einer vorangegangenen Arbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf wurde UTX und möglicherweise auch der verwandten Histondemethylase JMJD3 eine tumorsuppressive Eigenschaft zugeschrieben, da deren Expression in den untersuchten Urothelkarzinomzelllinien deutlich vermindert war. Zudem konnten in einigen Zelllinien somatische Mutationen nachgewiesen werden.

Vor diesem Hintergrund befasst sich diese Arbeit mit der funktionellen Bedeutung der Histondemethylasen UTX und JMJD3 im Urothelkarzinom. Hierfür wurden die Auswirkungen einer Überexpression und eines Knockdowns auf verschiedene Zellparameter untersucht. Für die tumorsuppressive Eigenschaft der beiden Enzyme wurden weitere Anhaltspunkte gewonnen. So verminderte eine Überexpression von UTX und in geringerem Maße von JMJD3 in mehreren Urothelkarzinomzelllinien deren Klonogenität. Zudem lässt sich eine gegenseitige Beeinflussung zwischen UTX und JMJD3 vermuten, da bei niedriger Expression von UTX die JMJD3 Expression zunahm. Transiente Überexpression oder siRNA vermittelter Knockdown von UTX führten im Zeitraum von 3 Tagen zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellvitalität und der Proliferation der untersuchten Urothelkarzinomzelllinien. Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Zielgene *RBBP4*, *HBP1*, *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC13* festgestellt. Tendenziell nahm die Expression von *RBBP4* wie erwartet ab; den Erwartungen entgegengesetzt nahm die Expression von *HBP1* jedoch zu. Es lässt sich vermuten, dass die Ergebnisse bei einem länger gewählten Versuchszeitraum - wie beim

Klonogenitätsassay - deutlicher ausgefallen wären, sodass das Augenmerk in weiterführenden Arbeiten auf die Auswirkungen eines langfristigen Knockdowns, beispielsweise mittels shRNA beziehungsweise einer langfristigen Überexpression, beispielsweise mittels lentiviralen Vektoren, gelegt werden sollte. Dabei sollten auch andere Parameter wie Zellmigration und Invasion untersucht werden.

Eine genaue Charakterisierung der Wirkung von UTX und JMJD3 kann zur Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen über „epigenetische Inhibitoren“ beitragen, beispielsweise über Inhibitoren der zu diesen Histondemethylasen antagonistischen Methyltransferase EZH2.

Summary

The relevance of epigenetics for the development of carcinomas has been highlighted by many scientific studies especially in the last decades. In bladder cancer, in particular, comprehensive genome sequencing has identified recurrent mutations in previously poorly studied genes encoding factors involved in the post-translational modification of histones. The most frequently mutated gene in this category is UTX (KDM6A). A previous thesis performed in the urology research lab provided preliminary evidence for a tumor-suppressive function of UTX and possibly, the related histone demethylase JMJD3. Expression of UTX was diminished and the gene was mutated in several urothelial carcinoma cell lines.

Therefore, the present thesis addressed the function of these two histone demethylases in urothelial carcinoma cells. To that end, the effects of experimental overexpression and siRNA-mediated knockdown on various cell parameters were investigated. The tumor-suppressive character of both enzymes was most apparent in the suppression of clone formation by UTX and to a lesser extent JMJD3 overexpression. JMJD3 expression increased following a decreased UTX expression, suggesting mutual regulation or compensation. However, transient overexpression or knockdown of UTX did not significantly affect cell viability or proliferation of the investigated urothelial carcinoma cell lines over the course of three days. Likewise, expression of the likely target genes *RBBP4*, *HBP1*, *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC13* was not significantly changed within this period, although *RBBP4* tended towards downregulation and *HBP1*, unexpectedly, towards upregulation.

Conceivably, changes affected by UTX modulation would have become more pronounced over a longer experimental period, as suggested by the clone formation assays. In future experiments, therefore, long-term stable knockdown, e.g. by shRNA, and stable overexpression, e.g. by lentiviral vectors, should be employed. In addition, further cellular parameters, e.g. cell migration and invasion might be investigated. The characterization of the biological action of UTX and JMJD3 may contribute to the development of novel therapeutic

approaches based on epigenetic inhibitors, notably of inhibitors targeting the histone methylase EZH2, which antagonizes UTX and JMJD3.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
BPE	Bovine Pituitary Extract
BSA	Bovine Serum Albumin
CBP	CREB-binding protein
cDNA	Complementary DNA
CHIP-qPCR	Chromatin immunoprecipitation-quantitative real-time PCR
dH_2O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FCS	Fetal calf serum
G418	Geneticin
H3K4/27	Histon 3 Lysin 4/27
HBP1	High mobility group box transcription factor 1
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HOX	Homeobox
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
GC	Gemcitabin und Cisplatin
IARC	Internationale Krebsforschungsagentur
Ir	Irrelevante
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
JMJD3	Jumonji Domain Containing 3 Histone Lysine Demethylase
KDM6A-C	Lysine (K)-Specific Demethylase 6A-C

KSFM	Keratinocyte serum-free medium
LB	Lysogeny broth
LSD	Lysin-spezifische-Demethylasen
LV	Leervektor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mHAg	Minor histocompatibility antigen
MKI67	Marker of proliferation Ki-67
MLL 1-3	Mixed-lineage leukemia 1-3
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin
p14, p16, p53	Protein 14 (ARF), Protein 16 (INKA4), Protein 53 (TP53)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET-CT	Positronenemissionstomographie-Computertomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PRC 1, 2	Polycomb repressive complex 1, 2
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RB	Retinoblastomprotein
RBBP 1-9	Retinoblastoma binding protein 1-9
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RKI	Robert Koch Institut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
TBP	TATA-binding protein
TNM	Tumor, node, metastasis (Tumor, Lymphknoten und Metastasen)
TUR-BT	Transurethrale Resektion von Blasentumoren
ub	Unbehandelt
UICC	Union internationale contre le cancer
UTX	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X
UTY	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome Y

VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Das Harnblasenkarzinom 1
1.1.1 Allgemeine Grundlagen 1
1.1.2 Genetische und epigenetische Faktoren 3
1.2 Epigenetik 5
1.2.1 Histonmethylierung 6
1.2.2 UTX 6
1.2.3 UTY 8
1.2.4 JMJD3 9
1.2.5 EZH2 10
1.2.6 Zielgene von UTX und JMJD3 11
1.2.6.1 HOX-Gene 11
1.2.6.2 RBBP4 12
1.2.6.3 HBP1 12
1.3 Ziele der Arbeit 13
2 Material und Methoden 14
2.1 Humane Zelllinien 14
2.1.1 Harnblasenkarzinomzelllinien 14
2.1.2 Prostatakarzinomzelllinie 15
2.1.3 Immortalisierte Zelllinien 15
2.2 Harnleiter aus Nephrektomien 15
2.3 Plasmide 16
2.4 Bakterienmedien 16
2.5 Small interfering RNA 16
2.6 Chemikalien 17
2.7 Molekularbiologische Kits 18
2.8 Zellkultur 18
2.9 Lösungen für Western-Blot-Analyse 19
2.9.1 Protein-Lysis-Puffer (pH 7,6) 19
2.9.2 Elektrophoresegel 19
2.9.3 Pufferlösungen 19

2.9.4 Waschlösung 19
2.9.5 Protein-Stripping-Lösung (pH 2,2) 20
2.9.6 Antikörperlösung 20
2.9.7 Antikörper 20
2.10 Primer für qRT-PCR 20
2.11 Materialien und Geräte 21
2.12 Datenbanken 22
2.13 Statistik 22
2.14 Kultivierung von Zellen 23
2.14.1 Kultivierung von humanen Harnblasen- und Prostatakarzinomzelllinien 23
2.14.2 Kultivierung der humanen Nierenzelllinie HEK293 23
2.14.3 Kultivierung von TERT-NHUC 24
2.15 Anlage von Urothelprimärkulturen 24
2.16 Kryokonservierung 25
2.17 Auftauen von Zelllinien 25
2.18 Ermittlung der Zellzahl 25
2.19 Bakterienkulturen 26
2.20 Präparation von Plasmiden 26
2.20.1 Restriktionsverdau von Plasmiden 27
2.21 Präparation von RNA 27
2.22 Präparation von Proteinlysaten 28
2.23 Transfektion von siRNA 29
2.24 Transfektion von Plasmiden 29
2.25 PCR 30
2.25.1 Reverse Transkription 30
2.25.2 Quantitative *real-time* PCR (qRT-RCR) 30
2.26 Immunoblot 31
2.27 Klonogenitätsassay und Isolation von Zellklonen 33
2.28 Giemsa-Färbung 34
2.29 Vitalitätsassay 34
3 Ergebnisse 36
3.1 Funktionelle Analysen 36
3.1.1 Überexpressionsanalysen 36

3.1.1.1 Nachweis der Überexpression 36
3.1.1.2 Vitalitätsassay nach transienter Überexpression..... 40
3.1.1.3 Klonogenitätsassay nach stabiler Überexpression..... 41
3.1.2 Knockdownanalysen..... 49
3.1.2.1 Nachweis des Knockdowns..... 49
3.1.2.2 Vitalitätsassay nach Knockdown 52
3.1.2.3 Auswirkung des Knockdowns von UTX auf die Proliferation..... 53
3.1.2.4 Auswirkung des UTX-Knockdowns auf Zielgene von UTX..... 54
3.1.2.5 JMJD3 Expression nach UTX Knockdown 58
3.1.2.6 Kockdown von UTX in Urothelprimärkulturen..... 59
4 Diskussion 61
4.1 Überexpression..... 61
4.1.1 Auswirkungen der Überexpression von UTX..... 61
4.1.2 Auswirkungen der Überexpression von JMJD3..... 62
4.2 UTX mRNA und UTX-Protein..... 63
4.3 Knockdown von UTX..... 64
4.3.1 Auswirkung des Knockdowns auf die Zielgene 65
4.3.2 Auswirkung des Knockdowns von UTX auf JMJD3..... 67
4.4. Expression von EZH2……..68
4.5 UTY-Überexpression..... 68
4.6 Knockdown von UTX in Urothelprimärkulturen 69
5 Zusammenfassung..... 70
6 Literatur- und Quellenverzeichnis..... 72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Konkurrierende und einander ausschließende Mutationen der häufig mutierten Gene im Urothelkarzinom **4**
Abb. 2 Vergleichende Darstellung der Expression von UTX/TBP mRNA mit JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen ... **8**
Abb. 3 Expression von *UTX* und *JMJD3* nach Überexpression **37**
Abb. 4 Western-Blot von UTX und EZH2 nach Überexpression von UTX **39**
Abb. 5 Western-Blot von UTX nach Überexpression **39**
Abb. 6 Western-Blot von JMJD3 nach Überexpression **40**
Abb. 7 Zellvitalität von Urothelkarzinomzellen nach Überexpression von UTX. **41**
Abb. 8 Klonogenitätsassay von Urothelkarzinomzellen nach Überexpression von UTX oder JMJD **44**
Abb. 9 Verhältnis gebildeter Klone nach Überexpression **45**
Abb. 10 Expression von *UTX* und *JMJD3* in UTX- und JMJD3-Klonen **47**
Abb. 11 Korrelation der Expression von *UTX* und *JMJD3* mRNA in UTX (A) und JMJD3 (B) Klonen **48**
Abb. 12 Western-Blot von JMJD3 in JMJD3-Klonen **48**
Abb. 13 Expression von *UTX* in Urothelkarzinomzelllinien nach Knockdown ... **50**
Abb. 14 Western-Blot von UTX und EZH2 nach Knockdown von UTX **52**
Abb. 15 Zellvitalität in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **53**
Abb. 16 Expression von *MKI67* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **54**
Abb. 17 Expression von *HBP1* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **55**
Abb. 18 Expression von *RBBP4* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **56**
Abb. 19 Expression von *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC13* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **57**
Abb. 20 Expression von *EZH2* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **58**
Abb. 21 Expression von *JMJD3* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown **59**

Abb. 22 Expression von *UTX* in normalen Urothelzellen nach UTX-Knockdown **60**

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Allgemeine Grundlagen

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist mit 90% die häufigste Form des Harnblasenkarzinoms; zu den selteneren Formen zählen das Plattenepithel- und das Adenokarzinom (Dahm and Gschwend, 2003). Beim Urothel handelt es sich um ein mehrschichtiges Epithel, welches die ableitenden Harnwege ausgehend von den Nierenkelchen bis zur Urethra auskleidet.

Für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms wird die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien verantwortlich gemacht, beispielsweise gegenüber aromatischen Aminen, die durch Tabakkonsum oder eine berufliche Exposition aufgenommen werden. Auch das Pflanzenalkaloid Aristolochiasäure wird im Zusammenhang mit der Balkannephropathie als karzinogen eingestuft. Im medizinischen Bereich werden das Zytostatikum Cyclophosphamid, das inzwischen vom Markt genommene Analgetikum Phenacetin und eine Radiatio des kleinen Beckens als gesicherte Risikofaktoren angesehen. Im Jahr 2013 stufte die Internationale Krebsforschungsagentur (IARC) das Antidiabetikum Pioglitazon als wahrscheinlich Blasenkrebs erregend ein (Quelle Robert Koch Institut (RKI), 2013). Zu den selteneren Faktoren zählen chronische Entzündungen, eine familiäre Prädisposition und genetische Faktoren wie beispielsweise eine langsam acetylierende N-Acetyltransferase 2 sowie das Fehlen des Enzyms Glutathion S-Transferase M1 (Burger et al., 2013; Fortuny et al., 2007; Jankovic Velickovic et al., 2009). Zudem sind bestimmte genetische Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko für das Harnblasenkarzinom assoziiert. Diese betreffen vor allem Gene, die für die Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose sowie für die Metabolisierung von Karzinogenen zuständig sind (Golka et al., 2011).

Das Harnblasenkarzinom ist mit 4,5% die vierthäufigste maligne Neoplasie der Männer in Deutschland. Bei den Frauen steht es an 14. Stelle, da insgesamt das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken für Männer 2-5-fach

höher ist. Dies ist bedingt durch den vermehrten Tabakkonsum und vermutlich die erhöhte berufliche Exposition der Männer gegenüber aromatischen Aminen. Zudem wird auch eine Beteiligung von Steroidrezeptoren wie des Androgenrezeptors bei der Tumorgenese und der Tumorprogression diskutiert (Ide and Miyamoto, 2015). Die Tumorinzidenz steigt ab dem 40. Lebensjahr an und erreicht ihr Maximum im 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Die Zahl der absoluten Neuerkrankungen bei Männern nimmt zu, wobei die Sterberate konstant ist. Weltweit ist das Harnblasenkarzinom das neunthäufigste Karzinom; im Jahr 2012 erkrankten daran mindestens 430 000 und starben 165 000 Menschen (Quelle RKI, 2013; World Health Organisation (WHO), 2012; Burger et al., 2013).

Als Kardinalsymptom des Harnblasenkarzinoms gilt die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie. Selten bestehen dysurische Beschwerden oder ein imperativer Harndrang. Zum diagnostischen Standard gehört die Zystoskopie, ggf. als Fluoreszenzzystoskopie. Eine Urinzytologie ist stark abhängig vom Untersucher (Schmitz-Dräger et al., 2014). Mit dem Ultraschall können nur expansiv wachsende Tumore diagnostiziert werden. Es gibt zahlreiche Urintests auf bestimmte Marker; ein Test auf spezifische Chromosomenveränderungen (Urovysion) wird wegen seiner hohen Spezifität auch klinisch genutzt. Alle Tests sind jedoch der Zystoskopie unterlegen. Beim Staging kommen bildgebende Verfahren zum Einsatz, wobei das PET-CT die sensitivste Methode ist (Teply and Kim, 2014; Gogalic et al., 2015).

Die Klassifikation des Harnblasenkarzinoms, die entscheidend für das therapeutische Vorgehen ist, erfolgt anhand der WHO-Klassifikation vom Jahr 2004. Entscheidend ist die Eindringtiefe des Karzinoms, wobei bei den „oberflächlichen“ papilläre (Ta), Carcinoma in situ (Tis) und invasiv wachsende (<T1) Karzinome unterschieden werden; muskelinvasive Tumore umfassen die Stufen T2-T4. Zudem wird der Lymphknotenbefall (N0-N3) sowie das Vorkommen von Fernmetastasen (M0, M1) bestimmt. Als weiteres wichtiges Kriterium gilt das Grading des Karzinomgewebes. Hierbei wird besonders bei oberflächlichen Tumoren zwischen *low grade* und *high grade* Tumoren unterschieden, die frühere Unterteilung in G1-G4 ist jedoch weiterhin gebräuchlich (Cheng et al., 2009).

Das therapeutische Vorgehen richtet sich nach dem Tumorstadium. Bei nicht muskelinvasiven Karzinomen reicht chirurgisch in der Regel die transurethrale Resektion der Harnblasentumoren (TUR-BT) aus mit möglicher nachfolgender intravesikaler Chemo- oder Immuntherapie. Bei muskelinvasiven Karzinomen wird eine radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie durchgeführt. Sie kann durch neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin-basierten Kombinationen unterstützt werden, beispielweise eine Kombination von Cisplatin mit Methotrexat, Vinblastin und Doxorubicin (MVAC) oder Gemcitabin (GC). Bei fortgeschrittenem Stadium und als blasenerhaltende Therapie wird eine Kombination aus einer Radio- und Chemotherapie angewandt. Bei bereits erfolgter Metastasierung kommen die oben genannten Chemotherapien ebenfalls zum Einsatz. Auch eine chirurgische Therapie kann sinnvoll sein, insbesondere wenn sich die Metastasierung auf die Lymphknoten des kleinen Beckens beschränkt (Teply and Kim, 2014; Balar and Milowsky, 2015). Besonderes Interesse gilt aktuell *targeted therapies* (zielgerichtete Therapien) wie beispielsweise dem VEGF-Antikörper Bevacizumab sowie Inhibitoren des EGFR-Signalwegs (Balar and Milowsky, 2015; Hahn et al., 2011; Kim, 2012).

1.1.2 Genetische und epigenetische Faktoren

Anhand klinischer wie molekularer Kriterien lassen sich grundsätzlich zwei unterschiedliche Gruppen von Urothelkarzinomen unterscheiden. Den größten Anteil machen mit 70-80% die oft multilokulär wachsenden und häufig zu Rezidiven neigenden nicht muskelinvasiven Karzinome aus. Diese entstehen über eine Hyperplasie aus dem Urothel und haben, besonders wenn sie gut differenziert sind, nur ein geringes Potential, sich zu einem muskelinvasiven Karzinom zu entwickeln. Die kleinere Gruppe machen mit 20-30% die muskelinvasiven Karzinome aus. Diese entstehen meist über die Vorstufe eines Carcinoma in situ. Molekulargenetisch unterscheiden sich diese zwei Gruppen dadurch, dass in nicht muskelinvasiven Karzinomen Mutationen im *fibroblast growth factor receptor 3* (*FGFR3*)-Gen und dem Onkogen *HRAS* viel häufiger sind, ebenso Mutationen in der Proteinkinase *PIK3CA*. Diese führen zur

Aktivierung der MAPK- und PI3K-Signalwege, die gemeinsam die Proliferation und Erneuerung von epithelialen Zellen steuern. Demgegenüber sind muskelinvasive Karzinome durch vielfältige chromosomale Veränderungen charakterisiert. Fast alle muskelinvasiven Karzinome weisen Mutationen auf, die zur Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und pRB1 führen und folglich zu Störungen in der Regulation des Zellzyklus und der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung (Wu, 2005). Unter diesen Veränderungen sind Deletionen des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* auch in nicht-muskelinvasiven Tumoren häufig. Auch eine Überexpression der Telomerase in Folge von Mutationen im Promoter des *hTERT* Gens ist über alle Stadien hinweg verbreitet (Williamson et al., 1995; Allory et al., 2014; Knowles and Hurst, 2015).

Durch neuere Sequenzierungsanalysen mit Hochdurchsatzmethoden wurden Mutationen in zahlreichen Genen entdeckt, die bis dahin noch nicht mit dem Harnblasenkarzinom in Zusammenhang gebracht worden waren (Gui et al., 2011; Guo et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Balbás-Martínez et al., 2013). Darunter fanden sich auch acht Gene, die an der posttranslationalen Modifikation von Histonen und der Umlagerung (Remodellierung) des Chromatins beteiligt sind. Unter diesen war UTX (*KDM6A*) das am häufigsten mutierte Gen (Gui et al., 2011).

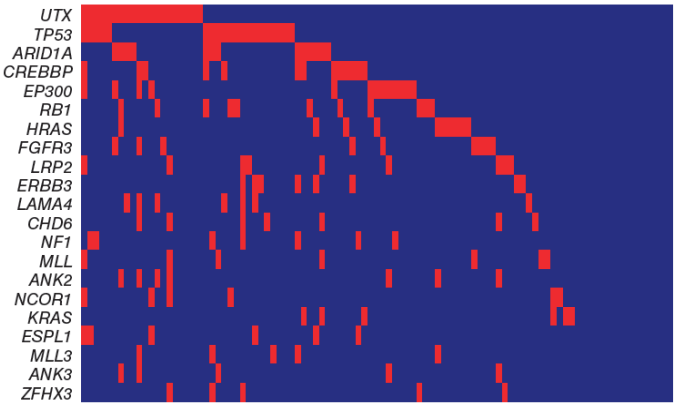


Abb. 1 Konkurrierende und einander ausschließende Mutationen der häufig mutierten Gene im Urothelkarzinom

Für jedes Gen (Zeile) ist in den Urothelkarzinomenproben (Spalte) eine vorhandene Mutation in rot markiert; blau: keine Mutation. Modifiziert nach Gui et al., 2011

Zahlreiche andere Karzinomentitäten weisen ebenfalls Mutationen auf, die UTX inaktivieren, beispielsweise das Nierenzellkarzinom oder verschiedene Leukämieformen (van Haaften et al., 2009). Im Urothelkarzinom finden sich die

UTX Mutationen eher in nicht muskelinvasiven, *low grade* Karzinomen (Gui et al., 2011).

1.2 Epigenetik

Die Epigenetik beschreibt stabile, vererbbare Veränderungen der Genexpression, die nicht auf eine Veränderung in der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Russo, 1996). Zu den wichtigsten epigenetischen Mechanismen zählen DNA-Methylierung sowie Histonmodifikationen. Diese Mechanismen beeinflussen die Transkription über das gesamte Genom hinweg, speziell das genomische Imprinting sowie die Inaktivierung des X-Chromosoms in weiblichen Zellen (Jaenisch and Bird, 2003).

In eukaryotischen Zellen liegt die DNA als Chromatin vor, d.h. in einem Komplex aus DNA und Proteinen. Zentral sind dabei die Histone, von denen es insgesamt 5 verschiedene Klassen gibt. Je zwei Histone H2A, H2B, H3 und H4 lagern sich zu einem Histon-Oktamer zusammen, um welches sich dann die DNA-Doppelhelix winden kann. Diesen Komplex bezeichnet man als Nukleosom. Die N-terminalen Aminosäuren der Histone ragen aus diesem Oktamer heraus und sind so für Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung besonders zugänglich. Die Histone der Klasse H1 verbinden benachbarte Nukleosomen und sind wichtig für die Geninaktivierung. Die Modifikationen erfolgen an geeigneten Aminosäuren, im Fall der Methylierung an den Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin. Durch die verschiedenen Modifikationen wird eine Veränderung der Chromatinstruktur erreicht, die die Zugänglichkeit zur DNA und letztendlich die Genexpression beeinflusst (Izzo et al., 2008).

Neben den verschiedenen Histonmodifikationen wirkt die DNA-Methylierung an der Regulation der Genexpression mit. In Karzinomzellen findet sich eine aberrante - oftmals vermehrte - Methylierung an Promotoren bestimmter Gene, die beispielsweise zu einem Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgenen führen kann (Baylin and Jones, 2011; McCabe et al., 2009).

Dabei sind DNA-Methylierung und Histonmodifikationen keinesfalls als alleinstehende Mechanismen zu sehen, vielmehr sind sie eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig (McCabe et al., 2009).

1.2.1 Histonmethylierung

Verschiedene Histonmethylierungen können aktivierend oder repressiv auf die Transkription von Genen wirken. So gilt beispielsweise eine (Tri-)Methylierung von Histon 3 am Lysin 4 (H3K4) als aktivierende Modifikation, die Promotoren markiert; eine (Tri-)Methylierung von Histon 3 am Lysin 27 (H3K27) stellt hingegen eine repressive Modifikation dar. Die am besten untersuchten Methylierungen sind die an der Aminosäure Lysin. Lysine können mono-, di-, oder trimethyliert werden. Bei der Histonmethylierung stehen sich grundsätzlich zwei verschiedene Enzymgruppen gegenüber: die Histonmethyltransferasen und die Histondemethylasen. Bekannt sind zwei Arten von Lysindemethylasen: Lysin-spezifische-Demethylasen (LSD) und die Jumonji-Demethylasen. Diese Enzyme können – je nach Enzym - mono-, di-, als auch trimethylierte Lysine demethylieren. Die Histondemethylasen UTX und JMJD3 zählen zu den Jumonji-Demethylasen. Es gibt verschiedene Arten von Histonmethyltransferasen, zu denen unter anderem das Enzym EZH2 zählt, das als Bestandteil repressiver PRC2 *Polycomb*-Proteinkomplexe wirkt (Dawson and Kouzarides, 2012; McCabe et al., 2009).

1.2.2 UTX

UTX (*ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X*) ist eine Histondemethylase vom Jumonji Typ (Lan et al., 2007), die spezifisch di- und trimethyliertes Lysin 27 am Histon 3 (H3K27me2/3) demethyliert; folglich entsteht monomethyliertes Lysin (H3K27me1). UTX wird vom *KDM6A* Gen codiert. Dieses ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, entgeht jedoch der X-chromosomalen Inaktivierung und wird ubiquitär exprimiert. Die konservierte JmjC-Domäne am C-terminalen Ende enthält das katalytische Zentrum und vermittelt eine von α-Ketoglutarat und Fe^{2+} abhängige Oxidationsreaktion

(Dawson and Kouzarides, 2012). Am N-terminalen Ende enthält UTX die namensgebenden *tetratricopeptide repeats*, die wichtig für Proteininteraktionen sind (Lan et al., 2007). Die Spezifität für H3K27me2/3 wird unter anderem durch eine Zink-bindende Domäne am C-terminalen Ende nahe des katalytischen Zentrums gewährleistet (Kim and Song, 2011).

Eine weitere, Demethylase-unabhängige Funktion erfüllt UTX im MLL2 (*mixed-lineage leukemia*) H3K4 Methyltransferase Komplex. Dieser Proteinkomplex methyliert H3K4, was eine transkriptionsaktivierende Wirkung hat (Issaeva et al., 2007). Zudem interagiert UTX mit dem Chromatinkomplex SWI/SNF, welcher die Zugänglichkeit von Chromatin erhöht (Miller et al., 2010). In Fliegen wurde darüber hinaus eine Kooperation zwischen UTX, SWI/SNF und der Histon-Acetyltransferase *CREB-binding protein* (CBP) nachgewiesen. CBP agiert als Antagonist des PRC2 (*polycomb repressive complex* 2), indem es H3K27 acetyliert und somit dessen Methylierung verhindert; auch dies bewirkt eine transkriptionelle Aktivierung von Genen (Tie et al., 2012). Es gibt demnach mehrere Funktionen von UTX, die teilweise von seiner Demethylase-Aktivität unabhängig sind. Bemerkenswert ist, dass im Urothelkarzinom auch inaktivierende Mutationen von MLL1, 2 und 3 sowie von CBP vorkommen.

UTX gilt als wichtiger Faktor bei physiologischen Prozessen wie der Entwicklung von embryonalen Stammzellen (Morales Torres et al., 2013), bei der gewebespezifischen Differenzierung von Zellen, u.a. während der kardialen Entwicklung (Lee et al., 2012), der Hämatopoese (Thieme et al., 2013) und der Myogenese (Seenundun et al., 2010).

Wie man seit kurzem weiß, finden sich Mutationen im *KDM6A* Gen beim Kabuki Syndrom alternativ zu Mutationen von *MLL2*, die bei der Mehrzahl der Patienten (bis zu 75%) verantwortlich sind. Das seltene Kabuki Syndrom ist seit 1981 bekannt und geht mit Entwicklungsstörungen und kongenitalen Anomalien einher (Lederer et al., 2012). Diese Entdeckung ist ein weiterer Beleg für die enge Interaktion von MLL2 und UTX.

Inaktivierende UTX Mutationen sind inzwischen in mindestens 12 verschiedenen Karzinomentitäten gefunden worden, so dass UTX als Tumorsuppressor angesehen wird (van Haaften et al., 2009). Am häufigsten

kommen UTX-Mutationen im Harnblasenkarzinom vor. In einer vorangegangenen Arbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf wurde untersucht, ob es Unterschiede bei der UTX-Expression zwischen Urothelkarzinomzellen und normalen Urothelzellen gibt. Zwar zeigte sich sowohl in den Karzinomzelllinien als auch in den normalen Urothelzellen eine inhomogene Expression von UTX auf mRNA-Ebene, diese war in den Karzinomzellen jedoch insgesamt niedriger. Insbesondere in den Zelllinien RT112 und Ku 19-19 mit nachgewiesener somatischer Mutation im *KDM6A* Gen wurde nur eine sehr niedrige UTX-Expression gemessen (Abb. 2).

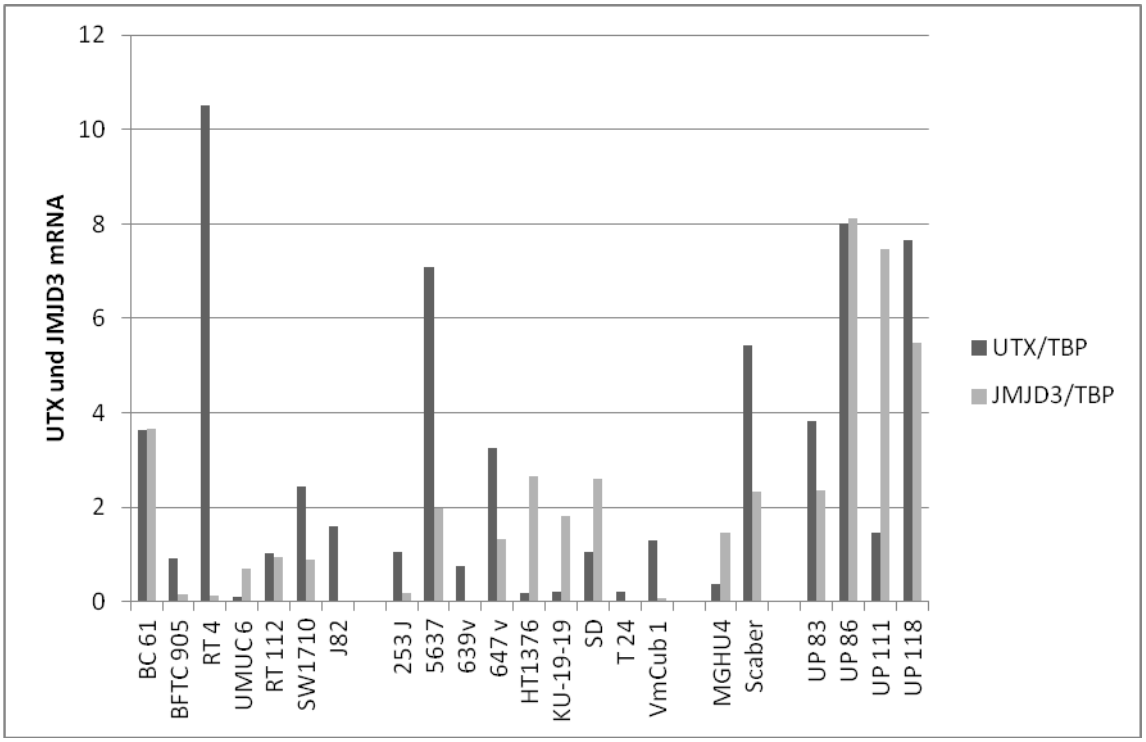


Abb. 2 Vergleichende Darstellung der Expression von UTX/TBP mRNA mit JMJD3/TBP mRNA in Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellen (Murday, 2016).

1.2.3 UTY

UTY (*ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome Y*) ist ein Homolog von UTX, liegt auf dem Y-Chromosom und wird vom *KDM6C* Gen codiert. Es besitzt 88% Ähnlichkeit mit UTX, und ebenfalls eine JmjC-Domäne als mögliches katalytisches Zentrum (Hong et al., 2007). UTY assoziiert

gleichfalls mit dem MLL2 Komplex und erfüllt eine Demethylase-unabhängige Funktion via H3K4 Methylierung (Shpargel et al., 2012). Darüber hinaus kann es als ein *minor histocompatibility antigen* (mHAg) zu Abstoßungsreaktionen von männlichen Stammzellen führen (Vogt et al., 2000). Lange konnte trotz großer Ähnlichkeit mit UTX keine Demethylase-Aktivität für UTY nachgewiesen werden; erst 2014 gelang dies, denn UTY demethyliert H3K27 in einem viel geringerem Ausmaß als UTX (Walport et al., 2014).

1.2.4 JMJD3

JMJD3 (*jumonji domain containing 3 histone lysine demethylase*) ist genau wie UTX eine Histondemethylase mit einer JmjC-Domäne als katalytisches Zentrum. JMJD3 demethyliert ebenfalls Lysin 27 am Histon 3. Zwar zeigt JMJD3 eine hohe Homologie zu UTX, besitzt jedoch nicht die *tetratricopeptide repeats* am N-terminalen Ende (Agger et al., 2007). JMJD3 wird vom *KDM6B* Gen auf Chromosom 17 kodiert (www.genecard.org).

JMJD3 besitzt viele physiologische Funktionen. Es wird zum Beispiel während inflammatorischer Prozesse in Makrophagen hochreguliert, wodurch verschiedene Zielgene vermehrt exprimiert werden (De Santa et al., 2007). Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung bestimmter Zellen. Beispielsweise konnte in Glioblastom-Stammzellen nachgewiesen werden, dass JMJD3 neben seiner Demethylasefunktion auch über eine direkte Interaktion mit p53 zur Differenzierung dieser Stammzellen beiträgt (Ene et al., 2012). Weiterhin reguliert JMJD3 Tumorsuppressoren (nämlich $p16^{INK4A}$ und $p14^{ARFI}$ auf dem *CDKN2A* Lokus), die für die durch Onkogene oder Stress induzierte Seneszenz von Zellen verantwortlich sind. Hierbei stehen sich JMJD3 und die Histonmethyltransferase EZH2 als Antagonisten gegenüber (Agger et al., 2009).

Wie UTX ist JMJD3 in die Regulation der HOX Gene involviert. Zudem wird vermutet, dass JMJD3 ebenfalls an MLL2 Komplexen mitwirkt, da es mit RBBP5, einer Untereinheit dieses Komplexes, interagiert (De Santa et al.,

2007). Weiterhin interagiert JMJD3 mit dem Chromatinkomplex SWI/SNF - eine weitere Parallele zu UTX (Miller et al., 2010).

In vielen Karzinomentitäten wurde eine verminderte Expression von JMJD3 oder der Verlust der Heterozygotie des Gens beschrieben, beispielsweise in verschiedenen Leukämieformen. Wegen seinen Funktionen bei der Zelldifferenzierung und der onkogen-induzierten Seneszenz wird eine tumorsuppressive Funktion für JMJD3 vermutet (Agger et al., 2009; Barradas et al., 2009). In Urothelkarzinomzellen konnte in der Arbeit von Murday (Dissertation 2016) ebenfalls eine signifikant verminderte Expression von JMJD3 nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Zelllinien Ku 19-19 und RT112 mit somatischen Mutationen von UTX tendenziell eine höhere JMJD3 Expression.

1.2.5 EZH2

EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) ist eine Histonmethyltransferase und agiert als katalytische Komponente in dem *polycomb repressive complex 2* (PRC2). Dieser Komplex ist für die Methylierung von monomethyliertem Lysin 27 am Histon 3 (H3K27me1) verantwortlich, so dass di- oder trimethyliertes Lysin (H3K27me2/3) entsteht (Dawson and Kouzarides, 2012). Diese Modifikation wirkt sich repressiv auf die Transkription von Genen aus. Durch den PRC2 Komplex können DNA-Methyltransferasen rekrutiert werden, so dass eine *de novo* DNA-Methylierung erfolgen und damit eine langfristige Repression stabilisiert werden kann. Des Weiteren wird die H3K27me3-Markierung vom *polycomb repressive complex 1* (PRC1) erkannt, der eine weitere Modifikation (Ubiquitinierung am Lysin 118) einfügt. Letztendlich fördert dies die kompakte Zusammenlagerung von Nukleosomen und behindert die Interaktion mit aktivierenden Transkriptionsfaktoren und Chromatin modifizierenden Enzymen. Diese Abfolge zeigt exemplarisch, wie durch mehrere ineinandergreifende epigenetische Mechanismen die Transkription bestimmter Gene stabil reprimiert werden kann (McCabe et al., 2009).

EZH2 wird in mehreren Karzinomentitäten vermehrt exprimiert, beispielsweise dem Prostatakarzinom und dem Mammakarzinom. Eine EZH2 Überexpression ist dort vergesellschaftet mit einem progressiven Wachstum und schlechter Prognose, so dass es als ein Onkogen angesehen wird (Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003). Im Harnblasenkarzinom wurde eine erhöhte EZH2 mRNA Expression besonders in muskelinvasiven, *high grade* Karzinomen beobachtet (Weikert et al., 2005). Auch in einer vorangegangenen Doktorarbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf wurde eine deutliche Erhöhung von EZH2 mRNA in den meisten Karzinomzelllinien im Vergleich zu normalen Urothelzellen gemessen (Murday, 2016).

1.2.6 Zielgene von UTX und JMJD3

Zahlreiche Gene sind als Zielgene von UTX/JMJD3 in verschiedenen Zellen identifiziert worden. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit untersuchten Zielgene eingegangen.

1.2.6.1 HOX-Gene

HOX (*homeobox*)-Gene sind Regulatoren der anterior-posterior Achse während der Embryogenese (Morgan, 1997). Sie sind in vier Clustern auf verschiedenen Chromosomen angeordnet, die mit *HOX A-D* bezeichnet werden. Ihre Expression wird durch antagonistische Effekte von PRC2 und UTX/JMJD3 geregelt (Agger et al., 2007; Lan et al., 2007). Im adulten Organismus bleiben HOX Gene weiter für die Gewebedifferenzierung relevant. Entsprechend sind HOX Gene auch in die Entstehung zahlreicher Karzinomentitäten involviert. So wurde beispielsweise eine vermehrte Expression von *HOXC* Genen in Prostatakarzinomen und Lungenkarzinomen beobachtet (Abe et al., 2006; Miller et al., 2003). Für das Harnblasenkarzinom wurde eine vermehrte Expression bestimmter *HOXC* Gene, besonders deutlich von *HOXC6* und *HOXC11* nachgewiesen (Cantile et al., 2003; Heubach et al., 2015). Am 3'-Ende der Gencluster angeordnete HOX Gene wie *HOXC11* und *HOXC13* werden physiologisch in posterioren Körpersegmenten und Organen exprimiert.

1.2.6.2 RBBP4

RBBP4 (*retinoblastoma binding protein 4*) ist ein Histon bindendes Protein, welches zum Retinoblastomprotein (pRB)-Netzwerk gehört. Es interagiert als Bestandteil eines Proteinkomplexes direkt mit dem Tumorsuppressor pRB und ist auf diese Weise an der Aufrechterhaltung der Zellzykluskontrolle beteiligt. Weiterhin ist RBBP4 ein Bestandteil des PRC2 Komplexes, zu dem auch EZH2 gehört. Durch CHIP-qPCR konnte festgestellt werden, dass UTX in Mausfibroblasten viele der RB-Familie zugehörige Gene, darunter auch *RBBP4* reguliert. Diese Gene sind in verschiedenen Karzinomen sowie Leukämien und Lymphomen herunterreguliert (Kuzmichev et al., 2002; Wang et al., 2010). Auch in Urothelkarzinomzellen weist *RBBP4* eine signifikant verminderte Expression auf (Murday, 2016).

1.2.6.3 HBP1

HBP (*high mobility group box transcription factor*) 1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher ebenfalls zur RB-Familie gehört. Es wird angenommen, dass RB1, HBP1 und RBBP 4-9 in einem Netzwerk agieren und durch UTX in ihrer Expression beeinflusst werden (Wang et al., 2010). Mutationen und verminderte Expression von HBP1 wurden in invasiven Mammakarzinomen beschrieben, so dass für HBP1 eine Funktion als Tumorsuppressor postuliert wurde (Paulson et al., 2007). In Urothelkarzinomzellen konnte eine signifikant verminderte Expression von HBP1 auf mRNA Ebene nachgewiesen werden, die mit der UTX Expression korreliert (Murday, 2016).

1.3 Ziele der Arbeit

DNA-Methylierung und Histonmodifikation als epigenetische Regulationsmechanismen standen in der letzten Dekade im Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten. Es stellte sich heraus, dass epigenetische Prozesse eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Karzinomen einnehmen können. Aufgrund der verminderten Expression von UTX und JMJD3 und erhöhten Expression von EZH2 in einigen Karzinomentitäten wurden diesen Proteinen tumorsuppressive beziehungsweise onkogene Eigenschaften zugesprochen. In einer vorangegangenen Arbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf konnten konform zu den Ergebnissen in der Fachliteratur eine verminderte Expression von UTX/JMJD3 und eine erhöhte Expression von EZH2 nachgewiesen werden. Im Hinblick darauf lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der funktionellen Bedeutung der veränderten Expression dieser drei Gene auch im Hinblick auf mögliche Zielgene. Von daher setzten sich die zentralen Ziele der Arbeit aus den folgenden Fragestellungen zusammen:

Welche Veränderungen ergeben sich aus der Überexpression (durch Transfektion von UTX und JMJD3 Expressionsplasmiden) beziehungsweise der Verminderung („Knockdown“ - durch Behandlung der Zellen mit spezifischer siRNA) von UTX und JMJD3 in Urothelkarzinomzellen und normalen Urothelzellen?

Welche Auswirkungen hat dies auf die Zellen, speziell deren Vitalität, Proliferation und Klonogenität?

Welche Auswirkungen haben die Überexpression beziehungsweise der Knockdown von UTX und JMJD3 auf deren mögliche Zielgene?

2 Material und Methoden

2.1 Humane Zelllinien

2.1.1 Harnblasenkarzinomzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien wurden von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Research Center, Rye, NY, USA und von Dr. M.A. Knowles, ICRF Cancer Research Unit, Leeds, UK zur Verfügung gestellt. Ihre Identität wurde von der DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft und laufend durch Genotypisierung mittels Minisatelliten-Analyse (Institut für Rechtsmedizin, Prof. Huckenbeck) verifiziert.

Zelllinie	Tumor-stadium, Tumorgrad	Rb mRNA/ Protein	Ursprung	Geschlecht	Alter
Papillär:					
BFTC905	pTaG3	+	Primärtumor Blase	w	51
RT112	G2	+	Primärtumor Blase	w	-
SW1710	G3	+	Blase	w	84
J82	G3	del	Primärtumor Blase	m	58
Muskelinvasiv:					
5637	G2	-	Primärtumor Blase	m	68
639v	G3	+/-	Primärtumor Ureter	m	69
Ku 19-19	pT3bG3	+	Blase	m	76
VmCub1	-	+	Primärtumor Blase	m	-

2.1.2 Prostatakarzinomzelllinie

Die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurde von Prof. Culig, Urologisches Forschungslabor der Universität Innsbruck, bereit gestellt.

Zelllinie	Tumorstadium, Tumorgrad	Ursprung	Geschlecht	Alter
Epithelial:				
PC-3	G4	Knochenmetastase	m	62

2.1.3 Immortalisierte Zelllinien

Die Zelllinie HEK293 wurde von Prof. Kolb-Bachofen von der ehemaligen Forschungsgruppe Immunbiologie der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Telomerase-immortalisierte Zelllinie TERT-NHUC wurde von Prof. M.A. Knowles, University of Leeds, bereitgestellt.

Zelllinie	Ursprung	Alter	Besonderheit
Epithelial:			
HEK293	Niere	Fötus	Transformiert mit Adenovirus 5 DNA
TERT-NHUC	Urothel	-	Telomerase-immortalisiert

2.2 Harnleiter aus Nephrektomien

Die verwendeten Harnleiter wurden bei Nephrektomien wegen Nierenkarzinomen in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf entnommen, wenn dadurch keine Beeinträchtigung der Therapie oder Diagnostik erfolgte (Ethikvotum Nr. 1788).

2.3 Plasmide

Es kamen folgende Plasmide zum Einsatz.

Plasmide:		
pCMV-HA-UTX Dr. Kristian Helin, Universität Kopenhagen	addgene	Cambridge,USA
pCS2-UTY-F Dr. Kai Ge, NIDDK USA	addgene	Cambridge,USA
pCMV-HA-JMJD3 Dr. Kristian Helin, Universität Kopenhagen	addgene	Cambridge,USA
pCS2-JMJD3-F Dr. Kai Ge, NIDDK USA	addgene	Cambridge, USA

Transfektionsreagenz		
X-tremeGene 9 DNA Transfection Reagent	Roche	Mannheim, Deutschland
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Gibco	UK

2.4 Bakterienmedien

LB-Medium	**LB-Agar**
25 g Luria Broth Base	30,5 g Luria Broth Agar
dH_2O ad 1000 ml	dH_2O ad 1000 ml
Ampicillin 50 mg/ml	Ampicillin 100 mg/ml

2.5 Small interfering RNA

Es kamen folgende small interfering Ribonukleinsäuren gegen UTX und Transfektionsreagenzien zum Einsatz:

siRNA	
Stealth siRNA UTXHSS 111232	Invitrogen
Stealth siRNA UTXHSS 187656	Invitrogen
Stealth™ RNAi Negative Control Low GC Duplex	Invitrogen

Transfektionsreagenz	
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Gibco

2.6 Chemikalien

6x DNA Loading Dye	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Collagen from human placenta	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DOC	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
EDTA	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
(-)N-Epinephrine	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol	VWR	Frankreich
G418-Sulfate	PAA	UK
	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Giemsa Reagenz	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
HCl 0,5 mol/l	Roth	Karlsruhe, Deutschland
HCl 25%	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Lämmli Sample Buffer	Biorad	München, Deutschland
Magermilchpulver	Neuform	Lüneburg, Deutschland
Methanol	VWR	Frankreich
NaCl	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
NP-40	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Page Ruler ™ Prestrained Protein Ladder	Thermo Scientific	Litauen
PBS	Biochrom	Berlin, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
TAE	5 Prime	Hamburg, Deutschland
TEMED	Bio-Rad	Hercules, USA
Tris	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
10x Tris/Glycin/SDS Buffer	Bio-Rad	München, Deutschland
Tween 20	Merck Schuchardt OHG	Hohenbrunn, Deutschland

2.7 Molekularbiologische Kits

BCA Protein Assay	Pierce, Rockford	USA
CellTiter-Glo	Promega	USA
ECL Select ™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	UK
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden	Deutschland
QIAfilter ™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden	Deutschland
QIAshredder	Qiagen, Hilden	Deutschland
QuantiTec Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden	Deutschland
QuantiTec SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden	Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden	Deutschland
ZR Plasmid miniprep™-Classic Kit	Zymo Research	USA

2.8 Zellkultur

Zellkulturflaschen- und Schalen	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
BPE (Bovine Pituitary Extratct)	Gibco	UK
DMEM	Gibco	UK
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
EGF (Epidermal Growth Factor)	Gibco	UK
Fötales Kälberserum	Biowest	Nuaillé, Frankreich
Hydrocortison	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
ITS (Insulin/Transferrin/ Selenium)	Gibco	UK
KSFM	Gibco	UK
PBS	Biochrom	Deutschland
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMax-I	Gibco	UK
Trypsin-EDTA-Solution	Sigma-Aldrich	Deutschland
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich	Deutschland
Versen-EDTA	Biochrom	Deutschland

2.9 Lösungen für Western-Blot-Analyse

2.9.1 Protein-Lysis-Puffer (pH 7,6)

150 mM NaCl
1% NP-40
0,5% DOC
0,1% SDS
1 mM EDTA
50 mM Tris pH 7,6
dH_2O ad 100 ml
Protease Inhibitor 10 µl/ml (kurz vor Gebrauch hinzufügen)
Ggf. Phosphatase Inhibitor 10 µl/ml (kurz vor Gebrauch hinzufügen)

Lagerung bei -20°C

2.9.2 Elektrophoresegel

Es wurden 8% Gele hergetellt.

Trenngel	**Sammelgel**
4,6 ml H_2O	3,4 ml H_2O
2,7 ml Polyacrylamid 30%	0,83 ml Polyacrylamid 30%
2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8	0,63 ml 1M Tris pH 6,8
0,1 ml 10% SDS	0,05 ml 10% SDS
0,1 ml 10% APS	0,05 ml 10% APS
0,01 ml TEMED	0,005 ml TEMED

2.9.3 Pufferlösungen

Laufpuffer (pH 8,3)	**Blottingpuffer**	**Blockingpuffer**
10x Tris/Glycin/SDS Buffer (Biorad)	28,4 mM Tris	0,1% Tween 20
	192 mM Glycin	TBS
	10% Methanol / Ethanol	5% Magermilchpulver

2.9.4 Waschlösung

TBS-Puffer (pH 7,4)
150 mM NaCl
10 mM Tris
0,1% Tween 20

2.9.5 Protein-Stripping-Lösung (pH 2,2)

1,5% Glycin
0,1% SDS
1% Tween 20
Aqua dest. ad 1 l
pH mit HCl auf 2,2 einstellen

2.9.6 Antikörperlösung

TBS
0,1% Tween 20
1% Magermilchpulver

2.9.7 Antikörper

Antikörper	**Hersteller**
Rabbit anti-UTX-Antibody	Bethyl
Rabbit polyclonal to KDM6B/JMJD3	Abcam
EZH2	Cell Signaling
α-Tubulin mouse IgG	Sigma-Aldrich
Goat-anti-Rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Goat-anti-Mouse-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.10 Primer für qRT-PCR

Name	**Sequenz**	**Annealing Temp. °C**
UTX F1	CGA AAA ACA AGC CGA AAC T	51
UTX R1	TAT CAA GAT GAG GCG GAT G	51
JMJD3 F1	GAG CCG GAC TTG TTC AAG A	55
JMJD3 R1	CCC TGG TAA GCG ATT TTC T	55
MKI67 F1	AGT GAA GGA GCA ACC GCA GT	57
MKI67 R1	ATA CAG TGC CGT CTT AAG GGA G	57
EZH2 F1	AAT GTG TCC TGC AAG AAC TG	56
EZH2 R1	CAT TTT TCT GCA CAG GAT CTT T	56
HBP1 F1	GGA CCA CCC TTT CTA TGT TA	54
HBP1 R1	GTA GAC ATA CAT CGC CAA TA	54
RBBP4 F1	CCC AGA ACC CTT GTA TCA TCG	57
RBBP4 R1	TTC TGA TGT CCA CGG AGA CG	57
HOX-C6 F1	CAG GAC CAG AAA GCC AGT ATC	59
HOX-C6 R1	TCT GGT ACC GCG AGT AGA TC	59

HOX-C11 F1	CCC GGA TGC TGA ACC TGA	59
HOX-C11 R1	AGC CGG TCT CTG CTC AGT	59
HOX-C13 F1	TCA GCG GGC ACC CGG AG	59
HOX-C 13 R1	CCG GTA GCT GCT CAC CTC G	59
TBP F1	ACA ACA GCC TGC CAC CTT A	55
TBP R1	GAA TAG GCT GTG GGG TCA GT	55

2.11 Materialien und Geräte

96 Well ELISA Microplates	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Allegra 25R Benchtop Centrifuge	Beckman Coulter™
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare,UK
Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA Easy Reader	SLT- Labinstruments, Österreich
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Biometra
Heraeus Kelvitron ® t	Thermo Scientific
Immobilon-P Membrane, PVDF	Millipore, USA
Innova 4200 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, USA
Kern Kompakte Präzisionswaage 440-33N	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG ® RCT	IKA- Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop Eclipse E 400	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Biorad
Nano-drop Photometer	Nanodrop Technologies,
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Viktor ^{2} 1420 Multilabel Counter	Wallac
Vortexer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK

2.12 Datenbanken

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

www.genecard.org

www.ensemble.org

https://cancergenome.nih.gov

2.13 Statistik

Zur Abschätzung der statistischen Signifikanz von Unterschieden wurde der studentische 2-seitige T-Test für nicht gepaarte Stichproben mittels Excel berechnet.

2.14 Kultivierung von Zellen

2.14.1 Kultivierung von humanen Harnblasen- und Prostatakarzinomzelllinien

Die Kultivierung von humanen Harnblasenkarzinomzelllinien erfolgte in DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*), welches mit 10% FCS (fötales Kälberserum) versetzt wurde. Die Harnblasenkarzinomzelllinie Ku 19-19, abweichend, sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurden in RPMI-Medium 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) mit einer Supplementierung von 10% FCS kultiviert. Die Zelllinien wuchsen in 175 cm^2 Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C sowie einem CO_2-Gehalt von 5%. Bei Erreichen einer ca. 80% Konfluenz wurden die Zelllinien im Verhältnis von 1:12 passagiert, mit Ausnahme der Zelllinie 639v, diese im Verhältnis von 1:18. Dabei wurden die Zelllinien nach dem Absaugen des alten Mediums zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und nachfolgend mit 2 ml 0,05% Trypsin-EDTA behandelt. Bei den Zelllinien BFTC905 sowie 5637 erfolgte vor der Trypsinierung eine zweiminütige Vorbehandlung mit 1% Versen zum besseren Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Nach einer kurzzeitigen Inkubation mit Trypsin bei 37°C wurde den abgelösten Zellen 12 ml frisches Medium zugesetzt. Die Zellen in der Suspension wurden durch wiederholtes Pipettieren vereinzelt. Wiederum 1 ml dieser Einzelzellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem frischen Medium überführt.

2.14.2 Kultivierung der humanen Nierenzelllinie HEK293

Die HEK293 Zelllinie wurde in DMEM mit 10% FCS in Kultur gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen durch einfaches Schütteln der Zellkulturflaschen vom Boden gelöst, da sie nur semiadherent waren. Die Zellsuspension wurde in ein Reagenzgefäß pipettiert und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:12 passagiert.

2.14.3 Kultivierung von TERT-NHUC

Normale humane uroepitheliale Zellen wurden in KSF-Medium kultiviert. Dabei wurden 500 ml Medium mit 25 mg BPE (*Bovine Pituitary Extract*) und 2,5 mg EGF (*Epidermal Growth Factor*) supplementiert. Für die TERT-NHUC Linie wurden weitere Supplemente in 50 ml Aliquots zugeführt, nämlich pro Liter 17,5 µg (-)N-Epinephrin, 16,5 µg Hydrocortison und 500 µg ITS (Insulin, Transferrin, Selenit). Die Zellkulturflaschen wurden 30 min lang bei Raumtemperatur mit Kollagen IV in 0,1% steriler Essigsäure beschichtet und dann drei Mal gründlich mit PBS gewaschen, um die Essigsäure zu entfernen. Zur Passagierung wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin 3 min bei 37°C inkubiert, so dass sie sich vom Flaschenboden lösten. Das doppelte Volumen an Trypsin-Inhibitor wurde zu der Zellsuspension hinzugefügt. Mit zusätzlichen 2 ml Medium wurden die Zellen in ein Reagenzgefäß überführt und bei 1000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, so dass die Zellen in frischem KSF-Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt werden konnten. Die Verdünnung erfolgte stets in einem Verhältnis von 1:3.

2.15 Anlage von Urothelprimärkulturen

Die Zellen aus Ureterpräparaten wurden in Zellkulturflaschen bereitgestellt. Nach Erreichen einer 80-90% Konfluenz wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml 0,05% Trypsin-EDTA behandelt und bei 37°C für zwei Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit der doppelten Menge des Trypsin-Inhibitors gestoppt. Nach Hinzufügen von frischem Medium wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und das Zellpellet nach Resuspension in KSFM in neue mit Kollagen-IV beschichtete Zellkulturflaschen überführt.

2.16 Kryokonservierung

Nach dem ersten Passagieren einer Zelllinie wurde eine Gefrierkultur zur längerfristigen Aufbewahrung angelegt. Dabei wurden die Zelllinien wie bereits in Punkt 2.14.1 beschrieben gewaschen und trypsiniert. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium aufgenommen, in ein Reagenzgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das verbleibende Zellpellet mit 1 ml auf Eis gelagertem Gefriermedium bestehend aus 90% FCS (fötales Kälberserum) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Lagerung in Kryoröhrchen erfolgte zunächst 5 min auf Eis, anschließend 24 h bei -20°C und weitere 24 - 48 h bei -80°C, bevor sie zur endgültigen Lagerung in einen Stickstofftank überführt wurden.

2.17 Auftauen von Zelllinien

Die aus dem Stickstofftank entnommen Zelllinien wurden zügig in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde im entsprechenden Medium (DMEM, RPMI 1640 oder KSFM) aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mittels Pasteur-Pipette abgesaugt und das Zellpellet mit frischen Medium resuspendiert und in eine 25 cm^2 oder 75 cm^2 Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

2.18 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermengt und vorsichtig zwischen der Zählkammer und einem darauf liegenden Objektplättchen pipettiert. Die Zellen, die sich innerhalb von vier Großquadraten befanden, wurden gezählt. Mit der folgenden Gleichung wurde die Zellzahl ermittelt:

$$Zellzahl = \frac{ausgezählte\ \ Zellen\ x\ a}{b(mm^2)\ x\ c(mm)}$$

a= Verdünnungsfaktor , b= Größe der Quadratfläche, c= Kammertiefe

2.19 Bakterienkulturen

Die Anzucht der mit den Plasmiden transfizierten Bakterien diente zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA. Die von der Organisation *addgene* erhaltenen Bakterienstichkulturen mit den Plasmiden pCMV-HA-UTX und pCMV-HA-JMJD3 wurden mittels 3-Ösenausstrich auf LB-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Der LB-Agar enthielt eine Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml, um die Bakterien mit Plasmiden, welche eine Ampicillinresistenz aufwiesen, zu selektionieren. Anschließend wurden einzelne Bakterienkolonien mittels steriler Impfnadel in sterile Reagenzgefäße mit 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die so gewonnenen Minikulturen konnten für eine Plasmid-Minipräparation oder für die Herstellung von Maxikulturen genutzt werden. Die Maxikulturen wurden analog zu den Minikulturen hergestellt, jedoch mit 200 ml LB-Medium. Aus den Maxikulturen erfolgte eine Plasmid-Maxipräparation sowie die Anlage von Gefrierkulturen. Für diesen Zweck wurde 1 ml der frischen Maxikulturen in einer 25% Glycerinlösung bei -70 gelagert.

2.20 Präparation von Plasmiden

Die Plasmid-DNA aus den oben beschriebenen Minikulturen wurde mit dem ZR Plasmid Miniprep™-Classic Kit gemäß den Herstellerangaben isoliert. Für die Maxipräparation der Plasmid-DNA diente das QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Bei diesen Verfahren wird eine Kombination aus einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer Säulenchromatographie angewendet. Die

Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch mittels Nanodrop (Nanodrop Technologies). Die Überprüfung der Plasmide erfolgte zum einen mittels Restriktionsverdau, zum anderen mittels Sequenzierung.

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde im Biologisch Medizinischen Forschungslabor (BMFZ) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger durchgeführt.

2.20.1 Restriktionsverdau von Plasmiden

Beim Restriktionsverdau wurden für jedes Plasmid drei Ansätze mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen angefertigt. Jeder Ansatz bestand aus einem Gesamtvolumen von 20 µl und enthielt neben den spezifischen Restriktionsenzymen die dazugehörigen Puffer, steriles H_2O sowie pro Ansatz 500 ng Plasmid-DNA. Nach einer einstündigen Inkubation der Ansätze auf einem Thermomixer bei 37°C wurden die Enzyme 10 min bei 65°C inaktiviert. Anschließend wurden die einzelnen Ansätze nach Zugabe von Ladepuffer auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Referenz wurde ein DNA-Größenmarker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas) aufgetragen. Zur Herstellung der Gele wurde das Agarosepulver in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung des Agarosegels wurde die Kammer mit 1 x TAE-Puffer befüllt und die jeweiligen Proben aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V. Nach ca. einer Stunde wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad inkubiert und die der Größe nach aufgetrennten DNA-Fragmente wurden abschließend mit einer Geldokumentationsanlage betrachtet und fotographisch dokumentiert.

2.21 Präparation von RNA

Die Gewinnung von RNA erfolgte aus in 6-Lochplatten kultivierten Zelllinien 24 h, 48 h oder 72 h nach entsprechender Behandlung. Zunächst wurde jedes Loch mit 2 ml PBS gewaschen und nachfolgend mit 350 µl RLT-*Buffer* - versetzt mit β-Mercaptoethanol - lysiert. Die nachfolgende Präparation geschah nach

Angaben des Herstellers mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die RNA wurde im letzten Schritt mit 36 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die quantitative und qualitative Bestimmung der RNA wurde spektralphotometrisch mit dem Nanodrop (Nanodrop Technologies) ermittelt. Dabei wurde die Qualität der RNA aus dem Quotienten der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm bestimmt, da in diesen Bereichen die Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren beziehungsweise Proteinen liegen. Ein Wert von 1,8 bis 2,0 weist darauf hin, dass keine störende Verunreinigung durch Proteine vorliegt.

2.22 Präparation von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die in 6-Lochplatten kultivierten Zelllinien mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen und anschließend mit je 100 µl Protein-Lysis-Puffer pro Loch lysiert. Die Zellen wurden auf Eis mittels Zellschaber von dem Boden der 6-Lochplatte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach der gründlichen Homogenisierung auf dem Laborrüttler wurden die Proteinlysate zunächst ca. ½ h auf Eis und anschließend in einer -80°C Kühltruhe gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Pierce BCA-Protein-Assay. Dabei wurden die Proteinlysate zunächst 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt wobei jeweils 10 µl dieser Verdünnung in ein Loch einer 96-Lochplatte pipettiert wurden. Anschließend wurden 200 µl BCA-Reagenz pro Loch hinzu pipettiert, wobei Reagenz B vorab mit Reagenz A 1:50 verdünnt wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm am ELISA Reader gemessen. Alle Bestimmungen erfolgten in Doppelwerten. Als Negativkontrolle diente RIPA-Puffer und als Standard BSA (*Bovine Albumin*) in einer Verdünnungsreihe.

2.23 Transfektion von siRNA

Folgende humane Harnblasenkarzinomzelllinien wurden mit siRNA gegen UTX behandelt: BFTC905, 5637, VmCub1. Zunächst wurden die Zellen in 6-Lochplatten 24 h ausgesät und inkubiert. Anschließend wurden sie mit siRNA gegen UTX oder einer Negativkontrolle (Stealth™ RNAi Negative Control Low GC Duplex) mit einer Konzentration von 10 nM transfiziert. Es standen drei verschiedene *small interfering* Ribonukleinsäuren gegen UTX zur Verfügung, wobei in einem Vorversuch nur zwei von ihnen eine gewünschte Herunterregulation von UTX auf RNA-Ebene hervorriefen, so dass in den folgenden Versuchen nur mit diesen gearbeitet wurde: Stealth siRNA UTXHSS 111232 (si32), Stealth siRNA UTXHSS 187656 (si18). Es wurden 10 nM siRNA und 3 µl Transfektionsreagenz in 250 µl serumfreiem Medium (Opti-MEM®) verdünnt und jeweils pro Loch verteilt. Um die Zytotoxizität des Transfektionsreagenzes zu reduzieren fand ein Mediumwechsel nach 24 h statt. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen vor der Gewinnung von RNA beziehungsweise von Protein nach 24 h, 48 h oder 72 h mit PBS gewaschen. Für die Gewinnung von RNA wurden biologische Triplikate angefertigt. In jedem Ansatz wurden zusätzlich unbehandelte Zellen kultiviert.

2.24 Transfektion von Plasmiden

Die Transfektion der Plasmide wurde mit den nachfolgend genannten Zelllinien durchgeführt: BFTC905, 639v, Ku 19-19, VmCub1 und PC-3. Dafür wurden die Zelllinien in 6-Lochplatten ausgesät und bei 37°C 24 h inkubiert. Im Anschluss fand die Transfektion mit den vier zur Verfügung stehenden Plasmiden (pCMV-HA-UTX, pCMV-HA-JMJD3, pCS2-UTY-F und pCS2-JMJD3-F) sowie einem Leervektor (pCMV-Neo-Bam) statt. Die Plasmid-DNA und das Transfektionsreagenz wurden im Verhältnis 2:3 eingesetzt. Dabei wurden die beiden Komponenten in 100 µl serumfreiem Medium (Opti-MEM®) verdünnt. Es wurde jeweils 1 µg Plasmid pro Loch einer 6-Lochplatte transfiziert. Zusätzlich wurden gänzlich unbehandelte Zellen als Negativkontrolle mitgeführt.

2.25 PCR

2.25.1 Reverse Transkription

Um PCR-Analysen von RNA durchführen zu können, ist eine Umschreibung zu cDNA notwendig. Bei dieser Reaktion nutzt das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mRNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Strangs (cDNA). Dabei entsteht zunächst ein doppelsträngiges DNA-RNA-Hybrid. Eine spezifische RNase H baut die RNA ab, so dass man als Produkt eine einzelsträngige cDNA erhält. Die Synthese der cDNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Um die Degradation der RNA zu verhindern, wurden die Ansätze auf Eis hergestellt. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit 2 µl gDNA Wipeout-Buffer sowie einer entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl gebracht. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 42 °C inkubiert. Hiernach wurde ein Master-Mix aus 1 µl Reverse Transkriptase, 4 µl 5 x RT-Buffer und 1 µl Primermix zusammengestellt. Um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erreichen, wurden 6 µl des Mastermixes zu den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt. Die Proben wurden für 15 min bei 42°C und abschließend für 3 min bei 95°C zur Inaktivierung der Reaktion inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert. Für die weitere Verwendung für eine qRT-PCR wurde die cDNA in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt.

2.25.2 Quantitative *real-time* PCR (qRT-RCR)

Die quantitative *real-time* PCR wurde am PCR-Gerät (ABI7500) durchgeführt. Als Referenz diente das *Housekeeping*-Gen *TBP* (TATA-binding protein). Bei der qRT-PCR findet über mehrere Zyklen eine Vermehrung der oben genannten cDNA statt. Durch die Zugabe von SYBR-Green - einem an doppelsträngige DNA assoziierenden Fluoreszenzfarbstoff - kann die Zunahme des PCR-Produktes durch die Zunahme der Fluoreszenz quantitativ erfasst werden. Um die Spezifität des PCR-Produkts zu bestätigen und etwaig

entstandene Primerdimere auszuschließen, wird am Ende der PCR-Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Jeder Versuchsansatz bestand aus einem Gesamtvolumen von 20 µl:

SYBR-Green-haltiges Reaktionsmix	10 µl
Steriles H_2O	8,8 µl
Primer Forward	0,1 µl
Primer Reverse	0,1 µl
cDNA	1 µl

Es wurde stets ein Master-Mix aus den oben genannten Komponenten angefertigt und die jeweilige cDNA abschließend zu den einzelnen Reaktionen gegeben.

Bedingungen der *real time* PCR:

	Temperatur (°C)	**Zeit**	**Zyklen**
Denaturierung	95	15 min	
Amplifizierung	95	15 sec	40
	primerspezifische Anlagetemperatur	20 sec	
	72	30 sec	
Schmelzkurvenanalyse	95		
	60-95	kontinuierlich	
Kühlung	60		

2.26 Immunoblot

Zur Herstellung von 8% SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden die einzelnen Komponenten des Trenngels in einem Reagenzgefäß zusammenpipettiert und unmittelbar zwischen zwei fixierte Glasplatten gegossen. Zur Glättung des Gelrandes wurde auf das Trenngel etwas Ethanol pipettiert. Das Trenngel härtete 30 min bei Raumtemperatur aus. Nachfolgend wurde das Ethanol abgegossen und die Mischung für das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Für die späteren Probetaschen wurde in das Sammelgel ein Kamm (für zehn Probetaschen) eingesetzt. Nach weiteren 30 min standen die Gele zur sofortigen Verwendung zur Verfügung oder konnten bis zu 14 Tagen bei +4°C aufbewahrt werden.

Es wurden 10-15 µg Proteinlysat eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit RIPA-Lysis-Puffer aufgefüllt. Ein Master-Mix von Lämmli-Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol wurde angefertigt, zu den einzelnen Proteinlysaten auf ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe pipettiert und gemischt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert, zentrifugiert und in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Die Geltaschen wurden vorher mit einer Spritze mit einer dünnen Kanüle mit Laufpuffer ausgespült. Die Elektrophorese wurde in Mini-PROTEAN Tetra Cell Kammern (Biorad) bei 150 V auf Eis durchgeführt. Nach der Proteinauftrennung wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten entnommen und das Trenngel vom Sammelgel getrennt. Die vorher auf die Größe des Gels zurechtgeschnittenen PVDF-Membran, das ebenfalls zurechtgeschnittene Whatman-Papier, die Schwämme und das Gel wurden in den Blottingpuffer gelegt. Die PVDF-Membran wurde vorher 5 min in Methanol equilibriert und anschließend 5 min in dH_2O gespült. Die Blottingkammer wurde nach dem folgenden Prinzip zusammengebaut: Auf die Kathodenseite der Kammer wurde zunächst ein Schwamm, darauf das Whatmanpapier und anschließend das Gel luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Auf das Gel wurden die PVDF-Membran, ein weiteres Whatmanpapier sowie noch ein Schwamm gelegt. Die Kammer wurde verschlossen und in kalten Blottingpuffer getaucht. Die Proteine wurden 90 min bei 180 mA auf Eis transferiert. Nachfolgend wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit dem Blocking-Puffer geblockt bevor sie mit dem Primärantikörper über Nacht bei +4°C inkubiert wurde. Die Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:2000 (Rabbit anti-UTX-Antibody), 1:1000 (Rabbit polyclonal to KDM6B/JMJD3) oder 1:5000 (EZH2) verwendet. Am nächsten Tag wurden die Membranen vier Mal für zehn Minuten mit der Waschlösung gewaschen. Hiernach wurden die Membranen 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden in den folgenden Verdünnungen eingesetzt: 1:5000 - 1:20000 (Goat-anti-Rabbit-IgG-HRP) und 1:25000 (Goat-anti-Mouse-IgG-HRP). Nach weiteren vier Waschvorgängen wurde die Membran mit 600 µl (300 µl Lösung A und 300 µl Lösung B) des ECL Select Western blotting detection kits ca. 3 min lang inkubiert. Die Membran wurde zwischen zwei Folien luftblasenfrei in eine Röntgenkassette eingelegt und im Dunkelraum

gegenüber einem ECL-Film exponiert. Die Entwicklung erfolgte in selbst hergestellten Lösungen. Als Kontrolle diente stets α-Tubulin in einer Antikörper-Verdünnung von 1:10000 (α-Tubulin mouse IgG) und 1:70000 (Goat-anti-Mouse-IgG-HRP).

2.27 Klonogenitätsassay und Isolation von Zellklonen

Der Klonogenitätsassay zeigt die Fähigkeit von Zellen an, nach einer spezifischen Behandlung - in diesem Fall der stabilen Transfektion mit den Plasmiden und anschließender Selektion - zu überleben und Klone zu bilden. Der Assay wurde mit den folgenden humanen Harnblasenkarzinomzelllinien durchgeführt: BFTC905, 639v, VmCub1, Ku 19-19. Die Zelllinien wurden mit den folgenden Zellzahlen zunächst in 6-Lochplatten ausgesät: BFTC905, 639v und VmCub1: 25 000 Zellen/ml, Ku 19-19: 5000 Zellen/ml. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Plasmide in biologischen Duplikaten. Es wurden die folgenden Plasmide transfiziert: pCMV-HA-UTX, pCMV-HA-JMJD3 und der Leervektor pCMV-Neo-Bam, die alle eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin enthalten. Zusätzlich wurde eine nicht transfizierte Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Harnblasenkarzinomzellen 1:1 von den 6-Lochplatten auf 10 cm^2 Zellkulturschalen übertragen. Die Selektion wurde mittels G418 nach weiteren 24 h begonnen. G418 ist ein Analog von Neomycinsulfat, einem Antibiotikum, welches der Wirkstoffgruppe der Aminoglykoside angehört. Dabei wurde die entsprechende Konzentration von G418 für jede Zelllinie in einem Vorversuch ermittelt. Die Konzentrationen wurden nach Zelllinie angepasst: BFTC905: 1250-1500 µg/ml, 639v: 1250 µg/ml, VmCub1: 1300 µg/ml, Ku 19-19 750 µg/ml. Die Zellen wuchsen unter regelmäßigen Wechsel des Mediums ca. 2-3 Wochen bei 37°C, bis sich makroskopisch sichtbare Kolonien gebildet haben. Anschließend wurden die Zellen mit einer Giemsa-Lösung gefärbt. Zuletzt wurden die Klone gezählt und fotografisch dokumentiert.

Für die Isolation einzelner Klone wurde nach Erreichen einer makroskopisch sichtbaren Größe kleine sterile Filterpapierstreifen zunächst für einige Minuten

in Trypsin gelegt und schließlich exakt über einzelne Kolonien positioniert. Nach ca. 5 min wurden die nun auf den Filterpapierstreifen anhaftenden Zellen in eine 24-Lochplatte übertragen. Sie wuchsen weiterhin im Selektionsmedium. Sobald die Zellen in der 24-Lochplatte präkonfluent gewachsen waren, wurden sie in eine 25 cm^2-Zellkulturflasche mit Selektionsmedium überführt. Nach Erreichen der Präkonfluenz wurden die Zellen in diesen Flaschen trypsiniert, zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet zum einen für die Gewinnung von RNA und zum anderen für die Anlage von Gefrierkulturen genutzt. Bei der anschließenden qRT-PCR wurde ermittelt, welche Klone das transfizierte Gen tatsächlich vermehrt exprimierten. Diese Klone wurden zur Gewinnung von Proteinen wiederum in Kultur gebracht.

2.28 Giemsa-Färbung

Zunächst wurde das alte Medium aus den 10 cm^2 Zellkulturschalen abgesaugt; die Zellen wurden dann mit PBS und nachfolgend mit einer 1:1 Mischung aus PBS und Methanol gewaschen. Hiernach wurden die Zellklone durch eine 10-minütige Inkubation mit 100% Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die 2-minütige Färbung mit einer Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung). Zu der Giemsa-Lösung wurde das doppelte Volumen an dH_2O hinzugefügt und weitere 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend abgesaugt. Die Zellkulturschalen wurden abschließend nochmals mit dH_2O gewaschen, bevor sie mit Leitungswasser befüllt und 30 min stehen gelassen wurden, damit sich störende Farbpartikel lösen konnten. Nach dem Trocknen der Farbe konnten die Schalen fotografiert und die Klone ausgezählt werden.

2.29 Vitalitätsassay

Der Vitalitätsassay diente zur Erfassung der Veränderung der Lebensfähigkeit der Zellen, hier nach Behandlung mit siRNA oder der Transfektion mit den Plasmiden. Dabei kam das CellTiter-Glo® Luminescent Kit (Promega) zur Anwendung. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der Bestimmung vitaler Zellen

über die Menge des vorhandenen ATP. Hierbei werden die Zellen lysiert und das vorhandene ATP wird von Luciferasen bei der Oxygenierung vom Luciferin zu Oxyluciferin verbraucht. Je mehr lebende Zellen und somit ATP vorhanden ist, desto größer ist die gemessene Lumineszenz.

Der Vitalitätsassay wurde an den folgenden Zelllinien durchgeführt: 5637, VmCub1, BFTC905 und 639v. Diese wurden zunächst in biologischen Duplikaten in 6-Lochplatten ausgesät und entsprechend behandelt. Nach 72 h erfolgte die Messung der Zellviabilität. Dabei wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300 µl Trypsin pro Loch vom Boden gelöst. Es wurden 700 µl DMEM hinzugefügt und durch mehrmaliges Pipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt. Nachfolgend wurden 50 µl dieser Zellen in eine 96-Lochplatte pipettiert. Anschließend wurden 50 µl vom CellTiter-Glo® Reagenz pro Loch hinzugefügt und 2 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator lysiert. Danach wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgt die Messung der Lumineszenz am Luminometer (Victor). Als Kontrolle diente eine Mischung aus Trypsin (30%) und DMEM (70%) um einen Wert für die Hintergrundlumineszenz zu erhalten. Die Bestimmung erfolgte in technischen Quadruplikaten.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Analysen

3.1.1 Überexpressionsanalysen

3.1.1.1 Nachweis der Überexpression

Da UTX und JMJD3 mRNAs in zahlreichen Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zu benignen Urothelzellen vermindert exprimiert sind, wurden die Effekte einer transienten oder stabilen Überexpression beider Gene in Karzinomzelllinien untersucht. Die transiente Transfektion wurde mit vier verschiedenen Plasmiden (siehe 2.24) in der Urothelkarzinomzelllinie VmCub1 sowie der immortalisierten Nierenzelllinie HEK293 durchgeführt. Es wurden jeweils ein Plasmid für UTX (pCMV-HA-UTX) und für UTY (pCS2-UTY-F) sowie zwei verschiedene Plasmide für JMJD3 (pCMV-HA-JMJD3 und pCS2-JMJD3-F) transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor (pCMV-Neo-Bam). Der Erfolg der Transfektion wurde zunächst durch Messung der Genexpression auf mRNA-Ebene überprüft. Anschließend wurde die Proteinkonzentration von UTX und JMJD3 mittels Immunoblot überprüft.

Eine Überexpression der jeweiligen mRNA wurde für UTX und JMJD3 im Vergleich zu nicht transfizierten oder mit dem Leervektor transfizierten Zellen in beiden Zelllinien erreicht, wobei die Transfektion von JMJD3 in beiden Zelllinien eine vielfach höhere Expression erbrachte als die von UTX. In der Zelllinie HEK293 erreichte die Expression der mRNA von UTX ein ca. 4-fach und der von JMJD3 ein ca. 16-fach höheres Niveau als in unbehandelten Zellen. In der Zelllinie VmCub1 wurde UTX nach Transfektion ca. 50-fach stärker und JMJD3 ca. 200-fach stärker exprimiert. Insgesamt lieferte die Transfektion der Zelllinie VmCub1 eine höhere Expression von UTX und JMJD3 als die Transfektion von HEK293 (ca. 12-13-fach) (Abb. 3). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bekannt hohen Transfektionseffizienz von VmCub1 Zellen.

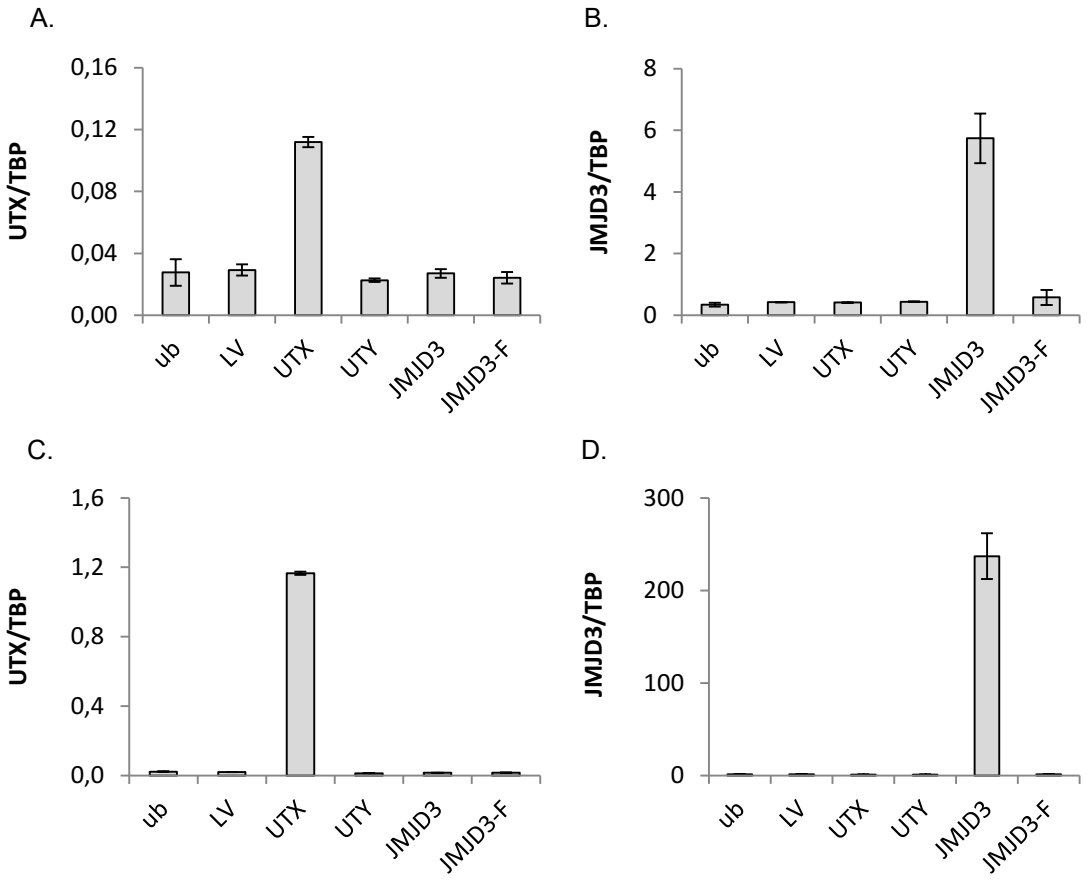


Abb. 3 Expression von *UTX* und *JMJD3* nach Überexpression

Expression der mRNAs von *UTX* (A), (C) und *JMJD3* (B), (D) relativ zu TBP ermittelt mittels qRT-PCR in den Zelllinien HEK293 (A), (B) und VmCub1 (C), (D) nach transienter Transfektion von UTX, UTY oder JMJD3 Expressionsplasmiden.

Nachdem die Transfektion erfolgreich zu einer vermehrten Expression von UTX bzw. JMJD3 mRNA geführt hatte, wurde die Expression der beiden Gene auch auf Proteinebene überprüft. Es zeigte sich, dass in der Zelllinie VmCub1 die Expression von UTX auf Proteinebene konform zu der RNA-Expression erhöht war. Zum Vergleich dienten die mit dem Leervektor transfizierten Zellen derselben Zelllinie (Abb. 4).

Auf dem gleichen Blot wurden Proteinextrakte aus weiteren unbehandelten Urothelkarzinomzelllinien, 5637, SW1710, 639v, J32 und BFTC905, sowie aus normalen immortalisierten humanen uroepithelialen Zellen (NHU-TERT) und einer Primärkultur normaler Urothelzellen (UP233) aufgetragen. Es wird deutlich, dass die Expression der UTX mRNA in den Urothelkarzinomzelllinien

nicht immer gleichsinnig mit der des Proteins verläuft, wie man am Beispiel von 639v sehen kann. Obwohl in dieser Zelllinie die mRNA Expression im Vergleich zu den UPs deutlich erniedrigt ist, zeigt sich eine relativ starke Expression von UTX auf Proteinebene. Das umgekehrte Beispiel ist bei 5637 zu sehen. Hier weist UTX eine relativ hohe Expression auf mRNA-Ebene auf, jedoch ist die Expression auf Proteinebene nicht im gleichen Maße erhöht. Doppelbanden bei einigen Zelllinien könnten durch posttranslationale Modifikationen zustande kommen, sind jedoch auch plausibel durch Spleißvarianten von UTX zu erklären. Insgesamt gibt es 14 Spleißvarianten von UTX, von denen 10 proteinkodierend sind. Die Doppelbanden könnten am ehesten den Transkripten KDM6A-201 und KDM6A-202 entsprechen (www.ensembl.org).

Darüber hinaus wurde auch der Gegenspieler von UTX, EZH2, auf Proteinebene untersucht (Abb. 4). Bei der Zelllinie VmCub1 wurde keine veränderte Proteinexpression zwischen den mit UTX und dem Leervektor transfizierten Zellen festgestellt. Eine kurzfristige Überexpression scheint demnach keine Gegenregulation in Gang zu setzen. Man erkennt jedoch, dass EZH2 in Tumorzelllinien im Vergleich zu den normalen Urothelzellen eine erhöhte Expression aufweist, wie nach vorhergehenden Untersuchungen zu erwarten war (s. 1.2.5).

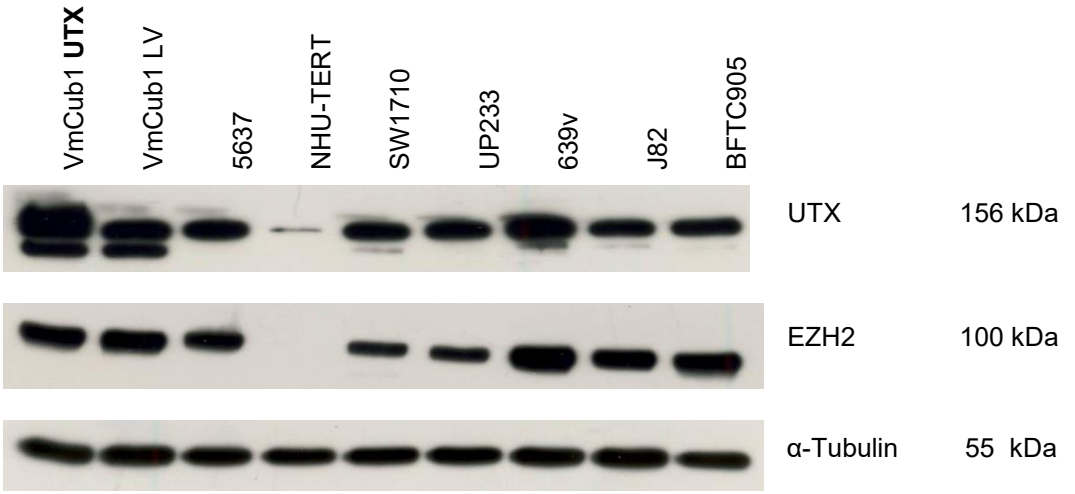


Abb. 4 Western-Blot von UTX und EZH2 nach Überexpression von UTX

Western-Blot von UTX und EZH2 in der Urothelkarzinomzelllinie VmCub1 nach Transfektion (Spuren links) eines UTX-Expressionsplasmids (UTX) oder eines Leervektors (LV). In den weiteren Spuren wurden die Urothelkarzinomzelllinien 5637, SW1710, 639v, J32 und BFTC905 sowie die Zelllinie NHU-TERT und normale Urothelzellen (UP233) analysiert. Als Ladungskontrolle diente α-Tubulin.

Auch in der Zelllinie HEK293 konnte eine deutliche Expression von UTX auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 5).

Überraschend ist jedoch die vorhandene - wenn auch schwache - Expression von UTX Protein in der Ku 19-19 Zelllinie, die eine Mutation von UTX aufweist (Abb. 5).

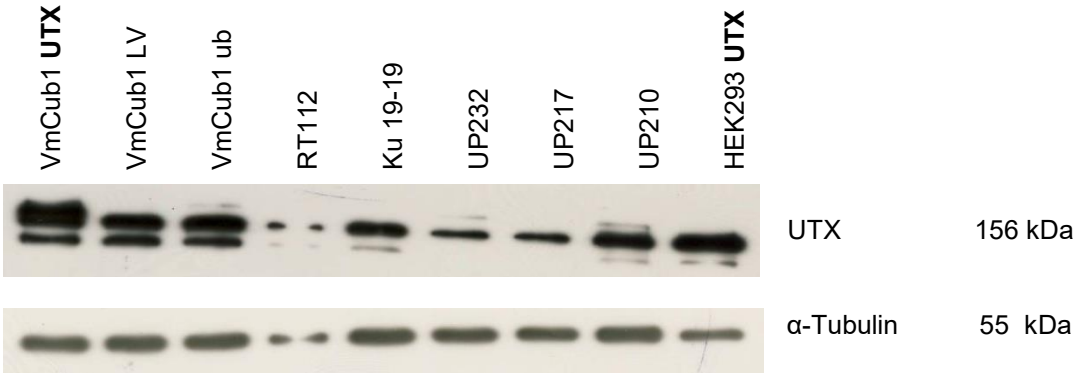


Abb. 5 Western-Blot von UTX nach Überexpression

Western-Blot von UTX in den Urothelkarzinomzelllinien VmCub1, RT112 und Ku 19-19 sowie den Kulturen normaler Urothelzellen UP32, 210 und 217 und in VmCub1 und HEK293 nach Überexpression von UTX (erste und letzte Spur), Leervektor (zweite Spur). Als Ladungskontrolle diente α-Tubulin.

Die Expression von JMJD3 auf Proteinebene war nur schwierig nachzuweisen. Eine naheliegende Erklärung dafür ist, dass JMJD3 in Urothelkarzinomzelllinien auf mRNA-Ebene meist nur ein sehr niedriges Expressionsniveau aufweist, so dass vermutet werden kann, dass die Expression auf Protein-Ebene ebenfalls stark vermindert ist. Lediglich nach Überexpression von JMJD3 durch Transfektion in der Zelllinie VmCub1 konnte eine neue Proteinbande in der erwarteten Größe (ca. 180 kDa) nachgewiesen werden. Somit war die Überexpression von JMJD3 zumindest in dieser Zelllinie offenbar erfolgreich (Abb. 6).

Abb. 6 Western-Blot von JMJD3 nach Überexpression

Western-Blot von JMJD3 in den Zelllinien VmCub1 und HEK293 nach Transfektion eines JMJD3-Expressionsplasmids (JMJD3) oder eines Leervektors (LV).

3.1.1.2 Vitalitätsassay nach transienter Überexpression

Um die Effekte der transienten Überexpression von UTX, UTY und JMJD3 genauer zu untersuchen, wurde 72 h nach Transfektion die Menge vitaler Zellen in den Zelllinien VmCub1 und 639v mithilfe des Cell-Titer-Glo Assays gemessen. Die Zelllinien wurden aufgrund der bekannt guten Transfektionseffizienz und der niedrigen Expression von UTX mRNA in der Zelllinie 639v ausgewählt. In dem Assay wird die Vitalität über die ATP-Menge in den Zellen bestimmt, die in einer von Luciferasen katalysierten Reaktion verbraucht wird. Die Zahl der Lichtsignale ist folglich über einen großen Konzentrationsbereich proportional zur Gesamtmenge an ATP.

In beiden Zelllinien wurde keine statistisch signifikante Veränderung der Zellvitalität der mit den vier Plasmiden transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen festgestellt (Abb. 7). Somit scheint eine transiente Überexpression der Gene die Lebensfähigkeit der Zellen nicht wesentlich zu beeinflussen.

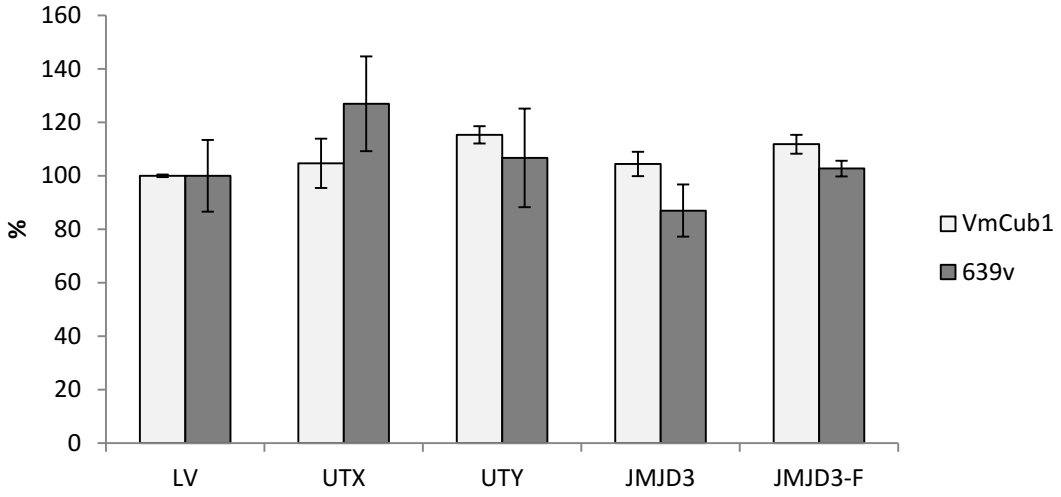


Abb. 7 Zellvitalität von Urothelkarzinomzellen nach Überexpression von UTX

Relative Zellvitalität von mit den Plasmiden pCMV-HA-UTX, pCS2-UTY-F, pCMV-HA-JMJD3 und pCS2-JMJD3-F transfizierten Zelllinien VmCub1 und 639v im Vergleich zu den mit dem Leervektor (pCMV-Neo-Bam) transfizierten Zellen. Die Lumineszenz der mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurde jeweils auf 100% normiert. Nach dem T-Test war keiner der Unterschiede statistisch signifikant.

3.1.1.3 Klonogenitätsassay nach stabiler Überexpression:

Die tumorsuppressive Eigenschaft von UTX und JMJD3 sollte durch die stabile Transfektion dieser beiden Gene in Form der Plasmide pCMV-HA-UTX sowie pCMV-HA-JMJD3 analysiert werden. Als Positivkontrolle wurde ein Leervektor (pCMV-Neo-Bam) transfiziert. Alle Plasmide enthielten eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin und konnten folglich mit Geneticin (G418) - einem Analogon vom Neomycin - selektioniert werden. Geneticin hemmt die Proteinsynthese sowohl in Prokaryonten wie in Eukaryonten. Daher bilden nur die Zellen Klone, die ein Plasmid stabil aufgenommen haben.

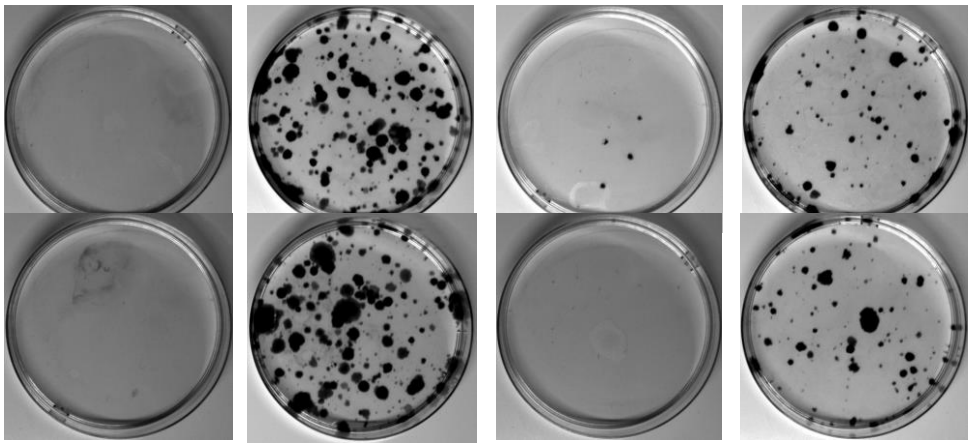
Für das Experiment wurden die Zelllinien Ku 19-19, VmCub1, BFTC905 und 639v verwendet, in denen die Expression von UTX und JMJD3 auf mRNA-Ebene im Vergleich zu primären Urothelzellen vermindert ist (Abb. 2). Die Proteinkonzentration von UTX scheint jedoch im Vergleich zu den normalen Urothelzellen nicht wesentlich oder gar nicht vermindert zu sein, nicht einmal in Ku 19-19, obwohl das Gen darin eine Punktmutation enthält (Abb. 4, Abb. 5).

Nach ca. drei bis vier Wochen konnten die makroskopisch sichtbaren Kolonien gefärbt und beurteilt werden. Nicht transfizierte Zellen überlebten wie erwartet im Selektionsmedium nicht.

In allen Zellreihen war bereits makroskopisch sichtbar, dass die mit dem UTX-Expressionsplasmid transfizierten Zellen deutlich weniger Kolonien gebildet hatten als die mit dem Leervektor transfizierten Zellen (Abb. 8). Dieser Eindruck konnte durch die Zählung der Klone bestätigt werden (Abb. 9). Bei den mit dem JMJD3-Expressionsplasmid transfizierten Zellen fiel der Effekt nicht so deutlich aus. Bei der Zelllinie 639v bildeten die mit dem JMJD3-Plasmid transfizierten Zellen sogar mehr Klone als die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

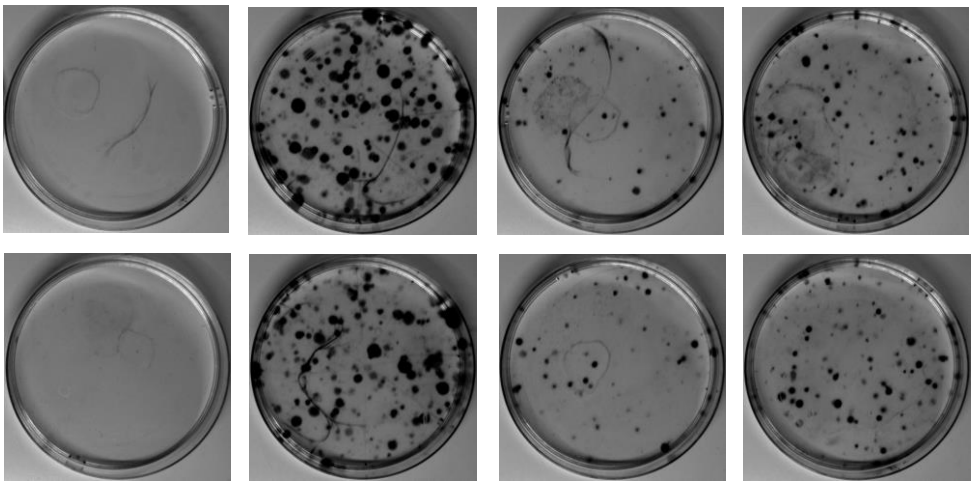
Bei der statistischen Auswertung wurde die Zahl der gebildeten Klone der mit dem Leervektor transfizierten Zellen als 100% gesetzt. Der Anteil der gebildeten Klone war bei allen Zellreihen statistisch signifikant (laut T-Test) verringert (Abb. 9). Dies deutet darauf, dass die stabile Transfektion der beiden Plasmide die Fähigkeit der Zellen, Klone zu bilden oder langfristig zu überleben beeinflusst. UTX scheint dabei in einem stärkeren Maße zu wirken als JMJD3.

A. Ku 19-19



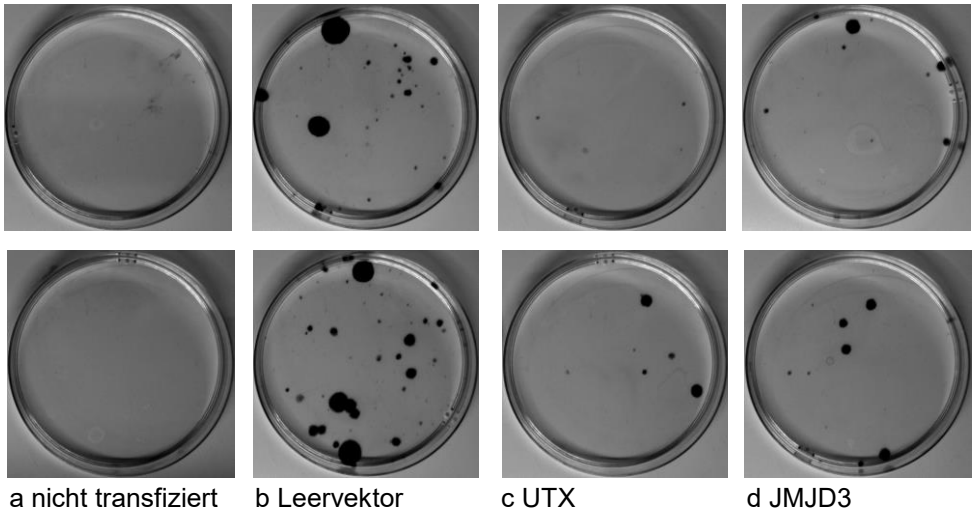
a nicht transfiziert b Leervektor c UTX d JMJD3

B.VmCub1



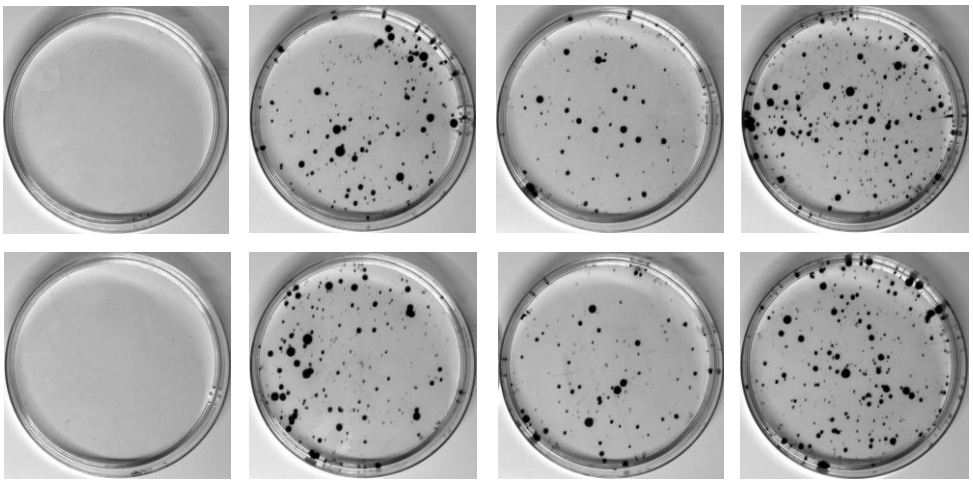
a nicht transfiziert b Leervektor c UTX d JMJD3

C. BFTC905



a nicht transfiziert b Leervektor c UTX d JMJD3

D. 639v



a nicht transfiziert b Leervektor c UTX d JMJD3

Abb. 8 Klonogenitätsassay von Urothelkarzinomzellen nach Überexpression von UTX oder JMJD3

Giemsafärbung makroskopisch sichtbarer Klone der Zelllinien Ku 19-19 (A), VmCub1 (B), BFTC905 (C) und 639v (D) nach stabiler Transfektion mit dem Leervektor pCMV-Neo-Bam (b), den Plasmiden pCMV-HA-UTX (c) oder pCMV-HA-JMJD3 (d) und anschließender Selektion mit G418; (a) mitgeführte nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle für die Effizienz der Selektion. Jeweils 2 Schalen mit gleicher Behandlung.

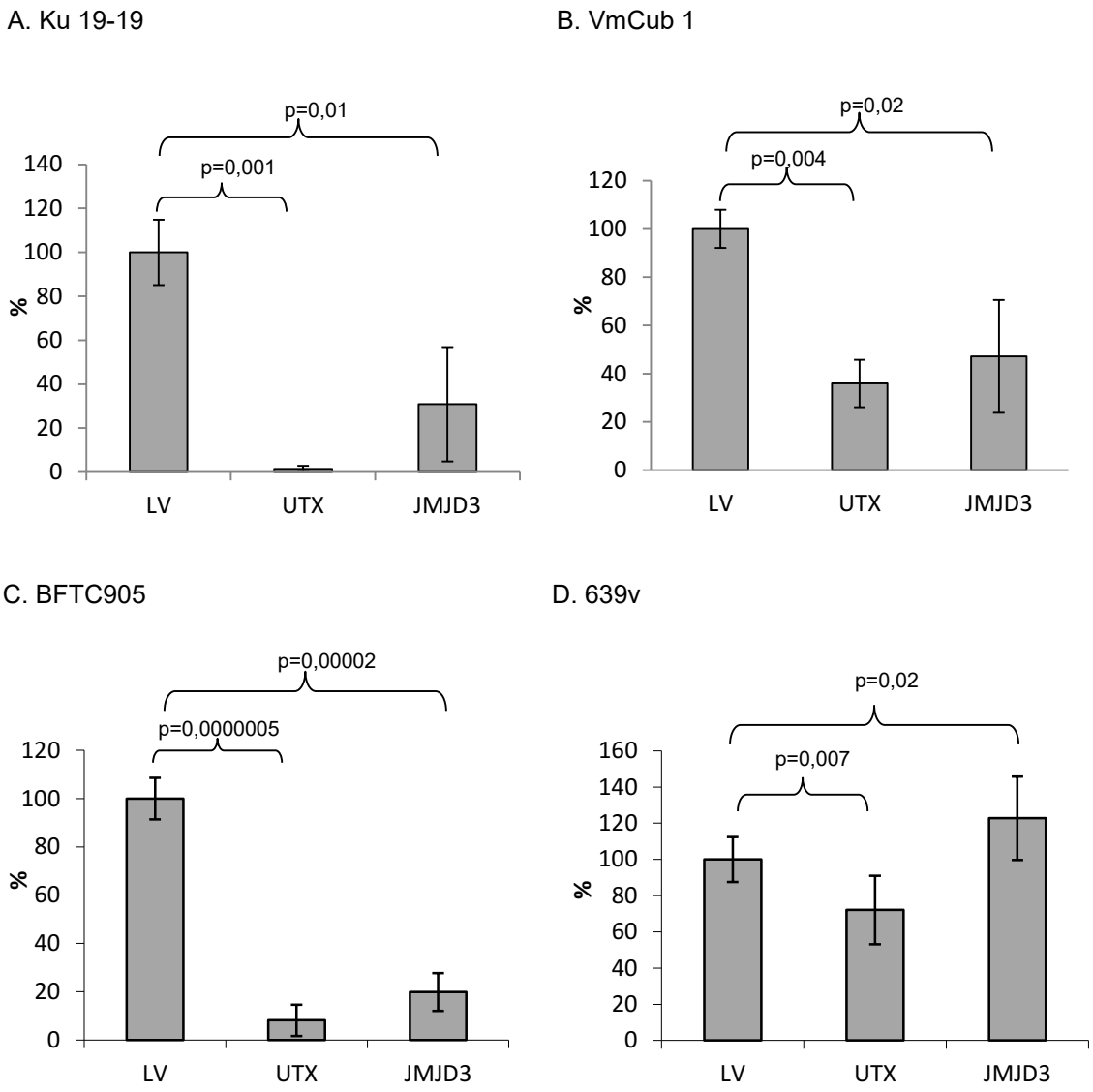


Abb. 9 Verhältnis gebildeter Klone nach Überexpression

Prozentueller Anteil gebildeter Klone von mit den Plasmiden pCMV-HA-UTX und pCMV-HA-JMJD3 transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit dem Leervektor (pCMV-Neo-Bam) transfizierten Zellen der Zelllinien Ku 19-19 (A), VmCub1 (B), BFTC905 (C) und 639v (D). Signifikanz (p) ermittelt mit dem T-Test.

Bei der Zelllinie 639v wurden nach erfolgreicher Selektion einige Klone isoliert, um das Expressionsniveau beider Gene auf mRNA- und Proteinebene zu untersuchen. Dabei wurden jeweils 11 mit dem Leervektor und dem JMJD3-Plasmid transfizierte und 13 mit dem UTX-Plasmid transfizierte Klone isoliert.

Die Messung der Expression der mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. Als Referenz diente das *housekeeping*-Gen TBP.

Keiner der UTX-Klone zeigte eine im Vergleich zum Leervektor erhöhte Expression von UTX. Im Gegenteil wiesen die mit dem UTX-Gen transfizierten Zellen ein signifikant vermindertes Expressionsniveau von UTX im Vergleich zum Leervektor auf. Auch die JMJD3-Klone wiesen durchschnittlich eine niedrigere Expression von UTX auf, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen.

In den mit dem JMJD3-Plasmid transfizierten Zellen, aber auch in den mit dem UTX-Plasmid transfizierten Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von JMJD3 auf mRNA-Ebene (Abb. 10).

Bei der statistischen Analyse der JMJD3 und UTX Expression in den UTX Klonen zeigte sich jedoch keine Korrelation, nämlich r= -0,01 (Pearson) mit p= 0,97. Bei den JMJD3 Klonen findet sich eine schwache negative Korrelation mit r= -0,35; diese ist jedoch nicht signifikant (p=0,3) (Abb. 11).

Die Expression von JMJD3 in den JMJD3-Klonen 5 und 9 war besonders hoch; sie wurden deshalb erneut in Kultur gebracht mit dem Ziel Proteinlysate zu gewinnen. Jedoch konnte mittels Immunoblot keine Erhöhung der Expression von JMJD3 auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 12).

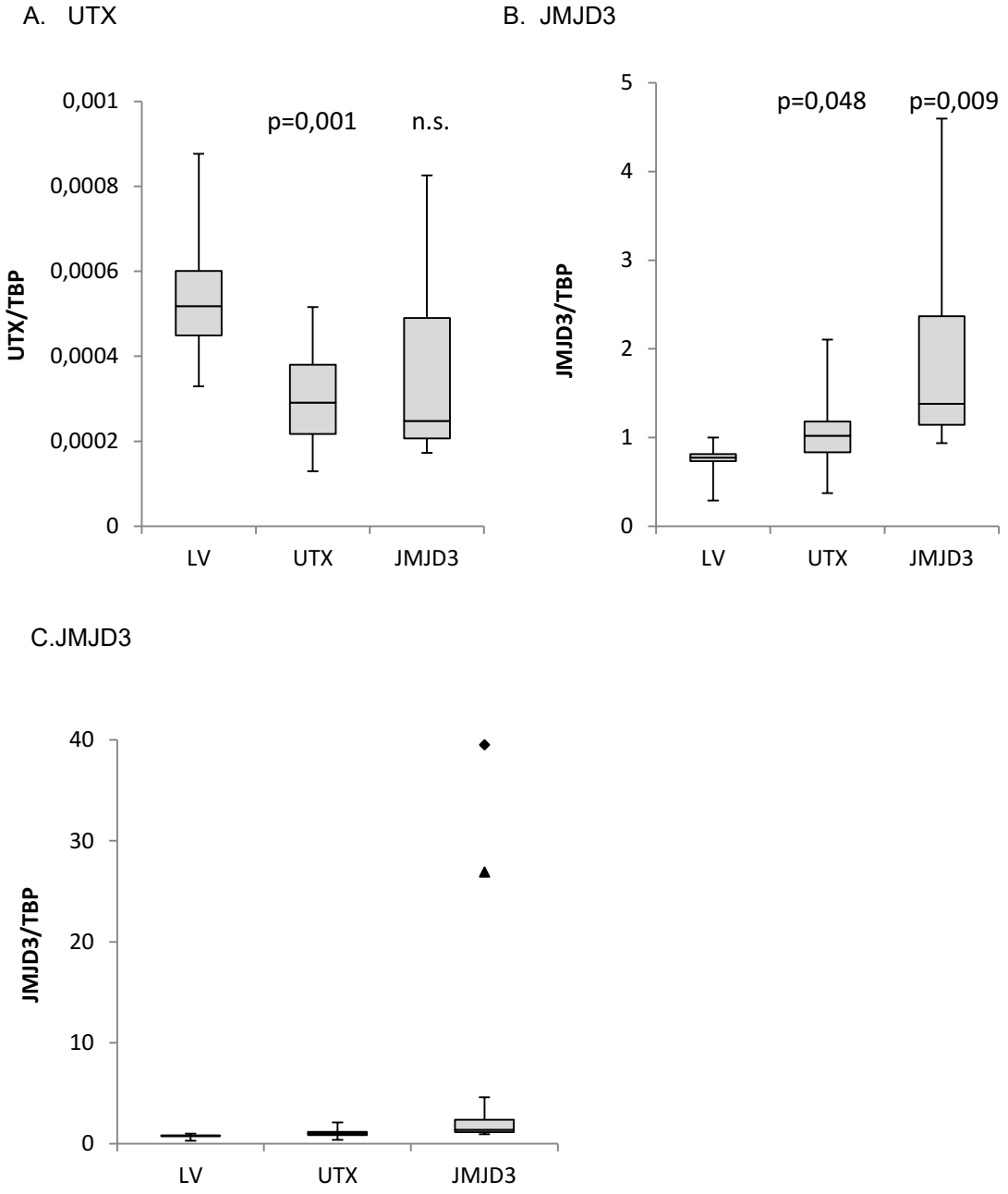


Abb. 10 Expression von *UTX* und *JMJD3* in UTX- und JMJD3- Klonen

Expressionsniveau von *UTX* (A) und *JMJD3* (B) in 13 mit dem UTX sowie 11 mit dem JMJD3-Plasmid transfizierten Klonen im Vergleich zu 11 mit dem Leervektor (LV) transfizierten Klonen relativ zu TBP. (C) *JMJD3* Expression wie in (B) jedoch mit 2 „Ausreißern“. ▲ JMJD3 Klon 5, ♦ JMJD3 Klon 9. Boxplot-Darstellung. Signifikanz ermittelt mittels T-Test, n.s.=nicht signifikant.

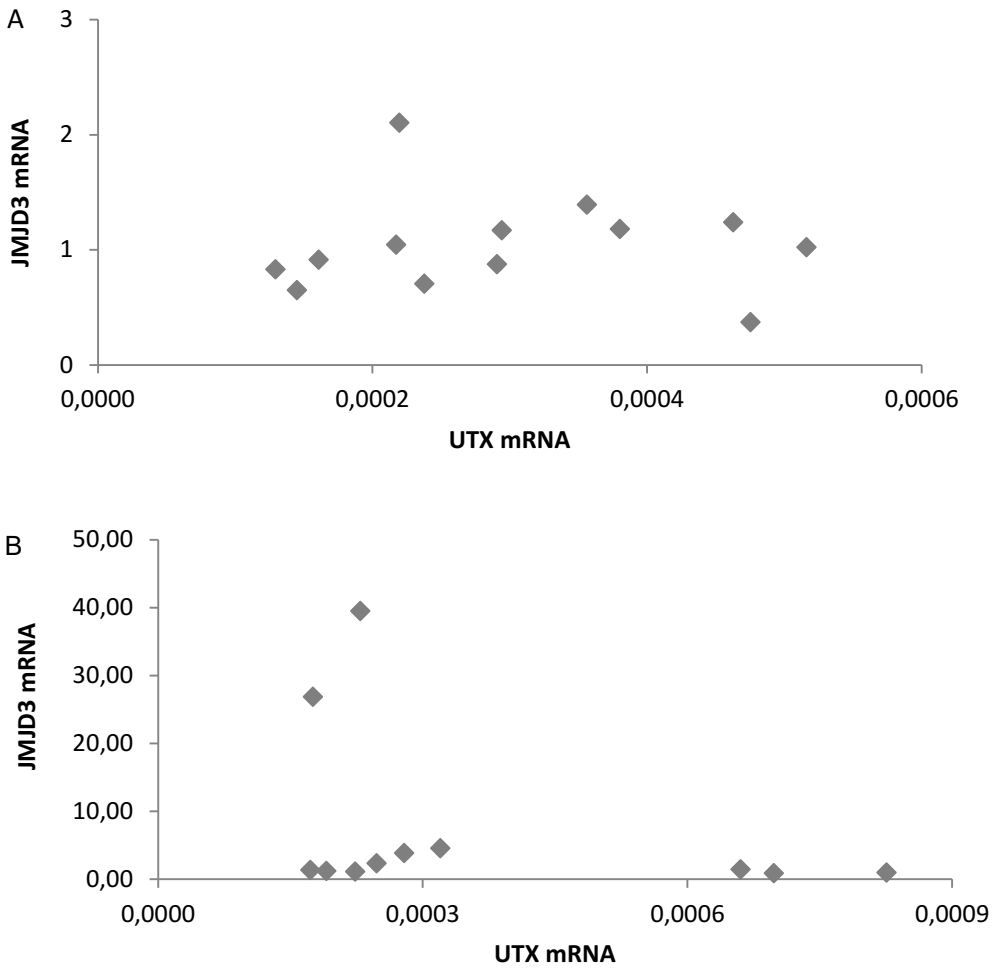


Abb. 11 Korrelation der Expression von *UTX* und *JMJD3* mRNA in UTX (A) und JMJD3 (B) Klonen.

Daten entnommen aus dem Expirement in Abb. 10.

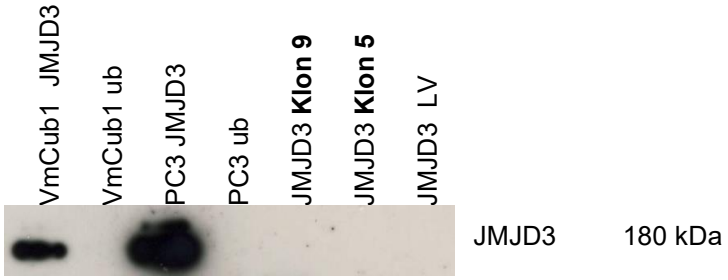


Abb. 12 Western-Blot von JMJD3 in JMJD3-Klonen

Western Blot von JMJD3 in den Zelllinien VmCub1 und PC3 nach Transfektion von UTX-HA-JMJD3 oder dem Leervektor (pCMV-Neo-Bam) sowie zwei stark JMJD3 mRNA exprimierenden Klonen der Zelllinie 639v nach stabiler Transfektion des JMJD3-Plasmids.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die stabile Transfektion mit dem UTX-Plasmid in diesen Zellen eine im Vergleich zum Leervektor verminderte Expression von UTX auf mRNA-Ebene verursacht. Die stabile Transfektion des JMJD3 Plasmids erbrachte in zwei Klonen eine Erhöhung der Expression auf mRNA-Ebene, die sich jedoch auf der Proteinebene nicht widerspiegelte.

3.1.2 Knockdownanalysen

3.1.2.1 Nachweis des Knockdowns

Viele Urothelkarzinomzelllinien weisen eine verminderte Expression von UTX auf. Einige jedoch - wie zum Beispiel die Zelllinie 5637 - haben ein im Vergleich zu normalen Urothelzellen in etwa gleiches UTX-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene. Zur funktionellen Analyse wurde UTX in den Zelllinien 5637, VmCub1 sowie BFTC905 mittels spezifisch gegen UTX gerichteter *small interfering* RNA (siRNA) herunterreguliert ("Knockdown"). Als Kontrolle wurde stets eine "irrelevante" siRNA transfiziert, die keine mRNA beeinflussen soll. Der Nachweis des erfolgreichen Knockdowns wurde zunächst auf RNA Ebene mittels qRT-PCR erbracht.

Der Knockdown war bereits nach 24 Stunden erfolgreich, die Expression von UTX war signifikant niedriger als in den Kontrollzellen. Es zeigte sich, dass si32 insgesamt ein besseres Knockdown-Ergebnis lieferte als si18. Bei der zuletzt genannten siRNA zeigten die Zellen nach 72 Stunden in allen drei Zelllinien keine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zur irrelevanten siRNA (Abb 13).

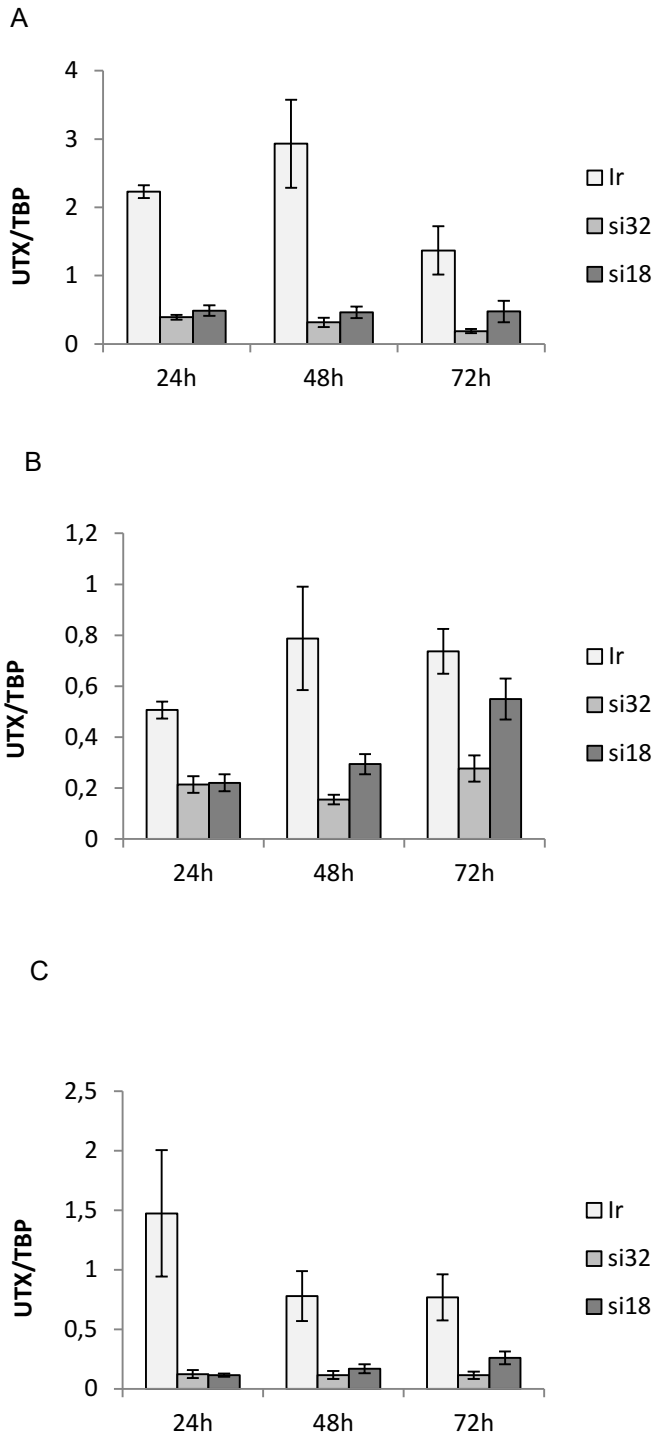


Abb. 13 Expression von UTX in Urothelkarzinomzelllinien nach Knockdown

Expression von UTX relativ zu TBP in den Zelllinien 5637 (A), VmCub1 (B) und BFTC905 (C) nach Behandlung der Zellen mit spezifisch gegen UTX gerichteter siRNA (si32, si18) sowie als Kontrolle mit irrelevanter siRNA (Ir).

Nach dem effizienten Knockdown auf mRNA-Ebene wurde untersucht, ob die Expression von UTX auch auf Protein-Ebene abnahm. In den Zelllinien 5637

und VmCub1 konnte auch auf Proteinebene eine verminderte Expression von UTX nachgewiesen werden. In der Zelllinie BFTC905 war das nicht der Fall (Abb. 14).

Des Weiteren wurde die Auswirkung des UTX-Knockdowns auf den Antagonisten von UTX, die Histonmethyltransferase EZH2, untersucht. Die Proteinkonzentration in den mit spezifischer siRNA sowie mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen oder in völlig unbehandelten Zellen war in etwa gleich. Es kam folglich nach UTX-Knockdown innerhalb des untersuchten Zeitraums nicht zu einer Gegenregulation des Antagonisten EZH2 (Abb. 14). Als Ladekontrolle diente α-Tubulin.

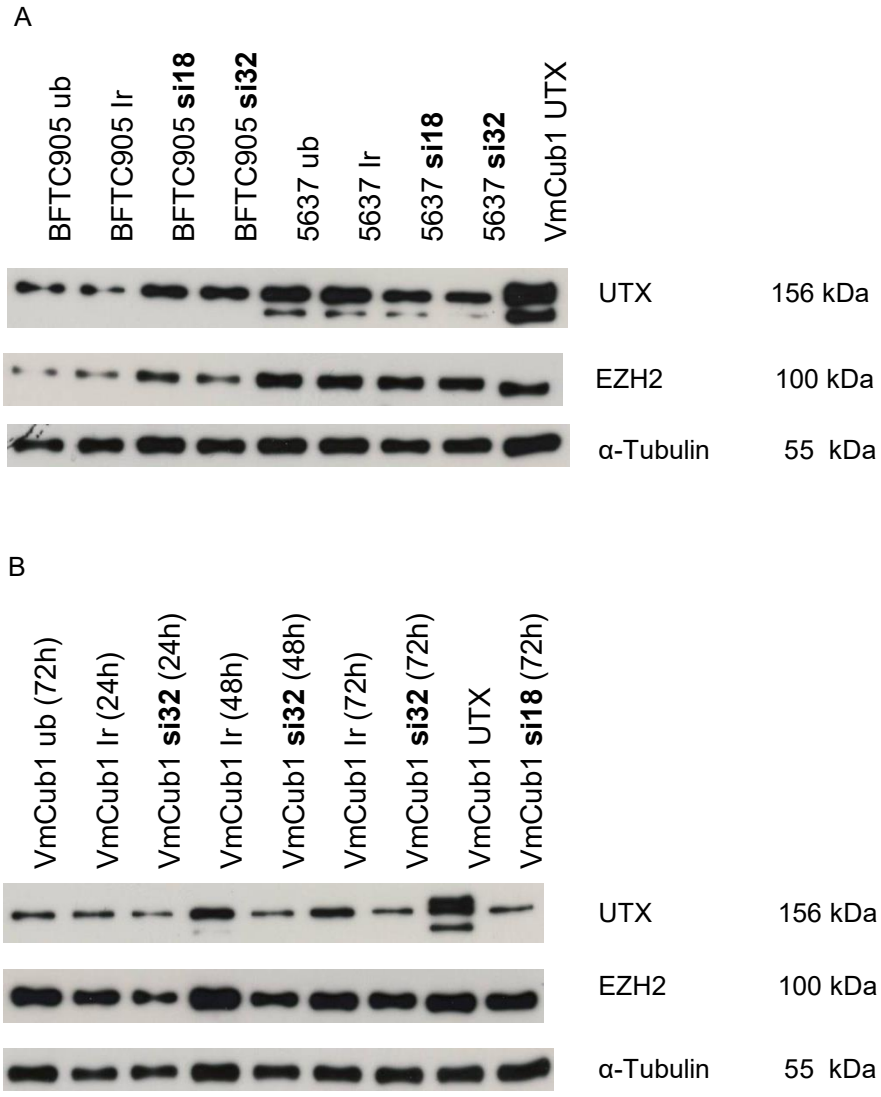


Abb. 14 Western-Blot von UTX und EZH2 nach Knockdown von UTX

Western-Blot von UTX und EZH2 in den Zelllinien BFTC905 und 5637 nach Knockdown von UTX mit si32 und si18 (A) sowie in der Zelllinie VmCub1 nach Knockdown von UTX mit si32 nach 24 h, 48 h und 72 h sowie mit si18 nach 72 h (B). Zum Vergleich dienten jeweils unbehandelte Zellen (ub) sowie mit einer irrelevanten siRNA behandelten Zellen (lr). Als Positivkontrolle diente die Zelllinie VmCub1 nach UTX Überexpression. Als Ladungskontrolle diente α-Tubulin.

3.1.2.2 Vitalitätsassay nach Knockdown

Der Effekt des Knockdowns von UTX auf das Überleben der Zellen wurde mit Hilfe des Cell-Titer-Glo-Assays in den Zelllinien 5637, VmCub1 sowie BFTC905 untersucht. Dabei wurden die Zellen 72 h nach Behandlung mit den beiden gegen UTX gerichteten siRNAs (si32, si18) untersucht. Dieser Assay misst lebende Zellen über die Gesamtmenge an ATP. Die Werte der mit der irrelevanten siRNA behandelten Zellen wurden jeweils als 100% gesetzt.

Es konnte bis auf eine Ausnahme keine statistisch signifikante Veränderung der Zellvitalität nach 72 h beobachtet werden. Lediglich in der Zelllinie BFTC905 nahm die Zellvitalität bei den mit der si18 behandelten Zellen um ca. 18% ab und der Unterschied erreichte eine statistische Signifikanz (Abb. 15).

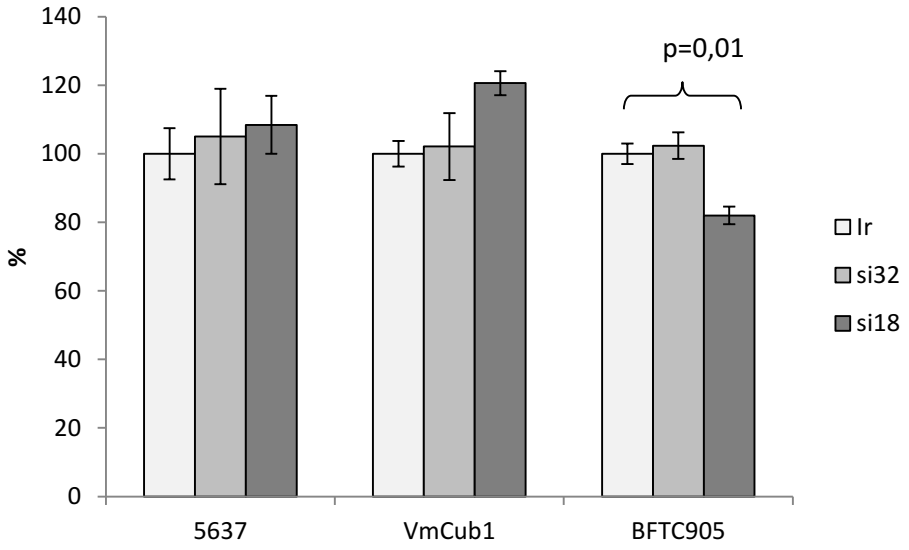


Abb. 15 Zellvitalität in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown

Relative Zellvitalität der mit spezifisch gegen UTX gerichteten siRNA behandelten Zellen im Vergleich zu mit einer irrelevanten siRNA behandelten Zellen der Zelllinien 5637, VmCub1 und BFTC905.

3.1.2.3 Auswirkung des Knockdowns von UTX auf die Proliferation

Im Folgenden wurde die Proliferation der Zellen nach UTX Knockdown untersucht. Dafür wurde die Expression von *MKI67* auf RNA Ebene gemessen. *MKI67* lässt sich nur in proliferierenden Zellen nachweisen, wohingegen Zellen in der G0 Phase kein *MKI67* aufweisen.

In der Zelllinie 5637 war die Expression von *MKI67* nach UTX Knockdown vermindert, jedoch ohne statistische Signifikanz. In den Zelllinien VmCub1 und BFTC905 konnte keine Veränderung der *MKI67* Expression festgestellt werden. Demnach nahm die Proliferation der Zelllinie 5637 nach UTX Knockdown leicht ab, jedoch nicht statistisch signifikant. Die übrigen zwei Zelllinien zeigten keine Änderung im Proliferationsverhalten. Diese Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen denen bei der Messung der relativen Zellvitalität (Abb. 16)

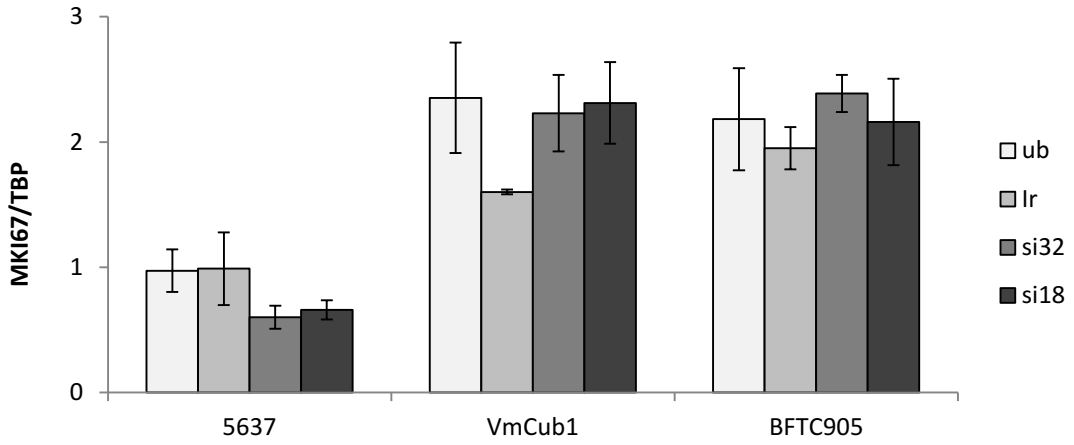


Abb. 16 Expression von *MKI67* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown

Expression des Proliferationsmarkers *MKI67* ermittelt mittels qRT-PCR relativ zu TBP in den Zelllinien 5637, VmCub1 sowie BFTC905 nach Behandlung der Zellen mit zwei spezifisch gegen UTX gerichteten siRNAs (si32 und si18) sowie einer unspezifischen siRNA (lr) verglichen mit unbehandelten Zellen.

3.1.2.4 Auswirkung des UTX-Knockdowns auf Zielgene von UTX

Nachdem der Knockdown von UTX auf RNA und Proteinebene verifiziert worden war, sollten mögliche Effekte auf die Expression vermuteter Zielgene von UTX untersucht werden. Zum einen wurden die zum RB1-Komplex gehörenden Gene *RBBP4* sowie *HBP1* untersucht, zum anderen drei HOX-Gene, die im Urothelkarzinom gegenüber dem Urothel häufig Expressionsveränderungen aufweisen. Zudem wurde das Histonmethyltransferase-Gen *EZH2* untersucht. Die mRNA Expression dieser sieben Gene wurde in unbehandelten Zellen, in mit der irrelevanten siRNA behandelten Zellen und in den mit spezifisch gegen UTX gerichteter siRNA behandelten Zellen verglichen.

HBP1 wird in Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zu normalen Urothelzellen vermindert exprimiert und seine Expression korreliert recht gut mit der von UTX (Murday, 2016). In Mausfibroblasten ist es ein Zielgen von UTX (Wang et al., 2010). Die Messung der Expression von *HBP1* nach UTX-Knockdown ergab in den Zelllinien 5637 sowie VmCub1 eine signifikante Erhöhung des Expressionsniveaus relativ zu TBP. In der Zelllinie BFTC905 war die *HBP1* Expression ebenfalls erhöht, jedoch nicht signifikant (Abb. 17).

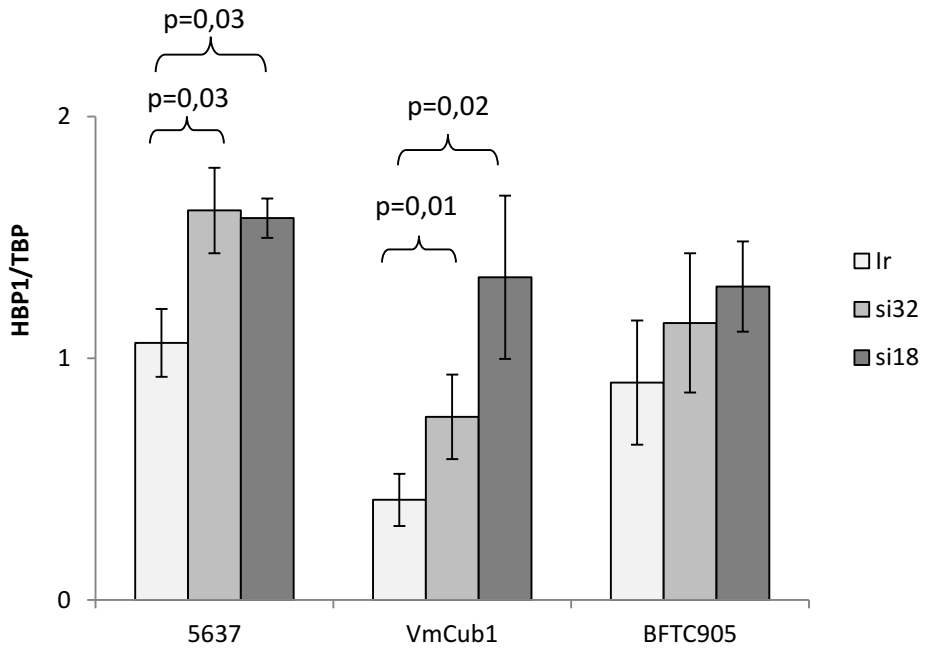


Abb. 17 Expression von *HBP1* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown

Genexpression von *HBP1* relativ zu TBP ermittelt mittels qRT-PCR nach Behandlung mit einer irrelevanten (Ir) sowie zwei spezifisch gegen UTX gerichteten siRNAs (si32, si18) in den Zelllinien 5627, VmCub1 und BFTC905. Signifikanz ermittelt mittels T-Test.

Nach UTX-Knockdown konnte in den drei Zelllinien keine deutliche Änderung im Genexpressionsniveau von *RBBP4* festgestellt werden. Lediglich in der Zelllinie 5637 war nach der Behandlung mit si18 die *RBBP4* Expression signifikant vermindert. Insgesamt zeigten die mit si32 behandelten Zellen eine verringerte Expression von *RBBP4*; die Änderung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb 18).

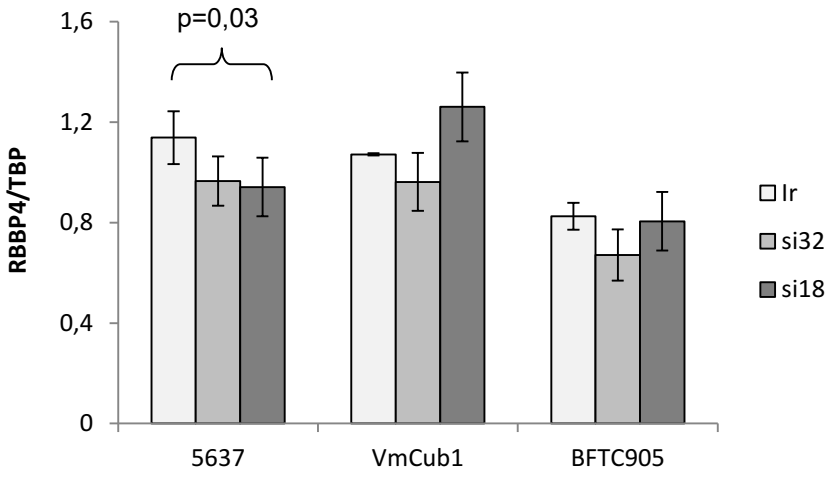


Abb. 18 Expression von *RBBP4* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown

Genexpression von *RBBP4* relativ zu TBP ermittelt mittels qRT-PCR nach Behandlung mit einer irrelevanten sowie zwei spezifisch gegen UTX gerichteten siRNAs (si32, si18) in den Zelllinien 5627, VmCub1 und BFTC905. Signifikanz ermittelt mittels T-Test.

Unter den HOX-Genen wurden die drei Gene *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC13* untersucht. Die Expression dieser drei Gene war in der Zelllinie BFTC905 im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien um ein Vielfaches erhöht. Speziell konnte *HOXC11* in der Zelllinie VmCub1 nicht nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich bei keinem der drei Gene eine Änderung der Expression auf mRNA-Ebene nach Knockdown von UTX (Abb. 19).

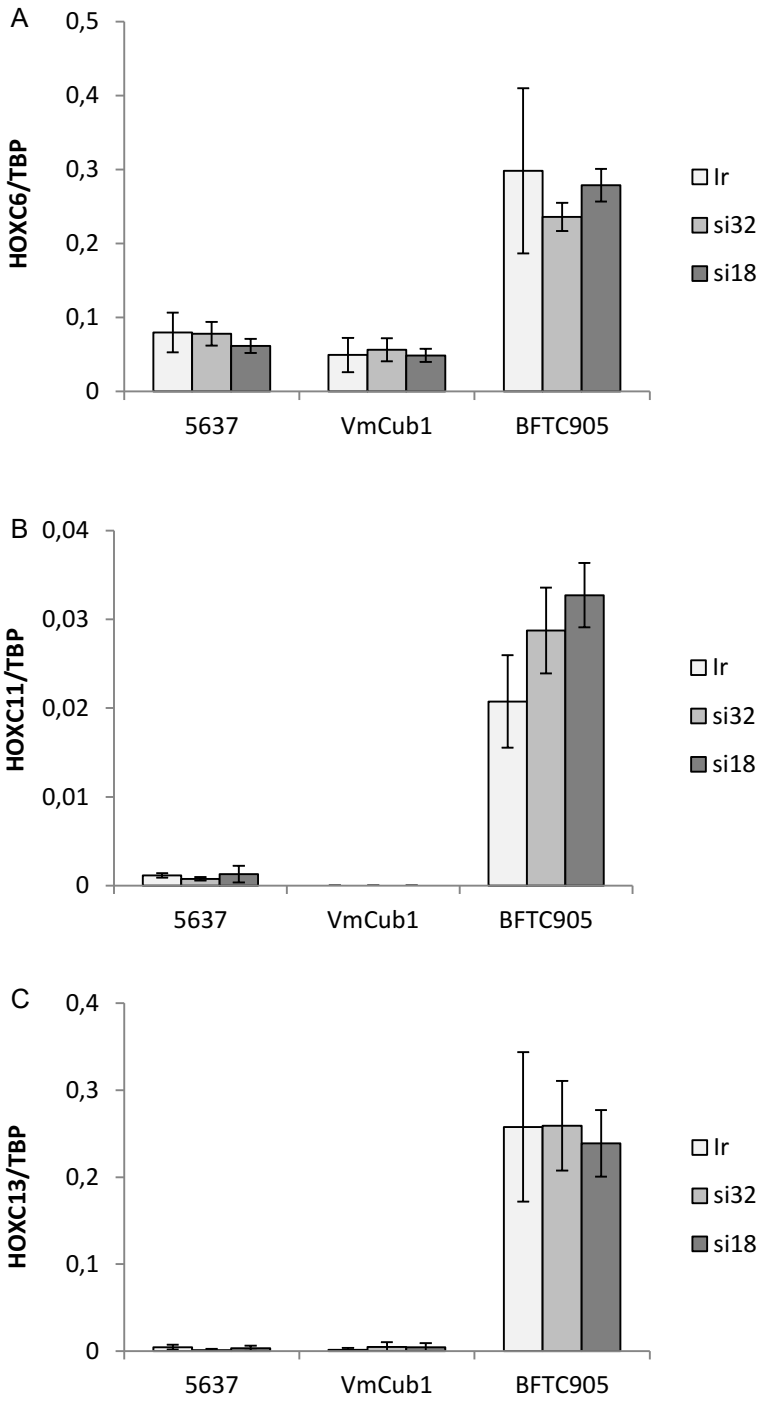


Abb. 19 Expression von *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC13* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown.

Genexpression von *HOXC6* (A), *HOXC11* (B) und *HOXC13* (C) relativ zu TBP ermittelt mittels qRT-PCR nach Behandlung mit einer irrelevanten (Ir) sowie zwei spezifisch gegen UTX gerichteten siRNAs (si32, si18) in den Zelllinien 5637, VmCub1 und BFTC905.

Auch bei der Messung von *EZH2* konnte keine signifikante Änderung der Expression auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Tendenziell zeigten die Zellen nach Behandlung mit si18 eine im Vergleich zur Behandlung mit der irrelevanten siRNA erhöhte Expression von *EZH2*, insbesondere in der Zelllinie 5637 (Abb. 20).

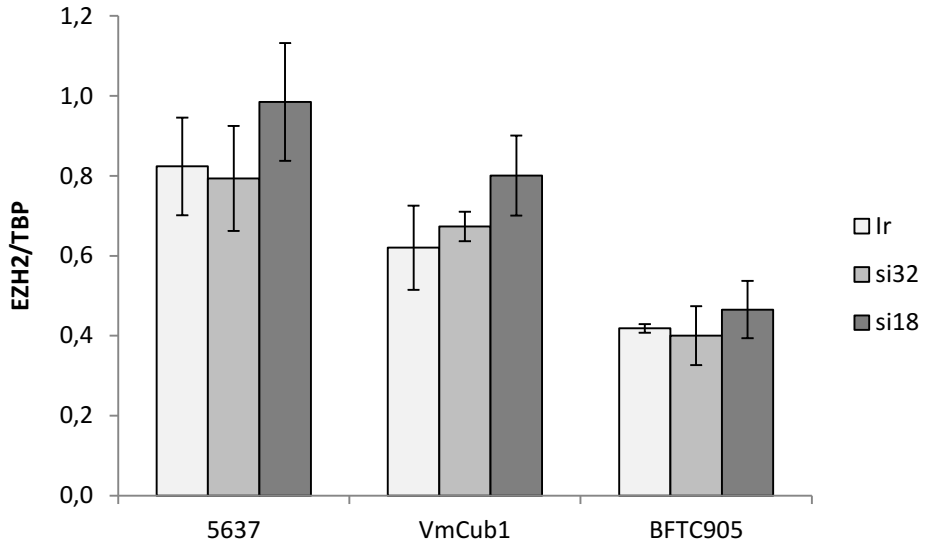


Abb. 20 Expression von *EZH2* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown

Genexpression von *EZH2* relativ zu TBP ermittelt mittels qRT-PCR nach Behandlung mit einer irrelevanten (Ir) sowie zwei spezifisch gegen UTX gerichteten siRNAs (si32, si18) in den Zelllinien 5637, VmCub1 und BFTC905. Signifikanz ermittelt mittels T-Test.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein kurzfristiger Knockdown (über 72 h) von UTX in den Zelllinien 5637, VmCub1 und BFTC905 keine Änderung der Expression von HOX-Genen oder *EZH2* bewirkt. In der Zelllinie 5637 konnte eine signifikante Abnahme der *RBBP4* Expression nach Behandlung mit si18 gemessen werden. *HBP1* wird in den Zelllinien 5637 und VmCub1 nach UTX-Knockdown vermehrt exprimiert.

3.1.2.5 JMJD3 Expression nach UTX Knockdown

Als Nächstes wurde eine mögliche Änderung der Expression von JMJD3 nach einem Knockdown von UTX untersucht. In den Zelllinien 5637 und VmCub1

ergab sich im Vergleich zur Behandlung mit der irrelevanten siRNA eine leichte, aber signifikant verstärkte Expression von JMJD3 mRNA nach 48 Stunden, wohingegen in der Zelllinie BFTC905 die JMJD3 Expression nach 48 Stunden signifikant abnahm (Abb 21). In den normalen Urothelzellen (UP) gab es zwar eine verstärkte Expression von JMJD3 nach Knockdown von UTX, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

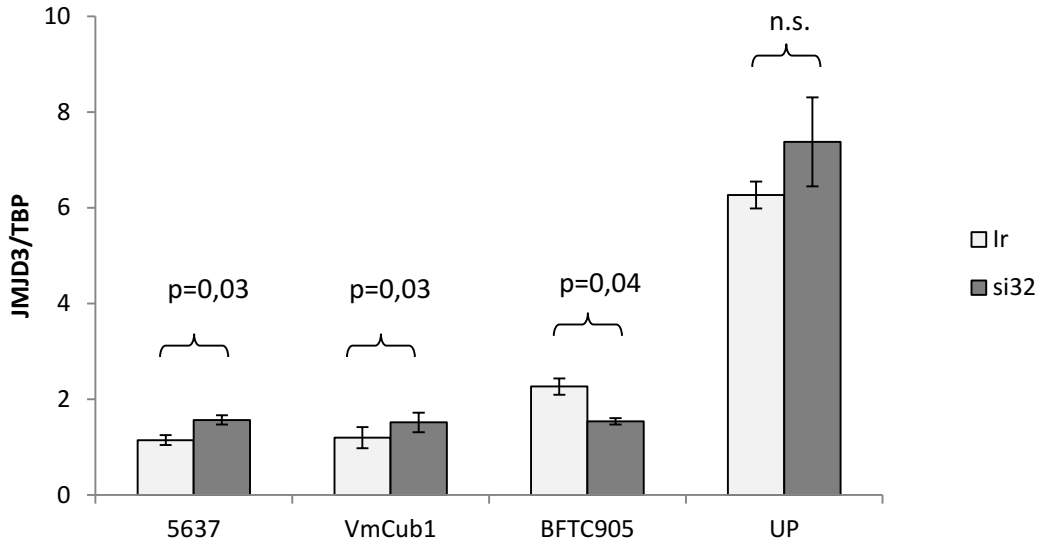


Abb. 21 Expression von *JMJD3* in Urothelkarzinomzelllinien nach UTX-Knockdown

Expression von *JMJD3* mRNA ermittelt mittels qRT-PCR relativ zu TBP in den Zelllinien 5637, BFTC905 und VmCub1 sowie normalen Urothelzellen (UP232).

3.1.2.6 Kockdown von UTX in Urothelprimärkulturen

Zuletzt wurde versucht, einen Knockdown von UTX in normalen Urothelzellen zu etablieren. Die Transfektion der siRNA erfolgte analog zu der Transfektion in den Urothelkarzinomzellen. Die Messung der UTX mRNA nach 48 Stunden zeigte eine signifikante Erniedrigung der Expression in den Zellen, die mit der si32 transfiziert wurden im Vergleich zu den Zellen, die mit einer irrelevanten siRNA transfiziert wurden (Abb. 22).

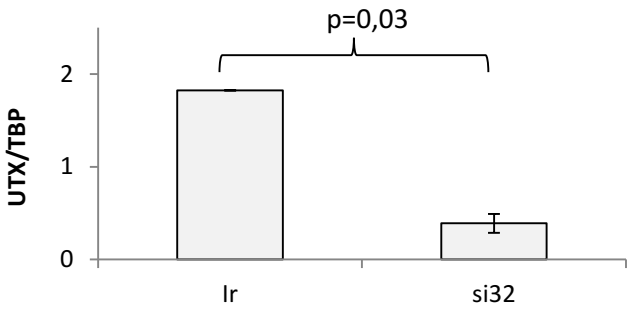


Abb. 22 Expression von *UTX* in normalen Urothelzellen nach UTX-Knockdown

Expression von *UTX* mRNA ermittelt mittels qRT-PCR relativ zu TBP in normalen Urothelzellen (UP232) nach Behandlung mit der spezifisch gegen UTX gerichteten siRNA 32 und einer irrelevanten siRNA.

4 Diskussion

4.1 Überexpression

4.1.1 Auswirkungen der Überexpression von UTX

Da UTX und JMJD3 mRNAs in zahlreichen Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zu benignen Urothelzellen vermindert exprimiert sind (Murday, 2016), wurden die Auswirkungen einer Überexpression dieser Demethylasen in Karzinomzelllinien untersucht. Die durchgeführten Überexpressionsversuche unterschieden sich in dem gewählten Zeitraum. Es wurde eine transiente und eine stabile Überexpression in Karzinomzelllinien mit einer eher niedrigen UTX Expression auf mRNA Ebene und der immortalisierten Nierenzelllinie HEK293 etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene eine transiente Überexpression möglich ist. Diese hat jedoch keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Im Gegensatz dazu scheint eine stabile Transfektion die Klonogenität der Zellen signifikant zu beeinflussen. In allen vier Karzinomzelllinien nahm diese nach UTX Überexpression ab. Dies bestätigt die These, dass UTX als ein Tumorsuppressor agiert. Jedoch ist zu vermuten, dass seine Wirkung erst über einen längeren Zeitraum einsetzt. Kurzfristig waren wenige Effekte nachweisbar (s.u.).

Zur weiterführenden Untersuchung wurden einige stabil transfizierte Klone wieder in Kultur gebracht. Es zeigte sich, dass die mit dem UTX Plasmid transfizierten Klone tatsächlich keine Überexpression, sondern sogar eine signifikant verminderte Expression von UTX aufwiesen. Dieser unerwartete Effekt stünde im Einklang mit einer tumorsuppressiven Funktion von UTX. Demnach konnten nur die Zellen Klone bilden, die im Stande waren, der UTX Überexpression entgegenzuwirken. Die Zellen, die UTX vermehrt exprimierten, konnten nicht überleben, was sich in der insgesamt deutlich verminderten Anzahl der Klone nach UTX Überexpression widerspiegelt. Es scheint sogar ein Gegenregulationsmechanismus in den überlebenden Klonen in Gang gesetzt zu werden, der zu einer verminderten Expression von UTX führt. Es konnte in diesen Klonen eine signifikant erhöhte Expression von JMJD3 nachgewiesen

werden. Dies kann als ein möglicher Kompensationsmechanismus interpretiert werden, da UTX und JMJD3 neben ihrer Demethylaseaktivität auch andere gleichsinnige Funktionen haben (siehe 1.2.4). In einer Arbeit von Ntziachristos zeigte sich nach einem Knockdown von UTX mittels shRNA in humanen T-ALL (T-Zell akute lymphatische Leukämie) Zellen ebenfalls eine vermehrte Expression von JMJD3 auf mRNA-Ebene. Bei der T-ALL wird JMJD3 jedoch eine onkogene Rolle zugeschieben. Dies zeigt die zelltypspezifische Funktion der beiden Enzyme (Ntziachristos et al., 2014).

4.1.2 Auswirkungen der Überexpression von JMJD3

In gleichartigen Reaktionsansätzen erbrachte die Transfektion der JMJD3 Plasmide eine viel höhere Expression von JMJD3 auf mRNA Ebene. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass JMJD3 von den Zellen besser toleriert wird. Auf Proteinebene gestaltete sich der Nachweis schwierig. Lediglich die Überexpression in der Zellreihe VmCub1 war erfolgreich nachzuweisen. Dies kann zum einen bedingt sein durch den suboptimalen Antikörper; auch die Angaben der Herstellerfirma lassen darauf schließen, dass er nur extrem hohe Mengen an JMJD3 erkennen kann. Bessere Antikörper waren zum Zeitpunkt der Arbeit kommerziell nicht erhältlich. Zum anderen ist bei einer sehr niedrigen Expression von JMJD3 mRNA auch nur wenig Protein zu erwarten.

Gleichsinnig zu den Ergebnissen der transienten UTX Überexpression konnte auch nach transienter JMJD3 Überexpression keine signifikante Abnahme der Zellvitalität festgestellt werden. Die stabile Überexpression von JMJD3 ergab in drei von vier Zelllinien ebenfalls eine Abnahme der Klonogenität. Der Effekt fiel jedoch nicht so deutlich aus wie bei UTX. Im Gegensatz zu UTX konnte tatsächlich in den erneut in Kultur gebrachten Klonen eine erhöhte JMJD3 mRNA Expression gemessen werden. Dies untermauert nochmals die These, dass JMJD3 in Urothelkarzinomzellen eine im Vergleich zu UTX untergeordnete Rolle bei der Entscheidung des Zellschicksals einnimmt. Bei zwei Klonen war die Expression sogar um ein Vielfaches gesteigert. Diese Überexpression konnte jedoch auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Wiederum könnte dies

auf die begrenzte Sensitivität des verwendeten Antikörpers oder aber auf verschiedene posttranslational bedingte Regulationsmechanismen zurückzuführen sein. Eine weitere Möglichkeit sind Mutationen in der integrierten Fremdsequenz, die in der verwendeten qRT-PCR nicht nachweisbar wären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch eine JMJD3 Überexpression keine kurzfristigen Veränderungen der Zellvitalität verursacht. Langfristig könnte dies wie auch bei UTX der Fall sein, jedoch in einem geringeren Ausmaß.

4.2 UTX mRNA und UTX-Protein

In Zusammenschau mit den Messungen der UTX Expression auf RNA Ebene aus einer vorhergehenden Arbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf sowie den in dieser Arbeit erstellten Messungen der Proteinexpression lässt sich zum Teil eine deutliche Diskrepanz zwischen beiden feststellen. So ist UTX mRNA beispielsweise in der Zelllinie 639v nur sehr niedrig exprimiert, jedoch ist die Expression des Proteins deutlich ausgeprägt. Generell ist die Expression der UTX mRNA in kultivierten normalen Urothelzellen (UP) höher als in den meisten Urothelkarzinomzelllinien (Murday, 2016); dieser Unterschied ist jedoch in den Western-Blot Analysen nicht evident. Es ist bekannt, dass die RNA und Proteinexpression nicht immer konform sind. So zeigte eine Analyse von über 1000 Genen aus 23 humanen Zelllinien - darunter auch eine Urothelkarzinomzelllinie - , dass es nur bei ca. 33% der Gene eine signifikante Korrelation zwischen RNA und Proteinexpression gibt (Gry et al., 2009). Die Gründe für die fehlende Korrelation können auf RNA-Ebene beispielsweise in der Translationseffizienz oder auf Proteinebene auf einen vermehrten oder verminderten Abbau eines Proteins zurückzuführen sein. Eine interessante Überlegung ist speziell die Regulation durch miRNAs, die die Menge an mRNA, aber in vielen Fällen noch stärker die Translationseffizienz beeinflussen. Für EZH2 sind beispielsweise mehrere miRNAs bekannt, die seine Expression regulieren (Hibino et al., 2014). Auch für UTX könnte laut Internetdatenbanken v.a. miR-153-3p eine mögliche

miRNA sein, die dessen Expression beinflusst. Die Regulation der Translation und Proteinstabilität von UTX sollte in weiteren Arbeiten gezielt untersucht werden.

Die zwei Zelllinien mit bekannten somatischen Mutationen von UTX - nämlich RT112 und Ku 19-19 - zeigten ebenfalls ein deutlich nachweisbares Proteinprodukt. Dies ist im Falle von Ku 19-19 darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um eine Missense-Mutation handelt und somit noch ein Proteinprodukt gebildet werden sollte. Diese Ergebnisse stimmen jedoch nicht mit einer Publikation überein, in der kein UTX-Protein in dieser Zelllinie nachgewiesen werden konnte (van Haaften et al., 2009). Bei RT112 handelt es sich zwar um eine Frameshift-Mutation, diese ist allerdings heterozygot. Da die Zelllinie einen weiblichen Karyotyp hat, ist auch die verminderte, jedoch nachweisbare Proteinexpression erklärt.

4.3 Knockdown von UTX

Weil JMJD3 in den Urothelkarzinomzelllinien in der Regel nur schwach exprimiert war, wurden Knockdownversuche nur für UTX durchgeführt. In den drei untersuchten Zelllinien konnte nach Behandlung mit spezifischer siRNA eine signifikante Abnahme der UTX mRNA erzielt werden. Auf Proteinebene bestätigte sich die Herunterregulation jedoch nur in zwei Zellreihen. Eine mögliche Erklärung für die geringe Herunterregulation von UTX ist, dass es Bestandteil zahlreicher Enzymkomplexe ist und darin stabilisiert wird. Auch dieses Ergebnis kann als Hinweis auf eine signifikante posttranskriptionale Regulation verstanden werden.

Auch in den Knockdown-Experimenten wurde ebenfalls zunächst die Auswirkung auf die Zellvitalität untersucht. Es konnte jedoch keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet wiederum die Zeitspanne des Experiments. Wie oben erwähnt ergab auch eine transiente Überexpression keinerlei Veränderung der Zellvitalität, wohingegen eine stabile Transfektion zu einer deutlichen Abnahme der Klonogenität führte.

Weitestgehend gleichsinnig zeigte sich auch das Proliferationsverhalten. Es konnte auch hier keine signifikante Veränderung festgestellt werden.

4.3.1 Auswirkung des Knockdowns auf die Zielgene

Es wurden die mutmaßlichen Zielgene von UTX, *HBP1*, *RBBP4* und die *HOXC* Gene 6, 11 und 13 untersucht. Dabei wurden 72 Stunden Messwerte erhoben.

Nach Knockdown von UTX konnte in den Urothelkarzinomzellen tendenziell eine verminderte Expression von *RBBP4* gemessen werden, jedoch zeigte sich nur in einer Zelllinie eine statistisch signifikante Abnahme. Auch hier stellt sich die Frage, ob der Zusammenhang nach einem länger gewählten Zeitraum - beispielsweise von 2-3 Wochen - deutlicher geworden wäre. Zu vermuten wäre dies auch mit Hinblick auf die Publikation von Wang et al., in der RBBP4 als ein UTX Zielgen postuliert wurde und eine eindeutige Korrelation zwischen der Expression von UTX und RBBP4 nachgewiesen wurde, so dass es durchaus denkbar ist, dass eine verminderte Expression von UTX in einer verminderten Expression von RBBP4 resultieren kann. Eine Verminderung von UTX und seinen Zielgenen, unter anderem RBPP4, kommt gehäuft ebenso in Malignomen wie AML und B-Zell Lymphomen vor (Wang et al., 2010).

Bei dem als nächsten untersuchtem Zielgen *HBP1*, welches ebenfalls wie *RBBP4* zu dem RB1-Netzwerk gehört, konnte dagegen in den zwei Zelllinien mit erfolgreichem *UTX* Knockdown eine Erhöhung seiner mRNA gemessen werden. Dieses Ergebnis widerspricht den Erwartungen, da prinzipiell eine entgegengesetzte - also verminderte - Expression zu erwarten wäre. Wang et al. konnten nach Knockdown von UTX in humanen Fibroblasten eine Erhöhung von H3K27me3 am *HBP1* Promotor und eine erniedrigte mRNA Expression von *HBP1* nachweisen. In einer vorangegangenen Arbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf wurde in den Urothelkarzinomzelllinien eine verminderte *HBP1* Expression und eine signifikante positive Korrelation zwischen *UTX* und *HBP1* Expression festgestellt. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass zwischen UTX und HBP1 tatsächlich ein

Zusammenhang besteht, der jedoch nicht einfach linear kausal – also: UTX aktiviert das *HBP1*-Gen – verläuft.

Zuletzt wurden die drei *HOXC* Gene 6, 11 und 13 untersucht. Zunächst fiel auf, dass es deutliche Unterschiede bei der Expression dieser drei Gene in den drei von uns untersuchten Zelllinien gab. In der Zelllinie BFTC905 waren alle drei *HOXC* Gene um ein Vielfaches vermehrt exprimiert gegenüber den zwei anderen Zelllinien (5637 und VmCub1). Eine mögliche Erklärung wäre hierbei, dass es sich bei BFTC905 um eine Zelllinie aus einem papillären Tumor handelt, wohingegen die beiden anderen aus muskelinvasiven Tumoren stammen. Es ist aus zahlreichen Publikationen bekannt, dass Urothelkarzinome klinisch und molekulargenetisch in zwei verschiedene Klassen unterteilt werden, in denen auch bestimmte Gene vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Die niedrige Expression von zwei der drei untersuchten HOXC-Gene, nämlich *HOXC11* und *HOXC13*, in den Zelllinien 5637 und VmCub1 im Vergleich zu der Zelllinie BFTC905 stimmen mit der Publikation von Heubach überein (Heubach et al., 2015). Insgesamt zeigte sich in den untersuchten Zelllinien - mit Ausnahme von 639v - eine vermehrte Expression von *HOXC11* in den papillären Zelllinien im Vergleich zu den muskelinvasiven.

Es ist bekannt, dass UTX bei vielen physiologischen Differenzierungsvorgängen HOX-Gene reguliert. Zudem sind aberrante Expressionen von HOX-Genen in Karzinomen - auch im Urothelkarzinom - bekannt, sodass die drei von uns untersuchten HOX-Gene als mögliche Zielgene von UTX untersucht wurden. Eine veränderte Expression dieser drei Gene konnte jedoch nach UTX Knockdown nicht festgestellt werden. Dies mag zum einen erneut an dem gewählten Zeitfenster liegen. Denkbar wäre auch, dass diese drei speziellen *HOXC* Gene gar nicht oder in einem geringen Maß von UTX reguliert werden. HOX Gene werden auch vom MLL2 Komplex reguliert, von dem UTX nur ein Bestandteil ist (Lan et al., 2007). MLL2 katalysiert die Trimethylierung von H3K4, was eine transkriptionsaktivierende Wirkung hat. Bei einem Knockdown von UTX verändert sich zwar der H3K27me3 Spiegel, es findet sich jedoch keine Veränderung in der Besetzung der dazugehörigen Promotorregionen mit Komponenten des MLL2 Komplexes (Lee et al., 2007). Dies könnte eine Erklärung sein, wieso es trotz einer Herunterregulation von UTX zu keiner

signifikanten Veränderung der Zielgenexpression kommt. Auch bei einem Knockdown von UTX mittels short hairpin RNA (shRNA) in HeLa Zellen konnte zwar ein erhöhtes Level von H3K27me3 an den Promotoren einiger HOXD Gene festgestellt werden, auch hierbei konnte keine korrespondierende Herunterregulation der entsprechenden Gene festgestellt werden (Lan et al., 2007). Es muss folglich auch die kontextabhängige Wirkung epigenetischer Faktoren berücksichtigt werden, wie zum Beispiel die Zellspezifität. Zum anderen spielt auch der Zeitpunkt eine entscheidende Rolle; eine Zelle, die eine durch die HOX-Gene verursachte Entwicklung bereits durchlaufen hat und deren HOX Gene transkriptionell inaktiv sind, erfährt folglich auch keine Änderung dieses Zustandes nach Knockdown oder Überexpression von UTX.

4.3.2 Auswirkung des Knockdowns von UTX auf JMJD3

Zuletzt wurde eine mögliche Auswirkung eines Knockdowns von UTX auf die Expression von JMJD3 untersucht. In den zwei Zelllinien, in denen der Knockdown auf RNA und Proteinebene etabliert wurde, zeigte sich tatsächlich eine signifikant erhöhte Expression von JMJD3 auf RNA Ebene. Leider konnte - wegen der bereits diskutierten Antikörper-Problematik - das Ergebnis nicht auf Proteinebene verifiziert werden. Das Ergebnis deutet jedoch auf einen Kompensationsmechanismus zwischen den beiden Enzymen, der auch durch verschiedene Ergebnisse der Literatur gestützt wird. Beispielweise führt ein UTX-Knockdown in humanen T-ALL-Zellen ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der JMJD3 mRNA (Ntziachristos et al., 2014). Dieser Kompensationsmechanismus scheint in einem kurzen Zeitraum in Gang gesetzt zu werden, da es sich dort um eine Messung nach 48 Stunden handelte. In der dritten Zelllinie (BFTC905) wurde eine erhöhte JMJD3 Expression gemessen. Hier konnte jedoch der Knockdown von UTX auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden, sodass für diese Zelllinie keine zuverlässigen Schlüsse gezogen werden können.

4.4 Expression von EZH2

Eine erhöhte Expression von EZH2 in den meisten Urothelkarzinomzelllinien wurde in vielen vorhergehenden Arbeiten, auch des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf (1.2.5), nachgewiesen. Dies bestätigt sich zum größten Teil auch auf Proteinebene, wobei es auch bei EZH2 eine gewisse Diskrepanz zwischen der RNA und Proteinexpression gibt, allerdings nicht so stark wie bei UTX.

Am Beispiel der Zelllinie VmCub1 zeigte sich nach Überexpression von UTX keine Änderung im EZH2-Protein. Selbstverständlich ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses bei nur einer untersuchten Zelllinie eingeschränkt. Nach UTX Knockdown in den Zelllinien 5637, VmCub1 und BFTC905 zeigte sich eine Tendenz zur erhöhten EZH2 mRNA Expression, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Auch auf Proteinebene konnte keine Veränderung der Expression festgestellt werden. Da es sich hierbei um 72 Stunden Werte handelt, kann man nur spekulieren, ob in einem länger gewählten Zeitraum die angedeutete Tendenz deutlicher zum Tragen gekommen wäre.

4.5 UTY-Überexpression

Bei fehlendem Primer konnte kein gezielter Nachweis einer Überexpression von UTY erfolgen, dieser wurde vorausgesetzt. Nach zu vermutender Überexpression konnte keine Veränderung in der Zellvitalität in den untersuchten Zellreihen festgestellt werden. Zu Beginn der Arbeit war nur sehr wenig über die eigentliche Funktion von UTY bekannt. Bis vor kurzem wurde trotz großer Übereinstimmung mit UTX - sogar einer 96% Gleichheit in der katalytischen Domäne - eine Demethylaseaktivität angezweifelt. Erst im Jahr 2014 konnte diese tatsächlich nachgewiesen werden, wenn auch in einem geringerem Ausmaß als bei UTX (Walport et al., 2014). Eine aktuelle Arbeit legt Evidenz für eine Tumorsuppressionsfunktion auch von UTY vor (Ahn et al, 2016).

4.6 Knockdown von UTX in Urothelprimärkulturen

Zuletzt wurde versucht, einen Knockdown von UTX in normalen Urothelzellen zu etablieren. Im Vergleich zu Karzinomzelllinien ist UTX mRNA in normalen Urothelzellen stark vermehrt exprimiert. Der Knockdown konnte zumindest auf mRNA Ebene signifikant vollzogen werden. Nach der Bestätigung des Knockdowns auf Proteinebene können mögliche funktionelle Auswirkungen des Knockdown untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Bedeutung der Epigenetik bei der Entstehung von Karzinomen wurde insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten durch viele wissenschaftliche Arbeiten unterstrichen. So konnten beim Harnblasenkarzinom durch umfassende Sequenzierungsanalysen häufige Mutationen in bis dahin wenig bekannten Genen festgestellt werden, von denen viele für posttranslationale Modifikationen von Histonen zuständig sind. Das am häufigsten mutierte Gen war dabei UTX; eine Histondemethylase.

In einer vorangegangenen Arbeit des urologischen Forschungslabors der HHU Düsseldorf wurde UTX und möglicherweise auch der verwandten Histondemethylase JMJD3 eine tumorsuppressive Eigenschaft zugeschrieben, da deren Expression in den untersuchten Urothelkarzinomzelllinien deutlich vermindert war. Zudem konnten in einigen Zelllinien somatische Mutationen nachgewiesen werden.

Vor diesem Hintergrund befasst sich diese Arbeit mit der funktionellen Bedeutung der Histondemethylasen UTX und JMJD3 im Urothelkarzinom. Hierfür wurden die Auswirkungen einer Überexpression und eines Knockdowns auf verschiedene Zellparameter untersucht. Für die tumorsuppressive Eigenschaft der beiden Enzyme wurden weitere Anhaltspunkte gewonnen. So verminderte eine Überexpression von UTX und in geringerem Maße von JMJD3 in mehreren Urothelkarzinomzelllinien deren Klonogenität. Zudem lässt sich eine gegenseitige Beeinflussung zwischen UTX und JMJD3 vermuten, da bei niedriger Expression von UTX die JMJD3 Expression zunahm. Transiente Überexpression oder siRNA vermittelter Knockdown von UTX führten im Zeitraum von 3 Tagen zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellvitalität und der Proliferation der untersuchten Urothelkarzinomzelllinien. Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Zielgene *RBBP4*, *HBP1*, *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC13* festgestellt. Tendenziell nahm die Expression von *RBBP4* wie erwartet ab; den Erwartungen entgegengesetzt nahm die Expression von *HBP1* jedoch zu. Es lässt sich vermuten, dass die

Ergebnisse bei einem länger gewählten Versuchszeitraum - wie beim Klonogenitätsassay - deutlicher ausgefallen wären, sodass das Augenmerk in weiterführenden Arbeiten auf die Auswirkungen eines langfristigen Knockdowns, beispielsweise mittels shRNA beziehungsweise einer langfristigen Überexpression, beispielsweise mittels letiviralen Vektoren, gelegt werden sollte. Dabei sollten auch andere Parameter wie Zellmigration und Invasion untersucht werden.

Eine genaue Charakterisierung der Wirkung von UTX und JMJD3 kann zur Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen über „epigenetische Inhibitoren“ beitragen, beispielsweise über Inhibitoren der zu diesen Histondemethylasen antagonistischen Methyltransferase EZH2.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Abe, M., Hamada, J., Takahashi, O., Takahashi, Y., Tada, M., Miyamoto, M., Morikawa, T., Kondo, S., and Moriuchi, T. (2006). Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. Oncol. Rep. 15(4):797-802.

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

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

Ahn, Jinwoo, Kwang Hyun Kim, Sanghui Park, Young-Ho Ahn, Ha Young Kim, Hana Yoon, Ji Hyun Lee (2016). Target sequencing and CRISPR/Cas editing reveal simultaneous loss of UTX and UTY in urothelial bladder cancer. Oncotarget 39, 63252-60.

Allory, Y., Beukers, W., Sagrera, A., Flández, M., Marqués, M., Márquez, M., van der Keur, K.A., Dyrskjot, L., Lurkin, I., Vermeij, M., et al. (2014). Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. Eur. Urol. *65*, 360–366.

Balar, A.V., and Milowsky, M.I. (2015). Cytotoxic and DNA-targeted therapy in urothelial cancer: Have we squeezed the lemon enough? Cancer *121*, 179–187.

Balbás-Martínez, C., Sagrera, A., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Earl, J., Márquez, M., Vazquez, M., Lapi, E., Castro-Giner, F., Beltran, S., Bayés, M., et al. (2013). Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. Nat. Genet. *45*, 1464–1469.

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

Baylin, S.B., and Jones, P.A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. Nat. Rev. Cancer *11*, 726–734.

Burger, M., Catto, J.W.F., Dalbagni, G., Grossman, H.B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeney, L.A., La Vecchia, C., Shariat, S., et al. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. Eur. Urol. *63*, 234–241.

Cantile, M., Cindolo, L., Napodano, G., Altieri, V., and Cillo, C. (2003). Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. Oncogene *22*, 6462–6468.

Cheng, L., Montironi, R., Davidson, D.D., and Lopez-Beltran, A. (2009). Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. Mod. Pathol. *22*, S70–S95.

Dahm, P., and Gschwend, J.E. (2003). Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder: a review. Eur. Urol. *44*, 672–681.

Dawson, M.A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell *150*, 12–27.

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

Ene, C.I., Edwards, L., Riddick, G., Baysan, M., Woolard, K., Kotliarova, S., Lai, C., Belova, G., Cam, M., Walling, J., et al. (2012). Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a tumor suppressor by regulating p53 protein nuclear stabilization. PLoS ONE *7*, e51407.

Fortuny, J., Kogevinas, M., Zens, M.S., Schned, A., Andrew, A.S., Heaney, J., Kelsey, K.T., and Karagas, M.R. (2007). Analgesic and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: a population based case control study. BMC Urol. *7*, 13.

Gogalic, S., Sauer, U., Doppler, S., and Preininger, C. (2015). Bladder cancer biomarker array to detect aberrant levels of proteins in urine. Analyst *140*, 724–735.

Golka, K., Selinski, S., Lehmann, M.-L., Blaszkewicz, M., Marchan, R., Ickstadt, K., Schwender, H., Bolt, H.M., and Hengstler, J.G. (2011). Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the “wimp SNPs.” Arch. Toxicol. *85*, 539–554.

Gry, M., Rimini, R., Strömberg, S., Asplund, A., Pontén, F., Uhlén, M., and Nilsson, P. (2009). Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. BMC Genomics *10*, 365.

Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., Wu, R., Chen, C., Li, X., Zhou, L., et al. (2011). Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. Nat. Genet. *43*, 875–878.

Guo, G., Sun, X., Chen, C., Wu, S., Huang, P., Li, Z., Dean, M., Huang, Y., Jia, W., Zhou, Q., et al. (2013). Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. Nat. Genet. *45*, 1459–1463.

van Haaften, G., Dalgliesh, G.L., Davies, H., Chen, L., Bignell, G., Greenman, C., Edkins, S., Hardy, C., O'Meara, S., Teague, J., et al. (2009). Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. Nat. Genet. *41*, 521–523.

Hahn, N.M., Stadler, W.M., Zon, R.T., Waterhouse, D., Picus, J., Nattam, S., Johnson, C.S., Perkins, S.M., Waddell, M.J., and Sweeney, C.J. (2011). Phase II trial of cisplatin, gemcitabine, and bevacizumab as first-line therapy for metastatic urothelial carcinoma: Hoosier Oncology Group GU 04-75. J. Clin. Oncol. *29*, 1525–1530.

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

Hibino, S., Saito, Y., Muramatsu, T., Otani, A., Kasai, Y., Kimura, M., and Saito, H. (2014). Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. Oncogenesis *3*, e104.

Hong, S., Cho, Y.-W., Yu, L.-R., Yu, H., Veenstra, T.D., and Ge, K. (2007). Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 18439–18444.

Ide, H., and Miyamoto, H. (2015). Steroid hormone receptor signals as prognosticators for urothelial tumor. Dis. Markers *2015*. Article ID 840640.

Izzo, A., Kamieniarz, K., and Schneider, R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? Biol. Chem. *389*, 333–343.

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat. Genet. *33 Suppl*, 245–254.

Jankovic Velickovic, L., Hattori, T., and Stefanovic, V. (2009). Molecular markers in upper urothelial carcinoma associated to balkan endemic nephropathy. Aristolochic acid as the major risk factor of the worldwide disease. Sci. World J. *9*, 1360–1373.

Kim, J.J. (2012). Recent advances in treatment of advanced urothelial carcinoma. Curr. Urol. Rep. *13*, 147–152.

Kim, E., and Song, J.-J. (2011). Diverse ways to be specific: a novel Zn-binding domain confers substrate specificity to UTX/KDM6A histone H3 Lys 27 demethylase. Genes Dev. *25*, 2223–2226.

Kleer, C.G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S.A., Ghosh, D., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., Hayes, D.F., et al. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 11606–11611.

Knowles, M.A., and Hurst, C.D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. Nat. Rev. Cancer *15*, 25–41.

Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. Genes Dev. *16*, 2893–2905.

Lan, F., Bayliss, P.E., Rinn, J.L., Whetstine, J.R., Wang, J.K., Chen, S., Iwase, S., Alpatov, R., Issaeva, I., Canaani, E., et al. (2007). A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. Nature *449*, 689–694.

Lederer, D., Grisart, B., Digilio, M.C., Benoit, V., Crespin, M., Ghariani, S.C., Maystadt, I., Dallapiccola, B., and Verellen-Dumoulin, C. (2012). Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki Syndrome. Am. J. Hum. Genet. *90*, 119–124.

Lee, M.G., Villa, R., Trojer, P., Norman, J., Yan, K.-P., Reinberg, D., Croce, L.D., and Shiekhattar, R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. Science *318*, 447–450.

Lee, S., Lee, J.W., and Lee, S.-K. (2012). UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. Dev. Cell *22*, 25–37.

McCabe, M.T., Brandes, J.C., and Vertino, P.M. (2009). Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 3927–3937.

Miller, G.J., Miller, H.L., van Bokhoven, A., Lambert, J.R., Werahera, P.N., Schirripa, O., Lucia, M.S., and Nordeen, S.K. (2003). Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. Cancer Res. *63*, 5879–5888.

Miller, S.A., Mohn, S.E., and Weinmann, A.S. (2010). Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. Mol. Cell *40*, 594–605.

Morales Torres, C., Laugesen, A., and Helin, K. (2013). Utx is required for proper induction of ectoderm and mesoderm during differentiation of embryonic stem cells. PLoS ONE *8*, e60020.

Morgan, B.A. (1997). Hox genes and embryonic development. Poult. Sci. *76*, 96–104.

Murday, Sammy (2016). UTX und verwandte chromatinmodifizierende Proteine im Urothelkarzinom, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Welstead, G.G., Trimarchi, T., Bakogianni, S., Xu, L., Loizou, E., Holmfeldt, L., Strikoudis, A., King, B., et al. (2014). Contrasting

roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. Nature *514*, 513–517.

Paulson, K.E., Rieger-Christ, K., McDevitt, M.A., Kuperwasser, C., Kim, J., Unanue, V.E., Zhang, X., Hu, M., Ruthazer, R., Berasi, S.P., et al. (2007). Alterations of the HBP1 transcriptional repressor are associated with invasive breast cancer. Cancer Res. *67*, 6136–6145.

Russo, V.E.A. [Hrsg (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schmitz-Dräger, B.J., Droller, M., Lokeshwar, V.B., Lotan, Y., Hudson, M.A., van Rhijn, B.W., Marberger, M.J., Fradet, Y., Hemstreet, G.P., Malmstrom, P.-U., et al. (2014). Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis and surveillance: The WHO/ICUD Consensus. Urol. Int. 94(1):1-24.

Seenundun, S., Rampalli, S., Liu, Q.-C., Aziz, A., Palii, C., Hong, S., Blais, A., Brand, M., Ge, K., and Dilworth, F.J. (2010). UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. EMBO J. *29*, 1401–1411.

Shpargel, K.B., Sengoku, T., Yokoyama, S., and Magnuson, T. (2012). UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. PLoS Genet *8*, e1002964.

Teply, B.A., and Kim, J.J. (2014). Systemic therapy for bladder cancer – a medical oncologist's perspective. J. Solid Tumors *4*, 25–35.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. Nature *507*, 315–322.

Thieme, S., Gyárfás, T., Richter, C., Özhan, G., Fu, J., Alexopoulou, D., Muders, M.H., Michalk, I., Jakob, C., Dahl, A., et al. (2013). The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. Blood *121*, 2462–2473.

Tie, F., Banerjee, R., Conrad, P.A., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2012). Histone demethylase UTX and chromatin remodeler BRM bind directly to CBP and modulate acetylation of histone H3 lysine 27. Mol. Cell. Biol. *32*, 2323–2334.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature *419*, 624–629.

Vogt, M.H.J., Goulmy, E., Kloosterboer, F.M., Blokland, E., Paus, R.A. de, Willemze, R., and Falkenburg, J.H.F. (2000). UTY gene codes for an HLA-B60–restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in stem cell graft rejection: characterization of the critical polymorphic amino acid residues for T-cell recognition. Blood *96*, 3126–3132.

Walport, L.J., Hopkinson, R.J., Vollmar, M., Madden, S.K., Gileadi, C., Oppermann, U., Schofield, C.J., and Johansson, C. (2014). Human UTY(KDM6C) is a male-specific n-methyl lysyl demethylase. J. Biol. Chem. *289*, 18302–18313.

Wang, J.K., Tsai, M.-C., Poulin, G., Adler, A.S., Chen, S., Liu, H., Shi, Y., and Chang, H.Y. (2010). The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. Genes Dev. *24*, 327–332.

Weikert, S., Christoph, F., Köllermann, J., Müller, M., Schrader, M., Miller, K., and Krause, H. (2005). Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. Int. J. Mol. Med. 16(2):349-53.

Williamson, M.P., Elder, P.A., Shaw, M.E., Devlin, J., and Knowles, M.A. (1995). p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. Hum. Mol. Genet. *4*, 1569–1577.

Wu, X.-R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. Nat. Rev. Cancer *5*, 713–725.

Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, Krebs in Deutschland 2009/2010 - kid_2013_c00-97_krebs_gesamt.pdf., 28.03.2017

Interational Agency for Research on Cancer, World Cancer Factsheet, CS_REPORT_WORLD.pdf., 28.03.2017

Danksagung

Mein größter und herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz für die Vergabe des Promotionsthemas, für seine sehr gute Betreuung, seine große und unermüdliche Unterstützung und seine unerschöpfliche Geduld.

Herrn Prof. Dr. Peter Albers danke ich für die Nutzung des urologischen Forschungslabors.

Ich möchte mich bei den Kollegen des urologischen Forschungslabors bedanken, insbesondere Frau Christiane Hader danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Meinen Eltern und meinem Verlobten möchte ich für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung danken.