



**Bedeutung aberranter DNA-Methylierungsveränderungen an Schlüsselgenen
des Methylgruppenmetabolismus für die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms**

Inaugural-Dissertation

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

**vorgelegt von
Lars Erichsen
aus Goch,**

Düsseldorf, August 2018

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

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

Berichtersteller:

1. Priv.-Doz. Dr. Simeon Santourlidis
2. Prof. Dr. William Frank Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2019

„Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart, lässt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.“

Alexander von Humboldt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Epigenetik	1
1.1.1 Histonmodifikationen.....	3
1.1.2 Kleine, nicht kodierende RNAs (miRNAs)	6
1.1.3 DNA-Methylierung.....	7
1.1.4 Methylgruppenmetabolismus	11
1.1.5 Polyaminmetabolismus	15
1.1.6 Einfluss des „one-carbon-metabolism“ und Polyaminstoffwechselweges auf die Epigenetik.....	18
1.2 Tumorerkrankungen	21
1.2.1 Epigenetische Veränderungen in Tumorzellen	25
1.2.2 Metabolische Veränderungen in Tumorzellen	27
1.3 Die Harnblase – Anatomie und Funktion	29
1.3.1 Das Harnblasenkarzinom.....	30
1.3.2 Genetische und epigenetische Veränderungen im Harnblasenkarzinom.....	33
1.4 Transposable Elemente.....	36
1.4.1 LINE-1 Retrotransposons.....	39
1.4.2 LINE-1 Retrotransposons in Tumorerkrankungen	42
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	43
2. Material und Methoden	46
2.1 Material	46
2.1.1 Probenmaterial	46
2.1.2 Geräte.....	49
2.1.3 Molekularbiologische Kits.....	50
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	51
2.1.5 DNA / Protein Standards, Enzyme und Substrate	52
2.1.6 Medien und Antibiotika.....	53
2.1.7 Bakterienstämme, Vektoren und Zelllinien	53
2.1.8 Chemikalien	54
2.1.9 Oligonukleotide und siRNA	55
2.1.10 Antikörper	58
2.1.11 Sonstige Materialien	58
2.1.12 Computerprogramme und -Software	59
2.2 Methoden	60
2.2.1 Entparaffinierung der Gewebeproben	60

2.2.2 Nukleinsäuren	61
2.2.2.1 DNA Isolation aus FFPE Geweben	61
2.2.2.2 DNA Isolation aus den Zelllinien	61
2.2.2.3 DNA Isolation aus Vollblut.....	61
2.2.2.4 RNA Isolation.....	61
2.2.2.5 DNA- und RNA-Quantifizierung.....	62
2.2.2.6 Bisulfit-Konvertierung	62
2.2.2.7 Konventionelle PCR.....	63
2.2.2.8 Nested PCR.....	65
2.2.2.9 Quantitative „ <i>Real Time</i> “ PCR.....	66
2.2.2.10 Reverse Transkription	68
2.2.2.11 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Gelelektrophorese	68
2.2.2.12 DNA Extraktion aus Agarosegelen	69
2.2.2.13 In vitro Methylierung.....	69
2.2.3 Proteine	70
2.2.3.1 Proteinisolation aus den Zelllinien	70
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	71
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	71
2.2.4 Methylierungsspezifische Mikroarrays	72
2.2.4.1 Fragmentierung der DNA	73
2.2.4.2 DNA Immunopräzipitation	74
2.2.4.3 Whole Genome Amplification	74
2.2.4.4 Labeling	74
2.2.4.5 Hybridisieren und Scannen der Arrays	75
2.2.5. Bakterien	76
2.2.5.1 Restriktionsverdau der Vektoren und Promotorfragmente sowie deren Ligation	76
2.2.5.2 Transformation.....	77
2.2.5.3 Plasmid Präparation aus den Bakterienkolonien	78
2.2.6 Zellkultur.....	78
2.2.6.1 Auftauen, Kultivierung und Kryokonservierung der Zelllinien.....	78
2.2.6.2 Bestimmung der Zellzahl.....	80
2.2.6.3 Transfektion der Zelllinien	80
2.2.6.4 Luciferase Assay.....	81
2.2.6.5 siRNA Behandlung der Zellen	81
2.2.7 Statistische Analysen	82
3. Ergebnisse.....	83

3.1 Globale Analysen der Methylierungsveränderungen innerhalb der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges	84
3.1.1 Detektion der DNA-Methylierungsveränderungen innerhalb der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges im Harnblasenkarzinom durch methylierungsspezifische Mikroarray-Analysen.....	84
3.1.2 Detailanalyse und Verifizierung der Methylierungsveränderungen der Gene <i>ODC1</i> und <i>AHCY</i> im Urothelkarzinom durch Bisulfit-Sequenzierung	93
3.1.3 Einfluss der DNA-Methylierungsveränderungen auf die mRNA-Transkription der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges	103
3.1.4 LINE-1 Hypermethylierung im frühen Harnblasenkarzinom.....	107
3.2 Funktionelle Bedeutungen der gefundenen aberranten Methylierung an den Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges.....	110
3.2.1 Bestätigung der Promotoraktivität der 5'-regulatorischen Bereiche der Gene <i>AHCY</i> und <i>ODC1</i>	110
3.2.2 Funktionelle Bedeutung der Methylierungsveränderungen im 5'-regulatorischen Bereich des Schlüsselgens <i>ODC1</i> für die zelluläre Integrität und das Zellschicksal	112
3.2.2.1 Überprüfung der erfolgreichen Repression des <i>ODC1</i> Genproduktes	113
3.2.2.2 Auswirkungen der <i>ODC1</i> siRNA Behandlung auf die funktionelle Integrität des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges gemessen anhand der globalen LINE-1 DNA-Methylierung, der LINE-1 Transkription und LINE-1 Translation.....	122
3.2.2.3 Auswirkungen der <i>ODC1</i> siRNA Behandlung auf die Zellzykluskontrolle	133
3.2.2.4 Globale Analysen der durch siRNA Behandlung gegen <i>ODC1</i> ausgelösten Methylierungsveränderungen.....	137
4. Diskussion	146
4.1 Wann können DNA-Methylierungsveränderungen detektiert werden und wie werden diese etabliert?.....	146
4.2 DNA-Methylierungsveränderungen im Harnblasenkarzinom	149
4.2.1 DNA-Methylierungsveränderungen an Genen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsels.....	149
4.2.2 Konsequenzen der detektierten Veränderungen für die globale DNA-Methylierung gemessen anhand der LINE-1-Elemente	165
4.3 Einfluss des Gens <i>ODC1</i> auf zelluläre Funktionen	168
4.3.1 Funktionelle Bedeutung von <i>ODC1</i> auf die Proliferation und Zellzykluskontrolle	168
4.3.2 Funktionelle Bedeutung von <i>ODC1</i> auf das Methylom	172
4.3.3 <i>ODC 1</i> als Masterregulator der Epigenetik.....	181
4.4 Der „ <i>PrimeEpiHit</i> “ (PEH) als möglicher Initiator der urothelialen Tumorgenese	183
4.5 Ausblick.....	187
5.1 Zusammenfassung.....	189
5.2 Summary.....	191
6. Literaturverzeichnis.....	192

7. Anhang	218
7.1 Originalabbildungen	218
7.2 Datenblätter der Zelllinien.....	222
7.3 Antikörper	228
7.4 Veröffentlichte Abbildungen.....	232
Veröffentlichungen	235
Danksagung	236
Eidesstattliche Erklärung	238

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histonmodifikationen der Lysinreste an Histon H3 sowie deren „ <i>writers</i> “, „ <i>erasers</i> “ und „ <i>readers</i> “ (Shen & Laird, 2013).	5
Abbildung 2: Anbringung der Methylgruppe an der Pyrimidinbase Cytosin (Chen & Riggs, 2011).	7
Abbildung 3: Stilllegung eines Gens durch DNA-Methylierung (Lahtz & Pfeifer, 2011).	9
Abbildung 4: „ <i>Writers</i> “, „ <i>erasers</i> “ und „ <i>readers</i> “ der DNA-Methylierung (Shen & Laird, 2013).	11
Abbildung 5: Der " <i>One-carbon-metabolism</i> " (Clayton <i>et al.</i> , 2005; Coppede, 2010).	13
Abbildung 6: Wirkweise der Polyamine auf zelluläre Funktionen (Seiler, 2005).	16
Abbildung 7: Der Polyaminstoffwechselweg (mod. nach Pegg, 2008).	17
Abbildung 8: Einfluss der Metabolite auf die epigenetischen Methylierungsreaktionen (Kinnaird <i>et al.</i> , 2016).	19
Abbildung 9: Einfluss der Metabolite auf epigenetische Regulatoren und deren Wirkung auf zelluläre Entscheidungen (Kinnaird <i>et al.</i> , 2016).	21
Abbildung 10: Die fünf genetischen Treffer zur Entstehung des Kolonkarzinoms. (Knudson, 2001).	23
Abbildung 11: „ <i>Grading</i> “ und „ <i>Staging</i> “ des Harnblasenkarzinoms (Knowles & Hurst, 2015).	32
Abbildung 12: Konzept des " <i>field change</i> " (Knowles & Hurst, 2015).	36
Abbildung 13: Transposable Elemente im Säugetiergenom.	38
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Bisulfit Konvertierung (New England Biolabs, 2018).	63
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Nested PCR (Thermo Fisher Scientific, 2017).	65
Abbildung 16: Darstellung der Methylierungsreaktion durch die DNA Methyltransferasen (Hitchler & Domann, 2007).	70
Abbildung 17: Verfahren der Mikroarray-Analyse (Roche Diagnostics GmbH, 2011).	73
Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der „ <i>peak values</i> “ für die Gene <i>AHCYL2</i> , <i>MTHFR</i> und <i>ODC1</i>	89
Abbildung 19: Methylierungssignaturen des 5′-regulatorischen Bereiches des <i>ODC1</i> -Gens in verschiedenen unifokalen Tumoren.	94
Abbildung 20: Alignment der Originalsequenz (<i>ori</i>) aus der NCBI Datenbank mit den Sequenzierungsdaten.	96
Abbildung 21: Detailanalyse des 348bp großen 5′-regulatorischen Bereiches des <i>AHCY</i> -Gens in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms.	98
Abbildung 22: Detailanalyse des 224bp großen 5′-regulatorischen Bereiches des <i>ODC1</i> -Gens in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms.	101
Abbildung 23: Transkriptionsdaten ausgewählter Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges in verschiedenen Tumorentitäten.	105

Abbildung 24: Relative Quantifizierung des Methylierungsgrades der LINE-1 Retrotransposons in zellulärer DNA, isoliert aus Harnblasengewebeproben.	109
Abbildung 25: Messung der Promotoraktivität für die 5'-regulatorischen Bereiche der Gene <i>AHCY</i> und <i>ODC1</i> in der Zelllinie HEK 293T mittels Luciferase Assay.	111
Abbildung 26: Relative Quantifizierung des Transkriptionsgrades des <i>ODC1</i> -Gens in den verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen <i>ODC1</i> und DFMO Behandlung.	116
Abbildung 27: Zellzahlbestimmung der verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen <i>ODC1</i> und DMFO Behandlung.	122
Abbildung 28: Relative DNA-Methylierung der LINE-1 Retrotransposons in den urothelialen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen <i>ODC1</i> und DFMO Behandlung.	126
Abbildung 29: Relative Quantifizierung des Transkriptionsgrades der LINE-1 Retrotransposons in den verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen <i>ODC1</i> und DFMO Behandlung.	130
Abbildung 30: Analyse der ORF1-Translation in den mit siRNA gegen <i>ODC1</i> behandelten Zelllinien HT1376 und dem primären Urothel nach 72h Behandlungsdauer.	132
Abbildung 31: Relative Quantifizierung des <i>p21</i> -Transkriptionsgrades in den verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen <i>ODC1</i>	136
Abbildung 32: „Heatmap“ der fünfzig Gene mit dem höchsten und dem niedrigsten Methylierungsgrad im jeweiligen 5'-regulatorischen Bereich in den Zelllinien nach Behandlung mit siRNA gegen <i>ODC1</i>	139
Abbildung 33: Prozentuale Verteilung der 50 am stärksten und der 50 am niedrigsten methylierten Gene anhand ihrer Funktion in den untersuchten Zelllinien HT 1376 und SW 1710.	141
Abbildung 34: Die „PrimeEpiHit“-Hypothese.	186

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase (Deutsche Krebshilfe, 2016).	31
Tabelle 2: Liste der untersuchten Gene des Methylgruppen- und Polyaminmetabolismus (Gene, NCBI).....	85
Tabelle 3: Statistische Auswertung der „ <i>peak values</i> “ der differentiell methylierten Regionen (DMR) innerhalb der 5'-regulatorischen Einheiten der Schlüsselgene des Methylgruppenmetabolismus und Polyaminstoffwechselweges.	91

IV Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1bp	Ein Basenpaar
1 kb	Eine Kilobase
5caC	5'-Carboxylcytosin
5fC	5'-Formylcytosin
5mC	5'-Methylcytosin
5hmC	5'-Hydroxymethylcytosin
5hmU	5'-Hydroxymethyluracil
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolat
5, 10-MTHF	5, 10-Methylenetetrahydrofolat
α -KG	α -Ketoglutarat
A	Adenin
Acetyl CoA	Acetyl-Coenzym-A
Act	Acetylierung
AHCY	Adenosylhomocysteinase
AMD	Adenosylmethionin-Decarboxylase
AMP	Adenosinmonophosphat
An	Poly (A); A/B, A- and B-box Pol III Promotor
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ARG	Arginase
ASB	Ankyrin repeat and SOCS box-containing
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
B6	Vitamin B6
B12	Vitamin B12

BER	Base excision repair
bG	Benachbartes Gewebe
BHMT	Betain-Homocystein-S-Methyltransferase
BLCA	Bladder Urotheliale Carcinoma
BMI	Body Mass Index
BPE	Hypophysenextrakt (Bovine Pituitary Extract)
BRCA	Breast invasive carcinoma
C	Cytosin; zinc knuckle domain
C _T	Threshold Cycle
Ca.	Circa
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
cDNA	Complementary DNA
CGIs	CpG-Inseln
CHOL	Cholangiocarcinoma
CIP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CpG	Cytosin/Guanin-Dinukleotid
CYS	Cystathionin
D-2HG	(D)-2-Hydroxygluterat
DAPk1	Human death-associated protein kinase 1
DBC1	Deleted in bladder cancer 1
dcSAM	Decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
Dest.	Destilliert
DFMO	Difluormethyl-Ornithin
DLBC	Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma

DMF	Dimethylformamid
DMR	Differenziell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	Direct repeat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EN	Endonuclease domain
Env	Envelope
ERCC2	Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 2
ESC	Embryonale Stammzellen
EtBR	Ethidiumbromid
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FANCA	Fanconi anaemia complementation group a
FFPE	Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Guanin
G	Gramm, Erdbeschleunigung
Gag	Group-specific antigen
GAMT	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase
GNMT	Glycin-Methyltransferase

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCY	Homocystein
HDAC	Histon-Deacetylase
HDM	Histon-Demethylase
HMT	Histon-Methyltransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
INT	Integrase domain
ISUP	International Society of Urological Pathology
ITR	Inverted terminal repeat
JHDM	Jumonji-C-domain-containing Histon-Demethylase
k	Tausend
KDM6A	Lysine-spezifische Demethylase 6A
KICH	Kidney Chromophobe
LGG	Brain Lower Grade Glioma
LINE	Long Interspersed Element
LTR	Long terminal repeat
M	Molar, Million
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
MAT2A	Methionin-Adenosyltransferase Isoform Typ 2
MBD	Methyl-bindende-Domäne
Me1	Monomethylierung
Me3	Trimethylierung

MeDIP	Methylated DNA immunoprecipitation
MET	Methionin
METZ	Methionin-Zyklus
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MIBC	Muskel-invasives Harnblasenkarzinom
Mind.	Mindestens
miRNA	Kleine nicht kodierende RNA
ml	Milliliter
MLL2	Mixed-lineage leukaemia 2
Mm	Millimeter
mRNA	Messenger RNA
MTA	Methylthioadenosin
MTHFD1	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 1
MTHFD1L	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 1 Like
MTHFD2	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 2
MTHFD2L	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 2 Like
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MTR	Methionin-Synthase
MTRR	Methionin-Synthase-Reduktase
n/D	Not determined
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NG	Normales / gesundes Gewebe
ng	Nanogramm
NIBC	Nicht-invasives Harnblasenkarzinom
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMIBC	Nicht muskelinvasives Harnblasenkarzinom
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ODC	Ornithin-Decarboxylase
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PAOX	Polyamin-Oxidase
PBs	Processing bodies
PcG	Polycomb Komplex
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEH	PrimeEpiHit
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
PGC	Urkeimzelle
pH	Potential of hydrogen
pM	Pikomolar
pmol	Pikomol
PMAT	Precision Mixer Alignment Tool
pre-miRNAs	Vorläufer-miRNAs
Pol	Polymerase
Prt	Protease
PTCH1	Patched 1
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUNLMP	Papillary urothelial malignancy of low malignant potential
RB1	RB transcriptional corepressor 1
RISC	RNA induced silencing complex
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rounds per minute
RSEM	RNA sequencing expectation maximization
RT	Raumtemperatur; reverse transcriptase domain
S.	Seite

SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SESAME	Serine-responsive SAM-containing metabolic enzyme complex
SGs	Stress granules
SHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase
SINE	Short Interspersed Element
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SMOX	Spermin-Oxidase
SMS	Spermin-Synthase
SNP	Single nucleotide polymorphism
S.O.C.	Super Optimal Broth Medium
SRM	Spermidin-Synthase
SSAT	Spermidin- / Spermin-N1-Acetyltransferase 1
SSIV	Super Script IV
ST18	Tumorigenicity 18
T	Tumor Gewebe, Thymin
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TCA	Krebs-Zyklus
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TDG	Thymin DNA Glycosylase
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TET	Ten-eleven-translocation
TGCT	Testicular Germ Cell Tumors
THF	Tetrahydrofolat
TNM	Tumor-Node-Metastasis-System
TP53	Tumor Protein P53

TpC	Thymin/Cytosin-Dinukleotid
TPRT	Target-primed reverse transcription
TrxG	Trithorax Gruppen Komplex
TSC1	Tuberous sclerosis 1
TSD	Target site duplication
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U	Units
UCS	Uterine Carcinosarcoma
UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolettstrahlung
UVM	Uveal melanoma
V	Volt
Vgl.	Vergleiche
VNTR	Variable number tandem repeats
WGA	Whole Genome Amplification
WHO	World Health Organization
Z.B.	Zum Beispiel
ZNF	Zink-Finger-Domäne

1. Einleitung

1.1 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik (Epi = griechisch für obenauf, daneben) wurde erstmals in den 1940-50er Jahren geprägt, als gezeigt werden konnte, dass in der DNA tierischer Zellen die Pyrimidinbase Cytosin oftmals methyliert vorkommt (Wyatt, 1950). Zu dieser Zeit lagen jedoch noch keine Kenntnisse über die Funktion oder die Verteilung der so modifizierten Basen vor. Im Jahr 1942 wurde die Epigenetik von Waddington als Mechanismus beschrieben, durch den die Gene ihre phänotypische Ausprägung bewirken. Nach aktueller Definition steht der Begriff Epigenetik für die mitotisch oder meiotisch vererbaren Veränderungen von Genfunktionen, die nicht durch Änderungen der DNA-Sequenz erklärbar sind (Russo *et al.*, 1996) und leitet sich aus den Wörtern „Genetik“ und „Epigenese“ ab. Der Begriff „Epigenese“ steht für die Differenzierung der Zellen während der embryonalen Entwicklung (Craig & Wong, 2011), bei der sich die Rolle der Epigenetik besonders anschaulich nachvollziehen lässt. Während dieses Prozesses entstehen aus einer totipotenten Stammzelle hunderte von verschiedenen Zelltypen. Jede Zelle dieser Zelltypen besitzt die gleiche genetische Grundausstattung, benötigt jedoch eine spezifische Regulation der Genexpression, um die jeweiligen strukturellen und funktionellen Eigenschaften erlangen zu können (Jaenisch & Bird, 2003). In diesem Zusammenhang konnte bereits in den 1980er Jahren von Monk *et al.* (1987) gezeigt werden, dass das generelle DNA-Methylierungslevel im sehr frühen Embryo verhältnismäßig niedrig ist. Im Jahr 1992 wurde dann von Kafri *et al.* entdeckt, dass an diversen Genen, die ursprünglich in der Oozyte oder im Spermium methyliert vorliegen, eine „Zurücksetzung“ des epigenetischen Codes stattfindet. Die epigenetisch „zurückgesetzten“ Sequenzen werden im Verlauf der Entwicklung des Embryos „*de novo*“ methyliert und dieser Prozess betrifft nahezu alle CpG Dinukleotide im gesamten Genom, bis auf solche, die hiervoor geschützt sind (Cedar & Bergman, 2012). Der Mechanismus, der zu diesem Schutz vor der „*de novo*“ Methylierung führt, ist bisher nicht bekannt. Jedoch sind nahezu alle geschützten Sequenzen mit der Bindung der RNA Polymerase und dem Vorhandensein von dreifach Methylierung am Histon H3K4 assoziiert (Straussman *et al.*, 2009). Hierdurch erscheint die transkriptionelle Aktivität dieser Regionen ausreichend, um sie vor der „*de novo*“ Methylierung zu schützen (Klutstein *et al.*, 2016). Es findet somit ein Prozess der

Reprogrammierung in der embryonalen Entwicklung statt (Kafri *et al.*, 1992), welcher zur Festlegung der unterschiedlichen Zellschicksale beiträgt (Reik *et al.*, 2001), indem entweder Gene durch „*de novo*“ Methylierung reprimiert oder durch Demethylierung von gewebespezifischen Genen aktiviert werden (Cedar & Bergman, 2012). Sobald diese Veränderungen etabliert sind, werden sie automatisch – selbst bei Abwesenheit der ursprünglich initiierenden Faktoren – aufrecht erhalten (Siegfried *et al.*, 1999).

Die Histonmodifikationen (1.1.1), kleine, nicht kodierende RNAs (1.1.2) und die DNA-Methylierung (1.1.3) stellen die drei am besten untersuchten Mechanismen der Epigenetik dar (Taby & Issa, 2010). Sie sind generell reversibel, werden aber zumeist stabil in meiotischen und mitotischen Zellteilungen weitergegeben (Jaenisch & Bird, 2003). Die beiden Mechanismen der DNA-Methylierung und der Histonmodifikationen interagieren miteinander, um die in Chromatin gepackte DNA für die Transkription zugänglich oder unzugänglich zu machen (Delcuve *et al.*, 2009). Hierbei verändern die Histonmodifikationen die Chromatinstruktur, während die Methylierung direkt die DNA betrifft (Janning & Knust, 2008). Veränderungen innerhalb der drei genannten Mechanismen spielen jedoch nicht nur, in entwicklungsbiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle, sondern auch in ausdifferenzierten somatischen Zellen. Auch in diesen kann eine Regulation der transkriptionellen Aktivität durch Veränderungen der epigenetischen Modifikationen ausgelöst werden. Hierdurch ist es der Zelle möglich auf interne und externe Einflüsse zu reagieren, wobei vor allem sich ändernde Umweltbedingungen und soziale Faktoren – wie z.B. die Ernährung oder die Exposition gegenüber bestimmten karzinogenen Stoffen – eine wichtige Rolle spielen (Stefanska *et al.*, 2012; Besaratinia & Tommasi, 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl in geringem Ausmaße „*de novo*“ Methylierung der CpG-Inseln (Kulis *et al.*, 1999; Teschendorff *et al.*, 2010; Issa, 2014) als auch generelle Demethylierung in somatischen Zellen (Maegawa *et al.*, 2010) während des Alterungsprozesses stattfinden. Um sich auf die wechselnden Umweltbedingungen einzustellen, benötigt die Zelle verschiedene epigenetische Regulatoren. Generell wird diese Aufgabe von „*initiators*“, wie z.B. lange nicht kodierende RNAs, übernommen. Diese initiieren das epigenetische „*Remodelling*“ und „führen“ sogenannte „*writers*“ zu der Sequenz im Genom, an der die Veränderung angebracht werden soll. Die „*writers*“ etablieren hierbei die epigenetischen Signaturen, so dass diese von sogenannten „*readers*“

interpretiert werden können und die Informationen in zelluläre Funktionen umgesetzt werden. Sogenannte „*remodelers*“ können zusätzlich noch die Proteinanordnung innerhalb der Nukleosomen verändern und „*insulators*“ etablieren die Grenzen zwischen den einzelnen epigenetischen Domänen (Shen & Laird, 2013).

Ein gut untersuchtes Beispiel für die unterschiedliche Entwicklung aufgrund von epigenetischen Mechanismen verschiedener Individuen einer Art, die alle über dasselbe Erbgut verfügen, zeigt eine Studie an Honigbienen (Lyko *et al.*, 2010). In dieser Studie wurden aufgrund unterschiedlicher Ernährung der Larven nach deren Schlüpfen – Larven, die sich zu Königinnen entwickeln, erhalten Gelée Royal und Larven, die sich zu Arbeiterinnen entwickeln, erhalten Pollen und Nektar – 550 differentiell methylierte Gene festgestellt, die entscheidend zur unterschiedlichen Entwicklung der Larven beitragen. Aus diesem Grund dient das Bienenmodell als Paradebeispiel für die transkriptionelle Plastizität, die durch Umweltfaktoren ausgelöst werden kann und durch epigenetische Mechanismen vermittelt wird.

1.1.1 Histonmodifikationen

Histone sind Oktamere und bestehen aus den folgenden acht Proteinen: 2x H2A, 2x H2B, 2x H3 und 2x H4. Diese sind von 147 Basenpaaren der DNA umwickelt und werden in dieser strukturellen Organisation als Nukleosom bezeichnet (Van Holde, 1988), welche untereinander durch das „*linker*“ Histon H1 verbunden werden. Jede Oktameruntereinheit enthält mehrere Lysinreste, welche im Zellkern Milieu positiv geladen sind und dadurch die negativ geladene DNA anziehen (Kinnaird *et al.*, 2016). Die Lysinreste des N-terminalen Schwanzes der Histonproteine können jeweils posttranslational modifiziert werden, wodurch sich die Interaktion zwischen den Histonproteinen und der DNA verändert. Dazu zählen u.a. Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung (Goodsell, 2003). So ist z.B. im Genom von Säugetieren an mehr als 60 der Lysinreste die Anbringung einer Acetylgruppe festgestellt worden. Hierbei kann die Acetylgruppe an den Histonproteinen H1 an 16 Stellen, H2A an 10 Stellen, H2B an 16 Stellen, H3 an 13 Stellen und H4 an 9 Stellen angebracht werden (Heby *et al.*, 1988; Zhang & Reinberg, 2001). Diese Reaktion erfordert als „*writer*“ die Histon-Acetyltransferasen (HATs) und als „*eraser*“ die Histon-Deacetylasen (HDACs) (Chi *et al.*, 2010). Das Anbringen der Acetylgruppe bewirkt eine Neutralisierung der positiven Ladung des Lysinrestes, wodurch die Interaktion zwischen dem Histon und der DNA gelockert wird. Dies führt zu einer

offeneren Chromatin-Konfiguration (Euchromatin) und erlaubt dadurch die Transkription der DNA Sequenz. Die Deacetylierung der Histone hingegen ist generell mit kondensiertem, kompaktem Chromatin (Heterochromatin) und transkriptioneller Repression verbunden (Kinnaird *et al.*, 2016).

Die Histon-Methylierung kann sowohl die Aktivierung als auch die Repression der Transkription regulieren. Dies ist abhängig von der Position des Lysinrestes an dem die Modifikation angebracht wird (Zhang & Reinberg, 2001). Histon-Methylierung ist für fünf Lysinreste des Histons H3 beschrieben (K4, K9, K27, K36, K79) und an einer Position des Histons H4 (K20), wobei jeder dieser Reste einfach, zweifach oder dreifach methyliert vorliegen kann (Martin & Zhang, 2005; Bannister & Kouzarides, 2005). Die Anbringung einer Methylgruppe an H3K4, H3K36 oder H3K79 ist assoziiert mit transkriptioneller Aktivität, wohingegen die Methylierung an H3K9, H3K27 oder H4K20 mit transkriptioneller Repression verbunden ist (Fischle *et al.*, 2003; Lachner *et al.*, 2003). Die Methylierungsreaktion wird von Histon-Methyltransferasen (HMTs; „*writers*“) und entgegengesetzt wirkenden Demethylasen (HDMs; „*eraser*“) durchgeführt (Chi *et al.*, 2010).

Die Enzyme, welche die Histonmodifikationen anbringen, agieren generell als Komplexe, wie z.B. der reprimierende Polycomb (PcG) und der aktivierende Trithorax-Gruppen Komplex (TrxG). Diese beiden Komplexe bilden ein Gegengewicht in der Genregulation und spielen in entwicklungsbiologischen Prozessen sowie in diversen Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle (Mills, 2010). Im menschlichen Genom sind ca. 2.000 Gene mit dem PcG Komplex assoziiert (Klutstein *et al.*, 2016). Dieser enthält die Histon-Methyltransferase EZH2 („*enhancer of zeste homolog 2*“), welche für die Trimethylierung am Histon H3K27 verantwortlich ist. Diese Modifikation hat eine lokale Heterochromatisierung zur Folge und stellt ein generelles System zur transkriptionellen Stilllegung der Gene dar. Sie ist vor allem in den frühen Stadien der Embryogenese an Genen zu finden, die für die Entwicklung und Differenzierung kodieren (Klutstein *et al.*, 2016). Durch Entfernung des PcG Komplexes können diese Gene jedoch bei Bedarf reaktiviert werden (Ahuja, 2014). In diversen Tumorerkrankungen konnte festgestellt werden, dass CpG-Inseln, die mit dem PcG Komplex assoziiert sind, „*de novo*“ methyliert werden. Der Auslöser für diese Reaktion ist bisher nicht bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass EZH2 – neben der Funktion als Histon-Methyltransferase – ebenfalls die DNA-

Methyltransferase DNMT3a/b binden kann (Vire *et al.*, 2006). Hierdurch wird angenommen, dass die mit dem PcG Komplex assoziierten Gene ebenfalls für die „*de novo*“ Methylierung exponiert sind. Der TrxG Komplex enthält die Histon-Methyltransferase MLL. Diese ist für die Methylierung an Histon H3K4 verantwortlich und stellt eine aktivierende Modifikation der Transkription dar (Shen & Laird, 2013). Beide Komplexe können HATs bzw. HDACs rekrutieren und wirken somit einander entgegen, wobei die Etablierung der Histon-Acetylierung eine Bindung des PcG Komplexes verhindern kann (Mills, 2010). Eine Liste der aktivierenden und der reprimierenden Histonmodifikationen an Histone H3 sowie der „*writers*“, „*erasers*“ und „*readers*“ ist in Abbildung 1 dargestellt.

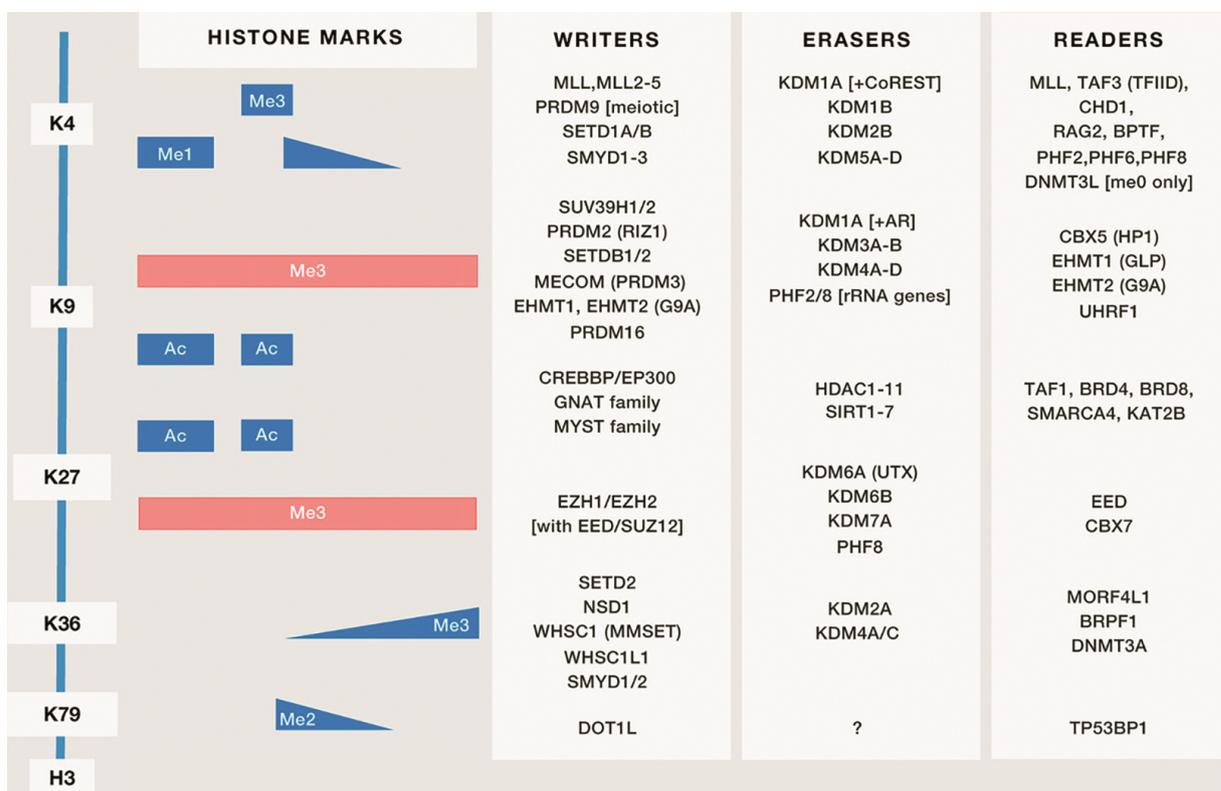


Abbildung 1: Histonmodifikationen der Lysinreste an Histon H3 sowie deren „*writers*“, „*erasers*“ und „*readers*“ (Shen & Laird, 2013).

Exemplarisch sind die am häufigsten vorkommenden Modifikationen an den Lysinresten des Histon H3 dargestellt (Ac: Acetylierung, me1: Monomethylierung, me3: Trimethylierung). Die Verteilung der Histonmodifikationen ist in den in blau (aktivierend) und rot (reprimierend) eingefärbten Balken angegeben und stellt das Vorkommen der einzelnen Modifikationen dar. Rechts davon sind die epigenetischen Regulatoren, die jeweils als „*writers*“, „*erasers*“ oder „*readers*“ der Modifikation wirken, angegeben.

Eine weitere Ebene der epigenetischen Regulation auf Histonebene stellen die sogenannten Histon-Varianten dar. Die Gene, welche für die in erster Linie vorkommenden Histonproteine kodieren, besitzen mehrere Kopien im Genom und

werden hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert. Während der anderen Phasen des Zellzyklus können jedoch auch differierende Histonprotein-Varianten exprimiert werden. Diese liegen meistens als „*single copy*“ vor. Hierbei verfügt das Histon H2A über die größte Anzahl an Varianten, wie z.B. H2A.Z, H2A-Bbd, H2AvD und H2A.X (Kamakaka & Biggins, 2005). Die Histon-Variante H2A.Z ist z.B. in embryonalen Stammzellen (ESC) weit verbreitet und das Genom ist dadurch transkriptionell leicht zugänglich (Zhu *et al.*, 2013). Während der Differenzierung der ESC findet dann eine Umverteilung der Varianten des Histonproteins H2A statt, wodurch die transkriptionelle Aktivität einzelner Gene beeinflusst wird (Zhu *et al.*, 2013).

1.1.2 Kleine, nicht kodierende RNAs (miRNAs)

Kleine, nicht kodierende RNAs, auch bekannt als microRNAs (miRNAs), stellen den zweiten Regulationsmechanismus der Epigenetik dar. Jedoch regulieren die miRNAs die Transkription, im Gegensatz zu den anderen beiden Mechanismen, posttranskriptional durch die sequenzspezifische Bindung an mRNAs. Die miRNAs haben typischerweise eine Länge von rund 21 Nukleotiden und regulieren die Genexpression im Zytoplasma. Sie entstehen als doppelsträngige RNA von etwa 500 Nukleotiden und werden durch das Enzym Drosha in 70 Nukleotid lange „Vorläufer“-miRNAs (pre-miRNAs) geschnitten. Anschließend werden sie durch exportin5 aus dem Zellkern geschleust und dort von dem Protein Dicer in Fragmente von 21 Nukleotiden gespalten. Hierbei entsteht sowohl ein *Sense*- wie auch ein *Antisense*-Strang. Der Proteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) bindet den *Antisense*-Strang und erkennt, bindet und spaltet mRNA Segmente, die Sequenzen enthalten, welche komplementär zu dem gebundenen miRNA *Antisense*-Strang sind (Klug *et al.*, 2007). Die RNA Interferenz wurde erstmals im Jahre 2001 von Lagos-Quintana *et al.* beschrieben. Es sind bisher 1.400 miRNAs im humanen Genom identifiziert worden, die zusammen etwa 30% der Gene regulieren können. Hierbei kann eine miRNA bis zu 200 unterschiedliche Gene durch Bindung der entsprechenden mRNA regulieren, wobei sich die einzelnen miRNAs untereinander ebenfalls regulieren können (Lewis *et al.*, 2005). Abhängig von ihren Zielgenen sind miRNAs an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Hierzu zählen u.a. die Apoptose, die Differenzierung, verschiedene metabolische Prozesse und auch die Tumorentstehung. Bei der Tumorentstehung können sie sowohl als Onkogen wie auch als Tumorsuppressor agieren (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

1.1.3 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist einer der am besten untersuchten epigenetischen Mechanismen und reguliert mehrere biologische Prozesse. Hierzu zählen neben den bereits erwähnten entwicklungsbiologischen Prozessen auch das „*Genomic Imprinting*“ und die X-Chromosom Inaktivierung (Illingworth & Bird, 2009). Im Gegensatz zu den Histonmodifikationen, bei denen die genetische Regulation durch eine Veränderung der Histonproteine und somit der Chromatinstruktur geschieht, wird bei der Methylierung die DNA selbst verändert (Janning & Knust, 2008). Hierbei wird an das 5'-Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings eines Cytosin-Nukleotids eine Methylgruppe angehängt (Esteller, 2008). Dies geschieht im Säugetiergenom jedoch nur, wenn auf die Cytosin Base ein Guanin-Nukleotid folgt. Diese Basenabfolge wird als CpG-Dinukleotid bezeichnet (Bird, 1986). In Abbildung 2 ist die Anbringung einer Methylgruppe an die 5'-Position des Cytosins dargestellt. S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) dient in dieser Reaktion als Methylgruppendonor (Morgan *et al.*, 2005).

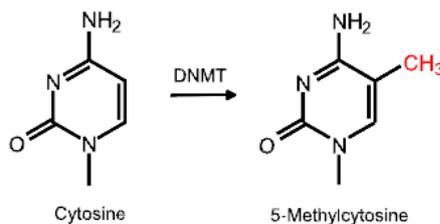


Abbildung 2: Anbringung der Methylgruppe an der Pyrimidinbase Cytosin (Chen & Riggs, 2011).

Transfer einer Methylgruppe an das 5'-Kohlenstoffatom eines Cytosins. Diese Reaktion wird durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT) katalysiert.

Die Enzymfamilie der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) ist verantwortlich für den Prozess der DNA-Methylierung. Es sind bisher zwei Gruppen an DNA-Methyltransferasen bekannt. Dies sind zum einen Methyltransferasen, die für die „*de novo*“ Methylierung zuständig sind und zum anderen die DNMT1, die für die Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters bei jeder Zellteilung verantwortlich ist (Cheng & Blumenthal, 2008). Die folgenden fünf DNA-Methyltransferasen sind bisher charakterisiert worden: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b und DNMT3l. Der zuletzt genannten DNMT3l konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden, jedoch wurde gezeigt, dass diese die beiden DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b rekrutieren und mit ihnen als Co-Faktor agieren kann (Hata *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu allen anderen DNA-Methyltransferasen methyliert die DNMT2 nur Cytosine die in t-RNA vorkommen (Goll *et al.*, 2006). Für den Prozess der DNA-

Methylierung als solchen sind also folglich vor allem die DNMT1 und die beiden DNMT3a/b von besonderer Bedeutung. Die DNMT1 dient als Erhaltungsmethyltransferase. Diese besitzt eine über 100fach höhere Präferenz für hemimethylierte DNA als für komplett unmethylierte DNA (Gruenbaum *et al.*, 1982) und überträgt während der semikonservativen Replikation das Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Tochterstrang (Bestor, 2000; Smith & Meissner, 2013). Sie wird durch direkte Interaktion mit dem „*proliferating cell nuclear antigen*“ (PCNA) und UHRF1, auch als NP95 bekannt, rekrutiert (Smith & Meissner, 2013). Im Gegensatz dazu zeigen die beiden DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b keine Präferenz zu hemimethylierter DNA (Chen & Riggs, 2011), sondern dienen der Anbringung der Methylgruppe an komplett unmethylierte DNA (Jair *et al.*, 2006). Sie werden deshalb auch als „*de novo*“ Methyltransferasen bezeichnet. Unter dem Begriff „*de novo*“ Methylierung ist der Vorgang zu verstehen, bei dem das Methylierungsmuster ohne Vorlage generiert wird. Dieser findet z.B. während der frühen Embryonalentwicklung statt. Für die Erhaltung eines unmethylierten Promotors ist daher der dauerhafte Ausschluss der DNA-Methyltransferasen aus dem jeweiligen 5'-regulatorischen Bereich von oberster Priorität. Dieser Zustand wird stark durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren gefördert, so dass die transkriptionelle Aktivität direkt den Methylierungsstatus des Promotors beeinflussen kann (Smith & Meissner, 2013). Analog dazu kann die transkriptionelle Inaktivität eines Gens zur progressiven Methylierung des 5'-regulatorischen Bereiches führen (Smith & Meissner, 2013).

Große Teile des Genoms von Säugetieren enthalten „*vast oceans*“ an DNA-Sequenzen mit einer geringen Dichte an CpG-Dinukleotiden. Diese sind in der Regel jedoch sehr stark methyliert. In diesen Bereichen finden sich vor allem repetitive Elemente und Transposons, die durch die starke Methylierung transkriptionell inaktiv gehalten werden (Wilson *et al.*, 2007). Die sogenannten „*oceans*“ werden interpunktiert von Regionen mit unmethylierten CpG-Dinukleotiden, welche in diesen Regionen in einer hohen Dichte auftreten. Es handelt sich hierbei um die sogenannten CpG-Inseln (CGIs) (Bird *et al.*, 1985). Diese sind vor der DNA-Methylierung durch Guanin-Cytosin Strang Asymmetrie und möglicherweise auch durch aktive Demethylierung der Familie der „*ten-eleven-translocation*“ Enzyme geschützt (Ginno *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012). Zu diesen Bereichen zählen vor allem die 5'-regulatorischen Bereiche vieler „*housekeeping*“ Gene, die konstitutiv

aktiv sind und somit unmethyliert vorliegen müssen. Übergangszonen zwischen CpG-Inseln und CpG-„oceans“ werden als CpG-„shores“ bezeichnet und zeigen ein gewebespezifisches DNA-Methylierungsmuster (Irizarry *et al.*, 2009). CpG-Inseln haben typischerweise eine Länge von 1kb (Illingworth & Bird, 2009) und sind mit über der Hälfte aller menschlichen Gene assoziiert, wobei sie größtenteils aktiv exprimierte Gene darstellen (Shen & Laird, 2013). Befinden sich jedoch Methylgruppen an den Cytosinen der CpG-Dinukleotide, so ist dies mit der transkriptionellen Inaktivierung des jeweiligen Gens assoziiert (Kim *et al.*, 2002). Die epigenetische Stilllegung eines Gens durch DNA-Methylierung ist in Abbildung 3 dargestellt.

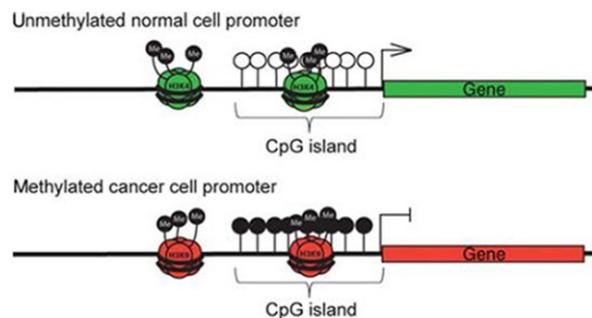


Abbildung 3: Stilllegung eines Gens durch DNA-Methylierung (Lahtz & Pfeifer, 2011).

Im unmethylierten Zustand, dargestellt in grün, kann das Gen transkribiert werden. Kommt es sukzessiv zu einer Methylierung des 5'-regulatorischen Bereiches, dargestellt in rot, so wird die Transkription reprimiert und das korrespondierende Gen inaktiviert.

In Säugetierzellen sind ca. 70 - 80% aller CpG-Dinukleotide methyliert (Ehrlich, 1982). Dies entspricht einem Anteil an Methylcytosinen von 2 - 5% aller im Genom vorkommenden Cytosinen (Paz *et al.*, 2002). Die Methylcytosine können auf unterschiedliche Weise die Transkriptionsrate beeinflussen. Zum einen können Methylgruppen direkt die Bindung der Polymerasen an ihre Erkennungssequenz verhindern, da diese in der Regel CpG Dinukleotide enthalten (Bell & Felsenfeld, 2000). Zum anderen kann die methylierte DNA von Proteinen mit Methyl-CpG bindenden (MBD) oder C2H2 Zink-Finger (ZNF) Domänen gebunden werden. Hierzu zählen die MBD enthaltenden Proteine MBD1, MBD2, MBD4 und MeCP2, sowie die ZNF enthaltenden Proteine Kaiso (ZBTB33), ZBTB4 und ZBTB38. Von den MBD Proteinen sowie von dem Kaiso Protein wird angenommen, dass sie einen Einfluss auf die transkriptionelle Stilllegung der DNA-Sequenz nehmen, an die sie gebunden sind (Shen & Laird, 2013).

Generell scheint die DNA-Methylierung, im Vergleich zu den Histonmodifikationen, den stabileren epigenetischen Regulationsmechanismus darzustellen, wobei gerade in Tumorerkrankungen die Stilllegung einzelner Gene durch Histonmodifikationen initiiert und die DNA-Methylierung erst später etabliert wird (Bachman *et al.*, 2003). Dass die „*de novo*“ DNA-Methylierung zu einem späteren Zeitpunkt der transkriptionellen Inaktivierung auftritt und somit nicht zur Initiation, sondern zur stabilen Stilllegung des betroffenen Gens beiträgt, konnte ebenfalls bei der Differenzierung von ESC beobachtet werden (Feldman *et al.*, 2006). Gerade während der embryonalen Entwicklung gibt es zwei Phasen, in denen globale Demethylierung auftritt. Dies ist zum einen, wie bereits unter 1.1 beschrieben, vor der Implantation des Embryos (Kafri *et al.*, 1992) und zum anderen bei der Entstehung der Urkeimzelle (PGC) der Fall (Zhao & Chen, 2013). Diese Demethylierung kann unabhängig von der DNA-Replikation aktiv oder abhängig von der DNA-Replikation passiv erfolgen (Smith & Meissner, 2013; Seisenberger *et al.*, 2013). Der erste Schritt der aktiven Demethylierung erfolgt durch die Enzyme der „*ten-eleven-translocation*“ (Tet) Familie: Tet1, Tet2 und Tet3. Diese können die Umwandlung von 5'-Methylcytosin (5mC) zu 5'-Hydroxymethylcytosin (5hmC), 5'-Formylcytosin (5fC) und 5'-Carboxylcytosin (5caC) katalysieren (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010). Die genannten Umwandlungsprodukte sind alle Zwischenprodukte der Demethylierung, wobei die Tet Enzymaktivität alleine nicht ausreicht, um in globaler DNA-Demethylierung zu resultieren (Zhao & Chen, 2013). Der einfachste Mechanismus der zur globalen Demethylierung führt, ist die passive Ausdünnung der modifizierten 5mC durch eine fehlende Erhaltungsmethylierung der DNMT1 während der Replikation. Denn diese methyliert 5hmC-CpG-Dinukleotide, die asymmetrisch nur in einem Strang der DNA vorkommen, in wesentlich geringerem Ausmaße als 5mC-CpG-Dinukleotide (Hashimoto *et al.*, 2012; Valinluck & Sowers, 2007). Als aktive Mechanismen sind vor allem drei verschiedene Mechanismen bisher beschrieben worden. Erstens können die Basen 5hmC, 5fC und 5caC von der Thymin DNA Glycosylase (TDG) erkannt und über den „*base excision repair*“ (BER) Signalweg repariert werden (He *et al.*, 2011; Maiti & Drohat, 2011). Hierdurch wird die modifizierte Base durch ein unmodifiziertes Cytosin ersetzt. Als zweite Möglichkeit kann 5hmC von den Desaminasen AID und APOBEC zu 5'-Hydroxymethyluracil (5hmU) desaminiert und anschließend ebenfalls über den BER Signalweg ausgetauscht werden (Cortellino *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011). Der dritte Weg erfolgt

über die DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b. Diese verfügen neben der DNA-Methyltransferaseaktivität auch über eine Funktion als Dehydroxymethylase, die die Umwandlung von 5hmC direkt zu Cytosin katalysieren kann (Chen *et al.*, 2012). Eine Übersicht der wichtigsten „*writers*“, „*erasers*“ und „*readers*“ der DNA-Methylierung ist in Abbildung 4 dargestellt.



Abbildung 4: „Writers“, „erasers“ und „readers“ der DNA-Methylierung (Shen & Laird, 2013).

Durch die blauen Kreise ist der unmethylierte 5'-regulatorische Bereich eines Gens dargestellt. Rechts davon sind die epigenetischen Regulatoren, die jeweils als „*writers*“, „*erasers*“ oder „*readers*“ der Modifikation wirken, angegeben. Hierbei kann es zwischen der DNA-Methylierung und den Histonmodifikationen zu einem sogenannten „*crossstalk*“ kommen, da das Enzym DNMT3a auch über eine Leseeigenschaft für Histonmodifikationen verfügt.

Die Demethylierung spielt insbesondere bei den bereits beschriebenen Anpassungen der Zellen an wechselnde Umweltbedingungen, der Lebensweise, dem Alter und dem damit einhergehenden epigenetischen Remodelling eine wichtige Rolle. Allerdings sind auch Giftstoffe wie Asbest, Alkohol, Strahlung, Arsen oder Tabakrauch mit DNA-Methylierungsveränderungen assoziiert (Christensen & Marsit, 2011). Da die DNA-Methylierung einen der fundamentalen epigenetischen Mechanismen darstellt, welcher an der Organisation des Genoms und der adaptiven Regulation der Genexpression beteiligt ist, stellt die Exposition mit den genannten Stoffen eine besondere Gefahr dar (Bonasio *et al.*, 2010; Jaenisch & Bird, 2003). Hierdurch kann die funktionelle epigenetische Genregulation beeinträchtigt werden, mit weitreichenden Konsequenzen für die genomische Integrität, der Fähigkeit zur Differenzierung und anderen zellulären Funktionen.

1.1.4 Methylgruppenmetabolismus

Der Methylgruppenmetabolismus, oder auch Methionin-Zyklus (METZ), bildet zusammen mit dem Folat- und dem Transsulfurierungs-Zyklus den „*one-carbon-metabolism*“, welcher in Abbildung 5 auszugsweise dargestellt ist. Dieser Stoffwechselweg beschreibt eine Serie von zyklischen Reaktionen, in denen jeweils eine Kohlenstoffgruppe transferiert wird. Diese Reaktionen sind für die Produktion von Phospholipiden und Nukleotiden während der Proliferation essentiell (Locasale,

2013). Außerdem kann durch den „*one-carbon-metabolism*“ der zelluläre Redox-Status durch Oxidation von NADPH und der Generierung von Glutathion reguliert werden (Ryall *et al.*, 2015).

Der Folat-Zyklus findet sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien statt (Ming & Vousden, 2016) und beginnt mit der Aufnahme von Folat durch die Nahrung. Folat ist die wasserlösliche Form des Vitamin B9, wird über Folatrezeptoren in reduzierter Form von Tetrahydrofolat (THF) aufgenommen und so in das Cytosol gebracht. Es kann von der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien in 5,10-Methylen-THF umgewandelt werden. Hierbei dient vor allem Serin und in geringerem Ausmaß Glycin als Kohlenstoffgruppen-Donor (Shyn-Chang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Im nächsten Schritt kann dann das 5,10-Methylen-THF durch die Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) in 5-Methyl-THF umgewandelt werden, welches im METZ zur Remethylierung von Homocystein (HCY) benutzt wird. Diese MTHFR abhängige Reaktion erfolgt jedoch nur im Cytosol. Im Gegensatz dazu wird das 5,10-Methylen-THF im Mitochondrium durch die Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase 2 (MTHFD2) oder die Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase 2 Like (MTHFD2L) in 5,10-Methenyl-THF und 10-Formyl-THF umgewandelt. Eine weitere Möglichkeit 5,10-Methylen-THF zu generieren, ist die Umwandlung von 10-Formyl-THF in 5,10-Methenyl-THF und letztendlich in 5,10-Methylen-THF. Diese Reaktion wird von der Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase 1 (MTHFD1) katalysiert. Als Ausgangsstoff zur Herstellung von 10-Formyl-THF dient Ameisensäure. Dieses wird im Mitochondrium von der Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase 1 Like (MTHFD1L) gebildet und kann nur in dieser Form aus dem Mitochondrium transferiert werden. In Cytosol und Zellkern kann es dann die Mehrheit der „*one-carbon*“ abhängigen Reaktionen mit Kohlenstoffgruppen versorgen (Brosnan *et al.*, 2015; Ducker *et al.*, 2016). Jedoch dient 10-Formyl-THF nicht nur zur Generierung der Metabolite des Folat- und Methionin-Zyklus, sondern kann zusätzlich dazu auch zur Purinsynthese verwendet werden (Ming & Vousden, 2016).

Der Methionin-Zyklus beginnt mit der Remethylierung von Homocystein (HCY) zu Methionin (MET) durch die Methionin-Synthase (MTR). Hierfür wird das im Folat-Zyklus durch die MTHFR hergestellte 5-Methyl-THF und Vitamin B12 als Cofaktor benötigt (Ryall *et al.*, 2015). Das Recycling des B12 Cofaktors durch MTHFR stellt

hierbei eine Schlüsselreaktion der Remethylierung dar. In anderen Geweben, wie z.B. in den Nieren oder der Leber, kann die Remethylierung auch durch andere Enzyme wie z.B. die Betain-Homocystein-S-Methyltransferase (BHMT) erfolgen (Sunden *et al.*, 1997). Bei dieser Reaktion wird 5-Methyl-THF als Methylgruppendedonor durch Betain ersetzt. Die anschließende, unter ATP Verbrauch stattfindende Adenylierung des MET führt zur Bildung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), welches als Methylgruppendedonor der DNA- und Histon-Methylierung dient (Locasale, 2013). Diese Reaktion wird durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT) katalysiert. MET kann, genau wie Folat, dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden, wobei die Hälfte des METs direkt in SAM umgewandelt wird (Mudd & Poole, 1975).

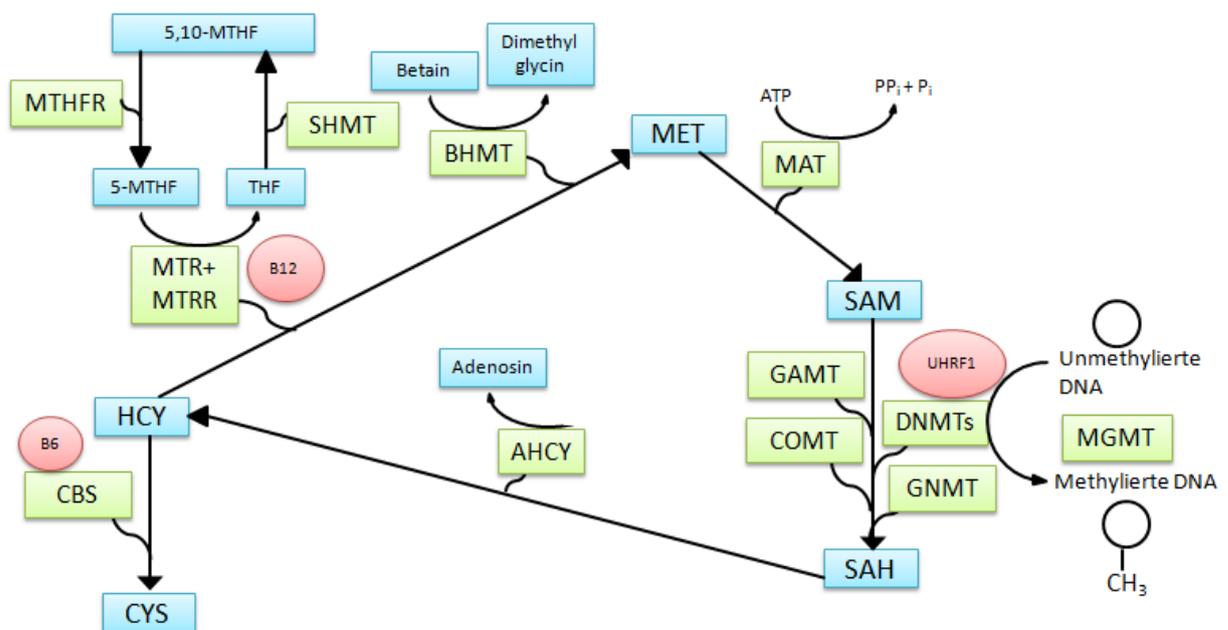


Abbildung 5: Der "One-carbon-metabolism" (Clayton *et al.*, 2005; Coppede, 2010).

Dargestellt ist der METZ, der initiierende Schritt des Transsulfurierungs-Zyklus und Teile des Folat-Zyklus.

Metabolite: 5-MTHF = 5-Methyltetrahydrofolat, 5,10-MTHF = 5,10-Methylen-tetrahydrofolat, CYS = Cystathionin, HCY = Homocystein, MET = Methionin, SAM = S-Adenosyl-Methionin, SAH = S-Adenosyl-Homocystein, THF = Tetrahydrofolat.

Enzyme: AHCY = Adenosylhomocysteinase, BHMT = Betain-Homocystein S-Methyltransferase, CBS = Cystathionin β -Synthase, COMT = Catechol-O-Methyltransferase, DNMT = DNA-Methyltransferase, GAMT = Guanidinoacetat-N-Methyltransferase, GNMT = Glycin-Methyltransferase, MAT = Methionin-Adenosyltransferase, MTR = Methionin-Synthase, MTHFR = Methylentetrahydrofolat-Reduktase, MTRR = Methionin-Synthase-Reduktase, SHMT = Serin-Hydroxymethyltransferase.

Co-Faktoren: B6 = Vitamin B6, B12 = Vitamin B12, UHRF1 = Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1.

Der Vorgang der Methylierung wird von Histon-Methyltransferasen (HMTs) oder DNA-Methyltransferasen (DNMTs) durchgeführt. Bei dieser Reaktion wird jeweils die Methylgruppe des SAM auf einen Lysin- oder Arginin-Rest eines Histonproteins bzw. auf das 5'-Kohlenstoffatom der Pyrimidinbase Cytosin überführt, wodurch S-Adenosyl-Homocystein (SAH) als Nebenprodukt entsteht (Ryall *et al.*, 2015). Als weitere Methyltransferasen, die ebenfalls SAM als Methylgruppendonor benötigen, sind u.a. die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), die Guanidinoacetat-N-Methyltransferase (GAMT) und die Glycin-Methyltransferase (GNMT) zu erwähnen. Der Wiedereintritt des SAH in den METZ kann durch die Hydrolyse des Moleküls zu Adenosin und HCY erfolgen. Diese Reaktion wird durch die Adenosylhomocysteinase (AHCY) katalysiert. Der METZ wird durch die Remethylierung von HCY zu MET abgeschlossen (Locasale, 2013). Für die Remethylierungsreaktion dient vor allem Serin als Methylgruppendonor (Davis *et al.*, 2004). In Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass der METZ auch losgelöst vom Folat-Zyklus ablaufen kann und die Kohlenstoffgruppen des Serins nicht zur Remethylierung benötigt werden (Maddocks *et al.*, 2016). Allerdings hatte Serin in diesem Modell über die Generierung von ATP, immer noch einen direkten Einfluss auf die SAM Synthese (Maddocks *et al.*, 2016).

HCY kann jedoch nicht nur durch den METZ abgebaut werden, sondern auch über den Transsulfurierungs-Zyklus. Im Transsulfurierungs-Zyklus werden ca. 60% des zellulären HCY metabolisiert (Storch *et al.*, 1988). Dieser Stoffwechselweg ist irreversibel und benötigt Vitamin B6 als Cofaktor für die enzymatische Aktivität der Cystathionin- β -Synthase (CBS). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Homocystein in Cystathion. In den weiteren Schritten des Zyklus wird Cystathion zu Cystein und letztendlich zu Glutathion umgewandelt. Homocystein kann nicht mit der Nahrung aufgenommen werden, sondern muss durch metabolische Prozesse im Körper selbst synthetisiert werden.

Viele der Gene, die für den „one-carbon-metabolism“ verantwortlich sind, weisen grundsätzliche Gemeinsamkeiten in der genetischen Anordnung auf. Zu diesen zählen u.a. *CBS*, *MTHFR*, *MTR* und *MTRR*. Diese Gene haben gemeinsam, dass sie in der Regel Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren besitzen, ihnen jedoch eine TATA-Box fehlt (Homberger *et al.*, 2000). Außerdem können die meisten

dieser Gene durch alternatives Spleißen und / oder verschiedene Transkriptions- bzw. Translationsstartpunkte reguliert werden (Homberger *et al.*, 2000).

1.1.5 Polyaminmetabolismus

Nicht nur für den „*one-carbon-metabolism*“, sondern auch im Polyaminstoffwechsel, dient S-Adenosyl-L-Methionin als zentrales Donor-Molekül. Polyamine, hierzu zählen Putrescin, Spermin und Spermidin, werden in jedem Zelltyp synthetisiert und sind für das zelluläre Wachstum essentiell (Park & Igarashi, 2013). Bisher sind drei Hauptaufnahmequellen für Polyamine bei Säugetieren bekannt. Zum einen können diese mit der Nahrung aufgenommen, zum anderen unter SAM Verbrauch enzymatisch synthetisiert werden (Park & Igarashi, 2013). Hierbei sind die intrazellulären Polyamin-Konzentrationen von der Ernährung abhängig und können selektiv durch die Inhibition der biosynthetischen Enzyme reduziert werden (Ackermann *et al.*, 2003; Seiler, 2003). Eine Reduktion der intrazellulären Spermin- und Spermidin-Konzentrationen sowie eine Erhöhung der Putrescin-Konzentration führt in verschiedenen Tumorzelllinien zu einer Induktion der Apoptose (Schipper *et al.*, 2000). Diese wird hierbei vor allem dadurch erreicht, dass die Polyamine in der Lage sind, die Expressionsrate des Tumorsuppressors p53 zu regulieren (Li *et al.*, 2001). P53 spielt eine kritische Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Apoptose und des Zellzyklus in epithelialen Zellen (Seiler, 2005). P21 dient als Mediator der p53 Genaktivität (Jung *et al.*, 2010) und induziert bei Depletion der Polyamine einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase (Xiang *et al.*, 2003). Die dritte Quelle für die Aufnahme von Polyaminen stellen Mikroorganismen dar (Park & Igarashi, 2013).

Polyamine können auf vier verschiedene Arten Einfluss auf die physiologischen Funktionen einer Zelle ausüben. Im Einzelnen geschieht dies:

1. durch Ionenbindung an anionische Stellen,
2. durch enzymatisch katalysierte kovalente Bindungen,
3. als Radikalfänger und Komplexbildner mit Kationen,
4. durch die Bildung zytotoxischer Aldehyde und reaktiver Sauerstoffspezies als Nebenprodukte der oxidativen Desaminierung.

Hierbei können die Polyamine u.a. mit negativ geladenen Molekülen wie z.B. RNA, DNA, Phospholipiden und Proteinen interagieren und darüber auf transkriptioneller,

translationeller und posttranslationeller Ebene verschiedene zelluläre Funktionen regulieren (Park & Igarashi, 2013). Zu diesen Funktionen zählen unter anderem Effekte auf die DNA Struktur (Thomas & Thomas, 2001), die Chromatin Kondensierung (Matthews, 1993), die RNA Struktur (Igarasgi & Kashiwagi, 2010), die Proteinsynthese und verschiedene Interaktionen mit Proteinkinasen/ -phosphatasen (Lawson *et al.*, 2005). Die Wirkungsweisen der Polyamine und deren jeweilige Funktion sind in Abbildung 6 dargestellt.

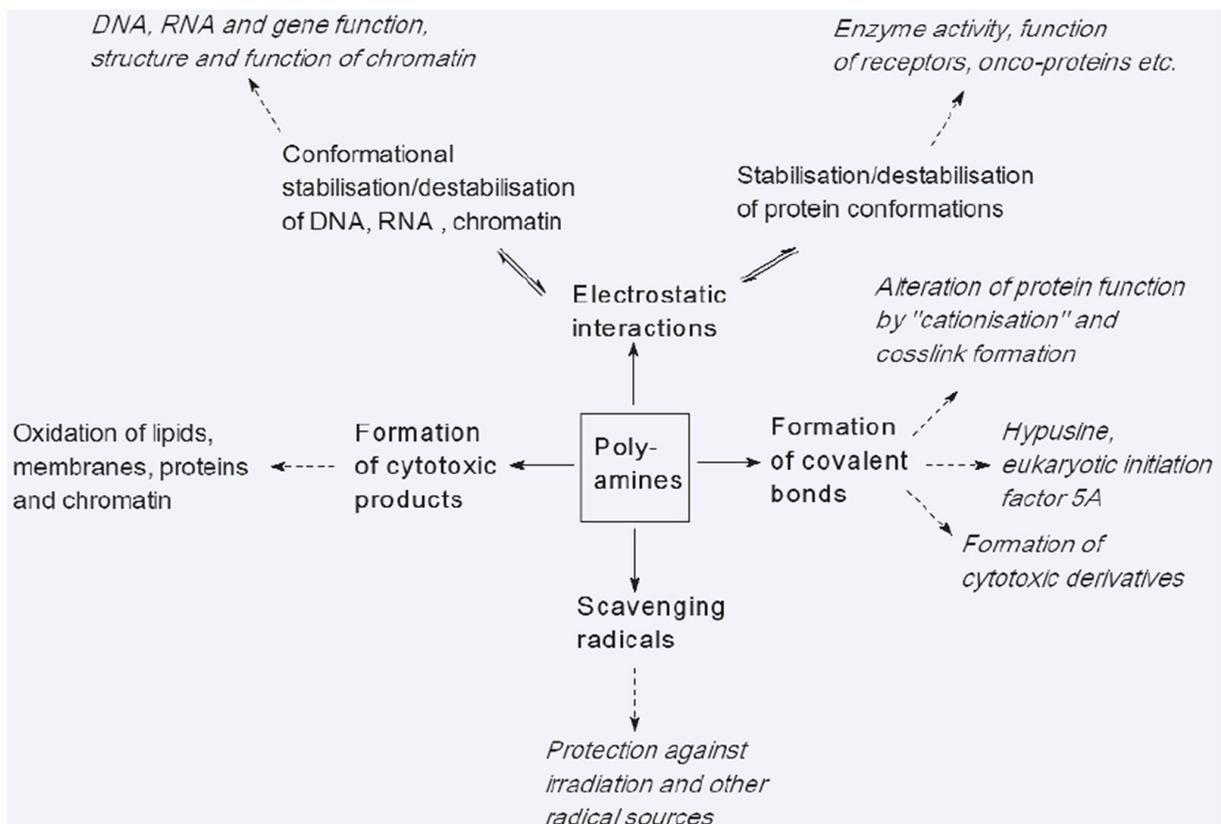


Abbildung 6: Wirkweise der Polyamine auf zelluläre Funktionen (Seiler, 2005).

Dargestellt sind die vier Wirkmechanismen, durch die Polyamine Einfluss auf zelluläre Funktionen nehmen können, und die damit verbundenen physiologischen Konsequenzen.

Der Polyaminstoffwechsel startet mit der basischen, nichtproteinogenen α -Aminosäure L-Ornithin. Aus dieser wird im ersten Schritt des Stoffwechselweges das Diamin Putrescin durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC) synthetisiert. Diese Reaktion stellt den wichtigsten und den metabolisch limitierenden Schritt des gesamten Polyaminmetabolismus dar, wobei die Ornithin-Decarboxylase als Schlüsselenzym angesehen wird (Tabor & Tabor, 1984). Die intrazelluläre Konzentration an ODC hat eine hohe Fluktuation, wodurch die Zelle sich an wechselnde Umweltbedingungen und metabolische Veränderungen anpassen kann. So konnte z.B. von Heljasvaara *et al.* (1997) an Mäusen gezeigt werden, dass selbst

bei einer Überexpression von ODC der Erhalt der Polyamin Homöostase gewährleistet werden konnte. Durch die Arginase (ARG) entsteht aus L-Arginin L-Ornithin.

In den nächsten Schritten des Polyaminstoffwechsels offenbart sich die Verbindung zum „one-carbon-metabolism“. Denn sowohl die Übertragung der Aminopropylgruppe durch die Spermidin-Synthase (SRM) auf das Putrescin (hierdurch entsteht Spermidin), als auch durch die Spermin-Synthase (SMS) auf Spermidin (hierdurch entsteht Spermin) benötigt decarboxyliertes SAM (dcSAM) als Aminopropyl-Gruppen-Donor. Dieses wird durch die Adenosylmethionin-Decarboxylase (AMD), aus dem im METZ synthetisierten SAM, gebildet. Die intrazelluläre Spermin- / Spermidin- Konzentration kann durch Export der beiden Stoffwechselprodukte aus der Zelle reguliert werden (Park & Igarashi, 2013). Alternativ zum Export können Spermin und Spermidin ebenfalls durch die Enzyme Spermin-Oxidase (SMOX), Spermidin- / Spermin-N1-Acetyltransferase 1 (SSAT) und Polyamin-Oxidase (PAOX) wieder in Putrescin umgewandelt werden (Park & Igarashi, 2013). Der Polyaminstoffwechselweg ist in Abbildung 7 dargestellt.

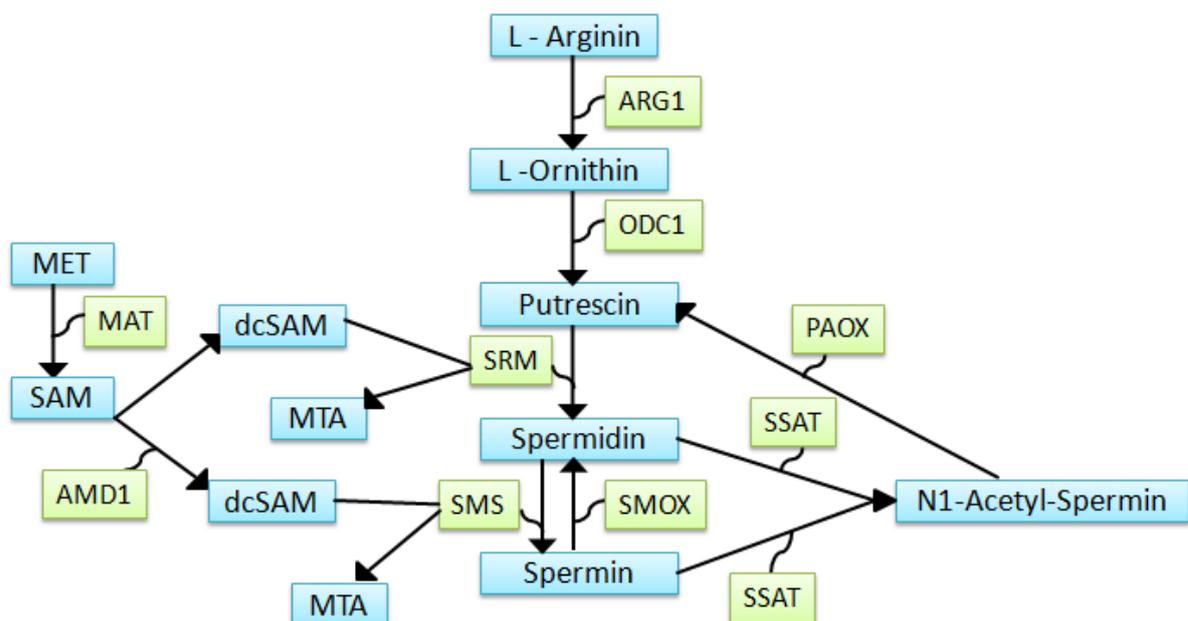


Abbildung 7: Der Polyaminstoffwechselweg (mod. nach Pegg, 2008).

Metabolite: dcSAM = decarboxyliertes S-Adenosyl-L-Methionin, MET = Methionin, MTA = Methylthioadenosin, SAM = S-Adenosylmethionin,

Enzyme: AMD1 = Adenosylmethionin-Decarboxylase, ARG1 = Arginase 1, MAT = Methionin-Adenosyltransferase, ODC1 = Ornithin-Decarboxylase 1, PAOX = Polyamin-Oxidase, SMOX = Spermin-Oxidase, SMS = Spermin-Synthase, SRM = Spermidin-Synthase, SSAT = Spermidin- / Spermin-N1-Acetyltransferase 1.

1.1.6 Einfluss des „*one-carbon-metabolism*“ und Polyaminstoffwechselweges auf die Epigenetik

Der Einfluss des „*one-carbon-metabolism*“ und des Polyaminstoffwechselweges auf die epigenetische Regulation ist komplex und vielfältig. Durch Beeinflussung verschiedener epigenetischer Mechanismen können Nährstoffe auf zwei verschiedene Weisen die Genexpression regulieren. Zum einen gibt es Inhaltsstoffe, die Bestandteile des „*one-carbon-metabolism*“ sind, wie z.B. Folat, Riboflavin, Betain, Serin, Methionin und Homocystein. Diese regulieren direkt die Verfügbarkeit von SAM und werden zur „*de novo*“ Synthese von Adenosin, Guanosin und Thymin benötigt (Yang & Vousden, 2016). Zum anderen gibt es Inhaltsstoffe, die Histonmodifikationen oder die Transkription von nicht kodierenden RNAs regulieren. Hierzu gehört u.a. Vitamin D (Stefanska *et al.*, 2012).

Weitere wichtige Stoffwechselprodukte, die nicht mit der Nahrung aufgenommen, sondern vom Körper synthetisiert werden müssen und einen Einfluss auf epigenetische Regulationsmechanismen nehmen können, sind die folgenden: Acetyl-Coenzym-A (Acetyl-CoA), welches in der Glykolyse gebildet wird, das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und α -Ketoglutarat (α -KG), welche beide im Krebs-Zyklus (TCA) synthetisiert werden (Ryall *et al.*, 2015). Im einfachsten Fall regulieren diese Metabolite selbst die Enzymaktivität, wobei sie sowohl verstärkend als auch inhibierend agieren können. Das Vorhandensein von Acetyl-CoA kann die Anbringung von Acetylgruppen an die Histone fördern und das Abbauprodukt dieser Reaktion CoA inhibieren (Albaugh *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Meier, 2013). Im Fall der DNA- und der Histon-Methylierung spielt vor allem SAM als Methylgruppendonor eine wichtige Rolle. Durch SAM kann sowohl die Aktivität der DNMTs als auch der HMTs reguliert werden (Locasale, 2013). Hierbei ist insbesondere das Abbauprodukt SAH für die Inhibition der verschiedenen Methyltransferasen verantwortlich. Steigt dessen zelluläre Konzentration an, so kann dies einen gewissen Grad an globaler Hypomethylierung zur Folge haben (Maruti *et al.*, 2009). Weitere Metabolite, deren Konzentrationsveränderungen mit globaler Hypomethylierung assoziiert sind, sind u.a. HCY (Akoglu *et al.*, 2004) und dcSAM (Pegg, 2010). Außerdem konnte durch z.B. homo- und heterozygote „*knockouts*“ des *MTHFR*-Gens in Mäusen gezeigt werden, dass diese als Folge signifikant niedrigere, intrazelluläre SAM- bzw. höhere SAH-Konzentrationen mit einhergehender DNA-Hypomethylierung aufweisen (Chen *et al.*, 2001). Im Fall der DNA- und Histon-Demethylierung spielt vor allem α -KG, als

Cosubstrat der „Jumonji-C-domain-containing“ HDMs (JHDMs) und TET-Methylcytosin-Dioxygenasen, eine entscheidend aktivierende Rolle. Strukturell dem α -KG ähnliche Metabolite, wie Succinate, Fumarsäure und 2-Hydroxyglutarat, spielen für die genannten Enzyme hingegen eine inhibierende Rolle (Tsukada *et al.*, 2006; Killian *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2012). Eine Übersicht der Metabolite, die epigenetische Mechanismen regulieren können, ist in Abbildung 8 dargestellt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das metabolische Gleichgewicht der genannten Stoffwechselprodukte einen direkten Einfluss auf das Epigenom durch posttranslationale Modifikationen der Histone, der DNA und verschiedener Transkriptionsfaktoren hat (Carey *et al.*, 2015; Moussaieff *et al.*, 2015; Ryall *et al.*, 2015; Shiraki *et al.*, 2014; Wellen *et al.*, 2009).

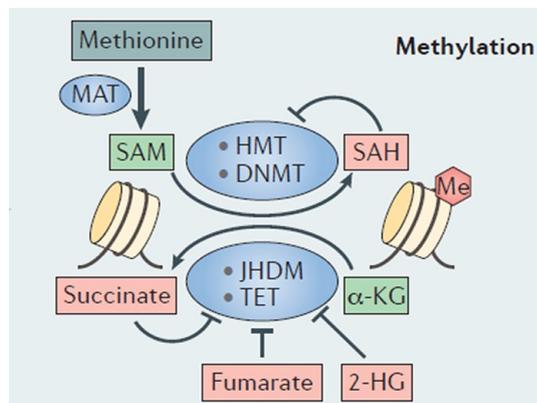


Abbildung 8: Einfluss der Metabolite auf die epigenetischen Methylierungsreaktionen (Kinnaird *et al.*, 2016).

SAM wird aus der essentiellen Aminosäure Methionin durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT) synthetisiert. Dieses dient den HMTs und DNMTs als Substrat und wird durch die Methylierungsreaktion zu SAH abgebaut, welches die Aktivität der HMTs und DNMTs negativ beeinflussen kann. Verschiedene andere Metabolite, wie z.B. Succinate, Fumarsäure und 2-HG, konnten als Inhibitoren der JHDMs und TET Demethylasen identifiziert werden, welche für die Aktivität als Cosubstrat α -KG benötigen.

Neben dieser direkten Regulation der epigenetischen Mechanismen durch die Metabolite, werden zwei weitere Modelle der möglichen Beeinflussung diskutiert. Dies ist zum einen das sogenannte „*nutrient sensing*“ (deutsch: Feststellung der Nährstoffdichte) (Kinnaird *et al.*, 2016). Ein gutes Beispiel hierfür ist die Abhängigkeit der Methylierungsreaktionen von Folat und der essentiellen Aminosäure Methionin. Diese werden mit der Nahrung aufgenommen und 50% der täglichen Zufuhr wird direkt in SAM umgewandelt (Mudd & Poole, 1975). Bei Patienten mit Darmkrebstumoren konnte festgestellt werden, dass solche, die mehr als 400 μ g Folat mit der Nahrung zu sich nahmen, global über ein höheres DNA-

Methylierungslevel verfügten als solche, die weniger als 200 µg Folat erhielten (Schernhammer *et al.*, 2010). Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass sich die Konzentration von SAM und SAH im Blutserum durch unterschiedliche Ernährung verändern lässt (Lim *et al.*, 2012; Poirier *et al.*, 2001). Analog zur DNA-Methylierung lässt sich eine ähnliche Korrelation auch für die Trimethylierung am Histon H4K3 finden. Diese Modifikation ist ebenfalls direkt abhängig von der Verfügbarkeit von Methionin und der intrazellulären Produktion von SAM (Mentch *et al.*, 2015).

Zum anderen können epigenetische Mechanismen durch die lokale Produktion der Metabolite im Zellkern reguliert werden (Kinnaird *et al.*, 2016). Die Enzyme, welche die jeweiligen Metabolite synthetisieren, werden hierbei direkt an die spezifischen Stellen des Chromatins rekrutiert, an welche die epigenetische Modifikation angebracht werden soll. Ein Beispiel für solch eine lokale Produktion der Metabolite ist die Rekrutierung der Methionin-Adenosyltransferase Isoform Typ 2 (MAT2A). Diese wird durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MAFK an die spezifische Sequenz im Genom gebunden. Hierdurch kann SAM lokal synthetisiert werden und steht den HMTs direkt für die lokale Histon-Methylierung zur Verfügung (Kato *et al.*, 2011). Ein weiteres Beispiel für lokale Synthese der Metabolite ist der sogenannte „*serine-responsive SAM-containing metabolic enzyme complex*“ (SESAME). Dieser interagiert mit dem Set1-Methyltransferase-Komplex und versorgt diesen mit dem benötigten SAM für die Trimethylierung am Histon H3K4 (Li *et al.*, 2015). Neben der direkten Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen, gibt es eine erste Evidenz dafür, dass die lokale Synthese der Metabolite ebenfalls einen Einfluss auf Prozesse der DNA Reparaturmechanismen hat (Jiang *et al.*, 2015).

Der Einfluss der Metabolite auf zelluläre Entscheidungen, welche durch epigenetische Mechanismen ausgelöst werden, lässt sich anhand des Acetyl-CoAs gut nachvollziehen. Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Acetyl-CoA ist mit erhöhten Leveln an Histon-Acetylierung, einer erhöhten Proliferationsrate und verstärktem Zellwachstum assoziiert. Interessanterweise sind genau die Gene, welche für die genannten Prozesse verantwortlich sind, durch Histon-Acetylierung regulierbar (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014). Genau so kann aber auch das Überleben der Zelle sowie die Apoptose durch die Verfügbarkeit von Acetyl-CoA reguliert werden (Kinnaird *et al.*, 2016). Der globale Einfluss der Methylierung ist im

Gegensatz dazu schwieriger zu interpretieren. So führt z.B. eine erhöhte Konzentration an α -KG zu einer Reduktion der reprimierenden DNA- und Histon-Methylierungssignaturen, wodurch z.B. die Pluripotenz in ESC aufrecht erhalten wird (Carey *et al.*, 2015). Ebenfalls wird die Differenzierung dieser Zellen durch den METZ und die Verfügbarkeit von SAM reguliert (Shiraki *et al.*, 2014; Shyn-Chang *et al.*, 2013). Die Differenzierung der jeweiligen Zelle kann aber auch durch Beeinträchtigung der 2-HG Produktion oder durch Demethylierung ausgelöst werden (Borodovsky *et al.*, 2013; Rohle *et al.*, 2013). Eine Übersicht der zellulären Entscheidungen, die aufgrund veränderter Konzentrationen von Metaboliten in der Zelle getroffen werden, ist in Abbildung 9 dargestellt.

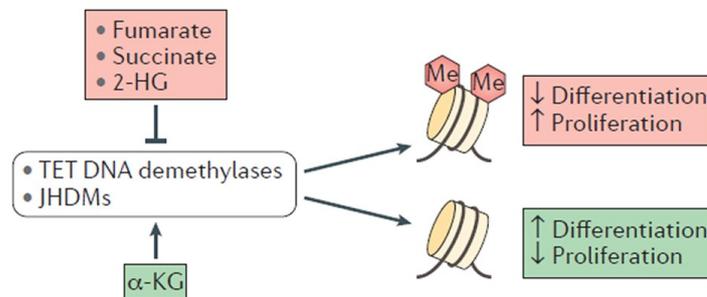


Abbildung 9: Einfluss der Metabolite auf epigenetische Regulatoren und deren Wirkung auf zelluläre Entscheidungen (Kinnaird *et al.*, 2016).

Succinate, Fumarsäure und 2-HG führen zu einer Inhibition der TETs und JHDMS und damit zu einer erhöhten DNA- und Histon-Methylierung. Diese resultiert in einer erhöhten Proliferations- und einer verringerten Differenzierungsrate. Im Gegensatz dazu fördert α -KG die TETs und JHDMS, womit geringere Level an DNA- und Histon-Methylierung assoziiert sind. Hierdurch wird die Differenzierung auf Kosten der Proliferation gefördert.

1.2 Tumorerkrankungen

Tumoren entstehen als Folge sukzessiver Beeinträchtigung der Genfunktionen für die Prozesse der Proliferation, der Angiogenese, der Apoptose, der Invasion und der Metastasierung (Shen & Laird, 2013). Die Beeinträchtigungen haben zur Folge, dass die entarteten Zellen aufgrund fehlender oder fehlerhafter Kontrollmechanismen unkontrolliert und unaufhaltsam wachsen. Die so entstehenden Zellen unterscheiden sich in ihrer Struktur und Funktion von den Zellen, die den gesunden Gewebeverband ausmachen (Stephens & Aigner, 2009). Die Entartung der Zellen wird als evolutionärer Prozess angesehen, welcher eine stabile Einbettung der malignen Eigenschaften in das Genom voraussetzt. Hierbei werden die vererbten Eigenschaften darwinistisch nach den größten Vorteilen für die Proliferation selektiert

(Shen & Laird, 2013). Über einen langen Zeitraum wurde spekuliert, ob Tumorzellen als Folge der Dedifferenzierung oder durch die Blockierung der Differenzierung in Stammzellen entstehen. Die Gene, welche für die Differenzierung kodieren, sind in Stammzellen in der Regel mit dem PcG-Komplex assoziiert. Hierdurch können sie für die Differenzierung der Stammzellen aktiviert oder sofern diese nicht notwendig sind, vollständig reprimiert werden (Bernstein *et al.*, 2006). Hypermethylierung an Genen, welche mit dem PcG assoziiert sind, konnte in Stammzellen während der Proliferation, der Alterung, und der malignen Transformation festgestellt werden (Ohm *et al.*, 2007; Schlesinger *et al.*, 2007; Teschendorff *et al.*, 2010). Die Konsequenz hieraus ist, dass diese Zellen ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren, jedoch ihre Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Proliferation behalten und dadurch attraktive Kandidaten für die maligne Transformation darstellen.

Neben den epigenetischen Veränderungen (siehe unter 1.2.1), erscheinen die genetischen Mechanismen der Mutation, der Veränderung der Kopienanzahl, die Insertion, die Deletion und die Rekombination am geeignetsten, um die malignen Eigenschaften stabil ins Genom zu integrieren. Genetische Veränderungen treten im humanen Genom jedoch nur in geringer Häufigkeit auf und sind direkt gekoppelt an die Mitoserate und die Mutationsrate pro Mitose des jeweiligen Gewebes (Knudson, 2001). Hierdurch lässt sich die gesteigerte Inzidenzrate der Tumorerkrankungen mit dem steigenden Alter erklären (Amitage & Doll, 1954; Nordling, 1953). Für die Tumorentstehung wurde deshalb von Knudson (2001) postuliert, dass die wesentlichen Charakteristika der malignen Transformation aller Tumorarten nur eine geringe Anzahl an Veränderungen einschließen und diese in der Regel Gene betreffen, die für die Proliferation und Apoptose kodieren. So beschreibt Knudson (2001) für das Kolonkarzinom fünf genetische „hits“ in verschiedenen Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen, die für die Entartung des Gewebes verantwortlich sind. Dieses Modell ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Entartung des Gewebes beginnt in diesem Modell mit zwei inaktivierenden Mutationen des *APC*-Gens. Bei diesem handelt es sich um einen negativ Regulator des Zellzyklus, dessen Inaktivierung eine erhöhte Proliferationsrate zur Folge hat (Fearon & Vogelstein, 1990). Es handelt sich somit um ein Tumorsuppressorgen, dessen Funktionsverlust zu neoplastischem Wachstum führen kann. In der Regel wird ein Tumorsuppressorgen durch „loss of heterozygosity“, Punktmutationen, homozygote Deletionen oder Promotor-Hypermethylierung inaktiviert (Hoffmann & Cairns, 2011). In der Sequenz der

Tumorgenese folgt eine Mutation des *RAS*-Gens. Hierbei handelt es sich um ein Onkogen. Onkogene sind dadurch charakterisiert, dass durch deren Aktivierung oder Überexpression neoplastisches Wachstum ausgelöst werden kann (Esteller, 2008).

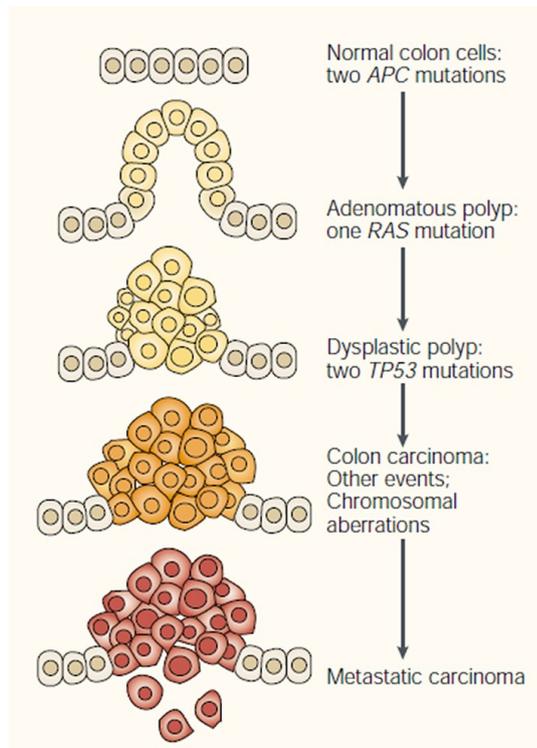


Abbildung 10: Die fünf genetischen Treffer zur Entstehung des Kolonkarzinoms. (Knudson, 2001).

Dargestellt sind die fünf mutagenen Ereignisse der Entartung des Darmgewebes. Diese korrelieren mit der Sequenz der Ereignisse der Adenom-Karzinom Bildung des Kolonkarzinoms. (Basierend auf einem Modell von Fearon und Vogelstein).

Die letzten beiden „hits“ betreffen das Tumorsuppressorgen *p53*. Eine inaktivierende Mutation oder der Verlust dieses Gens ist in etwa der Hälfte aller menschlichen Tumoren zu beobachten (Alberts *et al.*, 2012). Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches verschiedene zelluläre Aufgaben übernimmt, wie z.B. die Zellzykluskontrolle, die Initiation verschiedener DNA-Reparaturmechanismen und die Induktion der Apoptose (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Das Genprodukt von *p53* sorgt generell dafür, dass Zellen, die beschädigte DNA beinhalten, ihren Zellzyklus stoppen, um die Schäden beheben zu können, bevor der Zellzyklus weiterläuft. Die Zellzykluskontrolle erfolgt hierbei über die Inhibition cyclin-abhängiger-Kinasen. Diese Inhibition kann u.a. durch die Expression von *p21* erreicht werden. *p21* agiert hierbei als Mediator von *p53*, dessen Expression entweder in einem G1 oder einem G2 Arrest des Zellzyklus resultiert (Jung *et al.*, 2010). Können die Schäden an der DNA während des Zellzyklusarrestes nicht repariert werden, induziert *p53* die

Apoptose. In gesundem Gewebe sorgt der Vorgang der Apoptose für ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod (Alberts *et al.*, 2012), welches auch „Homöostase“ genannt wird. Diese liegt in den meisten malignen Tumorzellen gestört vor (Stephens & Aigner, 2009). In diesen wird der Zelltod durch Apoptose verhindert, wodurch die Proliferationsrate stets höher ist als die Apoptoserate. Dadurch übertrifft der Zuwachs an Zellen den Verlust solcher (Herbst & Hübner, 2004) und das auf diese Weise neugebildete Zellmaterial wird generell als Neoplasie („Neubildung“) oder als Tumor bezeichnet. Hierbei können sowohl bösartige („maligne“) als auch gutartige („benigne“) Tumoren entstehen. Die Bezeichnung „Krebs“ wird allerdings ausschließlich für maligne Tumoren gewählt. Charakteristisch für maligne Tumoren ist das unkontrollierte Wachstum. Durch diesen Vorgang können die entarteten Zellen in umliegendes Gewebe eindringen, die gesunden Zellen verdrängen und diese ersetzen (Franks & Teich, 1997). Hierdurch kann Schaden an den anderen Zellen des Gewebeverbandes verursacht sowie Einfluss auf deren Funktion genommen werden. Außerdem besitzen maligne Tumoren die Fähigkeit zur Metastasierung. Dies bedeutet, dass die entarteten Zellen zu anderen Orten im Organismus transportiert werden können, indem sie in die Blut- oder Lymphgefäße eindringen. An diesen Stellen können sich dann weitere Neoplasien entwickeln, die als sekundäre Tumoren bezeichnet werden (Franks & Teich, 1997). Im Gegensatz dazu metastasieren Benigne Tumoren nicht. Ein solcher weitet sich weder auf umliegendes Gewebe aus, noch zerstört er dieses (Stephens & Aigner, 2009). Ausgehend vom Gewebe in dem ein Tumor entsteht, werden diese noch in Karzinome und Sarkome unterteilt. Sarkome sind Tumoren die sich aus dem Binde- und Stützgewebe entwickeln, wohingegen Karzinome Tumoren des epithelialen Gewebes darstellen. Die zuletzt genannten Karzinome kommen, im Vergleich zu den Sarkomen, jedoch deutlich häufiger vor.

Tumorerkrankungen sind eine der Hauptursachen der Morbidität und Mortalität weltweit. Für das Jahr 2015 stellen sie nach kardiovaskulären Krankheiten die zweithäufigste Todesursache dar (World Health Organization, 2017), mit einer Inzidenz für das Jahr 2012 von schätzungsweise 14 Millionen Neuerkrankungen. Die „World Health Organization“ erwartet, dass die Rate der Tumor-Neuerkrankungen in den nächsten zwei Dekaden um bis zu 70% ansteigen wird. In etwa ein Drittel der Tumorerkrankungen entstehen aufgrund von einem oder mehreren der fünf Hauptrisikofaktoren. Diese sind:

1. Ein hoher „*Body Mass Index*“ (BMI)
2. Geringer Obst- und Gemüseverzehr
3. Mangel an körperlicher Aktivität
4. Tabakkonsum
5. Alkoholkonsum

Hierbei stellt vor allem der Tabakkonsum die Hauptursache der Tumorgenese dar und ist schätzungsweise für 22% der Mortalität verantwortlich (World Health Organization, 2017).

1.2.1 Epigenetische Veränderungen in Tumorzellen

Genau wie die genetischen Veränderungen (1.2) können die malignen Eigenschaften durch epigenetische Mechanismen stabil in das Genom eingebettet werden. Epigenetische Veränderungen stellen hierbei flexible, über mehrere Zellteilungen erhalten bleibende Alternativen dar, um Anpassungen an den zellulären Phänotyp, aufgrund von exogener Noxen, vorzunehmen. Hierbei beeinflussen genetische und epigenetische Veränderungen sich wechselseitig und etablieren dadurch in Zusammenarbeit die typischen Merkmale der Tumorzellen (Hanahan & Weinberg, 2011). Ein Beispiel hierfür ist, dass epigenetische Mechanismen sowohl die Rate, in der Schäden an der DNA entstehen, als auch die Rate, in der diese repariert werden, beeinflussen können. Methylierte und unmethylierte Cytosine können beide unter physiologischen Bedingungen spontan desaminieren. Hierbei entsteht aus einem methylierten Cytosin die Base Thymin und aus einem unmethylierten Cytosin die Base Uracil, wobei die Desaminierung von 5mC deutlich öfter vorkommt (Wang *et al.*, 1982). Da Uracil nicht als Base in der DNA vorkommt, wird diese Veränderung wesentlich effektiver repariert als die Fehlpaarung zwischen Thymin und Guanin. Die Konsequenz hieraus ist, dass die Rate der Cytosin zu Thymin Transitionen im Kontext der CpG-Dinukleotide um das Zehnfache höher ist als jeder andere „*single nucleotide polymorphism*“ (SNP) des humanen Genoms (Hodgkinson & Eyre-Walker, 2011). Schätzungsweise betrifft diese Form der epigenetischen Mutation in humanen Tumorerkrankungen ein Viertel aller TP53 Mutationen (Olivier *et al.*, 2010).

Generell gibt es hinsichtlich der DNA-Methylierung zwei Arten der Veränderungen, die Tumorzellen von ihrem korrespondierenden gesunden Gegenstück unterscheidet. Diese sind zum einen die Demethylierung (Hypomethylierung) großer Bereiche des Genoms und zum anderen die „*de novo*“ Methylierung

(Hypermethylierung) spezieller CpG-Inseln (Klutstein *et al.*, 2016). Die Hypomethylierung tritt hierbei als Resultat der Demethylierung Kernlamina assoziierter Regionen auf. Diese Bereiche machen ca. 40% des Genoms aus, kodieren in der Regel für eine geringe Anzahl an Genen und enthalten eine hohe Anzahl an repetitiven Sequenzen (Kulis *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu findet sich die Hypermethylierung an CpG-Inseln, die in der Regel unmethyliert im gesunden Gewebe vorliegen und mit dem 5'-regulatorischen Bereich von Tumorsuppressorgenen assoziiert sind (Keshet *et al.*, 2006). Von diesem „*de novo*“ Prozess wird angenommen, dass er nicht durch Selektion, sondern durch einen gerichteten Mechanismus, welcher durch den PcG-Komplex vermittelt wird, etabliert werden kann (Ohm *et al.*, 2007; Schlesinger *et al.*, 2007; Widschwendter *et al.*, 2007). Im menschlichen Genom gibt es schätzungsweise 13.000 unmethylierte CpG-Inseln, von diesen sind jedoch ca. 2.000 mit dem PcG-Komplex assoziiert und liegen dadurch inaktiviert vor. Generell erfolgt diese PcG assoziierte Inaktivierung ohne den Einfluss der DNA-Methylierung. Im Gegensatz dazu scheint der PcG-Komplex in Tumorerkrankungen jedoch für die Rekrutierung der „*de novo*“ Methyltransferasen DNMT3a / b verantwortlich zu sein (Nejman *et al.*, 2013). Diese Form der Inaktivierung tritt vor allem im Eierstockkarzinom für das Gen *BRCA1* (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011) und im Plattenepithelkarzinom der Lunge für das Gen *CDKN2A* auf (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012). Interessanterweise sind über 90% der Gene, die durch Promotorhypermethylierung in den Tumoren stillgelegt werden, bereits vor dem Prozess der Tumorgenese in dem jeweiligen Gewebe inaktiv (Keshet *et al.*, 2006).

Die DNA-Methylierungsveränderungen, wie sie in den Tumoren detektiert werden, können auf zwei Weisen interpretiert werden. Zum einen können gesunde Zellen durch eine initiale Mutation transformiert werden, welche zur Folge hat, dass die „*de novo*“ Methyltransferasen rekrutiert werden. Diese etablieren die Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene und führen dadurch zu einer aberranten Genexpression. Zum anderen kann eine Subpopulation der gesunden Zellen bereits Veränderungen der DNA-Methylierung, aufgrund von alterungsabhängigen Prozessen, erfahren haben. Diese Zellen würden dann ein präferiertes Ziel der onkogenen Transformation darstellen (Easwaran *et al.*, 2014; Issa, 2014). Grundsätzlich ist es jedoch denkbar, dass die Störung der epigenetischen Kontrolle durch Mutation eines Schlüsselfaktors der epigenetischen Regulation, weitreichende Veränderungen des Transkriptoms zur

Folge haben und auf diese Weise den Effekt einer einzelnen Mutation vielfach multiplizieren kann (Shen & Laird, 2013).

1.2.2 Metabolische Veränderungen in Tumorzellen

Da es sich bei Tumorzellen um proliferativ hoch aktive Zellen handelt, benötigen diese eine exogene Versorgung an Lipiden, Aminosäuren und Kohlenhydraten. Nur durch diese exogene Versorgung kann die hohe Proliferationsrate und das zelluläre Überleben gesichert werden (Kinnaird *et al.*, 2016). Hierfür müssen Tumorzellen ihren Metabolismus den Veränderungen der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung anpassen. Als Folge stehen diese Zellen unter ständigem metabolischem Stress und verändern dadurch ebenfalls ihre Umgebung innerhalb des Gewebeverbandes.

Die initiale Evidenz für veränderte metabolische Prozesse in Tumorzellen lieferte Otto Warburg in der Mitte der 1920er Jahre, als er mit dem sogenannten „Warburg Effekt“ eine erhöhte aerobe Glykolyserate in Tumorzellen beschrieb (Warburg, 1925). Im Vergleich zu gesunden Zellen nehmen entartete Tumorzellen verstärkt Glucose auf und sind in der Lage, durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und der aeroben Glykolyse eine signifikant höhere Menge an ATP zu produzieren (Jianrong *et al.*, 2015). Die oxidative Phosphorylierung ist die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Zelle (Ming & Vousden, 2016), wobei das ROS Level proportional zur Aktivität des mitochondrialen Elektronentransports ansteigt (Kang *et al.*, 2015). Reaktive Sauerstoffspezies können die Aktivität von Redox-sensitiven Proteinen regulieren und somit einen Einfluss auf unterschiedliche zelluläre Funktionen nehmen. So können z.B. geringe Mengen an ROS die Proliferation und das Überleben der Zelle stimulieren. Im Gegensatz dazu führen hohe Mengen an ROS zu irreversiblen Schäden an zellulären Makromolekülen, wie z.B. der DNA, Proteinen oder Fettsäuren, und induzieren ultimativ den Zelltod (Jianrong *et al.*, 2015). Über ein erhöhtes Level an ROS kann die Tumorzelle somit sowohl die Proliferationsrate als auch die Mutationshäufigkeit steigern (Liou & Storz, 2010).

Dass der „*one-carbon-metabolism*“ ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen hat, wurde in der Mitte des 20. Jahrhunderts beschrieben, als bei Kindern mit akuter Leukämie festgestellt werden konnte, dass durch Folatmangel in der Ernährung, die Zahl der Tumorzellen im Blut reduziert werden konnte (Farber &

Diamond, 1948). Diese Entdeckung führte zur Einführung sogenannter Antifolat Medikamente, die zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt werden können (Newman & Maddocks, 2017). Als Beispiele für solche Medikamente sind vor allem Methotrexat und Fluorouracil zu nennen. Bei beiden handelt es sich um Inhibitoren der THF- oder der Thymidinsynthese (Gonen & Assaraf, 2012; Locasale, 2013; Longley *et al.*, 2003). THF wird, wie unter 1.1.4 beschrieben, zur Remethylierung des MET im METZ und zur Synthese der Purinbase Thymin benötigt. Da Tumoren aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate einen erhöhten Bedarf an Nukleotiden haben, steigt auch der Bedarf an „one-carbon-units“ und im speziellen an THF. Durch die Medikamentengabe wird die THF- und Thymidinsynthese in solch einem Maße eingeschränkt, dass Uracil anstelle von Thymin in die DNA eingebaut und dadurch die Proliferation verhindert wird (Blount *et al.*, 1997; Goulian *et al.*, 1980).

Neben diesem direkten Einfluss der metabolischen Prozesse auf die Verfügbarkeit der benötigten zellulären Rohstoffe in Tumorzellen, kann der Einfluss der Metabolite auch durch genetische und epigenetische Mechanismen den Prozess der Entartung fördern. So konnte z.B. in verschiedenen Tumorentitäten, welche jeweils eine Mutation in den Genen Isocitrat Dehydrogenase (NADP(+)) 1 (*IDH1*) oder Isocitrat Dehydrogenase (NADP(+)) 2 (*IDH2*) trugen, das erste Onko-Metabolit (D)-2-Hydroxygluterat (D-2HG) identifiziert werden. Durch die Mutationen katalysieren die Enzyme die Umwandlung von α -KG in D-2HG. Dieses selten vorkommende Molekül kann die Funktion von DNA- und Histondemethylase inhibieren und dadurch einen erheblichen Einfluss auf die epigenetische Regulation, die Kollagensynthese und das „cell signaling“ nehmen (Cairns & Mak, 2013). Hierdurch zeigen Zellen mit solchen Mutationen generell erhöhte DNA- und Histon-Methylierungssignaturen und damit assoziierte veränderte Expressionsprofile (Figuroa *et al.*, 2010; Losman *et al.*, 2013). Interessanterweise steht die IDH-1 abhängige reduzierende Carboxylierung von α -KG ebenfalls mit der Verringerung des zellulären ROS Levels und der damit einhergehenden Fähigkeit zur Metastasierung im Zusammenhang (Jiang *et al.*, 2016). Zudem sind verschiedene andere Onkogene und Tumorsuppressorgene ebenfalls in der Lage, die im Folat-Zyklus benötigten Gene zu regulieren. So hat z.B. die aktivierende Mutation des *KRAS*-Gens eine erhöhte Expressionsrate von *MTHFD2* zur Folge (Moran *et al.*, 2014). Durch die beschriebenen genetischen

Veränderungen, die metabolische Prozesse betreffen, werden epigenetische Mechanismen verändert und diese können wiederum die Transkriptionsrate vieler verschiedener Gene beeinflussen. Hierdurch kann der direkte Einfluss der veränderten metabolischen Aktivität in Tumorzellen multipliziert werden und somit anders als erwartet ausfallen (Kinnaird *et al.*, 2016).

1.3 Die Harnblase – Anatomie und Funktion

Die ableitenden Harnwege, auch Urogenitaltrakt genannt, dienen der Ausscheidung nicht verwertbarer flüssiger Stoffe im Körper. Zu den Organen, die für das Sammeln und den Transport des Urins zuständig sind, zählen im oberen Abschnitt die Nieren und die Harnleiter (Ureter) und im unteren Abschnitt die Blase und die Harnröhre (Urethra). Die Harnausscheidung regelt den Wasser- und Salzhaushalt (Deutsche Krebshilfe, 2016). Bei diesem Prozess gelangt der Urin von beiden Nieren zunächst in die Nierenbecken und fließt durch den 25 bis 30 cm langen Harnleiter in die Blase. Diese befindet sich beim ausgewachsenen Menschen hinter dem Schambein im kleinen Becken und ist ein sogenannter Hohlmuskel, welcher aus glatten Muskelzellen besteht. Die Muskelstränge gliedern sich in drei Hauptlagen und sind sowohl rings- als auch längsförmig angeordnet. Diese Anordnung gewährleistet, dass sich die Harnblase zusammen ziehen und den Urin entleeren kann (Hafke, 2013). Die Harnblase besitzt bei Erwachsenen eine Kapazität von 400 - 500ml (Hautmann & Huland, 2006). Erreicht die Menge des Urins diese Speicherkapazität, so setzen genau aufeinander abgestimmte Vorgänge zur Urinentleerung (Miktion) ein. Dehnungsrezeptoren, welche sich in der Wand der Harnblase befinden, signalisieren die zunehmende Füllung. Hierdurch wird in den parasympathischen Zentren des sakralen Rückenmarks der sogenannte Miktionsreflex ausgelöst. Dieser induziert die Kontraktion der Muskulatur in der Blasenwand und löst eine Entspannung des inneren Schließmuskels aus, wodurch der Urin durch die Harnröhre ausgeschieden wird (Hafke, 2013).

Die „*Tunica mucosa*“ bildet die innere Auskleidung der Harnblase. Hierbei handelt es sich um eine Schleimhautschicht, welche aus dem Übergangsepithel, kurz Urothel, aufgebaut ist. Dieses besteht im Normalfall aus sechs bis sieben Zellreihen, wobei die Schichtdicke zum Nierenbecken hin mit nur noch zwei bis drei Zellreihen, abnimmt. Charakteristisch für das Uroepithel sind die lumenwärts liegenden „*Umbrella cells*“, auch bekannt als Schirm- oder Deckzellen. Aufgrund ihres Aufbaus

können diese Zellen sich in ihrer Form je nach Füllungszustand der Blase verändern und dienen dem Schutz des Organs vor dem Urin. Das Übergangsepithel der Harnblase, die *Tunica mucosa*, ruht auf einer aus Kollagen und elastischen Fasern bestehenden „*Lamina propria mucosae*“. Hierdurch erhält sie die Verbindung zur Harnblasenmuskulatur, bei der es sich um ein Geflecht aus zufällig angeordneten glatten Muskelfasern handelt. Diese können sowohl in Zirkulär-, Longitudinal- als auch in Spiraltouren die gesamte muskuläre Blasenwand durchziehen (Hautmann & Huland, 2006) und dienen der Kontraktion des Organs während der Entleerung. Die Abgrenzung nach außen bildet eine Schicht aus Bindegewebe, die sogenannte Adventitia. Diese ist von Nerven-, Blut- und Lymphgefäßen durchzogen (Deutsche Krebshilfe, 2016).

1.3.1 Das Harnblasenkarzinom

Die am häufigsten vorkommende Tumorerkrankung der Harnwege ist das Harnblasenkarzinom, mit einer weltweiten Inzidenz von 429.000 Neuerkrankungen und einer Mortalität von 150.000 Patienten pro Jahr (Ferlay *et al.*, 2015). Das Harnblasenkarzinom stellt 2% aller malignen Tumoren dar und ist die fünft häufigste Tumorerkrankung beim Mann (Knowles & Hurst, 2015). In Deutschland erkranken jedes Jahr mehr als 29.000 Menschen an einem Harnblasenkarzinom, hiervon sind 21.000 männlichen Geschlechts (Deutsche Krebshilfe, 2016). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt für Männer bei 74 und für Frauen bei 76 Jahren (Deutsche Krebshilfe, 2016). Jedoch steigt die Erkrankungsrate mit dem Alter stetig an. So erkrankt nur etwa jede(r) fünfte vor dem 65. Lebensjahr (Robert Koch Institut, 2013).

Für die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms sind verschiedene Faktoren beschrieben, die das Risiko erhöhen, an dieser Krebsart zu erkranken. Analog zum Lungenkarzinom ist der Hauptrisikofaktor des Harnblasenkarzinoms der Zigarettenrauch (Antoni *et al.*, 2016), welcher für ca. 30 - 70% aller Blasenkrebserkrankungen verantwortlich ist (Deutsche Krebshilfe, 2016). Der Zigarettenrauch enthält verschiedene krebserregende Substanzen, hierzu zählen aromatische Amine, wie z.B. 2-Naphtylamin, und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Besaratina & Tommasi, 2013). Diese Schadstoffe gehen beim Rauchen ins Blut über und werden von der Niere aus dem Blut gefiltert. Sie gelangen mit dem Urin in die Blase und werden letztlich über die Harnröhre ausgeschieden. Die Karzinogene wirken dabei auf das gesamte Urothel und es besteht eine

Korrelation zwischen urothelialer Oberfläche und der Häufigkeit eines Urothelkarzinoms. Aus diesem Grund befinden sich Urothelkarzinome in etwa 4% aller Fälle im Nierenbecken, zu 3% im Harnleiter und zu 93% in der Harnblase (Rübben, 2009). Funktionell wirken die Schadstoffe des Zigarettenrauches, indem sie DNA-Addukte bilden und dadurch Mutationen in Schlüsselgenen der Karzinogenese bewirken (Besaratina & Tommasi, 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass Harnblasenzellen, nachdem sie Zigarettenrauch ausgesetzt waren, als direkte Konsequenz aberrante Methylierungsmuster aufweisen (Besaratina & Tommasi, 2013). Weitere Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom sind neben dem Alter, chronische Harnwegsinfektionen und verschiedene chemische Verbindungen, wie z.B. Benzidin, Cyclophosphamid und Chlornaphazin. Nach dem Zigarettenrauch stellen diese Chemikalien den zweithäufigsten Risikofaktor dar, um an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase (Deutsche Krebshilfe, 2016).

T = Primärtumor	TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
	T0	Kein Nachweis von Primärtumor
	Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
	Tis	Carcinoma in situ: „Flache Neoplasie“
	T1	Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein
	T2	Tumor dringt in Muskularis propria ein
	T2a	Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte)
	T2b	Tumor dringt tief in Muskularis propria ein (äußere Hälfte)
	T3	Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein
	T3a	Mikroskopisch
	T3b	Makroskopisch (extravesikale Masse)
	T4	Tumor dringt in eine der folgenden Strukturen ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand
	T4a	Tumor dringt in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina ein
	T4b	Tumor dringt in Beckenwand oder Abdominalwand ein
N = Regionale Lymphknoten	NX	Regionale Lymphknoten können nicht bewertet werden
	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastase in einem Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches
	N2	Metastase in mehreren Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches
	N3	Metastasen der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis
M = Fernmetastas	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Benzidin, ebenfalls ein karzinogenes, aromatisches Amin, wurde in der Farbindustrie und als Härtemittel in der Gummiindustrie verwendet, wodurch seit 1950 das Harnblasenkarzinom als Berufskrankheit anerkannt wird (Pasin *et al.*, 2008).

Das „Staging“ der Tumoren der Harnblase erfolgt nach dem „Tumor-Node-Metastasis“-System (TNM) (Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 2009).

Hierbei werden sie nach dem Invasionsgrad (Tis-T4) und den zellulären Charakteristika unterteilt. Das T steht hierbei für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, das N steht für die Anzahl und Lokalisation befallener Lymphknoten und das M steht für das Auftreten und die Lokalisation von Fernmetastasen in anderen Organen (Deutsche Krebshilfe, 2016). Die TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase ist in Tabelle 1 dargestellt.

Derzeit finden zwei Systeme zum „Grading“ des Harnblasenkarzinoms Anwendung (Eble *et al.*, 2004; World Health Organization, 1973). Dies geschieht zum einen nach den Kriterien der World Health Organization von 1973 und zum anderen nach denen der World Health Organization und der „*International Society of Urological Pathology*“ (ISUP) von 2004. Die Kriterien sind im Einzelnen in Abbildung 11 dargestellt. Der Hauptunterschied der beiden Systeme ist hierbei die Unterteilung der papillären Tumoren.

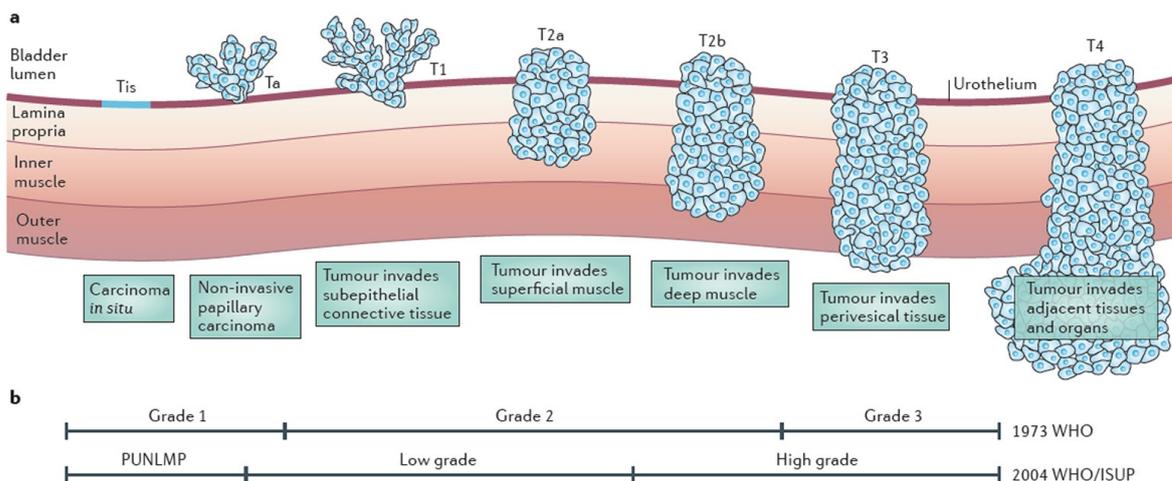


Abbildung 11: „Grading“ und „Staging“ des Harnblasenkarzinoms (Knowles & Hurst, 2015).

A: „Staging“ des Harnblasenkarzinoms anhand der TNM-Klassifikation.

B: Grading anhand der Kriterien der WHO (1973) und der WHO / ISUP (2004). Der Hauptunterschied hierbei ist die Unterteilung der papillären Tumoren. In dem System von 1973 wurden diese als Grad 1 bis 3 und im neueren System von 2004 als „*papillary urothelial malignancy of low malignant potential*“ (PUNLMP) sowie „*low*“ und „*high Grade*“ klassifiziert.

In dem System von 1973 wurden diese als Grad 1 bis 3 und im neueren System von 2004 als „*papillary urothelial malignancy of low malignant potential*“ (PUNLMP) sowie „*low*“ und „*high Grade*“ klassifiziert. In etwa 75% der Fälle handelt es sich zum Zeitpunkt der Diagnose der Erkrankung um nicht muskelinvasive Harnblasenkarzinome (NMIBC) (Babjuk *et al.*, 2017). Zu den NMIBCs zählen, mit

einem Anteil von 20%, die „*high grade*“ T1 Tumoren sowie mit einem Anteil von 10% die „*carcinoma in situ*“ (CIS). Die größte Gruppe innerhalb der NMIBCs (70%) stellt jedoch die Gruppe der nicht-invasiven Harnblasenkarzinome (NIBC) dar. Diese werden als pTa Tumoren bezeichnet und penetrieren die epitheliale Basalmembran nicht (Hurst *et al.*, 2017). Diese Tumoren werden in der Regel durch Resektion mit anschließender Chemotherapie behandelt (Babjuk *et al.*, 2017), wobei die Rezidivrate 50-70% betrifft. Allerdings neigen die NMIBCs nur in 10 - 15% der Fälle zu invasivem Wachstum und die Überlebensrate nach fünf Jahren beträgt ca. 90% (Knowles & Hurst, 2015). Der Krankheitsverlauf von Patienten, die an einem NMIBC erkranken, geschieht in der Regel durch Zystoskopie. Während dieser Zeit können mehrere Resektionen der erkrankten Areale notwendig werden, was mit einer erheblichen Belastung für den Patienten und hohen Kosten verbunden ist. Muskel-invasive Harnblasenkarzinome (MIBC), hierzu zählen T2 und höhere Tumoren, haben im Gegensatz dazu eine schlechtere Prognose, so metastasieren über die Hälfte aller MIBCs und die Überlebensrate nach fünf Jahren beträgt weniger als 50% (Knowles & Hurst, 2015). Generell wird angenommen, dass NMIBCs aus epithelialen Hyperplasien und der Rekrutierung eines verzweigten Gefäßsystems entstehen, wohingegen MIBCs sich aus flachen Dysplasien und „*carcinoma in situ*“ entwickeln. Die unterschiedliche Entwicklung der invasiven und nicht-invasiven Harnblasenkarzinome spiegelt sich auch in den molekular genetischen Charakteristika wieder, da diese zwischen NMIBCs und MIBCs sehr unterschiedlich sind (vgl. unter 1.3.2) (Knowles & Hurst, 2015).

1.3.2 Genetische und epigenetische Veränderungen im Harnblasenkarzinom

Das Harnblasenkarzinom weist eine Vielzahl an genetischen und epigenetischen Veränderungen auf, wobei diese in NMIBCs und MIBCs sehr unterschiedlich ausfallen. Hierbei weisen NMIBCs generell einen nahezu diploiden Karyotyp auf und verfügen nur über eine geringe Anzahl an genomischen „*Rearrangements*“. Im Gegensatz dazu sind MIBCs häufig aneuploid und mit einer Vielzahl an chromosomalen Veränderungen versehen (Morrison *et al.*, 2014). Für das MIBC sind vor allem inaktivierende Mutationen in Genen, die für die DNA-Reparatur und der DNA-Schäden assoziierten Zellzykluskontrolle kodieren, beschrieben. Hierzu zählen u.a. „*cross complementation group 2*“ (*ERCC2*), „*ataxia-telangiectasia mutated*“ (*ATM*) und „*Fanconi anaemia complementation group a*“ (*FANCA*) (Knowles & Hurst, 2015). Außerdem zeigen fast alle MIBCs eine inaktivierende Mutation in mindestens

einem Gen, das den Zellzyklus Checkpoint in der G1 Phase reguliert. Hierzu zählen das Tumor Protein P53 (*TP53*), „RB transcriptional corepressor 1“ (*RB1*) und „cyclin-dependent kinase inhibitor 2A“ (*CDKN2A*) (Mitra *et al.*, 2012). Des Weiteren zeigen 89% der MIBCs Mutationen in den Genen, die für die Verpackung des Chromatins verantwortlich sind (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Hierzu zählen u.a. die „Lysin-spezifische Demethylase 6A“ (*KDM6A*) oder die Histon-Methyltransferase „mixed-lineage leukaemia 2“ (*MLL2*). Im Gegensatz dazu zeigen NMIBCs zu mehr als 82% Mutationen in einem der beiden Gene „*fibroblast growth factor receptor 3*“ (*FGFR3*) und *RAS* (Jebar *et al.*, 2005). Hierbei handelt es sich um aktivierende Mutationen. Diese Art der Veränderung wurde vor allem in pTa Tumoren (bis zu 80%) gefunden (Cappellen *et al.*, 1999). Funktionell konnte von Di Martino *et al.* (2009) nachgewiesen werden, dass die Überexpression von *FGFR3* in einer gesunden humanen urothelialen Zelllinie zu einer Aktivierung des RAS-MAPK-Signalweges („*mitogen-activated protein kinase*“) und einer damit einhergehenden erhöhten Überlebens- sowie Proliferationsrate führt. Die am häufigsten vorkommende Mutation im Harnblasenkarzinom ist jedoch, sowohl für die invasiven als auch für die nicht invasiven Tumoren, eine Punktmutation im Promotorbereich des „*telomerase reverse transcriptase*“-Gens (*TERT*). Diese Punktmutation tritt in ca. 80% der Tumoren auf und betrifft in der Regel eine Position zwischen -124 und -146bp in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt (Allory *et al.*, 2013; Hurst *et al.*, 2013). Nach dem Lungenkarzinom und den Melanomen hat das Harnblasenkarzinom, und im speziellen die MIBCs, die dritthöchste Mutationsrate, mit 7,7 und 5,5 Mutationen pro Megabase (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Hierbei ist die am meisten vorkommende Veränderung die Transition von C:G zu T:A im TpC Kontext. Dies ist das charakteristische Muster der „*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like*“-Desaminase (APOBEC). Im gesunden Gewebeverband dient diese normalerweise der transkriptionellen Restriktion von Retroviren und Retrotransposons (vgl. unter 1.4.1). Im Harnblasenkarzinom konnte eine signifikante Überexpression der APOBEC-Desaminase gefunden werden (Burns *et al.*, 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

Ein generelles Charakteristikum des Harnblasenkarzinoms ist die Deletion des Chromosoms 9. Diese Veränderung tritt sowohl in MIBC, als auch in NMIBC mit einer Häufigkeit von über 50% auf (Knowles & Hurst, 2015). Durch die Deletion wird die

Genaktivität verschiedener Tumorsuppressoren affektiert, wobei schon der Verlust eines Allels in ungefähr 45% der Harnblasenkarzinome eine funktionelle Konsequenz hat (Carnero *et al.*, 2000; Serrano, 2000). Zu den betroffenen Tumorsuppressoren zählen u.a. *CDKN2A*, *CDKN2B*, „*patched 1*“ (*PTCH1*), „*deleted in bladder cancer 1*“ (*DBC1*), *NOTCH1* und „*tuberous sclerosis 1*“ (*TSC1*). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass sich anhand des Verlustes von Chromosom 9 zwei Subtypen von nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen unterscheiden lassen. Solche Tumoren, die Chromosom 9 deletieren, weisen im Gegensatz zu solchen, die dieses Chromosom nicht verlieren, in der Regel einen höheren Grad an genomischer Instabilität und ein verändertes metabolisches Profil auf (Hurst *et al.*, 2017).

Neben diesen genetischen Veränderungen, sind exzessive DNA-Methylierungsveränderungen für das Harnblasenkarzinom mit einem bestimmten klinisch-pathologischen Verlauf beschrieben (Dudziec *et al.*, 2011; Kim & Kim, 2009; Sanchez-Carbayo, 2012). So konnte z.B. eine Untergruppe des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms definiert werden, die sich durch hohe Level an Promotor-Hypermethylierung auszeichnet. Die gefundenen Methylierungssignaturen korrelieren hierbei ebenfalls mit den Rauchgewohnheiten des jeweiligen Patienten (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Im Gegensatz dazu zeigen die nicht-invasiven Harnblasenkarzinome deutliche Muster an Hypomethylierung in Bereichen, die nicht mit CpG-Inseln assoziiert sind (Wolff *et al.*, 2010). Hypomethylierung der LINE-1 Retrotransposons (vgl. unter 1.4.2) konnte in 90% der Harnblasenkarzinome nachgewiesen werden (Neuhausen *et al.*, 2006). Diese Art der Veränderung ist sowohl für die invasiven, als auch die nicht-invasiven Harnblasenkarzinome beschrieben (Schulz & Goering, 2016) und trägt möglicherweise zur Entartung des Gewebes durch Induktion der genomischen Instabilität (Ghanjati *et al.*, 2014) und Veränderung der gewebespezifischen Transkriptionsmuster bei (Wolff *et al.*, 2010). Ein Drittel aller Harnblasentumoren entsteht an mehreren Stellen der Harnblasenwand. In solch einem Fall wird von einem multifokalen Tumor gesprochen. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet das Konzept des „*field change*“. Diese Hypothese besagt, dass Zellen die dem Tumor benachbart sind, bereits genetische und epigenetische Veränderungen, wie sie in diesem Kapitel beschrieben wurden, durchlaufen haben und deshalb bereits auf den Prozess der Entartung „vorbereitet“ sind (Simon *et al.*, 2001). Allerdings muss sich

die phänotypische Erscheinung dieser Zellen nicht von der einer gesunden Zelle unterscheiden. Die Differenzierung dieser Areale kann somit nur molekularbiologisch erfolgen. Die Hypothese des „*field change*“ ist in Abbildung 12 dargestellt.

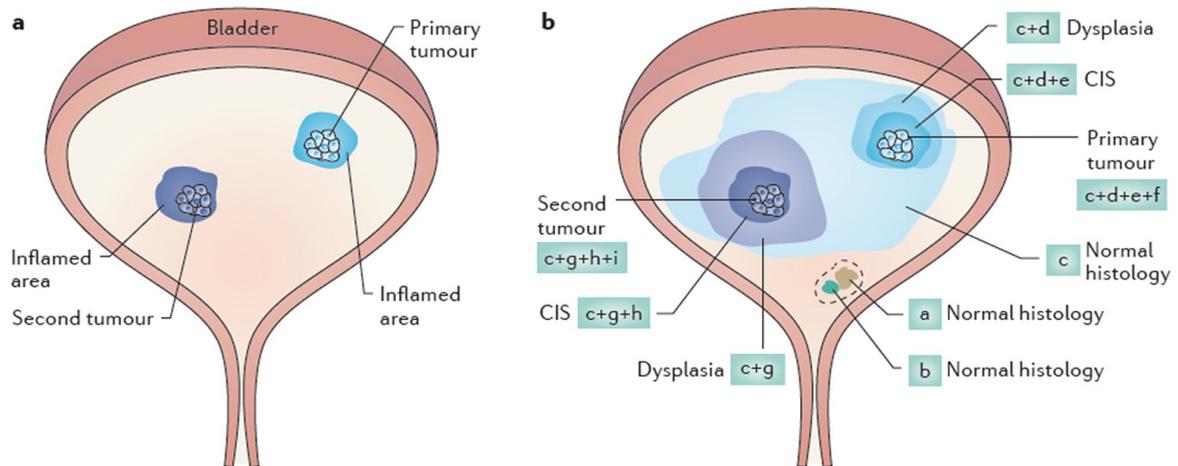


Abbildung 12: Konzept des "field change" (Knowles & Hurst, 2015).

A: Schematische Darstellung der Sicht des Pathologen auf die Harnblase. Hierbei sind sowohl der Primär-, als auch der Sekundärtumor von einer Zone mit einer Entzündungsreaktion umgeben.

B: Schematische Zeichnung der molekulargenetischen Sicht. Ein großer Anteil der gesunden Harnblasenzellen wurde durch veränderte Zellen ersetzt. Die molekulare Veränderung (c) hat sich hierbei, in einem großen Radius um den Primärtumor herum, in phänotypisch gesund erscheinenden Zellen manifestiert. Innerhalb dieser Zellen gibt es eine Subgruppe (c+d), die dysplastische Veränderungen trägt. Zellen mit c+d+e Veränderungen stellen die direkten Vorläufer der Tumorzellen (c+d+e+f) dar und werden als Zone der Entzündungsreaktion wahrgenommen. Ähnlich verhält es sich bei dem Sekundärtumor. Allerdings kann es sich hierbei auch um Veränderungen handeln, die sich in ihrer phänotypischen Ausprägung vom Primärtumor unterscheiden (g, h und i).

1.4 Transposable Elemente

Transposable Elemente (TE's; auch als „springende Gene“ bekannt) sind kurze DNA-Stücke, die sich innerhalb des Genoms bewegen können (Cordaux & Batzer, 2009). Sie wurden erstmals von Barbara McClintock in der Mitte des 20. Jahrhunderts beschrieben (McClintock, 1950) und lange Zeit als „junk DNA“ bezeichnet. Neuere Erkenntnisse belegen jedoch, dass transposable Elemente maßgeblich zur dynamischen Variabilität des Genoms beitragen und dadurch die Form sowie die Funktion vieler Gene geprägt haben (Kazazian, 2011). Schätzungsweise sind 40% des humanen Genoms durch transposable Elemente entstanden, wobei es sich bei den TE's vor allem um parasitäre DNA handelt (Goodier, 2016). Aufgrund des parasitären Charakters müssen TE's durch zelluläre Mechanismen kontrolliert

werden. Andernfalls können sie bei transkriptioneller Aktivität zu erheblichen Schäden innerhalb des Genoms führen (Goodier, 2016).

Die transposablen Elemente im humanen Genom werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: Die DNA-Transposons und die Retrotransposons. DNA-Transposons machen ca. 3% des humanen Genoms aus und bewegen sich hauptsächlich über den sogenannten „*cut and paste*“-Mechanismus. Dieser beinhaltet das Herausschneiden des jeweiligen Elements aus der DNA, mit dem anschließenden Neueinfügen an einer anderen Stelle im Genom (Goodier & Kazazian, 2008). Mit Ausnahme einer Familie der sogenannten „*piggyBac*“-Elemente, welche in einer bestimmten Fledermausart gefunden werden konnte, gibt es in Säugetieren keine aktiven DNA-Transposons (Mitra *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den DNA-Transposons bewegen sich Retrotransposons durch den sogenannten „*copy and paste*“-Mechanismus. Dieser beinhaltet die reverse Transkription einer RNA-Zwischenstufe, mit anschließender Insertion der cDNA-Kopie an einer neuen Stelle im Genom (Goodier, 2016). Abhängig von dem Vorhandensein oder Fehlen von „*long terminal repeats*“ (LTRs), werden die Retrotransposons nochmals in zwei Untergruppen unterteilt. LTR-Retrotransposons (wie z.B. HERVs) besitzen an ihren Enden lange, sich wiederholende Sequenzen, die sowohl als Transkriptionspromotoren als auch als Transkriptionsterminatoren dienen können. Bei Retrotransposons ohne solch eine Struktur, auch als „*non*“-LTR-Retrotransposons bezeichnet, befindet sich der Promotor im Transkript selbst (Deininger & Batzer, 2002). Zu den „*non*“-LTR-Retrotransposons gehören sowohl die „*Short Interspersed Elements*“ (SINEs) als auch die „*Long Interspersed Elements*“ (LINEs), wobei letztere die einzigen selbstständig aktiven Elemente im humanen Genom darstellen (Goodier, 2016).

Bei transposablen Elementen, die selbstständig für solche Proteine kodieren, die zur Transposition benötigt werden, handelt es sich um sogenannte autonome Transposons. Zu dieser Gruppe können sowohl LTR- als auch „*non*“-LTR-Retrotransposons zählen. Die bekanntesten Vertreter sind aus der Gruppe der LTR-Familie die humanen endogenen Retroviren (HERVs) (Belancio *et al.*, 2010) und aus der „*non*“-LTR-Familie die LINE-1 Elemente (Deininger & Batzer, 2002). Im Gegensatz dazu kodieren nicht autonome Elemente für keine Proteine. Zu dieser Gruppe gehören die SINEs, mit ihrem wichtigsten Vertreter den ALU-Elementen

(Deininger & Batzer, 2002). Diese Elemente sind bei der Transposition abhängig von den kodierenden Proteinen der autonomen Retrotransposons. Eine Übersicht aller im Genom von Säugetieren vorkommenden transposablen Elemente ist in Abbildung 13 dargestellt.

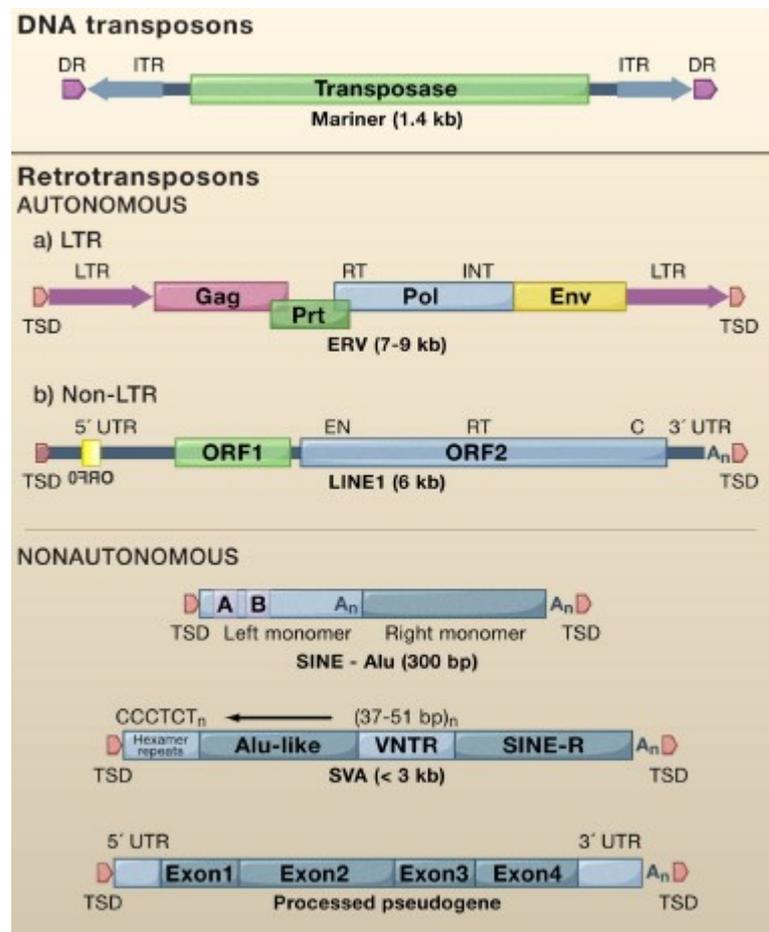


Abbildung 13: Transposable Elemente im Säugetiergenom.

Abkürzungen: DR = „direct repeat“; ITR = „inverted terminal repeat“; Gag = „group-specific antigen“; Prt = Protease; Pol = Polymerase; Env = „envelope“; RT = „reverse transcriptase domain“; INT = „integrase domain“; TSD = „target site duplication“; LTR = „long terminal repeat“; EN = „endonuclease domain“; C = „zinc knuckle domain“; A_n = poly (A); A/B, A- and B-box Pol III promoter; SVA, SINE-R, VNTR, Alu element; VNTR = „variable number tandem repeats“.

Die Aktivität der transposablen Elemente und insbesondere der ALU- und LINE-1 Elemente ist in der humanen Genetik mit verschiedenen erworbenen Erkrankungen verbunden. Dazu zählen u.a. Mukoviszidose, Neurofibromatose und verschiedene Tumorerkrankungen (Callinan & Batzer, 2006), wie z.B. der Darmkrebs. Im Fall des Kolonkarzinoms wird durch die Insertion eines LINE-1 Elements das *APC*-Gen verändert und dadurch die Entartung des Gewebes initiiert (Hancks & Kazazian,

2012). Hierbei kann die Fehlregulation der Elemente auf drei verschiedene Weisen genomische Schäden herbeiführen:

Erstens können die Insertionen der TE's innerhalb eines kodierenden oder regulierenden Bereiches erfolgen. Dieser Vorgang wird auch als Insertionsmutagenese bezeichnet und ist für ca. 0,3% aller menschlichen Mutationen verantwortlich (Callinan & Batzer, 2006). Zweitens können, durch die kodierte Endonuklease, DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst werden (Gasior *et al.*, 2006). Drittens kann die Aktivität der TE's zur ektopischen Expression von Genen führen. Hierzu tragen sowohl Deletionen als auch Duplikationen und Genumlagerungen aufgrund von homologer Rekombination bei (Haig & Kazazian, 2004).

1.4.1 LINE-1 Retrotransposons

Die „*Long Interspersed Elements*“ (LINEs) gehören zu der Gruppe der „*non*“-LTR-Retrotransposons. Im humanen Genom befindet sich derzeit nur ein aktives, autonom mobiles Mitglied dieser Gruppe, die sogenannten LINE-1 Elemente. Diese haben sich in den letzten 150 Millionen Jahren der Säugetierentwicklung massiv im Genom ausgebreitet, so dass sie mit ca. 500.000 Kopien 17% des humanen Genoms für sich beanspruchen (Goodier, 2016). LINE-1 Elemente verfügen über ein 6 kb großes, bicistronisches Transkript, mit jeweils einer 3'- und 5'-untranslatierten Region. Bei diesen handelt es sich am 5'-Ende um den internen Promotor und das 3'-Ende beinhaltet das Signal für den Poly-A-Schwanz. Das Transkript kodiert in „*sense*“-Orientierung für zwei offene Leseraster (*ORF1* und *ORF2*). *ORF2* kodiert hierbei für ein 150kD großes Protein, welches sowohl über Endonuklease-, als auch über reverse Transkriptase-Aktivität verfügt (Goodier, 2016). Die durch *ORF2* kodierte Endonuklease besitzt eine kurze Konsensussequenz (5'-TTTT/A-3') und kann deshalb an vielen Stellen das Genom schneiden. Hierdurch ist es den LINE-1 Elementen möglich an zahlreichen Stellen ins Genom zu integrieren (Babushok & Kazazian, 2007). Es wird angenommen, dass vor allem die Dysregulation der durch *ORF2* kodierten Endonuclease und die damit verbundenen dsDNA-Strangbrüche, zur genomischen Instabilität und zur Tumorgenese beitragen (Goodier, 2016).

Die genaue Funktion des durch *ORF1* kodierten Proteins ist bisher nicht bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass das 40kD große Protein über eine RNA-bindende-Domäne verfügt, Chaperon-Aktivität aufweist und essentiell für die

Transposition ist (Martin, 2006, 2010). Das ORF1 Protein kann hauptsächlich im Zytoplasma detektiert werden, wo es Aggregate bildet. Diese konnten als „*stress granules*“ (SGs) und „*processing bodies*“ (PBs) identifiziert werden (Goodier, 2007; Hohjoh & Singer, 1997; Martin & Branciforte, 1993). SGs werden als Reaktion auf diverse zelluläre Stresssituationen, wie z.B. einem Hitze- oder Osmotischen Schock, oxidativem Stress, einer viralen Infektion und bei der Überexpression bestimmter Proteine im Zytoplasma, gebildet. Im Gegensatz dazu sind PBs zytoplasmatische Kompartimente, welche in der Regel Moleküle, die mit dem Abbau von mRNA oder der Translationsinhibition in Verbindung stehen, enthalten (Anderson & Kedersha, 2006). Zusätzlich zu *ORF1* und *ORF2* verfügen die LINE-1 Elemente im humanen Genom auf dem „*anti-sense*“-Strang über einen schwachen Promotor, welcher „*upstream*“ eines 216 Nukleotid langen, translationsfähigen „*open reading frame 0*“ (*ORF0*) liegt (Denli *et al.*, 2015; Speek, 2001).

Von den 500.000 LINE-1 Kopien sind die meisten am 5'-Ende durch Mutationen oder genomische Rearrangements verkürzt (Khan *et al.*, 2006). Diese Elemente sind nicht mehr in der Lage im Genom zu „springen“. Allerdings können sie transkriptionell aktiv sein. Im humanen Genom liegen mindestens 3.000 - 5.000 sogenannte „*full-length*“ LINE-1 Kopien vor, von denen jedoch nur 80 - 100 intakt und damit zur Retrotransposition fähig sind (Brouha *et al.*, 2003). Diese 80 - 100 Kopien werden für die meisten „*de novo*“ LINE-1 Insertionen verantwortlich gemacht, wobei Allel-Variationen erheblichen Einfluss auf das Transpositionereignis nehmen können (del Carmen *et al.*, 2006). So kann bei etwa 5% der neugeborenen Kinder eine neue Insertion eines Retrotransposons festgestellt werden. Alleine bei der menschlichen Gehirnentwicklung kann von 20 Milliarden neuen LINE-1-Insertionen ausgegangen werden. Dies entspricht einer Insertionsrate von 0,2 LINE-1-Insertionen pro Neuron (Goodier, 2016). Für jede dieser Insertionen wird hierbei angenommen, dass sie zur neuronalen Plastizität beitragen kann (Singer *et al.*, 2010). Ebenfalls erscheint es wahrscheinlich, dass die LINE-1 Insertionen im gleichen Maße zur Entwicklung von Gehirntumoren beitragen könnten, hierfür fehlt bisher jedoch die experimentelle Evidenz (Helman *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2012). Allerdings sind derzeit 124 Erkrankungen mit einer Keimbahn-Insertion eines LINE-1-, Alu- oder SVA-Elementes assoziiert (Cordaux *et al.*, 2006; Hancks & Kazazian, 2012, 2016).

Die Aktivität von TEs konnte, zusätzlich zu den beschriebenen entwicklungsbiologischen Prozessen, ebenfalls mit der Alterung verknüpft werden. Hierbei scheinen die altersbedingten Veränderungen der Chromatinstruktur eine erhöhte Expression an Retrotransposons zur Folge zu haben (Belancio *et al.*, 2015; Maxwell, 2016; St. Laurent *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang ist es jedoch schwer die Insertionen nachzuweisen, da die „*de novo*“ Insertionen nur in einer geringen Anzahl an Zellen zu finden sein werden und somit die Nachweisgrenze der derzeitigen Amplifikations-Methoden zu gering sein könnte. Erst eine klonale Expansion der Insertion, wie sie z.B. in Tumoren stattfindet, kann solch ein Retrotranspositionereignis sichtbar werden lassen (Goodier, 2016).

Das Retrotranspositionereignis kann nicht nur, durch die Insertionsmutagenese einen Einfluss auf die Genexpression nehmen, sondern ebenfalls dadurch, dass an den Stellen im Genom, an denen ein LINE-1 Element inseriert wird, oftmals Duplikationen von variabler Länge (TSDs) oder Deletionen generiert werden. Diese werden durch den sogenannten „*target-primed reverse transcription*“ (TPRT) Prozess der LINE-1 Elemente hervorgerufen. Hierbei schneidet die LINE-1 Endonuklease den DNA-Doppelstrang an der Insertionsstelle, so dass eine 3'-Hydroxylgruppe frei wird. An diese Hydroxylgruppe bindet die LINE-1-mRNA, welche dann als Primer für die reverse Transkription dient (Goodier, 2016). Während dieses Vorgangs werden die meisten LINE-1 Kopien am 5'-Ende verkürzt und verlieren dadurch ihre Fähigkeit zum „Springen“. Aber auch die LINE-1 Insetrate, die nach der TPRT noch intakt vorliegen, verlieren meistens im Anschluss an die TPRT durch Rekombinationsereignisse oder Mutationen ihre Transpositionsfähigkeit (Ostertag & Kazazian, 2011). Interessanterweise zeigen jedoch „*in silico*“-Analysen, dass ca. 15% der LINE-1 Elemente einen 3'-flankierenden DNA-Bereich an die Stelle der Insertion transduziert haben. Hierdurch wurden zwischen 19 und 30Mb an neuer DNA generiert. Dies entspricht in etwa einem Prozent des gesamten humanen Genoms (Goodier *et al.*, 2000; Holmes *et al.*, 1994; Moran *et al.*, 1999).

Um die LINE-1 Elemente inaktiv zu halten, werden mehrere zelluläre Kontrollmechanismen benötigt. Als primärer, evolutionärer Mechanismus gegen die Aktivität der TEs wurde die DNA-Methylierung der CpG-Dinukleotide vorgeschlagen (Yoder *et al.*, 1997). Dass die DNA-Methylierung von besonderer Bedeutung ist, zeigt

die Tatsache, dass ca. die Hälfte aller CpGs des humanen Genoms mit repetitiven Elementen assoziiert sind (25% Alus und 12% LINEs) (Rollins *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2009). Die CpGs der 5'-UTR-Bereiche der LINE-1 Elemente werden in somatischen Zellen in der Regel stark methyliert vorgefunden, wodurch die Expression inhibiert wird (Hata & Sakaku 1997; Woodcock *et al.*, 1997). Hierbei konnte jedoch beobachtet werden, dass die DNA-Methylierung und die reprimierenden Histonmodifikationen, die bei Neuinsertionen der TEs angebracht werden, ebenfalls auf die Insertion flankierende DNA Bereiche ausgeweitet werden können. Dadurch kann die Expression benachbarter Gene ebenfalls beeinflusst werden (Grandi *et al.*, 2015; Pezic *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012). Allerdings muss eine starke Demethylierung der LINE-1 Elemente nicht zwangsläufig auch zu einer transkriptionellen Aktivität führen (Seisenberger *et al.*, 2012). Denn neben der DNA-Methylierung gibt es weitere Kontrollmechanismen, die sowohl auf Proteinebene, wie z.B. durch das APOBEC3-Protein (Arias *et al.*, 2012; Koito & Ikeda, 2013), als auch auf RNA-Ebene, wie z.B. durch den RNAi-Komplex (Obbard *et al.*, 2009; Yang & Wang, 2016), die Aktivität der TEs beeinflussen können. Hierbei kann die RNA-Interferenz sowohl posttranskriptionell, durch RNA Degradierung, als auch auf transkriptioneller Ebene, durch die Induktion von epigenetischen Modifikationen, wirken (Goodier, 2016). Das APOBEC3-Protein hingegen kontrolliert die LINE-1 Elemente während der TPRT. Hierbei kann es die Cytosine in der einzelsträngigen LINE-1-cDNA desaminieren, wodurch sich die Mutationsrate erhöht und eine Destabilisierung dieses Bereiches induziert wird (Richardson *et al.*, 2014).

1.4.2 LINE-1 Retrotransposons in Tumorerkrankungen

Derzeit sind 124 Erkrankungen mit einer Keimbahn-Insertion eines LINE-1-, Alu- oder SVA-Elementes assoziiert (Cordaux *et al.*, 2006; Hancks & Kazazian, 2012, 2016). In wie weit der Prozess der Retrotransposition hierbei die Ätiologie der Tumorgenese betrifft, konnte bis heute nicht geklärt werden. Allerdings konnten vor über 20 Jahren die ersten tumorspezifischen LINE-1 Insertionen gefunden werden, die maßgeblich für die Entartung des jeweiligen Gewebes verantwortlich sein können. Dies sind im Fall des Leberkarzinoms Insertionen in das „*Tumorigenicity 18*“-Gen (*ST18*) (Shukla *et al.*, 2013), im Fall des Endometriumkarzinoms Insertionen in das „*Phosphatase and Tensin Homolog*“-Gen (*PTEN*) (Helman *et al.*, 2014) und im Fall des Kolonkarzinoms Insertionen in das „*Adenomatous Polyposis Coli*“-Gen (*APC*) (Scott *et al.*, 2016). Neuere Studien ergaben, dass die Insertionen, wie sie in

den einzelnen Tumoren vorgefunden wurden, ebenfalls in den somatischen Zellen des jeweiligen Patienten detektiert werden konnten. Diese somatischen Zellen erscheinen folglich als Vorläufer der Tumorzellen, mit einem erhöhten Potential zur Entartung. Allerdings gab es auch solche Insertionen, die ausschließlich spezifisch für Metastasen waren und nicht im Primärtumor vorgefunden werden konnten. Bei diesen Transpositionereignissen scheint es sich also um späte tumorspezifische Ereignisse zu handeln (Ewing *et al.*, 2015; Rodić *et al.*, 2015). Es stellt sich somit die Frage, ob das Ereignis der Retrotransposition die Tumorgenese initiieren kann oder ob die Entartung des Gewebes die Häufigkeit des Auftretens der Transpositionen beschleunigt. In diesem Zusammenhang ist es von besonderer Bedeutung, dass ein wichtiger Kontrollmechanismus für die Aktivität der TEs in diversen Tumorentitäten dysreguliert wird. Hierbei handelt es sich um das unter 1.4.1 beschriebene APOBEC3-Protein, welches in den entsprechenden Tumoren überexprimiert wird. Hierdurch steigt die Rate in der Cytosine desaminiert werden und folglich die Mutationsrate der Tumoren, wodurch angenommen wird, dass dieser Mechanismus zur Tumorprogression beiträgt (Burns *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2013).

DNA-Hypomethylierung von Retrotransposons und insbesondere der LINE-1 Elemente konnte für viele Tumorentitäten beschrieben werden (Alves *et al.*, 1996; Kitkumthorn & Mutirangura, 2011), unter anderem auch in 90% der Harnblasenkarzinome (Neuhausen *et al.*, 2006). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die TEs in diesen Tumoren stärker exprimiert werden und folglich die Häufigkeit der Transpositionen zunimmt. Hierfür fehlt bisher jedoch die experimentelle Evidenz. Es konnte aber gezeigt werden, dass die LINE-1-Expression in verschiedenen Tumorentitäten verändert vorliegt, wodurch auch die beiden Proteine des *ORF1* und *ORF2* nachgewiesen werden können. Deshalb werden diese als potentielle diagnostische Marker für den Tumorprozess diskutiert (De Luca *et al.*, 2015; Doucet-O'Hare *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2010).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Das Harnblasenkarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung des Urothel-Traktes, mit einer weltweiten Inzidenz von 429.000 Neuerkrankungen und einer Mortalität von 150.000 Patienten pro Jahr. Erhebliche DNA-Methylierungsveränderungen sind bereits für frühe Stadien der Tumorgenese beschrieben, von denen angenommen wird, dass sie durch die Veränderung der Genexpression zur genomischen

Instabilität und der Tumorprogression beitragen können. Bisher ist jedoch unbekannt, wie diese epigenetischen Veränderungen während der Tumorgenese entstehen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, ob der Methylgruppen- oder Polyaminmetabolismus eine mögliche Erklärung dieses Phänomens bieten kann. Denn beide Stoffwechselwege werden benötigt, um das Zelltyp-spezifische Methylohm aufrecht zu erhalten und dadurch die genetische Integrität und die Ausübungen der zellulären Funktionen zu gewährleisten. Im ersten Teil der Arbeit werden daher die Gene, die mit den beiden Stoffwechselwegen assoziiert sind, hinsichtlich ihrer DNA-Methylierung in den 5'-regulatorischen Bereichen untersucht. Sollte die Transkription dieser Gene beispielsweise durch DNA-Methylierung inhibiert sein, könnte dies zu einer Veränderung der intrazellulären SAM und SAH Konzentrationen führen, welche wiederum die Fähigkeit einer Zelle Methylgruppen an die DNA anzubringen beeinträchtigt. Als Folge würde die Hypermethylierung der Promotorbereiche, der Gene des Methylgruppen- und Polyaminmetabolismus, weitere DNA Methylierungsveränderungen begünstigen und es könnte sich eine „*feed-back*“-Schleife bilden, die in der Lage ist, die Tumorentstehung und -progression zu fördern. Auf der Basis der gefundenen DNA-Methylierungsveränderungen könnte sich somit ein Biomarker entwickeln lassen, welcher bei der Früherkennung und der richtigen Diagnose eines Harnblasenkarzinoms helfen kann.

Neben der Fragestellung, ob die Gene der beiden Stoffwechselwege im Harnblasenkarzinom von DNA-Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich betroffen sind, sollte auch die Frage geklärt werden, welche funktionellen Auswirkungen die transkriptionelle Inhibition dieser Gene auf urotheliale Zellen hat. Die metabolischen Prozesse können hierbei auf verschiedene Weise einen Einfluss auf zelluläre Funktionen nehmen. So stellt z.B. die direkte „*feed-back*“-Inhibition der Metabolite auf die jeweiligen Enzyme einen gut untersuchten Mechanismus dar, welcher zu gravierenden DNA-Methylierungsveränderungen führen kann. Diese Art der Inhibition ist für verschiedene Metabolite in diversen Tumorentitäten beschrieben. Eine der am besten untersuchten Veränderungen ist hierbei die Transition von Cytosin zu Thymin an Position 677 des *MTHFR*-Gens (Clayton *et al.*, 2005). Diese Mutation senkt die Transkription homozygot um 70% und im heterozygoten Fall um 40%, mit einhergehender globaler DNA-Hypomethylierung. Allerdings handelt es sich bei den in der Literatur beschriebenen Veränderungen in der Regel um genetische

Aberrationen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges. Ob diese Gene durch Hypermethylierung affektiert sind und welche Auswirkungen diese Art der Veränderung hat, ist bisher für das Harnblasenkarzinom nicht beschrieben und wird in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Neben dem diagnostischen Nutzen, könnten die funktionellen Analysen auch für therapeutische Zwecke genutzt werden. Da sich durch die gezielte Zufuhr an Metaboliten die Auswirkungen der globalen DNA-Methylierungsveränderungen revertieren lassen, könnte die Tumorentstehung oder -progression verhindert werden. Bisher wurden mit Methotrexat und Fluorouracil zwei Medikamente eingeführt, die als sogenannte Antifolate den Methylgruppenmetabolismus direkt affektieren können (Newman & Maddocks, 2017).

2. Material und Methoden

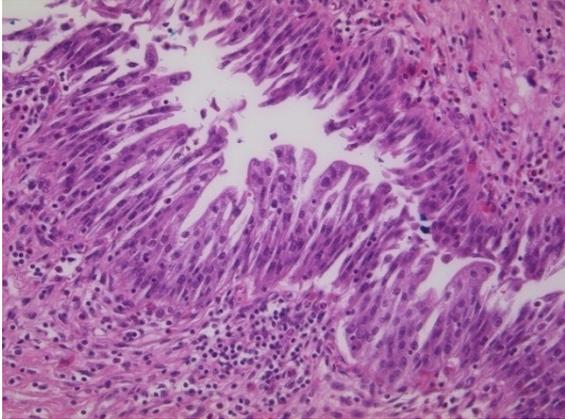
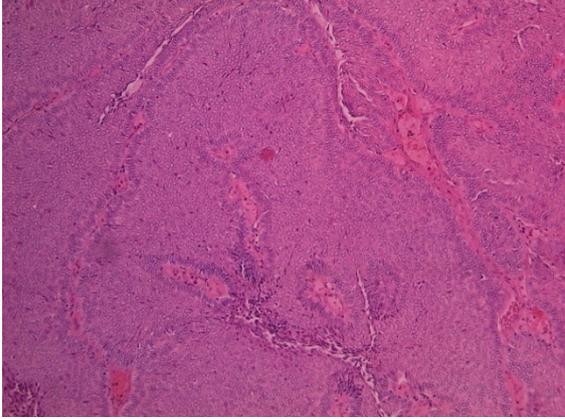
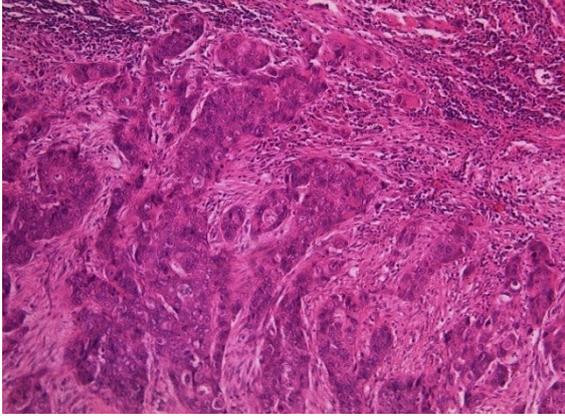
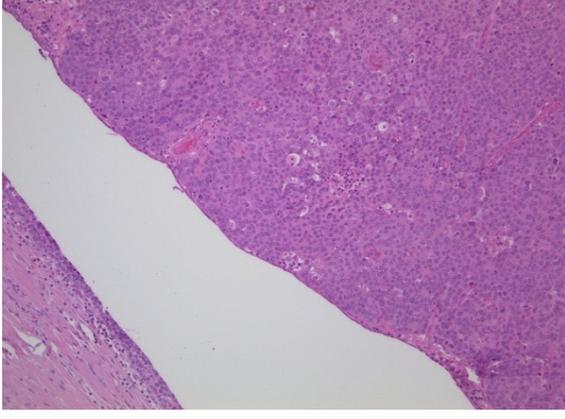
2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Für diese Studie wurden zum einen Hämatoxylin-Eosin gefärbte, Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Blasengewebeschnitte (FFPE) von den Pathologen Dr. Anlauf, Dr. Jankowiak und Dr. Braunstein (Uniklinikum Düsseldorf) begutachtet und zur Verfügung gestellt. Von diesen Geweben wurden jeweils 5µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt. Bei diesen Präparaten handelt es sich um jeweils sechs unifokale Tumorgewebe (UT), vier weitere pathologisch für gesund befundene Gewebe, die jedoch an eine unifokale Tumorregion angrenzten (ubG), und ein Präparat mit gesundem Harnblasengewebe. Von den sechs Tumorproben waren vier Patienten männlichen und zwei Patientinnen weiblichen Geschlechts, im Alter zwischen 51 und 86 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 71 Jahre. Von den insgesamt fünf Proben mit gesundem Gewebe waren vier Patienten männlichen und eine Patientin weiblichen Geschlechts, im Alter zwischen 39 und 82 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 68 Jahre.

Zum anderen wurden im Universitätsspital Zürich Stanzbiopsien mit einer Hohlnadel (Durchmesser 0,6mm und einer Länge von 2-3mm) aus FFPE Blasengewebe angefertigt. Diese Proben wurden durch den Pathologen Prof. Dr. Wild begutachtet und zur Verfügung gestellt. Bei diesen Präparaten handelt es sich um fünf multifokale (MT) und vier unifokale (UT) Tumoren, sowie jeweils fünf multifokal (mbG) und vier unifokal benachbarte (ubG) Gewebe, die pathologisch als gesund bewertet wurden, und drei gesunde Harnblasen Biopsien. Die Patienten der neun Tumorproben waren im Alter zwischen 62 und 81 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 74 Jahre. Die Patienten der insgesamt elf Proben mit gesundem Gewebe waren, im Alter zwischen 62 und 86 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 81 Jahre. In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Proben mit dem jeweiligen Befund aufgeführt. Zur besseren Übersicht sind die Tumorgewebe in weiß und die gesunden Gewebe in blau unterlegt.

Probennr.	TNM Befund	Lokalisation	Klinikum
ZH 51NT	bG pTa, low Grade	-	Zürich
ZH 108NT	bG pTa, low Grade	-	Zürich
ZH 148NT	bG, pTa, low Grade	-	Zürich
H30833-11	bG pTa, low Grade	-	Düsseldorf
ZH 84NT	bG pTa, high Grade	-	Zürich
ZH 105NT	bG pTa, high Grade	-	Zürich
ZH 111NT	bG pTa, high Grade	-	Zürich
ZH 63NT	bG pT1, high Grade	-	Zürich
ZH 103NT	bG pT1, high Grade	-	Zürich
ZH 151NT	bG pT1, high Grade	-	Zürich
H29799-10	bG, pT1, high Grade	-	Düsseldorf
H16840-10	bG pT1, low Grade	-	Düsseldorf
1229-4	NG	-	Düsseldorf
H35396	NG	-	Düsseldorf
Ac-1	NG	-	Zürich
Ac-2	NG	-	Zürich
Ac-3	NG	-	Zürich
H30833-11	pTa, low Grade	unifokal	Düsseldorf
H28923-12	pTa, low Grade	unifokal	Düsseldorf
ZH 108T	pTa, low Grade	unifokal	Zürich
ZH 105T	pTa, high Grade	unifokal	Zürich
ZH 111T	pTa, high Grade	unifokal	Zürich
H28643-12	pT1, low Grade	unifokal	Düsseldorf
ZH 151	pT1, high Grade	unifokal	Zürich
H29986-12	pT1, high Grade	unifokal	Düsseldorf
H00156-13	pT1, high Grade	unifokal	Düsseldorf
H27784-08	pT3, low Grade	unifokal	Düsseldorf
ZH 51T	pTa, low Grade	multifokal	Zürich
ZH 148T	pTa, low Grade	multifokal	Zürich
ZH 84T	pTa, high Grade	multifokal	Zürich
ZH 63T	pT1, high Grade	multifokal	Zürich
ZH 103T	pT1, high Grade	multifokal	Zürich

Harnblasensektionsmaterial	Probennummer / Befund
	35396 / gesundes Gewebe
	38033 / Tumorgewebe (pTa)
	29986 / Tumorgewebe (pT1)
	28774 / Tumorgewebe (pT3)

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
DNA Analyzer 3700	Applied Biosystems
Gene Amp PCR Systems 2700	Applied Biosystems
Step One Plus „Real Time“ PCR System	Applied Biosystems
Veriti 96 Well Thermal Cyclers	Applied Biosystems
Microarray High Speed Centrifuge	Array It
Power Pac 300	BioRad
CERTOMAT [®] H/MO Bakterienschüttler	B.Braun
Bioruptor plus	Diagenode
Centrifuge 5424	Eppendorf
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Concentrator Plus	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Wasserbad Typ 1003	GFL
Wasserbad Typ 1086	GFL
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Rotina 46R Zentrifuge	Hettich
Rotixa / P	Hettich
Universal 30RF Zentrifuge	Hettich
Thermoblock HBT 130	HLC
VF2 Vortexer	Janke + Kunkel
Präzisionswaage 440-47 und GS	KERN
Mikroskop DMIL Type 090-136.002	Leica
LI-COR C-Digit Scanner	LI-COR
Gelkammer 401515	Peqlab
Mini Rocker Shaker MR-1	Peqlab
Nanodrop [™] 2000 Spectrophotometer	Peqlab
NimbleGen [®] HS4	Roche
NimbleGen [®] MS 200	Roche
Precision Mixer Alignment Tool (PMAT)	Roche
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Mikrobiologische Sicherheitsbank KS18	Thermo Electron Corporation

Ultrasonic Processor	Vibra Cell
Brutschrank Binder	WTC

2.1.3 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
DC™ Protein Assay	BioRad
Experion 1K Reagent Kit	BioRad
WesternBright Quantum Kit	Biozym
MagMeDIP Kit™	Diagenode
MeDIP Kit™	Diagenode
SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen™
The Original TA Cloning Kit	Invitrogen™
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen
EpiTec® Bisulfite Kit (48)	Qiagen
MinElute® Gel Extraction Kit (50)	Qiagen
QiAamp® DNA Blood Mini Kit (250)	Qiagen
QiAquick® PCR Purification (250)	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
NimbleGen® Dual Color DNA Labeling Kit	Roche
NimbleGen® Hybridization Kit	Roche
NimbleGen® Wash Buffer Kit	Roche
GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit	Sigma - Aldrich®
SuperSignal™ West Femto Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Hersteller	
5x Blotting Puffer		28,4mM Tris; 192mM Glycin, pH 8.3
Blocking Puffer		5% Magermilchpulver; 0,1% Tween 20 in 1 x TBS
Laufpuffer		100mM Tris; 100mM Hepes; 3mM SDS, pH 8
Waschlösung		0,1% Tween 20 in 1 x TBS
5x siRNA Puffer	Dharmacon™	
TE Puffer	Diagenode	
5x T4 DNA Ligase Puffer	Invitrogen™	
5x SSIV Puffer	Invitrogen™	
PBS	Gibco	
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England BioLabs® Inc.	
Luciferase Assay Puffer II	Promega	
Passive Lysis Puffer	Promega	
Stop and Glo Puffer	Promega	
10x PCR Puffer	Qiagen	
ATL Puffer	Qiagen	
Gel Pilot® Loading Dye (5x)	Qiagen	
RTC Puffer Plus	Qiagen	
Nimble® Gen Array Reuse Solution	Roche	
Rotiphorese 10x TBE-Puffer	Roth	
TBST-Puffer	ThermoFisher Scientific	

2.1.5 DNA / Protein Standards, Enzyme und Substrate

DNA Standard / Enzym / Substrat	Hersteller
0,25% Trypsin – EDTA (1x)	Gibco
Heat Inactivated FBS	Gibco
StemPro Accutase	Gibco
100bp DNA Ladder	Invitrogen™
1kb DNA Ladder	Invitrogen™
Oligo (dT) Primer 500µg/ml	Invitrogen™
RNase H 2U/µl	Invitrogen™
RNase Inhibitor 40U/µl	Invitrogen™
SSIV Reverse Transcriptase 200U/µl	Invitrogen™
T4 DNA Ligase 4.0U	Invitrogen™
CpG Methyltransferase (M.SssI) 4000U/ml	New England BioLabs® Inc.
Alkaline Phosphatase Calf Intestinal 10.000U/ml	New England BioLabs® Inc.
Hind III 20.000U/ml	New England BioLabs® Inc.
Xho I 20.000U/ml	New England BioLabs® Inc.
dNTPs 10mM	Promega
Stop and Glo Substrat 50x	Promega
Carrier RNA 0,2µg/µl	Qiagen
DNaseI, RNase free 1500 units	Qiagen
Protease 7.5U	Qiagen
Proteinase K 7.5U	Qiagen
Taq Polymerase 5U/µl	Qiagen
Collagen IV 0,5mg/ml	Sigma - Aldrich®
Trypsininhibitor	Sigma - Aldrich®
Fermentas Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Precise™ Tris-HEPES Gels	Thermo Fisher Scientific
Thermo Scientific™ Oxoid™ Magermilchpulver	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Medien und Antibiotika

Medium / Antibiotika	Hersteller
CnT-Prime Epithelial Culture Medium	CELLnTEC
Ampicillin (10.000U/ml)	Gibco
DMEM (1x) + Glutamax	Gibco
KFSM Medium (EGF 5ng/ml + BPE 50µg/ml)	Gibco
Opti-MEM [®] 1x	Gibco
Penicillin-Streptomycin (10.000U/ml)	Gibco
S.O.C. Medium	Invitrogen [™]
LB Agar	Invitrogen [™]
LB Broth Base	Invitrogen [™]

Das LB-Medium wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen[™]) wie folgt hergestellt: In einem Liter H₂O wurden 20g LB Broth Base gelöst, anschließend autoklaviert und auf RT abgekühlt. Vom LB Agar wurden 32g in einem Liter H₂O gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50 - 60°C erfolgte die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100µg/ml). Bevor die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen auf die Platten ausplattiert werden konnten, wurden diese mit je 40µl x-Gal (20mg/ml, gelöst in DMF) bestrichen. Die Zellkulturmedien für die Kultivierung der Zelllinien wurden jeweils mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% FBS versetzt. Die Medien, in denen die Transfektion der Zellen stattfand, enthielten im Gegensatz dazu kein Antibiotikum und waren nur mit 10% FBS versetzt.

2.1.7 Bakterienstämme, Vektoren und Zelllinien

Es wurden chemisch kompetente TOP10 *E. coli* sowie der TA Cloning[®] Vektor pCR[®] 2.1 der Firma Invitrogen[™] benutzt. Als Vektoren für die Luciferase Experimente dienten der pTK-Green Renilla Luc Vektor der Firma Invitrogen und der pGL3-basic Vektor der Firma Promega. Die Zelllinien HBLAK, HEK 293T, HT 1376, SW 1710 und VMcub1 sowie das primäre Urothel wurden durch Prof. Dr. Schulz, Forschungslabor der Klinik für Urologie in Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien sind im Einzelnen wie folgt charakterisiert:

Zelllinie	Ursprung	Verdopplungszeit	Medium
HBLAK	Spontan immortalisierte primäre Urothelzellen	Ca. 30h	CnT-Prime Epithelial Culture Medium + Collagen IV beschichtete Kulturflaschen / -platten
HEK 293T	Humanes embryonales Nierenepithel immortalisiert durch Adenovirus Transfektion	24 - 30h	DMEM + Glutamax 10% FBS 1% Pen/Strep
HT 1376	Stufe 3 Übergangszellkarzinom der Harnblase	Ca. 60h	DMEM + Glutamax 10% FBS 1% Pen/Strep
Primäres Urothel	Harnleiter Epithelzellen erhalten durch eine Nierenresektion	Ca. 168h	KFSM (5ng/ml EGF + 50µg/ml BPE) + Collagen IV beschichtete Kulturflaschen / -platten
SW 1710	Übergangszellkarzinom der Harnblase	25 - 32h	DMEM + Glutamax 10% FBS 1% Pen/Strep
VMCub1	Übergangszellkarzinom der Harnblase	30 - 45h	DMEM + Glutamax 10% FBS 1% Pen/Strep

Für die Collagen IV Beschichtung wurde 0,1% Essigsäure hergestellt und steril filtriert. Das Collagen IV – Lyophilisat der Firma Sigma - Aldrich® – wurde in 10ml 4°C kalter Essigsäure gelöst und die Kulturflaschen/-platten wurden für 30min bei RT oder über Nacht bei 4°C in dieser inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

2.1.8 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Power Sybr Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Trypanblau (0,4%)	Gibco
Agarose Ultra Pure™	Invitrogen™
DTT 0,1M	Invitrogen™
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen™
2-Propanol	Merck
DFMO	Merck

Xylol	Merck
peq Gold universal Agarose	Peqlab
EDTA	Roth
Ethidiumbromidlösung (mg/ml)	Roth
Ethanol	Roth
Methanol	Roth
X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside)	Sigma-Aldrich®
HiPerSolv Wasser (HPLC)	VWR

2.1.9 Oligonukleotide und siRNA

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation synthetisiert. Sie wiesen jeweils in der Stocklösung eine Konzentration von 100pmol/μl auf und die jeweiligen Arbeitskonzentrationen wurden durch Verdünnung mit sterilem Aqua dest. hergestellt. Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma Dharmacon mit einer Konzentration der Stocklösung von 5nM synthetisiert. Diese wurde mit 5x siRNA Puffer auf eine Arbeitskonzentration von 20pM verdünnt. Alle Primer wurden so entworfen, dass Pseudogene und andere Sequenz ähnliche Bereiche, welche die Amplifikation beeinträchtigen könnten, durch die Analyse in der BLAT Sequenz Datenbank ausgeschlossen wurden.

	Gen	Primer-Bezeichnung	Primer Sequenz	Größe (Bp)	TM (°C)
LINE-1Methylierungsprimer	Methyliertes LINE	sL1met	5'-GCG CGA GTC GAA GTA GGG C-3'	193	58
		asL1met	5'-CTC CGA ACC AAA TAT AAA ATA TAA TCT CG-3'		
	Unmethylier-tes LINE	sCpGlos	5'-AGG TTT TAT TTT TGG GGG TAG GGT ATA-3'	214	60
		asCpGlos	5'-CCC CTA CTA AAA AAT ACC TCC CAA TTA AAC-3'		

Klonierungsprimer für den Luciferase Assay	AHCY	s1AHCYRS	5'-CCG CTC GAG CGG AGT TCC GCT GGG TTT TGA C- 3'	503	60
		as1AHCYRS	5'-CCC AAG CTT GGG ATT CCA GGG GGT CCA GAG A-3'		
	ODC1	s1ODC1RS	5'-CCG CTC GAG CGG ATA AGT AGG GAG CGG CGT G-3'	298	58
		as1ODC1RS	5'-CCC AAG CTT GGG CTC CCT CCC TTC CTC CG-3'		
Klonierungsprimer für die Bisulfit-Sequenzierung	AHCY	s1AHCYkonv	5'-ATT TTG AGG TTT TTT TTT AGG GA-3'	348	56
		as1AHCYkonv	5'-TTC CAA AAA ATC CAA AAA ACC-3'		
		as2AHCYkonv	5'-CAA AAA ATC CAA AAA ACC CCC-3'		
	ODC1	s1ODC1konv	5'-GGT TTT GTT AGT TTT TTT TGT A-3'	224	52
		s2ODC1konv	5'-TTT TGT TAG TTT TTT TTG TA-3'		
		as1ODC1konv	5'-AAA AAT CCC TCA CCT CAA-3'		
		as2ODC1konv	5'-AAA TGC CTC ACC TCA AAA-3'		

„Real Time“ PCR Primer für siRNA Experimente	GAPDH	s1GAPDHmrna	5'-CAT GAC AAC TTT GGT ATC GTG GA-3'	381	62
		as1GAPDHmrna	5'-GTG GGT GTC GCT GTT GAA GTC-3'		
	LINE	s1LINEmrna	5'-TGG AAT AGG TGT GGT GTG GTG CT-3'	246	61
		as1LINEmrna	5'-TCA CTC AGG ACA GCC CAG ACG-3'		
	ODC1	s1ODC1mrna	5'-CCG CTC GAG CGG ATA AGT AGG GAG CGG CGT G-3'	276	54
		as1ODC1mrna	5'-ATC ATG GCG ACC CTA CTC TTA C-3'		
	p21	sp21mrna	5'-GGA AGA CCA TGT GGA CCT GT-3'	146	55
asp21mrna		5'-GGC GTT TGG AGT GGT AGA AA-3'			
	Gen	siRNA	Zielsequenz		
Zellkultur siRNA Experimente	“non targeting” siRNA	siGENOME “non targeting” siRNA Pool #2	5'-UAA GGC UAU GAA GAG AUA C-3'		
			5'-AUG UAU UGG CCU GUA UUA G-3'		
			5'-AUG AAC GUG AAU UGC UCA A-3'		
			5'-UGG UUU ACA UGU CGA CUA A-3'		
	ODC1	siGENOME SMART pool siRNA, ODC1	5'-GAG CAG ACC UUU AUG UAU U-3'		
			5'-CGA AAG AGC UAA AUA UCG A-3'		
			5'-GAA GUU GAG UUG AUG AAA G-3'		
			5'-GAA GAG AUC ACC GGC GUA A-3'		

2.1.10 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Rabbit-anti- α -Tubulin Antibody	Abcam	1:25.000
Anti-5meC Antibody	Diagenode	1:10
Goat-anti-mouse-IgG-HRP Conjugate	Merck Millipore	1:5.000
Mouse-anti-LINE-1-Orf1 Antibody	Merck Millipore	1:1.000
Mouse-anti-rabbit-IgG-HRP Secondary Antibody	Santa Cruz	1:10.000

Die Verdünnungen der Antikörper für den Western Blot erfolgten jeweils in 1% Milchpulver/TBST-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Verdünnung des Antikörpers für die methylierungsspezifische Immunopräzipitation erfolgte in Aqua dest. und Puffer A der Firma Diagenode.

2.1.11 Sonstige Materialien

Artikel	Hersteller
MicroAmp Fast optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp Fast optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Experion DNA Chip	BioRad
Zählkammer Neubauer	Bürker
5ml, 10ml und 25ml Stripette [®]	Costar
Safe Lock Tubes (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Sarstedt
Petrischalen	Greiner
RNase Free 8-Strip 0,2ml PCR Tubes	Invitrogen [™]
Human DNA Methylation 2.1M Deluxe	Roche
Human DNA Methylation 385k Array	Roche
HX1 Mixer	Roche
Nylon-Membranen	Roche
X1 Mixer	Roche
Objektträger	Roth
5ml Röhren	Sarstedt

TC Flasche T25/75	Sarstedt
TC Platte 6/48 Well	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen Falcon® 15ml / 50ml	VWR
Chromatographie-Papier (35x45cm)	Whatman®

2.1.12 Computerprogramme und -Software

Software	Hersteller
PROMO	http://algggen.lsi.upc.es
StepOne Software 2.2	Applied Biosystems
Sequence Alignment Editor	BioEdit
Reverse Complement	Bioinformatics.org
TCGA Datenbank	https://cancergenome.nih.gov/
ClustalW2	Ebi.ac.uk
MUSCLE	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
Firebrowse	http://firebrowse.org/
GenCards	http://www.genecards.org/
BLAT	https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Oligo	http://www.oligo.net/
NimbleGen DEVA Software Version 1.0	Roche
NimbleScan (Version 2.5)	Roche
SignalMap™ (Version 1.9)	Roche
DNA Duster	https://users.soe.ucsc.edu/~kent/dnaDust/dnadust.html

2.2 Methoden

2.2.1 Entparaffinierung der Gewebeproben

Die FFPE-Gewebeproben aus dem Universitätsspital Zürich wurden durch den Pathologen Prof. Dr. Wild ausgewählt und begutachtet. Von den definierten Arealen wurden dann mittels Hohlneedle (Durchmesser 0,6mm und 2-3mm Länge) jeweils drei Stanzbiopsien angefertigt, in 1,5ml Eppendorf Gefäße überführt und zur Verfügung gestellt. Die FFPE-Gewebeproben aus der Pathologie Düsseldorf wurden von den Pathologen Dr. Anlauf, Dr. Braunstein und Dr. Jankowiak ausgewählt, begutachtet und die gesunden wie auch die entarteten Areale des Gewebes auf einem Objektträger markiert. Von jedem ausgewähltem Gewebe wurden dann jeweils acht Schnitte mit einer Dicke von 5µm am Mikrotom der Pathologie Uniklinikum Düsseldorf angefertigt, welche auf Objektträger überführt wurden. Alle Gewebeproben wurden mittels einer aufeinander folgenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte zunächst auf den Objektträgern an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und die vom Pathologen definierten Bereiche unterhalb des Objektträgers markiert. Anschließend wurden die so markierten Areale mit einer mit Lysepuffer ATL benetzten Pipettenspitze abgekratzt und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Es wurde dann jeweils 1ml Xylol zu den Proben gegeben, 15sec gevortext und 10min bei 37°C sowie 1.000rpm im Thermomixer inkubiert. Hiernach wurde für 5min bei 12.000 x g und RT zentrifugiert und der Überstand konnte abgenommen und verworfen werden. Nach erneuter Zugabe von 1ml Xylol wurden die Proben wieder 15sec gevortext, 10min bei 37°C und 1000rpm im Thermomixer inkubiert und bei 12.000 x g und RT für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und verworfen. Hiernach folgten jeweils fünf minütige Inkubationsschritte mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen (2 x 100%, 95%, 90%, 80%, 70% und 60%), nach denen die Proben jeweils für 5min bei RT auf 12.000 x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und verworfen. Die so entparaffinierten Gewebe wurden dann für ca. 30min bei RT getrocknet. Für die anschließende Lyse wurden die getrockneten Gewebeschnitte / -stanzen dann in 200µl ATL Puffer und 20µl Proteinase K, beides von der Firma Qiagen, resuspendiert und ÜN bei 70°C inkubiert.

2.2.2 Nukleinsäuren

2.2.2.1 DNA Isolation aus FFPE Geweben

Für die DNA Extraktion wurden je Probe drei FFPE Gewebestanden (Zürich) mit einem Durchmesser von 0,6mm und einer Länge von 2-3mm in einem 1,5ml Eppendorfgefäß und acht 5µm dicke, auf Objektträger fixierte Gewebeschnitte (Düsseldorf) verwendet. Diese wurden jeweils nach Entparaffinierung mit 200µl ATL Puffer der Firma Qiagen versetzt und die DNA mit dem QiAamp DNA Mini and Blood Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.2.2 DNA Isolation aus den Zelllinien

Für die DNA Extraktion aus den verschiedenen Zelllinien wurden die Zelllinien in einer TC 6-Well Platte der Firma Sarstedt ausgesät. Durch Zugabe von Trypsin (HEK 293T, HT1376, primäres Urothel und SW1710) oder Accutase (HBLAK), beide Enzyme von der Firma Gibco, wurden die Zelllinien geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer der Firma Bürker wurde dann die DNA mit dem QiAamp DNA Mini and Blood Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.2.3 DNA Isolation aus Vollblut

Die DNA Extraktion aus Vollblut erfolgte aus je 200µl der Blutproben mit dem QiAamp DNA Mini and Blood Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Abweichend zum Protokoll des Herstellers wurde bei der Isolation der DNA, im Fall von Vollblut und den Zelllinien, die Inkubationszeit für die Lyse der Proben von 10min auf 30min erhöht. Im Fall der FFPE-Gewebe wurde die Inkubation mit der Proteinase über Nacht durchgeführt. Darüber hinaus wurde die DNA nicht wie angegeben in 200µl, sondern in nur 35µl AE Puffer der Firma Qiagen, eluiert. Zusätzlich wurden sie nach der Elution nochmals bei 20.000 x g für 1min reeluiert.

2.2.2.4 RNA Isolation

Für die RNA Isolation wurden die Zelllinien, analog zu der DNA Isolation, in einer TC 6-Well Platte der Firma Sarstedt ausgesät. Durch Zugabe von Trypsin (HEK 293T, HT1376, primäres Urothel und SW1710) oder Accutase (HBLAK), beide Enzyme von der Firma Gibco, wurden die Zelllinien geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer der Firma Bürker, wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 350µl RTL Puffer lysiert und das Lysat wurde mittels „QIAshredder

spin column“ homogenisiert. Die Inkubationszeit mit DNase wurde von 15min auf 30 min abgeändert und wie bei der DNA Extraktion wurde nach dem ersten Elutionsschritt ein weiterer bei 20.000 x g für 1min hinzugefügt.

2.2.2.5 DNA- und RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der DNA sowie der RNA erfolgte mit dem Spektrophotometer NANODROP 2000 der Firma Thermo SCIENTIFIC. Bei dieser Messung wird das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260nm und das Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bei 280nm bestimmt. Durch die Bildung des Quotienten aus 260/280 kann der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren bestimmt werden. Das Verhältnis reiner DNA und RNA liegt zwischen 1,8 und 2. Ein Quotient von unter 1,8 deutet auf eine Kontamination in der Probe hin (Keer & Birch, 2008). Die Konzentration der jeweiligen Probe wird nach dem Absorptionswert λ berechnet. Für DNA entspricht 1 OD = 50 μ g/ml DNA und für RNA entspricht 1 OD = 40 μ g/ml RNA.

2.2.2.6 Bisulfit-Konvertierung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine epigenetische Veränderung, die keine Änderung der DNA-Sequenz zur Folge hat. Aus diesem Grund muss zum Nachweis einer Veränderung des Methyloms die DNA chemisch modifiziert werden, so dass der Unterschied zwischen dem Cytosin und dem 5-Methylcytosin bestimmt werden kann. Dies erfolgt durch die Methode der Bisulfit-Konvertierung. Durch die Zugabe von Bisulfit zur DNA werden nicht methylierte Cytosine durch nukleophile Addition zu Uracil desaminiert (vgl. Abbildung 14). Allerdings sind methylierte Cytosine durch die Methylgruppe am 5'-Kohlenstoffatom vor dieser Reaktion geschützt und bleiben als Cytosine erhalten (Zimmermann & Henikoff, 2007). Hierbei liegt die Rate der C zu U Konvertierung bei >99% (Seth *et al.*, o.J.). Die Konvertierung der isolierten DNA aus Vollblut, Zelllinien und FFPE-Gewebe wurde mit dem EpiTect Bisulfit Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die einzige Änderung zum Protokoll des Herstellers war, dass die Proben in 30 μ l statt in 20 μ l EB-Puffer aufgenommen wurden. Für die Bisulfit-Konvertierung wurden von jeder Probe 500ng DNA eingesetzt.

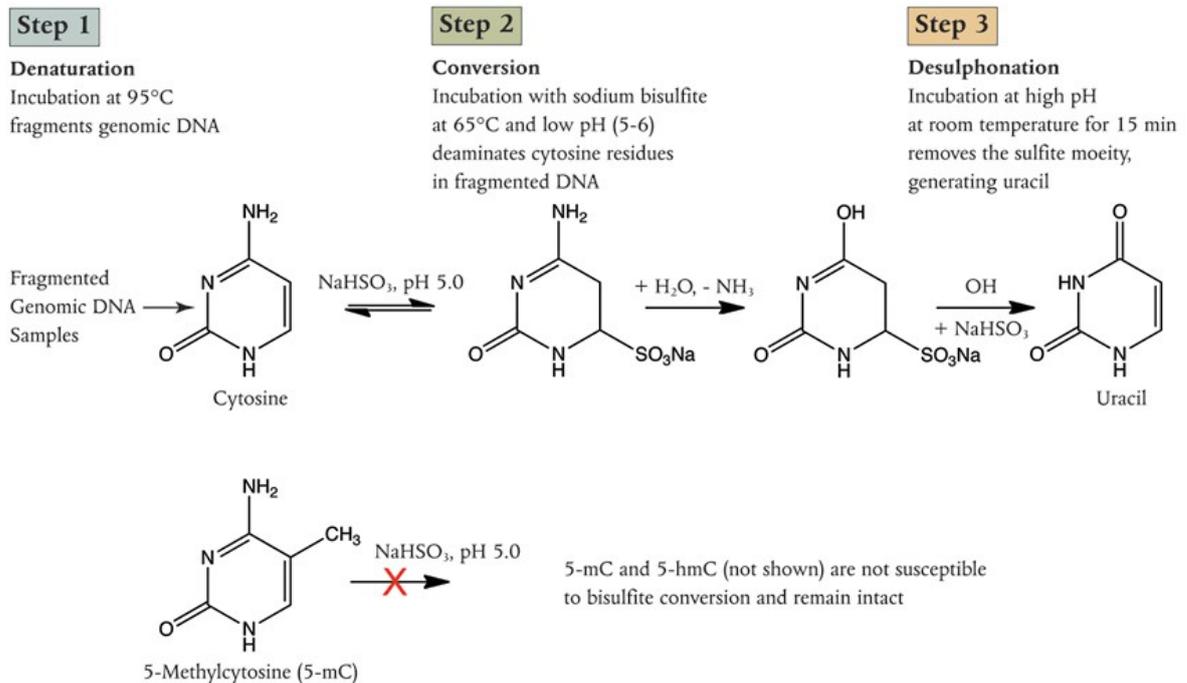


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Bisulfit Konvertierung (New England Biolabs, 2018).

Schritt 1 zeigt die reversible Sulfonierung zu Cytosin-6-Sulfonat. Schritt 2 zeigt die hydrolytische Desaminierung von Cytosin-6-Sulfonat zu Uracil-6-Sulfonat. Dieser Schritt ist irreversibel. Schritt 3 zeigt die unter alkalischen Bedingungen stattfindende Desulfonierung.

2.2.2.7 Konventionelle PCR

Die Methode der Polymerasenkettenreaktion (PCR) ermöglicht *in vitro* die enzymatische Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch die gezielte Auswahl an synthetischen Oligonukleotiden (Primer). In der ersten Phase der PCR, der sogenannten Denaturierungsphase, wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt. Durch diesen Vorgang werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basen des Doppelstranges aufgebrochen. Die Primer können sich dann in der zweiten Phase der PCR, der sogenannten Annealing-Phase, spezifisch an die einzelsträngige DNA Sequenz anlagern, da sie so entworfen wurden, dass ihre Sequenzen komplementär zu dem zu untersuchenden DNA Abschnitt sind. Die optimale Annealing-Temperatur ist für jedes Primerpaar individuell und wird sowohl über die Primerlänge als auch über den GC-Gehalt bestimmt. Sie ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) des jeweiligen Primers. In der Regel liegt die Annealing-Temperatur zwischen 45 - 65°C. Es gilt die folgende Formel:

$$T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$$

In der dritten und letzten Phase der PCR, der sogenannten Elongationsphase, verlängert die für den Versuch ausgewählte Polymerase die jeweiligen Primer an ihren 3' Enden durch Polymerisierung der dNTPs. Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit der *HotStarTaq*-Polymerase der Firma Qiagen durchgeführt, deren Aktivitätsmaximum bei 74°C und einem pH-Wert von über 8 liegt. Diese Polymerase wurde aus dem hitzebeständigen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert und besitzt neben der 5'-3' DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3' Exonukleaseaktivität. Durch den Ablauf dieser drei Phasen hat sich die Anzahl der DNA Stücke verdoppelt. Durch das Wiederholen dieser Schritte, wird die exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA Abschnittes erreicht. Es wurde folgender PCR Ansatz für die nicht konvertierte DNA aus Vollblut, für die Klonierung und anschließendem Luciferase Assay verwendet:

Master Mix (1X):	Puffer (10x)	2,5 µl
	dNTPs (10mM)	1 µl
	Primer sense (10pmol/ µl)	1 µl
	Primer antisense (10pmol/ µl)	1 µl
	Taq Polymerase (5U)	0,5 µl
	H ₂ O	17 µl
	<u>DNA Template</u>	<u>2 µl</u>
	Σ	25 µl

PCR Bedingungen:	<u>Initiale Denaturierung</u>	95°C - 13'	} 36 Zyklen
	Denaturierung	95°C - 30"	
	Annealing	60°C - 40" (<i>AHCYRS</i>)	
		58°C - 40" (<i>ODC1RS</i>)	
	<u>Elongation</u>	<u>72°C - 25"</u>	
	Finale Elongation	72°C - 3'	
	Hold	4°C - ∞	

2.2.2.8 Nested PCR

Der Ablauf einer Nested, auch geschachtelte PCR genannt, ist analog zu dem der konventionellen PCR (vgl. unter 2.2.2.7) und in die drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation eingeteilt. Allerdings sind bei dieser Methode zwei PCR Reaktionen nacheinander geschaltet. Dadurch ist es bei dieser Methode notwendig, zwei unterschiedliche Primerpaare, ein äußeres und ein nested Primerpaar, zu verwenden. Das äußere Primerpaar kommt in der ersten Runde der PCR zum Einsatz und amplifiziert die Zielsequenz. Dieses in der ersten PCR generierte Produkt dient als Matrize für die zweite PCR, da es die Bindestellen des nested Primerpaares beinhaltet (vgl. Abbildung 15). Der Vorteil der Nested-PCR gegenüber der konventionellen PCR liegt in der gesteigerten Sensitivität und Spezifität.

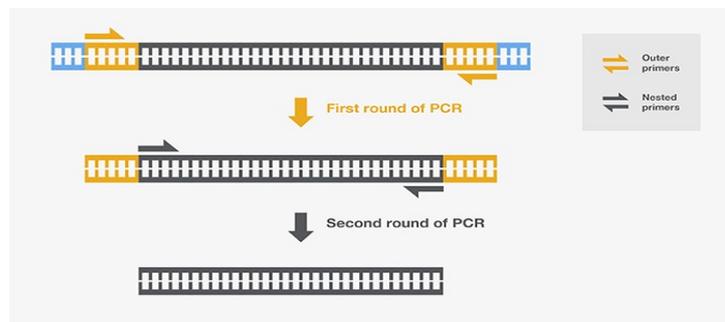


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Nested PCR (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Für die Klonierungsversuche nach Bisulfit-Konvertierung wurden die folgenden PCR Bedingungen gewählt, wobei das PCR Produkt nach der ersten PCR 1:10 verdünnt wurde:

Master Mix (1X):	Puffer (10x)	2,5 μ l
	dNTPs (10mM)	1 μ l
	Primer sense (10pmol/ μ l)	1 μ l
	Primer antisense (10pmol/ μ l)	1 μ l
	Taq Polymerase (5U)	0,5 μ l
	H ₂ O	17 μ l
	<u>DNA Template</u>	<u>2 μl</u>
	Σ	25 μ l

PCR Bedingungen: <u>Initiale Denaturierung</u>	95°C - 10'	} 20 + 36 Zyklen
Denaturierung	95°C - 30"	
Annealing	56°C - 40" (AHCYkonv)	
	52°C - 40" (ODC1konv)	
<u>Elongation</u>	72°C - 25"	
Finale Elongation	72°C - 3'	
Hold	4°C - ∞	

2.2.2.9 Quantitative „Real Time“ PCR

Der Ablauf der quantitativen „Real Time“ PCR ist analog zu dem der konventionellen PCR (vgl. unter 2.2.2.7) und ist in die drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation eingeteilt. Die Messungen der quantitativen „Real Time“ PCR erfolgte mit dem StepOnePlus Gerät und dem SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist in der Lage doppelsträngige DNA zu binden und bildet mit ihr sofort einen Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Komplex. Dieser Komplex lässt sich durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge detektieren. Da SYBR Green ausschließlich doppelsträngige DNA bindet, kommt es während der Denaturierungsphasen der PCR zu einer Freisetzung des Farbstoffes und folglich einer Reduktion des Fluoreszenzsignals. In der folgenden Annealing- und Elongations-Phase wird das zu untersuchende Ziel-Gen durch die Bindung der Primer und die DNA Polymerase amplifiziert. Durch diesen Anstieg an doppelsträngiger DNA kann nun auch mehr Fluoreszenzfarbstoff an die DNA binden, wodurch ein stärkeres Signal detektiert werden kann. Dieses verhält sich proportional zu den entstanden PCR Produkten. Hierdurch spiegelt das Fluoreszenzsignal, welches nach jedem durchlaufenen Zyklus gemessen wird, die Menge an gebildeter DNA in Echtzeit wider. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung auf „Fast optical 96 well“ Platten der Firma Applied Biosystems gemessen. Es wurden im Einzelnen folgende PCR Bedingungen genutzt:

Master Mix (1X):	Power SYBR Green	10	μl
	Primer sense (1,25-10pmol/ μl)	1	μl
	Primer antisense (1,25-10pmol/ μl)	1	μl
	H ₂ O	6	μl
	<u>DNA Template</u>	<u>2</u>	<u>μl</u>
	Σ	25	μl

PCR Bedingungen:	<u>Initiale Denaturierung</u>	95°C - 13'	
	Denaturierung	95°C - 30"	} 40 Zyklen
	Annealing	60°C - 40" (CpGlos)	
		62°C - 40" (GAPDHmrna)	
		58°C - 40" (L1)	
		61°C - 40" (LINEmrna)	
		54°C - 40" (ODC1mrna)	
		55°C - 40" (p21mrna)	
	<u>Elongation</u>	<u>72°C - 25"</u>	
	Finale Elongation	72°C - 3'	
	Hold	4°C - ∞	

Die Analyse der „*Real Time*“ PCR Messungen erfolgte über die relative Quantifizierung. Um die sogenannten C_T-Werte (*cycle threshold*) zu ermitteln, wurde die StepOne Software 2.2 der Firma Applied Biosystems verwendet. Die C_T-Werte werden wie folgt definiert: Der Threshold Cycle ist die Zyklenzahl, an der das Fluoreszenzsignal einer Probe den Threshold schneidet. Um die einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können, wurde der Grenzwert der Fluoreszenz so festgelegt, dass der C_T-Wert abgelesen wurde, sobald die Amplifikationskurven in die exponentielle Phase übergegangen sind. Dieser Wert wurde für jedes Primerpaar individuell bestimmt. Durch die Dreifachbestimmung jeder Probe, konnten die gemessenen C_T-Werte gemittelt und Ausreißer verworfen werden. Im nächsten Schritt der relativen Quantifizierung wurde der C_T-Wert der Normierungsamplifikation

(CpGlos, *GAPDH*mrna) von dem C_T -Wert der zu untersuchenden Amplifikation (*L1*, *LINE*mrna, *ODC1*mrna und *p21*mrna) abgezogen, wodurch der ΔC_T -Wert ermittelt wurde. Der ΔC_T -Wert wurde hiernach von jeder gemessenen Probe um den ΔC_T -Wert einer ausgewählten Bezugsprobe (gesundes Gewebe / nicht transfizierte Kontrolle) vermindert. Hierdurch wird der $\Delta\Delta C_T$ -Wert errechnet. Im finalen Berechnungsschritt wurde über die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ der relative Transkriptions- bzw. Methylierungsgrad ermittelt.

2.2.2.10 Reverse Transkription

Zur Ermittlung des Transkriptionsgrades der Gene *GAPDH*, *ODC1* und der *LINE1* Elemente wurde die aus den Zelllinien isolierte RNA, mit Hilfe des SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit der Firma Invitrogen, in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Es wurde der folgende Mastermix (1x) verwendet:

5x SSIV Puffer	4	μ l
dNTPs (10mM)	1	μ l
DTT (100mM)	1	μ l
Ribonukleaseinhibitor	1	μ l
Oligo dT Primer	1	μ l
RNA Template	1,5	μ g
H ₂ O	ad. 20	μ l

2.2.2.11 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Da die DNA aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung negativ geladen vorliegt, ist es möglich Nukleinsäuren, mittels elektrischen Feldes und einer Matrix, ihrer Größe nach zu trennen. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Laufweite im Gel und dem Molekulargewicht der einzelnen Fragmente (Southern, 1979). Das Gel, welches für diese Form der Auftrennung benutzt wird, besteht aus Agarose und ermöglicht eine Trennung von ca. 0,1-10kb. Die Agarose wird aus den Rotalgen „*Gelidium*“ und „*Gracillaria*“ gewonnen und besteht aus einem Heteroglucan aus β -D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose (Ausubel *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten Gele waren 1%ig, das bedeutet, dass jeweils 1g Agarose in 100ml 1x TBE Puffer der Firma Roth in einer Mikrowelle aufgekocht wurde. Nachdem sich die gesamte Agarose im Puffer gelöst

hatte, wurden 5µl EtBR / 100ml Agarosegel hinzugegeben und das so vorbereitete Gel in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TBE Puffer. Die DNA Proben wurden jeweils 1/5 mit dem Gel Pilot Loading Dye der Firma Qiagen bzw. 1/6 mit dem Gel Loading Dye Purple der Firma NewEngland BioLabs versetzt und in die Gelkammern pipettiert. Von den PCR Produkten wurde immer das gesamte Volumen (20-25µL) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 10 - 15min bei 60V und wurde anschließend auf 130V für ca. 1h erhöht. Die Auswertung der Gele erfolgte durch UV Licht an einer Geldokumentationsanlage.

2.2.2.12 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die PCR-Amplifikate, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt, nachgewiesen und anhand eines Größenstandards bestimmt werden konnten, wurden unter UV Licht aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QiAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.13 In vitro Methylierung

Um den Einfluss der DNA-Methylierung im Promotorbereich der Gene *ODC1* und *AHCY* auf ihre funktionelle Relevanz zu überprüfen, wurden diese nach Klonierung in den pGL3-basic Vektor der Firma Promega mittels CpG Methyltransferase (M. SssI) vollständig methyliert. Diese Methyltransferase ist die einzige bekannte DNA-5'-Cytosin-Methyltransferase, die innerhalb der 5'-CG-3' Erkennungssequenz methylieren kann, und stammt aus dem Bakterium *Spiroplasma spec.* Stamm MQ (Nur *et al.*, 1985). Als Substrat dient S-Adenosylmethionin (SAM), dessen Methylgruppe (CH₃) auf die unmethylierten Bereiche der DNA übertragen wird. Durch diese Reaktion entsteht aus dem SAM das S-Adenosyl-Homocystein (vgl. Abbildung 16). Für die in vitro Methylierung wurden jeweils 1µg des pGL 3 *basic* Vektors eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für jeweils 1h bei 37°C inkubiert und im Anschluss daran wurden nochmals 1µl SAM sowie 0,5µl *M.SssI* hinzugegeben. Anschließend wurde die so methylierte DNA mit dem QiAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die Vektoren wurden in die jeweiligen Zellen transfiziert. Für die in vitro Methylierung wurde das folgende Protokoll verwendet (1x):

10x NEPuffer 2	2 μ l
M. Sssl (12U)	3 μ l
SAM (160 μ M)	1 μ l
DNA	1 μ g
H ₂ O	ad 30 μ l

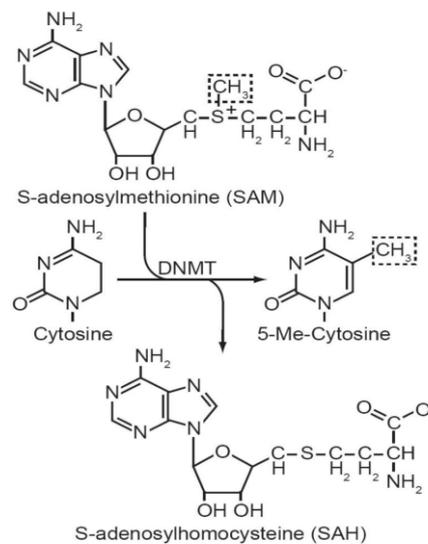


Abbildung 16: Darstellung der Methylierungsreaktion durch die DNA Methyltransferasen (Hitchler & Domann, 2007).

DNA Methyltransferasen (DNMT) katalysieren den Methylgruppen Transfer von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf das 5'- Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings des Cytosin. Dies ist in genomischer DNA nur möglich, wenn auf das Cytosin ein Guanin folgt. Bei dieser Reaktion entsteht aus dem SAM das S-Adenosyl-Homocystein (SAH).

2.2.3 Proteine

2.2.3.1 Proteinisolation aus den Zelllinien

Für die Proteinextraktion aus der Zelllinie HT 1376 und dem primären Urothel wurden diese jeweils in einer TC 6-Well Platte der Firma Sarstedt ausgesät. Durch Zugabe von Trypsin der Firma Gibco wurden die Zellen geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer der Firma Bürker, konnten die Proteine mit dem AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert werden.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das DC Protein Assay Kit der Firma BioRad verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Proteinnachweis nach Lowry und wird spektrometrisch durchgeführt. Hierbei wird ein alkalisches Kupferreagenz eingesetzt, welches durch die Bindung an die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin eine Farbreaktion hervorruft (Lowry *et al.*, 1951). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte im Bezug auf eine Standardkurve mit bekannten Protein-Konzentrationen von 0,125 bis 2mg/ml. Die Inkubation der Proteine mit den einzelnen Puffern erfolgte bei RT für 15min. Im Anschluss daran konnte die Proteinkonzentration durch die Messung der Absorption bei 750nm im Photometer bestimmt werden. Aqua dest. diente hierbei als Referenz.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Hierzu wurden die Proteinlysate mit einem SDS und DTT enthaltenen Laufpuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Die stark negative Ladung von SDS gleicht hierbei die Ladungen der Proteine aus, so dass i.d.R. alle Proteine negativ geladen sind und sich durch die Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht auftrennen lassen. Die Auftrennung erfolgt in einem 12% Polyacrylamidgel der Firma Thermo Fisher Scientific für 45min bei 150V. Von jedem Proteinlysate wurden jeweils 15-20µg verwendet. Polyacrylamidgele bestehen aus zwei Schichten, zum einen das Sammel- und zum anderen das Trenngel. Die beiden Schichten unterscheiden sich sowohl durch den vorliegenden pH-Wert als auch durch die Porengröße. Zur Detektion der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, mussten diese auf eine PVDF-Membran transferiert werden (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde zunächst ein Stück einer PVDF-Membran in der Größe des Gels zurechtgeschnitten, für 15min in Methanol geschwenkt, für 5min in Wasser gelegt und danach in 1x Blotting-Puffer gelagert. Nach dem Zusammenbauen der Blot-Kammer erfolgte der Proteintransfer für 1h bei 180mA (330V). Im Anschluss daran wurde die Membran in TBST mit 5% Magermilchpulver für 1h bei RT blockiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die ÜN Inkubation der Membran mit dem gelösten Primärantikörper bei 4°C unter ständigem Schütteln. Nach viermaligem Waschen für 10min mit TBST-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific erfolgte die Inkubation der Membran mit der sekundären Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Antikörperlösung für 1h bei

RT. Die Meerrettichperoxidase ist eines der am häufigsten verwendeten Reporterenzyme. Es katalysiert die Reduktion verschiedener Peroxide wie z.B. Wasserstoffperoxid. Durch die Spaltung des Peroxids, wird das vorher fast farblose Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt oxidiert (Ryan *et al.*, 1994). Nach viermaligem Waschen für 10min mit TBST-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific erfolgte die Immundetektion mittels Super Signal West Femto Kit der Firma Thermo Fisher Scientific oder dem WesternBright Quantum Kit der Firma Biozym nach Angaben der Hersteller. Die Signalintensitäten wurden mit dem LI-COR C-Digit Scanner der Firma LI-COR gemessen.

2.2.4 Methylierungsspezifische Mikroarrays

Die Methode der methylierungsspezifischen Mikroarraytechnologie ermöglicht die Analyse des gesamten Methyloms einer bestimmten Zellidentität. Für diese Arbeit kamen sowohl „*Human DNA Methylation 2.1M Deluxe*“ als auch „*Human DNA Methylation 385k*“ Arrays der Firma Roche zum Einsatz. Die Promotorbereiche von allen bekannten RefSeq. Genen sind durch ca. 100bp lange Oligonukleotid-Sonden („*probes*“) auf den Arrays lokalisiert und werden von 50-75mer großen, sogenannten „*Tiled regions*“, abgedeckt. Die *Tiled regions* der 385k Arrays bilden in etwa einen Bereich von 2.200bp stromabwärts und 500bp stromaufwärts eines jeden Promotorbereiches ab. Die *Tiled regions* der 2.1M Arrays bilden in etwa einen Bereich von 7.250bp stromabwärts und 3.250bp stromaufwärts eines jeden Promotorbereiches ab. Auf diese Weise decken die 385k Arrays 17.345- und die 2.1M Arrays 28.000 humane Promotorregionen ab. Die Analyse der methylierten DNA mittels dieser Methode erfolgt in fünf aufeinander folgenden Schritten. Diese sind in Abbildung 17 illustriert:

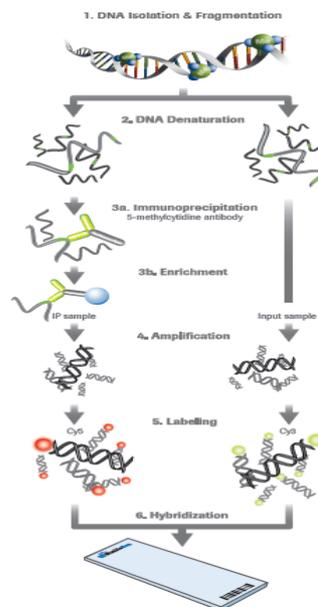


Abbildung 17: Verfahren der Mikroarray-Analyse (Roche Diagnostics GmbH, 2011).

Dargestellt sind die einzelnen Schritte, die für die Methylom-Analyse mittels methylierungsspezifischer Mikroarrays benötigt werden. Dies sind im Einzelnen: 1. DNA Isolation, 2. Fragmentation, 3. DNA Immunopräzipitation (MeDIP), 4. Amplifikation des gesamten Genoms (WGA), 5. Labeling und 6. Hybridisierung und Scannen.

- DNA Isolation und Fragmentation
- Immunopräzipitation der methylierten DNA (MeDIP)
- Amplifikation des gesamten Genoms (WGA)
- Färben der amplifizierten DNA (Labeling)
- DNA Hybridisierung und Scannen der Arrays

2.2.4.1 Fragmentierung der DNA

Für die Analyse des Methyloms mit Hilfe der NimbleGen Plattform musste die zu untersuchende DNA zunächst fragmentiert werden. Hierfür wurden von jeder Probe 1,2µg der isolierten DNA aus den Geweben/Zelllinien in 100µl TE-Puffer der Firma Diagenode aufgenommen und mittels Ultraschall in 300 bis 1000bp Lange DNA-Stücke fragmentiert (sonifiziert). Dies geschah mit dem Bioruptor plus der Firma Diagenode unter den folgenden Einstellungen: *Power Low*, 15sec on/15sec off, 20 Zyklen. Die Bestimmung der DNA Fragmentgröße erfolgte mit dem Experion System sowie den dazugehörigen Experion DNA Chips und dem Experion 1K Reagent Kit der Firma BioRad nach Angaben des Herstellers.

2.2.4.2 DNA Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation der zuvor fragmentierten DNA erfolgte mit dem MeDIP Kit der Firma Diagenode nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde die sonifizierte DNA, nach Zugabe des IP Inkubationsmixes, zunächst bei 95°C für 3min inkubiert. Von diesem Mix wurden dann 20% für die Input-Probe (= interne Kontrolle) entnommen und bei -20°C gelagert. Der IP Probe wurden dann die Antikörper sowie sogenannte „beads“ zugegeben. Es handelt sich hierbei um monoklonale *mouse*-anti-5-Methylcytosin-Antikörper, welche spezifisch an das methylierte Cytosin des DNA-Einzelstranges binden. Die „beads“ dienen der späteren Aufreinigung der präzipitierten DNA, da an diese ein anti-*Mouse*-IgG-Antikörper gebunden ist. Die Immunopräzipitation wurde bei 4°C unter ständiger Rotation ÜN durchgeführt. Nach dieser Inkubationsphase wurde sowohl die IP- als auch die Input-Probe mit dem MeDIP Kit der Firma Diagenode nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die Antikörper-„bead“-Komplexe wurden mittels QiAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen entfernt.

2.2.4.3 Whole Genome Amplification

Da die Ausbeute der methylierten DNA relativ gering ausfällt und für die Mikroarray Analyse eine mindest DNA Menge von 4µg vorausgesetzt wird (Pälmke, *et al.*, 2011), war es nötig die DNA in einem weiteren Schritt genomweit mittels der „*Whole Genome Amplification*“ Methode zu amplifizieren. Dies wurde mit dem WGA Kit der Firma Sigma nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Bei dieser Methode werden zufällige Hexa- sowie Oktamerprimer zu der DNA hinzugegeben. Diese decken die gesamte Sequenz des Genoms ab und ermöglichen dadurch eine vollständige Amplifikation (Zourob, 2010). Für die Amplifikation wurden jeweils 10µl der IP- und 20µl der Input-Proben eingesetzt, außerdem wurde die Zyklenzahl von 14 auf 20 erhöht. Anschließend wurden die Proben mit dem QiAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt und quantifiziert.

2.2.4.4 Labeling

Beim Labeling wurden die amplifizierten DNA-Proben jeweils endständig mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Markierung der Input-Probe erfolgte mit dem grünen Cyanin 3 Farbstoff und die für die IP-Probe mit dem roten Cyanin 5 Farbstoff des Labeling Kits der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss

daran wurden 30µg der zusammen gehörenden Input- sowie der IP-Proben in einem Eppendorfgefäß kombiniert und in einer Vakuumzentrifuge im Dunkeln eingengt.

2.2.4.5 Hybridisieren und Scannen der Arrays

Für die Hybridisierung wurden die gelabelten Proben in 12,5µl HPLC Wasser aufgenommen und mit dem Hybridisierungsmix der Firma Roche für 5min bei 98°C inkubiert. Die NimbleGen X1-, im Fall der 385k Arrays, bzw. die NimbleGen HX1, im Fall der 2,1M Arrays, wurden mittels „*Precision Mixer Alignment Tool*“ (PMAT) auf den Arrays befestigt und die Proben mit Hilfe einer Gilson-Pipette in die jeweiligen Mixer überführt. Hierbei wurden die FFPE Gewebeproben aus Düsseldorf sowie die Zelllinien mittels 385k Arrays und die FFPE Gewebeproben aus Zürich mit 2,1M Arrays analysiert. Die so beladenen Arrays wurden dann im Hybridization System 4 (HS4) der Firma Roche bei 42°C ÜN (mind. 16h) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Arrays nach dem Protokoll des Wasch-Kits der Firma Roche gereinigt, für 1min in der „*Microarray High Speed Centrifuge*“ der Firma Array It getrocknet und im NimbleGen MS 200 Microarray Scanner mittels MS 200 „*Data Collection Software*“ mit einer Auflösung von 2µm eingescannt. Die Rohwerte der Methylierungsdaten wurden im Fall der 385k Arrays mit Hilfe der „*NimbleScan Software*“ und im Fall der 2,1M Arrays durch die „*DEVA Software*“, beide Programme von der Firma Roche, erstellt. Bei dieser Methode wird der Methylierungsgrad der DNA durch den Quotienten der beiden benutzten Fluoreszenzfarbstoffe berechnet. Die Informationen über die Promotor Loci auf den NimbleGen-Arrays basiert auf RefSeq. MM9. Für jedes Gen des Methylgruppenmetabolismus wurde der Mittelwert für die gefundene DNA- Methylierung des gesamten Promotorbereiches gebildet. Die so berechneten Mittelwerte wurden dann innerhalb der einzelnen Gruppen (Tumor/Tumor benachbart/gesund; Kontrollen/siRNA behandelte Zellen) untereinander verglichen und differenziell methylierte Regionen (DMRs) konnten durch diese Analyse ermittelt werden. Für die statistischen Analysen wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha_{DMR} = 0,05$ durchgeführt. Die Signifikanzebene wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Das bedeutet, dass ein Gen, für welches ein solcher Wert ermittelt wurde, mit einer Wahrscheinlichkeit von >95% signifikante Methylierungsveränderungen im Vergleich zu der Referenzgruppe besitzt. Zusätzlich konnten innerhalb der Ziellinien die Regionen mit der stärksten und der schwächsten Methylierung vor und nach der siRNA Behandlung identifiziert werden.

2.2.5. Bakterien

2.2.5.1 Restriktionsverdau der Vektoren und Promotorfragmente sowie deren Ligation

Vektoren sind in der Regel ringförmige, doppelsträngige DNA Moleküle (dsDNA), die in der Molekularbiologie dazu verwendet werden, Fremd-DNA in eine Empfängerzelle durch Transfektion (tierischer Empfänger) oder Transduktion (bakterieller Empfänger) einzuschleusen (Lodish *et al.*, 2001). Für diese Arbeit wurden zum einen der pTK-Green Renilla Luc Vektor der Firma Invitrogen und der pGL3-basic Vektor der Firma Promega für den Luciferase Assay und zum anderen der pCR 2.1 Vektor der Firma Invitrogen für die Bisulfit-Sequenzierung der *ODC1*- und *AHCY*-Promotorfragmente benutzt.

Die Klonierung der Fremd-DNA in den pCR 2.1 Vektor erfolgte mit dem TA-Cloning Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Methode ist kein Verdau mit Restriktionsenzymen notwendig. Aufgrund einer nicht Template gebundenen Aktivität der Taq-Polymerase wird am 3'-Ende des PCR Produktes jeweils ein Desoxyadenosin angehängt. Der von der Firma Invitrogen vertriebene Vektor verfügt am 3'-Ende über ein Desoxythymine und gewährleistet dadurch eine effektive Ligation des PCR Produktes mit dem Vektor. Die Klonierung der Fremd-DNA in den pGL3-basic Vektor erfolgte im Gegensatz dazu mit den Restriktionsenzymen *Xho I* und *Hind III* der Firma NewEngland BioLabs. Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die spezifische 4 bis 8bp lange Sequenzen, sogenannte Restriktionsschnittstellen, erkennen und anschließend beide Stränge der DNA an dieser Stelle schneiden (Lodish *et al.*, 2001). Durch diesen Vorgang entstehen Enden mit Überhängen die komplementär sind zu solchen, die mit demselben Restriktionsenzym geschnitten wurden. Es wird hierbei zwischen „*sticky ends*“ (komplementäre Überhänge) und „*blunt ends*“ (glatte Enden) unterschieden. Für den Restriktionsverdau wurden jeweils 1µg DNA/Vektor eingesetzt und für eine Stunde bei 37°C mit 1µl des jeweiligen Enzyms verdaut. Anschließend wurde erneut jeweils 1µl des Enzyms hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte im Fall von *Xho I* bei 65°C für 20 min und im Fall von *Hind III* bei 80°C für 20min. Es wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet (1x):

DNA	1 µg
10xNEB Puffer (Cut Smart)	5 µl
Restriktionsenzym (10U)	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Die so verdauten Vektoren wurden im Anschluss mit dem QiAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und zusätzlich wurde der pGL3-basic Vektor mit „*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal*“ (CIP) der Firma NewEngland BioLabs für 1h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphomonoester an den 5'- und 3'-Enden der DNA und RNA. Hierdurch wird eine Religation des linearisierten Vektors verhindert. Es wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet (1x):

DNA	1 µg
10NEB Puffer (Cut Smart)	5 µl
CIP	1 µl
H ₂ O	ad. 50 µl

Die so behandelten Vektoren und die verdauten DNA-Fragmente wurden danach mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel erneut aufgereinigt und mittels QiAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Die Ligation erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe der T4 DNA Ligase der Firma Invitrogen. Dieses Enzym katalysiert die Phosphodiesterbindung zwischen der 5' Phosphatgruppe (5'-P) des einen Stranges und der 3'-Hydroxylgruppe des anderen Stranges (3'-OH) (Ukal, *et al.*, 2002). Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers ÜN bei 14°C. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:10.

2.2.5.2 Transformation

Es wurden jeweils 50µl chemisch kompetenter „*TOP10 One Shot E. coli*“ Zellen für ca. 15min auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden anschließend 2µl des Ligationsansatzes direkt auf die Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30sec wurden 250µl S.O.C. Medium auf die

Zellen gegeben und diese wurden dann für 1h Stunde bei 37°C und 225rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf LB-Amp. Platten, die im Vorfeld mit 20µg/ml X-Gal bestrichen wurden, ausplattiert und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei X-Gal handelt es sich um ein farbloses Laktose Analogon, welches durch Hydrolyse ein intensiv blau gefärbtes Produkt bildet und somit als Reporter fungieren kann. Für die Ausprägung des Farbumschlages wurden die Platten nach der Inkubation nochmals für 3 - 4h bei 4°C gelagert.

2.2.5.3 Plasmid Präparation aus den Bakterienkolonien

Die Bakterienklone, die durch den Farbumschlag des X-Gal selektiert wurden, wurden mit einer 200er Pipettenspitze in 2ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Diese Kulturen wurden ÜB bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Plasmid Präparation erfolgte dann mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Auftauen, Kultivierung und Kryokonservierung der Zelllinien

Die Zelllinien HEK 293T, HT 1376 und SW1710 wurden in DMEM (1x) + Glutamax, versetzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin / Streptomycin, in TC 75 Flaschen der Firma Sarstedt bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank Binder der Firma WTC kultiviert. Die Zelllinie HBLAK und die primären Zellen wurden unter den selben Bedingungen im Brutschrank kultiviert, jedoch geschah dies im Fall der primären Zellen in dem KFSM-Medium der Firma Gibco, versetzt mit 5ng/ml Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und 50µg/ml Bovinem Hypophysenextrakt (BPE), und im Fall der HBLAK-Zelllinie im CnT-Prime *Epithelial Culture* Medium der Firma CELLnTEC. Des Weiteren mussten die TC 75 Flaschen für die Kultivierung des primären Urothels und der HBLAK-Zelllinie mit Collagen IV beschichtet werden. Hierfür wurde 0,1% Essigsäure hergestellt und steril filtriert. Das Collagen IV – Lyophilisat der Firma Sigma - Aldrich® – wurde in 10ml, 4°C kalter Essigsäure gelöst und die Kulturflaschen wurden für 30min bei RT oder über Nacht bei 4°C in dieser inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Das Arbeiten mit den Zelllinien erfolgte unter der Mikrobiologischen Sicherheitsbank KS 18 der Firma Thermo Electron Corporation mit vertikalem Luftstrom. Alle Kulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nur für den Gebrauch im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Je nach Verdopplungszeit der verschiedenen

Zelllinien wurden diese alle 2 - 7 Tage passagiert und mit neuem Kulturmedium versetzt. Das Passagieren erfolgte bei 90% konfluentem Wachstum der Zelllinien. Hierzu wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 2ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS vorsichtig entfernt wurde, wurden zum Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen, die Zelllinien HEK 293T, HT 1376, SW 1710 sowie die primären Zellen mit 2ml Trypsin der Firma Gibco versetzt und jeweils für ca. 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Fall der Zelllinie HBLAK geschah das Ablösen der Zellen durch die StemPro Accutase der Firma Gibco für ca. 5min bei RT. Durch die anschließende Zugabe von 5ml Medium wurde das Trypsin bei Zelllinien HEK 293T, HT 1376 und SW 1710 inaktiviert. Für das Abstoppen im Fall der primären Zellen musste die doppelte Menge hinzugegeben werden. Die Inaktivierung der Accutase erfolgte durch Zugabe von 5ml Medium und fünfminütiger Inkubation bei 37°C. Die so erzeugten Suspensionen wurden bei 1000rpm für 10min zentrifugiert, das Zellpellet mit 5ml frischem Medium resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:10 auf neue TC 75 Kulturflaschen der Firma Sarstedt mit 25ml Medium verteilt. Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Zelllinien aus separaten Mediumflaschen versorgt. Für die Versuche wurden die Zellen erst nach zwei Passagen eingesetzt und um genetische und chromosomale Veränderungen zu vermeiden, wurden die Zellen nicht länger als 12 Wochen kultiviert. Zu diesem Zweck wurden von jeder Zelllinie zu Beginn der Arbeit Aliquots mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ erstellt. Diese wurden bei -80°C gelagert, wofür ein besonderes Einfriermedium von Nöten war. Analog zu dem Passagieren der Zellen wurden diese zunächst trypsinisiert und abzentrifugiert. Die Resuspension der Zellenpellets erfolgte nun aber in 1ml des jeweiligen Mediums, versetzt mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20% FBS. Die Zugabe von DMSO bewirkt eine Reduktion des Wassergehaltes der Zelle und schützt sie daher vor der Zerstörung der Zellmembran durch die Bildung von Eiskristallen. Die Zellsuspension wurde in 2ml Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden dem Gefrierschrank entnommen und für maximal 5min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Hiernach wurden sie mit ca. 10ml Medium versetzt und in ein 15ml Falcon Zentrifugenröhrchen der Firma VWR überführt. Nachdem die Zellen bei 1000rpm 5min zentrifugiert wurden, konnte der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 6ml frischem Medium resuspendiert werden. Die Zellsuspension wurde anschließend in TC 25er Flaschen der Firma Sarstedt gegeben. Nach einer Inkubation von 24h

wurden die Zellen aus den TC 25er Flaschen in TC 75er Flaschen mit 25ml Medium überführt.

2.2.6.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl nach siRNA Behandlung und um gleiche Bedingungen für alle Versuche gewährleisten zu können, musste im Vorfeld der Versuche die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer der Firma Bürker ermittelt werden. Hierfür wurden, nach Resuspension der Zellpellets, jeweils 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau (0,4%) der Firma Gibco versetzt und 10% davon in die Neubauerkammer pipettiert. Unter einem inversen Labormikroskop der Firma Leica wurden dann die Zellen in vier großen Eckquadraten ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Zellzahl über alle Quadrate} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

2.2.6.3 Transfektion der Zelllinien

Die Transfektion der Zelllinien, sowohl mit dem pTK-Green Renilla Luc Vektor der Firma Invitrogen und dem pGL3-basic Vektor der Firma Promega als auch mit der siRNA der Firma Dharmacon, erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen. Dieses Reagenz bildet eine künstliche Membran (Liposom) um die DNA, welche in die Zelle eingebracht werden soll, und fusioniert anschließend mit der Zellmembran der Wirtszelle. DNA-Stücke, die mit dieser Methode in Säugetierzellen eingebracht werden, integrieren in der Regel in das Wirtsgenom (Klug *et al.*, 2007). Für die Transfektion der Vektoren, die für den Luciferase Assay benötigt wurden, wurde die Zelllinie HEK 293T ausgewählt. Nach der Zellzahlbestimmung wurden von dieser Zelllinie jeweils 50.000 Zellen pro Well in 200µl Medium in TC 48 „well“ Platten der Firma Sarstedt ausgesät. Hierbei wurden nur die inneren Felder der Platten berücksichtigt und die leeren „wells“ wurden mit 200µl PBS aufgefüllt, um das Feuchtigkeitsmilieu der Platte aufrecht zu erhalten. Es wurden jeweils vier technische und drei biologische Replikate erstellt. Für die Transfektion der verschiedenen Zelllinien mit siRNA, wurden die Zelllinien in 500µl Medium in TC 6 „well“ Platten der Firma Sarstedt ausgesät. Die Zellzahl war hierbei vom Transfektionszeitraum und von der Verdopplungszeit der einzelnen Zelllinien abhängig. Es wurden zwischen 50.000 und 480.000 Zellen eingesetzt. Für die eigentliche Transfektion wurden zwei Mastermixe angesetzt. Zum einen wurde die

einzubringende DNA (50ng / Vektor; 40pmol siRNA) mit dem Opti-MEM (1x) Medium der Firma Gibco so vermischt, dass pro „well“ 25µl im Fall des Luciferase Assays und 250 µl für die siRNA Transfektion eingesetzt werden konnten. Zum anderen wurde der zweite Mastermix so angesetzt, dass pro „well“ jeweils 5µl Lipofectamin mit der entsprechenden Menge an Opti-MEM Medium (24,5µl/245µl) vermischt wurden. Die beiden Mastermixe wurden dann für 5min bei RT inkubiert. Hiernach konnten diese vereint werden und es erfolgte eine weitere Inkubationsphase von 20min bei RT. Im Anschluss daran wurden jeweils 50µl auf die 48 „well“ Platten und 500µl auf die 6 „well“ Platten gegeben und die Zellen für 24h im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Die Retransfektion der Zelllinien mit siRNA erfolgte alle 24h und wurde insgesamt über 72h durchgeführt. Analog dazu wurden die Zellen über die genannten Zeiträume jeweils mit 15µmol DFMO kultiviert.

2.2.6.4 Luciferase Assay

Der Luciferase Assay dient dazu, die Aktivität verschiedener Promotoren nachzuweisen. Bei dieser Methode werden DNA Sequenzen „*upstream*“ des Transkriptionsstartpunktes vor einem Reportergen kloniert. Als Reportergene des Luciferase Assays dieser Arbeit dienen Enzyme, die sogenannten Luciferasen des Leuchtkäfers „*Photinus pyralis*“ und der Seefeder „*Renilla reniformis*“. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Luciferinen zu Licht, wobei Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) verbraucht wird (Lodish *et al.*, 2001). Von den behandelten Zellen (vgl. 2.2.5.3) wurde das Medium abgenommen, jedes „well“ mit jeweils 200µl PBS gewaschen und im Anschluss daran 65µl „*passive lysis*“ Puffer der Firma Invitrogen hinzugegeben. Für den Zellaufschluss wurden die Platten dann für 15min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Von dem Zellysat wurden 20µl in die Photometer Röhren der Firma Sarstedt überführt. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System der Firma Promega nach Angaben des Herstellers, mittels Lumat LB 9507 Photometer der Firma Berthold Technologies.

2.2.6.5 siRNA Behandlung der Zellen

Unter RNA-Interferenz wird der Prozess verstanden, bei dem kleine RNA-Moleküle, sogenannte „*small interfering RNAs*“ (siRNA), mit einer Länge von um die 21 Nukleotide die Genexpression im Zytoplasma regulieren. Die siRNAs entstehen als doppelsträngige RNA von etwa 500 Nukleotiden Länge und werden durch das

Enzym Drosha in 70 Nukleotid lange „Vorläufer“-miRNAs (pre-miRNAs) geschnitten. Durch exportin 5 werden die pre-miRNAs aus dem Zellkern geschleust und dort von dem Protein Dicer in Fragmente von 21 Nukleotiden gespalten. Hierbei entsteht sowohl ein *Sense*- wie auch ein *Antisense*-Strang. Der Proteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) bindet den Antisense-Strang und kann dadurch mRNA Segmente, die komplementär zum gebundenen siRNA Antisense-Strang sind, erkennen, binden und spalten (Klug, *et al.*, 2007). Für die Versuche in dieser Arbeit wurden die Zellen jeweils mit 40pmol siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2 und siGENOME SMARTpool siRNA, ODC1 transfiziert. Die Transfektion mit der siRNA erfolgte alle 24h über einen Zeitraum von bis zu 72h. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen jeweils 24h im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde von jedem Zeitpunkt die Zellzahl bestimmt und die Zellen wurden mit dem QiAamp DNA Blood Mini Kit bzw. dem RNeasy Kit, beides von der Firma Qiagen, nach Angaben des Herstellers lysiert.

2.2.7 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Die Signifikanzebene wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Dies bedeutet, dass ein Gen mit solch einem Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von >95% signifikante Änderungen hinsichtlich der zu untersuchenden Fragestellung im Vergleich zur Referenzgruppe besitzt.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Teilabschnitte gegliedert. Der erste Teil beschäftigt sich mit den globalen Analysen der DNA-Methylierungsveränderungen im Harnblasenkarzinom. Dies geschah hinsichtlich der 5'-regulatorischen Bereiche der Gene des Methylgruppenmetabolismus und des Polyaminstoffwechsels sowie der LINE-1 Retrotransposons. Außerdem erfolgt eine Bestätigung der gefundenen Signaturen am Beispiel der Gene *ODC1* und *AHCY*. Für die globalen Analysen wurde die DNA aus verschiedenen Harnblasenpräparaten, die von zwei unabhängigen Kliniken (Düsseldorf und Zürich) zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Die DNA-Methylierungssignaturen konnten dann im Fall des LINE-1 Promotors mittels „*Real Time*“ PCR und im Fall des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsels durch methylierungsspezifische Mikroarrays ermittelt werden. Die so gefundenen Veränderungen im Methylom der unterschiedlichen Proben konnten im Anschluss durch die Methode der Bisulfit-Sequenzierung für die Gene *ODC1* und *AHCY* im Detail dargestellt und bestätigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit steht die funktionelle Bedeutung der im Vorfeld dokumentierten Veränderungen sowie deren Einfluss auf die Tumorgenese und damit der Ätiologie des Harnblasenkarzinoms im Vordergrund. Für diese Analysen wurden die folgenden urothelialen Zelllinien ausgewählt: die aus primären Urothelzellen gewonnene, spontan immortalisierte HBLAK, die embryonale Nierenepithel-Zelllinie HEK 293T, die Übergangszellkarzinom-Zelllinie HT 1376, primäre Harnleiterzellen, die bei einer Nierenresektion gewonnen wurden, und die Übergangszellkarzinom-Zelllinie SW 1710. Zum einen sollte der Einfluss der im ersten Teil beschriebenen Methylierungsveränderungen auf die transkriptionelle Aktivität der jeweiligen Gene durch einen Luciferase Assay überprüft werden. Zum anderen lag der Fokus auf der transkriptionellen Stilllegung des *ODC1*-Gens mittels siRNA und der Dokumentation der daraus resultierenden Veränderungen für die jeweiligen Zellen. Bei diesen Analysen stehen, neben der Zellzahlbestimmung, insbesondere die funktionelle Bedeutung dieser Veränderung für den LINE-1 Methylierungsgrad und die damit verbundenen Konsequenzen für die zelluläre Integrität und Tumorgenese im Vordergrund.

3.1 Globale Analysen der Methylierungsveränderungen innerhalb der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges

3.1.1 Detektion der DNA-Methylierungsveränderungen innerhalb der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges im Harnblasenkarzinom durch methylierungsspezifische Mikroarray-Analysen

Für die Analysen der genomweiten DNA-Methylierung wurden Harnblasengewebepräparate von zwei unabhängigen klinischen Zentren verwendet. Dies waren zum einen sieben Eosin gefärbte, Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Blasengewebeschnitte (FFPE) aus dem Institut für Pathologie des Uniklinikums Düsseldorf. Bei diesen Präparaten handelt es sich um jeweils sechs unifokale Tumorgewebe (UT) und ein Präparat mit gesundem Harnblasengewebe. Von den sechs Tumorproben waren vier Patienten männlichen und zwei Patientinnen weiblichen Geschlechts, im Alter zwischen 51 und 86 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 71 Jahre. Das gesunde Gewebe stammte von einem männlichen Patienten, im Alter von 72 Jahren. Die Generierung der Arraydaten erfolgte mittels „*Human DNA Methylation 385k Arrays*“ der Firma Roche und wurde im Rahmen meiner Masterarbeit mit der NimbleScan Software Version 2.5 der Firma Roche durchgeführt (Erichsen, 2013). Zum anderen wurden Stanzbiopsien aus FFPE Blasengeweben durch das Universitätsspital Zürich zur Verfügung gestellt. Bei diesen Präparaten handelt es sich um fünf multifokale (MT) und vier unifokale Tumoren (UT), sowie jeweils fünf multifokal (mbG) und vier unifokal benachbarte (ubG) Gewebe, die pathologisch als Gesund bewertet wurden und zwei gesunde Harnblasen Biopsien. Die Patienten der neun Tumorproben waren im Alter zwischen 62 und 81 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 74 Jahre. Die Patienten der insgesamt elf Proben mit gesundem Gewebe waren, im Alter zwischen 62 und 86 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 81 Jahre. Die Generierung der Arraydaten erfolgte mit „*DNA Methylation 2.1M Deluxe Arrays*“ der Firma Roche und wurde von Dr. Agnes Beermann und Dr. Foued Ghanjati mit der NimbleGen DEVA Software Version 1.0 der Firma Roche durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Datensätze der methylierungsspezifischen Mikroarrays hinsichtlich der Methylierungssignaturen in den Promotorbereichen der Gene des Methylgruppen- und Polyaminmetabolismus ausgewertet. Die analysierten Gene wurden aufgrund von Recherchen in der Meta Datenbank „PubMed“ ausgewählt. Hierfür wurde in den gelisteten Fachartikeln gezielt nach relevanten Genen der jeweiligen

Stoffwechselwege gesucht. In der nachfolgenden Tabelle sind die untersuchten Gene im Einzelnen dargestellt.

Tabelle 2: Liste der untersuchten Gene des Methylgruppen- und Polyaminmetabolismus (Gene, NCBI)

Gensymbol	Genname	Lokus	Funktion
<i>AHCY</i>	Adenosylhomocysteinase	20q11.22	Katalysiert die Hydrolyse von SAH zu Adenosin und L-Homocystein
<i>AHCYL1</i>	Adenosylhomocysteinase Like 1	1p13.3	Interagiert mit Inositol 1,4,5- Triphosphat und ist möglicherweise involviert in der Katalyse von SAH zu Adenosin und L-Homocystein
<i>AHCYL2</i>	Adenosylhomocysteinase Like 2	7q32.1	Interagiert mit Inositol 1,4,5- Triphosphat und ist möglicherweise involviert in der Katalyse von SAH zu Adenosin und L-Homocystein
<i>AMD1</i>	Adenosylmethionin-Decarboxylase 1	6q21	Decarboxyliert SAM und spielt dadurch eine wichtige Rolle im Polyaminstoffwechsel
<i>ARG1</i>	Arginase 1	6q23	Katalysiert die Hydrolyse von Arginin zu Ornithin und Harnstoff
<i>BHMT</i>	Betain-Homocystein-S-Methyltransferase	5q13.1-q15	Katalysiert die Umwandlung von Betain und Homocystein zu Dimethylglycin und Methionin
<i>BHMT2</i>	Betain-Homocystein-S-Methyltransferase 2	5q13	Überträgt eine Methylgruppe von Betain auf Homocystein
<i>CBS</i>	Cystathionin-beta-Synthase	21q22.3	Katalysiert die Umwandlung von Homocystein zu Cystathion
<i>COMT</i>	Catechol-O-Methyltransferase	22q11.21	Überträgt Methylgruppen auf Katecholamine
<i>DNMT1</i>	DNA-Methyltransferase 1	19p13.2	Aufrechterhaltung des DNA-

			Methylierungsmusters während der Zellteilung
<i>DNMT3a</i>	DNA-Methyltransferase 3 Alpha	2p23	„de novo“ DNA-Methylierung
<i>DNMT3b</i>	DNA-Methyltransferase 3 Beta	20q11.2	„de novo“ DNA-Methylierung
<i>DNMT3l</i>	DNA-Methyltransferase 3 Like	21q22.3	Katalytisch inaktiver regulatorischer Faktor der Methyltransferasen DNMT 3a/b
<i>FOLR1</i>	Folat Rezeptor 1 (adult)	11q13.3-q14.1	Bindet Folsäurederivate und transportiert 5-Methyltetrahydrofolat in die Zellen
<i>FOLR2</i>	Folat Rezeptor 2 (fetal)	11q13.3-13.5	Bindet Folsäurederivate und transportiert 5-Methyltetrahydrofolat in die Zellen
<i>FOLR3</i>	Folat Rezeptor 3 (Gamma)	11q13	Bindet Folsäurederivate und transportiert 5-Methyltetrahydrofolat in die Zellen
<i>GAMT</i>	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase	19p13.3	Wandelt Guanidoacetat in Kreatin um, als Methylgruppendonor dient SAM
<i>GNMT</i>	Glycin-N-Methyltransferase	6p12	Katalysiert die Umwandlung von SAM zu SAH und Sarkosin
<i>MAT1A</i>	Methionin-Adenosyltransferase 1 Alpha	10q22	Überträgt in einer zwei Schritt Reaktion die funktionelle Adenosin-Gruppe des ATPs auf Methionin wodurch SAM und Tripolyphosphat entstehen
<i>MAT2A</i>	Methionin-Adenosyltransferase 2 Alpha	2p11.2	Beteiligt an der Bildung von SAM und Methionin
<i>MAT2B</i>	Methionin-Adenosyltransferase 2 Beta	5q32-q35	Regulatorische Untereinheit der MAT
<i>MGMT</i>	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase	10q26	Beteiligt an DNA Reparaturmechanismen
<i>MTHFD1</i>	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 1	14q23.3	Katalysiert die Umwandlung von 10-Formyl-Tetrahydrofolat zu 5,10-Methenyltetrahydrofolat und 5,10-Methenyltetrahydrofolat

			zu 5,10-Methylentetrahydrofolat
<i>MTHFD1L</i>	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 1 Like	6q25.1	Katalysiert die Umwandlung von 10-Formyl-Tetrahydrofolat zu Formiat
<i>MTHFD2</i>	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 2	2p13.1	Katalysiert die Umwandlung von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5,10-Methenyltetrahydrofolat und 5,10-Methenyltetrahydrofolat zu 10-Formyl-Tetrahydrofolat
<i>MTHFD2L</i>	Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 2 Like	4q13.3	Wirkt als Cofaktor von MTHFD2
<i>MTHFR</i>	Methylentetrahydrofolat-Reduktase	1p36.3	Katalysiert die Umwandlung von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat
<i>MTHFS</i>	Methenyltetrahydrofolat-Synthetase	15q25.1	Katalysiert die Umwandlung von 5-formyltetrahydrofolat zu 5,10-Methenyltetrahydrofolat
<i>MTR</i>	5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase	1q43	Überträgt eine Methylgruppe von Methyl-Cobalamin auf Homocystein wodurch Methionin und Cob(I)alamin entstehen
<i>MTRR</i>	5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase-Reduktase	5p15.32	Regeneriert MTR durch reduzierende Methylierung
<i>ODC1</i>	Ornithin-Decarboxylase 1	2p25	Katalysiert die Umwandlung von Ornithin zu Putrescin
<i>PAOX</i>	Polyamin-Oxidase	10q26.3	Katalysiert die Oxidation von N(1)-Acetylspermin zu Spermidin
<i>SHMT1</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase 1	17p11.2	Katalysiert die Umwandlung von Serin und Tetrahydrofolat zu Glycin und 5, 10-Methylentetrahydrofolat.
<i>SHMT2</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase 2	12q12-q14	Katalysiert die Umwandlung von Serin und Tetrahydrofolat zu

			Glycin und 5,10-Methylen tetrahydrofolat
<i>SMOX</i>	Spermin-Oxidase	20p13	Katalysiert die Oxidierung von Spermin zu Spermidin
<i>SMS</i>	Spermin-Synthase	Xp22.1	Katalysiert die Bildung von Spermin aus Spermidin und decarboxyliertes SAM
<i>SRM</i>	Spermidin-Synthase	1p36-p22	Katalysiert die Bildung von Spermidin aus Putrescin und decarboxyliertes SAM
<i>SSAT (SAT1)</i>	Spermidin- / Spermin-N1-Acetyltransferase 1	Xp22.1	Katalysiert die Acetylierung von Polyaminen
<i>TET1</i>	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 1	10q21.3	DNA-Demethylase
<i>TET2</i>	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 2	4q24	DNA-Demethylase
<i>TET3</i>	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 3	2p13.1	DNA-Demethylase
<i>UHRF1</i>	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	19p13.3	Regulatorischer Faktor der Replikation

Für jedes der in Tabelle 2 aufgeführten Gene wurde, mit der NimbleScan Software Version 2.5 für die „*Human DNA Methylation 385k Arrays*“ bzw. mit der NimbleGen DEVA Software Version 1.0 für die *DNA Methylation 2.1M Deluxe Arrays*, der Methylierungsstatus der auf den Arrays annotierten CpG-Dinukleotide an jeder Position bestimmt („*peak values*“). Die Anzahl der einzelnen CpG-Dinukleotid Positionen variiert hierbei mit der Größe- und der CpG-Dinukleotid Dichte der einzelnen Promotoren. Aus diesem Grund wurden die Mittelwerte aller „*peak values*“ der jeweiligen Gene bestimmt. Dies ist in Abbildung 18 exemplarisch für die Gene *AHCYL2*, *MTHFR* und *ODC1* dargestellt. Für jedes Gen ist der Mittelwert der detektierten Fluoreszenz über alle CpG-Dinukleotide des 5'-regulatorischen Bereiches des jeweiligen Gens für die unterschiedlichen Gewebe dargestellt.

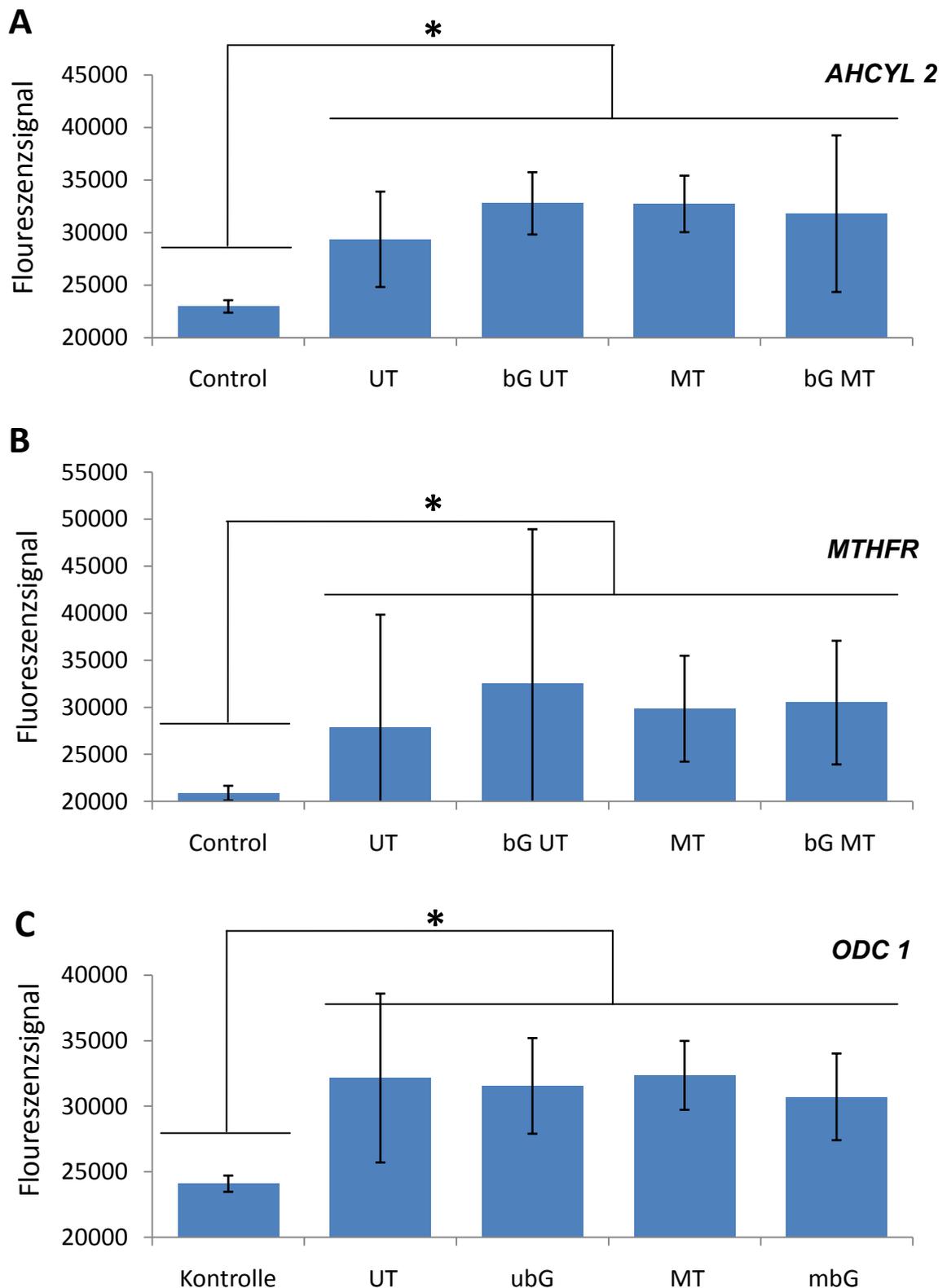


Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der „peak values“ für die Gene *AHCYL2*, *MTHFR* und *ODC1*.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ($X \pm SD$) der detektierten Methylierung der CpG-Dinukleotide für die 5'-regulatorischen Regionen der Gene *AHCYL2* (A), *MTHFR* (B) und *ODC1* (C). Statistische Analysen wurden mit dem zweiseitigen Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha_{DMR} = 0,05$ durchgeführt.

Aufgrund des „*Field change*“ Effektes (Simon *et al.*, 2001) wurden die vom Pathologen als gesund klassifizierten Tumor benachbarten Gewebe als eigenständig behandelt und nicht zu den gesunden Geweben dazugezählt. Denn der „*Field change*“ Effekt besagt, dass die Tumor benachbarten Areale bereits genetische Veränderungen erfahren haben könnten, welche sich jedoch nicht phänotypisch manifestiert haben müssen. Hierdurch werden diese Areale in der pathologischen Begutachtung als gesund klassifiziert, obwohl sie möglicherweise auf molekularer Ebene bereits entartete Zellen darstellen. Die Fluoreszenz der gemessenen Signale variiert zwischen 20.893 und 33.280 und ist im Einzelnen wie folgt verteilt: „*Peak values*“ im gesunden Harnblasengewebe *AHCYL2*: 22.971, *MTHFR*: 20.893 und *ODC1*: 24.090; „*Peak values*“ in den unifokalen Tumoren: *AHCYL2*: 29.357, *MTHFR*: 27.891 und *ODC1*: 32.152; „*Peak values*“ in den unifokal benachbarten Arealen: *AHCYL2*: 32.778, *MTHFR*: 32.515 und *ODC1*: 31.552; „*Peak values*“ in den multifokalen Tumoren: *AHCYL2*: 32.726, *MTHFR*: 29.866 und *ODC1*: 32.356 und „*Peak Values*“ in den multifokal benachbarten Arealen: *AHCYL2*: 31.793, *MTHFR*: 30.509 und *ODC1*: 30.719. Die Standardabweichung schwankt hierbei zwischen 2,7% (für das Gen *AHCYL2* in den gesunden Geweben) und 50,5% (für das Gen *MTHFR* in den unifokal benachbarten Arealen). Bei der Betrachtung der Standardabweichungen für die „*peak values*“ ist festzustellen, dass diese in den gesunden Geweben für alle drei Gene am geringsten ist und für die anderen Gewebearten deutlich zunimmt. Dies ist vermutlich durch die Entartung der Gewebe und den damit einhergehenden Veränderungen des Methyloms zu erklären. Um festzustellen, ob die Werte sich statistisch signifikant unterscheiden, wurden die Mittelwerte der „*peak values*“ für die einzelnen Gewebefractionen (unifokale und multifokale Tumoren, sowie die daran angrenzenden Areale) jeweils mit denen der gesunden Harnblasen (Kontrolle) verglichen. Für diese Analysen wurde der zweiseitige Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha_{DMR} = 0,05$ gewählt. Die p-Werte für die in Abbildung 18 dargestellten Gene sind im Einzelnen: Für das Gen *AHCYL2* ist der p-Wert für die „*peak value*“ Unterschiede zwischen den unifokalen Tumoren im Vergleich zu den gesunden Harnblasengeweben 0,03; für die unifokal benachbarten Areale liegt der p-Wert bei 0,01; für die multifokalen Tumoren liegt der p-Wert bei 0,01 und für multifokal benachbarte Areale bei 0,01. Es zeigen somit alle untersuchten Gewebefractionen eine signifikante Veränderung der Methylierungssignatur im 5'-regulatorischen Bereich des *AHCYL2*-Gens im Vergleich

zu den gesunden Kontrollgeweben. Für das *MTHFR*-Gen liegt der p-Wert der DMRs der unifokalen Tumoren bei 0,05 und für die unifokal benachbarten Areale bei 0,03. Für die multifokalen Tumoren liegt der p-Wert bei 0,05 und für multifokal benachbarte Areale bei 0,5. Somit liegen in allen untersuchten Geweben signifikante Unterschiede innerhalb der Promotorregion des *MTHFR*-Gens vor. Für das *ODC1* Gen liegt der p-Wert der DMRs der unifokalen Tumoren bei 0,01 und für die unifokal benachbarten Areale bei 0,05. Für die multifokalen Tumoren liegt der p-Wert bei 0,04 und für multifokal benachbarte Areale bei 0,04. Auch für dieses Gen sind in allen Geweben signifikante Unterschiede innerhalb des 5'-regulatorischen Bereiches zu finden. Die Ergebnisse dieser statistischen Analyse sind in Tabelle 3 dargestellt und geben einen Überblick über die differentiell methylierten Regionen im 5'-regulatorischen Bereich der Gene des Methyl- und Polyaminstoffwechselweges im Harnblasenkarzinom bzw. in den Arealen, die an ein solches angrenzen, im Vergleich zu den gesunden Kontrollgeweben.

Tabelle 3: Statistische Auswertung der „peak values“ der differentiell methylierten Regionen (DMR) innerhalb der 5'-regulatorischen Einheiten der Schlüsselgene des Methylgruppenmetabolismus und Polyaminstoffwechselweges.

Gen	UT	ubG	MT	mbG
ARG1	0,64	0,14	0,38	0,38
BHMT	0,79	0,50	0,91	0,28
BHMT2	0,34	0,39	0,09	0,67
CBS	0,97	0,77	0,50	0,35
DNMT3a	0,54	0,06	0,88	0,53
DNMT3b	0,49	0,09	0,60	0,72
FOLR1	0,79	0,15	0,45	0,80
FOLR2	0,15	0,12	0,32	0,22
FOLR3	0,20	n/D	0,08	0,17
GAMT	n/D	n/D	n/D	n/D
MAT1A	0,91	0,49	0,49	0,72
MAT2B	0,76	0,93	0,98	0,90
MTR	0,81	0,93	0,84	0,80
MTRR	0,99	0,76	0,88	0,90
MTHFD1	0,15	0,34	0,53	0,64
MTHFD1L	0,75	0,46	0,81	0,42
MTHFD2	0,54	0,32	0,34	0,81
MTHFD2L	0,15	n/D	0,15	0,53
MTHFS	0,20	0,17	0,46	0,22
SHMT1	0,67	0,97	0,75	0,83
SHMT2	n/D	0,06	0,65	0,57
SMOX	0,70	0,81	0,23	0,64

SMS	0,92	0,95	0,42	0,55
SRM	0,06	0,89	0,78	0,66
TET1	0,90	0,91	0,99	0,72
TET2	0,62	0,85	0,50	0,32
TET3	0,40	0,60	0,89	0,85
UHRF1	0,83	0,08	0,06	0,53
AMD1 (+)	0,04	0,68	0,10	0,41
DNMT1 (+)	0,01	0,21	0,20	0,27
MGMT (+)	0,05	0,02	0,38	0,14
PAOX (+)	0,59	0,01	0,25	0,08
SSAT(SAT1) (-)	0,90	0,01	0,41	0,79
AHCYL1 (+)	0,41	0,91	0,01	0,16
DNMT3I (-)	0,96	0,67	0,04	0,03
GNMT (-)	0,09	0,44	0,02	0,94
MAT2A (-)	0,46	0,34	0,01	0,01
AHCY (+)	0,03	0,10	0,04	0,16
AHCYL2 (+)	0,03	0,01	0,01	0,01
COMT (-)	0,06	0,04	0,13	0,04
MTHFR (+)	0,05	0,03	0,05	0,05
ODC1 (+)	0,01	0,05	0,04	0,04

Statistisch signifikante Veränderungen der Methylierungssignaturen werden durch eine rote Markierung innerhalb der Tabelle angezeigt. Anhand der Veränderungen hinsichtlich der DNA-Methylierung lassen sich die Gene des Methyl- und Polyaminstoffwechselweges in drei Gruppen einteilen. Zum einen die Gruppe der Gene, die keine signifikante Hyper- oder Hypomethylierung in einer der vier untersuchten Gewebekohorten zeigt. Zu dieser Gruppe gehören 28 der 42 untersuchten Gene. Im Einzelnen sind dies die folgenden: *ARG1*, *BHMT*, *BHMT2*, *CBS*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *FOLR1*, *FOLR2*, *FOLR3*, *GAMT*, *MAT1A*, *MAT2B*, *MTR*, *MTRR*, *MTHFD1*, *MTHFD1L*, *MTHFD2*, *MTHFD2L*, *MTHFS*, *SHMT1*, *SHMT2*, *SMOX*, *SMS*, *SRM*, *TET1*, *TET2*, *TET3* und *UHRF1*. Innerhalb dieser Gruppe lässt sich jedoch für die Gene *BHMT2* (MT: $p=0,09$), *DNMT3a* (ubG: $p=0,06$), *DNMT3b* (ubG: $p=0,09$), *FOLR3* (MT: $p=0,08$), *SHMT2* (ubG: $p=0,08$), und *UHRF1* (ubG: $p=0,08$; MT: $p=0,06$) eine Tendenz hinsichtlich Hypermethylierung im 5'-regulatorischen Bereich finden, welche mit p-Werten für die „peak values“ von $p > 0,05$ und $p < 0,1$ nahe am gewählten Signifikanzniveau von $\alpha\text{DMR} = 0,05$ liegen. Das Gen *SRM* zeigt in den unifokalen Tumoren eine Tendenz hinsichtlich Promotorhypomethylierung mit einem p-Wert von 0,06. Die zweite Gruppe der Gene besteht aus solchen, welche eine statistisch signifikante Veränderung in den

Methylierungssignaturen der unifokalen Tumoren und den unifokal benachbarten Geweben oder der multifokalen Tumoren und den multifokal benachbarten Geweben zeigen. Dies sind im Fall der unifokalen Gewebe 5 der 42 und im Fall der multifokalen Gewebe 4 der 42 untersuchten Gene. In den unifokalen Tumoren und / oder den unifokal benachbarten Geweben zeigen die Gene *AMD1* (UT), *DNMT1* (UT), *MGMT* (UT, ubG) und *PAOX* (ubG) jeweils eine signifikante Hypermethylierung und das Gen *SSAT* (ubG) eine signifikante Hypomethylierung. In den multifokalen Tumoren und / oder den multifokal benachbarten Geweben zeigt nur das Gen *AHCYL1* (MT) eine statistisch signifikante Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches und die Gene *DNMT3I* (MT; mbG), *GNMT* (MT) und *MAT2A* (MT; mbG) eine signifikante Hypomethylierung. In der letzten Gruppe sind die Gene zusammengefasst, bei denen sowohl in den unifokalen als auch in den multifokalen Geweben statistisch signifikante differentiell methylierte Regionen gefunden wurden. Hierbei zeigen die Gene *AHCY* (UT, MT), *AHCYL2* (UT, ubG, MT, mbG), *MTHFR* (UT, ubG, MT, mbG) und *ODC1* (UT, ubG, MT, mbG) jeweils eine statistisch signifikante Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches und das Gen *COMT* (ubG, mbG) zeigt eine signifikante Hypomethylierung. Die Tendenz zur Hypomethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *COMT*-Gens zeigt sich auch in den unifokalen Tumoren mit einem p-Wert von 0,06. Besonders auffällig ist hierbei, dass die gefundenen Methylierungsveränderungen für die Gene *AHCYL2*, *MTHFR* und *ODC1* jeweils in allen untersuchten Geweben vorzufinden waren. Ein n/D in der Tabelle 3 steht für eine nicht bestimmbare Methylierungssignatur, da in diesen Fällen die Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale nicht ausreichte, um eine statistische Auswertung durchzuführen.

3.1.2 Detailanalyse und Verifizierung der Methylierungsveränderungen der Gene *ODC1* und *AHCY* im Urothelkarzinom durch Bisulfit-Sequenzierung

Um die Methylierungsveränderungen in den 5'-regulatorischen Bereichen der Gene *ODC1* und *AHCY*, wie sie durch die methylierungsspezifischen Mikroarray-Analysen aufgedeckt wurden, zu bestätigen und die Methylierungssignaturen der differentiell methylierten Regionen im Detail darzustellen, wurde die Methode der Bisulfit-Sequenzierung gewählt. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe der SignalMap Software Version 1.9, im Fall der „*Human DNA Methylation 385k Arrays*“, bzw. mit der NimbleGen DEVA Software Version 1.0, für die *DNA Methylation 2.1M Deluxe Arrays*

der Firma Roche, für die Gene eine Abbildung erstellt, die das jeweilige Methylierungsmuster an der 5'-regulatorischen Einheit widerspiegelt.

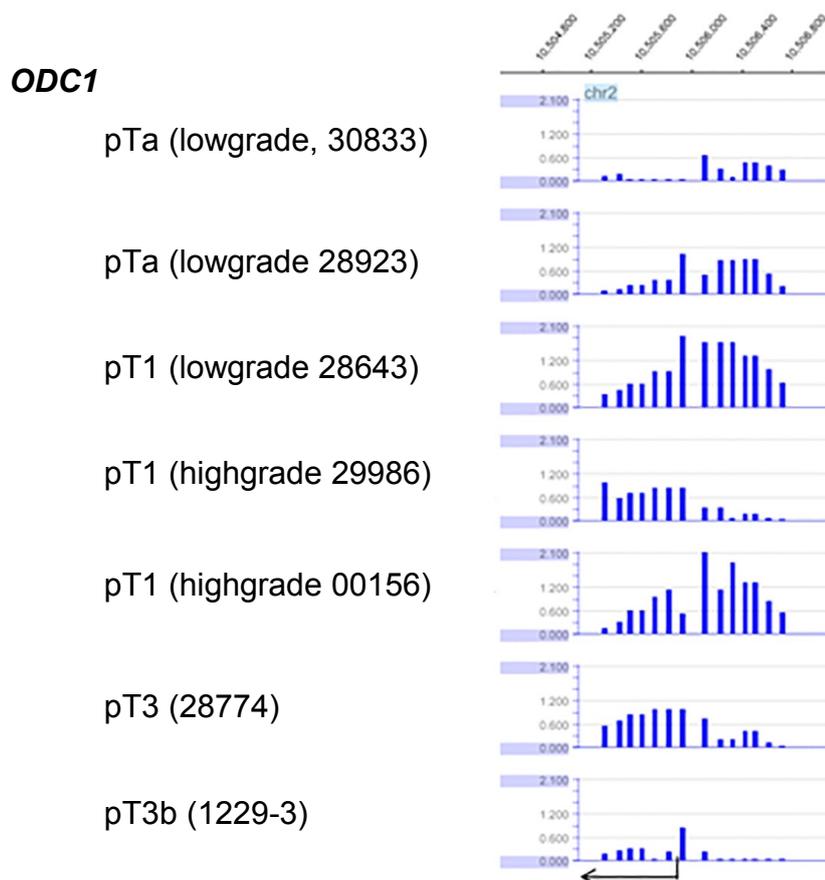


Abbildung 19: Methylierungssignaturen des 5'-regulatorischen Bereiches des ODC1-Gens in verschiedenen unifokalen Tumoren.

Die Abbildung zeigt die Auswertung der methylierungsspezifischen Mikroarrays von sechs unifokalen Tumoren, die mit Hilfe des Programmes SignalMap erstellt wurde. Neben den pathologischen Befunden (linker Bildrand), ist im oberen Bildabschnitt die Lokalisation des *ODC1*-Gens auf dem Chromosom 2 dargestellt. Der Pfeil unterhalb der Abbildung gibt den Transkriptionsstart und die Transkriptionsrichtung an. Jeder blaue Balken stellt hierbei eine 75bp lange „probe“ dar. Die Höhe ist hierbei proportional zum detektierten Methylierungsgrad.

Dies ist in Abbildung 19, welche mit der SignalMap Software erstellt wurde, exemplarisch für das Gen *ODC1* dargestellt. Es ist die Auswertung der methylierungsspezifischen Mikroarrays von sechs unifokalen Tumoren mit unterschiedlichem pathologischem Befund dargestellt. Dieser befindet sich jeweils am linken Bildrand und ist nach aufsteigender T-Klassifikation angeordnet. Die dargestellten Tumoren sind im Einzelnen: pTa 30833, pTa 28923, pT1 28643, pT1 29986, pT1 00156 und pT3 28774. Neben dem Gennamen, welcher sich in der oberen linken Ecke der Abbildung befindet, ist die Lokalisation des *ODC1*-Gens auf dem Chromosom 2 dargestellt und stellt die Abszisse der Abbildung dar. Sie umfasst

die „*Tiled region*“ – in etwa einen Bereich von 2.200bp stromabwärts und 500bp stromaufwärts – des *ODC1* Promotorbereiches. Dieser ist durch 75bp lange Oligonukleotid-Sonden („*probes*“) auf dem Array abgebildet und wird in der Abbildung durch die blauen Balken widergespiegelt. Die Höhe der Balken gibt dabei das Verhältnis der detektierten Fluoreszenzsignale wieder und beschreibt dadurch in einer relativen Größe den DNA-Methylierungsgrad. Der Pfeil unterhalb der Abbildung zeigt sowohl den Transkriptionsstartpunkt als auch die Transkriptionsrichtung an. Die Promotorbereiche liegen dementsprechend stets entgegen der Transkriptionsrichtung vor dem Pfeil. Wie in Abbildung 19 dargestellt, weisen alle Tumoren ein starkes Fluoreszenzsignal und damit folglich eine dichte Promotormethylierung im 5'-regulatorischen Bereich dieses Gens auf. Die einzige Ausnahme stellt hierbei der pTa Tumor mit der Nummer 30833 dar. Die Intensität der detektierten Fluoreszenzsignale liegt hierbei zwischen 1.000 und 2.000. Anhand dieser Abbildung konnten die differentiell methylierten Regionen innerhalb der Promotorbereiche mit den größten Veränderungen der Methylierungssignatur bestimmt werden. Hierdurch war es möglich, gezielt Oligonukleotidprimer für die Bisulfit-Sequenzierung dieser Bereiche zu designen. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Scientific synthetisiert und ermöglichten die Detailanalyse eines 348 bp großen *AHCY* Promotorfragmentes und eines 224 bp großen *ODC1* Promotorfragmentes. Die 5'-regulatorischen Bereiche der jeweiligen Gene beziehen sich auf den +1 Transkriptionsstart der folgenden Transkripte:

Homo sapiens Adenosylhomocysteinase (*AHCY*), transcript variant 1, mRNA NCBI Reference Sequence: NM_000687.3

Homo sapiens Ornithine Decarboxylase 1 (*ODC1*), transcript variant 1, mRNA NCBI Reference Sequence: NM_002539.2

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte jeweils aus 15 verschiedenen Bakterienklonen und ist in Abbildung 20 exemplarisch für einen Teilabschnitt des *AHCY*-Gens in der gesunden Harnblasengewebeprobe Ac-1 dargestellt. Hierbei werden die 15 aus den Bakterien isolierten Sequenzen mit der Originalsequenz aus der Datenbank NCBI verglichen. In rot sind dabei jeweils die untersuchten CpG-Dinukleotide dargestellt.

```

ori -----ATTTTGAGGTTT
6 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
1 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
2 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
5 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
12 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
16 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
11 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGG--TT
10 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
14 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
15 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
9 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGG--TT
7 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
17 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
20 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
3 CTGCAGAATTCGGCTTTGAGTGAGATTTTTGGGGTTATGTTTTGTGAAATTTTGAGGTTT
***** **

ori TTTTATAGGGATCGAAATTTTTTTCGGTTTCGTTTTCGCGTTGGGTTTCGTTTTAGCGG
6 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
1 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGTTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
2 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGTTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
5 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGTTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
12 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGTTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
16 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGTTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
11 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
10 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
14 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
15 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
9 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
7 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
17 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
20 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
3 TTTTATAGGGATTGAAATTTTTTTTGGTTTTGCTTTGTGTGTGGGTTTGTGTTAGTGG
***** **

ori GTTATGAATATGTAAGTCGAGGAAGATATTTAAAGCGGCGGCGTTATCGGTATATTTT
6 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGT--TATTTT
1 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
2 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
5 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
12 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
16 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
11 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
10 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
14 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
15 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
9 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
7 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
17 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
20 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
3 GTTATGAATATGTAAGTGAGAGGAAGATATTTAAAGGTGTTGGTGTATGTGTATATTTT
***** **

ori TGTTCGG-----CGTTGTTC--GTTAGTTTTTGTGTTTTAGATTGAGGTTTAGTTTTTTT
6 TGTGTTGGTGTGTTTGTGTTTTTTTGTGAGTTT-----
1 TGTGTTG-----TGTGTTT--CTTAGTTTTGA-----
2 TGTGTTG-----TGTGTTT--CTTAGTTTTGA-----
5 TGTGTTGG-----TGTGTTTTAGTTTATTTTATAGATT-----
12 TGTGTTGG-----TGTGTTTTAGTTTATTTTATAGATT-----
16 TGTGTTGG-----TGTGTTTTAGTTTATTTTATAGATT-----
11 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTG-----
10 TGTGTTGG-----TGTGTTCC----TAGTTTTTA-----
14 TGTGTTGG-----TGTGTTT--G-TTAGTT-----
15 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTTTATTTTATAGATTGAGGTTTAGTTTTCT
9 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTTTG---TAGATTGAGGTTTAGATTCGC-
7 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTTTGTGTTTTAGATTGAGGTTTAGTTTTTTT
17 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTTTGTGTTTTAGATTGAGGTTTAGTTTTTTT
20 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTTTGTGTTTTAGATTGAGGTTTAGTTTTTTT
3 TGTGTTGG-----TGTGTTT--GTTAGTTTTT-----
***** **

```

Abbildung 20: Alignment der Originalsequenz (ori) aus der NCBI Datenbank mit den Sequenzierungsdaten.

Die untersuchten CpG-Dinukleotide sind in rot dargestellt. Cytosine die nach der Bisulfit-Konvertierung als solche erhalten geblieben sind, sind in blau dargestellt. Übereinstimmungen innerhalb der untersuchten 5'-regulatorischen Bereiches sind mit * gekennzeichnet.

Diese können innerhalb des 5'-regulatorischen Bereiches differentiell methyliert vorliegen und damit einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des *AHCY*-Gens haben. Wie unter 2.2.2.6 (Bisulfit-Konvertierung) beschrieben, werden >99% der nicht methylierten Cytosine zu Uracil desaminiert und durch die nachgeschaltete PCR durch Thymin ausgetauscht. Im Vergleich zwischen Tumor- und gesundem Gewebe lassen sich so differentiell methylierte Bereiche, die mit der Entartung assoziiert sein können bzw. für diese ursächlich sein können, identifizieren. Da es bei der Konvertierung immer vorkommen kann, dass vereinzelt Cytosine als solche erhalten bleiben, sind diese in der Abbildung 20 durch eine blaue Farbe markiert. Zu beiden Seiten der untersuchten Sequenz wird diese von Bereichen flankiert, in denen sowohl Cytosine als auch CpG-Dinukleotide vorkommen. Hierbei handelt es sich um Sequenzbereiche des Vektors, die nicht in die Analyse mit einbezogen wurden. Für die Probe Ac-1 ist durch den Vergleich der CpG-Dinukleotide mit der Originalsequenz zu erkennen, dass alle Cytosine im CpG-Kontext zu Uracil desaminiert wurden und folglich durch Thymin in der analysierten Sequenz abgebildet werden. Ebenfalls ist zu bemerken, dass hinter dem dritten untersuchten CpG-Dinukleotid, ein Cytosin, welches nicht im CpG-Kontext steht, in 10 der 15 untersuchten Sequenzen als solches erhalten geblieben ist. Für das Gen *AHCY* wurden insgesamt sechs verschiedene Gewebeproben hinsichtlich dieses Promotorfragmentes untersucht. Diese sind die beiden gesunden Harnblasengewebe Ac-1 und H35396, der unifokale pTa Tumor H28923-12 (*low grade*), der multifokale pTa Tumor ZH 148T (*high grade*), der unifokale pT1 Tumor H28643-12 (UT, *low grade*) und der multifokale pT1 Tumor ZH 103T (*high grade*). Zur Vereinfachung sind in Abbildungen 21 und 22 nur noch die Analysen der CpG-Dinukleotide innerhalb der 5'-regulatorischen Einheit des *AHCY*- und *ODC1*-Gens ohne eigentliche DNA-Sequenz dargestellt. Oberhalb der jeweiligen Abbildung ist angegeben, ob es sich um eine gesunde Gewebeprobe handelt, oder der jeweilige pathologische Befund ist mit der Probennummer zusammen dargestellt.

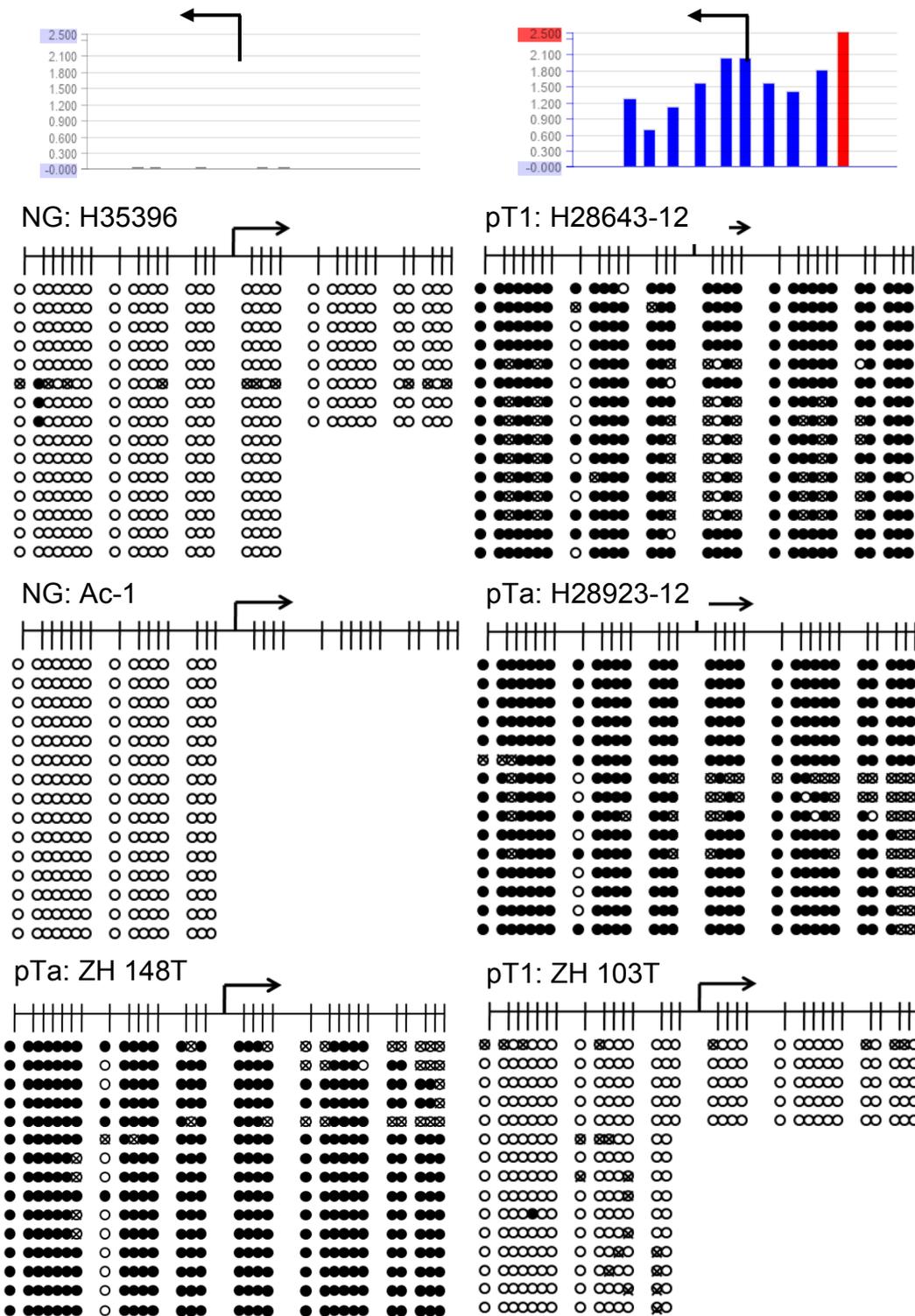


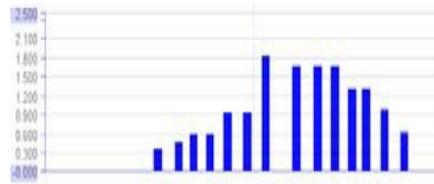
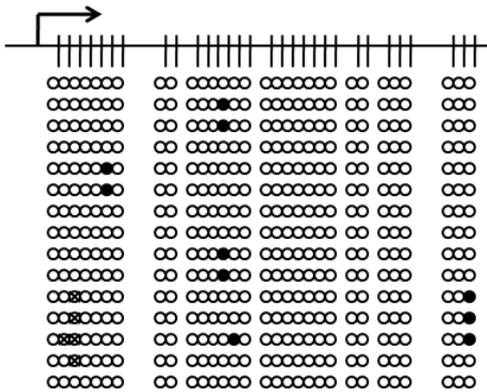
Abbildung 21: Detailanalyse des 348bp großen 5'-regulatorischen Bereiches des AHCY-Gens in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms.

Über der jeweiligen Abbildung ist angegeben, ob es sich um eine gesunde Gewebeprobe handelt, oder der jeweilige pathologische Befund ist zusammen mit Probennummer dargestellt. Exemplarisch ist über den oberen beiden Abbildungen das Ergebnis der dazugehörigen Mikroarray-Analyse angegeben. Jeder blaue Balken stellt hierbei eine 75bp lange „probe“ dar, deren Höhe proportional zum detektierten Methylierungsgrad ist. Der rote Balken zeigt an, dass das gemessene Fluoreszenzsignal mit einem Wert von 3.200 über die Skala hinausgeht. Die Abbildungen zeigen jeweils die Detailanalyse des 384bp langen 5'-regulatorischen Bereiches des AHCY-Gens. ● = Methyliertes CpG-Dinukleotid, ○ = Unmethyliertes CpG-Dinukleotid, ⊗ = CpG-Dinukleotid nicht bestimmbar. Die Pfeile geben den Transkriptionsstart und die Transkriptionsrichtung an.

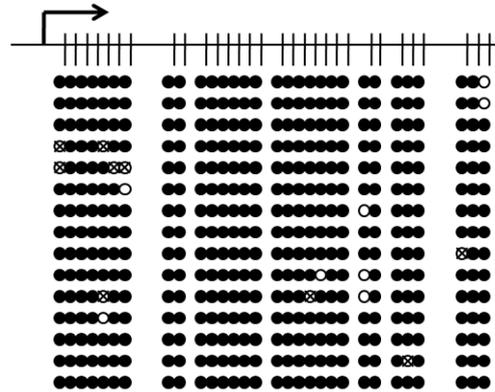
Für die beiden oberen Abbildungen sind exemplarisch die mit Hilfe der Mikroarray-Analyse detektierten Methylierungssignaturen angegeben. Der rote Balken in dieser Abbildung gibt an, dass das gemessene Fluoreszenzsignal mit einem Wert von 3.200 außerhalb der gewählten Skala liegt. Die Messwerte des Fluoreszenzsignals liegen zwischen 600 und 3.200 für die einzelnen „probes“. Die schwarz ausgefüllten Kreise stehen für methylierte CpG-Dinukleotide. Weiße Kreise stellen unmethylierte CpG-Dinukleotide dar und durchgestrichene Kreise symbolisieren ein CpG-Dinukleotid dessen Methylierungsstatus nicht detektierbar war. Der untersuchte 5'-regulatorische Bereich enthielt insgesamt 30 CpG-Dinukleotide, die in den beiden gesunden Proben H35396 und AC1, bis auf drei Positionen in der Probe H35396, alle unmethyliert vorliegen. Im Gegensatz dazu zeigt sich in drei der vier untersuchten Tumoren eine dichte Promotormethylierung. Dies sind im Einzelnen der unifokale *low grade* pTa Tumor H28923-12 mit 441 methylierten Positionen von 450 untersuchten CpG-Dinukleotiden, der multifokale *low grade* pTa Tumor ZH 148T mit 439 methylierten Positionen und der unifokale pT1 *low grade* Tumor H28643-12 mit 428 methylierten Positionen. Dies entspricht 98% (H28923-12), 97,6% (ZH 148T) und 95,2% (H28643-12) aller Cytosine die im CpG-Kontext stehen und bedeutet, dass in diesen Proben nur 2% (H28923-12), 2,4% (ZH 148T) und 4,8% (H28643-12) aller CpG-Dinukleotide des untersuchten Promotorbereiches unmethyliert vorliegen. Die gefundene Methylierungssignatur im 5'-regulatorischen Bereich des *AHCY*-Gens im multifokalen pT1 *high grade* Tumor ZH 103T ist identisch mit der Methylierungssignatur wie sie in den gesunden Geweben detektiert wurde. Auch in diesem Fall wurden, mit einer Ausnahme, nur unmethylierte CpG-Dinukleotide gefunden. In allen untersuchten Gewebeproben konnten die Methylierungssignaturen im Promotorbereich des *AHCY*-Gens, wie sie bereits durch die Mikroarray-Analyse gefunden wurden, bestätigt werden. Hierdurch konnte die Hypermethylierung im 5'-regulatorischen Bereich für das *AHCY*-Gen durch die Methode der Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden und scheint somit im frühen Harnblasenkarzinom vorzukommen. Um den Methylierungsstatus des 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens zu charakterisieren, wurden insgesamt 10 verschiedene Gewebe analysiert. Dies sind im Einzelnen die drei gesunden Harnblasenproben H35396, Ac-1 und Ac-3, die drei unifokalen pTa Tumoren ZH 108T (*low grade*), ZH 105T (*high grade*) und ZH 111T (*high grade*), der multifokale pTa Tumor ZH 148T (*low grade*),



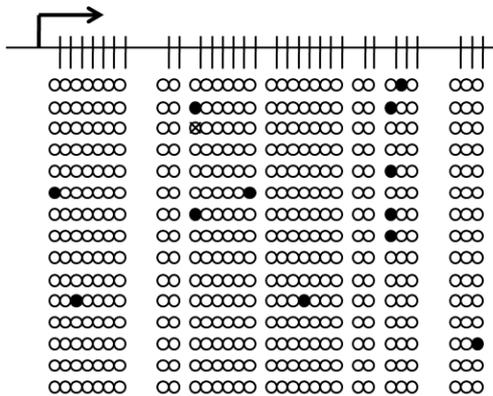
NG: H35396



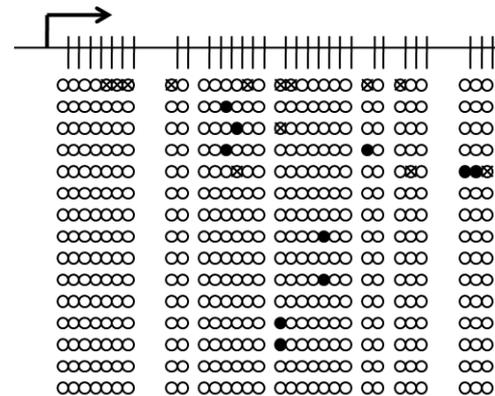
pT1: H28643-12



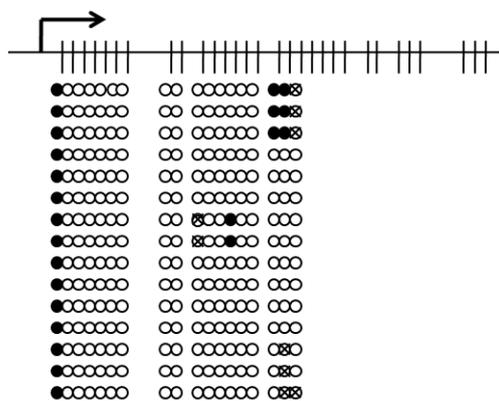
NG: Ac-1



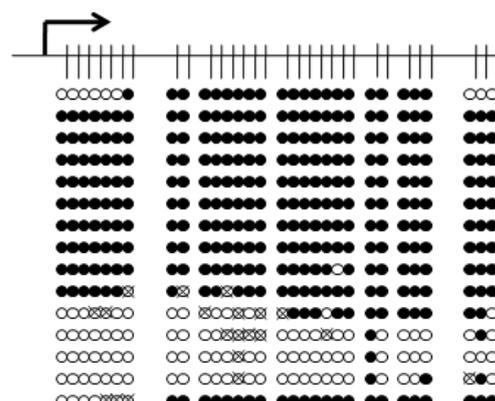
NG: Ac-3



pTa: ZH 108T



pTa: ZH 111T



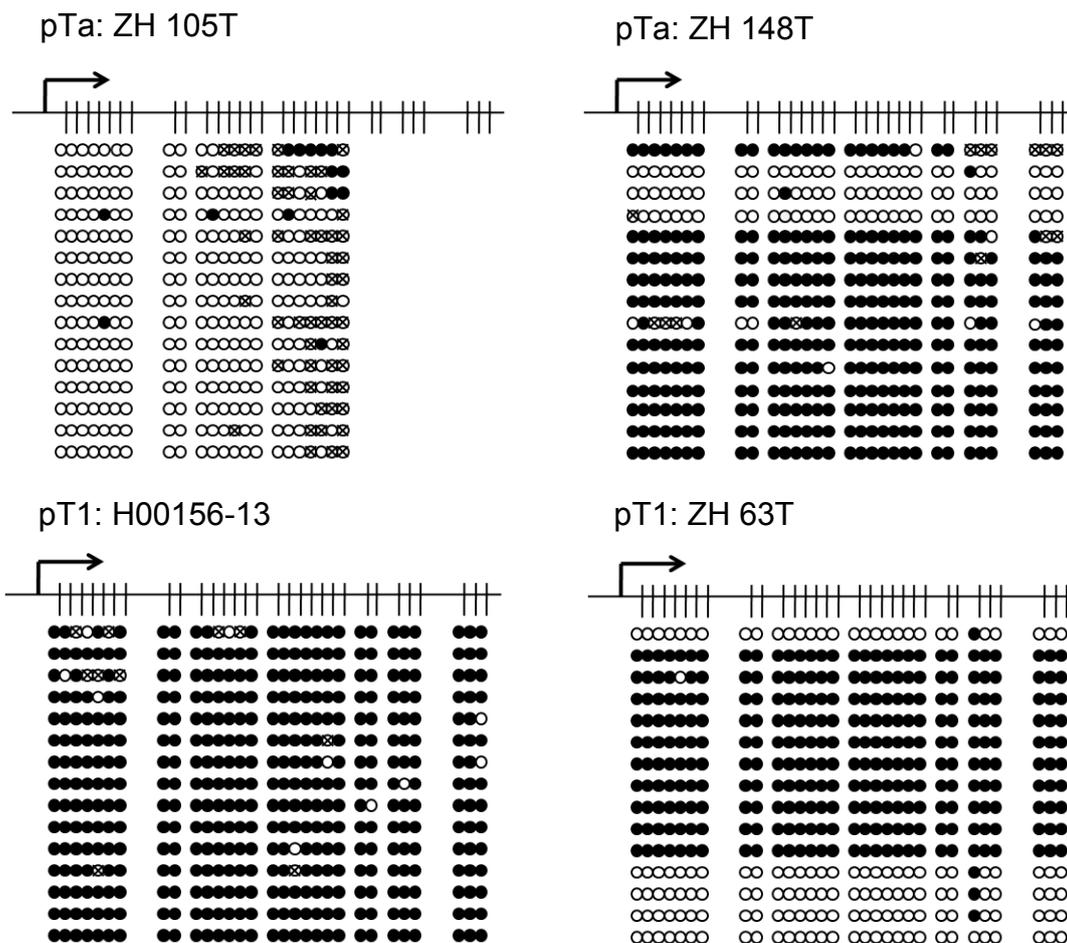


Abbildung 22: Detailanalyse des 224bp großen 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms.

Oberhalb der jeweiligen Abbildung ist angegeben, ob es sich um eine gesunde Gewebeprobe handelt, oder der jeweilige pathologische Befund ist zusammen mit der Probennummer dargestellt. Exemplarisch ist über den oberen beiden Abbildungen das Ergebnis der dazugehörigen Mikroarray-Analyse angegeben. Jeder blaue Balken stellt hierbei eine 75bp lange „probe“ dar, deren Höhe proportional zum detektierten Methylierungsgrad ist. Die Abbildungen zeigen jeweils die Detailanalyse des 224bp langen 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens. ● = Methyliertes CpG-Dinukleotid, ○ = Unmethyliertes CpG-Dinukleotid, ⊗ = CpG-Dinukleotid nicht bestimmbar. Die Pfeile geben den Transkriptionsstart und die Transkriptionsrichtung an.

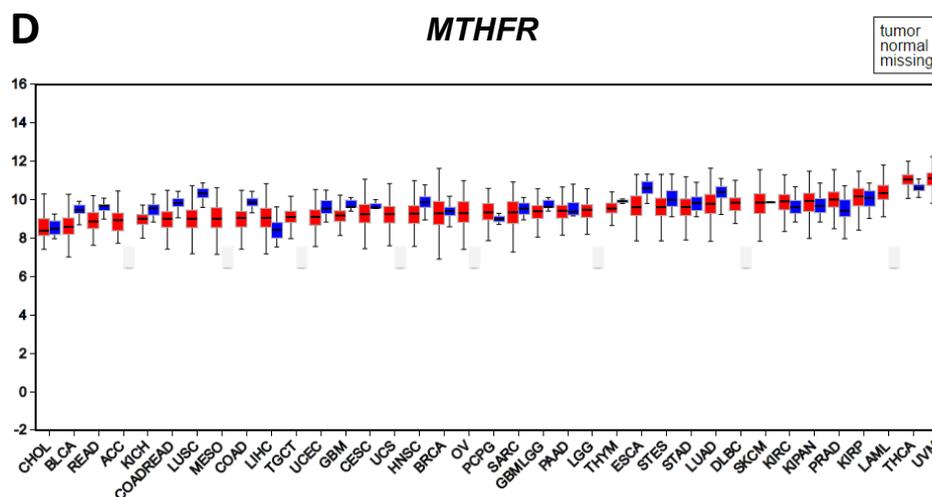
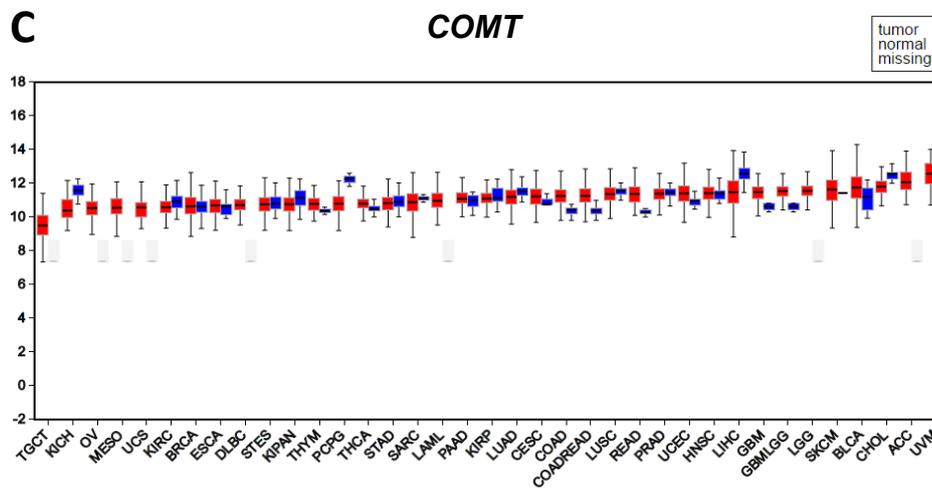
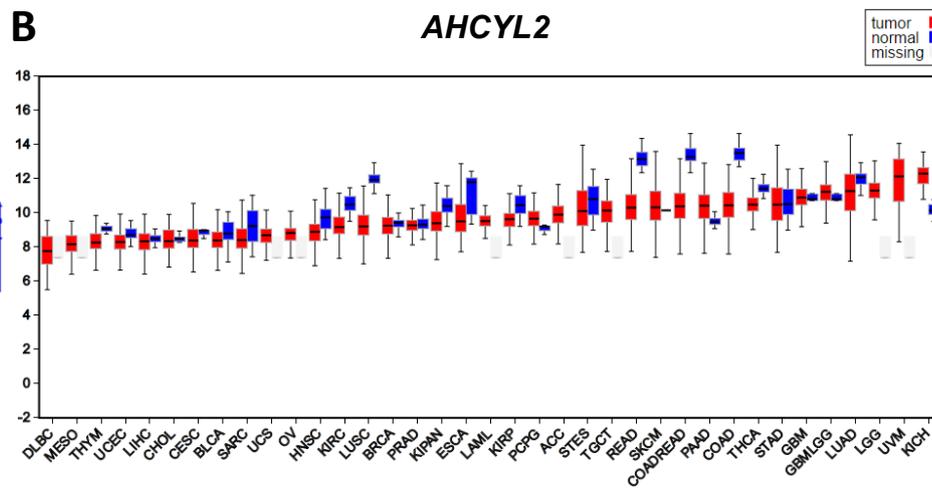
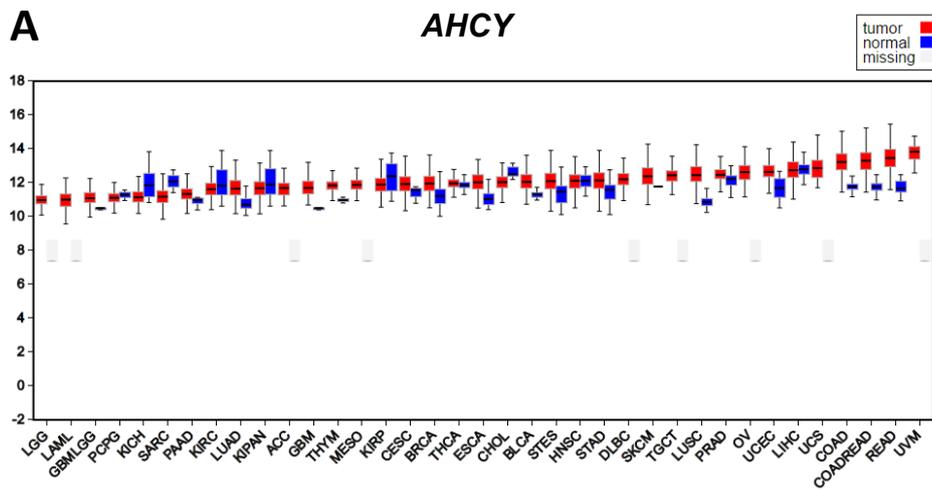
die beiden unifokalen pT1 Tumoren H28643-12 (*low grade*) und H00156-13 (*high grade*) und der multifokale pT1 Tumor ZH 63T (*high grade*). Die Bisulfid-Sequenzierungsergebnisse dieser Gewebeproben sind in Abbildung 22 dargestellt. Auch in dieser Abbildung ist jeweils für die obersten beiden Proben exemplarisch das Ergebnis der Mikroarray-Analyse des 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens dargestellt. Die Messwerte der durch die Fluoreszenz detektierten Methylierungssignatur im Promotorbereich liegt zwischen 300 und 1.600 für die einzelnen „probes“. Analog zu Abbildung 21 steht auch in Abbildung 22 ein schwarz

ausgefüllter Kreis für methylierte CpG-Dinukleotide. Weiße Kreise stellen unmethylierte CpG-Dinukleotide dar und durchgestrichene Kreise symbolisieren ein CpG-Dinukleotid dessen Methylierungsstatus nicht detektierbar war. Der untersuchte 5'-regulatorische Bereich enthielt insgesamt 30 CpG-Dinukleotide, die in den drei untersuchten Geweben größtenteils unmethyliert vorliegen. In der Probe Ac-1 wurde von den 450 untersuchten an nur 12 Positionen eine Methylierung festgestellt. Dies entspricht einem Anteil von 2,6% aller CpG-Dinukleotide. In den Proben H35396 und Ac-3 mit gesundem Harnblasengewebe war der Anteil der methylierten CpG-Dinukleotide mit 2,2% – dies entspricht 10 methylierten Cytosinen – noch geringer. Im Vergleich dazu zeigen die Tumoren im 5'-regulatorischen Bereich des *ODC1*-Gens eine deutliche Hypermethylierung. In den beiden unifokalen pTa Tumoren ZH 108T (*low grade*) und ZH 105T (*high grade*) wiesen, ähnlich wie im gesunden Gewebe, nur wenige der Cytosine eine Methylierung auf. Dies waren 23 der 270 untersuchten Cytosine in dem ZH 108T Tumor und 14 der 330 untersuchten Cytosine in dem ZH 105T Tumor. Dies entspricht für beide Proben einem Anteil von 8,5% aller Cytosine die im CpG-Kontext stehen. In den anderen fünf sequenzierten Tumorgewebeproben konnte jedoch eine deutliche Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens detektiert werden. Dies waren im Einzelnen der unifokale pTa Tumor ZH 111T (*high grade*), der multifokale pTa Tumor ZH 148T (*low grade*) sowie die beiden unifokalen pT1 Tumoren H28643-12 (*low grade*) und H00156-13 (*high grade*). Die Hypermethylierung im Promotorbereich schwankt in diesen Proben zwischen 67,6% und 98,2% und ist wie folgt verteilt: In dem ZH 111T Tumor waren 349 der 450 untersuchten Cytosine, die im CpG-Kontext stehen, methyliert. Dies entspricht 77,6% aller CpG-Dinukleotid Positionen und bedeutet, dass nur 22,4% der CpG-Dinukleotide im 5'-regulatorischen Bereich des *ODC1*-Gens unmethyliert in dieser Probe vorliegen. In dem Tumor ZH 148T waren 354 der 450 untersuchten Cytosine, die im CpG-Kontext stehen, methyliert. Dies entspricht 78,7% aller CpG-Dinukleotid Positionen. Auffallend bei dieser Probe ist, dass sich fast die gesamten unmethylierten Cytosine in nur drei der 15 analysierten Sequenzen befinden. Dadurch liegen diese fast vollständig unmethyliert vor. Die anderen 12 Sequenzen hingegen zeigen eine dichte Methylierungssignatur im Promotorbereich. In dem Tumor H28643-12 waren 442 der 450 untersuchten CpG-Positionen methyliert. Dies entspricht 98,2% aller CpG-Dinukleotid Positionen. In dem Tumor H00156-13 wiesen 440 der 450 untersuchten CpG-Dinukleotide eine

Methylierung auf. Dies entspricht 97,8% aller CpG-Dinukleotid Positionen. In dem Tumor ZH 63T lagen 304 der 450 analysierten Cytosine unmethyliert vor. Dies entspricht 67,6% aller CpG-Dinukleotid Positionen. Ähnlich wie in der Probe ZH 148T ist auch in dieser auffallend, dass sich fast alle unmethylierten Cytosine auf fünf Sequenzen verteilen. Hierdurch liegt diese ebenfalls fast komplett unmethyliert vor und die anderen zehn Sequenzen zeigen eine dichte CpG-Methylierung. Auch für den 5'-regulatorischen Bereich des *ODC1*-Gens konnten die Ergebnisse der methylierungsspezifischen Mikroarray-Analyse durch die Bisulfit-Sequenzierung für jede Probe bestätigt werden. Wie für das *AHCY*-Gen bereits beschrieben, scheint auch im Fall des *ODC1*-Gens eine Promotor Hypermethylierung im frühen Harnblasenkarzinom vorzukommen, die jedoch nicht in allen untersuchten Proben gefunden wurde. Auffallend ist hierbei, dass die beiden Tumoren die keine Hypermethylierung zeigen, zur Gruppe der pTa Tumoren gehören. Die späteren pT1 Tumoren hingegen weisen alle diese Veränderung auf.

3.1.3 Einfluss der DNA-Methylierungsveränderungen auf die mRNA-Transkription der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges

Um den Einfluss der DNA-Methylierungsveränderungen auf die Transkription, wie sie durch die methylierungsspezifischen Mikroarray-Analysen aufgezeigt und durch die Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden konnte, zu ermitteln, wurden auf der Seite „*The Cancer Genome Atlas*“ (TCGA; <https://cancergenome.nih.gov/>) mit der dort bereitgestellten Software „*Firebrowse*“ (<http://firebrowse.org/>) die Transkriptionsprofile dieser Gene untersucht. Die TCGA Datenbank enthält die Transkriptionsprofile aller bekannten humanen Gene in diversen Tumorentitäten, die durch die Methode der RNA-Sequenzierung ermittelt und durch das „*Expectation-Maximization*“ Verfahren, wie es von Li und Dewey (2011) beschrieben wurde, analysiert wurden. Für das Harnblasenkarzinom besteht die untersuchte Kohorte aus 408 Tumorproben und 19 gesunden Harnblasengeweben. Die Proben der Tumorpatienten unterteilen sich nach TNM-Klassifikation wie folgt: T0 = 1, T1 = 3, T2 = 119, T3 = 194 und T4 = 58, N0 = 237, N1 = 46, N2 = 75 und N3 = 8. M0 = 196 und M1 = 11 (Robertson *et al.*, 2017). Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten beträgt 68,06 Jahre mit einer Standardabweichung von 11 Jahren.



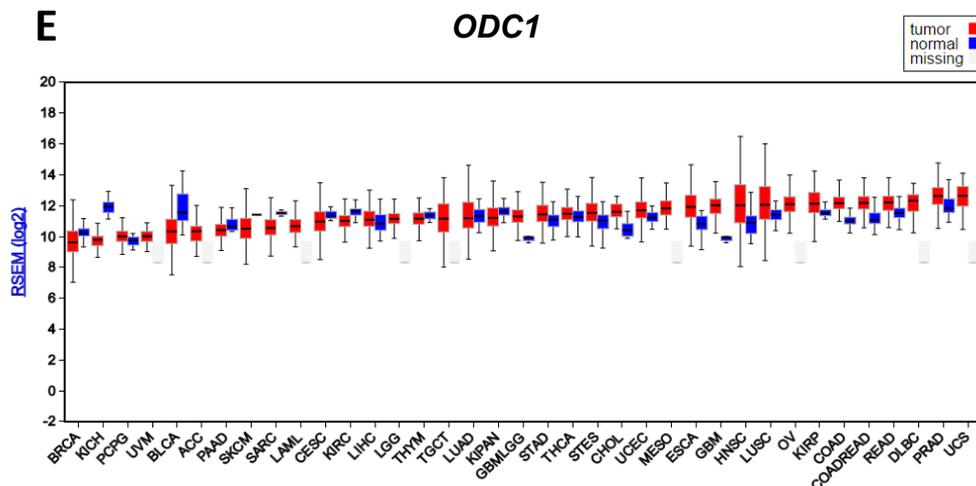


Abbildung 23: Transkriptionsdaten ausgewählter Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges in verschiedenen Tumorentitäten.

Die Abbildung zeigt jeweils den mRNA-Transkriptionsgrad ($X+SD$) der Gene *AHCY* (A), *AHCYL2* (B), *COMT* (C), *MTHFR* (D) und *ODC1* (E) in den verschiedenen untersuchten Tumorentitäten. Diese sind durch die roten Balken im Vergleich zu dem jeweiligen korrespondierenden gesunden Gewebe (blaue Balken) dargestellt. Die mRNA-Transkription wurde durch RNA Sequenzierung quantifiziert und durch das „Expectation-Maximization“-Verfahren analysiert. Die Mittelwerte sind jeweils durch den horizontalen Strich dargestellt. Datenpunkte, die nicht erhoben werden konnten, sind durch die ausgegrauten Balken dargestellt. Das Harnblasenkarzinom wird in der Abbildung jeweils durch das Kürzel BLCA repräsentiert, wobei die Kohorte aus 408 Tumorproben im Vergleich zu 19 gesunden Harnblasengeweben besteht (Robertson *et al.*, 2017).

Von den 408 untersuchten Patienten waren 301 Probanden männlichen und 107 Probandinnen weiblichen Geschlechts. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse für die Gene *AHCY*, *AHCYL2*, *COMT*, *MTHFR*, und *ODC1* der RNA-Sequenzierung nach „Expectation-Maximization“ als \log_2 RSEM dargestellt. Diese Gene wurden deshalb ausgewählt, weil durch die Mikroarray-Analysen im 5'-regulatorischen Bereich eben dieser eine signifikante Hyper- bzw. Hypomethylierung in allen untersuchten Geweben festgestellt werden konnte. In der Abbildung der RNA-Sequenzierungsdaten sind alle Tumoren eines Gewebes, unabhängig ihrer TNM-Klassifikation oder Lokalisation, in einem Blot zusammengefasst. Hierbei sind die 37 verschiedenen Tumorentitäten nach aufsteigender mRNA-Transkription, beginnend mit dem niedrigsten Transkriptionsgrad, des jeweiligen Gens sortiert. Das Harnblasenkarzinom wird durch das Kürzel „BLCA“ („Bladder Urothelial Carcinoma“) repräsentiert. Tumorgewebe werden durch rote Balken und die korrespondierenden gesunden Gewebe durch blaue Balken dargestellt. Die Mittelwerte des Transkriptionsgrades der jeweiligen Gene sind durch einen horizontalen schwarzen Strich angegeben. Gewebearten, für die keine Daten erhoben werden konnten, sind durch ausgegraute Balken dargestellt. Über den Abbildungen ist jeweils angegeben, welches Gen dargestellt wird.

Für das Gen *AHCY* (A) zeigt das Harnblasenkarzinom, im Vergleich zu den Tumoren anderer Gewebe, einen durchschnittlichen Wert für die *AHCY*-mRNA-Transkription. Dieser ist jedoch in den Tumoren höher als in den gesunden Geweben und stellt damit einen Widerspruch zu der in der Mikroarray-Analyse gefundenen Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *AHCY*-Gens dar. Den niedrigsten *AHCY*-mRNA-Transkriptionsgrad zeigt das low grade Gliom (LGG) und den höchsten *AHCY*-Transkriptionsgrad zeigt das Aderhautmelanom (UVM).

Für das Gen *AHCYL2* (B) zeigt das Harnblasenkarzinom den acht niedrigsten mRNA-Transkriptionsgrad, wobei dieser in den Tumoren niedriger als in den gesunden Geweben ist. Dieses Ergebnis korreliert mit der durch die Mikroarray-Analyse gefundenen Hypermethylierung des *AHCYL2*-Promotorbereiches. Den niedrigsten *AHCYL2*-mRNA-Transkriptionsgrad zeigt das diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DBLC) und den höchsten *AHCYL2*-Transkriptionsgrad zeigt das chromophobe Nierenzellkarzinom (KICH). Auffallend für dieses Gen ist auch, dass insgesamt 16 der 37 Tumoren eine niedrigere Transkription im Tumorgewebe zeigen, wodurch das *AHCYL2*-Gen in diesen Tumorentitäten ebenfalls hypermethyliert vorliegen könnte.

Für das Gen *COMT* (C) zeigt das Harnblasenkarzinom den viert höchsten mRNA-Transkriptionsgrad. Wobei dieser, wie bei dem Gen *AHCY*, in den Tumoren höher ist als im gesunden Gewebe. Auch dieses Ergebnis korreliert mit den durch die Mikroarray-Analyse gefundenen Methylierungssignaturen. Für das *COMT*-Gen wurde eine in den Tumor benachbarten Geweben signifikante Veränderung und für die Tumorgewebe mit p-Werten von 0,06 und 0,13 eine Tendenz zur Hypomethylierung des Promotorbereiches gefunden. Den niedrigsten *COMT*-mRNA-Transkriptionsgrad zeigt der Hodenkrebs (TGCT) und den höchsten *COMT*-Transkriptionsgrad zeigt das Aderhautmelanom (UVM).

Für das Gen *MTHFR* (D) zeigt das Harnblasenkarzinom den zweit niedrigsten mRNA-Transkriptionsgrad. Wobei dieser, wie für das Gen *AHCYL2*, in den Tumoren niedriger als in den gesunden Geweben ist. Genau wie für das *AHCYL2* Gen beschrieben, korreliert auch dieses Ergebnis mit der Methylierungssignatur, die mit Hilfe der Mikroarrays gefunden wurde. Den niedrigsten *MTHFR*-mRNA-Transkriptionsgrad zeigt das Gallengangskarzinom (CHOL) und den höchsten *MTHFR*-Transkriptionsgrad zeigt das Aderhautmelanom (UVM).

Für das Gen *ODC1* (E) zeigt das Harnblasenkarzinom den fünft niedrigsten mRNA-Transkriptionsgrad. Analog zu den Genen *AHCLY2* und *MTHFR* ist auch in diesem Fall der Transkriptionsgrad in den Tumoren niedriger als in den gesunden Referenzgeweben. Auffallend hierbei ist jedoch, dass der Unterschied in dem gefunden mRNA-Transkriptionsgrad von den fünf beschriebenen Genen (*AHCY*; *AHCYL2*; *COMT*; *MTHFR* und *ODC1*) für dieses am deutlichsten ausfällt. Die durch die Mikroarray-Analyse gefundene Hypermethylierung im 5'-regulatorischen Bereich des *ODC1*-Gens, stimmt mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung überein. Den niedrigsten *ODC1*-mRNA-Transkriptionsgrad zeigt der Brustkrebs (BRCA) und den höchsten *ODC1*-Transkriptionsgrad zeigen die Uterinen Sarkome (UCS).

Für die anderen neun Gene, die entweder in den unifokalen oder den multifokalen Tumoren eine signifikante Hyper- bzw. Hypomethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches in der Mikroarray-Analyse gezeigt haben, stimmt in fünf Fällen dieses Ergebnis mit denen der RNA-Sequenzierung überein. Dies ist für die Gene *AHCYL1*, *AMD1*, *GNMT*, *PAOX*, und *MAT2A* der Fall. Für drei Gene korrelieren die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse und der RNA Sequenzierung nicht. Dies sind die Gene *DNMT1*, *MGMT* und *SSAT* (*SAT1*). Für das Gen *DNMT3I* konnten die Analyseergebnisse nicht verglichen werden, da bei der Messung der Transkription keine Daten für die gesunden Harnblasengewebe vorliegen. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass der Großteil der gefunden DNA-Methylierungsveränderungen in den 5'-regulatorischen Bereichen der Gene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges mit den mRNA-Transkriptionsprofilen der TCGA Datenbank korrelieren, so dass sich ein Zusammenhang zwischen Hyper- bzw. Hypomethylierung und Transkriptionsrate erkennen lässt.

3.1.4 LINE-1 Hypermethylierung im frühen Harnblasenkarzinom

Um den Einfluss der Veränderungen im 5'-regulatorischen Bereich der einzelnen Gene, wie sie durch die Mikroarray-Analyse gefunden und durch die Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden konnten, auf die Fähigkeit der Zellen die globale Methylierung aufrecht erhalten zu können, zu ermitteln, wurde der LINE-1 Methylierungsstatus innerhalb der verschiedenen Gewebeproben mit Hilfe der „*Real Time*“ PCR bestimmt. Der LINE-1 Methylierungsgrad dient hierbei als Referenz für die globale Methylierung, da diese Elemente mit mehr als 500.000 Kopien im

humanen Genom vorkommen. Dies entspricht einem Anteil von ca. 17% am gesamten Genom (Deininger & Batzer, 2002). Im gesunden Gewebe wird die Transkription der LINE-1 Elemente generell unterdrückt (Haig & Kazazian, 2004). Dies kann durch DNA-Methylierung und / oder durch Bildung einer siRNA erfolgen. Werden die Promotorbereiche der LINE-1 Elemente jedoch hypomethyliert, kann dies zur transkriptionellen Aktivierung führen und letztendlich zu genomischer Instabilität beitragen (Jürgens *et al.*, 1996). Zur Bestimmung des Methylierungsgrades der LINE-1 Elemente wurde das idiolokale Normierungsverfahren angewandt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Quantifizierung der DNA-Methylierung in Proben mit gleicher und ungleicher genetischer Ausstattung, wie sie z.B. in Tumoren gefunden werden kann (Santourlidis *et al.*, 2016). Diese weisen oftmals genetische Aberrationen und chromosomale Anomalien auf und sind beim Harnblasenkarzinom bereits für die frühen Stadien (pTa und pT1) beschrieben (Simon *et al.*, 1998). Zur Bestimmung des LINE-1 Methylierungsgrades wurde dieser für jede Probe in Dreifachbestimmung mit Hilfe der „Real Time“ MSPCR gemessen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem ungepaarten Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 24 dargestellt, wobei die gesunden Gewebe durch die blauen und die Tumorgewebe durch die roten Balken dargestellt werden. Die untersuchte Probenkohorte besteht aus den vier gesunden Harnblasengewebeproben Ac-1, Ac-3, 1229-4 und H35396, den drei Tumor benachbarten aber pathologisch als gesund bewerteten Gewebeproben H16840-10, H30833-11 und H29799-10, den fünf unifokalen pTa Tumoren H30833-11 (*low grade*), H28923-12 (*low grade*), ZH 108T (*low grade*), ZH 105T (*high grade*) und ZH 111T (*high grade*), den vier unifokalen pT1 Tumoren H28643 (*low grade*), ZH 151T (*high grade*), H29986-12 (*high grade*) und H00156-13 (*high grade*), dem unifokalen pT3 Tumor H27794-08 (*low grade*), den drei multifokalen pTa Tumoren ZH 51T (*low grade*), ZH 148T (*low grade*) und ZH 84T (*high grade*) und den zwei multifokalen *high grade* pT1 Tumoren ZH 63T und ZH 103T. Von jeder Probe wurden 500ng DNA zur Bisulfit Konvertierung eingesetzt. In der Abbildung 24 sind zunächst die gesunden Gewebe und darauf folgend die Tumorgewebe nach aufsteigender T-Klassifikation dargestellt. Zusätzlich wurden die Tumorgewebe nach unifokaler und multifokaler Lokalisation getrennt. Zuerst werden die unifokalen Tumoren, beginnend bei pTa H30833-11 bis pT3 H27784-08, dargestellt und dann die multifokalen, beginnend bei pTa ZH 51T und endend bei

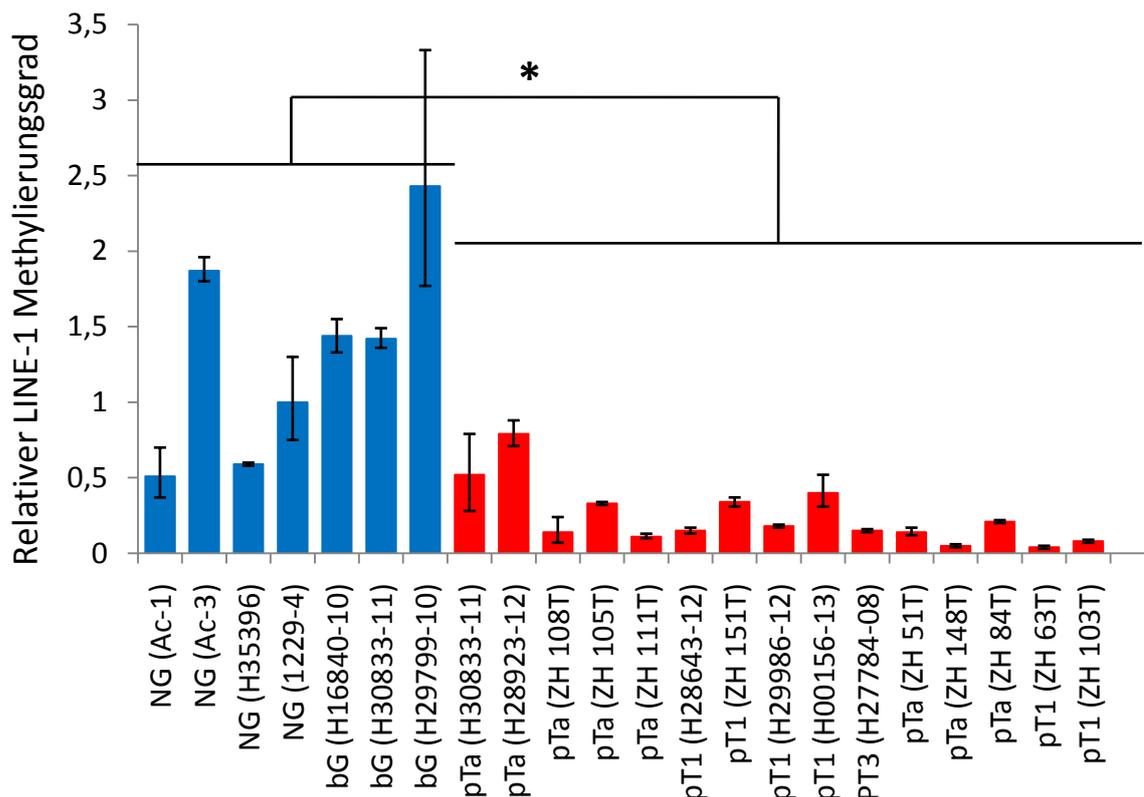


Abbildung 24: Relative Quantifizierung des Methylierungsgrades der LINE-1 Retrotransposons in zellulärer DNA, isoliert aus Harnblasengewebeproben.

Der LINE-1 Methylierungsgrad wurde aus zellulärer DNA von gesunden Harnblasengewebe bzw. Tumor benachbarten Arealen, die jedoch pathologisch als gesund definiert wurden, und Harnblasenkarzinomgewebe bestimmt. Die gesunden Gewebe sind durch die blauen Balken und die Tumorgewebe durch die roten Balken dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels idiolokal normierter „Real Time“ MSPCR (X+SD) (Santourlidis *et al.*, 2016), wobei das gesunde Gewebe 1229-4 als Referenz dient. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

pT1 ZH 103T. Als Referenz für alle Messwerte diente das gesunde Harnblasengewebe 1229-4. Die Messwerte der relativen Quantifizierung des LINE-1 Methylierungsgrades, nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, schwanken zwischen 0,04 und 2,43. Auffallend ist, dass alle Tumorproben, mit Ausnahme der beiden unifokalen *low grade* pTa Tumoren H30833-11 und H28923-12, einen relativen Methylierungsgrad der LINE-1 Retrotransposons von $<0,5$ aufweisen. Die beiden pTa Proben hingegen zeigen mit den relativen Werten von 0,52 (H30833-11) und 0,79 (H28323-12) einen vergleichbaren bzw. sogar höheren Methylierungsgrad als die gesunden Gewebe. Für die gesunden Gewebeprobe ergibt sich über alle Proben der Mittelwert MW = 1,32 des LINE-1 Methylierungsgrades mit einer Standardabweichung von SD = 0,68. Hierbei zeigt die Probe des gesunden Tumor benachbarten Gewebes H29799-10 mit 2,43 den höchsten Wert für die DNA-

Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich der LINE-1 Retrotransposons aller untersuchten Proben. Der Mittelwert über alle gemessenen Tumorproben ist $MW = 0,24$ mit einer Standardabweichung von $SD = 0,19$. Wenn die beiden bereits erwähnten pTa Tumorproben, welche einen deutlich höheren Methylierungsgrad aufweisen, aus dieser Analyse ausgeschlossen werden, ist der Mittelwert $MW = 0,17$ mit einer Standardabweichung von $SD = 0,11$. Wie für die Standardabweichungen bei den „peak scores“ der Mikroarray-Analyse beschrieben, kann die hohe Varianz der Messdaten auf die Entartung und die damit einhergehende chromosomale und genetische Heterogenität der Tumoren und der Tumor benachbarten Areale zurückzuführen sein. Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mittels ungepaartem Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Der Vergleich der Messdaten für die gesunden Gewebe mit den Tumorproben ergab einen p-Wert von $p = 0,0001$. Hierdurch konnte eine signifikante Hypomethylierung der LINE-1 Retrotransposons in den untersuchten Tumorgeweben nachgewiesen werden.

3.2 Funktionelle Bedeutungen der gefundenen aberranten Methylierung an den Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges

3.2.1 Bestätigung der Promotoraktivität der 5'-regulatorischen Bereiche der Gene *AHCY* und *ODC1*

Um den Einfluss der durch die Mikroarray-Analyse gefundenen und durch die Bisulfit-Sequenzierung bestätigten DNA-Methylierungsveränderungen im 5'-regulatorischen Bereich der Gene *AHCY* und *ODC1* zu ermitteln, sollte die Promotoraktivität der sequenzierten Bereiche in einem Luciferase Assay gemessen werden. Ebenfalls sollte durch die Analyse der Promotoraktivität die Korrelation zwischen den Methylierungsveränderungen, wie sie durch die Mikroarray-Analyse detektiert wurden, und den mRNA-Transkriptionsprofilen der TCGA Datenbank weitergehend untersucht werden. Als Zelllinienmodell wurde die embryonale Nierenepithelzelllinie HEK 293T, welche durch die Transfektion mit Adenoviren immortalisiert wurde, ausgewählt. Von jedem Promotorfragment wurden für jedes transfizierte Vektorkonstrukt vier technische und drei biologische Replikate erstellt und gemessen. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse des Luciferase Assays dargestellt.

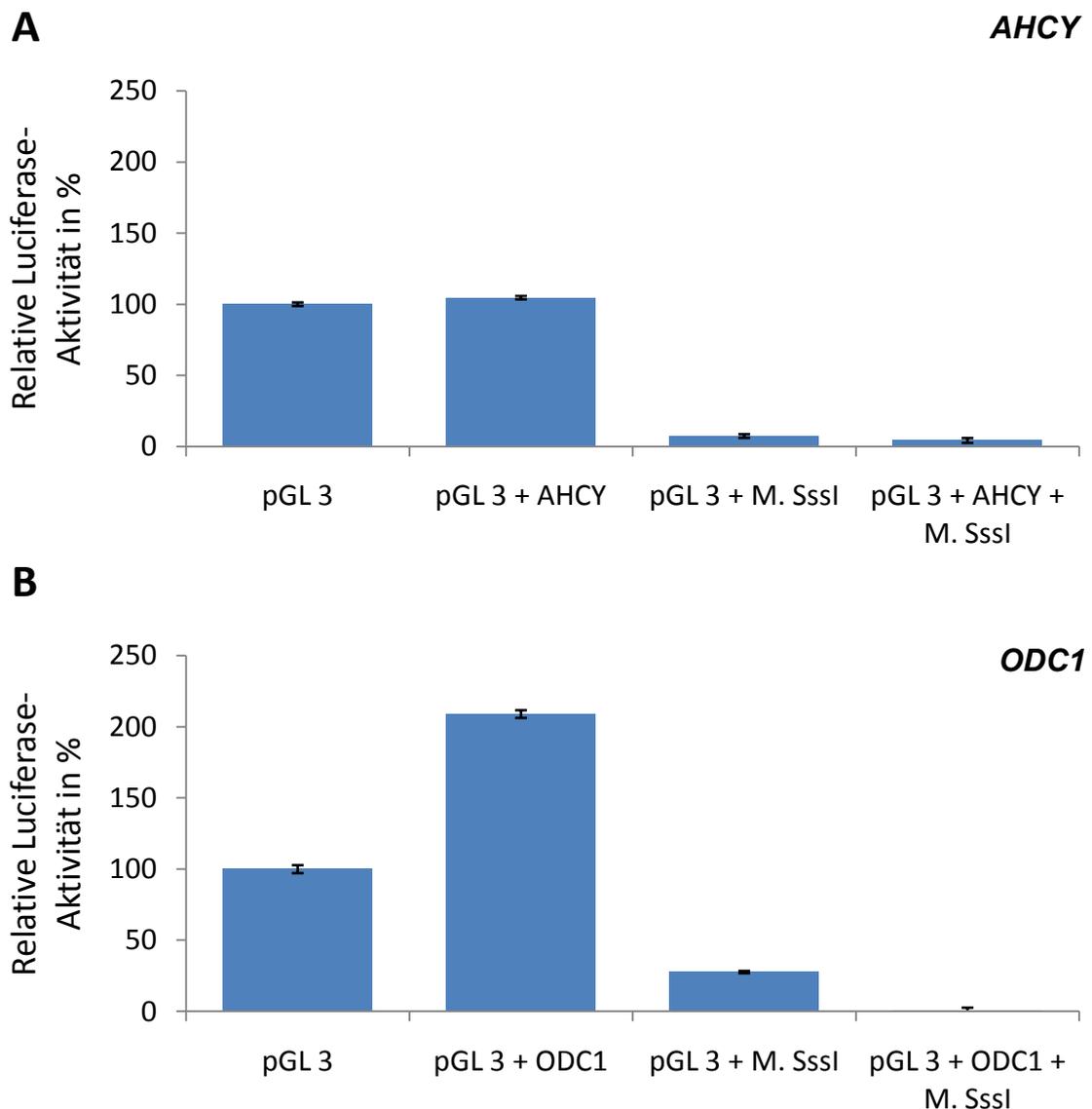


Abbildung 25: Messung der Promotoraktivität für die 5'-regulatorischen Bereiche der Gene *AHCY* und *ODC1* in der Zelllinie HEK 293T mittels Luciferase Assay.

Die embryonale Nierenepithelzelllinie HEK 293T wurde jeweils mit 50ng der folgenden Vektorkonstrukte transfiziert: pGL3basic Vektor, pGL3 + 5'-regulatorischer Bereich der Gene *AHCY* (A) / *ODC1* (B) ohne Methylierung und beide Vektoren jeweils in vitro methyliert durch die M. Sssl Methyltransferase. Als Referenz für die Transfektionseffizienz dient der pTK-Green Renilla Luc Vektor. Die relative Luciferase-Aktivität (X+SD) wurde gemessen und ist in der Abbildung in Prozent, bezogen auf den unmethylierten pGL3-Vektor, angegeben.

Angegeben in Prozent ist immer die relative Luciferase-Aktivität bezogen auf den unmethylierten pGL3-Vektor. Die relative Luciferase-Aktivität des pGL3-Vektors wurde hierbei auf 100% festgelegt. Wie in Abbildung 25 A dargestellt, konnte keine erhöhte Luciferase-Aktivität für das *AHCY*-Promotorfragment festgestellt werden. Die gemessene relative Luciferase-Aktivität liegt in diesem Fall, im Vergleich zu dem pGL3basic Vektor, bei 104,6% mit einer Standardabweichung von 1,2%. Somit weist

der durch die Bisulfit-Sequenzierung analysierte 5'-regulatorische Bereich des *AHCY*-Gens in diesem Luciferase Assay Experiment eine sehr schwache bis keine Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität auf. Im Vergleich zu den beiden unmethylierten Konstrukten zeigen die durch die Methyltransferase M. Sssl „*in vitro*“ methylierten Vektoren eine deutlich reduzierte Luciferase-Aktivität. Hierbei ist die Aktivität der Luciferase für den methylierten pGL3basic Vektor um 92,6% – die relative Aktivität liegt also bei 7,4% mit einer Standardabweichung von 1,3% – und die des pGL3basic Vektors mit *AHCY* Promotorfragment um 95,8% – die relative Aktivität liegt somit bei 4,2% mit einer Standardabweichung von 1,7% – reduziert.

In Abbildung 25 B ist das Luciferase Experiment für den 5'-regulatorischen Bereich des *ODC1*-Gens dargestellt. Im Gegensatz zu dem *AHCY* Promotorfragment weist der pGL3basic Vektor mit dem *ODC1* Promotorfragment eine deutlich erhöhte Luciferase-Aktivität auf. Diese ist mit 209,1% zweimal so hoch. Durch dieses Ergebnis ist also davon auszugehen, dass der untersuchte 5'-regulatorische Bereich des *ODC1*-Gens in der Zelllinie HEK 293T über eine Promotoraktivität verfügt und somit die Transkription regulieren kann. Zusätzlich lässt sich durch die „*in vitro*“ methylierten Konstrukte zeigen, dass die Methylierung in diesem Bereich zu einer verringerten Genexpression führt, da die relative Luciferase-Aktivität für den „*in vitro*“ methylierten pGL3basic Vektor um 72,3% mit einer Standardabweichung von 0,8% und für den methylierten pGL3basic Vektor mit *ODC1* Promotorfragment um sogar 99,77% mit einer Standardabweichung von 2,5% reduziert ist.

3.2.2 Funktionelle Bedeutung der Methylierungsveränderungen im 5'-regulatorischen Bereich des Schlüsselgens *ODC1* für die zelluläre Integrität und das Zellschicksal

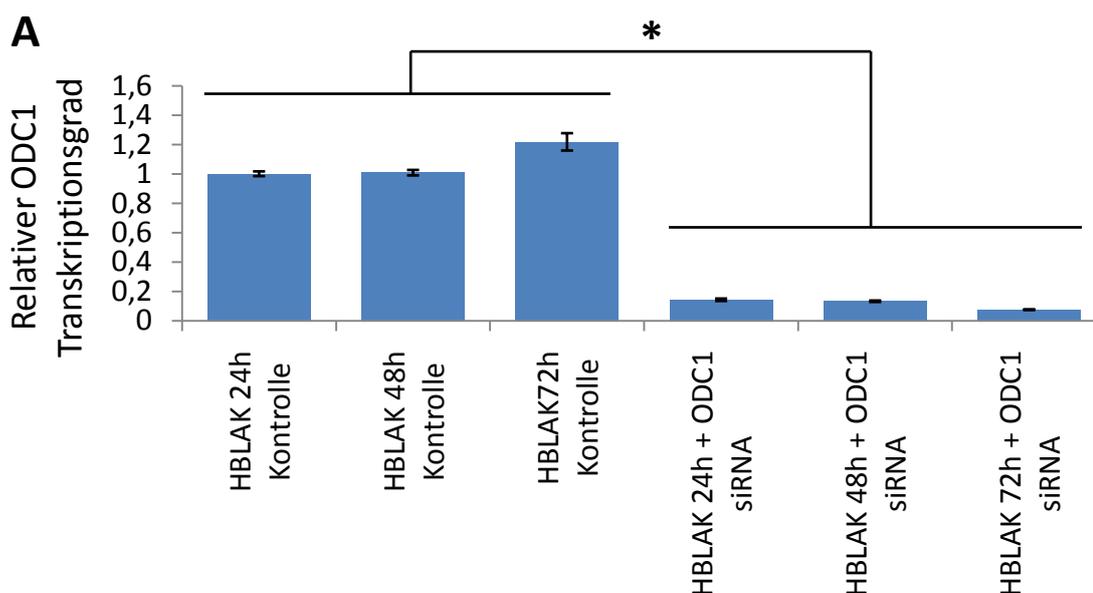
Um die funktionelle Bedeutung der Promotorhypermethylierung an den Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges hinsichtlich der zellulären Integrität und des Zellschicksals nachvollziehen zu können, sollte der reprimierende Effekt, der für die DNA-Methylierung untersucht ist (Kim *et al.*, 2002), mit Hilfe von siRNA gegen das Schlüsselgen *ODC1* nachempfunden werden. Das Gen *ODC1* kodiert für die Ornithin-Decarboxylase, welche aus L-Ornithin das Diamin Putrescin synthetisiert und damit die limitierende Reaktion des gesamten Polyaminstoffwechselweges darstellt (Park & Igarashi, 2013). Es ist somit von fundamentaler Bedeutung für die Fähigkeit der Zellen, die physiologische

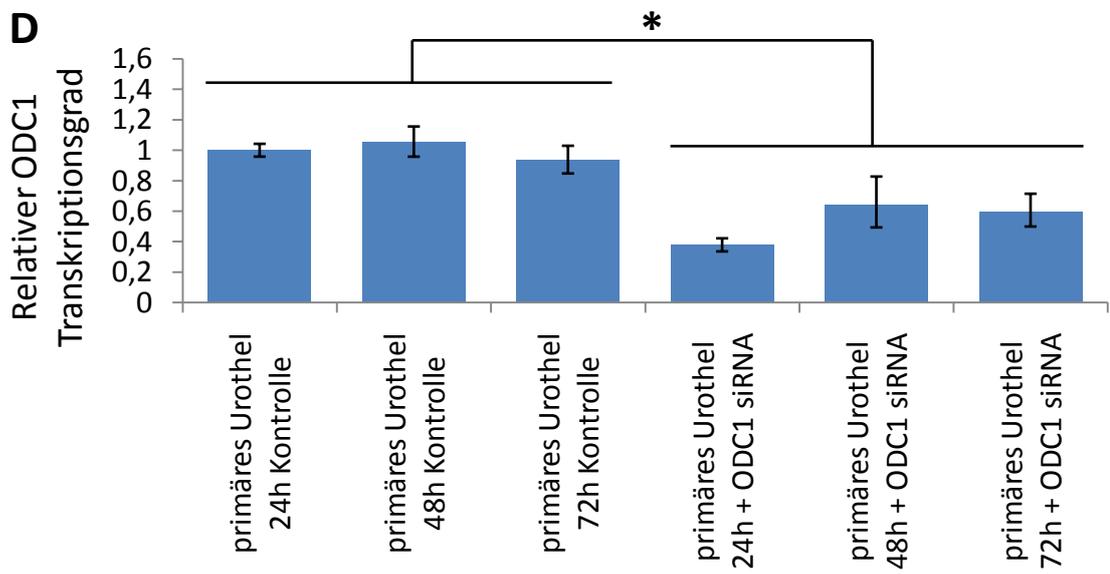
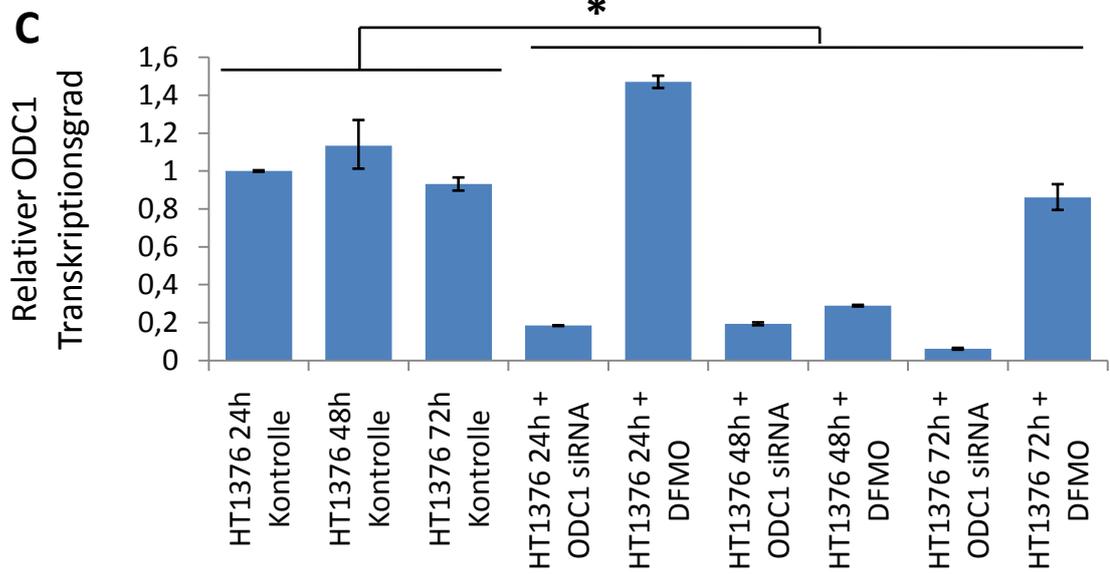
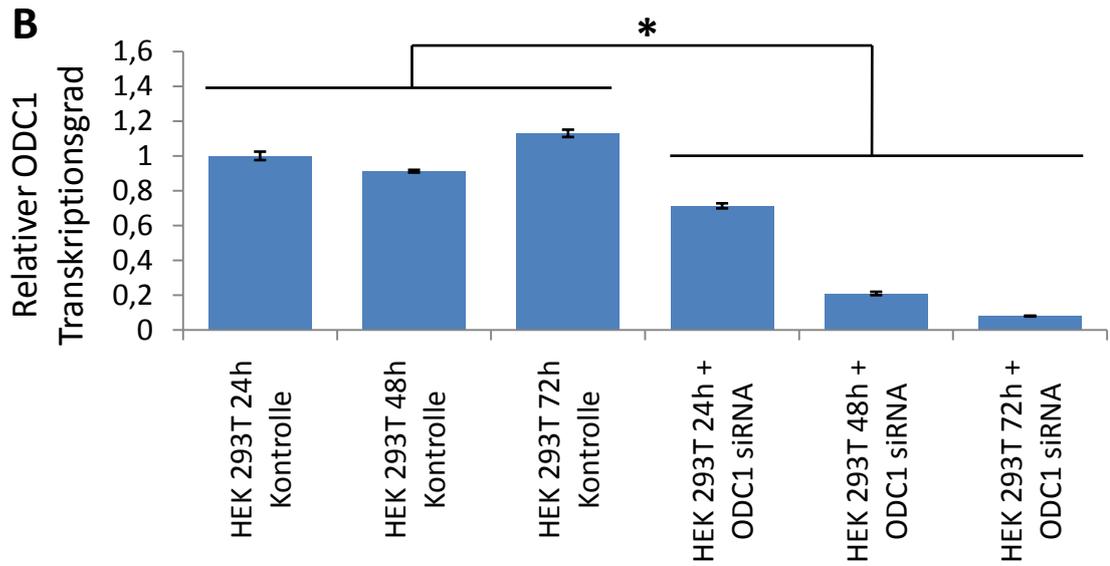
Konzentration an dcSAM, welcher ein starker Inhibitor der DNA-Methylierung ist, aufrecht zu erhalten (Kim *et al.*, 2002; Pegg, 2010). Darüber hinaus wurde das Gen *ODC1* aus dem Grund ausgewählt, da es in den Mikroarray-Analysen für alle untersuchten Gewebearten (UT, ubG, MT und mbG) signifikante Methylierungsveränderungen im 5'-regulatorischen Bereich gezeigt hat, welche ebenfalls durch eine zweite unabhängige Methode der Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden konnte. Zudem konnte die funktionelle Relevanz des in den Experimenten für die globalen Analysen untersuchten Promotorbereiches für die transkriptionelle Expression des *ODC1*-Gens in einem Luciferase Assay gezeigt werden. Im Einklang dazu zeigen die RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank zusätzlich eine signifikante Reduktion der *ODC1*-mRNA-Transkription. Alle nachfolgenden Versuche sind mit der „*siGENOME SMARTpool*“ siRNA gegen *ODC1* der Firma Dharmacon und dem irreversiblen Hemmstoff der Ornithin-Decarboxylase DFMO der Firma Merck durchgeführt worden. Als Kontrolle diente, ebenfalls von der Firma Dharmacon, die „*siGENOME Non-Targeting*“ siRNA Pool #2. Für diese Analysen wurden verschiedene urotheliale Zelllinien ausgewählt: die aus primären Urothelzellen gewonnene, spontan immortalisierte HBLAK, die embryonale Nierenepithelzelllinie HEK 293T, die Übergangszellkarzinom Zelllinie HT 1376, primäre Harnleiterzellen, die bei einer Nierenresektion gewonnen wurden, und die Übergangszellkarzinom Zelllinien SW1710 und VMCub1. Von den siRNAs wurden jeweils 40pmol mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen in die Zellen eingebracht oder die Zellen wurden mit 15 µmol DFMO kultiviert. Die Behandlung der Zelllinien erfolgte über 72h, wobei die Zellen alle 24h mit der siRNA retransfiziert wurden. Die Analysen der Effekte der siRNA Behandlung erfolgten zu drei verschiedenen Zeitpunkten: nach 24h, nach 48h und nach 72h. Hierfür wurden jeweils zu den verschiedenen Zeitpunkten die DNA, die RNA und die Proteine aus den Zelllinien isoliert und für die nachfolgenden Analysen benutzt.

3.2.2.1 Überprüfung der erfolgreichen Repression des *ODC1* Genproduktes

Die Überprüfung der erfolgreichen Repression des *ODC1*-Genproduktes erfolgte über zwei verschiedene Analysen. Zum einen geschah dies durch Bestimmung des *ODC1*-Transkriptionsgrades. Hierfür wurde aus den behandelten Zelllinien die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer „*Real Time*“ PCR konnte dann der Transkriptionsgrad in Dreifachbestimmung für jeden untersuchten Zeitpunkt ermittelt werden. Normiert wurde mit dem „*housekeeping*“ Gen *GAPDH*

und als Referenz diente jeweils die Kontrollprobe nach 24h. Zum anderen wurde die Zellzahl der Zelllinien mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden, unter einem inversen Labormikroskop der Firma Leica, die Zellen pro Quadrat für vier große Eckquadrate ausgezählt. Die statistischen Analysen erfolgten mit dem ungepaarten Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Die Ergebnisse der Messung des *ODC1*-Transkriptionsgrades sind in Abbildung 26 innerhalb der untersuchten Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW1710 (E) und VMCub1 (F) dargestellt. Hierbei sind in jeder Abbildung zunächst die Kontrollen für alle drei Zeitpunkte, gefolgt von den drei mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben sowie jeweils, in den Abbildungen C und F, die mit DFMO behandelten Zellen, dargestellt. Die Messwerte der relativen Quantifizierung des *ODC1*-Transkriptionsgrades, nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, schwanken zwischen 0,02 und 1,53. Die höchste *ODC1*-Transkription konnte in der Zelllinie VMCub1 nach 72h Behandlung mit DFMO gemessen werden und der niedrigste Wert in der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten 48h Probe derselben Zelllinie. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Messwerte für die Kontrollen aller untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der VMCub1, jeweils um den Wert 1 schwanken.





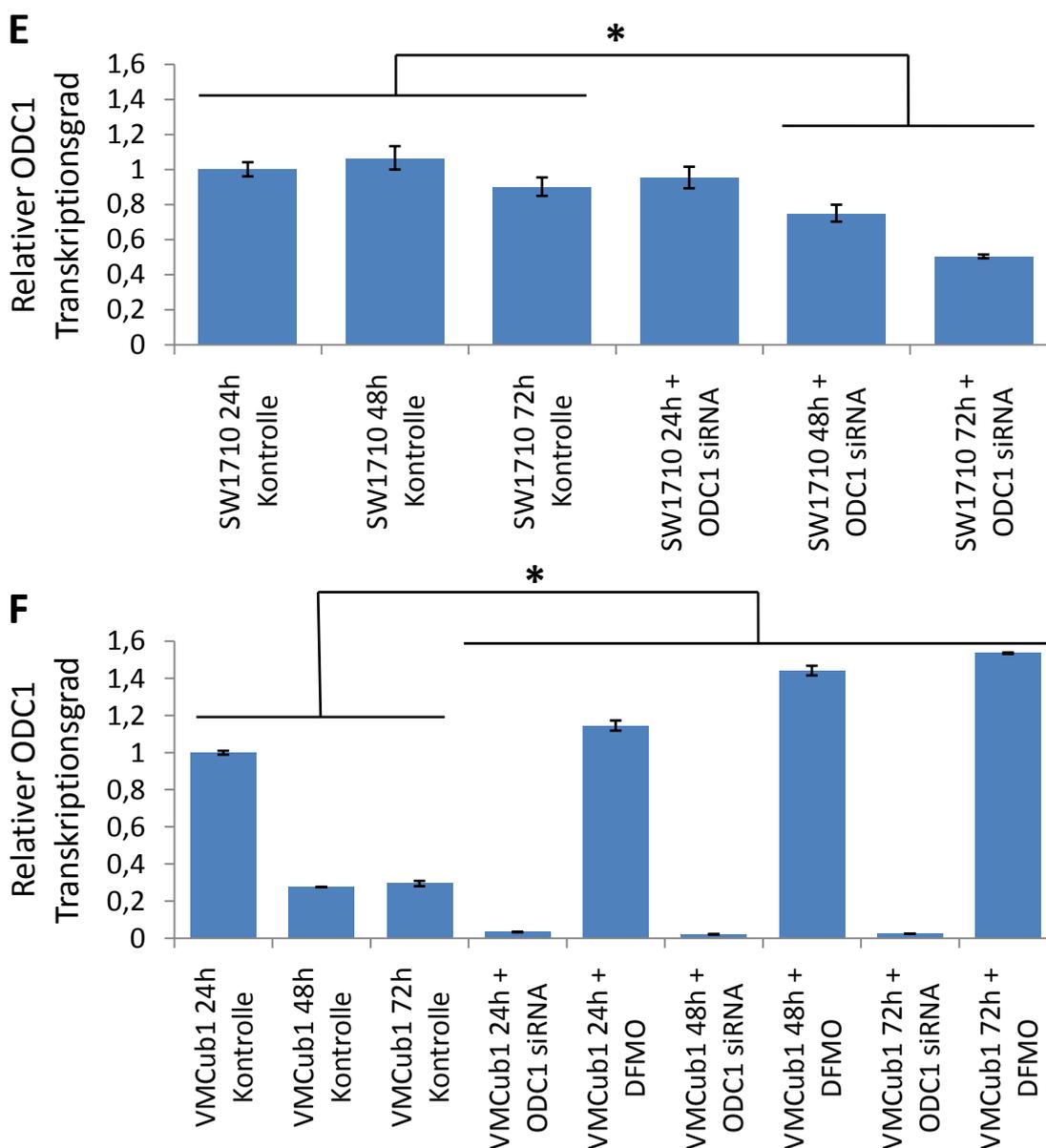


Abbildung 26: Relative Quantifizierung des Transkriptionsgrades des *ODC1*-Gens in den verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen *ODC1* und DFMO Behandlung.

Die Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW 1710 (E) und VMCub1 (F) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert oder mit 15 μ mol DFMO kultiviert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 24h, 48h und 72h lysiert und die RNA isoliert. Der *ODC1* Transkriptionsgrad wurde aus der RNA, der mit siRNA gegen *ODC1* oder DFMO behandelten Zelllinien und den korrespondierenden Kontrollen, behandelt mit einer „non targeting“ siRNA, mittels „Real Time“ PCR bestimmt. Alle Messwerte sind für die Zeitpunkte nach 24h, 48h und 72h in Dreifachbestimmung (X+SD) erfolgt. Hierbei dient jeweils die 24h Kontrolle als Referenz. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Die Messwerte der mit „non targeting“ transfizierten Kontrollen liegen, mit einem Mittelwert von MW = 0,93 und einer Standardabweichung von SD = 0,23, zwischen 0,27 (VMCub1) und 1,2 (HBLAK). Es ist ebenfalls auffallend, dass die Messwerte des *ODC1*-Transkriptionsgrades für alle untersuchten Zelllinien, die mit siRNA gegen *ODC1* behandelt wurden, deutlich unter den Messwerten der Kontrollen liegen. Die

einzigste Ausnahme stellt hierbei die 24h Probe der Zelllinie SW1710 mit einem relativen Wert von 0,95 für die *ODC1*-Transkription dar. Die Messwerte aller anderen Zelllinien, die mit siRNA gegen *ODC1* behandelt wurden, liegen, mit einem Mittelwert von MW = 0,32 und einer Standardabweichung von SD = 0,29, in einem Bereich von 0,02 (VMCub1) bis 0,74 (SW 1710). Wie in Abbildung 26 dargestellt, ergibt sich durch die statistische Betrachtung der Messwerte in jeder der untersuchten Zelllinien eine signifikante Repression des *ODC1*-Transkriptionsgrades durch die siRNA Behandlung, mit Ausnahme der Zelllinie SW 1710 nach 24h Behandlung. Die p-Werte des Vergleiches zwischen den Kontrollen und den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben für die Messdaten nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode sind im Einzelnen: für die Zelllinie HBLAK (A): $p = 0,0002$, für die Zelllinie HEK 293T (B): $p = 0,02$, für die Zelllinie HT 1376 (C): $p = 0,002$, für das primäre Urothel (D): $p = 0,006$, für die Zelllinie SW 1710 (E): $p = 0,04$ und für die Zelllinie VMCub1 (F): $p = 0,01$. Die mit DFMO behandelten Zellen (Abbildung 26 C + F) zeigen im Gegensatz dazu eine deutlich höhere *ODC1*-Transkription im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die einzige Ausnahme stellt hierbei die nach 48 h mit DFMO behandelte Probe der Zelllinie HT 1376 mit einem relativen Wert von 0,29 dar. Die Messwerte aller anderen Proben die mit DFMO behandelt wurden liegen in einem Bereich von 0,86 (HT 1376) bis 1,53 (VMCub1), mit einem Mittelwert von MW = 1,28 und einer Standardabweichung von SD = 0,28. Wie in Abbildung 26 dargestellt, ergibt sich durch die statistische Betrachtung der Messwerte in der Zelllinie VMCub1 eine signifikante Zunahme des *ODC1*-Transkriptionsgrades durch die DFMO Behandlung. Der p-Wert für die Messdaten nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ergibt in der Zelllinie VMCub1 (F): $p = 0,03$ und in der Zelllinie HT 1376 (C): $p = 0,69$.

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW 1710 (E) und VMCub1 (F) sind in Abbildung 27 dargestellt. Hierbei sind die zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils gezählten Zellzahlen prozentual in Bezug auf die korrespondierende Kontrolle angegeben. Die Kontrollen der Zeitpunkte 24h, 48h und 72h sind dabei jeweils auf 100% gesetzt. Im Vergleich dazu ergeben sich für die mit siRNA gegen *ODC1* und DMFO behandelten Zellen die folgenden absoluten und prozentualen Werte:

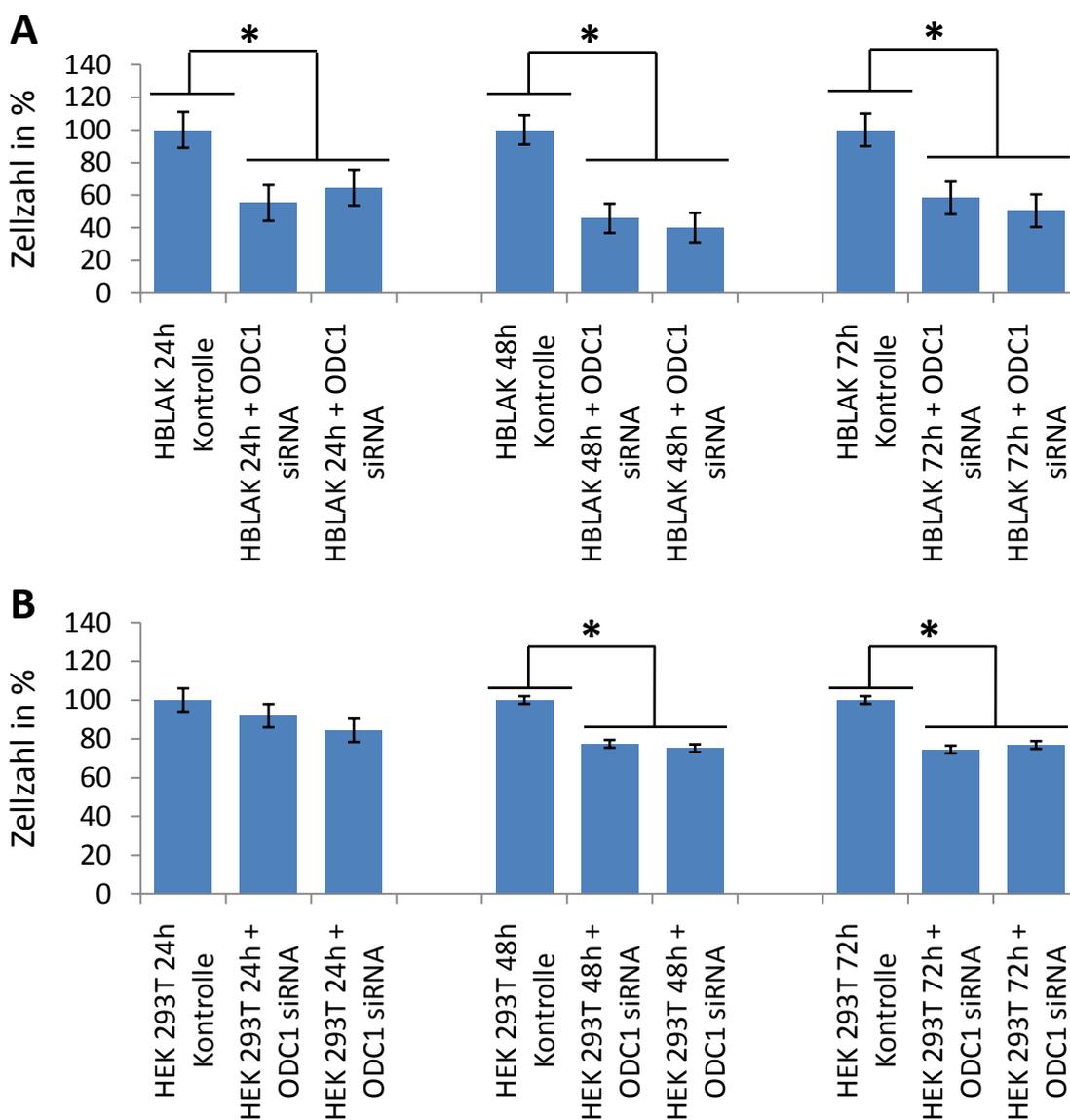
Für die Zelllinie HBLAK:	24h Kontrolle:	425.000 / 100%
	48h Kontrolle:	785.000 / 100%
	72h Kontrolle:	960.000 / 100%
	24h + <i>ODC1</i> siRNA:	235.000 / 55,3% + 275.000 / 64,7%
	48h + <i>ODC1</i> siRNA:	360.000 / 45,9% + 315.000 / 40,1%
	72h + <i>ODC1</i> siRNA:	560.000 / 58,3% + 485.000 / 50,5%
Für die Zelllinie HEK:	24h Kontrolle:	2.650.000 / 100%
	48h Kontrolle:	2.190.000 / 100%
	72h Kontrolle:	2.740.000 / 100%
	24h + <i>ODC1</i> siRNA:	2.435.000 / 91,9% + 2.235.000 / 84,3%
	48h + <i>ODC1</i> siRNA:	1.695.000 / 77,4% + 1.645.000 / 75,1%
	72h + <i>ODC1</i> siRNA:	2.040.000 / 74,4% + 2.105.000 / 76,8%
Für die Zelllinie HT1376:	24h Kontrolle:	755.000 / 100%
	48h Kontrolle:	1.060.000 / 100%
	72h Kontrolle:	1.070.000 / 100%
	24h + <i>ODC1</i> siRNA:	310.000 / 41,1% + 340.000 / 45 %
	48h + <i>ODC1</i> siRNA:	455.000 / 42,9% + 525.000 / 49,5%
	72h + <i>ODC1</i> siRNA:	495.000 / 46,3% + 470.000 / 43,9 %
	24h + DFMO:	435.000 / 57,62%
	48h + DFMO:	620.000 / 58,59 %
	72h + DFMO:	540.000 / 50,46 %

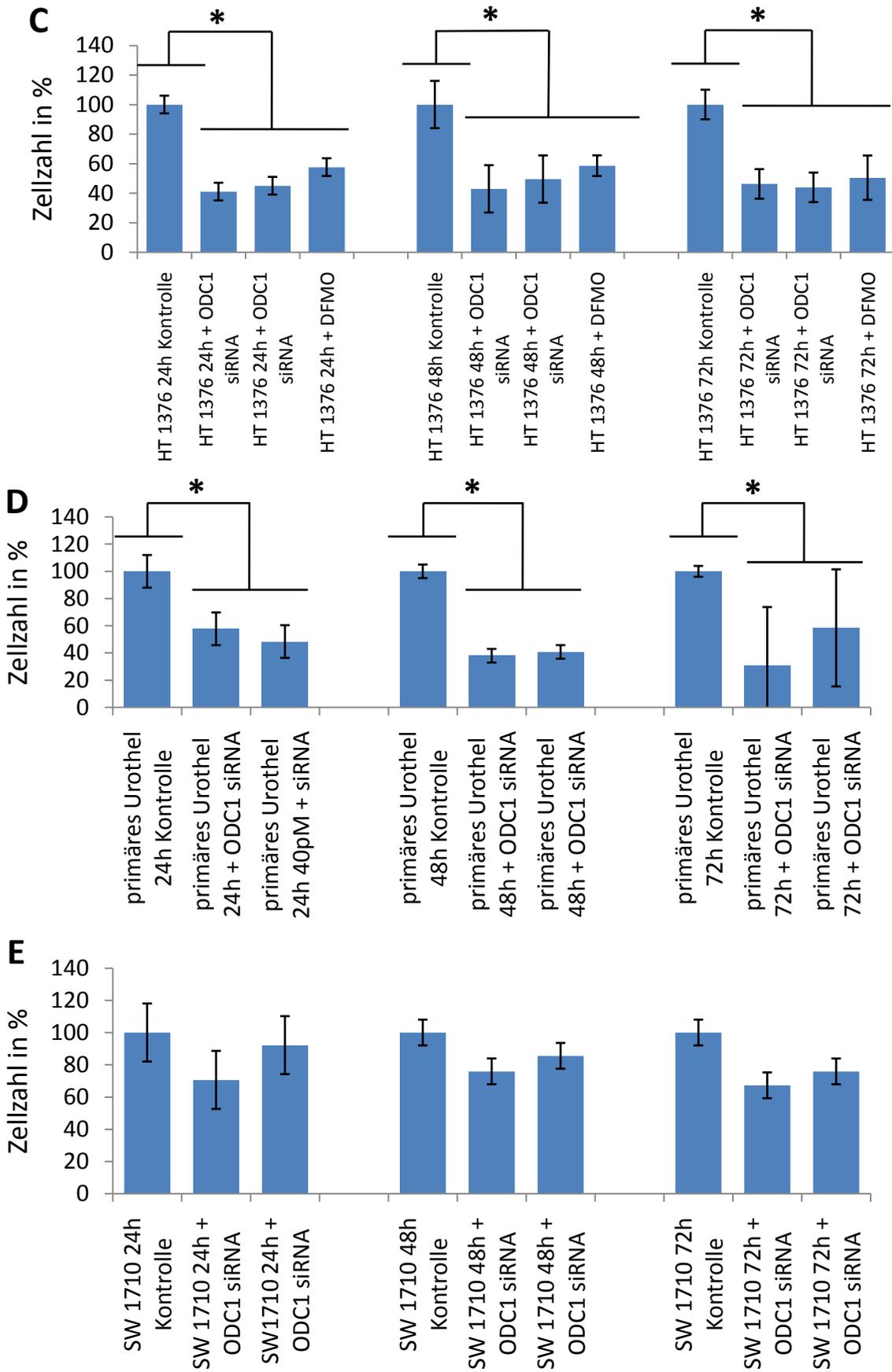
Für das primäre Urothel: 24h Kontrolle: 320.000 / 100 %
 48h Kontrolle: 355.000 / 100 %
 72h Kontrolle: 325.000 / 100 %
 24h + *ODC1* siRNA: 185.000 / 57,8% + 155.000 / 48,4%
 48h + *ODC1* siRNA: 135.000 / 38% + 145.000 / 40,9%
 72h + *ODC1* siRNA: 100.000 / 30,8% + 190.000 / 58,5%

Für die Zelllinie SW1710: 24h Kontrolle: 255.000 / 100%
 48h Kontrolle: 415.000 / 100%
 72h Kontrolle: 580.000 / 100%
 24h + *ODC1* siRNA: 180.000 / 70,6% + 235.000 / 92,2%
 48h + *ODC1* siRNA: 315.000 / 75,9% + 355.000 / 85,5%
 72h + *ODC1* siRNA: 390.000 / 67,2% + 440.000 / 75,9%

Für die Zelllinie VMCub1: 24h Kontrolle: 420.000 / 100%
 48h Kontrolle: 525.000 / 100%
 72h Kontrolle: 630.000 / 100%
 24h + *ODC1* siRNA: 215.000 / 51,19%
 48h + *ODC1* siRNA: 310.000 / 59,09%
 72h + *ODC1* siRNA: 365.000 / 57,94%
 24h + DFMO: 160.000 / 38,1%
 48h + DFMO: 455.000 / 86,67%
 72h + DFMO: 505.000 / 80,16%

Die statistische Auswertung der Zellzahlen ergibt, dass in allen Zelllinien durch die Behandlung mit der siRNA gegen *ODC1* oder mit DFMO eine signifikant niedrigere Anzahl an Zellen bestimmt werden konnte, mit Ausnahme der Zelllinie SW 1710 für alle drei untersuchten Zeitpunkte und der Zelllinie HEK 293T für den Zeitpunkt nach 24h. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen der Bestimmung des *ODC1*-Transkriptionsgrades aus der RNA (vgl. Abbildung 26). Die p-Werte sind im Einzelnen: HBLAK: p = 0,02; HEK 293T: p = 0,05; HT 1376: p = 0,0001; primäres Urothel: p = 0,0006, SW 1710: p = 0,28 und VMCub1: p = 0,04.





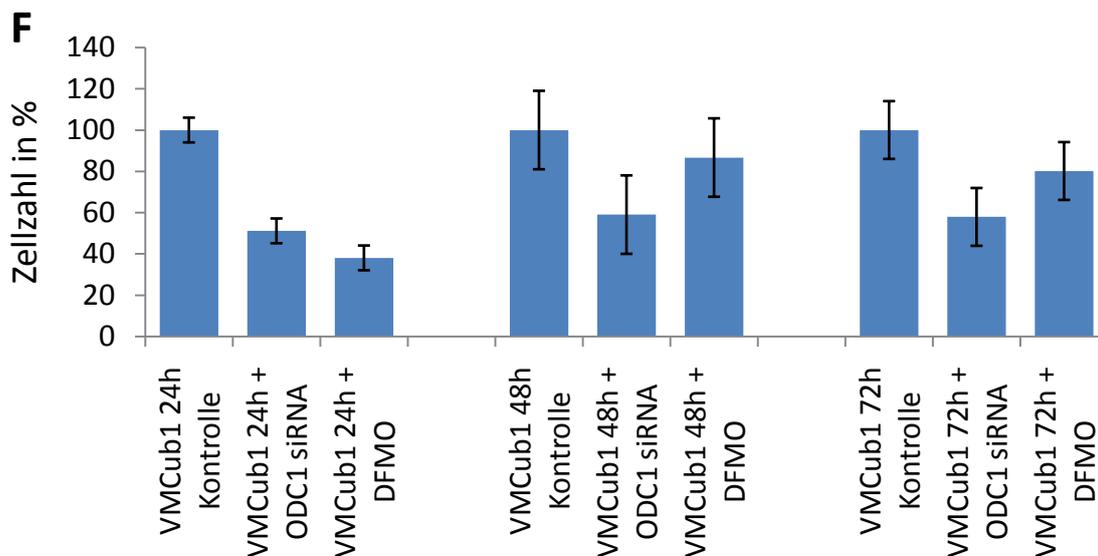


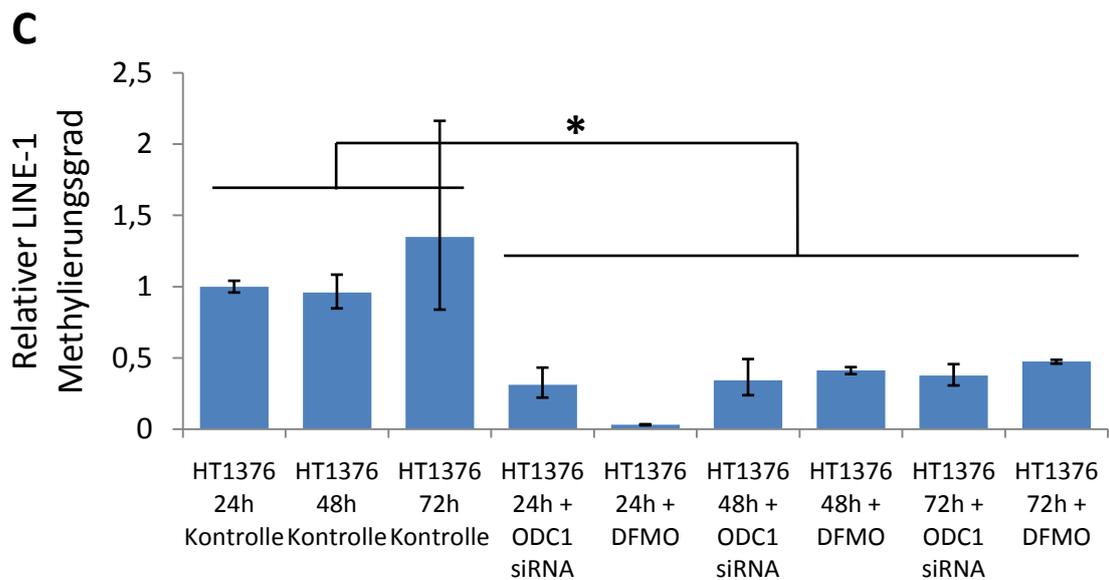
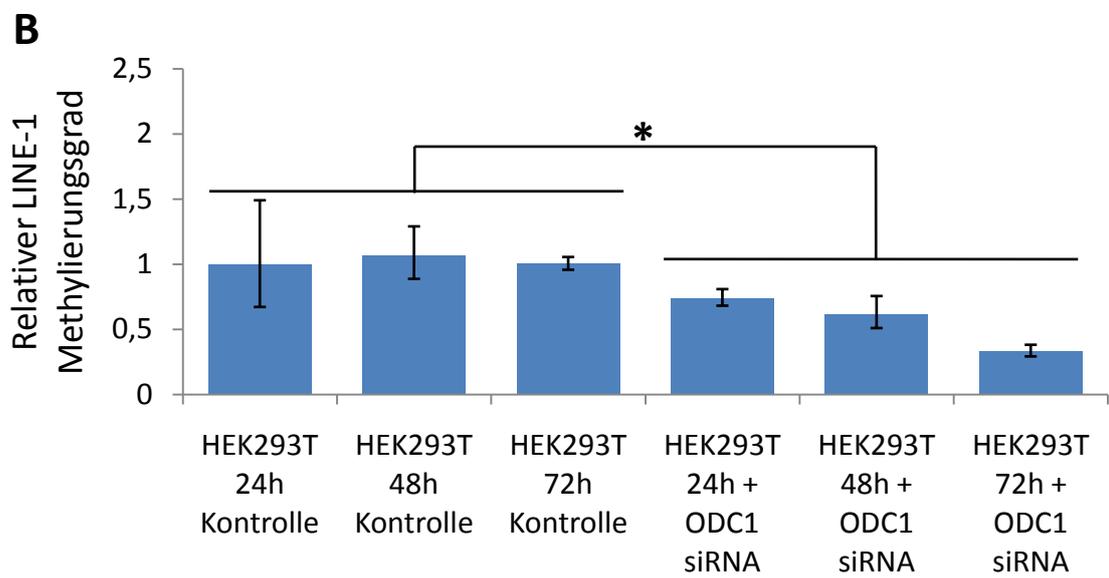
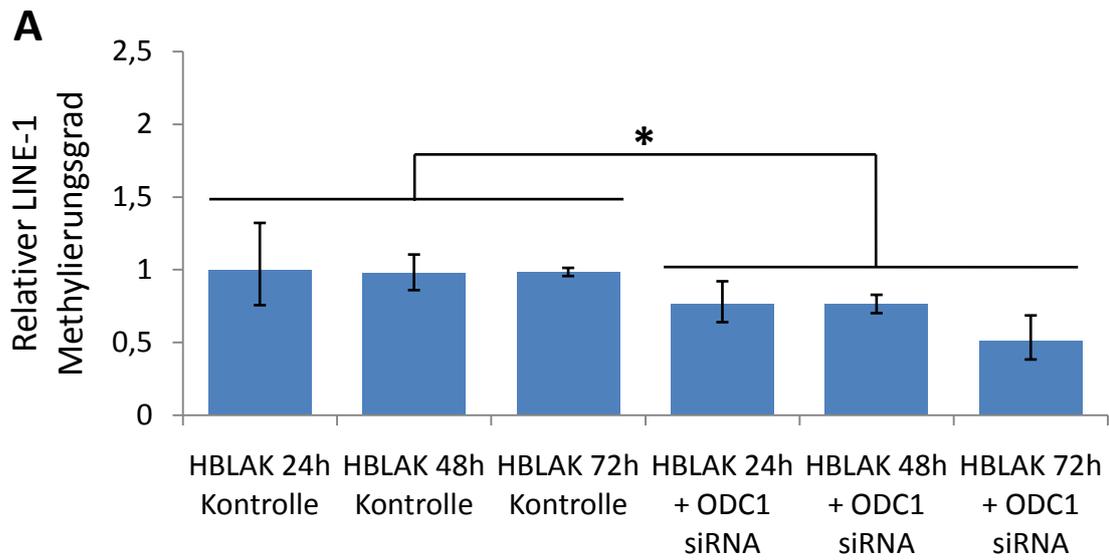
Abbildung 27: Zellzahlbestimmung der verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen *ODC1* und DMFO Behandlung.

Die Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW 1710 (E) und VMCub1 (F) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert oder mit 15µmol DFMO kultiviert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 24h, 48h und 72h lysiert und die Zellzahlen mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellzahlen (X+SD) sind in der Abbildung in Prozent im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$.

3.2.2.2 Auswirkungen der *ODC1* siRNA Behandlung auf die funktionelle Integrität des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges gemessen anhand der globalen LINE-1 DNA-Methylierung, der LINE-1 Transkription und LINE-1 Translation

Die Auswirkungen der Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* und DFMO auf die Fähigkeit der Zelle Methylgruppen an die DNA anzubringen und somit auf die funktionelle Integrität des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges, sollte anhand der globalen LINE-1 DNA-Methylierung nachvollzogen werden. Wie bereits beschrieben, kodiert das Gen *ODC1* für die Ornithin-Decarboxylase, welches aus L-Ornithin das Diamin Putrescin synthetisiert und damit die limitierende Reaktion des gesamten Polyaminstoffwechselweges darstellt (Park & Igarashi, 2013). Hierdurch ist es von fundamentaler Bedeutung für die Fähigkeit der Zellen die physiologische Konzentration an dcSAM, welcher ein starker Inhibitor der DNA-Methylierung ist, aufrecht zu erhalten (Pegg, 2010). Nur die physiologische Konzentration an dcSAM gewährleistet, dass die Zelle während der Replikation die globalen Methylierungssignaturen auf die Tochterzellen weitergeben kann. Kommt es im Zuge

einer *ODC1*-Inhibition zu einer Akkumulation von dcSAM, kann dies zu globaler Hypomethylierung der CpG-Inseln, wie in einer humanen Mundhöhlenkarzinomzelllinie gezeigt wurde, führen (Yamamoto *et al.*, 2010). Der Nachweis, ob die Inhibition des *ODC1*-Transkriptionsgrades in den untersuchten urothelialen Zelllinienmodellen ebenfalls in einer globalen Hypomethylierung resultiert, stand im Mittelpunkt dieses Versuches. Als Marker für die globale Hypomethylierung wurde wieder der LINE-1 Methylierungsgrad gewählt. Zusätzlich zu den unter 3.1.4 beschriebenen Merkmalen, lässt sich sowohl in frühen Stadien des nicht invasiven Harnblasenkarzinoms, als auch in den aggressiveren muskelinvasiven Tumoren der Harnblase früh eine LINE-1 Hypomethylierung detektieren (Kandimalla *et al.*, 2013; Schulz & Goering, 2016). Von besonderer Bedeutung für die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms ist dieser Versuch in den Zellen des primären Urothels, welche bei einer Nierenresektion gewonnen werden konnten. Denn die LINE-1-Hypomethylierung kann in der transkriptionellen Aktivität der Retrotransposons resultieren und damit auf verschiedenen Wegen, wie z.B. durch genomische Instabilität (Ghanjati *et al.*, 2014) oder durch Aktivierung aberranter Transkriptionsmuster (Wolff *et al.*, 2010), zur Entartung des Gewebes beitragen. Von jeder Probe wurden 500ng DNA zur Bisulfit Konvertierung eingesetzt und im Anschluss daran wurde der Methylierungsgrad der LINE-1 Retrotransposons mit Hilfe der idiolokalen Normierung (Santourlidis *et al.*, 2016) und der Methode der „*Real Time*“ MSPCR in Dreifachbestimmung gemessen. Als Referenz hierfür diente jeweils die 24h Kontrolle. Die statistischen Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Die Ergebnisse der Quantifizierung des relativen LINE-1 Methylierungsgrades der untersuchten Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW1710 (E) und VMCub1 (F) sind in Abbildung 28 dargestellt. Hierbei sind in jeder Abbildung zunächst die Kontrollen für alle drei Zeitpunkte, gefolgt von den drei mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben sowie jeweils in den Abbildungen C und F die mit DFMO behandelten Zellen dargestellt. Die Messwerte der relativen Quantifizierung des Methylierungsgrades der LINE-1 Retrotransposons nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode schwanken zwischen 0,31 und 1,79. Der höchste Methylierungsgrad der LINE-1 Retrotransposons konnte in der 48h Kontrolle des primären Urothels festgestellt werden und der niedrigste Wert in der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten 24h Probe der Zelllinie HT 1376. Die Messwerte für die LINE-1 DNA-Methylierung



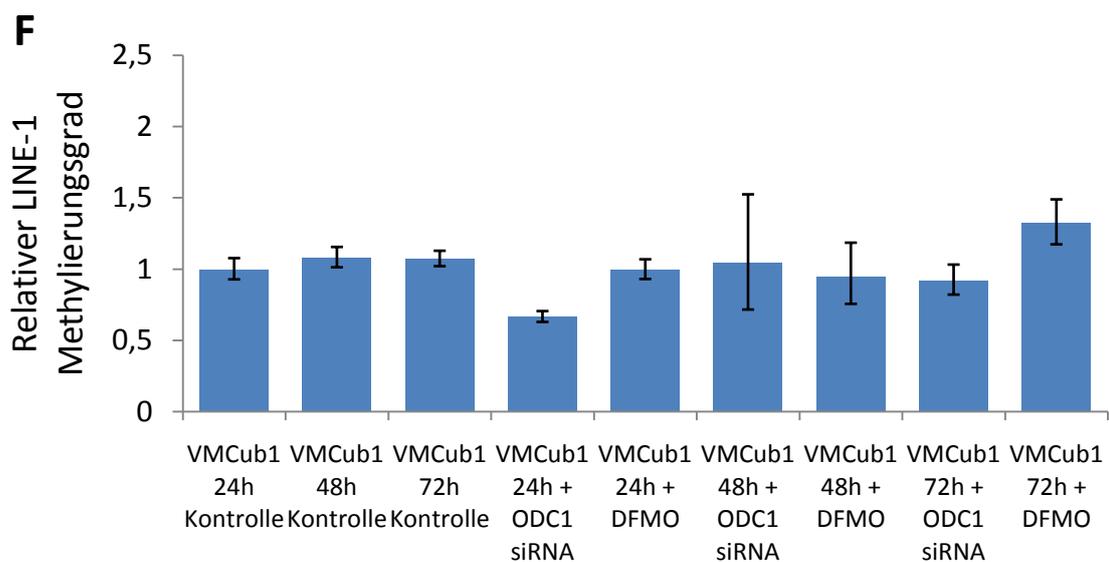
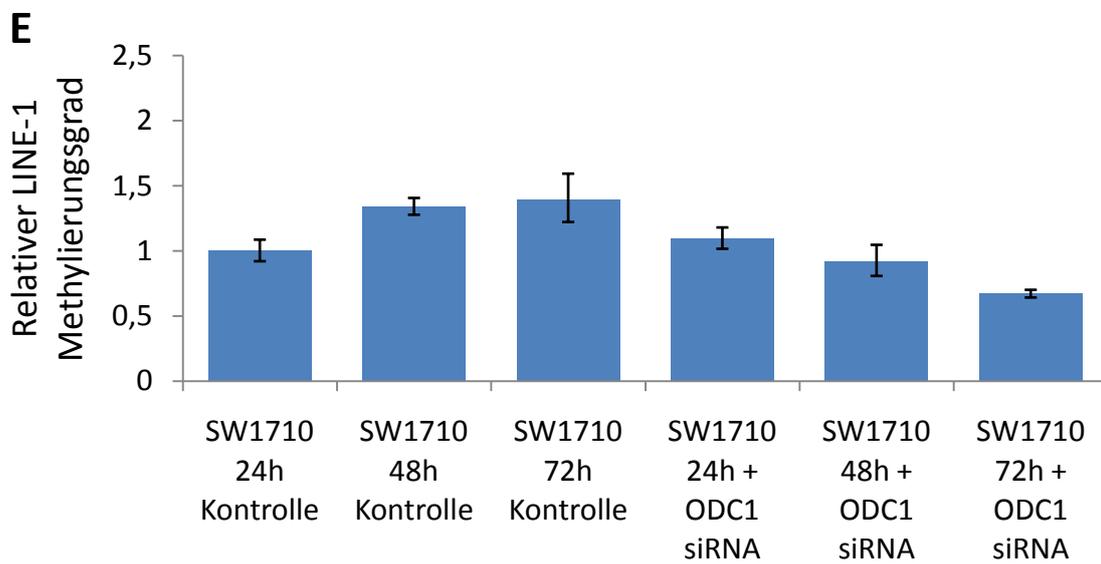
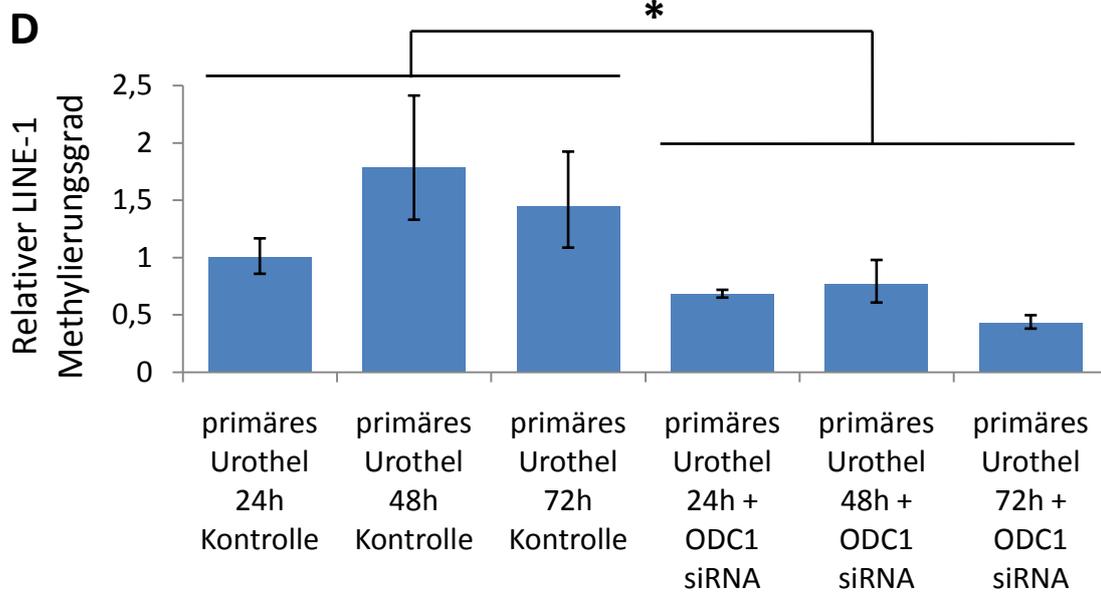


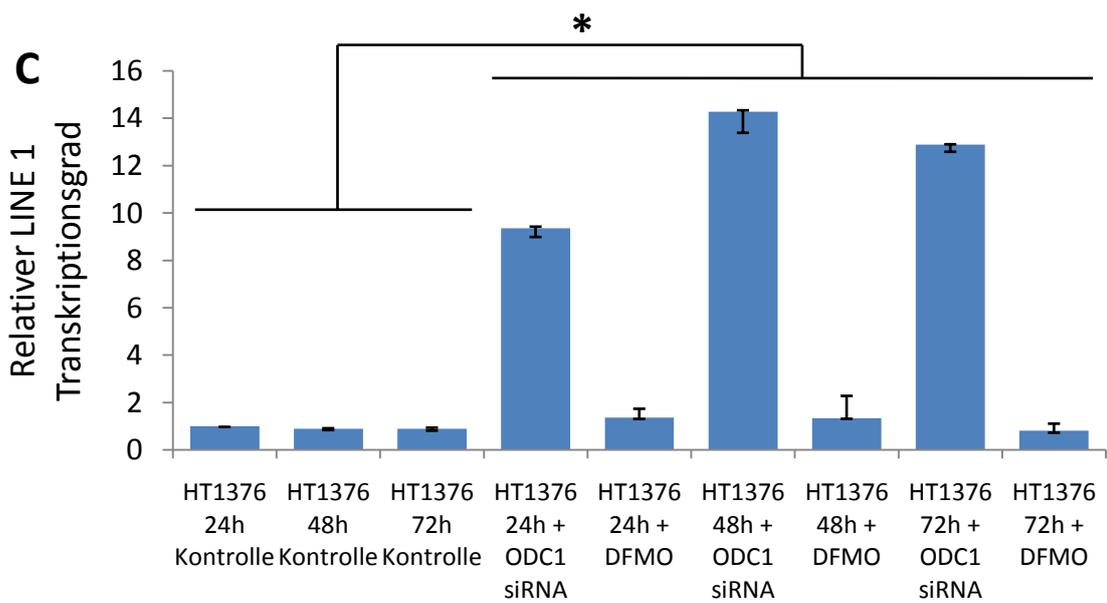
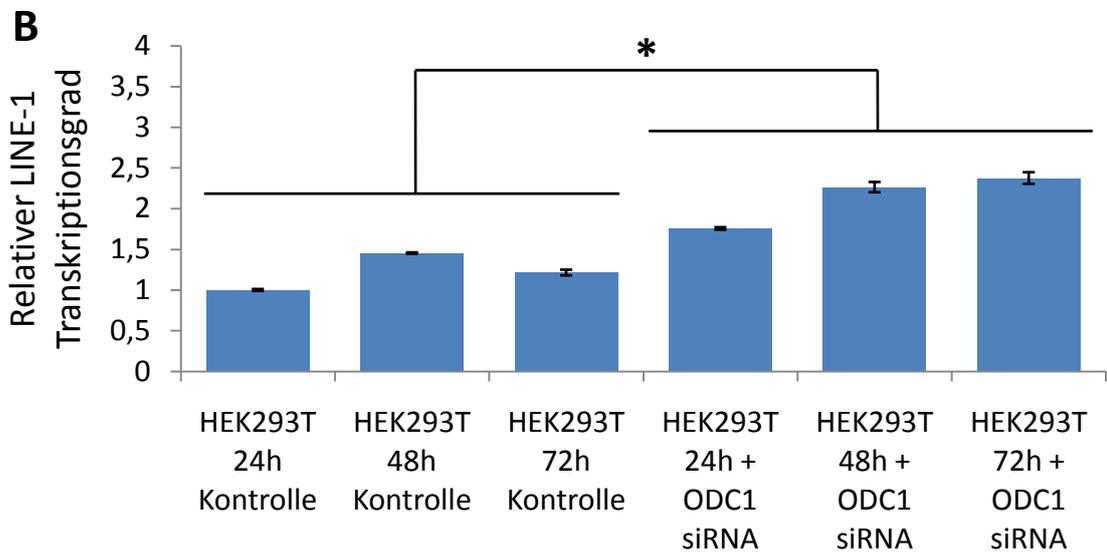
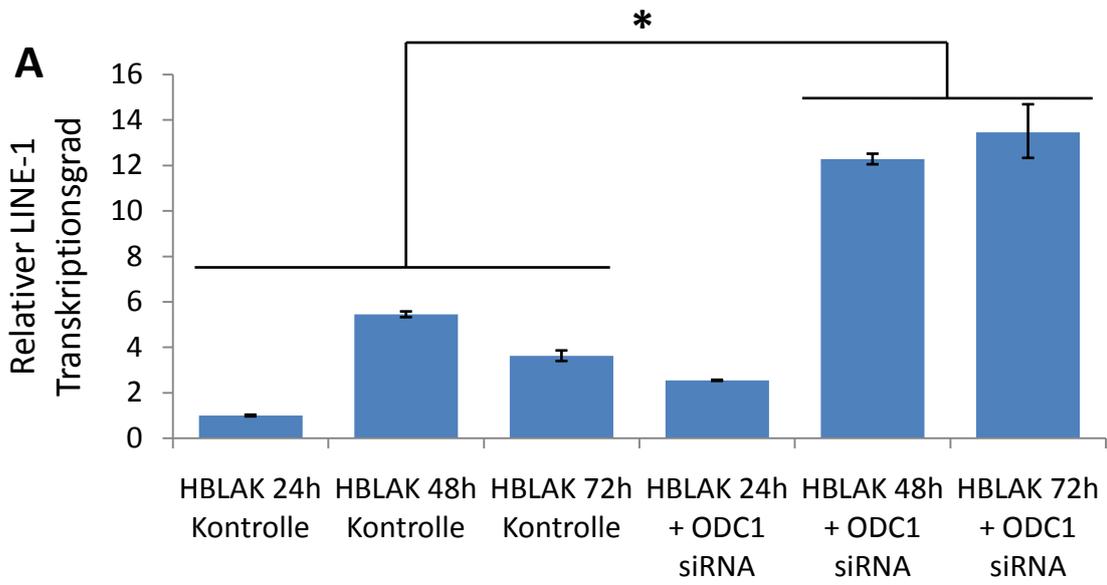
Abbildung 28: Relative DNA-Methylierung der LINE-1 Retrotransposons in den urothelialen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen *ODC1* und DFMO Behandlung.

Die urothelialen Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW 1710 (E) und VMCub1 (F) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert oder mit 15µmol DFMO kultiviert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 24h, 48h und 72h lysiert, die DNA isoliert und jeweils 500ng davon konvertiert. Mittels „*Real Time*“ MSPCR und idiolokaler Normierung (Santourlidis *et al.*, 2016) erfolgte dann die Quantifizierung des LINE-1-Methylierungsgrades (X+SD), der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zelllinien und den korrespondierenden Kontrollen, behandelt mit einer „*non targeting*“ siRNA, in Dreifachbestimmung. Als Referenz diente jeweils die 24h Kontrolle. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

schwanken in den mit „*non targeting*“ siRNA behandelten Kontrollproben, bei einem Mittelwert von MW = 1,13 und einer Standardabweichung von SD = 0,22, zwischen 0,92 (HT 1376) und 1,79 (primäres Urothel). Die Messwerte in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben schwanken, bei einem Mittelwert von MW = 0,66 und einer Standardabweichung von SD = 0,24, zwischen 0,31 (HT 1376) und 1,09 (SW 1710). Die Messwerte in den mit DFMO behandelten Proben schwanken, bei einem Mittelwert von MW = 0,68 und einer Standardabweichung von SD = 0,46, zwischen 0,03 (HT 1376) und 1,32 (VMCub1). Hierbei zeigt das mit „*non targeting*“ siRNA behandelte primäre Urothel den höchsten Methylierungsgrad aller untersuchten Zelllinien mit einem Mittelwert von MW = 1,41 über die drei untersuchten Zeitpunkte. Danach folgen die Zelllinien SW1710 (MW = 1,24), HT 1376 (MW = 1,1), VMCub1 (MW = 1,05), HEK 293T (MW = 1,02) und HBLAK (MW = 0,98). Nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* zeigt die Zelllinie HT 1376 den niedrigsten DNA-Methylierungsgrad aller untersuchten Zellen, mit einem Mittelwert von MW = 0,34 über alle drei untersuchten Zeitpunkte. Danach folgen die Zelllinien HEK 293T (MW = 0,56), das primäre Urothel (MW = 0,62), HBLAK (MW = 0,67), SW 1710 (MW = 0,89) und VMCub1 (MW = 0,90). Die Betrachtung der Differenz dieser beiden Mittelwerte gibt Aufschluss darüber, in welchem Modell die DNA-Hypomethylierung an den LINE-1 Retrotransposons am stärksten durch die Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* ausgefallen ist. Dies ist mit einer Differenz von 0,78 im primären Urothel der Fall. Die geringste Differenz ist in der Zelllinie VMCub1 mit 0,15 zu sehen. Die statistische Auswertung der Messdaten nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ergibt, dass in allen Zelllinien – mit Ausnahme der SW 1710 und der VMCub1 – der Methylierungsgrad der LINE-1 Retrotransposons statistisch signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle durch die siRNA Behandlung gegen *ODC1* abnimmt. Die p-Werte sind im Einzelnen: HBLAK: p = 0,02; HEK 293T: p = 0,02; HT 1376: p = 0,003; primäres Urothel: p = 0,03, SW 1710: p = 0,11 und VMCub1: p = 0,28. Die mit DFMO

behandelten Zelllinien zeigen jeweils einen Mittelwert des LINE-1 DNA-Methylierungsgrades über alle drei Zeiträume von 1,06 (VMCub1) und 0,30 (HT 1376). Hierdurch wird deutlich, dass in der Zelllinie HT 1376 sowohl die siRNA Behandlung gegen *ODC1* als auch die DFMO Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich der LINE-1 Retrotransposons geführt haben. Genau das Gegenteil ist für die Zelllinie VMCub1 der Fall. In dieser konnte weder durch die siRNA Behandlung noch durch die Behandlung mit DFMO eine Veränderung der Promotormethylierung der LINE-1 Elemente detektiert werden. Die p-Werte sind im Einzelnen: HT 1376: $p = 0,01$ und VMCub1: $p = 0,93$.

Da die LINE-1 Retrotransposons im gesunden Harnblasengewebe entweder durch DNA-Methylierung oder durch Bildung einer siRNA transkriptionell unterdrückt werden (Haig & Kazazian, 2004), kann die gefundene Hypomethylierung zur Aktivierung der LINE-1 Elemente führen und damit zur genomischen Instabilität beitragen (Jürgens *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde ebenfalls der Transkriptionsgrad der LINE-1 Retrotransposons überprüft. Hierfür wurde aus den behandelten Zelllinien die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer „*Real Time*“ PCR der Transkriptionsgrad in Dreifachbestimmung für jeden untersuchten Zeitpunkt ermittelt. Normiert wurde mit dem „*housekeeping*“ Gen *GAPDH* und als Referenz diente jeweils die Kontrollprobe nach 24h. Die Statistischen Analysen erfolgten ebenfalls mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Die Ergebnisse der Quantifizierung des relativen LINE-1-Transkriptionsgrades der untersuchten Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW1710 (E) und VMCub1 (F) sind in Abbildung 29 dargestellt. Hierbei sind in jeder Abbildung zunächst die Kontrollen für alle drei Zeitpunkte, gefolgt von den drei mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben sowie jeweils in den Abbildungen C und F die mit DFMO behandelten Zellen dargestellt. Die Messwerte der relativen Quantifizierung des Transkriptionsgrades der LINE-1 Retrotransposons nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode schwanken hierbei zwischen 0,54 und 14,27. Der höchste Transkriptionsgrad der LINE-1 Retrotransposons konnte in der Zelllinie HT 1376 in der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Probe nach 48h und der niedrigste Wert in der mit DFMO behandelten Probe der Zelllinie VMCub1 nach 48h festgestellt werden. Die Messwerte für den LINE-1-Transkriptionsgrad schwanken, bei einem Mittelwert von $MW = 1,45$ und



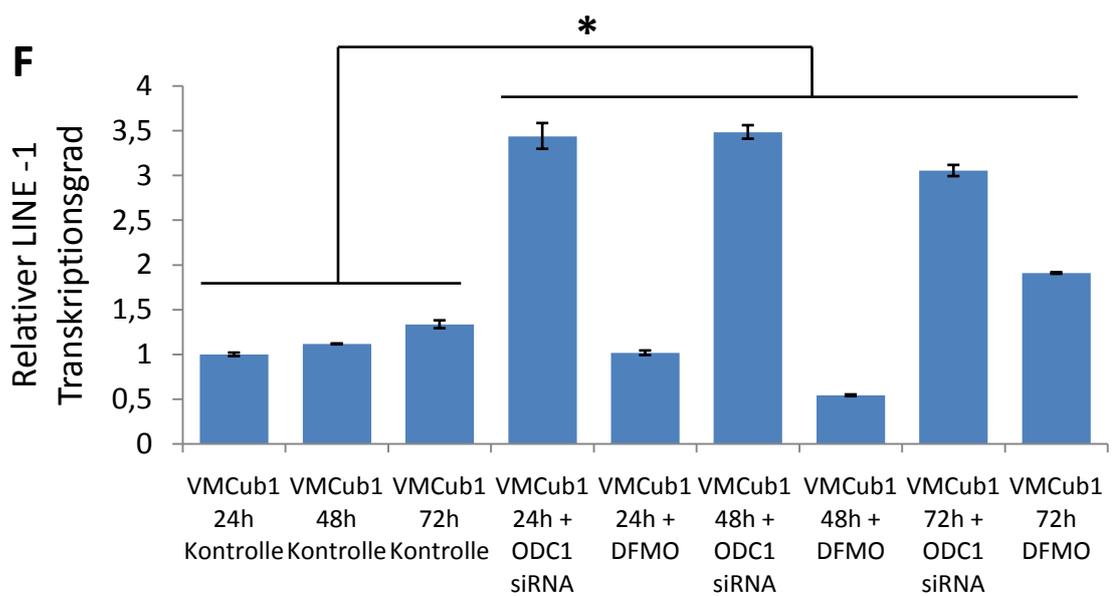
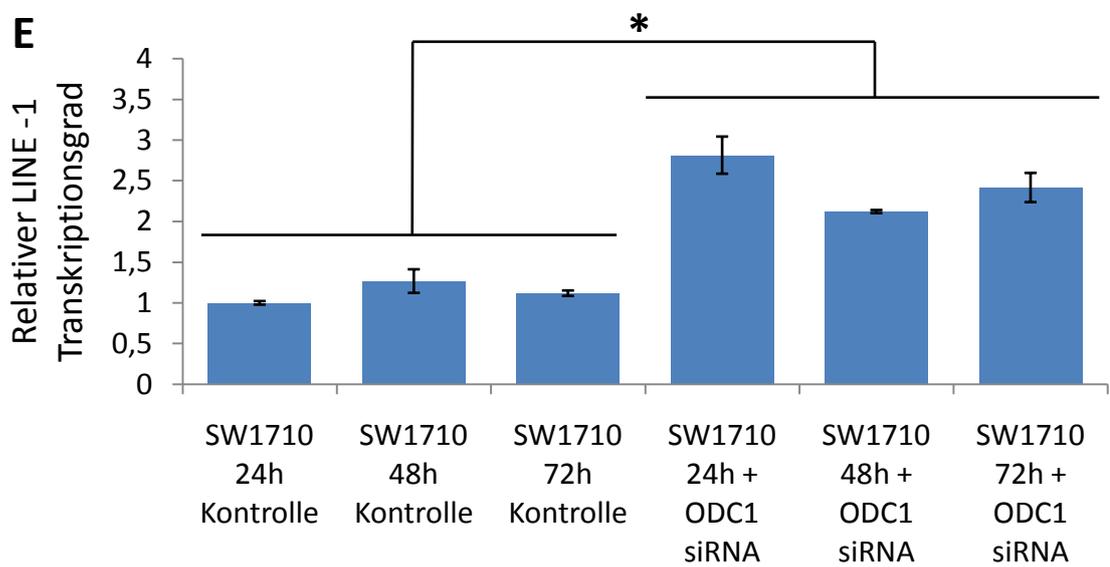
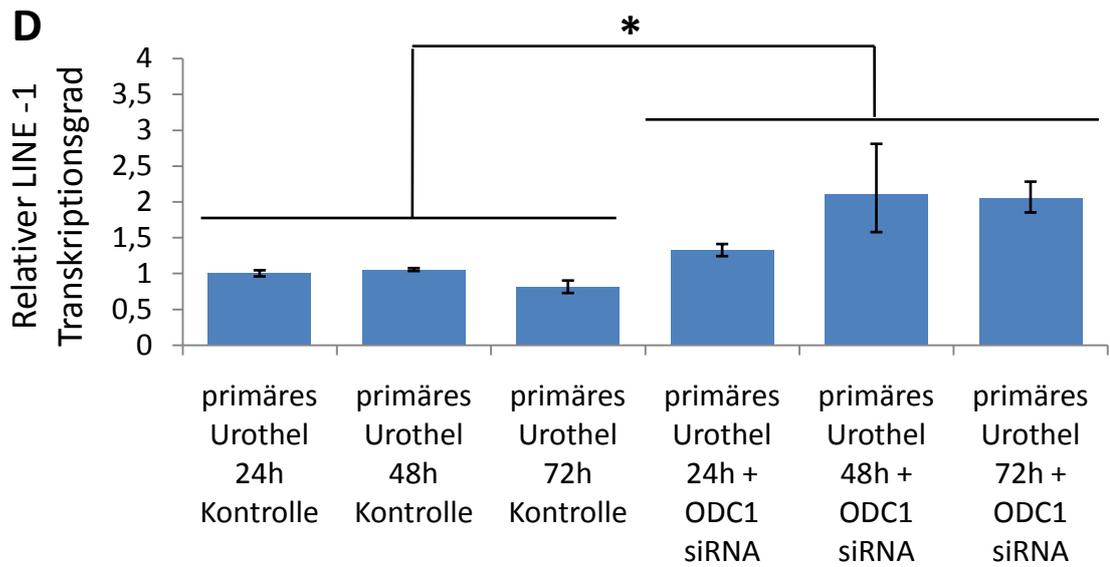


Abbildung 29: Relative Quantifizierung des Transkriptionsgrades der LINE-1 Retrotransposons in den verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen ODC1 und DFMO Behandlung.

Die Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D), SW 1710 (E) und VMCub1 (F) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert oder mit 15µmol DFMO kultiviert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 24h, 48h und 72h lysiert und die RNA isoliert. Der *LINE-1*-Transkriptionsgrad wurde aus der RNA, der mit siRNA gegen *ODC1* oder DFMO behandelten Zelllinien und den korrespondierenden Kontrollen, behandelt mit einer „non targeting“ siRNA, mittels „Real Time“ PCR bestimmt. Alle Messwerte sind für die Zeitpunkte nach 24h, 48h und 72h in Dreifachbestimmung (X+SD) erfolgt, wobei jeweils die 24h Kontrolle als Referenz dient. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

einer Standardabweichung von $SD = 1,17$, in den mit „non targeting“ siRNA behandelten Kontrollproben zwischen 0,8 (primäres Urothel) und 5,45 (HBLAK). Die Messwerte in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben schwanken, bei einem Mittelwert von $MW = 5,22$ und einer Standardabweichung von $SD = 4,73$, zwischen 1,3 (primäres Urothel) und 14,27 (HT 1376). Die Messwerte in den mit DFMO behandelten Proben schwanken, bei einem Mittelwert von $MW = 1,16$ und einer Standardabweichung von $SD = 0,48$, zwischen 0,54 (VMCub1) und 1,9 (VMCub1). Hierbei zeigt die mit der „non targeting“ siRNA behandelte Zelllinie HBLAK den höchsten *LINE-1*-Transkriptionsgrad aller untersuchter Zelllinien, mit einem Mittelwert von $MW = 3,36$ über die drei untersuchten Zeitpunkte. Danach folgen die Zelllinien HEK 293T ($MW = 1,22$), VMCub1 ($MW = 1,15$), SW 1710 ($MW = 1,1$), das primäre Urothel ($MW = 0,95$) und HT 1376 ($MW = 0,92$). Im Gegensatz dazu zeigt die Zelllinie HT 1376 den höchsten *LINE-1*-Transkriptionsgrad aller untersuchten Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* mit einem Mittelwert von $MW = 12,15$ über alle drei Zeitpunkte. Danach folgen die Zelllinien HBLAK ($MW = 9,42$), VMCub1 ($MW = 3,32$), SW 1710 ($MW = 2,44$), HEK 293T ($MW = 2,11$) und das primäre Urothel ($MW = 1,82$). Die Betrachtung der Differenz dieser beiden Mittelwerte gibt Aufschluss darüber, in welchem Modell die DNA Hypomethylierung der *LINE-1* Retrotransposons am stärksten die transkriptionelle Aktivierung durch die Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* bewirkt hat. Dies ist mit einer Differenz von 11,2 in der Zelllinie HT 1376 der Fall. Die geringste Differenz ist im primären Urothel mit 0,87 zu sehen. Die statistische Auswertung der Messdaten nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ergibt, dass in allen Zelllinien die Hypomethylierung der *LINE-1* Retrotransposons statistisch signifikant zu einer Aktivierung des korrespondierenden Transkripts im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle durch die siRNA Behandlung gegen *ODC1* geführt hat, mit Ausnahme der Zelllinie HBLAK nach 24 h. Die p-Werte sind im Einzelnen: HBLAK: $p = 0,01$; HEK 293T: $p = 0,008$; HT 1376: $p = 0,0001$; primäres

Urothel: $p = 0,001$; SW 1710: $p = 0,004$ und VM-Cub1: $p = 0,0002$. Die mit DFMO behandelten Zelllinien zeigen jeweils einen Mittelwert der LINE-1-Transkription über alle drei Zeiträume von 1,15 (VM-Cub1) und 1,16 (HT 1376). Dies zeigt an, dass DFMO keinen Einfluss auf die LINE-1-Transkription hat. Diese Erkenntnis wird ebenfalls durch p -Werte von 0,98 (VM-Cub1) und 0,24 (HT1376) unterstützt. Die Ergebnisse sind im Einklang mit denen der Zellzahlbestimmung und der Analyse des *ODC1*-Transkriptionsgrades und deuten darauf hin, dass analog zu den von Yamamoto *et al.* für das Mundhöhlenkarzinom beschriebenen Ergebnissen (Yamamoto *et al.*, 2010), die Inhibition des *ODC1*-Gens im urothelialen Zellmodell zu einer globalen Hypomethylierung mit einer für dieses Gewebe untypischen Genexpression führt.

Um zu überprüfen ob die gemessene *LINE-1*-Transkription in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zellen auch in einer Translation des ORF1-Proteins resultiert, wurde eine Analyse mittels Western-Blots durchgeführt, wie sie in Abbildung 30 dargestellt ist. Hierfür wurden Proteinlysate aus der Zelllinie HT1376 und des primären Urothels verwendet. Als Positivkontrollen wurden Proteinlysate der Harnblasenkarzinom-Zelllinie VM-Cub-1 und der Teratokarzinom-Zelllinie NCC-IT vom Forschungslabor der Urologie zur Verfügung gestellt und eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa, da diese keine LINE-1-Expression aufweist. Der Nachweis des ORF1-Proteins erfolgte mit dem „*mouse-anti-LINE-1-ORF1*“-Antikörper der Firma Merck Millipore mit einer Verdünnung von 1:1.000. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin mit dem „*rabbit-anti- α -Tubulin*“-Antikörper der Firma Abcam mit einer Verdünnung von 1:25.000 nachgewiesen (siehe unter 7.3). Die erwarteten Größen der spezifischen Banden betragen für das ORF1-Protein 42kD und für das α Tubulin-Protein 50kD. Die Immundetektion erfolgte mittels Super Signal West Femto Kit der Firma Thermo Fisher Scientific oder WesternBright Quantum Kit der Firma Biozym nach Angaben der Hersteller. Die Abbildungen A - C zeigen jeweils die Detektion des ORF1-Proteins. Hierbei zeigt Abbildung A die Immundetektion mit dem WesternBright Quantum Kit der Firma Biozym und in den Abbildungen B und C werden diejenigen Immundetektionen dargestellt, die mit dem Super Signal West Femto Kit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt wurden, wobei diese sich in Ihrer Belichtungsdauer unterscheiden. Von jedem Proteinlysate wurden 20 μ g von links nach rechts wie folgt aufgetragen: VM-Cub1, die unbehandelten Referenzlysate der Zelllinie HT 1376 (HT-), die mit siRNA gegen

ODC1 behandelte Zelllinie HT 1376 (HT+), die unbehandelten Referenzlysate des primären Urothels (PZ-), das mit siRNA gegen *ODC1* behandelte primäre Urothel sowie die Zelllinien HeLa und NCC-IT. Die Analyse lieferte eine spezifische Bande des ORF1-Proteins bei den beiden Positivkontrollen VM-Cub1 und NCC-IT, sowie bei der unbehandelten Zelllinie HT 1376.

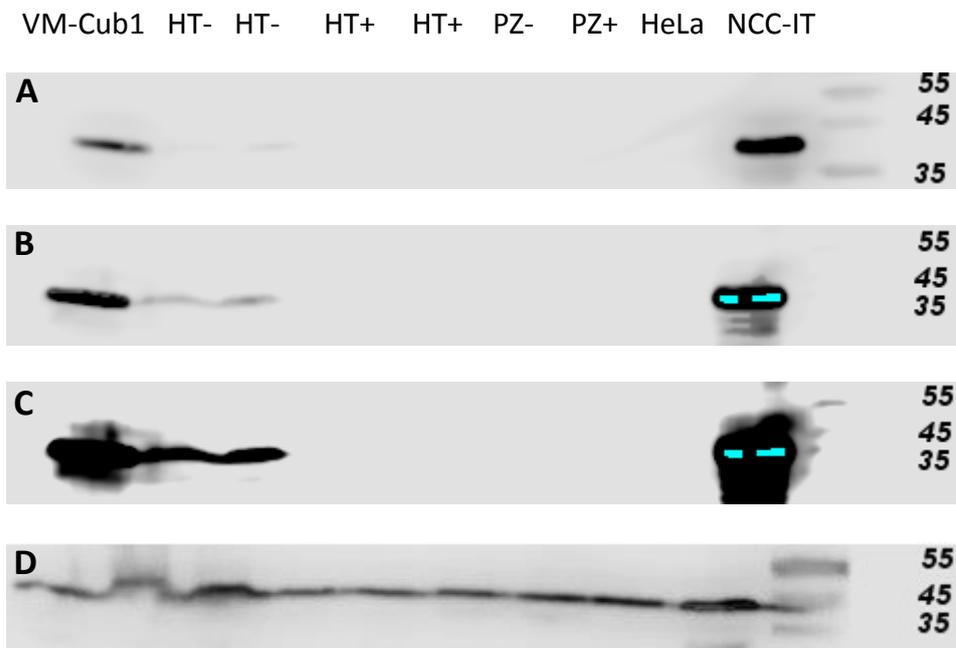


Abbildung 30: Analyse der ORF1-Translation in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zelllinien HT1376 und dem primären Urothel nach 72h Behandlungsdauer.

Die Abbildungen A - C zeigen jeweils die Detektion des ORF1-Proteins. Hierbei zeigt Abbildung A die Immundetektion mit dem WesternBright Quantum Kit der Firma Biozym und die Abbildungen B und C zeigen die Detektion, die mit dem Super Signal West Femto Kit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt wurde, wobei diese sich in Ihrer Belichtungsdauer unterscheiden. Die Abbildung D zeigt die Detektion des α -Tubulin. Es wurden je 20 μ g Proteinlysate der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zelllinien HT1376 und des primären Urothels, sowie unbehandelte Referenzen aufgetragen. Als Positivkontrollen dienten die Zelllinien VM-Cub1 und NCC-IT und als Negativkontrolle diente die Zelllinie HeLa. Die Signale für das ORF1-Protein sowie das α -Tubulin-Protein liegen bei ca. 45kD. Die erwarteten Größen waren für das ORF1-Protein 42kD und für das α -Tubulin-Protein 50kD.

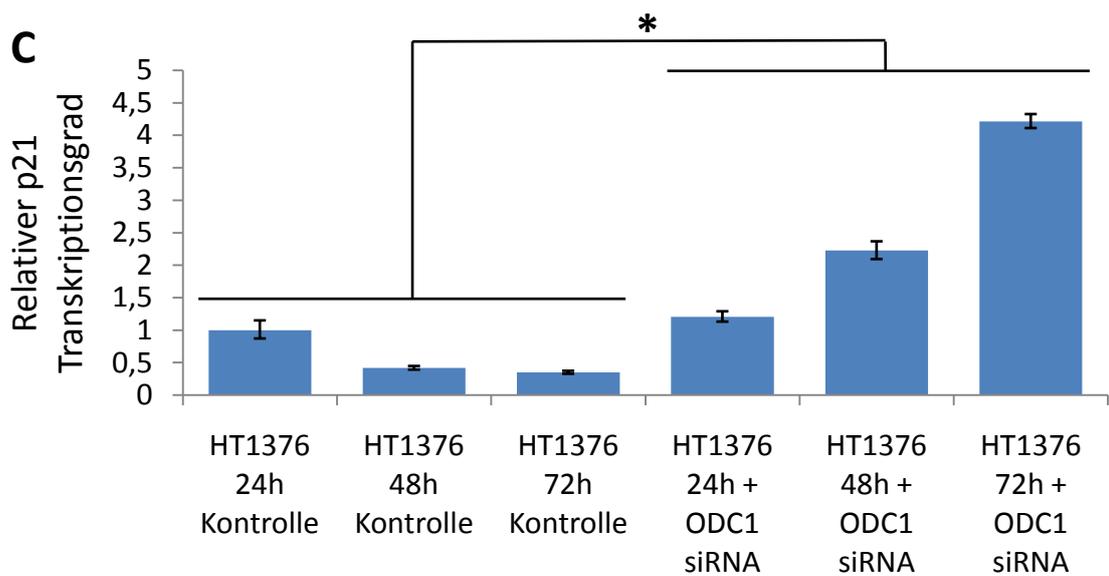
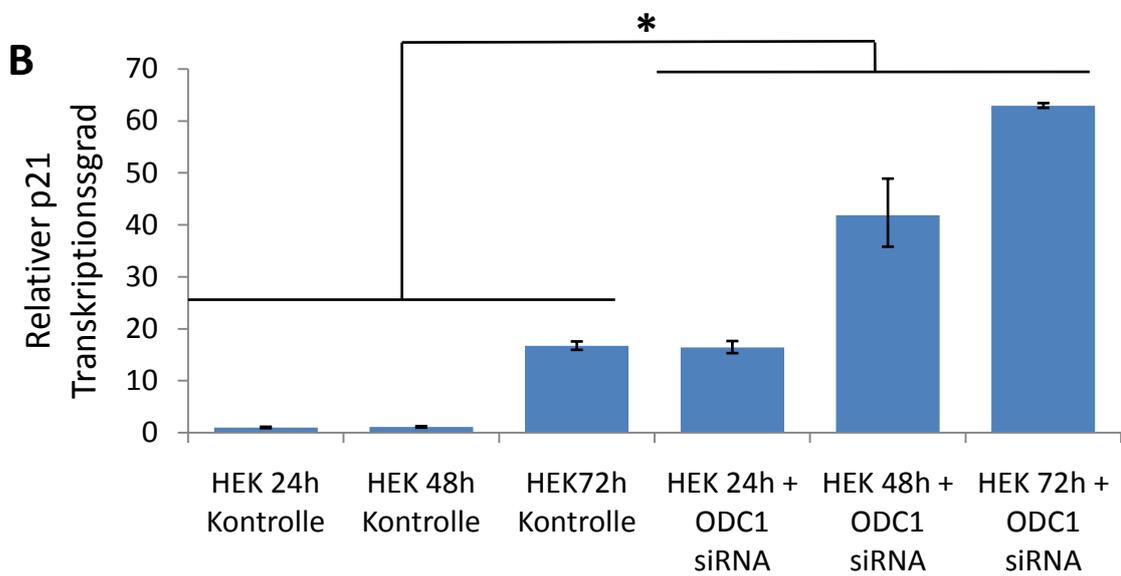
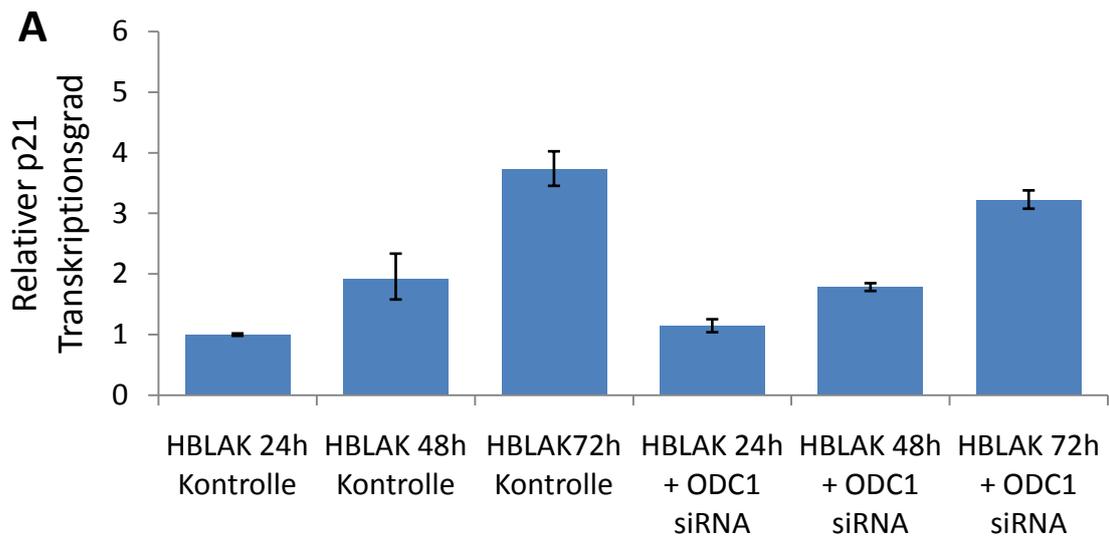
Diese konnte bei ca. 45kD detektiert werden. Allerdings fällt auf, dass die Intensität der detektierten Banden unterschiedlich stark ist. Hierbei zeigt die Teratokarzinom-Zelllinie NCC-IT die stärkste und die unbehandelten HT1376 Zellen zeigen die geringste ORF1-Translation. Die Negativkontrolle HeLa, das unbehandelte primäre Urothel sowie die mit siRNA gegen *ODC1* behandelten HT 1376 und primären Zellen zeigen im Gegensatz dazu keine spezifische Bande für das ORF1-Protein. Diese konnte durch keines der beiden Detektionskits (Abbildungen A und B) und auch nicht bei maximaler Auflösung (Abbildung C) detektiert werden. Die Abbildung D zeigt die

Detektion des als Ladekontrolle gewählten α -Tubulin-Proteins. Die erwartete Bandengröße liegt für das α -Tubulin-Protein bei 50kD. Eine spezifische Bande konnte hierfür in allen Zellen bei ca. 45kD detektiert werden. Es erscheint folglich so, dass sich die gefundene LINE-1 DNA-Hypomethylierung und die gesteigerte LINE-1-Transkriptionsrate, wie sie im Vorfeld beschrieben wurden, nicht auf Proteinebene, zumindest innerhalb des untersuchten Zeitabschnitts, widerspiegeln lassen. Denn die mit siRNA gegen *ODC1* behandelten primären sowie die HT 1376 Zellen zeigen keine erhöhte Expression des ORF1-Proteins. Eher scheint das Gegenteil der Fall zu sein. In den unbehandelten Zellen konnte das ORF1-Protein, im Gegensatz zu den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zellen, nachgewiesen werden. Folglich erscheint es, dass die siRNA Behandlung zu einer Reduktion der ORF1-Expression in der Zelllinie HT1376 führt.

3.2.2.3 Auswirkungen der *ODC1* siRNA Behandlung auf die Zellzykluskontrolle

Um die Auswirkungen der siRNA Behandlung gegen *ODC1* auf die Zellzykluskontrolle zu überprüfen, wurde der *p21*-Transkriptionsgrad bestimmt. Bei *p21* handelt es sich um ein Gen, welches für einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen kodiert. Dieser ist in der Lage den Zellzyklus zu kontrollieren und spielt daher eine wichtige Rolle im Alterungsprozess, bei der zellulären Seneszenz, bei der DNA Reparatur und dem Zelltod. P21 agiert hierbei als Mediator von p53 und die Expression von *p21* resultiert entweder in einem G1 oder einem G2 Arrest des Zellzyklus (Jung *et al.*, 2010). Für die Bestimmung des *p21*-Transkriptionsgrades wurde aus den behandelten Zelllinien die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer „*Real Time*“ PCR wurde der Transkriptionsgrad in Dreifachbestimmung für jeden untersuchten Zeitpunkt ermittelt. Normiert wurde mit dem „*housekeeping*“ Gen *GAPDH* und als Referenz diente jeweils die Kontrollprobe nach 24h. Die statistischen Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$. Die Ergebnisse der Quantifizierung des relativen *p21*-Transkriptionsgrades der untersuchten Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D) und SW1710 (E) sind in Abbildung 31 dargestellt. Hierbei sind in jeder Abbildung zunächst die Kontrollen für alle drei Zeitpunkte, gefolgt von den drei mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben, dargestellt. Die Messwerte der relativen Quantifizierung des *p21*-Transkriptionsgrades nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode schwanken zwischen 0,34 und 62,94. Der höchste *p21*-Transkriptionsgrad konnte in der Zelllinie HEK 293T in der mit siRNA gegen *ODC1*

behandelten Probe nach 72h festgestellt werden und der niedrigste Wert in der 72h Kontrolle der Zelllinie HT 1376. Die Messwerte für den *p21*-Transkriptionsgrad schwanken, bei einem Mittelwert von MW = 3,22 und einer Standardabweichung von SD = 4,3, in den mit „*non targeting*“ siRNA behandelten Kontrollproben zwischen 0,34 (HT 1376) und 16,72 (HBLAK). Die Messwerte in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben schwanken, bei einem Mittelwert von MW = 11,77 und einer Standardabweichung von SD = 17,77, zwischen 1,08 (HBLAK) und 62,9 (HEK 293T). Hierbei zeigt die mit „*non targeting*“ siRNA behandelte Zelllinie HEK 293T den höchsten *p21*-Transkriptionsgrad aller untersuchter Zelllinien, mit einem Mittelwert von MW = 6,27 über die drei untersuchten Zeitpunkte. Danach folgen die Zelllinien primäres Urothel (MW = 4,5), SW 1710 (MW = 2,45), HBLAK (MW = 2,28) und HT 1376 (MW = 0,58). Ebenfalls zeigt die Zelllinie HEK 293T den höchsten *p21*-Transkriptionsgrad aller untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* mit einem Mittelwert von MW = 40,36 über alle drei untersuchten Zeitpunkte. Danach folgen die Zelllinien primäres Urothel (MW = 10,24), SW 1710 (MW = 3,67), HT 1376 (MW = 2,5) und HBLAK (MW = 2,02). Die Betrachtung der Differenz dieser beiden Mittelwerte gibt Aufschluss darüber, in welchem Modell die *p21*-Transkription am stärksten durch die Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* ausgelöst wurde. Dies ist hierbei die Zelllinie HT 1376. Bei dieser nimmt die *p21*-Transkription in den Zellen, die mit der „*non targeting*“ siRNA transfiziert wurden, nach 48h und 72h ab. Außerdem fällt auf, dass die mit siRNA behandelten Zellen, mit Ausnahme der Zelllinie HBLAK, jeweils eine deutlich höhere *p21*-Transkription für die einzelnen Zeitpunkte als die korrespondierenden Kontrollen zeigen. Die statistische Auswertung der Messdaten nach Normierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ergibt, dass in den Zelllinien HEK 293T und HT 1376 die *p21*-Transkription statistisch signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle durch die siRNA Behandlung gegen *ODC1* zunimmt. Die p-Werte sind im Einzelnen: HBLAK: p = 0,8; HEK 293T: p = 0,05; HT 1376: p = 0,04; primäres Urothel: p = 0,32 und SW 1710: p = 0,3.



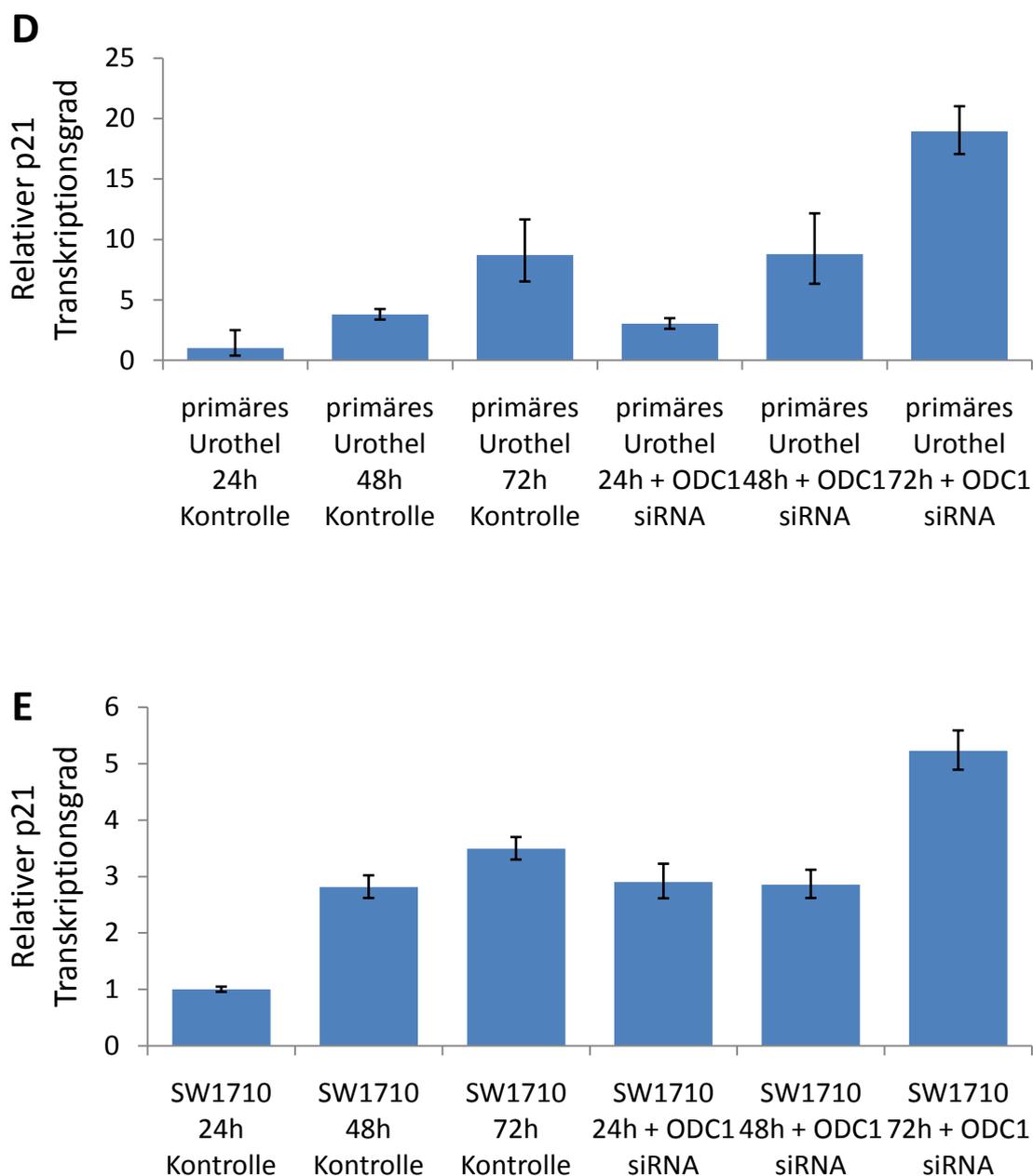


Abbildung 31: Relative Quantifizierung des *p21*-Transkriptionsgrades in den verschiedenen Zelllinien nach Transfektion von siRNA gegen *ODC1*.

Die Zelllinien HBLAK (A), HEK 293T (B), HT 1376 (C), primäres Urothel (D) und SW 1710 (E) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 24h, 48h und 72h lysiert und die RNA isoliert. Der *p21*-Transkriptionsgrad wurde aus der RNA, der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zelllinien und den korrespondierenden Kontrollen, behandelt mit einer „non targeting“ siRNA, mittels „Real Time“ PCR bestimmt. Alle Messwerte sind für die Zeitpunkte nach 24h, 48h und 72h in Dreifachbestimmung (X+SD) erfolgt, wobei jeweils die 24h Kontrolle als Referenz dient. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

3.2.2.4 Globale Analysen der durch siRNA Behandlung gegen *ODC1* ausgelösten Methylierungsveränderungen

Um die Auswirkungen der siRNA Behandlung gegen *ODC1* auf den Methylierungsstatus einzelner Gene und die damit einhergehenden Veränderungen nachweisen zu können, wurden von den Zelllinien HT 1376 und SW 1710, 72h nach siRNA Behandlung gegen *ODC1* und den korrespondierenden Kontrollen mit Hilfe der methylierungsspezifischen „*Human DNA Methylation 385k Arrays*“ der Firma Roche, globale Analysen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe der SignalMap Software Version 1.9 der Methylierungsstatus der auf den Arrays annotierten CpG-Dinukleotide an jeder Position bestimmt („*peak values*“). Danach wurden für jede Zelllinie innerhalb der Kontrollen die 50 Gene mit den höchsten und den niedrigsten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich bestimmt und mit denen der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben verglichen. Hierbei lagen die Messwerte der „*peak values*“ für die Zelllinie HT 1376 zwischen 8.342.368 und 20.014 und für die Zelllinie SW 1710 zwischen 47.331 und 12.114. Da die Messwerte der „*peak values*“ für die 50 Gene mit dem stärksten Methylierungsgrad im Promotorbereich der Zelllinie HT 1376 deutlich höher waren als bei der Zelllinie SW 1710, wurden die Werte zur besseren Vergleichbarkeit auf 50.000 begrenzt. In Abbildung 32 ist die „*Heatmap*“ dieser Gene in absteigender Reihenfolge nach dem gefundenen Methylierungsgrad im 5'-regulatorischen Bereich dargestellt. Hierbei sind die höchsten Werte in rot und die niedrigsten Werte in blau markiert. Die Gene für die keine Messwerte durch die Mikroarrays erhoben werden konnten, sind in der Abbildung durch einen schwarzen Balken dargestellt. Die linke „*Heatmap*“ zeigt jeweils die gefundenen „*peak values*“ der 5'-regulatorischen Bereiche der Gene innerhalb der Kontrollen an. Hierbei handelt es sich um Zellen, welche mit einer „*non targeting*“ siRNA behandelt wurden. Die rechte „*Heatmap*“ zeigt jeweils die gefundenen „*peak values*“ der Methylierungssignaturen des 5'-regulatorischen Bereiches derselben Gene innerhalb der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zelllinienproben nach 72h an. Der jeweilige Genname ist links neben der „*Heatmap*“ der Kontrollen dargestellt. Für die Zelllinie HT 1376 zeigen 46 (46%) und für die Zelllinie SW 1710 44 der 100 (44%) untersuchten Gene nach 72 stündiger Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* keine Veränderung ihres Methylierungsstatus im 5'-regulatorischen Bereich. Für 33% der untersuchten Gene in der Zelllinie HT 1376 und für 37% der untersuchten Gene in der Zelllinie SW 1710 lassen sich keine

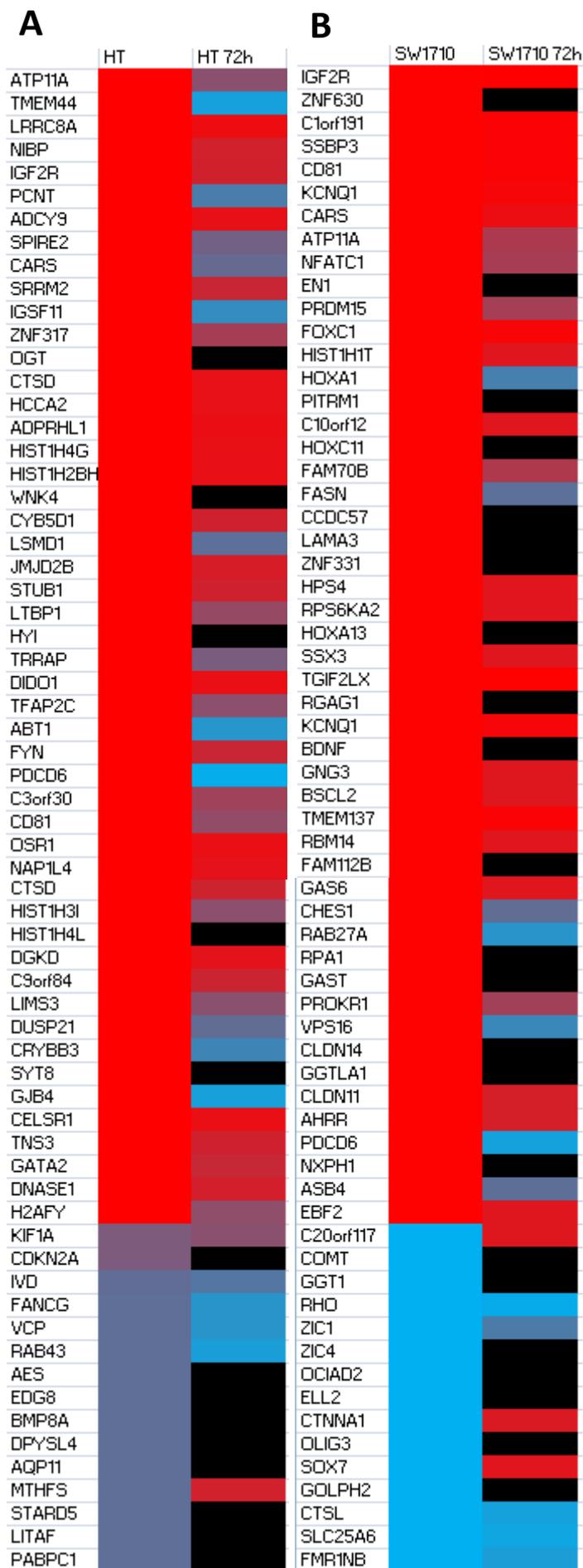




Abbildung 32: „Heatmap“ der fünfzig Gene mit dem höchsten und dem niedrigsten Methylierungsgrad im jeweiligen 5'-regulatorischen Bereich in den Zelllinien nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1*.

Die Zelllinien HT 1376 (A) und SW 1710 (B) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 72h lysiert, die genomische DNA isoliert und für die methylierungsspezifischen Mikroarray-Analysen verwendet. Dargestellt sind die 50 Gene mit dem höchsten (rot) und dem niedrigsten (blau) Methylierungsgrad im 5'-regulatorischen Bereich der jeweiligen Zelllinie. Diese sind in absteigender Reihenfolge nach dem Methylierungsgrad dargestellt.

Messdaten auf den Arrays nach der siRNA Behandlung detektieren. Dies bedeutet, dass in der Zelllinie HT 1376 21 (21%) und in der Zelllinie SW 1710 19 (19%) der 100 untersuchten 5'-regulatorischen Bereiche nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* eine Veränderung in ihrer Methylierungssignatur zeigen. Um die Bedeutung dieser DNA-Methylierungsveränderungen nachvollziehen zu können, wurden die 100 untersuchten Gene zunächst hinsichtlich ihrer Funktionalität in die folgenden sieben Gruppen eingeteilt: Transkriptionsfaktoren (rot), Onkogene bzw. Gene deren Über- / Unterexpression mit Tumoren assoziiert ist (gelb), Zellzyklus und „cell signaling“ (grün), Epigenetische Regulatoren (lila), Cytoskelett (grau), Proteasen / DNAsen (orange) und solche Gene, die keiner dieser Kategorien zugeordnet werden konnten

(zusammengefasst als Andere; blau). Hierbei wurden solche Gene, die mehreren Kategorien zugeordnet werden konnten, auch mehrmals aufgeführt. Dies ist z.B. für das Gen *TFAP2C* in der Zelllinie HT 1376 der Fall. Bei diesem Gen handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher durch die Bindung an die DNA verschiedene Gene, die eine wichtige Rolle während der Entwicklung spielen, aktivieren kann. Jedoch ist die Aktivität von *TFAP2C* auch mit der aberranten Regulation der Genexpression in Brusttumoren assoziiert (Park *et al.*, 2015). Aus diesem Grund besteht die Auswertung der 50 am stärksten methylierten Gene für die Zelllinie HT 1376 aus insgesamt 57 und für die Zelllinie SW 1710 aus insgesamt 60 Genen. Die Auswertung der 50 Gene mit den niedrigsten Methylierungssignalen in den 5'-regulatorischen Bereichen bezieht sich im Fall der Zelllinie HT 1376 auf 53 und im Fall der Zelllinie SW 1710 auf 57 Gene. Die Aufteilung der Gene nach ihrer Funktionalität ist im prozentualen Verhältnis in Abbildung 33 dargestellt. Hierbei ergibt sich, dass in der Zelllinie HT 1376 die Gene mit den stärksten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich zu 21% zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren, zu 12% zu den Onkogenen, zu 19% zum Zellzyklus oder zum „cell signaling“, zu 14% zu den Epigenetischen Regulatoren, zu 7% zum Cytoskelett und zu 4% zu den Proteasen / DNAsen gehören. Bei 23% der untersuchten Gene ließ sich die Genfunktion keiner der oben genannten Kategorien zuordnen. Die Gene sind im Einzelnen wie folgt verteilt:

Andere: *ADCY9*, *ADPRHL1*, *ATP11A*, *C9orf84*, *C30orf30*, *CRYBB3*, *CYB5D1*, *GJB4*, *IGSF11*, *OGT*, *STUB1*, *TMEM44*, *WNK4*

Transkriptionsfaktoren: *ABT1*, *CD81*, *IGF2R*, *GATA2*, *HCCA2*, *LIMS3*, *LTBP1*, *OSR1*, *SPIRE2*, *SRRM2*, *TFAP2C*, *ZNF317*

Onkogene: *CARS*, *CD81*, *DIDO*, *FNY*, *PDCD6*, *TRRAP*, *TFAP2C*

Zellzyklus + „cell signaling“: *CD81*, *CELSR1*, *DGKD*, *DIDO*, *DUSP21*, *IGF2R*, *LRRC8A*, *NIBP*, *PCNT*, *PDCD6*, *SYPT8*

Epigenetische Regulatoren: *H2AFY*, *HIST1H2BH*, *HIST1H3L*, *HIST1H4G*, *HIST1H4L*, *JMJD2B*, *LSMD1*, *NAP1L4*

Cytoskelett: *HYI*, *LRRC8A*, *PCNT*, *TNS3*

Proteasen / DNAsen: *CTSD*, *DNASE1*

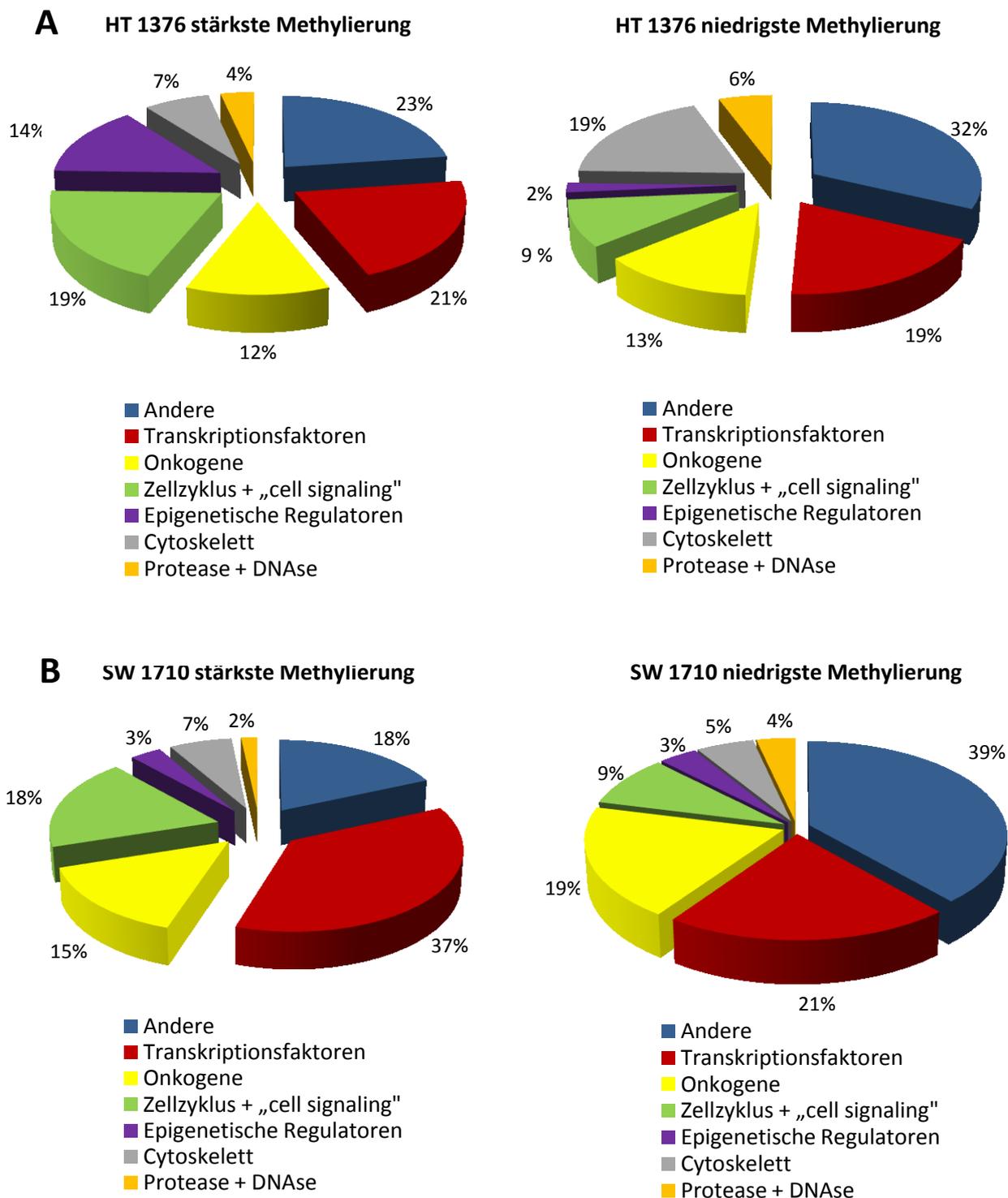


Abbildung 33: Prozentuale Verteilung der 50 am stärksten und der 50 am niedrigsten methylierten Gene anhand ihrer Funktion in den untersuchten Zelllinien HT 1376 und SW 1710.

Die Zelllinien HT 1376 (A) und SW 1710 (B) wurden jeweils mit 40pmol siRNA gegen *ODC1* alle 24h transfiziert. Die so behandelten Zellen wurden dann nach 72h lysiert, die genomische DNA isoliert und für die methylierungsspezifischen Mikroarray-Analysen verwendet. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der 50 Gene mit dem höchsten und dem niedrigsten Methylierungsgrad im 5'-regulatorischen Bereich der jeweiligen Zelllinie anhand ihrer Funktion. Hierbei sind die Gene in die Kategorien Andere (blau), Transkriptionsfaktoren (rot), Onkogene (gelb), Zellzyklus + „cell signaling“ (grün), Epigenetische Regulatoren (lila), Cytoskelett (grau) und Proteasen / DNAsen (orange) eingeteilt.

In der Zelllinie HT 1376 gehören die Gene mit den niedrigsten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich zu 19% zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren, zu 13% zu den Onkogenen, zu 9% zum Zellzyklus oder zum „cell signaling“, zu 2% zu den Epigenetischen Regulatoren, zu 19% zum Cytoskelett und zu 6% zu den Proteasen / DNAsen. Bei 25% der untersuchten Gene ließ sich die Genfunktion keiner der oben genannten Kategorien zuordnen. Die Gene sind im Einzelnen wie folgt verteilt:

Andere: *AICDA, AQP11, C16orf3, DDX26B, EFHB, GCC1, INSIG1, IVD, LY6K, MAEA, OLFM1, OXCT2, PABPC1, PAQR1, PTPRN2, SYCP3, TK2*

Transkriptionsfaktoren: *AES, BMP8A, COBRA1, DPRX, GATA4, LITAF, NOTCH1, PER1, SCML1, ZNFN1A3*

Onkogene: *CDKN2A, GAS8, MEST, PCM1, PER1, RAB43, RHBDD2*

Zellzyklus + „cell signaling“: *CDKN2A, EDG8, FANC, RTEL1, YWHAZ*

Epigenetische Regulatoren: *MTHFS*

Cytoskelett: *ANKRD27, ARF5, DPYSL4, DYNC1H1, KIF1A, NEF3, PLEC1, RAB43, STARD5, VCP*

Proteasen / DNAsen: *NYREN18, PSMD12, RHBDD2*

Für die Zelllinie SW1710 ergibt sich, dass die Gene mit den stärksten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich zu 37% zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren, zu 15% zu den Onkogenen, zu 18% zum Zellzyklus oder zum „cell signaling“, zu 3% zu den Epigenetischen Regulatoren, zu 7% zum Cytoskelett und zu 2% zu den Proteasen / DNAsen gehören. Bei 18% der untersuchten Gene ließ sich die Genfunktion keiner der oben genannten Kategorien zuordnen. Die Gene sind im Einzelnen wie folgt verteilt:

Andere: *ASB4, ATP11A, BSCL2, C1orf191, C10orf12, FAM70B, FAM112B, FASN, KCNQ1, NXPH1, RGAG1*

Transkriptionsfaktoren: *CCDC57, CD81, CHES1, EBF2, EN1, FOXC1, GAST, HOXA1, HOXA13, HOXC11, IGF2R, NFATC1, PRDM15, PROKR1, RBM14, RPS6KA2, SSBP3, SSX3, TGIF2LX, TMEM137, ZNF331, ZNF630*

Onkogene: *CARS*, *CCDC57*, *CD81*, *EN1*, *IGF2R*, *PDCD6*, *RAB27A*, *SSX3*, *ZNF331*

Zellzyklus + „*cell signaling*“: *AHRR*, *BDNF*, *CHES1*, *CD81*, *CLDN11*, *GAS6*, *GNG3*, *IGF2R*, *LAMA3*, *PDCD6*, *RPA1*

Epigenetische Regulatoren: *GGTLA1*, *HIST1H1T*

Cytoskelett: *CLDN14*, *HSP4*, *LAMA3*, *VSP16*

Proteasen / DNAsen: *PITRM1*

Die Gene mit den niedrigsten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich in der Zelllinie SW 1710 gehören zu 21% zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren, zu 19% zu den Onkogenen, zu 9% zum Zellzyklus oder zum „*cell signaling*“, zu 3% zu den Epigenetischen Regulatoren, zu 5% zum Cytoskelett und zu 4% zu den Proteasen / DNAsen. Bei 39% der untersuchten Gene ließ sich die Genfunktion keiner der oben genannten Kategorien zuordnen. Die Gene sind im Einzelnen wie folgt verteilt:

Andere: *AKAP13*, *APOA5*, *C6orf194*, *C20orf17*, *FAM100A*, *GGT1*, *GHRL*, *GOLPH2*, *INPP5A*, *KIAA1622*, *NCF4*, *NECAP2*, *PCDHGA6*, *PCDHGA9*, *PCDHGA10*, *PCDHGA11*, *PCDHGB7*, *RHO*, *SEMA4C*, *SIGLEC7*, *SLC25A6*, *SYN1*

Transkriptionsfaktoren: *ARID3A*, *CTBP1*, *CTDP1*, *ELL2*, *RBM15B*, *SOX7*, *TCF7*, *TGFB1i1*, *WNT11*, *ZIC1*, *ZIC4*, *ZNF236*

Onkogene: *CTBP1*, *CTSL*, *FMR1NB*, *OCIAD2*, *OLIG3*, *SPANX-N3*, *TCF7*, *TGFB1i1*, *TMEM87B*, *ZIC1*, *ZIC4*

Zellzyklus + „*cell signaling*“: *ADCY8*, *CTBP1*, *FAM32A*, *OR2V2*, *PJCG6*

Epigenetische Faktoren: *COMT*, *JMJD2B*

Cytoskelett: *ABCG1*, *CTNNA1*, *MYLK2*

Proteasen / DNAsen: *CTSL*, *SERPINF2*

Es fällt auf, dass die Transkriptionsfaktoren und die Anderen in beiden Zelllinien jeweils den größten Anteil an Genen mit der stärksten / niedrigsten DNA-Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich aufweisen. Die Onkogene bzw. die Gene, deren Expressionsveränderungen mit der Entartung assoziiert sind, machen in

beiden untersuchten Zelllinien hinsichtlich ihrer Methylierungssignatur eine große Gruppe aus, wobei die prozentuale Verteilung zwischen 12% und 19% schwankt. Auffallend ist auch, dass die Gruppe der Epigenetischen Regulatoren, zu der ebenfalls die Histonprotein kodierenden Gene gezählt werden, jeweils nur einen geringen Anteil an den am stärksten / niedrigsten methylierten Genen zeigen. Die einzige Ausnahme stellt mit 14% die Zelllinie HT 1376 für die 50 am stärksten methylierten Gene dar. In der Auflistung der Gene sind solche, die in beiden Zelllinien zu den 50 mit der stärksten Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich zählen, in rot markiert. Dies ist der Fall für die Gene *ATP11A*, *CARS*, *CD81*, *IGF2R* und *PDCD6*. Bei diesen handelt es sich, mit Ausnahme von *ATP11A*, um Gene, die als Onkogene bzw. Tumor assoziierte Gene beschrieben sind oder wichtige Rollen im Zellzyklus oder als Transkriptionsfaktoren einnehmen. Übereinstimmungen bei den Genen mit der niedrigsten Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich wurden nicht gefunden. Allerdings wurde eine Übereinstimmung für das Gen *JMJD2B* gefunden. Hierbei handelt es sich um eine Histondemethylase, welche in der Zelllinie HT1376 unter den 50 Genen mit der stärksten und in der Zelllinie SW1710 mit der niedrigsten Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich zu finden ist. Diese ist in der Auflistung durch eine blaue Farbe dargestellt. Von den 100 untersuchten Genen wiesen nach siRNA Behandlung gegen *ODC1* in der Zelllinie HT 1376 15 Gene eine Promotorhypomethylierung auf: Andere: *ATP11A*, *CRYBB3*, *GJB4*, *IGSF11* und *TMEM44*; Transkriptionsfaktoren: *ABT1*, *CD81*, *SPIRE2* und *TFAP2C*; Onkogene: *CARS*, *CD81*, *PDCD6* und *TFAP2C*; Zellzyklus + „cell signaling“: *CD81*, *DUSP21*, *PCNT* und *PDCD6*; Epigenetische Regulatoren: *H2AFY* und *LSMD1*. Eine Hypermethylierung wiesen die 5'-regulatorischen Bereiche der folgenden sechs Gene innerhalb der Zelllinie HT 1376 nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* auf: Transkriptionsfaktoren: *GATA4*, *NOTCH1* und *ZNFN1A3*; Onkogene: *GAS8*; Epigenetische Regulatoren: *MTHFS* und Cytoskelett: *ANKRD27*. Von den 100 untersuchten Genen wiesen nach siRNA Behandlung gegen *ODC1* in der Zelllinie SW 1710 zehn Gene eine Promotorhypomethylierung auf: Andere: *ASB4*, *ATP11A* und *FASN*; Transkriptionsfaktoren: *Hox16*, *NFATC1*, *PRDM15* und *PROKR1*; Onkogene: *RAB27A* und *PDCD6*; Zellzyklus + „cell signaling“: *PDCD6* und Cytoskelett: *VSP16*. Eine Hypermethylierung wiesen die 5'-regulatorischen Bereiche der neun folgenden Gene innerhalb der Zelllinie SW 1710 nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* auf: Andere: *APOA5*, *C6orf194*, *C20orf117*, *FAM100A* und

KIAA1622; Transkriptionsfaktoren: *SOX7* und *TGFB1i1*; Onkogene: *TGFB1i1*; Zellzyklus + „*cell signaling*“: *OR2V2* und Cytoskelett: *CTNNA1*. Auffällig ist, dass in beiden untersuchten Zelllinien eine Promotorhypomethylierung für die Gene *ATP11A* und *PDCD6* detektiert werden konnte.

4. Diskussion

4.1 Wann können DNA-Methylierungsveränderungen detektiert werden und wie werden diese etabliert?

Die genauen Gründe, die zu einer anormalen DNA-Methylierungssignatur führen, oder die Auslöser, die zur Initiation dieses Prozesses einleiten, sind bisher nicht bekannt. Allerdings liegt eine mögliche Erklärung hierfür im Alterungsprozess. So konnte z.B. für alternde hämatopoetische (Sun *et al.*, 2014) oder epidermale Stammzellen (Raddatz *et al.*, 2013) gezeigt werden, dass in diesen, in ähnlichem Maße wie in Tumorzellen, sowohl die „*de novo*“ Methylierung der CpG-Inseln als auch eine generelle Demethylierung stattfindet. Hierdurch wird angenommen, dass Zellen, die den Alterungsprozess durchlaufen, ein präferiertes Ziel der onkogenen Transformation darstellen (Easwaran *et al.*, 2014; Issa, 2014). Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass über 90% der Gene, die in den Tumoren durch „*de novo*“ Methylierung transkriptionell stillgelegt werden, bereits im Vorfeld inaktiv vorliegen (Keshet *et al.*, 2006). Die Zielgene dieser „*de novo*“ Methylierung sind in den gesunden somatischen Zellen mit dem PcG-Komplex assoziiert. Hierdurch lässt sich erklären, warum sich das Methylierungsmuster der Tumoren verschiedener Gewebearten ähnelt. Die Intensitäten der angebrachten Veränderungen können jedoch unterschiedlich stark sein. So zeigt zum Beispiel das Kolonkarzinom den stärksten Grad an Methylierungsveränderungen aller humanen Karzinome, wohingegen die Hirntumoren nur geringe Veränderungen hinsichtlich der DNA-Methylierung aufweisen (Nejman *et al.*, 2013). Es muss also weitere Faktoren geben, die die Anbringung der Methylgruppen an die verschiedenen zellulären Kompartimente regulieren, wobei diese möglicherweise im Zusammenhang mit dem spezifischen Entwicklungsprogramm des jeweiligen Zelltyps stehen könnten.

Es ist hingegen bewiesen, dass inflammatorische Prozesse, wie sie z. B. bei der „*Colitis ulcerosa*“ auftreten, mit DNA-Methylierungsveränderungen assoziiert sind, die in einem ähnlichen Muster in Kolonkarzinomen gefunden werden können (Niwa & Ushijima, 2010). Ein weiterer umweltbedingter Faktor, welcher zur Etablierung anormaler DNA-Methylierungsmuster führen kann, ist oxidativer Stress. Dieser scheint zu einer Rekrutierung der DNMTs an die PcG assoziierten Gene zu führen, wodurch ein tumorähnliches Methylierungsmuster etabliert werden kann (O'Hagan *et al.*, 2011). Oxidativer Stress tritt in Tumorzellen in Form von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) auf. Diese werden durch eine gesteigerte Rate an oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) bei der ATP-Produktion erzeugt. Reaktive Sauerstoffspezies können unterschiedliche zelluläre Funktionen regulieren. Geringe Mengen an ROS können die Proliferation und das Überleben der Zelle stimulieren. Im Gegensatz dazu führen hohe Mengen an ROS zu irreversiblen Schäden an zellulären Makromolekülen, wie z.B. der DNA, Proteinen oder Fettsäuren, und induzieren ultimativ den Zelltod (Jianrong *et al.*, 2015). Über ein erhöhtes Level an ROS kann die Tumorzelle somit sowohl die Proliferationsrate als auch die Mutationshäufigkeit steigern (Liou & Storz, 2010). Genau dieser Zusammenhang zwischen den metabolischen Prozessen und der Tumorentstehung konnte für diverse Tumorentitäten bestätigt werden. So konnte z.B. für das Leberzellkarzinom (Fujimoto *et al.*, 2012) und das Harnblasenkarzinom (Gui *et al.*, 2011) in ca. der Hälfte aller untersuchten Tumoren eine Mutation in einem Gen, welches für den Metabolismus der DNA-Methylierung oder die Kontrolle der Chromatinstruktur verantwortlich ist, festgestellt werden. Generell ist es jedoch denkbar, dass die Störung der epigenetischen Kontrolle durch Mutation eines Schlüsselfaktors der epigenetischen Regulation weitreichende Veränderungen des Transkriptoms zur Folge haben und auf diese Weise der Effekt einer einzelnen Mutation vielfach multipliziert werden kann (Shen & Laird, 2013). Allerdings stellt die „*de novo*“ Methylierung ein Charakteristikum der Tumorgenese dar, die auch im Alterungsprozess unabhängig von Mutationen stattfindet und zeitlich vor der eigentlichen zellulären Transformation erfolgen kann.

Weitere umweltbezogene Faktoren die zu anormalen DNA-Methylierungsmustern führen können sind verschiedene karzinogene Substanzen. Hierbei ist vor allem der Tabakkonsum als Hauptursache der Tumorgenese identifiziert worden und schätzungsweise für 22% der Mortalität verantwortlich (World Health Organization, 2017). Die im Zigarettenrauch enthaltenen aromatischen Amine können direkt durch die Zellmembranen diffundieren und dort mit zellulären Strukturen reagieren. Es ist nachgewiesen, dass sie zum einen mit der DNA Addukte bilden und dadurch Mutationen in Schlüsselgenen der Karzinogenese auslösen können (Besaratina & Tommasi, 2013). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Harnblasenzellen, nachdem sie Zigarettenrauch ausgesetzt waren, als direkte Konsequenz aberrante Methylierungsmuster aufweisen (Besaratina & Tommasi, 2013).

Der Zigarettenrauch stellt den Hauptrisikofaktor für die Erkrankung mit einem Harnblasenkarzinom dar (Antoni *et al.*, 2016) und ist für ca. 30 - 70% aller Blasenkrebskrankungen verantwortlich (Deutsche Krebshilfe, 2016). Diese zeichnen sich durch eine Vielzahl an genetischen und epigenetischen Veränderungen aus, welche in den frühen Stadien der Karzinogenese entstehen und sich während des Krankheitsverlaufes über das gesamte Genom ausbreiten können (Schulz & Goering, 2016).

In dieser Arbeit werden die gefundenen epigenetischen Veränderungen der DNA-Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich der Gene, die für Schlüsselfaktoren des Methylgruppen- und Polyaminmetabolismus kodieren, diskutiert und die möglichen Konsequenzen dieser Modifikationen für die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms aufgezeigt. Die genannten Stoffwechselwege regulieren die Verfügbarkeit von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) und von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) (vgl. unter 1.1.4 + 1.1.6). Hierbei dient SAM als wichtigster Methylgruppendonor, wohingegen SAH u.a. als Inhibitor der DNMTs wirkt. Die Fähigkeit einer Zelle, die DNA-Methylierung aufrecht zu erhalten, kann demnach direkt durch das intrazelluläre Verhältnis von SAM/SAH bestimmt werden. Eine Fehlregulation der intrazellulären Konzentrationen kann zur Inaktivierung der DNMTs und damit einhergehend zu globaler Hypomethylierung führen, wie sie in Tumoren und im Speziellen dem Harnblasenkarzinom vorgefunden werden kann. Zusätzlich führt die Inaktivierung dieser Gene zu einer veränderten metabolischen Aktivität, die wiederum mit einer veränderten Konzentration von ROS assoziiert ist. Aus diesem Grund kann die Inaktivierung der Gene des Methylgruppenstoffwechsels ein entscheidender Faktor der Tumorentstehung und -entwicklung sein, da sie maßgeblich an der Etablierung der anormalen Methylierungsmuster beteiligt sein kann. Aber nicht nur bei der Etablierung sondern auch bei der Initiation der anormalen Methylierungsmuster können diese Gene eine entscheidende Rolle spielen. Dies kann zum einen während des Alterungsprozesses durch die beschriebene „*de novo*“ Methylierung stattfinden oder zum anderen kann die Verfügbarkeit der Metabolite eingeschränkt sein, wodurch die Stoffwechselwege in ihrer metabolischen Aktivität eingeschränkt wären und die bereits beschriebenen Konsequenzen für die Methylierungsmuster und die zelluläre Integrität auftreten würden.

4.2 DNA-Methylierungsveränderungen im Harnblasenkarzinom

4.2.1 DNA-Methylierungsveränderungen an Genen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsels

Ein typisches Charakteristikum vieler Tumorentitäten ist ein hoher Grad an DNA-Hypomethylierung (Jürgens *et al.*, 1996). Dieser manifestiert sich insbesondere im Harnblasenkarzinom und ist generell mit genomischer Instabilität verbunden (Calvisi *et al.*, 2007). Die zentrale Hypothese dieser Arbeit besagt, dass durch DNA-Methylierungsveränderungen in den 5'-regulatorischen Bereichen der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges, die SAM-Konzentration so stark ab- und die SAH-Konzentration so stark zunimmt, dass daraus ein aberrantes intrazelluläres SAM:SAH Verhältnis resultiert. Dieses Verhältnis bestimmt direkt die Fähigkeit einer Zelle die DNA-Methylierung aufrecht zu erhalten, da SAM als wichtigster Methylgruppendonor dient und SAH die DNMTs inhibieren kann. Generell ist es denkbar, dass die Störung der epigenetischen Kontrolle durch Mutation eines Schlüsselfaktors oder Anbringung von aberranter DNA-Methylierung in dessen Promotorbereich, weitreichende Veränderungen des Transkriptomts zur Folge haben und auch weitere epigenetische Veränderungen fördern kann, wie z.B. die charakteristische globale DNA-Hypomethylierung. Hierdurch ist die funktionelle Integrität der betroffenen Zelle gefährdet und diese könnte ein präferiertes Ziel der onkogenen Transformation darstellen. Indizien für diese Theorie sind in den Ergebnissen von Fujimoto *et al.* (2012) und Gui *et al.* (2011) zu finden. In diesen Arbeiten wurde in ca. der Hälfte aller untersuchten Leberzell- und Harnblasenkarzinome eine Mutation in einem Gen, welches für den Metabolismus der DNA-Methylierung oder die Kontrolle der Chromatinstruktur verantwortlich ist, festgestellt. Aus den genannten Gründen kann die Inaktivierung der Gene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsels durch Hypermethylierung in den Promotorbereichen ein entscheidender Faktor der Tumorentstehung und -entwicklung sein.

In dieser Arbeit wurde mittels methylierungsspezifischer Mikroarray-Analysen, der Methylierungsstatus im 5'-regulatorischen Bereich von 42 Genen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges untersucht (vgl. Tab.3). Viele dieser Gene kodieren für sogenannte „housekeeping“ Enzyme, die in so gut wie allen Gewebearten exprimiert werden. Hierzu zählt u.a. die Ornithin-Decarboxylase (ODC1), deren 5'-regulatorischer Bereich essentiell für die Transkription ist

(Halmeekytö *et al.*, 1989) und somit generell unmethyliert vorliegen sollte. Des Weiteren weisen viele der Gene, die für den „*one-carbon-metabolism*“ verantwortlich sind, grundsätzliche Gemeinsamkeiten in der genetischen Anordnung auf. Die Gene *CBS*, *MTHFR*, *MTR* *MTRR* besitzen z.B. alle Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, jedoch fehlt ihnen eine TATA-Box (Homberger *et al.*, 2000). Außerdem können die meisten dieser Gene durch alternatives Spleißen und / oder verschiedene Transkriptions- bzw. Translationsstartpunkte reguliert werden (Homberger *et al.*, 2000). Sollten diese Gene durch aberrante DNA-Methylierungsmuster im Promotorbereich affektiert sein, könnte dies durch alternative Splicemuster oder veränderte Transkriptionsraten zu einer Veränderung der Enzymaktivität führen und dadurch die bereits beschriebenen Konsequenzen bedingen. Um den potentiellen Einfluss der Stilllegung der Schlüsselgene durch DNA-Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich für die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms festzustellen, wurde der Methylierungsstatus in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms ermittelt. Hierfür wurden acht nicht invasive pTa-Tumoren und sechs pT1-Tumoren, welche bereits in das subepitheliale Bindegewebe eindringen, zur Verfügung gestellt. Ebenfalls wurden sieben pTa-benachbarte und fünf pT1-benachbarte Harnblasengewebe zur Verfügung gestellt. Diese wurden von den Pathologen morphologisch als gesund bewertet. Allerdings können diese Zellen bereits genetische und epigenetische Veränderungen tragen, die phänotypisch nicht in Erscheinung treten, wodurch eine Differenzierung dieser Areale nur molekularbiologisch erfolgen kann. Es wird in diesem Zusammenhang von dem sogenannten „*field change*“ gesprochen, wobei angenommen wird, dass die Zellen in diesen Bereichen bereits auf den Prozess der Entartung „vorbereitet“ sind (Simon *et al.*, 2001). Aus diesem Grund ist der Vergleich zwischen Tumorgewebe und Tumor benachbarten Arealen von besonderem Interesse. So könnten die DNA-Methylierungsveränderungen, die eine Gemeinsamkeit in beiden untersuchten Kohorten darstellen, maßgeblich für die Entartung des gesunden Gewebes sein, da diese Veränderungen analog zu den während des Alterungsprozesses stattfindenden „*de novo*“ Insertionen der LINE-1 Elemente in einer zu geringen Anzahl an Zellen im gesunden Gewebeverband zu finden sind. Hierdurch könnte die Nachweisgrenze der derzeitigen molekularbiologischen Methoden zu gering sein und erst eine klonale Expansion, wie sie z.B. in Tumoren oder den benachbarten Arealen stattfindet, könnte solche Veränderungen sichtbar werden lassen. Um den möglichen Einfluss

der DNA-Methylierungsveränderungen im 5'-regulatorischen Bereich der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges für die Tumorprogression ermitteln zu können, wurde der Methylierungsstatus in einem pT3 Tumor – dieser penetriert sowohl das Muskel- als auch das perivesikales Gewebe – analysiert. Außerdem wurden die gefundenen Methylierungsveränderungen, mit Hilfe der TCGA-Datenbank, in Bezug zur Transkription des jeweiligen Genes gesetzt. Diese enthält die Transkriptionsprofile aller bekannten humanen Gene in diversen Tumorentitäten. Für das Harnblasenkarzinom besteht die untersuchte Kohorte aus 408 Tumorproben, wobei es sich fast ausschließlich um pT2 und pT3 Tumoren handelt und 19 gesunden Harnblasengeweben. Aus dem Vergleich der Methylierungs- mit den Transkriptionsdaten lässt sich ableiten, ob die in den frühen Phasen der Tumorgenese etablierten Veränderungen während der Progression erhalten bleiben, sich weitere aberrante Methylierungsmuster manifestieren oder diese revertiert werden.

Von den 42 untersuchten Genen weisen 28 keine signifikante Hyper- oder Hypomethylierung im 5'-regulatorischen Bereich auf (vgl. Tab.3). Innerhalb dieser Gruppe lässt sich jedoch für die Gene *BHMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *FOLR3*, *SHMT2* und *UHRF1* eine Tendenz hinsichtlich Hypermethylierung des Promotorbereiches finden. Außerdem zeigt das Gen *SRM* eine Tendenz hinsichtlich Hypomethylierung in seinem 5'-regulatorischen Bereich. Der Vergleich der DNA-Methylierungsdaten der Mikroarray-Analyse mit den Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank ergibt, dass die Ergebnisse für die Gene *BHMT2*, *FOLR3* und *SRM* im Einklang sind. Für jedes dieser Gene gibt es eine Korrelation zwischen den Transkriptionsdaten der späten Tumoren und dem Trend der DNA-Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich der frühen Tumoren. Es kann somit angenommen werden, dass die Methylierungsveränderungen während der Tumorgenese etabliert werden und in den späteren Stadien Bestand haben. Die Betain-Homocystein-S-Methyltransferasen 1 und 2 (*BHMT 1/2*) sind verantwortlich für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin und sorgen somit direkt dafür, dass die Zelle mit ausreichend SAM versorgt wird. Ein Ausfall dieser Gene könnte somit das SAM:SAH Verhältnis innerhalb der Zelle verändern und weitreichende Folgen für die funktionelle Integrität haben. Allerdings werden diese Gene fast ausschließlich in der Leber exprimiert und es wäre dem zur Folge anzunehmen, dass sie eher eine Rolle in der Entstehung von Leberkarzinomen spielen, wie es etwa von Pellanda vorgeschlagen wurde

(Pellanda, 2013). Die Folatezeptoren binden die wasserlösliche Form des Vitamins B9 und transportieren dieses in Form von Tetrahydrofolat in die Zelle. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Formen der Folatezeptoren untersucht. Diese sind der in adulten Zellen vorkommende *FOLR1*, der in fetalen Zellen vorkommende *FOLR2* und der *FOLR3* gamma. Tetrahydrofolat wird für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin benötigt. Eine verminderte Aufnahme an Folat und die damit verbundene Reduktion an Tetrahydrofolat hätte demnach dieselbe Auswirkung auf den METZ wie die transkriptionelle Stilllegung von *BHMT 1* und *2*. Allerdings konnte bereits 1948 von Farber & Diamond festgestellt werden, dass durch Folatmangel in der Ernährung die Zahl der Tumorzellen im Blut reduziert werden konnte. Diese Entdeckung bedingte die Einführung sogenannter Antifolate. Dies sind Medikamente, die zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt werden können, wobei sie die THF Synthese inhibieren (Newman & Maddocks, 2017). Demnach würde die Inaktivierung der Gene *BHMT 1/2* oder der Folatezeptoren *FOLR1/2/3* durch DNA-Methylierung eine ähnliche Wirkung wie die Antifolat Medikamente aufweisen und könnte die Proliferation inhibieren. Neuere Studien zeigen ebenfalls, dass das *FOLR3*-Gen in verschiedenen Tumorentitäten stark überexprimiert wird (Davidson *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2018). Dies scheint für das Harnblasenkarzinom nicht zuzutreffen, da die DNA-Methylierungsveränderungen bereits in den frühen nicht invasiven Tumoren zu finden sind. Sollten diese während der Tumorgenese stattfinden, könnte vor allem die Stilllegung des *FOLR3* Gens einen Schutzmechanismus der entarteten Zellen gegen z.B. Antifolat Medikamente darstellen. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden. Die Spermidin-Synthase (*SRM*) synthetisiert Spermidin durch Übertragung einer Aminopropylgruppe auf das Putrescin. Eine gesteigerte Aktivität der Spermidin-Synthase hätte neben der erhöhten Spermidin-Synthese ebenfalls einen erhöhten Abbau von dcSAM zur Folge. Der Metabolit dcSAM ist als Inhibitor der Methyltransferasen beschrieben und die Akkumulation dieses Stoffes resultiert in einem gewissen Grad an Hypomethylierung (Maruti *et al.*, 2009; Pegg, 2010). Dies würde der grundlegenden Hypothese widersprechen. Allerdings kann eine erhöhte Konzentration an dcSAM die Onkogenese begünstigen, sie ist aber auch in der Lage die Proliferation zu inhibieren (Zabala-Letona *et al.*, 2017). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die detektierte Hypomethylierung des *SRM* Gens während der

Tumorgenese die Genfunktion so beeinträchtigt, dass sich ein Gleichgewicht zwischen der Inhibition der DNMTs und der Proliferationsrate einstellt.

Der Vergleich der DNA-Methylierungsdaten der Mikroarray-Analyse mit den Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank ergibt, dass die Ergebnisse für die Gene *DNMT3a*, *DNMT3b*, *SHMT2* und *UHRF1* nicht im Einklang sind. Hierdurch ist anzunehmen, dass die Methylierungsveränderungen maßgeblich zur Tumorgenese beitragen könnten, jedoch während der Tumorprogression wieder revertiert werden müssen, um eine ausreichende Proliferationsrate oder das zelluläre Überleben zu sichern. Denkbar ist es z.B., dass die Methylierungsveränderungen an diesen Genen nur für einen kurzen Zeitraum Bestand haben und in dieser Zeit den initialen Faktor der Entartung darstellen. Denn generell handelt es sich bei dem epigenetischen Regulationsmechanismus der DNA-Methylierung um eine reversible Modifikation, welche aber zumeist stabil in meiotischen und mitotischen Zellteilungen weitergegeben wird (Jaenisch & Bird, 2003). Hierdurch ist es der Zelle möglich, auf interne und externe Einflüsse zu reagieren, wobei vor allem sich ändernde Umweltbedingungen und soziale Faktoren – wie z.B. die Ernährung oder die Exposition gegenüber bestimmten karzinogenen Stoffen – eine wichtige Rolle spielen (Stefanska *et al.*, 2012; Besaratinia & Tommasi, 2013).

Die beiden „*de novo*“ DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b besitzen keine Präferenz zu hemimethylierter DNA (Chen & Riggs, 2011), sondern dienen der Anbringung der Methylgruppe an komplett unmethylierte DNA (Jair *et al.*, 2006). Eine Depletion dieser Enzyme führt zu einer erhöhten Mikrosatelliteninstabilität (Guo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004) sowie einer Destabilisierung von repetitiven Sequenzen (Dion *et al.*, 2008) und erhöht auf dramatische Weise die Telomerlänge sowie die Anzahl der Rekombinationsereignisse innerhalb der Telomere (Gonzalo *et al.*, 2006) und kann daher zur Tumorgenese beitragen. So ist das Gen *DNMT3a* in vielen Fällen der akuten myeloischen Leukämie mutiert (Ley *et al.*, 2010) und der Verlust dieses Gens zeigte im Mausmodell eine progressive Inhibition der hämatopoetischen Stammzellendifferenzierung (Challen *et al.*, 2012). Hierdurch wird angenommen, dass die epigenetische Störung zu einem Differenzierungsstopp und einer darauf folgenden malignen Transformation führt. Der Verlust von *DNMT3a* führt generell zu genomweiter Hypomethylierung und damit einhergehender transkriptioneller Fehlregulation einer Vielzahl von Genen (Raddatz *et al.*, 2012).

Allerdings führt die Inaktivierung der DNMTs, genau wie für die Akkumulation von dcSAM beschrieben, zu einer verringerten Proliferationsrate (Wang *et al.*, 2018). Die Stilllegung der DNA-Methyltransferasen durch Hypermethylierung im 5'-regulatorischen Bereich, wie sie durch die Mikroarray-Analyse detektiert wurde, könnte somit zu globaler Hypomethylierung und genomischer Instabilität führen. Beides sind Charakteristika der Tumorgenese, die in den untersuchten Proben maßgeblich für die maligne Transformation verantwortlich sein könnten, da sie bereits in den frühen nicht invasiven pTa Tumoren detektiert werden konnten. Sobald jedoch der Tumor spezifische Phänotyp erreicht wurde, scheinen die DNA-Methylierungsveränderungen dieser Gene wieder zu Gunsten der Proliferationsrate revertiert zu werden, da die Transkriptionsdaten der TCGA-Datenbank eine signifikant höhere Transkription der *DNMT3a/b* in den untersuchten Tumoren zeigen. Das Gleiche könnte auch für die beiden anderen Gene *SHMT2* und *UHRF1* gelten. *SHMT2* kodiert für die Serin-Hydroxymethyltransferase, die Tetrahydrofolat in 5,10-Methylen-THF umwandelt und dadurch ebenfalls an der Remethylierung von Homocystein zu Methionin beteiligt ist. Die Hauptreaktion, die durch die SHMT katalysiert wird, ist die Umwandlung von Glycin zu Serin. Diese hat zur Folge, dass „one-carbon-units“ verbraucht und dadurch die Nukleotidsynthese sowie die Proliferation inhibiert werden (Labuschagne *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Tumorzellen für die optimalen Proliferationsbedingungen insbesondere auf die Genaktivität von *SHMT2* angewiesen sind (Jain *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2014). Allerdings führt die Depletion von *SHMT1* zu einer erhöhten SAM Produktion auf Kosten der Thymidylat-Synthese. Dies resultiert in einem erhöhten Einbau von Uracil in den DNA-Doppelstrang (MacFarlane *et al.*, 2008), von dem angenommen wird, dass dieser genomische Instabilität fördert (MacFarlane *et al.*, 2014). *UHRF1*, auch bekannt als *NP95*, rekrutiert durch direkte Interaktion mit dem „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1. Diese überträgt während der semikonservativen Replikation das Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Tochterstrang (Bestor, 2000; Smith & Meissner, 2013). *UHRF1* wird in diversen Tumorentitäten überexprimiert. Hierbei wird angenommen, dass der Hauptmechanismus durch den dieses Gen zur onkogenen Transformation beitragen kann, die Inhibition der Apoptose ist (Choudhry *et al.*, 2018). In einer Studie von Ashraf *et al.* (2017) konnte aber auch gezeigt

werden, dass die Runterregulation von *UHRF1* in globaler Hypomethylierung, wie sie insbesondere im Harnblasenkarzinom gefunden werden kann, resultiert.

Von den 42 untersuchten Genen weisen 14 signifikante Hyper- oder Hypomethylierung in ihrem 5'-regulatorischen Bereich auf (vgl. Tab. 3). Es scheint daher so, dass die Gene des Polyamin- und Methylgruppenstoffwechsels bereits in den frühen nicht invasiven Stadien des Harnblasenkarzinoms durch DNA-Methylierungsveränderungen affiziert sind. Zu den Genen, an deren Promotorbereich signifikante Veränderungen festgestellt werden konnten, zählen *AHCY*, *AHCYL1*, *AHCYL2*, *AMD1*, *COMT*, *DNMT1*, *DNMT3I*, *GNMT*, *MAT2A*, *MGMT*, *MTHFR*, *ODC1*, *PAOX* und *SSAT*. Diese Methylierungsveränderungen konnten im Detail durch die Methode der Bisulfit-Sequenzierung für die Gene *AHCY* (vgl. Abb. 21) und *ODC1* (vgl. Abb. 22) bestätigt werden. Beide Gene werden jeweils durch eine einzelne CpG-Insel assoziierte Promotorregion reguliert und stellen wichtige Faktoren des jeweiligen Stoffwechselweges dar. Für das Gen *AHCY* konnten die gefundenen Methylierungssignaturen der Mikroarrays für zwei gesunde Gewebe und vier Tumorgewebe bestätigt werden. Hierbei trugen in den gesunden Geweben sowie in dem einen unmethylierten Tumor zwischen 2% und 4,8% der Cytosine eine Methylgruppe an der 5'-Position. Im Vergleich dazu waren die 5'-regulatorischen Bereiche des *AHCY*-Gens in den Tumorgeweben an bis zu 98% der CpG-Dinukleotide methyliert. Ein ähnliches Bild konnte für das *ODC1*-Gen festgestellt werden. Für dieses Gen wurden drei gesunde Gewebe sowie sieben Tumorgewebe sequenziert. Von den sieben analysierten Tumoren zeigten zwei keine Hypermethylierung im Promotorbereich. Das Methylierungsmuster ähnelt dem, wie es auch in den gesunden Geweben detektiert werden konnte. Der Anteil an methylierten Cytosinen betrug in diesen Proben zwischen 2% und 8,5%. Die Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens betrug in den analysierten Tumorproben bis zu 98,2%. Allerdings ist es auffallend, dass für dieses Gen mehrere Tumorproben auch komplett unmethylierte Sequenzen zeigen. Dies kann möglicherweise auf die Entartung und die damit einhergehende chromosomale und genetische Heterogenität der Tumoren und der Tumor benachbarten Areale zurückzuführen sein. Gerade der Aspekt des „*field change*“ und der damit verbundenen Erschwernis der pathologischen Bewertung des jeweiligen Areales sollte bei dieser Analyse berücksichtigt werden.

Der Vergleich der DNA-Methylierungsdaten der Mikroarray-Analyse mit den Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank (vgl. Abb. 23) ergibt, dass die Ergebnisse für die Gene *AHCYL1*, *AHCYL2*, *AMD1*, *COMT*, *MTHFR* und *ODC1* im Einklang sind. Für das Gen *DNMT3I* zeigt die TCGA-Datenbank keinen Wert für die gesunden Kontrollen und die Gene *MGMT*, *PAOX* und *SSAT* zeigen keine Veränderungen in den Transkriptionsmustern. Widersprüchliche Ergebnisse liefert der Vergleich der Methylierungsdaten mit den Transkriptionsdaten für die Gene *AHCY*, *DNMT1*, *GNMT* und *MAT2A*.

Dem offensichtlichen Widerspruch zwischen den Ergebnissen der methylierungsspezifischen Mikroarray-Analyse (vgl. Tab.3) sowie der Bisulfit-Sequenzierung (vgl. Abb. 21) und den Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank für das *AHCY*-Gen (vgl. Abb. 23), sollte durch einen Luciferase-Assay, in dem die Promotoraktivität des analysierten Fragmentes bestätigt werden sollte, nachgegangen werden. In diesem konnte jedoch für das Promotorfragment keine erhöhte Luciferase- und somit auch keine transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden (vgl. Abb. 25). Dies bedeutet, dass die analysierte Sequenz in dem ausgewählten Zelllinienmodell keine fördernde Funktion bezüglich der Transkription aufweist und somit die Hypermethylierung in den Tumorgewebeproben in dem untersuchten 5'-regulatorischen Bereich des *AHCY*-Gens zu keiner Veränderung in der transkriptionellen Aktivität führen könnte. Im Hinblick auf die Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA Datenbank, in denen eine erhöhte *AHCY*-mRNA-Transkription beschrieben ist, scheinen diese Ergebnisse den Widerspruch erklären zu können. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Methylierung in diesem Bereich nicht noch auf andere Weise einen Einfluss auf die Aktivität des Genes nimmt. So könnte sie z.B. zu alternativen Splice- und Transkriptionsinitiationspunkten führen. Das DNA-Methylierung zu alternativen Splicevarianten führen kann, konnte erst kürzlich von Zhang *et al.* (2018) für den Interleukin-6-Rezeptor-alpha gezeigt werden. Ob ähnliches auch für den *AHCY*-Promotor zutrifft, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Adenosylhomocysteinase (*AHCY*) ist das einzige Enzym der Säugetiere, welches die Hydrolyse von SAH zu Homocystein katalysiert. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung für den Methylgruppenmetabolismus. Ein Ausfall dieses Enzyms hat zur Folge, dass die intrazelluläre SAH Konzentration ansteigt und sich

dadurch das SAM:SAH Verhältnis verändert. Dies kann in einer reduzierten Aktivität der Methyltransferasen resultieren und zu einem gewissen Grad an Hypomethylierung führen (Medici *et al.*, 2013). Dieser Sachverhalt konnte in kultivierten Endothelzellen bestätigt werden (Castro *et al.*, 2005). Zudem ist die Runterregulierung von *AHCY* durch DNA-Methylierung mit der Onkogenese assoziiert, indem sie die Zelle vor einem p53 und p16^{ink4} induziertem Zellzyklusarrest bewahrt (Leal *et al.*, 2008). Die genauen Funktionen von *AHCYL1/2* sind bisher nicht bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass sie ebenfalls an der Umwandlung von SAH zu HCY beteiligt sind. Hieraus lässt sich schließen, da alle drei Gene in der Mikroarray-Analyse Hypermethylierung in ihrem jeweiligen 5'-regulatorischen Bereich zeigen und diese Veränderung ebenfalls durch die Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden konnte, dass die Umwandlung von SAH zu HCY bereits in den nicht invasiven Tumoren gestört ist. Dies wird ebenfalls für die Gene *AHCYL1/2* durch die Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank für spätere Stadien des Harnblasenkarzinoms bestätigt. Hierbei zeigen die Gene *AHCY* und *AHCYL1* nur signifikante Veränderungen innerhalb der Tumorgewebe. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *AHCYL2*-Gens in allen untersuchten Geweben gefunden werden (vgl. Tab. 3), was somit auf eine Beteiligung dieser Gene während der Tumorgenese hindeutet. Eine weitere Studie zeigt ebenfalls, dass die *AHCY*-mRNA in ca. 50% aller untersuchten Tumorgewebe runterreguliert wurde. Dabei wurden 206 Patienten mit 14 verschiedenen Tumorentitäten untersucht, wobei das Harnblasenkarzinom nicht untersucht wurde (Leal *et al.*, 2008). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass *AHCY* über eine mögliche Tumorsupressorfunktion verfügt, welche aber bisher größtenteils nicht untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Transkription des *AHCY*-Gens epigenetisch reguliert werden kann. Dies hat zur Folge, dass eine Akkumulation von SAH begünstigt wird und diese zur Tumorgenese beitragen kann. Ein weiteres Gen, welches genau wie *AHCYL2* in allen untersuchten Geweben signifikante Methylierungsveränderungen zeigt (vgl. Tab.3) und somit maßgeblich an der Entartung der gesunden Zellen beteiligt sein kann, ist *MTHFR*. Die Methylentetrahydrofolat-Reduktase ist zum einen verantwortlich für die Umwandlung von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat und zum anderen für eine der Schlüsselreaktionen dieses Stoffwechselweges, dem Recyceln von Vitamin B12. Die besondere Bedeutung

dieses Gens für den Methylgruppenmetabolismus konnte im Jahr 2001 von Chen *et al.* festgestellt werden. Die Arbeit dieser Gruppe zeigt, dass durch homo- bzw. heterozygote „knockouts“ des *MTHFR*-Gens in Mäusen, die Tiere als Resultat signifikant niedrigere SAM- bzw. höhere SAH Konzentrationen aufweisen und diese mit einer einhergehenden DNA-Hypomethylierung assoziiert sind. Es ist bisher gut dokumentiert, dass das *MTHFR*-Gen entscheidend zur Tumorgenese beitragen kann, wie z.B. im Fall des Kolon- (Yousef *et al.*, 2013), des Lungen- (Senses *et al.*, 2013) und des Magenkarzinoms (Yan *et al.*, 2014). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um genetische Polymorphismen, wie die gut dokumentierte, funktionell relevante Transition C677T und die Transversion A1298C. Für Beide ist beschrieben, dass sie die Enzymaktivität reduzieren können, wobei Personen mit der *MTHFR*-Allelvariante A1298C eine um 4% niedrigere LINE-1 Methylierungssignatur aufweisen (Llanos *et al.*, 2015). Ebenfalls ist diese Allelvariante mit einem 4.76-fach erhöhten Risiko assoziiert, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (Ouerhani *et al.*, 2007). Die gleichen Konsequenzen für die transkriptionelle und translationale Expression könnten durch die detektierte Promotorhypermethylierung des *MTHFR*-Gens ausgelöst werden, was auf transkriptioneller Ebene ebenfalls durch die Daten der TCGA-Datenbank gestützt wird (vgl. Abb. 23). Dieser Sachverhalt konnte zusätzlich auch in Tumorzellen der Lunge bestätigt werden. In diesen war die Methylierung des *MTHFR*-Gens ebenfalls invers mit der Gen-Expression korreliert (Vaissière *et al.*, 2009).

Die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) überträgt die Methylgruppe des SAM auf die Katecholamine. Zu diesen zählen u.a. die Neurotransmitter Dopamin, Epinephrin und Norepinephrin. Bei dieser Reaktion entsteht ebenfalls SAH, welches durch Akkumulation die DNMTs negativ regulieren kann. Für das *COMT*-Gen konnte jeweils in den Tumor benachbarten Arealen eine signifikante Hypomethylierung detektiert werden (vgl. Tab.3). Die Tumoren zeigten ebenfalls eine Hypomethylierung, die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Der Vergleich mit der TCGA-Datenbank (vgl. Abb. 23) zeigt, dass die späteren Tumorstadien ebenfalls eine erhöhte Transkription des *COMT*-Gens aufweisen, wie sie durch die detektierten Methylierungsveränderungen erklärbar ist. Dies deutet darauf hin, dass die detektierten Methylierungsveränderungen zur Tumorgenese beitragen könnten und in den späteren Stadien nicht revertiert werden. Tatsächlich gibt es eine Assoziation zwischen dem Val158Met Polymorphismus der Catechol-O-Methyltransferase und

dem Harnblasenkarzinom (Chen *et al.*, 2016). Es wird angenommen, dass dieser Polymorphismus das Risiko an dieser Tumorart zu erkranken dadurch erhöht, dass er die Tumorentwicklung begünstigen kann (Zhou *et al.*, 2015). Die genaue Funktion dieses Polymorphismus ist bisher nicht bekannt, jedoch ist es erwiesen, dass der *COMT*-Promotor methylierungssensitiv ist und dessen Hypomethylierung mit dem Risiko, eine koronare Herzerkrankung zu erleiden, assoziiert ist (Zhong *et al.*, 2016). Zwei weitere Methyltransferasen, die eine signifikante Hypomethylierung zeigen, sind die Glycin-Methyltransferase (*GNMT*) und die DNA-Methyltransferase 3I (*DNMT3I*). Die *GNMT* katalysiert die reversible Umwandlung von SAM und Glycin zu SAH und Sarkosin. Ähnlich wie *BHMT*, wird *GNMT* gewebespezifisch exprimiert und kommt vor allem in der Leber, den Nieren und dem Pankreas vor. Für das Hepatozelluläre Karzinom ist *GNMT* als Tumorsuppressorgen beschrieben. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass homozygote „*knockouts*“ dieses Gens in Mäusen die Tumorgenese bedingten (Liao *et al.*, 2009). Hierbei ist der Verlust der *GNMT*-Genaktivität mit globaler Hypomethylierung und aberranter Expression der *DNMT1* und *DNMT3b* assoziiert. Dies scheint jedoch für das Harnblasenkarzinom nicht zuzutreffen, da es sich hierbei um eine Hypomethylierung in den multifokalen Tumoren handelt. Der *DNMT3I* konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden, jedoch wurde gezeigt, dass diese die beiden DNA-Methyltransferasen *DNMT3a* und *DNMT3b* rekrutieren und mit ihnen als Co-Faktor agieren kann (Hata *et al.*, 2002). Die Überexpression, wie sie die gefundene Hypomethylierung zur Folge haben könnte, ist für verschiedene embryonale Tumorarten beschrieben und wird als maßgeblicher Faktor der Entartung angesehen (Matsuoka *et al.*, 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die ektopische *DNMT3I*-Expression in *Drosophila melanogaster* zur Bildung von melanotischen Tumoren führt. Diese zeichneten sich durch epigenetische Aberrationen wie veränderte DNA-Methylierungssignaturen und Histonmodifikationen aus (Basu *et al.*, 2016). Ähnliches scheint auch für die Methylierungsveränderungen, wie sie in den multifokalen Tumoren der Harnblase für das Gen *DNMT3I* detektiert werden konnten, zu gelten. Allerdings werden für beide Gene die gefundenen Veränderungen nicht durch die TCGA-Datenbank bestätigt, wodurch für die beiden Methyltransferasen hinsichtlich der Ätiologie ähnliches gelten könnte wie bereits für die *DNMT3a/b* diskutiert wurde. Da es sich hierbei jedoch um eine Hypomethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches handelt, könnte der erhöhte Abbau von SAM zu SAH und

die damit einhergehende Inhibierung der DNMTs im Vordergrund stehen. Im Gegensatz dazu zeigt die DNMT1 eine signifikante Hypermethylierung in den frühen Stadien des unifokalen Harnblasenkarzinoms. Die DNMT1 dient als Erhaltungsmethyltransferase. Diese besitzt eine über 100fach höhere Präferenz für hemimethylierte DNA als für komplett unmethylierte DNA (Gruenbaum *et al.*, 1982) und überträgt während der semikonservativen Replikation das Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Tochterstrang (Bestor, 2000; Smith & Meissner, 2013). Für das Harnblasenkarzinom ist die Überexpression, wie sie auch von den TCGA-Daten gezeigt wird, mehrfach publikativ beschrieben (Jin *et al.*, 2017; Wojtczyk-Miaskowska *et al.*, 2017). Allerdings konnte in endothelialen Vorläuferzellen gezeigt werden, dass die Inhibition von DNMT1 durch HCY zu einer verringerten Proliferation und fokaler Hypomethylierung führt (Zhang *et al.*, 2018). Da die Transkriptionsdaten und die Methylierungsdaten für alle untersuchten DNMTs widersprüchlich sind, ist anzunehmen, dass die DNMTs im Allgemeinen früh in der Tumorgenese ein verändertes Methylierungsprofil aufweisen können, welches jedoch im weiteren Krankheitsverlauf revertiert werden muss. Da es sich bei SAH und dcSAM jeweils um starke Inhibitoren der DNMTs handelt, ist davon auszugehen, dass eine Akkumulation dieser Stoffe auch die transkriptionelle Aktivität der DNMTs negativ regulieren kann. Hierdurch kann es zu einer progressiven Methylierung der jeweiligen Promotorbereiche kommen, wodurch die aberranten Methylierungsmuster, wie sie durch die Mikroarray-Analyse detektiert werden können, zu Stande kommen. Gleichzeitig würde dies aber auch dazu führen, dass in den späteren Stadien durch die verringerte Expression der DNMTs ebenfalls weniger SAM umgewandelt werden kann. Hierdurch würde weniger SAH gebildet und das negative Feedback sowie die Fähigkeit, Methylgruppen an die DNA anzubringen, verringert. Dies könnte wiederum dazu führen, dass die vorher stillgelegten Bereiche wieder transkriptionell aktiv werden und dadurch auch die Proliferationsrate ansteigt. Diese Demethylierung kann unabhängig von der DNA-Replikation aktiv oder abhängig von der DNA-Replikation passiv erfolgen (Smith & Meissner, 2013; Seisenberger *et al.*, 2013). Der einfachste Mechanismus, der zur globalen Demethylierung führt, ist die passive Ausdünnung der modifizierten 5mC durch eine fehlende Erhaltungsmethylierung der DNMT1 während der Replikation. Allerdings scheint auch die aktive Demethylierung, welche durch die Enzyme der „*ten-eleven-translocation*“ (Tet) Familie Tet1, Tet2 und Tet3 erfolgt, in den frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms nicht eingeschränkt zu sein

(vgl. Tab.3), wobei die Tet-Enzymaktivität alleine nicht ausreicht, um in globaler DNA-Demethylierung zu resultieren (Zhao & Chen, 2013). Hierdurch könnte der Widerspruch zwischen den Methylierungsdaten und den Transkriptionsdaten erklärt werden. Ein weiteres Gen, welches signifikante Methylierungsveränderungen sowohl in den Tumor benachbarten Arealen als auch in den Tumorgewebe zeigt, ist *MAT2A*. Die Methionin-Adenosyltransferase Isoform Typ 2 (*MAT2A*) katalysiert unter ATP Verbrauch die Adenylierung des MET. Hierdurch wird S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) gebildet, welches als Methylgruppendonor der DNA- und Histon-Methylierung dient (Locasale, 2013). Die durch Mikroarray-Analyse detektierte Hypomethylierung, die ausschließlich in den multifokalen Tumoren und den multifokal benachbarten Geweben festgestellt werden konnte, deutet darauf hin, dass dieses Gen in den frühen Phasen der Tumorgenese der Harnblase überexprimiert vorliegen könnte. Eine Überexpression des *MAT2A*-Gens ist ebenfalls für das Kolon- (Tomasi *et al.*, 2013) und das Leberkarzinom (Maldonado *et al.*, 2018) dokumentiert. Hierbei ist die Induktion der Gene *MAT2A/2B* mit einem Vorteil für das zelluläre Wachstum sowie das Überleben der Tumorzelle verbunden und es wird angenommen, dass es zur Tumormigration beiträgt (Maldonado *et al.*, 2018). Eine Stilllegung dieser Gene ist hingegen mit einer gesteigerten Apoptoserate assoziiert (Tomasi *et al.*, 2013). Es ist anzunehmen, dass es sich bei *MAT2A* um ein potentiell Onkogen handelt. Die gefundene Hypomethylierung könnte genau auf diese Weise zur Entartung des Harnblasengewebes beitragen. Allerdings stehen die gefundenen Ergebnisse nicht im Einklang mit den Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank. Diese zeigen eine deutlich niedrigere *MAT2A*-Transkription der Tumorgewebe im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Zu beachten ist jedoch, dass nicht angegeben wird, ob es sich um uni- oder multifokale Tumoren handelt. Sollten hauptsächlich unifokale Tumoren untersucht worden sein, wäre dies eine mögliche Erklärung für die Unterschiede, da ausschließlich die multifokalen Areale der Harnblase in der Mikroarray-Analyse signifikante Methylierungsunterschiede aufwiesen. Das letzte untersuchte Gen des Methylgruppenmetabolismus, welches eine signifikante Hypermethylierung ausschließlich in den unifokalen Tumoren gezeigt hat, ist *MGMT*. Die O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist bei der Reparatur von alkylierter DNA beteiligt. Hierbei überträgt sie die Methylgruppe einer Nukleobase auf einen Cysteinrest, welcher sich innerhalb der Methyltransferase selbst befindet. Dies stellt eine sogenannte „*suicide reaction*“ dar, da das Enzym hierbei irreversibel inaktiviert

wird. Eine Hypermethylierung dieses Gens wird in der Studie von Jahed *et al.* (2016) für ca. die Hälfte der untersuchten Patienten, die an einem Harnblasenkarzinom erkrankt sind, beschrieben. Hierbei korreliert die Methylierungsveränderung nicht mit dem Tumorgrad, jedoch konnte eine Assoziation sowohl mit dem Wiederauftreten des Tumors als auch mit der Fähigkeit Metastasen zu bilden, gefunden werden. Von diesen Patienten zeigten 92,5% eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors, wie sie auch durch die methylierungsspezifische Mikroarray-Analyse detektiert werden konnte. Hierdurch lässt sich eine potentielle Rolle dieses Gens für das Wiederauftreten der Erkrankung ableiten und die Methylierungsveränderungen könnten als mögliches „*Tool*“ für die Diagnostik eines Harnblasenkarzinoms dienen.

Die Adenosylmethionin Decarboxylase (AMD1) wird benötigt um SAM zu decarboxylieren. Hierbei zeigt dieses Enzym mit 10 - 30min, genau wie die Ornithin-Decarboxylase (ODC1), eine der kürzesten Halbwertszeiten aller humanen Enzyme und stellt nach ODC1 den zweiten limitierenden Schritt des Polyaminstoffwechselweges dar (Evangelidou *et al.*, 2016). Kommt es innerhalb der Zelle zu einer erhöhten Konzentration an decarboxyliertem SAM, kann dies zu einer globalen Hypomethylierung führen, da dcSAM ein starker Inhibitor der DNA Methylierung ist. Gleichzeitig ist eine erhöhte dcSAM Konzentration auch mit einer Inhibition der Proliferationsrate assoziiert. Wird AMD1 fehlreguliert, kann dies die maligne Transformation begünstigen, wie es für das Prostatakarzinom beschrieben wurde (Zabala-Letona *et al.*, 2017). Dies scheint jedoch für das Harnblasenkarzinom nicht zuzutreffen, da sowohl die Methylierungsdaten als auch die Sequenzierungsdaten eine Promotorhypermethylierung und die damit assoziierte transkriptionelle Reduktion zeigen. Demnach würde es zu keiner Akkumulation von dcSAM und den damit verbundenen Konsequenzen kommen. Wird jedoch der Methylierungs- und Expressionsstatus der Ornithin-Decarboxylase (*ODC1*) und damit des limitierenden Enzyms des Polyaminstoffwechselweges betrachtet, so können diese Methylierungsveränderungen erklärt werden. Die Methylierungsdaten für den Promotorbereich des *ODC1*-Gens zeigen eine Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches und deuten darauf hin, dass die Stilllegung des *ODC1*-Gens durch Promotorhypermethylierung maßgeblich zur Entartung beitragen kann. Denn diese ist nicht nur in den Tumorgeweben, sondern auch in den Tumor benachbarten Arealen, welche als gesund bewertet wurden, zu finden (vgl. Tab.3). Bereits 1989 wurde durch die Arbeit von Halmekytö *et al.* gezeigt, dass der *ODC1*-

Promotor methylierungssensitiv ist und eine Korrelation zwischen Methylierung und Expression besteht. Dies konnte, für die in dieser Arbeit als Modell gewählte epitheliale Nierenzelllinie, durch einen Luciferase-Assay für den durch die Bisulfit-Sequenzierung analysierten 5'-regulatorischen Bereich des *ODC1*-Gens bestätigt werden (vgl. Abb. 22 + 25). Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit denen der RNA-Sequenzierung der TCGA-Datenbank (vgl. Abb. 23), da die verringerte *ODC1*-Transkription in den Tumorgeweben durch die in der Mikroarray-Analyse gefundene und durch die Bisulfit-Sequenzierung bestätigte Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens erklärbar ist. Dieser Sachverhalt wird weiterhin dadurch bestätigt, dass bereits 1991 von Wahlfors aberrante Methylierungssignaturen dieses Gens in malignen Zellen beobachtet werden konnten. Durch die beschriebene geringe Halbwertszeit des ODC1-Proteins könnte die transkriptionelle Inaktivierung zu einer verringerten Enzymaktivität innerhalb der betroffenen Zelle führen. Interessanterweise zeigt das Harnblasenkarzinom in der TCGA-Datenbank für die *ODC1*-Transkription auch einen der geringsten Werte von allen analysierten Tumoren. Diese verminderte Transkription sowie die damit vermutlich einhergehende verringerte Enzymaktivität könnten zur Akkumulation von dcSAM führen und dann in globaler DNA-Hypomethylierung und veränderten Methylierungsmustern der Histone resultieren. Dies konnte z.B. auch im Mundhöhlenkarzinom festgestellt werden (Yamamoto *et al.*, 2010). Die gefundene dichte DNA-Methylierung des 5'-regulatorischen Bereiches würde in den frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms die *ODC1*-Transkription epigenetisch inhibieren und dadurch zur Akkumulation von dcSAM und der malignen Transformation beitragen. Unter diesem Gesichtspunkt scheint die Hypermethylierung des Promotorbereiches des *AMD1*-Gens möglicherweise einen Versuch der Zelle darzustellen, die inhibitorischen Effekte des dcSAM auf die DNMTs und die Proliferation im Gleichgewicht zu halten. Zwei weitere Gene des Polyaminstoffwechselweges, die signifikante Veränderungen des Methylierungsstatus zeigen, sind die Polyamine Oxidase (*PAOX*) und Spermidin/Spermin N1-Acetyltransferase 1 (*SSAT*). Beide Enzyme spielen eine wichtige Rolle beim Abbau der Polyamine und werden durch die Polyaminkonzentration reguliert. Hierbei katalysiert *SSAT* die Umwandlung von Spermin oder Spermidin zu N1-Acetyl-Spermin, welches von *PAOX* im Anschluss daran wieder in Putrescin umgewandelt wird. Eine verringerte *PAOX* Aktivität wurde

2008 von Pegg *et al.* auch für das Mammakarzinom beschrieben. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die transkriptionelle Aktivität des jeweiligen Gens den Methylierungszustand des Promotors reguliert (Smith & Meissner, 2013) und die Inaktivierung von *ODC1* und *SRM* zu signifikant niedrigeren Polyamin Konzentrationen führen, ist anzunehmen, dass die transkriptionelle Aktivität von *SSAT* und *PAOX* nachlässt und diese deshalb progressiv methyliert werden. Allerdings zeigt *SSAT* eine signifikante DNA-Hypomethylierung innerhalb der unifokal benachbarten Gewebe, welche in den Tumorgeweben nicht detektiert und auch nicht durch die TCGA-Datenbank belegt werden konnte. Möglicherweise stellt dies eine Reaktion der gesunden Zellen auf die veränderten metabolischen Prozesse dar, wie sie durch die beschriebenen Veränderungen von vor allem *AHCY*, *MTHFR* und *ODC1* ausgelöst werden und ist ein Ereignis, welches zeitlich vor der eigentlichen Entartung stattfindet.

Eine wichtige Tatsache, die bei der Betrachtung der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges nicht außer Acht gelassen werden darf, ist, dass die transkriptionelle Aktivität, ausgelöst durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren, den Methylierungsstatus beeinflussen kann (Smith & Meissner, 2013). Analog dazu kann die transkriptionelle Inaktivität eines Gens zur progressiven Methylierung des 5'-regulatorischen Bereiches führen (Smith & Meissner, 2013). Wie bereits erwähnt, ist sowohl eine hohe Konzentration von SAH als auch von dcSAM in der Lage die DNMTs zu inhibieren. Sollte dies über einen längeren Zeitraum Bestand haben, ist es also durchaus denkbar, dass die Promotoren eben dieser Gene progressiv methyliert werden, wodurch die gefundenen Ergebnisse für die Gene *DNMT1/3A/3B* zu erklären sind. Dies würde dann die erwähnten funktionellen Konsequenzen bedingen, so dass das metabolische Gleichgewicht der genannten Stoffwechselprodukte einen direkten Einfluss auf das Epigenom durch posttranslationale Modifikationen der Histone, der DNA und verschiedener Transkriptionsfaktoren hat (Carey *et al.*, 2015; Moussaieff *et al.*, 2015; Ryall *et al.*, 2015; Shiraki *et al.*, 2014; Wellen *et al.*, 2009). Dieser Sachverhalt wird dadurch bestätigt, dass auch andere Metabolite einen Einfluss auf zelluläre Entscheidungen nehmen können. So sind z.B. erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Acetyl-CoA mit erhöhten Levels an Histon-Acetylierung, erhöhter Proliferationsrate und verstärktem Zellwachstum assoziiert. Aber auch das Überleben der Zelle sowie die Apoptose kann durch die Verfügbarkeit von Acetyl-

CoA reguliert werden (Kinnaird *et al.*, 2016). Generell gilt jedoch, dass die Stilllegung bzw. Aktivierung dieser Gene zu oxidativem Stress führen kann. Bei diesem handelt es sich um einen umweltbedingten Faktor, der zur Etablierung anormaler DNA-Methylierungsmuster führen kann, wodurch möglicherweise ein Tumor ähnliches Methylierungsmuster etabliert wird (O'Hagan *et al.*, 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms veränderte DNA-Methylierungssignaturen an den Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges aufweisen. Diese sind in der Lage mit der Expression dieser Gene und der Integrität des Methyloms im Allgemeinen zu interferieren, wobei nicht auszuschließen ist, dass sich diese Gene wechselseitig regulieren. Hierdurch könnte ein „*feed-forward-loop*“ entstehen, wodurch weitere epigenetische Veränderungen, wie z.B. die LINE-1 Hypomethylierung, begünstigt wären. Einige der Veränderungen scheinen hierbei ursächlich für die Entartung zu sein und haben während der Tumorprogression Bestand, wohingegen andere während der Tumorprogression wieder revertiert werden. Ob es sich hierbei um einen aktiven, wie z.B. durch die Tet-Demethylasen bedingten, oder einen passiven, durch Ausdünnung der Methylcytosine während der Replikation, Mechanismus handelt, sollte in weiteren Versuchen untersucht werden. Außerdem lassen die Methylierungsveränderungen der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges zusätzlich noch eine Differenzierung zwischen unifokalen und multifokalen Tumoren sowie den benachbarten Arealen zu. Dies ist auf den „*field change*“ zurückzuführen und macht deutlich, wie wichtig die molekularbiologische Diagnostik für Tumorerkrankungen im Allgemeinen und insbesondere für das Harnblasenkarzinom ist. Ob die in dieser Arbeit gefundenen Methylierungsveränderungen jedoch spezifisch und verlässlich zwischen den uni- und multifokalen Tumoren sowie den einzelnen T-Stadien unterscheiden können, sollte in weiteren Versuchen und einer größeren Probenkohorte untersucht werden.

4.2.2 Konsequenzen der detektierten Veränderungen für die globale DNA-Methylierung gemessen anhand der LINE-1-Elemente

Die Auswirkungen der unter 4.2.1 beschriebenen Veränderungen in den 5'-regulatorischen Bereichen der Gene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges auf die Fähigkeit der affizierten Zellen, Methylgruppen

an die DNA anzubringen, sollten anhand der LINE-1 Retrotransposons charakterisiert werden. Diese sind mit ca. 500.000 Kopien im humanen Genom vertreten und machen dadurch etwa 17% des Genoms aus (Goodier, 2016). In gesunden somatischen Zellen sind die Promotorbereiche der LINE-1 Elemente mit einem hohen Grad an DNA-Methylierung assoziiert, wodurch die Expression dieser Regionen inhibiert wird (Hata & Sakaku 1997; Woodcock *et al.*, 1997). Aus diesen beiden Gründen lassen sich die LINE-1 Elemente als Marker für den globalen Grad an DNA-Methylierung und damit einhergehend für die Fähigkeit der Zelle, solche Modifikationen anzubringen, benutzen. Wie in 4.1 und 4.2.1 beschrieben, können die Veränderungen in den Promotorbereichen der Schlüsselgene des Polyamin- und Methylgruppenmetabolismus auf verschiedene Weisen mit der Integrität des Methyloms interferieren. Hierbei kann insbesondere durch Hypermethylierung in den 5'-regulatorischen Bereichen dieser Gene ein direkter Einfluss auf die globale DNA-Methylierung, wie im Fall der DNMTs, oder ein indirekter Einfluss durch Akkumulation verschiedener Stoffwechselprodukte oder durch einen Anstieg an ROS, genommen werden. Diese Veränderungen resultieren generell in globaler Hypomethylierung. Der relative Methylierungsgrad der LINE-1 Retrotransposons wurde in dieser Arbeit mittels der quantitativen „*Real Time*“ MSPCR in Dreifachbestimmung und durch das idiolokale Normierungsverfahren ermittelt. Hierbei ist auffallend, dass alle untersuchten Tumoren einen niedrigeren DNA-Methylierungsgrad im Vergleich zu den gesunden Kontrollgeweben aufweisen. Hierbei liegt der gemessene Mittelwert der DNA-Methylierung für alle Tumorproben bei 0,24 (SD = 0,19). Im Vergleich dazu liegt der Mittelwert der gesunden Kontrollen bei 1,32 (SD = 0,68). Die statistische Analyse erfolgte mit dem ungepaarten Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und ergab einen p-Wert von $p = 0,0001$. Es handelt sich somit um eine statistisch signifikante Hypomethylierung der LINE-1 Retrotransposons in der untersuchten Gewebekohorte. Die hohe Varianz der Messdaten kann auf den „*field change*“ und die damit einhergehende chromosomale und genetische Heterogenität der Tumoren und insbesondere der Tumor benachbarten Areale zurückzuführen sein. Die Hypomethylierung der LINE-1 Elemente im Harnblasenkarzinom ist publikativ gut dokumentiert und charakterisiert sowohl die frühen Stadien des nicht invasiven Harnblasenkarzinoms, als auch die aggressiveren muskelinvasiven Tumoren der Harnblase (Kandimalla *et al.*, 2013; Schulz & Goering, 2016). Hierbei ist die Hypomethylierung mit einer transkriptionellen Aktivierung der LINE-1 Elemente

assoziiert (Jürgens *et al.*, 1996), welche auf verschiedenen Wegen zur Entartung des Gewebes, wie z.B. durch genomische Instabilität (Ghanjati *et al.*, 2014) oder durch Aktivierung aberranter Transkriptionsmuster (Wolff *et al.*, 2010), beitragen kann. Es wird angenommen, dass die durch *ORF 2* kodierte Endonuklease, welche bicistronisch gemeinsam mit dem *ORF1*-Produkt kodiert wird, zur genomischen Instabilität beitragen könnte (Goodier, 2016). Diese Endonuklease besitzt eine kurze Konsensussequenz (5'-TTTT/A-3') und kann deshalb an vielen Stellen das Genom schneiden. Hierdurch ist es den LINE-1 Elementen möglich, an vielen Stellen ins Genom zu integrieren (Babushok & Kazazian, 2007) und dadurch Schäden anzurichten. In der Tat sind derzeit 124 Erkrankungen mit einer Keimbahn-Insertion eines LINE-1-, Alu- oder SVA-Elementes assoziiert (Cordaux *et al.*, 2006; Hancks & Kazazian, 2012, 2016). Hierbei ist jedoch noch nicht geklärt, in wie weit der Prozess der Retrotransposition die Ätiologie der jeweiligen Erkrankung betrifft. Mit LINE-1 Insertionen in die Gene „*Tumorigenicity 18*“-Gen (*ST18*) im Fall des Leberkarzinoms (Shukla *et al.*, 2013), „*Phosphatase and Tensin Homolog*“-Gen (*PTEN*) im Fall des Endometriumkarzinoms (Helman *et al.*, 2014) und „*Adenomatous Polyposis Coli*“ – Gen (*APC*) im Fall des Kolonkarzinoms (Scott *et al.*, 2016) sind jedoch Transpositionereignisse beschrieben, die für die Entartung des jeweiligen Gewebes verantwortlich sein können. Ähnliches ist ebenfalls für das Harnblasenkarzinom denkbar. Hierbei würden die beschriebenen metabolischen Veränderungen eine Hypomethylierung der LINE-1 Elemente bedingen. Diese könnte zur transkriptionellen Aktivierung führen, wodurch Insertionen und Doppelstrangbrüche induziert werden würden, die zur Entartung des Gewebes führen könnten. Ein Indiz, welches diese Hypothese unterstützt, ist, dass die beiden „*de novo*“ DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b in der Mikroarray-Analyse, wenn auch statistisch nicht signifikant, Promotorhypermethylierung zeigen (vgl. Tab.3). Der dadurch möglicherweise induzierte Verlust der Genaktivität und die damit einhergehende Depletion dieser Enzyme ist publikativ mit einer erhöhten Mikrosatelliteninstabilität (Guo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004) und einer Destabilisierung von repetitiven Sequenzen (Dion *et al.*, 2008) assoziiert. Ebenfalls konnte in den Harnblasenkarzinomzelllinien UM-UC-3 und TCCSUP sowie in der Nierenzelllinie HK-2 ein Zusammenhang zwischen der DNA-Hypomethylierung der LINE-1 Elemente und einer SAM-Depletion, ausgelöst durch Exposition der Zellen mit ROS, gefunden werden (Kloypan *et al.*, 2015). Dies könnte für die Ätiologie des

Harnblasenkarzinoms bedeuten, dass die Veränderungen, wie sie durch die Mikroarray-Analyse detektiert wurden, maßgeblich die LINE-1 Hypomethylierung durch eine veränderte metabolische Aktivität und die damit möglicherweise einhergehende SAM-Depletion auslösen könnten. Dies könnte weitreichende Konsequenzen für die funktionelle Integrität der Zellen haben und somit einen erheblichen Einfluss auf die Tumorgenese des Harnblasenkarzinoms nehmen.

4.3 Einfluss des Gens *ODC1* auf zelluläre Funktionen

4.3.1 Funktionelle Bedeutung von *ODC1* auf die Proliferation und Zellzykluskontrolle

Um die funktionelle Bedeutung der Promotorhypermethylierung an den Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges hinsichtlich der zellulären Integrität und des Zellschicksals nachvollziehen zu können, sollte der reprimierende Effekt, der für die DNA-Methylierung gut untersucht ist (Kim *et al.*, 2002), mit Hilfe von siRNA gegen das Schlüsselgen *ODC1* nachempfunden werden. Das Gen *ODC1* kodiert für die Ornithin-Decarboxylase, welche aus L-Ornithin das Diamin Putrescin synthetisiert und damit die limitierende Reaktion des gesamten Polyaminstoffwechselweges darstellt (Park & Igarashi, 2013). Es ist somit von fundamentaler Bedeutung für die Fähigkeit der Zellen die physiologische Konzentration an dcSAM, welcher ein starker Inhibitor der DNA-Methylierung ist, aufrecht zu erhalten (Kim *et al.*, 2002; Pegg, 2010). Zudem konnte anhand der bisher diskutierten Ergebnisse gezeigt werden, dass für dieses Gen in der Mikroarray-Analyse in allen untersuchten Gewebearten (UT, ubG, MT und mbG) eine signifikante Hypermethylierung im 5'-regulatorischen Bereich gefunden und ebenfalls durch die zweite unabhängige Methode der Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde die funktionelle Relevanz des untersuchten Promotorbereiches für die transkriptionelle Expression des *ODC1*-Gens in einem Luciferase Assay bestätigt und diese Ergebnisse stehen ebenfalls im Einklang mit den RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank, die eine signifikante Reduktion der *ODC1*-mRNA-Transkription in 408 untersuchten Harnblasenkarzinomproben zeigt. Für die Analysen wurden verschiedene urotheliale Zelllinien ausgewählt: die aus primär Urothelzellen gewonnene, spontan immortalisierte HBLAK, die embryonale Nierenepithelzelllinie HEK 293T, die Übergangszellkarzinom

Zelllinie HT 1376, primäre Harnleiterzellen, die bei einer Nierenresektion gewonnen wurden, und die Übergangszellkarzinom Zelllinien SW1710 und VMCub1. Diese wurden jeweils mit 40pmol der „*siGENOME SMARTpool*“ siRNA gegen *ODC1* der Firma Dharmacon oder mit 15µmol des irreversiblen Hemmstoffes der Ornithin-Decarboxylase DFMO der Firma Merck für bis zu 72h inkubiert. Als Kontrolle diente, ebenfalls von der Firma Dharmacon, die „*siGENOME Non-Targeting*“ siRNA Pool #2. Die erfolgreiche Repression der *ODC-1* Genfunktion durch die siRNA- oder DFMO-Behandlung wurde zum einen durch die quantitative „*Real Time*“ PCR Messung des *ODC1*-mRNA-Transkriptionsgrades und zum anderen durch die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer vorgenommen. Die statistischen Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Hierbei konnte die Bestimmung der Zellzahl zur Überprüfung der erfolgreichen Repression des *ODC1*-Gens benutzt werden, da die *ODC1* Genaktivität mit der Proliferationsrate korreliert (Choi *et al.*, 2016). So konnte z.B. von Shukla-Dave *et al.* (2016) in der immortalisierten epithelialen Prostatazelllinie RWPE1 durch *ODC1* Überexpression eine Zunahme der Proliferationsrate und durch Inhibition der *ODC1*-Expression durch siRNA in der humanen Leberzellkarzinomzelllinie Huh1 eine Inhibition des zellulären Wachstums durch Blockade des Zellzykluses und Induktion der Apoptose gezeigt werden (Choi *et al.*, 2016). Diese in der Literatur beschriebene Konsequenz für die Proliferationsrate scheint der Verlust der Genfunktion von *ODC1* auch auf die untersuchten urothelialen Zelllinien zu haben. In allen untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie SW 1710 für alle drei untersuchten Zeitpunkte und der Zelllinie HEK 293T für den Zeitpunkt nach 24h, konnte eine signifikant niedrigere Anzahl an Zellen durch die Behandlung mit der siRNA gegen *ODC1* oder DFMO bestimmt werden. Im Einklang damit konnte, ebenfalls durch die „*Real Time*“ PCR Auswertung, eine statistisch signifikante Reduktion der *ODC1*-Transkription nach Behandlung mit der siRNA festgestellt werden. Hierdurch wird deutlich, dass der Zusammenhang zwischen *ODC1*-Transkription und der Proliferation der Zellen, wie von Choi *et al.* (2016) gezeigt wurde, somit auch für die Zelllinien HBLAK, HEK 293T, HT 1376, VMCub1 sowie für das primäre Urothel, aber nicht für die Zelllinie SW 1710 zu gelten scheint, obwohl sich in dieser ebenfalls eine Tendenz hinsichtlich einer eingeschränkten Proliferationsrate zeigt. Im Gegensatz dazu zeigt die Behandlung mit DFMO einen signifikanten Anstieg des *ODC1*-Transkriptionsgrades bei gleichbleibender Abnahme der Zellzahl. Dieser ist jedoch nur in der Zelllinie VMCub1

statistisch signifikant und könnte darin begründet sein, dass es durch die irreversible Inhibition der Ornithin-Decarboxylase durch den Hemmstoff DFMO und der damit einhergehenden Akkumulation der Polyaminkonzentrationen zu einem „*feedback loop*“ auf die Transkription kommt und die Zelle dadurch versucht, die Fehlregulation auszugleichen. Aufgrund der Tatsache, dass aber sowohl durch die siRNA- als auch durch die DFMO-Behandlung die Anzahl der Zellen in allen Zelllinien statistisch signifikant reduziert wird, scheint die Viabilität der Zellen nicht direkt von dem *ODC1*-Transkriptionsgrad abhängig zu sein. Viel mehr ist die effektive Inhibition der Enzymaktivität, und somit die Akkumulation der Stoffwechselprodukte, maßgeblich für die Abnahme der Zellzahl verantwortlich. Bei Verdopplungszeiten der Tumorzelllinien zwischen 24 - 60h und der Verdopplungszeit des primären Urothels von 168h, findet bei der Versuchsdurchführung der Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* oder DFMO von bis zu 72h, insbesondere im primären Urothel keine Verdopplung der Zellzahl statt. Jedoch zeigen alle Zelllinien, mit Ausnahme der SW1710, eine signifikante Abnahme der Zellzahl von bis zu 60% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Hierdurch wird klar, dass selbst in den Tumorzelllinien die Proliferationsrate durch die Inhibition des *ODC1*-Genes beeinflusst werden kann. Dies zeigt, welche eine Gradwanderung die transkriptionelle Repression der Gene des Polyamin- und Methylgruppenstoffwechselweges darstellt und warum die Zellen die in den frühen Stadien der Tumorgenese angebrachten Modifikationen während der Tumorprogression wieder revertieren müssen, wie es auch unter 4.2.1 diskutiert wurde. Aus diesem Grund könnte die Inhibition einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung und die Messung der transkriptionellen Aktivität des *ODC1*-Gens einen diagnostischen Ansatz zur Klassifizierung des Harnblasenkarzinoms darstellen. Ebenfalls wird durch die verringerte Anzahl an Zellen in den urothelialen Zelllinien deutlich, dass noch andere Faktoren, welche ebenfalls durch *ODC1* reguliert werden können, einen Einfluss auf die zelluläre Viabilität nehmen müssen. Diese Annahme wird ebenfalls dadurch gestützt, dass die DFMO bedingte Depletion der Polyamine Putrescin und Spermidin (Bey *et al.*, 1987) publikativ in einer Vielzahl von verschiedenen Zelllinien zu einer Induktion der Apoptose und einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt (Ackermann *et al.*, 2003). Deshalb wurde die Auswirkung der siRNA Behandlung gegen *ODC1* auf die Zellzykluskontrolle durch Bestimmung des *p21*-Transkriptionsgrades ermittelt werden. Bei *p21* handelt es sich um einen Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen, wodurch es für die Zellzykluskontrolle

benötigt wird und wichtige Rollen im Alterungsprozess, bei der zellulären Seneszenz, bei der DNA-Reparatur und dem Zelltod spielt. P21 agiert hierbei als Mediator von p53 und die Expression von p21 resultiert entweder in einem G1 oder einem G2 Arrest des Zellzyklus (Jung *et al.*, 2010). Von Lin *et al.* (2014) konnte gezeigt werden, dass in der Interleukin 3 abhängigen prä-B-Zell Zelllinie FL5.12 der Maus eine Limitation von S-Adenosylmethionin zu einem Zellzyklusarrest der G1 Phase führt. Außerdem resultiert die Limitation von Serin und die damit einhergehende Abnahme der Purin-Synthese, die durch das Fehlen der Intermediate des Methylgruppenstoffwechselweges bedingt wird, in einer Aktivierung von p53 und führt letztendlich zu einem p21 induzierten Zellzyklusarrest (Maddocks *et al.*, 2013). Dies konnte von Ray *et al.* (1999) ebenfalls in der IEC-6 Zelllinie gezeigt werden. Der *p21*-Transkriptionsgrad wurde in den behandelten urothelialen Zelllinien mittels quantitativer „*Real Time*“ PCR in Dreifachbestimmung für jeden untersuchten Zeitpunkt ermittelt. Dabei ist auffallend, dass die *p21*-Transkription sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Zellen über die drei untersuchten Zeitpunkte jeweils ansteigt. Dies kann einerseits auf die Toxizität des Transfektionsreagenzes oder andererseits auf die Kontaktinhibition der Zellen beim Wachstum in den Petrischalen zurückzuführen sein. Außerdem ist auffallend, dass die mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zellen, mit Ausnahme der Zelllinie HBLAK, jeweils eine deutlich höhere *p21*-Transkription für die einzelnen Zeitpunkte als die korrespondierenden Kontrollen zeigen. Folglich scheint die Reduktion der Proliferationsrate, wie sie durch die siRNA-Behandlung gegen *ODC1* detektiert werden konnte, ebenfalls durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase und einer Induktion der Apoptose bedingt zu sein. Allerdings handelt es sich nur im Fall der Zelllinien HEK 293T und HT 1376 um eine statistisch signifikante Induktion der *p21*-Transkription. Die Ergebnisse deuten für diese Zelllinien somit darauf hin, dass – wie von Lin *et al.* (2014), Maddocks *et al.* (2013) und Ray *et al.* (1999) in anderen Zelllinienmodellen gezeigt werden konnte – eine Limitation der Metabolite des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges auch in den untersuchten urothelialen Zelllinienmodellen zu einem p21 induziertem Zellzyklusarrest in der G1 Phase führen könnte, wodurch sich die gefundene Abnahme der Zellzahlen in den einzelnen Zelllinienmodellen, trotz der variierenden Verdopplungszeiten, erklären lässt. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die Tumoren der TCGA-Datenbank, die den fünft niedrigsten *ODC1*-Transkriptionsgrad aller untersuchten Tumorentitäten

gezeigt haben, zu einem von Choi *et al.* (2014) definierten „p53 like“ luminalen Subtypen gehören. Dieser zeichnet sich durch die Expression von p53 und damit einhergehend geringen Mengen an Proliferations- und Zellzyklusmarkern aus. Die in dieser Arbeit detektierte Hypermethylierung des 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens kann somit direkt diesen Subtyp durch die Aktivierung von p53 bedingen, wodurch sich ebenfalls die geringeren Tumorverdopplungszeiten der urothelialen Tumoren im Vergleich zu anderen humanen Tumorentitäten erklären lassen. So zeigt das Prostatakarzinom eine Tumorverdopplungszeit von 2 - 4 Jahren (Ambs, 2018). Im Gegensatz dazu beträgt die Verdopplungszeit eines Lungenkarzinoms nur 10 - 50 Tage (Universität Heidelberg, 2018).

4.3.2 Funktionelle Bedeutung von *ODC1* auf das Methylom

Um die funktionelle Bedeutung der Promotorhypermethylierung an den Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges hinsichtlich der Integrität des Methyloms nachvollziehen zu können, sollte der reprimierende Effekt, der für die DNA-Methylierung gut untersucht ist (Kim *et al.*, 2002), mit Hilfe von siRNA gegen das Schlüsselgen *ODC1* anhand der globalen Methylierung der LINE-1 Elemente nachempfunden werden. Von Yamamoto *et al.* (2010) konnte in einer humanen Mundhöhlenkarzinomzelllinie gezeigt werden, dass die Akkumulation von dcSAM im Zuge einer *ODC1*-Inhibition zu einer globalen Hypomethylierung der CpG-Inseln führt. Als Marker für die globale Hypomethylierung wurde wiederum der LINE-1 Methylierungsgrad gewählt. Denn die Veränderungen im 5'-regulatorischen Bereich dieser Retrotransposons lassen sich sowohl in frühen Stadien des nicht invasiven Harnblasenkarzinoms, als auch in den aggressiveren muskelinvasiven Tumoren der Harnblase detektieren (Kandimalla *et al.*, 2013; Schulz & Goering, 2016). Es wird hierbei angenommen, dass die transkriptionelle Aktivität der Retrotransposons auf verschiedenen Wegen zur Entartung des Harnblasengewebes, wie z.B. durch genomische Instabilität (Ghanjati *et al.*, 2014) oder durch Aktivierung aberranter Transkriptionsmuster (Wolff *et al.*, 2010), beitragen kann. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse in den Zellen des primären Urothels von besonderer Bedeutung für die Ätiologie des Harnblasenkarzinoms. Für die Analysen wurden verschiedene urotheliale Zelllinien ausgewählt: die aus primär Urothelzellen gewonnene, spontan immortalisierte HBLAK, die embryonale Nierenepithelzelllinie HEK 293T, die Übergangszellkarzinom Zelllinie HT 1376, primäre Harnleiterzellen, die bei einer Nierenresektion gewonnen wurden, und die Übergangszellkarzinom

Zelllinien SW1710 und VMCub1. Diese wurden jeweils mit 40pmol der „*siGENOME SMARTpool*“ siRNA gegen ODC1 der Firma Dharmacon oder mit 15µmol des irreversiblen Hemmstoffes der Ornithin-Decarboxylase DFMO der Firma Merck für bis zu 72h inkubiert. Als Kontrolle diente, ebenfalls von der Firma Dharmacon, die „*siGENOME Non-Targeting*“ siRNA Pool #2. Von jeder Probe wurden der Methylierungsgrad sowie der Transkriptionsgrad der LINE-1 Retrotransposons mit Hilfe der idiolokalen Normierung (Santourlidis *et al.*, 2016) und der Methode der „*Real Time*“ MSPCR in Dreifachbestimmung gemessen. Als Referenz hierfür diente jeweils die 24h Kontrolle. Die statistischen Analysen erfolgten mittels Student's T-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Die statistische Auswertung ergibt, dass durch die Behandlung mit siRNA gegen ODC1 oder DFMO in allen Zelllinienmodellen, mit Ausnahme der SW 1710 und der VMCub1, eine signifikante Reduktion des LINE-1 DNA Methylierungsgrades induziert werden konnte. Es scheint somit der Fall einzutreten, dass die durch die Mikroarray-Analyse detektierte Hypermethylierung im Promotorbereich des ODC1-Gens maßgeblich das Methylohm der betroffenen Zellen beeinflussen und damit weitreichende Konsequenzen für die funktionelle Integrität des Gewebeverbandes nach sich ziehen kann. Hierbei ist besonders auffallend, dass die Inhibition der ODC1-Genfunktion selbst in den Tumorzelllinien, wie z.B. der HT 1376, die bereits über funktionell eingeschränkte „Schutzmechanismen“ gegen die Retrotransposons und somit einer transkriptionellen und translationellen Aktivität verfügen, in einer weiteren Demethylierung im 5'-regulatorischen Bereich der LINE-1 Elemente resultiert. Wie unter 4.2.2 beschrieben, sind derzeit 124 Erkrankungen mit einer Keimbahn-Insertion eines LINE-1-, Alu- oder SVA-Elementes assoziiert (Cordaux *et al.*, 2006; Hancks & Kazazian, 2012, 2016), wobei jedoch noch nicht geklärt ist, in wie weit der Prozess der Retrotransposition die Ätiologie der jeweiligen Erkrankung betrifft. Allerdings ist es denkbar, dass die detektierten Methylierungsveränderungen der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges in den gesunden Zellen der Harnblase, induziert durch alterungsbedingte Verwertungsdefizite oder karzinogene Substanzen, die globale Methylierungsveränderungen bedingen, wie sie hier anhand der LINE-1 Elemente nachvollzogen werden konnten, zur Entartung des Gewebes beitragen. Hierbei stellen mögliche Transpositionereignisse nur einen Weg, der für die Entartung des jeweiligen Gewebes verantwortlich sein könnte, dar. Diese Hypothese wird besonders dadurch bekräftigt, dass die stärkste Abnahme der DNA-

Methylierung im Promotorbereich der LINE-1 Retrotransposons im primären Urothel zu finden ist. Außerdem wird hierdurch deutlich, welchen starken Einfluss die Inhibition eines Schlüsselgenes des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges auf die funktionelle Integrität der betroffenen Zelle hat. Bestätigt wird dies auch durch die Messung des LINE-1-Transkriptionsgrades nach Behandlung der Zellen mit siRNA gegen *ODC1*. Hierbei wird deutlich, dass analog zur Reduktion des DNA-Methylierungsgrades alle behandelten urothelialen Zelllinien ebenfalls einen statistisch signifikant erhöhten LINE-1-Transkriptionsgrad zeigen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Literatur, denn die DNA-Methylierung wird als primärer, evolutionärer Mechanismus gegen die Aktivität der TEs vorgeschlagen (Yoder *et al.*, 1997), da die CpGs der 5'-UTR-Bereiche der LINE-1 Elemente in somatischen Zellen in der Regel stark methyliert vorgefunden werden, wodurch die Expression inhibiert wird (Hata & Sakaku 1997; Woodcock *et al.*, 1997). Die höchste transkriptionelle Aktivierung durch den Verlust der DNA-Methylierung konnte hierbei in der Tumorzelllinie HT 1376 detektiert werden. Dies zeigt, ebenfalls im Zusammenhang mit den Sequenzierungsdaten der TCGA-Datenbank, dass die Inhibition der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges nicht nur für die Ätiologie, sondern auch für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung sein kann und somit als wichtiger diagnostischer Marker fungieren kann. Die geringste transkriptionelle Aktivierung konnte im primären Urothel festgestellt werden. Dies scheint unter Berücksichtigung der Ergebnisse der DNA-Methylierungsveränderungen zunächst widersprüchlich, jedoch gilt es zu bedenken, dass es sich hierbei um gesunde Zellen handelt, welche im Gegensatz zu den Tumorzelllinien über keine genetischen und chromosomalen Anomalien verfügen. Eine starke Demethylierung der LINE-1 Elemente muss nicht zwangsläufig in einer transkriptionellen Aktivität resultieren (Seisenberger *et al.*, 2012), da mehrere zelluläre Kontrollmechanismen benötigt werden, um die LINE-1 Elemente inaktiv zu halten. Dies sind z.B. auf Proteinebene das APOBEC3-Protein (Arias *et al.*, 2012; Koito & Ikeda, 2013) und auf RNA-Ebene der RNAi-Komplex (Obbard *et al.*, 2009; Yang & Wang, 2016). Es ist demnach anzunehmen, dass die Zellen des primären Urothels über weitere „Schutzmechanismen“ verfügen, die die transkriptionelle Aktivität der Retrotransposons restringieren, wohingegen die Tumorzelllinien diese „Schutzmechanismen“ durch die beschriebenen chromosomalen und genetischen Aberrationen verloren haben. Allerdings ist die transkriptionelle Aktivierung der LINE-

1 Elemente nur in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zelllinien zu finden. Die mit DFMO behandelten Zelllinien zeigen im Gegensatz dazu keine Veränderung der LINE-1-Transkription. Dies ist zumindest für die Zelllinie VM-Cub1 ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der DNA-Methylierung. Für die Zelllinie HT 1376 jedoch konnte eine Reduktion der LINE-1 Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich detektiert werden, welche aber anscheinend keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität nimmt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der zuvor beschriebenen Überexpression des *ODC1*-Gens durch die DFMO Behandlung liegen. Hierdurch könnte verhältnismäßig mehr funktionelles ODC1 Protein intrazellulär vorliegen, wodurch andere Schutzmechanismen möglicherweise nicht in der Weise affiziert werden, wie es bei den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zellen der Fall ist. Die Ergebnisse sind im Einklang mit denen von Yamamoto *et al.* (2010) für das Mundhöhlenkarzinom beschriebenen Ergebnissen und deuten darauf hin, dass die Inhibition des *ODC1*-Gens im urothelialen Zellmodell zu einer globalen Hypomethylierung mit einer für dieses Gewebe untypischen Genexpression führt.

Um zu überprüfen ob die gemessene *LINE-1*-Transkription in den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zellen auch in einer Translation des ORF1-Proteins resultiert, wurde eine Analyse mittels Western-Blots durchgeführt. Hierfür wurden Proteinlysate aus der Zelllinie HT1376 und des primären Urothels verwendet. Als Positivkontrollen wurden Proteinlysate der Harnblasenkarzinom-Zelllinie VM-Cub-1 und der Teratokarzinom-Zelllinie NCC-IT vom Forschungslabor der Urologie zur Verfügung gestellt und eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa. Der Nachweis des ORF1-Proteins erfolgte mit dem „*mouse-anti-LINE-1-ORF1*“-Antikörper der Firma Merck Millipore mit einer Verdünnung von 1:1.000 und als Ladekontrolle wurde α -Tubulin mit dem „*rabbit-anti- α -Tubulin*“-Antikörper der Firma Abcam mit einer Verdünnung von 1:25.000 nachgewiesen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich die gefundene DNA-Hypomethylierung der LINE-1 Retrotransposons sowie deren transkriptionelle Aktivierung nicht auf Proteinebene nachweisen ließ. Eher scheint das genaue Gegenteil einzutreten. Denn in den unbehandelten Zellen der Tumorzelllinie HT 1376 konnte das ORF1-Protein, im Gegensatz zu den mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Zellen, nachgewiesen werden. Folglich scheint es, dass die siRNA Behandlung zu einer Reduktion der *ORF1*-Translation in der Zelllinie HT1376 führt. Hierdurch wird möglicherweise deutlich, dass *ODC1* alleine nicht in der Lage ist, eine onkogene Transformation in

dem untersuchten Zeitraum und unter den untersuchten Bedingungen zu initiieren. Viel mehr scheint es so, wie es auch durch die Mikroarray-Analysen der Harnblasenkarzinome aufgezeigt wird, dass eine Vielzahl an Genen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges durch DNA-Methylierung affektiert sein muss und die Kombinatorik dieser Gene letztendlich zur onkogenen Transformation und dem Tumor-Phänotyp führen könnte.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Induktion der LINE-1 Elemente auf Proteinebene können hierbei wiederum die Schutzmechanismen der Zellen gegen die Transposablen Elemente liefern. Eine andere mögliche Erklärung bieten aber auch die Mikroarray-Analysen der Zelllinien HT1376 sowie SW1710 vor und nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1*. Für diese Analysen wurden von den Zelllinien HT 1376 und SW 1710 globale Analysen, 72h nach siRNA Behandlung gegen *ODC1* und den korrespondierenden Kontrollen mit Hilfe der methylierungsspezifischen „*Human DNA Methylation 385k Arrays*“ der Firma Roche, durchgeführt. Es wurden für jede Zelllinie innerhalb der Kontrollen, die 50 Gene mit den höchsten und den niedrigsten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich bestimmt und mit denen der mit siRNA gegen *ODC1* behandelten Proben verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass etwa jedes fünfte Gen – in der Zelllinie HT 1376 21 (21%) und in der Zelllinie SW 1710 19 (19%) – Veränderungen in der Methylierungssignatur des 5'-regulatorischen Bereiches nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* zeigt. Dies verdeutlicht, analog zu den detektierten Veränderungen in den Promotorbereichen der LINE-1 Elemente, wie stark der inhibierende Einfluss von dcSAM auf die DNMTs sein muss und welche weitreichenden Konsequenzen die funktionelle Inhibition der Schlüsselgene des Polyamin- und Methylgruppenmetabolismus haben kann. Zu den 50 Genen mit den höchsten und den niedrigsten Methylierungssignaturen im 5'-regulatorischen Bereich gehören in beiden Zelllinien zum größten Teil sowohl Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren als auch beschriebene Onkogene bzw. Gene, deren Expressionsveränderungen mit der Entartung assoziiert sind. Aber auch epigenetische Regulatoren, zu denen ebenfalls die Histonprotein kodierenden Gene gezählt werden, befinden sich unter diesen Top 50. Gene, die in beiden Zelllinien zu den 50 mit der stärksten Methylierung im 5'-regulatorischen Bereich gehören, sind *ATP11A*, *CARS*, *CD81*, *IGF2R* und *PDCD6*. Bei diesen handelt es sich, mit Ausnahme von *ATP11A*, um Gene, die beschriebene Onkogene bzw. Tumor assoziierte Gene sind oder wichtige Rollen im Zellzyklus oder als

Transkriptionsfaktoren einnehmen. Von besonderer Bedeutung ist insbesondere das Gen *PDCD6*. Dieses Gen kodiert für ein Ca^{2+} bindendes Protein, welches eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Apoptose spielt. Es interagiert mit der „*human death-associated protein kinase 1*“ (*DAPk1*) und die Co-Transfektion von *PDCD6*- und *DAPk1*-cDNA in eine Tumorzelllinie führte zu einem Anstieg der Apoptoserate. Diese wurde durch den Caspase 3 abhängigen Signalweg ausgelöst (Lee *et al.*, 2005). Die Dysregulation des *PDCD6*-Gens steht im Zusammenhang mit der Entartung diverser Gewebetypen und wird als prognostischer Marker für die Diagnostik diskutiert (Zhou *et al.*, 2014). Durch die Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* kommt es in beiden Zelllinien zu einer Promotorhypomethylierung des *PDCD6*-Gens, was darauf schließen lässt, dass es in beiden Zelllinien aktiviert wird und über den Caspase 3 abhängigen Signalweg Apoptose induzieren kann. Dies würde zum einen die starke Abnahme der Zellzahl und den Anstieg der *p21*-mRNA, wie sie durch die siRNA Behandlung gefunden werden konnten, erklären. Zum anderen könnte dies für die fehlende Induktion der LINE-1 Elemente auf Proteinebene bedeuten, dass die Zellen, welche in einem erhöhten Maße das ORF1 und / oder das ORF2 Protein translatieren, ebenfalls durch die wieder etablierte Genfunktion von *PDCD6* zur Apoptose getrieben werden und somit die Proteine nicht detektiert werden können.

Ein weiteres Gen, welches in beiden Zelllinien eine Hypomethylierung im 5'-regulatorischen Bereich nach 72h Behandlung mit der siRNA gegen *ODC1* zeigt, ist *ATP11A*. Hierbei handelt es sich um einen Adenosin-Triphosphat bindendes Transporterprotein, welches nicht im direkten Zusammenhang mit der Entstehung eines humanen Tumors steht. Allerdings konnte für das Kolonkarzinom gezeigt werden, dass der *ATP11A*-mRNA-Transkriptionsgrad im Vergleich zur gesunden Kontrolle deutlich erhöht vorliegt, wodurch die *ATP11A* Expression als unabhängiger Marker für die Bildung von Metastasen diskutiert wird (Miyoshi *et al.*, 2010). Hierdurch wird deutlich, welchen Einfluss die transkriptionelle Repression des *ODC1*-Gens in den späteren Stadien des Harnblasenkarzinoms, wie sie durch die TCGA-Datenbank gezeigt wird, auf die Progression des Tumors nehmen kann. Demnach könnten, wie für das Kolonkarzinom beschrieben, die Demethylierung und die damit einhergehende transkriptionelle Aktivierung des *ATP11A*-Gens einen diagnostischen Marker für die Metastasierung im Harnblasenkarzinom darstellen. Ähnliches gilt auch für das Gen *RAB27A*, welches jedoch nur in der Zelllinie SW 1710 eine Promotor

Hypomethylierung erfährt. Hierbei handelt es sich um eine GTPase, welche durch ihre Funktion beim Vesikeltransport das Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen begünstigen kann. Dieses Gen wurde in den Primärtumoren des Kolons ebenfalls runterreguliert vorgefunden und das Fehlen des Genproduktes war mit einer erhöhten Dedifferenzierung und Metastasierungsrate verbunden (Dong *et al.*, 2015).

Ein weiteres Gen, welches allerdings nur in der Zelllinie HT 1376 eine Demethylierung des Promotorbereiches nach siRNA Behandlung gezeigt hat, ist *CD81*. Hierbei handelt es sich um ein Zelloberflächenprotein, welches für ein breites Spektrum an zellulären Funktionen benötigt wird. Hierzu gehören u.a. entwicklungsbiologische Prozesse, das zelluläre Wachstum und die zelluläre Beweglichkeit. In Bezug auf die Tumorgenese steht es in verschiedenen Entitäten in Zusammenhang mit der Tumorprogression und Migration (Mazzocca *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2013). Ebenfalls ist beschrieben, dass *CD81* in der zytoplasmatischen Membran des gesunden Urothels hoch exprimiert wird, wohingegen die Expression in Tumorzellen der Harnblase deutlich reduziert wird (Lee *et al.*, 2015). Dies deckt sich mit der detektierten Hypermethylierung des *CD81* Promotorbereiches in der unbehandelten Zelllinie. Allerdings wird durch die Revertierung der DNA-Methylierung und der damit möglicherweise einhergehenden Revertierung der *CD81*-Expression wiederum deutlich, dass die Behandlung von Tumorzellen mit siRNA gegen *ODC1* eventuell einen therapeutischen Ansatz bietet, welcher in der Lage ist, die Zellen entweder durch Aktivierung von Genen wie *PDCD6* zur Apoptose zu treiben, oder durch eine Normalisierung des Methyloms, wie im Fall von *CD81*, wieder ein gesundes Transkriptionsmuster zu etablieren.

Das Gen *TFAP2C* zeigte nach der Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* ebenfalls eine Hypomethylierung im 5'-regulatorischen Bereich. Bei diesem handelt es sich um ein Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der beiden Östrogenrezeptoren ER und Her2. Außerdem ist dieses Protein in der Lage die Expression von *GPX1* zu regulieren, welches wiederum den Redox-Status und die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber oxidativem Stress beeinflusst (Kulak *et al.*, 2013). Die DNA Methylierung im Promotorbereich des *GPX1*-Gens konnte in 20% der primären Mammakarzinome festgestellt werden, wobei ein höchst signifikanter Zusammenhang zwischen der *TFAP2C*- und der

GPX1-Expression bestätigt werden konnte (Kulak *et al.*, 2013). Eine Inaktivierung dieses Gens würde demnach für die Tumorzelllinie HT 1376 bedeuten, dass die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies aufgrund der Deregulierung von *TFAP2C*, kombiniert mit der veränderten metabolischen Aktivität des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges, ansteigt und dadurch irreversible Schäden an zellulären Makromolekülen, wie z.B. der DNA, Proteinen oder Fettsäuren, induziert werden. Hierdurch würde sich auch die Vielzahl an genetischen und epigenetischen Veränderungen, die für das Harnblasenkarzinom und insbesondere für die Zelllinie HT 1376 (siehe unter 7.2) beschrieben sind, erklären lassen. Denn über ein erhöhtes Level an ROS kann die Tumorzelle sowohl die Proliferationsrate als auch die Mutationshäufigkeit steigern (Liou & Storz, 2010).

Drei Gene, welche allerdings nur in der Zelllinie SW1710 eine Demethylierung des Promotorbereiches nach siRNA Behandlung gezeigt haben, sind *ASB4*, *FASN* und *NFATc1*. Das Genprodukt von *ASB4* ist ein Mitglied der „*ankyrin repeat and SOCS box-containing*“ (ASB) Proteinfamilie, welches als Suppressor des Zytokin Signalweges agiert. Hierbei handelt es sich um ein Tumorstammzell-spezifisches Antigen, welches von somatischen Zellen nicht exprimiert wird (Miyamoto *et al.*, 2018). Bei *FASN* handelt es sich um die Fettsäuresynthase, welche eine wichtige Rolle in dem „*de novo*“ lipogenen Signalweg einnimmt und dessen Überexpression in diversen Tumorentitäten, wie z.B. dem Retinoblastom, publikativ beschrieben ist (Sangeetha *et al.*, 2015). Hierbei konnte die siRNA bedingte Inhibition des *FASN*-Gens mit einer Reduktion der Tumorzell Viabilität korreliert werden (Sangeetha *et al.*, 2015). Die funktionelle Bedeutung des „*nuclear factor of activated T-cells*“ (*NFAT*) ist für die Immunantwort gut, für die Tumorentstehung bisher jedoch kaum charakterisiert. Allerdings konnte eine Isoform von *NFAT* als Onkogen in einem Sarkom-Modell des humanen Prostatakarzinoms identifiziert werden (Kawahara *et al.*, 2015). Aufgrund dieser Tatsachen zeigen die drei Gene *ASB4*, *FASN* und *NFATc1*, wie durch die transkriptionelle Inhibition der Schlüsselgene des Polyamin- und Methylgruppenmetabolismus Marker, die nur in Tumorgewebe exprimiert werden bzw. deren Überexpression in solchen Geweben beschrieben ist, aktiviert werden können.

Drei Gene, die in verschiedenen humanen Tumoren überexprimiert werden und die ebenfalls in den Mikroarray-Analysen eine Hypermethylierung im Promotorbereich

nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* zeigten, sind in der Zelllinie HT 1376 die Gene *GATA4* und *NOTCH1* sowie in der Zelllinie SW1710 das Gen *TGFB1i1*. Das Genprodukt von *GATA4* gehört zur Familie der Zinkfinger Transkriptionsfaktoren und reguliert Gene, die während der Embryogenese, der Differenzierung des Myokards und der normalen Entwicklung der Testikel benötigt werden. Die Überexpression dieses Gens ist für diverse Tumorentitäten, wie z.B. dem Magenkarzinom, beschrieben (Chia *et al.*, 2015), wobei angenommen wird, dass hierdurch die Entwicklung des Magenkarzinoms, durch Etablierung eines proonkogenen Transkriptionsnetzwerkes, begünstigt wird (Chia *et al.*, 2015). Ähnliches gilt auch für die Überexpression des *NOTCH1*-Gens im Zusammenhang mit dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (Zhou *et al.*, 2015) und des *TGFB1i1*-Gens im Zusammenhang mit dem Astrozytom (Liu *et al.*, 2014). Dass in den urothelialen Zelllinien durch die Mikroarray-Analyse keine Promotormethylierung detektiert werden konnte, deutet zwar nicht auf eine Überexpression dieser Gene in den Modellen hin, jedoch zeigt es, dass diese Gene potentiell exprimiert werden können. Die Hypermethylierung im Zuge der siRNA Behandlung gegen *ODC1* zeigt jedoch, dass diese Gene, trotz der Inhibition der DNMTs durch die Akkumulation von dcSAM, transkriptionell stillgelegt werden. Dies deutet daraufhin, dass sie nur eine geringe bis gar keine Rolle bei der Entartung des Harnblasenkarzinoms spielen, da die TCGA-Sequenzierungsdaten die Runterregulation der *ODC1*-mRNA ebenfalls für die späteren Stadien des Harnblasenkarzinoms bestätigen.

Von besonderer Bedeutung für die zentrale Hypothese der Arbeit sind jedoch die Methylierungsveränderungen der 5'-regulatorischen Bereiche der Gene, die für epigenetische Regulatoren kodieren. Diese treten nur in der Zelllinie HT 1376 auf und bieten möglicherweise die Erklärung, warum die Zellzahl sowie die DNA-Methylierung der LINE-1 Retrotransposons und der *p21*-Transkriptionssgrad in der Zelllinie SW 1710 nicht statistisch signifikant verändert vorliegen. Die Zelllinie HT 1376 weist nach Behandlung mit siRNA gegen *ODC1* an den beiden Genen *H2AFY* und *LSMD1* eine Hypo- und an dem *MTHFS*-Gen eine Hypermethylierung auf. Bei *H2AFY* handelt es sich um ein Mitglied der H2A Histone Familie, welches replikationsunabhängig ist. Es kann mit dem HER2 Protein interagieren und dadurch zu einer gesteigerten Proliferationsrate beitragen (Li *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wird angenommen, dass eine Überexpression die Tumorentstehung und -progression begünstigen kann. Bei *LSMD1* handelt es sich um die N-terminale

Acetyltransferase C, welche die Acetylierung der N-terminalen Domäne von Methioninresten katalysiert. Das Genprodukt von *MTHFS* ist verantwortlich für die Spaltung von 5-Formyltetrahydrofolat zu 5,10-MTHF. Dieses Molekül stellt den Vorläufer des im „one carbon metabolism“ benötigten, reduzierten Folates dar. Welche Folgen die transkriptionelle Veränderung dieses Gens haben kann, zeigt die gut untersuchte Veränderung des *MTHFR*-Gens. Dieses Enzym benötigt 5,10-MTHF, um das für die Remethylierung von HCY verwendete 5-Methyl-THF herzustellen. Kommt es an der Position 677 des *MTHFR*-Gens zu einer Cytosin zu Thymin Transition (Clayton *et al.*, 2005), so senkt diese Mutation die Transkriptionsrate im homozygoten Fall um 70% und im heterozygoten Fall um 40%, mit einhergehender globaler DNA-Hypomethylierung. Durch diese Tatsache kann die detektierte Hypermethylierung des *MTHFS*-Gens weitreichende Veränderungen des Methyloms bedingen und den beschriebenen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien erklären. Allerdings wird durch die Veränderung dieser drei Gene eindrucksvoll gezeigt, dass die Interferenz mit der transkriptionellen Aktivität eines Schlüsselgenes des Polyaminstoffwechselweges eine direkte Rückkopplung auf die transkriptionelle Aktivität und somit auch auf den Methylierungsstatus anderer Gene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsels hat. Hierdurch werden weitreichende Konsequenzen für die jeweils affizierte Zelle bedingt.

4.3.3 ODC 1 als Masterregulator der Epigenetik

Wie unter 4.3.2 beschrieben, ist die funktionelle Inhibition der Ornithin Decarboxylase 1 in der Lage, durch Akkumulation des Stoffwechselproduktes dcSAM, global das Methylom zu verändern. Diese Veränderungen konnten zum einen anhand der Demethylierung der LINE-1 Retrotransposons, die einen Großteil des humanen Genoms für sich beanspruchen, und zum anderen durch die Hypo- und Hypermethylierung der 5'-regulatorischen Bereiche einzelner Gene, wie sie durch die Mikroarray-Analyse gezeigt wurden, detektiert werden. Die Mikroarray gestützte Analyse offenbarte, dass durch die Interferenz mit der transkriptionellen Aktivität eines Schlüsselgenes des Polyaminstoffwechselweges, eine direkte Rückkopplung auf die transkriptionelle Aktivität und somit auch auf den Methylierungsstatus anderer Gene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechsels bedingt wird. Hieraus lässt sich folgern, dass die Hypermethylierung der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges zu einem „Feed-Forward-Zyklus“ führen kann, der als Konsequenz zusätzliche DNA-Methylierungsänderungen nach sich ziehen kann.

Diese Ergebnisse zeigen, wie bedeutsam die Funktion von *ODC1* für die Aufrechterhaltung des Methyloms und somit für die funktionelle Integrität der Zelle ist. Potentiell ist es daher denkbar, dass es sich bei *ODC1* und dessen Stoffwechselprodukten um Masterregulatoren der epigenetischen Modifikation der DNA-Methylierung handelt. Die Tatsache, dass die transkriptionelle Inhibition von *ODC1* zu einer Demethylierung der LINE-1 Elemente und einer transkriptionellen Aktivierung der Retrotransposons führt und deren Aktivität mit der Entstehung diverser humaner Erkrankungen assoziiert ist, zeigt auch, dass es sich bei *ODC1* und dessen Stoffwechselprodukten um Onko-Metabolite bzw. Onkogene handeln könnte. In diesem Zusammenhang ist bisher mit (D)-2-Hydroxygluterat (D-2HG) das erste und einzige Stoffwechselprodukt beschrieben worden, welches in der Lage ist, die Funktion von DNA- und Histondemethylase zu inhibieren und dadurch einen erheblichen Einfluss auf die epigenetische Regulation, die Kollagensynthese und das „*cell signaling*“ nehmen kann (Cairns & Mak, 2013). Durch dieses Stoffwechselprodukt werden epigenetische Mechanismen verändert, was wiederum die Transkriptionsrate vieler verschiedener Gene beeinflussen kann. Hierdurch kann der direkte Einfluss der veränderten metabolischen Aktivität in Tumorzellen multipliziert werden. Dies konnte in dieser Arbeit auch für die siRNA Behandlung gegen *ODC1* im urothelialen Zelllinienmodell nachempfunden werden. Als direkte Konsequenzen der Behandlung zeigten sich Beeinträchtigungen der Proliferationsraten, die transkriptionelle Aktivierung des p53-Mediators *p21* und weitreichende Veränderungen innerhalb des Methyloms der betroffenen Zellen, wie sie auch in Tumorzellen detektiert werden können. Aus den genannten Gründen könnte die funktionelle Inhibition der Ornithin Decarboxylase 1 maßgeblich zur Entartung des Gewebes beitragen und somit ursächlich für die Ätiologie des Harnblasenkarzinomes sein. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in dieser Arbeit, trotz der Demethylierung der LINE-1 Elemente und deren transkriptioneller Aktivität, keine Induktion der Translation des ORF1 Proteins beobachtet werden konnte. Jedoch ist es denkbar, dass eine Vielzahl an Genen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges durch DNA-Methylierung affiziert sein müssen und die Kombinatorik dieser Gene letztendlich zur onkogenen Transformation und dem Tumor-Phänotyp führt, wie es auch durch die Mikroarray-Analysen der Harnblasenkarzinome beobachtet werden konnte. Daher könnte der

Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweg eine Vielzahl an Onko-Metaboliten und Onkogenen beinhalten, was in weiteren Versuchen untersucht werden sollte.

4.4 Der „*PrimeEpiHit*“ (PEH) als möglicher Initiator der urothelialen Tumorgenese

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit wurde die Hypothese des sogenannten „*PrimeEpiHits*“ (PEH) für die molekulare Ätiologie des Harnblasenkarzinoms entwickelt. Hierbei wird angenommen, dass karzinogene Stoffe, wie die im Zigarettenrauch enthaltenen aromatischen Amine, durch ihre längere Verweil- und damit einhergehende Expositionsdauer, ihren schädlichen Effekt auf das Epithel der Harnblase verstärken. Diese Substanzen sind in der Lage direkt durch die Zellmembranen zu diffundieren und dort mit zellulären Strukturen zu reagieren. Funktionell können die Schadstoffe des Zigarettenrauches auf zwei Arten die Transkription beeinflussen. Zum einen können sie mit der DNA Addukte bilden und dadurch Mutationen in Schlüsselgenen der Karzinogenese auslösen (Besaratina & Tommasi, 2013). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Harnblasenzellen, nachdem sie Zigarettenrauch ausgesetzt waren, als direkte Konsequenz aberrante Methylierungsmuster aufweisen (Besaratina & Tommasi, 2013). Geschehen diese funktionellen Veränderungen der Transkription und letztendlich des epigenetischen Status bei einem Schlüsselgen des Methylgruppen- oder Polyaminstoffwechselweges, erfolgt der sogenannte „*PrimeEpiHit*“. Diese Veränderung hat zur Folge, dass die Regulation des jeweiligen affektieren Stoffwechselweges gestört wird, wodurch die intrazellulären SAM-, SAH- und dcSAM-Konzentrationen in Ungleichgewicht geraten können. Durch alle drei genannten Metabolite lässt sich die Aktivität der DNMTs sowie der HMTs regulieren (Locasale, 2013). Hierbei sind insbesondere die Konzentrationsveränderungen der Abbauprodukte von SAM, also SAH und dcSAM, als Inhibitoren der Methyltransferasen beschrieben (Maruti *et al.*, 2009; Pegg, 2010), wobei eine Akkumulation dieser Stoffwechselprodukte mit einem gewissen Grad an globaler DNA-Hypomethylierung assoziiert ist. Alle Enzyme der beiden Stoffwechselwege, die direkt dieses Verhältnis beeinflussen können, werden als Schlüsselgene angesehen, wobei in dieser Arbeit speziell *ODC1* untersucht und als möglicher Masterregulator der epigenetischen Regulation identifiziert wurde. Die auf diese Art induzierte globale Hypomethylierung betrifft auch die CpGs der 5'-UTR-Bereiche der LINE-1-Elemente, die sonst in somatischen Zellen stark methyliert vorliegen (Hata & Sakaku 1997;

Woodcock *et al.*, 1997). Hierdurch kann sowohl die transkriptionelle, wie in dieser Arbeit gezeigt, als auch die translationelle Aktivität dieser Elemente ausgelöst werden und damit auf verschiedenen Wegen zur Entartung des Gewebes, wie z.B. durch genomische Instabilität (Ghanjati *et al.*, 2014) oder durch Aktivierung aberranter Transkriptionsmuster (Wolff *et al.*, 2010), beitragen. Derzeit sind 124 Erkrankungen mit einer Keimbahn-Insertion eines LINE-1-, Alu- oder SVA-Elementes assoziiert (Cordaux *et al.*, 2006; Hancks & Kazazian, 2012, 2016), wobei die Hypomethylierung der LINE-1 Retrotransposons in 90% der Harnblasenkarzinome nachgewiesen werden konnte (Neuhausen *et al.*, 2006) und ebenfalls in dieser Arbeit bestätigt wurde. Ob diese Form der Veränderung maßgeblich zu Entartung des Gewebes beiträgt oder ob sie eine Folgeerscheinung der Tumorgenese ist, konnte experimentell bisher nicht belegt werden.

Zusätzlich zu den karzinogenen Substanzen, könnte der „*PrimeEpiHit*“ auch durch alterungsbedingte Verwertungsdefizite innerhalb des „*one-carbon-metabolism*“ erfolgen. Diese Verwertungsdefizite sind ebenfalls durch eine Akkumulation des Abbauproduktes SAH und damit einhergehender DNA-Hypomethylierung charakterisiert (Hoffmann *et al.*, 1979). Auch in neueren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl in geringem Ausmaße „*de novo*“ Methylierung der CpG-Inseln (Kulis *et al.*, 1999; Teschendorff *et al.*, 2010; Issa, 2014) als auch eine generelle Demethylierung in somatischen Zellen (Maegawa *et al.*, 2010) während des Alterungsprozesses stattfinden. Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie ein präferiertes Ziel der onkogenen Transformation darstellen (Easwaran *et al.*, 2014; Issa, 2014), insbesondere da die altersbedingten Veränderungen der Chromatinstruktur eine erhöhte Expression an Retrotransposons zur Folge haben (Belancio *et al.*, 2015; Maxwell, 2016; St. Laurent *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang ist es jedoch schwer die Insertionen nachzuweisen, da die „*de novo*“ Insertionen nur in einer geringen Anzahl an Zellen zu finden sein werden und somit die Nachweisgrenze der derzeitigen Amplifikationsmethoden zu gering sein könnte. Erst eine klonale Expansion der Insertion, wie sie z.B. in Tumoren stattfindet, kann solch ein Retrotranspositionereignis sichtbar werden lassen (Goodier, 2016). Zusätzlich kommen neben der DNA-Methylierung weitere Kontrollmechanismen hinzu, die sowohl auf Proteinebene, wie z.B. durch das APOBEC3-Protein (Arias *et al.*, 2012; Koito & Ikeda, 2013), als auch auf RNA-Ebene, wie z.B. durch den RNAi-Komplex (Obbard *et al.*, 2009; Yang & Wang, 2016), die Aktivität der TES

beeinflussen können und damit eine mögliche Erklärung für die, wie in dieser Arbeit beschrieben, fehlende Induktion der LINE-1-Elemente auf Proteinebene bieten könnten. Generell gilt jedoch, dass das Alter einen Risikofaktor für die Erkrankung mit einem Harnblasenkarzinom darstellt, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter für Männer bei 74 und für Frauen bei 76 Jahren (Deutsche Krebshilfe, 2016) liegt und die Erkrankungsrate mit dem Alter stetig ansteigt. So erkrankt nur etwa jede(r) fünfte vor dem 65. Lebensjahr (Robert Koch Institut, 2013).

Neben den karzinogenen Substanzen des Tabakrauches, ist auch die Exposition des Organismus mit Giftstoffen wie Asbest, Alkohol, Strahlung und Arsen mit DNA-Methylierungsveränderungen assoziiert (Christensen & Marsit, 2011). Wobei vornehmlich der Tabakkonsum die Hauptursache der Tumorgenese darstellt und für schätzungsweise 22 % der Mortalität verantwortlich ist (World Health Organization, 2017). Für die Tumorentstehung wurde deshalb von Knudson (2001) postuliert, dass die wesentlichen Charakteristika der malignen Transformation aller Tumorarten nur eine geringe Anzahl an Veränderungen einschließen und diese in der Regel Gene betreffen, die für die Proliferation und Apoptose kodieren. In diesem Zusammenhang beschreibt Knudson (2001) für das Kolonkarzinom fünf genetische „hits“ in verschiedenen Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen, die für die Entartung des Gewebes verantwortlich sind. Aus diesen Gründen ist anzunehmen, dass die Veränderungen in Schlüsselgenen des Polyamin- und Methylgruppenstoffwechselweges und damit die Hypothese des PEH auch auf andere Tumorentitäten zutreffen könnten. Die Hypothese des „*PrimeEpiHit*“ ist in Abbildung 34 dargestellt.

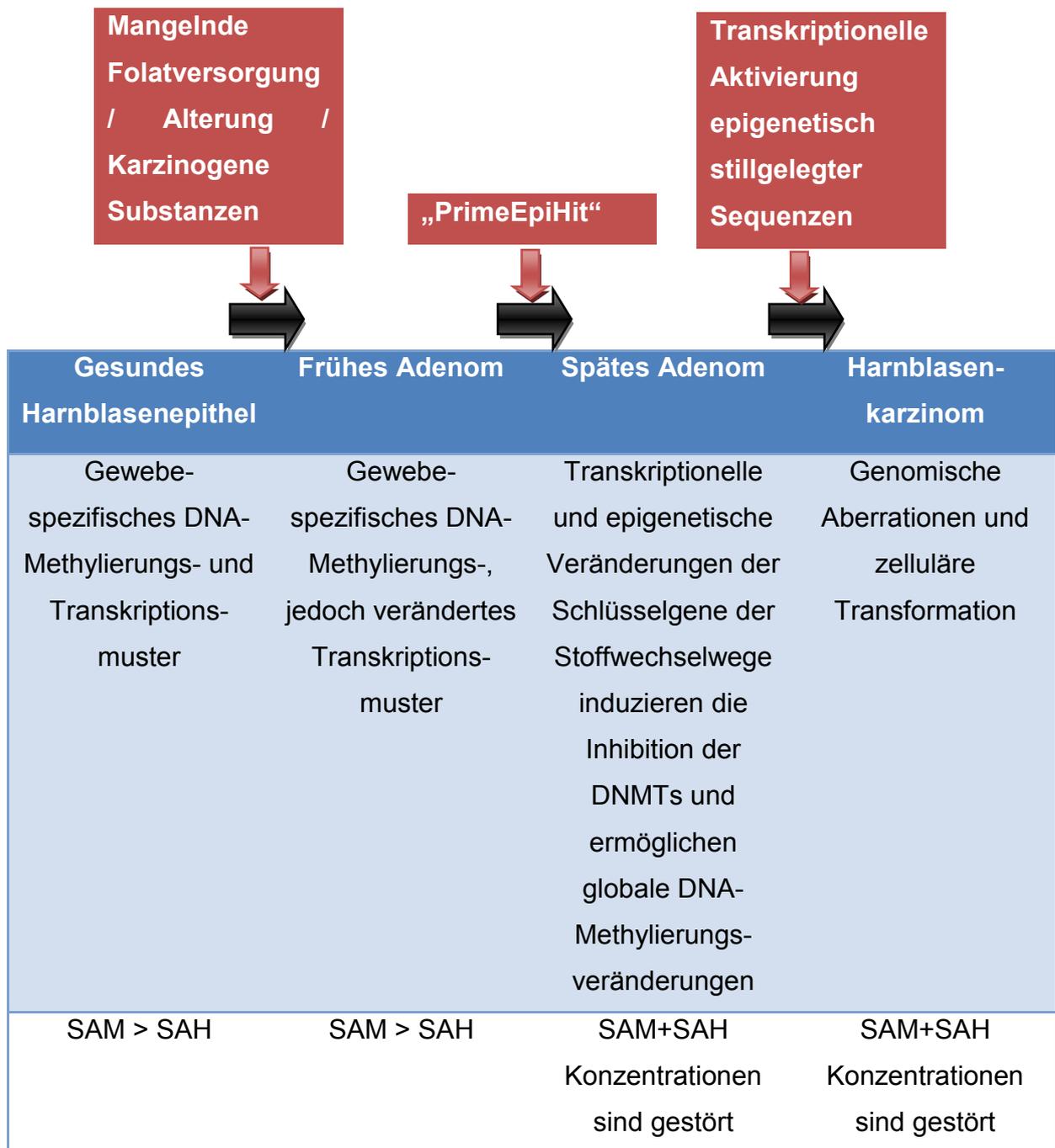


Abbildung 34: Die „PrimeEpiHit“-Hypothese.

Die Abbildung zeigt die Entartung des Harnblasengewebes nach der Hypothese des „PrimeEpiHit“. Hierbei erfährt das gesunde Harnblasengewebe durch eine mangelnde Versorgung an Folat, durch alterungsbedingte Faktoren oder durch karzinogene Stoffe eine Veränderung des gewebespezifischen Transkriptionsmusters. Geschieht dies an einem Schlüsselgen des Methylgruppen- oder Polyaminstoffwechselweges, kann dies zu einer Veränderung des epigenetischen Status im Promotorbereich des jeweiligen Gens führen. Dieser Vorgang ist der sogenannte „PrimeEpiHit“. Als Folge etablieren sich veränderte SAM und SAH Konzentrationen innerhalb der Zelle, die in einer Inhibition der DNMTs und damit einhergehender globalen Hypomethylierung resultieren können. Hierdurch können ehemals stillgelegte Sequenzen (wie z.B. Onkogene und Retrotransposons) aktiviert werden, die dann zu genomischen Aberrationen und der zellulären Transformation führen.

4.5 Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hat die funktionelle Inhibition der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges weitreichende Folgen für das Methylom und damit einhergehend für die funktionelle Integrität der betroffenen Zellen. Hierbei konnten die in der Literatur bereits gut dokumentierten Charakteristika des Harnblasenkarzinoms durch die Behandlung mit siRNA gegen *ODC1*, wie die Demethylierung der LINE-1 Elemente und deren transkriptionelle Aktivierung in den gewählten urothelialen Zelllinienmodellen, induziert werden. Hierdurch wird klar, welche Gefahr die funktionelle Inhibition der Schlüsselgene für die Entartung des Gewebeverbandes darstellen kann. Da jedoch die Induktion der LINE-1 Retrotransposons auf Proteinebene ausblieb, ist es denkbar, dass nicht nur ein Gen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges ausgeschaltet werden muss. Vielmehr könnte eine Vielzahl an Schlüsselgenen betroffen sein und die Kombinatorik dieser führt letztendlich zur onkogenen Transformation und dem Tumor-Phänotyp. Aus diesem Grund könnte der Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweg eine Vielzahl an Onkogenen beinhalten, die in weiteren Versuchen identifiziert werden sollten. In der Literatur werden diverse mit einem Tumor assoziierte Methylierungsveränderungen als Biomarker diskutiert. Diese lassen sich sowohl in der Diagnostik, als auch in der Prognostik und Nachsorge einsetzen (Kandimalla *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen könnten somit ein wichtiges Diagnostikum sowohl für die Tumorentstehung, als auch für die Progression und Differenzierung zwischen uni- und multifokalen Tumoren der Harnblase darstellen. Deshalb sollte in den vorgeschlagenen weiteren Versuchen der Fokus vor allem darauf gelegt werden, ob sich die uni- und multifokalen Tumoren sowie die einzelnen T-Stadien anhand der Methylierungsveränderungen spezifisch und verlässlich unterscheiden lassen. Hierfür ist es notwendig, eine größere Probenkohorte zu untersuchen, welche pathologisch und im Idealfall auch molekularbiologisch im Vorfeld gut charakterisiert wird. Auch der Aspekt der Onko-Metabolite sollte weitere Aufmerksamkeit erhalten, denn es ist prinzipiell denkbar, dass sich diese Stoffe in veränderter Konzentration im Urin der erkrankten Personen nachweisen lassen. Diese Veränderungen könnten hierbei spezifisch für den Status der Erkrankung sein, wodurch der Zugriff auf ein nicht invasives Diagnostikum gegeben wäre. Dies hätte zum einen den Vorteil die Belastung für den Patienten zu minimieren und zum anderen auch den

Kostenaufwand zu senken. Des Weiteren wäre solch ein Diagnostikum in der Lage, den Verlauf der Erkrankung verlässlich anzuzeigen.

Um die funktionelle Bedeutung der Schlüsselgene des Polyamin- und Methylgruppenmetabolismus weiter zu untersuchen, sollten die mit einer Kombination von siRNAs gegen die Faktoren der Stoffwechselwege behandelten urothelialen Zelllinien auch auf genetische und chromosomale Veränderungen hin untersucht werden. Eine Möglichkeit hierfür bietet der sogenannte UroVysion-Test. Dieser ist in der Lage durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in relativ kurzer Zeit Aneuploidien der Chromosomen 3,7,17 und / oder der Deletion des Locus 9p21 zu detektieren (Schulz *et al.*, 2018). Hierdurch würden weitere Einblicke in die Ätiologie der Tumorentstehung im Allgemeinen und des Harnblasenkarzinoms im Speziellen erzielt werden, die möglicherweise zur Therapie beitragen könnten. Dass diese Form der Therapie durchaus vielversprechend sein kann, zeigt die Tatsache, dass sogenannte Antifolat-Medikamente bereits zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt werden (Newman & Maddocks, 2017). Als Beispiele für solche Medikamente sind vor allem Methotrexat und Fluorouracil zu nennen. Bei Beiden handelt es sich um Inhibitoren der THF- oder der Thymidinsynthese (Gonen & Assaraf, 2012; Locasale, 2013; Longley *et al.*, 2003). Analog dazu und unter Berücksichtigung der verminderten Zellzahl in den urothelialen Tumorzelllinien nach der siRNA Behandlung, erscheint eine Inhibition der ODC1 ebenfalls einen möglichen Therapieansatz darzustellen.

Zusätzlich könnten weitere Versuche ebenfalls Auskunft darüber geben, ob es sich bei der Hypomethylierung der 5'-regulatorischen Bereiche um einen aktiven, wie z.B. durch die Tet-Demethylasen bedingten, oder einen passiven, durch Ausdünnung der Methylcytosine während der Replikation, Mechanismus handelt. Dies ist für das grundlegende Verständnis der Epigenetik von fundamentaler Bedeutung und könnte für eine ganze Bandbreite an neuen Applikationen verwendet werden.

5.1 Zusammenfassung

Die am häufigsten vorkommende Tumorerkrankung der Harnwege ist das Harnblasenkarzinom mit einer weltweiten Inzidenz von 429.000 Neuerkrankungen und einer Mortalität von 150.000 Patienten pro Jahr (Ferlay *et al.*, 2015). Das Harnblasenkarzinom stellt 2% aller malignen Tumoren dar und ist die fünft häufigste Tumorerkrankung beim Mann (Knowles & Hurst, 2015). Die Erkrankung verursacht erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem aufgrund der Notwendigkeit längerer Behandlungen und der Langzeitüberwachung (Erichsen *et al.*, 2018).

Ausgedehnte aberrante DNA-Methylierungssignaturen sind für das Urothelkarzinom ausführlich beschrieben. Von diesen wird angenommen, dass sie zur genetischen Instabilität sowie veränderter Genexpression und zur Tumorprogression beitragen. Die Ursachen dieser epigenetischen Veränderungen sind jedoch genauso unbekannt wie der Zeitpunkt, an dem diese auftreten. Es ist folglich nicht klar, ob sie ursächlich für die Karzinogenese sind oder als Folgeerscheinung auftreten. Ein intakter Methylgruppenmetabolismus ist erforderlich, um die Aufrechterhaltung von zelltypspezifischen Methylomen und damit die genetische Integrität sowie die ordnungsgemäße zelluläre Funktion sicherzustellen. Unter Verwendung von zwei unabhängigen Methoden zum Nachweis der DNA-Methylierung konnte in dieser Arbeit eine DNA-Hypermethylierung der 5'-regulatorischen Bereiche von Schlüsselgenen des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges, einschließlich der Gene *ODC1* und *AHCY*, beim frühen Urothelkarzinom festgestellt werden. Diese Hypermethylierungsereignisse sind mit einer genomweiten DNA-Hypomethylierung verbunden, die üblicherweise mit einer genetischen Instabilität assoziiert ist (Erichsen *et al.*, 2018). Um die hemmende Wirkung der gefundenen DNA-Hypermethylierung innerhalb der Promotorregion nachzuahmen, wurde eine siRNA-Behandlung gegen *ODC1* in verschiedenen urothelialen Zelllinien durchgeführt. Die direkten Konsequenzen dieser Behandlung zeigten sich in einer Beeinträchtigung der Proliferationsrate, einer transkriptionellen Aktivierung des p53-Mediators *p21* und weitreichenden Veränderungen innerhalb des Methyloms der urothelialen Zelllinien. Die signifikantesten Veränderungen waren die globale Demethylierung und die damit verbundene transkriptionelle Aktivierung der LINE-1-Retrotransposons, sowie Methylierungsveränderungen, die innerhalb mehrerer epigenetischer Regulatoren

beobachtet werden konnten. Es wird daher gefolgert, dass die Hypermethylierung der Schlüsselgene des Methylgruppen- und Polyaminstoffwechselweges zu einem „*Feed-Forward-Zyklus*“ führt, der zusätzliche DNA-Methylierungsveränderungen fördern kann. Diese Beobachtungen führen dazu, dass eine neue Hypothese der molekularen Ätiologie des Urothelkarzinoms vorgeschlagen wird (Erichsen *et al.*, 2018).

5.2 Summary

The most common urinary tract disease is bladder cancer with a worldwide incidence of 429,000 new cases and a mortality of 150,000 patients per year (Ferlay *et al.*, 2015). Bladder cancer represents 2% of all malignant tumors and is the 5th most common male tumor disease (Knowles & Hurst, 2015). “The disease incurs considerable costs for the health system due to the need for prolonged treatments and long-term monitoring” (Erichsen *et al.*, 2018).

“Extensive aberrant DNA methylation is described to prevail in urothelial carcinoma and is thought to contribute to genetic instability, altered gene expression and tumor progression. However, the causes of these epigenetic changes are as unknown as the timing at which they occur. It is therefore not clear whether they are primal to carcinogenesis, or appear as sequelae. Intact methyl group metabolism is required to ensure maintenance of cell-type specific methylomes and thereby genetic integrity and proper cellular function. Here, using two independent techniques for detecting DNA methylation, DNA hypermethylation of the 5'-regulatory regions of key methyl group metabolism genes, including *ODC1* and *AHCY*, in early urothelial carcinoma has been observed. These hypermethylation events are associated with genome-wide DNA hypomethylation which is commonly associated with genetic instability” (Erichsen *et al.*, 2018). To mimic the inhibitory effect of the found DNA hypermethylation within the promoter, we used siRNA treatment against *ODC1* in several different urothelial cell lines. The direct consequences of this treatment were reflected in an impairment of proliferation, a transcriptional activation of the p53 mediator p21 and far-reaching changes within the methylome of the urothelial cell lines. The most significant changes were the global demethylation and the associated transcriptional activation of LINE-1 retrotransposons as well as the methylation changes, which could be observed within several epigenetic regulators. “Hypermethylation of key methyl group metabolism genes might act in a feed-forward cycle to promote additional DNA methylation changes and give rise to a new hypothesis on the molecular etiology of urothelial carcinoma” (Erichsen *et al.*, 2018).

6. Literaturverzeichnis

- Ackermann JM, Pegg AE, Mc Closkey DE (2003): Drugs affecting the cell cycle via actions of the polyamine metabolic pathway. In *Prog. Cell Cycle Res.*, 2003 (5), pp. 461–468.
- Ahuja N, Easwaran H, Baylin SB (2014): Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. In *J. Clin. Invest.*, 2014 (124), pp. 56–63.
- Akoglu B, Milovic V, Caspary WF, Faust D (2004): Hyperproliferation of homocystein-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate. In *Eur. J. Nutr.*, 2004 (43), pp. 93–99.
- Albaugh BN, Arnold KM, Denu JM (2011): KAT(ching) metabolism by the tail: insight into the links between lysine acetyltransferases and metabolism. In *ChemBiochem.*, 2011 (12), pp. 290–298.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2012): Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. 4. Aufl. Weilheim: Wiley-VCH Verlag.
- Allory Y, Beukers W, Sagrera A, Flández M, Marquéz M, van der Keur KA, Dyrskjot L, Lurkin I, Vermeij M, Carrato A, Lloreta J, Lorente JA, Carrillo-de Santa Pau E, Masius RG, Kogevinas M, Steyerberg EW, van Tilborg AA, Abas C, Orntoft TF, Zuiverloon TC, Malats N, Zwarthoff EC, Real FX (2013): Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. In *Eur. Urol.*, 2013 (65), pp. 360–366.
- Alves G, Tatro A, Fanning T (1996): Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. In *Gene*, 1996 (176), pp. 39–44.
- Ambis KE (2018): Medizinische Vortragsreihe: Das Prostatacarzinom. Available online at <http://www.dr-ambis.com/PDF/01-Das-Prostatakarzinom.pdf>, checked on 3/7/2018.
- Amitage P, Doll R. (1954): The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. In *Br. J. Cancer*, 1954 (8), pp. 1–12.
- Anderson P, Kedersha N. (2006): RNA granules. In *J. Cell Biol.*, 2006 (172), pp. 803–808.
- Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F (2016): Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. In *Eur. Urol.*, 2016 (28), pp. 30280–30289.
- Arias JF, Koyama T, Kinomoto M, Tokunaga K (2012): Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. In *Front. Microbio.*, 2012 (3), p. 275.
- Ashraf W, Bronner C, Zaayter L, Ahmad T, Richert L, Alhosin M, Ibrahim A, Hamiche A, Mely Y, Mousli M (2017): Interaction of the epigenetic integrator UHRF1 with the MYST domain of TIP60 inside the cell. In *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2017 (36), doi: 10.1186/s13046-017-0659-1.
- Ausubel F M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1999): Short protocols in molecular biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.
- Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Comperat Em, Hernandez V, Kaasinen E, Palou J, Roupret M, van Rhijn B, Shariat S, Sylvester R, Zigeuner R, Gontero P, Mostafid H (2017): EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update. In *Eur. Urol.*, 2017 (71), pp. 447–461.
- Babushok DV, Kazazian H. H. (2007): Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. In *Hum. Mutat.*, 2007 (28), pp. 527–539.

- Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B (2003): Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. In *Cancer Cell*, 2003 (3), pp. 89–95.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2005): Reversing Histone methylation. In *Nature*, 2005 (436), pp. 1103–1106.
- Basu A, Tomar A, Dasari V, Mishra RK, Khosla S (2016): DNMT3L enables accumulation and inheritance of epimutations in transgenic *Drosophila*. In *Sci. Rep.*, 2016 (doi: 10.1038/srep19572.).
- Belancio VP, Blask DE, Deininger P, Hill SM, Jazwinski SM (2015): The aging clock and circadian control of metabolism and genome stability. In *Front. Genet.*, 2015 (5 doi: 10.3389).
- Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger PL (2010): All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. In *Semin Cancer Biol.*, 2010 (20), pp. 200–210.
- Bell AC, Felsenfeld G (2000): Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. In *Nature*, 2000 (405), pp. 482–485.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006): A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. In *Cell*, 2006 (125), pp. 315–326.
- Besaratinia A, Tommasi S (2013): Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. In *FASEB J.*, 2013 (27), pp. 2090–2100.
- Bestor TH (2000): The DNA methyltransferases of. In *Hum. Mol. Genet.*, 2000 (9), pp. 2395–2402.
- Bey P, Danzin C, Jung M (1987): Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis. Orlando: Academic Press.
- Bird A (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. In *Nature*, 1986 (321), pp. 209–213.
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985): A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. In *Cell*, 1985 (40), pp. 91–99.
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN (1997): Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997 (94), pp. 3290–3295.
- Bonasio R, Tu S, Reinberg D (2010): Molecular signals of epigenetic states. In *Science*, 2010 (29), pp. 612–616.
- Borodovsky A, Salmasi V, Turcan S, Fabius AW, Baia GS, Eberhart CG, Weingart JD, Gallia GL, Baylin SB, Chan TA, Riggins GJ (2013): 5-Azacytidine reduces methylation, promotes differentiation and induces tumor regression in a patient-derived IDH1 mutant glioma xenograft. In *Oncotarget*, 2013 (4), pp. 1737–1747.
- Brosnan ME, MacMillan L, Stevens JR, Brosnan JT (2015): Division of labour: how does folate metabolism partition between one-carbon metabolism and amino acid oxidation? In *Biochem. J.*, 2015 (472), pp. 135–146.

- Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, Kazazian HH (2003): Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003 (100), pp. 5280–5285.
- Burns MB, Temiz NA, Harris RS (2013): Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. In *Nature Genetics*, 2013 (45), pp. 977–983.
- Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP (2011): Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. In *Mol. Cell*, 2011 (42), pp. 426–437.
- Cairns RA, Mak TW (2013): Oncogenic Isocitrate Dehydrogenase Mutations: Mechanisms, Models, and Clinical Opportunities. In *Cancer Discov.*, 2013 (3), pp. 730–741.
- Callinan PA, Batzer M. A. (2006): Retrotransposable elements and human disease. In *Genome Dyn.*, 2006 (1), pp. 104–115.
- Calvisi DF, Simile MM, Ladu S, Pellegrino R, De Murtas V, Pinna F, Tomasi ML, Frau M, Virdis P, De Miglio MR, Pascale RM, Feo F (2007): Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: relationship with genomic instability and prognosis. In *Int. J. Cancer*, 2007 (1), pp. 2410–2420.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2011): Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. In *Nature*, 2011 (474), pp. 609–615.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2012): Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers, 2012 (489), pp. 519–525.
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F (1999): Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. In *Nature Genetics*, 1999 (23), pp. 18–20.
- Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB (2015): Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. In *Nature*, 2015 (518), pp. 413–416.
- Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH (2000): p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. In *Nature Cell Biol.*, 2000 (2), pp. 148–155.
- Castro R, Rivera I, Martins C, Struys EA, Jansen EE, Clode N, Graca LM, Blom HJ, Jakobs C, de Almeida IT (2005): Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. In *J. Mol. Med.*, 2005 (83), pp. 831–836.
- Cedar H, Bergman Y (2012): Programming of DNA methylation patterns. In *Annu. Rev. Biochem.*, 2012 (81), pp. 97–117.
- Cedar H, Razin A (2017): Annotating the genome by DNA methylation. In *Int. J. Dev. Biol.*, 2017 (61), pp. 137–148.
- Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, Liang S, Lu Y, Darlington GJ, Meissner A, Issa JP, Godley LA, Li W, Goodell MA (2012): Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. In *Nat. Genet.*, 2012 (44), pp. 23–31.
- Chen CC, Wang KY, Shen CK (2012): The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. In *J. Biol. Chem.*, 2012 (287), pp. 33116–33121.

- Chen Y, Yu X, Li T, Yan H, Mo Z (2016): Significant association of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism with bladder cancer instead of prostate and kidney cancer. In *Int. J. Biol. Markers*, 2016 (doi: 10.5301/jbm.5000204.).
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS (2001): Mice deficient in methylentetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. In *Hum. Mol. Gen.*, 2001 (10), pp. 433–443.
- Chen ZX, Riggs AD (2011): DNA methylation and demethylation in mammals. In *The Journal of biological Chemistry*, 2011 (286), pp. 18347–18353.
- Cheng X, Blumenthal RM (2008): Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. In *Structure*, 2008 (16), pp. 341–350.
- Chi P, Allis CD, Wang GG (2010): Covalent histone modifications - miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. In *Nat. Rev. Cancer*, 2010 (10), pp. 457–469.
- Chia NY, Deng N, Das K, Huang D, Zhu Y, Lim KH, Lee MH, Wu J, Sam XX, Tan GS, Wan WK, Yu W, Gan A, Tan AL, Tay ST, Soo KC, Wong Wk, Dominguez LZ, Ng HH, Rozen S, Goh LK, Teh BT, Tan P (2015): Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development. In *Gut*, 2015 (64), pp. 707–719.
- Choi W, Porten S, Kim D, Pilmack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP, McConkey DJ (2014): Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. In *Cancer Cell*, 2014 (25), pp. 152–165.
- Choi Y, Oh ST, Won MA, Choi KM, Ko MJ, Seo D, Joen TW, Baik IH, Ye SK, Park KU, Park IC, Jang BC, Seo JY, Lee YH (2016): Targeting ODC1 inhibits tumor growth through reduction of lipid metabolism in human hepatocellular carcinoma metabolism in human hepatocellular carcinoma. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016 (478), pp. 1674–1681.
- Choudhry H, Zamzami MA, Omran Z, Wu W, Mousli M, Bronnder C, Alhosin M (2018): Targeting microRNA/UHRF1 pathways as a novel strategy for cancer therapy. In *Oncol. Lett.*, 2018 (1), pp. 3–10.
- Christensen BC, Marsit CJ (2011): Epigenomics in environmental health. In *Front. Genet.*, 2011 (2), p. 84.
- Clayton L, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO (2005): The impact of metabolism on DNA methylation. In *Hum. Mol. Genet.*, 2005 (14), pp. 139–147.
- Coppede F (2010): One-Carbon Metabolism and Alzheimer's Disease: Focus on Epigenetics. In *Curr. Genomics*, 2010 (11), pp. 246–260.
- Cordaux R, Batzer MA (2009): The impact of retrotransposons on human genome evolution. In *Nat. Rev. Genet.*, 2009 (10), pp. 691–703.
- Cordaux R, Hedges DJ, Herke SW, Batzer MA (2006): Estimating the retrotransposition rate of human Alu elements. In *Genes Dev.*, 2006 (373), pp. 134–137.
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A (2011): Thymine

- DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. In *Cell*, 2011 (146), pp. 67–79.
- Craig JM, Wong NC (2011): *Epigenetics: A Reference Manual*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Davidson B, Abeler VM, Forsund M, Holth A, Yang Y, Kobayashi Y, Chen L, Kristensen GB, Shih IeM, Wang TL (2014): Gene expression signatures of primary and metastatic uterine leiomyosarcoma. In *Hum. Pathol.*, 2014 (45), pp. 691–700.
- Davis SR, Stacpoole PW, Williamson J, Kick LS, Quinlivan EP, Coats BS, SHane B, Bailey LB, Gregory JF 3rd (2004): Tracer-derived total and folate-dependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor. In *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004 (268), pp. 272–279.
- De Luca C, Guadagni F, Sinibaldi-Vallebona P, Sentinelli S, Gallucci M, Hoffmann A, Schumann GG, Spadafora C, Sciamanna I (2015): Enhanced expression of LINE-1-encoded ORF2 protein in early stages of colon and prostate transformation. In *Oncotarget*, 2015 (7), pp. 4048–4061.
- Deininger L, Batzer MA (2002): Mammalian Retroelements. In *Genome Res.*, 2002 (12), pp. 1455–1465.
- del Carmen SM, Vetter MR, Cordaux R, Bastone L, Batzer MA, Kazazian HH (2006): Extensive individual variation in L1 retrotransposition capability contributes to human genetic diversity. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006 (103), pp. 6611–6616.
- Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR (2009): Epigenetic Control. In *Journal of Cellular Physiology*, 2009 (219), pp. 243–250.
- Denli Ahmet M, Narvaiza I, Kerman Bilal E, Pena M, Benner C, Marchetto MC, Diedrich JK, Aslanian A, Ma J, Moresco JJ, Moore L, Hunter T, Saghatelian A, Gage FH (2015): Primate-specific ORF0 contributes to retrotransposon-mediated diversity. In *Cell*, 2015 (163), pp. 583–593.
- Deutsche Krebshilfe (2016): *Blasen Krebs - Antworten. Hilfen. Perspektiven*. Bonn.
- Di Martino E, L'Hôte CG, Kennedy W, Tomlinson DC, Knowles MA (2009): Mutant fibroblast growth factor receptor 3 induces intracellular signaling and cellular transformation in a cell type- and mutationspecific manner. In *Oncogene*, 2009 (28), pp. 4306–4316.
- Dion V, Lin Y, Hubert L, Waterland RA, Wilson JH (2008): Dnmt1 deficiency promotes CAG repeat expansion in the mouse germline. In *Hum. Mol. Gen.*, 2008 (17), pp. 1306–1317.
- Dong W, Cui J, Yang J, Li W, Wang S, Wang X, Li X, Lu Y, Xiao W (2015): Decreased expression of Rab27A and Rab27B correlates with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. In *Discov. Med.*, 2015 (20), pp. 357–367.
- Doucet-O'Hare TT, Rodić N, Sharma R, Darbari I, Abril G, Choi JA, Young Ahn J, Cheng Y, Anders RA, Burns KH, Meltzer SJ, Kazazian HH (2015): LINE-1 expression and retrotransposition in Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015 (112), pp. 4894–4900.
- Ducker GS, Chen L, Morscher RJ, Ghergurovich JM, Esposito M, Teng X, Kang Y, Rabinowitz JD (2016): Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway. In *Cell Metabol.*, 2016 (23), pp. 1140–1153.
- Dudzic E, Goepel JR, Catto JW (2011): Global epigenetic profiling in bladder cancer. In *Epigenomics*, 2011 (3), pp. 35–45.

- Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB (2014): Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. In *Mol. Cell*, 2014 (54), pp. 716–727.
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (2004): Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. In *World Health Organization Classification of Tumours*, 2004.
- Ehrlich M (1982): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. In *Nucleic Acids. Res.*, 1982 (10), pp. 2709–2721.
- Erichsen L (2013): DNA Methylierungsveränderungen des Methylgruppenstoffwechselweges beim Harnblasenkarzinom. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2013.
- Erichsen L, Ghanjati F, Beermann A, Poyet C, Hermanns T, Schulz WA, Seifert HH, Wild PJ, Buser L, Kröning A, Braunstein S, Anlauf M, Jankowiak S, Hassan M, Bendhack ML, Araúzo-Bravo MJ, Santourlidis S (2018): Aberrant methylated key genes of methyl group metabolism within the molecular etiology of urothelial carcinogenesis. In *Sci. Rep.*, 2018 (8), doi: 10.1038/s41598-018-23158-z.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006): Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. In *Nat. Rev. Cancer*, 2006 (6), pp. 259–269.
- Esteller M (2008): Epigenetics in cancer. In *The New England Journal of Medicine*, 2008 (358), pp. 1148–1159.
- Evangelidou NF, Haber M, Vu A, Laetsch TW, Murray J, Gamble LD, Cheng NC, Liu K, Reese M, Corrigan KA, Ziegler DS, Webber H, Hayes CS, Pawel B, Marshall GM, Zhao H, Gilmour SK, Norris MD, Hogarty MD (2016): Polyamine Antagonist Therapies Inhibit Neuroblastoma Initiation and Progression. In *Clin. Cancer Res.*, 2016 (22), pp. 4391–4404.
- Ewing AD, Gacita A, Wood LD, Ma F, Xing D, Kim MS, Manda SS, Abril G, Pereira G, Makohon-Moore A, Looijenga LH, Gillis AJ, Hruban RH, Anders RA, Romans KE, Pandev A, Iacobuzio-Donahue CA, Vogelstein B, Kinzler KW, Kazazian HH, Solyom S (2015): Widespread somatic L1 retrotransposition occurs early during gastrointestinal cancer evolution. In *Genome Res.*, 2015 (25), pp. 1536–1545.
- Farber S, Diamond LK (1948): Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. In *N. Eng. J. Med.*, 1948 (238), pp. 787–793.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. In *Cell*, 1990 (61), pp. 759–767.
- Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y (2006): G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. In *Nature Cell Biol.*, 2006 (8), pp. 188–194.
- Ferlay J, Soerjornataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. In *Int. J. Cancer*, 2015 (136), pp. 359–386.
- Figuroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A (2010): Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. In *Cancer Cell*, 2010 (18), pp. 553–567.

- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003): Histone and chromatin cross-talk. In *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003 (15), pp. 172–183.
- Franks LM, Teich N. M. (1997): Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd ed. Oxford: University Press.
- Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T, Nakagawa H (2012): Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. In *Nat. Genet.*, 2012 (44), pp. 760–764.
- Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL (2006): The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. In *J. Mol. Biol.*, 2006 (357), pp. 1383–1393.
- Ghanjati F, Beermann A, Hermanns T, Poyet C, Araújo-Bravo MJ, Seifert HH, Schmidpeter M, Goering W, Sorg R, Wernet P, Santourlidis S (2014): Unreserved application of epigenetic methods to define differences of DNA methylation between urinary cellular and cell-free DNA. In *Cancer Biomark.*, 2014 (14), pp. 295–302.
- Ginno PA, Lott PL, Christensen HC, Korf I, Che`din F (2012): R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. In *Mol. Cell*, 2012 (45), pp. 814–825.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hiseh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH (2006): Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. In *Science*, 2006 (31), pp. 395–398.
- Gonen N, Assaraf YG (2012): Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. In *Drug Resist. Updat*, 2012 (15), pp. 183–210.
- Gonzalo S, Jaco I, Frage MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA (2006): DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. In *Nat. Cell Biol.*, 2006 (8), pp. 416–424.
- Goodier JL (2016): Restricting retrotransposons: a review. In *Mobile DNA*, 2016 (7).
- Goodier JL, Kazazian HH (2008): Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. In *Cell*, 2008 (135), pp. 23–35.
- Goodier JL, Ostertag EM, Kazazian HH (2000): Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition. In *Hum. Mol. Gen.*, 2000 (9), pp. 653–657.
- Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH (2007): LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. In *Mol. Cell Biol.*, 2007 (27), pp. 6469–6483.
- Goodsell DS (2003): The molecular perspective: histone deacetylase. In *Stem Cells*, 2003 (21), pp. 620–621.
- Goulian M, Bleile B, Tseng BY (1980): Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980 (77), pp. 1956–1960.

- Grandi FC, Rosser JM, Newkirk SJ, Yin J, Jiang X, Xing Z, Whitmore L, Bashir S, Izsvák Z, Ye P, Yu YE, An W (2015): Retrotransposition creates sloping shores: a graded influence of hypomethylated CpG islands on flanking CpG sites. In *Genome Res.*, 2015 (25), pp. 1135–1146.
- Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A (1982): Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. In *Nature*, 1982 (295), pp. 620–622.
- Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L, He M, Li Z, Sun X, Jia W, Chen J, Yang S, Zhou F, Zhou X, Wan S, Ye R, Liang C, Liu Z, Huang P, Liu C, Jiang H, Wang Y, Zheng H, Sun L, Liu X, Jiang Z, Feng D, Chen J, Wu S, Zou J, Zhang Z, Yang R, Zhao J, Xu C, Yin W, Guan Z, Ye J, Zhang H, Li J, Kristiansen K, Nickerson ML, Theodorescu D, Li Y, Zhang X, Li S, Wang J, Yang H, Wang J, Cai Z (2011): Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. In *Nat. Genet.*, 2011 (43), pp. 875–878.
- Guo G, Wang W, Bradley A (2004): Mismatch repair genes identified using genetic screens in Blm-deficient embryonic stem cells. In *Nature*, 2004 (429), pp. 891–895.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H (2011): Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. In *Cell*, 2011 (145), pp. 423–434.
- Hafke R (2013): Der Blasenkrebs – Ein Leitfaden für Patienten. Available online at <http://docplayer.org/27790446-Dr-med-robert-hafke-der-harnblasenkrebs-ein-leitfaden-fuer-patienten.html>, checked on 12/1/2017.
- Haig H, Kazazian JR (2004): Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. In *Science*, 2004 (303), pp. 1626–1632.
- Halmekytö M, Hirvonen A, Wahlfors J, Alhonen L, Jänne J (1989): Methylation of human ornithine decarboxylase gene before transfection abolishes its transient expression in Chinese hamster ovary cells. In *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989 (14), pp. 528–534.
- Hanahan D, Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In *Cell*, 2011 (144), pp. 646–674.
- Hancks C, Kazazian H. (2012): Active human retrotransposons: variation and disease. In *Genetics and Development*, 2012 (22), pp. 191–203.
- Hancks DC, Kazazian HH (2012): Active human retrotransposons: variation and disease. In *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2012 (22), pp. 191–203.
- Hancks DC, Kazazian HH (2016): Roles for retrotransposon insertions in human disease. In *Mob. DNA*, 2016 (7), p. 1.
- Harris CR, Normart R, Yang Q, Stevenson E, Haffty BG, Ganesan S, Cordon-Cardo C, Levine AJ, Tang LH (2010): Association of nuclear localization of a Long Interspersed Nuclear Element-1 Protein in breast tumors with poor prognostic outcomes. In *Genes Cancer*, 2010 (1), pp. 115–124.
- Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, Zhang X, Cheng X (2012): Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. In *Nucleic Acids Res.*, 2012 (40), pp. 4841–4849.
- Hata K, Sakaki Y (1997): Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. In *Gene*, 1997 (189), pp. 227–234.

- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002): Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. In *Development*, 2002 (129), pp. 1983–1993.
- Hautmann R, Huland H. (2006): Urologie. 3rd ed. Heidelberg: Springer Verlag.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL (2011): Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. In *Science*, 2011 (333), pp. 1303–1307.
- Heby O, Perrson L, Smith SS (1988): Progress in Polyamine Research. In *V. a. R. Zappia AE*, 1988, pp. 291–299.
- Heljasvaara R, Veress I, Halmekytö M, Alhonen L, Jänne J, Laajala P, Pajunen A (1997): Transgenic mice overexpressing ornithine- and S-adenosylmethionine decarboxylases maintain a physiological polyamine homeostasis in their tissues. In *Biochem. J.*, 1997 (323), pp. 457–462.
- Helman E, Lawrence MS, Stewart C, Sougnez C, Getz G, Meyerson M (2014): Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. In *Genome Res.*, 2014 (24), pp. 1053–1063.
- Herbst H, Hübner J. H. (2004): Thema 9: Tumoren I. Available online at <http://www.pathologie-online.de/ap/9/index.php>, checked on 7/29/2013.
- Hitchler MJ & Domann FE (2007): An epigenetic perspective on the free radical theory of development. In *Free Radic. Biol. Med.*, 2007 (43), pp. 1023–1036.
- Hodgkinson A, Eyre-Walker A. (2011): Variation in the mutation rate across mammalian genomes. In *Nat. Rev. Genet.*, 2011 (12), pp. 756–766.
- Hoffmann AM, Cairns P. (2011): The Epigenetics of Kidney Cancer and Bladder Cancer. In *Epigenomics*, 2011 (3), pp. 19–34.
- Hoffmann DR, Cornatzer WE, Duerre JA (1979): Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylations reactions. In *Cancer J. Biochem.*, 1979 (57), pp. 56–65.
- Hohjoh H, Singer MF (1997): Ribonuclease and high salt sensitivity of the ribonucleoprotein complex formed by the human LINE-1 retrotransposon. In *J. Mol. Biol.*, 1997 (271), pp. 7–12.
- Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH (1994): A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. In *Nat. Genet.*, 1994 (7), pp. 143–148.
- Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG (2000): Genomic Structure and transcript of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. In *European Journal of Human Genetics*, 2000 (8), pp. 725–729.
- Hurst CD, Alder O, Platt FM, Droop A, Stead LF, Burns JE, Burghel GJ, Jain S, Klimczak LJ, Lindsay H, Roulson JA, Taylor CF, Thygesen H, Cameron AJ, Ridley AJ, Mott HR, Gordenin DA, Knowles MA (2017): Genomic Subtypes of Non-invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency. In *Cancer Cell*, 2017 (32), pp. 701–715.
- Hurst CD, Platt FM, Knowles MA (2013): Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. In *Eur. Urol.*, 2013, pp. 367–369.

- Igarasgi K, Kashiwagi K (2010): Modulation of cellular function by polyamines. In *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010 (42), pp. 39–51.
- Illingworth RS, Bird AP (2009): CpGislands - 'A rough guide'. In *FEBS Letters*, 2009 (583), pp. 1713–1720.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash J, Sabunciyan S, Feinberg AP (2009): The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. In *Nat. Genet.*, 2009 (41), pp. 178–186.
- Issa JP (2014): Aging and epigenetic drift: A vicious cycle. In *J. Clin. Invest.*, 2014 (124), pp. 24–29.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010): Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. In *Nature*, 2010 (466), pp. 1129–1133.
- Jaenisch R, Bird A (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. In *Nature Genetics*, 2003 (33), pp. 245–254.
- Jahed M, Ebadi N, Mivehchi M, Majidizadeh T, Shahshanipour M, Asgari M, Ghadakzadeh S, Hosseini SA (2016): MGMT hypermethylation and BCL-2 overexpression associated with superficial bladder cancer and recurrence. In *Cancer Biomark.*, 2016 (16), pp. 627–632.
- Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, Kafri R, Kirschner MW, Clish CB, Mootha VK (2012): Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. In *Science*, 2012 (336), pp. 1040–1044.
- Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2006): De novo CpG island methylation in human cancer cells. In *Cancer Res.*, 2006 (66), pp. 682–692.
- Janning W, Knust E (2008): Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik – Entwicklungsgenetik. 2nd ed. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnstn C, Taylor CF, Knowles MA (2005): FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. In *Oncogene*, 2005 (24), pp. 5218–5225.
- Jiang L, Shestov AA, Swain P, Yang C, Parker SJ, Wang QA, Terada LS, Adams ND, McCabe MT, Pietrak B, Schmidt S, Metallo CM, Dranka BP, Schwartz B, DeBerardinis RJ (2016): Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. In *Nature*, 2016 (532), pp. 255–258.
- Jiang Y, Qian X, Shen J, Wang Y, Li X, Liu R, Xia Y, Chen Q, Peng G, Lin SY, Lu Z (2015): Local generation of fumarate promotes DNA repair through inhibition of histone H3 demethylation. In *Nat. Cell Biol.*, 2015 (17), pp. 1158–1168.
- Jianrong L, Ming T, Qingsong C (2015): The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. In *Cancer Lett.*, 2015 (356), pp. 156–164.
- Jin F, Thaiparambil, Donepudi SR, Vantaku V, Piyarathna DWB, Maity S, Krishnapuram R, Putluri V, Gu F, Purwaha P, Bhowmik SK, Ambati CR, von Rundstedt FC, Roghmann F, Berg S, Noldus J, Rajapakshe K, Gödde D, Roth S, Störkel S, Degener S, Michailidis G, Kaiparettu BA, Karanam B, Terris MK, Kavuri SM, Lerner SP, Kheradmand F, Coarfa C, Sreekumar A, Lotan Y, El-Zein R, Putluri N (2017): Tobacco-

- Specific Carcinogens Induce Hypermethylation, DNA Adducts, and DNA Damage in Bladder Cancer. In *Cancer Prev. Res.*, 2017 (10), pp. 588–597.
- Jung YS, Qian Y, Chen X (2010): Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. In *Cell Signal.*, 2010 (22), pp. 1003–1012.
- Jürgens B, Schmitz-Dräger BJ, Schulz WA (1996): Hypomethylation of L1 LINE Sequences Prevailing in Human Urothelial Carcinoma. In *Cancer Research*, 1996 (56), pp. 5698–5703.
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, Mc Carrey J, Cedar H, Razin A (1992): Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germline. In *Genes Dev.*, 1992 (6), pp. 705–714.
- Kamakaka RT, Biggins S (2005): Histone variants: deviants? In *Genes Dev.*, 2005 (19), pp. 295–310.
- Kandimalla R, van Tilborg AA, Kompier LC, Stumpel DJ, Stam RW, Bangma CH, Zwarthoff EC (2012): Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers. In *Eur. Urol.*, 2012 (61), pp. 1245–1256.
- Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC (2013): DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. In *Nat. Rev. Urol.*, 2013 (10), pp. 327–335.
- Kang SW, Lee S, Lee EK (2015): ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. In *Archives of Pharmacal Research*, 2015 (38), pp. 338–345.
- Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, Kera Y, Noda T, Igarashi K (2011): Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. In *Mol. Cell*, 2011 (41), pp. 554–566.
- Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Ishiguro H, Miyamoto H (2015): The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. In *Prostate*, 2015 (75), pp. 573–584.
- Kazazian HH (2011): *Mobile DNA: Finding Treasure in Junk*. New Jersey: FT Press, Upper Saddle River.
- Keer JT, Birch L (2008): *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*. In *Royal Society of Chemistry (1. Aufl.)*, 2008.
- Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, Pikarski E, Young RA, Niveleau A, Cedar H, Simon I (2006): Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. In *Nature Genetics*, 2006 (38), pp. 149–153.
- Khan H, Smit A, Boissinot S (2006): Molecular evolution and tempo of amplification of human LINE-1 retrotransposons since the origin of primates. In *Genome Res.*, 2006 (16), pp. 78–87.
- Killian JK, Kim SY, Miettinen M, Smith C, Merion M, Tsokos M, Quezado M, Smith WI Jr, Jahromi MS, Xekouki P, Szarek E, Walker RL, Lasota J, Raffeld M, Klotzle B, Wang Z, Jones L, Zhu Y, Wang Y, Waterfall JJ, O'Sullivan MJ, Bibikova M, Pacak K, Stratakis C, Janeway KA, Schiffman JD, Fan JB, Helman L, Meltzer PS (2013): Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor. In *Cancer Discov.*, 2013 (3), pp. 648–657.
- Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S (2002): Cooperation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. In *EMBO J.*, 2002 (21), pp. 4183–4195.

- Kim M, Trinh BN, Long TI, Oghamian S, Laird PW (2004): Dnmt1 deficiency leads to enhanced microsatellite instability in mouse embryonic stem cells. In *Nucleic Acids. Res.*, 2004 (32), pp. 5742–5749.
- Kim WJ, Kim Y. J. (2009): Epigenetic biomarkers in urothelial bladder cancer. In *Expert Rev, Mol. Diagn.*, 2009 (9), pp. 259–269.
- Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, Michelakis ED (2016): Metabolic control of epigenetics in cancer. In *Nature*, 2016 (16), pp. 694–707.
- Kitkumthorn N, Mutirangura A (2011): Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. In *Clinical Epigenetics*, 2011 (2), pp. 315–330.
- Kloypan C, Srisa-art M, Mutiranqura A, Boonia C (2015): LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. In *Cell Biochem. Funct.*, 2015 (33), pp. 375–385.
- Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2007): Genetik. 8. Auflage: Pearson Studium.
- Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H (2016): DNA Methylation in Cancer and Aging. In *Cancer Res.*, 2016 (76), pp. 3446–3450.
- Knowles MA, Hurst C. D. (2015): Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. In *Nature Reviews*, 2015 (15), pp. 25–41.
- Knudson AG (2001): Two genetic hits (more or less) to cancer. In *Nature Reviews*, 2001 (1), pp. 157–162.
- Koito A, Ikeda T (2013): Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. In *Front. Microbio.*, 2013 (4), p. 28.
- Kulak MV, Cyr AR, Woodfield GW, Bogachek M, Spanheimer PM, Li T, Price DH, Dormann FE, Weigel RJ (2013): Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. In *Oncogene*, 2013 (32), pp. 4043–4051.
- Kulis M, Merkel A, Heath S, Queiros AC, Schuyler RP, Castellano G (1999): DNA methylation represses transcription in vivo. In *Nat. Genet.*, 1999 (47), pp. 746–756.
- Kulis M, Merkel A, Heath S, Queiros AC, Schuyler RP, Castellano G, Beekman R, Raineri E, Exteve A, Clot G, Verdaguer-Dot N, Duran-Ferrer M, Russinol N, Vilarrasa-Blasi R, Ecker S, Pancaldi V, Rico D, Aqueda L, Blanc J, Richardson D, Clarke L, Datta A, Pascual M, Qqirre X, Prosper F, Alignani D, Paica B, Caron G, Fest T, Muench MO, Fomin ME, Lee ST, Wiemels JL, Valencia A, Gut M, Flicek P, Stunnenberg HG, Siebert R, Küppers R, Gut IG, Campo E, Martin-Subero JI (2015): Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. In *Nat. Genet.*, 2015 (47), pp. 746–756.
- Labuschagne CF, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD (2014): Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. In *Cell Rep.*, 2014 (7), pp. 1248–1258.
- Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T (2003): An epigenetic road map for histone lysine methylation. In *J. Cell Sci.*, 2003 (116), pp. 2117–2124.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In *Nature*, 1970 (227), pp. 680–685.

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. In *Science*, 2001 (294), pp. 853–858.
- Lahtz C, Pfeifer GP (2011): Epigenetic changes of DNA repair Genes in cancer. In *Journal of Molecular Cell Biology*, 2011 (3), pp. 51–58.
- Lawson K, Larentowicz L, Laury-Kleintop L, Gilmours SK (2005): B23 is a downstream target of polyamine-modulated CK2. In *Mol. Cell Biochem.*, 2005 (274), pp. 103–114.
- Leal JF, Ferrer I, Blanco-Aparicio C, Hernandez-Losa J, Ramon Y Cajal S, Carnero A, Lleonaart ME (2008): S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. In *Carcinogenesis*, 2008 (29), pp. 2089–2095.
- Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, Lohr JG, Harris CC, Ding L, Wilson RK, Wheeler DA, Gibbs RA, Kucherlapati R, Lee C, Kharchenko PV, Park PJ, Cancer Genome Atlas Research Network (2012): Landscape of Somatic Retrotransposition in Human Cancers. In *Science*, 2012 (337), pp. 967–971.
- Lee JH, Rho SB, Chun T (2005): Programmed cell death 6 (PDCD6) protein interacts with death-associated protein kinase 1 (DAPk1): additive effect on apoptosis via caspase-3 dependent pathway. In *Biotechnol. Lett.*, 2005 (27), pp. 1011–1015.
- Lee JV, Carrer A, Shah S, Snyder NW, Wei S, Venneti S, Worth AJ, Yuan ZF, Lim HW, Liu S, Jackson E, Aiello NM, Haas NB, Rebbeck TR, Judkins A, Won KJ, Chodosh LA, Garcia BA, Stanger BZ, Feldman MD, Blair IA, Wellen KE (2014): Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation. In *Cell Metabol.*, 2014 (20), pp. 306–309.
- Lee MS, Kim JH, Lee JS, Yun SJ, Kim WJ, Ahn H, Park J (2015): Prognostic Significance of CREB-Binding Protein and CD81 Expression in Primary High Grade Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: Identification of Novel Biomarkers for Bladder Cancer Using Antibody Microarray. In *PLOS One*, 2015 (10: e0125405).
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In *Cell*, 2005 (14), pp. 15–20.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK (2010): DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. In *N. Eng. J. Med.*, 2010 (363), pp. 2424–2433.
- Li B, Dewey CN (2011): RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. In *Bioinformatics*, 2011 (12).
- Li L, Rao JN, Guo X, Liu L, Santora R, Bass BL, Wang JY (2001): Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. In *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001 (281), pp. 941–953.
- Li S, Swanson SK, Gogol M, Florens L, Washburn MP, Workman JL, Suganuma T (2015): Serine and SAM responsive complex SESAME regulates histone modification crosstalk by sensing cellular metabolism. In *Mol. Cell*, 2015 (60), pp. 408–421.

- Li X, Kuang J, Shen Y, Majer MM, Nelson CC, Parsawar K, Heichman KA, Kuwada SK (2012): The atypical histone macroH2A1.2 interacts with HER-2 protein in cancer cells. In *J. Biol. Chem.*, 2012 (287), pp. 23171–23183.
- Liao YJ, Liu SP, Lee CM, Yen CH, Chuang PC, Chen CY, Tsai TF, Huang SF, Lee YH, Chen YM (2009): Characterization of a glycine N-methyltransferase gene knockout mouse model for hepatocellular carcinoma: Implications of the gender disparity in liver cancer susceptibility. In *Int. J. Cancer*, 2009 (doi: 10.1002/ijc.23979.).
- Lim U, Song MA (2012): Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. In *Methods Mol. Biol.*, 2012 (863), pp. 359–376.
- Lin DW, Chung BP, Kaiser P (2014): S-adenosylmethionine limitation induces p38 mitogen-activated protein kinase and triggers cell cycle arrest in G1. In *J. Cell Sci.*, 2014 (1), pp. 50–59.
- Liou GY, Storz P (2010): Reactive oxygen species in cancer. In *Free Radic. Res.*, 2010 (44), pp. 479–496.
- Liu Y, Hu H, Wang K, Zhang C, Wang Y, Yao K, Yang P, Han L, Kang C, Zhang W, Jiang T (2014): Multidimensional analysis of gene expression reveals TGFB1I1-induced EMT contributes to malignant progression of astrocytomas. In *Oncotarget*, 2014 (30), pp. 12593–12606.
- Llanos AA, Marian C, Brasky TM, Dumitrescu RG, Liu Z, Mason JB, Makambi KH, Spear SL, Kallakury BV, Freudenheim JL, Shields PG (2015): Associations between genetic variation in one-carbon metabolism and LINE-1 DNA methylation in histologically normal breast tissues. In *Epigenetics*, 2015 (10), pp. 727–735.
- Locasale JW (2013): Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. In *Nat. Rev. Cancer*, 2013 (13), pp. 572–583.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001): *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage. Wiesbaden: Spektrum Akademischer Verlag.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003): 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. In *Nat. Rev. Cancer*, 2003 (3), pp. 330–338.
- Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, Cowley GS, Root DE, Ebert BL, Kaelin WG Jr (2013): (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. In *Science*, 2013 (339), pp. 1621–1625.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In *J. Biol. Chem.*, 1951 (193), pp. 265–275.
- Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R (2010): The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. In *PLoS Biol.*, 2010 (8(11):e1000506).
- MacFarlane AJ, Liu X, Perry Ca, Flodby P, Allen RH, Stabler SP, Stover PJ (2008): Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase regulates the metabolic partitioning of methylenetetrahydrofolate but is not essential in mice. In *J. Biol. Chem.*, 2008 (283), pp. 25846–25853.
- MacFarlane AJ, McEntee MF, Stover PJ (2014): Azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice occurs independently of de novo thymidylate synthesis capacity. In *J. Nutr.*, 2014 (144), pp. 419–424.

- Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH (2013): Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. In *Nature*, 2013 (24), pp. 542–546.
- Maddocks OD, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH (2016): Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through de novo ATP synthesis in cancer cells. In *Mol. Cell*, 2016 (61), pp. 210–221.
- Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, Zhang N, Liang S, Donehower LA, Issa JP (2010): Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. In *Genome Res.*, 2010 (20), pp. 332–340.
- Maiti A, Drohat AC (2011): Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. In *J. Biol. Chem.*, 2011 (286), pp. 35334–35338.
- Maldonado LY, Arsene D, Mato JM, Lu SC (2018): Methionine adenosyltransferases in cancers: Mechanisms of dysregulation and implications for therapy. In *Exp. Biol. Med.*, 2018 (243), pp. 107–117.
- Martin C, Zhang Y (2005): The diverse functions of histone lysine methylation. In *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005 (6), pp. 838–849.
- Martin SL (2006): The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. In *J. Biomed. Biotechnol.*, 2006, pp. 1–6.
- Martin SL (2010): Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1. In *RNA Biol.*, 2010 (7), pp. 706–711.
- Martin SL, Branciforte D (1993): Synchronous expression of LINE-1 RNA and protein in mouse embryonal carcinoma cells. In *Mol. Cell Biol.*, 1993 (19), pp. 5383–5392.
- Maruti SS, Ulrich CM, White E (2009): Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. In *AM. J. Clin. Nutr.*, 2009 (89), pp. 624–633.
- Matsuoka T, Kawai K, Ando S, Sugita S, Kandori S, Kojima T, Miyazaki J, Nishiyama H (2016): DNA methyltransferase-3 like protein expression in various histological types of testicular germ cell tumor. In *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2016 (doi: 10.1093/jjco/hyw012.).
- Matthews HR (1993): Polyamines, chromatin structure and transcription. In *Bioessays*, 1993 (15), pp. 561–566.
- Maxwell PH (2016): What might retrotransposons teach us about aging? In *Curr. Genet.*, 2016 (62), pp. 277–282.
- Mazzocca A, Liotta F, Carloni V (2008): Tetraspanin CD81-regulated cell motility plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. In *Gastroenterology*, 2008 (135), pp. 244–256.
- McClintock B (1950): The origin and behavior of mutable loci in maize. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1950 (36), pp. 344–355.
- Medici V, Shibata NM, Kharbanda KK, LaSalle JM, Woods R, Liu S, Engelberg JA, Devaraj S, Török NJ, Jiang JX, Havel PJ, Lönnnerdal B, Kim K, Halsted CH (2013): Wilson's disease: changes in methionine metabolism and inflammation affect global DNA methylation in early liver disease. In *Hepatology*, 2013 (57), pp. 555–565.

- Meier JL (2013): Metabolic mechanisms of epigenetic regulation. In *ACS Chem. Biol.*, 2013 (8), pp. 2607–2621.
- Mentch SJ, Mehrmohamadi M, Huang L, Liu X, Gupta D, Mattocks D, Gómez Padilla P, Ables G, Bamman MM, Thalacker-Mercer AE, Nichenametla SN, Locasale JW (2015): Histone methylation dynamics and gene regulation occur through the sensing of one-carbon metabolism. In *Cell Metab.*, 2015 (22), pp. 861–873.
- Mills AA (2010): Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. In *Nat. Rev. Cancer*, 2010, pp. 669–682.
- Ming Y, Vousden KH (2016): Serine and one-carbon metabolism in cancer. In *Nature*, 2016 (16), 650–662.
- Mitra AP, Hansel DE, Cote RJ (2012): Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. In *Semin. Oncol.*, 2012 (39), pp. 524–533.
- Mitra R, Li X, Kapusta A, Mayhew D, Mitra RD, Feschotte C, Craig NL (2013): Functional characterization of piggyBat from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013 (110), pp. 234–239.
- Miyamoto S, Kochin V, Kanaseki T, Hongo A, Tokita S, Kikuchi Y, Takaya A, Hirohashi Y, Tsukahara T, Terui T, Ishitani K, Hata F, Takemasa I, Miyazaki A, Hiratsuka H, Sato N, Torigoe T (2018): The Antigen ASB4 on Cancer Stem Cells Serves as a Target for CTL Immunotherapy of Colorectal Cancer. In *Cancer Immunol. Res.*, 2018 (doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0518. [Epub ahead of print]).
- Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Nagai K, Uemura M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M (2010): ATP11A is a novel predictive marker for metachronous metastasis of colorectal cancer. In *Oncol. Rep.*, 2010 (23), pp. 505–510.
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S (1987): Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. In *Development*, 1987 (99), pp. 371–382.
- Moran DM, Trusk PB, Pry K, Paz K, Sidransky D, Bacus SS (2014): KRAS mutation status is associated with enhanced dependency on folate metabolism pathways in non-small cell lung cancer cells. In *Mol. Cancer Ther.*, 2014 (13), pp. 1611–1624.
- Moran JV, DeBerardinis R, Kazazian HH (1999): Exon shuffling by L1 retrotransposition. In *Science*, 1999 (283), pp. 1530–1534.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2005): Epigenetic reprogramming in mammals. In *Hum. Mol. Genet.*, 2005 (14), pp. 47–58.
- Morrison CD, Liu P, Woloszynska-Read A, Zhang J, Luo W, Qin M, Bshara W, Conroy JM, Sabatini L, Vedell P, Xiong D, Liu S, Wang J, Shen H, Li Y, Omilian AR, Hill A, Head K, Guru K, Kunnev D, Leach R, Eng KH, Darlak C, Hoeflich C, Veeranki S, Glenn S, You M, Pruitt SC, Johnson Cs, Trump DL (2014): Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014 (111), pp. 672–681.
- Moussaieff A, Kogan NM, Aberdam D (2015): Concise Review: Energy Metabolites: Key Mediators of the Epigenetic State of Pluripotency. In *Stem Cells*, 2015 (33), pp. 2374–2380.

- Mudd SH, Poole, JR (1975): Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. In *Metabolism*, 1975 (24), pp. 721–735.
- Nejman D, Strassman R, Steinfeld I, Ruvolo M, Roberts D, Yakhini Z, Cedar H (2013): Molecular rules governing de novo methylation in cancer. In *Cancer Res.*, 2013 (74), pp. 1475–1483.
- Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA (2006): DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. In *Cancer Biol. Ther.*, 2006 (5), pp. 993–1001.
- New England Biolabs (2018): Overview of EpiMark® Bisulfite Conversion Kit. Edited by NEB. Available online at <https://international.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion>, checked on 7/22/2018.
- Newman AC, Maddocks ODK (2017). One-carbon metabolism in cancer. In *Br. J. Cancer*, 2017 (116), pp. 1499–1504.
- Niwa T, Ushijima T (2010): Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. In *Adv. Genet.*, 2010 (71), pp. 41–56.
- Nordling CEA (1953): A new theory on the cancer-inducing mechanism. In *Br. J. Cancer*, 1953 (6), pp. 68–72.
- Nur I, Szyf M, Razin A, Glaser G, Rottem S, Razin S (1985): Procaryotic and eucaryotic traits of DNA methylation in spiroplasmas (mycoplasmas). In *J. Bacteriol.*, 1985 (164(1)), pp. 19–24.
- Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH, Jiggins FM (2009): The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. In *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2009 (364), pp. 99–115.
- O'Hagan HM, Wang W, Sen S, Destefano Shields C, Lee SS, Zhang YW, Clements EG, Cai Y, Van Neste L, Easwaran H, Casero RA, Sears CL, Baylin SB (2011): Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. In *Cancer Cell*, 2011 (20), pp. 606–619.
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB (2007): A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. In *Nat. Genet.*, 2007 (39), pp. 237–242.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010): TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. In *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 2010. Available online at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2827900/>, checked on 11/24/2017.
- Ostertag EM, Kazazian HH (2011): Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. In *Genome Res.*, 2011 (11), pp. 2059–2065.
- Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Ben Slama MR, Sfaxi M, Ayed M, Chebil M, Amorim A, El Gaaied AB, Prata MJ (2007): Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms and risk of bladder cancer in a Tunisian population. In *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2007 (1), pp. 48–53.
- Pälmke N, SantaCruz D, Walter J (2011): Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. In *Elsevier Methods*, 2011 (53), pp. 175–184.
- Park JM, Wu T, Cyr AR, Woodfield GW, De Andrade JP, Spanheimer PM, Li T, Sugg SL, Lal G, Domann FE, Zhang W, Weigel RJ (2015): The role of Tcfap2c in tumorigenesis and cancer growth in an activated Neu model of mammary carcinogenesis. In *Oncogene*, 2015 (34), 6105-6014.

- Park MH, Igarashi K (2013): Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases. In *Biomolecules and Therapeutics*, 2013 (21), pp. 1–9.
- Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP (2008): Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. In *Rev. Urol.*, 2008 (10), pp. 31–43.
- Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M (2002): Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. In *Cancer Res.*, 2002 (62), pp. 4519–4524.
- Pegg AE (2008): Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. In *AM. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008 (294), pp. 995–1010.
- Pegg AE (2010): Spermin synthase. In *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010 (67), pp. 113–121.
- Pellanda H (2013): Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)-dependent remethylation pathway in human healthy and tumoral liver. In *Clin. Chem. Lab. Med*, 2013 (51), pp. 617–621.
- Pezic D, Manakov SA, Sachidanandam R, Aravin AA (2014): piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. In *Genes Dev.*, 2014 (28), pp. 1410–1428.
- Poirier LA, Wise CK, Delongchamp RR, Sinha R (2001): Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: correlations with diet. In *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001 (10), pp. 649–655.
- Raddatz G, Gao Q, Bender S, Jaenisch R, Lyko F (2012): Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. In *PLoS Genet.*, 2012 (<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003146>).
- Raddatz G, Hagemann S, Aran D, Sohle J, Kulkarni PP, Kaderali L, Hellman A, Winnefeld M, Lyko F (2013): Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. In *Epigenetics Chromatin*, 2013 (6), p. 36.
- Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR (1999): Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21 (Waf1/Cip1), p27 (Kip1), and p53 in IEC-6 cells. In *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1999 (276), pp. 684–691.
- Reik W, Dean W, Walter J (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. In *Science*, 2001 (293), pp. 1089–1093.
- Richardson SR, Narvaiza I, Planegger RA, Weitzman MD, Moran JV (2014): APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. In *Elife*, 2014 (3 doi: 10.7554/eLife.02008).
- Robert Koch Institut (2013): Krebs in Deutschland. In *Broschüre*, 2013.
- Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, Kiezun A, Kryukov GV, Carter SL, Saksena G, Harris S, Shah RR, Resnick MA, Getz G, Gordenin DA (2013): An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. In *Nat. Genet.*, 2013 (45), pp. 970–976.
- Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE,

- Czerniak BA, Reuter VE, Su X, Sa Carvalho B, Chagas VS, Mungall KL, Sadeghi S, Pedamallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ, Weinstein JN, Kwiatkowski DJ, Lerner SP (2017): Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. In *Cell* 171 (3), 540-556.
- Roche Diagnostics GmbH (2011): NimbleGen ChIP-chip & DNA Methylation Microarrays. In *Broschüre*, 2011.
- Rodić N, Steranka JP, Makohon-Moore A, Moyer A, Shen P, Sharma R, Kohutek ZA, Huang CR, Ahn D, Mita P, Taylor MS, Barker NJ, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue CA, Boeke JD, Burns KH (2015): Retrotransposon insertions in the clonal evolution of pancreatic ductal adenocarcinoma. In *Nat. Med.*, 2015 (21), pp. 1060–1064.
- Rohle D, Popovici Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, Tsoi J, Clark O, Komisopoulou E, Kunii K, Pedraza A, Schalm S, Silverman L, Miller A, Wang F, Yang H, Chen Y, Kernysky A, Rosenblum MK, Liu W, Biller SA, Su SM, Brennan CW, Chan TA, Graeber TG, Yen KE, Mellinghoff IK (2013): An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. In *Science*, 2013 (340), pp. 626–630.
- Rollins RA, Haghghi F, Edwards JR, Das R, Zhang MQ, Ju J, Bestor TH (2006): Large-scale structure of genomic methylation patterns. In *Genome Res.*, 2006 (16), pp. 157–163.
- Rübber H (2009): Uroonkologie. 5th ed. Heidelberg: Springer Verlag.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996): Epigenetic mechanisms of gene regulation. 32nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Ryall JG, Cliff T, Dalton S, Sartorelli V (2015): Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. In *Cell Stem Cell*, 2015 (17), pp. 651–662.
- Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, Juan A, Zare H, Feng X, Clermont D, Koulis M, Gutierrez-Cruz G, Fulco M, Sartorelli V (2015): The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. In *Cell Stem Cell*, 2015 (16), pp. 171–183.
- Ryan O, Smyth MR, Fágáin CO (1994): Horseradish peroxidase: the analyst's friend. In *Essays in biochemistry*, 1994 (28), pp. 129–146.
- Sanchez-Carbayo M (2012): Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. In *Tumour Biol.*, 2012 (33), pp. 347–361.
- Sangeetha M, Deepa PR, Rishi P, Khetan V, Krishnakumar S (2015): Global gene deregulations in FASN silenced retinoblastoma cancer cells: molecular and clinico-pathological correlations. In *J. Cell Biochem.*, 2015 (116), pp. 2676–2694.
- Santourlidis S, Ghanjati F, Beermann A, Hermanns T, Poyet C (2016): IDLN-MSP: Idioloal normalization of real-time methylation-specific PCR for genetic imbalanced DNA specimens. In *Biotechniques* (60), pp. 84–87.
- Schernhammer ES, Giovannucci E, Kawasaki T, Rosner B, Fuchs CS, Ogino S (2010): Dietary folate, alcohol and B vitamins in relation to LINE-1 hypomethylation in colon cancer. In *Gut*, 2010 (59), pp. 794–799.

- Schipper RG, Penning LS, Verhofstad AJ (2000): Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: Effectors or protectors? In *Semin Cancer Biol.*, 2000 (10), pp. 55–68.
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H (2007): Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. In *Nat. Genet.*, 2007 (39), 232–236.
- Schulz WA, Goering W (2016): DNA methylation in urothelial carcinoma. In *Epigenomics*, 2016 (8), pp. 1415–1428.
- Schulz WA, Hoffmann M, Niegisch G (2018): Urothelial Carcinoma. Methods and Protocols. 1st ed. New York: Humana Press.
- Scott EC, Gardner EJ, Masood A, Chuang NT, Vertino PM, Devine SE (2016): A hot L1 retrotransposon evades somatic repression and initiates human colorectal cancer. In *Genome Res.* (26), pp. 745–755.
- Seiler N (2003): Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. In *Current Drug Targets*, 2003 (4), pp. 537–564.
- Seiler N, Francis R (2005): Polyamines and apoptosis. In *J. Cell Mol. Med.*, 2005 (9), pp. 623–642.
- Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, Popp C, Thienpont B, Dean W, Reik W (2012): The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. In *Mol. Cell*, 2012 (48), pp. 849–862.
- Seisenberger S, Peat JR, Reik W (2013): Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. In *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2013 (25), pp. 281–288.
- Senses KM, Gonen M, Barutcu AR, Kalyioglu Z, Isbilen M, Konu O, Chen YT, Altorki NK, Gure AO (2013): Cancer-testis gene expression is associated with the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C>T polymorphism in non-small cell lung carcinoma. In *BMC Med. Genet.*, 2013 (doi: 10.1186/1471-2350-14-97.).
- Serrano M (2000): The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. In *Carcinogenesis*, 2000 (21), pp. 865–869.
- Seth A, Karberg M, Xi-Yu J, Van Eden ME (o.J.): Bisulfite Treatment of DNA: Perfecting the Deamination of Cytosine into Uracil., o.J.
- Shen H, Laird PW (2013): Interplay between the Cancer Genome and Epigenome. In *Cell*, 2013 (153), pp. 38–55.
- Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S (2014): Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. In *Cell Metabol.*, 2014 (19), pp. 780–794.
- Shukla R, Upton Kyle R, Muñoz-Lopez M, Gerhardt Daniel J, Fisher Malcolm E, Nguyen T, Brennan PM, Baillie JK, Collino A, Ghisletti S, Sinha S, Iannelli F, Radaelli E, Dos Santos A, Rapoud D, Guettier C, Samuel D, Natoli G, Carcinci P, Ciccarelli FD, Garcia-Perez JL, Faivre J, Faulkner GJ (2013): Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. In *Cell*, 2013 (153), pp. 101–111.
- Shukla-Dave A, Castillo-Martin M, Chen M, Lobo J, Gladoun N, Collazo-Lorduy A, Khan FM, Ponomarev V, Yi Z, Zhang W, Pandolfi PP, Hricak H, Cordon-Cardo C (2016): Ornithine Decarboxylase

- Is Sufficient for Prostate Tumorigenesis via Androgen Receptor Signaling. In *The American Journal of Pathology*, 2016 (186), pp. 3131–3145.
- Shyn-Chang N, Locasale JW, Lyssiotis CA, Zheng Y, Teo RY, Ratanasirintrao S, Zhang J, Onder T, Unternaehrer JJ, Zhu H, Asara JM, Daley GQ, Cantley LC (2013): Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. In *Science*, 2013 (339), pp. 222–226.
- Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tzubari B, Cedar H (1999): DNA methylation represses transcription in vivo. In *Nat. Genet.*, 1999 (22), pp. 203–206.
- Simon R, Bürger H, Brinkschmidt C, Böcker W, Hertle L, Terpe HJ (1998): Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. In *J. Pathol*, 1998 (185), pp. 345–351.
- Simon R, Eltze E, Schäfer KL, Bürger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ, Böcker W (2001): Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. In *Cancer Res.*, 2001 (61), pp. 355–362.
- Singer T, McConnell MJ, Marchetto MC, Coufal NG, Gage FH (2010): LINE-1 retrotransposons: mediators of somatic variation in neuronal genomes? *Trends Neurosci.*, 2010 (33), pp. 345–354.
- Smith ZD, Meissner A (2013): DNA methylation: roles in mammalian development. In *Nature*, 2013 (14), pp. 204–220.
- Southern EM (1979): Measurement of DNA length by gel electrophoresis. In *Anal. Biochemistry*, 1979.
- Speek M (2001): Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. In *Mol. Cell Biol.*, 2001 (21), pp. 1973–1985.
- St. Laurent G, Hammell N, McCaffrey TA (2010): A LINE-1 component to human aging: Do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? In *Mech. Ageing Dev.*, 2010 (131), pp. 299–305.
- Stefanska B, Karlic H, Varga F, Fabianowska-Majewska K, Haslberger AG (2012): Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components – the implications in cancer prevention. In *British Journal of Pharmacological Society*, 2012 (167), pp. 279–297.
- Stephens FO, Aigner KR (2009): *Basics of oncology*. 1. Aufl. Berlin: Springer Verlag.
- Storch KJ, Wagner DA, Burke JF, Young VR (1988): Quantitative study in vivo methionine cycle in humans using [methyl-2h3]- and [1-13c]methionine. In *Am. J. Physiol. Endocrinol.*, 1988 (255), pp. 322–331.
- Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H (2009): Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. In *Nature Struct. Mol. Biol.*, 2009 (16), pp. 546–571.
- Sun D, Luo M, Jeong M, Rodriguez B, Xia Z, Hannah R, Wang H, Le T, Faull KF, Chen R, Gu H, Bock C, Meissner A, Göttgens B, Darlington GJ, Li W, Goodell MA (2014): Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. In *Cell Stem Cell*, 2014 (14), pp. 673–688.
- Sunden SL, Redunchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA (1997): Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. In *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997 (345), pp. 171–174.

- Tabor CW, Tabor H. (1984): Polayamines. In *Annu. Rev. Biochem.*, 1984 (53), pp. 749–790.
- Taby R, Issa JP (2010): Cancer epigenetics. In *Cancer J. Clin.*, 2010 (60), pp. 376–392.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009): Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymehtylctosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. In *Science*, 2009 (324), pp. 930–935.
- Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, Shen H, Campan M, Noushmehr H, Bell CG, Maxwell AP, Savage DA, Mueller-Holzner E, Marth C, Kocjan G, Gayther SA, Jones A, Beck S, Wagner W, Laird PW, Jacobs IJ, Widschwendter M (2010): Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. In *Genome Res.*, 2010 (20), pp. 440–446.
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2014): Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. In *Nature*, 2014 (507), pp. 315–322.
- Thermo Fisher Scientific (2017): PCR Methods—Top Ten Strategies. Available online at <http://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html>, checked on 9/21/2017.
- Thomas T, Thomas TJ (2001): Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. In *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001 (58), pp. 244–258.
- Tomasi ML, Ryou M, Skay A, Tomasi I, Giordano P, Mato JM, Lu SC (2013): Polyamine and methionine adenosyltransferase 2A crosstalk in human colon and liver cancer. In *Exp. Cell Res.*, 2013 (319), pp. 1902–1911.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979 (76), pp. 4350–4354.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006): Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. In *Nature*, 2006 (439), pp. 811–816.
- Ukal H, Ukai-Tadenuma M, Ogiu T, Tsuji H (2002): A New Technique to Prevent Self-Ligation of DNA. Available online at <http://www.nirs.go.jp>, checked on 9/22/2017.
- Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (2009). In *TNM Classification of Malignant Tumors*, 2009 (7), 262-256.
- Universität Heidelberg (2018): Lungenkarzinom. Available online at https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/651/bronchialkarzinom, checked on 3/7/2018.
- Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Paliwal A, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z (2009): Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. In *Cancer Res.*, 2009 (69), pp. 243–252.
- Valinluck V, Sowers LC (2007): Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. In *Cancer Res.*, 2007 (67), pp. 946–950.
- Van Holde KE (1988): Chromatin. Series in molecular biology. 2nd ed. New York: Springer Verlag.

- Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Van Der Winden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. In *Nature*, 2006 (439), pp. 871–874.
- Waddington CH (1942): The epigenotype. In *Int. J. Epidemiol.*, 1942 (41), pp. 10–13.
- Wahlfors J (1991): Certain changes in ornithine decarboxylase gene methylation accompany gene amplification *Biochem. J.*, 1991 (15), pp. 435–440.
- Wang LH, Huang J, Wu CR, Huang LY, Cui J, Xing ZZ, Zhao CY (2018): Downregulation of miR-29b targets DNMT3b to suppress cellular apoptosis and enhance proliferation in pancreatic cancer. In *Mol. Med. Rep.*, 2018 (17), pp. 2113–2120.
- Wang RY, Kuo KC, Gehrke CW, Huang LH, Ehrlich M (1982): Heat- and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. In *Biochim. Biophys. Acta*, 1982 (697), pp. 371–377.
- Warburg O (1925): Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. In *Klin. Wochenschr.*, 1925 (4), pp. 534–536.
- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB (2009): ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. In *Science*, 2009 (324), pp. 1076–1080.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW (2007): Epigenetic stem cell signature in cancer. In *Nat. Genet.*, 2007 (39), pp. 157–158.
- Williams K, Christensen J, Helin K (2012): DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? In *EMBO Rep.*, 2012 (13), pp. 28–35.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL (2007): DNA hypomethylation and human diseases. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2007 (1775), pp. 138–162.
- Wojtczyk-Miaskowska A, Presler M, Michajlowski J, Matuszewski M, Schlichtholz B (2017): Gene Expression, DNA Methylation and Prognostic Significance of DNA Repair Genes in Human Bladder Cancer. In *Cell Physiol. Biochem.*, 2017 (42), pp. 2404–2417.
- Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, Yang AS, Jones PA, Liang G (2010): Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. In *PLoS Genet.*, 2010 (22).
- Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G (2010): Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. In *Cancer Res.*, 2010 (70), pp. 8169–8178.
- Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD (1997): Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. In *J. Biol. Chem.*, 1997 (272), pp. 7810–7816.
- World Health Organization (1973): *Histological Typing of Urinary Bladder Tumours*, 1973.
- World Health Organization (2017): Fact sheet: Cancer. Available online at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, checked on 11/24/2017.

- Wu MH, Luo JD, Wang WC, Chang TH, Hwang WL, Lee KH, Liu SY, Yang JW, Chiou CT, Chang CH, Chiang WF (2018): Risk analysis of malignant potential of oral verrucous hyperplasia: A follow-up study of 269 patients and copy number variation analysis. In *Head Neck*, 2018 (Epub ahead of print).
- Wyatt GR (1950): Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. In *Nature*, 1950 (4214), pp. 237–238.
- Xiang Q, Fan MZ, Xu B (2003): Apoptotic induction of human lung carcinoma A549 cells by DFMO through Fas/FasL pathway. In *Ai Zheng*, 2003 (22), pp. 1260–1263.
- Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, Liu L, Liu Y, Yang C, Xu Y, Zhao S, Ye D, Xiong Y, Guan KL (2012): Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. In *Genes Dev.*, 2012 (26), pp. 1326–1338.
- Xie H, Wang M, Bonaldo MF, Smith C, Rajaram V, Goldman S, Tomita T, Soares MB (2009): Highthroughput sequence-based epigenomic analysis of Alu repeats in human cerebellum. In *Nucleic Acids Res.*, 2009 (37), pp. 4331–4340.
- Yamamoto D, Shima K, Matsuo K, Nishioka T, Chen CY, Hu GF, Sasaki A, Tsuji T (2010): Ornithine Decarboxylase Antizyme Induces Hypomethylation of Genome DNA and Histone H3 Lysine 9 Dimethylation (H3K9me2) in Human Oral Cancer Cell Line. In *PLOS One*, 2010 (5).
- Yan S, Xu D, Wang P, Liu C, Hua C, Jiang T, Zhang B, Li Z, Lu L, Liu X, Wang B, Zhang D, Zhang R, He S, Sun B, Wang X (2014): MTHFR C677T polymorphism contributes to the risk for gastric cancer. In *Tumour Biol.*, 2014 (35), pp. 2123–2132.
- Yang F, Wang P. J. (2016). Multiple LINEs of retrotransposon silencing mechanisms in the mammalian germline. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2016 (59), pp. 118–125.
- Yang M, Vousden KH (2016): Serine and one-carbon metabolism in cancer. In *Nature*, 2016 (16), 650–662.
- Ye J, Fan J, Venneti S, Wan YW, Pawel BR, Zhang J, Finley LW, Lu C, Lindsten T, Cross JR, Qing G, Liu Z, Simon MC, Rabinowitz JD, Thompson CB (2014): Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. In *Cancer Discov.*, 2014 (4), pp. 1406–1417.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. In *Trends Genet.*, 1997 (13), pp. 335–340.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991): Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. In *Nature*, 1991 (352), pp. 345–347.
- Yoo TH, Ryu BK, Lee MG, Chi SG (2013): CD81 is a candidate tumor suppressor gene in human gastric cancer. In *Cell Oncol.*, 2013 (36), pp. 141–153.
- Yousef AM, Shomaf M, Berger S, Ababneh N, Bobali Y, Ali D, Al-Hasan S, Diab O, Ismail S (2013): Allele and Genotype Frequencies of the Polymorphic Methylenetetrahydrofolate Reductase and Colorectal Cancer among Jordanian Population. In *Asian Pac. J. Cancer*, 2013 (14), pp. 4559–4565.
- Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristonrena, Martin-Martin N, Fernandez-Ruiz S, Sutherland JD, Clasquin M, Tomas-Cortazar J, Jimenez J, Torres I, Quang P, Ximenez-Embun P, Bago R, Ugalde-Olano A, Loizaga-Iriarte A, Lacasa-Viscasillas I, Unda M, Torrano V, Cabrera D, van Liempd SM, Cendon Y,

- Casto E, Murray S, Revandkar A, Alimonti A, Zhang Y, Barnett A, Lein G, Pirman D, Cortazar AR, Arreal L, Prudkin L, Astobiza I, Valcarcel-Jimenez L, Zuniga-Garcia P, Fernandet-Dominguez I, Piva M, Caro-Maldonado A, Sanchet-Mosquera P, Castillo-Martin M, Serra V, Beraza N, Gentilella A, Thomas G, Azkargorta M, Elortza F, Farras R, Olmos D, Efeyan A, Anguita J, Munoz J, Falcon-Perez JM, Barrio R, Macarulla T, Mato JM, Martinez-Chantar ML, Cordon-Cardo C, Aransay AM, Marks K, Baselga J, Tabernero J, Nuciforo P, Manning BD, Marjon K, Carracedo A (2017): mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. In *Nature*, 2017 (547), pp. 109–113.
- Zhang HP, Wang YH, Ma SC, Zhang H, Yang XL, Zhang MH, Sun JM, Hao YJ, Jiang YD (2018): Homocysteine inhibits endothelial progenitor cells proliferation via DNMT1-mediated hypomethylation of Cyclin A. In *Exp. Cell Res.*, 2018 (362), pp. 217–226.
- Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, Soh BS, Sun LL, Tai BC, Nga ME, Bhakoo KK, Jayapal SR, Nichane M, Yu Q, Ahmed DA, Tan C, Sing WP, Tam J, Thirugananam A, Noghabi MS, Pang YH, Ang HS, Mitchell W, Robson P, Kaldis P, Soo RAm Swarup S, Lim EH, Lim B (2012): Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. In *Cell*, 2012 (148), pp. 259–272.
- Zhang Y, Reinberg D (2001): Transcription regulation by histone Methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. In *Genes Dev.*, 2001, pp. 2343–2360.
- Zhang Y, Shu J, Si J, Shen L, Estecio MRH, Issa JPJ (2012): Repetitive elements and enforced transcriptional repression co-operate to enhance DNA methylation spreading into a promoter CpG-island. In *Nucleic Acids Res.*, 2012 (40), pp. 7257–7268.
- Zhang Y, Wang X, Jiang Q, Hao H, Ju Z, Yang C, Sun Y, Wang C, Zhong J, Huang J, Zhu H (2018): DNA methylation rather than single nucleotide polymorphisms regulates the production of an aberrant splice variant of IL6R in mastitic cows Cell Stress Chaperones, 2018 (doi: 10.1007/s12192-017-0871-0. [Epub ahead of print]).
- Zhao H, Chen T (2013): Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. In *J. Hum. Genet.*, 2013 (58), pp. 421–427.
- Zhong J, Chen X, Wu N, Shen C, Cui H, Du W, Zhang Z, Feng M, Liu J, Lin S, Zhang L, Wang J, Chen X, Duan S (2016): Catechol-O-methyltransferase promoter hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease. In *Exp. Ther. Med.*, 2016 (12), pp. 3445–3449.
- Zhou B, Zhang P, Tang T, Zhang K, Wang Y, Song Y, Liao H, Zhang L (2014): Prognostic value of PDCD6 polymorphisms and the susceptibility to bladder cancer. In *Tumour Biol.*, 2014 (35), pp. 7547–7554.
- Zhou L, Wu S, Yu L, Gong X, Song W, Cheng Z (2015): Expression of CD133 and Notch1 in non-small cell lung cancer and the clinicopathological significance. In *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015 (35), pp. 196–201.
- Zhou Q, Wang Y, Chen A, Tao Y, Song H, Li W, Tao J, Zuo M (2015): Association between the COMT Val158Met polymorphism and risk of cancer: evidence from 99 case-control studies. In *Onco targets Ther.*, 2015 (doi: 10.2147/OTT.S90883. eCollection 2015.).
- Zhu J, Adli M, Zou JY, Verstappen G, Coyne M, Zhang X, Durham T, Miri M, Deshpande V, De Jager PL, Bennett DA, Houmard JA, Muoio DM, Onder TT, Camahort R, Cowan CA, Meissner A, Epstein CB, Shoresh N, Bernstein BE (2013): Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. In *Cell*, 2013 (152), pp. 642–654.

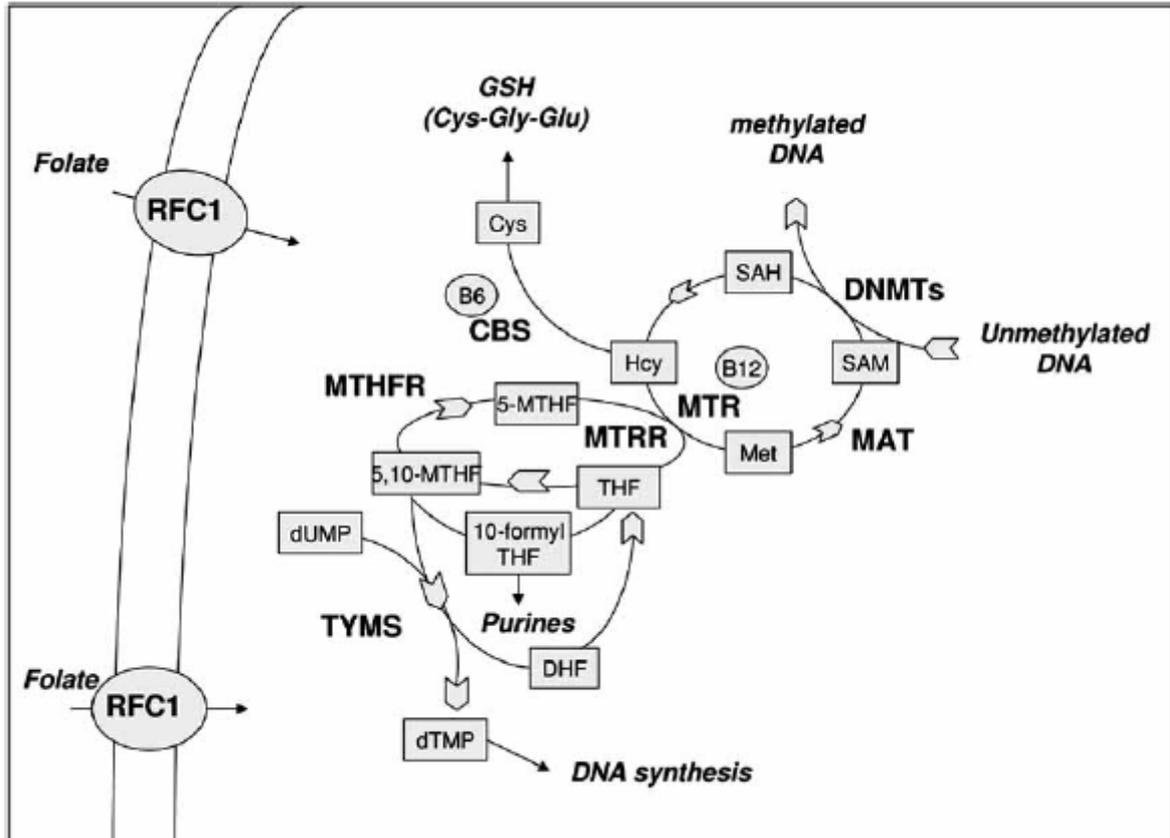
Zimmermann S, Henikoff D (2007): Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. In *Development*, 2007, 3959-3965.

Zourob M (2010): Recognition receptors in biosensors. 1. Aufl. New York: Springer Verlag.

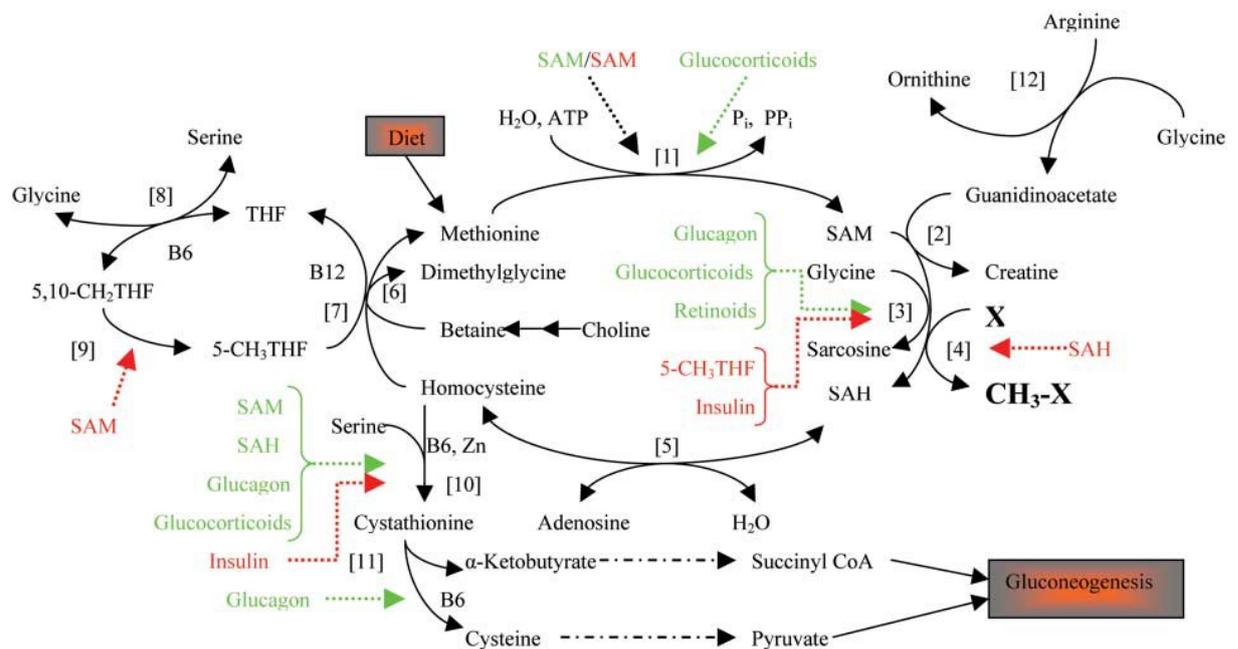
7. Anhang

7.1 Originalabbildungen

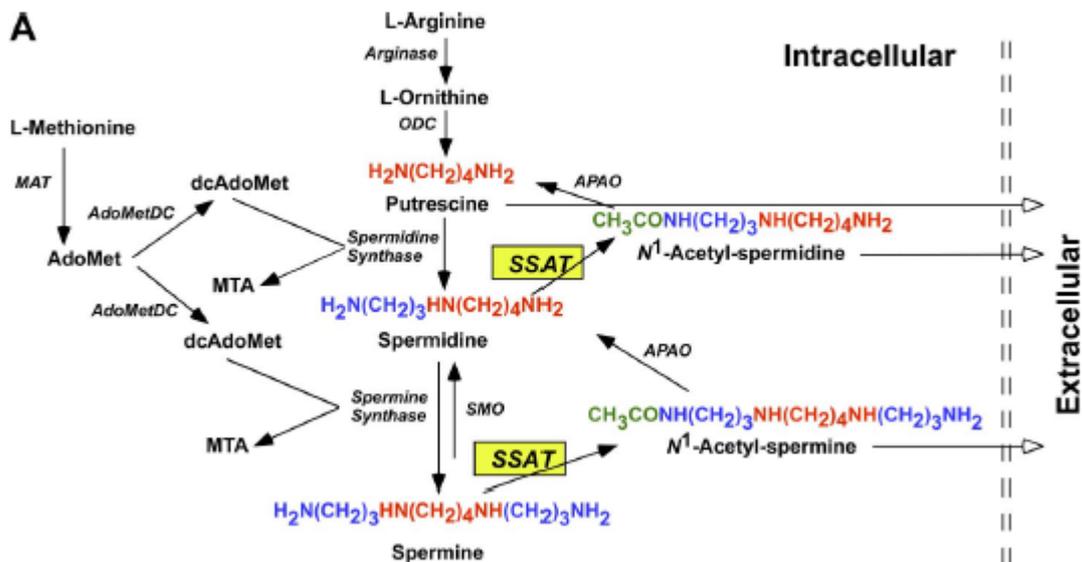
“One-Carbon Metabolism and Alzheimer’s Disease: Focus on Epigenetics”, (Coppede, 2010).



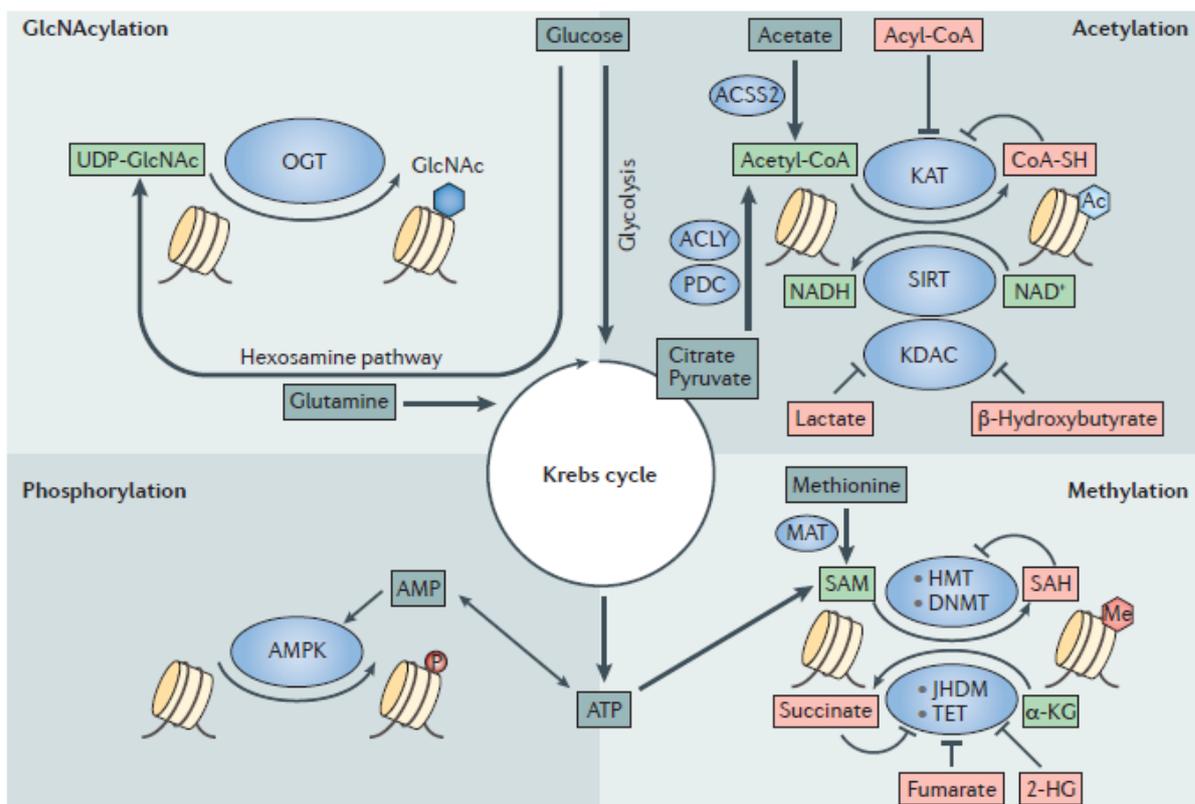
“The impact of metabolism on DNA Methylation”, (Clayton, et al., 2005).



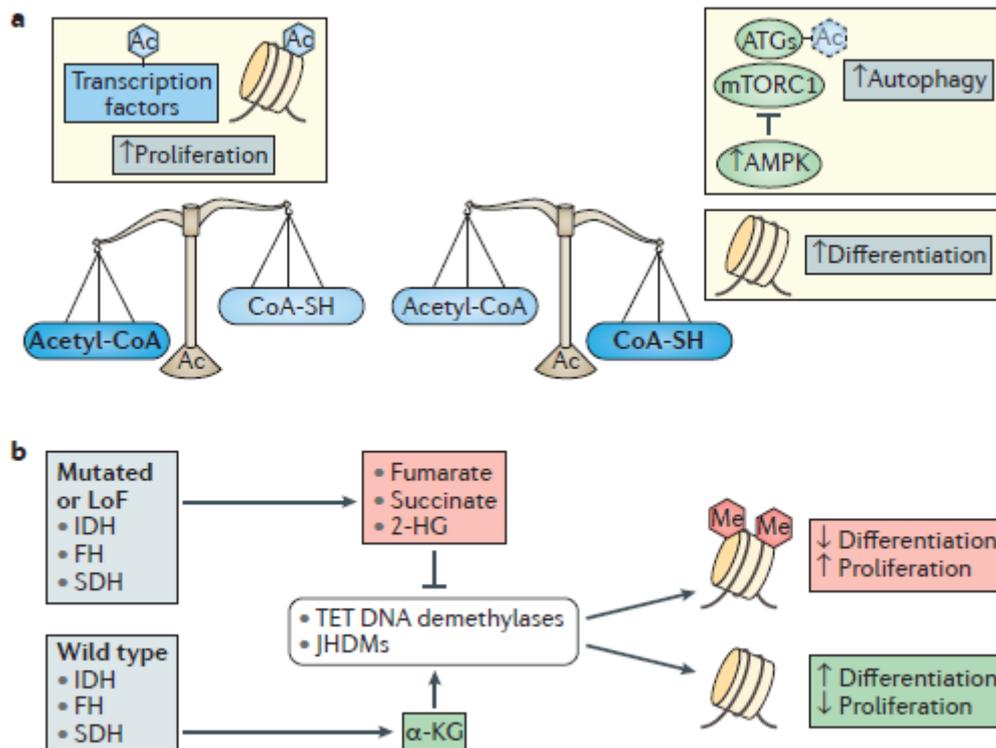
“Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator”, (Pegg, 2008).



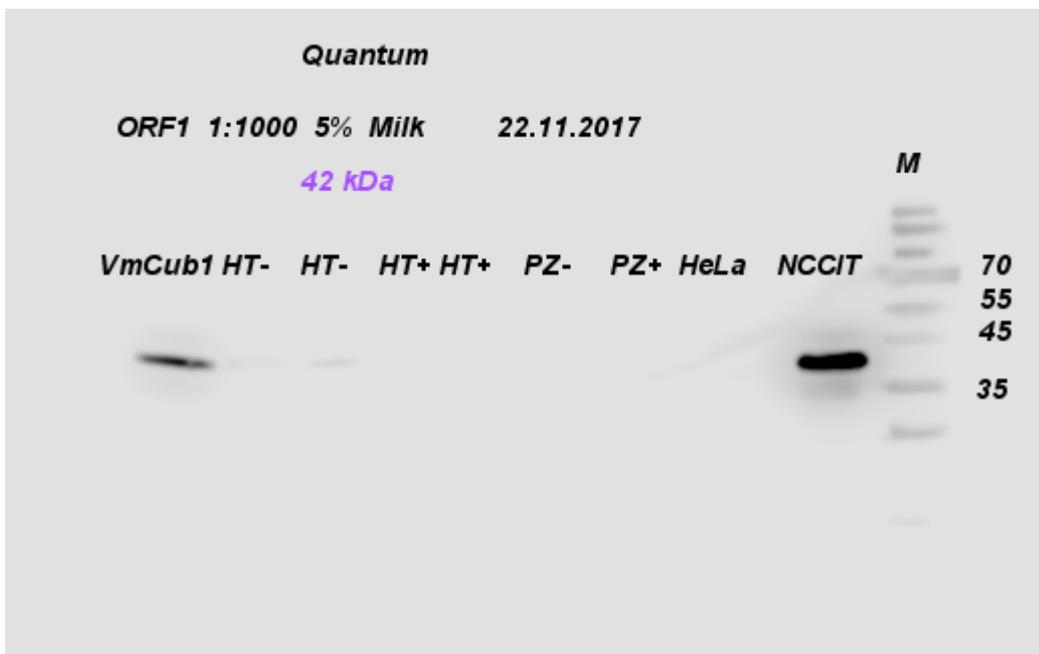
“Metabolic control of epigenetics in cancer”, (Kinnaird *et al.*, 2016).

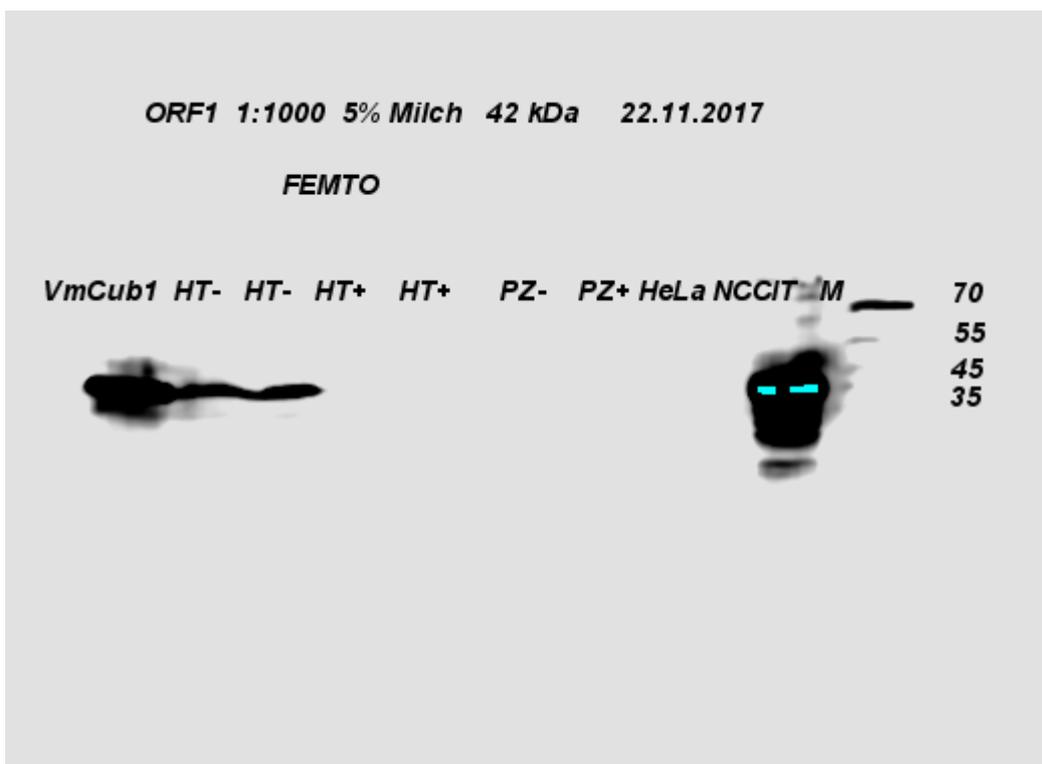


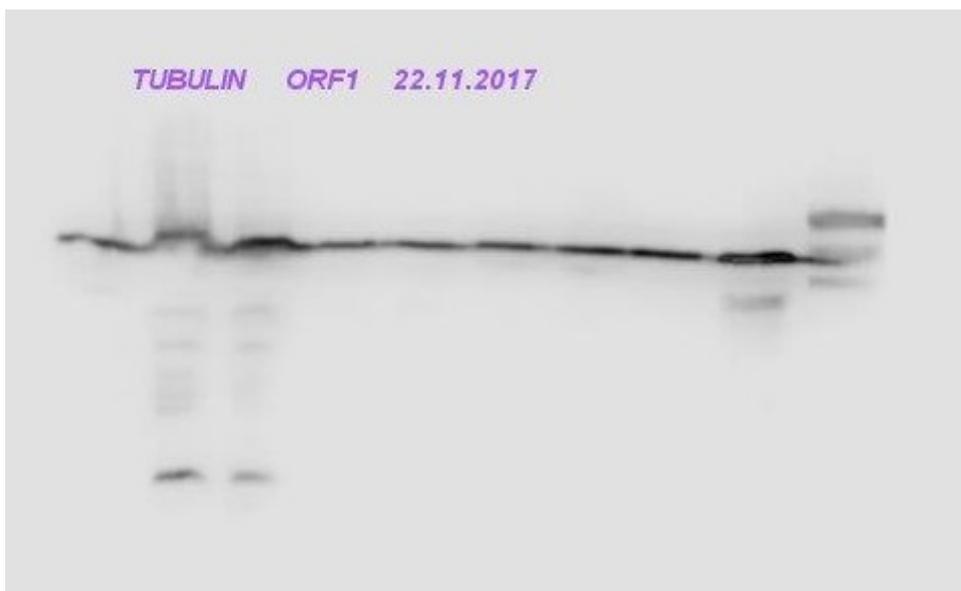
“Metabolic control of epigenetics in cancer”, (Kinnaid *et al.*, 2016).



Western Blot







7.2 Datenblätter der Zelllinien

Cell line: HBLAK

<http://cellIntec.com/products/hblak#datasheet>

Species: Human, single donor, bladder

Tissue type: Epithelia

Pack Size: HBLAK is a vial containing $> 5 \times 10^5$ cells (1ml)

Defined: Yes

ACF: No

Culture Medium: CnT-PR

Cultivation: For cultivation instructions, please see general cultivation protocol in the resources section of www.cellIntec.com

Passaging: Recommended seeding density after passaging: 4×10^3 cells / cm^2 . For detailed passaging instructions, please see general cultivation protocol in the resources section of www.cellIntec.com.

Longevity: Guaranteed to provide at least 6 months further growth when grown in CnT-PR medium.

Storage / Shelf Life: Immediately upon arrival, transfer the cryo vial to the liquid nitrogen container until ready to use. Medium storage: refer to medium label and data sheet.

Thawing: Recommended seeding density: after thawing: 4.000 cells cm^2 . For thawing instructions, please see general cultivation protocol in the resources section of www.cellIntec.com.

Freezing: Recommended freezing density: 1×10^6 cells / ml. For freezing instructions, please see general cultivation protocol in the resources section of www.cellIntec.com.

Quality Control: Tested negative for Hepatitis B, Hepatitis C and HIV-1. Free of bacteria, fungi and mycoplasma contamination.

Shipping Condition: Cells are shipped on dry ice.

Comments: Bladder cells are sensitive to trypsin and trypsin like enzymes. The use of these enzymes impairs the cell attachment and cell growth, therefore CELLnTEC recommends the use of Accutase for

detachment. For routine cell cultivation CELLnTEC recommends to work without antibiotics / antimycotics.

Intended Use: For research use only. Not for use in therapy or diagnostics.

Cell line: HELA

<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-57.html> 1/2

DSMZ no.: ACC 57

Species: human (*Homo sapiens*)

Cell type: cervix carcinoma

Origin: established from the epitheloid cervix carcinoma of a 31-year-old black woman in 1951; later diagnosis changed to adenocarcinoma; first aneuploid, continuously cultured human cell line

Reference(s): 14926, 14555, 18012, 18013

Biosafety level: 1

Risk assessment: The cell line is infected with papilloma virus type 18 (HPV-18). The cells contain several copies as proviruses integrated into the eukaryotic genome. The integrated virus genomes are incomplete and exhibit 2-3 kb deletions of the E2-L2 region. An activation and transmission of the HPV-18 during handling of the cell line is improbable. The cell line is categorized biosafety level 1.

Permissions and restrictions: A

DSMZ Cell Culture Data: Morphology: epithelial-like cells growing in monolayers; image ; image
Medium: 90% MEM (with Earle's salts) + 10% h.i. FBS + 2 mM L-glutamine + nonessential amino acids (cells also grow well in 90-95% RPMI 1640 + 5-10% h.i. FBS) Subculture: seed out at ca. 1-2 x 10⁶ cells/80 cm²; split confluent culture 1:4 to 1:6 every 3-5 days using trypsin/EDTA; cells reach confluence quickly Incubation: at 37 °C with 5% CO₂ Doubling time: ca. 40-48 hours Harvest: cell harvest of ca. 10-15 x 10⁶ cells/175 cm² Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO

DSMZ Scientific Data: Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays Immunology: cytokeratin +, cytokeratin-7 +, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 +, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, HMB-45 -, neurofilament -, vimentin +

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile Species: confirmed as human with IEF of G6PD, MDH, NP Cytogenetics: human hypertriploid/hypotetraploid karyotype with 15% polyploidy - 82(77-84) <4n>XXX, -X, -2, -3, -4, +5, +5, +5, +5, -7, -8, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21, -22, +mar - der(1)t(1;3)(p11;q11), add(2)(q37), del(3)(q13), der(3)t(3;5)(q11;q11), i(5p)x4, del(6)(q15), der(9)t(1;9)(p11;p11), add(12)(q23), i(15q), der(19)t(13;19)(q22;p13)x1-2, add(21)(p11), del(?22)(q12)

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV-1 -, HIV-2 -, HPV +, HTLV-I/II -, MLV -, SMRV -

Supplied as: Delivery form Prices Frozen culture 360€, Growing culture (please inquire for exact delivery time) 720€, DNA isolated from cell line (25 µg) 440€, DNA isolated from cell line (5 µg) 100 €

Cell line: HEK 293

<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC305>.

DSMZ no.: ACC 305

Species: human (*Homo sapiens*)

Cell type: embryonal kidney

Origin: established from a human primary embryonal kidney transformed by adenovirus type 5 (Ad 5); classified as risk category 1 according to the German Central Commission for Biological Safety (ZKBS); cell line also known as HEK293 (human embryonic kidney293)

Reference(s): 14573

Biosafety level: 1, GMOS1

Risk assessment: The cell line was established by transfection of the cells with sheared DNA of adenovirus type 5. The cells contain 4 to 5 copies of the left end of the virus (12% of the viral genome) including E1a and E1b genes and one copy of the right end of the virus (10% of the genome) including the E4 gene. No active viruses are produced.

Permissions and restrictions: A, D

DSMZ Cell Culture Data: Morphology: adherent fibroblastoid cells growing as monolayer; image ; image Medium: 90/95% Dulbecco's MEM + 5/10% h.i. FBS Subculture: split confluent culture 1:5 to 1:6 every 23 days (without using trypsin/EDTA, cells can be detached by tapping the flask); seed out at about 23 x 10⁶ cells/25 cm² Incubation: at 37 °C with 10% CO₂ Doubling time: about 24/30 hours

Harvest: cell harvest of about 40 x 10⁶ cells/175 cm²

Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO

DSMZ Scientific Data:

Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays Immunology: cytokeratin +, cytokeratin7, cytokeratin8+, cytokeratin17, cytokeratin18 (+), cytokeratin19, desmin , endothel, EpCAM, GFAP, neurofilament +, vimentin +

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of AST, LDH

Cytogenetics: human neartriploid karyotype with 6% polyploidy 69 (6469) XX?X, +1, +6, -10,-13, -16,-18, -20, +21, +22, +mar, add(?X)(p22), inv(1)(p35q43), del(1)(p35), i(5p), del(6)(q11), add(8)(q24), add(13)(p13), add(17)(qter), der(?)t(5;?)(q13;?)

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV, HBV, HCV, HHV8, HIV1, HIV2, HTLV/II, MLV, SMRV

Supplied as: Delivery form Prices Frozen culture 360€, Growing culture (please inquire for exact delivery time) 720€ DNA isolated from cell line (25 µg) 440€, DNA isolated from cell line (5 µg) 100€

Cell line: HT1376

<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC397>.

DSMZ no.: ACC 397

Species: human (*Homo sapiens*)

Cell type: urinary bladder carcinoma

Origin: established from a transurethral resection of invasive, moderately pleomorphic (grade 3) bladder transitional cell carcinoma of a 58yearold Caucasian woman who had not received chemoradiotherapy

Reference(s): 14579, 14882

Biosafety level: 1

Permissions and restrictions: A

DSMZ Cell Culture Data: Morphology: epitheloid adherent cells growing in monolayers Medium: 85% Dulbecco's MEM (4.5 g/L glucose) + 15% h.i. FBS + 2 mM Lglutamine Subculture: split confluent cultures 1:5 once a week using trypsin/EDTA; seed out at ca. 1.5×10^6 cells/80 cm²; maximal density at ca. 60×10^6 cells/175 cm² Incubation: at 37 °C with 10% CO₂ Doubling time: ca. 60 hours Harvest: cell harvest of ca. 40×10^6 cells/175 cm² Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO

DSMZ Scientific Data: Mycoplasma: contamination was eliminated with BMCyclin (tiamulin & minocycline), then negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays

Immunology: cytokeratin +, cytokeratin7+, cytokeratin17+, cytokeratin18+, desmin, endothel, GFAP, neurofilament, vimentin

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of AST, LDH, MDH

Cytogenetics: human flat moded pentaploid karyotype with 8% polyploidy 111(102116) <5n>XX/XXX, +3, +3, +5, +5, -6, +7, +8, +8, -12,-13,-13,-14,-14,-15,-15,-15, -15,-16,-17, -17, -19, -19, +20, -22, -22, -22, +6-8mar del(2)(q25), add(3) (q27)x2, del(3)(p11p14), i(5q), add(5)(p15), del(5)(p13), add(5)(q1?3;hsr), del(6) (q25), add(7)(p22), del(7)(q11), add(8)(p23)x2, i(9q)x2, del(9)(p21), del(10)(q24), add(11)(p15), add(12)(p13)x12, del(12)(p11), der(13)t(13;?)(p11;?)t(?;1)(?;q11), add(17)(p1?), add(18)(p11) sideline with i(5p) 3p, 5p/q10, +7, 8p, 9p, 10q, 11p, 17p rearrangements associated with bladder TCC matches published karyotypes

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV, HBV, HCV, HIV, HTLV/II, MLV,

SMRV Supplied as: Delivery form Prices Frozen culture 360€, Growing culture (please inquire for exact delivery time) 720€, DNA isolated from cell line (25 µg) 440€, DNA isolated from cell line (5 µg) 100€

Cell line: NCCIT

https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2073.aspx?geo_country=de

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: anterior mediastinal mixed germ cell tumor

Product Format: frozen

Morphology: epithelial

Culture Properties: adherent

Biosafety: Level 1 Biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines, it is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.

Disease: pluripotent embryonal carcinoma; teratocarcinoma

Age adult

Gender male

Ethnicity Japanese

Cell line: SW1710

<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC426>.

DSMZ no.: ACC 426

Species: human (*Homo sapiens*)

Cell type: urinary bladder transitional cell carcinoma

Origin: established from the bladder tumor of an 84yearold Caucasian woman following transurethral tumor resection in 1977

Reference(s): 14700

Biosafety level: 1

Permissions and restrictions: A

DSMZ Cell Culture Data: Morphology: epitheliallike, elongated cells growing adherently as monolayers
Medium: 85% Dulbecco's MEM + 15% h.i. FBS Subculture: split confluent culture 1:5 to 1:10 every 36 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. 1.5×10^6 cells/80 cm² in 10 ml medium Incubation: at 37 °C with 10% CO₂ Doubling time: ca. 2532 hours Harvest: cell harvest of ca. 68×10^6 cells/175 cm²
Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO

DSMZ Scientific Data: Mycoplasma: negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays Immunology: cytokeratin +, cytokeratin7, cytokeratin8+, cytokeratin17, cytokeratin18+, desmin, endothel, EpCAM, GFAP, neurofilament, vimentin (+)

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of LDH, NP

Cytogenetics: human flatmoded hypotetraploid karyotype with 8% polyploidy 7784<4n>X, -X, -X, -X, -4, -4, -5, -5,+6, +6, -8, -9, -10, -11, -13, -14, -14, -16, -19, +20, +20, +4mar,

der(X)t(X;6)(q1113;q25q27), del(2)(p12)x2, add(3)(p1421), der(6)t(X;6)(q1113;q2527) x2, der(6)del(6)(p11p12.2)add(6)(q2527) x2, add(13)(q3334) resembles published karyotype

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV, HBV, HCV, HIV, HTLV/III, MLV, SMRV

Supplied as: Delivery form Prices Frozen culture 360€, Growing culture (please inquire for exact delivery time) 720€, DNA isolated from cell line (25 µg) 440€, DNA isolated from cell line (5 µg) 100€

Cell line: VM-CUB1

<https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-400.html> 1/2

DSMZ no.: ACC 400

Species: human (*Homo sapiens*)

Cell type: urinary bladder transitional cell carcinoma

Origin: established from the primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder of a male patient; described in the literature to carry a p53 point mutation

Reference(s): 14579, 15063

Biosafety level: 1

Permissions and restrictions: A

DSMZ Cell Culture Data: Morphology: adherent epithelial-like cells growing as monolayers; image Medium: 90% Dulbecco's MEM (4.5 g/L glucose) + 10% h.i. FBS Subculture: split confluent culture 1:5 to 1:10 every 3-5 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. 1-2 x 10⁶ cells/80 cm² Incubation: at 37 °C with 10% CO₂ Doubling time: ca. 30-45 hours Harvest: cell harvest of ca. 40 x 10⁶ cells/175 cm² Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO

DSMZ Scientific Data: Mycoplasma: contamination was eliminated with Mycoplasma Removal Agent, then negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays Immunology: cytokeratin +, cytokeratin-7 +, cytokeratin -8 +, cytokeratin -17 +, cytokeratin -18+, cytokeratin -19 +, desmin -, endothel -, EpCAM +, GFAP -, neurofilament -, vimentin -

Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile

Species: confirmed as human with IEF of AST, NP

Cytogenetics: human hypertriploid karyotype with 4% polyploidy - 80<3n>XX/XX?Y, +1, +1, +5, +6, +7, +9, -11, +15, -18, +19, +20, +22, +22, +7mar, del(1)(q21), del(1)(q11), der(1;6)(p10;q10)x2, add(3)(p21.3)x2, i(5p), der(6)t(1;6)(q11;q22), ? inv(7)(p15q35), i(9q), del(10)(p11), del(10)(q?22?24), add(12)(p11)x2, add(15)(p11), add(21)(p11) - sideline with i(5q)

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV-1 -, HIV-2 -, HTLV-I/II -, MLV -, SMRV -

Supplied as: Delivery form Prices Frozen culture 360€, Growing culture (please inquire for exact delivery time) 720€, DNA isolated from cell line (25 µg) 440€, DNA isolated from cell line (5 µg) 100€

7.3 Antikörper

Anti-LINE-1 ORF1p Antibody, clone 4H1

http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Anti-LINE-1-ORF1p-Antibody-clone-4H1,MM_NF-MABC1152

Catalogue Number: MABC1152

Alternate Names: LINE-1 retrotransposable element ORF1 protein L1ORF1p

Information: LINE-1 retrotransposable element ORF1 protein (UniProt: Q9UN81; also known L1ORF1p, LINE retrotransposable element 1, LINE1 retrotransposable element 1) is encoded by the L1RE1 (also known as LRE1) gene in human. LINE1-ORF 1P belongs to the transposase 22 family. It is mainly cytoplasmic protein and is enriched in stress granules, but may rarely be detected in the nucleolus. It contains a coiled coil domain that mediates its homotrimerization. The RNA recognition motif (RRM) the C-terminal domain are required for its proper RNA binding activity. LINE1-ORF 1P is a nucleic acid-binding protein which is essential for retrotransposition of LINE-1 elements in the genome. It is also reported to function as a nucleic acid chaperone binding its own transcript and therefore preferentially mobilizing the transcript from which they are encoded. Retrotransposition is shown to be a complex process that involves transcription of the LINE1, transport of its RNA to the cytoplasm, translation of the bicistronic RNA, formation of a ribonucleoprotein particle, its re-import to the nucleus and then target-primed reverse transcription at the integration site. Somatic LINE1 insertions are rare in most tissues, but are found in brain, testis, and many cancer types and have been implicated in carcinogenesis. Its expression is consistently detected in p53 mutant tumors, but, little or no expression is detected in Wilms tumors that were normal for p53. (Ref.: Goodier, JL et al. (2013). *Nucleic Acids Res.* 41(15): 7401-7419).

Format: Purified

Presentation: Purified mouse monoclonal antibody IgG1 in buffer containing 0.1 M Tris-Glycine (pH 7.4), 150mM NaCl with 0.05% sodium azide.

Application: Detect LINE-1 retrotransposable element ORF1 protein using this mouse monoclonal Anti-LINE-1 ORF1p Antibody, clone 4H1, Cat. No. MABC1152. It is used in Immunocytochemistry, Immunohistochemistry (Paraffin), Immunoprecipitation, and Western Blotting. Key Applications Western Blotting, Immunocytochemistry, Immunoprecipitation, Immunohistochemistry (Paraffin).

Analysis: A representative lot detected LINE-1 ORF1p in Immunohistochemistry applications (Rodic, N., et. al. (2014). *AM J Pathol.* 184(5):1280-6; Doucet-O'Hare, T.T., et. al. (2015). *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(35):E4894-900; Wylie, A., et. al. (2016). *Genes Dev.* 30(1):64-77). Immunocytochemistry Analysis: A representative lot detected LINE-1 ORF1p in Immunocytochemistry applications (Taylor, M.S., et. al. (2013). *Cell* 155(5):1034-48). Immunoprecipitation Analysis: A representative lot detected LINE-1 ORF1p in Immunoprecipitation applications (Taylor, M.S., et. al. (2013). *Cell* 155(5):1034-48). Western Blotting Analysis: A representative lot detected LINE-1 ORF1p in Western Blotting applications (Taylor, M.S., et. al. (2013). *Cell* 155(5):1034-48).

Immunogen A linear peptide corresponding to 10 amino acids from the N-terminal region of human LINE-1 ORF1 protein. Clone 4H1

Concentration: Please refer to lot specific datasheet.

Host: Mouse Specificity Clone 4H1 specifically detects LINE-1 ORF1 protein in MCF7 cells. This clone targets the sequence corresponding to 10 amino acids from the N-terminal region of LINE-1 ORF1p.

Isotype: IgG1k

Species Reactivity: Human

Antibody Type: Monoclonal Antibody

Gene Symbol: L1RE1, LRE1

Purification Method: Protein G purified

UniProt Number: Q9UN81

Molecular Weight: ~42 kDa observed; 40.06 kDa calculated. Uncharacterized bands may be observed in some lysate(s).

Quality Assurance: Evaluated by Western Blotting in MCF7 cell lysate. Western Blotting Analysis: A 1:1,000 dilution of this antibody detected LINE-1 ORF1p in 10 µg of MCF7 cell lysate.

Usage Statement: Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals.

Storage Conditions: Stable for 1 year at 2-8°C from date of receipt.

Material Size 100 µL

Anti-alpha Tubulin antibody

<http://www.abcam.com/alpha-tubulin-antibody-ab15246.html>

Description: Rabbit polyclonal to alpha Tubulin

Host species: Rabbit

Tested applications Suitable for: ICC/IF, IHC-Fr, WB, IHC-P, IP

Species reactivity Reacts with: Mouse, Rat, Sheep, Human, Pig, Drosophila melanogaster, Zebrafish
Predicted to work with: Rabbit, Chicken, Guinea pig, Cow, Xenopus laevis, Gerbil, Newt

Immunogen: Synthetic peptide corresponding to alpha Tubulin.

Positive control: IHC-P: Human lung tissue.

Form: Liquid

Storage instructions Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C. Avoid freeze / thaw cycles.

Storage buffer: pH: 7.6, Preservative: 0.1% Sodium azide, Constituents: 0.0268% PBS, 1% BSA

Purity: Immunogen affinity purified

Clonality: Polyclonal

Isotype: IgG

Applications: ICC/IF: Use at an assay dependent concentration. PubMed: 17785506. IHC-Fr: Use at an assay dependent concentration. PubMed: 21069788. WB: Use at an assay dependent concentration. Detects a band of approximately 55 kDa (predicted molecular weight: 50 kDa). IHC-P: 1/100. Perform heat mediated antigen retrieval before commencing with IHC staining protocol. IP: Use at an assay dependent concentration.

mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357

<https://datasheets.scbt.com/sc-2357.pdf>

SOURCE: mouse anti-rabbit IgG-HRP is an affinity purified secondary antibody raised in mouse against rabbit IgG and conjugated to HRP (horseradish peroxidase).

PRODUCT: Each vial contains 200 µg mouse IgG in 0.5 ml of PBS containing 40% glycerol, 1% stabilizer protein and < 0.01% thimerosal.

APPLICATIONS: mouse anti-rabbit IgG-HRP is recommended for detection of rabbit IgG by Western Blotting (starting dilution: 1:1000, dilution range: 1:1000-1:10000) and immunohistochemical staining (starting dilution: 1:25, dilution range: 1:25- 1:100). Optimal dilution to be determined by titration.

STORAGE: Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required

SELECT PRODUCT CITATIONS 1. Liu, S. 2000. Interaction of MyoD family proteins with enhancers of acetylcholine receptor subunit genes in vivo. *J. Biol. Chem.* 275: 41364-41368. 2. Shibata, H., et al. 2007. α -catenin is essential in intestinal adenoma formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 18199-18204. 3. Waning, D.L., et al. 2008. Cul4A is required for hematopoietic cell viability and its deficiency leads to apoptosis. *Blood* 112: 320-329. 4. Mascia, C., et al. 2010. Proinflammatory effect of cholesterol and its oxidation products on CaCo-2 human enterocyte-like cells: effective protection by epigallocatechin-3-gallate. *Free Radic. Biol. Med.* 49: 2049-2057. 5. Nagel, J.M., et al. 2011. Dietary walnuts inhibit colorectal cancer growth in mice by suppressing angiogenesis. *Nutrition* 28: 67-75. 6. Chen, J., et al. 2015. Low expression of phosphatase and tensin homolog in clear-cell renal cell carcinoma contributes to chemoresistance through activating the Akt/HDM2 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 12: 2622-2628. 7. Srivastava, K., et al. 2016. Expression of heat shock protein 70 gene and its correlation with inflammatory markers in essential hypertension. *PLoS ONE* 11: e0151060. 8. Su, F., et al. 2016. A novel alternative splicing isoform of NF2 identified in human Schwann cells. *Oncol. Lett.* 12: 977-982.

Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate

http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Goat-Anti-Mouse-IgG-Antibody-HRP-conjugate,MM_NF-12-349

Catalogue Number: 12-349

Description: Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate

Background Information: Immunoglobulin G (IgG), is one of the most abundant proteins in human serum with normal levels between 8-17 mg/mL in adult blood. IgG is important for our defense against microorganisms and the molecules are produced by B lymphocytes as a part of our adaptive immune response. The IgG molecule has two separate functions; to bind to the pathogen that elicited the response and to recruit other cells and molecules to destroy the antigen. The variability of the IgG pool is generated by somatic recombination and the number of specificities in an individual at a given time point is estimated to be 1011 variants.

Format: HRP

Presentation: Purified goat polyclonal IgG in buffer containing conjugated to horseradish peroxidase lyophilized from 0.02 M Potassium Phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 10 mg/mL BSA, and 0.01% gentamicin sulfate. **Rehydration:** Add 500 µL sterile, distilled water containing 50% glycerol, to make a 1 mg/mL stock solution.

Application: Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate is an antibody against Mouse IgG for use in ELISA, IH & WB. **Key Applications:** ELISA
Immunohistochemistry Western Blotting.

Application Notes: Additional Research Applications ELISA and Immunohistochemistry: A working dilution of 1:10,000 to 1:40,000 is suggested for ELISA and 1:500 to 1:2,000 for immunohistochemistry. Optimal antibody dilution for other applications should be determined by the researcher

Immunogen: Highly purified whole mouse IgG.

Host: Goat

Specificity: Recognizes mouse IgG, both heavy and light chains.

Species: Reactivity Mouse

Antibody Type: Polyclonal Antibody

Quality Assurance: Western Blot Analysis: Suitable for western blotting (dot blot) at 1:1,000 to 1:4,000 dilution.

Usage Statement: Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals

Storage Conditions: Stable for 1 year at -20°C from date of receipt.

Material Size: 500 µg

5-methylcytosine (5-mC) monoclonal antibody 33D3 – Premium

https://www.diagenode.com/files/products/antibodies/Datasheet_5-mC33D3_C15200081.pdf

Cat. No. C15200081-100

Type: Monoclonal

Size: 100 µg

Concentration: 1.24 µg/µl

Lot No.: RD-004

Storage buffer: PBS containing 0.05% azide

Specificity: Human, mouse, rat, other (wide range): positive

Isotype: IgG1

Source: Mouse

Purity: Protein A purified monoclonal antibody

Storage conditions: Store in small aliquots at -80°C. Avoid multiple freeze-thaw cycles

Precautions: This product is for research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures

Applications: MeDIP/MeDIP-seq, Dot Blotting, IF

7.4 Veröffentlichte Abbildungen

Abbildungen erschienen in Scientific Reports 22.Feb. 2018;8(1):3477. doi: 10.1038/s41598-018-21932-7.

Erichsen L, Ghanjati F, Beermann A, Poyet C, Hermanns T, Schulz WA, Seifert HH, Wild PJ, Buser L, Kröning A, Braunstein S, Anlauf M, Jankowiak S, Hassan M, Bendhack ML, Bravo MA, Santourlidis S (2018). **“Aberrant methylated key genes of methyl group metabolism within the molecular etiology of urothelial carcinogenesis.”**

5-jähriger „Impact Factor“: 4,847

Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der peak values für die Gene *AHCY*, *AHCYL2* und *ODC1*. (S.89)

Eigener Anteil: Prozessieren der Gewebeproben aus der Pathologie Düsseldorf

Mikroarray-Analysen

Auswertung der Arraydaten

Erstellung der Abbildung

Abbildung 21: Detailanalyse des 348bp großen 5'-regulatorischen Bereiches des *AHCY*- Gens in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms. (S.98)

Eigener Anteil: DNA-Isolation aus den Gewebeproben

Bisulfit-Konvertierung der DNA-Proben

PCR-basierte Amplifikation des *AHCY*-Promotorfragmentes

Ligation des Promotorfragmentes in den pCR2.1 Vektor

Transformation von TOP10 chemisch kompetenten *E.coli* mit dem pCR2.1 Vektor

Plasmidpräparation

Vorbereitung für die Sequenzierung

Erstellung der Abbildung

Abbildung 22: Detailanalyse des 224bp großen 5'-regulatorischen Bereiches des *ODC1*-Gens in frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms. (S.101)

Eigener Anteil: DNA-Isolation aus den Gewebeproben

Bisulfit-Konvertierung der DNA-Proben

PCR-basierte Amplifikation des *ODC1*-Promotorfragmentes

Ligation des Promotorfragmentes in den pCR2.1 Vektor

Transformation von TOP10 chemisch kompetenten *E.coli* mit dem pCR2.1 Vektor

Plasmidpräparation

Vorbereitung für die Sequenzierung

Erstellung der Abbildung

Abbildung 24: Relative Quantifizierung des Methylierungsgrades der LINE-1 Retrotransposons in zellulärer DNA isoliert aus Harnblasengewebeproben. (S.108)

Eigener Anteil: DNA-Isolation aus den Gewebeproben

Bisulfit-Konvertierung

„Real-Time“ PCR basierte Amplifikation der LINE-1 Elemente

Erstellung der Abbildung

Abbildung 25: Messung der Promotoraktivität für die 5'-regulatorischen Bereiche der Gene *AHCY* und *ODC1* in der Zelllinie HEK 293T mittels Luciferase Assay. (S.111)

Eigener Anteil: DNA-Isolation aus Vollblut

PCR basierte Amplifikation der *AHCY*- und *ODC1* Promotorfragmente

Klonierung des PCR-Produktes in den pGL3basic Vektor

Kultivierung der Zelllinie HEK293T

Transfektion der Zelllinie HEK293T mit den Vektor Konstrukten

Luciferase-Assay

Erstellung der Abbildung

Tabelle 3: Statistische Auswertung der „peak values“ der differentiell methylierten Regionen (DMR) innerhalb der 5'-regulatorischen Einheiten der Schlüsselgene des Methylgruppenmetabolismus und Polyaminstoffwechselweges. (S.91)

Eigener Anteil: Prozessieren der Gewebeproben aus der Pathologie Düsseldorf

Mikroarray-Analysen

Auswertung der Arraydaten

Erstellung der Abbildung

Veröffentlichungen

Publikationen

Al-Quraishy SA, Dkhil MA, Abdel-Baki AA, Ghanjati F, Erichsen L, Santourlidis S, Wunderlich F, Arauzo-Bravo MJ (2017). "Epigenetic modifications of gene promoters in the liver of Balb/c mice protected by vaccination against blood-stage malaria of *Plasmodium chabaudi*". In *Parasitol Res.*, 2017 (116), 1463-1477.

Erichsen L, Beermann A, Arauzo-Bravo MJ, Hassan M, Dkhil MA, Al-Quraishy SA, Hafiz TA, Fischer JC, Santourlidis S (2018). "Genome-wide hypomethylation of LINE-1 and Alu retroelements in cell-free DNA of blood is an epigenetic biomarker of human aging". In Press by *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Erichsen L, Ghanjati F, Beermann A, Poyet C, Hermanns T, Schulz WA, Seifert HH, Wild PJ, Buser L, Kröning A, Braunstein S, Anlauf M, Jankowiak S, Hassan M, Bendhack ML, Bravo MA, Santourlidis S (2018). "Aberrant methylated key genes of methyl group metabolism within the molecular etiology of urothelial carcinogenesis." In Press by *Scientific Reports*.

Posterpräsentationen

Erichsen L, Arauzo-Bravo MJ, Beermann A, Ghanjati F, Poyet C, Hermanns T, Santourlidis S (2017). "Aberrant methylated key genes of methyl group metabolism within the molecular etiology of urothelial carcinogenesis". *Cinical Epigenetics 7th International Meeting 2017, Düsseldorf*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Simeon Santourlidis für seine engagierte Betreuung bedanken. Seine hilfreichen Anregungen und seine Geduld sowie seine tatkräftige Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders hervorheben möchte ich, dass er stets ein offenes Ohr für jegliche Probleme hatte und durch seine unermüdliche Geduld in unseren Diskussionen, mir viele wertvolle Ratschläge und Anregungen geben konnte, durch die ich fachlich und persönlich eine Menge lernen konnte. Außerdem war die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe beispiellos und ich möchte mich bei Dr. Foued Ghanjati und Dr. Agnes Beermann für ihre moralische und fachliche Kompetenz bedanken. Sie haben mir die ganze Zeit mit gutem Rat beiseite gestanden und mir ermöglicht die Methoden der Epigenetik zu erlernen. Durch ihre Anregungen und Vorschläge haben sie maßgeblich zu der Richtigkeit und Vollständigkeit der Inhalte beigetragen. Vielen Dank dafür.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Martin für die Bereitschaft meine Dissertation zu betreuen. Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Schulz und Marija Lenzen für den regen Diskussionsaustausch sowie ihre stetige Unterstützung mit den Zelllinien und den Western Blots.

Mein besonderer Dank gilt der Kooperationspartnerin Frau Dr. Jankowiak des UKD für die Bereitstellung und Begutachtung der Proben, die diese Arbeit entscheidend vorangebracht haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Cousine Ruth Kaiser bedanken, die durch ihre selbstlose Bereitschaft meine Arbeit Korrektur zu lesen maßgeblich für die grammatikalische Richtigkeit und korrekte Rechtschreibung verantwortlich ist. Tausend Dank, liebe Cousine.

Der größte Dank geht an meine Eltern und an meine Freundin Kristin Harnisch, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und motiviert haben. Ohne euch hätte ich diese Arbeit nicht vollbringen können. Vielen Dank, dass ihr nie an mir gezweifelt habt und mich vorbehaltlos unterstützt habt. Danke, dass ihr mich auf meinem Weg begleitet. Ich könnte mir keine besseren Gefährten vorstellen.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.“ Die Dissertation wurde weder in dieser vorgelegten noch in ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 27.08.2018

Lars Erichsen