
Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Albers

**Expression und epigenetische Regulation von Retroelementen im
Harnblasenkarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von
Ulrike Kreimer

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Carsten Münk

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kreimer, U., et al., HERV-K and LINE-1 DNA methylation and reexpression in urothelial carcinoma. *Front Oncol.* 2013;3:255.

Jaguva Vasudevan, A. A., APOBEC3B activity is prevalent in urothelial carcinoma cells and only slightly affected by LINE-1 expression. *Front Microbiol.* 2018;9:2088.

Zusammenfassung

Retroelemente stellen mit über 42 % einen großen Teil unseres Genoms dar. Wichtige Vertreter sind LINE Elemente, Alu Elemente und humane endogene Retroviren (HERV). Einige dieser Elemente übernehmen Funktionen während der Ontogenese und Embryogenese und können auf DNA- und RNA-Ebene die Transkription anderer Gene beeinflussen. Der größte Teil der Retroelemente ist durch Mutationen nicht mehr zur eigenständigen Retrotransposition fähig. Zudem sind somatische Zellen durch epigenetische Inaktivierung vor der Reaktivierung von Retroelementen geschützt. In vielen Tumoren kommt es zu einer globalen DNA-Hypomethylierung, die nicht zuletzt Retroelemente betrifft. Die Auswirkungen dieser und weiterer epigenetischer Änderungen sind bisher nur unzulänglich bekannt. Eine vermehrte Expression der Retroelemente könnte beispielsweise zu DNA-Doppelstrangbrüchen und genomischer Instabilität mit Tumorprogression führen. Eine Hypomethylierung von Retroelementen sowie eine Expression von LINE-1 im Urothelkarzinom sind im Prinzip bekannt. Diese Arbeit sollte nun eine umfassendere Untersuchung der DNA-Methylierung, RNA-Expression und Proteinexpression von Retroelementen in Urothelkarzinomzelllinien und Tumorgeweben liefern. Mittels LINE-1 *Knockdown* durch siRNA und mit einem nichtnukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor sollten weiterhin die Auswirkungen einer LINE-1 Expression auf Urothelkarzinomzelllinien untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die DNA-Hypomethylierung von LINE-1 im Urothelkarzinom der Harnblase ein früh auftretendes und weit verbreitetes Merkmal ist. LINE-1 DNA war in Urothelkarzinomen gegenüber den benignen Kontrollen signifikant hypomethyliert. Die Hypomethylierung ging mit einer Verschiebung der RNA-Expression in Richtung Vollängen LINE-1 Elemente einher, nicht jedoch mit einer generellen Expressionssteigerung von LINE-1. Die Untersuchung der HERV-K Proviren ergab zwar deutliche DNA-Methylierungsunterschiede, aber bei keinem getesteten Provirus einen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen benignen Geweben und Urothelkarzinomen. Die Expression von Alu Elementen stieg an, wobei nur die Expression von AluYb8 signifikant zunahm. Durch den LINE-1 *Knockdown* kam es zu einer deutlich veränderten Zellmorphologie, vermindertem Zellwachstum und Seneszenz. Die veränderte Zellmorphologie könnte eine weitere Entdifferenzierung anzeigen. Durch Hemmung der reversen Transkriptase wurde keine Apoptose induziert.

Diese Arbeit gibt somit einen Überblick über den DNA-Methylierungsstatus und die Expression verschiedener Retroelemente im Harnblasenkarzinom und erste Einblicke in mögliche Auswirkungen der LINE-1 RNA-Expression. Ziele weiterer Arbeiten sollten Sequenzierungsanalysen individueller LINE-1 und HERV-K Elemente sein, um spezifische aktive Elemente im Harnblasenkarzinom zu identifizieren. Es sollten sich weitere Analysen zur Expression von Differenzierungsmarkern und funktionelle Untersuchungen in Zelllinien unter LINE-1 Suppression anschließen, um die Rolle von LINE-1 in der Tumorgenese und Tumorprogression im Harnblasenkarzinom zu verstehen.

Abstract

Retroelements make up more than 42 % of the human genome. The most important families are LINE elements, Alu elements and human endogenous retroviruses (HERV). Some of them are transcribed and active during ontogenesis and embryogenesis. Furthermore, they can affect transcription of protein coding genes at the DNA or RNA level. The majority of retroelements has lost the ability for retrotransposition by mutations. Somatic cells are moreover largely protected against reactivation of retroelements by epigenetic mechanisms. Global DNA hypomethylation in many cancers prominently affects retroelements, but its impact on retroelement activation is not well understood. Increased expression of retroelements could result in DNA double-strand breaks and contribute to genomic instability and tumor progression. DNA hypomethylation of retroelements and expression of LINE-1 are also known to occur in urothelial carcinoma of the urinary bladder. This thesis aims at a more comprehensive analysis of DNA methylation, RNA expression and protein expression of retroelements in this cancer type, using cell lines and tumor tissues. In addition, potential effects of LINE-1 in urothelial carcinoma were investigated by means of siRNA-mediated knockdown and treatment with a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

The results confirm that LINE-1 DNA hypomethylation is a regular finding in urothelial carcinoma cell lines and tissues. LINE-1 DNA was significantly hypomethylated in urothelial carcinoma compared to normal urothelial tissue. Hypomethylation was associated with increased expression of LINE-1 full length elements but not with generally increased LINE-1 expression. Analysis of HERV-K proviruses revealed distinct differences in DNA methylation, but no significant differences in RNA expression between benign urothelial and urothelial carcinoma tissues. Expression of Alu elements increased in urothelial carcinoma, but only expression of AluYb8 was elevated significantly. LINE-1 knockdown resulted in decreased cell growth and senescence. Cell morphology changed towards a less differentiated appearance. Reverse transcriptase inhibition did not induce apoptosis.

This thesis provides the first overview about DNA methylation status and expression of different retroelement families in urothelial carcinoma as well as initial insights into the effects of LINE-1 RNA-expression. Future research should include RNA sequencing for individual LINE-1 and HERV-K to identify active elements with the potential to retrotranspose. Further expression analyses of markers of differentiation and additional cellular assays should be performed in urothelial carcinoma cell lines to understand the effects of LINE-1 expression on tumorigenesis and tumor progression in urothelial carcinoma.

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic proteins</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BCG	<i>Bacillus-Calmette-Guérin</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>
cis	<i>Carcinoma in situ</i>
CK	Zytokeratin
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnmt1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
Dnmt3a	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
Dnmt3b	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EN	Endonuklease
Env	Envelope
ERCC	<i>excision repair cross complementing</i>
ETV1	<i>ETS variant 1</i>
FANCA	<i>Fanconi anaemia, complementation group A</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
HELLS	<i>lymphoid-specific helicase</i>
HERV	Humane endogene Retroviren
hTERT	<i>Humane telomerase reverse transkriptase</i>
INT	Integrase
KLF-4	<i>Krüppel-like factor-4</i>
LINE	<i>Long interspersed element</i>
lincRNA	<i>long intergenic non-coding RNA</i> (lange intergenetische nicht kodierende RNA)
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i> (lange nicht kodierende RNA)
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein</i>
MECP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
MIR	<i>mammalian-wide interspersed repeats</i>
miRNA	Micro-RNA
MPSS	<i>Massively parallel signature sequencing</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
PLZF	<i>Promyelocytic leukaemia zinc finger protein</i>
Pol	Polymerase
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
Prt	Protease

PTCH1	<i>Protein patched homolog 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time Polymerasekettenreaktion</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RB1	<i>retinoblastoma protein-containing complex 1</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	<i>Reverse Transkriptase</i>
Runx	<i>runt-related transcription factor</i>
SINE	<i>Short interspersed elements</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIRT6	<i>Sirtuin 6</i>
SOX	<i>Sry-related HMG box</i>
STAG2	<i>Stromal Antigen 2</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TDS	<i>target duplication sites</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TNM	<i>tumor, node, metastasis</i>
TPRT	<i>target-primed reverse transcription</i>
TREX1	<i>39 repair exonuclease 1</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1</i>
UFP1	<i>Up-frameshift 1</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
vlncRNA	<i>Very long non-coding RNA</i>
WNT	<i>Wingless Int-Gen</i>
YY1	<i>Yin-Yang1</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Urothelkarzinom der Harnblase: Epidemiologie, Ätiologie, Klassifikation und Therapie	1
1.2	Transposable Elemente	4
1.2.1	LINE: Long interspersed elements	5
1.2.1.1	Reverse Transkription der LINE-1	6
1.2.2	SINE: Small interspersed Elements	7
1.2.3	HERV: Humane endogene Retroviren	8
1.2.4	Funktionen der Retroelemente	9
1.2.5	Epigenetische Kontrolle der Retroelemente	10
1.2.6	Aktivierung von Retroelementen in humanen Tumorerkrankungen	10
1.2.6.1	HERV-K Aktivierung in humanen Tumorerkrankungen	11
1.2.6.2	Retroelemente im Urothelkarzinom der Harnblase	11
1.2.7	Auswirkung der Expression von LINE-1 und seiner reversen Transkriptase	12
2	Ziele der Arbeit	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Materialien	14
3.1.1	Ethikvotum	14
3.1.2	Zelllinien	14
3.1.3	Gewebeproben	15
3.1.4	Chemikalien, Reagenzien, Kits	19
3.1.5	Puffer, Lösungen	21
3.1.6	Oligonucleotide	23
3.1.7	siRNA	28
3.1.8	Antikörper	29
3.1.9	Geräte	29
3.1.10	Software und Datenbanken	30
3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellkultur	30
3.2.1.1	Urothelkarzinomzelllinien	30
3.2.2	RNA-Isolierung und RT-PCR	31
3.2.3	Quantitative RT-PCR	31
3.2.4	DNA-Isolierung	32
3.2.5	Bisulfitumwandlung	32
3.2.6	Pyrosequenzierung	32

3.2.7	Proteinextraktion und Western Blot Analyse	33
3.2.8	Standard Endprodukt PCR und Gelelektrophorese	33
3.2.9	Funktionelle Versuche	34
3.2.9.1	LINE-1 <i>Knockdown</i> mittels siRNA	34
3.2.9.2	SA- β -Galaktosidase Assay	35
3.2.9.3	Viabilitäts-Assay	35
3.2.9.4	Behandlung mit Efavirenz	35
3.2.9.5	Caspase-Assay	36
3.2.10	Statistische Auswertung	36
4	Ergebnisse	37
4.1	LINE-1 Promotor-Methylierung und Expression	37
4.1.1	LINE-1 Promotor-Methylierung in Zelllinien	38
4.1.2	LINE-1 Promotor-Methylierung im Gewebe	39
4.1.3	LINE-1 RNA-Expression in Zelllinien	40
4.1.4	LINE-1 RNA-Expression in benignem Gewebe und Tumorgewebe	41
4.1.5	Individuelle LINE-1 Elemente	42
4.2	Proteinexpressionsanalysen	43
4.2.1	ORF1 Proteinexpression	43
4.3	Behandlung zweier Urothelkarzinomzelllinien mit LINE-1 siRNA	44
4.3.1	LINE-1 ORF1 RNA-Expression in LINE-1 siRNA transfizierten Urothelkarzinomzelllinien	44
4.3.2	Zellmorphologie	47
4.3.3	ORF1 Proteinexpression	50
4.3.4	Zellviabilität unter der LINE-1 siRNA Behandlung	51
4.3.5	Seneszenz Assay der LINE-1 siRNA behandelten Zellen	52
4.4	Behandlung dreier Urothelkarzinomzelllinien mit Efavirenz	55
4.5	Humane endogene Retroviren: DNA-Methylierung und RNA-Expression	57
4.5.1	HERV-K DNA-Methylierung	57
4.5.2	HERV-K RNA-Expression	60
4.5.3	HERV-K RNA-Expression in den Zelllinien und Geweben	60
4.6	Alu RNA-Expression in den Zelllinien und im Gewebe	64
5	Diskussion	66
5.1	Globale Hypomethylierung und Änderungen der LINE-1 Promotor DNA-Methylierung im Urothelkarzinom der Harnblase	66
5.2	Änderungen der LINE-1 RNA- und Protein Expression im Urothelkarzinom der Harnblase	68
5.3	Auswirkungen eines LINE-1 <i>Knockdowns</i> auf Urothelkarzinomzelllinien	71
5.4	HERV-K Elemente im Urothelkarzinom der Harnblase	77

5.5	Alu Elemente im Urothelkarzinom der Harnblase	79
5.6	Fazit und Ausblick	80
6	Literaturverzeichnis	82

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase: Epidemiologie, Ätiologie, Klassifikation und Therapie

Das Urothelkarzinom stellt mit 90% die häufigste Tumorentität der Harnblase dar. Wesentlich seltenere Malignome der Harnblase sind Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome. Maligne Neoplasien der Harnblase machen 3-4% aller Malignome in Deutschland aus. Männer sind mit über 70% der Urothelkarzinome deutlich häufiger betroffen als Frauen (Zentrum für Krebsregisterdaten 2014). Als häufigster Risikofaktor für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms gilt die Exposition gegenüber chemischen Noxen, die über die Nieren ausgeschieden werden und das Urothel schädigen. Für bis zu 50% der Urothelkarzinome sind aromatische Amine aus dem Zigarettenrauch mitverantwortlich. Die Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, chlorierten Kohlenwasserstoffen und aromatischen Aminen in der Farb-, Metall- und Erdölindustrie ist der zweitwichtigste Risikofaktor. Genetische Risikofaktoren sind unter anderem hypomorphe Allele der N-Acetyltransferase 2 und Glutathion-S-Transferase $\mu 1$, die zu Störungen im Abbau toxischer Substanzen unter anderem der aromatischen Amine führen [1]. Eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* stellt vor allem für squamöse Plattenepithelkarzinome einen Risikofaktor dar und ist in Asien, Afrika und Südamerika verbreitet [2]. Eine virale Genese des Urothelkarzinoms durch humane Papillomviren wurde oft diskutiert, konnte aber bisher nicht bewiesen werden [3].

Das Urothel ist ein spezialisiertes Epithel, das den gesamten Harntrakt auskleidet und ihn vor dem Übertreten von Bestandteilen des Urins, einschließlich Noxen und Mikroorganismen, in das Stroma schützt. Es baut sich aus drei Schichten auf. Die unterste Schicht, die Basalzellen, grenzt an das Stroma. Es folgen nach luminal die Intermediärzellen und die Deckzellen. Die homöostatische Erneuerung und Regeneration findet aus Vorläuferzellen und Stammzellen in der Basalschicht statt, wobei eine weitere Stammzellpopulation in der Intermediärschicht vermutet wird. Die Differenzierung der Schichten spiegelt sich in einer Expression unterschiedlicher Zytokeratine wider. Während die Vorläufer das Cytokeratin CK5 exprimieren, sind die differenzierten Deckzellen durch CK8/18 und CK20 gekennzeichnet [4, 5].

Das Urothelkarzinom der Harnblase kann aus zwei unterschiedlichen Vorstufen hervorgehen: einer Hyperplasie oder einer Dysplasie des Urothels. Eine Hyperplasie des Urothels führt in der Regel zur Entstehung von papillären Tumoren. Diese können

histologisch in *low grade* und *high grade* Tumore unterteilt werden. 75% aller Urothelkarzinome sind gut differenzierte *low grade* Tumore ohne invasives Wachstum (pTa) mit einer geringen Tendenz zur Tumorprogression. *High grade* pTa Tumore gehen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit in ein invasives Stadium über und sind deshalb mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert. Der häufigere Weg zur Entstehung eines invasiven Urothelkarzinoms führt jedoch über eine *high grade* Dysplasie des Urothels, das Carcinoma *in situ*. Neuere Studien versuchen die Urothelkarzinome nach ihren molekulargenetischen Eigenschaften in weitere Untergruppen zu gliedern, um die Prognose und Therapiemöglichkeiten zu spezifizieren [6-8].

Papilläre *low grade* und invasive Urothelkarzinome unterscheiden sich in vielen molekulargenetischen Eigenschaften. Papilläre Urothelkarzinome sind genomisch stabiler und weisen weniger Mutationen auf. Etwa 80% der papillären pTa Tumore haben aktivierende Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase *FGFR3*, häufig durch den Verlust der Transmembrandomäne. Die gesteigerte *FGFR3* Aktivität führt über die Aktivierung des *RAS-MAPK* Signalweges und der Phospholipase C γ zu einer klonalen Zellvermehrung [2]. *FGFR3* Mutationen gehen meist mit einem gut differenzierten Tumor und einer besseren Prognose einher. Dagegen ist die Überaktivierung des *PI3K/Akt*-Signalweges meist mit einer höheren Aggressivität und einer schnelleren Tumorprogression der papillären Urothelkarzinome assoziiert und findet sich auch häufiger in invasiven Tumoren [9, 10]. Zu den Mechanismen, die den *PI3K/AKT*-Signalweg aktivieren, gehören neben Mutationen im *PIK3CA* Gen auch die Überexpression von *EGFR*, *ERBB2* und *ERBB3*. Der Signalweg mündet unter anderem in die Aktivierung der Proteinkinase *AKT*, unterstützt die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. Auch eine verminderte Aktivität des *PI3K* Gegenspielers *PTEN* beeinflusst den Signalweg und führt zu einer schlechteren Prognose [2]. Weiterhin sind die *MAPK*-, *WNT*- und *NOTCH*-Signalwege im Urothelkarzinom häufig verändert [2]. Mutationen in Genen für DNA-Reparaturfaktoren und Regulatoren der DNA-Reparatur werden häufiger in invasiven Urothelkarzinomen gefunden. Zu diesen gehören unter anderem *ATM*, *ERCC2*, *FANCA* und *STAG2*. Durch eine fehlerhafte DNA-Reparatur entstehen nach DNA-Doppelstrangbrüchen gehäuft Translokationen und Deletionen über *non-homologous end-joining*. Dies führt zu einer höheren Rate an Chromosomenaberrationen in invasiven Urothelkarzinomen [2]. Die partielle Deletion des Chromosoms 9q ist eine der häufigsten genetischen Veränderungen; auch in papillären *low grade* Tumoren. Auf diesem Chromosom befindet sich unter anderem *CDKN2A*, das für die Tumorsuppressoren *p16* und *p14* kodiert, sowie *CDKN2B*, *PTCH1* und *TSC1* [2, 11, 12]. Die vollständige Inaktivierung von *CDKN2A* ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [13]. Fast alle

invasiven Urothelkarzinome weisen Defekte in Proteinen der Zellzyklusregulation auf. Hierzu zählen neben *CDKN2A* vor allem die Tumorsuppressoren *p53* und *RB1* [2, 10, 13, 14]. Im Urothelkarzinom kommen häufiger als in anderen epithelialen Tumoren Mutationen in Chromatin-Regulatoren vor, die vermutlich zur Repression von Genen für die Differenzierung des Urothels führen [2]. Weiterhin sind Mutationen im Promotor der *telomerase reverse transkriptase* (TERT) im Urothelkarzinom sehr häufig [15]. Eine Unterteilung der papillären Urothelkarzinome in zwei genomische Subtypen anhand unterschiedlicher Marker, unter anderem der partiellen Deletion des Chromosom 9q, einem erhöhten Ki67, einer verstärkten Glykolyse und DNA-Reparatur scheint sinnvoll zu sein [16]. In lokal fortgeschrittenen und metastasierten Urothelkarzinomen findet man vermehrt eine Androgenrezeptorexpression [10].

Die Therapie des Urothelkarzinoms der Harnblase richtet sich nach der UICC (*Union internationale contre le cancer*), deren Stadieneinteilung sich auf die TNM Klassifikation bezieht. Dabei steht T für ein Vordringen der Urothelkarzinomzellen in andere Gewebeschichten oder für die Infiltration benachbarter Strukturen. Das Stadium T1 bedeutet eine Infiltration der Submukosa, T2 der Muskularis, T3 des perivesikalen Fettgewebes und T4 eine Infiltration der Nachbarorgane. Das Ausmaß der lymphonodalen Metastasierung gibt der Lymphknotenstatus N an. Beim Stadium N0 sind keine Lymphknoten infiltriert, bei N1 liegt eine solitäre Lymphknotenmetastase kleiner als 2 cm vor, bei N2 überschreiten die Lymphknotenmetastasen die Größe von 5 cm nicht, wohingegen bei N3 Lymphknotenmetastasen größer als 5 cm vorliegen. Der Status der Fernmetastasierung wird mit M angegeben; bei M0 liegen keine Fernmetastasen vor, M1 bezeichnet eine vorhandene Fernmetastasierung.

Die Wahl der Therapieoptionen des Urothelkarzinoms richtet sich nach dem Tumorstadium sowie den biologischen Eigenschaften des Karzinoms. Neben den lang etablierten Therapien, der Chirurgie, der Strahlentherapie und der konventionellen Chemotherapie werden vor allem für die Behandlung des metastasierten Urothelkarzinoms auch neue zielgerichtete Therapien erprobt. Diese orientieren sich an den oben genannten genetischen und molekularbiologischen Eigenschaften der Tumore. Operative Optionen sind lokale Resektion oder radikale Operation. Urothelkarzinome der Stadien Carcinoma *in situ*, pTa, und pT1 (bis zum Grading 2) können durch eine transurethrale Resektion abgetragen werden. Hierbei neigen vor allem papilläre Tumore nach Resektion zu Rezidiven. Dies wird wahrscheinlich durch den sogenannten Feldeffekt verursacht, bei dem das umliegende Urothel bereits molekulargenetische Veränderungen aufweist, die eine erneute und multifokale Entartung erlauben [2, 17, 18]. Die Rezidivrate

kann postoperativ durch eine intravesikale Immuntherapie oder eine intravesikale Chemotherapie gesenkt werden. Bei der Immuntherapie ruft BCG (*Bacillus-Calmette-Guérin*) eine bakterielle Zystitis hervor, mit dem Nebeneffekt der Immunisierung gegen die Tumorzellen und einer Zerstörung der Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen [19]. Höhergradig invasive Urothelkarzinome können nach Ausschluss einer Fernmetastasierung mittels radikaler Zystektomie kurativ behandelt werden. Eine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie senkt hierbei die Rezidivrate. Gebräuchliche Therapieschemata sind die MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) oder Cisplatin/Gemcitabin Kombinationstherapien. Fortgeschrittene und metastasierte Urothelkarzinome werden mit einer konventionellen palliativen Chemotherapie, experimentell mit zielgerichteten Therapien behandelt [20]. Seit neuestem sind Immuncheckpoint-Inhibitoren für die Therapie des metastasierten oder lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Harnblase zugelassen [21].

1.2 Transposable Elemente

Retroelemente werden in die Gruppe der transposablen DNA-Elemente eingeordnet. Transposable Elemente gehören zu den repetitiven Sequenzen und bilden etwa 45% unseres Genoms [22]. Es handelt sich um DNA-Sequenzen, die sich im Genom ausbreiten können, wobei die meisten Elemente diese Fähigkeit durch Mutationen verloren haben. Sie unterteilen sich in zwei Klassen. Die Klasse II wird von DNA-Transposons gebildet und stellt ~3% des Genoms dar. DNA-Transposone bewegen sich über einen *cut and copy* Mechanismus, bei dem die DNA ausgeschnitten und an anderer Stelle eingebaut wird. Die DNA-Transposone im humanen Genom sind nicht mehr aktiv.

Die größere Klasse I der transposablen Elemente bilden mit ~42% des Genoms die Retroelemente [22].

Retroelemente nutzen den Mechanismus der reversen Transkription, um sich zu vermehren und weitere Kopien in das Genom zu integrieren. Transkribierte RNA wird mit einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und über Integrasen in das Genom integriert. Dieser Mechanismus wird als *copy and paste* bezeichnet.

Retroelemente werden wiederum nach dem Vorhandensein eines LTR (*long terminal repeats*) in zwei Gruppen unterteilt. *Long interspersed elements* (LINEs), *Short interspersed elements* (SINEs) und Pseudogene besitzen keine LTRs. Humane endogene Retroviren (HERVs) enthalten LTRs. In den folgenden Abschnitten werden die Retroelement-Klassen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, näher beschrieben.

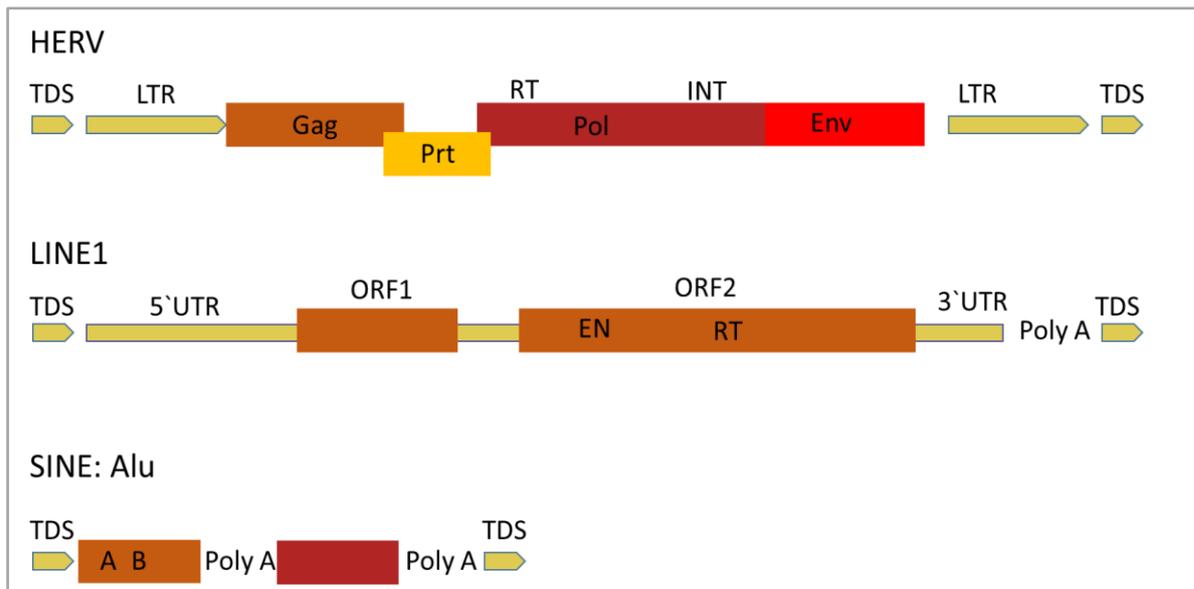


Abbildung 1: Schematischer Aufbau ausgewählter Retroelemente. Dargestellt ist zuoberst die provirale Struktur eines humanen endogenen Retrovirus. Die Leserahmen mit den kodierenden Sequenzen für Gag, Prt, Pol und Env werden von den LTRs umschlossen. Einige HERVs kodieren durch alternatives Spleißen für ein kleines zusätzliches Protein; dies ist hier nicht dargestellt. Mittig ein Volllängen-LINE-1 Element. Auf die 5'UTR folgen die beiden offenen Leseraster (ORF), getrennt von einer nicht kodierenden Sequenz und die 3'UTR. Zuunterst ein Alu Element aus der Gruppe der SINE. Alle dargestellten Elemente werden von TDS umgeben. TDS, target duplication sites; LTR, long terminal repeat; Gag, Gruppenspezifisches Antigen, codiert die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine; Prt, Protease; Pol, Polyprotein, codiert die Protease, Reverse Transkriptase mit RNase und Integrase; Env, Envelope, codiert die Hüllproteine; RT, reverse Transkriptase; INT, Integrase; UTR, untranslated region; ORF, open reading frame; EN, Endonuklease; A und B, A und B Boxen des Polymerase III Promotor.

1.2.1 LINE: Long interspersed elements

LINE Elemente können in LINE-1, LINE-2 und LINE-3 unterteilt werden, wobei LINE-1 den weitaus größten und einzig noch aktiven Teil dieser Gruppe im menschlichen Genom ausmachen. Sie stellen mit etwa 500.000 Kopien 18% des menschlichen Genoms dar, wobei die meisten mutiert und verkürzt sind, so dass lediglich 3000-5000 Volllängen LINE-1 existieren [22]. Von diesen sind vermutlich weniger als 100 zur eigenständigen Retrotransposition fähig [23]. Volllängen LINE-1 sind 6,0 kb groß und setzen sich aus einer 5'-untranslatierten Region (UTR) [24, 25], zwei offenen Leserahmen ORF1 und ORF2, die sich nicht überlappen, einer 3'-untranslatierten Region mit einer AATAAA Terminator-Sequenz und einem kurzen Poly-A Schwanz zusammen [26]. Flankiert

werden die LINE-1 oft von TSD, *target site duplications*, die während der Insertion entstehen (s. Abbildung 1). Die 5'-UTR ist etwa 900 Nukleotide lang und enthält einen internen Promotor für die RNA-Polymerase II. Der ORF1 kodiert für ein 40 kDa RNA-bindendes Protein [27]. Der ORF2 kodiert ein 150 kDa Protein mit einer Endonuklease [28], einer reversen Transkriptase [29] und einer Cystein-reichen Domäne [30]. Die 3'-UTR ist etwa 200 bp lang. Der Poly-A Schwanz spielt eine wichtige Rolle für das *Priming* der reversen Transkriptase [31].

Die Geschichte der Retroelemente ohne LTR geht über 500 Millionen Jahre zurück. Die Expansion der LINE-1 hat jedoch vorwiegend in den letzten 150 Millionen Jahren stattgefunden und wird von wenigen Mastergenen getrieben, die Unterfamilien gebildet haben [32].

1.2.1.1 Reverse Transkription der LINE-1

Die reverse Transkription der Retroelemente ohne LTR setzt sich aus Transkription, RNA-Prozessierung, nukleärem Export, Translation, posttranslationalen Modifikationen, RNA-Formatierung, Re-Import in den Nukleus, reverser Transkription und Integration zusammen.

Transkription, RNA-Prozessierung und nukleärer Export: Die 5'-UTR enthält den internen Promotor. Obwohl er A- und B-Box-Sequenzen aufweist, die typisch für eine Polymerase III Transkription sind, erfolgt die Transkription durch die RNA-Polymerase II. Die AATAAA Polyadenylierungs-Sequenz am Ende der LINE-1 DNA ist eine typische Stopp-Sequenz für RNA-Polymerase II [33-35]. Des Weiteren konnte in Untersuchungen mit gekoppelten LINE-1 und Polymerase II Promotoren [36, 37] eine LINE-1 Expression beobachtet werden und eine Bindung der Pol II an die 5'-UTR [38]. Über die Regulation der LINE-1 Transkription ist wenig bekannt. Die Transkriptionsfaktoren YY1 (Yin-Yang1), RUNX (*runt-related transcription factor*) und SOX interagieren mit der Promotorregion und sind an der Regulation der LINE-1 Transkription beteiligt [39-42]. YY1 kann als Aktivator, Repressor oder Initiator wirken [43].

Die Transkription endet nicht immer an dem LINE-1 Schneide- und Polyadenylierungs-Signal für die Pol II, sondern oft an einem weiter 3' in der flankierenden DNA gelegenen stärkeren Signal [36]. Dies kann zu einer Transduktion abwärts gelegener DNA Abschnitte während der LINE-1 Transkription führen.

Weiterhin ist ein Antisense-Promotor in der LINE-1 5'-UTR bekannt [44]. Dieser führt zur Transkription der 5'-UTR und vorgeschalteter genomischer DNA, die gegebenenfalls Gene enthält [45].

Die LINE-1 RNA trägt eine *Cap*, bei der ein Methylgruppen-tragendes Guanodin am 5'-Ende angelagert wird [46, 47]. Über spezielle Mechanismen beim nukleären Export der LINE-1 RNA ist wenig bekannt.

Translation: ORF1 und ORF2 sind durch eine 63 bp lange Sequenz geteilt [48, 49]. Während die Translation des ORF1 über die Bindung der 40S ribosomalen Einheit an die *Cap* erfolgt [48], findet die Translation des ORF2 wahrscheinlich über einen Terminations/Reinitiations-Mechanismus statt. Das ORF1p wird daher stärker als das ORF2p exprimiert [50].

Reverse Transkription: Die reverse Transkription und die Integration ins Genom erfolgt wahrscheinlich nach dem TPRT Mechanismus (*target-primed reverse transcription*). Die Endonuklease des ORF2p schneidet die DNA vor allem an der 5'TTTT/AA3' Zielregion und die Reverse Transkriptase nutzt die freie 3'-Hydroxyl Gruppe und die Poly-A Sequenz für das Priming und den Beginn der DNA Synthese. Der Kontakt des 5'-Endes der LINE-1 RNA mit der Reversen Transkriptase führt zu deren Springen auf die geschnittene DNA an der Integrationsstelle [47]. Die Reverse Transkriptase kann auch auf andere mRNAs springen und somit Chimäre bilden [51, 52]. Kommt es frühzeitig zum Schneiden des zweiten DNA Stranges, kann die zweite 3' Hydroxyl Gruppe eine weitere reverse Transkription initiieren und ein *twin priming* verursachen [53]. Dieser Mechanismus kann zu Inversion und häufigen 5'-Deletionen der neuen LINE-1 Elemente führen.

1.2.2 SINE: Small interspersed Elements

SINEs sind 80-500 bp lang und stellen 12% des humanen Genoms dar [22, 54]. Sie umfassen die Familien der MIR (*mammalian-wide interspersed repeats*) und der Alu Elemente. Alu Elemente machen 10% des Genoms aus und liegen in über einer Million Kopien vor [55]. Ihr Ursprung liegt etwa 65 Millionen Jahre zurück. Sie stammen von der 7SL RNA [56]. Besonders evolutionär ältere Alu Elemente liegen häufiger in genomischen Orten mit hoher Transkriptionsrate [22, 57].

Ein Volllänge Alu setzt sich aus zwei Derivaten der 7SL RNA zusammen, denen jeweils eine Poly-A Sequenz folgt. Im 5'-Teil des Alu Elementes liegt der interne Polymerase III Promotor. Flankiert werden die Elemente von TSD (s. Abbildung 1).

Alus besitzen einen internen Promotor mit A und B Boxen. Ihre Transkription erfolgt über die Pol III. Die reverse Transkription und Integration erfolgt wahrscheinlich über den TPRT Mechanismus [36, 58]. Die dafür notwendigen Enzyme, vor allem das ORF2 Protein, werden von LINE-1 gestellt [29, 59, 60].

1.2.3 HERV: Humane endogene Retroviren

Humane endogene Retroviren sind Retroelemente mit LTRs. Sie machen im humanen Genom 8% der DNA aus [22]. HERVs stammen von exogenen Retroviren ab, die über eine Keimzellinfektion in unserem Genom integriert wurden und sich amplifiziert haben. HERVs werden in Familien unterteilt, von denen HERV-K mit etwa 90 Vollängenelementen und über 900 einzelnen LTRs die jüngste Gruppe darstellt [61-63]. Die letzte Infektion mit HERV-K113 hat wahrscheinlich binnen der letzten 100.000 Jahre stattgefunden [64]. Dessen Allel-Frequenz beträgt je nach Bevölkerungsgruppe 13-30% [62]. HERV-K Elemente werden in elf Untergruppen geteilt (HML-1-11). Jede resultiert aus einer Keimzellinfektion [63]. Besonders interessant ist die Untergruppe HML-2, da viele ihrer Proviren fast vollständig intakt sind und sie die Vollängenelemente stellen [65].

Im humanen Genom sind jedoch keine zur Reinfektion kompetenten HERVs bekannt, allerdings können einige HERV-Ks unreife Viruspartikel bilden [66, 67]. Vor allem Deletionen und Mutationen im *Env*-Gen haben zu einem Verlust einer intakten Virushülle und somit der Infektiosität geführt. Sie besitzen jedoch weiterhin das Potential sich in ihrer Wirtszelle zu integrieren [68].

Intakte HERVs werden von zwei ehemals identischen LTRs flankiert, die ca. 1000 bp lang sind und über die Zeit Mutationen akkumuliert haben [69]. Anhand der Mutationsrate kann auf das Alter der Elemente rückgeschlossen werden. Homologe Rekombinationen zwischen 3'- und 5'-LTRs der HERVs haben zur Bildung und Ausbreitung einzelner LTRs geführt [61]. Die LTRs können als Promotor, *Enhancer* und Polyadenylierungssignal fungieren [65]. Sie umschließen die ORFs für *gag*, *prt*, *pol*, *env*. Diese kodieren für funktionelle Proteine inklusive Strukturproteine. Die jüngste Gruppe der endogenen Retroviren beim Menschen, HERV-K, kodieren weiterhin für ein akzessorisches Protein, entweder für Rec oder für Np9.

Die reverse Transkription der humanen endogenen Retroviren findet im Gegensatz zu Retroelementen ohne LTRs in vielen Schritten in einem virusähnlichen Partikel im Zytoplasma statt [68].

1.2.4 Funktionen der Retroelemente

Retroelemente übernehmen auf der einen Seite vielfältige Funktionen in unserem Genom, auf der anderen Seite können sie DNA schädigen und damit zu Erkrankungen führen.

Durch die Fähigkeit der Retrotransposon haben Retroelemente einen konstruktiven Einfluss auf die Evolution unseres Genoms. Retroelemente ohne LTRs haben zur Genomexpansion durch zahlreiche Kopien beigetragen [68] und dabei durch Transduktion 3'-gelegene kodierende Sequenzen und regulatorische Elemente an neue Genloci transportiert [35]. Auf etwa jede 100-270te Geburt kommt eine neue LINE-1 Keimzellinsertion [70]. Des Weiteren können bei der Retrotransposition durch Wechsel von LINE-1 RNA auf andere mRNA chimäre Retrogene entstehen, sodass ein Gen unter die Regulation des LINE-1 Promotors gerät [71]. Während die Retrotransposition in den meisten somatischen Geweben unterdrückt wird, findet sie regelmäßig während der Entwicklung der Neuronen und des Gehirns statt [72]. Retroelemente greifen außerdem auf vielfältige Weise in die Regulation der Genexpression ein. Einige der Retroelement-Sequenzen sind an der Bildung protein-kodierender Exone beteiligt [73]. Retroelement-Sequenzen in Introns können die RNA destabilisieren und eine Expression vermindern [72, 74]. Der interne Antisense-Promotor kann die Expression 5'-gelegener Gene regulieren [44]. Weiterhin tragen LINE-1 Elemente wahrscheinlich zur Inaktivierung des X-Chromosoms bei [75, 76]. Sowohl LINE-1 als auch HERVs bilden Barrieren zwischen Genen und schirmen die Transkriptionen benachbarter Gene voneinander ab [77]. Alu Elemente können als Zentrum für eine *de novo* Methylierung fungieren [78]. Des Weiteren steigt die Expression von Alu RNA unter zellulärem Stress an [79, 80] und verändert u. a. über Regulation der Translation zelluläre Prozesse [81].

HERVs haben ebenfalls physiologische Aufgaben in unseren genetischen und zellulären Prozessen übernommen. Auf DNA-Ebene werden die LTRs als regulatorische Elemente für die Expression diverser Gene verwendet [82-84], wobei die Expression jedoch stark vom Methylierungszustand des jeweiligen LTRs abhängig ist. Auf diese Weise können Gene selektiv während bestimmter Phasen, z.B. in der frühen embryonalen Phase, in Keimzellen und in der Plazenta effektiv transkribiert werden [85]. Auf Proteinebene ist Syncytin, ein Derivat des *Env* Proteins, an der Bildung von Synzytiotrophoblasten in der Plazenta beteiligt [86].

Insertionen und Deletionen durch Retrotransposition von LINE-1 und Alu Elemente in Keimzellen oder frühen embryonalen Stadien können verschiedene Erkrankungen verursachen [31]. Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei erworbenen Erkrankungen, zu

denen neben der Entstehung und Progression von malignen Tumoren Erkrankungen wie die Arteriosklerose und der Lupus erythematoses gehören. Besonders bei Autoimmunerkrankungen findet sich häufig eine Reaktivierung von HERV-K. So ist die Expression von HERV-H/F and HERV-W bei der multiplen Sklerose gesteigert [87].

1.2.5 Epigenetische Kontrolle der Retroelemente

Retroelemente werden in normalen somatischen Geweben inaktiviert, da eine Aktivierung zu genomischen Veränderungen und Erkrankungen führen kann. Diese Inaktivierung erfolgt hauptsächlich über epigenetische Mechanismen, darunter DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und durch RNAi (RNA interference) vermittelte Effekte.

Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe an ein Cytosin in einem Cytosin-Guanin-Dinukleotid (CpG) gekoppelt. In normalen Geweben liegt der Großteil der Retroelement-DNA in einer stark methylierten Form vor [88]. Die starke Methylierung wird überwiegend während der Gastrulation des Embryos etabliert [89]. Mit der inaktivierenden DNA-Methylierung gehen oft repressive Histonmodifikationen einher [62].

In der Keimzellentwicklung und Gametogenese ist die Inhibition durch RNAi ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Retroelemente [90]. Es kommt durch Bindung von piRNA (PIWI-*interacting* RNA) an die Retroelemente-kodierende DNA zu einer epigenetischen Repression [91].

Eine Regulation der Retroelemente erfolgt zudem über die Proteine MECP2 (*methyl CpG binding protein 2*), HELLS (*lymphoid-specific helicase*), RB1 (*retinoblastoma protein-containing complex*), TREX1 (*39 repair exonuclease 1*), ERCC (*excision repair cross complementing 1*) und APOBEC3A, APOBEC3B, und APOBEC1 (*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic proteins*) [92].

1.2.6 Aktivierung von Retroelementen in humanen Tumorerkrankungen

Während der Tumorgenese findet in vielen Tumorentitäten eine genomweite Hypomethylierung statt [88, 93], deren Ausdehnung sowohl zwischen, als auch innerhalb den Entitäten stark variiert [94]. Auch der Zeitpunkt der Methylierung unterscheidet sich zwischen den Tumorentitäten. In Keimzell-, Harnblasen-, Kolon- und Magentumoren ist die Hypomethylierung ein frühes Ereignis, während sie sich im Prostatakarzinom später in der Tumorprogression einstellt. Die Hypomethylierung betrifft vor allem die repetitiven Elemente [95]. Die Methylierung von LINE-1 sinkt meist mit der globalen

Hypomethylierung [96]. Die Hypomethylierung könnte zu einer Reaktivierung der Retroelemente führen und damit zu einer verstärkten genomischen Instabilität [93, 97], die mitverantwortlich für Tumorprogression und Metastasierung sein könnte [94, 95]. Kausale Mechanismen könnten dabei die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Endonuklease und die Retrotransposition selbst sein [98]. Diese könnte über Translokationen und Insertionen zu Tumorsuppressor-Inaktivierung oder Onkogen-Aktivierung führen.

Mehr als 25% der CpG Dinukleotide des menschlichen Genoms liegen in der DNA der Alu Elemente [99]. Daher sind diese, wie LINE-1, ebenfalls von der globalen Hypomethylierung in Tumoren betroffen. Jedoch können Alu Elemente auch Orte der fokalen Hypermethylierung sein, vor allem, wenn sie in der Nähe von hypermethylierten Genen liegen. So kommen sie auch als Zentren einer *de novo* Methylierung 3' gelegener Regionen in Frage, von denen eine Inaktivierung von benachbarten Tumorsuppressorgenen ausgehen kann [100, 101].

1.2.6.1 HERV-K Aktivierung in humanen Tumorerkrankungen

Eine HERV-K Aktivierung ist vor allem für Keimzelltumore beschrieben [102]. Aber auch in soliden Tumoren der Mamma [103, 104], der Ovarien [105, 106], der Prostata [107] sowie in Sarkomen [108] und Melanomen [109-111] wurde eine Aktivierung von HML-2 berichtet. HERV-K Produkte ließen sich sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene nachweisen.

Im Prostatakarzinom wurden neben einer Steigerung der Expression von HML-2 mRNA und Proteinen androgen-abhängige Fusionsgene zwischen den LTRs des HERV-K 17 bzw. des HERV-K 22q11.23 und dem ETV1 Onkogen beschrieben [112, 113]. Die Expression von HERV-K 17 und besonders HERV-K 22q11.23 ist in androgen-abhängigen Prostatakarzinomzelllinien signifikant gesteigert [107]. Eine Arbeit von Ono et al. 1987 zeigt, dass in der Mammakarzinomzelllinie T47D eine Expression von HML-2 durch Behandlung mit Progesteron stimuliert werden [114]. Auch die DNA-Methylierung einzelner HERV-K Elemente verändert sich zum Teil in malignen Tumoren. So wurde im Prostatakarzinom eine Hypomethylierung des H22q Elementes und eine Steigerung seiner Expression gefunden [107].

1.2.6.2 Retroelemente im Urothelkarzinom der Harnblase

Über die Methylierung und die Expression verschiedener Arten von Retroelementen im Urothelkarzinom liegt nur eine begrenzte Anzahl an Daten vor. Eine starke

Demethylierung von LINE-1 in Urothelkarzinomen ist vorbeschrieben [115-117]. Sie korreliert nicht mit dem Tumorstadium. Dies deutet auf eine frühe Hypomethylierung in der Genese des Harnblasenkarzinoms hin. Eine Methylierungsanalyse mittels *Southern Blot* zeigte, dass die signifikante Hypomethylierung von LINE-1 mit einer Hypomethylierung von HERV-K im Harnblasenkarzinom korreliert [115]. Auch Untersuchungen einzelner LINE-1 Loci deuten auf eine besonders starke Hypomethylierung im Urothelkarzinom der Harnblase gegenüber anderen soliden Tumoren hin [118]. Eine Steigerung der LINE-1 mRNA-Expression ist ebenfalls beschrieben [115]. Eine Aktivierung des MET-Onkogens durch einen Antisense-Promotor wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gefunden [116, 119]. Mittels MPSS (*Massively parallel signature sequencing*) Analyse wurde die Expression der RNA von 17 HERV-K Elementen im normalem Urothel der Harnblase detektiert [120].

1.2.7 Auswirkung der Expression von LINE-1 und seiner reversen Transkriptase

Es ist beschrieben, dass die Inhibition der Transkripte von Retroelementen oder der reversen Transkriptase in Karzinomzelllinien und Tumorgewebeproben zu einer Differenzierung der Zellen, einer Verlangsamung des Zellwachstums und einer veränderten Genexpression führt [121, 122]. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, die in der Behandlung des Retrovirus HIV-1 angewendet werden, können auch die endogene reverse Transkriptase von Retroelementen hemmen und die erwähnten Veränderungen in Karzinomzelllinien unterschiedlicher Entitäten auslösen [122, 123]. Efavirenz und Nevirapine sind Arzneimittel aus dieser Gruppe. Sie hemmen nichtkompetitiv die reverse Transkriptase. Ähnliche Ergebnisse wie mit diesen Medikamenten konnten durch die Behandlung mit einer RNAi gegen LINE-1 RNA in unterschiedlichen Karzinomzelllinien erzielt werden [121, 124]. Ob eine medikamentöse Inhibition der reversen Transkriptase oder eine Inhibition von LINE-1 durch eine interferierende RNA ähnliche Wirkungen im Urothelkarzinom der Harnblase hat, ist bisher unbekannt.

2 Ziele der Arbeit

In vielen Tumoren ist eine genomweite DNA-Hypomethylierung beschrieben, die mit einer Änderung der DNA-Methylierung und der Expression von Retroelementen einhergeht und zu deren Reaktivierung führen kann. Aktive Retroelemente können über verschiedene Mechanismen in die Zellphysiologie eingreifen und zu einer genomischen Instabilität beitragen. Diese könnte zur Tumorgenese und -progression beitragen.

Im Urothelkarzinom der Harnblase ist eine Hypomethylierung von LINE-1 und HERV-K gut dokumentiert. Es liegen jedoch nur wenige Daten über die Expression von Retroelementen vor. Diese Arbeit soll eine umfassendere Analyse bezüglich der DNA-Methylierung und der Expression von Retroelementen im Urothelkarzinom der Harnblase liefern.

Die vorhandenen Daten zur LINE-1 DNA-Methylierung sollen mit dem modernen Verfahren der Pyrosequenzierung reevaluiert werden. Es wird weiterhin untersucht, ob – wie beim Prostatakarzinom - Methylierungsänderungen von einzelnen HERV-Ks LTRs im Urothelkarzinom auftreten.

Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob es im Urothelkarzinom zu Veränderungen der LINE-1 RNA-Expression kommt und ob diese auf individuelle LINE-1 Elemente zurückgeführt werden kann. Außerdem wurde die RNA-Expression von 18 HERV-K Proviren und zwei Alu Elementfamilien untersucht. Bei Unterschieden in der LINE-1 RNA-Expression im Urothelkarzinom gegenüber dem normalen Urothelgewebe, sollte zudem nach möglichen Expressionssteigerungen der von LINE-1 kodierten Proteine gesucht werden.

Über einen *Knockdown* von LINE-1 durch eine Behandlung mit spezifischer siRNA gegen LINE-1 RNA sollte geprüft werden, ob die zuvor erhobenen Expressionsmuster von RNA und Proteinen verändert werden können. Im positiven Falle können Rückschlüsse auf die Funktionen von LINE-1 in Tumoren an den auftretenden zellulären Veränderungen gezogen werden. Schließlich sollte eine Behandlung mit Efavirenz zur Repression der Aktivität der reversen Transkriptase erfolgen um eine weitere funktionelle Analyse zur Wirkung reaktivierter LINE-1 Retroelemente durchzuführen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Ethikvotum

Referenznummer, Datum: 2694, 21.10.2005 und 3038, 16.04.2008

3.1.2 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden 19 humane Urothelkarzinom-Zelllinien verwendet: BC61, BFTC-905, J82, RT4, RT-112, SW1710, UMUC6, 253J, 5637, 639v, 647v, HT-1376, Ku-19-19, SD, T24, UMUC3, VMCUB1, MGH-U4, SCaBER und die Telomerase-immortalisierte Urothelzelllinie TERT-NHUC. Sie kommen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig), mit Ausnahme der Zelllinien BC61, die in unserem Labor etabliert wurde [125], UMUC3, die von Dr. Grossman, Houston zur Verfügung gestellt wurde, sowie TERT-NHUC, die von Prof. M. A. Knowles (Leeds, UK) zur Verfügung gestellt wurde.

Als Kontrollen wurden RNA und Proteine aus Zelllysaten der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT, sowie urotheliale Primärkulturen aus Ureteren nach Nephrektomien und karzinomassoziierte Fibroblasten verwendet. Eine Übersicht der Eigenschaften der Zelllinien zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Die Tabelle zeigt für die verwendeten Zelllinien das Alter (wenn bekannt) und Geschlecht der Patienten, das Tumorstadium, den Lymphknotenbefall, den Fernmetastasierungszustand und die histologische Herkunft.

Zelllinie	Charakterisierung	TMN	Herkunft
Urothelkarzinom			
BC61	m	(papillär) pTaG2	epithelial
BFTC-905	m, 51 J	(papillär) pTaG3	epithelial
J82	m	(papillär) G3	epithelial/ mesenchymal
RT4	m, 63 J	(papillär) pT2G1	epithelial
RT-112	w	(papillär) G2	epithelial
SW1710	w, 84 J	(papillär) G3	epithelial/

			mesenchymal
UMUC6	m	(papillär) TCC	epithelial
253J	w, 84 J	LK-Metastase von TCC, G2	epithelial
5637	m, 68 J	TCC, G2	epithelial
639v	m, 69 J	TCC, G3	mesenchymal
647v	m, 59 J	pT1G3	epithelial
HT-1376	w, 58 J	pT2G3	epithelial
Ku-19-19	m, 76 J	pT3bG3	mesenchymal
SD	m	TCC	epithelial
T24	w, 81 J	TCC, G3 Rezidiv	mesenchymal
UMUC3	m	TCC, G3	mesenchymal
VMCUB1	m	TCC	epithelial/ mesenchymal
MGH-U4	m, 57 J	Urotheliale Atypie	epithelial
SCaBER	m	Plattenepithelkarzinom	epithelial

Immortalisierte Zelllinien

TERT-NHUC	ref. [126]	benignes Urothel	epithelial
------------------	------------	------------------	------------

Zervixkarzinom

Histologie

HeLa	w, 30 J	Adenokarzinom	epithelial
-------------	---------	---------------	------------

Teratokarzinom

Histologie

NCCIT	m, 24 J	Mediastinale Testistumor-Metastase eines nicht seminomatösen Kombinationstumors	
--------------	---------	---	--

3.1.3 Gewebeproben

Die Gewebeproben, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 bis 4 aufgeführt. Es stand jeweils ein Gewebe-Set für RNA- und DNA-Analysen zur Verfügung. Es gab nur geringe Überschneidungen zwischen RNA- und DNA-Proben. Tabelle 19 (s. 4.1) stellt die Eigenschaften der Gewebeproben gegenüber.

Tabelle 2: Klinische Parameter der normalen Urothelgewebe für RNA-Analysen

Gewebeprobe	Alter und Geschlecht	TMN
BN15	70J, m	benigne

BN18	73J, m	benigne
BN273	68J, m	benigne
BN274	66J, m	benigne
BN275	62J, m	benigne
BN276	unbekannt	benigne
BN351	77J, w	benigne
BN357	unbekannt	benigne
BN363	75J, m	benigne
BN365	65J, m	benigne
BN369	86J, m	benigne
BN373	63J, m	benigne
BN374	69J, m	benigne
BN371	72J, m	benigne

Tabelle 3: Klinische Parameter der tumorhaltigen Urothelgewebe für RNA-Analysen

Gewebeprobe	Alter und Geschlecht	TMN	Herkunft
BT3	75, m	pT3bii N0 M0 G2	Urothelkarzinom +Plattenepithelkarzinom + Adenokarzinom
BT6	76, m	pT3bii N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT12	60, m	pT3a N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT28	68, m	pT3b N0 Mo G3	Urothelkarzinom
BT41	54, w	pTa N0 G2	Urothelkarzinom
BT55	74, m	pT4a N1 M0 G3	Urothelkarzinom
BT61	75, m	pT3b N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT62	80, w	pT3b N0 M0 G2	Nierenbecken Urothelkarzinom
BT67	94, w	pT2 N0 G3	Urothelkarzinom
BT69	77, m	pT3b N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT111	66J, m	pT3b N0 M0 G2-3	Urothelkarzinom
BT115	65J, m	pT3a N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT120	57J, m	pT2 N0 G2	Urothelkarzinom
BT168	64J, m	pT3a N2 M0 G3	Urothelkarzinom

BT170	55J, w	pT2 N0 M0 G2	Nierenbecken Urothelkarzinom
BT172	72J, m	pT3a N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT212	unbekannt	pT2a N1 G3	Urothelkarzinom
BT246	61J, m	pT4a Nx G3	Urothelkarzinom
BT320	67J, m	pT2a N1 G3	Urothelkarzinom Zystektomie
BT322	70J, m	pT4a N0 G3	Urothelkarzinom Zystektomie
BT354	57J, w	pT2b N0 G3	Urothelkarzinom Zystektomie
BT360	76J, m	pT4a Nx G3	Urothelkarzinom Zystektomie
BT362	75J, m	pT2a N0 G2	Urothelkarzinom Zystektomie
BT364	65J, m	pT4a N1 G3	Urothelkarzinom /Zystektomie

Tabelle 4: Klinische Parameter der normalen Urothelgewebe für DNA-Analysen

Gewebeprobe	Alter und Geschlecht	TNM
BN1	65J, m	benigne
BN214	78J, w	benigne
BN194	60J, m	benigne
BN200	unbekannt	benigne
BN12	60J, m	benigne
BN101	68J, m	benigne
BN106	unbekannt	benigne
BN134	70J, m	benigne
BN218	67J, m	benigne
BN69	unbekannt	benigne
BN90	65J, m	benigne
BN26	70J, m	benigne

Tabelle 5: Klinische Parameter der tumorhaltigen Urothelgewebe für DNA-Analysen

Gewebeprobe	Alter und Geschlecht	TMN	Herkunft
BT16	70J, m	pT2a N0 G2	Urothelkarzinom
BT45	52J, m	pT1 N0 M0 G2	Urothelkarzinom
BT52	66J, m	pT3b N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT132	71J, w	pT3a N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT78	64J, m	pT3a N2 M0 G3	Urothelkarzinom+ Plattenepithelkarzi nom
BT77	76J, m	pT4a N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT42	73J, m	pT4a N1 M0 G3	Urothelkarzinom
BT39	m	pT4a N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT31	45J, w	pTa Nx Mx G2	Urothelkarzinom
BT28	73J, w	pT3b N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT25	61J, m	pT3b N0 M0 G2	Urothelkarzinom
BT133	50J, w	pTa G1	Urothelkarzinom
BT13	60J, m	pT3a N0 M0 G3	Urothelkarzinom
BT15	77J, m	pT3 Nx Mx G3	Urothelkarzinom
BT4	52J, m	pT2b N0 M0 G3	Urothelkarzinom + Adenokarzinom +Plattenepithelkar zinom
BT3	66J, m	pT2a N0 Mx G2	Urothelkarzinom
BT119	57J, m	pT3a N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT118	81J, w	pT4a N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT116	64J, m	pT3b N1 M0 G3	Urothelkarzinom
BT102	68J, m	pT4a N2 M0 G3	Urothelkarzinom
BT98	45J, m	pT4a N0 Mo G3	Urothelkarzinom
BT86	66J, w	pT1 N0 M0 G2-3	Urothelkarzinom

3.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Kits

Tabelle 6: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Allgemeine Chemikalien	Hersteller
Agarose	Sigma
Aprotinin	Calbiochem
6x Auftragspuffer (Agarosegele)	Fermentas
Chloroform	Merck
Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck
Dinatriumhydrogencarbonat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
DMSO	Sigma
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
dNTP-Mix	PeqLab
EDTA	Merck
Ethanol	Merck
Formaldehyd 37%	Merck
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck
Glutaraldehyd 25%	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat (III) (K ₃ Fe(CN) ₆)	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat (II) (K ₄ Fe(CN) ₆)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
NP40	Merck
Oligo-dT15	Roche
PBS Dulbecco	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
2-Propanol	Merck
Salzsäure 25%	Merck
SDS	Merck
50x TAE Buffer	5-PRIME
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck

Triton X100	Sigma
Tween-20	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid)	Merck
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck

Tabelle 7: Kits für RNA Isolation, Reverse Transcription, PCR

RNA Isolation, Reverse Transcription, PCR	Hersteller
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kt	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	Qiagen
dNTP Mix	Fermentas
6x DNA Loading Dye	Thermo
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo
QuantiTec SYBR Green PCR Kit	Qiagen

Tabelle 8: Kits für Bisulfitkonvertierung und Pyrosequenzierung

Bisulfitkonvertierung, Pyrosequenzierung	Hersteller
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research
PyroMark PCR Kit	Qiagen
1x Coraload Concentrate	Qiagen
Streptavidin Sepharose Beads	Amersham
PyroMark Gold Q24 Reagenz	Qiagen

Tabelle 9: Chemikalien, Reagenzien und Kits für Proteinextraktion und Western Blot Analysen

Proteinisolation, Western Blot	Hersteller
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma
Pierce BCA Protein Assay	Thermo
Lämmli Probenpuffer	Biorad
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo
10x Tris/ Glycin/ SDS Puffer	Biorad

Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
Whatman Papier	Whatman
Milchpulver, entfettet	Drogerie
ESL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare
Amersham Hyperfilm ECL	

Tabelle 10: Chemikalien, Reagenzien und Medien für Zellkultur, Transfektion und Behandlungen

Zellkultur, Transfektion, Behandlung	Hersteller
PBS Dulbecco	Biochrom
FCS (fötale Kälberserum)	Biowest
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Invitrogen
GlutaMAX	
Trypsin EDTA	Sigma
Penicillin, Streptomycin	Sigma
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma
Efavirenz	Freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Carsten Münk, HIV- Forschung UKD
Puromycin	Sigma
Optimem	Gibco
Lipofectamine RNAiMAX Transfektionsreagenz	Invitrogen

3.1.5 Puffer, Lösungen

Tabelle 11: Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen

Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen	Konzentration	Menge
Protein Lysis Puffer RIPA		
NaCl 5M	150 mM	3 ml
NP-40	1%	1 ml
DOC	0,5%	0,5 g
SDS 10%	0,1%	1 ml
EDTA 0,5 M	1 mM	200 µl

Tris pH 7,6 1M	50 mM	5 ml
dest. H ₂ O		auf 100 ml
*für die Zellyse: + Protease Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail		
Transferlösung 5x Stocklösung		
Tris	0,28 M	34 g
Glycin	0.5 M	144 g
dest. H ₂ O		auf 2 l
Elektrophorese Puffer		
10x Tris/ Glycin/ SDS Buffer (Biorad)	1x	100 ml
dest. H ₂ O		auf 1 l
Transfer Puffer 1x		
Transferpuffer 5x Stocklösung	1x	200 ml
Methanol	10%	100 ml
dest. H ₂ O		auf 1 l
TBS 10x		
Tris	0,5 M	24 g
NaCl	1,5 mM	88 g
dest. H ₂ O		auf 1 l
* auf pH 7,6 mit HCl einstellen		
Waschpuffer (TBST)		
TBS Puffer 10x	1x	100 ml
Tween 20	0,1%	0,5 ml
dest. H ₂ O		auf 1 l
Blockierlösung		
Milchpulver	5%	5 g
TBST 1x	1x	50 ml
Protein Stripping Lösung		
Glycin	1,5%	15 g
SDS 10% Lösung	0,1%	1 ml

Tween 20	1%	1 ml
dest. H₂O		auf 100 ml
*pH 2 mit HCl einstellen		

Tabelle 12: Puffer und Lösungen für den SA-β-Galactosidase Assay

Puffer und Lösungen für SA-β-Galactosidase

Assay

Citrat-/Phosphatpuffer		
Na₂HPO₄	200 mM	63,15 ml
C₆H₈O₇·xH₂O	100 mM	36,85 ml

***pH 6 einstellen**

Fixativ

Formaldehyd 37%	2%	2,7 ml
Glutaraldehyd	0,2%	0,4 ml
PBS		auf 50 ml

X-Gal Färbelösung

NaCl	150 mM	1,5 ml
MgCl₂	2 mM	0,1 ml
K₃Fe(CN)₆	5 mM	2,5 ml
K₄Fe(CN)₆	5 mM	2,5 ml
X-Gal	1 mg/ml	1,25 ml
Citrat-/Phosphatpuffer		auf 50 ml

3.1.6 Oligonucleotide

Die Tabellen 13 bis 14 listen Oligonukleotide für Endpunkt, qRT-PCR und Pyrosequenzierung auf. Für die PCR-Primer sind Sequenz, Anlagerungstemperatur [Anl.T.] und die Produktgröße angegeben.

Tabelle 13: Primer für Endpunkt und qRT-PCR

Gen	Primer	Sequenz	Anl.T. [°C]	Produkt [bp]
HERV-K 3q25.3	H3q25.3_qPCR _for	GCATCTGTCTCCTGCTT G	53	70
	H3q25.3_qPCR _rev	ATCTCAGTAGATGGAAT CG		
HERV-K 3q12.3	H3q12.3_qPCR _for	GTGCTGAGGAGGATTA GTG	53	193
	H3q12.3_qPCR _rev	AGTATTGCTGCCGGCTT G		
HERV-K 3q27.2	H3q27.2_qPCR _for	CATGGTTTCCAGAACAA GAA	53	172
	H3q27.2_qPCR _rev	GAAACTGAAACGCTATC TTCTG		
HERV-K 10p14	H10p14_qPCR_ for	CTCAACTACCCAGGGAT AC	55	155
	H10p14_qPCR_ rev	TTACGGGTGTCGAGCT GC		
HERV-K 11q22.1	H11q22.1_qPC R_for	TCCTATTTGCTTAGGGA CAG	53	68
	H11q22.1_qPC R_rev	GTACTTCTACCAACCAG TTT		
HERV-K 3q21.2	H3q21.2_qPCR _for	ATTAGTAAAAGAGGAAA GAATG	48	109
	H3q21.2_qPCR _rev	CATACAATCAGGTTTTA TACTG		
HERV-K 12q24.11	H12q24.11_qPC R_for	GACGAGAGATCCCGAG GA	55	68
	H12q24.11_qPC R_rev	CCCTAGCTTCTTCCGAG TG		
HERV- K_22q11.23	HERVK22q_for	TTCCCGAGTACGTCTAC AGTGA	55	113

	HERVK22q_rev	GGTGTTCATCAGGT GGAAT		
HERV-K 104	HERV- K_104_RT_for	AGTCATCACCCTCCCT CATC	55	117
	HERV- K_104_RT_rev	GCCATATTTTCAGACTAT GAAACC		
HERV-K 108	HERV- K_108_RT_for	CACCCACAGATGATCAG T	54	148
	HERV- K_108_RT_rev	AAGGTGGGACGAGAGA TT		
HERV-K 113	HERV- K_113_RT_for	TAGGGAAAAACCGCCT CA	51	147
	HERV- K_113_RT_rev	CGTGAACAAAGGTCTTG G		
HERV-K 12q14.1	HERV- K_12q14.1_RT_ for	GTCAGCAGACAAACATG TGAA	55	204
	HERV- K_12q14.1_RT_ rev	GTCAGCAGACAAACATG TGAA		
HERV-K 10	HERV- K_10_RT_for	GAAAAGCAAGAGAGAT CAAATT	51	96
	HERV- K_10_RT_rev	GCAGAAGAATTTTTCTT AGCA		
HERV-K 18.2	HERV- K_18.2_RT_for	ATCCTCCATATGCTGAA CGTTG	55	110
	HERV- K_18.2_RT_rev	TGTTTCTCGTAAGGTGC AATGA		
HERV-K 102	HERV- K_102_RT_for	TGGCGGGATCCTCCAC AT	55	110
	HERV- K_102_RT_rev	CGTAAGGTGGGATGAG AGA		
HERV- K22q11.21	HERVK.21_for	TCCCAGAAAGAAACGG AAAG	55	195
	HERVK.21_rev	ACCTGCTGGAAGAGGA CTTGTC		

HERV-K17	HERVK17_for	CAGACAAACCTGGAGAT GAG ref. [112]	55	184
	HERVK17_rev	AGGCTCCAAGCTACATT GCT ref. [112]		
LINE-1_3'	LINE-1_3'_for	GGGAATTGAACAATGAG ATCAC	55	159 (Rebase 15.10)
	LINE-1_3'_rev	TATACATGTGCCATGCT GGTG		
LINE-1_5'	LINE-1_5'_for	GTACCGGGTTCATCTCA CTAGG	56	246 (Rebase 15.10)
	LINE-1_5'_rev	TGTGGGATATAGTCTCG TGGTG		
AluYa5	AluYa5_for	CGCCTGTAGTCCCAGC TACTTG	56	100 (Rebase 15.10)
	AluYa5_rev	CTGGAGTGCAGTGGCG G		
AluYb8	AluYb8_for	GGCGCCTGTAGTCCCA GCTACTCG	64	122 (Rebase 15.10)
	AluYb8_rev	TCTGTGCGCCCCAGGCC GGA		
ORF1	L1_ORF1qPCR_for	CAGGAGAACTTCCCCAA TCTAGC	62	166
	L1_ORF1qPCR_rev	CTTTCTCTCTGGCTGCC CTTAAC		
L1C2 Chr2:197771649 +197771733 hg19	L1C2_qPCR_for	AAACCTCCAAGAAATAT GGGT	53	85
	L1C2_1qPCR_rev	GGTTCCATTCTCCACAT CTC		

L1C6 Chr6:113,027,87 7-113,027,984 hg19	L1C6_qPCR_for	ACACCCTAACATCACAA TTAACTAG	53	107
	L1C6_qPCR_re v	GTTCTCTATTTCTTCA GTTCTGG		
L1C10 Chr10:87118181 +87118562 hg19	L1C10_qPCR_f or	ATCCAAAATTGACACCC TAACG	53	382
	L1C10_qPCR_r ev	GAGAGTGTATGTGTTGA GGAATGT		
L1C11 Chr11:95172822 +95172949 hg19	L1C11_qPCR_f or	GGAGCTGGCACCATTC CTTCAG	58	128
	L1C11_qPCR_r ev	TCTCTTTTTTGGTTGTGT GTCTGC		
L1C20 Chr20:11637344 +11637457 hg38	L1C20_qPCR_f or	AGCCAAAAGAACAAAGT TG	53	114
	L1C20_qPCR_r ev	CCATTGATCTATATCTC TGTTTAAG		
L1X1 chrX:154748859- 154749035 hg19	L1X1_qPCR_for	ACAGTGCAATCAAATA GAACG	53	177
	L1X1_qPCR_re v	CCCAGAGATTCTGGTAT GTGA		
L1X4 chrX:118570893- 118571105 hg19	L1X4_qPCR_for	AGGAAATAAAAGAGGA GACAAATG	53	213
	L1X4_qPCR_re v	CTTAGGATTGACTTGGC AATG		
L1X5 chrX:26332632- 26332753 hg19	L1X5_qPCR_for	GAACAATGAGATCACAT GGATA	53	122
	L1X5_qPCR_re v	CACTAACGTGTCATCTA GCATC		

TBP	TBP_for	ACAACAGCCTGCCACCT	55	120
		TA		
	TBP_rev	GAATAGGCTGTGGGGT		
		CAGT		

Tabelle 14: Amplifizierungsprimer und Sequenzierungsprimer für Pyrosequenzierung. Angegeben ist zusätzlich die Anzahl der erfassten CpG Stellen

Assay		DNA Sequenz	CpGs
LINE-1	LINE-1_Pyro_for	TTGAGTTAGGTGTGGGATATAG	4
		T	
	LINE-1_Pyro_rev (biotinyliert)	AAACCCAAAAAATCAAAAAA TTCCCTTTCC	
	Sequenzierungsprimer LINE-1_Pyro_S1	GGTGTGGGATATAGTT	
H17	HERVK17_Pyro_for	TTGAGGGTGGTGTATTAGGTAG	6
		GTT	
	HERVK17_Pyro_rev (biotinyliert)	AAATTATCCCATATATCCCTAA AATACT	
	Sequenzierungsprimer HERVK17_Pyro_S1	GAATTTAGGTGAAGTTATATTTG A	
HERV- K_22q11.23	HERVK.23_Pyro_for	GTTGGGTATTAGATGGAGTGGT	6
		T	
	HERVK.23_Pyro_rev (biotinyliert)	ATTACCCTATTATCCTACCACAT CC	
	Sequenzierungsprimer HERVK.23_Pyro_S1	AGAAAGAAAAGTGGGTTTA	

3.1.7 siRNA

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten siRNAs mit Angabe der Sense und Antisense Sequenz

Gen	Primer	Sequenz	Hersteller
L1_RNAi	Sense	5'GAGAACGCCACAAAGAUACtt3'	ambion
	Antisense	5'GUAUCUUUGUGGCGUUCUCtt3'	
L1_RNAi_II	Sense	5'UAAACUCCCUUCUCGCUUCAUUUC3'	Invitrogen

	Antisense	5'GAAUGAAGCGAGAAGGGAAGUUUA3'
Negativ	Silencer Select	ambion

3.1.8 Antikörper

Tabelle 16: Primäre und sekundäre Antikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Primärantikörper		
Anti ORF1p	1:2000	ref. [127]
α -Tubulin	1:50000	Sigma
Sekundärantikörper		
anti rabbit HRP	1:30000	Santa Cruz
anti-mouse HRP	1:200000	Santa Cruz

3.1.9 Geräte

Tabelle 17: Geräte

Geräte	Hersteller
5415D Zentrifuge	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortexer	Neolab
Avanti 30 Zentrifuge	Beckman Coulter
Allegra 25 R Zentrifuge	Beckman Coulter
Schüttler	Neolab
Incubator Shaker Innova 4200	New Brunswick Scientific
Trio Thermoblock	Biometra
T3 Thermocycler	Biometra
Tube Roller	Benchmark
Mini-PROTEAN Tetra System	Biorad
Power Supply Power Pac 200	Biorad
Power Supply	Biometra
Nanodrop 2000	Nanodrop technologies

ABI Prism 7500 fast	Applied Biosystems
Gel Dokumentationssystem	Intas
ELISA Easy Reader EAR 400 AT	SLT Labinstruments Austria
PyroMark Q24 Vakuum Workstation	Qiagen
Pyromark Q24 Pyrosequencer	Biotage
Curix 60 (Entwicklermaschine)	Agfa
CanoScan 4400F	Canon
Victor Mikroplatten-Reader	Wallac
Zellkulturmikroskop Nikon Eclipse200	Nikon

3.1.10 Software und Datenbanken

Die Genom-Datenbanken UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) und Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) wurden für die Ausgabe von DNA und RNA Sequenzen und für die *in-Silico-PCR* verwendet. PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) diente hauptsächlich zur Literaturrecherche. Die quantitativen PCR am ABI Prism 7500 fast (Applied Biosystems) wurden mit der 7500 Software v2.0.5 programmiert und analysiert.

Die Analyse für Pyrosequenzierungen wurde mittels PyroMark Assay Design Version 2.0 (Qiagen) erstellt. Statistische Auswertungen wurden mit IBM/SPSS Statistics 20 und MS Excel 2013 vorgenommen. Das Fotodokumentationsprogramm NIS-Elements AR (Nikon) wurde zur Aufnahme von Zellkulturbildern verwendet. EndNote X7 wurde zur Erstellung und Verwaltung der Literaturdatenbank genutzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Urothelkarzinomzelllinien

Die Urothelkarzinomzelllinien wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco*) unter Zugabe von 10% FCS (*fetal calf serum*), 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin kultiviert. Die Bedingungen im Inkubator lagen bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Die Luft war wasserdampfgesättigt.

Für die Passagierung wurden die Urothelkarzinomzelllinien mittels Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Reaktion wurde nach fünf Minuten durch Zugabe von FCS-haltigem DMEM abgestoppt.

Die Zellen wurden zum Einfrieren in eiskaltem FCS mit DMSO (Verhältnis 9:1) über Nacht bei -70°C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Die tumor-assoziierten Fibroblasten wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) unter Zugabe von 10% FCS kultiviert.

Urotheliale Primärkulturen stammen aus Ureteren nach Nephrektomien und wurden in KSFM (kalzium- und serum-freies Medium; Gibco) unter Zugabe von 5 ng/ml EGF (*epidermal growth factor*) und 50 µg/ml BPE (*bovine pituitary extract*) kultiviert.

3.2.2 RNA-Isolierung und RT-PCR

Totale RNA wurde aus subkonfluenten Zellkulturen gewonnen. Die Zellen wurden in RLT Puffer (Qiagen; mit 10 µl/ml Mercaptoethanol) lysiert und mittels QIAshredder (Qiagen) homogenisiert. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und in 30-40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm am Nanodrop bestimmt. Die cDNA wurde aus 1 µg RNA mit dem QuantiTect *Reverse Transcription* Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben synthetisiert und in 14 µl Wasser gelöst. Das Endvolumen betrug 20 µl. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C, die der cDNA bei -20°C. Für spätere Analysen wurde die erstellte cDNA 1:10 in nukleasefreiem Wasser (Qiagen) verdünnt.

3.2.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR zur Analyse der Genexpression wurde am ABI Prism 7500 *fast* (Applied Biosystem) und am LightCycler (Roche) durchgeführt. Für die Analyse wurde die cDNA 1:10 verdünnt. Für den Reaktionsansatz von 20 µl wurde 1 µl cDNA (1:110 verdünnt), 1x QuantiTect SYBR Green PCR Mastmix (Qiagen) und 10 pmol Oligonukleotidprimer (s. Tabelle 13) verwendet. Der Reaktionsansatz für die Analysen am LightCycler entsprach der Hälfte. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Als Referenzgen wurde die *TBP* Expression bestimmt und die gemessene Expression der anderen Gene hierauf normiert.

Die PCR umfasste die folgenden Schritte: Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten, 40 Amplifikationszyklen mit 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C, primerabhängiger

Anlagerungstemperatur (s. Tabelle 13) für 20 Sekunden und Extension bei 72°C für 3 Sekunden. Es schloss sich die Schmelzkurvenanalyse bei einer Temperaturerhöhung von 1°C/min von 60°C auf 95°C an. Die Variation der Quantität der Assays lag in den Duplikaten unter 10%. Die relative Expression wurde mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode nach Pfaffl berechnet [128].

3.2.4 DNA-Isolierung

Genomische DNA wurde mit dem DNA Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben gewonnen.

3.2.5 Bisulfitumwandlung

Genomische DNA (1 µg) wurde mit dem EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben in „methylierungsspezifische“ (MS-) DNA umgewandelt. Die Behandlung mit Bisulfit führt dabei zu einer Konvertierung unmethylierter Cytosine zu Uracil. Methylierte Cytosine bleiben unverändert.

3.2.6 Pyrosequenzierung

Die Methylierung spezifischer CpG Stellen der Promotoren von HERV K17, H22q und LINE-1 wurde mittels Pyrosequenzierung gemessen.

Dazu wurde 30-60 ng bisulfitkonvertierte DNA amplifiziert. Der PCR-Ansatz von 50 µl bestand aus 1x PCR-Puffer, 10 pmol dNTPs (Fermentas), je 20 pmol Primern, 4 U Hot Star Taq Polymerase (Qiagen) und 30-60 ng MS-DNA. Die Enzymaktivierung fand bei 95°C für 15 Minuten statt, es folgten 44 Zyklen mit 25 Sekunden bei 94°C, 20 Sekunden entsprechend der *Annealing*-Temperatur des *Primer-Assays* (s. Tabelle 13), und 30 Sekunden bei 72°C. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 15 Minuten. Das Produkt wurde auf einem 2% Agarosegel aufgetragen und kontrolliert.

Für die Pyrosequenzierung wurden 20-30 µl des PCR Produktes verwendet. Dieses wurde mit *Binding Puffer* während 10 Minuten Schütteln an Streptavidin *Beads* (Amersham Biosciences) gebunden. Die *Beads* wurden mit der PyroMark Q24 Vacuum Workstation angesaugt und in 70% Ethanol gewaschen, dann in 0,2 N NaOH denaturiert und mit *Washing Puffer* (Qiagen) gewaschen. Die Sequenzierungsprimer (0,3 mM; s. Tabelle 14) wurden mit *Annealing Puffer* (25 µl, Qiagen) und der an die *Beads* gebundenen DNA gemischt. Der Ansatz wurde bei 80°C für 2 Minuten denaturiert und

über 15 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Kartusche (Qiagen) wurde mit dNTPs (Qiagen), Enzym und Substrat befüllt.

Die Pyrosequenzierung erfolgte am Pyromark Q24 Pyrosequencer (Qiagen). Die Daten wurden mit der PyroMark Q24 Version 2.0 Software analysiert. Die Methylierungswerte der Assays wurden als Mittelwerte der Methylierung der spezifischen CpG berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels IMB SPSS Statistics 20.

3.2.7 Proteinextraktion und Western Blot Analyse

Für die Ganzzellproteinextraktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit RIPA Puffer (s. Tabelle 11) für 30 Minuten unter ständigem Schütteln auf Eis lysiert. Die Zellreste wurden durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 15.000 g entfernt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Pierce BCA-Protein Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Absorption bei 570 nm wurde am ELISA Reader gemessen.

Für die Western Blot Analyse wurde ein Probenansatz (20 µl) aus 10-30 µg Proteinlösung, 9,5 µl Lämmli-Probenpuffer, 0,5 µl β-Mercaptoethanol und RIPA Puffer hergestellt und die Proteine bei 95 für 5 Minuten denaturiert. Proteine und PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo) wurden auf ein Gradientengel (10-12% TGX Gel, Biorad) aufgetragen und über eine Gelelektrophorese bei 140-200 V in Mini-PROTEAN-TetraCell Kammern (Biorad) mit Elektrophorese-Puffer aufgetrennt (s. Tabelle 1). Die Proteine wurden 90 Minuten bei 180 mA von dem Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde für eine Stunde in Blockierlösung (s. Tabelle 11) geblockt und dann mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit Waschlösung (s. Tabelle 11) für 10 Minuten gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL *advanced* Kit (GE Healthcare). Auf fotosensitiven Filmen (Amersham Bioscience) wurde die Chemilumineszenz detektiert. Die Kontrolle für die Proteinmengen erfolgte mit α-Tubulin-Antikörpern.

3.2.8 Standard Endprodukt PCR und Gelelektrophorese

Die cDNA-Amplifizierung wurde mit dem HotStarTaq DNA Polymerase Kit (Qiagen) durchgeführt. Der Reaktionsansatz (25 µl) bestand aus je 10 pmol Oligonucleotid-Primer, 1x PCR-Puffer, 0,5 U HotStarTaq Polymerase, 2,5 nM dNTPs, Wasser und 1 µl cDNA (1:10 verdünnt). Die PCR wurde am Biometra Thermocycler durchgeführt und das PCR-

Programm umfasste die folgenden Schritte: Enzymaktivierung bei 95°C für 15 Minuten, 32-36 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, Primer-abhängiger Anlagerungs-Temperatur (s. Tabelle 14) für 15-20 Sekunden und eine Extensionsphase mit 72°C für 30 Sekunden, danach folgte eine finale Extension bei 72°C für 10 Minuten. Die PCR-Produkte wurden mit 6x *Loading dye* (Thermo) und dem GeneRuler Ladder Mix (Thermo) auf ein 0,7-2,5 % Agarose-Gel (je nach Produkt-Größe) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE Puffer. Die Produkte wurden im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und mittels Geldokumentationssystem (Intas) fotografiert.

3.2.9 Funktionelle Versuche

3.2.9.1 LINE-1 *Knockdown* mittels siRNA

Knockdown Versuche mit siRNA (s. Tabelle15) wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) durchgeführt. Die Zellen wurden in 6-Loch oder 24-Loch Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit der siRNA transfiziert. Die siRNA und das Transfektionsreagenz wurden jeweils in OptiMEM Medium gelöst, die Ansätze gemischt und vor der Behandlung der Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsansätze für 1 ml Zellkulturmedium zeigt Tabelle 18. Das Zellkulturmedium wurde jeweils 24 Stunden nach der Transfektion gewechselt. Die Transfektion wurde über 24, 48, 72, und 120 Stunden vorgenommen. Bei Behandlung über 120 Stunden wurde nach 72 Stunden ein zweites Mal transfiziert und das Medium nach 24 Stunden erneut gewechselt.

Tabelle 18: Transfektionsansatz und siRNA Endkonzentration für 1 ml Zellkulturmedium

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Ansatz A		
Opti-MEM Medium	100 µl	
Lipofectamine RNAiMAX	2 µl	
Ansatz B		
Opti-MEM Medium	100 µl	
siRNA (50 nM)	0,2 µl	10 pM
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) GlutaMAX	ad 1 ml	

3.2.9.2 SA- β -Galaktosidase Assay

Für den SA- β -Galaktosidase Assay wurden Zellen der Zelllinie 5637 und VMCUB1 in 6-Loch Platten ausgesät. Dann wurden sie für 120 Stunden mit der jeweiligen L1 siRNA oder mit Kontroll-siRNA behandelt (s. Abschnitt 3.3.10.2; s. Tabelle 16). Als weitere Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden nach der Behandlung zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Fixativ (Tabelle 11) pro Loch für drei bis fünf Minuten fixiert. Dann wurden die Zellen erneut zweimalig mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 2 ml X-Gal Färbelösung pro Loch aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit PBS abgestoppt.

Seneszente Zellen werden in dem Assay blau gefärbt. Die lysosomale β -Galaktosidase hydrolysiert bei einem sauren pH das X-Gal zu dem Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. Bilder der gefärbten Zellen wurden mit dem Fotodokumentationsprogramm NIS-Elements AR (Nikon) aufgenommen.

3.2.9.3 Viabilitäts-Assay

Die Zahl der vitalen Zellen nach L1 siRNA Behandlung der Zelllinien 5637 und VMCUB1 wurde mit dem Celltiter-Glo Luminescent Assay Kit (Promega) untersucht. Die Reagenzien lysieren die Zellen, inhibieren die ATPasen und zeigen das vorhandene ATP an, indem die Firefly Luciferase mit Hilfe von Mg^{2+} (Beetle) Luciferin und ATP unter Sauerstoffverbrauch zu Oxyluciferin, AMP, PP_i , CO_2 und Licht katalysiert. Das freigesetzte Licht wurde am Victor (Wallac) gemessen.

Die Zellen wurden über 120 Stunden mit L1 siRNA behandelt (s. Abschnitt 3.3.10.2; s. Tabelle 15). Danach wurden sie mit 100 μ l Trypsin-EDTA aus den 24-Loch Platten gelöst und in 500 ml Medium aufgenommen. Dann wurde der Assay nach Herstellerangaben vorgenommen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen verwendet. Als Nullwert diente das Kulturmedium. Von jeder Probe wurden Quadruplikate gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 20.

3.2.9.4 Behandlung mit Efavirenz

Die Zellen wurden in 96-Loch Platten ausgesät und 24 Stunden später mit 20 μ M (6,3 μ g/ml) in DMSO gelöstem Efavirenz für 72 Stunden behandelt. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden erneut mit Efavirenz behandelt.

3.2.9.5 Caspase-Assay

Um die Apoptoserate unter Efavirenz-Behandlung zu untersuchen, wurde der Caspase Glo 3/7 Assay (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Test katalysieren aktivierte Caspasen 3 und 7, ein Kennzeichen apoptotischer Zellen, die Umwandlung des DEVD-Luciferol Komplexes zu DEVD und Luciferin. In dem folgenden Reaktionsschritt wird Luciferin von der Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase als Substrat verwendet und es entsteht Licht. Die Lumineszenz wurde mit dem Victor (Wallac) detektiert.

Die Zellen wurden für 72 Stunden mit Efavirenz behandelt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die über 24 Stunden mit Puromycin (100 µg/ml Zellkulturmedium) behandelt wurden. Negativkontrolle waren unbehandelte Zellen, die in 0,4 µl DMSO auf 1 ml Zellkulturmedium wuchsen. Als Leerwert diente Zellkulturmedium mit DMSO.

Jede Probe wurde als Quadruplikat gemessen. Der Leerwert wurde von den Mittelwerten subtrahiert und die statistische Auswertung mit IBM SPSS Statistics 20 vorgenommen.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm IBM/SPSS Statistics 20 erstellt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test berechnet. Korrelationsanalysen wurden mittels Spearman's rho berechnet. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit IBM/SPSS Statistics 20 und MS Excel 2013.

4 Ergebnisse

4.1 LINE-1 Promotor-Methylierung und Expression

Um zu verifizieren, ob es im Harnblasenkarzinom zu einer generellen DNA-Hypomethylierung kommt und zu einer anschließenden Änderung der LINE-1 Expression, wurde zunächst die LINE-1-Methylierung mittels Pyrosequenzierung an bisulfitkonvertierter DNA analysiert. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um 18 Urothelkarzinomzelllinien und 10 normale Harnblasenzellkulturen, sowie ein DNA Gewebeset mit 23 Urothelkarzinomen und 12 benignen Urothelgeweben. Die Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Das hierfür vorhandene RNA Gewebe-Set umfasst 11 benigne Gewebe und 24 Tumorgewebe. Eine Zusammenfassung der Tumoreigenschaften enthält Tabelle 19.

Tabelle 19: Die Tabelle zeigt die wesentlichen Tumoreigenschaften des RNA-Sets und DNA-Sets im Vergleich.

		DNA-Set (n=23)	RNA-Set (n=24)
Alter	Median	65	66
	95% KI	61-71	63-69
	Range	41-84	45-84
Geschlecht	Weiblich	7	5
	Männlich	16	19
TMN Klassifikation	pTa	3	1
	pT1	1	0
	pT2	4	7
	pT3	10	11
	pT4	5	5
Lymphknoten	Negativ	11	13
	Positiv	5	3
	Unbekannt	5	3
Grading	G1	1	0
	G2	5	7
	G3	17	17

4.1.1 LINE-1 Promotor-Methylierung in Zelllinien

Die LINE-1 DNA-Methylierung wurde mit einem Assay gemessen, der vier CpG Dinukleotide erfasst. Diese liegen in der internen Promotorregion von etwa 400 Vollängen LINE-1 Elementen, die im Genom verteilt sind. Analysiert wurden zunächst die 10 normalen Urothelzellkulturen und die 18 Urothelkarzinomzelllinien. Als Kontrollmaterial wurden karzinomassoziierte Fibroblasten, immortalisierte Urothelzellen (TERT-NHU) und frisches benignes Urothelgewebe aus Harnleitern verwendet. Die Untersuchung ergab eine konstant hohe DNA-Methylierung in den normalen Urothelzellkulturen. Im Gegensatz dazu zeigen die Urothelkarzinomzelllinien eine sehr variable DNA-Methylierung, die insgesamt gegenüber den normalen Kulturen signifikant vermindert war (Mann-Whitney U-Test; $p=0,001$). Bei einer Unterteilung in papilläre und muskelinvasive Urothelkarzinomzelllinien waren die muskelinvasiven im Vergleich zu den papillären Urothelkarzinomzelllinien geringer methyliert (Mann-Whitney U-Test; $p<0,001$). Eine Ausnahme bildete hier BC61, eine papilläre Urothelkarzinomzelllinie, die mit 14% am schwächsten methyliert war. Auf der anderen Seite waren BFTC905 und SW1710, ebenfalls papilläre Urothelkarzinomzelllinien, sehr stark methyliert (Abbildung 2).

Auch die tumorassoziierten Fibroblasten wiesen eine geringe DNA-Methylierung auf. Im Vergleich fand sich in den benignen Kontrollen aus dem Ureter und den nicht kultivierten Urothelzellen ein hohes DNA-Methylierungsniveau.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es im Harnblasenkarzinom zu einer generellen Hypomethylierung kommt, die bei den invasiven Tumoren stärker ausgeprägt ist als bei den papillären Tumoren.

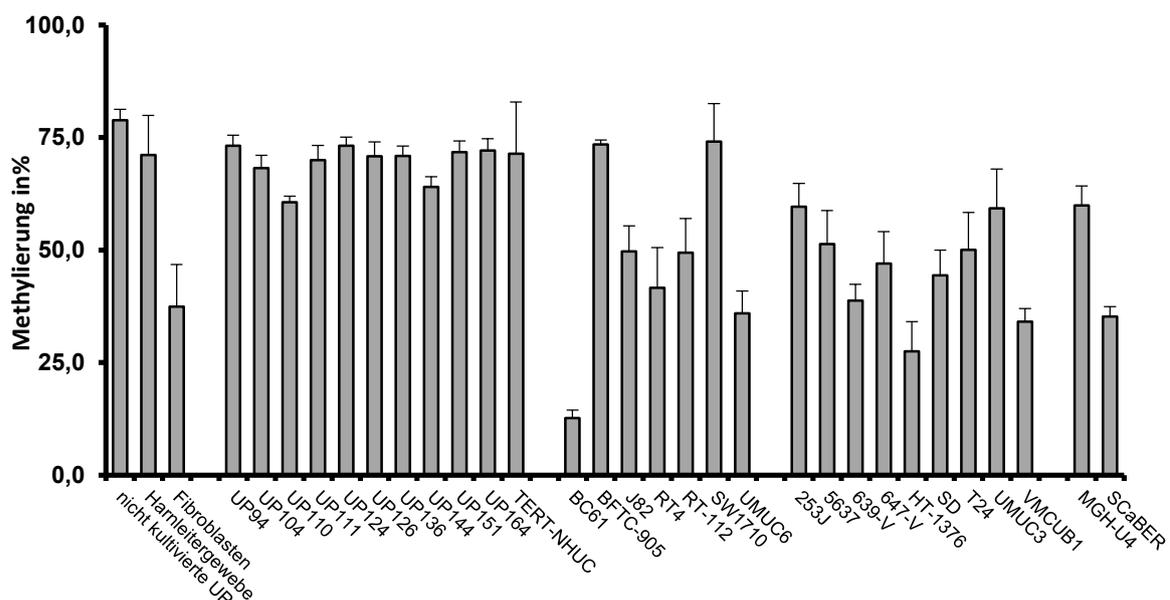


Abbildung 2: DNA-Methylierung des LINE-1 Promotors in 18 Urothelkarzinomzelllinien und 10 normalen Urothelzellkulturen. Die Urothelkarzinomzelllinien sind nach Herkunft aus papillären (links) und invasiven Tumoren (rechts) angeordnet. Kontrollen bilden karzinomassoziierte Fibroblasten, immortalisierte Urothelzellen (TERT-NHU) und frisches benignes Urothelgewebe aus dem Harnleiter. Aufgetragen ist die durchschnittliche prozentuale Methylierung der vier CpG Dinukleotide.

4.1.2 LINE-1 Promotor-Methylierung im Gewebe

Anschließend wurde derselbe Assay am DNA Gewebeset angewandt. Die Analyse der 22 Tumorproben und 12 normalen Gewebe ergab ebenfalls eine signifikante Hypomethylierung der DNA des Tumorgewebes gegenüber der DNA des benignen Gewebes (Mann-Whitney U-Test; $p=0,009$). Ein Unterschied zwischen den Tumorstadien konnte aufgrund der geringen Anzahl an pTa, pT1 und pT2 Stadien nicht untersucht werden. Es zeigt sich in den Tumoren mit einer histologischen G2 und G3 Grading jeweils eine signifikante Hypomethylierung (G2: Mann-Whitney U-Test; $p=0,01$; G3: Mann-Whitney U-Test; $p=0,003$).

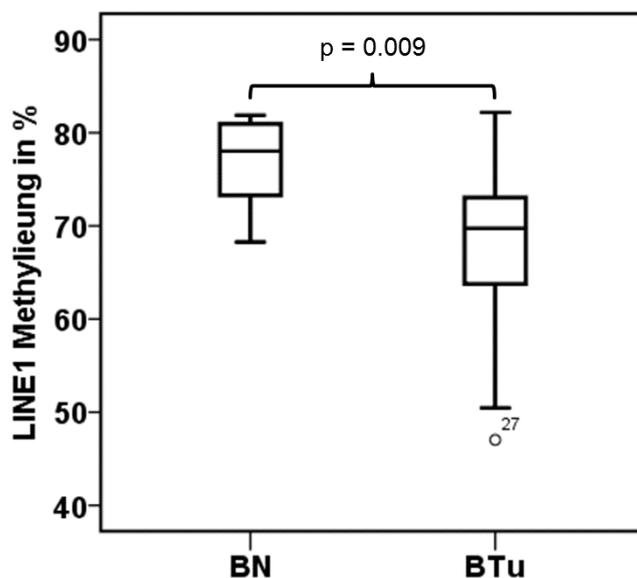


Abbildung 3: DNA-Methylierung des LINE-1 Promotors im DNA Gewebeset. Aufgetragen ist die durchschnittliche prozentuale Methylierung der vier CpG Dinukleotide. BN, benignes Urothelgewebe (n=12); BTu, Urothelkarzinome (n=22). p, Signifikanz nach Mann-Whitney U-Test.

4.1.3 LINE-1 RNA-Expression in Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die generelle DNA-Hypomethylierung die Transkription und somit die Expression der LINE-1 Sequenzen beeinflusst, wurden quantitative RT-PCR Analysen an RNA aus den 19 Urothelkarzinomzelllinien und sechs normalen Urothelzellkulturen durchgeführt. Im Anschluss wurde die LINE-1 Expression in den Gewebeproben des RNA-Sets untersucht (s. Tabelle 6). Die beiden verwendeten Assays, LINE-1 3' und LINE-1 5', erfassen unterschiedliche Untergruppen aller LINE-1 Transkripte. Der LINE-1 3'-Assay erfasst etwa 2000 Elemente, von denen viele am 5'-Ende verkürzt sind. Der LINE-1 5'-Assay detektiert hingegen deutlich weniger Elemente, etwa 400, die aber im Wesentlichen vollständig sind. Die schematische Lage der Amplikons der LINE-1 Assays zeigt Abbildung 4.



Abbildung 4: Schematische Lage der Amplikons der LINE-1 Expressions-Assays. Die LINE-1 3'-Primer binden in der 3'-UTR Region der LINE-1 Elemente - das Amplikon ist durch den grünen Pfeil gekennzeichnet. Die LINE-1 5'-Primer binden in der 5'-UTR - die Lage des Amplikons wird durch den orangenen Pfeil symbolisiert.

In der qRT-PCR zeigte sich, dass die LINE-1 Expression von LINE-1 3' in den Urothelkarzinomzelllinien gegenüber den normalen Urothelzellkulturen nicht generell steigt (Abbildung 5). Es kommt vielmehr zu einer erheblich variableren LINE-1 Expression. Der Median der LINE-1 Expression lag in den Urothelkarzinomzelllinien über dem Median in den normalen Urothelzellkulturen, die Erhöhung ist aber nicht signifikant.

Betrachtet man den LINE-1 5'-Assay, zeigte sich eine starke Expression in den Urothelkarzinomzelllinien BC61, BFTC-905, RT4, RT112, SD und VMCUB1. Diese Steigerung ist weitaus deutlicher als im LINE-1 3'-Assay. Die Expressionsniveaus von LINE-1 3' und LINE-1 5' korrelierten in den untersuchten Proben positiv miteinander (Spearman's rho= 0,628; p=0,005). Die DNA-Methylierung und die Expression korrelierten negativ, aber nicht signifikant. Dabei war die Korrelation mit dem LINE-1 5'-Assay deutlicher (Spearman's rho=0,443; p=0,066) als mit dem LINE-1 3'Assay (Spearman's rho= 0,225; p=0,307).

Diese Daten zeigen zusammengenommen, dass es in den Urothelkarzinomzelllinien zu einer deutlichen Hypomethylierung kommt, auf die nicht immer eine signifikante Expressionssteigerung folgt. Dennoch wird deutlich, dass es vor allem zu einer Steigerung der Volllängen-Transkripte kommt.

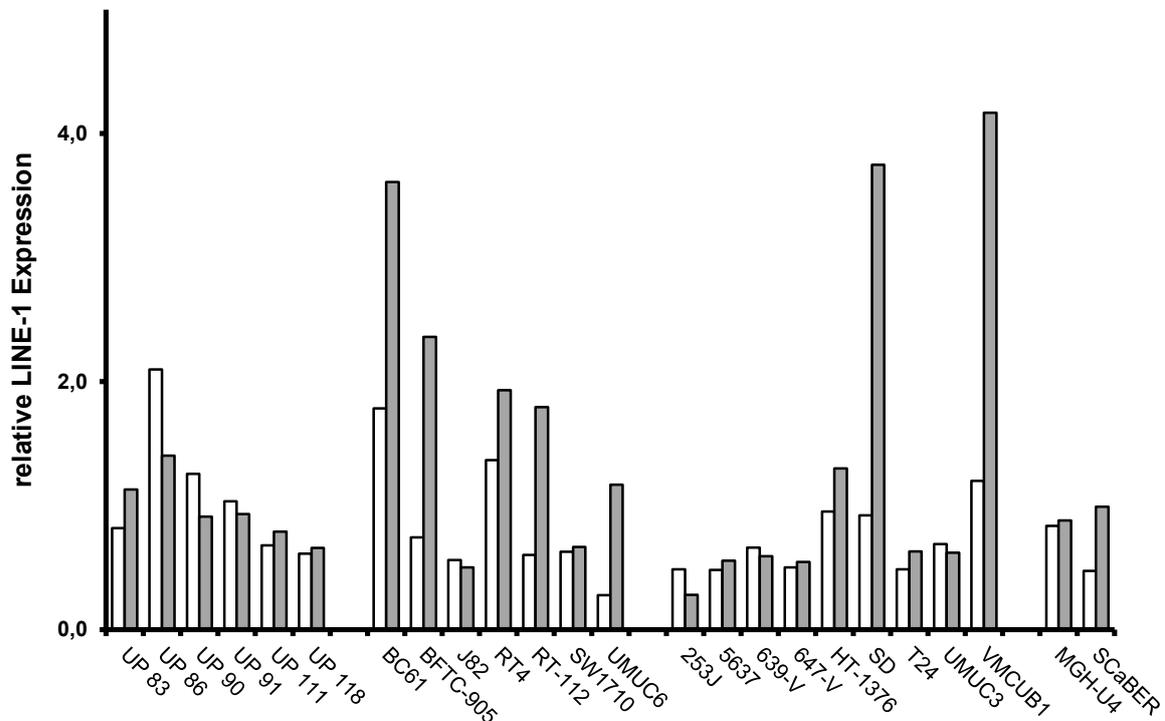


Abbildung 5: Die Expression von LINE-1 Transkripten wurde mit dem LINE-1 3'-Assay (helle Balken) und LINE-1 5'-Assay (dunkle Balken) in den angegebenen normalen Urothelzellkulturen und Urothelkarzinomzelllinien mittels qRT-PCR gemessen und auf TBP mRNA normiert.

4.1.4 LINE-1 RNA-Expression in benignem Gewebe und Tumorgewebe

Im Anschluss wurde das RNA-Gewebeset untersucht, dessen Eigenschaften Tabelle 3 zeigt. Es besteht aus 11 benignen und 24 tumorösen Geweben. Es wurde ebenfalls die LINE-1 3'- und LINE-1 5'-Expression untersucht. Dabei zeigen sich ähnliche Veränderungen der Expression von LINE-1 wie bei den Zelllinien. Die Expression in den Tumoren ist im Fall von LINE-1 5' signifikant erhöht (Mann-Whitney U-Test; $p=0,005$), wohingegen die LINE-1 3'-Transkripte nur eine geringe, nicht signifikante Steigerung zeigen (Abbildung 6). Eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und RNA-Expression konnte in diesem Fall nicht durchgeführt werden, da die Gewebesets von RNA und DNA nur zum geringen Teil überlappen.

Wie in Urothelkarzinomzelllinien kommt es in den Tumorgewebeproben zu einer Verschiebung der LINE-1 Expression. Dabei zeigt sich auch hier eine deutliche Verschiebung zu den Elementen, die über den LINE-1 5'-Assay erfasst werden.

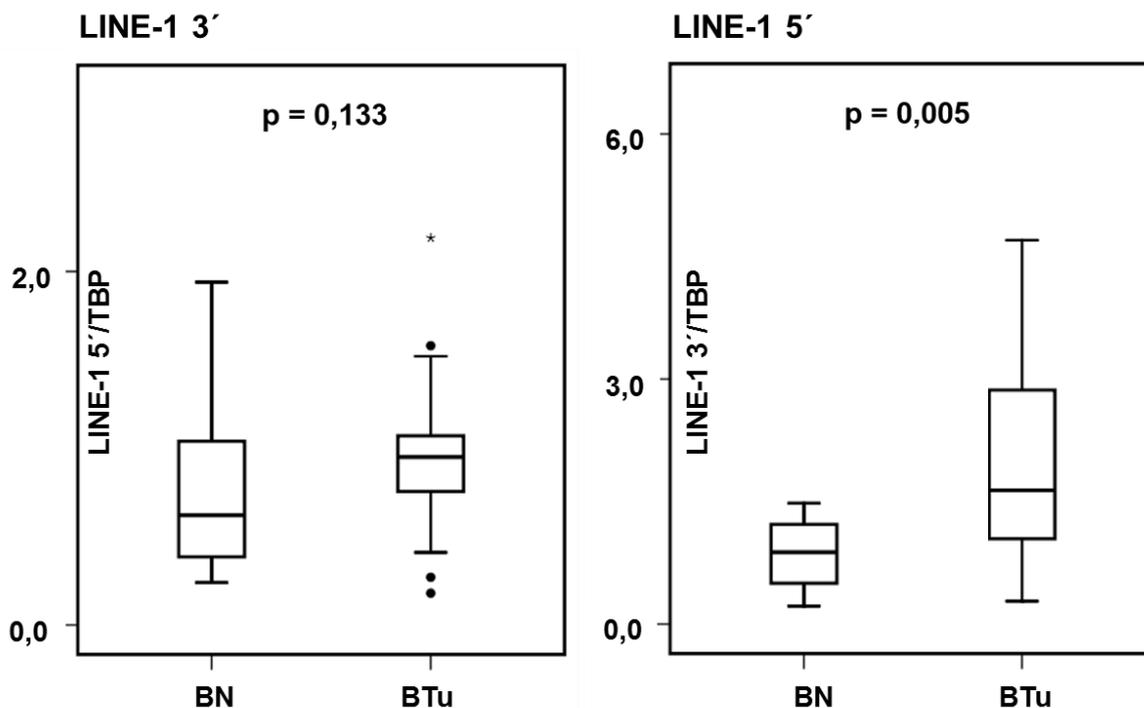


Abbildung 6: LINE-1 3'- und LINE-1 5'-Expression in benignen Geweben und Tumorgeweben. Die Gewebeproben entsprechen den in Tabelle 3 aufgelisteten Proben. Die Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht und auf TBP mRNA normiert.

4.1.5 Individuelle LINE-1 Elemente

Um zu untersuchen, ob sich die LINE-1 Expressionssteigerung in einer Expressionssteigerung spezifischer LINE-1 Elemente widerspiegelt, wurden acht individuelle LINE-1 Elemente mittels PCR untersucht. Zunächst wurde eine qualitative PCR durchgeführt. In den Fällen, in denen sich hierbei eine Expression zeigte, wurde eine qRT-PCR angeschlossen. Die Assays für die individuellen LINE-1 Elemente, L1C2, L1C6, L1C10, L1C11, L1C20, L1X1, L1X4, L1X5 [118], wurden an den 19 Urothelkarzinomzelllinien und 6 normalen Urothelzellkulturen getestet. Dabei war nur für L1C2, L1C10, L1C11 eine Expression nachweisbar. Bei der qRT-PCR stellten sich für alle drei Elemente nur minimale Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen Urothelkarzinomzelllinien und normalen Urothelzellkulturen heraus. Außerdem lag die Expression am Rande der Messbarkeit. Daher wurde auf eine weitere Expressionsanalyse im Gewebeset verzichtet.

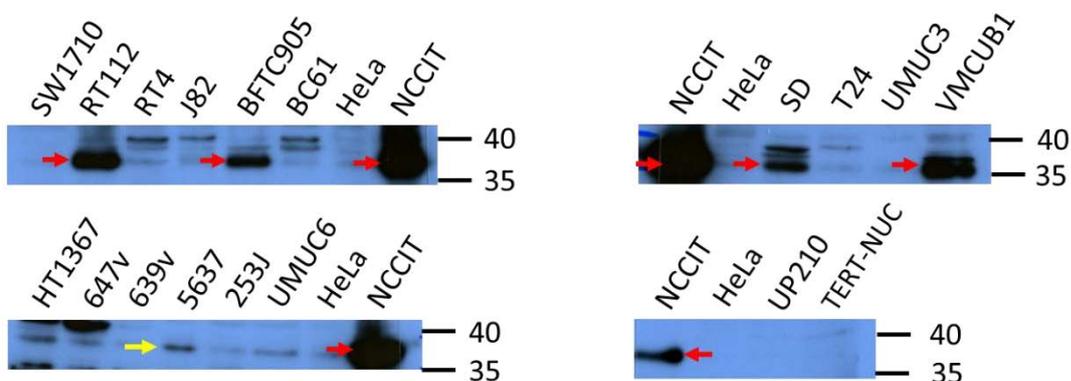
4.2 Proteinexpressionsanalysen

Die Volllängen LINE-1 Elemente besitzen zwei offene Leserahmen, ORF1 und ORF2. ORF1 kodiert für ein RNA bindendes Protein, das für Transport und Translation der RNA eine wichtige Rolle spielt. Der ORF2 kodiert für eine Endonuklease und eine reverse Transkriptase. Es soll untersucht werden, ob erhöhte Transkription von vermutlichen Vollängen-LINE-1 auch zu einer gesteigerten Protein Expression führt.

Um die Proteine zu detektieren, wurden Western Blots angefertigt. Es wurden ein Antikörper verwendet, der ORF1p detektiert. Die Analyse wurde an 16 Urothelkarzinomzelllinien, BC61, BFTC-905, J82, RT4, RT-112, SW1710, UMUC6, 253J, 5637, 639v, 647v, HT-1376, SD, T24, UMUC3, VMCUB1 und einer normalen Urothelzellkultur vorgenommen. Als Positivkontrolle diente NCCIT, eine Zelllinie aus einem Keimzelltumor. Die Negativkontrolle stellt HeLa dar, eine Zervixkarzinomzelllinie.

4.2.1 ORF1 Proteinexpression

Abbildung 7 zeigt die ORF1 Proteinexpression. In den Zelllinien RT112, BFTC-905, SD und VMCUB1 war eine Expression von ORF1 auf der Proteinebene nachweisbar. Im Vergleich mit den Ergebnissen der LINE-1 3' und LINE-1 5' qRT-PCR-Messungen zeigt sich, dass diese Zelllinien ebenfalls eine hohe LINE-1 mRNA-Expression aufweisen und besonders LINE-1 5' mRNA exprimieren. Eine Ausnahme stellt BC61 dar, die auf RNA-Ebene LINE-1 5' stark exprimiert (s. Abbildung 4); im Western Blot ist dagegen keine Proteinexpression zu detektieren. Die kultivierten normalen Urothelzellen weisen ebenfalls keine Proteinexpression auf. Die Zervixkarzinomzelllinie HeLa zeigt als Negativkontrolle keine ORF1 Proteinexpression, während die Teratokarzinom-Zelllinie NCCIT als Positivkontrolle eine deutlich stärkere Expression aufweist als die positiven



Urothelkarzinomzelllinien.

Abbildung 7: ORF1 Proteinexpression. Der Western Blot zeigt die ORF1 Proteinexpression in 16 Urothelkarzinomzelllinien und einer normalen Urothelzellkultur, UP210. HeLa stellt die Negativkontrolle dar, während NCCIT die Positivkontrolle ist. 1. AK: anti ORF1p (1:2000 dil), 2. AK: anti rabbit HRP (1:30000 dil). Auf Höhe der roten Pfeile läuft das ORF1p. Die roten Pfeile deuten auf die Zelllinien hin, die ORF1 Protein stark exprimieren. Der gelbe Pfeil markiert die geringe Proteinexpression der Zelllinie 5637.

4.3 Behandlung zweier Urothelkarzinomzelllinien mit LINE-1 siRNA

In Analogie zu einer Publikation, die eine Veränderung der Zellmorphologie, der Differenzierung und der Zellproliferation nach Suppression der LINE-1 Expression in Mammakarzinom-Zelllinien beschreibt [124], wurden zwei Urothelkarzinomzelllinien mit LINE-1 siRNA I transfiziert. Die Auswahl der Urothelkarzinomzelllinien wurde anhand der LINE-1 ORF1 Proteinexpression und ihrer zellulären Herkunft vorgenommen. Beide Urothelkarzinomzelllinien, VMCUB1 und 5637, besitzen ein epitheliales Wachstumsmuster. VMCUB1 zeigte im Western Blot eine ORF1 Proteinexpression, während 5637 eine sehr geringe ORF1 Proteinexpression aufwies (s. Abbildung 7; gelber Pfeil). Die beiden Zelllinien hatten ebenfalls einen deutlichen Unterschied in der LINE-1 RNA-Expression: 5637 wies insgesamt eine geringe LINE-1 RNA-Expression auf, VMCUB1 dagegen eine erhöhte Expression und eine Verlagerung von der LINE-1 3'-Expression zur LINE-1 5'-Expression. Die unterschiedlichen LINE-1 RNA- und Proteinexpression sollte die Möglichkeit bieten, unspezifische Effekte der verwendeten siRNA herauszufiltern. Die Transfektion mit der LINE-1 siRNA erfolgte über 24, 48, 72 und 120 Stunden. Im Anschluss wurden die LINE-1 ORF1 RNA-Expression, die ORF1 Proteinexpression, die Zellviabilität und die Seneszenz untersucht. Änderungen der Zellmorphologie wurden fotografisch festgehalten. Um auszuschließen, dass die erhobenen Ergebnisse auf einer Hemmung anderweitiger Sequenzen durch die LINE-1 siRNA beruhen, wurde eine zweite LINE-1 siRNA (LINE-1 siRNA II) entworfen. Beide Zelllinien wurden ebenfalls mit der LINE-1 siRNA II behandelt und die Experimente zur Expressionsänderung sowie Morphologie der Zellen wiederholt.

4.3.1 LINE-1 ORF1 RNA-Expression in LINE-1 siRNA transfizierten Urothelkarzinomzelllinien

Um zu verifizieren, dass es durch eine Transfektion mit LINE-1 siRNA I zu einer Änderung der LINE-1 RNA-Expression kommt, wurde die RNA-Expression der behandelten Zelllinien mittels qRT-PCR untersucht. Dazu wurde der LINE-1 ORF1 Assay verwendet,

dessen Amplikon im LINE-1 5'-Bereich liegt. Dieser detektiert spezifischer jene LINE-1 Elemente, mit denen die beiden LINE-1 siRNAs interferieren, spezifischer als der bisher verwendete LINE-1 5' Assay. Die LINE-1 Expression wurde nach 24, 48, 72 und 120 Stunden Behandlung gemessen. Zur Kontrolle wurden die Urothelkarzinomzelllinien mit einer nicht spezifischen Kontroll-siRNA behandelt, die gegen keine bekannte Sequenz gerichtet ist. Zur weiteren Kontrolle wurden VMCUB1 und 5637 unbehandelt kultiviert.

VMCUB1 wies nach 24, 48 und 72 Stunden Behandlung eine Suppression der LINE-1 RNA-Expression um 25-30% gegenüber der Kontroll-siRNA auf. Nach 120 Stunden lag die verbleibende Expression bei etwa 40%. In der 5637 sank die LINE-1 RNA-Expression kontinuierlich. Nach 24 Stunden Behandlung lag die LINE-1 RNA-Expression noch bei durchschnittlich 80% verglichen mit der Expression in der Behandlung mit der Kontroll-siRNA, nach 120 Stunden sank die Expression auf etwa 30% (Abbildung 8). Die Ct Werte der 5637 LINE-1 RNA-Expression lagen 2,5 Zyklen unter denen der VMCUB1. Durch die Transfektion mit siRNA I konnte die LINE-1 RNA-Expression also deutlich herunterreguliert werden.

Die Behandlung mit der LINE-1 siRNA II ergab ähnliche Ergebnisse. Diese sind in Abbildung 9 zu sehen. Es waren auch hier starke Schwankungen in den biologischen Doppelwerten erkennbar. In VMCUB1 war die LINE-1 RNA-Expression gegenüber der Kontroll-siRNA deutlich vermindert, in der Behandlung mit Kontroll-siRNA gegenüber den unbehandelten Zelllinien jedoch erhöht. Die Verminderung der LINE-1 RNA-Expression war zu allen Zeitpunkten deutlich. Die Zelllinie 5637 zeigte nach einer Behandlung von 24 Stunden keine Änderung der Expression, jedoch nach 48 Stunden. In der Langzeitbehandlung über 120 Stunden zeigten sich jedoch wiederum keine Unterschiede in der LINE-1 RNA-Expression.

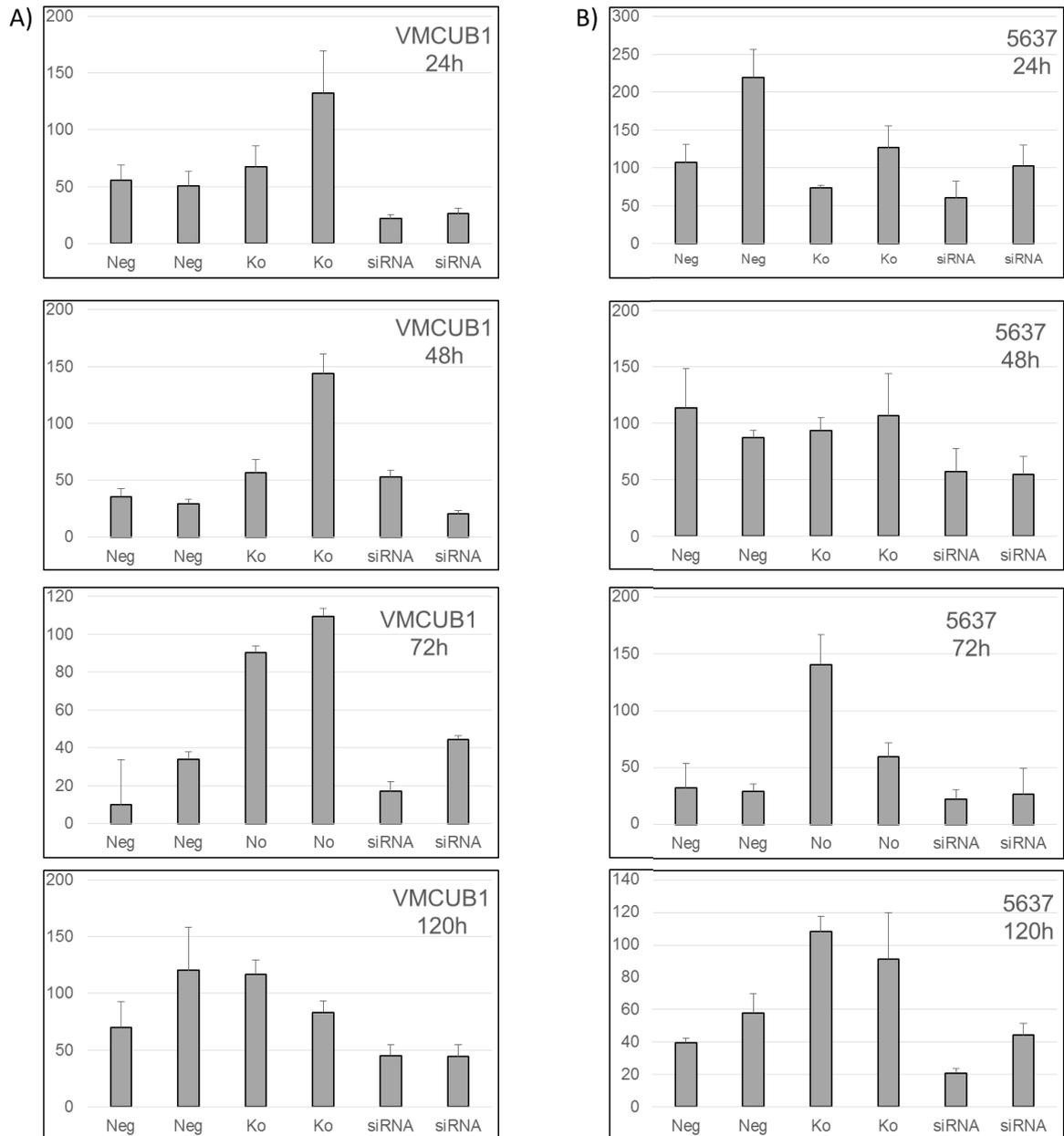


Abbildung 8: Expression von LINE-1 ORF1 nach Behandlung mit LINE-1 siRNA I. Untersucht wurden die LINE-1 RNA-Expression in den Zelllinien 5637 und VMCUB1 mittels qRT-PCR mit dem L1_ORF1 Assay. Sie wurden zwischen 24 und 120 Stunden mit LINE-1 siRNA I oder mit Kontroll-siRNA behandelt. Weiterhin ist die LINE-1 RNA-Expression von unbehandelten Zellen dargestellt. Alle Werte sind auf die TBP Expression normiert. Alle Messungen wurden doppelt durchgeführt und die Expression jeweils in Doppelwerten gemessen. Aufgrund der geringen Zahl der Datensätze war eine statistische Auswertung nicht möglich. Neg, unbehandelte Zelllinie; Ko/No, Behandlung mit Kontroll-siRNA.

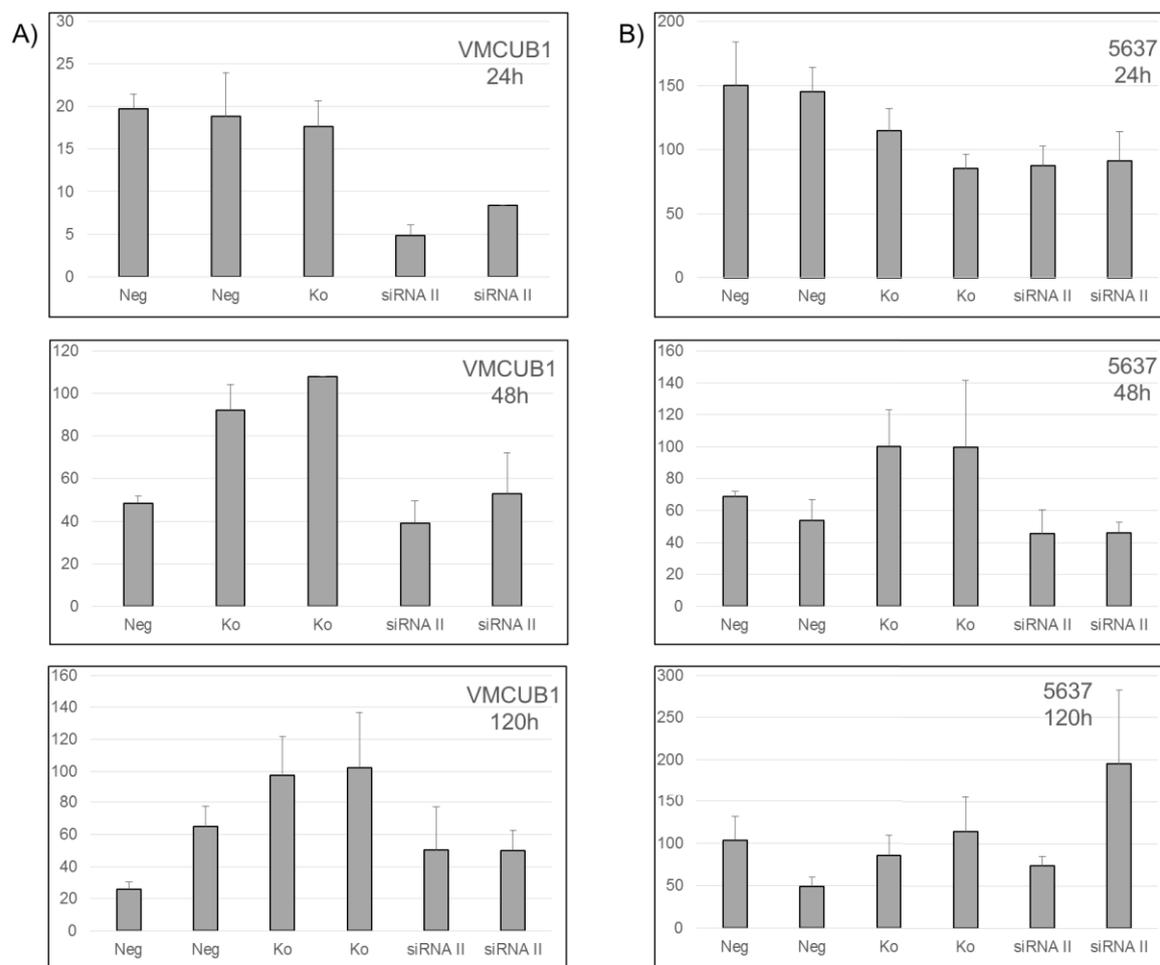


Abbildung 9: Expression von LINE-1 ORF1 nach Behandlung mit L1 siRNA II. Untersucht wurden die LINE-1 RNA-Expression Zelllinien 5637 und VMCUB1 mittels qRT-PCR und dem L1_ORF1 Assay. Sie wurden zwischen 24 und 120 Stunden mit LINE-1 siRNA II oder mit Kontroll-siRNA behandelt. Weiterhin ist die LINE-1 ORF1 Expression von unbehandelten Zellen dargestellt. Alle Werte sind auf die TBP Expression normiert. Alle Messungen wurden doppelt durchgeführt und die Expression jeweils in Doppelwerten gemessen. Aufgrund der geringen Zahl der Datensätze war eine statistische Auswertung nicht möglich. Neg, unbehandelte Zelllinie; Ko, Behandlung mit Kontroll-siRNA.

4.3.2 Zellmorphologie

Um Änderungen der Zellmorphologie zu verfolgen, wurden die beiden Urothelkarzinomzelllinien über 120 Stunden mit der LINE-1 siRNA I und II sowie der Kontroll-siRNA behandelt. Anschließend wurden Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop angefertigt. (Abbildung 10-13).

Die mit LINE-1 siRNA I und II behandelten Zellen der Zelllinie 5637 zeigten morphologische Unterschiede zu den unbehandelten und mit Kontroll-siRNA behandelten

Zellen (Abbildung 10 und 12). Es fällt ein unregelmäßiges Zellgefüge mit veränderten Zell-Zell-Kontakten auf. Die Kolonien sind kleiner und ihre Ränder sind schärfer begrenzt. Die Zellen enthalten mehr Granula.

Die Zellen der VMCUB1, die mit LINE-1 siRNA I und II behandelt wurden, zeigten diese Veränderungen verglichen mit den unbehandelten und den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen noch deutlicher als die Zellen der Zelllinie 5637 (Abbildung 11 und 13). Die Größe der einzelnen Zellen variierte stark und es gab eine Population von sehr großen, flächig wirkenden Zellen, ebenso vermehrt polynukleäre Zellen. Viele Zellen wiesen außerdem sehr lange, dünne Zellausläufer auf.

Die Zahl und die Größe der Kolonien nahm unter LINE-1 siRNA Behandlung in beiden Urothelkarzinomzelllinien deutlich gegenüber der Kontroll-siRNA ab. Noch stärker war dieser Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dies könnte auf einer Toxizität des Transfektionsreagenzes oder der siRNA an sich beruhen.

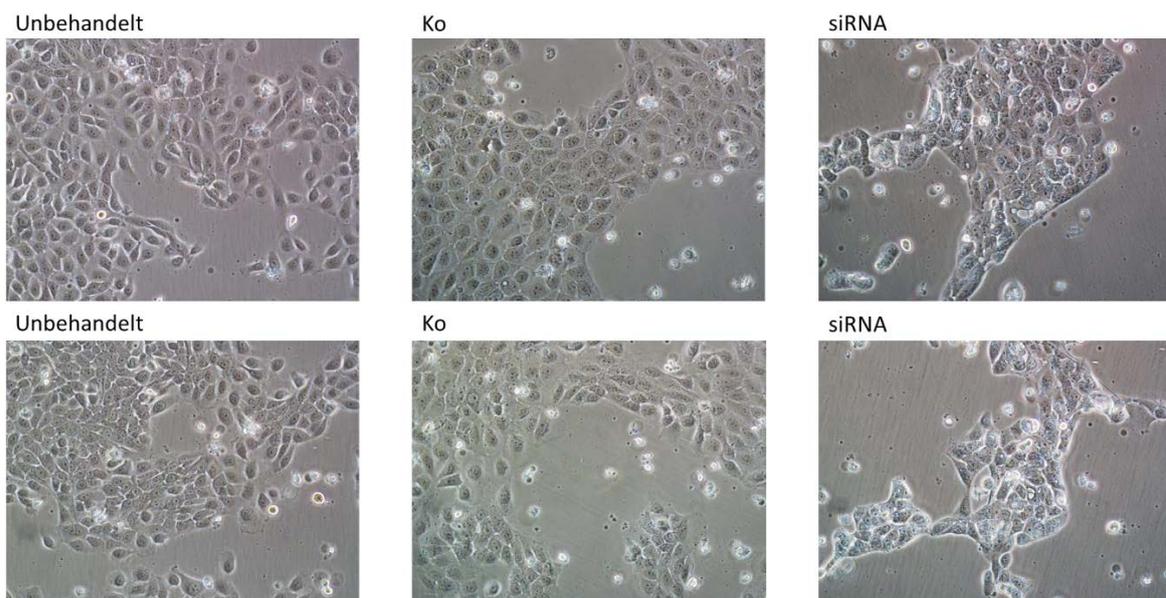


Abbildung 10: Veränderung der Zellmorphologie der Zelllinie 5637 unter LINE-1 siRNA I Behandlung über 120 Stunden. Die erste Spalte zeigt die Zellen ohne Behandlung. Die zweite Spalte zeigt die Zellen unter Behandlung mit der Kontroll-siRNA. Die Zellen der dritten Spalte wurden mit LINE-1 siRNA I transfiziert.

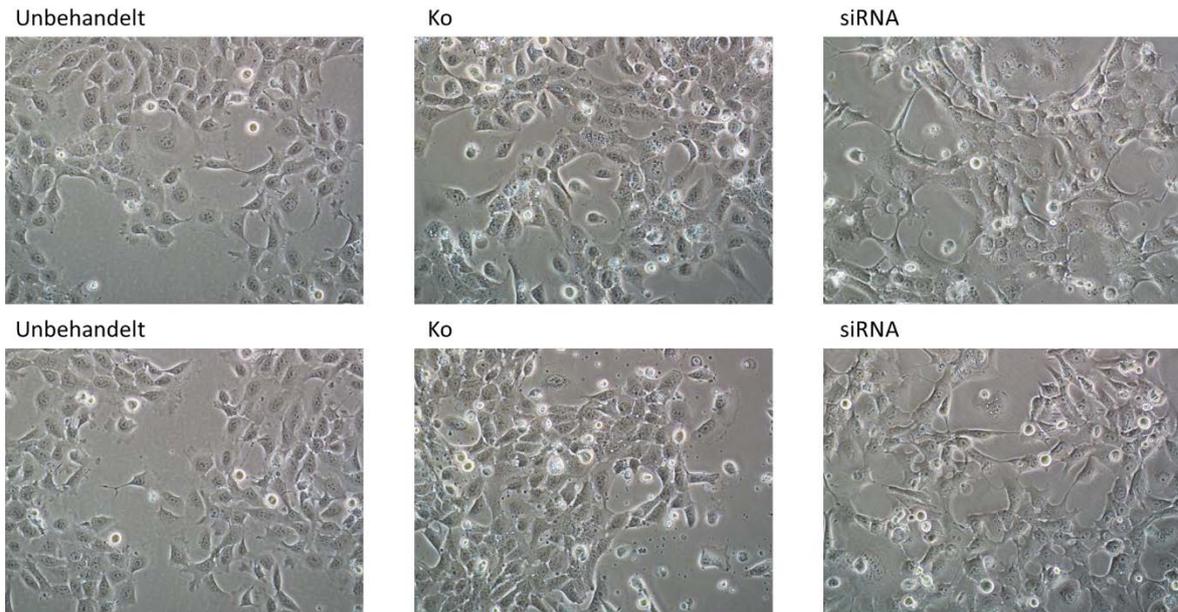


Abbildung 11: Veränderung der Zellmorphologie der Zelllinie VMCUB1 unter LINE-1 siRNA I Behandlung über 120 Stunden. Die erste Spalte zeigt die Zellen ohne Behandlung. Die zweite Spalte zeigt die Zellen unter Behandlung mit der Kontroll-siRNA. Die Zellen der dritten Spalte wurden mit LINE-1 siRNA I transfiziert.

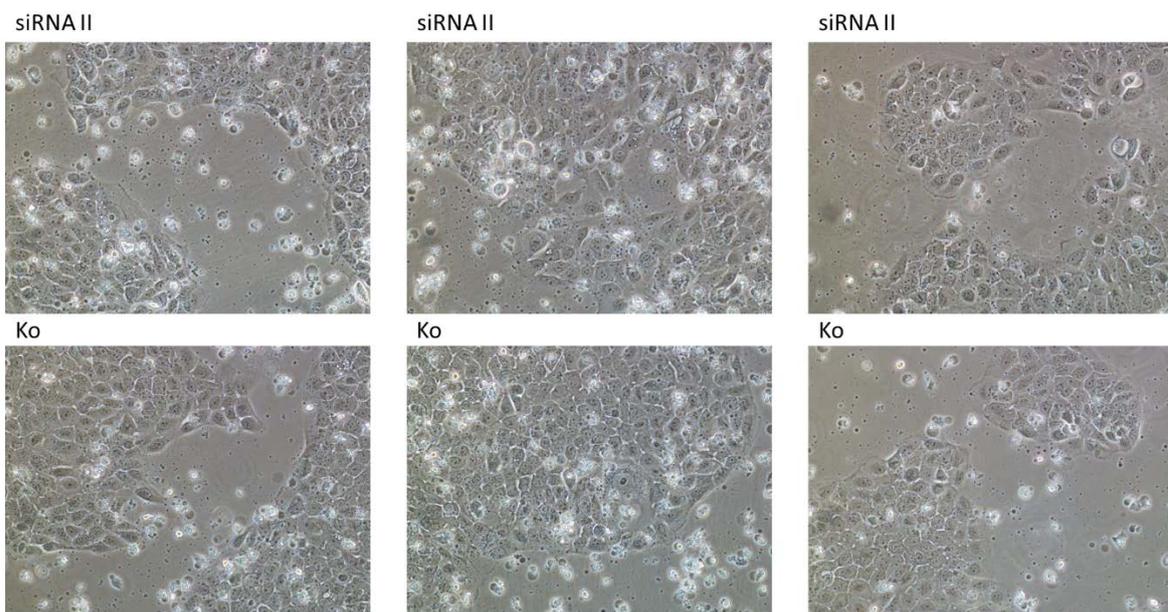


Abbildung 12: Veränderung der Zellmorphologie der Zelllinie 5637 unter LINE-1 siRNA II Behandlung über 120 Stunden. Die Zellen der ersten Zeile wurden mit LINE-1 siRNA II transfiziert. Die zweite Zeile zeigt die Zellen unter Behandlung mit der Kontroll-siRNA.

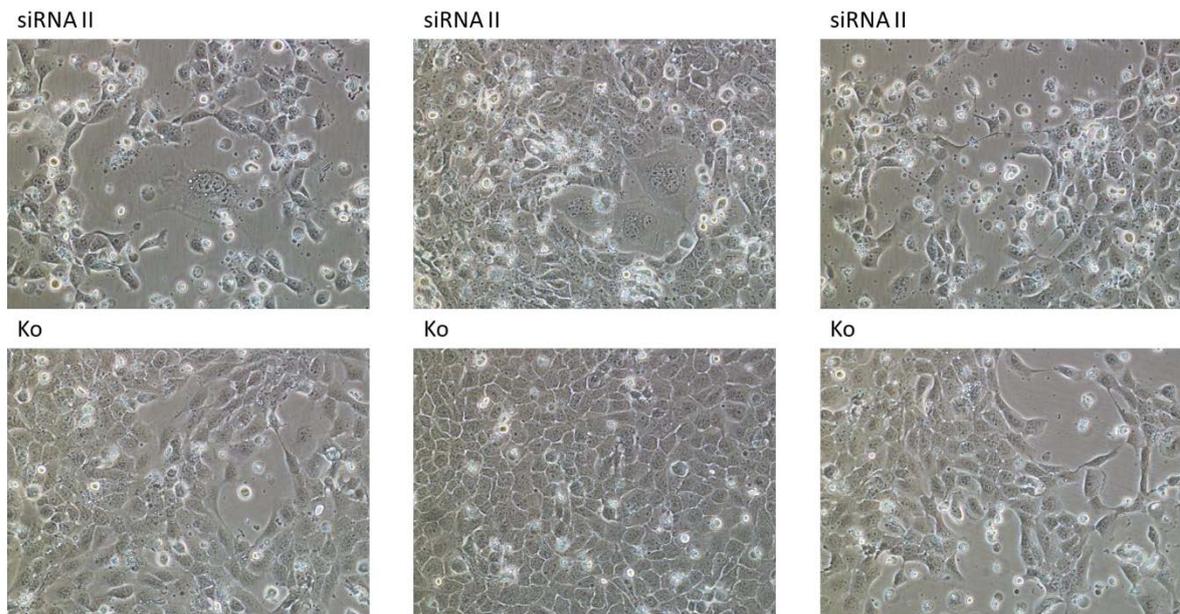


Abbildung 13: Veränderung der Zellmorphologie der Zelllinie VMCUB1 unter LINE-1 siRNA II Behandlung über 120 Stunden. Die Zellen der ersten Zeile wurden mit LINE-1 siRNA II transfiziert. Die zweite Zeile zeigt die Zellen unter Behandlung mit der Kontroll-siRNA.

4.3.3 ORF1 Proteinexpression

Um die Auswirkung des RNA-Knockdowns auf die LINE-1 kodierten Proteine zu untersuchen, wurde eine Western Blot Analyse mit dem Anti-L1 ORF1p Antikörper vorgenommen. Zelllysate der 72 und 120 Stunden mit der LINE-1 siRNA II behandelten Zellen der Zelllinien 5637 und VMCUB1 wurden für die Analyse verwendet. Die Konstanz der Proteinkonzentration wurde durch die Expression des Proteins β -Aktin dargestellt.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analyse. Es ist deutlich, dass es in beiden Zelllinien zu einer starken Suppression des ORF1p Proteins durch die Behandlung mit der LINE-1 siRNA II kommt. In diesem Western Blot war durch die längere Exposition auch die basale Expression des LINE-1 ORF1p in der Zelllinie 5637 nachzuweisen (vgl. Abbildung 7).

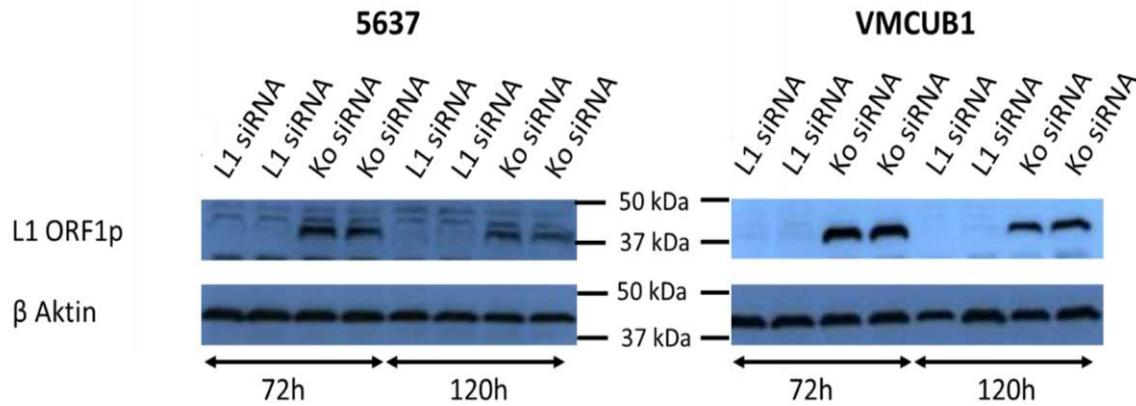


Abbildung 14: Der Western Blot zeigt die ORF1 Proteinexpression in den Urothelkarzinomzelllinien 5637 und VMCUB1 nach Behandlung mit L1 siRNA nach 72 und nach 120 Stunden. 1. AK: anti ORF1p (1:2000 dil), 2. AK: anti rabbit HRP (1:30000). Als Kontrolle der Proteinkonzentration wurde β -Aktin verwendet. Die Expositionszeit ist länger als in Abbildung 7, dadurch ergibt sich eine erkennbare Bande für die niedrige ORF1 Proteinexpression in der Zelllinie 5637.

4.3.4 Zellviabilität unter der LINE-1 siRNA Behandlung

Um zu klären, ob sich der Anteil der lebenden Zellen in der Zellkultur durch die Behandlung mit LINE-1 siRNA ändert, wurde die Zellviabilität mittels des CellTiterGlo Assays detektiert. Dazu wurden die Zelllinien 5637 und VMCUB1 für 120 Stunden mit LINE-1 siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt.

Die Ergebnisse des Testes zeigt Abbildung 15. Die Zellviabilität der Zelllinie VMCUB1 sank durch die Behandlung mit der LINE-1 siRNA I und II hoch signifikant (LINE-1 siRNA I: Mann-Whitney U-Test: $p=0,001$; LINE-1 siRNA II: Mann-Whitney U-Test: $p=0,001$), bei der Behandlung mit der LINE-1 siRNA I um durchschnittlich 40%, bei der Behandlung mit LINE-1 siRNA II um 50%. Bei der Zelllinie 5637 nahm die Zellviabilität unter der Behandlung mit der LINE-1 siRNA I sehr signifikant um 23% ab (LINE-1 siRNA I: Mann-Whitney U-Test: $p=0,007$); dagegen kam es unter der Behandlung mit der LINE-1 siRNA II zu einer Steigerung der Zellviabilität um durchschnittlich 38%, die ebenfalls signifikant war (LINE-1 siRNA II: Mann-Whitney U-Test: $p=0,021$).

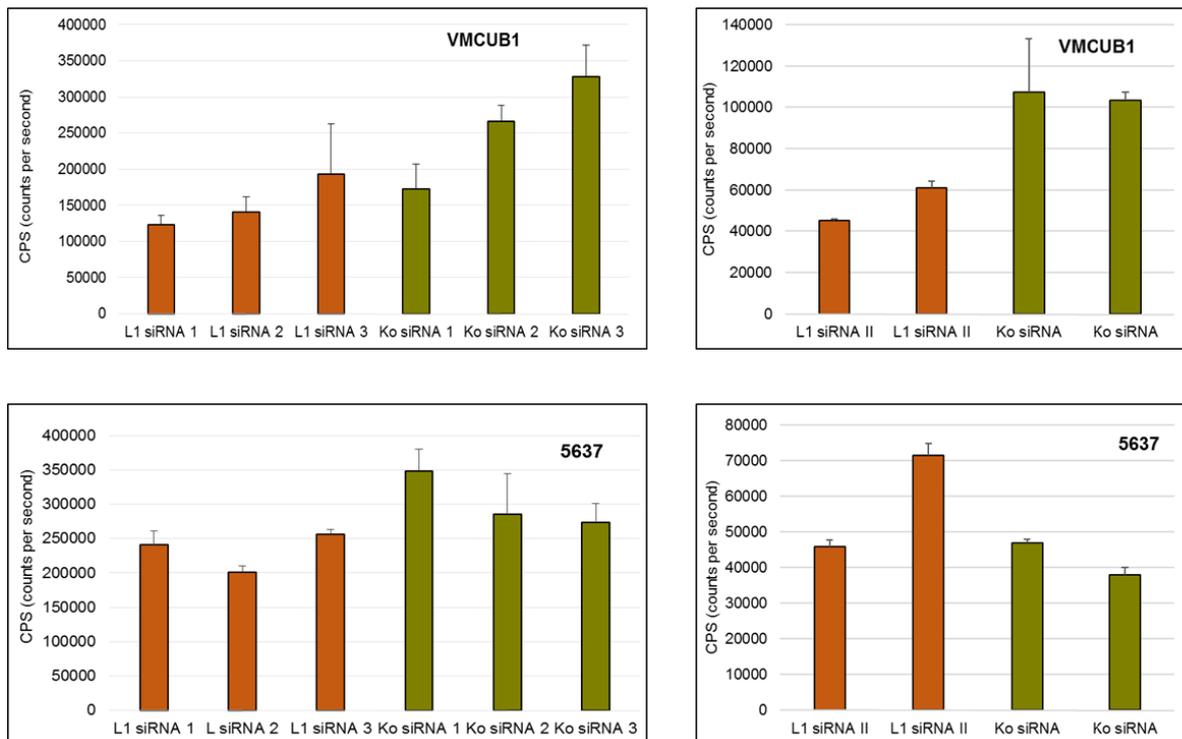


Abbildung 15: Messung der Lumineszenz in CPS (Counts per second) nach Anwendung des Celltiter Glo Assays. Die Behandlung der Zelllinien VMCUB1 und 5637 erfolgte zuvor über 120 Stunden mit LINE-1 siRNA oder mit Kontroll-siRNA. Die obere Bildreihe zeigt die Zelllinie VMCUB1 nach der Behandlung mit LINE-1 siRNA I links und nach Behandlung mit LINE-1 siRNA II rechts. Die untere Bildreihe zeigt die Zelllinie 5637 ebenfalls nach Behandlung mit LINE-1 siRNA I links und mit LINE-1 siRNA II rechts. Jede Probe wurde in Quadruplikaten gemessen. Standardabweichung ist angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (Ergebnisse s. Text).

4.3.5 Seneszenz Assay der LINE-1 siRNA behandelten Zellen

Um zu untersuchen, ob die morphologischen Veränderungen der Zellen unter der LINE-1 siRNA Behandlung durch Seneszenz zu erklären sind, wurde ein SA- β -Galaktosidase Assay durchgeführt, der die Vermehrung von Lysosomen in seneszenten Zellen detektiert. Dabei färben sich seneszente Zellen blau. Die Urothelkarzinomzelllinien 5637 und VMCUB1 wurden für 120 Stunden mit LINE-1 siRNA oder mit Kontroll-siRNA behandelt.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse des β -Galaktosidase-Assays in der Zelllinie VMCUB1. Die oberen Bilder und das Bild unten links wurden nach LINE-1 siRNA Behandlung aufgenommen. In den Zellen nach LINE-1 siRNA Behandlung erkennt man seneszente Zellen. Diese weisen eine perinukleäre granuläre Blaufärbung auf. Zu erkennen ist, dass sowohl große, flächige als auch kompaktere Zellen gefärbt sind, wobei die Zellpopulation

der flächigen Zellen eine deutlichere Färbereaktion aufweist. Noch deutlicher wird dies unter der Behandlung mit der LINE-1 siRNA II (Abbildung 17). Unter der Behandlung mit Kontroll-siRNA zeigt sich eine unspezifische Blaufärbung, die nicht speziell die perinukleäre Region der Zellen betrifft.

In der 5637 Zelllinie stellt sich weder nach Behandlung der Zellen mit LINE-1 siRNA noch mit Kontroll-siRNA eine Färbung dar. Hier ist nur die Behandlung mit LINE-1 siRNA II dargestellt (Abbildung 18).

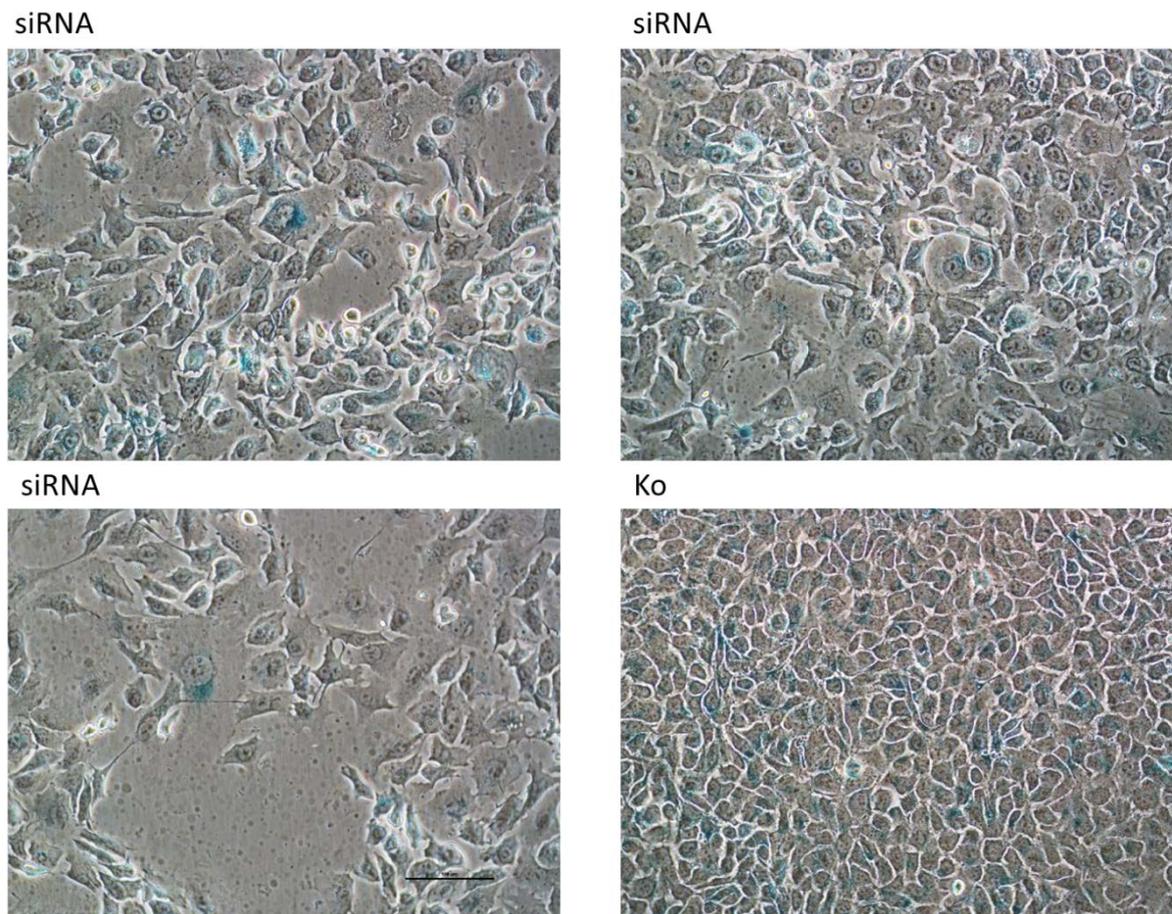
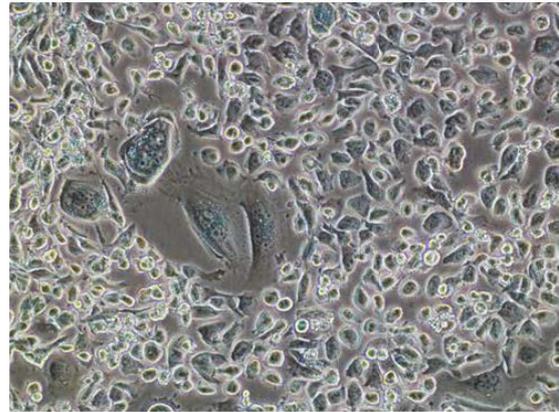
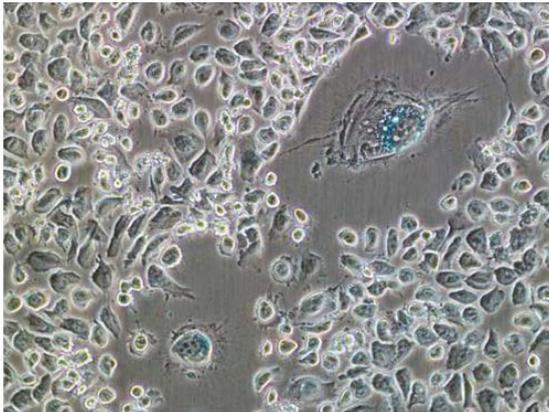
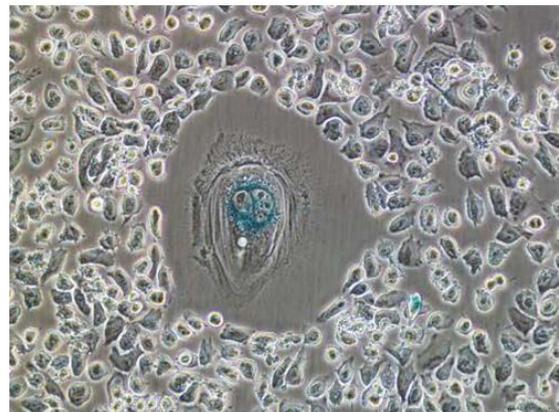
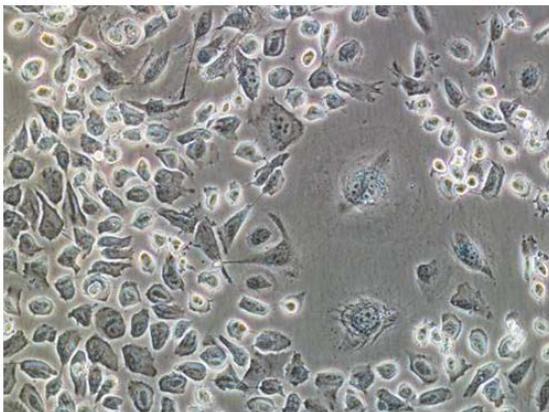


Abbildung 16: SA- β -Galaktosidase Assay nach Behandlung der Urothelkarzinomzelllinie VMCUB1 mit LINE-1-siRNA I über 120 Stunden. Die oberen und die linke Abbildung zeigen Aufnahmen nach LINE-1 siRNA I Behandlung, die rechte untere nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. Die Blaufärbung der perinukleär konzentrierten Lysosomen zeigt seneszente Zellen an. (Ko: Kontroll-siRNA; siRNA: LINE-1 siRNA I)

siRNA II



siRNA II



Ko

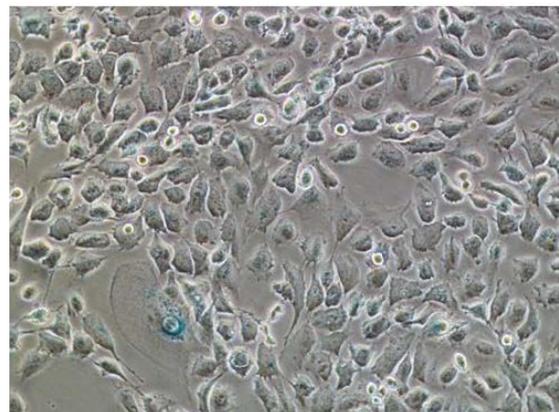
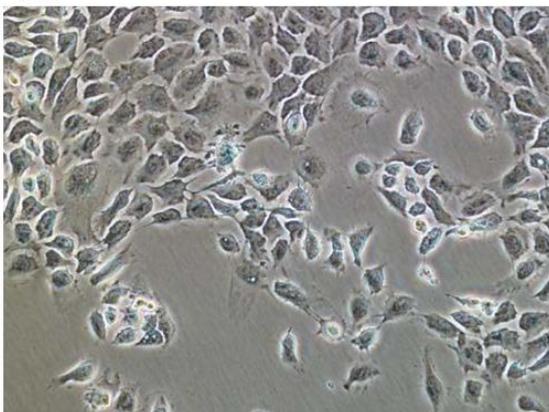
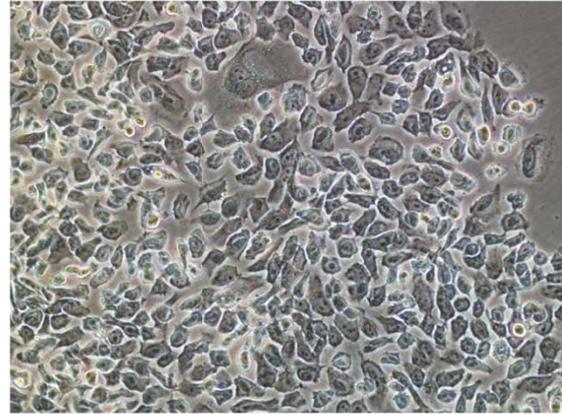
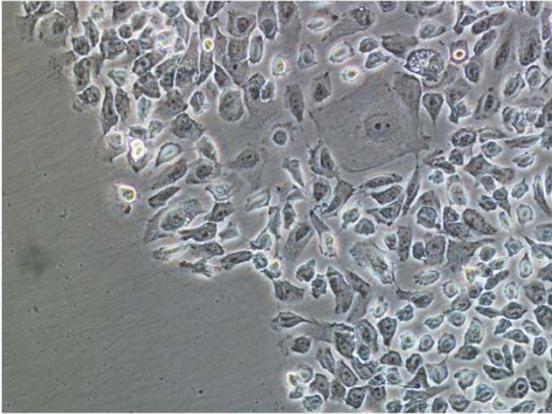


Abbildung 17: SA- β -Galaktosidase Assay nach Behandlung der Urothelkarzinomzelllinie VMCUB1 mit LINE-1-siRNA II über 120 Stunden. Die oberen Abbildungen zeigen Aufnahmen nach LINE-1 siRNA II Behandlung, die unteren nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. Die Blaufärbung der perinukleär konzentrierten Lysosomen zeigt seneszente Zellen an. (Ko: Kontroll-siRNA; siRNA: LINE-1 siRNA II)

siRNA II



Ko

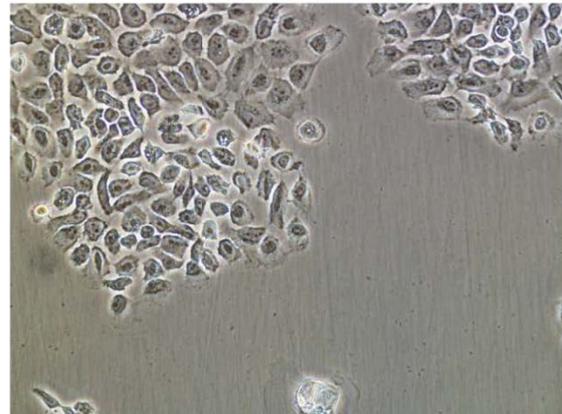
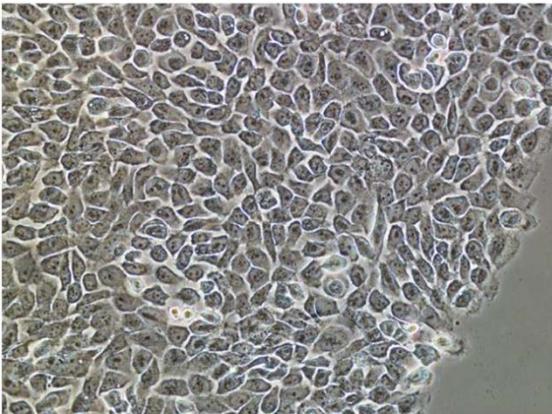


Abbildung 18: SA- β -Galaktosidase Assay nach Behandlung der Urothelkarzinomzelllinie 5637 mit LINE-1-siRNA II über 120 Stunden. Die oberen Abbildungen zeigen Aufnahmen nach LINE-1 siRNA II Behandlung, die unteren nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. Die Blaufärbung der perinukleär konzentrierten Lysosomen zeigt seneszente Zellen an. (Ko: Kontroll-siRNA; siRNA: LINE-1 siRNA II)

4.4 Behandlung dreier Urothelkarzinomzelllinien mit Efavirenz

Efavirenz ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der nichtnukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren. Es ist beschrieben, dass die Behandlung mit Efavirenz in Karzinomzelllinien eine Änderung der Differenzierung, des Zellwachstums und der Genexpression auslöst [122].

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung der Urothelkarzinomzelllinien mit Efavirenz das Zellwachstum durch eine verstärkte Apoptose hemmt, wurde ein Caspase Assay durchgeführt. Dieser detektiert die Aktivität der Caspasen 3 und 7, die ein Merkmal der Apoptose darstellt.

Behandelt wurden die Urothelkarzinomzelllinien VMCUB1, 5637 und T24. VMCUB1 und 5637 wurden für die Untersuchung ausgewählt, da sie starke Unterschiede in der LINE-1 RNA- und Proteinexpression aufweisen (vgl. Kapitel 4.3). T24 wurde ausgewählt, da sie bei einem im Vorfeld angefertigten MTT-Test schon bei Behandlung mit geringen Konzentrationen von Efavirenz eine Abnahme der Zellviabilität zeigt.

Die Behandlung der Zellen mit Efavirenz für den Caspase-Assay erfolgte über 72 h. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit Puromycin.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 aufgeführt. Sowohl die VMCUB1 als auch die 5637 Zellen zeigten keine Steigerung der Caspase-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. T24 wies eine deutliche höhere Caspase-Aktivität unter der Behandlung mit Efavirenz auf. Allerdings fällt bei der T24 auf, dass unter der Behandlung mit Puromycin die Caspase-Aktivität sinkt.

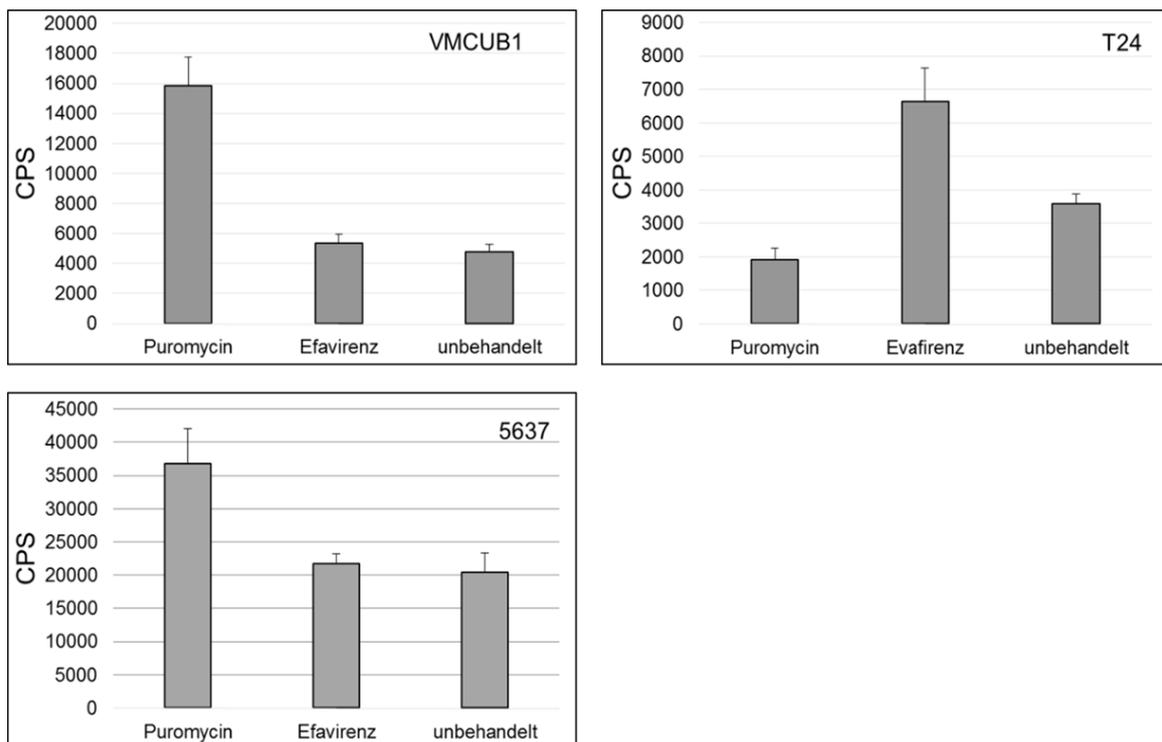


Abbildung 19: Die Balkendiagramme stellen die Caspase 3/7-Aktivität in den Zelllinien VMCUB1, T24 und 5637 nach 72-stündiger Behandlung mit 10 ng/µl Efavirenz dar. Puromycin dient als Positivkontrolle. Gemessen wurde die Lumineszenz nach Anwendung des Caspase Assays.

4.5 Humane endogene Retroviren: DNA-Methylierung und RNA-Expression

4.5.1 HERV-K DNA-Methylierung

Nachdem sich in den bisherigen Untersuchungen eine DNA-Hypomethylierung von LINE-1 bestätigt hat, stellt sich die Frage, ob es auch zu DNA-Methylierungsveränderungen der humanen endogenen Retroviren kommt. Besonderes Interesse gilt dabei der jüngsten Gruppe, den HERV-K. Zwei etablierte Assays, die die DNA-Methylierung der LTRs von HERV-K17 und H22q detektieren, wurden verwendet. Diese Assays ermöglichen die Analyse von jeweils sechs CpG-Dinukleotiden in den LTRs der Proviren HERV-K17 und H22q (inzwischen auch als HERV-K32 bezeichnet). Bisulfit-konvertierte DNA der Urothelkarzinomzelllinien, der normalen Urothelzellkulturen und dem DNA Gewebeset wurde mit diesen Assays in der Pyrosequenzierung untersucht. Als Kontrollen wurden karzinomassoziierte Fibroblasten, immortalisierte Urothelzellen (TERT-NHUC) und frisches benignes Urothelgewebe aus dem Harnleiter verwendet.

Die Methylierung des H22q LTR stellt Abbildung 20 dar. Die DNA des H22q LTR ist in den Urothelkarzinomzelllinien gegenüber den normalen Urothelzellkulturen hypermethyliert (Mann-Whitney U-Test; $p=0,036$). Dabei ist die Hypermethylierung in den papillären Zelllinien stärker ausgeprägt als in den muskelinvasiven Urothelkarzinomzelllinien.

Andersherum stellt sich das Bild in der Methylierungsanalyse der Gewebe dar (Abbildung 22). Hier kommt es zu einer signifikanten Abnahme der H22q LTR-Methylierung in den Tumorgeweben (72,4 %) im Vergleich zu den normalen Geweben (88,6 %; Mann-Whitney U-Test; $p=0,009$).

In der DNA-Methylierungsanalyse des HERV-K17 LTR wiesen die normalen Urothelzellkulturen einen sehr niedrigen Methylierungsstatus auf; in den Urothelkarzinomzelllinien kam es zu einer Hypermethylierung (Abbildung 21). Auch hier lag ein Unterschied zwischen den papillären und den muskelinvasiven Urothelkarzinomzelllinien vor. Während die Methylierung in den muskelinvasiven Zelllinien signifikant stieg (Mann-Whitney U-Test; $p<0,001$), zeigten die papillären Zelllinien nur eine geringe Hypermethylierung (Mann-Whitney U-Test; $p=0,635$). In den papillären Zelllinien war die Methylierung des HERV-K 17 LTR sehr variabel. Auf der einen Seite zeigten die Zelllinien BFTC-905 und SW1710 eine starke DNA-Methylierung, auf der anderen Seite war in den Zelllinien BC61, J28, RT4, RT112 und UMUC3 der HERV-K17 LTR nur sehr schwach methyliert.

Die Analyse der HERV-K17 LTR Methylierung im Gewebeset ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen normalem und Tumorgewebe (Abbildung 22). Es zeigte sich jedoch unerwartet ein großer Unterschied in der Methylierung zwischen normalen Urothelzellkulturen (Median: 3,7%) und normalen Urothelgeweben (Median: 44,9%).

Zwischen der HERV-K17 LTR und der H22q LTR Methylierung wurde eine starke, positive Korrelation festgestellt (Spearman's rho=0,669; p<0,001).

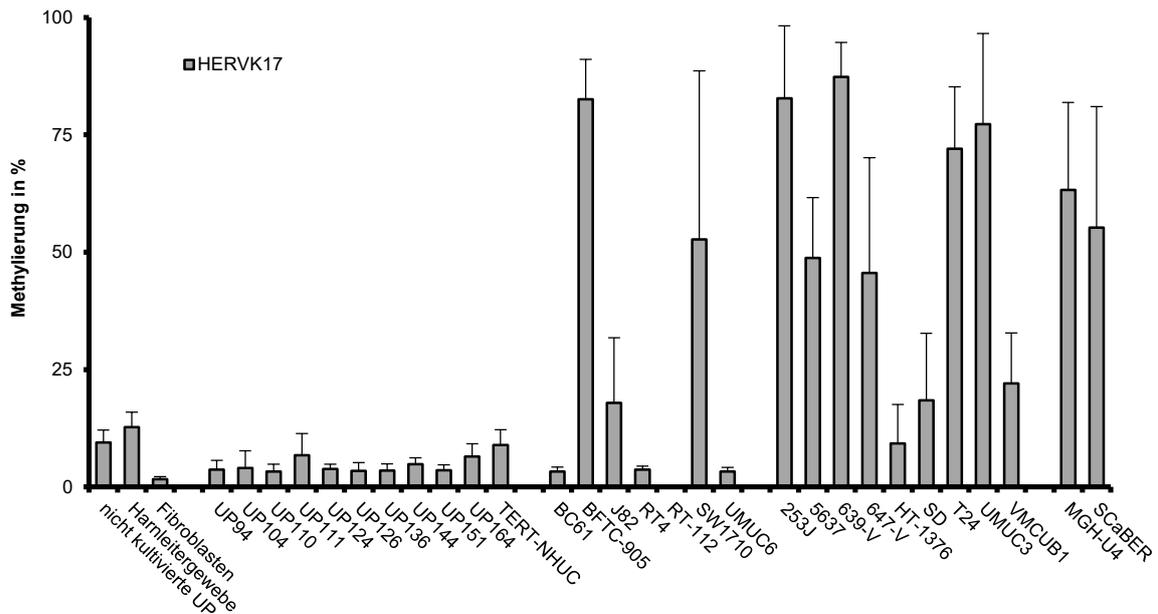


Abbildung 20: Methylierung von sechs CpG-Dinukleotiden im HERV-K17 LTR in normalen Urothelzellkulturen und Urothelkarzinomzelllinien. Die Analyse wurde mittels Pyrosequenzierung vorgenommen. Auf der Y-Achse ist die prozentuale Methylierung aufgetragen.

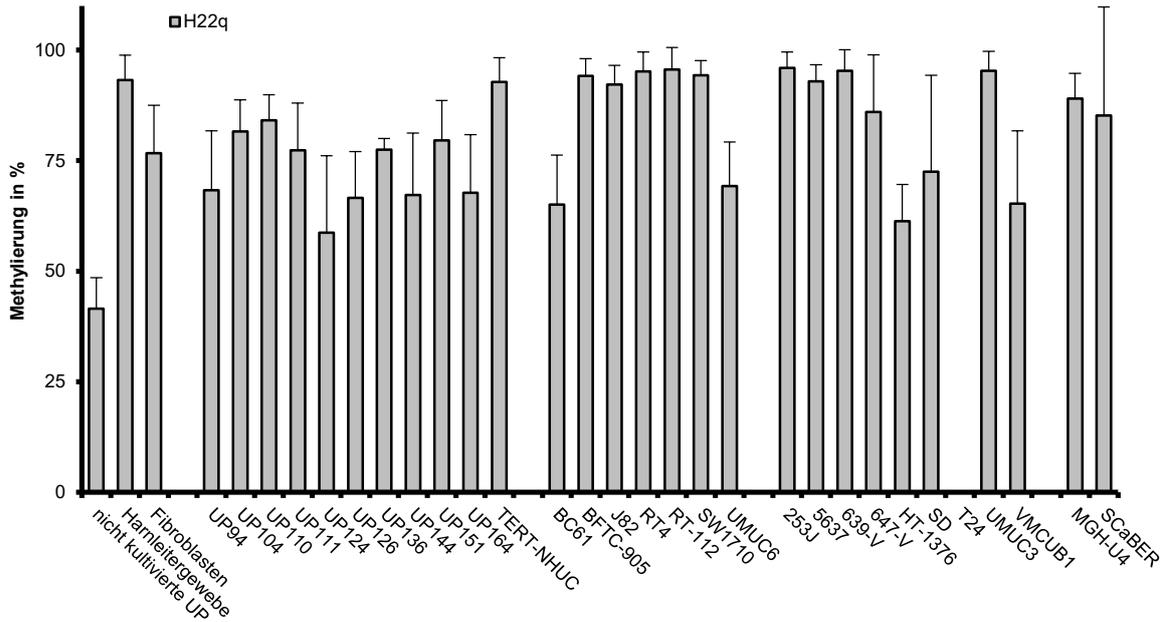


Abbildung 21: Methylierung von sechs CpG-Dinukleotiden im HERV-K 22q LTR in den Urothelzellkulturen und Urothelkarzinomzelllinien. Die Analyse wurde mittels Pyrosequenzierung vorgenommen. Auf der Y-Achse ist die prozentuale Methylierung aufgetragen.

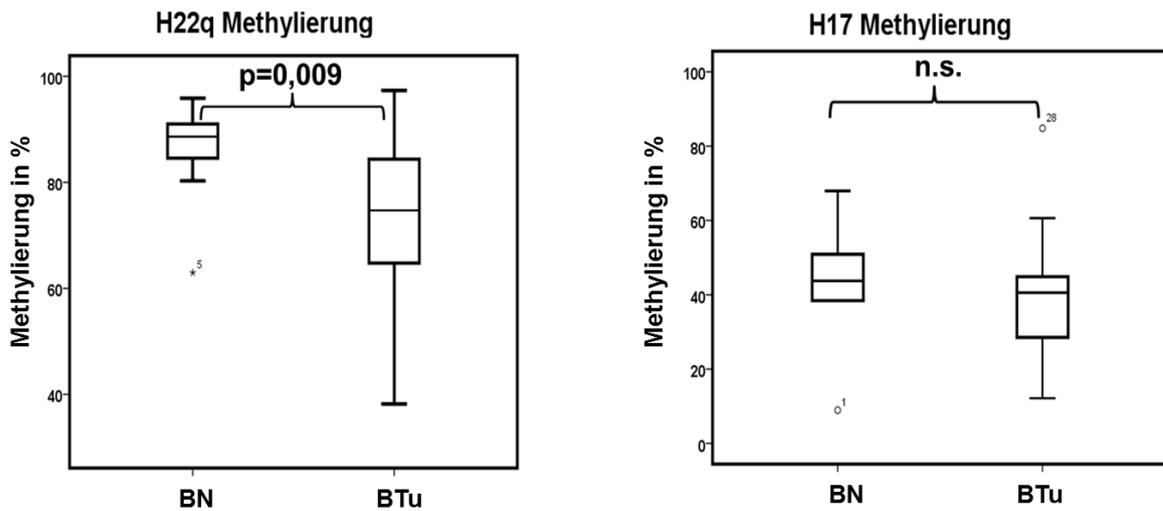


Abbildung 22: HERV-K17 LTR und H22q LTR-Methylierung in benignem Gewebe und Tumorgewebe. Auf der Y-Achse ist die prozentuale Methylierung aufgetragen. BN, benignes Urothelgewebe (n=12); BTu, Urothelkarzinome (n=22)

4.5.2 HERV-K RNA-Expression

Nachdem sich Änderungen der DNA-Methylierung der beiden HERV-Ks Proviren gezeigt haben, wurde die Expression dieser und weiterer HERV-Ks untersucht. Bei der Auswahl der Assays wurde zunächst auf vier zurückgegriffen, die aus Vorarbeiten am Prostatakarzinom etabliert waren, H11q23.3, H17, H22q, und H.21. Eine *in silico* Analyse von Stauffer et al., 2004 hat die Expression verschiedener HERV-K Elemente in unterschiedlichen Geweben untersucht und beschrieb die Expression von 14 Elementen im benignen Harnblasengewebe. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden 14 Assays für die quantitative RT-PCR etabliert. Abbildung 23 gibt einen Überblick über das schrittweise Vorgehen zur Expressionsanalyse dieser HERV-Ks im Urothelkarzinom.

In einem ersten Schritt wurden die 18 ausgewählten HERV-K Elemente mittels qualitativer RT-PCR an den Urothelkarzinomzelllinien getestet. In zehn Fällen konnten dabei Transkripte in einem Ausmaß nachgewiesen werden, das weitere Analysen sinnvoll erschienen ließ. Diese Elemente wurden im Anschluss mittels qRT-PCR an demselben Probenset untersucht. Bei fünf HERV-K Assays stellte sich hierbei ein Unterschied in der Expression zwischen normalen Urothelzellkulturen und Urothelkarzinomzelllinien dar. Daraufhin wurde die qRT-PCR an den RNA Gewebeproben vorgenommen.

4.5.3 HERV-K RNA-Expression in den Zelllinien und Geweben

Die Analyse der HERV-K17 Expression mittels qualitativer RT-PCR ergab starke Banden in den normalen Urothelzellkulturen und in BC61, RT4 und UMUC6 (Abbildung 24). Die Zelllinien BC61, RT4 und UMUC6 wurden aus Tumoren papillären Ursprungs etabliert. In der qRT-PCR stellte sich dieses Ergebnis ebenfalls dar. Es kommt demnach zu einer Verminderung der HERV-K17 RNA-Expression in den meisten Urothelkarzinomzelllinien mit den beschriebenen Ausnahmen BC61, RT4 und UMUC6 (Abbildung 25).

Vergleicht man HERV-K 17 DNA-Methylierung und Expression, zeigt sich, dass BC61, RT4 und UMUC6 eine ausgeprägte Hypomethylierung aufweisen und eine hohe Expression. Hier scheint ein inverser Zusammenhang zu bestehen. Über alle Urothelkarzinomzelllinien hinweg kann jedoch keine signifikante Korrelation zwischen HERV-K 17 Methylierung und Expression festgestellt werden.

Die Analyse der HERV-K102 Expression ergab eine signifikante Abnahme der Expression in den Urothelkarzinomzelllinien gegenüber den normalen Urothelzellkulturen (Mann-Whitney U-Test; $p < 0,013$) (Abbildung 25).

Die Analyse der Expressionen von HERV-K17, HERV-K3q12.3, HERV-K12q14.1, HERV-K113 und HERV-K10 an dem RNA-Gewebeset ergab keine signifikante Änderung zwischen normalen Urothelgeweben und Tumorgeweben.

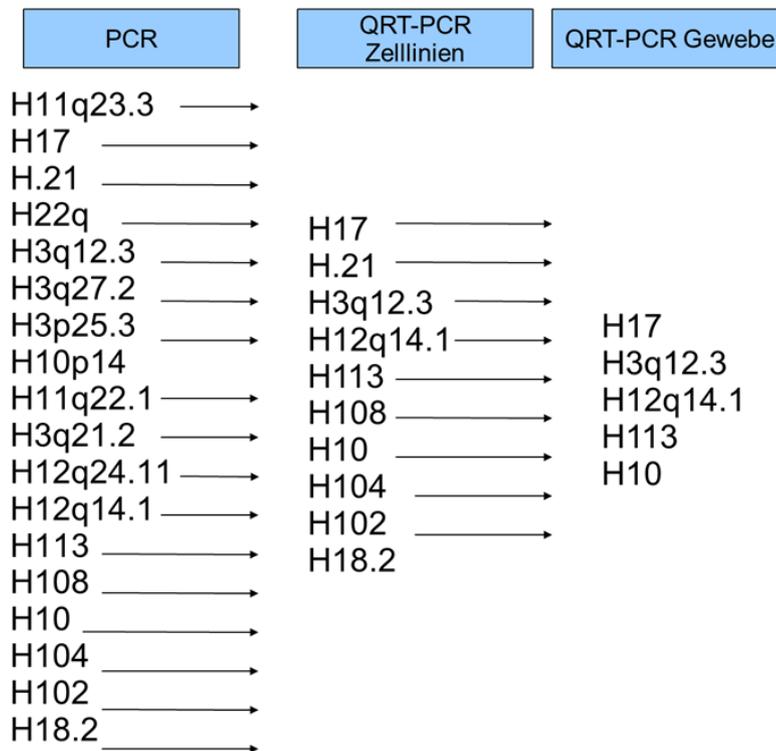


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Auswahl der HERV-K Elemente für die RNA Analyse und der Vorgehensweise.

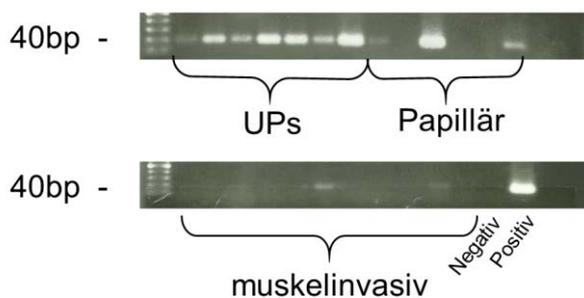


Abbildung 24: RT-PCR der HERV-K 17 RNA Expression. Die ersten sechs Proben in der oberen Reihe stammen aus normalen Urothelzellkulturen (UPs), die sechs folgenden aus papillären Urothelkarzinomzelllinien. In der unteren Zeile stellen sich die muskelinvasiven Zelllinien dar. Es folgt erst die Leer- und dann die Positivkontrolle MDAPCa 2b. bp: Basenpaare.

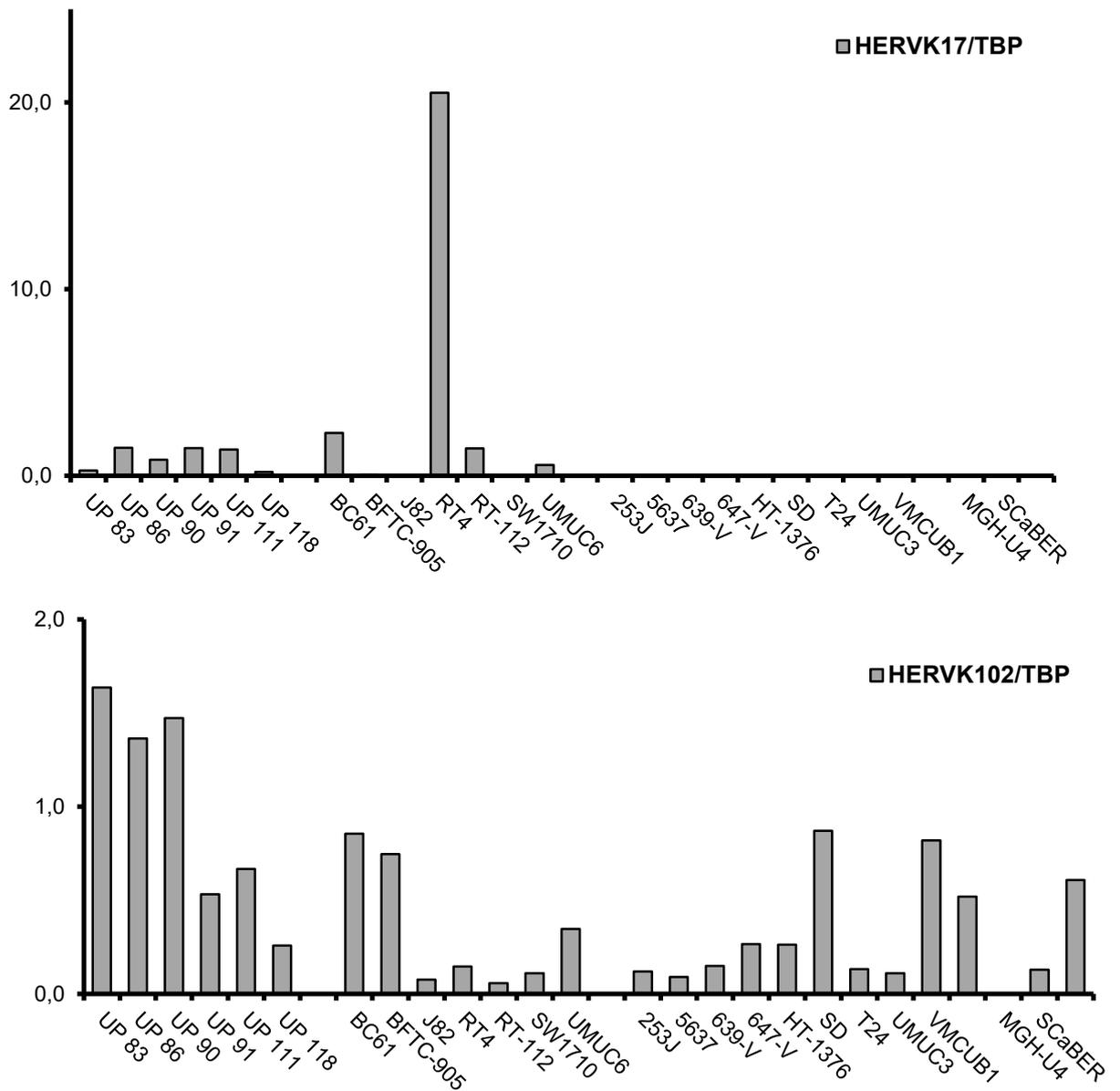
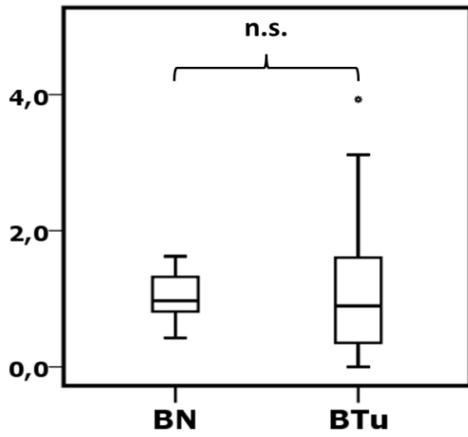
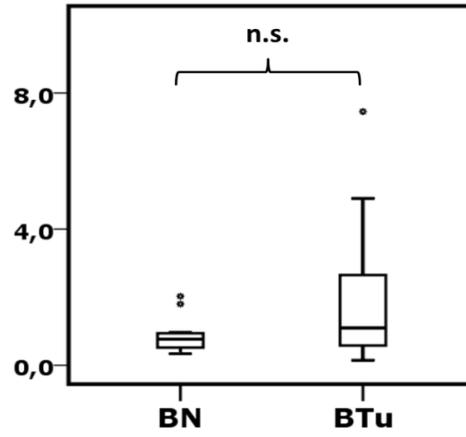


Abbildung 25: RNA-Expression von HERV-K17 (oben) und HERV-K102 (unten) in den normalen Urothelzellkulturen und Urothelkarzinomzelllinien getestet mittels qRT-PCR. TBP diente zur Normalisierung.

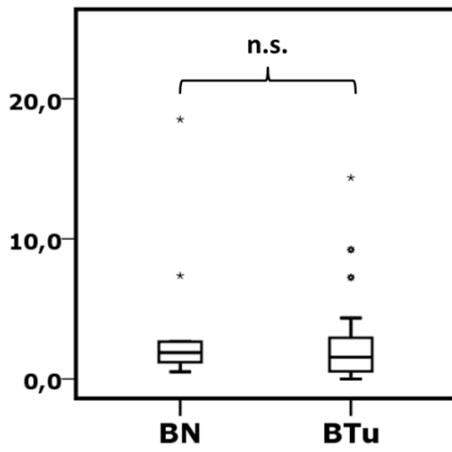
H3q12.3/TBP



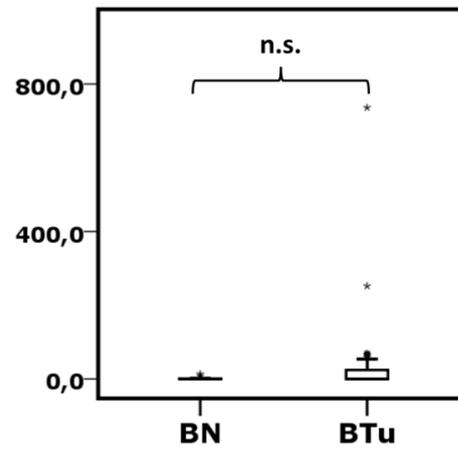
HERV-K10/TBP



H12q14.1/TBP



H17/TBP



HERV-K113/TBP

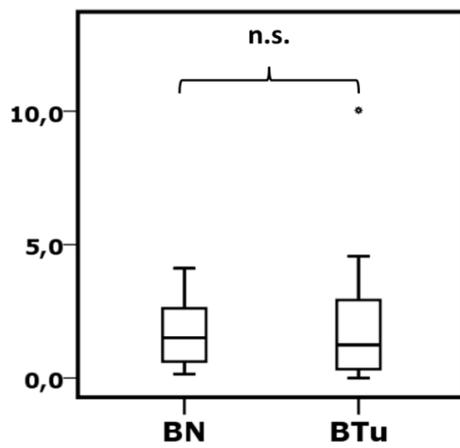


Abbildung 26: RNA-Expression der HERV-K Elemente, die am RNA Gewebeset mittels qRT-PCR untersucht wurden. BN, benignes Urothelgewebe (n=11); BTu, Urothelkarzinome (n=24). Alle Werte wurden auf TBP-Expression normalisiert.

4.6 Alu RNA-Expression in den Zelllinien und im Gewebe

Die häufigsten *short interspersed nuclear elements* (SINEs) im humanen Genom sind Alu Elemente; AluYa5 und AluYb8 sind zwei wichtige, aktive Familien der Retroelemente. Um zu ermitteln, ob es auch bei diesen während der Tumorgenese zu Veränderungen der RNA-Expression kommt, wurde die RNA-Expression von AluYa5 und AluYb8 mittels etablierter Assays in der qRT-PCR gemessen. Die getesteten RNA-Proben stammen aus den Urothelkarzinomzelllinien, normalen Urothelzellkulturen und dem RNA Gewebeset.

Abbildung 27 stellt die Ergebnisse der qRT-PCR dar. Es wurden keine signifikanten Änderungen der RNA-Expression von AluYa5 und AluYb8 in den Urothelkarzinomzelllinien festgestellt. Es zeigt sich nur eine geringe Tendenz der papillären Urothelkarzinomzelllinien zur einer verminderten RNA-Expression beider Alu Elemente. Dahingegen lag in den muskelinvasiven Urothelkarzinomzelllinien eine leichte Tendenz zur RNA-Expressionssteigerung vor. Die Expressionen von Alu Ya5 und Alu Yb8 korrelierten positiv miteinander (Spearman's rho=0,990; p<0,001).

In den Tumorproben zeigte sich eine hoch signifikante Alu Yb8 RNA-Expressionssteigerung gegenüber den normalen Geweben (Mann-Whitney U-Test; p<0,001). Die Expression von Alu Ya5 änderte sich nicht signifikant, tendiert aber ebenfalls zu einer Steigerung. In den Gewebeanalysen korrelierten die beiden Alu Expressionen jedoch nicht miteinander.

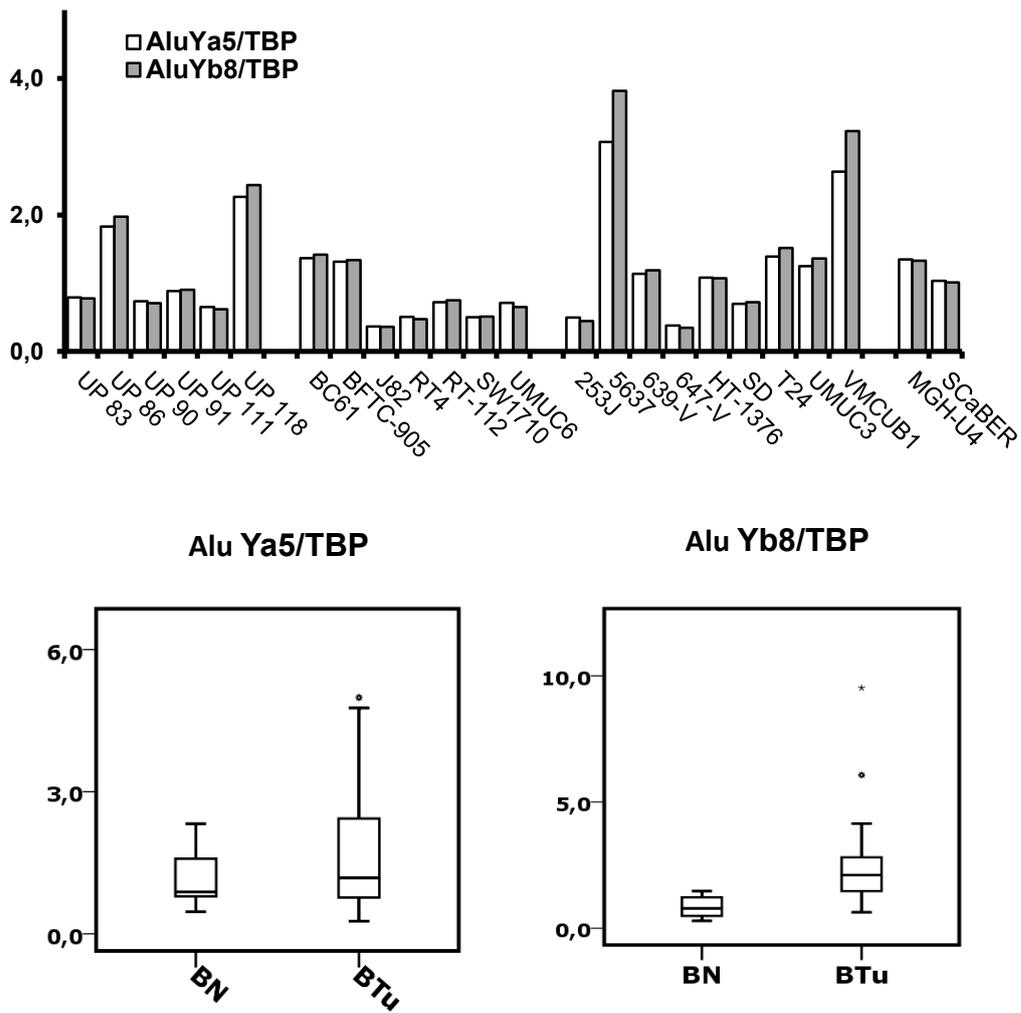


Abbildung 27: RNA-Expression von Alu Yb8 und Alu Ya5. Oben: Expression in den Urothelkarzinomzelllinien und den kultivierten benignen Urothelzellen. Unten: Expression gemessen im RNA-Gewebesetz; BN, benignes Urothelgewebe (n=11); BTu, Urothelkarzinome (n=24). Alle Werte wurden auf TBP normiert.

5 Diskussion

5.1 Globale Hypomethylierung und Änderungen der LINE-1 Promotor DNA-Methylierung im Urothelkarzinom der Harnblase

Die globale DNA-Hypomethylierung ist ein Phänomen, das im Urothelkarzinom der Harnblase früh und konstant auftritt und nicht zuletzt repetitive Elemente betrifft [115-117]. Die LINE-1 DNA-Methylierung reflektiert dabei weitgehend die globale DNA-Methylierung, da LINE-1 etwa 17% unseres Genoms darstellt [22, 96]. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die bisherigen Erkenntnisse, indem sie zeigen, dass die LINE-1 DNA-Methylierung in Urothelkarzinomzelllinien gegenüber den normalen Urothelzellkulturen signifikant abnimmt [115, 129]. Auch in den Gewebeproben ist die DNA-Methylierung signifikant vermindert, unabhängig vom Tumorgrading. In muskelinvasiven Zelllinien kommt es jedoch zu einer stärkeren Abnahme der DNA-Methylierung als in den papillären Zelllinien. Aufgrund der geringen Anzahl an papillären Tumoren im Gewebeset lässt sich nicht beurteilen, in wieweit die DNA-Hypomethylierung in muskelinvasiven Tumorgeweben ebenfalls ausgeprägter als in papillären Tumoren ist.

Ob die globale DNA-Hypomethylierung erst während der Tumorgenese entsteht oder ob sie in Vorläuferzellen *a priori* vorhanden ist und zur Tumorentstehung beiträgt, ist bisher nicht abschließend geklärt und scheint vom Ursprungsgewebe oder der Ursprungszelle abhängig. Einige Tumorarten zeigen, wie das Urothelkarzinom der Harnblase, eine frühe und konstante DNA-Hypomethylierung, die ebenfalls unabhängig vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen ist. Im Magenkarzinom findet die globale DNA-Hypomethylierung bereits beim Übergang von der intestinalen Metaplasie zum Adenom statt, also in einer sehr frühen Phase der Tumorgenese [130]. Im Adenokarzinom der Prostata ist die globale DNA-Hypomethylierung vor allem bei fortgeschrittenen und metastasierten Karzinomen stark ausgeprägt [131-133], nur in einer Arbeit wurde eine DNA-Hypomethylierung schon in einer frühen Phase der Tumorgenese, der intraepithelialen Neoplasie gefunden [134]. Im Adenokarzinom der Lunge ist die globale DNA-Hypomethylierung ebenfalls beschrieben. Hier zeigte sich in den Präkanzerosen wie der atypischen adenösen Hyperplasie und dem *Carcinoma in situ* noch kein Anhalt für eine globale DNA-Hypomethylierung [135], z.T. wurde sogar eine DNA-Hypermethylierung von LINE-1 beschrieben [136]. Die globale DNA-Hypomethylierung tritt hier erst in den invasiven Tumoren auf. In den letzteren beschriebenen Karzinomen ist sie mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [130, 131, 136]. In einer aktuellen Studie wurden neben der globalen LINE1 Hypomethylierung spezifische LINE-1 Loci in

Tumorgewebe auf ihren Methylierungsstatus untersucht, um festzustellen, ob einzelne LINE-1 Elemente oder einzelne CpG Dinukleotide innerhalb des LINE-1 Promotor speziell von der Hypomethylierung betroffen sind. Es zeigte sich, dass zwar einzelne CpG Dinukleotide besonders häufig von der Hypomethylierung betroffen sind, jedoch keine individuellen LINE-1 Loci [118].

Welche Bedeutung die globale DNA-Hypomethylierung und die daraus folgende LINE-1 DNA-Hypomethylierung für die Tumorgenese und -progression hat, ist ebenfalls nicht geklärt. Daher soll zunächst beleuchtet werden, wie und warum es in der normalen Zelle zu einer dichten Methylierung der Retroelemente kommt. Daraus lassen sich Hinweise zu den Folgen einer LINE-1 DNA-Hypomethylierung ableiten und wie sie die Tumorgenese und -progression beeinflussen kann. Die DNA-Methylierung der repetitiven Einheiten erfolgt in einer bestimmten Phase der fetalen Entwicklung, der Gastrulation, durch die Methyltransferasen Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt1 und bleibt in somatischen Zellen weitgehend erhalten [89]. Der Großteil dieser methylierten Retroelemente, v.a. LINE-1, liegt gehäuft in heterochromatischen Bereichen der DNA und somit in G-Banden [22]. Wahrscheinlich hat ein Selektionsdruck zu dieser ungleichen Verteilung geführt, da eine Lage innerhalb der Gene zu einer störenden Interferenz während der Transkription führen könnte [137]. Ein anderer Mechanismus, über den es in den männlichen Keimzellen zu einer Methylierung von LINE-1 kommt, basiert auf piRNA (*PIWI-interacting RNA*) und deren rekrutierten Proteinkomplexen (PIWI/Argonaute Protein Komplex), die nur in Keimzellen exprimiert werden [138-140]. In somatischen Zellen sind andere nicht-kodierende RNAs aus der Klasse der lncRNA (*long non-coding RNA*) beschrieben, die an epigenetischer Regulation und Heterochromatinbildung beteiligt sind und zur Inaktivierung von Retroelementen beitragen [141-144]. Des Weiteren wirkt PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein*) in Keimzellen und hämatopoetischen Stammzellen als Repressor von LINE-1 indem er sowohl eine DNA-Methylierung der ORF2 Sequenz und des LINE-1 Promotor induziert und zu Heterochromatinbildung führt, als auch direkt mit der LINE-1 mRNA interagiert [145]. Innerhalb von Genen gelegene LINE-1 Elemente können durch eine PLZF induzierte Hypermethylierung die Expression dieses Gen unterbinden [145]. Auch das Protein SIRT6 (Sirtuin 6) bindet an die 5'-UTR des LINE-1 und rekrutiert Proteine für Heterochromatinbildung [146]. SIRT6 ist unter anderem mit dem Alterungsprozess assoziiert. Es dissoziiert bei zellulärem Stress von der LINE-1 5'-UTR und wird zu DNA-Doppelstrangbrüchen verlagert [146]. Dieser Mechanismus könnte in Tumoren zu einer Hypomethylierung von LINE-1 beitragen, da es hier häufiger zu DNA Schäden kommt.

Eine Veränderung des Heterochromatins im Rahmen der globalen Hypomethylierung kann bereits Folgen haben, da es viele Funktionen in der Organisation der DNA-Transkription und der DNA Reparatur ausübt. Um nur ein Beispiel zu nennen, schirmt es transkriptionell aktive Einheiten voneinander ab. Im Heterochromatin der G-Banden liegen außerdem gewebespezifische Gene [147]. So ist es vorstellbar, dass die LINE-1 Hypomethylierung in Tumoren zu einer veränderten Genexpression führt, die nicht nur Retroelemente, sondern auch gewebespezifische Gene betrifft. Dies kann einerseits mit der offeneren Chromatinstruktur zusammenhängen, die die Expression steigert, zum anderen könnten aber auch vorher voneinander abgeschirmte Transkriptionseinheiten miteinander interagieren.

Um die Beschreibung des Einflusses von Retroelementen auf das Heterochromatin zu vervollständigen, soll an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass Retroelemente die Ausbreitung des Heterochromatins in benachbarte Gene selbst unterbinden. Vor allem bidirektional transkribierte Elemente können als Barriere dienen. Dies ist für SINE Elemente in der Regulation der Gene für das GH (*growth hormon*) der Hypophyse, für den Dioxin-Rezeptor in der Maus [148, 149] und für *inverse repeats*, Teilstrukturen von einigen Retroelementen, in *Schizosaccharomyces pombe* [150] beschrieben.

Neben der globalen Hypomethylierung kommt es in Tumoren gehäuft zu einer fokalen Hypermethylierung von bestimmten Genen [151]. LINE und besonders SINE liegen häufig nahe von Transkriptionsstartstellen solcher Gene, die in Tumoren nicht hypermethyliert werden [152]. Sie scheinen einen gewissen Schutz vor der fokalen Hypermethylierung bieten zu können. Es ist jedoch auch das Gegenteil beschrieben. Das Tumorsuppressorgen von Hippel-Lindau und das Gen für E-Cadherin (*CDH1*) sind von Alu Elementen flankiert. In manchen Tumorgeweben sind diese Gene durch eine fokale Hypermethylierung inaktiviert. Die Alu Elemente könnten als Ausgangspunkte für eine *de novo* Methylierung fungieren [100].

5.2 Änderungen der LINE-1 RNA- und Protein Expression im Urothelkarzinom der Harnblase

Zur RNA-Expression von LINE-1 Sequenzen in Urothelkarzinomen lagen bisher nur wenige publizierte Daten vor [115]. Die RNA-Expressionsanalysen in den Tumorgewebeproben ergaben eine signifikante Steigerung der Expression von LINE-1 Transkripten, die durch LINE-1 5'-Assay erfasst werden, gegenüber den entsprechenden benignen Kontrollproben. Der Assay erfasst vor allem Vollängen LINE-1 Elemente. Der LINE-1 3'-Assay, der die Expression einer größeren Anzahl, auch teilweise deletierten

Elemente erfasst, zeigte nur eine Tendenz zur Steigerung. In den Urothelkarzinomzelllinien fällt ebenfalls eine Verlagerung hin zur LINE-1 5'-Expression gegenüber den benignen Urothelzellkulturen auf. Zusammenfassend ergibt sich hieraus eine Verschiebung der Expression zu den Volllängen-LINE-1 Elementen. In den Urothelkarzinomzelllinien korrelierte die Methylierung negativ mit der LINE-1 5'-Expression, wenn auch nicht signifikant. Die Korrelation zu der LINE-1 3'-Expression ist geringer. Die vermehrte RNA-Expression von Volllängen LINE-1 gegenüber deletierten Elementen wurde auch in anderen Tumoren wie dem Prostatakarzinom und in Keimzelltumoren beobachtet [107, 153].

Es stellt sich die Frage, wodurch die Verschiebung der RNA-Expression in Richtung der Volllängen LINE-1 Elemente zu erklären ist. Dabei ist zu bedenken, dass viele LINE-1 Elemente innerhalb von Genen liegen und ihre Transkription in benignen Geweben wesentlich durch die Expression des umgebenden Gens bestimmt wird [22, 154]. Da die innerhalb von Genen gelegenen LINE-1 Elemente oft verkürzt sind, und dies vor allem in der 5' Region, werden sie eher durch den LINE-1 3' Assay erfasst. Die RNA-Expression solcher unvollständiger LINE-1 Elemente geht nicht von ihrem internen Promotor, sondern eher von dem Promotor des entsprechenden Gens aus. Bei Volllängen-Elementen findet die Initiation der Transkription eher am internen Promotor der erhaltenen 5'-UTR statt, sollte dieser nicht durch epigenetische Mechanismen inaktiviert sein. Daher ist zu erwarten, dass eine Hypomethylierung von LINE-1 Promotoren, wie sie im Urothelkarzinom nachweisbar ist, vor allem zu einer gesteigerten Transkription von Volllängen LINE-1 Elementen führt. Der Anstieg des Verhältnisses von RNA, die mit dem 5'-Assay erfasst wird, ist mit dieser Interpretation gut vereinbar.

Wenn in Urothelkarzinomen vor allem die RNA-Expression von LINE-1 Volllängeelementen steigt, stellt sich weiterhin die Frage, ob dies durch einzelne LINE-1 Elemente ausgelöst ist oder ob es sich um eine Steigerung über viele oder alle Elemente hinweg handelt. Die Analyse von acht individuellen LINE-1 Elementen legt nahe, dass die erste Alternative zutrifft. Die acht getesteten Elemente, allesamt intakte Mitglieder der evolutionär neuen L1Hs-Famile, wiesen nur eine RNA-Expression am Rande der Messbarkeit in den Urothelkarzinomzelllinien auf. Dies bedeutet, dass acht von etwa 100 Elementen nicht für die RNA-Expressionssteigerung verantwortlich sind; wahrscheinlich ist die gesteigerte Expression auf einige wenige andere Elemente zurückzuführen. Um welche Elemente es sich im Urothelkarzinom handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Notwendig wäre hierfür eine RNA-Sequenzierungstechnik mit hoher Genauigkeit über längere Abschnitte hinweg, um die sehr ähnlichen LINE-1

Sequenzen voneinander eindeutig zu unterscheiden. In wenigen Arbeiten konnten jedoch die Expression einzelner LINE-1 Elemente nachgewiesen werden. In der Teratokarzinomzelllinie NTera2D1 wurde die Expression von Vollängen LINE-1 beschrieben, um welche es sich handelt, konnte zu dem Zeitpunkt, im Jahr 1988, jedoch nicht bestimmt werden [153]. Eine neue Arbeit hat einzelne LINE-1 Elemente mit *next generation sequencing* unter anderem in Karzinomzelllinien untersucht. Hier konnten individuelle LINE-1 Elementen für die LINE-1 RNA-Expressionssteigerung verantwortlich gemacht werden, wobei sich die individuellen LINE-1 Elemente zwischen den Tumorentitäten unterscheiden [155]. Es bleibt zu untersuchen, ob spezifische LINE-1 Elemente für das Urothelkarzinom der Harnblase im Allgemeinen gefunden werden können oder ob diese interindividuell verschieden sind.

Die ORF1 Proteinexpression in den Urothelkarzinomzelllinien steht im Zusammenhang mit der LINE-1 5'-RNA-Expression. Bis auf BC61 zeigten alle Zelllinien mit einer hohen LINE-1 5'-Expression eine ORF1 Proteinexpression. Der ORF1 kodiert für ein RNA-bindendes Protein, das eine wichtige Rolle in der reversen Transkription übernimmt. Die Expression von ORF2p wurde mangels eines geeigneten Antikörpers und der zu erwartenden niedrigen Expression nicht untersucht; sie verläuft in der Regel parallel zu der Expression von ORF1p, wobei sie deutlich niedriger ist als die von ORF1p [156]. Es ist zu erwarten, dass die Wirtszelle auch die LINE-1 Proteine kontrolliert und reguliert. So konnte sowohl Taylor et al 2013 als auch Goodier et al 2013 zeigen, dass eine Vielzahl von Proteinen mit dem LINE-1 Ribonukleoprotein interagiert. In der Arbeit von Taylor et al 2013 wurden zwei Proteine näher untersucht. UPF1 ist ein Protein des NMD-Signalweges (*Nonsense-mediated mRNA Decay*), das unter anderem bicistronische mRNA abbaut. So ist es naheliegend, dass eine Überexpression von UFP1 (*Up-frameshift1*) zu einer Verminderung der LINE-1 mRNA mit ihren zwei offenen Leserahmen führt. Verwunderlich ist jedoch, dass eine Interaktion von UFP1 und ORF2p zu einer Steigerung der Retrotransposition führt. Auch PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*), ein an der DNA-Reparatur beteiligtes Enzym, interagiert mit dem ORF2p des LINE-1 Ribonukleoproteins und steigert die Rate der Retrotransposition [157]. Zusammenfassend scheint die Wirtszelle durch eine Ko-Evolution die unkontrollierte LINE-1 Expression zu supprimieren, jedoch eine gezielte Expression zuzulassen. Die Expression von ORF1p und ORF2p führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen, Insertionen und zu einer genomischen Instabilität, die die Tumorprogression antreiben kann [36]. Wie sich die Expression von LINE-1 RNA und Proteinen im Urothelkarzinom der Harnblase auswirkt, wurde mit einem *Knockdown* Experiment untersucht.

5.3 Auswirkungen eines LINE-1 *Knockdowns* auf Urothelkarzinomzelllinien

Es ist unklar, inwieweit die gesteigerte Expression der LINE-1 Elemente als Folge der Tumorgenese zu betrachten ist oder inwieweit sie aktiv dazu beiträgt und ob daher eine Unterdrückung der LINE-1 Aktivität zu einer Tumorsuppression führen kann. LINE-1 Elemente wurden in diversen Studien experimentell supprimiert. Sciamanna et al., 2005 zeigten beispielsweise, dass eine LINE-1 Suppression mittels RNAi oder eine pharmakologische Hemmung der reversen Transkriptase in Prostatakarzinom- und Melanom-Zelllinien ein vermindertes Wachstum und eine gesteigerte Expression von Differenzierungsmarkern auslöst [121].

In dieser Arbeit wurde LINE-1 RNA durch Behandlung von Urothelkarzinomzelllinien mit LINE-1 siRNA supprimiert und für einige Experimente die reverse Transkriptase pharmakologisch gehemmt. Die beiden verwendeten Zelllinien VMCUB1 und 5637 unterschieden sich im Ausmaß ihrer basalen LINE-1 Expression. Die Transfektion mit den beiden LINE-1 siRNAs führte jeweils zu einer deutlichen Repression der LINE-1 RNA gegenüber der Behandlung mit Kontroll-siRNA. Auffällig waren starke Expressionsschwankungen in den biologischen Doppelwerten vor allem unter LINE-1 siRNA oder Kontroll-siRNA Behandlung und eine gesteigerte LINE-1 RNA-Expression durch die Kontroll-siRNA gegenüber den unbehandelten Zellen. Möglicherweise induziert die siRNA Behandlung an sich eine LINE-1 RNA-Expression. Dies könnte als eine Art Stressreaktion der Zellen auf die Transfektionsreagenzien oder die siRNA zu werten sein, wie auch eine Zunahme der Expression von Alu-Elementen unter zellulärem Stress beschrieben ist [80], zumal es zu einer Ko-Expression von LINE-1 und Alu Elementen unter Stress kommen kann [158]. Ein verantwortlicher Mechanismus kann die Abnahme der epigenetische Kontrolle von LINE-1 durch PLZF (*Promyelocytic leukaemia zinc finger protein*) ein, die zu einer Abnahme der Methylierung führt [145]. Der LINE-1 *Knockdown* spiegelt sich auch im Proteinexpressionsmuster wider. Es kommt zu einer konstanten Verminderung der ORF1p Expression in beiden Zelllinien. Jedoch stieg unter der Behandlung mit der Kontroll-siRNA analog zur LINE-1 RNA die L1 ORF1p Expression an. Am deutlichsten ist dies an der Zelllinie 5637 zu erkennen, die zuvor kaum eine Proteinexpression des L1 ORF1p aufwies.

Im Unterschied zu den Ergebnissen in Prostatakarzinom- und Melanom-Zelllinien zeigten die LINE-1 siRNA transfizierten 5637 Zellen ein unregelmäßigeres Wachstum, veränderte Zell-Zell Kontakte und vermehrte perinukleäre Granula. In der Zelllinie VMCUB1 waren

diese morphologischen Veränderungen noch deutlicher. Auffällig war zudem eine Population von sehr großen, flächigen, unscharf begrenzten Zellen, die oft polynukleär waren. Diese Zellen konnten mit dem SA- β -Galaktosidase Assay als seneszent identifiziert werden. Des Weiteren zeigten die VMCUB1 Zellen besonders unter der ersten LINE-1 siRNA Behandlung lange, Dendriten-ähnliche Zellausläufer. Diese sind auch von Oricchio et al. 2007 in transfizierten Melanom-Zelllinien beschrieben und werden dort als Differenzierungsprozess interpretiert [124]. In beiden Zelllinien war die Kolonienzahl geringer und die Zellzahl sank. Der Viabilitäts-Assay verdeutlicht, dass es unter der Behandlung meist auch zu einer verminderten Zahl vitaler Zellen kommt; eine Ausnahme stellen die 5637 Zellen unter der Transfektion mit der LINE-1 siRNA II dar - hier gab es keinen Unterschied zu der Kontrolle. Zusammenfassend hat der LINE-1 *Knockdown* stärkere Effekte auf die Zelllinie VMCUB1, was durch eine a priori höhere LINE-1 RNA-Expression zu erklären ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich jedoch wenig mit den früher publizierten Arbeiten, da die Urothelkarzinomzelllinien weniger Zeichen einer Redifferenzierung, als vielmehr eine weitere Tendenz zur morphologischen Entdifferenzierung aufwiesen. Eine Verminderung der Zellzahl kann in diesem Fall nicht ausschließlich auf eine Senkung der Proliferation im Rahmen eines Differenzierungsvorgangs zurückgeführt werden, stattdessen kommt es eher zur vermehrten Apoptose.

Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine LINE-1 RNA-Expression auf die Zellbiologie hat und wie die Inhibition von LINE-1 RNA zu diesen divergenten Effekten führt. Man kann zunächst zwei unterschiedliche Ansätze verfolgen, zum einen die ursprüngliche Funktion der LINE-1 Elemente zu betrachten, sich über Retrotransposition im Genom zu vervielfältigen, zum anderen die Funktionen zu betrachten, die während der Evolution entwickelt wurden und zur normalen Zellphysiologie gehören. Hierzu zählt vor allem die Regulation der Expression protein-kodierender Gene durch LINE-1. Zu den bekannten Mechanismen, über die LINE-1 Elemente einen Einfluss auf die Expression anderer Gene nehmen, zählt auf DNA-Ebene die Verwendung von LINE-1 Promotoren durch andere protein-kodierende Gene [159], sowie die Mittranskription benachbarter Gene bei der Transkription von LINE-1 Sequenzen. Wenn in diesen Transkripten zur siRNA komplementäre LINE-1 RNA vorliegt, kann durch den *Knockdown* die Expression der Gene verhindert werden. Dies beträfe auf der einen Seite mRNA, die in den Karzinomzelllinien durch die DNA-Hypomethylierung von LINE-1 vermehrt transkribiert wird und auf der anderen Seite mRNA, die zum normalen Transkriptom der Zelle gehört. Hieraus könnten sich je nach supprimierter mRNA ganz unterschiedliche Effekte auf die Zellbiologie ergeben. Dabei kann die Transkription sowohl vom LINE-1 Antisense

Promotor als auch von dem internen LINE-1 Promotor ausgehen [45]. Im Folgenden soll ein Fall erörtert werden. Das MET Onkogen ist ein Beispiel für eine gesteigerte Transkription durch DNA-Hypomethylierung im Urothelkarzinom. Durch die DNA-Hypomethylierung des LINE-1 Antisense-Promotor im *MET* Onkogen kommt es zur Expression des alternativen LINE-1/MET Fusionsgenes im Urothelkarzinom der Harnblase und zur Aktivierung der MET-Rezeptor-Tyrosinkinase [116]. Die Aktivierung des verschiedener Signalwege durch *MET* führt zu einer Tumorprogression, Steigerung der Proliferation und Migration sowie zur Hemmung der Apoptose [160]. Die Hemmung eines solchen Fusionsgenes könnte zu einer Redifferenzierung und Hemmung der Zellteilung führen wie sie in anderen Arbeiten beschrieben ist [124]; jedoch könnte eine vermehrte Apoptose, wie wir sie berichten auch Folge einer Hemmung des LINE-1/MET Fusionsgenes sein. Weitere chimäre LINE-1 Transkripte wurden in Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen gefunden [161]. Ein besonderer Fall wurde im Hepatitis B induzierten hepatozellulären Karzinom beschrieben. Das Virus integrierte sich bei fast einem Viertel der untersuchten Karzinome an einen chr.8p11 Locus, der normalerweise transkriptionell inaktiv ist und in dem ein Vollängen LINE-1 Element liegt [162]. Es kommt zur Expression eines chimären Transkriptes des Hepatitis B Virus und LINE-1. Dieses Transkript kann als lncRNA den WNT Signalweg induzieren und proliferationsfördernd wirken [162]. Diese Beispiele zeigen, dass eine Aktivierung des LINE-1 Promotors direkten Einfluss auf die Tumorgenese und Progression haben kann. Zu den Aufgaben des LINE-1 Antisense Promotor als alternativem Promotor gehört die gewebespezifische Genexpression [163], sodass sich auch hieraus zelluläre Veränderungen ergeben können, sollte es zur Transkription von dem hypomethylierten Promotor kommen.

Betrachtet man die RNA von LINE-1, die innerhalb von Genen gelegen ist, können sich noch weitere Konsequenzen durch den LINE-1 *Knockdown* ergeben. So sind LINE-1 Elemente auch in Intronen zu finden. Entgegen der Erwartung, dass es bei einer starken LINE-1 Transkription zu einer Behinderung der Transkription des Wirts-Genes kommt, konnte gezeigt werden, dass die Transkription von LINE-1 und des Wirts-Genes in manchen Fällen synergistisch ist [164]. Dies könnte auf einer allgemein offeneren DNA-Struktur durch die Hypomethylierung der LINE-1 Elemente basieren. LINE-1 Elemente in Intronen können, wenn sie gleichsinnig ausgerichtet sind, auch mit der Genexpression interferieren, indem ihr Poly-A Signal die Transkription der Gene vorzeitig abbricht [165]. Diese Interferenz würde über die LINE-1 Transfektion wahrscheinlich nicht verändert. Im Rahmen der Erforschung des Transkriptom sind weitere RNAs in den letzten Jahren intensiver untersucht worden. miRNAs (mikro RNA) und lncRNA (*long non-coding RNA*) galten lange Zeit als funktionslose Nebenprodukte, zeigen in aktuellen

Untersuchungen jedoch vielfältige Funktionen [166]. Die zu den lincRNA zählenden lincRNA (*long intergenic non-coding*) bestehen aus über 200 Basen [167]. Über 80% der lincRNA enthalten mindestens eine Retroelement-Sequenz, wobei die HERVs gegenüber den LINE und SINE Elementen verglichen zur genomischen Verteilung überrepräsentiert sind [168]. LINE-1 Elemente liegen innerhalb der lincRNA meist in *antisense* Richtung. lincRNA, die Retroelemente enthalten, mit Ausnahme von Alu Elementen, werden vor allem in Keimzellen exprimiert und sind in somatischen Zellen seltener vorhanden als lincRNA ohne Retroelemente [168]. In der Entwicklung sind sie an der Inaktivierung des X-Chromosoms und dem *Imprinting* beteiligt [167]. Sie nehmen Einfluss auf die DNA-Architektur indem sie die Bildung von DNA-Loops und trans-chromosomaler DNA-Interaktion steuern [167]. Dadurch beeinflussen sie über Promotor/Promotor- und Promotor/Enhancer-Interaktionen die Genexpression [169]. In der Regulation epigenetischer Mechanismen wirken sie meist repressiv. Zum Beispiel können sie den PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) rekrutieren und so zu einer Verdichtung des Chromatins führen [170]. Gerade lincRNA, die Alu Elemente enthalten, können über Bildung von RNA-Duplices in regulierter Weise die Halbwertszeit von mRNA verkürzen [171]. lincRNA scheinen in Tumoren verändert exprimiert zu werden [172], was durch ihren hohen Anteil an Retroelementen über die globale Hypomethylierung gut zu erklären wäre. So kann durch den LINE-1 *Knockdown* auch eine Suppression von lincRNA, die LINE-1 RNA enthalten, erfolgen. Aus dem genannten Zusammenhang ergeben sich demnach weitere Erklärungen für die unterschiedlichen Effekte einer LINE-1 *Knockdown* auf die Tumorzellen.

Ein letzter Punkt soll in diesem Zusammenhang noch angesprochen werden. Im Urothelkarzinom kommt es häufig zu TERT (*telomerase reverse transcriptase*) Promotor Mutationen und einer Reaktivierung der Telomerase [173], z.B. in der Zelllinie VMCUB1 [174]. In einem LINE-1 *Knockdown* Versuch in drei Tumorzelllinien aus Kolonkarzinom, Melanom und Osteosarkom konnte gezeigt werden, dass LINE-1 die hTERT (humane TERT) aktiviert [175]. Zwei Mechanismen kommen dabei zum Tragen: erstens eine Steigerung der Telomerase Promotoraktivität und damit der mRNA-Expression und der Telomeraseaktivität durch LINE-1 und zweitens eine vermehrte Expression der Protoonkogene *KLF-4* (*Krüppel-like factor-4*) und *cMyc*, die wiederum bekannte Aktivatoren der Telomerase sind [175]. In dieser Arbeit wurde analog zu unserer eine verminderte Zellviabilität, Proliferation und eine Seneszenz durch LINE-1 *Knockdown* beschrieben. Damit gibt es auch im Bereich der nicht kodierenden RNA eine LINE-1 Funktion, die in direkten Zusammenhang mit der Tumorprogression gebracht werden

kann und welche die Auswirkungen des LINE-1 *Knockdown* auf die Zellmorphologie und Zellzahl gut erklärt.

Wenn man sich den Proteinen widmet, für die LINE-1 kodiert, können weitere Mechanismen eruiert werden, durch eine LINE-1 Expression in die Tumorbilogie eingreift. Übereinstimmend zu dieser Arbeit konnten Rodić et al., 2014 eine vermehrte Expression von LINE-1 kodierten Proteinen in Urothelkarzinomzelllinien und weiteren Tumoren detektieren. Dabei wiesen Rodić et al., 2014 in über 60% der Proben eine hohe ORF1p Expression im Harnblasenkarzinom nach. Vergleichsweise wurde der höchste Expressionsgrad mit 97% im Mammakarzinom gefunden, von den Nierentumoren exprimierten nur knapp über 20% ORF1p. In normalen Geweben konnte keine Expression von ORF1p detektiert werden. Die Expression von ORF1p korrelierte über die getesteten Tumorentitäten hinweg sowohl mit dem Tumorgrading als auch mit einem Verlust des Tumorsuppressors p53 [176]. Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen sind häufig in Urothelkarzinomen beschrieben. Die getesteten benignen Proben wiesen keine ORF1p Proteinexpression auf [176]. Zu einer Abhängigkeit vom Tumorgrading kann auf Grund der geringen Anzahl der getesteten Zelllinien hier keine Aussage getroffen werden. Festzuhalten ist, dass es sich bei den ORF1p exprimierenden Zelllinien sowohl um papilläre (RT112 und BFTC905), als auch um invasive Zelllinien (SD und VMCUB1) handelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Zelllinien durch lange Kultivierung ihren Phänotyp geändert haben. Die reverse Transkription und die daran beteiligten Proteine ORF1p und ORF2p müssen bei der Diskussion der beobachteten Veränderungen in Betracht gezogen werden, zumal eine deutliche Verminderung der ORF1p Expression unter siRNA Behandlung festgestellt werden konnte. Ursächlich ist wahrscheinlich die geringere Expression von Vollängen-LINE-1 Elementen.

Eine Steigerung der Mobilisation und Retrotransposition von LINE-1 Elementen ist in vielen Karzinomen beschrieben [177-179]. Aktuelle Untersuchungen mittels LINE-1 Sequenzierungen konnten hunderte solcher Insertionen aufdecken. So wurden zum Beispiel in Untersuchungen an Pankreastumorgewebe viele LINE-1 Insertionen gefunden [180]. Dabei variierte die Häufigkeit der Insertionen pro Tumor stark. Auch das zeitliche Auftreten der Insertionen während der Tumorgenese war uneinheitlich. In diesem Fall gab es auch keine Insertionen in Gene, die offensichtlich zur Tumorgenese oder -progression beitragen [180]. Eine andere Arbeit zu LINE-1 Insertionen in gastrointestinalen Tumoren fand viele Insertionen schon in frühen Tumorstadien oder in Tumorstadien [181]. Eine weitere Arbeit verglich 12 Tumorarten und fand heraus, dass sie meisten Insertionen in kolorektalen Karzinomen und Lungenkarzinomen vorlagen. Bei

den Insertionen handelte es sich zu 25% um Ereignisse, bei denen 3' gelegene DNA Abschnitte mit transduziert wurden [182]. Im Prostatakarzinom ist die Anzahl der Insertionen in metastatischem Gewebe deutlich höher [182], was zu der späten globalen Hypomethylierung im Prostatakarzinom passt. In kolorektalen Karzinomen betreffen einige Insertionen Gene, die funktionell zur Tumorgenese beitragen könnten [183]. Die Zuordnung der Insertionen zu einzelnen Vollängen LINE-1 Elementen ist durch moderne Sequenzierungstechniken vereinfacht worden. So konnte gezeigt werden, dass die meisten Retrotranspositionen von einigen wenigen aktiven LINE-1 Elementen der Gruppe L1Hs ausgehen und es dazu einer Hypomethylierung ihrer Promotoren bedarf [182]. Ein LINE-1 Element im ersten Intron des TTC28-Gens ist zum Beispiel für viele Retrotranspositionen im kolorektalen Karzinom verantwortlich [184]. Die Insertionen können zur Destruktion von Genen und Bildung von Fusionsgenen beitragen können [116, 165]. Bei der Transposition können neben der LINE-1 RNA auch benachbarte Gene des LINE-1 Ursprungsortes an den Insertionslocus kopiert werden. Oft beruht dies wie oben beschrieben auf einer 3'-Transduktion [185], selten kann es auch zu einer 5'-Transduktion kommen, wenn die Initiation der LINE-1 Transkription nicht von seinem internen Promotor ausgeht, sondern von einem weiter 5' gelegenen [164]. Die bisherigen Untersuchungen zeigen jedoch, dass es sich bei den meisten Insertionen um neutrale Ereignisse handelt [180, 182]. Nur wenige Insertionen, die zu Tumorprogression führen, sind bisher beschrieben. Ein älteres Beispiel ist die Destruktion des APC (Adenomatous-polyposis-coli) Tumorsuppressorgens durch eine LINE-1 Insertion [186]. Eine andere Auswirkung der reversen Transkription ist die chromosomale Instabilität durch DNA-Doppelstrangbrüche, für die vor allem das ORF2 Protein verantwortlich ist [97, 187]. Durch die TPRT können auch Alu-Elemente inserieren. Die Alu Elemente benötigen hierfür nur das ORF2 Protein, das auch als Spleißvariante bei 5'-trunkierten LINE-1 Elementen entstehen kann [187]. Die erläuterten Mechanismen der reversen Transkription und Transduktion werden wahrscheinlich nicht reversibel sein und nicht durch einen *Knockdown* von LINE-1 RNA beeinflusst. Ob eine langfristige LINE-1 Inhibition durch eine verringerte Aktivität der reversen Transkriptase und als Folge dessen eine geringere Rate an begonnenen oder vollendeten Retrotranspositionen die Tumorprogression verzögern könnte, müssten weitere Studien zeigen. In einer Arbeit erfolgte durch Inhibition der reversen Transkriptase eine kurzfristige Änderung des miRNA Transkriptoms [188]. Sciamanna et al 2013 detektierten nach Inhibition der reversen Transkriptase eine Verminderung von tumorspezifischen RNA:DNA Hybriden. Angenommen wurde, dass es in Tumoren zu einer reversen Transkription von Retroelement-RNA kommt, die zu RNA:DNA Hybriden führt. Die Hybrid-Bildung inhibiert die Bildung von miRNA aus der Retroelement-RNA [188]. Damit wären deren

regulatorischen Funktionen unterbunden. LINE-1 und Alu können sowohl selber Promotoren für die miRNA-Synthese liefern, als auch als Bindungsstellen für miRNAs dienen und damit die Translation von mRNA hemmen [72, 189]. An diesem Punkt könnte ein LINE-1 *Knockdown* Änderungen in der Konzentration aktiver miRNAs zur Folge haben.

Eine Behandlung mit einem Inhibitor der reversen Transkriptase sollte die Frage klären, ob diese unmittelbar das Tumorwachstum fördert und ob es bei der Hemmung eine erhöhte Apoptoserate gibt. Solche Beobachtungen sind von Arbeitsgruppe um Spadafora an Prostatakarzinomzelllinien und Melanomzelllinien berichtet worden [121, 123]. In den mit Efavirenz behandelten Urothelkarzinom-Zelllinien zeigten sich – auch bei hohen Konzentrationen - keine Zeichen für eine Induktion einer Apoptose durch eine Hemmung der Reversen Transkriptase. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die durch die LINE-1 siRNA Behandlung ausgelösten Effekte vor allem über die regulatorischen Funktionen von LINE-1 auf die Transkription zu erklären sind und die Aktivität der Reversen Transkriptase im Urothelkarzinom eine geringere Stellung einnimmt. Des Weiteren ist zu beachten, dass Efavirenz nicht spezifisch die reverse Transkriptase von LINE-1 hemmt. In unserem Genom sind weitere reverse Transkriptasen vorhanden. Neben der reversen Transkriptase der humanen endogenen Retroviren gibt es auch die humane Telomerase als reverse Transkriptase. Diese soll im Gegensatz zur RT der HERV nicht durch Efavirenz inhibiert werden [190]. Efavirenz scheint die reverse Transkriptase nur in sehr hohen Konzentrationen zu hemmen [92], sodass die Aussagekraft dieser Experimente eher gering ist. Zusammenfassend kann man sagen, die Inhibition von LINE-1 mit siRNA wahrscheinlich spezifischer die Funktionen von LINE-1 einschränkt als die Inhibition der reversen Transkriptase.

5.4 HERV-K Elemente im Urothelkarzinom der Harnblase

Im Urothelkarzinom der Harnblase kommt es zu einer globalen Hypomethylierung, von der LINE-1 Retroelemente betroffen sind. Offen war die Frage, ob die allgemeine Hypomethylierung ebenfalls zu einer Veränderung der DNA-Methylierung einzelner HERV-K Elemente und in Folge zu deren Expression führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten sehr variable Ergebnisse bezüglich des Methylierungsstatus der beiden untersuchten HERV-K Elemente. Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass nur zwei der 18 getesteten Elemente in unserer Gewebeprobenserie exprimiert wurden.

Die DNA-Methylierung des HERV-K17 LTR war in normalen kultivierten Urothelzellen nur sehr schwach mit einem Median von 3,7 %. Es wurden zusätzlich frisch gewonnenes

Urothel aus einem Harnleiter und benigne Fibroblasten getestet, um zu ermitteln, ob die geringe Methylierung auf die Kultivierung zurückzuführen ist, da die Methylierung des HERV-K17 LTR in den benignen Gewebeproben deutlich höher ist mit einem Median von 44,9 %. In beiden Proben zeigte sich jedoch ebenfalls eine sehr geringe HERV-K17 Methylierung. Welche Ursache der Differenz der HERV-K17 LTR Methylierung zwischen kultivierten Urothelzellen und benignem Urothelgewebe zugrunde liegt, ist unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es sich bei den Gewebeproben um eine Mischung mit anderen Zelltypen handelt, zum Beispiel durch eine Lymphozyteninfiltration in die Harnblase im Rahmen des Urothelkarzinoms. Des Weiteren könnte der Ursprung der normalen kultivierten Urothelzellen zu der Differenz der Methylierung führen. Die kultivierten Urothelzellen werden aus Harnleitern gewonnen, die Patienten mit Nephrektomien entnommen wurden. Im Unterschied zu den normalen kultivierten Urothelzellen stammen die benignen Gewebeproben aus Zystektomiepräparaten von Patienten mit Urothelkarzinomen. Im Rahmen des Urothelkarzinoms ist beschrieben, dass es über die gesamte Harnblase hinweg zu molekulargenetischen Läsionen kommen kann, sogenannten Feldeffekten [17, 18], die ebenfalls epigenetische Veränderungen aufweisen. Dies könnte zu der Differenz in der HERV-K17 Methylierung zwischen kultivierten Urothelzellen und benignen Gewebeproben beitragen. Das Urothel der Harnblase und das Urothel des Harnleiters unterscheiden sich in einigen molekularen Merkmalen, sodass auch hierin eine Ursache für den Unterschied liegen könnte [191].

Es kommt zu keiner signifikanten Steigerung der DNA-Methylierung des HERV-K17 LTR in muskelinvasiven Urothelkarzinomzelllinien gegenüber den benignen kultivierten Urothelzellen. Die papillären Urothelkarzinomzelllinien zeigen entweder eine sehr geringe Methylierung ähnlich den kultivierten Urothelzellen oder eine starke Hypermethylierung. In Zusammenschau mit der Expression von HERV-K17 RNA in den Zelllinien zeigt sich die Tendenz einer Korrelation zwischen Methylierung und Expression. Die Expressionsdaten stimmen insofern mit der Arbeit von Stauffer et al. überein, wonach sich eine erhöhte Expression von HERV-K Elementen in Urothelkarzinomen nachweisen ließ, eine Expression in normalem Urothelgewebe wurde dort allerdings nicht untersucht [120]. Jedoch kann dieses Expressionsmuster in der Analyse der Gewebeproben nicht gefunden werden. Hier stellen sich sowohl die benignen, als auch die malignen Gewebeproben mit einer sehr geringen Expression dar, die sich nicht signifikant unterscheidet.

Auch in der DNA-Methylierungsanalyse des H22q ergibt sich eine Hypomethylierung in den normalen kultivierten Urothelzellen, die jedoch weniger ausgeprägt als bei HERV-K 17 ist. In den Gewebeproben stellt sich das Bild umgekehrt dar. Die Tumorgewebe waren

gegenüber dem benignen Gewebe signifikant hypermethyliert. Bei diesem HERV-K Provirus kann folglich keine einheitliche Aussage getroffen werden kann. Auch hier bleibt die Ursache des unterschiedlichen Methylierungsstatus unklar. Eine Expression von H22q konnte weder in den Urothelkarzinomzelllinien noch in den kultivierten Urothelzellen gefunden werden. H22q ist in einigen Geweben, unter anderem der Prostata und dem Gehirn, häufig exprimiert [107, 120, 192]. Im Urothelkarzinom der Harnblase ist bisher keine Expression der H22q RNA beschrieben [120], jedoch konnte gezeigt werden, dass sich in den Seren von Patienten mit Urothelkarzinomen der Harnblase Antikörper gegen das Gag Protein des H22q befanden [192]. Eine mögliche Erklärung ist eine Kreuzreaktion mit Gag Proteinen anderer HERV-K Elemente, da sich diese z. T. ähneln.

Im Gegensatz zu LINE-1 Elementen gibt es im humanen Genom keine aktiven, zur Retrotransposition fähigen HERV-K Proviren, jedoch gibt es einige intakte ORFs, die einzelne HERV-K Proteine produzieren können. Diese können im Unterschied zu anderen humanen Proteinen eine häufigere Antikörperbildung auslösen, die vor allem nach Infektionen oder in Patienten mit Tumorerkrankungen auftritt [193]. Ein verstärktes Auftreten von HERV Proteinen ist in verschiedenen Tumorarten beschrieben [102]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Proteinexpression der beiden Proteine Rec und Np9 und der Genese von Keimzelltumoren in Mäusen über die Aktivierung von PLFZ ist beschrieben. Dabei kommt es über die Aktivierung von PLFZ zu einer verminderten Repression des *cMyc* Protoonkogens [194].

Neben der verstärkten Expression einiger HERV Proviren in bestimmten Tumoren, lässt sich auch eine gewebespezifische Expression von HERV-K Elementen in normalen Geweben nachweisen [195]. In dieser Arbeit konnte mit der Ausnahme des HERV-K17 und des HERV-K102 keine wesentlichen Änderungen der HERV-K RNA Expression gefunden werden. Dass überhaupt nur für zwei HERV-K Proviren eine Expression nachweisbar war, passt zu der zunehmenden Evidenz für ein stark gewebespezifisches Expressionsmuster dieser Retroelement-Klasse [196, 197].

5.5 Alu Elemente im Urothelkarzinom der Harnblase

Die zweithäufigste Gruppe der Retroelemente im menschlichen Genom stellen die Alu Elemente dar. In dieser Arbeit wurde die Expression zweier Unterfamilien, AluYb8 und AluYa5, aus der entwicklungsgeschichtlich jungen AluY Familie untersucht [198]. Es ist beschrieben, dass die Alu Elemente im Rahmen der Tumorgenese von der globalen Hypomethylierung betroffen sind [199, 200] und AluYb8 im Urothelkarzinom der

Harnblase hypomethyliert ist [201]. Der Methylierungsstatus einzelner Alu Elemente hängt jedoch stark von ihrer genomischen Lokalisation ab [202].

Unsere Analysen zeigen für die AluYb8 und AluYa5 RNA-Expression in den Urothelkarzinomzelllinien keine signifikante Änderung gegenüber den normalen kultivierten Urothelzellen, jedoch haben die einzelnen Zelllinien ein sehr ähnliches Expressionsmuster von AluYb8 und AluYa5. In den Gewebeproben kam es dagegen zu einem signifikanten Anstieg der AluYb8 RNA-Expression in den Urothelkarzinomen gegenüber den benignen Geweben. Die AluYa5 RNA-Expression war in dem Gewebeset nicht signifikant verändert.

Alu Elemente sind deutlich häufiger in transkriptionell aktiven Abschnitten des Genoms zu finden und übernehmen hier organisatorische Aufgaben. Sie liegen zu 66% in Intronen protein-codierender Gene und haben sowohl in *sense*, als auch in *antisense* Richtung alternative Spleiß-Stellen [203, 204]. In *sense* Richtung können sie auch Polyadenylierungssignale bieten und damit zu Änderungen in der Transkription des 3'-gelegenen Gens führen [205]. Bei Änderung der 3'-UTR können sie den Export aus dem Nukleus beeinflussen [206]. Alu Elemente in der 3'-UTR können mit *antisense* RNA dsRNA bilden und Proteine für die Regulation der Translation rekrutieren. Dabei kann die Translation über *dsRNA-dependent protein kinase* oder über STAU1 hochreguliert werden [207]. Ihre Häufung in Intronen und damit im gesamten Transkriptom kann eine Erklärung für die geringen Expressionsunterschiede sein.

Eine mögliche Ursache für die etwas stärkere Induktion der Alu Elemente in den Gewebeproben gegenüber den Urothelkarzinomzelllinien könnte der höhere zelluläre Stress sein. Eine Expressionssteigerung von Alu Elementen unter diversen Stressbedingungen ist beschrieben [208, 209]. Dabei kommt es über SINE zu einer Inaktivierung der Polymerase II und zur selektiven Expression von Polymerase III transkribierten Genen, die wichtig in der zellulären Stressantwort sind [210]. Solide Tumore wie das Urothelkarzinom sind insbesondere oft hypoxisch, anders als unter *in vitro* Bedingungen. Für die Hypoxie konnte eine Aktivierung von AluYb8 nachgewiesen werden [211].

Weitere Funktionen von Alu Elementen in der Genregulation überschneiden sich zu einem großen Teil mit denen der LINE-1 Elemente und wurden an anderer Stelle diskutiert.

5.6 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit bildet eine Basis in der Untersuchung der Retroelemente im Urothelkarzinom der Harnblase. Es wurde bestätigt, dass die LINE-1 DNA-Methylierung in Urothelzellkarzinomen eine frühe und konstante Veränderung ist. Die Auswirkung dieser Veränderungen können auf vielfältige Weise in die Biologie des Tumors eingreifen. Zu den möglichen Auswirkungen gehört eine gesteigerte reverse Transkription von LINE-1 Transkripten mit der Folge von Genrearrangements, genetischer Instabilität durch DNA-Doppelstrangbrüche und nicht-homologe Rekombination. Vor allem zu bedenken sind die epigenetischen Effekte inklusive der DNA-Methylierung und Bildung von Heterochromatin, Expression von miRNA und lncRNA, die wiederum vielzähligen Aufgaben übernehmen und auf DNA-Ebene die Beeinflussung der Transkription als Promotor oder Enhancer. Dabei bleibt weiterhin offen, ob die DNA-Hypomethylierung zur Entstehung des Urothelkarzinoms beiträgt oder ob sie einen Nebeneffekt im Rahmen der Tumorgenese darstellt. In jedem Fall bieten Änderungen des Methylierungsstatus Möglichkeiten zum Einsatz als Biomarker. Dafür werden bisher vor allem hypermethylierte Gene in Betracht gezogen [212]. Jedoch bieten auch hypomethylierte LINE-Sequenzen, z.B. im L1-MET Locus Möglichkeiten [116]. Neben dem Methylierungsstatus scheinen auch die LINE-1 Proteine als Biomarker in Betracht zu kommen, da sie bisher nur in Tumorgeweben detektiert werden konnten [176] und moderne Sequenzierungstechniken könnten individuelle LINE-1 Transkripte in den Fokus rücken [213]. Die Detektion von chimären LINE-1 Transkripten wird ebenfalls durch bessere Sequenzierungstechniken vereinfacht. Dadurch könnten in Zukunft mehr einzelne LINE-1 Elemente gefunden werden, die in einem direkten kausalen Zusammenhang mit der Tumorgenese oder Progression stehen und ein Ziel für zielgerichtete Therapien bieten. Es bleiben weitere Analysen abzuwarten, um die klinische Bedeutung der Retroelemente im Urothelkarzinom zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Burger, M., et al., *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer*. Eur Urol, 2013. **63**(2): p. 234-41.
2. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
3. Shigehara, K., T. Sasagawa, and M. Namiki, *Human papillomavirus infection and pathogenesis in urothelial cells: A mini-review*. J Infect Chemother, 2014.
4. De La Rosette, J., et al., *Changing patterns of keratin expression could be associated with functional maturation of the developing human bladder*. J Urol, 2002. **168**(2): p. 709-717.
5. Yamany, T., J. Van Batavia, and C. Mendelsohn, *Formation and regeneration of the urothelium*. Curr Opin Organ Transplant, 2014. **19**(3): p. 323-330.
6. Sjobahl, G., et al., *A molecular taxonomy for urothelial carcinoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(12): p. 3377-86.
7. Damrauer, J.S., et al., *Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3110-5.
8. Choi, W., et al., *Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy*. Cancer Cell, 2014. **25**(2): p. 152-65.
9. Mooso, B.A., et al., *The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: A review of clinical data and molecular evidence*. J Urol, 2015. **193**(1): p. 19-29.
10. Millis, S.Z., et al., *Molecular profiling of infiltrating urothelial carcinoma of bladder and nonbladder origin*. Clin Genitourin Cancer, 2015. **13**(1): p. e37-e49.
11. Tsai, Y.C., et al., *Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer*. Cancer Res, 1990. **50**(1): p. 44-7.
12. Williamson, M.P., et al., *p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(9): p. 1569-77.
13. Kim, P.H., et al., *Genomic predictors of survival in patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder*. Eur Urol, 2015. **67**(2): p. 198-201.
14. Mitra, A.P., R.H. Datar, and R.J. Cote, *Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification*. J Clin Oncol, 2006. **24**(35): p. 5552-64.
15. Allory, Y., et al., *Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome*. Eur Urol, 2014. **65**(2): p. 360-6.
16. Hurst, C.D., et al., *Genomic subtypes of non-invasive bladder cancer with distinct metabolic profile and female gender bias in KDM6A mutation frequency*. Cancer Cell, 2017. **32**(5): p. 701-715 e7.
17. Denzinger, S., et al., *Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses*. Hum Pathol, 2006. **37**(2): p. 143-51.
18. Frau, D.V., et al., *Fluorescence in situ hybridization patterns in newly diagnosed superficial bladder lesions and corresponding bladder washings*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **169**(1): p. 21-6.
19. Bohle, A. and S. Brandau, *Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer*. J Urol, 2003. **170**(3): p. 964-9.
20. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-22.

21. Inman, B.A., et al., *Atezolizumab: A PD-L1-blocking antibody for bladder cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(8): p. 1886-1890.
22. Lander E.S., L.L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
23. Brouha, B., et al., *Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5280-5.
24. Swergold, G.D., *Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(12): p. 6718-6729.
25. Minakami, R., et al., *Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(12): p. 3139-3145.
26. Scott, A.F., et al., *Origin of the human L1 elements: Proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence*. Genomics, 1987. **1**(2): p. 113-125.
27. Holmes, S.E., M.F. Singer, and G.D. Swergold, *Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 19765-19768.
28. Feng, Q., et al., *Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition*. Cell. **87**(5): p. 905-916.
29. Mathias, S.L., et al., *Reverse transcriptase encoded by a human transposable element*. Science, 1991. **254**(5039): p. 1808-10.
30. Fanning, T. and M. Singer, *The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(5): p. 2251-2260.
31. Ostertag, E.M. and H.H. Kazazian, Jr., *Biology of mammalian L1 retrotransposons*. Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 501-38.
32. Deininger, P.L., et al., *Master genes in mammalian repetitive DNA amplification*. Trends Genet, 1992. **8**(9): p. 307-311.
33. Osheim, Y.N., N.J. Proudfoot, and A.L. Beyer, *EM visualization of transcription by RNA Polymerase II: Downstream Termination Requires a Poly(A) Signal but Not transcript cleavage*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 379-387.
34. Hirose, Y. and J.L. Manley, *RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 93-96.
35. Moran, J.V., *Exon shuffling by L1 retrotransposition*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1530-1534.
36. Moran, J.V., et al., *High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells*. Cell, 1996. **87**(5): p. 917-927.
37. Naas, T.P., et al., *An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements*. EMBO J, Vol. 17. 1998. 590-597.
38. Yang, N. and H.H. Kazazian, Jr., *L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 763-71.
39. Becker, K.G., et al., *Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(10): p. 1697-1702.
40. Kurose, K., et al., *RNA polymerase III dependence of the human L1 promoter and possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(18): p. 3704-3709.
41. Tchénio, T., J.-F. Casella, and T. Heidmann, *Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): p. 411-415.
42. Yang, N., et al., *An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(16): p. 4929-4940.
43. Seto, E., Y. Shi, and T. Shenk, *YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro*. Nature, 1991. **354**(6350): p. 241-245.

44. Speek, M., *Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 1973-85.
45. Nigumann, P., et al., *Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon*. Genomics, 2002. **79**(5): p. 628-34.
46. Lavie L., M.E., Brouha B., Meese E.U., Mayer J., *The human L1 promoter: Variable transcription initiation sites and a major impact of upstream flanking sequence on promoter activity*. Genome Res, 2004. **14**(11): p. 2253–2260.
47. Babushok, D.V., et al., *L1 integration in a transgenic mouse model*. Genome Res, 2006. **16**(2): p. 240-50.
48. McMillan, J.P. and M.F. Singer, *Translation of the human LINE-1 element, L1Hs*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1993. **90**(24): p. 11533-11537.
49. Dombroski, B.A., et al., *Isolation of an active human transposable element*. Science, 1991. **254**(5039): p. 1805-8.
50. Alisch, R.S., et al., *Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons*. Genes Dev, 2006. **20**(2): p. 210-24.
51. Gilbert, N., S. Lutz-Prigge, and J.V. Moran, *Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition*. Cell, 2002. **110**(3): p. 315-25.
52. Gilbert, N., et al., *Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7780-95.
53. Ostertag, E.M. and H.H. Kazazian, Jr., *Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition*. Genome Res, 2001. **11**(12): p. 2059-65.
54. Kramerov, D.A. and N.S. Vassetzky, *Short retroposons in eukaryotic genomes*. Int Rev Cytol, 2005. **247**: p. 165-221.
55. Rubin, C.M., et al., *Partial nucleotide sequence of the 300-nucleotide interspersed repeated human DNA sequences*. Nature, 1980. **284**(5754): p. 372-4.
56. Ullu, E. and C. Tschudi, *Alu sequences are processed 7SL RNA genes*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 171-2.
57. Medstrand, P., L.N. van de Lagemaat, and D.L. Mager, *Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes*. Genome Res, 2002. **12**(10): p. 1483-95.
58. Feng, Q., et al., *Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition*. Cell, 1996. **87**(5): p. 905-916.
59. Kajikawa, M. and N. Okada, *LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence*. Cell, 2002. **111**(3): p. 433-44.
60. Hagan, C.R., R.F. Sheffield, and C.M. Rudin, *Human Alu element retrotransposition induced by genotoxic stress*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 219-20.
61. Löwer, R., J. Löwer, and R. Kurth, *The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1996. **93**(11): p. 5177-5184.
62. Hanke, K., O. Hohn, and N. Bannert, *HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep*. APMIS, 2016. **124**(1-2): p. 67-87.
63. Subramanian, R.P., et al., *Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 90.
64. Turner, G., et al., *Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1531-1535.
65. Bannert, N. and R. Kurth, *The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. **7**: p. 149-73.
66. Löwer, R., et al., *Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses*. J Gen Virol, 1984. **65**(5): p. 887-898.
67. Bronson, D.L., et al., *Morphologic evidence for retrovirus production by epithelial cells derived from a human testicular tumor metastasis*. J Natl Cancer Inst, 1978. **60**(6): p. 1305-8.

68. Kazazian, H.H., Jr., *Mobile elements: drivers of genome evolution*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1626-32.
69. Ono, M., *Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes*. J Virol, 1986. **58**(3): p. 937-44.
70. Solyom, S. and H.H. Kazazian, Jr., *Mobile elements in the human genome: implications for disease*. Genome Med, 2012. **4**(2): p. 12.
71. Buzdin, A., et al., *The human genome contains many types of chimeric retrogenes generated through in vivo RNA recombination*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(15): p. 4385-4390.
72. Elbarbary, R.A., B.A. Lucas, and L.E. Maquat, *Retrotransposons as regulators of gene expression*. Science, 2016. **351**(6274): p. aac7247.
73. Li, W.H., et al., *Evolutionary analyses of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 847-9.
74. Han, J.S., S.T. Szak, and J.D. Boeke, *Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes*. Nature, 2004. **429**(6989): p. 268-74.
75. Bailey, J.A., et al., *Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6634-9.
76. Bala Tannan, N., et al., *DNA methylation profiling in X;autosome translocations supports a role for L1 repeats in the spread of X chromosome inactivation*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(5): p. 1224-36.
77. Raschke, S., et al., *Homozygous deletions of CDKN2A caused by alternative mechanisms in various human cancer cell lines*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(1): p. 58-67.
78. Turker, M.S., *Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5388-93.
79. Schmid, C.W., *Does SINE evolution preclude Alu function?* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(20): p. 4541-50.
80. Liu, W.M., et al., *Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(10): p. 1758-65.
81. Ivanova, E., et al., *Alu RNA regulates the cellular pool of active ribosomes by targeted delivery of SRP9/14 to 40S subunits*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(5): p. 2874-87.
82. Van De Lagemaat, L.N., et al., *Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions*. Trends Genet, 2003. **19**(10): p. 530-536.
83. Thompson, P.J., T.S. Macfarlan, and M.C. Lorincz, *Long terminal repeats: From parasitic elements to building blocks of the transcriptional regulatory repertoire*. Mol Cell, 2016. **62**(5): p. 766-76.
84. Cohen, C.J., W.M. Lock, and D.L. Mager, *Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment*. Gene, 2009. **448**(2): p. 105-14.
85. Schulte, A.M., et al., *Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14759-64.
86. Mi, S., et al., *Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 785-9.
87. Christensen, T., *HERVs in neuropathogenesis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(3): p. 326-35.
88. Goodier, J.L. and H.H. Kazazian, Jr., *Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites*. Cell, 2008. **135**(1): p. 23-35.
89. Li, E., *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(9): p. 662-73.

90. Cox, D.N., et al., *A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal*. *Genes Dev*, 1998. **12**(23): p. 3715-27.
91. Thomson, T. and H. Lin, *The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **25**: p. 355-76.
92. Rodic, N. and K.H. Burns, *Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms?* *PLoS Genet*, 2013. **9**(3): p. e1003402.
93. Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy, *DNA hypomethylation and human diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(1): p. 138-62.
94. Hoffmann, M.J. and W.A. Schulz, *Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer*. *Biochem Cell Biol*, 2005. **83**(3): p. 296-321.
95. Ehrlich, M., *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. *Oncogene*, 2002. **21**(35): p. 5400-13.
96. Kaneda, A., et al., *Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(1): p. 58-64.
97. Schulz, W.A., *L1 retrotransposons in human cancers*. *J Biomed Biotechnol*, 2006. **2006**(1): p. 83672.
98. Schulz, W.A., C. Steinhoff, and A.R. Florl, *Methylation of endogenous human retroelements in health and disease*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **310**: p. 211-50.
99. Luo, Y., X. Lu, and H. Xie, *Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 784706.
100. Graff, J.R., et al., *Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(35): p. 22322-9.
101. Wang, X., et al., *Spreading of Alu methylation to the promoter of the MLH1 gene in gastrointestinal cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25913.
102. Ruprecht, K., et al., *Endogenous retroviruses and cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(21): p. 3366-82.
103. Wang-Johanning, F., et al., *Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(10): p. 1528-35.
104. Wang-Johanning, F., et al., *Expression of human endogenous retrovirus K envelope transcripts in human breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(6): p. 1553-1560.
105. Iramaneerat, K., et al., *HERV-K hypomethylation in ovarian clear cell carcinoma is associated with a poor prognosis and platinum resistance*. *Int J Gynecol Cancer*, 2011. **21**(1): p. 51-7.
106. Wang-Johanning, F., et al., *Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(1): p. 81-90.
107. Goering, W., T. Ribarska, and W.A. Schulz, *Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(10): p. 1484-92.
108. Schiavetti, F., et al., *A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes*. *Cancer Res*, 2002. **62**(19): p. 5510-6.
109. Reiche, J., G. Pauli, and H. Ellerbrok, *Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation*. *Melanoma Res*, 2010. **20**(5): p. 435-40.
110. Serafino, A., et al., *The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(5): p. 849-62.
111. Schmitt, K., et al., *HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues*. *Mob DNA*, 2015. **6**: p. 4.
112. Hermans, K.G., et al., *Truncated ETV1, fused to novel tissue-specific genes, and full-length ETV1 in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(18): p. 7541-9.

113. Tomlins, S.A., et al., *Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 595-9.
114. Ono, M., M. Kawakami, and H. Ushikubo, *Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D*. J Virol, 1987. **61**(6): p. 2059-62.
115. Florl, A.R., et al., *DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas*. Br J Cancer, 1999. **80**(9): p. 1312-21.
116. Wolff, E.M., et al., *Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer*. PLoS Genet, 2010. **6**(4): p. e1000917.
117. Van Bommel, D., et al., *Correlation of LINE-1 methylation levels in patient-matched buffy coat, serum, buccal cell, and bladder tumor tissue DNA samples*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(7): p. 1143-8.
118. Nusgen, N., et al., *Inter-locus as well as intra-locus heterogeneity in LINE-1 promoter methylation in common human cancers suggests selective demethylation pressure at specific CpGs*. Clin Epigenetics, 2015. **7**: p. 17.
119. Weber, B., et al., *Demethylation of a LINE-1 antisense promoter in the cMet locus impairs Met signalling through induction of illegitimate transcription*. Oncogene, 2010. **29**(43): p. 5775-84.
120. Stauffer, Y., et al., *Digital expression profiles of human endogenous retroviral families in normal and cancerous tissues*. Cancer Immun, 2004. **4**: p. 2.
121. Sciamanna, I., et al., *Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth*. Oncogene, 2005. **24**(24): p. 3923-31.
122. Patnala, R., et al., *Inhibition of LINE-1 retrotransposon-encoded reverse transcriptase modulates the expression of cell differentiation genes in breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **143**(2): p. 239-53.
123. Mangiacasale, R., et al., *Exposure of normal and transformed cells to nevirapine, a reverse transcriptase inhibitor, reduces cell growth and promotes differentiation*. Oncogene, 2003. **22**(18): p. 2750-61.
124. Oricchio, E., et al., *Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression*. Oncogene, 2007. **26**(29): p. 4226-33.
125. Koch, A., et al., *Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines*. Cell Oncol (Dordr), 2012. **35**(4): p. 243-57.
126. Chapman, E.J., et al., *Integrated genomic and transcriptional analysis of the in vitro evolution of telomerase-immortalized urothelial cells (TERT-NHUC)*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(8): p. 694-710.
127. Kirilyuk, A., et al., *Functional endogenous LINE-1 retrotransposons are expressed and mobilized in rat chloroleukemia cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): p. 648-65.
128. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
129. Jürgens, B., B.J. Schmitz-Dräger, and W.A. Schulz, *Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(24): p. 5698-5703.
130. Bae, J.M., et al., *ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications*. Int J Cancer, 2012. **131**(6): p. 1323-31.
131. Yegnasubramanian, S., et al., *DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8954-67.
132. Santourlidis, S., et al., *High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate*. Prostate, 1999. **39**(3): p. 166-74.

133. Florl, A.R., et al., *Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation*. Br J Cancer, 2004. **91**(5): p. 985-94.
134. Cho, N.Y., et al., *Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm*. Virchows Arch, 2009. **454**(1): p. 17-23.
135. Selamat, S.A., et al., *DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21443.
136. Rhee, Y.-Y., et al., *Prognostic significance of promoter CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in stage I lung adenocarcinoma*. Virchows Arch, 2015. **466**(6): p. 675-683.
137. Schumann, G.G., et al., *Unique functions of repetitive transcriptomes*. Int Rev Cell Mol Biol, 2010. **285**: p. 115-88.
138. Kuramochi-Miyagawa, S., et al., *DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 908-17.
139. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
140. Kawasaki, H. and K. Taira, *Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells*. Nature, 2004. **431**(7005): p. 211-7.
141. Lippman, Z., et al., *Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control*. Nature, 2004. **430**(6998): p. 471-6.
142. Bierhoff, H., A. Postepska-Igielska, and I. Grummt, *Noisy silence: non-coding RNA and heterochromatin formation at repetitive elements*. Epigenetics, 2014. **9**(1): p. 53-61.
143. Martienssen, R. and D. Moazed, *RNAi and heterochromatin assembly*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(8): p. a019323.
144. Moyano, M. and G. Stefani, *piRNA involvement in genome stability and human cancer*. J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 38.
145. Puszyk, W., et al., *The epigenetic regulator PLZF represses L1 retrotransposition in germ and progenitor cells*. EMBO J, 2013. **32**(13): p. 1941-52.
146. Van Meter, M., et al., *SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5011.
147. Holmquist, G.P. and T. Ashley, *Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution*. Cytogenet Genome Res, 2006. **114**(2): p. 96-125.
148. Lunyak, V.V., et al., *Developmentally regulated activation of a SINE B2 repeat as a domain boundary in organogenesis*. Science, 2007. **317**(5835): p. 248-51.
149. Roman, A.C., et al., *Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch*. Genome Res, 2011. **21**(3): p. 422-32.
150. Noma, K., et al., *A role for TFIIIC transcription factor complex in genome organization*. Cell, 2006. **125**(5): p. 859-72.
151. Feinberg, A.P., *The epigenetics of cancer etiology*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 427-32.
152. Estecio, M.R., et al., *Genome architecture marked by retrotransposons modulates predisposition to DNA methylation in cancer*. Genome Res, 2010. **20**(10): p. 1369-82.
153. Skowronski, J., T.G. Fanning, and M.F. Singer, *Unit-length line-1 transcripts in human teratocarcinoma cells*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(4): p. 1385-97.
154. Apornetewan, C., et al., *Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17934.
155. Philippe, C., et al., *Activation of individual L1 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci*. Elife, 2016. **5**.
156. Dai, L., et al., *Expression and detection of LINE-1 ORF-encoded proteins*. Mob Genet Elements, 2014. **4**: p. e29319.

157. Taylor, M.S., et al., *Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1034-48.
158. Li, T.H. and C.W. Schmid, *Differential stress induction of individual Alu loci: implications for transcription and retrotransposition*. Gene, 2001. **276**(1-2): p. 135-41.
159. Faulkner, G.J., et al., *The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 563-71.
160. Finisguerra, V., H. Prenen, and M. Mazzone, *Preclinical and clinical evaluation of MET functions in cancer cells and in the tumor stroma*. Oncogene, 2016. **35**(42): p. 5457-5467.
161. Cruickshanks, H.A. and C. Tufarelli, *Isolation of cancer-specific chimeric transcripts induced by hypomethylation of the LINE-1 antisense promoter*. Genomics, 2009. **94**(6): p. 397-406.
162. Lau, C.C., et al., *Viral-human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression*. Cancer Cell, 2014. **25**(3): p. 335-49.
163. Matlik, K., K. Redik, and M. Speek, *L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(1): p. 71753.
164. Rangwala, S.H., L. Zhang, and H.H. Kazazian, Jr., *Many LINE1 elements contribute to the transcriptome of human somatic cells*. Genome Biol, 2009. **10**(9): p. R100.
165. Wheelan, S.J., et al., *Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution*. Genome Res, 2005. **15**(8): p. 1073-8.
166. Lee, J.T., *Epigenetic regulation by long noncoding RNAs*. Science, 2012. **338**(6113): p. 1435-9.
167. Khorkova, O., J. Hsiao, and C. Wahlestedt, *Basic biology and therapeutic implications of lncRNA*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 15-24.
168. Kelley, D. and J. Rinn, *Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs*. Genome Biol, 2012. **13**(11): p. R107.
169. Shibayama, Y., et al., *lncRNA and gene looping: what's the connection?* Transcription, 2014. **5**(3): p. e28658.
170. Khalil, A.M., et al., *Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11667-72.
171. Gong, C. and L.E. Maquat, *lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 284-8.
172. St Laurent, G., et al., *VlincRNAs controlled by retroviral elements are a hallmark of pluripotency and cancer*. Genome Biol, 2013. **14**(7): p. R73.
173. Borah, S., et al., *Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer*. Science, 2015. **347**(6225): p. 1006-10.
174. Hoffmann, M.J., et al., *The new immortalized uroepithelial cell line HBLAK contains defined genetic aberrations typical of early stage urothelial tumors*. Bladder Cancer, 2016. **2**(4): p. 449-463.
175. Aschacher, T., et al., *LINE-1 induces hTERT and ensures telomere maintenance in tumour cell lines*. Oncogene, 2016. **35**(1): p. 94-104.
176. Rodic, N., et al., *Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers*. Am J Pathol, 2014. **184**(5): p. 1280-6.
177. Lee, E., et al., *Landscape of somatic retrotransposition in human cancers*. Science, 2012. **337**(6097): p. 967-71.
178. Asch, H.L., et al., *Comparative expression of the LINE-1 p40 protein in human breast carcinomas and normal breast tissues*. Oncol Res, 1996. **8**(6): p. 239-47.
179. Bratthauer, G.L. and T.G. Fanning, *Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer*. Oncogene, 1992. **7**(3): p. 507-10.
180. Rodic, N., et al., *Retrotransposon insertions in the clonal evolution of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Med, 2015. **21**(9): p. 1060-4.

181. Ewing, A.D., et al., *Widespread somatic L1 retrotransposition occurs early during gastrointestinal cancer evolution*. *Genome Res*, 2015. **25**(10): p. 1536-45.
182. Tubio, J.M., et al., *Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes*. *Science*, 2014. **345**(6196): p. 1251343.
183. Solyom, S., et al., *Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors*. *Genome Res*, 2012. **22**(12): p. 2328-38.
184. Pitkanen, E., et al., *Frequent L1 retrotranspositions originating from TTC28 in colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2014. **5**(3): p. 853-9.
185. Goodier, J.L., E.M. Ostertag, and H.H. Kazazian, Jr., *Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(4): p. 653-7.
186. Miki, Y., et al., *Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer*. *Cancer Res*, 1992. **52**(3): p. 643-5.
187. Belancio, V.P., et al., *Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(12): p. 3909-22.
188. Sciamanna, I., et al., *A tumor-promoting mechanism mediated by retrotransposon-encoded reverse transcriptase is active in human transformed cell lines*. *Oncotarget*, 2013. **4**(12): p. 2271-87.
189. Piriyaongsa, J., L. Marino-Ramirez, and I.K. Jordan, *Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements*. *Genetics*, 2007. **176**(2): p. 1323-37.
190. Sciamanna, I., et al., *Regulatory roles of LINE-1-encoded reverse transcriptase in cancer onset and progression*. *Oncotarget*, 2014. **5**(18): p. 8039-51.
191. Catto, J.W., et al., *Behavior of urothelial carcinoma with respect to anatomical location*. *J Urol*, 2007. **177**(5): p. 1715-20.
192. Ishida, T., et al., *Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity*. *Cancer Immun*, 2008. **8**: p. 15.
193. Kassiotis, G., *Endogenous retroviruses and the development of cancer*. *J Immunol*, 2014. **192**(4): p. 1343-9.
194. Downey, R.F., et al., *Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice?* *Int J Cancer*, 2015. **137**(6): p. 1249-57.
195. Flockerzi, A., et al., *Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 354.
196. Okahara, G., et al., *Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs*. *Genomics*, 2004. **84**(6): p. 982-90.
197. Shiroma, T., et al., *Search for active endogenous retroviruses: identification and characterization of a HERV-E gene that is expressed in the pancreas and thyroid*. *J Hum Genet*, 2001. **46**(11): p. 619-25.
198. Carroll, M.L., et al., *Large-scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity¹*. *J Mol Biol*, 2001. **311**(1): p. 17-40.
199. Rodriguez, J., et al., *Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(3): p. 770-84.
200. Puttipanyalears, C., et al., *Alu hypomethylation in smoke-exposed epithelia and oral squamous carcinoma*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **14**(9): p. 5495-5501.
201. Choi, S.H., et al., *Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(3): p. 723-9.
202. Xie, H., et al., *Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(10): p. 4099-108.
203. Sela, N., et al., *Comparative analysis of transposed element insertion within human and mouse genomes reveals Alu's unique role in shaping the human transcriptome*. *Genome Biol*, 2007. **8**(6): p. R127.

204. Sorek, R., G. Ast, and D. Graur, *Alu-containing exons are alternatively spliced*. *Genome Res*, 2002. **12**(7): p. 1060-7.
205. Lee, J.Y., Z. Ji, and B. Tian, *Phylogenetic analysis of mRNA polyadenylation sites reveals a role of transposable elements in evolution of the 3'-end of genes*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(17): p. 5581-90.
206. Hu, S.B., et al., *Protein arginine methyltransferase CARM1 attenuates the paraspeckle-mediated nuclear retention of mRNAs containing IRAlus*. *Genes Dev*, 2015. **29**(6): p. 630-45.
207. Elbarbary, R.A., et al., *STAU1 binding 3' UTR IRAlus complements nuclear retention to protect cells from PKR-mediated translational shutdown*. *Genes Dev*, 2013. **27**(13): p. 1495-510.
208. Nikitina, T.V., L.I. Tischenko, and W.A. Schulz, *Recent insights into regulation of transcription by RNA polymerase III and the cellular functions of its transcripts*. *Biol Chem*, 2011. **392**(5): p. 395-404.
209. Berger, A. and K. Strub, *Multiple Roles of Alu-Related Noncoding RNAs*. *Prog Mol Subcell Biol*, 2011. **51**: p. 119-46.
210. Mariner, P.D., et al., *Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock*. *Mol Cell*, 2008. **29**(4): p. 499-509.
211. Ord, J.J., et al., *Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **93**(3): p. 346-54.
212. Darwiche, F., D.J. Parekh, and M.L. Gonzalgo, *Biomarkers for non-muscle invasive bladder cancer: Current tests and future promise*. *Indian J Urol*, 2015. **31**(4): p. 273-82.
213. Ardeljan, D., et al., *The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia*. *Clin Chem*, 2017.
214. Kreimer, U., et al., *HERV-K and LINE-1 DNA methylation and reexpression in urothelial carcinoma*. *Front Oncol*. 2013;3:255.
215. Jaguva Vasudevan, A. A., *APOBEC3B activity is prevalent in urothelial carcinoma cells and only slightly affected by LINE-1 expression*. *Front Microbiol*. 2018;9:2088.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt im Besonderen Herrn Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation im urologischen Forschungslabor zu schreiben. Ich bedanke mich bei ihm für die hervorragende Betreuung und seine unerschöpfliche Geduld.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Wolfgang Göring und den Kollegen aus dem Forschungslabor für die Hilfsbereitschaft und die vielen konstruktiven Vorschläge.

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

Meiner Familie danke ich von Herzen für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung.