

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

Direktor: Prof. Dr. med. P. Albers

**Analyse neuer Kandidatengene auf Hypermethylierung
im Harnblasenkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Najla Sadat

2020

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: Prof. PD Dr. rer. nat. Simeon Santourlidis

Was wir wissen ist ein Tropfen;
was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet**

Zusammenfassung

Die DNA-Hypermethylierung in CpG-Inseln in der Promotorregion vor Genen kann zur Tumorentstehung beitragen. Solche tumorspezifischen Methylierungsveränderungen können als Tumormarker in der Diagnostik, beispielsweise zur Früherkennung von Tumoren eingesetzt werden. Auch im Harnblasenkarzinom trägt die DNA-Hypermethylierung bestimmter Gene zur Tumorphagenese bei. Aus Vorarbeiten hatten sich Hinweise auf Hypermethylierung der Gene *ADAM19*, *CBX7* und *RUNX3* ergeben.

In dieser Arbeit wurde daher die Expression dieser Kandidatengene mittels RT-PCR gemessen. Für die DNA-Methylierungsanalyse wurden die Methoden Bisulfitsequenzierung sowie Pyrosequenzierung etabliert und angewandt. Insgesamt wurden acht uroepitheliale Zellkulturen, 20 Harnblasenkarzinom-Zelllinien, 11 Harnblasennormalproben und 86 Harnblasentumorproben (Set 1 mit 23 Proben und Set 2 mit 63 Proben) untersucht.

Die Expression von *ADAM19* konnte in Zelllinien und normalen uroepithelialen Zellen nachgewiesen werden und war in vielen Tumorzelllinien vermindert. Jedoch konnte mittels Bisulfitsequenzierung keine erhöhte Methylierung von *ADAM19* in den untersuchten Zelllinien dargestellt werden. Die Expressionsanalyse von *CBX7* ergab stark variable Expression sowohl in den normalen Harnblasenproben als auch in den Harnblasentumorproben, mit einer leichten, aber nicht signifikanten Verminderung in den Tumoren. Gegenüber den Geweben war die Expression in den uroepithelialen Zellen ebenso wie in Tumorzelllinien niedrig. Die DNA-Methylierung von *CBX7* und *RUNX3* war in den untersuchten uroepithelialen Zellen niedriger als in den Tumorzelllinien. Die Tumorproben ließen sich in eine Gruppe mit niedriger und eine Gruppe mit einer mittelstarken Methylierung einteilen. In Korrelation zu den klinischen Parametern (Alter, Geschlecht, Tumor-Stadium, Tumor-Grad) war die Methylierung von *CBX7* in Tumoren mit hohem ($p = 0,001$) gegenüber niedrigem ($< G3$) Grading erhöht, sowie in höheren ($> T2$) gegenüber niedrigeren Tumorstadien ($p = 0,034$). Die DNA-Methylierungsanalyse von zwei verschiedenen Abschnitten der großen CpG-Insel am Beginn des *RUNX3* Gens belegte in Abhängigkeit von der untersuchten Sequenz eine verstärkte Methylierung in den Harnblasentumorproben und den Tumorzelllinien.

Die Gene *ADAM19*, *CBX7* und *RUNX3* werden in uroepithelialen Zellen exprimiert. Für *CBX7* und *RUNX3* konnte eine Korrelation zwischen den DNA-Methylierungswerten und den klinischen Parametern mit einem signifikanten Zusammenhang zum Tumor-Stadium und -Grad für *CBX7* gezeigt werden. Um die Hypermethylierung von *CBX7* und *RUNX3* im Harnblasentumoren als Tumormarker in der Diagnostik nutzen zu können, müssten quantitative und qualitative Methylierungsanalysen dieser Gene in weiteren Proben erfolgen.

Abstract

DNA hypermethylation in gene promoters can contribute to tumorigenesis. This kind of tumor-specific methylation changes can be employed as a diagnostic biomarker, e.g. for the early detection of cancers. In bladder cancers, too, DNA hypermethylation of specific genes may promote tumor development and progression. In particular, hypermethylation was suggested for the *ADAM19*, *CBX7* and *RUNX3* genes.

To follow up on these preliminary results, expression of these candidate genes was measured by quantitative RT-PCR. Bisulfite sequencing and pyrosequencing were used for DNA methylation analysis. Samples comprised eight normal uroepithelial cell cultures, 20 bladder cancer cell lines, and 11 normal bladder and 86 bladder cancer tissues (in two sets of 23 and 63 samples).

Expression of *ADAM19* was decreased in several cancer cell lines compared to normal cells, but DNA hypermethylation could not be detected. *CBX7* was variably expressed in tumor and normal tissues; expression was generally lower in both normal cell cultures and cancer cell lines than in tissues. DNA methylation was however increased in cancer cell lines as well as in cancer tissues. *CBX7* methylation distinguished two groups of cancer tissues which were distinguished by higher grading (< G3 vs. > G3, $p = 0,001$) and tumor stage (< T3 vs. > T3, $p = 0,034$), but did not differ significantly by gender or age. Methylation of *RUNX3* was likewise generally lower in normal cells than in cancer cell lines and lower in normal tissues than in bladder cancer tissues. However, the extent of these differences depended on which sequence within the large CpG-island at the 5'-end of the *RUNX3* gene was investigated.

In conclusion, the *ADAM19*, *CBX7* and *RUNX3* genes were found expressed in urothelial cells. Hypermethylation in bladder cancer tissues and cell lines was confirmed for *CBX7* and *RUNX3*. *CBX7* methylation was moreover significantly correlated with clinical parameters. Quantitative and qualitative methylation analyses of *CBX7* and *RUNX3* in additional tissue sets would be necessary to develop *CBX7* and *RUNX3* methylation as biomarkers in bladder cancer diagnostics.

Abkürzungen

5-Aza-2`dC	5-Aza-2`-Desoxycytidin
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS1	ADAM mit Thrombospondin Motiv Typ 1
ALA	Aminolävulinsäure
ANRIL	Antisense noncoding ribonucleic acid
APC	Adenomatosis polyposis coli
APS	Adenosinphosphosulfat
Aqua dest	destilliertes Aqua
ARF	ADP-ribosylation factor
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BN	Normale Harnblasenproben
bp	Basenpaare
bt	Blutprobe
CBX7	Chromobox homolog 7
CCND1	Cyclin D1
CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin dependent kinases
CDK2A	Cyclin dependent kinases 2A
CDKI	Cyclin dependent kinases inhibitor
CDKN2B	Cyclin dependent kinases inhibitor 2B
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CG-Dinukleotid	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CpG	Cytosin Phosphat Guanin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAbi	DNA bisulfit-behandelt
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EcoRI	Escherichia coli restriction enzyme I
EDNRB	Endothelin receptor type B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ER α	Estrogenrezeptor alpha
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FCS	Fötales Kälberserum
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
fwd	Forward
GHSR	Growth hormone secretagogue receptor
GSTP1	Glutathion S- Transferase P1
H2A-K116	Histon 2A Lysin 116
H3K27me3	Histon 3 Lysin 27 Trimethylierung
H3K9me3	Histon 3 Lysin 9 Trimethylierung
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDAC1	Histondeacetylase 1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1	Hypoxie induzierter Faktor 1 α
HP1	Heterochromatin Protein 1
HS3ST2	Heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 2
INK	Inhibitor of kinases
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton

KSFM	Keratinocyte Serum-Free Growth Medium
LB	Luria Broth
lncRNA	Long noncoding RNA
LOH	Loss of heterozygosity
MAL	Myelin and lymphocyte protein
microRNA	Micro ribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
ncRNA	Non-coding ribonucleic acid
NEB2	Nuclear extraction buffer 2
NF-kB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NID2	Nidogen 2
OD	Optische Dichte
Oligo dT	Oligo-desoxythymidin
ONECUT2	One cut homeobox 2
OSR1	Odd-skipped related 1
OTX1	Orthodenticle homeobox 1
PBS	Phosphate buffered saline
PcG	Polycomb group
PCR	Polymerase chain reaction
PPi	Pyrophosphat
PRC	Polycomb repressive complex
pTa	Nicht invasive papilläre Carcinome
pTis	Carcinoma in situ
PUNLMPs	Papillary urothelial neoplasias of low malignant potential
qRT-PCR	quantitative Real Time -PCR
RB1	Retinoblastom 1
rev	Reverse
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotation per minute
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RUNX	Runt related transcription factor
SALL3	Spalt like transcription factor 3

SAM	S-Adenosylmethionin
SEPTIN9	Septin 9
SCC	Squamous cell carcinoma
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLIT2	Slit guidance ligand 2
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SSC	Standard sodium citrat puffer
SSSI	CpG-Methylase aus Spiroplasma
Stadium M	Fernmetastasen
Stadium N	regionaler Lymphknotenbefall
Stadium T	lokale Ausdehnung des Primärtumors
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-box-binding protein
TCF4	Transcription factor 4
TCGA	The cancer genome atlas
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGF- β	Tumor growth factor- β
TNM	Tumor-Node-Metastasis
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
TUR	Transurethrale Resektion
TWIST1	Twist family bHLH transcription factor 1
UC	Urothelkarzinom
UP	Normale kultivierte Urothelzellen
WNT	Wingless type growth factor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Harnblasenkarzinom.....	1
1.2	DNA-Methylierung als Mechanismus der Epigenetik	5
1.3	Neue Kandidatengene.....	9
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	Materialien und Methoden.....	16
2.1	Materialien.....	16
2.2	Methoden	25
2.2.1	Untersuchungen zur Zellkultur	25
2.2.2	Untersuchungen zur Expression	28
2.2.3	Untersuchungen zur Methylierung	30
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Analyse von <i>ADAM19</i>	37
3.2	Analyse von <i>CBX7</i>	40
3.3	Analyse von <i>RUNX3</i>	47
3.4	Korrelation zu klinischen Parametern	54
4	Diskussion	57
4.1	DNA-Methylierung im Harnblasenkarzinom	57
4.2	<i>ADAM19</i> und andere <i>ADAM</i> -Gene im Harnblasenkarzinom	58
4.3	<i>CBX7</i> im Harnblasenkarzinom	60
4.4	<i>RUNX3</i> im Harnblasenkarzinom	64
4.5	Klinische Anwendung und Zukunftsperspektiven	66
5	Literaturverzeichnis	69

1 EINLEITUNG

1.1 HARNBLASENKARZINOM

Das Harnblasenkarzinom stellt mit einer Inzidenz zwischen 4 und 40/100.000 weltweit das zweithäufigst diagnostizierte Karzinom des Urogenitaltraktes dar (Cumberbatch und Noon 2019, Kamat et al. 2016). In den westlichen Ländern ist das Harnblasenkarzinom meist das fünfthäufigste Karzinom (Cumberbatch und Noon 2019, Kamat et al. 2016, Knowles und Hurst 2015). 429.793 Neuerkrankungen und 165.084 Todesfälle weltweit pro Jahr verdeutlichen die Notwendigkeit einer Optimierung in der Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms (Cumberbatch und Noon 2019, Sanli et al. 2017, Knowles und Hurst 2015, Kandimalla et al. 2013).

Das Urothelkarzinom (UC) ist sein häufigster histologischer Subtyp und entsteht aus dem Urothel, dem spezialisierten Epithel des Harnwegtrakts, vom Nierenbecken bis in die Harnröhre (Sanli et al. 2017). Ein weiterer histologischer Subtyp ist das Plattenepithel-Karzinom (englisch: Squamous Cell Carcinoma, SCC), das beispielsweise nach chronischer Inflammation des Harnwegstrakts durch *Schistosoma haematobium* Infektion auftritt (Muhammad et al. 2019, Manley et al. 2017, Knowles und Hurst 2015). Das Adeno- und das Plattenepithelkarzinom zählen zu den seltenen histologischen Formen (Sanli et al. 2017, Knowles und Hurst 2015). Die Hauptrisikofaktoren für das UC sind ein hohes Alter mit einem Maximum in der Gruppe der über 70-Jährigen, das Geschlecht mit einer zwei- bis vier-fachen Prädominanz bei Männern, Rauchen mit einem bis zu sechsfach erhöhten Risiko, chronische Harnwegsinfektionen und viele chemische Karzinogene, wie aromatische Amine, polyzyklische Aromate, Nitroverbindungen, Nitrosamine, Arsenite, Metabolite von Phenacetin und Cyclophosphamid, halogenierte Kohlenwasserstoffe und der Pflanzeninhaltsstoff Aristolochiasäure (Cumberbatch und Noon 2019, Cumberbatch et al. 2018, Knowles und Hurst 2015). Starke genetische familiäre Prädispositionen, wie das Lynch Syndrom spielen eine untergeordnete Rolle, jedoch beeinflussen verschiedene Gen-Polymorphismen, wie ein Glutathion-Transferase-M1-Defekt im Fremdstoffmetabolismus, das Risikopotenzial in gewissem Umfang (Cumberbatch et al. 2018).

Die Einteilung des Tumors erfolgt nach dem Stadium des Primärtumors und seiner lokalen Ausdehnung (T), dem regionalen Lymphknotenbefall (N) und der Fernmetastasen (M) gemäß dem Tumor-Node-Metastasis System (TNM-Klassifikation). Dabei wird das Harnblasenkarzinom in fünf T-Stadien, anhand des Ausmaßes der Tumordinvasion der Gewebeschichten und im Falle des Stadiums pT4 der Invasion in benachbarte Organe (Abb. 1) eingeteilt (Sanli et al. 2017, Knowles und Hurst 2015). Eine weitere Unterteilung findet nach dem pathologischen Grad in G1 bis G3, oder einfacher, *low grade* und *high grade* statt (Knowles und Hurst 2015).

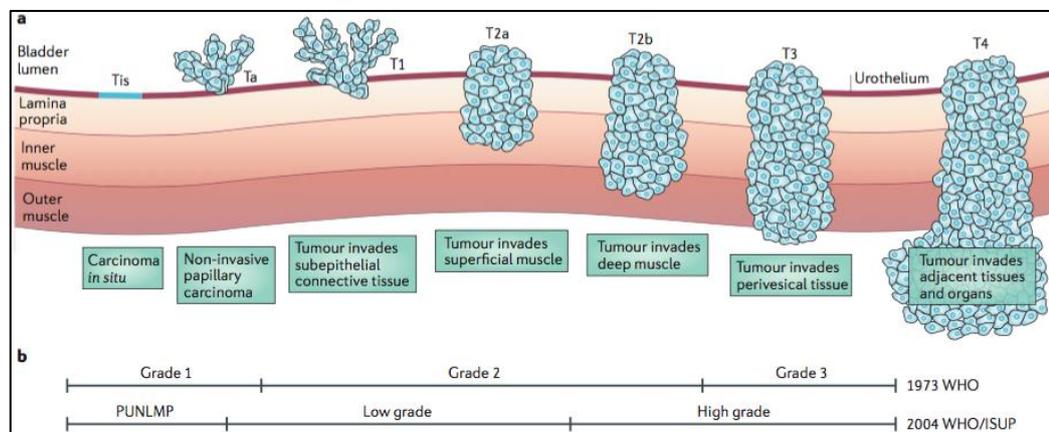


Abb. 1: a) Klassifikation der lokalen Ausdehnung eines Harnblasenkarzinoms (T-Stadien) (Knowles und Hurst 2015; mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature; Copyright Lizenz Nummer: 4336501225069) pTis= Carcinoma in situ, pTa= nicht invasive papilläre Carcinom, pT1=Infiltration der Submucosa, pT2= Infiltration Lamina muscularis, pT3= Infiltration des perivaskulären Gewebes, pT4= Infiltration der Nachbarorgane.
 b) Unterteilung nach dem pathologischen Grad: G1, G2 und G3 oder nach dem Malignitätsgrad (WHO 2004): papillary urothelial neoplasias of low malignant potential (PUNLMPs), low grade und high grade.

Das UC wird häufig auch in nicht-muskelinvasive (englisch: non-muscle invasive bladder cancer = NMIBC), veraltet „superficiales UC“ genannt, und in muskelinvasive UC (englisch: muscle invasive bladder cancer = MIBC) eingeteilt (Kamat et al. 2016, Goebell und Knowles 2010). Das nicht-muskelinvasive UC kann als *high grade* oder *low grade* UC auftreten, während das muskel-invasive UC fast immer *high grade* ist (Abb.2), (Sanli et al. 2017, Kamat et al. 2016). *High grade* flache Dysplasien des Urothelkarzinoms werden als Carcinoma in situ (pTIS) bezeichnet

und haben ein hohes Progressionspotential (Kamat et al. 2016, Knowles und Hurst 2015). In 70 bis 80 % der Fälle handelt es sich beim UC um eine papilläre Form (Sanli et al. 2017). Beim papillären UC (pTa) findet eine Hyperproliferation nach lateral und vertikal aus dem Urothel statt, sodass sich im Lumen des Harnwegstrakts polypenartige Strukturen bilden (Sanli et al. 2017, Kamat et al. 2016, Schulz 2006). Die Therapie des papillären UC erfolgt mittels transurethraler Resektion (TUR) (Soria et al. 2019, Sanli et al. 2017). Bei einer Rezidivrate von bis zu 75 % sind regelmäßige Zystoskopien, wiederholte Resektionen, adjuvante intravesicale Instillationstherapie mit Zytostatika oder Mycobacterium Vaccine (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) notwendig (Sanli et al. 2017). Mehrfache Rehospitalisationen zur Behandlung der Rezidive verursachen beim papillären UC einen hohen Leidensdruck und hohe Kosten der medizinischen Versorgung (Cumberbatch und Noon 2019, Sanli et al. 2017, McConkey et al. 2010). Klinisch müssen Tumore, die nach ihrer primären Behandlung ein Rezidiv aufweisen von den Fällen ohne Rezidiv unterschieden werden, da sie trotz ähnlicher Morphologie unterschiedliche Progressionsneigung zeigen (Sanli et al. 2017, Kamat et al. 2016). Das Risiko eines Rezidivs und der Progression werden durch histopathologische Merkmale des Tumors, wie Morphologie, Stadium, Grad, Größe, Ausprägung der Invasion und Lymphknotenbefall bestimmt (Sanli et al. 2017, Goebell und Knowles 2010).

Low-grade papilläre Tumore, die nicht die epitheliale Basalmembran durchbrechen, haben eine gute Prognose (Sanli et al. 2017, Schulz und Hoffmann 2014, Knowles 2008, Enokida und Nakagawa 2008). High-grade papilläre Tumore können jedoch in 10 -15 % der Fälle eine invasive Entwicklung nehmen (Knowles und Hurst 2015, McConkey et al. 2010, Knowles 2008). Das invasive UC entsteht vermutlich überwiegend aus dem Vorläufer pTis (Knowles und Hurst 2015, Schulz et al. 2015, Knowles 2008). Seine Behandlungsoptionen sind die Zystektomie, sowie Chemo- und Radiotherapie mit kurativer Absicht im Frühstadium (Kamat et al. 2016, Schulz und Hoffmann 2014, McConkey et al. 2010, Schulz 2006). Lokale Progression und Metastasenbildung in Leber, Lunge, Knochen und Nebenniere führen zum letalen Verlauf des invasiven UC (Sanli et al. 2017). Muskelinvasive Urothelkarzinome (\geq pT1) haben eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von < 50 % abhängig vom T-Stadium und dem Ausmaß der Metastasierung (Olkhov-Mitsel et al. 2017, Knowles und Hurst 2015, Knowles 2008). Bei *high grade* pT1-Tumoren ist

strittig, ob radikale Chirurgie oder lokale Chirurgie mit adjuvanter Immun- oder Chemotherapie die optimale Therapie darstellen (Robertson et al. 2017, Kamat et al. 2016, Knowles und Hurst 2015, Knowles 2008).

Ein wichtiges Forschungsziel beim UC ist die Entwicklung von Biomarkern für prognostische und diagnostische Zwecke (Szarvas et al. 2018, Sanli et al. 2017, Schulz 2006). Benötigt werden Marker zur Identifizierung von papillären UC und Frühstadien des invasiven UC, die ein hohes Risiko für Rezidive und Progression haben, zuverlässige nicht-invasive Methoden zur Verlaufskontrolle, Marker zur Differenzierung von metastasierenden und lokal begrenzten Tumoren und prädiktive Marker für die Auswahl effizienter Behandlungsoptionen für Patienten im Spätstadium des UC mit Metastasen (Bouschetier et al. 2018, Santoni et al. 2018, Niegisch et al. 2015, Mikeska und Craig 2014, Kandimalla et al. 2013, Schulz 2006).

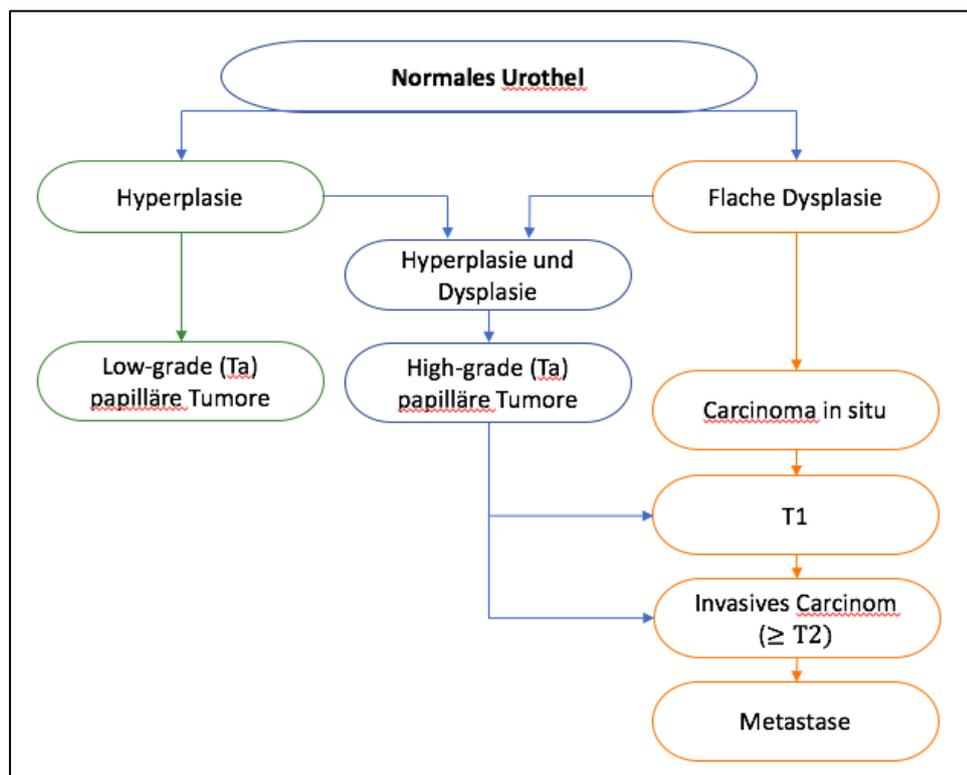


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der pathogenetischen Wege des Harnblasenkarzinoms (modifiziert nach Sanli et al. 2017; mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature; Copyright Lizenz Nummer: 4336510559031)

Zur Etablierung von Therapieansätzen und für die Entwicklung von Biomarkern ist zunächst das Verständnis der Pathomechanismen des Harnblasenkarzinoms notwendig, speziell der Veränderungen in der Regulation der Genexpression (Sanli et al. 2017, Baylin und Jones 2016, Knowles und Hurst 2015, Niegisch et al. 2015, Schulz und Hoffmann 2014). Verschiedene in der Karzinompathogenese involvierte Gene beeinflussen die Progression und Prognose des Harnblasenkarzinoms aufgrund ihrer veränderten Expression und somit Funktion im Vergleich zum normalen Gewebe (Schulz und Goering 2016, Knowles und Hurst 2015, Schulz und Hoffmann 2014, Enokida und Nakagawa 2008). Ein wesentlicher Genregulationsmechanismus, assoziiert mit oder ursächlich für die Expressionsänderungen, ist die epigenetische Veränderung der DNA-Methylierung (Schulz und Goering 2016, Knowles und Hurst 2015, Kandimalla et al. 2013).

1.2 DNA-METHYLIERUNG ALS MECHANISMUS DER EPIGENETIK

Die Epigenetik umfasst Mechanismen im Zellkern, die komplexe Vorgänge wie Zelldifferenzierung, Gendosiskompensation oder genomisches Imprinting bei der Entwicklung eines Organismus regulieren (Baylin und Jones 2016, Schulz et al. 2015, Baylin und Jones 2011). Dadurch können mit der gleichen Menge und Sequenz der vererbten DNA unterschiedlich zelluläre Phänotypen hervorgebracht werden (Niegisch et al. 2015, Schulz et al. 2015, Baylin und Jones 2011). Als Schlüsselmechanismen dienen die DNA-Methylierung, Histonmodifikation, Chromatinremodellierung und die dazu gehörigen Enzyme und Proteinkomplexe, sowie kurze und lange Ribonukleinsäuren (micro-RNA und lange nichtkodierende RNA), (Baylin und Jones 2016, Niegisch et al. 2015, Schulz et al. 2015, Baylin und Jones 2011). Die kontrollierte Interaktion und Wechselwirkung dieser epigenetischen Prozesse sorgen für die Durchführung des normalen Entwicklungsprogramms (Niegisch et al. 2015, Baylin und Jones 2011). Abweichungen bei diesen Regulationswegen können zu Fehlfunktionen und unkontrollierter Vermehrung von Zellen und Geweben führen und so auch die Pathogenese des Urothelkarzinoms fördern (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Niegisch et al. 2015).

Genetische und epigenetische Mechanismen verändern Gene, darunter Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Tumoren haben (Baylin und Jones 2016, Schulz et al. 2015, Baylin und Jones 2011). Proto-Onkogene können über Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Komponenten von Signaltransduktionswegen, Transkriptionsproteine und Zellzyklusregulatoren eine Verstärkung der Zellproliferation und eine Verlängerung der Lebensdauer der Zelle bewirken (Baylin und Jones 2016, Schulz et al. 2015). Tumorsuppressorgene hemmen die Proliferation und kontrollieren dadurch das Wachstum und die Lebensdauer der Zelle (Baylin und Jones 2016, Knowles und Hurst 2015). Besonders die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch epigenetische Prozesse wie die DNA-Methylierung kann als Ursache für die Tumorentstehung fungieren (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Schulz et al. 2015, Niegisch et al. 2015).

Die DNA-Methylierung kann in Form einer genomweiten Hypomethylierung (Verminderung der DNA-Methylierung) oder einer abschnittweisen Hypermethylierung (Erhöhung der DNA-Methylierung) vorkommen (Baylin und Jones 2016, Knowles und Hurst 2015, Baylin und Jones 2011, Enokida und Nakagawa 2008). Dabei kommt auch oxidativer Stress als Ursache für globale DNA Hypomethylierung und Promotor Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen in Frage (Wongpaiboonwattana et al. 2013). Die DNA-Methylierung in Säugetierzellen erfolgt in der Regel als kovalente Anbindung einer Methylgruppe an den 5'-Cytosinrest innerhalb eines CpG-Dinukleotids der DNA (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Baylin und Jones 2011). Diese Reaktion wird durch Methyltransferasen (DNMT) katalysiert, die S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppen-Donor nutzen (Schulz und Goering 2016, Enokida und Nakagawa 2008). Dabei unterscheidet man zwischen Enzymen (DNMT1), die zur Erhaltung der methylierten DNA-Abschnitte über die Replikation hinweg dienen, und den *de-novo*-Methylasen (DNMT3a und DNMT3b), die eine Methylierung an nicht-methylierten DNA-Abschnitten einführen können (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Baylin und Jones 2011, Enokida und Nakagawa 2008, Veerla et al. 2008). Mehr als 70 % aller CpG-Dinukleotide im Genom somatischer adulter Zellen sind methyliert (Baylin und Jones 2016). Eine wichtige Ausnahme bilden kurze CpG-reiche Abschnitten mit einer Länge von 0.5 bis 2 kb, die als CpG-Inseln bezeichnet werden (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016). Sie kommen in ca. 60%

der Gene vor, meist um den Transkriptionsstart oder am 3'-Ende (Baylin und Jones 2016, Baylin und Jones 2011, Enokida und Nakagawa 2008). Die meisten CpG-Inseln sind in allen Geweben und allen Entwicklungsstadien unmethyliert (Schulz und Goering 2016, Enokida und Nakagawa 2008). In vielen Tumoren sind jedoch gerade solche Sequenzen methyliert (Robertson et al. 2017, Baylin und Jones 2016). Die Hypermethylierung wird durch DNA-Methyltransferasen vermittelt, vermutlich während der DNA-Replikation; welche Faktoren sie auslösen, ist jedoch unbekannt (Salin et al. 2017, Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Hoffmann und Schulz 2005). Diese DNA-Hypermethylierung gehört zu den meist untersuchten epigenetischen Veränderungen (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Knowles und Hurst 2015, Niegisch et al. 2015, Baylin und Jones 2011).

In der Literatur sind im Harnblasenkarzinom über 50 Gene mit häufiger Hypermethylierung beschrieben (Sanli et al. 2017, Knowles und Hurst 2015, Schulz und Goering 2016, Kandimalla et al. 2103, Enokida und Nakagawa 2008). Dabei zeigte sich in den analysierten Sequenzen dieser Gene eine Veränderung des Methylierungsmusters in Richtung erhöhte oder verminderte Methylierung (Sanli et al. 2017, Enokida und Nakagawa 2008). Die betroffenen Gene regulieren zelluläre Signalwege, die Einfluss auf Zellzykluskontrolle, Zellinvasion, Zellarchitektur, DNA-Reparaturmechanismen, Apoptose, WNT-Signalweg, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion haben (Knowles und Hurst 2015, Schulz und Hoffmann 2014, Enokida und Nakagawa 2008). Einige dieser Gene könnten eine Funktion als Tumorsuppressor ausüben, die sie durch die Promotorhypermethylierung verlieren (Baylin und Jones 2016, Baylin und Jones 2011, Knowles und Hurst 2015, Enokida und Nakagawa 2008). Auf diese Weise fördert die DNA-Hypermethylierung die Initiation, Progression, Invasion und Metastasierung von Tumoren (Sanli et al. 2017, Baylin und Jones 2011, McConkey et al. 2010, Enokida und Nakagawa 2008). Hypermethylierung tritt häufiger in invasiven als im papillären UC auf (Sanli et al. 2017, Knowles und Hurst 2015, Schulz 2006) und ist universal im invasiven Karzinom (Sanli et al. 2017, Baylin und Jones 2016, Knowles und Hurst 2015, Schulz 2006). Neben der Hypermethylierung in CpG-reichen Promotorregionen bestimmter Gene stellt die genomweite reduzierte Methylierung eine zweite häufige Form der Methylierungsveränderung im UC dar (Baylin und Jones 2016, Schulz et al. 2015, Baylin und Jones 2011, Hoffmann und Schulz 2005).

Im UC werden die Veränderungen der DNA-Methylierung besonders mit der Störung der Zellzyklusregulation, die zum Tumorwachstum und genomischer Instabilität führen kann, und einer gestörten Gewebedifferenzierung in Beziehung gebracht (Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Schulz et al. 2015). Zellzyklus-Kontroll-Gene können die Tumorpheriferation beeinflussen (Schulz und Goering 2016, Knowles und Hurst 2015, Enokida und Nakagawa 2008). Im Zellzyklus gibt es verschiedenen Kontrollpunkte, die durch mehrere Faktoren, wie dem Retinoblastom (RB1) Protein, Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und CDK-Inhibitoren (CDKI) gesteuert werden (Schulz und Goering 2016, Schulz und Hoffmann 2014, Enokida und Nakagawa 2008, Schulz 2006). Zu den CDKI gehören p14^{ARF} und p16^{INK4A}, die durch *CDKN2A* kodiert werden und als Tumorsuppressoren agieren können (Knowles und Hurst 2015, Schulz et al. 2015, Schulz und Hoffmann 2014, Enokida und Nakagawa 2008, Schulz 2006).

Im Bereich der Abwehrmechanismen gegen DNA-schädigende Verbindungen sind Gene, wie die Glutathion S-Transferase P1 (*GSTP1*), durch moderate Hypermethylierung im Promotor im Harnblasenkarzinom inaktiviert (Schulz und Goering 2016, Enokida und Nakagawa 2008). Die Expression von E-Cadherin (*CDH1*), einem wichtigen Zelladhäsions-Protein in Epithelien, ist im Harnblasenkarzinom oftmals vermindert, eine Korrelation zwischen der *CDH1* Promotor-Hypermethylierung und Tumor-Stadium, -Grad und Prognose wurde in einigen Studien gefunden (Knowles und Hurst 2015, Kandimalla et al. 2013, Enokida und Nakagawa 2008). E-Cadherin begrenzt auch die Aktivierung des WNT/ β -Catenin Signalwegs (Thievensen et al. 2003). Durch Promotorhypermethylierung von E-Cadherin im UC entfällt diese Funktion und der WNT/ β -Catenin Signalweg wird aktivierbar (Nusse und Clevers 2016, Enokida und Nakagawa 2008, Thievensen et al. 2003). Er nimmt v.a. über die Aktivierung des Zellzyklusaktivators CCND1 (Cyclin D1) Einfluss auf das Zell-Wachstum und die -Differenzierung (Nusse und Clevers 2016). Wingless-Typ (WNT) Proteine steuern die Proliferation und Differenzierung vieler Gewebe (Nusse und Clevers 2016). Die Inaktivierung ihrer Antagonisten durch Promotor-Hypermethylierung kann zur Überaktivität des WNT/ β -Catenin Signalwegs führen (Enokida und Nakagawa 2008).

Einige Tumorsuppressorgene unterliegen durch Promotor-Hypermethylierung einem Funktionsverlust im Harnblasenkarzinom (Sanli et al. 2017, Baylin und Jones 2016, Schulz et al. 2015, Enokida und Nakagawa 2008). Infolge der Gen-Inaktivierung

durch Hypermethylierung entsteht eine gesteigerte Progression, mit positiver Korrelation zum Tumor-Stadium, pathologischen Grad, Rezidiv und Letalität im Harnblasenkarzinom (Sanli et al. 2017, Schulz und Goering 2016, Kandimalla et al. 2013, Enokida und Nakagawa 2008).

Epigenetische Veränderungen in der Pathogenese des UC, wie die DNA-Methylierung, bieten Ansatzmöglichkeiten für neue Therapiestrategien und zur Entwicklung diagnostischer und prognostischer Biomarker (Baylin und Jones 2016, Niegisch et al. 2015). Zur Etablierung solcher Biomarker sind jedoch Untersuchungen zur Analyse weiterer Kandidatengene auf Hypermethylierung im Harnblasenkarzinom notwendig (Schulz und Goering 2016).

1.3 NEUE KANDIDATENGENE

ADAM19

ADAM19, auch *MADDAM* und *Meltrin β* genannt, gehört zur *ADAM* Familie (A Disintegrin And Metalloproteinase) (Murphy 2008). Beim Menschen wurden 22 verschiedene *ADAM* Gene identifiziert, die bei Fertilisation, Muskelentwicklung, Zellinteraktionen, Inflammation, Zellmigration, aber auch Tumordinvasion und Metastasenbildung agieren (Mullooly et al. 2016, Murphy 2008, Takada et al. 2005, Seals und Courtneidge 2003). *ADAMs* sind Multi-Domänen-Proteine, die in der Regel aus einem aminoterminalen Propeptid, einer Metalloproteinase-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-Domäne, einer Epidermal-Growth-Factor-like-Repeat Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer cytoplasmatischen Domäne bestehen (Mullooly et al. 2016, Murphy 2008, Reiss et al. 2006). Gemeinsam wirken sie auf das Tumor-Mikromilieu, die inflammatorische Antwort, Immunregulation, Angiogenese, sowie Zell-Migration und -Proliferation (Edwards et al. 2008, Murphy 2008, Ehrnsperger et al. 2005).

Einige Vertreter der *ADAM* Familie beeinflussen die Tumorgenese und Progression durch antiangiogenetische und anti-metastatische Effekt der Disintegrin-Domäne (Edwards et al. 2008, Reiss et al. 2006). Die Tumorentwicklung ist abhängig vom Gewebsumilieu, in dem die Stromal-Zellen an der Induktion, Selektion und

Expansion von neoplastischen Zellen beteiligt sind (Murphy 2008). Dabei agieren extrazelluläre Proteasen als Regulatoren von Interaktionen zwischen Zellen untereinander und von Zellen mit der extrazellulären Matrix, die für die Tumorgenese und Metastasenbildung entscheidend sind (Yadav et al. 2014, Murphy 2008, Reiss et al. 2006, Takada et al. 2005).

Im Rahmen der extrazellulären Regulation von zellulären Signaltransduktionsmechanismen bewirken *ADAMs* die Spaltung transmembranöser Proteine und leiten den vollständigen Abbau von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen ein (Murphy 2008).

Der proteolytische Abbau von Membran-verankerten Proteinen erfüllt eine wichtige Funktion beim Signalaustausch im Tumor-Mikromilieu (Murphy 2008, Reiss et al. 2006). Eine erhöhte Expression und Hochregulation von *ADAMs* mit proteolytischer Wirkung wurde sowohl in Zelllinien als auch in Tumorproben mit Assoziation zur Tumoraggressivität festgestellt (Murphy 2008, Coussens et al. 2002). Dabei können auch stromale Komponenten von Karzinomen, wie Fibroblasten, kapilläre endotheliale Zellen und Makrophagen, als Quelle einiger *ADAMs* dienen (Murphy 2008, Reiss et al. 2006).

Die Überexpression einiger *ADAMs* (8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 23 und 28) wurde in Tumoren von Gehirn, Niere, Lunge, Pankreas, Brust, Magen, Leber, Prostata, Colon Uterus, Ovarien, Harnblase und Leber beschrieben (Murphy 2008, Mochizuki und Okada 2007, Reiss et al. 2006). Die genaue Lokalisation innerhalb der Tumore und das Expressionsmuster der *ADAMs* sind jedoch nicht bei allen Tumoren ausreichend bekannt. Daher sind weitere Studien notwendig, um die Regulationsmechanismen der *ADAMs* in Korrelation zur Tumorexpression und zum Malignitätsgrad zu verstehen (Murphy 2008).

Umgekehrt konnte in einigen Studien eine Inaktivierung bestimmter *ADAMs* durch DNA-Methylierung dargestellt werden (Murphy 2008, Takada et al. 2005). Die Inaktivierung von *ADAMs* durch Hypermethylierung scheint auch eine Rolle im Harnblasenkarzinom zu spielen (Murphy 2008). Allerdings gibt es keine Studien, die das Expressionsmuster von *ADAM19* im Harnblasenkarzinom und den Einfluss von DNA-Methylierung auf *ADAM19* untersucht haben.

CBX7

Das *CBX7* Gen ist auf dem Chromosom 22q13.1 lokalisiert und kodiert das Chromobox homolog 7, das zur Familie der Polycomb-Gruppen Proteine (PcG) gehört (Pallante et al. 2008). Im Genom von Säugetieren sind fünf *CBX* Gene (*CBX2*, *CBX4*, *CBX6*, *CBX7* und *CBX8*) bekannt (Vandamme et al. 2011). Das *CBX7* Protein ist 28,4 kDa groß und umfasst 251 Aminosäuren mit der namensgebenden Chromodomäne zwischen Aminosäure 10 und 46 (Federico et al. 2009, Pallante et al. 2008). Chromodomänen erkennen methylierte Histone. Eine Chromodomäne, mit einer 37 Aminosäuren langen Homologieregion, beinhaltet u. A. auch das Heterochromatin Protein 1 (HP1) und das homologe Polycomb Protein in *Drosophila melanogaster* (Pallante et al. 2008, Gil et al. 2004).

PcG Proteine bilden im Wesentlichen zwei Protein-Komplexe, die als *Polycomb repressive complex 1* und *2* (PRC1 und PRC2) bezeichnet werden (Vandamme et al. 2011). PRC2 enthält als zentrale Untereinheit die Lysin Methyltransferase EZH2 und initiiert damit die Repression von Zielgenen durch Trimethylierung am Lysin 27 im Histon H3 (H3K27me3), (Li et al. 2010, Yap et al. 2010). Der PRC1-Komplex wirkt ebenfalls repressiv; daran ist eine Mono-Ubiquitinierung am H2A-K116 beteiligt. *CBX7* wirkt besonders die Einschränkung der Lebensdauer von Zellen über p16^{INK4a} und p14^{ARF}/p53 entgegen (Gil et al. 2004). Das *CBX7* Protein im PRC1 dirigiert eine Repression der Transkription des Tumorsuppressor-Gens *CDKN2A*/p16^{INK4} durch eine direkte Bindung am von PRC2 gebildeten H3K27me3 (Ren et al. 2016, Messaoudi-Aubert et al. 2010, Yap et al. 2010). *CBX7* soll daraufhin auch die Trimethylierung von Histon 3 im Lysin 9 im p16 Locus (H3K9me3) auslösen (Li et al. 2010). Die transkriptionale Repression von Genen mittels H3K27me3 und H3K9me3 würde so durch beide PRCs etabliert (Ren et al. 2016, Li et al. 2010).

Lange nichtkodierende RNAs (lncRNA) haben eine wichtige Funktion bei der Geninaktivierung mittels Histon-Methyltransferasen (Yap et al. 2010). ANRIL, eine lange nichtkodierende RNA, auch *CDKN2B-AS* genannt, wird im Chromosom 9p21 am gleichen Locus wie die Tumorsuppressoren p14^{ARF}, p15^{INK4B} und p16^{INK4A} transkribiert und kann zur Chromatinkondensation am INK4a/ARF Locus und seiner Repression führen (Ren et al. 2016, Hoffmann et al. 2015, Yap et al. 2010). *CBX7* wird sowohl über Bindung an H3K27me als auch direkt durch Bindung an ANRIL reguliert und führt so zur Aktivierung des PRC1 (Yap et al. 2010). ANRIL nimmt auf diese Weise Einfluss sowohl auf das normale als auch Tumor-Zellwachstum

(Yap et al. 2010). *CBX7* kann entsprechend durch seine Wirkung auf den *CDKN2A/B*-Locus das Zellwachstum von normalen und Tumorzellen kontrollieren (Maertens et al. 2009, Bernard et al. 2005, Pallante et al. 2008).

Innerhalb der Tumorphathogenese soll *CBX7* so auf die Progression, die Zellmigration und Proliferation, Seneszenz, Metastasierung, sowie Lymphangiogenese wirken (Zhang et al. 2010, Scott et al. 2007). Dabei soll *CBX7* auch durch Komplexbildung mit der DNA-Methyltransferase (DNMT) in Promotoren von Schlüsselgenen, die durch tumorspezifische DNA-Methylierung verändert werden, eine DNA-Hypermethylierung induzieren oder erweitern können (Mohammad et al. 2009).

Die Analyse von *CBX7* in verschiedenen Karzinomen mit unterschiedlichen pathologischen Bedingungen und Charakteristika deutet jedoch auf eine zweischneidige Rolle von *CBX7* als wechselweise Tumorsuppressorgen oder Onkogen (Ni et al. 2017, Xie et al. 2015, Zheng et al. 2015, Pallante et al. 2014, Karamitopoulou et al. 2010, Hinz et al. 2008, Zhang et al. 2010, Pallante et al. 2008). *CBX7* scheint in Lymphomen, Prostata-Karzinom, Ovarial-Karzinom und Magenkarzinom als Onkogen zu agieren, dagegen eher als Tumorsuppressorgen im Harnblasenkarzinom, Colon-Karzinom, Pankreas-Karzinom, Lungen-Karzinom, Glioblastom und Schilddrüsenkarzinom (Ni et al. 2017, Pallante et al. 2015, Zheng et al. 2015, Zhang et al. 2010).

Die genauen Abläufe dieser Regulationsmechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt. Weitere Studien sind daher notwendig, um diese Regulationsmechanismen von *CBX7* und ihren Einfluss auf die Pathogenese der Tumorprogression zu definieren. Die DNA-Methylierung bietet einen guten Ansatzpunkt zur weiteren Eruierung der Expression und Funktion des *CBX7* Gens im Harnblasenkarzinom (Mohammad et al. 2009, Hinz et al. 2008).

Die Funktion und Expression von *CBX7* im Urothelkarzinom wurde bereits untersucht (Pallante et al. 2015, Hinz et al. 2008). Die Analyse von *CBX7* auf DNA-Methylierung im Harnblasenkarzinom war zu Beginn der Dissertation aber noch nicht erfolgt.

RUNX3

Bei Säugetieren wurden drei *RUNX* (Runt related transcription factor) Gene, *RUNX1*, *RUNX2* und *RUNX3*, nachgewiesen (Kim et al. 2008). Jedes *RUNX* Gen beinhaltet zwei Promotoren, einen proximalen (P1) und einen distalen (P2) (Ito et al. 2015, Bone et al. 2010). Die *RUNX* Transkriptionsfaktoren sind bedeutend für die Ontogenese und wirken auf die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Spezifikation von Zellen (Ito et al. 2015).

Die *RUNX* Gene üben als Regulatoren bei der Karzinompathogenese eine gewebsspezifische Funktion aus (Ito et al. 2015). *RUNX1* ist für die Hämatopoese essentiell und Mutationen finden sich bei Leukämien (Ito et al. 2015, Kim et al. 2008). *RUNX2* ist als wichtiger Transkriptionsfaktor im Knochen bedeutend bei der Entstehung von Osteosarcomen und Knochenmetastasen bildenden Tumoren, wie Mamma- und Prostakarzinom, und zeigt bei diesen Tumoren eine erhöhte Expression (Ito et al. 2015).

Das *RUNX3* Gen befindet sich in der chromosomalen Region 1p36-35 (Ito et al. 2015, Ko et al. 2012). In dieser Region liegen offenbar mehrere Tumorsuppressor-Gene (Ito et al. 2015). Diese Region unterliegt Deletionen in Karzinomen von Colon, Harnblase, Brust, Lunge und Magen, sowie im hepatozellulären Karzinom und Neuroblastom (Ito et al. 2015). In soliden Tumoren kann die *RUNX3* Inaktivierung die Karzinompathogenese fördern, da *RUNX3* die Zell-Proliferation inhibiert und die Apoptose aktiviert (Ko et al. 2012, Kim et al. 2008).

Die Expression der *RUNX* Gene und die Regulation der Aktivität der *RUNX* Transkriptionsfaktoren wird durch viele Faktoren beeinflusst; dabei interagieren entwicklungssteuernde (morphogene) Signalwege, Zellzyklusmechanismen, Tumornekrosefaktoren, DNA-Reparaturmechanismen, hypoxische Mikroumgebung, Hormonrezeptoren und Tyrosinkinaserzeptoren, Inflammation, sowie DNA-Methylierung (Lotem et al. 2015, Ito et al. 2015, Wongpaiboonwattana et al. 2013).

Die Inaktivierung von *RUNX3* durch Hypermethylierung seiner Promotor CpG-Insel wurde in Magen-, Lungen-, hepatozellulären, Brust-, Colon-, Pankreas-, Gallengangs-, Prostata-, Larynx-, Schilddrüsen- und Harnblasen-Karzinomen beobachtet (Ko et al. 2012, Nishio et al. 2010, Kim et al. 2008).

Dabei wurde die Hypermethylierung der CpG-Insel im *RUNX3* P2 Promotorbereich als wichtiger Faktor in der Karzinompathogenese des Harnblasenkarzinoms

identifiziert (Lotem et al. 2015, Kim et al. 2008). Eine solche Inaktivierung wurde auch in Magenkarzinomen festgestellt (Lotem et al. 2015). Die Hypermethylierung von *RUNX3* beginnt früh in der Tumorgenese (Ito et al. 2015). So zeigt sich in atypischen adenomatösen Hyperplasien der Lunge eine Inaktivierung von *RUNX3* mittels Hypermethylierung (Ito et al. 2015). Im colorectalen Karzinom konnte die *RUNX3* Hypermethylierung als Ansatz für die Auswahl der Therapie genutzt werden (Ito et al. 2015, Nishio et al. 2010).

Aufgrund seiner wichtigen Funktion in der Tumorphogenese ist *RUNX3* ein geeignetes Kandidatengens zur Analyse der DNA-Methylierung im Harnblasenkarzinom (Kim et al. 2008, Zhang et al. 2008). Der Zusammenhang von *RUNX3* Inaktivierung durch Hypermethylierung und der Pathogenese des Harnblasenkarzinoms könnte zur Etablierung von diagnostischen und prognostischen Markern genutzt werden (Kim et al. 2005). Die Bedeutung der DNA-Hypermethylierung von *RUNX3* im Harnblasenkarzinom wurde bereits in einigen Studien verdeutlicht, jedoch gibt es bisher keine Analyse des Methylierungsmusters von *RUNX3* P1 Promotorbereich im Vergleich zu P2 Promotorbereich (Lotem et al. 2015, Kim et al. 2008).

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Die bisherigen Erkenntnisse verdeutlichen die hohe Relevanz der DNA-Methylierung bei der Tumorprogression und Proliferation in verschiedenen Karzinomen. Die Aufklärung der Veränderungen der DNA-Methylierung und ihrer Auswirkung auf das Harnblasenkarzinom kann zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen und klinischem Nutzen führen.

DNA-Methylierungsveränderungen der Gene *ADAMI9*, *CBX7* und *RUNX3* im Harnblasenkarzinom wurden bisher nicht oder nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse dieser neuen Kandidatengene auf Hypermethylierung im Harnblasenkarzinom unter der Berücksichtigung folgender Fragestellungen:

1. Findet eine Hypermethylierung dieser Gene im Harnblasenkarzinom statt?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen dem DNA-Methylierungsmuster und der Expression?
3. Gibt es eine Beziehung zwischen Hypermethylierung und klinischen Parametern?

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

In dieser Arbeit wurden 20 Harnblasenkarzinomzelllinien (Tabelle 1), acht normale uroepitheliale Zellkulturen (Tabelle 2), 11 normale Harnblasenproben (Tabelle 3), 23 Harnblasentumorproben (Set 1, Tabelle 4) und 63 Harnblasentumorproben (Set 2, Tabelle 5) aus der Gewebekbank des Forschungslabors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Düsseldorf verwendet. Die Harnblasentumorproben aus Set 1 wurden für die Expressionsmessungen und die Harnblasentumorproben aus Set 2 für die DNA-Methylierungsanalyse verwendet. Eine Überprüfung der humanen Proben erfolgte durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Die Zelllinien wurden auf Kontaminationen durch Mykoplasmen gemäß dem Standardprotokoll des Forschungslabors kontrolliert. Die normalen uroepithelialen Zellen (Tabelle 1) wurden aus Harnleitern von Patienten mit Nephrektomien bei Nierenkarzinom in der Urologischen Klinik im Forschungslabor etabliert und kultiviert. Die Blutproben wurden Patienten, die aufgrund eines Urothelkarzinoms behandelt wurden, entnommen. Die Tumorproben stammen aus Zystektomien von Patienten, die in der Urologischen Klinik chirurgisch behandelt wurden. Die Patienteneinwilligung wurde nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung mittels eines Formblatts geholt. Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität hat die Durchführung der Studie mit der Studiennummer 3077 für die Gewebeproben und mit der Studiennummer 1788 für die uroepithelialen Zellen bewilligt.

Normale uroepitheliale Zellen	Herkunft	Geschlecht	Alter
UP80	Harnleiter	M	39
UP81	Harnleiter	M	-
UP83	Harnleiter	M	73
UP86	Harnleiter	-	-
UP91	Harnleiter	-	-
UP111	Harnleiter	F	69
UP118	Harnleiter	F	74
UP193	Harnleiter	M	75

Tabelle 1: Normale uroepitheliale Zellen wurden aus Harnleiter von Patienten mit Nephrektomien bei Nierenzellkarzinom gewonnen und kultiviert; das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation.

Zelllinien	Herkunft	Geschlecht	Alter	Tumor-Stadium/ Tumor-Grad	Referenz
5637	Primärtumor Blase	M	68	G2	Williams 1980
253J	Lymphknotenmetastese	M	53	T4, G4	Elliot et al. 1974; Masters 2000
639v	Primärtumor Ureter	M	69	G3	Elliot et al. 1976
647v	Primärtumor Blase	M	59	pT1, G2	Williams 1980
BC61	-	-	-	pTa, G2	Seifert et al. 2007
BFTC905	Primärtumor Blase	F	51	pTa, G3	Tzeng et al. 1996
BFTC909	Primärtumor Nierenbecken	M	64	G3	Tzeng et al. 1996
HIA		-	-	TCC	Bruch 1999
HT1376	Blase	F	58	pT2, G3	Rasheed et al. 1977
J82	Primärtumor Blase	M	58	pT3, G3	O'Toole et al. 1978
MGHU4	Urotheliale Atypie	-	-	urotheliale Atypie	Lin et al. 1985
RT4	Tumor Blase (Rezidiv)	M	63	T2, G1	Rigby and Franks 1970
RT112	Primärtumor Blase	F	-	G2	Masters 2000
SCABER	-	-	-	-	O'Toole et al. 1976
SD	Primärtumor Blase	-		TCC	Pauli et al. 1983
SW1710	Blase	F	84	G3	Kyriazis et al. 1984
T24	Primärtumor	F	81	G3	Williams 1980
Umuc3	Blase	M	-	TCC	Grossmann et al. 1986
VmCub1	Primärtumor Blase	M	-	TCC	Williams 1980
VmCub3	Primärtumor Blase	M	-	TCC	Williams 1980

Tabelle 2: Zelllinien verwendet für Expressionsmessungen von *ADAM19* und *CBX7* mittels qRT-PCR, sowie Sequenzierungsmessungen mittels Bisulfitsequenzierung (*ADAM19* und *CBX7*) und Pyrosequenzierung (*CBX7* und *RUNX3*); (www.dsmz.de/).

Normale Harnblasenproben	Herkunft	Geschlecht	Alter
BN18	Harnblase	M	72
BN273	Harnblase	M	68
BN274	Harnblase	M	66
BN275	Harnblase	M	62
BN276	Harnblase	F	-
BN357	Harnblase	F	-
BN363	Harnblase	M	75
BN373	Harnblase	M	86
BN369	Harnblase	-	-
BN365	Harnblase	M	65
BN371	Harnblase	-	-

Tabelle 3: Normale Harnblasenproben verwendet für Expressionsmessungen von *CBX7* mittels qRT-PCR.

Harnblasen Tumorproben	Geschlecht	Alter	Tumor-Stadium T	Tumor-Stadium N	Tumor-Stadium M	Tumor-Grad G
Bt41	F	54	pTa	N0	M0	G2
Bt170	F	55	pT2	N0	M0	G2
Bt67	F	84	pT2	N0	M0	G3
Bt212	M	67	pT2a	N1	M0	G2
Bt362	M	75	pT2a	N0	M0	G2
Bt320	M	67	pT2a	N1	M0	G3
Bt354	F	57	pT2b	N0	M0	G3
Bt115	M	65	pT3a	N0	M0	G3
Bt168	M	57	pT3a	N2	M0	G3
Bt12	M	60	pT3a	N0	M0	G3
Bt172	M	72	pT3a	N0	M0	G3
Bt3	M	65	pT3b	N0	M0	G2
Bt62	F	69	pT3b	N0	M0	G2
Bt6	M	76	pT3b	N2	M0	G3
Bt28	M	68	pT3b	N0	M0	G3
Bt61	M	75	pT3b	N0	M0	G3
Bt69	M	77	pT3b	N0	M0	G3
Bt111	M	73	pT3b	N0	M0	G2-3
Bt246	M	61	pT4a	N0	M0	G3
Bt360	M	76	pT4a	N0	M0	G3
Bt364	M	65	pT4a	N1	M0	G3
Bt55	M	73	pT4a	N1	M0	G3
Bt322	M	70	pT4a	N0	M0	G3

Tabelle 4: Harnblasentumorproben Set 1 verwendet für Expressionsmessungen von *CBX7* mittels qRT-PCR.

Harnblasen Tumorproben	Geschlecht	Alter	Tumor- Stadium T	Tumor- Stadium N	Tumor- Stadium M	Tumor- Grad G
141	M	71	pT1	N0	M0	G1
31	F	45	pTa	N0	M0	G2
91	M	64	pT1	N0	M0	G2
86	F	66	pT1	N1	M0	G2-G3
170	F	61	pT1	N1	M0	G3
128	M	50	pT1	N0	M0	G3
69	M	61	pT2	N0	M0	G1
74	M	65	> pT2	N0	M0	G3
195	M	60	pT2a	N0	M0	G2
27	M	70	pT2a	N0	M0	G2
3	M	66	pT2a	N0	M0	G2
140	M	73	pT2a	N0	M0	G2
45	M	64	pT2a	N0	M0	G3
163	M	67	pT2a	N1	M0	G2
191	M	73	pT2a	N1	M0	G2
189	M	62	pT2a	N0	M0	G3
152	M	59	pT2b	N0	M0	G3
99	F	81	pT2b	N0	M0	G3
96	F	64	pT2b	N0	M0	G3
4	M	52	pT2b	N0	M0	G3
61	M	65	pT3	N0	M0	G4
15	M	77	pT3	N0	M0	G3
169	M	71	pT3	N0	M0	G2
13	M	60	pT3a	N0	M0	G3
161	M	46	pT3a	N1	M0	G3
119	M	57	pT3a	N2	M0	G3
132	F	71	pT3a	N2	M0	G3
193	M	52	pT3a	N2	M0	G3
199	F	78	pT3a	N0	M0	G3
25	M	61	pT3b	N0	M0	G2
184	M	87	pT3b	N0	M0	G2
85	M	73	pT3b	N0	M0	G2-G3
186	M	68	pT3b	N0	M0	G3
157	M	67	pT3b	N0	M0	G3
100	M	74	pT3b	N0	M0	G3
106	F	41	pT3b	N0	M0	G3
39	F	77	pT3b	N0	M0	G3
135	M	70	pT3b	N1	M0	G3
116	M	64	pT3b	N1	M0	G3
43	F	75	pT3b	N1	M0	G3-G4
167	F	55	pT3b	N2	M0	G3
52	M	66	pT3b	N2	M0	G3
40	F	73	pT3b	N0	M0	G3
9	M	67	pT3b	N2	M0	G3

98	M	45	pT4a	N0	M0	G3
67	M	63	pT4a	N0	M0	G3
54	F	60	pT4a	N0	M0	G3
77	M	76	pT4a	N0	M0	G3
82	M	59	pT4a	N0	M0	G3
60	F	81	pT4a	N0	M0	G4
42	M	73	pT4a	N1	M0	G3
174	M	62	pT4a	N1	M0	G3
197	M	61	pT4a	N2	M0	G3
102	M	68	pT4a	N2	M0	G3
118	F	81	pT4a	N2	M0	G3
180	M	64	pT4a	N0	M0	G2
114	M	65	pT4a	N2	M0	G3
133	F	50	pTa	N0	M0	G1
144	M	73	pTa	N0	M0	G2
78	M	64	pT3a	N0	M0	G3
16	M	84	>pT2	N0	M0	G2
58	F	80	>pT2	N0	M0	G3
28	F	73	pT3b	N0	M0	G3

Tabelle 5: Harnblasentumorproben Set 2 verwendet für Sequenzierungsmessungen von *CBX7* und *RUNX3* mittels Pyrosequenzierung.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	TM (°C)	Amplifikation	Verwendung	CpG
Biseq_ <i>ADAM19</i> Fwd	GGTAGTGG GTAGGTAT GGTT	57,3	166 bp	<i>ADAM19</i> Bisulfitsequenzierung	17
Biseq_ <i>ADAM19</i> Rev	CTAACCAC TTACTTAT CCATCC	56,5	166 bp	<i>ADAM19</i> Bisulfitsequenzierung	17
Hs_ <i>ADAM19</i> _1SG	Quanti Tect Primer Assay (Qiagen)			<i>ADAM19</i> Expressionsmessung	
<i>CBX7</i> _Fwd	GGTTTTTA GTGAGGA ATGGAGG		302 bp	<i>CBX7</i> Expressionsmessung Bisulfitsequenzierung	30
<i>CBX7</i> _Rev	CCCTTCCA TTTATCCA TCCACC		302 bp	<i>CBX7</i> Expressionsmessung Bisulfitsequenzierung	30

Hs_AL03184 6.3_02_PM Sequence to Analyze	GGATCGG ACGTAGG GATCCTCA GCGCCATC CCACCTCG C	56	146 bp	<i>CBX7</i> Pyrosequenzierung	4
Hs_AL03184 6.3_02_PM Sequence after Bisulfite treatment	GGATYGG AYGTAGG GATTTTAA GYGTTATT TTATTTYG T	56	146 bp	<i>CBX7</i> Pyrosequenzierung (Reverse Primer mit Biotin)	4
Hs_AL03184 6.3_02_PM Anti-Sense	TGATCGAT CGATAGA GTTATGTC GTATTATT CG	56	146 bp	<i>CBX7</i> Pyrosequenzierung	4
HS_RUNX3 _01_PM Sequence to Analyze	TCGCCGGC CGGGCGTG GACGACG CGC		88 bp	<i>RUNX3_01</i> Pyrosequenzierung	7
Hs_RUNX3_ 01_PM Sequence after Bisulfite treatment	TYGTYGGT YGGGYGT GGAYGAY GYGT		88 bp	<i>RUNX3_01</i> Pyrosequenzierung (Reverse Primer mit Biotin)	7
Hs_RUNX3_ 01_PM Anti-Sense	ATCGTCGT CGTCGATG ATCGATCG TCG		88 bp	<i>RUNX3_01</i> Pyrosequenzierung	7
HS_RUNX3 _04_PM	CAGTGCCC CGATCCCG GCCTAGCG		162 bp	<i>RUNX3_04</i> Pyrosequenzierung	5

Sequence to Analyze	CCGTCCGG T				
Hs_RUNX3_04_PM Sequence after Bisulfite treatment	TAGTGTTT YGATTTYG GTTTAGYG TYGTTYGG T		162 bp	<i>RUNX3_04</i> Pyrosequenzierung (Reverse Primer mit Biotin)	5
HS_RUNX3_04_PM Anti-Sense	ATAGTGTT CGAGTTCG TATGTCGA TCGTCG		162 bp	<i>RUNX3_04</i> Pyrosequenzierung	5

Tabelle 6: Primer verwendet für Expressions- und Sequenzierungsmessungen.

Verwendung	Kit	Firma
DNA-Präparation	Blood and Cell Midi Kit	Qiagen
DNA-Isolierung	Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf
RNA-Isolierung	RNeasy Mini Kit	Qiagen
Expressionsmessung	LightCyclerFastStart DNA Master HypProbe	Roche
qRT-PCR	QuantiTect SYPER Green PCR Kit	Qiagen
Klonierung und Aufreinigung	TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing Fast Plasmid Mini Kit	Invitrogen Eppendorf
Sequenzierung	BigDye Terminator Kit V3.1	Thermo Fisher Scientific
Bisulfitumwandlung	EZ DNA Methylation GOLD Kit	Zymo Research Corp.
Pyrosequenzierung	PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen

Tabelle 7: Kits verwendet für DNA-Präparation, DNA- und RNA-Isolierung, Expressionsmessung, quantitative Real-Time-PCR, Bisulfitumwandlung, Bisulfitsequenzierung und Pyrosequenzierung.

Verwendung	Reagenzien	Firma
Zellkultur	Plasmide: PCR 4-TOPO-Vektor TOP 10 Komponente E.coli	Invitrogen Invitrogen
Zellkultur	Enzyme: EcoRI HotStar Taq Polymerase SSSi (CpG) Methylase	Fermentas Qiagen Biolabs
Zellkultur	Bakterien: One Shot®TOP10	Invitrogen
Zellkultur	Antibiotika: Penicillin/Streptomycin Ampicillin	Biochem Sigma
Zellkultur	Aprotinin HEPES Collagen IV Solution KSBM (Serum-freie Keratinocyten Medium) EGF (epidermal growth factor) Rinderhypophysenextrakt Choleratoxin PBS Ethanol, absolut EDTA Fökales Kälberserum DMSO Tris Trypsin Versene S.O.C. Proteinase K Ribonuklease Inhibitore	Calbiochem Sigma Sigma Gibco Gibco Gibco Calbiochem Biochem Sigma Sigma SeromedBiochem Sigma Merck Biochem Gibco Roth Qiagen Fermentas

	weitere Zellkulturmedien	Gibco
PCR und Gelelektrophorese	Magnesiumchlorid	Qiagen
	Aqua ad iniectabilita	Delta Select
	0,5g/µl DNA Ladder Mix	Fermentas
	6x Lade Puffer	Fermentas
	6x Stopp Puffer	Fermentas
	10mM dNTPs	Fermentas
	0,5mg/ Ethidiumbromid	Sigma
	Agarose	Sigma
	Luria Agar Base	Becton Dickinson
	Luria Broth Base	Gibco
	Lithiumchlorid	Sigma
TAE	Eppendorf	
Zellkultur	5-Aza-2`-Desoxycytidin	Sigma

Tabelle 8: Reagenzien verwendet für die Zellkultur, PCR und Gelelektrophorese.

Verwendung	Gerät	Firma
PCR	Thermocycler T3	Biometra
Real-Time PCR	Light Cycler	Roche
Gelelektrophorese	Elektrophoresekammer	Biometra, Biorad
Zellkultur	Brutschrank (ID 014024)	Heraeus
Zellkultur	Inkubator Innova 4200	Edison
Schüttler	Thermomixer	Eppendorf
Messung von RNA/DNA	Nanodrop	Nanodrop Technologies
Mini-Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge	Avanti TM 30/Allegra 21R	Eppendorf
Pyrosequenzierung	PyroMark Q24 Echtzeit-Pyrosequenzierungs-Analysator	Qiagen
Gel Print	Gel Print 2000i	MWG Biotech

Tabelle 9: Geräte verwendet für die PCR, Zellkultur, Messungen von RNA/DNA und Sequenzierung.

Software	
Programme:	LightCycler Software 3.5 Oligo 4.1 Primer Analysis Software SPSS 11.5 PyroMark Q24 1.01.0
Datenbanken:	https://www.ncbi.nlm.nih.gov https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ https://www.ensembl.org https://genome.ucsc.edu https://xenabrowser.net

Tabelle 10: Software; verwendete Programme und Datenbanken.

2.2 METHODEN

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Zellkultur (2.2.1), Untersuchungen zur Expression mittels quantitativen Real-Time-PCR (2.2.2) und Untersuchungen zur DNA-Methylierung mittels Bisulfitsequenzierung und Pyrosequenzierung (2.2.3) durchgeführt. Die im Folgenden beschriebenen Methoden entsprechen den Protokollen des Urologischen Forschungslabors, sowie den Herstellerangaben.

2.2.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLKULTUR

In der Zellkultur wurden humane Urothel-Primärkulturen angelegt, humane Zelllinien kultiviert, DNA und RNA aus Zelllinien isoliert und qualitativ und quantitativ gemessen, sowie eine Behandlung der Zelllinien mit Inhibitoren der DNA-Methylierung durchgeführt.

2.2.11 Anlage von humanen Urothel-Primärkulturen

Nach Resektion wird der Harnleiter in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) mit 10 mM HEPES und 0,2 ml Aprotinin (20 kIU/ml) transportiert.

Die Harnleiterpräparation erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Urologischen Forschungslabors. Der Harnleiter wird zum Entfernen des Transportmediums in eine Petrischale überführt. Danach folgt eine zweifache Waschung mit dem Waschpuffer und das Entfernen des umgebenden Gewebes. Der Harnleiter wird in eine neue Petrischale mit frischem Waschpuffer zum Aufschneiden überführt und mit der epithelialen Seite nach oben über Nacht bei 4 °C gelagert. Eine 75 cm² Kulturflasche wird mit 300 µl Collagen IV Lösung (5 mg Collagen in 10 ml 0,1 % Essigsäure) über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgt nach dem Entfernen des Waschpuffers eine zweifache Waschung mit KFSM ohne

Supplemente (Serum-freiem Keratinozyten Medium). Die epithelialen Zellen werden mit einer Glaspipette abgeschabt und das Medium mit den Zellen wird in ein Greiner-Röhrchen überführt. Die Zellen werden resuspendiert und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wird die Kollagenlösung aus der Kulturflasche entfernt und einmal mit PBS gewaschen. 3 ml KSFM mit Supplementen wird hinzugefügt. Die Supplemente bestehen aus 4 ng/ml EGF (epidermalen Wachstumsfaktor), 30 ng/ml Cholera toxin, 1 % Rinderhypophysenextrakt (BPF= bovine pituitary extracts), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Der Überstand der Zellen wird nach der Zentrifugation aus den Greiner-Röhrchen abgesaugt. Der Zellenpellet wird in 3 ml KSFM mit Supplementen suspendiert und in die Kulturflasche überführt. Die Zellen werden bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Am dritten Tag wird das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und frisches KSFM mit Supplementen hinzugegeben. Am nächsten Tag wird erneut das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen, 3 ml Versene hinzugefügt und nach 1 min Inkubation wieder entfernt. Es folgt eine Zugabe von 1 ml Trypsin, dass nach 1 min Schütteln wieder entfernt wird. Die Zugabe von einem weiteren ml Trypsin wird nach 3 min bei 37 °C durch 2 ml Trypsin-Inhibitor gehemmt. Aus der Kulturflasche werden die Zellen in ein Greiner-Röhrchen überführt, die Kulturflasche mit KSFM Medium ausgewaschen; dieses Medium wird ebenfalls zu den Zellen gegeben und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen können für weitere Versuche ausgesät werden.

2.2.12 Kultivierung von humanen Zelllinien

Die Kultivierung der Harnblasenkarzinomzelllinien erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Urologischen Forschungslabors im Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit stabilisiertem Glutamin (Glutamax), 15 % FCS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂. Die Zelllinien wurden in 75 cm² Kulturflaschen mit 12 ml Medium aufbewahrt und jeden dritten Tag im Verhältnis 1:5 passagiert. Beim Mediumwechsel wird das alte Medium abgesaugt, die Zellen werden mit 10 ml PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen, mit 2 ml Trypsin trypsiniert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Nach Zugabe von 8 ml Medium/FCS wird 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet wird in 8 ml neuem Medium/FCS resuspendiert. Davon werden 2 ml Zellsuspension in eine neue 75 cm² Kulturflasche mit 12 ml Medium/FCS überführt.

Alternativ wird für Gefrierkulturen nach dem Absaugen des Überstands das Zellpellet in 1 ml eiskaltem FCS mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert, dann in 2 ml Kryoröhrchen überführt, 10 min bei RT inkubiert, 3 bis 4 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, 24 h bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Zellen können durch kurze Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wiederaufgetaut werden. Nach Zugabe von 8 ml kaltem Medium und 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm wird der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wird in 10 ml Medium resuspendiert und in eine neue 75 cm² Kulturflasche überführt.

2.2.13 DNA-Isolation aus Zellkulturen

Zur Präparation der DNA werden die kultivierten Zellen gemäß dem Standardprotokoll des Forschungslabors vorbereitet. Das Zellkulturmedium wird aus der Kulturflasche abgesaugt, die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und die Waschlösung wird wieder abgesaugt. Die Zellen werden mit 2 ml Trypsin trypsiniert und für bis zu 5 min, je nach Zelllinie, im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, sodass sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösen. Nach Zugabe von 8 ml Medium/FCS wird die Zellsuspension in einem 50 ml Greiner-Röhrchen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird nach dem Absaugen des Überstands in 4 ml PBS resuspendiert und wieder 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wird das Zellpellet in 2 ml kaltem PBS resuspendiert.

Das weitere Procedere wird mit dem Blood and Cell Culture Midi Kit gemäß dem Qiagen-Protokoll durchgeführt, außer dass die Proteasebehandlung mit Proteinase K durchgeführt wurde. Nach Elution der DNA mit TE-Puffer wird die DNA bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.14 RNA-Isolation aus Zellkulturen

Zur Präparation der RNA werden kultivierte Zellen gemäß dem Standardprotokoll des Urologischen Forschungslabors vorbereitet. Die kultivierten Zellen werden mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trizol lysiert und 10 min auf dem Schüttler gestellt. Das Lysat wird mehrfach pipettiert, 1 ml in einem Eppendorf-Cup überführt und 1 min gevortext. Die RNA-Extraktion erfolgt durch Zugabe von 200 μl Chloroform, 15 sec Vortexen, 3 min Inkubation bei RT und anschließend 15 min Zentrifugation bei $12000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert, durch einen gleichen Volumenanteil 70 %iger Ethanol ergänzt und 15 sec gevortext. Das weitere Procedere der RNA-Isolierung wird mit dem RNeasy Mini Kit gemäß dem Qiagen-Protokoll durchgeführt. Die isolierte RNA wird bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.15 Quantitative und qualitative DNA- und RNA-Messung

Die quantitative und qualitative DNA-Messung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Urologischen Forschungslabors. Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe des Eppendorf Photometers bei einer optischen Dichte von 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein Verdünnungspuffer wird zur Eichung auf einen Nullwert (Blank) eingesetzt. Da die DNA-Elution im TE-Puffer erfolgt ist, wird auch hier zur Eichung TE-Puffer verwendet. Nach Einstellung des Photometers auf „dsDNA“ werden 60 µl TE-Puffer mittels einer Plastikkuvette in den Strahlengang eingesetzt und die „Blank-Taste“ betätigt. Zur Messung der DNA-Proben werden 2 µl der Proben und 60 µl TE-Puffer (1:30 Verdünnung) eingesetzt. Die A_{260}/A_{280} Ratio liegt bei proteinfreien Proben bei 1,9 – 2,0. Die gleiche Methode wird auch für die quantitative RNA-Messung eingesetzt.

Die Bestimmung der DNA-Qualität erfolgt durch die Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wird 1 µg unverdaute DNA auf ein 0,8 %-Agarosegel zur elektrophoretischen Darstellung der DNA aufgetragen.

2.2.16 Behandlung der Zelllinien mit Inhibitoren der DNA-Methylierung

Die Zelllinien werden mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2'-dC) gemäß dem Standardprotokoll des Forschungslabors in einem Medium mit 2 µM 5-Aza-2'-dC kultiviert. Dazu wird eine Stocklösung von 2 mM 5-Aza-2'-dC in DMSO verwendet. Das Medium mit 5-Aza-2'-dC wird täglich gewechselt. Die Zelllinien werden im Brutschrank bei 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Nach gewöhnlich 3 Tagen erfolgt eine RNA-Isolierung zur Messung der relativen Gen-Expression mittels RT-PCR.

2.2.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION

2.2.21 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine Methode zur Transkription von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Dabei wird durch die Inkubation 2 µg RNA und 3,5 µl Mastermix A (Tabelle 11) 5 min bei 65 °C die RNA denaturiert. Nach kurzer Abkühlung der Probe auf Eis erfolgt die Zugabe von 7 µl Mastermix B (Tabelle 12) und eine zweiminütige Inkubation bei 42 °C zur Aktivierung des RNase Inhibitors. Nach 50 min bei 42 °C wird die RNA durch das Enzym Superscript RT-Transkriptase in cDNA umgewandelt. Die Reaktion wird nach 15 min bei 70 °C gestoppt. Die cDNA wird bei -20 °C aufbewahrt.

Mastermix A	Volumen in μl
Oligo dT [500 ng/ μl]	2,5
dNTP [10 mM]	1
RNA [2 μg]	variabel
Aqua dest	ad 10

Tabelle 11: Mastermix A für RT-PCR.

Mastermix B	Volumen in μl
Puffer [5x]	4
DTT	2
RNase Inhibitor [40 U/ μl]	1
Superscript II RT-Transkriptase	1

Tabelle 12: Mastermix B für RT-PCR.

2.2.22 Quantitative Real Time-PCR

Die Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von cDNA und DNA unter Nutzung von Fluoreszenz. Zur Fluoreszenzmessung wurde der Fluorophor SYBRGreen (Qiagen) eingesetzt. SYBRGreen bindet an die doppelsträngige DNA. Die gemessene Fluoreszenz steigt proportional zur gebildeten Doppelstrang-DNA während der PCR an. Abschließend wird eine Schmelzkurve zur Qualitätssicherung durchgeführt. Die qRT-PCR (Tabelle 13) wurde mit Hilfe des QuantiTect SYBRGreen PCR Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben mit 1 μl 1:10 verdünnter cDNA (10 ng) in einem Gesamtvolumen von 10 μl durchgeführt (Tabelle 14). Als Referenzen wurde das Haushaltsgen *TBP* für die Messung der Expression der Gene *ADAM19* und *CBX7* eingesetzt. Für die Expressionsmessung wurden uroepitheliale Zellen (Tab. 1), Zelllinien (Tab. 2) und normale Harnblasenproben (Tab. 3) und Harnblasen-Tumorproben aus Set 1 (Tab. 4) verwendet.

Programmschritte	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklenzahl
Denaturierung	95	900	1
Amplifikation	94	15	45
	55	20	45
	72	20	45
Schmelzkurve	83	20	
Kühlung	40	30	1

Tabelle 13: PCR-Programm für qRT-PCR.

Mastermix	Volumen in μl
cDNA [1:10]	1
SYBRGreen-Mix [2x]	5
Aqua dest	3
10x Quantitect Primer Assay für TBP oder Primer Forward und Reverse [10 pmol]	1 (0,5 + 0,5)

Tabelle 14: Mastermix für qRT-PCR.

2.2.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR METHYLIERUNG

2.2.31 Bisulfitumwandlung

Die Bisulfitumwandlung dient der Unterscheidung von methylierter und unmethylierter DNA. Für die Analyse von Methyl-Cytosin ist eine Behandlung der denaturierten DNA mit Natriumbisulfit mit dem EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research Corp.) notwendig. Die Bisulfitumwandlung wurde mit 1 μg DNA gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wird alles unmethylierte Cytosin zu Uracil desaminiert, sodass nur 5-Methylcytosin-Basen erhalten bleiben. Die Reinigung der Bisulfit-umgewandelten DNA (DNAbi) von Salzen und Chemikalien erfolgt über einen Bindungspuffer und Waschpuffer über mehrere Waschschrte auf einer Säule. Anschließend wird die aufgereinigte DNAbi in 25 μl M-Elution-Puffer aufgenommen. Mittels einer PCR (Tabelle 15) oder Sequenzierung kann die behandelte DNA unmittelbar im Anschluss auf ihren Methylierungsstatus weiter untersucht werden oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Temperatur in °C	Dauer
98	10 min
80	30 min
50	4 h
4	∞

Tabelle 15: Bedingungen für die Bisulfitumwandlung.

2.2.32 CpG-Methylierung

SSSI ist eine CpG-Methylase, die mit dem Cofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) zur Methylierung von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden verwendet wird. Ein Mastermix (Tabelle 16) wird gemäß dem Standardprotokoll vorbereitet und 2 h bei 37 °C, sowie 20 min bei 65 °C gestellt. Die Reinigung der methylierten DNA erfolgt durch Präzipitation mit 5 µl 4 M LiCl und 125 µl kaltem 100 % Ethanol 30 min bei -70 °C. Anschließend wird 30 min bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand weggekippt, das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 10 min bei 15.000 g zentrifugiert. Nach dem Wegkippen des Überstands und ca. 5 min trocknen lassen wird die DNA in 25 µl TE aufgenommen.

	Menge	Volumen in µl
DNA (aus Leukozyten)	1 µg	variabel
SSS I Methylase [4 U/µl]	12 U	3
NEB2-Puffer [10 x]	1 x	5
SAM [5 mM]	160 µM	1,6
Aqua dest		ad 50

Tabelle 16: Mastermix für die Herstellung vollständig methylierter DNA.

2.2.33 Bisulfitsequenzierung

Ziel der Bisulfitsequenzierung ist ein DNAbi-Fragment auf Methylierung zu untersuchen. Dabei wird zunächst die DNAbi amplifiziert, in einen Vektor kloniert, im TOPO 10 E.coli vermehrt und anschließend sequenziert.

Schritt 1: Amplifikation

Für das Gen *ADAM19* wurden 100 ng DNAbi für den Mastermix (Tabelle 17) und die Biseq_*ADAM19*_Fwd / Rev Primer (Tabelle 6) in der PCR für die Bisulfitsequenzierung mit

den in der Tabelle 18 aufgeführten Bedingungen verwendet. Für das Gen *CBX7* wurden 100 ng DNAbi für den Mastermix (Tabelle 17) und die Biseq1_*CBX7*_Fwd / Rev Primer (Tabelle 6) in der PCR für die Bisulfidsequenzierung mit den in der Tabelle 19 aufgeführten Bedingungen verwendet.

Schritt 2: Ligation und Transformation

Nach der PCR wird 20 µl des Produktes auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Ligation und Transformation erfolgt mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen gemäß dem Standardprotokoll. 2 µl des PCR-Produkts, 1 µl TOPO-TA-Vektor, 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl und 0,06 M MgCl₂) und 2 µl steriles Wasser werden 5 min bei Raumtemperatur ligiert. 2 µl der Ligation werden mit kompetenten TOPO 10 Bakterien 20 min auf Eis inkubiert und 30 sec ins 42 °C Wasserbad gestellt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C. wird die Probe 1 h auf dem Schüttler bewegt. Anschließend wird 50 µl von der Probe auf eine Ampicillin Platte gestrichen und über Nacht kultiviert. Jeweils eine Kolonie wird in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) in einem Greiner-Röhrchen bei 37 °C über Nacht geschüttelt.

Schritt 3: DNA-Präparation

Die DNA-Isolierung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Fast Plasmid Mini Kit von Eppendorf. Für den Restriktionsverdau wurde 1 µl DNAbi, 1 µl 10 U EcoRI (Fermentas), 2 µl 1 x Puffer auf 20 µl sterilem Wasser aufgefüllt (Tabelle 20) und 1 h bei 37 °C verdaut. Mit 1 µl 6x Stopp Puffer (Fermentas) wird die Reaktion gestoppt und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen. Der Restriktionsverdau und die Gelelektrophorese dienen zum Nachweis der Insertgröße und des korrekten Einbaus in den Vektor. Die DNA-Konzentration, sowie die Reinheit der Präparationen wird photometrisch mit dem Nanodrop-Instrument bestimmt.

Schritt 4: Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism 3130x im Molekularbiologischen Zentrallabor des BMFZ der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Mit Hilfe des Big DYE Terminator Kit V3.1 wurde im 10 µl Ansatz 10 pmol M13 rev Primer und 1/10 ng der Plasmid-DNA eingesetzt, mit Ethanol gefällt und in Formamidpuffer aufgenommen.

Mastermix	Volumen in μl
DNAbi [100 ng]	2
Primer F [10 pmol]	2,5
Primer R [10 pmol]	2,5
dNTP [150 μ M]	1
Puffer [10 x]	5
HotStarTaq DNA Polymerase [1,25 U]	0,4
Aqua dest	ad 50

Tabelle 17: Mastermix für Bisulfitequenzierung.

Programmschritte	Temperatur ($^{\circ}$C)	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94	15 min	1
Denaturierung	95	30 sec	36
Primer-Bindung	53	30 sec	36
Synthese	72	45 sec	36
Abschließende Synthese	72	10 min	1
Stopp	4	∞	1

Tabelle 18: PCR-Programm für *ADAM19* Bisulfitequenzierung.

Programmschritte	Temperatur ($^{\circ}$C)	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94	15 min	1
Denaturierung	95	30 sec	37
Primer-Bindung	58	30 sec	37
Synthese	72	45 sec	37
Abschließende Synthese	72	10 min	1
Stopp	4	∞	1

Tabelle 19: PCR-Programm für *CBX7* Bisulfitequenzierung.

Mastermix	Volumen in μl
DNAbi [1 μg]	variabel
EcoRI [10 U]	1
Puffer [1 x]	2
Aqua dest	ad 20

Tabelle 20: Restriktionsverdau für Bisulfitsequenzierung.

2.2.34 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode zur quantitativen Analyse von methylierter DNA. Durch Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit kann Methylcytosin mittels Pyrosequenzierung nachgewiesen werden, da methyliertes Cytosin bei der Behandlung nicht in Uracil (bzw. Thymin nach PCR) umgewandelt (Abb. 3) wird. So kann der Methylierungsgrad jeder CpG-Stelle quantitativ gemessen werden; je nach untersuchter Sequenz werden mehrere CpG-Stellen innerhalb von etwa 100 bp erfasst. 100 ng Bisulfit-umgewandelte DNA (DNAbi) wird in einem Mastermix A (Tabelle 21) mit einem Biotin-markierten Reverse Primer (Tabelle 6) für die PCR (Tabelle 21) eingesetzt. Die Pyrosequenzierung wurde in dieser Arbeit mit dem PyroMark Gold Q24 Reagents Kit von Qiagen durchgeführt. Nach elektrophoretischen Kontrolle der DNA-Qualität auf einem Agarose-Gelelektrophorese wird 20 μl des PCR-Produkts und 60 μl eines Mastermix B (Tabelle 22) für 5 min auf dem Schüttler auf Stufe 1 gestellt, damit sich der Biotin-haltige Strang an die Streptavidin Sepharose bindet. Der Sequenzierungs-Primer (Tabelle 6) wird 1:10 mit Annealing Puffer verdünnt und 25 μl davon pro Probe wird in eine kleine Platte (PyroMark Platte) pipettiert. Das PCR-Produkt und der Mastermix B (Tabelle 22) werden nach dem Mischen durch das Handgerät des Pyrosequenzierungs-Analysators angesaugt. Die festen Bestandteile bleiben an den Nadeln des Handgeräts haften, während die Flüssigkeit abgesaugt wird. Anschließend werden EtOH, der Denaturierungspuffer, Waschpuffer aus dem PyroMark Gold Q24 Reagents Kit von Qiagen nacheinander mit dem Handgerät angesaugt. Durch die Bindung des Biotin-haltigen Strangs am Sepharose-Bead bleibt dieser erhalten und der komplementäre DNA Strang wird ausgewaschen. Nach Ausschalten der Pumpe werden die Nadeln des Handgeräts in die PyroMark Platte zum Abschütteln der festen Bestandteile eingetaucht. Nach 2 min Denaturierung bei 80 °C und kurzem Abkühlen wird die Proben-Platte ins Pyrosequenzierungsgerät gestellt. Eine Kartusche wird gemäß dem Herstellerprotokoll mit einem Enzym-Mix, einem Substrat-Mix

und 4 Desoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) aus dem Pyro Gold Reagents Kit befüllt und ebenfalls ins Gerät gestellt. Der Lauf wird gestartet, wodurch die Reagenzien Desoxynukleotidtriphosphate nach einer vorgegebenen Reihenfolge zur Probenmix zugegeben werden. Beim Einbau eines korrekten Nukleotids entsteht Pyrophosphat, das enzymatisch über eine Sulfurylase zu ATP und über eine Luciferase zum Licht umgewandelt wird (Abb. 3). Die Lichtstärke ist proportional zu der Menge des eingebauten Nukleotids und wird über das Pyrosequenzierungsprogramm graphisch als Peak dargestellt (Abb. 4).

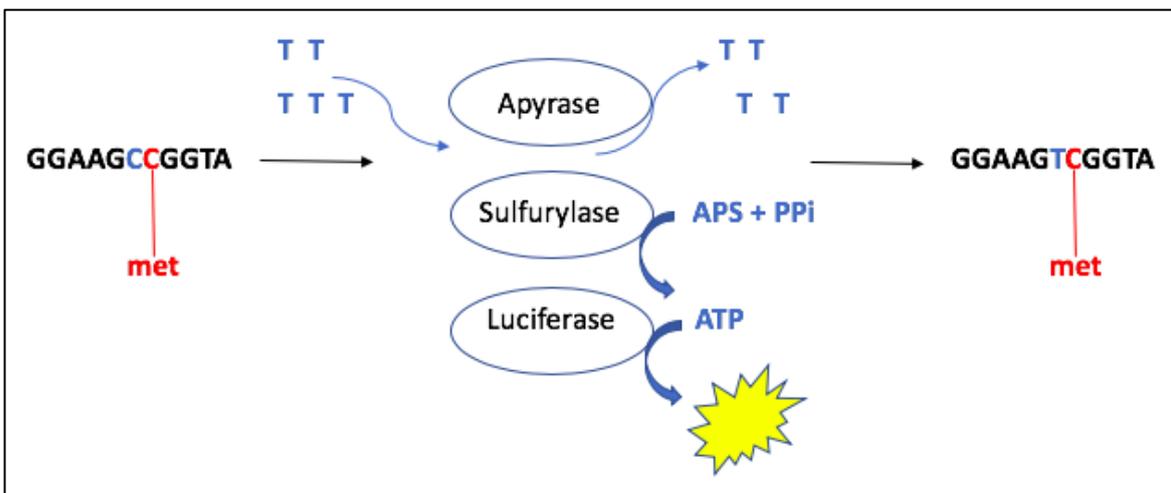


Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung des Pyrosequenzierungsprinzips: A = Adenosin, met-C = methyliertes Cytosin, G = Guanin, T = Thymin (jeweils als dNTPs), Enzym Apyrase diminiert nicht eingebautes Thymin (T), Enzyme Sulfurylase und Luciferase wandeln Pyrophosphat (PPi) und Adenosinphosphosulfat (APS) zu Adenosintriphosphat (ATP) und Licht um; Lichtsignal gelb dargestellt.

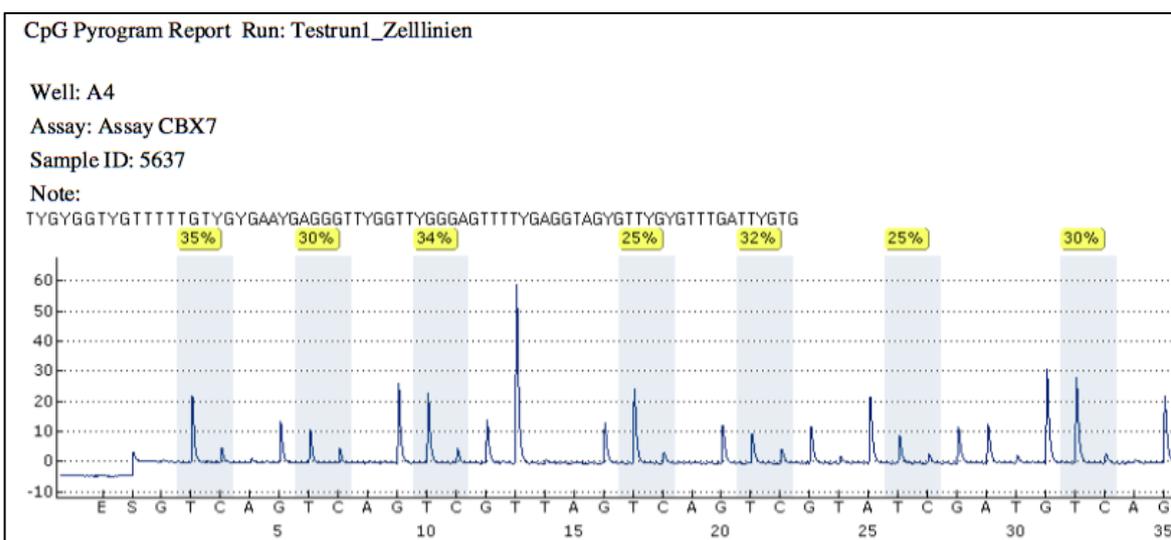


Abb. 4: Ausschnitt aus einem Pyrosequenzierungslauf: E = Enzym, S = Substrat, A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, CpG = Cytosin-Guanin-Dinukleotid, Methylierung in Prozent auf der Y-Achse gelb dargestellt.

Mastermix A	Volumen in μl
DNAbi (100 ng)	2
Primer F (10 pmol)	2,5
Primer R (10 pmol)	2,5
dNTP (150 mM)	1
10 x Puffer	5
HotStarTaq DNA Polymerase (1,25 M)	0,4
Aqua dest	ad 50

Tabelle 21: Mastermix A für Pyrosequenzierung-PCR: *CBX7* und *RUNX3* (RUNX3_01 und RUNX3_04).

Programmschritte	Temperatur ($^{\circ}$C)	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	15 min	1
Denaturierung	94	15 sec	37
Primer-Bindung	56	30 sec	37
Synthese	72	40 sec	37
Abschließende Synthese	72	10 min	1
Stopp	4	∞	1

Tabelle 22: Programmverlauf für Pyrosequenzierung-PCR: *CBX7* und *RUNX3* (RUNX3_01 und RUNX3_04).

Mastermix B	Volumen in μl
Binding Puffer	40
Streptavidin Sepharose Beads	2
Aqua dest	18

Tabelle 23: Mastermix B für Pyrosequenzierung.

3 ERGEBNISSE

3.1 ANALYSE VON *ADAM19*

Aufgrund der wichtigen Rolle von *ADAMs* bei der Pathogenese verschiedener Tumore und Hinweise auf einen Einfluss von DNA-Hypermethylierung auf die Expression einiger *ADAMs* (vergleiche 1.3) wurde in dieser Arbeit *ADAM19* auf seine Expression im Urothelkarzinom mittels qRT-PCR und sein DNA-Methylierungsmuster mittels Bisulfitsequenzierung analysiert.

3.1.1 EXPRESSIONSANALYSE VON *ADAM19*

Die relative Expression von *ADAM19* wurde mittels quantitativer RT-PCR in 11 Harnblasenkarzinomzelllinien und zwei Urothelzellkulturen nach Abgleich auf die Expression des Haushaltsgens *TBP* als interne Kontrolle untersucht (Tabelle 1, Tabelle 2 und Abb. 5). Die höchste Expression ließ sich in den Harnblasenzelllinien VmCub3 und J82 beobachten, die in etwa der in den normalen uroepithelialen Zellen entspricht. BFTC909, Umuc3, 647v, SW1710, RT112 und 639v hatten deutliche, aber etwas niedrigere Expression. Eine sehr geringe bis keine Expression wiesen die Harnblasenkarzinomzelllinien SD, VmCub1 und HT1376 auf (Abb. 5).

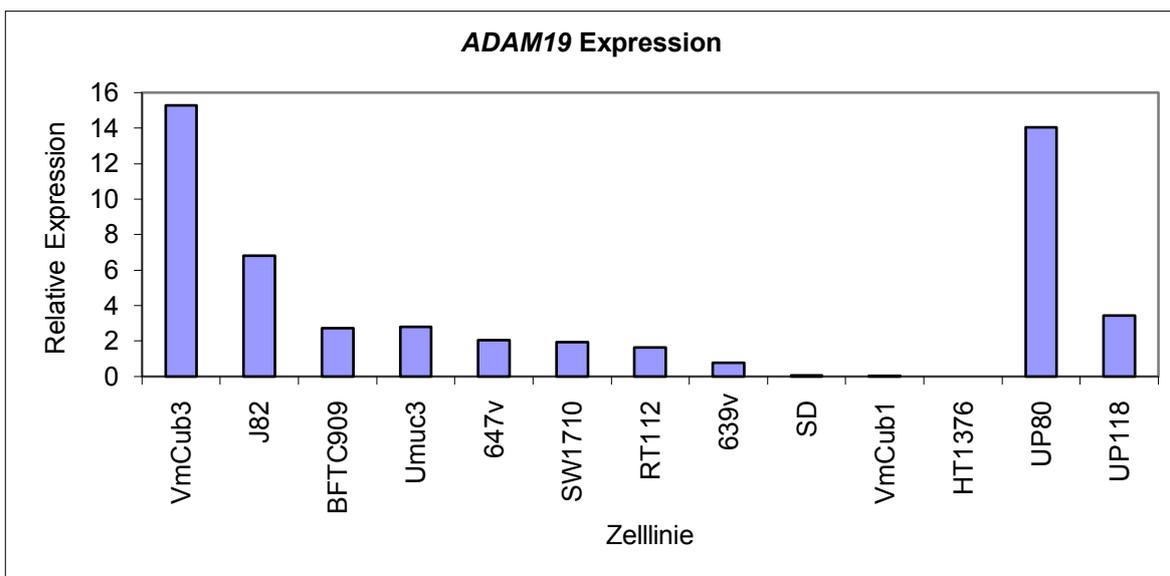


Abb. 5: Säulendiagrammdarstellung der relativen Expression von *ADAM19* bezogen auf *TBP* mRNA in den angegebenen Urothelkarzinom-Zelllinien und normalen uroepithelialen Zellkultur (UP). Messung mittels qRT-PCR.

Um den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression zu untersuchen, waren als Vorversuch im Rahmen eines Praktikums im Urologischen Forschungslabor (Knievel 2009) Harnblasenkarzinomzelllinien mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'dC behandelt und mit den unbehandelten Ansätzen dieser Zelllinien verglichen worden (Abb. 6). Die *ADAM19* Expression war nach Behandlung mit 5-Aza-2'dC in den Zelllinien VmCub1, SW1710, SD, HT1376 erhöht, ebenso in der normalen uroepithelialen Kultur UP118 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 6). Die Zelllinie Umuc3 wies diesen Effekt nicht auf. Kein Unterschied war in der Expression von *ADAM19* in der Zelllinie RT112 mit und ohne 5-Aza-2'dC-Behandlung vorzufinden. Die erhöhte Expression von *ADAM19* im Vergleich zu den unbehandelten Proben in einigen Harnblasenkarzinomzelllinien spricht für die Möglichkeit, dass die Expression von *ADAM19* in einigen Zelllinien durch DNA-Methylierung vermindert ist.

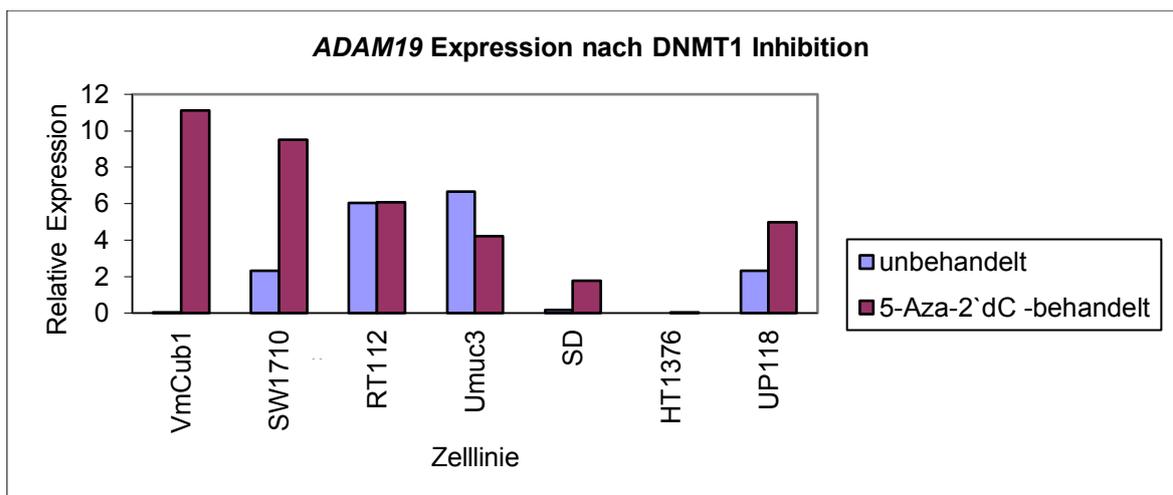


Abb. 6: Säulendiagrammdarstellung der relativen Expression von *ADAM19* bezogen auf *TBP* mRNA nach DNMT1 Inhibition durch 5-Aza-2'dC in unbehandelten UC-Zelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. Messung mittels qRT-PCR. (Abb. modifiziert nach Judith Knievel, Praktikumsprotokoll, mit freundlicher Genehmigung).

3.1.2 DNA-METHYLIERUNGSANALYSE VON *ADAM19*

Um den Einfluss der DNA-Methylierung auf *ADAM19* im Harnblasenkarzinom weiter zu untersuchen, wurde ein Abschnitt um den Transkriptionsstartpunkt im *ADAM19* Promotorbereich (Abb. 7) auf Methylierung der CpG-Dinukleotide mittels Bisulfitsequenzierung (Abb. 8) analysiert. Als positive Kontrolle wurde SSSI-Methylase

behandelte DNA mitgeführt. Wie zu erwarten, zeigte diese Kontrolle eine vollständige Methylierung in der Bisulfitsequenzierung. Die Harnblasenkarzinomzelllinien SD, VmCub3, SW1710 und die normale uroepitheliale Zellkultur UP81 wiesen in der Bisulfitsequenzierung keine Methylierung auf (Abb. 8). Aufgrund dieser Untersuchung scheint eine DNA-Hypermethylierung von *ADAM19* im Harnblasenkarzinom selten vorzuliegen. Allerdings ist die Aussagekraft dieser Analyse durch die kleine Anzahl von untersuchten Zelllinien limitiert.

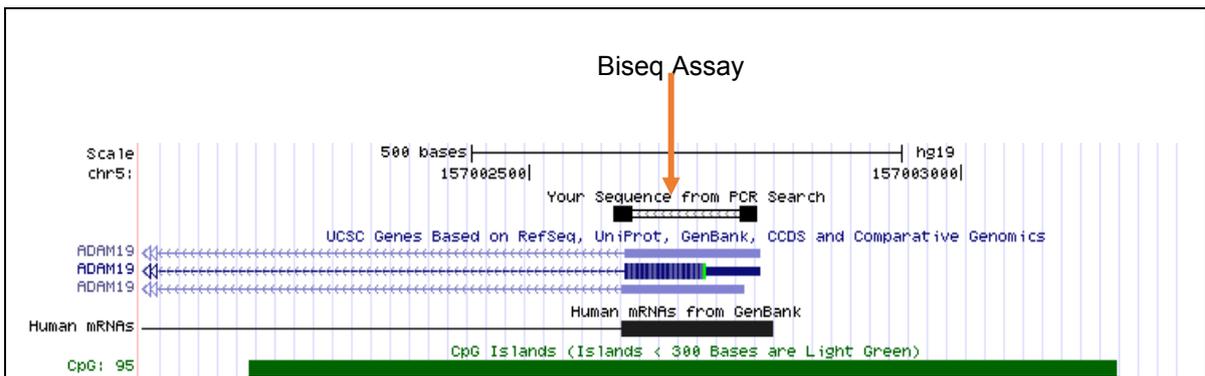


Abb. 7: Schema des Anfangs des *ADAM19* Gens, CpG-Insel grün dargestellt, Sequenz für PCR mit rotem Pfeil markiert; (<https://genome.ucsc.edu>).

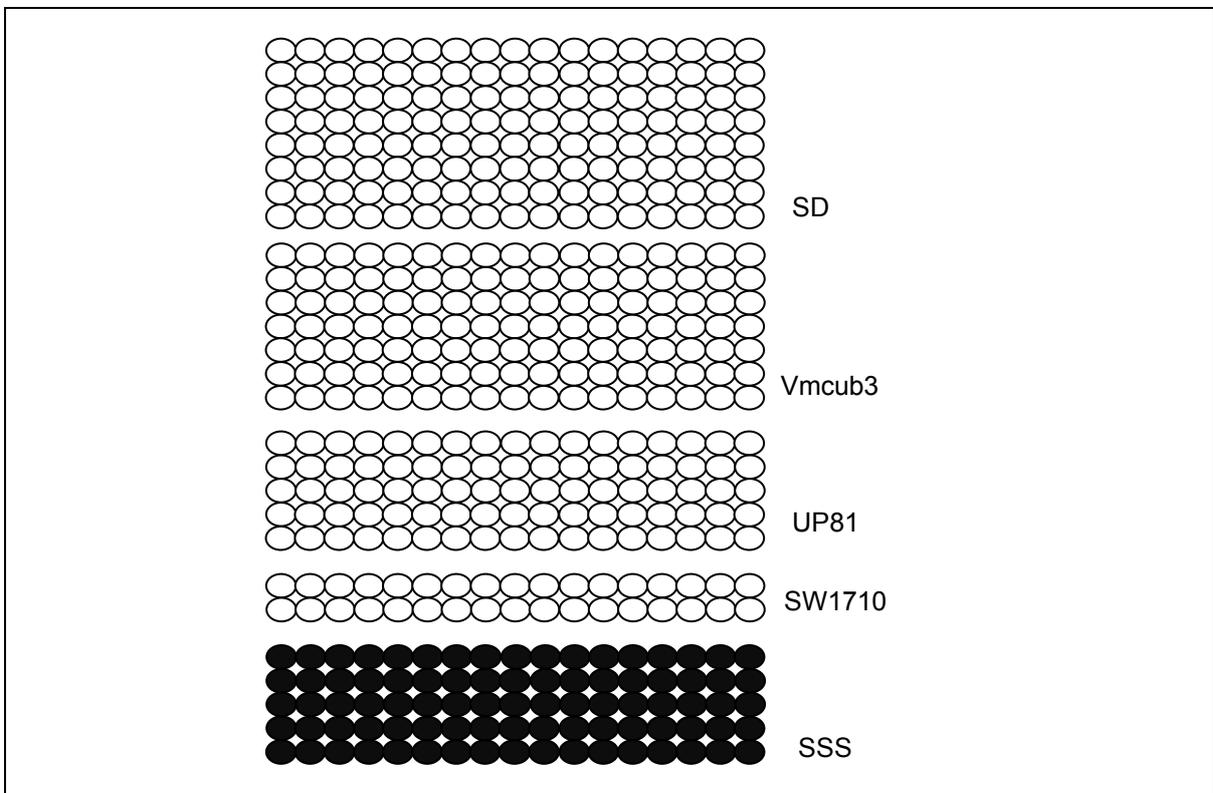


Abb. 8: Analyse des Promotorbereichs von *ADAM19*. Jedes Kreissymbol steht für ein CpG-Dinukleotid; schwarze Kreise: methylierte CpG-Dinukleotide; weiße Kreise: unmethylierte CpG-Dinukleotide; eine Reihe steht für ein untersuchtes Allel. Messung mittels Bisulfitsequenzierung.

3.2 ANALYSE VON *CBX7*

Das Gen *CBX7* beeinflusst die Pathogenese verschiedener Tumore, vermutlich auch im Harnblasenkarzinom (vergleiche Kapitel 1.3). Allerdings ist der Einfluss einer DNA-Methylierung von *CBX7* im Harnblasenkarzinom bisher nicht erforscht. Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde die Expression von *CBX7* mittel qRT-PCR, sowie die DNA-Methylierung von *CBX7* im Promotorbereich mittels Bisulfitsequenzierung und Pyrosequenzierung untersucht.

3.2.1 Expressionsanalyse von *CBX7*

Die relative Expression von *CBX7* wurde in 18 Urothelkarzinom-Zelllinien (Tabelle 2, und Abb. 9) und sechs uroepithelialen Zellkulturen (Tabelle 1 und Abb. 9) mittels quantitativer RT-PCR mit Abgleich auf die Expression des Haushaltsgens *TBP* als Referenz gemessen. Zudem wurden mit dem gleichen Verfahren Gewebeproben von 34 Patienten, davon 23 Harnblasentumorgewebe- und 11 Normalgewebeproben aus dem Set 1 (Tabelle 3 und Tabelle 4) untersucht (Abb. 9 und Abb. 10). Die Analyse der relativen Expression des *CBX7* Gens in Zelllinien und normalen uroepithelialen Zellkulturen ergab in den Zelllinien HT1376 und Umuc3 die höchsten Expressionswerte (Abb. 9). Die Zelllinien SD, 647v, RT112, T24, RT4 und 253J wiesen ein Expressionsniveau im mittleren Bereich auf. Die normalen uroepithelialen Zellkulturen (UP111, UP118, UP86, UP83, UP91 und UP193) hatten im Vergleich zu den Zelllinien ein niedriges Expressionsniveau.

Um festzustellen, ob in Geweben von Urothelkarzinom-Patienten eine im Vergleich von Primärtumoren zu Normalgewebe erhöhte Expression des *CBX7* Gens vorliegt, wurden 23 Harnblasentumorgewebe- und 11 Normalgewebeproben mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die relative Expression von *CBX7* war in den normalen Harnblasen- und Harnblasentumorgeweben im Vergleich zu den untersuchten Zelllinien fast durchgehend höher (Abb. 10 und Abb. 11). Ein Vergleich der Expressionswerte der normalen Harnblasenproben mit den Harnblasentumorgeweben zeigt einzelne Unterschiede in der relativen Expression des *CBX7* Gens in den Harnblasentumorproben (Abb. 11). Allerdings ist der Unterschied über alle Proben hinweg nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p=0.834$). In beiden Arten von Geweben war die Expression in der Regel höher als in den Zelllinien und -kulturen.

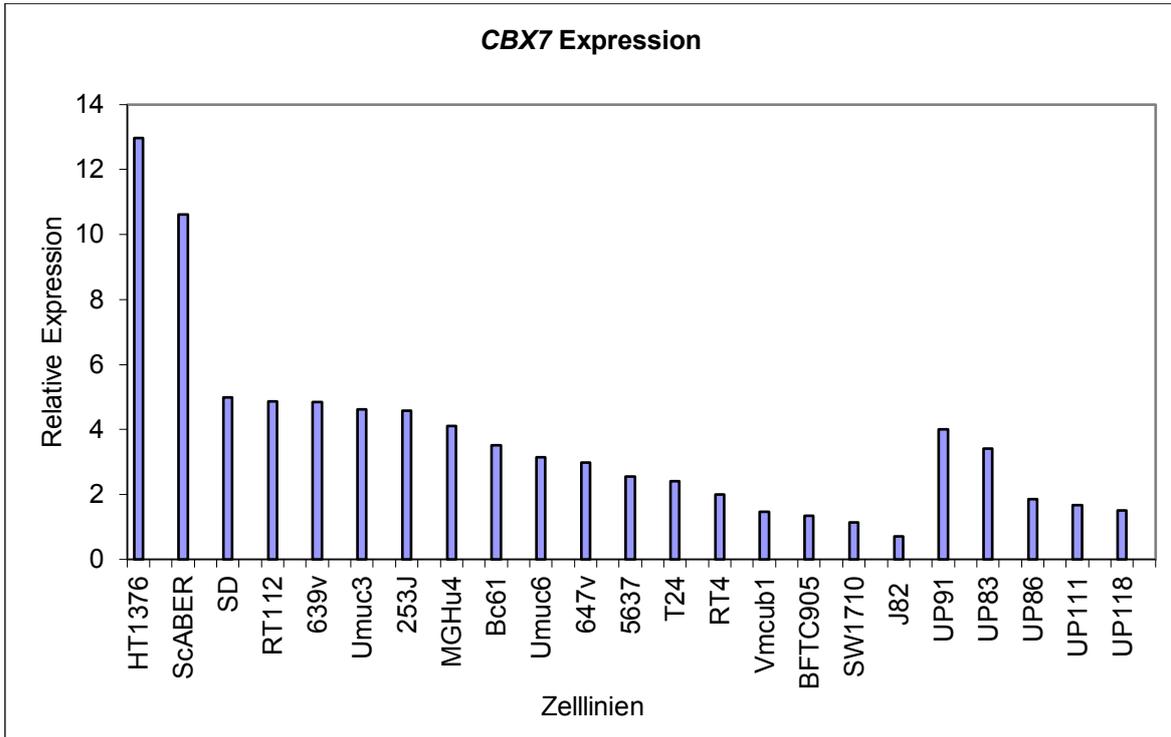


Abb. 9: Säulendiagrammdarstellung der relativen Expression von *CBX7* in Zelllinien und normalen uroepithelialen Zellkulturen, relativ zum Haushaltsgen *TBP*. Messung mittels qRT-PCR.

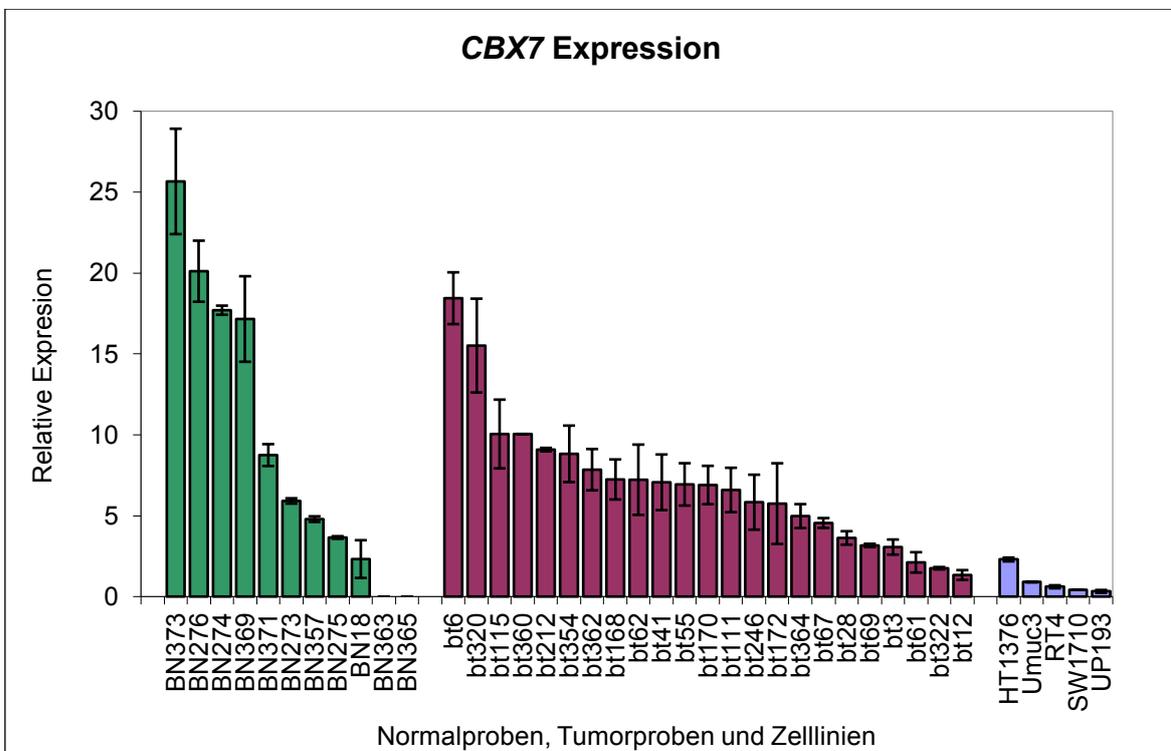


Abb. 10: Säulendiagrammdarstellung der relativen Expression des *CBX7* Gens in normalen Harnblasenproben (BN373 bis BN365), Harnblasentumorproben (bt6 bis bt112), Zelllinien (HT1376 bis SW1710) und einer uroepithelialen Zellkultur (UP193), relativ zum Haushaltsgen *TBP*. Messung mittels qRT-PCR.

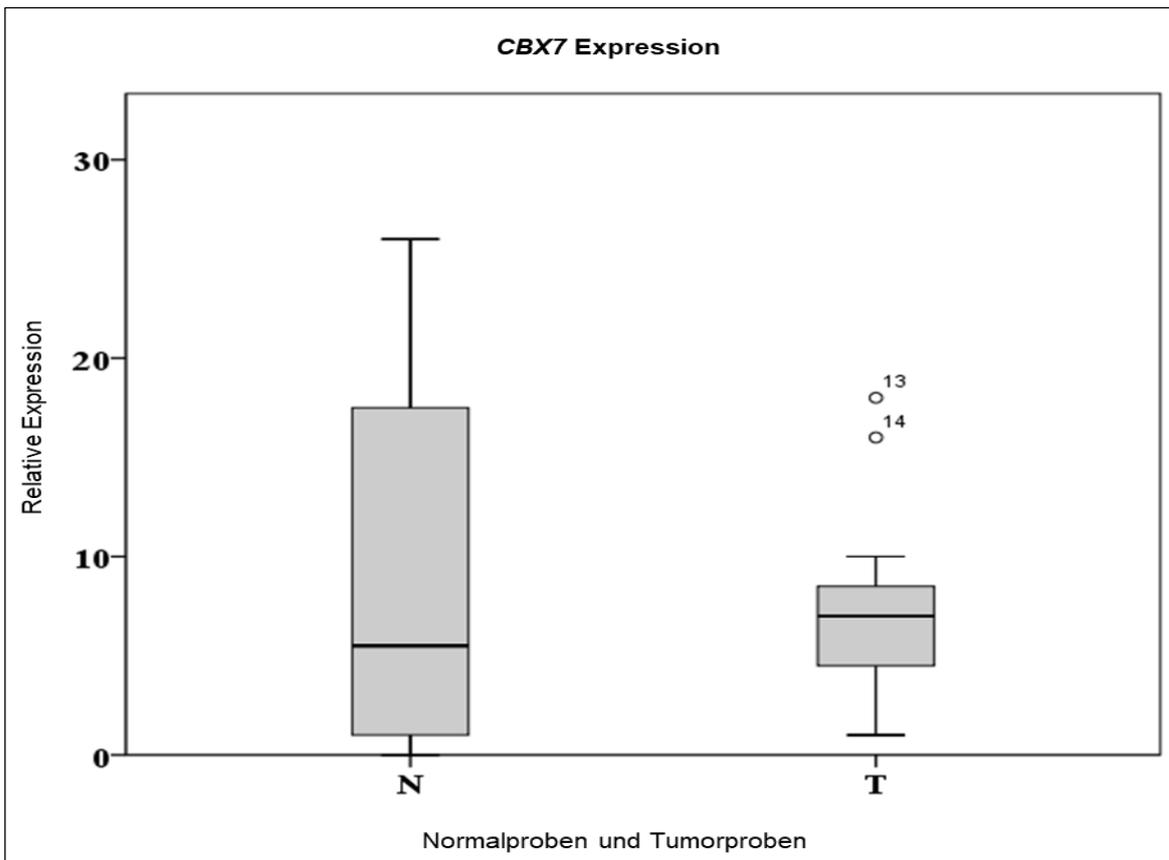


Abb. 11: Boxplot-Diagrammdarstellung der relativen Expression des *CBX7* Gens in Harnblasentumorproben (T) und normalen Harnblasenproben (N), relativ zum Haushaltsgen *TBP*. Im Boxplot-Diagramm sind durch die untere Kante der Kästen der 25 % Wert und durch die obere Kante der Kästen der 75 % Wert dargestellt, somit liegen 50 % der Fälle innerhalb der Kästen, die Tumorproben 13 und 14 sind Ausreißer und als Kreise gekennzeichnet. Mann-Whitney-U-Test $p=0.834$. Messung mittels qRT-PCR.

3.2.2 DNA-Methylierungsanalyse von *CBX7*

Die Methylierung des *CBX7* Gens wurde mittels Bisulfitsequenzierung und Pyrosequenzierung analysiert. Für die Methylierungsanalyse des *CBX7* Gens wurden 73 Proben untersucht; diese umfassen 63 Harnblasentumorproben aus dem Set 2, acht UC-Zelllinien und zwei uroepitheliale Zellkulturen (Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 5).

3.2.21 Bisulfitsequenzierung von *CBX7*

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Abschnitt am Transkriptionsstart (Abb. 12) auf den Methylierungszustand der CpG-Dinukleotide mittels Bisulfitsequenzierung untersucht. In der untersuchten Sequenz liegen 30 CpG-Dinukleotide. Durch die Bisulfitsequenzierung kann das Methylierungsmuster einzelner Allele, sowie die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide bestimmt werden. Für das Gen *CBX7* wurden für

die Bisulfitequenzierung sechs Tumorzelllinien, zwei normale uroepitheliale Zellkulturen und, als weitere Kontrolle, eine Blutprobe (Bt1100) ausgewählt, um Zellen mit unterschiedlichem Expressionsniveau auf DNA-Methylierung zu analysieren (Abb. 13). Die uroepithelialen Zellkulturen UP126, UP92 und die Zelllinie RT4 zeigten keine Methylierung. Einzelne methylierte CpG-Dinukleotide und ein einziges methyliertes Allel stellten sich in der Zelllinie 5637 und in der Blutprobe Bt1100 dar. Ein inhomogenes Methylierungsmuster wies die Zelllinie BFTC909 auf. Die Zelllinien T24, Umuc3 und SD waren dagegen fast vollständig methyliert. Als Kontrolle in der Bisulfitequenzierung wurde SSSI-Methylase behandelte DNA mitgeführt und zeigte, wie zu erwarten, eine vollständige Methylierung. Um eine Korrelation zwischen der Genexpression (Abb. 9) und dem Methylierungsmuster (Abb. 13) zu ermitteln, wurden die untersuchten Zelllinien und die uroepithelialen Zellen in drei Gruppen mit niedrigem (UP126, UP92, RT4), mittlerem (BFTC909, 5637) und hohem Methylierungszustand (T24, Umuc3, SD) eingeteilt. Dabei scheint tendenziell ein niedriger Methylierungszustand mit einer niedrigen *CBX7* Expression und ein hoher Methylierungszustand mit einer hohen *CBX7* Expression zu korrelieren. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht signifikant und die Aussagekraft der Korrelation ist durch die kleine Anzahl der mittels Bisulfitequenzierung auf Methylierung untersuchten Zelllinien limitiert.

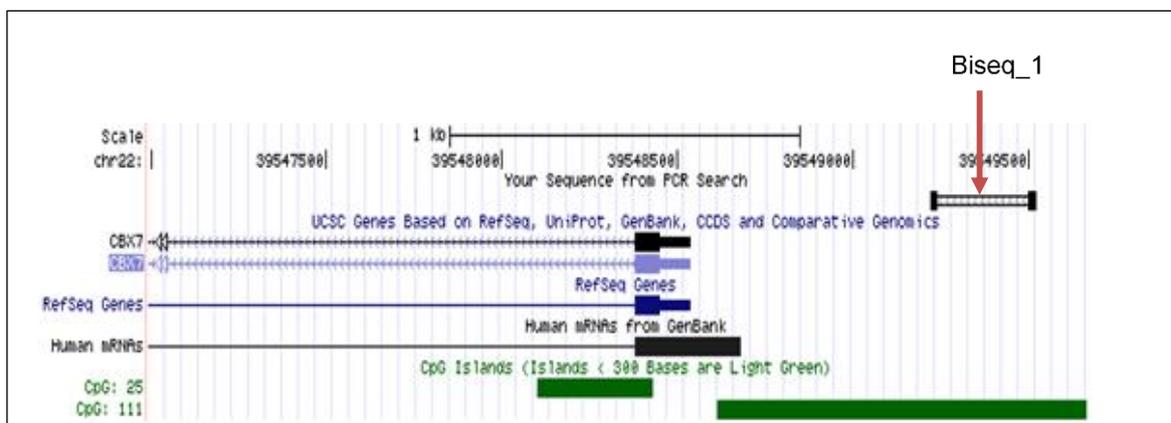


Abb. 12: Genlokalisierung *CBX7*, die CpG-Insel mit 30 CpG-Dinukleotide ist grün dargestellt, ein roter Pfeil markiert die untersuchte Sequenz (302 bp); (<https://genome.ucsc.edu>).

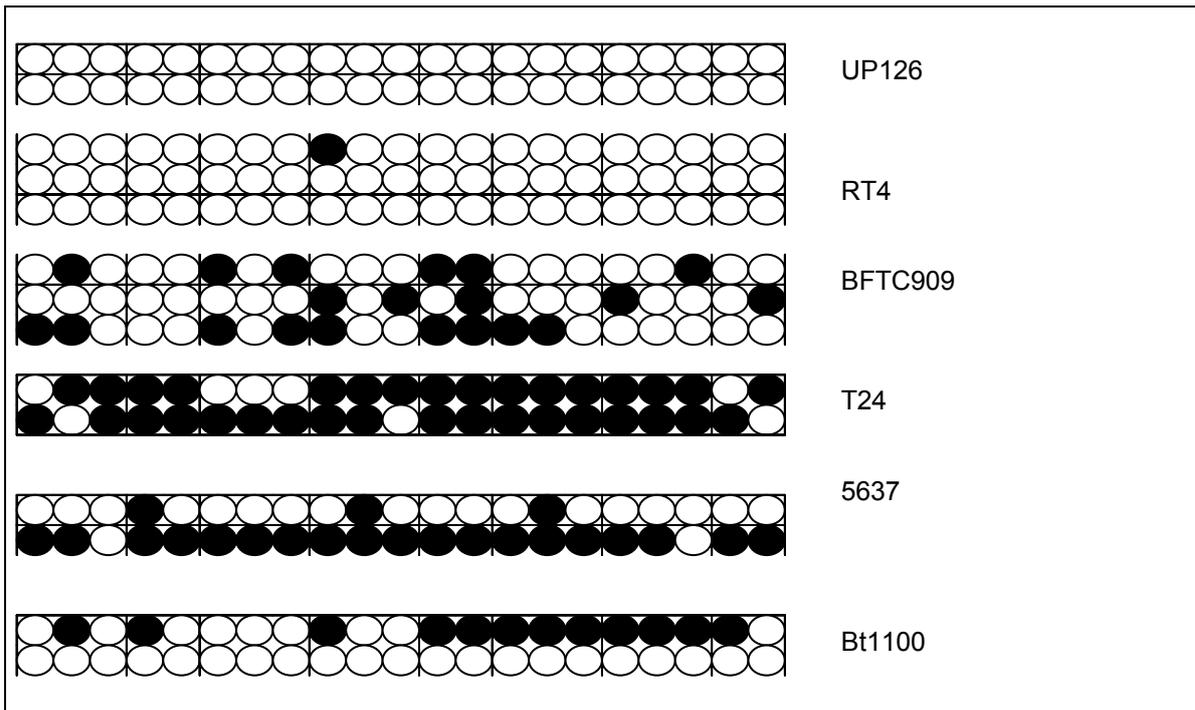


Abb. 13: DNA-Methylierungsanalyse von *CBX7* in Zelllinien, einer Blutprobe (Bt1100) und einer uroepithelialen Zellkultur (UP126); jedes Kreissymbol steht für ein CpG-Dinukleotid, schwarze Kreise für methylierte CpG-Dinukleotide, weiße Kreise für unmethylierte CpG-Dinukleotide; eine Zeile steht für ein untersuchtes Allel. Messung mittels Bisulfitsequenzierung.

3.2.22 Pyrosequenzierung von *CBX7*

Da sich in der Bisulfitsequenzierung für das Gen *CBX7* in den untersuchten Zelllinien Methylierungsveränderungen zeigten, wurde mittels der Pyrosequenzierung in Zelllinien und 63 Harnblasentumorproben (Tabelle 5) die Methylierung quantitativ untersucht. Die untersuchte Sequenz befindet sich hinter dem Transkriptionsstart (Abb. 14) und umfasst vier CpG-Dinukleotide. Anhand der Pyrosequenzierung konnte in den untersuchten Allelen der Methylierungszustand jedes CpG-Dinukleotids prozentual angegeben werden.

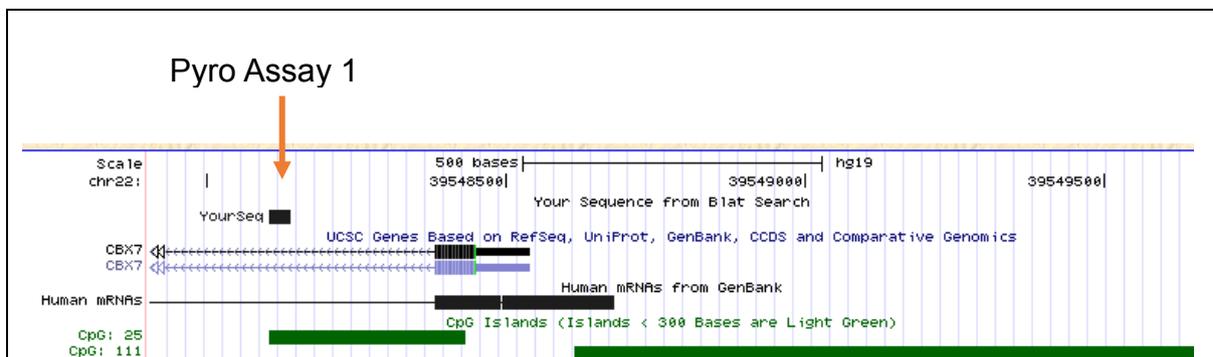


Abb. 14: Genlokalisierung *CBX7* Pyro Assay 1, die CpG-Insel mit vier CpG-Dinukleotiden ist grün dargestellt, ein roter Pfeil markiert die untersuchte Sequenz (146 bp); (<https://genome.ucsc.edu>).

Die Zelllinien lassen sich anhand der Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung in drei Gruppen einteilen. In den Zelllinien T24, HIA, RT4, Umuc3, SD und BFTC909 war das *CBX7* Gen mit einer durchschnittlichen Methylierung von über 90 % in den vier CpG-Dinukleotiden am stärksten methyliert (Gruppe 1 in Abb. 15). In den Zelllinien J82 und SW1710 wies das *CBX7* Gen eine Methylierung zwischen 50 % und 70 % auf (Gruppe 2 in Abb. 15). Die Methylierung von *CBX7* lag dagegen in den normalen uroepithelialen Zellkulturen UP126 und UP81 unter 20 % (Gruppe 3 in Abb. 15). Trotz dieses Unterschieds in der Methylierung war die Expression in den Tumorzelllinien nicht erkennbar geringer als in den normalen Zellen.

Obwohl der Pyrosequenzierungsassay eine weiter im *CBX7* Gen gelegene Sequenz erfasst, ähneln die Ergebnisse in den untersuchten Zelllinien denen der Bisulfitsequenzierung tendenziell (vergleiche Kapitel 3.2.21). Die Zelllinie RT4 zeigt allerdings in den vier untersuchten Allelen mittels Bisulfitsequenzierung keine Methylierung, aber mittels Pyrosequenzierung eine hohe Methylierung (Abb. 13 und Abb. 15).

Die Analyse der Methylierung des *CBX7* Gens in den Harnblasentumorproben (Tabelle 5) führte zu einer Einteilung in einer Gruppe mit niedriger Methylierung von < 26 % (Harnblasentumorproben aus Set 2 (Tabelle 5): 3, 27, 31, 58, 61, 67, 69, 85, 86, 91, 98, 106, 118, 133, 144, 174, 197; Gruppe 4 in Abb. 16) und einer Gruppe mit mittelstarker Methylierung von 30 % bis 55 % (Harnblasentumorproben aus Set 2 (Tabelle 5): 4, 9, 16, 25, 28, 39, 40, 42, 43, 45, 52, 54, 74, 77, 78, 82, 96, 99, 100, 102, 116, 119, 128, 132, 140, 141, 152, 157, 161, 163, 167, 169, 180, 184, 186, 189, 195, 199; Gruppe 5 in Abb. 16). In den Tumorproben ist die Methylierung der CpG-Dinukleotide CpG3 und CpG4 im Allgemeinen höher als die der CpG1 und CpG2 (Abb. 16).

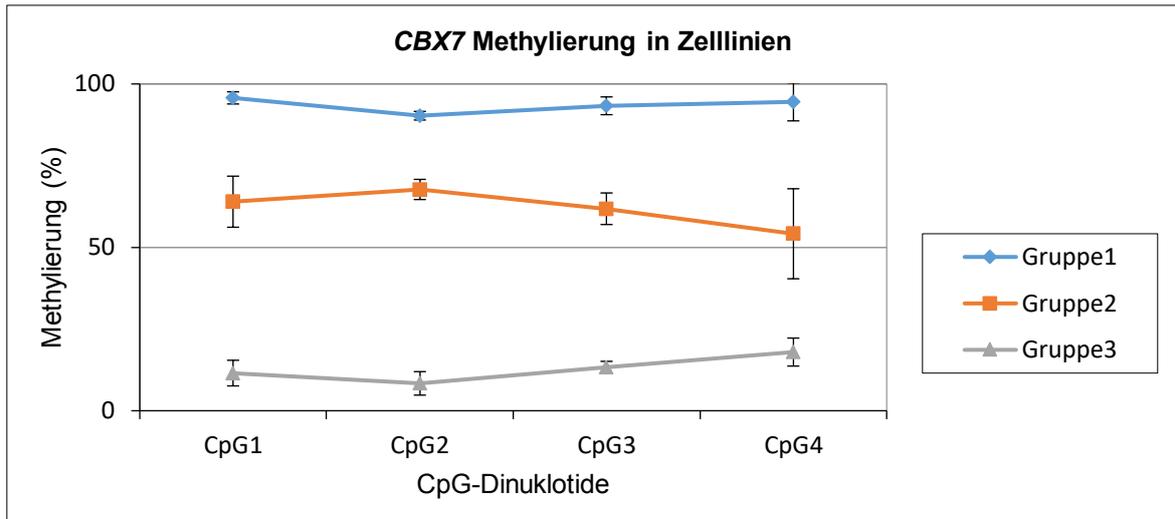


Abb. 15: Liniendiagrammdarstellung der Methylierung des *CBX7* Gens in UC-Zelllinien und uroepithelialen Zellen; Analyse von vier CpG-Dinukleotiden (CpG1, CpG2, CpG3 und CpG4) auf Methylierung und Darstellung der Mittelwerte in Prozent; Einteilung der Proben anhand des Methylierungsmusters in drei Gruppen (Gruppe 1-3): Gruppe 1: T24, HIA, RT4, Umuc3, SD, BFTC909 mit hoher Methylierung > 90 %; Gruppe 2: J82, SW1710 mit mittelhoher Methylierung 50 % bis 70 %; Gruppe 3: UP81, UP126 mit niedriger Methylierung < 20 %. Messung mittels Pyrosequenzierung.

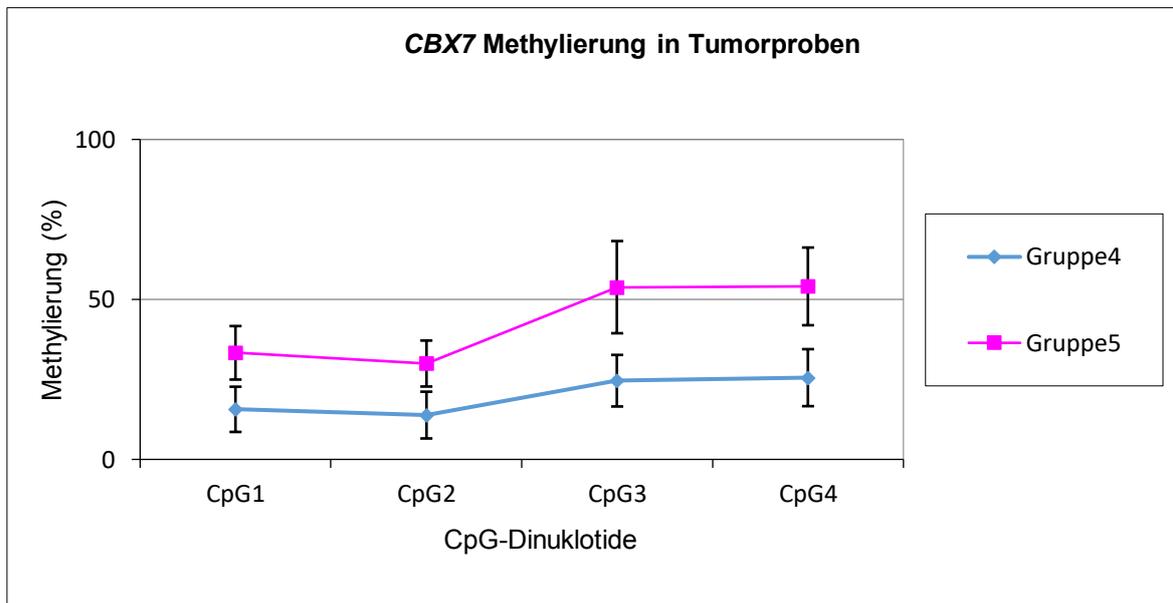


Abb. 16: Liniendiagrammdarstellung der Methylierung des *CBX7* Gens in Harnblasentumorproben; Analyse von vier CpG-Dinukleotiden (CpG1, CpG2, CpG3 und CpG4) auf Methylierung und Darstellung der Mittelwerte in Prozent; Einteilung der Tumorproben anhand des Methylierungsmusters in zwei Gruppen (Gruppe 4-5); Gruppe 4: Tumorproben mit niedriger Methylierung < 26 %; Gruppe 5: Tumorproben mit mittlerer Methylierung 30 % bis 55 %. Messung mittels Pyrosequenzierung.

3.3 ANALYSE VON *RUNX3*

Die Methylierung des *RUNX3* Gens wurde in acht Zelllinien, zwei uroepithelialen Zellkulturen und 63 Harnblasentumorproben mittels Pyrosequenzierung untersucht (Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 5).

3.3.1 Pyrosequenzierung von *RUNX3*

Das *RUNX3* Gen wurde auf Methylierung mittels Pyrosequenzierung analysiert. Dabei wurden zwei Sequenzen innerhalb der großen CpG-Insel des *RUNX3* Gens untersucht. Die Sequenz *RUNX3_04* liegt hinter dem Transkriptionsstart und umfasst fünf CpG-Dinukleotide (Abb. 17). Die Sequenz *RUNX3_01* liegt vor dem Transkriptionsstart und umfasst sieben CpG-Dinukleotide (Abb. 18).

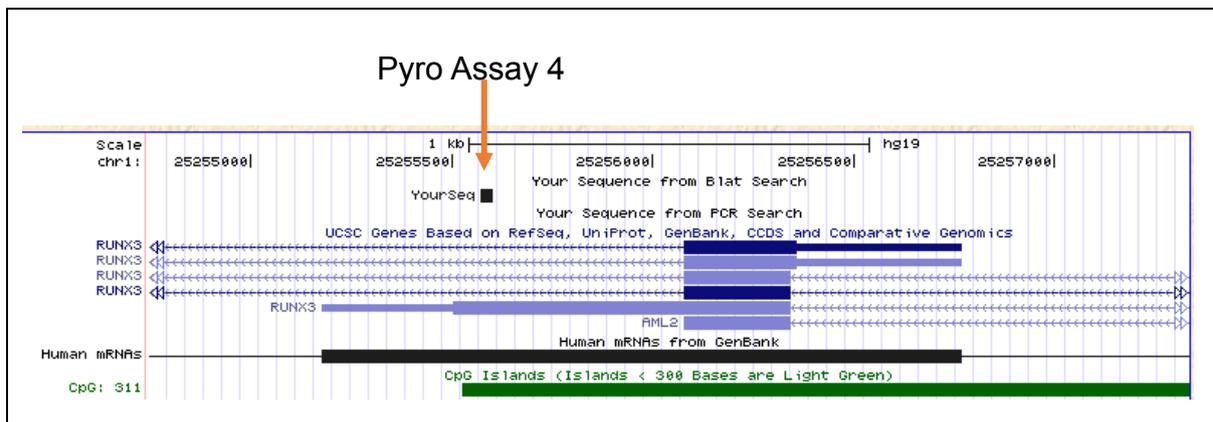


Abb. 17: Genlokalisierung *RUNX3* Pyro Assay 4 (*RUNX3_04*), die CpG-Insel mit den fünf untersuchten CpG-Dinukleotiden ist grün dargestellt, ein roter Pfeil markiert die untersuchte Sequenz (162 bp); (<https://genome.ucsc.edu>).

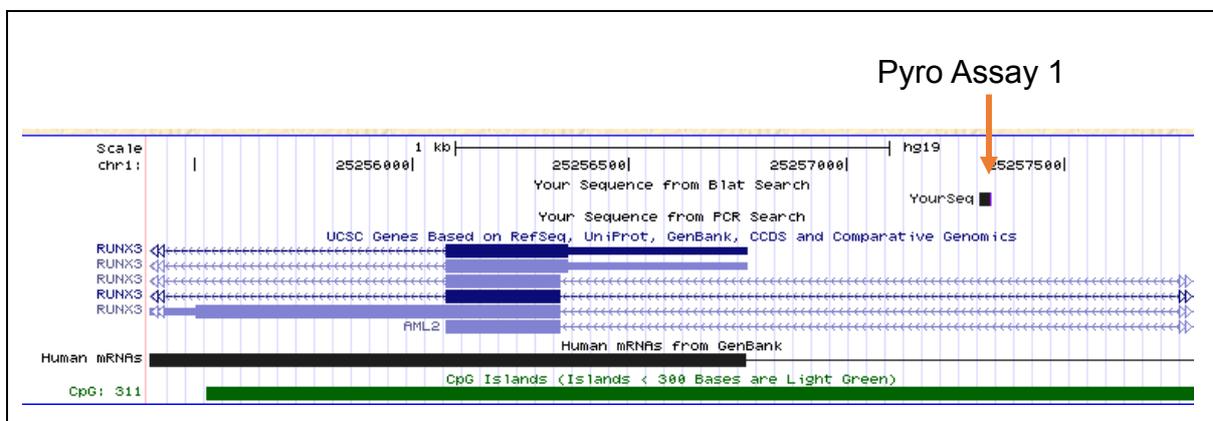


Abb. 18: Genlokalisierung *RUNX3* Pyro Assay 1 (*RUNX3_01*), die CpG-Insel mit den sieben untersuchten CpG-Dinukleotiden ist grün dargestellt, ein roter Pfeil markiert die untersuchte Sequenz (88 bp); (<https://genome.ucsc.edu>).

Die Zelllinien lassen sich anhand der DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung in drei Gruppen einteilen. In den Zelllinien T24, HIA, RT4, Umuc3, SD und BFTC909 war das *RUNX3* Gen in der Sequenz RUNX3_04 mit einer durchschnittlichen Methylierung > 80 % in den fünf CpG-Dinukleotiden am stärksten methyliert (Gruppe 1 in Abb. 19). In den Zelllinien J82 und SW1710 weist das *RUNX3* Gen in der Sequenz RUNX3_04 eine Methylierung zwischen 35 % und 40 % auf (Gruppe 2 in Abb. 23). Die Methylierung von *RUNX3* in der Sequenz RUNX3_04 liegt in den normalen uroepithelialen Zellkulturen UP126 und UP81 unter 15 % (Gruppe 3 in Abb. 19). Über die untersuchten CpG-Stellen hinweg war die Methylierung innerhalb einer Probe gleichmäßig.

Die Methylierungsanalyse des *RUNX3* Gens in den Harnblasentumorproben (Tabelle 5) in der Sequenz RUNX3_04 führte zu einer Einteilung eine Gruppe mit mittelstarker Methylierung von 25 % bis 50 % (Harnblasentumorproben aus Set 2 (Tabelle 5): 58, 86, 118, 144, 169, 186 und 197; Gruppe 4 in Abb. 20) und in eine Gruppe mit niedriger Methylierung von < 20 % (Harnblasentumorproben aus Set 2 (Tabelle 5): 3, 4, 9, 13, 15, 16, 25, 27, 28, 31, 40, 42, 43, 45, 52, 54, 60, 61, 67, 69, 85, 91, 96, 98, 99, 100, 102, 106, 114, 116, 119, 128, 132, 133, 141, 152, 157, 16, 167, 170, 174, 180, 184, 189, 191, 193, 195 und 199; Gruppe 5 in Abb. 20). Gruppe 4 in den Geweben ähnelt Gruppe 2 in den Zelllinien, ebenso entsprechen die Gruppen 5 und 3 als fast unmethyliert einander (Abb. 19 und Abb. 20). Gewebeproben mit starker Methylierung entsprechend Gruppe 1 wurden nicht beobachtet.

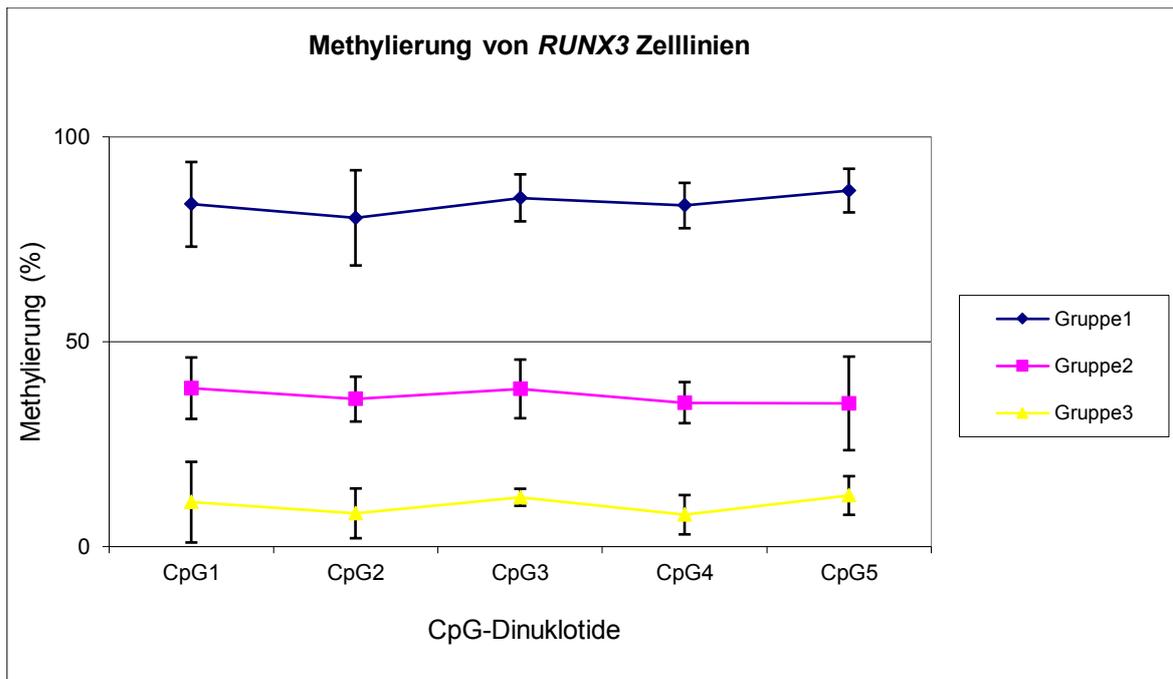


Abb. 19: Liniendiagrammdarstellung der DNA-Methylierung des *RUNX3* Gens in der Sequenz *RUNX3_04* in UC-Zelllinien und uroepithelialen Zellen; Analyse von fünf CpG-Dinukleotiden (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 und CpG5) auf Methylierung und Darstellung der Mittelwerte in Prozent; Einteilung der Proben anhand des Methylierungsmusters in drei Gruppen (Gruppe 1-3); Gruppe 1: T24, HIA, RT4, Umuc3, SD, BFTC909 mit hoher Methylierung > 80 %; Gruppe 2: J82, SW1710 mit mittlerer Methylierung 35 % bis 40 %; Gruppe 3: UP81, UP126 mit niedriger Methylierung < 15 %. Messung mittels Pyrosequenzierung.

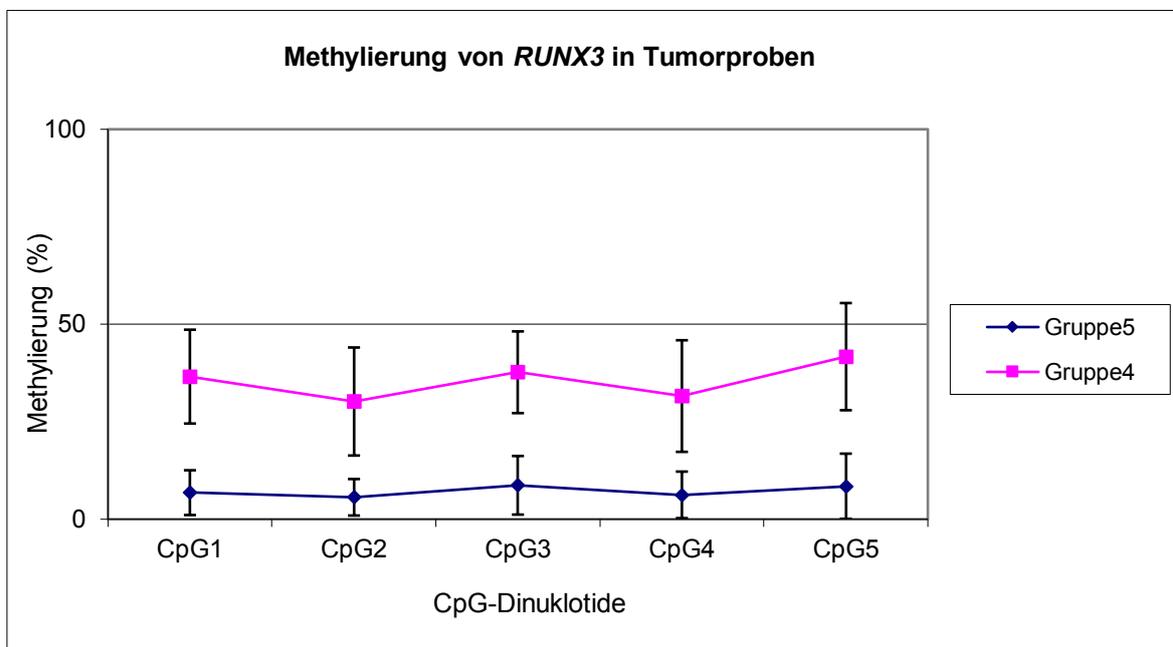


Abb. 20: Liniendiagrammdarstellung der Methylierung des *RUNX3* Gens in der *RUNX3_04* Sequenz in Harnblasentumorproben; Analyse von fünf CpG-Dinukleotiden (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 und CpG5) auf Methylierung und Darstellung der Mittelwerte in Prozent; Einteilung der Tumorproben anhand des Methylierungsmusters in zwei Gruppen (Gruppe 4-5); Gruppe 4: Tumorproben mit mittelhoher Methylierung 25 % bis 50 %; Gruppe 5: Tumorproben mit niedriger Methylierung < 20 %. Messung mittels Pyrosequenzierung.

Die Methylierung für das *RUNX3* Gen wurde in den Sequenzen *RUNX3_01* und *RUNX3_04* mittels Pyrosequenzierung in den gleichen fünf Zelllinien (T24, RT4, Sw1710, BFTC909 und 5637) und 11 Tumorproben (4, 9, 13, 15, 16, 25, 27, 28, 40, 42 und 43) ermittelt und miteinander verglichen (Abb. 21). Die Methylierung von *RUNX3* beträgt in den Zelllinien in der Sequenz *RUNX3_01* im Mittelwert (MW) 92 % (SD = 1,4) und in den Tumorproben im MW 49 % (SD = 7,7). Die Methylierung von *RUNX3* beträgt in den Zelllinien in der Sequenz *RUNX3_04* im MW 43 % (SD = 35) und in den Tumorproben im MW 7 % (SD = 6,5). Insgesamt stellt sich sowohl in den Zelllinien als auch in den Tumorproben eine erhöhte Methylierung der Sequenz *RUNX3_01* im Vergleich zu der Sequenz *RUNX3_04* dar (Abb. 21). Die Methylierung in der Sequenz *RUNX3_01* war in den Zelllinien signifikant höher als in der Sequenz *RUNX3_04* ($p=0,016$). Weiterhin war die Methylierung in der Sequenz *RUNX3_01* in den Zelllinien signifikant höher als in den Tumorproben ($p = 0,005$).

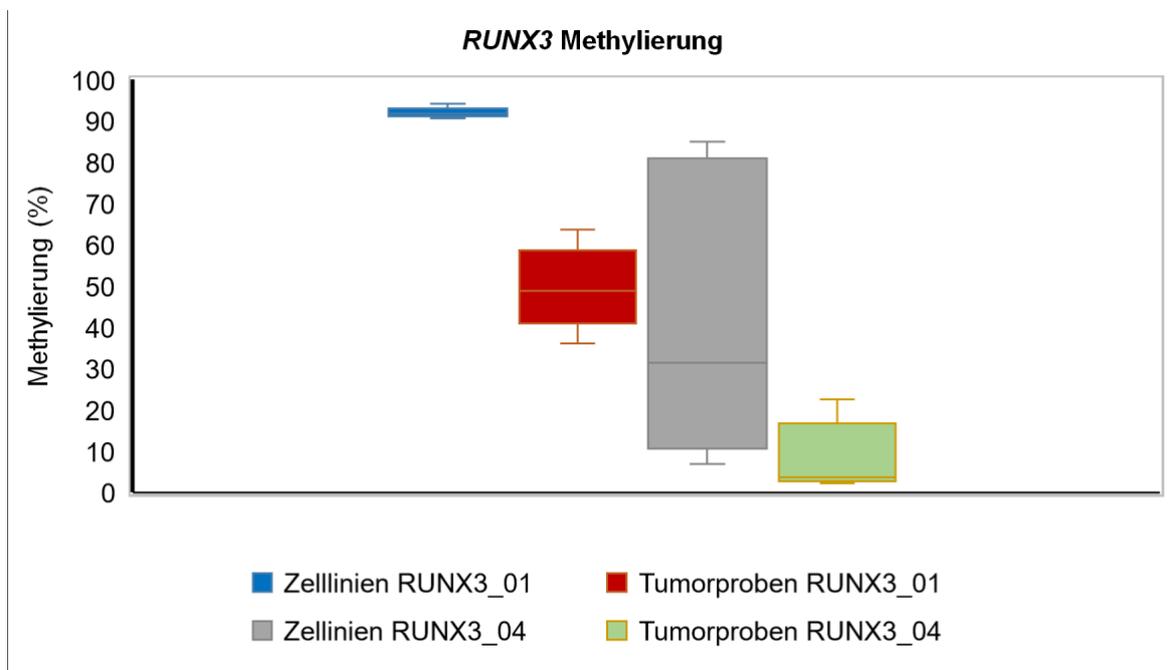


Abb. 21: Boxplot-Darstellung der Methylierung von *RUNX3* in den Sequenzen *RUNX_01* und *RUNX_04* in UC-Zelllinien und Tumorproben. Im Boxplot-Diagramm sind durch die untere Kante der Kästen der 25 % Wert und durch die obere Kante der Kästen der 75 % Wert dargestellt, somit liegen 50 % der Fälle innerhalb der Kästen. Messung mittels Pyrosequenzierung.

In der Abb. 22 sind die Mittelwerte (MW) der Methylierungsanalysen mittels Pyrosequenzierung des *CBX7* (Pyro-Assay 1) und *RUNX3* Gens in den Sequenzen *RUNX3_01* und *RUNX3_04* in neun UC-Zelllinien (SW1710, HIA, BFTC909, J82, RT4, SD, 5637, T24 und Umuc3) und zwei UPs (UP126 und UP81) dargestellt (Abb. 22). Die MW der Methylierung von *CBX7* und von *RUNX3* in den Sequenzen *RUNX3_01* und *RUNX3_04* liegen in den zwei untersuchten UPs bei < 15 %. *RUNX3* zeigt in der Sequenz *RUNX3_04* niedrige MW und in der Sequenz *RUNX3_01* tendenziell höhere MW im Vergleich zu *CBX7* (Abb. 22). Diese Ergebnisse zeigen die Abb. 23 und Abb. 24 in einer Datenpunktediagrammdarstellung. Die Methylierungsergebnisse wurden in den Abb. 23 und Abb. 24 nochmals als Datenpunktediagramm zur visuellen Veranschaulichung der Methylierungs-Mittelwerte als Punktwolke abgebildet. Die Methylierungs-Mittelwerte von *RUNX3* in einzelnen Zelllinien in der Sequenz *RUNX3_01* sind in Bezug zu den Methylierungs-Mittelwerten in der Sequenz *RUNX3_04* gestellt (Abb. 23). Die Zelllinien weisen in der Sequenz *RUNX3_01* eine höhere Methylierung als in der Sequenz *RUNX3_04* auf (Abb. 24). Die Methylierungs-Mittelwerte von *CBX7* in den Zelllinien sind in Bezug zu denen des *RUNX3* Gens in der Sequenz *RUNX3_04* gestellt (Abb. 24). Die Methylierung des *CBX7* Gens in den untersuchten Zelllinien ist höher als die Methylierung des *RUNX3* Gens in der Sequenz *RUNX3_04* (Abb. 24).

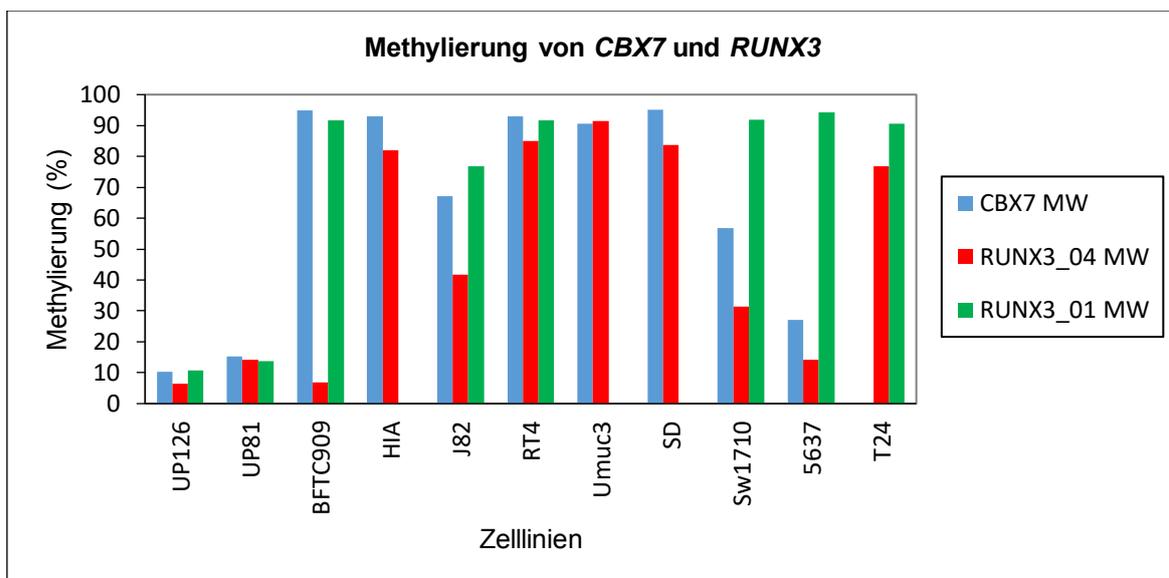


Abb. 22: Säulendiagrammdarstellung der Methylierungsanalyse; Vergleich der Methylierungs-Mittelwerte (MW) von *CBX7* und *RUNX3* in den Sequenzen *RUNX_01* und *RUNX3_04* in neun Zelllinien und zwei UPs. Messung jeweils mittels Pyrosequenzierung.

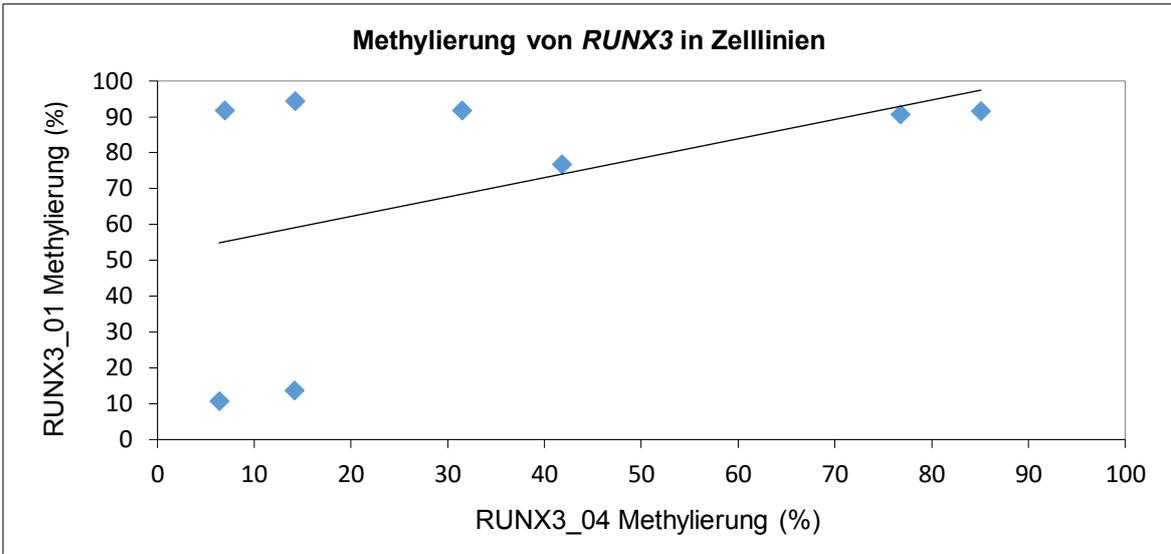


Abb. 23: Datenpunktediagrammdarstellung der Methylierungsanalyse von *RUNX3*; Vergleich der Methylierungs-Mittelwerte von *RUNX3* in den Sequenzen *RUNX3_01* und *RUNX3_04* in Zelllinien und zwei UPs (unten links). Messung jeweils mittels Pyrosequenzierung.

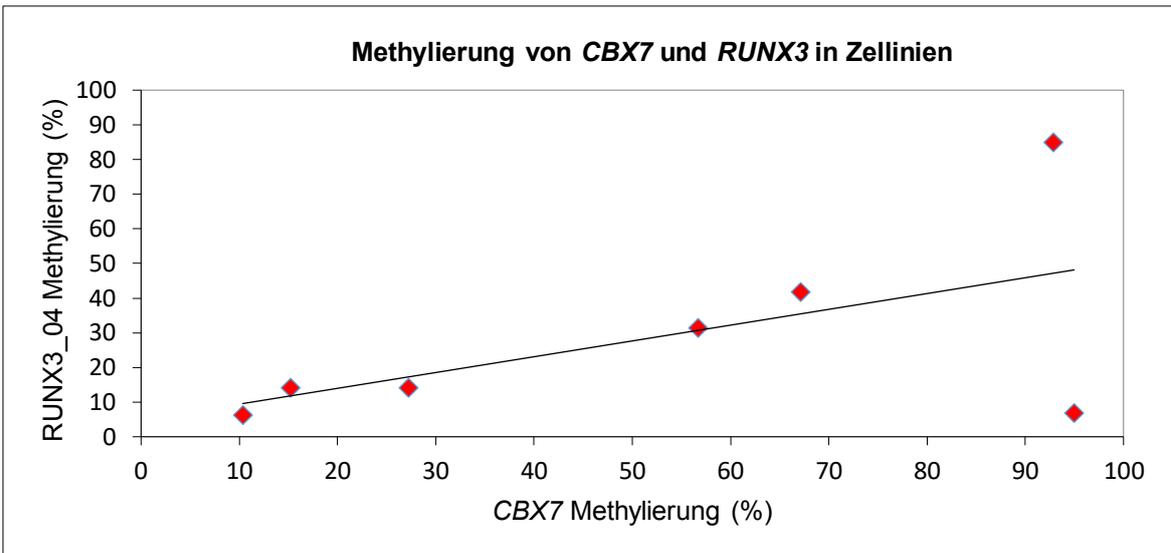


Abb. 24: Datenpunktediagrammdarstellung der Methylierungsanalyse von *CBX7* und *RUNX3*; Vergleich der Methylierungs-Mittelwerte von *CBX7* und *RUNX3* in der Sequenzen *RUNX3_04* in Zelllinien. Messung jeweils mittels Pyrosequenzierung.

In der Abb. 25 wird die Methylierung des *RUNX3* Gens in Tumorproben in der Sequenz *RUNX_04* im Vergleich zu der Sequenz *RUNX3_01* als Datenpunktediagramm dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Methylierung der untersuchten Tumorproben in der Sequenz *RUNX_04* < 25 % und in der Sequenz *RUNX3_01* > 25 % betragen, ein Zusammenhang ist nicht erkennbar (Abb. 25). Die Methylierungsanalyse des *RUNX3* Gens in Bezug zum *CBX7* Gen zeigt in den Tumorproben in der Sequenz *RUNX3_04* eine Methylierung < 25 % und eine erhöhte Methylierung des *CBX7* Gens von 10 % bis 60 % (Abb. 26). Die Abb. 23 bis Abb. 26 veranschaulichen die Variabilität der Methylierungsergebnisse zwischen verschiedenen Genen. Ebenso zeigt sich eine Sequenz-abhängige Methylierung innerhalb des *RUNX3* Gens (Abb. 23 und Abb. 25). Dieselbe Zelllinie (BFTC909) kann einen Methylierungs-Mittelwert des *RUNX3* Gens von 7 % in der Sequenz *RUNX3_04*, von 92 % in der Sequenz *RUNX3_01* und einen Methylierungs-Mittelwert des *CBX7* Gens von 95 % aufweisen (Abb. 23 und Abb. 24). Zum Beispiel kann auch dieselbe Harnblasen-Tumorprobe (Probe 42 aus Set 2) einen Methylierungs- Mittelwert des *RUNX3* Gens von 2 % in der Sequenz *RUNX3_04*, von 49 % in der Sequenz *RUNX3_01* und einen Methylierungs-Mittelwert des *CBX7* Gens von 45 % aufweisen (Abb. 25 und Abb. 26). Die Methylierung scheint abhängig vom untersuchten CpG-Dinukleotid (Abb.19 und Abb. 20), von der untersuchten Sequenz (*RUNX3_01* vs *RUNX3_04*), (Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 25) und vom untersuchten Gen (*RUNX3* vs *CBX7*), (Abb. 22, Abb. 24 und Abb. 26) zu sein.

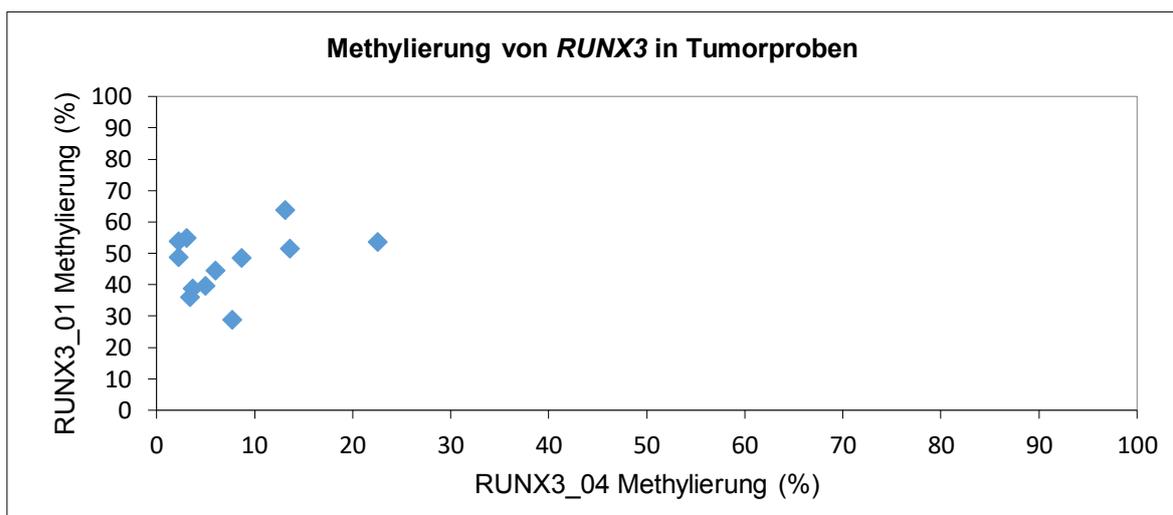


Abb. 25: Datenpunktediagrammdarstellung der Methylierungsanalyse von *RUNX3*; Darstellung der Methylierungs-Mittelwerte von *RUNX3* in den Sequenzen *RUNX3_01* und *RUNX3_04* in Harnblasentumorproben. Messung mittels Pyrosequenzierung.

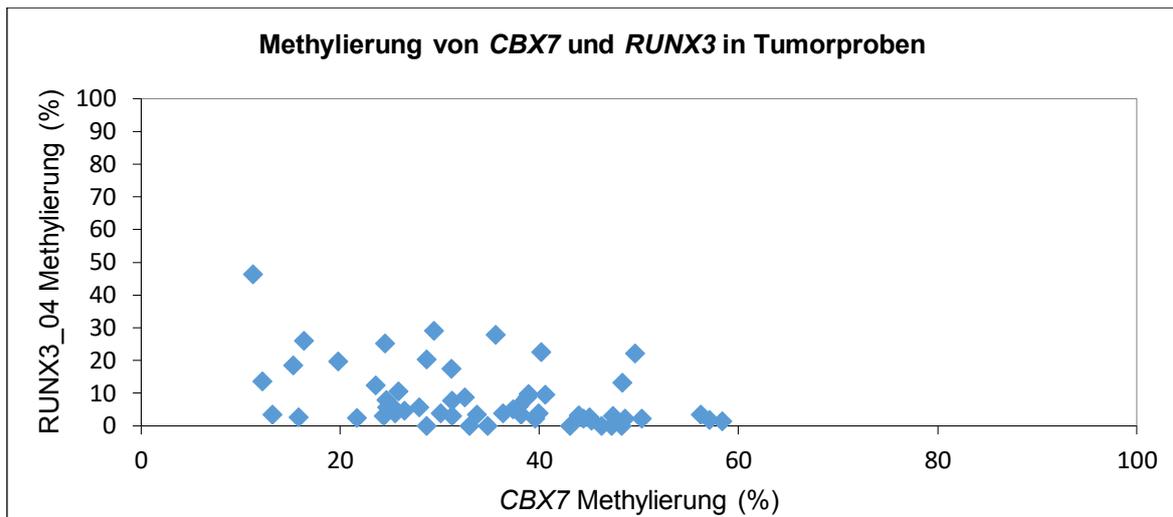


Abb. 26: Datenpunktediagrammdarstellung der Methylierungsanalyse von *CBX7* und *RUNX3*; Vergleich der Methylierungs-Mittelwerte von *CBX7* und *RUNX3* in der Sequenz *RUNX3_04* in Harnblasentumorproben. Messung mittels Pyrosequenzierung.

3.4 KORRELATION ZU KLINISCHEN PARAMETERN

Für die Analyse der Methylierung von *CBX7* und *RUNX3* wurden Proben von 63 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom (Tabelle 5) untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 66 Jahre. 18 Patienten waren weiblich und 45 männlich. Die Ergebnisse der DNA-Methylierungs-Mittelwerte (MW) mittels Pyrosequenzierung mit *CBX7* Pyro Assay 1 und *RUNX3* *RUNX3_04* (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 23, Abb. 24 und Abb. 30) wurden in Korrelation zum Geschlecht, Alter, Tumor-Stadium (TNM) und Tumor-Grad analysiert.

Es stellte sich kein signifikanter Unterschied der Methylierung von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Geschlecht dar (Tabelle 24). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Methylierung von *CBX7* und *RUNX3* zwischen Patienten < 60 Jahre versus ≥ 60 Jahre oder Patienten < 70 Jahre versus ≥ 70 Jahre (Tabelle 25). Die Methylierung von *CBX7* war jedoch signifikant unterschiedlich ($p = 0,004$) im Tumor-Stadium $T < 2$ versus $T \geq 2$ (Tabelle 26), ebenso im Tumor-Stadium $T < 3$ versus $T \geq 3$ ($p = 0,03$) (Tabelle 26). Die Methylierung von *RUNX3* wies hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen T Tumor-Stadien auf (Tabelle 26). Die Auswertung der Methylierung von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Lymphknoten-Stadium (Tumor-Stadium N) ergab keine signifikanten Unterschiede von $N < 1$ versus $N \geq 1$ sowie $N < 2$ versus $N \geq 2$ (Tabelle 27). In den untersuchten Patienten gab es keine nachgewiesenen Fernmetastasen (Tumor-Stadium M). Die Methylierung von *CBX7* war in den untersuchten

Gewebe mit Tumor-Grad $G < 3$ versus $G \geq 3$ signifikant unterschiedlich ($p = 0,001$) (Tabelle 28). Die Methylierung von *RUNX3* war in den untersuchten Proben dagegen nicht signifikant mit dem Tumor-Grad korreliert (Tabelle 28).

Korrelation	Geschlecht	
	F versus M	
Methylierung	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>
MW1 (%)	30	13
MW2 (%)	33	10
T-Test	0,333	0,399

Tabelle 24: Darstellung der Methylierungs-MW (%) von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Geschlecht; MW1 entspricht dem Methylierungs-MW für Frauen (F) und MW2 für Männer (M); Angabe der Signifikanz mit dem T-Test; signifikant ist $p \leq 0,05$. Messung mittels Pyrosequenzierung.

Korrelation	Alter			
	< 60 versus ≥ 60		< 70 versus ≥ 70	
Methylierung	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>
MW1 (%)	33	7	32	9
MW2 (%)	32	12	33	13
T-Test	0,938	0,199	0,569	0,196

Tabelle 25: Darstellung der Methylierungs-MW (%) von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Alter; in der Korrelation Alter < 60 versus ≥ 60 Jahre entspricht MW1 < 60 Jahre und MW2 ≥ 60 Jahre; in der Korrelation Alter < 70 versus ≥ 70 Jahre entspricht MW1 < 70 Jahre und MW2 ≥ 70 Jahre; Angabe der Signifikanz mit dem T-Test; signifikant ist $p \leq 0,05$. Messung mittels Pyrosequenzierung.

Korrelation	Tumor-Stadium T			
	< 2 versus ≥ 2		< 3 versus ≥ 3	
Methylierung	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>
MW1 (%)	21	14	28	13
MW2 (%)	34	10	35	9
T-Test	0,004	0,402	0,034	0,265

Tabelle 26: Darstellung der Methylierungs-MW (%) von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Tumor-Stadium (pT1 bis pT4); in der Korrelation Tumor-Stadium T < 2 versus ≥ 2 entspricht MW1 T < 2 und MW2 T ≥ 2 ; in der Korrelation Tumor-Stadium T < 3 versus ≥ 3 entspricht MW1 T < 3 und MW2 T ≥ 3 ; Angabe der Signifikanz mit dem T-Test; signifikant ist $p \leq 0,05$. Messung mittels Pyrosequenzierung.

Korrelation	Tumor-Stadium N			
	< 1 versus ≥ 1		< 2 versus ≥ 2	
Methylierung	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>
MW1 (%)	32	12	33	11
MW2 (%)	33	7	29	8
T-Test	0,894	0,249	0,391	0,503

Tabelle 27: Darstellung der Methylierungs-MW (%) von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Lymphknotenstatus der Tumoren (N0 bis N2); in der Korrelation Tumor-Stadium N < 1 versus ≥ 1 entspricht MW1 N < 1 und MW2 N ≥ 1 ; in der Korrelation Tumor-Stadium N < 2 versus ≥ 2 entspricht MW1 N < 2 und MW2 N ≥ 2 ; Angabe der Signifikanz mit dem T-Test; signifikant ist $p \leq 0,05$. Messung mittels Pyrosequenzierung.

Korrelation	Tumor-Grad			
	< 2 versus ≥ 2		< 3 versus ≥ 3	
Methylierung	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>	<i>CBX7</i>	<i>RUNX3</i>
MW1 (%)	24	9	25	14
MW2 (%)	33	11	36	9
T-Test	0,272	0,813	0,001	0,137

Tabelle 28: Darstellung der Methylierungs-MW (%) von *CBX7* und *RUNX3* in Korrelation zum Tumor-Grad (G1 bis G3); in der Korrelation Tumor-Grad < 2 versus ≥ 2 entspricht MW1 G < 2 und MW2 G ≥ 2 ; in der Korrelation Tumor-Grad < 3 versus ≥ 3 entspricht MW1 G < 3 und MW2 G ≥ 3 ; Angabe der Signifikanz mit dem T-Test; signifikant ist $p \leq 0,05$. Messung mittels Pyrosequenzierung.

4 DISKUSSION

4.1 DNA-METHYLIERUNG IM HARNBLASENKARZINOM

Aberrante Methylierungsvorgänge kommen in Karzinomen besonders in CpG-reichen Abschnitte der DNA um den Transkriptionsstart von bestimmten Genen vor (Baylin und Jones 2016, Knowles und Hurst 2015, Schulz et al. 2015, Neuhausen et al. 2006). Diese Hypermethylierungen zeigen eine hohe Spezifität, da in der Regel solche CpG-Inseln im normalen Gewebe keine Methylierungsveränderungen aufweisen (Schulz et al. 2015, Enokida und Nakagawa 2008, Neuhausen et al. 2006). Diese Eigenschaft kann zu therapeutischen Zwecken für die Etablierung von Biomarkern basierend auf Methylierungsveränderungen genutzt werden (Sanli et al. 2017, Neuhausen et al. 2006).

Im UC sind eine genomweite Hypomethylierung und genspezifische Hypermethylierungen seit längerer Zeit nachgewiesen (Schulz et al. 2015, Neuhausen et al. 2006). Dabei wurde zwischen den einzelnen Tumoren kein einheitliches Methylierungsmuster identifiziert (Neuhausen et al. 2006). Das Methylierungsmuster ist auch innerhalb einer Tumorprobe im Einzelnen variabel und kann in Form einer lückenhaften oder kompletten Methylierung einzelner Allele auftreten (Kandimalla et al. 2013, Neuhausen et al. 2006). Derartige Variationen könnten eine Erklärung für Diskrepanzen in der Literatur bieten (Schulz und Goering 2016, Kandimalla et al. 2013, Neuhausen et al. 2006). Insbesondere unterscheiden sich muskelinvasives UC und nicht muskelinvasives UC in ihren Methylierungsmustern (Kandimalla et al. 2013, Neuhausen et al. 2006). Hypermethylierung steigt mit dem Stadium, Grad und histologischen Subtyp des Tumors an, offenbar v.a. beim Übergang zum invasiven Karzinom (Olkhov-Mitsel et al. 2017, Enokida und Nakagawa 2008, Neuhausen et al. 2006). Dies konnte in den in dieser Arbeit untersuchten Harnblasentumorproben für *CBX7* und *RUNX3* bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2 und 3.3). Aus diesem Grund sollten auch Tumore im niedrigen Stadium und Grad, aber mit vielen hypermethylierten Genen als Hochrisikofälle eingestuft werden (Neuhausen et al. 2006). Die größten Diskrepanzen stellen sich zwischen pTa und pT1 Tumoren im Vergleich zum muskel-invasivem Karzinom dar (Olkhov-Mitsel et al. 2017, Sanli et al. 2017, Kamat et al. 2016, Knowles und Hurst 2015, Knowles 2008).

Das Verständnis der Pathomechanismen des Harnblasenkarzinoms und die Auswirkung von Hypermethylierung auf einzelne Gene und ihrer Wirkung auf die Interaktion intrazellulärer sowie interzellulärer Signalwege und Regulationsmechanismen könnte für die Erstellung eines Therapiekonzeptes und für das klinische Management entscheidende Informationen

liefern (Sanli et al. 2017, Baylin und Jones 2016, Schulz und Goering 2016, Schulz und Hoffmann 2014, Kandimalla et al. 2013). Während sich jedoch die klinische Nutzung von DNA-Methylierungsveränderungen in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms abzeichnet (Bosschieter et al. 2018), ist die Nutzung für Prognostik und Prädiktion weiterhin offen. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit weitere Kandidatengene explorativ auf DNA-Methylierung untersucht.

4.2 ADAM19 UND ANDERE ADAM-GENE IM HARNBLASENKARZINOM

Die Expressionsanalyse von *ADAM19* in den in dieser Arbeit untersuchten Zellen ergab eine verminderte Expression in den meisten Urothelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu normalen uroepithelialen Zellen. Da die Bisulfitsequenzierung des *ADAM19* Promotors jedoch keinen Hinweis auf eine Hypermethylierung als Ursache der verminderten Expression erbrachte, wurde dieses Gen nicht weiter untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können nunmehr mit den inzwischen verfügbaren Daten aus den umfassenden Analysen des TCGA-Konsortiums (englisch: „The cancer genome atlas“ = TCGA) und den seither in der Literatur veröffentlichten Arbeiten verglichen werden. Dabei zeigen die TCGA-Daten in der Tat eine signifikant verminderte Expression von *ADAM19* ($p = 0,02$) in 412 Harnblasentumorgeweben im Vergleich zu den 23 normalen Harnblasenproben (<https://xenabrowser.net>).

In dieser Arbeit konnte keine Methylierung von *ADAM19* mittels Bisulfitsequenzierung in den untersuchten Harnblasenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden. Die TCGA-Daten bestätigen das Fehlen der Methylierung in Zelllinien; in Tumorgeweben wurde dagegen DNA-Methylierung beobachtet (<https://xenabrowser.net>). In den TCGA-Daten wurde *ADAM19* in 436 Harnblasenproben auch auf Methylierung an 20 verschiedenen CpG-Stellen analysiert. Dabei fand sich eine höhere Methylierung in den Harnblasentumorgeweben im Vergleich zu den normalen Harnblasenproben (<https://xenabrowser.net>). An vier der 20 untersuchten CpG-Stellen stellte sich sogar eine signifikant höhere Methylierung von *ADAM19* in den Harnblasentumorproben im Vergleich zu den normalen Harnblasengeweben dar (cg15598120 mit $p < 0,0001$; cg08295410 mit $p = 0,025$; cg14104626 mit $p < 0,0001$ und cg09648467 mit $p < 0,0001$), (<https://xenabrowser.net>).

Die ursprüngliche Vermutung, dass *ADAM19* in Harnblasenkarzinomen häufig vermindert exprimiert ist und dass dies in manchen Fällen mit einer verstärkten Methylierung des Gens einhergeht, erscheint also prinzipiell korrekt.

ADAM Gene stehen im Fokus der Tumorforschung, da sie durch ihre verschiedenartigen Funktionen zur Tumorprogression und Invasion beitragen können (Mullooly et al. 2016, Choi et al. 2009). Der Einfluss von *ADAMs* auf intrazelluläre und interzelluläre Regulationsmechanismen sowie Zell-Extrazellular-Matrix-Interaktionen können bei nicht physiologischer Funktion von *ADAMs* die Karzinompathogenese fördern (Mullooly et al. 2016, Murphy 2008). In Tumoren treten sowohl verstärkte als auch verminderte Expression einzelner Enzyme, z.T. verbunden mit DNA-Hypermethylierung, auf. Die Inaktivierung von *ADAMs* mittels Hypermethylierung der Promotorregion konnte bei bestimmten Tumoren inzwischen für *ADAM17*, *ADAM23*, *ADAM12* und *ADAMTS1* gezeigt werden (Mullooly et al. 2016, Fridrichova et al. 2015, Chen et al. 2015). Dagegen wurde in einigen Studien eine erhöhte Expression und Hochregulation von *ADAM19* in Zelllinien und Tumorproben von Gehirn und Niere in Korrelation mit Tumorinvasion nachgewiesen (Mochizuki und Okada 2007).

Für *ADAMTS1* (*ADAM* mit Thrombospondin Motif Typ 1) zeigte sich eine Korrelation zwischen dem DNA-Methylierungsstatus und der Tumorinvasion, dem Lymphknotenbefall und der Metastasierung im Magenkarzinom (Chen et al. 2015). Die Inaktivierung von *ADAMTS1* durch DNA-Methylierung konnte auch experimentell nachgewiesen werden, ebenso der Einfluss von *ADAMTS1* auf wichtige Eigenschaften bei der Progression von Tumoren, darunter Zellproliferation, Apoptose, Migration, Invasion und Angiogenese (Chen et al. 2015).

Im Östrogenrezeptor-positiven (ER) Brustkarzinom zeigte sich eine Korrelation zwischen steigender *ADAM23* DNA-Hypermethylierung, gemessen mittels Pyrosequenzierungsanalyse, und Tumorprogression (Fridrichova et al. 2015). Auch im colorectalen Karzinom soll eine Herunterregulation von *ADAM23* mittels Promotor-Hypermethylierung zur Tumorprogression beitragen (Choi et al. 2009). *ADAM23* Funktionsverlust durch Hypermethylierung seiner CpG-reichen Promotorregion ist als Pathogenesemechanismus für das Magenkarzinom bekannt (Takada et al. 2005). Im Harnblasenkarzinom wurden bisher keine Analysen zu DNA-Methylierungsveränderungen von *ADAM23* durchgeführt. Möglicherweise ist *ADAM23* ein weiteres geeignetes Kandidatengen zur Analyse von DNA-Methylierung im Harnblasenkarzinom.

In der Literatur ist eine Überexpression von *ADAM8*, *ADAM10* und *ADAM12* im Harnblasenkarzinom beschrieben (Murphy 2008, Fröhlich et al. 2006). *ADAM12* mRNA Expression und *ADAM12* Protein-Expression korrelierten dabei mit dem Tumorgrad und -Stadium. Eine erhöhte Konzentration von *ADAM12* mRNA ließ sich auch im Urin nachweisen (Fröhlich et al. 2006). Untersuchungen zu Methylierungsveränderungen von *ADAM12* im Harnblasenkarzinom wurden bisher nicht durchgeführt.

4.3 CBX7 IM HARNBLASENKARZINOM

Die Expressionsanalyse von *CBX7* in dieser Arbeit ergab in den untersuchten Proben tendenziell zunehmende Expression in normalen uroepithelialen Zellen, Urothelkarzinom-Zelllinien, Harnblasentumorgewebe und normalen Harnblasenproben (in dieser Reihenfolge). Insbesondere war die Expression von *CBX7* in den 23 untersuchten Harnblasentumorproben im Vergleich zu den 11 normalen Harnblasenproben eher vermindert, wenn auch nicht signifikant ($p = 0.834$), vermutlich aufgrund der geringen Probenzahl. Die TCGA-Daten zeigen nämlich in der Auswertung von 436 Fällen eine signifikant verminderte Expression von *CBX7* in den 412 Harnblasentumorproben im Vergleich zu den 23 untersuchten normalen Harnblasenproben ($p < 0,001$), (<https://xenabrowser.net>).

Die Untersuchung der DNA-Methylierung von *CBX7* ergab eine niedrige Methylierung in den uroepithelialen Zellen und eine mittlere bis hohe Methylierung in den Urothelkarzinom-Zelllinien. Die analysierten Harnblasentumorproben lassen sich in eine Gruppe mit niedriger Methylierung und eine Gruppe mit mittelstarker Methylierung von *CBX7* aufteilen. Die Korrelation der Methylierung von *CBX7* zu den klinischen Parametern der 63 in dieser Arbeit untersuchten Harnblasentumorproben ergab einen signifikanten Bezug zum Tumorgrad und Tumor-Stadium. Die Methylierung von *CBX7* war deutlich signifikant stärker in Tumoren mit $G \geq 3$ versus $G < 3$ ($p = 0,001$). Ebenso war die Methylierung von *CBX7* in Tumoren mit höherem Tumor-Stadium signifikant höher, unabhängig davon, ob die Tumoren nach $T < 2$ ($p = 0,004$) oder $T \geq 3$ ($p = 0,034$) gruppiert wurden. In den TCGA-Daten wurde *CBX7* ebenfalls auf Methylierung in 436 Harnblasenproben an 24 CpG-Stellen analysiert. Dabei war das Ergebnis inhomogen, nämlich abhängig von der speziellen Stelle (<https://xenabrowser.net>). Die Methylierung von *CBX7* kann in Harnblasentumorproben im

Vergleich zu den normalen Harnblasenproben signifikant erhöht (cg00545295 mit $p = 0,028$; cg18708252 mit $p = 0,007$ und cg05903330 mit $p = 0,001$), signifikant vermindert (cg13455509 mit $p = 0,002$; cg02523424 mit $p = 0,005$; cg26227661 mit $p = 0,042$ und cg07311505 mit $p = 0,043$) oder auch etwa gleich stark sein, abhängig von der untersuchten Sequenz (<https://xenabrowser.net>). Insgesamt bestätigen die Methylierungsanalysen von *CBX7* in den TCGA-Daten die Ergebnisse dieser Arbeit (<https://xenabrowser.net>).

Im Urothelkarzinom der Harnblase wurde beim *CBX7* Gen vom superfiziellen (pTa) zum beginnend invasiven (pT1) bis hin zum muskel-invasiven Tumor eine absteigende Expression der mRNA gemessen (Hinz et al. 2008). Eine signifikante Korrelation konnte zwischen Tumorgrad und *CBX7* Expression dargestellt werden (Hinz et al. 2008, Pallante et al. 2015). Die gemessenen Expressionswerte von *CBX7* in Korrelation mit der Progression des Tumorgrades und -Stadiums weisen darauf hin, dass eine Herunterregulation von *CBX7* mit einem aggressiven Phänotyp des Urothelkarzinoms einhergeht (Pallante et al. 2015, Hinz et al. 2008).

In Schilddrüsen- und Lungenkarzinomen reguliert *CBX7* 120 Gene positiv und 196 Gene negativ durch direkte Bindung des Proteins am Promotor dieser Gene (Pallante et al. 2014). Der Verlust von *CBX7* führt daher zur Deregulation solcher Ziel-Gene, von denen viele Funktionen bei der Tumorprogression ausüben (Pallante et al. 2014). *CBX7* kann insbesondere Gene mit Einfluss auf die Tumorprogression und die epithelial-mesenchymal Transition regulieren, beispielsweise Osteopontin und E-Cadherin (Pallante et al. 2015). Osteopontin kann durch Hemmung der Apoptose die Tumormigration, Invasion und Angiogenese fördern (Pallante et al. 2014). *CBX7* kann diesen Regulationsweg hemmen (Pallante et al. 2014). *CBX7* kann die Expression von E-Cadherin erhalten, dass wesentlich für die Erhaltung der epithelialen Zellmorphologie in der epithelialen-mesenchymalen Übergangszone ist (Pallante et al. 2014, Karamitopoulou et al. 2010). Entsprechend wurde eine positive Korrelation zwischen *CBX7* Expression und E-Cadherin berichtet (Monaco et al. 2014, Federico et al. 2009). Der maligne Phänotyp beim Verlust von *CBX7* könnte daher u.a. durch die Fehlfunktion von E-Cadherin erklärt werden (Federico et al. 2009). Auch im Pankreas-Adenokarzinom wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der *CBX7* Expression und steigendem Malignitätsgrad, sowie schlechterer Überlebensrate beobachtet (Pallante et al. 2015, Karamitopoulou et al. 2010). Dabei zeigte sich weiterhin eine Korrelation zwischen dem Verlust von E-Cadherin und niedriger Überlebensrate (Pallante et al. 2015, Karamitopoulou et al. 2010). Am Verlust von E-Cadherin könnte die

Hypermethylierung des Promotorbereichs von *CDH1*/E-Cadherin beteiligt sein (Federico et al. 2009). Der genaue Mechanismus im Weiteren ist noch ungeklärt.

CBX7 wirkt als Tumorsuppressor beim Schilddrüsenkarzinom, Pankreaskarzinom, Glioblastom und colorectalen Karzinom (Yu et al. 2017, Zheng et al. 2015, Pallante et al. 2014, Karamitopoulou et al. 2010, Pallante et al. 2008). Dabei konnte festgestellt werden, dass der Verlust von *CBX7* beim Schilddrüsenkarzinom, Pankreaskarzinom und colorectalen Karzinom mit einem hohen Malignitätsgrad, Tumorstadium und schlechter Prognose assoziiert ist und im Experiment eine Tumorprogression bewirken kann (Zheng et al. 2015, Pallante et al. 2014, Forzati et al. 2012, Pallante et al. 2008). *CBX7* kann in solchen Tumoren als prognostischer Faktor betrachtet werden, da sein Verlust mit schlechter Prognose und Progression korreliert und zum ausgeprägteren malignen Phänotyp führen kann (Ni et al. 2017, Yu et al. 2017, Pallante et al. 2015, Xie et al. 2015). Die Reaktivierung von *CBX7* führte in Glioblastom-Zellen zur Inhibition des Wachstums und einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Erhöhtes *CBX7* fördert dagegen Proliferation, Migration und Invasion (Yu et al. 2017). Auch in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien reduziert die Reaktivierung von *CBX7* das Wachstum (Pallante et al. 2008).

Dagegen wirkt *CBX7* im Magenkarzinom als Onkogen und wird überexprimiert (Zhang et al. 2010). In dieser Tumorart korreliert die Überexpression von *CBX7* mit dem Patientenalter, klinischem Stadium und Lymphknotenmetastasen, kürzerer Überlebensrate und einem aggressiven Phänotyp (Zhang et al. 2010). Der Verlust von *CBX7* Expression in Magenkarzinom-Zelllinien löst eine zelluläre Seneszenz aus und hemmt die zelluläre Proliferation und Migrationsfähigkeit (Zhang et al. 2010). Die Funktion von *CBX7* als Onkogen wird seiner Wirkung auf *CDKN2A*/p16^{INK4A} zugeschrieben (Zhang et al. 2010). Die Inaktivierung von p16^{INK4A}, eines der beiden Produkte des *CDKN2A* Locus, durch DNA-Methylierung und Histonmodifikationen gehört zu den Schlüsselmechanismen der Tumorgenese (Li et al. 2010). Eine Hochregulation von *CBX7* soll über den PRC1 Komplex eine Trimethylierung von H3K9 und dadurch eine reduzierte Transkription von p16 auslösen (Li et al. 2010).

Auch im UC nimmt eine Inaktivierung des *CDKN2A* (auch INK4/ARF) Locus im Chromosom 9p21 über die dort kodierten Tumorsuppressoren p14^{ARF}, p15^{INK4B} und p16^{INK4A} entscheidenden Einfluss auf das Tumor-Zellwachstum (siehe Kapitel 1.3), (Ren et al. 2016, Hoffmann et al. 2015, Schulz et al. 2015, Yap et al. 2010). Bei vielen Harnblasenkarzinomen ist dieser Locus deletiert und die Wirkung von *CBX7* dort dementsprechend nicht relevant. In anderen Fällen könnte die im gleichen Locus in

Antisense-Richtung transkribierte lange nicht-kodierende RNA ANRIL wichtig sein. ANRIL interagiert über CBX7 mit dem PRC1 (Hoffmann et al. 2015, Schulz et al. 2015, Yap et al. 2010). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurde im UC die Expression von ANRIL in Zelllinien, Harnblasennormalproben, sowie Harnblasentumorproben untersucht (Hoffmann et al. 2015). Bei dieser Analyse stellte sich eine gewebsspezifische sowie Isoform-abhängige (3'-truncated ANRIL) Überexpression von ANRIL in den Harnblasentumorproben und Zelllinien dar (Hoffmann et al. 2015). Die Expression der p14, p15 und p16 Transkripte aus den *CDKN2A* und *CDKN2B* Loci wurde in den gleichen Zelllinien und Harnblasenproben gemessen. Dabei ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen ANRIL und p14 sowie p16 Expression für alle ANRIL Isoformen (ANRIL all, ANRIL full length, ANRIL 3-truncated und ANRIL 5'-truncated), (Hoffmann et al. 2015). In den untersuchten Zelllinien korrelierte die ANRIL Expression Isoform-abhängig signifikant mit p14 und p16 (ANRIL full length und ANRIL 5'-truncated). Eine Überexpression von CBX7 zeigte sich in den gleichen untersuchten Zelllinien. Jedoch konnte, möglicherweise wegen der kleinen Anzahl der untersuchten Zelllinien, keine signifikante Korrelation von CBX7 Expression und p16 dargestellt werden. Auch gab es in den Gewebeproben keine signifikante Korrelation der Expressionsdaten zu den klinischen Daten, entgegen den bisherigen Publikationen aus anderen Arbeitsgruppen (Hoffmann et al. 2015). Die untersuchte Interaktion von ANRIL mit CBX7 PcG Protein über PRC1 scheint demnach im UC keine allgemeine Rolle bei der Repression des INK4/ARF Locus zu spielen (Hoffmann et al. 2015).

Die paradoxe Wirkung von *CBX7* als Tumorsuppressorgen und Onkogen, je nach Tumorart, sowie der Einfluss von *CBX7* auf mehrere hundert Gene mit den folgenden Auswirkungen auf wichtige zelluläre Regulationswege verdeutlichen die Bedeutung von *CBX7* in der Tumorphagenese (Ni et al. 2017, Yu et al. 2017, Pallante et al. 2014, Li et al. 2010, Zhang et al. 2010). Entsprechend könnte die in dieser Arbeit dargestellte Hypermethylierung von *CBX7* im Harnblasenkarzinom dessen Pathogenese entscheidend beeinflussen. Um aus diesen Erkenntnissen diagnostischen und therapeutischen Nutzen zu gewinnen, sind weitere Studien notwendig.

4.4 *RUNX3* IM HARNBLASENKARZINOM

Die TCGA-Daten ergeben in der Auswertung von 436 Fällen eine durchschnittlich verminderte Expression von *RUNX3* in den 412 Harnblasentumorproben im Vergleich zu den 23 untersuchten normalen Harnblasenproben, die aber keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,076$), (<https://xenabrowser.net>).

Die Methylierungsanalyse von *RUNX3* ergab in den in dieser Arbeit untersuchten Proben eine niedrige DNA-Methylierung in den uroepithelialen Zellen und eine mittlere bis hohe Methylierung in den Urothelkarzinom-Zelllinien. Die Auswertung der Harnblasentumorproben in den zwei untersuchten Sequenzen ergab eine signifikant höhere Methylierung von *RUNX3* in den Zelllinien in der Sequenz *RUNX3_01* als in der Sequenz *RUNX3_04* ($p = 0,016$). Ebenso zeigte sich eine signifikant höhere Methylierung von *RUNX3* in der Sequenz *RUNX3_04* in den untersuchten Zelllinien im Vergleich zu den Tumorproben in der gleichen Sequenz ($p = 0,005$). Die Methylierung von *RUNX3* - innerhalb der großen CpG-Insel am Beginn des Gens - scheint also abhängig von der untersuchten Sequenz zu sein. Ähnlich zeigen die TCGA-Daten in der Auswertung von 436 Fällen an 92 untersuchten CpG-Stellen eine signifikant höhere, eine signifikant niedrige und eine etwa gleich hohe Methylierung von *RUNX3* abhängig von der untersuchten CpG-Stelle in den Harnblasentumorgeweben im Vergleich zu den normalen Harnblasenproben (<https://xenabrowser.net>).

In dieser Arbeit war die DNA-Methylierung von *RUNX3* in der Sequenz *RUNX3_04* in den untersuchten Harnblasen-Tumorproben nicht signifikant mit den klinischen Parametern Alter, Geschlecht, Tumorgrad und Tumorstadium korreliert. In der Arbeitsgruppe von Kim et al. wurde eine Hypermethylierung des *RUNX3* P2 Promotors in 71,2 % der Harnblasentumorproben mit einer Korrelation zwischen erhöhten *RUNX3* Methylierung und fortgeschrittenem Tumorstadium festgestellt (Kim et al. 2008, Kim et al. 2005). Erhöhte *RUNX3* Methylierung ging mit signifikant schlechterem Überleben einher (Kim et al. 2008). Yan et al. analysierten in 186 nicht-muskelinvasiven Harnblasentumorproben die Methylierung von *RUNX3* und stellten eine signifikante Korrelation zur Progression fest (Yan et al. 2012). Im normalen Urothelgewebe ist *RUNX3* nicht methyliert, die Methylierung entsteht aber offenbar früh während der Karzinogenese (Ito et al. 2015, Nishio et al. 2010, Wolff et al. 2008). Hohes Alter, Rauchen und oxidativer Stress scheinen Risikofaktoren für eine verstärkte Methylierung zu sein (Wongpaiboonwattana et al. 2013, Wolff et al. 2008). Die Regulationsmechanismen von *RUNX3* bei der Tumorphathogenese sind sehr komplex und sind als ein Zusammenspiel von äußeren Einflussfaktoren, Einfluss von *RUNX3* auf

Signalwege und deren Interaktionen, sowie epigenetischer Veränderungen, wie der DNA-Hypermethylierung zu verstehen (Ito et al. 2015, Yan et al. 2012, Kim et al. 2008).

Wie *CBX7* kann *RUNX3* in der Tumorphathogenese paradoxe Funktionen als Tumorsuppressor oder als Onkogen ausüben (Ito et al. 2015). Diese Funktion ist abhängig von äußeren Faktoren, wie z.B. dem Mikroumgebungsmilieu und dem hypoxischen Zustand des Gewebes unter Einwirkung von HIF1 α (Ito et al. 2015). Hypoxische Bedingungen können zur genomischen Instabilität, Metastasenbildung, Verstärkung der Angiogenese, sowie Induktion von G9a Histon-Methyltransferase und HDAC1 führen (Ito et al. 2015, Wongpaiboonwattana et al. 2013). Letztere können den *RUNX3* Promotor reprimieren (Ito et al. 2015). Eine Veränderung der Mikroumgebung kann auch als Folge einer chronischen Inflammation auftreten und sowohl die Entstehung wie die Progression von Tumoren fördern (Ito et al. 2015, Lotem et al. 2015). Dabei assoziiert *RUNX3* mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B und supprimiert die Inflammation über IL-23 (Ito et al. 2015, Lotem et al. 2015).

Des Weiteren wird in der Literatur für *RUNX3* in der Karzinompathogenese eine ähnliche Wirkweise als Tumorsuppressor wie p53 einerseits in der Reaktion auf DNA-Schäden und Reparaturmechanismen, aber auch eine wichtige Funktion im Zellzyklus-Arrest, sowie in der Apoptose beschrieben (Ito et al. 2015, Yan et al. 2012). Dabei sollen *RUNX3* Proteine Komplexe mit p53 zur synergistischen Aktivierung bilden und zusätzlich die Phosphorylierung von p53 mittels der Kinase Ataxia Teleangiectasia Mutated (ATM) unterstützen (Ito et al. 2015).

RUNX3 kann mit potentiell onkogenen Signalwegen wie TGF β -, WNT- und Östrogen-Signalweg interagieren (Ito et al. 2015, Ko et al. 2012). Über den TGF β -Signalweg kann *RUNX3* möglicherweise die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 und des proapoptischen mit BCL-2 interagierenden Zelltod-Mediators BIM (BCL-2-interacting mediator of cell death) induzieren (Ito et al. 2015). Die Verstärkung der TGF β -abhängigen Tumorsuppression durch *RUNX3* könnte zum Wachstumsarrest und zur Apoptose führen; dem würde eine *RUNX3*-Hypermethylierung entgegenwirken (Lotem et al. 2015, Ito et al. 2015, Zhang et al. 2008). *RUNX3* kann die onkogene Wirkung von WNT durch Störung der Bindung des WNT-Effektors, dem Transkriptionsfaktor 4 (TCF4)- β -Catenin Komplex, an DNA verhindern (Ito et al. 2015). *RUNX3* kann über den Abbau des Östrogen-Rezeptors (ER α) die Proliferation und das tumorgene Potenzial von Östrogen vermindern (Ito et al. 2015). Die möglichen onkogenen Wirkungen von *RUNX3* über die genannten Signalwege werden in der Literatur kontrovers diskutiert (Lotem et al. 2015, Ito et al. 2015, Ko et al.

2012, Zhang et al. 2008). Da Signalwege nicht als voneinander unabhängige Prozesse zu verstehen sind, sondern sich wechselseitig beeinflussen können, ist die Aussagekraft von Untersuchungen über die Wirkung und Bedeutung von RUNX3 in nur einzeln untersuchten Signalwegen in der oben genannten Literatur limitiert.

Die Hypermethylierung des *RUNX3* Promotorbereichs stellt jedenfalls einen übergeordneten Mechanismus mit Auswirkung auf viele Interaktionen der Signalwege, Zellzyklusarrest, Apoptose und Reparaturvorgänge dar (Lotem et al. 2015, Ito et al. 2015, Ko et al. 2012, Kim et al. 2005). Eine Hypermethylierung der *RUNX3* Promotorregion führt zur Inaktivierung von RUNX3 und damit dessen Einflusses auf die Signalwege. Auf diese Weise könnte die Tumorsuppressor-Funktion von *RUNX3* entfallen und die onkogenen Wirkungen der Signalwege überwiegen (Ito et al. 2015).

Im Harnblasenkarzinom wurde vorgeschlagen den Methylierungsstatus von *RUNX3* als prognostischen Marker in der klinischen Diagnostik zu nutzen (Kim et al. 2008). Des Weiteren bietet sich ein therapeutischer Ansatz bei der Behandlung vom Harnblasenkarzinom an (Ito et al. 2015). Die Reaktivierung von *RUNX3* durch DNA-Methylierungsinhibitoren könnte zur Tumorregression führen (Kim et al. 2008). DNA-Methylierungsinhibitoren könnten in der Therapie des Harnblasenkarzinoms als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie, Immuntherapie und Radiotherapie angewandt werden (Marques-Magalhães et al. 2018). Bis zum Einsatz dieser Therapieoption sind jedoch weitere Erkenntnisse über die epigenetischen Mechanismen der *RUNX3* DNA-Methylierung sowie die Wirkungsweise der Methylierungsinhibitoren notwendig. Bisher verfügbare pharmakologische DNA-Methylierungsinhibitoren wirken jedenfalls nicht genspezifisch, sondern genomweit.

4.5 KLINISCHE ANWENDUNG UND ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN

Erkenntnisse über DNA-Methylierungsveränderungen im UC können zur Etablierung von Biomarkern verwendet werden, mit dem Ziel der Anwendung in der klinischen Diagnostik, zur Früherkennung oder zum Monitoring, können jedoch auch als Ansatz für Therapieoptionen Anwendung finden (Olkhov-Mitsel et al. 2017, Knowles und Hurst 2015, Niegisch et al. 2015, Kandimalla et al. 2013, Wood et al. 2013).

In der Diagnostik sind quantitative und qualitative Urintests zur Erkennung und Klassifikation des Harnblasenkarzinoms durch Analyse verschiedener Bestandteile des

Urins Gegenstand aktueller Forschung; einige befinden sich in der klinischen Anwendung (Maas et al. 2019, Bosschieter et al. 2018, Heijden et al. 2018, Sanli et al. 2017, Van Kessel et al. 2017, Kamat et al. 2016). DNA-Methylierungsmarker könnten eine frühzeitige Behandlung des UC indizieren, bevor sich invasive Karzinome manifestieren (Mikeska und Craig 2014). Bisher wird die Zystoskopie als Goldstandard in der Diagnostik und zum Monitoring des UC in der klinischen Routine betrachtet (Bosschieter et al. 2019, Heijden et al. 2018, Santoni et al. 2018, Kandimalla et al. 2013, Zuiverloon et al. 2012). Die Zystoskopie ist kostenineffizient und bleibt trotz technischer Verbesserungen als invasive Untersuchung bei Patienten mit UC oder Personen mit Verdacht darauf eine unangenehme und gelegentlich gefährliche Prozedur (Heijden et al. 2018, Santoni et al. 2018). Die Zytologie bietet als nicht invasive Untersuchung bei high-grade Tumoren, die leichter als Tumorzellen erkennbare Zellen in den Urin freisetzen, eine gute Option zur Detektion mit einer Spezifität von 83% bis 99 % und einer Sensitivität von 38% bis 84 % (Maas et al. 2019, Zuiverloon et al. 2012). Allerdings ist die Zytologie mit einer Sensitivität von 12% bis 26 % für low-grade Tumore nicht geeignet (Maas et al. 2019). Da die low-grade Tumore durch eine Rezidivrate bis zu 70 % eine Langzeitüberwachung mit regelmäßigen Zystoskopien und Biopsien indizieren, ist v.a. beim NMIBC eine effiziente nicht-invasive Methode zur Einstufung des Rezidiv-Potenzials notwendig (Heijden et al. 2018, Santoni et al. 2018, Roperch et al. 2016, Kamat et al. 2016, Kandimalla et al. 2013). Verschiedene hypermethylierte Gene wurden in der Literatur zum Nachweis des UC mit hoher Spezifität und Sensitivität im Urin identifiziert (Schulz und Goering 2016). DNA-Methylierungsmarker im Urin können eine Sensitivität von 65 % bis 100 % und eine Spezifität von 77 % bis 100 % aufweisen (Sanli et al. 2017). Das Ziel besteht darin durch die Methylierungsanalyse der Urinbestandteile als kosteneffiziente, nicht-invasive Methode die Anzahl der Zystoskopien zu reduzieren und damit die Lebensqualität der Patienten mit UC zu verbessern (Bosschieter et al. 2019, Heijden et al. 2018, Van Kessel et al. 2018, Roperch et al. 2016). Die Varianz der Methylierungsergebnisse abhängig vom untersuchten Gen und der untersuchten Sequenz, wie sie diese Arbeit illustriert, limitieren in der klinischen Anwendung die Nutzung einzelner Gene als Biomarker (Bosschieter et al. 2019, Bosschieter et al. 2018, Sanli et al. 2017). Deshalb sind verschiedene Assays zur Methylierungsanalyse mehrerer Gene etabliert worden (Bosschieter et al. 2019, Heijden et al. 2018, Roperch et al. 2016, Kandimalla et al. 2013, Zuiverloon et al. 2012). Assays, welche die Methylierung zweier Gene (*GHR5-MAL* oder *NID2-TWIST1*), dreier Gene (*CFTR-SALL3-TWIST1* oder *HS3T2-SEPTIN9-SLIT2*) und gar von vier Genen (*APC_a-TERT_a-*

TERT_b-EDNRB) erfassen, erbringen eine höhere Sensitivität im Vergleich zur Zytologie (Bosschieter et al. 2019, Santoni et al. 2018, Roperch et al. 2016, Zuiverloon et al. 2012). Zusätzlich wurde die Mutation von *FGFR3* (fibroblast growth factor receptor 3), die bei 60% bis 70 % der NMIBC mit einer Spezifität von 100 % vorkommt, als Biomarker im Urin integriert (Roperch et al. 2016, Kandimalla et al. 2013). Die Kombination von 3-Plex-Methylierungs-Assays (*OTX1-OSR1-ONECUT2* oder *HS3ST2-SEPTIN9-SLIT2*) und *FGFR3*-Mutationsnachweis zur Untersuchung des Urins bietet als nicht-invasive Methode mit hoher Sensitivität eine vielversprechende Option zur Diagnostik des UC und zum Monitoring des Therapieerfolgs (Maas et al. 2019, Bosschieter et al. 2018, Heijden et al. 2018, Santoni et al. 2018, Roperch et al. 2016, Kandimalla et al. 2013). Die ersten Erfahrungen in der klinischen Anwendung zeigen, dass Methylierungsanalysen der Urinbestandteile sensitiver als die Zytologie sind und die Zystoskopien um ein Drittel reduzieren könnten (Maas et al. 2019, Bosschieter et al. 2018, Heijden et al. 2018, Beukers et al. 2017, Roperch et al. 2016, Zuiverloon et al. 2012).

Da die DNA-Methylierung ein reversibler Prozess ist, bieten sich weiterhin Ansatzpunkte für Therapiestrategien bei der Behandlung von Tumoren (Schulz und Goering 2016, Niegisch et al. 2015). DNMT-Inhibitoren, wie 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabine) sind für die klinische Anwendung bei akuter Leukämie, chronischer Leukämie und myelodysplastischen Syndrom zugelassen (Marques-Magalhães et al. 2018, Sanli et al. 2017, Schulz und Goering 2016). In der Vergangenheit wurde angenommen, dass DNA-Methylierungsinhibitoren das Tumorwachstum durch die Re-Expression von Tumorsuppressorgenen und pro-apoptische Gene, die durch Hypermethylierung inaktiviert wurden, stoppen. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass sie darüber hinaus eine antivirale Antwort auslösen, die unmittelbar und über Immunantworten das Tumorwachstum hemmt (Marques-Magalhães et al. 2018, Schulz und Goering 2016). DNA-Methylierungsinhibitoren könnten zudem in Kombination mit Chemotherapeutika zur Vermeidung von Resistenzen eingesetzt werden (Robertson et al. 2018, Schulz und Goering 2016). Auch in diesem Zusammenhang könnten DNA-Methylierungsassays als - in diesem Falle prädiktive - Biomarker Verwendung finden. Bis zum Routine-Einsatz und anhaltenden klinischen Nutzen von Hypermethylierungs-Markern für diagnostische, prognostische und prädiktive Zwecke sind nun vor allem weitere Studien zur Entwicklung und Optimierung robuster und leicht anwendbarer Biomarker unter standardisierten Bedingungen erforderlich (Bosschieter et al. 2018, Niegisch et al. 2015, Mikeska und Craig 2014).

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Baylin SB, Jones PA (2011)
A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications
Nat Rev Cancer. 11(10):726-734
- Baylin SB, Jones PA (2016)
Epigenetic determinants of cancer
Cold Spring Harb Perspect Biol. 8(9)pii: a019505
- Bernard D, Martinez-Leal JF, Rizzo S, Martinez D, Hudson D, Visakorpi T, Peters G, Carnero A, Beach D, Gil J (2005)
CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the *Ink4a/Arf* locus
Oncogene. 24(36):5543-5551
- Beukers W van der Keur KA, Kandimalla R, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Boormans JL, Jensen JB, Lorente JA, Real FX, Segersten U, Orntoft TF, Malats N, Malmström PU, Dyrskjot L, Zwarthoff EC (2017)
FGFR3, TERT and OTX1 as a Urinary Biomarker Combination for Surveillance of Patients with Bladder Cancer in a Large Prospective Multicenter Study
J Urol. 197(6):1410-1418
- Bone KR, Gruper Y, Goldenberg D, Levanon D, Groner Y (2010)
Translation regulation of *Runx3*
Blood Cells Mol Dis. 45(2):112-116
- Bosschieter J, Lutz C, Segerink LI, Vis AN, Zwarthoff EC, A van Moorselaar RJ, van Rhijn BW, Heymans MW, Jansma EP, Steenbergen RD, Nieuwenhuijzen JA (2018)
The diagnostic accuracy of methylation markers in urine for the detection of bladder cancer: a systemic review
Epigenomics. 10(5):673-687

- Bosschieter J, Nieuwenhuijzen JA, Hentschel A, van Splunter AP, Segerink LI, Vis AN, Wilting SM, Lissenberg-Witte BI, A van Moorselaar RJ, Steenbergen RD **(2019)**
A two-gene methylation signature for the diagnosis of bladder cancer in urine
Epigenomics. 11(3):337-347
- Bruch J, Wöhr G, Brüderlein S, Barbi G, Wolter H, Dixkens C, Mattfeldt T, Möller P, Paiss T, Hautmann R, Vogel W, Hameister H **(1999)**
Detailed marker chromosome analysis in cell line U-BLC1, established from transitional-cell carcinoma of the bladder
Int J Cancer. 80(6):903-10
- Chen J, Zhang C, Xu X, Zhu X, Dai D **(2015)**
Downregulation of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif type 1 DNA hypermethylation in human gastric cancer
Mol Med Rep. 12(2):2487-2494
- Choi JS, Kim KH, Jeon YK **(2009)**
Promotor hypermethylation of the *ADAM23* gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues
Int J Cancer. 124(6):1258-1262
- Coussens LM, Fingleton B, Martisian LM **(2002)**
Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations
Science. 295(5564):2387-2392
- Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, Esperto F, Figueroa JD, Kamat AM, Kiemeny L, Lotan Y, Pang K, Silverman DT, Znaor A, Catto JWF **(2018)**
Epidemiology of bladder cancer: a systemic review and contemporary update of risk factors in 2018
Eur Urol. 74(6):784-795
- Cumberbatch MGK, Noon AP **(2019)**
Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer
Transl Androl Urol. 8(1):5-11
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ **(2008)**
The *ADAM* metalloproteinases

Mol Aspects Med. 29(5):258-289

- Ehrnsperger A, Rehli M, Thu-Hang P, Kreutz M **(2005)**
Epigenetic regulation of the dendritic cell-marker gene *ADAM19*
Biochem Biophys Res Commun. 332(2):456-464
- Elliott AY, Bronson DL, Stein N, Fraley EE **(1976)**
In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract
Cancer Res. 36: 365-9
- Elliott AY, Cleveland P, Cervenka J, Castro AE, Stein N, Hakala TR, Fraley EE **(1974)** Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract
J Natl Cancer Inst. 53: 1341–1349
- Enokida H, Nakagawa M **(2008)**
Epigenetics in bladder cancer
Int J Clin Oncol. 13(4):298-307
- Federico A, Pallante P, Bianco M, Ferraro A, Esposito F, Monti M, Cozzolino M, Keller S, Fedele M, Leone V, Troncone G, Chiariotti L, Pucci P, Fusco A **(2009)**
Chromobox protein homologue 7 protein, with decreased expression in human carcinomas, positively regulates E-Cadherin expression by interacting with the histone deacetylase 2 protein
Cancer Res. 69(17): 7079-7087
- Forzati F, Federico A, Pallante P, Fedele M, Fusco A **(2012)**
Tumor suppressor activity of *CBX7* in lung carcinogenesis
Cell Cycle. 11(10): 1888-189
- Fridrichova I, Smolkova B, Kajabova V, Zmetakova I, Krivulcik T, Mego M, Cierna Z, Karaba M, Benca J, Pindak D, Bohac M, Repiska V, Danihel L **(2015)**
CXCL12 and *ADAM23* hypermethylation are associated with advanced breast cancers
Transl Res. 165(6):717-730
- Fröhlich C, Albrechtsen R, Dyrskjøt L, Rudkjaer L, Ørntoft TF, Wewer UM **(2006)**
Molecular profiling of *ADAM12* in human bladder cancer

Clin Cancer Res. 12(24):7359-7368

- Gil J, Bernard D, Martínez D, Beach D **(2004)**
Polycomb *CBX7* has a unifying role in cellular lifespan
Nat Cell Biol. 6(1): 67-72
- Goebell PJ, Knowles MA **(2010)**
Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium
Urol Oncol. 28(4):409-428
- Grossmann HB, Wedemeyer G, Ren L, Wilson GN, Cox B **(1986)**
Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures
J Urol. 136: 953–959
- van der Heijden AG, Mengual L, Ingelmo-Torres M, Lozano JJ, van Rijt-van de Westerlo CCM, Baixauli M, Geavlete B, Moldoveanu C, Ene C, Dinney CP, Czerniak B, Schalken JA, Kiemeny LALM, Ribal MJ, Witjes JA, Alcaraz A **(2018)**
Urin cell-based DNA methylation classifier for monitoring bladder cancer
Clin Epigenetics. 30;10:71
- Hinz S, Kempkensteffen C, Christoph F, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S **(2008)**
Expression parameters of the polycomb group proteins BMI1, SUZ12, RING1 and *CBX7* in urothelial carcinoma of the bladder and their prognostic relevance
Tumour Biol. 29(5):323-329
- Hoffmann MJ, Schulz WA **(2005)**
Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer
Biochem Cell Biol. 83(3):296-321
- Hoffmann MJ, Dehn J, Droop J, Niegisch G, Niedworok C, Szarvas T, Schulz WA **(2015)**
Truncated Isoforms of lncRNA ANRIL are overexpressed in bladder cancer, but do not contribute to repression of INK4 tumor suppressors
Noncoding RNA. 1(3):266-284
- Hu Q, Wu W, Zeng A, Yu T, Shen F, Nie E, Wang Y, Liu N, Zhang J, You Y **(2017)**
Polycomb group expression signatures in the malignant progression of gliomas

Oncol Lett. 13(4):2583-2590

- Hurst CD, Knowles MA **(2014)**
Molecular subtyping of invasive bladder cancer: time to divide and rule?
Cancer Cell. 25(2):135-136
- Ito Y, Bae SC, Chuang LS **(2015)**
The RUNX family: developmental regulators in cancer
Nat Rev Cancer. 15(2):81-95
- Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, Guo CC, Lotan Y, Kassouf W **(2016)**
Bladder cancer
Lancet. 3;388(10061):2796-2810
- Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC **(2013)**
DNA Methylation-based biomarkers in bladder cancer
Nat Rev Urol. 10(6):327-335
- Kandimalla R, Masius R, Beukers W, Bangma CH, Orntoft TF, Dyrskjot L, van Leeuwen N, Lingsma H, van Tilborg AA, Zwarthoff EC **(2013)**
A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine
Clin Cancer Res. 19(17):4760-9
- Karamitopoulou E, Pallante P, Zlobec I, Tornillo L, Carafa V, Schaffner T, Borner M, Diamantis I, Esposito F, Brunner T, Zimmermann A, Federico A, Terracciano L, Fusco A **(2010)**
Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer
Eur J Cancer. 46(8):1438-1444
- Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC **(2005)**
RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors
Cancer Res. 65(20):9347-9354
- Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ **(2008)**
Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder

- Tumor J Urol. 180(3):1141-1145
- Knowles MA, Hurst CD **(2015)**
Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity.
Nat Rev Cancer. 15(1):25-41
 - Knowles MA **(2008)**
Molecular pathogenesis of bladder cancer
Int J Clin Oncol. 13(4):287-297
 - Ko HJ, Kim BY, Jung CH, Chun SW, Mok JO, Kim YJ, Park HK, Kim CH, Kim SJ, Byun DW, Suh KI, Yoo MH, Kang SG **(2012)**
DNA methylation of RUNX3 in papillary thyroid cancer
Korean J Intern Med. 27(4):407-410
 - Kyriazis AA, Kyriazis AP, McCombs WB, Peterson WD **(1984)**
Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice
Cancer Res. 44: 3997-4005
 - Li G, Warden C, Zou Z, Neman J, Krueger JS, Jain A, Jandial R, Chen M **(2013)**
Altered expression of polycomb group genes in glioblastoma multiforme
PLoS One. 8(11): e80970
 - Li Q, Wang X, Lu Z, Zhang B, Liu Z, Zhong Q, Gu L, Zhou J, Zhu B, Jil J, Deng D **(2010)**
Polycomb *CBX7* directly controls trimethylation of histone H3 at lysine 9 at the *p16* locus
PLoS One. 5(10): e13732
 - Lin CW, Lin JC, Prout GR **(1985)**
Establishment and characterization of four human bladder tumor cell lines and sublines with different degrees of malignancy
Cancer Res. 45: 5070–5079
 - J, Levanon D, Negreanu V, Bauer O, Hantisteanu S, Dicken J, Groner Y **(2015)**
Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer
Biochim Biophys Acta. 1855(2):131-143

- Maertens GN, El Messaoudi-Aubert S, Racek T, Stock JK, Nicholls J, Rodriguez-Niedenführ M, Gil J, Peters G **(2009)**
Several distinct polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus
PLoS One. 4(7): e6380
- Manley KV, Hubbard R, Swallow D, Finch W, Wood SJ, Biers SM **(2017)**
Risk factors for development of primary bladder squamous cell carcinoma
Ann R Coll Surg Engl. 99(2):155-160
- Marques-Magalhães Â, Graça I, Henrique R, Jerónimo C **(2018)**
Targetings DNA methyltransferases in urological tumors
Front Pharmacol. 9:366
- Masters JR **(2000)**
Human cancer cell lines: fact and fantasy
Nat Rev Mol Cell Biol. 1: 233–236
- Maas M, Bedke J, Stenzl A, Todenhöfer T **(2019)**
Can urinary biomarkers replace cystoscopy?
World J Urol. 37(9):1741-1749
- Messaoudi-Aubert S, Nicholls J, Maertens GN, Brookes S, Bernstein E, Peters G **(2010)**
Role for the MOV10 RNA helicase in polycomb-mediated repression of the INK4a tumor suppressor
Nat Struct Mol Biol. 17(7):862-8
- McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, Siefker-Radtke A, Dinney C, Czerniak B **(2010)**
Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression.
Urol Oncol. 28(4):429-440
- Mikeska T, Craig JM **(2014)**
DNA methylation biomarkers: cancer and beyond
Genes. 5(3):821-864
- Mochizuki S and Okada Y **(2007)**

ADAMs in cancer cellproliferation and progression

Cancer Sci. 98(5):621-628

- Mohammad HP, Cai Y, McGarvey KM, Easwaran H, Van Neste L, Ohm JE, O'Hagan HM, Baylin SB **(2009)**
Polycomb *CBX7* promotes initiation of heritable repression of genes frequently silenced with cancer specific DNA hypermethylation
Cancer Res. 69(15): 6322-6330
- Monaco M, Chiappetta G, Aiello C, Federico A, Sepe R, Russo D, Fusco A, Pallante P **(2014)**
CBX7 expression in oncocytic thyroid neoplastic lesions (Hürthle cell adenomas and carcinomas)
Eur Thyroid J. 3(4): 211-216
- Muhammad AS, Mungadi IA, Darlington NN, Kalayi GD **(2019)**
Effectiveness of bladder tumor antigen quantitative test in the diagnosis of bladder carcinoma in a schistosoma endemic area
Urol Ann. 11(2):143-148
- Mullooly M, McGowan PM, Crown J, D MJ **(2016)**
The *ADAMs* family of proteases as targets for the treatment of cancer
Cancer Biol Ther. 17(8):870-880
- Murphy G **(2008)**
The *ADAMs*: signalling scissors in the tumour microenvironment
Nat Rev Cancer. 8(12):929-941
- Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA **(2006)**
DNA methylation alterations in urothelial carcinoma
Cancer Biol Ther. (8):993-1001
- Ni S, Wang H, Zhu X, Wan C, Xu J, Xiao L, He J, Jiang C, Wang W, He Z **(2017)**
CBX7 suppresses cell proliferation, migration, and invasion through the inhibition of PTEN/Akt signaling in pancreatic cancer
Oncotarget. 8(5):8010-8021
- Niegisch G, Hoffmann MJ, Koutsogiannouli EA, Schulz WA **(2015)**

Epigenetics in urothelial cancer: Pathogenesis, improving diagnostics and developing novel treatment options

Urologe A. 54(4):526-532

- Nishio M, Sakakura C, Nagata T, Komiyama S, Miyashita A, Hamada T, Kuryu Y, Ikoma H, Kubota T, Kimura A, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Sonoyama T, Ida H, Ito K, Chiba T, Ito Y, Otsuji E **(2010)**
RUNX promotor methylation in colorectal cancer: its relationship with microsatellite instability and its suitability as a novel serum tumor marker
Anticancer Res. 2010 Jul;30(7):2673-82
- Nusse R, Clevers H **(2017)**
Wnt/ β -Catenin signaling, disease and, emerging therapeutic modalities
Cell. 169(6):985-999
- Olkhov-Mitsel E, Savio AJ, Kron KJ, Pethe VV, Hermanns T, Fleshner NE, van Rhijn BW, van der Kwast TH, Zlotta AR, Bapat B **(2017)**
Epigenome-wide DNA methylation profiling identifies differential methylation biomarkers in high-grade bladder cancer
Translational Oncology. 10(2):168-177
- O'Toole C, Nayak S, Price Z, Gilbert WH, Waisman J **(1976)**
A cell line (SCABER) derived from squamous cell carcinoma of the human urinary bladder
Int J Cancer. 17: 707–714
- O'Toole C, Price ZH, Ohnuki Y, Unsgaard B **(1978)**
Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma
Br J Cancer. 38: 64–76
- Pallante P, Federico A, Berlingieri MT, Bianco M, Ferraro A, Forzati F, Iaccarino A, Russo M, Pierantoni GM, Leone V, Sacchetti S, Troncone G, Santoro M, Fusco A **(2008)**
Loss of the *CBX7* gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer
Cancer Res. 68(16): 6770-6778

- Pallante P, Terracciano L, Carafa V, Schneider S, Zlobec I, Lugli A, Bianco M, Ferraro A, Sacchetti S, Troncone G, Fusco A, Tornillo L **(2010)**
The loss of the *CBX7* gene expression represents an adverse prognostic marker for survival of colon carcinoma patients
Eur J Cancer. 46(12):2304-2313
- Pallante P, Sepe R, Federico A, Forzati F, Bianco M, Fusco A **(2014)**
CBX7 modulates the expression of genes critical for cancer progression
PLoS One. 9(5): e98295
- Pallante P, Forzati F, Federico A, Arra C, Fusco A **(2015)**
Polycomb protein family member *CBX7* plays a critical role in cancer progression
Am J Cancer Res. (5):1594-1601
- Paulie S, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P **(1983)**
Lectins as probes for identification of tumor-associated antigens on urothelial and colonic carcinoma cell lines
Int J Cancer. 31: 297–303
- Rasheed S, Gardner MB, Rongey RW, Nelson-Rees WA, Arnstein P **(1977)**
Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses
J Natl Cancer Inst. 58: 881–890
- Reiss K, Ludwig A, Saftig P **(2006)**
Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion
Pharmacol Ther. 111(3):985-1006
- Ren C, Smith SG, Yap K, Li S, Li J, Mezei M, Rodriguez Y, Vincek A, Aguilo F, Walsh MJ, Zhou MM **(2016)**
Structure-guided discovery of selective antagonists for the chromodomain of polycomb repressive Protein CBX7
ACS Med Chem Lett. 7(6):601-605
- Rigby CC, Franks LM **(1970)**
A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure

Br J Cancer. 24: 746–754

- Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, de Sa Carvalho B, Chagas VS, Mungall KL, Sadeghi S, Pedamallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ; TCGA Research Network, Weinstein JN, Kwiatkowski DJ, Lerner SP **(2018)**
Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer
Cell. 174(4):1033
- Roperch JP, Grandchamp B, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I, Roupret M, Phe V, Ciofu C, Tubach F, Cussenot O, Incitti R **(2016)**
Promotor hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer
BMC Cancer. 16:704
- Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, Lotan Y **(2017)**
Bladder cancer
Nat Rev Dis Primers. 13;3:17022
- Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Battelli N **(2018)**
Urinary markers in bladder cancer: an update
Front Oncol. 8:362
- Schulz WA **(2006)**
Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways
Int J Cancer. 119(7):1513-1518
- Schulz WA, Hoffmann M **(2014)**
Urothelial Carcinoma
In Schwab M. (eds) Encyclopedia of Cancer. Springer, Berlin, Heidelberg
- Schulz WA, Koutsogiannouli EA, Niegisch G, Hoffmann MJ **(2015)**
Epigenetics of urothelial carcinoma

Methods Mol Biol. 1238:183-215

- Schulz WA, Goering W **(2016)**
DNA methylation in urothelial carcinoma
Epigenomics. 8(10):1415-1428
- Scott CL, Gil J, Hernando E, Teruya-Feldstein J, Narita M, Martinez D, Visakorpi T, Mu D, Cordon Cardo C, Peters G, Beach D, Lowe SW **(2007)**
Role of the chromobox protein CBX7 in lymphomagenesis
Proc Natl Acad Sci U S A. 104(13): 5389-5394
- Seals DF, Courtneidge SA **(2003)**
The *ADAMs* family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions
Genes Dev. 17(1):7-30
- Seifert HH, Meyer A, Cronauer MV, Hatina J, Müller M, Rieder H, Hoffmann MJ, Ackermann R, Schulz WA **(2007)**
A new and reliable culture system for superficial low-grade urothelial carcinoma of the bladder
World J Urol. 25(3):297-30
- Soria F, Marra G, D'Andrea D, Gontero P, Shariat SF **(2019)**
The rationale and benefits of the second look transurethral resection of the bladder for T1 high grade bladder cancer
Transl Androl Urol. 8(1):46-53
- Szarvas T, Nyirády P, Ogawa O, Furuya H, Rosser CJ, Kobayashi T **(2018)**
Urinary protein markers for the detection and prognostication of urothelial carcinoma
Methods Mol Biol. 1655:251-273
- Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, Mitsufuji S, Hosoda F, Hirohashi S, Ohki M, Inazawa J **(2005)**
ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation
Oncogene. 24(54):8051-8060
- Thievensen I, Seifert HH, Swiatkowski S, Florl AR, Schulz WA **(2003)**

- E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells
Br J Cancer. 88(12):1932-1938
- Tzeng CC, Liu HS, Li C, Jin YT, Chen RM, Yang WH, Lin JS **(1996)**
Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan
Anticancer Res. 16: 179–1804
 - Vandamme J, Völkel P, Rosnoblet C, Le Faou P, Angrand PO **(2011)**
Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells
Mol Cell Proteomics. 10(4):M110.002642
 - Van Kessel KE, Beukers W, Lurkin I, Ziel-van der Made A, van der Keur KA, Boormans JL, Dyrskjøt L, Márquez M, Ørntoft TF, Real FX, Segersten U, Malats N, Malmström PU, Van Criekinge W, Zwarthoff EC **(2017)**
Validation of DNA methylation-mutation urine assay to select patients with hematuria for cystoscopy
J Urol. 197(3 Pt 1):590-595
 - Veerla S, Panagopoulos I, Jin Y, Lindgren D, Höglund M **(2008)**
Promotor analysis of epigenetically controlled genes in bladder cancer
Genes Chromosomes. 47(5):368-378
 - Williams RD **(1980)**
Human urologic cancer cell lines
Invest Urol. 17: 359-63
 - Wolff EM, Liang G, Cortez CC, Tsai YC, Castelao JE, Cortessis VK, Tsao-Wie DD, Groshen S, Jones PA **(2008)**
RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking
Cancer Res. 68(15):6208-6214
 - Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C **(2013)**
Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the

- RUNX3 promotor in a bladder cancer cell line
Asian Pac J Cancer Prev. 14(6):3773-3778
- Wood SL, Knowles MA, Thompson D, Selby PJ, Banks RE **(2013)**
Proteomic studies of urinary biomarkers for prostate, bladder and kidney cancers
Nat Rev Urol. 10(4):206-218
 - Xie D, Shang C, Zhang H, Guo Y, Tong X **(2015)**
Up-Regulation of miR-9 Target *CBX7* to regulate invasion ability of bladder transitional cell carcinoma
Med Sci Monit. 21:225-230
 - Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G **(2014)**
Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy
Asian Pac J Cancer Prev. 15(3):1085-1091
 - Yan C, Kim YW, Ha YS, Kim IY, Kim YJ, Yun SJ, Moon SK, Bae SC, Kim WJ **(2012)**
RUNX3 methylation as a predictor for disease progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer
J Surg Oncol. 105(4):425-30
 - Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM **(2010)**
Molecular Interplay of the Non-coding RNA *ANRIL* and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb *CBX7* in Transcriptional Silencing of *INK4a*
Mol Cell. 38(5):662-674
 - Yu T, Wu Y, Hu Q, Zhang J, Nie E, Wu W, Wang X, Wang Y, Liu N **(2017)**
CBX7 is a glioma prognostic marker and induce G1/S arrest via the silencing of CCNE1
Oncotarget. 8(16):26637-26647
 - Zhang Z, Wang S, Wang M, Tong N, Fu G, Zhang Z **(2008)**
Genetic variants in RUNX3 and risk of bladder cancer: a haplotype-based analysis
Carcinogenesis. 29(10):1973-1978
 - Zhang X-W, Zhang L, Qin W, Yao XH, Zheng LZ, Liu X, Li J, Guo WJ **(2010)**
Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer

J Exp Clin Cancer Res. 29:114

- Zheng X, Zhou J, Zhang B, Zhang J, Wilson J, Gu L, Zhu B, Gu J, Ji J, Deng D **(2015)**

Critical evaluation of *CBX7* downregulation in primary colon carcinomas and its clinical significance in Chinese patients

BMC Cancer. 15:145

- Zuiverloon TC, Beukers W, van der Keur KA, Munoz JR, Bangma CH, Lingsma HF, Eijkemans MJ, Schouten JP, Zwarthoff EC **(2012)**

A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine

BJU Int. 109(6):941-8

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. W.A. Schulz für das interessante und klinisch relevante Thema danken. Und insbesondere bedanke ich mich für seine Professionalität, Unterstützung und Geduld während der Betreuung dieser Arbeit. Durch seine positive Einstellung und gute Laune hat es sehr viel Spaß gemacht mit ihm zusammenzuarbeiten.

Auch ein großes Dankeschön an das Team des Urologischen Forschungslabor für die schöne gemeinsame Zeit und Hilfsbereitschaft. Vor allem Theodora Ribarska danke ich für ihre freundschaftlichen Ratschläge und ihr großes Engagement Labormitglieder zu unterstützen. Anne-Marie Koch, Christiane Hader und Wolfgang Goering danke ich für ihre wertschätzende Erfahrung und Tipps, die mir bei der Ausführung der Experimente dieser Arbeit eine große Hilfe waren.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in jeder Hinsicht danken.