

**Funktionelle Bedeutung
langer nicht-codierender RNAs
in der Regulation squamöser Differenzierung
in Urothelkarzinomen und Kopf-Hals-Tumoren**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Johanna Droop
aus Gütersloh

Düsseldorf, Februar 2019

aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

2. Prof. Dr. rer. nat. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung:

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter der Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen unter *Creative Commons Attribution License* (CC BY 4.0) veröffentlicht:

- Droop J, Szarvas T, Schulz WA, Niedworok C, Niegisch G, Scheckenbach K, Hoffmann MJ. Diagnostic and prognostic value of long noncoding RNAs as biomarkers in urothelial carcinoma. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0176287.

Die Datenerhebung erfolgte durch mich unter Mithilfe von T. Szarvas und M.J. Hoffmann bei der Korrelation der Expressionendaten mit klinischen Daten sowie der Analyse der TUG1-Expression in öffentlich zugänglichen Datensätzen.

- Hoffmann MJ, Dehn J, Droop J, Niegisch G, Niedworok C, Szarvas T, Schulz WA. Truncated Isoforms of lncRNA ANRIL Are Overexpressed in Bladder Cancer, But Do Not Contribute to Repression of INK4 Tumor Suppressors. *Noncoding RNA*. 2015; 1(3):266-284.

Die in dieser Publikation veröffentlichten PVT1-Expressionsdaten in Zelllinien wurden von mir erhoben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	6
1. Einleitung	7
1.1 Das Urothelkarzinom	7
1.1.1 Molekulare Subtypen des Urothelkarzinoms	9
1.2 Lange nicht-codierende RNAs (lncRNAs)	11
1.3 Epidermale Differenzierung in der Haut im Vergleich zu urothelialer Differenzierung	14
1.3.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich im Vergleich zu squamösen Urothelkarzinomen	16
1.3.2 Lange nicht-codierende RNAs in epithelialer Differenzierung	17
1.4 Lange nicht-codierende RNAs als Biomarker im UC und HNSC	19
1.5 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Urothelkarzinom-Gewebeproben und klinische Daten	24
2.1.1.1 Gewebeproben aus Düsseldorf	24
2.1.1.2 Gewebeproben aus Essen	24
2.1.1.3 Gewebeproben aus Aachen	26
2.1.2 Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich	26
2.1.2 Zelllinien	27
2.1.3.1 Urothelkarzinom-Zelllinien	27
2.1.3.2 Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich	28
2.1.4 Bakterienstämme	29
2.1.5 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien und Kits	29
2.1.6 Geräte	33
2.1.7 Oligonucleotide	34
2.1.8 Plasmide	38
2.1.9 Software	38
2.2 Methoden	39
2.2.1 Kultivierung von Zelllinien	39

2.2.1.1	Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien und Plattenepithelkarzinom-Zelllinien.....	39
2.2.1.2	Kultivierung von HBLAK.....	40
2.2.1.3	Kultivierung von humanen Keratinozyten	40
2.2.1.4	Kultivierung von HaCaT	41
2.2.2	MTT-Assay	41
2.2.3	Klonogenitäts-Assay und Giemsa-Färbung	42
2.2.4	Transfektionen	42
2.2.4.1	Plasmid-Transfektionen mittels Lipofektion	42
2.2.4.2	Transfektion von HBLAK mittels Nucleofektion	43
2.2.4.3	siRNA-Transfektion mittels Lipofektion.....	44
2.2.4.4	stabile Transfektion durch Antibiotika-Selektion.....	44
2.2.5	In vitro Differenzierung	45
2.2.5.1	In vitro Differenzierung von HBLAK	45
2.2.5.2	In vitro Differenzierung von HaCaT.....	45
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	46
2.2.6.1	RNA-Isolation	46
2.2.6.2	Fraktionierte RNA-Isolation	46
2.2.6.3	Reverse Transkription	47
2.2.6.4	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)	47
2.2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten	48
2.2.7	Klonierung von lncRNA-Überexpressionskonstrukten	49
2.2.7.1	Restriktionsverdau.....	49
2.2.7.2	Plasmid-Dephosphorylierung.....	49
2.2.7.3	Ligation	49
2.2.7.4	Bakterientransformation	50
2.2.7.5	Plasmidisolation	50
2.2.7.6	Klonierung von DANCR	50
2.2.7.7	Klonierung von TINCR	51
2.2.8	<i>In silico</i> -Analysen	52
2.2.8.1	Analyse von lncRNA-Expression und DNA-Methylierung in öffentlichen Datensätzen	52
2.2.8.2	Analyse von Microarray- und RNA-Sequenzierungsanalysen.....	53
2.2.8.3	Statistik.....	53

2.2.8.4 Hierarchische Clusteranalyse.....	54
3. Ergebnisse	55
3.1 Literaturrecherche zur Identifizierung von lncRNAs als Biomarker-Kandidaten im UC	55
3.2 Expressionsbestimmung in Tumor- und Normalgewebe mittels quantitativer PCR im Vergleich zu TCGA-Daten.....	55
3.3 Korrelation der lncRNA-Expression mit klinischen Parametern.....	63
3.4 TUG1 als Marker für Urothelkarzinome mit BASQ-Subtyp.....	69
3.5 <i>In vitro</i> -Differenzierung von urothelialen Zellen: Analyse von Microarray- und RNA-Seq-Daten	73
3.6 Validierung der identifizierten lncRNAs mittels quantitativer PCR	80
3.7 Differentiell exprimierte lncRNAs im Urothelkarzinom im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich	82
3.9 <i>In silico</i> Analyse des Methylierungsmusters differentiell exprimierter lncRNAs im UC	88
3.10 Modelle der urothelialen Differenzierung <i>in vitro</i>	90
3.10.1 Identifizierung von Markergenen der squamösen Differenzierung <i>in vitro</i> ...	90
3.10.2 Molekulare Charakterisierung der urothelialen Differenzierung	97
3.10.3 Vergleich urothelialer Differenzierung mit Keratinozyten-Differenzierung anhand des HaCaT-Modells	107
3.11. Bedeutung der lncRNAs TINCR und DANCR während der urothelialen Differenzierung und Karzinogenese.....	109
3.11.1 TINCR-/DANCR-Expression im Urothelkarzinom im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.....	109
3.11.2 TINCR/DANCR-Expression in verschiedenen Tumorentitäten.....	118
3.11.4 Subzelluläre Lokalisation von TINCR/DANCR während der urothelialen Differenzierung.....	121
3.12 Modulation der TINCR-Expression in Tumorzelllinien.....	122
3.12.1 siRNA-vermittelte Herunterregulation von TINCR	122
3.12.2 Stabile TINCR-Überexpression	127
3.12.3 Transiente vs. stabile DANCR-Überexpression	131
3.12.4 Modellierung der TINCR-Expression in der urothelialen Differenzierung ...	132
4. Diskussion	138
4.1 lncRNAs als Biomarker im Urothelkarzinom.....	138
4.1.1 TINCR und DANCR im Urothelkarzinom	140
4.1.2 Assoziation der lncRNA-Expression mit molekularen Subtypen des UC.....	144

4.1.3 Identifikation differentiell exprimierter lncRNAs in der urothelialen Differenzierung.....	146
4.2 Molekulare Charakterisierung der urothelialen Differenzierung in vitro.....	148
4.2.1 Funktionelle Bedeutung von TINCR und DANCR im Urothel	154
Literaturverzeichnis.....	157
Abbildungsverzeichnis.....	171
Tabellenverzeichnis	174
Abkürzungsverzeichnis.....	175
Danksagung	180
Anhang.....	183
Plasmidkarten	183
Tabelle I: Mediane DNA-Methylierung verschiedener lncRNA-Gene in Tumor- (T) und Normal-Proben (N) für alle analysierten CpG-Stellen.....	185

Zusammenfassung

Lange nicht-codierende RNAs (lncRNAs) sind per Definition länger als 200 Nukleotide und verfügen nicht über eine substantielle Protein-codierende Kapazität. Sie sind meist Gewebe-spezifisch exprimiert und nehmen Einfluss auf die Genregulation. Ziel dieser Arbeit war es lncRNAs zu identifizieren, die an der urothelialen Differenzierung beteiligt sind und durch differentielle Expression zu einer aberranten Differenzierung und somit zur Entstehung von Urothelkarzinomen (UC) beitragen können. Hierbei lag der Fokus auf Tumoren mit squamösen Eigenschaften, die vergleichbar sind mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSC). Im Zuge der molekularen Subtypisierung werden diese Tumore dem basal-squamösen Subtyp (BASQ) von UC zugeordnet. Zunächst sollte die Eignung bereits vorgeschlagener lncRNAs (MALAT1, H19, UCA1, lnc-UBC1, TUG1, GAS5, ncRAN) als diagnostische und prognostische Biomarker für das UC verifiziert werden. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, da keine konsistenten Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe gefunden wurden. Vielmehr stellte sich eine niedrige TUG1-Expression charakteristisch für BASQ-Tumore heraus. Anhand von *RNA-Seq* und *Microarray*-Analysen von *in vitro*-Modellen der urothelialen Differenzierung wurden lncRNAs mit potentiell regulatorischer Funktion identifiziert. Für funktionelle Untersuchungen wurden die lncRNAs TINCR und DANCR ausgewählt, die in der Keratinozyten-Differenzierung gegenläufige Funktionen ausüben. TINCR war im UC leicht überexprimiert, während DANCR eher vermindert exprimiert war. Clusteranalysen von öffentlichen Datensätzen belegen die Assoziation der Expression beider lncRNAs mit bestimmten Subtypen des UC. Modulationen dieser lncRNAs in UC- und HNSC-Zelllinien mittels siRNA-vermitteltem *Knockdown* und stabiler Überexpression durch Antibiotika-Selektion nach Transfektion führten nicht zu deutlichen Veränderungen in zellulären Eigenschaften. Auch eine Überexpression von TINCR in der HBLAK-Zelllinie veränderte nicht deren Fähigkeit zur urothelialen oder squamösen Differenzierung. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der funktionelle Stellenwert der untersuchten lncRNAs TINCR und DANCR in der urothelialen Differenzierung und Onkogenese eher gering ist, Expressionsveränderungen aber für die Subtypisierung relevant sind und sie dadurch diagnostische und prognostische Aussagen liefern können.

Summary

Long non-coding (lncRNAs) are per definition longer than 200 nucleotides and do not have any substantial protein-coding capacity. They are mostly expressed in a tissue-specific manner and contribute to gene regulation. The objective of this project was to identify lncRNAs that control urothelial differentiation and contribute to aberrant differentiation and therefore the genesis of urothelial carcinoma (UC) via differential expression. The focus was on tumors with squamous characteristics which share similarities with head and neck squamous cell carcinomas (HNSC). In molecular subtyping of UC these tumors are termed basal-squamous-like (BASQ). The initial aim was to verify the suitability of already proposed lncRNAs (MALAT1, H19, UCA1, lnc-UBC1, TUG1, GAS5, ncRNAN) as diagnostic and prognostic biomarkers for UC. However, this could not be confirmed as no consistent differential expression between tumor and normal tissue was discernable. In fact a low TUG1-expression proved to be characteristic for BASQ-tumors. On the basis of RNA-Seq and microarray-analyses of *in vitro* models of urothelial differentiation, lncRNAs with potential regulational function were identified. For functional analysis lncRNAs TINCR and DANCR were chosen which exert opposite functions in keratinocyte differentiation. TINCR is slightly overexpressed in UC whereas DANCR expression is rather diminished. Cluster analysis of public data revealed that expression of both lncRNAs is associated with certain subtypes of UC. Modulation of both lncRNAs in UC and HNSC cell lines via siRNA-mediated knockdown and stable overexpression by antibiotics-selection after transfection did not lead to clear changes in cellular characteristics. Furthermore overexpression of TINCR in the HBLAK cell line did not change its ability for urothelial or squamous differentiation. Taken together these results indicate that the functional significance of the investigated lncRNAs TINCR and DANCR in urothelial differentiation and oncogenesis is minor, but changes in expression are relevant for subtyping and might therefore provide diagnostic and prognostic informations.

1. Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist die neunthäufigste Tumorerkrankung weltweit, wobei über 90% der Erkrankungen Urothelkarzinome sind (1). Das Urothel, auch als Übergangsepithel bezeichnet, erstreckt sich vom Nierenbecken über die Harnblase bis zum Harnleiter (2). Weltweit erkranken mehr Männer an Blasenkrebs als Frauen, wogegen bei Frauen die Erkrankung häufiger tödlich verläuft (3). Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer Erkrankung ist das Zigarettenrauchen (4). Neben der Exposition gegenüber aromatischen Aminen und anderen Chemikalien als weiteren Risikofaktoren wird auch über eine gewisse genetische Prädisposition diskutiert (5, 6). Ein Großteil der Urothelkarzinome sind papilläre nicht-muskelinvasive Karzinome (NMIBC), die häufig rezidivieren (*5-year-recurrence* 50-70%) und in einigen Fällen auch zu muskelinvasiven Karzinomen (MIBC) progredieren (*5-year-progression* 10-30%) (7). Die Behandlung der NMIBC erfolgt durch transurethrale Resektion (TUR), welche durch eine intravesikale Immunotherapie oder Chemotherapie begleitet werden kann. Muskelinvasive Karzinome werden in der Regel durch eine radikale Zystektomie bei gleichzeitiger bilateraler pelviner Lymphadenektomie behandelt, der eine neoadjuvante Cisplatin-basierte Chemotherapie vorausgehen kann. Eine systemische Chemotherapie kann durch eine Strahlentherapie ergänzt werden (8). Die Klassifizierung der Karzinome erfolgt nach dem TNM-System, wobei ‚T‘ Größe und Ausbreitung des Tumors angibt, ‚N‘ das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und ‚M‘ das von Fernmetastasen. Darüber hinaus erfolgen ein *Grading* basierend auf dem Grad an zellulärer Anaplasie sowie ein *Staging*, das sich auf die Invasionstiefe und den Metastasierungsgrad der Tumore bezieht. Für die Beurteilung von NMIBC ist das *Grading* der wichtigere prognostische Faktor, für die Beurteilung der MIBC das *Staging* (7).

Neben dem Urothelkarzinom gibt es weitere, aber deutlich seltenere histologische Varianten des Blasenkarzinoms, insbesondere Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome. Letztere machen etwa 5% aller Blasenkarzinome aus und treten insbesondere in Gebieten mit einer hohen Inzidenz an Infektionen mit *Schistosoma haematobium* (vorwiegend noch Ägypten) auf (9).

NMIBC gehen aus epithelialen Hyperplasien hervor, sie haben meist einen nahezu diploiden Karyotyp und sind genomisch stabil. MIBC, die aus flachen Dysplasien und

Carcinoma in situ (CIS) hervorgehen, sind dagegen aneuploid und genomisch instabil (10). In NMIBC finden sich Mutationen häufig in *FGFR3*, *PIK3CA*, *KDM6A* und *STAG2*. Mutationen in *STAG2*, einer Komponente des Cohesin-Komplexes, der eine zentrale Funktion bei der Organisation des Chromatins für Transkription wie Mitose ausübt, könnten in Krebszellen anderer Tumorentitäten ursächlich für Aneuploidie sein (11). Diese Assoziation trifft auf das UC jedoch vermutlich nicht zu (12). Bis zu 80% der papillären Tumore im Stadium pTa weisen aktivierende Punktmutationen im *FGFR3*-Gen auf, die zur Hyperproliferation beitragen, aber dennoch mit einer besseren Prognose einhergehen (13). Neben *TP53*-Mutationen und dem Verlust von *RB1*, auch bereits bei CIS, sind in MIBC häufig *ERBB2*, *ARID1A* und *PTEN* mutiert. Eine der häufigsten chromosomalen Veränderungen in allen Formen des UC ist die Deletion von Chromosom 9p, die zum Verlust des Tumorsuppressorlokus *CDKN2A* führt, der für zwei Proteine codiert (p16^{INK4A} und p14^{ARF}) (14).

MIBC weisen neben einer hohen intratumoralen Heterogenität auch eine besonders hohe Mutationsrate (mediane somatische Mutationsrate von 5.5 pro Megabase) auf. Bei der Mehrzahl der Blasenkarzinome findet sich dabei eine Mutationssignatur, die auf die Aktivität von Deaminasen der *APOBEC*-Familie zurückgeht. Diese Enzyme deaminieren in einzelsträngiger DNA Cytosin zu Uracil und sind an der Abwehr von Retroviren beteiligt. Im Blasenkarzinom ist insbesondere eine erhöhte Expression von *APOBEC3B* mit dem Auftreten der beschriebenen *APOBEC*-Mutations-Signatur assoziiert (15, 16). Eine besondere Bedeutung bei der Karzinogenese des Urothelkarzinoms kommt epigenetischen Veränderungen zu, die insbesondere in extensiven DNA-Methylierungsveränderungen und einer transkriptionellen Deregulation durch veränderte Histonmodifikationen zum Tragen kommen (10). Gut beschrieben ist die Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen, die positiv mit dem Tabakkonsum korreliert ist (17, 18). Veränderungen in Histonmodifikationen sind vermutlich auf Mutationen in Chromatin-regulierenden Genen zurückzuführen (16). Zu den Chromatin-regulierenden Genen, die in über 50% der MIBC-Tumore mutiert sind, gehören *ARID1A* (s.o.), kodierend für eine Komponente des *SWI/SNF chromatin remodelling complex*, die Histonmethyltransferase-Gene *MLL2* und *MLL3*, die Histonacetyltransferase-Gene *EP300* und *CREBBP*, sowie das Histon-demethylase-Gen *KDM6A* (10).

1.1.1 Molekulare Subtypen des Urothelkarzinoms

Da es sich beim Urothelkarzinom um eine sehr heterogene Erkrankung handelt, wurde in den vergangenen Jahren von verschiedenen Gruppen versucht auf Grundlage genomweiter Genexpressionsstudien molekulare Subtypen zu definieren, von denen im Folgenden ausgewählte Klassifizierungen näher erläutert werden. Eine Einteilung der Tumore in molekulare Subtypen, die mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sind, soll ähnlich wie beim Brustkarzinom eine präzisere Prognose und individuellere Therapieoptionen ermöglichen (19). Möglicherweise rühren die unterschiedlichen molekularen Subtypen von Ursprungszellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades innerhalb des Urothels her (20). So wurden von Choi et al. luminale und basale Subtypen in MIBC identifiziert, die molekulare Charakteristika der Basalzellen des Urothels bzw. der terminal differenzierten Deckzellen (*umbrella cells*), die dem Blasenlumen zugewandt sind, widerspiegeln. Luminale Tumore weisen eher einen papillären Phänotyp auf und haben eine etwas bessere Prognose, wohingegen basale Tumore einen aggressiveren Phänotyp haben und plattenepitheliale Anteile enthalten können. Typische molekulare Charakteristika von basalen MIBCs sind die Überexpression des Transkriptionsfaktors $\Delta Np63\alpha$, einer trunkierten Variante von TP63, die eine wichtige Funktion in der Kontrolle der epidermalen Entwicklung hat, sowie des EGFR. Letzteres führt u. A. zu einer Aktivierung von STAT3. Biomarker des basalen MIBC sind KRT5, KRT6, KRT14, CD44 und CDH3 (21).

Luminale MIBC exprimieren verstärkt Uroplakine, die physiologisch fast nur in terminal differenzierten Deckzellen vorkommen. Ähnlich wie papilläre NMIBC enthalten luminale MIBCs häufig aktivierende *FGFR3*-Mutationen oder den *FGFR3* aktivierende Gen-Fusionen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass luminale MIBC aus progredienten papillären NMIBC hervorgehen. Eines der Hauptmerkmale von luminalen Tumoren ist die Aktivierung des *Peroxisome Proliferator-Activator Receptor Gamma* PPAR γ (22). Es ist bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der urothelialen Differenzierung hat, wobei seine Wirkungsweise im molekularen Detail bisher nicht bekannt ist (23). Insbesondere das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren FOXA1 und GATA3 mit PPAR γ kann zu der Entwicklung eines Tumors mit luminalem Subtyp beitragen (24). Dieses Zusammenspiel ist jedoch auch für die normale Differenzierung des Urothels notwendig.

Bereits vor der Klassifizierung durch Choi et al wurden von Sjö Dahl et al. durch Clusteranalysen von cDNA-Microarrays fünf Tumorcluster identifiziert, bezeichnet als urobasal A, genomisch instabil, urobasal B, *squamous-like* und heterogen-infiltriert (25). In der ersten Studie des TCGA-Konsortiums wurden - ebenfalls durch Cluster-Analysen von RNA-Sequenzierungsdaten - vier Cluster (I-IV) unterschieden, wobei Cluster I und II bedingt durch die Expression von HER2, FOXA1 und GATA3 Ähnlichkeiten mit luminalen Subtypen des Mammakarzinoms haben. Cluster III entspricht einem basal-squamösen Subtyp (18). Die Ähnlichkeit der im UC identifizierten luminalen und basalen Subtypen mit den entsprechenden Subtypen im Mammakarzinom konnte durch weitere Consensus-Cluster-Analysen bestätigt werden (19).

Die aktuellste Subtypisierung (26) basiert auf der Studie des TCGA-Konsortiums von 2017, die insgesamt drei luminalen Subtypen unterscheidet (luminal-papillär, luminal-infiltriert, luminal), weiterhin einen basal-squamösen Subtyp und, deutlich seltener, einen neuronalen Subtyp. Der luminal-papilläre Subtyp zeichnet sich vor allem durch die prominente Rolle von FGFR3 (Amplifikation, Überexpression) aus. Tumore des luminal-infiltrierten Subtyps sind stark mit Lymphozyten infiltriert und enthalten einen hohen Anteil an Stroma, was mit einer Genexpressionssignatur von glatter Muskulatur und Myofibroblasten einhergeht. Der luminal Subtyp ist gekennzeichnet durch die höchste Expression von Uroplakinen (UPK1A, UPK2) und weiteren Markern der terminalen Differenzierung im Urothel (KRT20, SNX31). Der basal-squamöse Subtyp exprimiert, wie zuvor von anderen Gruppen gefunden, stark basale Urothel-Marker wie CD44, KRT5, KRT6A und KRT14 sowie plattenepitheliale Marker (TGM1, DSC3, PI3). Überdies weist dieser Subtyp die deutlichste Expressionssignatur von immun-assoziierten Genen auf. Die sehr kleine Gruppe der Tumore mit neuronalem Subtyp (~5%) lässt nur in wenigen Fällen tatsächlich eine neuroendokrine Histologie erkennen, dennoch sind neuronale und neuroendokrine Markergene exprimiert. Diese Gruppe hat die schlechteste Überlebensprognose (26).

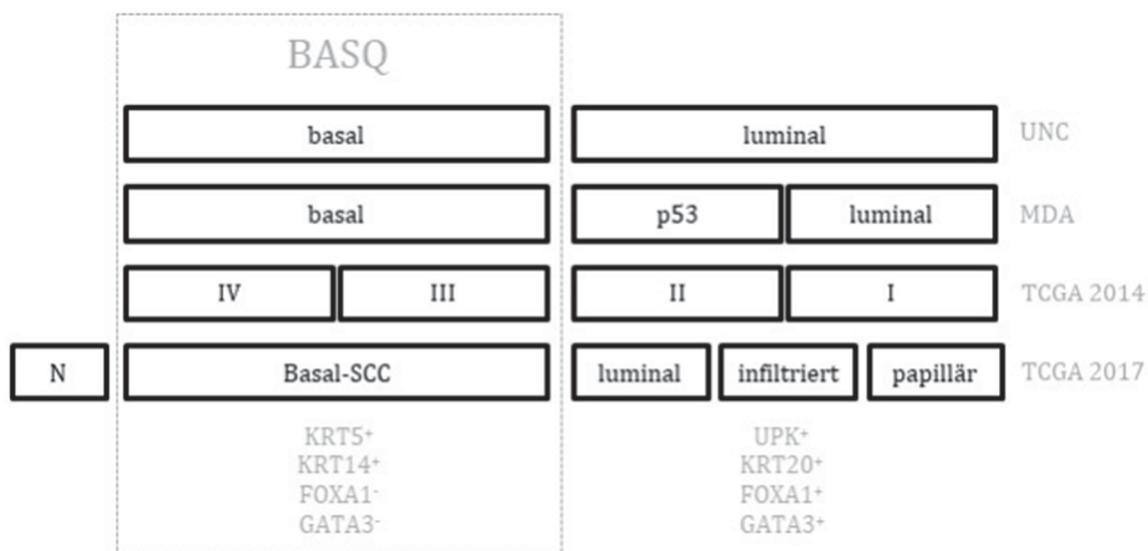


Abb.1.1: Übersicht ausgewählter molekularer Subtypen des Urothelkarzinoms. Basal-Squamöse Subtypen (BASQ) sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von KRT5 und KRT14 und eine verminderte Expression der Transkriptionsfaktoren FOXA1 und GATA3. Luminale Subtypen exprimieren neben FOXA1 und GATA3 Uroplakine und KRT20.

Eine vereinfachte Darstellung der erläuterten Subtypisierungen ist in Abbildung 1.1 aufgeführt. Allen bisherigen Ansätzen zur Subtypisierung ist gemein, dass ein Subtyp durch eine hohe Expression basaler Markergene (KRT5/6; KRT14) bei gleichzeitig niedriger Expression luminaler Markergene (FOXA1, GATA3) gekennzeichnet ist. Diese Tumore haben zudem häufig eine Histologie mit squamösen Anteilen und lassen sich auch molekular mit Plattenepithelkarzinomen anderer Gewebe wie der Lunge oder des Kopf-Hals-Bereichs gruppieren. Daher wird dieser Subtyp als *Basal-Squamous-like* (BASQ) bezeichnet. Tumore mit einem BASQ-Subtyp sind auch deshalb von besonderem Interesse, weil sie mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert sind (27, 28). Obwohl sich die Subtypen durch eine Vielzahl an Genexpressionsänderungen unterscheiden, könnte eine immunhistochemische Färbung von GATA3 und KRT5/6 ausreichend zuverlässig zumindest zwischen basalen und luminalen Subtypen unterscheiden (29).

1.2 Lange nicht-codierende RNAs (lncRNAs)

Obwohl nur etwa zwei Prozent des menschlichen Genoms für Proteine codieren, haben RNA-Sequenzierungsstudien ergeben, dass bis zu 90% des Genoms transkribiert wird. Mittlerweile ist bekannt, dass auch viele der so entstehenden nicht-codierenden RNAs (ncRNAs) wichtige Funktionen in der Genregulation, auch in Differenzierungsprozessen,

übernehmen. Eine aberrante Expression kann ihrerseits mit verschiedenen Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, assoziiert sein (30). ncRNAs lassen sich in zwei Klassen einteilen: die kurzen ncRNAs, zu denen microRNAs und *Piwi-interacting-RNAs* (piRNAs) zählen, und die langen nicht-codierenden RNAs (lncRNAs). Diese sind per Definition länger als 200 b und verfügen über keinen substantiellen offenen Leserahmen (*open reading frame, ORF*). Ähnlich wie die Messenger-RNAs (mRNA) Protein-codierender Gene (PCG) werden lncRNAs von RNA-Polymerase II transkribiert und anschließend prozessiert (31). lncRNAs sind häufig Gewebe-spezifisch exprimiert, wobei sie ein im Verhältnis zu mRNAs insgesamt niedrigeres Expressionsniveau aufweisen (32). Anders als mRNAs sind viele lncRNAs im Nucleus lokalisiert, wo sie mit dem Chromatin interagieren, die Transkription bzw. die RNA-Prozessierung (bspw. *Splicing*) regulieren und Histonmodifikationen beeinflussen. Ein Beispiel für eine im Nucleus lokalisierte lncRNA ist NEAT1, die maßgeblich an der Bildung von *Paraspeckle*-Suborganellen beteiligt ist, indem sie die Komplexbildung des SWI/SNF-Chromatinmodellierenden Komplexes mit weiteren Proteinen vermittelt (33, 34). Im Zytoplasma können lncRNAs die Stabilität anderer RNAs beeinflussen und an der Kontrolle der Translation beteiligt sein (30). Ein Beispiel für die translationale Kontrolle durch eine nicht-codierende RNA ist ein *natural antisense transcript* (NAT) zu dem Gen des Transkriptionsfaktor Zeb2, welches im Zuge der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) exprimiert wird. Durch die Bindung des NAT an die Zeb2-mRNA wird das Spleißen deren 5'-UTR verhindert. Diese sog. *intron retention* ermöglicht die Translation über eine *internal ribosome entry site* (IRES) (35). Bei der transkriptionellen Regulation durch lncRNAs unterscheidet man den Einfluss auf chromosomal benachbart liegende Gene (*in cis*) und genomisch weiter entfernt liegende Gene (*in trans*). lncRNAs beeinflussen häufig auch die Funktion anderer ncRNAs, u.A indem sie als sog. *microRNA-Sponges* kompetitiv mit mRNAs an microRNAs binden (36).

Die Funktion vieler lncRNAs ist bisher unbekannt. Eine der am besten charakterisierten lncRNAs ist HOTAIR (*HOX transcript antisense RNA*), die im *HOXC*-Lokus auf Chromosom 12 lokalisiert ist. In diversen Tumorentitäten wurde eine erhöhte Expression von HOTAIR gefunden, die häufig mit einem aggressiveren Phänotyp einhergeht, d.h. verstärkter Metastasierung und damit verschlechterter Prognose (37). HOTAIR interagiert mit Histon-modifizierenden Proteinen wie EZH2, SUZ12 oder LSD1, die zu Polycomb- und Trithorax-Proteinkomplexen gehören, und vermittelt über diese Interaktionen

Histonmodifikationen an Histon 3 Lysin 27 (H3K27) und Histon 3 Lysin 4 (H3K4) an Genen im *HOXD*-Lokus (38). HOTAIR ist auch im Urothelkarzinom überexprimiert, wobei der Mechanismus, über welchen HOTAIR zur Tumorentstehung und -progression beiträgt, Gewebe- und Kontext-abhängig ist (39). Ein weiteres Beispiel für den umfassenden Einfluss einer lncRNA auf Genregulationsprozesse ist XIST (*X inactive specific transcript*), die maßgeblich an der X-Chromosomen-Inaktivierung zur Gen-Dosiskompensation in weiblichen Säugetieren beteiligt ist. XIST ist auf dem X-Chromosom in einer genomischen Region lokalisiert, die als *X Inactivation Center* (XIC) bezeichnet wird. Wird die Expression von XIST auf dem zu inaktivierenden X-Chromosom hochreguliert, bindet die RNA an das Chromosom in *cis* und rekrutiert Proteine und Proteinkomplexe, die die Inaktivierung weiterer Gene bewirken (40). Darüber hinaus wird eine mögliche Funktion als Onkogen diskutiert, da eine aberrante Expression in verschiedenen Tumorentitäten gefunden wurde, darunter auch dem Urothelkarzinom (41). Für die lncRNA *ANRIL*, die im INK4/ARF-Lokus auf Chromosom 9p21 lokalisiert ist, wird ebenfalls ein Einfluss auf die Tumorentstehung beim UC postuliert. Ähnlich wie HOTAIR interagiert auch ANRIL mit Histon-modifizierenden Proteinkomplexen. Der INK4/ARF-Lokus ist im UC vor allem durch Deletionen inaktiviert, in anderen Fällen werden aber auch epigenetische Repressionsmechanismen diskutiert, an denen ANRIL über eine Interaktion mit dem *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) beteiligt sein könnte. Tatsächlich ist ANRIL im UC überexprimiert, wobei diese Überexpression vor allem von 3'-trunkierten Isoformen herrührt, die jedoch keine repressive Wirkung auf den INK4/ARF-Lokus vermitteln (42).

Zu ihrer funktionellen Bedeutung in Differenzierungsprozessen und in der Karzinogenese passt, dass lncRNAs auch mit der Entstehung spezifischer molekularer Subtypen in verschiedenen Tumorentitäten in Zusammenhang gebracht worden sind. Beispielsweise wurde ein Cluster von lncRNAs identifiziert, das mit den molekularen Subtypen des Mammakarzinoms korreliert. Zu diesen vermutlich onkogen wirkenden lncRNAs gehört TINCR, der eine prominente Rolle in der epidermalen Differenzierung zukommt (43, 44).

1.3 Epidermale Differenzierung in der Haut im Vergleich zu urothelialer Differenzierung

Wie bereits beschrieben, ist für die Beurteilung der Prognose eines Blasenkarzinoms die histologische und molekulare Klassifizierung von großer Bedeutung. Beides ist eng mit dem Aufbau und den Differenzierungsprozessen innerhalb des Urothels verknüpft. Dabei ähnelt die Struktur des Urothels am ehesten der verschiedenen Plattenepithelien wie der Epidermis in der Haut. Daraus ergibt sich möglicherweise auch die Ähnlichkeit basal-squamöser Urothelkarzinome mit anderen Tumoren plattenepithelialen Ursprungs, insbesondere Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.

Das Urothel ist ein dreischichtiges pseudo-stratifiziertes Epithel. Über der Basalmembran befindet sich eine Schicht aus Basalzellen, die auch molekular durch die Expression basaler Marker wie KRT5, KRT10 und p63 gekennzeichnet ist. Es folgt eine Zwischenschicht, die aus mehreren Lagen besteht. Dem Blasenlumen zugewandt sind die terminal-differenzierten Deckzellen (*umbrella-cells*). Sie sind gekennzeichnet durch die Expression der Cytokeratine KRT18 und KRT20 sowie von Uroplakinen wie UPK2. Insbesondere diese Transmembran-Oberflächenproteine sind essentiell für die charakteristischen Eigenschaften des Urothels: geringe Permeabilität und hohe mechanische Widerstandsfähigkeit. Das Urothel muss sehr dehnbar sein um unterschiedliche Füllstände der Blase zu ermöglichen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Barriere zwischen dem Urin und den inneren Gewebeschichten (45–48). Für diese Barrierefunktion sind auch *Tight junctions* wichtig, die Claudine enthalten. Die verschiedenen Schichten sind über Desmosomen miteinander verbunden. Die Basalschicht ist mit der Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden (49).

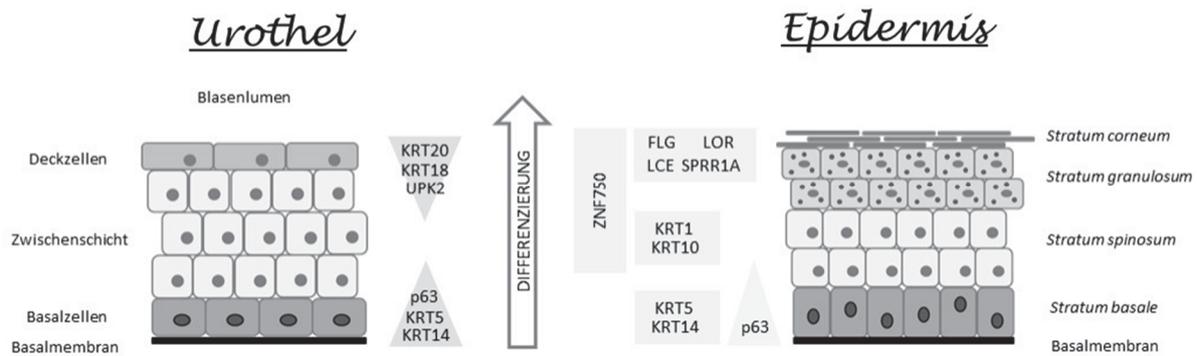


Abb.1.2: Vergleich urotheliale und epidermale Differenzierung.

Die Epidermis der Haut besitzt ebenso an der Basalmembran eine Schicht an Basalzellen (*Stratum basale*), die molekular ebenfalls durch die Expression von KRT5 und KRT10 sowie p63 charakterisiert ist. Der Transkriptionsfaktor ZNF750, der in den höher liegenden Zellschichten die Differenzierung induziert, wird in den Basalzellen nicht exprimiert (50). Diese höher liegenden Zellschichten setzen sich zunächst zusammen aus dem *Stratum spinosum* und dem *Stratum granulosum*, die jeweils mehrere Lagen umfassen. Im *Stratum spinosum* werden neben Involucrin KRT1 und KRT10 exprimiert. Terminal differenzierte Zellen im *Stratum granulosum* exprimieren u. A. Filлагrin, Loricrin, LCE-Proteine (*late cornified envelope*), und SPRR1B. Anders als im Urothel gibt es in der Epidermis eine keratinisierte Schicht aus abgestorbenen Zellen, dem *Stratum corneum*. Dessen Zellen weisen keinen Zellkern und keine Zellorganellen mehr auf (51). Einer der wichtigsten Differenzierungsfaktoren innerhalb der Epidermis ist Calcium, was u. A. aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Die Differenzierungsinduktion durch Calcium führt zur Bildung von Strukturen wie Desmosomen, *adherens junctions* und *tight junctions*, die entscheidend sind für die Barrierefunktion der Haut (52).

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit sind Methoden zur Differenzierung von normalen urothelialen Zellen *in vitro* etabliert worden. Gewonnen werden diese Zellen aus Harnleitern, welche im Laufe von Nephrektomien von Patienten mit Nierenzellkarzinom entnommen werden, sofern es keine Hinweise auf eine maligne Erkrankung der Harnleiter gibt. Die Isolierung und Kultivierung der normalen urothelialen Zellen („UP“s) erfolgt nach einem nach Southgate et al. adaptierten Protokoll (53). Die *in vitro*-Differenzierung dieser Primärzellen kann durch zwei verschiedene Protokolle induziert werden, welche unterschiedliche urotheliale Differenzierungsmuster widerspiegeln. Werden die Zellen mit einem pharmakologischen Aktivator von *Peroxisome Proliferator-*

Activated Receptor gamma (PPAR γ) (1 μ M Troglitazone) und gleichzeitig mit einem Inhibitor für den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (1 μ M PD153035) über einen Zeitraum von etwa einer Woche regelmäßig behandelt, kommt es zu einer urothelialen Differenzierung ohne Stratifizierung, die auf molekularer Ebene besonders über eine Hochregulation der Gene für Uroplakin 2 (*UPK2*) und Zytokeratin 20 (*KRT20*) verfolgt werden kann. Während KRT20 auch für die strukturelle Integrität anderer Epithelien von Bedeutung ist, wird UPK2 speziell in den terminal differenzierten Deckzellen des Urothels exprimiert. Stimuliert man die Differenzierung in den Primärzellen jedoch durch zusätzliche Zugabe von 2 mM Calciumchlorid zum Kulturmedium, das etwa 70 μ M Ca²⁺ enthält, kommt es zu einer gemischten urothelialen Differenzierung, die auch plattenepitheliale Anteile aufweist. Dies zeigt sich phänotypisch durch eine Stratifizierung, d.h. Schichtung der Zellen, und dem Auftreten von ‚Inseln‘ mit deutlich squamös erscheinenden Zellen. Auf molekularer Ebene ist die Hochregulation von UPK2 und KRT20 deutlich schwächer, jedoch wird Zytokeratin 14 (*KRT14*) als Hinweis auf plattenepitheliale Differenzierung hochreguliert (23, 53, 54).

1.3.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich im Vergleich zu squamösen Urothelkarzinomen

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (*Head & Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSC, auch HNSCC) gehören mit ca. 600.000 Neuerkrankungen jährlich zu den häufigsten malignen Erkrankungen im oberen Respirationstrakt. Die Tumore können in der Nase und den Nasennebenhöhlen, der Mundhöhle, im Rachen (Pharynx) und am Kehlkopf (Larynx) auftreten (55). Zu den Therapieoptionen gehören die komplette chirurgische Entfernung der Primärtumore und ihrer Metastasen sowie eine Strahlen- und/oder Chemotherapie oder Immuntherapie mit EGFR-Antikörpern sowie einer Kombination dieser Möglichkeiten. Seit Kurzem ist bei therapierefraktären, metastatischen Tumoren und Rezidiven auch die Immuntherapie mit Checkpointinhibitoren zugelassen (56). Hauptrisikofaktoren sind Tabak- und/oder Alkoholkonsum sowie eine Infektion mit onkogenen humanen Papillomaviren (vor allem HPV16 und HPV18). Tumore, die auf eine HPV-Infektion zurückzuführen sind, haben eine bessere Prognose gegenüber HPV-negativen Tumoren und reagieren besser auf eine kombinierte Radio-Chemotherapie (57). Die HPV-Infektion ist auch der bisher wichtigste prognostische Faktor für HNSC auf molekularer Ebene: Tumore, die auf eine HPV-Infektion zurückzuführen sind, haben eine bessere Prognose gegenüber HPV-negativen Tumoren. Dies ist vermutlich darin

begründet, dass HPV-positive Tumore meist wildtypisch für *TP53* sind und seltener Veränderungen in *CDKN2A* tragen, wogegen HPV-negative Tumore in den meisten Fällen *TP53*-Mutationen aufweisen (58).

Charakteristische molekulare Veränderungen von HNSC sind Kopienzahlveränderungen (*copy number variations, CNA*). Ähnlich wie bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge beinhalten diese häufig Verluste von Chromosom 3p und 8p und Zugewinne von 3q, 5p und 8q. Insbesondere der Zugewinn von Chromosom 8q betrifft Differenzierungs-assoziierte Gene wie *TP63* und *SOX2*, aber auch Onkogene wie *PIK3CA*. Es wurden inaktivierende Mutationen in Genen gefunden, deren Produkte die plattenepitheliale Differenzierung steuern, wie *NOTCH1* und der Transkriptionsfaktor *ZNF750*. Molekulare Veränderungen, die mit Tabakkonsum in Verbindung stehen, betreffen auch die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress, die über *NFE2L2*, auch bekannt als *NRF2*, vermittelt wird (59).

Genomweite Analysen über alle Plattenepithelkarzinom-Entitäten hinweg, die innerhalb des TCGA-Konsortiums untersucht worden sind, haben gezeigt, dass vor allem Zugewinne von Chromosom 3q und 11q22 in allen Entitäten zu finden sind. Dies stellt noch einmal die Bedeutung des Transkriptionsfaktors *TP63* (kodiert auf Chromosom 3q) heraus. Hauptsächlich wird die verkürzte Variante $\Delta Np63$ exprimiert, was vermutlich auch auf eine differentielle Methylierung an der alternativen Transkriptionsstartstelle (TSS) für *TP63* zurückzuführen ist (60). Dieser Zusammenhang wurde zuvor bereits für das Harnblasenkarzinom postuliert (61). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass Blasenkarzinome, die $\Delta Np63$ exprimieren, einen basalen Phänotyp haben, der mit einer schlechteren Prognose einhergeht (62). In der epidermalen Differenzierung ist *TP63* ein zentraler Transkriptionsfaktor, der u. A. den Transkriptionsfaktor *ZNF750* aktiviert. Dieser wiederum reguliert, vermittelt über einen weiteren Transkriptionsfaktor *KLF4*, eine Vielzahl an Genen, die für die terminale Differenzierung entscheidend sind (50, 63). Über die funktionelle Bedeutung von *ZNF750* im Urothel bzw. im Urothelkarzinom ist dagegen bisher nichts bekannt.

1.3.2 Lange nicht-codierende RNAs in epithelialer Differenzierung

In den letzten Jahren haben auch lncRNAs als zusätzliche Regulatoren der epidermalen Differenzierung immer mehr an Aufmerksamkeit gewonnen. Dabei sind vor allem die beiden lncRNAs *Terminal Differentiation-Induced ncRNA* *TINCR* und *Differentiation*

Antagonizing ncRNA DANCR (auch als ANCR bezeichnet) in den Fokus gerückt. TINCR wurde zunächst als eine lncRNA beschrieben, die den Differenzierungsprozess positiv beeinflusst, indem sie im Zytoplasma mit dem sog. *TINCR-Box-Motif* über einen Stufen1-vermittelten Mechanismus an Differenzierungs-assoziierte mRNAs Protein-codierender Gene wie Filaggrin oder Loricrin bindet, wodurch diese mRNAs stabilisiert werden (44). Bereits zuvor wurde die lncRNA DANCR identifiziert, die innerhalb des *Stratum basale* exprimiert wird und einer Differenzierung der Zellen entgegen wirkt, indem die Expression von Differenzierungs-assoziierten Genen unterdrückt wird. Während der Differenzierung wird die Expression von DANCR herunter reguliert (64). Als Mechanismus für die Unterdrückung der Differenzierung durch DANCR wurde für die Osteoblasten-Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) folgendes beschrieben: DANCR bindet an EZH2, wodurch die repressive Trimethylierung von Histon 3 Lysin 27 (H3K27me3) am Promoter von RUNX2, einem Hauptregulator der Osteoblastendifferenzierung, vermittelt wird (65).

In einer Studie aus dem Jahre 2015 konnte der Einfluss von TINCR und DANCR auf die epidermale Differenzierung weiter spezifiziert werden. In dieser Studie werden die Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren MAF und MAFB als weitere zentrale Regulatoren der epidermalen Differenzierung beschrieben. Diese unterbinden zum einen die Expression von Vorläuferzell-Genen (z.B. Zellzyklus-Aktivatoren), zum anderen aktivieren sie die Expression von Differenzierungs-assoziierten Genen, wie den Transkriptionsfaktoren ZNF750 und KLF4. Als vorgeschaltete Regulatoren der MAF:MAFB-Transkriptionsfaktoren konnten neben p63 auch TINCR und DANCR identifiziert werden. TINCR wirkt dabei als Aktivator und DANCR als Repressor über die zuvor beschriebenen molekularen Mechanismen (66).

Insbesondere das Zusammenspiel von ZNF750 und TINCR innerhalb der epidermalen Differenzierung wurde durch weitere Studien belegt. Sun et al. konnten zeigen, dass die Expression von Calmodulin-like protein 5 CALML5 durch ZNF750 induziert wird und dessen mRNA anschließend durch TINCR stabilisiert wird (67). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TINCR selbst durch ZNF750 induziert wird (68).

Für beide lncRNAs wird auch eine Rolle in Tumoren unterschiedlicher Entitäten postuliert, wobei die genaue Funktion Gewebe-abhängig zu sein scheint. So wurde eine

Überexpression von TINCR im Magenkrebs von verschiedenen Gruppen gefunden (69, 70) (71). Dagegen wurde eine verminderte Expression in Lungenkarzinomen und in Kolorektalkarzinomen beschrieben (72, 73). DANCR wurde als Zielgen von MYC in einer Vielzahl von Tumorentitäten als überexprimiert identifiziert; es soll zur Tumorentstehung beitragen, indem es den Zellzyklus-Inhibitor p21 reprimiert (74). Zu den Tumorentitäten, in denen eine erhöhte DANCR-Expression gefunden wurde, zählen ebenfalls Magenkrebs und Osteosarkome (75–77). Die Rolle von DANCR in Brustkrebs ist hingegen in der Literatur noch kontrovers. In Triple-negativen Brustkarzinomen (TNBC) wurde eine erhöhte Expression von DANCR gefunden (78). Laut einer anderen Studie jedoch wird die Expression von DANCR durch TGF β im Brustkrebs herunter reguliert, was zu einer erhöhten Expression von RUNX2 führt, die wiederum zu einer erhöhten Metastasierung beiträgt (79). Eine weitere Publikation berichtete wiederum, dass DANCR im Zusammenhang mit der Metastasierung von Brustkrebs vermittelt über EZH2 herunter reguliert wird (80). Obwohl über die funktionelle Rolle von TINCR und DANCR in der urothelialen Differenzierung bisher nichts bekannt ist, legt die aktuelle Veröffentlichung des TCGA-Konsortiums einen Einfluss beider lncRNAs im Urothelkarzinom nahe, der mit dem Auftreten bestimmter Subtypen assoziiert ist. Im Falle von DANCR geht dies auch mit einer erhöhten Expression in Tumoren gegenüber Normalgewebe einher (26).

1.4 Lange nicht-codierende RNAs als Biomarker im UC und HNSC

Sowohl für das UC als auch für das HNSC werden prognostische und diagnostische Biomarker gesucht, die eine bessere Überwachung des Krankheitsverlaufes ermöglichen. Aufgrund ihrer Gewebe-spezifischen Expression und ihrer häufig veränderten Expression in Tumoren werden lncRNAs als geeignete Biomarker für verschiedene Tumorentitäten propagiert, auch wenn ihre Funktion oftmals noch unzureichend bekannt ist. Insbesondere die genomweiten Expressionsstudien des TCGA-Konsortiums verschiedener Tumorentitäten ermöglichen die Identifizierung von lncRNAs, die als prognostische oder diagnostische Biomarker in Betracht kommen. Nohata et al. konnten so für das orale HNSC feststellen, dass insgesamt 728 lncRNAs differentiell exprimiert sind, davon aber nur 55 mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Die Expression von 140 lncRNAs korrelierte mit dem HPV-Status, 30 lncRNAs waren mit dem Mutationsstatus von TP53 assoziiert (81).

Auch für das UC wurden eine Reihe lncRNAs identifiziert, die in Tumorgeweben gegenüber Normalgewebe differentiell exprimiert sind (82). Dazu gehören *Urothelial Cancer Associated 1* (UCA1) und *Bladder Cancer Associated Transcript 1* (BLACAT1/linc-UBC-1), die zunächst im UC beschrieben wurden. Speziell UCA1 stellt einen vielversprechenden prognostischen Biomarker dar, da die in Urinsedimenten gefundene erhöhte Expression mit *Stage* und *Grade* assoziiert sein soll (83, 84). Ebenso wurde eine erhöhte Expression von linc-UBC1/BLACAT1 mit prognostischer Bedeutung in UC-Gewebeproben gefunden. Erste mechanistische Studien deuten auf eine Interaktion von linc-UBC1/BLACAT1 mit Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) und EZH2 hin, die zu veränderten Histonmodifikationen an Zielgenen führt (85). Weitere lncRNAs, die im UC als überexprimiert gefunden wurden und als mögliche Biomarker fungieren könnten, sind neben den bereits erwähnten lncRNAs HOTAIR und ANRIL MALAT1, TUG1, H19, GAS5, und ncRAN (86–91). Eine lncRNA, die in UC-Gewebe gegenüber Normalgewebe schwächer exprimiert gefunden wurde, ist MEG3. Hierbei ist die Repression auf epigenetische Regulationsmechanismen wie veränderte DNA-Methylierung und Histonmodifikationen zurückzuführen (92).

Es fällt auf, dass alle genannten lncRNAs auch als potentielle Biomarker für andere Tumorentitäten beschrieben wurden (93). Eine pan-Cancer-Analyse von Chen et al. hat beispielsweise ergeben, dass BLACAT1 in acht von zwölf untersuchten Tumorentitäten als nicht-spezifischer diagnostischer Marker in Blutseren dienen könnte um Tumorpatienten von gesunden Menschen zu unterscheiden. Die Auswertung der RNA-Sequenzierungsanalysen des TCGA-Konsortiums ergab jedoch, dass eine erhöhte Expression von BLACAT1 nur in Endometriumkarzinomen (*uterine corpus endometrial carcinoma* UCEC) auch eine prognostische Relevanz hat (94). Wie bereits unter 3.2 beschrieben, hat die Studie des TCGA-Konsortiums von 2017 verdeutlicht, dass die Expression einzelner lncRNAs im UC mit den verschiedenen molekularen Subtypen assoziiert sein kann (26).

Während ihre Gewebe-spezifische Expression, Deregulation in Tumoren und Assoziation mit spezifischen Tumorsubtypen lncRNAs besonders relevant für personalisierte Medizin erscheinen lässt, fällt auf, dass in vielen Studien nur ein kleines Patientenkollektiv untersucht wurde und es bisher an Validierungsstudien in größeren, unabhängigen Kohorten fehlt.

1.5 Zielsetzung

Obwohl bekannt ist, dass lncRNAs häufig Gewebe-spezifisch exprimiert werden, Genregulationsprozesse beeinflussen und eine veränderte Expression zur Tumorentstehung beitragen kann, war zu Beginn dieser Arbeit wenig über ihre funktionelle Bedeutung für das Urothel und in der urothelialen Karzinogenese bekannt (82). Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung hat die Einteilung der Tumore in unterschiedliche molekulare Subtypen einen zunehmend hohen Stellenwert bekommen. Trotz spezifischer Beschreibungen der molekularen Veränderungen ist wenig bekannt, welche Faktoren zur Ausbildung dieser Subtypen beitragen (24). Daraus folgte die Hypothese, dass eine veränderte Expression spezifischer lncRNAs zu einer aberranten urothelialen Differenzierung führen könnte, die zur Entstehung einzelner Subtypen beiträgt. Hierbei wurde der Fokus auf Tumore mit plattenepithelialen Anteilen bzw. Tumore mit einem basal-squamösen (BASQ)-Subtyp gelegt, begründet durch die bekannte schlechte Prognose dieser Tumore (27).

Daraus ergaben sich für diese Arbeit folgende übergeordnete Fragestellungen:

1. Zunächst sollte allgemein auf die Frage eingegangen werden, welchen Nutzen lncRNAs als Biomarker für die Diagnose und Prognose des Urothelkarzinoms haben. Dazu wurde die Expression bereits publizierter potentieller Biomarker-Kandidaten mittels qRT-PCR in einer großen Gewebeserie gemessen und mit klinischen Daten der Patienten korreliert. Die Ergebnisse wurden weiterhin mit den Ergebnissen öffentlich zugänglicher Datensätze verglichen, um eine mögliche Assoziation mit molekularen Subtypen des Urothelkarzinoms zu beleuchten.
2. Im nächsten Schritt sollten lncRNAs identifiziert werden, die spezifisch während der urothelialen Differenzierung verändert exprimiert werden und die auch zu einer aberranten Differenzierung, insbesondere in Richtung squamöser Fehldifferenzierung, beitragen. Diesbezüglich wurden Microarray- und RNA-Sequenzierungsdaten von *in vitro* differenzierten normalen urothelialen Zellen (UPs) im Hinblick auf differentiell exprimierte lncRNAs ausgewertet. Um zu überprüfen, ob die identifizierten lncRNAs tatsächlich eine funktionelle Bedeutung für das Urothelkarzinom haben könnten, wurde ihre Expression in einer kleinen Gewebeserie mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) gemessen. Außerdem wurde die Expression auch in einer Gewebeserie von Patienten mit

Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSC) gemessen. Dieser Vergleich sollte Aufschluss darüber geben, ob bestimmte lncRNAs eine ähnliche funktionelle Bedeutung in HNSC-Tumoren haben wie in urothelialen Tumoren mit basal-squamösem Phänotyp.

3. Die funktionelle Bedeutung einzelner lncRNAs sollte in urothelialen *in vitro*-Differenzierungsmodellen näher untersucht werden. Diese Differenzierungsmodelle wurden zunächst näher molekular charakterisiert, besonders im Hinblick auf die Entwicklung basal-squamöser Eigenschaften. Auf diese Weise wurden geeignete Markergene identifiziert, die eine Differenzierung in eine basale bzw. luminale Richtung charakterisieren. Die Ergebnisse wurden mit dem HaCaT-Modell für epidermale Differenzierung verglichen.
4. In der Literatur wird auf die Bedeutung der lncRNAs TINCR und DANCR in der epidermalen Differenzierung hingewiesen (44, 64). Die lncRNA TINCR wurde in der urothelialen Differenzierung als verändert exprimiert identifiziert (siehe Punkt 2); lncRNA DANCR wurde in der aktuellen Publikation von *The Cancer Genome Association* (TCGA) im UC erhöht exprimiert gefunden (26). Diese beiden lncRNAs wurden für eine nähere funktionelle Charakterisierung in der urothelialen Differenzierung mit besonderem Fokus auf aberrante Differenzierung in Richtung eines basal-squamösen Phänotyps ausgewählt. Hierfür sollte zunächst – ähnlich wie in Fragestellung 1- ihre diagnostische und prognostische Bedeutung durch Expressionsmessung in größeren Gewebeserien und Korrelation mit klinischen Daten ermittelt werden. Durch einen siRNA-vermittelte *Knockdown* beider lncRNAs in UC-Zelllinien und HNSC-Zelllinien sollte ermittelt werden, inwieweit die beiden Gene einen funktionellen Einfluss auf zelluläre Eigenschaften wie Proliferation und Klonogenität haben, aber auch die Expression der identifizierten molekularen Marker (siehe Punkt 3) beeinflussen. Umgekehrt wurden Überexpressionskonstrukte generiert, mit denen stabil transfizierte Urothelkarzinom-Zelllinien etabliert werden konnten. Zudem wurde auch die HBLAK-Zelllinie (prä-neoplastische, spontan-immortalisierte Urothelzelllinie), die für *in-vitro*-Differenzierungsversuche verwendet wurde, mit dem Überexpressionskonstrukt für TINCR stabil transfiziert. Auf diese Weise sollte der direkte Einfluss dieser lncRNA auf die urotheliale Differenzierung bestimmt werden.

Zusammenfassend war die Zielsetzung dieser Arbeit einen Überblick zur Bedeutung von lncRNAs für das Urothelkarzinom zu erlangen, besonders im Kontext aberranter Differenzierung, mit Fokus auf einen basal-squamösen Phänotyp. Durch Expressionsmodulation von lncRNAs mit bekannter Funktion in der epidermalen Differenzierung sollte ein Einblick in deren Einfluss auf die urotheliale Differenzierung gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Urothelkarzinom-Gewebeproben und klinische Daten

2.1.1.1 Gewebeproben aus Düsseldorf

Für die Messung der Expression von lncRNAs wurden 19 Urothelkarzinome und 10 Gewebeproben aus tumorfreien Anteilen von Harnblasen verwendet, die an der Uniklinik Düsseldorf gesammelt wurden. Der Verwendung der Gewebeproben wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf im Ethikvotum 3836 (April 2012) zugestimmt.

2.1.1.2 Gewebeproben aus Essen

Die Expression ausgewählter lncRNAs wurden in einem erweiterten Gewebeprobenset gemessen, das von Dr. rer. nat. Tibor Szarvas und Dr. med. Christian Niedworok aus der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt wurde. Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen hat der Verwendung der Gewebeproben im Ethikvotum 07-3537 zugestimmt. Für die Validierung von lncRNAs als Biomarker im Urothelkarzinom wurde ein Patientenkollektiv von 106 Tumorproben und 10 Normalproben verwendet, dessen klinische Parameter in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 1: Patientenkollektiv Urothelkarzinom UK Essen 1

Parameter		n
Alter	≤ 65	54
	> 65	52
Geschlecht	M	76
	W	30
Tumor-Stage	Ta	13

	T1	13
	T2	17
	T3	44
	T4	19
	Nicht-muskelinvasiv	26
	muskelinvasiv	80
Grade	G1	7
	G2	32
	G3	67
	Low Grade (G1-2)	39
	High Grade (G3)	67
Lymphknoten	N0/Nx/M0/Mx	78
	N+/M+	28
Tabakkonsum	Nein	29
	ja	58
	unbekannt	19

Für die Messung der Expression der lncRNAs TINCR und DANCR sowie des Proliferationsmarker Ki67 wurde ein erweitertes Patientenkollektiv aus 165 Tumorproben und 8 Normalproben verwendet. In die statistische Analyse wurden acht tumorfreie Proben, fünf Proben vom selben Patienten, zwei Proben ohne *follow up*-Daten sowie eine Probe, die sich als Harnblasen-Sarkom herausgestellt hat, nicht einbezogen.

Tabelle 2: Patientenkollektiv Urothelkarzinom UK Essen 2

Parameter		n
Alter	≤ 66	76
	> 66	73
Geschlecht	M	109
	W	40
Tumor-Stage	Ta	45
	T1	25
	T2	19

	T3	40
	T4	20
	Nicht-muskelinvasiv	70
	muskelinvasiv	79
Grade	G1	26
	G2	52
	G3	71
	Low Grade (G1-2)	78
	High Grade (G3)	71
Lymphknoten	N0/Nx/M0/Mx	116
	N+/M+	33
Tabakkonsum	Nein	41
	ja	37
	unbekannt	71

2.1.1.3 Gewebeproben aus Aachen

Weitere RNA aus Gewebeproben mit Fokus auf Harnblasentumoren mit plattenepithelialer Differenzierung wurden von Frau Dr.med Dr.nat.med. Nadine Gaisa aus der Uniklinik der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Dieses Set besteht aus 14 Tumoren, die eine reine plattenepitheliale Histologie aufweisen, 17 Tumoren mit gemischter Histologie, 11 Urothelkarzinomen sowie vier Normalgewebeproben.

2.1.2 Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Es wurden zehn Tumorgewebeproben von Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich und drei normale Schleimhautproben aus Tonsillektomien von Frau PD Dr.med. Kathrin Scheckenbach aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik (Uniklinik Düsseldorf) für die Bestimmung von lncRNA-Expressionen zur Verfügung gestellt. Der Verwendung der Gewebeproben wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (Studiennummer: 4698R, Registrierungs-ID: 2014052545, Juni 2014) zugestimmt.

Die extrahierte RNA hatte in allen Fällen eine RIN (*RNA integrity number*) > 7. Klinische Parameter der Tumorpatienten sind, soweit bekannt, in der folgenden Tabelle aufgeführt. Der HPV-Status wurde durch Nachweis der p16-Expression bestimmt.

Tabelle 3: Tumorgewebeproben Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich

ID	Alter [MM/JJJJ]	Geschlecht	HPV Status	Material/Lokalisation	T	N	M
54/12	05/1945	M	neg	Tumor/Supraglottis	2	0	0
60/12	10/1943	W	neg	Mundhöhle/ Wangenschleimhaut	4	2c	0
16/13	11/1946	M	neg	Larynx (Sarkom)	?	?	?
17/13	09/1951	M	neg	Larynx-K./Supraglottis	4a	2c	0
18/13	06/1928	M	pos	Larynx-Karzinom	1	0	0
24/13	08/1966	W	neg	Oropharynx/S.piriformis	1	0	0
30/13	04/1961	M	neg	Mundhöhlen-K./Gaumen	T	0	0
33/14	02/1944	M	neg	Hypopharynx-K.	T4	0	0
51/14	10/1954	M	neg	Oropharynx-K.	?	?	?
52/14	01/1954	M	neg	Larynx-K.	?	?	?

2.1.2 Zelllinien

2.1.3.1 Urothelkarzinom-Zelllinien

Tabelle 4: Urothelkarzinom-Zelllinien

Name	Geschlecht, [Jahre]	Alter	TNM, Grading	Referenz
BFTC-905	F, 51		Ta, G3	Tzeng et al., 1996 (95)
RT-4	M, 63		T2, G1	Rigby et al., 1970 (96)
RT-112	F		G2	Masters et al., 1986 (97)
SW-1710	F, 84		G3	Kyriazis et al., 1984 (98)
J82	M, 58		TCC	O'Toole et al., 1978 (99)

253J	M, 53	T4, G4	Elliott et al., 1974 (100)
5637	M, 68	G2	Fogh 1978 (101)
639-V	M, 69	G3	Elliott et al., 1976 (102)
647-V	M, 69	G2	Elliott et al., 1976 (102)
HT-1376	F, 58	T2, G3	Rasheed et al., 1977 (103)
T24	F, 81	G3	Bubenik et al., 1973 (104)
UM-UC-3	M	TCC	Grossman et al., 1986 (105)
UM-UC-6	M	TCC	Grossman et al., 1986 (105)
VM-CUB1	M	TCC	Williams et al., 1980 (106)
SCaBER	M, 58	SCC	O'Toole et al., 1976 (107)

Urothel normal

- TERT-NHUC (Chapman et al., 2006) (108)
- HBLAK (Hoffmann et al., 2016) (109)

2.1.3.2 Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Tumorzelllinien für Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich wurden aufgrund der beschriebenen Charakterisierung der Publikation von Hoffmann et al., 2008 ausgewählt (110) und um die HPV-positiven Zelllinien Zelllinien UM-SCC-47 und UM-SCC-104 (111) sowie FaDu (112) ergänzt.

Tabelle 5: Tumorzelllinien Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Name	Lokalisation	TNM	HPV-Status
UD-SCC-2	Hypopharynx	T3N3	+
UM-SCC-47	Zunge		+
UM-SCC-104	Mundhöhle		+
UD-SCC-3	Larynx		-
UD-SCC-6	Oropharynx	T3N0	-
UM-SCC-10A	Larynx	T3N1M0	-
UM-SCC-10B	Metastase von UM-SCC-10A		-

UM-SCC-14A	Mundhöhle	T1N0M0	-
UM-SCC-14B	Metastase von UM-SCC-14A		-
UM-SCC-17A	Larynx	T1N0M0	-
UM-SCC-17B	Metastase von UM-SCC-17A		-
FaDu	Pharynx		-

Plattenepithel normal

- Normale Keratinozyten [NHEK]: Clonetics™ human epidermal keratinocyte cell systems (Lonza)
- HaCaT (113)

2.1.4 Bakterienstämme

One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen)

XL2-Blue MRF' Competent Cells (Agilent Technologies)

2.1.5 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien und Kits

Kits & Assays

RNA Clean & Concentrator™ -5 Kit (ZYMO RESEARCH)

QuantiTect^R SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)

HotStarTag^R DNA Polymerase (QIAGEN)

QuantiTect^R Reverse Transcription Kit (QIAGEN)

QIAshredder (QIAGEN)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

DNA Clean & Concentrator™ -5 Kit (ZYMO RESEARCH)

Monarch^R DNA Gel Extraction Kit (NEB)

ZR Plasmid Miniprep™ -Classic Kit (ZYMO RESEARCH)

Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)

QIAfilter™ Maxi Cartridges (QIAGEN)

Amaxa™ Basic Nucleofector™ Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Lonza)

Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)

XtremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche)

Substanzen

PCR & Gelelektrophorese

Ampuwa Wasser für Injektionszwecke (FRESENIUS KABI)

Rotiphorese 50x TAE Puffer (ROTH)

Ethidiumbromide aqueous solution 1% w/v (Serva)

GeneRuler DNA Ladder Mix 0.5µg/µl (Thermo Scientific)

6x Ladepuffer (Thermo Scientific)

dNTPs [10mM] (Thermo Scientific)

Agarose BioReagent, low EEO (SIGMA)

Medien

DMEM (1X) + GlutaMAX™-I [4.5g/L D-Glucose, Pyruvate] (gibco)

CnT-Prime Epithelial Cell Culture Medium (CELLnTEC)

CnT-Prime 2D Diff (CELLnTEC)

Cryo-Defined Freezing Medium (CELLnTEC)

KGM-Gold Basal Medium (Lonza)

KGM-Gold SingleQuots [Hydrocortisone, Transferrin, Epinephrine,
GA-1000, BPE, rhEGF, Insulin] (Lonza)

PBS (gibco, SIGMA)

FETAL BOVINE SERUM (BIOCHROME)

Trypsin – EDTA Solution (SIGMA)

0.25% Trypsin-EDTA (1X) (gibco)

Trypsin-Inhibitor (Sigma)

HEPES Buffer solution 1M (gibco)

StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent (gibco)

Opti-MEM I (1x) + GlutaMAX™-I (gibco)

Collagen IV from human placenta (SIGMA-ALDRICH)

Difco™ Luria Broth Base, Miller (BD)

Difco™ Luria Agar Base, Miller (BD)

SOB Medium (ROTH)

Antibiotika, Inhibitoren und weitere Substanzen

Ampicilin sodium salt (SIGMA-ALDRICH)

Kanamycin sulphate (SERVA)
Zeocin™ (InvivoGen)
Penicillin/Streptomycin (gibco)
Troglitazone (Cayman Chemical)
PD153035 (Calbiochem)

Puffer

RLN-Puffer

50 mM Tris, pH 8
1 M NaCl
1.5 mM MgCl₂
0.5% v/v Nonidet P40
0.1 M DTT

5x siRNA-Puffer (nach Dharmacon) [100mL]

30 mL RNase freies Wasser
2.24 g KCl
0.72 g HEPES (Säure-frei)
0.02 g MgCl₂ 6H₂O
→ mit 2M KOH auf pH 7.3-7.6 einstellen
→ mit RNase-freiem Wasser auf 100 mL auffüllen

Enzyme

Restriktionsenzyme

EcoRI, XbaI, Acc65I, NotI, KpnI, HindIII (NEB)

T4 DNA Ligase (Thermo Scientific)

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)

FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific)

Sonstige Chemikalien

Glycin (VWR Chemicals)

MTT Formazan (SIGMA)

Giemsa's azur eosin methylene blue solution (Merck)

CERTISTAIN Kristallviolett (MERCK)

Methanol (VWR Chemicals)

Ethanol absolute (VWR Chemicals)

2-Propanol (VWR Chemicals)

QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)
Chloroform (VWR Chemicals)
Dimethylsulfoxid [DMSO] (SIGMA)
2-Mercaptoethanol (SIGMA)
TRIS (C₄H₁₁NO₃) (Merck)
Natriumchlorid (VWR Chemicals)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Merck)
Nonidet P40/ IGEPAL CA-830 (SIGMA)
DL-Dithiothreitol solution [DTT] (SIGMA)
Kaliumchlorid (Merck)
HEPES (Roth)
Kaliumhydroxid Plätzchen (Merck)
Calciumchlorid-Dihydrat (Merck)
Essigsäure (Eisessig) 100% (Merck)

Verbrauchsmaterialien

Zellkultur

Zellkulturflaschen [25 cm², 75 cm²] (greiner bio-one)
Zellkulturplatten CELLSTAR [96-, 24-, 12-, 6-Well] (greiner bio-one)
Stripetten [1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL] (Costar)
Filter Tips, Graduated, Sterile [10 µl, 100 µl, 1000 µl] (greiner bio-one)
Combitips advanced [1 mL, 5 mL, 10 mL] (eppendorf)
Pasteurpipetten aus Glas (Brand)
CryoTube™ Vials [1.0 mL] (Thermo Scientific)
Minisart Syringe Filter 0.2 µM (Sartorius)

Bakterienkultur

PETRI DISH (greiner bio-one)
14 ml PP Tube (greiner bio-one)
Inokulationsnadeln (UltraCruz)
CryoTube™ Vials [1.8 mL] (Thermo Scientific)

qRT-PCR

LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white (Roche)
LightCycler 480 Sealing Foil (Roche)
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems)

LightCycler Capillaries (20µl) (Roche)

Combitips advanced 1.0 mL (eppendorf)

Sonstiges

Falcon/CELLSTAR Tubes [15 mL, 50 mL] (greiner bio-one)

TipOne Graduated Tips [10 µl, 100 µl, 1000 µl] (starlab)

epT.I.P.S. Standard /Bulk 5000 µl (eppendorf)

Safe-Lock Tubes [0.5-2 mL] (eppendorf)

Röhrchen [5 mL, 20 mL] (Sarstedt)

2.1.6 Geräte

PCR

TRIO-Thermoblock (Biometra)

T3 Thermocycler (Biometra)

LightCycler II (Roche)

LightCycler 96 (Roche)

ABI Prism 7500 fast (Applied Biosystems)

Gel-Dokumentationsanlage (INTAS)

Elektrophoresekammern (Biometra, Biorad)

Power-Supply (Biometra)

Mikrowelle (Küppersbusch)

Zentrifugen

Centrifuge 5415 D (eppendorf)

Centrifuge 5418 (eppendorf)

Centrifuge 5415 D (eppendorf)

Centrifuge 5810 (eppendorf)

Allegra 25R Centrifuge (Beckmann Coulter)

Allegra X-30R Centrifuge (Beckmann Coulter)

Allegra 2IR Centrifuge (Beckmann Coulter)

Mikroskope

ECLIPSE TE2000-S (Nikon)

ECLIPSE Ts2 (Nikon)

Brutschränke

Innova4200 INCUBATOR SHAKER (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)

CO₂-AUTO-ZERO (Heraeus)

HERACELL 150i CO₂ Incubator (Thermo Scientific)

Absorptionsmessung

FLUOstar OPTIMA (bmG)

NANODROP 2000 Spectrophotometer (peQlab, Thermo Scientific)

Sterilbänke

GELAIRE BSB 4A (Flow Laboratories)

GELAIRE BSB 4 (Flow Laboratories)

Sonstiges

Thermomixer comfort (eppendorf)

Thermomixer 5436 (eppendorf)

PRESS TO MIX Vortex (LABIN)

IKAMAG RCT (IKA-Labortechnik)

Pipetten (Gilson, eppendorf)

Multipette stream (eppendorf)

Microprocessor pH Meter (WTW)

Schüttelwasserbad 1083 (GFL)

Autoklav 3870 ELV (tuttnauer Systec)

Nucleofector™ 2b Device (Lonza)

2.1.7 Oligonucleotide**Tabelle 6: Primer qRT-PCR Housekeeper**

Name	Sequenz	T _m [°C]	Produktgröße [bp]	AT [°C]	Standard
TBP	F:ACAACAGCCTGCCACCTTA	56.7	120	55	RT-112
	R:GAATAGGCTGTGGGGTCAGT	59.4			
SDHA	F:GCCAGGACCTAGAGTTTGTTC	60.7	115	55	RT-112
	R: CTTTCGCCTTGACTGTTAATGA	59.4			
GAPDH	F: TCTGACTTCAACAGCGACAC	57.5	107	52	J82
	R: CCAAATTCGTTGTCATACCAG	58.0			

Tabelle 7: Primer qRT-PCR lncRNA

Name	Sequenz	Tm [°C]	Produktgröße [bp]	AT [°C]	Standard
UCA1	F: TTTTTCACACCCAAAACAA	52.0	109	55	5637
	R: ATTTTCATGAGAGTAGGCTTGAGGA	59.3			
MALAT1 5'	F: CTTCTGGGTGTGTCCCTGACTG	64	110	55	UM-UC-3
	R: GCCATGGAAAGCGAGTTCAA	57.3			
MALAT1 3'	F: AAAGCAAGGTCTCCCCACAAG	59.8	71	55	J82
	R: GGTCTGTGCTAGATCAAAAGGCA	60.6			
H19	F: CACCAGCTGCCGAAGGCCAA	71.1	122	62	22Rv1
	R: CCAGCCTAAGGGTTCAGGAAGG	65.4			
GAS5	F: CTTGCCTGGACCAGCTTAAT	57.3	122	57	T-24
	R: CAAGCCGACTCTCCATACCT	59.4			
ncRAN long	F: CAGTCAGCCTCAGTTTCCAA	57.3	152	55	T-24
	R: AGGCAGGGCTGTGCTGAT	58.2			
ncRAN short	F: ATGTTAGCTCCCAGCGATGC	59.4	151	55	T-24
	R: CTAAGTGCCTCCAGCGATGC	55.9			
linc-UBC1	F: CCTGCTTGAAACTAATGACC	57.9	152	57	UM-UC-3
	R: AGGCTCAACTTCCCAGACTCA	59.8			
TUG1	F: TTCCTACCACCTTACTACTGACG	60.6	93	55	253J
	R: GGAGGTAAAGGCCACATC	56			
TINCR	F: GAGGCAGAGCCATGACCA	58.2	84	57	J82
	R: GGAGAAGTGCCTTCCAAAAGTG	60.3			
DANCR	F: CTATGTAGCGGGTTTCGG	56.0	100	52	T-24
	R: GCACTTCCGCAGACGTAA	56.0			
LINC01503	F: CTTTCCCTGAGGACCATCT	56.7	97	55	RT-112
	R: GGGCTGGCTCTACAGGAT	58.2			
CASC15	F: GTGTGAATCATGGCAATACAG	55.9	116	52	5637
	R: CTGGAAAGGGAAGGAAGTAA	55.3			
PVT1	F: GGCCAGAAGGAGATTAATAA	53.2	138	52	RT-112
	R: ATGGTTCCACCAGCGTTAT	54.5			
GATA3- AS1	F: ACACCAAAGGCCAGAAAC	53.7	91	50	RT-4

	R: TTGATCGAGCTGGAATGG	53.7			
LINC01116	F: AGCAGCTCCCACCAAAGT	56.0	83	52	T-24
	R: CGAACAGGCAGATTTTCAC	54.5			
HAGLROS	F: CCTGAGCCACAGTGACCTT	58.8	105	55	RT-112
	R: GGTGTATTTCGTCCCTCTCTG	59.4			
NEAT1	F: GGCCATCAGCTTTGAATAAA	53.2	114	52	T-24
	R: ACCGGAGGCTCAATTTAGAA	55.3			

Tabelle 8: Primer qRT-PCR Protein-codierende Gene

Name	Sequenz	Tm [°C]	Produktgröße [bp]	AT [°C]	Standard
Ki67	F: AGTGAAGGAGCAACCGCAGT	62.3	219	57	T-24
	R: ATACACTGCCGTCTTAAGGGAG	59.7			
KRT6A	F: CACTAAAGTGCGTCTGCTAG	52.5	186	50	PreC
	R: TGGGTGCTCAGATGGTATAG	54.6			
KRT6B	F: TGCCATAATTCTGAGAAGAAA	52	104	53	NHEK
	R: GGATGGTTAGCAATTAAGAGAG	57.1			
SCEL	F: ATGAAGAGCACCACTCAGG	56.7	103	53	NHEK
	R: GGGCGTTTCTTTATCCAAC	55.3			
SPRR1B	F: CATTCTGTCTCCCCAAAAA	55.3	172	55	NHEK
	R: ATGGGGGTATAAGGGAGCTG	59.4			
DSC3	F: TTTTTGGTGCAACTAAAGG	50.2	141	53	NHEK
	R: GGCTAGAGTTGTTGGTAGTTTG	58.4			
INV	F: TGCCTGAGCAAGAATGTGAG	60.1	109	55	HaCaT
	R: TGCTCTGGGTTTTCTGCTTT	60.0			
S100A7	F: GAACTTCCCCAACTTCCTTAG	57.9	123	52	UD-SCC-6
	R: AGCAAGGACAGAAACTCAGAA	55.9			
UPK2	F: GACAGCCACTGAGTCCAGCAG	63.7	114	59	5637
	R: AGCACCGTGATGACCACCATG	61.8			
KRT20	F: GAAGTCCTCAGCAGCCAGTT	59.4	126	55	HT1376
	R: GGTCGCGACTACAGTGCATA	59.4			
FOXA1	F: ACAGCTACTACGCAGACACG	59.4	162	53	LnCAP
	R: TGGCATAGGACATGTTGA	51.4			
GATA3	F: ATTAAGCCCAAGCGAAGGCTG	64.8	100	55	T47-D
	R: CATTGGCATTCCTCCTCCAGA	64.8			

ZNF750	F: TAAGCCTCAATGTTGTGAAC	53.8	129	52	RT-112
	R: CTGATTTCTTGGAGAGGTTG	54.9			
KRT14	F: GCGCACCATGCAGAACCTG	61	140	59	HT1376
	R: CCTCCACGCTGCCAATCATC	61.4			

Klonierungsprimer für DANCR

F: CGGAATTCCTCTTTGTCAGCTGGAGTTG

R: GCTCTAGAAGGCCAAGTAAGTTTATTAACC

Annealing-Temperatur: 62°C

cDNA-Template: UD-SCC-11B (Zelllinie)

Tabelle 9: Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz	T _m [°C]
TINCR_Seq1	AGCTGCAAGAGAAGAGGTTGA	57.3
TINCR_Seq2	AAGACCCAAGTCATTCTGCA	55.3
TINCR_Seq3	AGGCTTAAGAAATGGGTGGT	55.3
TINCR_Seq4	TGCAGGACTCAGAGCAT	52.8
TINCR_Seq5	ATTGACAGCCTCACTGCT	53.7

Small interfering RNAs (siRNAs)

Die lyophilisierten Oligos wurden in 1x siRNA-Puffer (nach Dharmacon) mit einer Stockkonzentration von 20 µM gelöst.

- Dharmacon™ ON-TARGETplus™ Control Pool
Non-Targeting Pool
D-001810-10-05
- Dharmacon™ Lincode SMARTpool
Human SNHG13 (DANCR)
R-024130-00
- Dharmacon™ Lincode SMARTpool
Human PLAC2 (TINCR)
R-015725-00

2.1.8 Plasmide

Tabelle 10: Plasmide

Plasmide	Promoter	Insert	Bakterielle Resistenz
pcDNA4/TO	CMV	Kein Insert	Amp
pcDNA4/TO_DANCR	CMV	cDNA DANCR PCR-Produkt	Amp
pcDNA4/TO_TINCR	CMV	cDNA TINCR clone 5216222	Amp
pEGFP-C1	CMV	Kein Insert	Neo/Kan
pEGFP-C1_TINCR	CMV	cDNA TINCR clone 5261222	Neo/Kan

2.1.9 Software

Als Referenz und zur Sequenzanalyse wurden der *UCSC Genome Browser* (genome-euro.ucsc.edu/index.html) sowie die *ensembl*-Datenbank (ensembl.org) mit den jeweils implementierten Funktionen verwendet. Für Primerdesign wurde die *PyroMark Assay Design 2.0* -Software (Qiagen) verwendet. Quantitative Real Time-PCRs wurden mit der *LightCycler® 96 SW1.1*-Software (Roche) sowie der *7500 Software v2.0.5*-Software (Applied Biosystems) ausgewertet.

Die Analyse der TCGA-Daten erfolgte mit Hilfe verschiedener Online-Tools:

- TANRIC-Datenbank zur Auswertung von lncRNA-Expressionen (ibl.mdanderson.org/tanric/_design/basic/index.html) (114)
- cbioportal.org (115)
- Xenabrowser: xena.ucsc.edu
- MORPHEUS: software.broadinstitute.org/morpheus/

Statistische Analysen wurden sowohl mit *IBM SPSS Statistics 21* als auch mit *R (R Studio)* unter Verwendung des Package ‚pROC‘ (116) durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

2.2.1.1 Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien und Plattenepithelkarzinom-Zelllinien

Die Karzinomzelllinien beider untersuchter Tumorentitäten (Urothelkarzinom und Plattenepithelkarzinom aus dem Kopf-Hals-Bereich) wurden in DMEM-Medium mit 10% Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) in Zellkulturflaschen bei 37°C und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden ein- bis zweimal in der Woche bei Erreichen von etwa 90% Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) gewaschen und anschließend mit ausreichend Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt bis zum Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 - 1:20 in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt. Die Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf Kontaminationen mit Bakterien hin untersucht. Kontaminationen durch Mykoplasmen wurde regelmäßig durch PCR mit Mykoplasmen-spezifischen Primern ausgeschlossen. Für die langfristige Lagerung wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen nach Abstoppen der Trypsinierung in 15-ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 200xg (1000 rpm) für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in entsprechender Menge Kryomedium (FCS versetzt mit 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen (1 ml) überführt. Diese wurden zunächst für wenige Stunden bei -20°C, anschließend bei -70°C aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen möglichst schnell aus dem Kryoröhrchen in vorgewärmtes Medium in einem 15-ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde wie zuvor beschrieben zentrifugiert, der Mediumüberstand abgenommen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Kultivierung von HBLAK

Die HBLAK-Zelllinie handelt ist aus einem spontan-immortalisierten Zellklon von normalen Uroepithelzellen humanen Ursprungs hervorgegangen (109). Für die Kultivierung von HBLAK wurden sämtliche Kultivierungsgefäße wie Zellkulturflaschen oder Platten zunächst mit Collagen IV beschichtet. Dazu wurde Collagen IV Lyophilisat in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0.1%-iger Essigsäure, welche zuvor sterilfiltriert wurde, gelöst. Für die Beschichtung wurden die jeweiligen Gefäße für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Collagen IV-Lösung abgenommen und die Oberfläche zum Entfernen der Essigsäure zweimal mit PBS gewaschen. Die Collagen-Lösung wurde wiederverwendet und bei 4°C gelagert. Die HBLAK-Zellen wurden in CnT-Prime-Medium ohne weitere Zusätze kultiviert. Bei Erreichen von etwa 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zum Ablösen bei 37°C in Accutase-Lösung inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in eine 15-ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann für fünf Minuten bei 200xg (1000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 - 1:5 in neue mit Collagen IV beschichtete Zellkulturflaschen überführt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen wie unter 2.1.1.1 beschrieben in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Kryomedium wurde Cryo-Defined-Medium im Verhältnis 1:1 mit CnT-Prime-Medium verwendet.

2.2.1.3 Kultivierung von humanen Keratinozyten

Als benigne Kontrolle für die Plattenepithelkarzinom-Zelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich wurden normale humane epidermale Keratinozyten aus der Haut über die Fa. Lonza bezogen. Die Zellen wurden entsprechend der Herstellerangaben in *KBM-Gold Basal Medium* supplementiert mit *KGM-Gold SingleQuots* (Transferrin, Insulin, GA-1000, BPE, rhEGF, Hydrocortison und Epinephrin) kultiviert. Zum Auftauen wurden die Zellen in dem supplementierten Medium suspendiert, jedoch nicht zentrifugiert. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 µM HEPES-Puffer in PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen unter dem Mikroskop abgerundet erschienen, wurden sie

abgeklopft und in Trypsin-Inhibitor aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 15-ml Greiner-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen erneut mit HEPES/PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 - 1:4 in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurde frisches Medium zuvor für 15 Minuten in der Zellkulturflasche bei 37°C inkubiert. So war es möglich die Zellen etwa viermal zu passagieren. Wie unter 2.2.1.1 beschrieben wurden die Zellen in den ersten beiden Passagen in Kryoröhrchen eingefroren. Es wird jedoch vom Hersteller keine Garantie übernommen, dass es möglich ist, diese nochmals aufzutauen. Als Kryomedium wurde eine Mischung bestehend aus 80% Kultivierungsmedium, 10% DMSO und 10% Hitze-inaktiviertem FCS verwendet.

2.2.1.4 Kultivierung von HaCaT

Die spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Boukamp aus dem Leibniz Institut für Umwelt-medizinische Forschung (IUF) zur Verfügung gestellt (113). Die Zellen wurden ebenso wie die Karzinom-Zelllinien wie unter 2.2.1.1 beschrieben kultiviert, jedoch erst bei Erreichen von vollständiger Konfluenz im Verhältnis 1:10 - 1:20 einmal die Woche passagiert.

2.2.2 MTT-Assay

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden MTT-Assays durchgeführt. Dabei wird die Zellvitalität indirekt gemessen durch die Bestimmung der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen. Diese setzen das leicht gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in das dunkelblaue Formazan um. Die Stärke dieser Blaufärbung kann als Absorption photometrisch quantifiziert werden (Testwellenlänge 550 nm, Referenzwellenlänge 620 nm). Die Zellen wurden im 96-Well-Format zur vierfachen Bestimmung ausgesät, je nach Zelllinie 2000-4000 Zellen/Well in 100 µl Medium. Leere angrenzende Wells wurden mit PBS aufgefüllt um ein Austrocknen im Brutschrank zu verhindern. Pro Messzeitpunkt wurde eine 96-Well-Platte befüllt. Um die Proliferation der Zellen im Zeitverlauf anhand der Zellvitalität zu bestimmen, wurde 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Aussaat in die 96-Well-Platten je 10 µl MTT-Reagenz zum Medium dazugegeben sowie in vier leere Wells als ‚Blank‘. Für die Karzinomzelllinien betrug die Inkubationszeit mit MTT-Reagenz eine Stunde bei 37°C, im Falle der HBLAK-

Zelllinie verlängerte sich diese auf fünf Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden das Medium mit MTT-Reagenz abgeschüttet und der gebildete Farbstoff aus den nun gefärbten Zellen in 50 µl DMSO je Well gelöst. Die Adsorption wurde direkt am Optima-Star-Elisa-Reader gemessen.

2.2.3 Klonogenitäts-Assay und Giemsa-Färbung

Mit dem Klonogenitäts- bzw. *Limited Dilution*-Assay kann die Fähigkeit der Zellen getestet werden aus Einzelzellen Klone bilden zu können. Dazu wurden jeweils 500 Zellen in 2 ml Medium in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Es wurden jeweils Triplikate ausgesät. Nach etwa 10 Tagen (Kolonien mit bloßem Auge erkennbar) wurden die Zellen mit Giemsa-Lösung gefärbt. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus PBS und Methanol im Verhältnis 1:1 inkubiert. Zur vollständigen Fixierung wurden die Zellen anschließend für weitere 10 Minuten in 100% Methanol inkubiert. Für die Färbung wurden die Zellen etwa fünf Minuten lang bei Raumtemperatur mit Giemsa-Lösung inkubiert. Die Giemsa-Lösung wurde abgenommen und wiederverwendet. Anschließend wurden die Wells für etwa eine halbe Stunde mit Wasser bei Raumtemperatur entfärbt. Im Falle der HBLAK-Zelllinie wurde die Inkubationszeit mit Giemsa-Lösung verlängert. Nach Entfärben mit Wasser wurden die Kolonien zudem mit 0.1%iger Kristall-Violett-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur nachgefärbt.

2.2.4 Transfektionen

2.2.4.1 Plasmid-Transfektionen mittels Lipofektion

Die Transfektion von Plasmid-DNA in humane Karzinomzelllinien erfolgte mittels Lipofektion. Dabei wird die DNA an Liposomen gebunden bzw. eingeschlossen und so in die Zellen geschleust. Es wurden 100.000 – 250.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten in je 2 ml Medium ausgesät. Die Transfektion erfolgte nachdem die Zellen adhärent geworden sind bzw. am Folgetag. Als Transfektionsreagenz wurde *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* verwendet. Pro Well wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 3 µl Transfektionsreagenz in einem Volumen von 100 µl OptiMEM-Medium gemischt. Die DNA-Liposomen-Komplexe wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor sie tröpfchenweise zu den Zellen gegeben wurden. Bei transienten Transfektionen

wurden die Zellen im Zeitraum von 24-72 Stunden nach Transfektion geerntet. Die aus der Transfektion resultierende Überexpression wurde mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen.

2.2.4.2 Transfektion von HBLAK mittels Nucleofektion

Es war möglich die HBLAK-Zelllinie mittels Lipofektion wie unter 2.1.4.1 beschrieben transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren; eine anschließende zusätzliche Behandlung mit Antibiotika (in diesem Fall Zeocin) zur Etablierung stabil transfizierter Zelllinien überlebten die Zellen jedoch nicht. Daher wurde für diesen speziellen Fall die Nucleofektion als Transfektionsmethode ausgewählt. Die Methode basiert darauf, dass durch das Anlegen eines elektrischen Feldes für einen sehr kurzen Zeitraum die Zellmembran permeabilisiert wird. Die Nucleofektion erfolgte mit dem Amaxa Nucleofector unter Verwendung des *Amaxa Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts*. Die Zellen wurden wie unter 2.1.1.2 beschrieben abgelöst und pro Transfektionsansatz 1×10^6 Zellen in je ein 15-ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für fünf Minuten bei 200xg wurde der Überstand abgenommen und die Röhrchen über Kopf gestellt um Mediumreste, welche die Nucleofektion stören könnten, bestmöglich zu entfernen. 1 μ g der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden mit 100 μ l der im Kit enthaltenen nach Herstellerangaben supplementierten Basisnucleofektionslösung gemischt. In dieser Transfektionslösung wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und in eine Küvette überführt. Die befüllten Küvetten wurden in das Nucleofektions-Gerät eingespannt und das Programm für humane mesenchymale Stammzellen (MSC) gestartet. Anschließend wurden direkt 500 μ l vorgewärmtes Medium zu den Zellen in die Küvetten dazugegeben und diese für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Mini-Pasteurpipette aus den Küvetten entnommen und in vorgelegtes Medium in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Resuspendierung wurden die Zellen auf Collagen-IV-beschichtete 6-Well-Platten aufgeteilt und weiter kultiviert. Als Transfektionskontrolle wurde jeweils der im Kit enthaltene pmaxGFP-Vektor transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion wurde durch das Beobachten von GFP-Expression unter dem Mikroskop nachgewiesen. 72 Stunden nach Transfektion wurde mit der Antibiotika-Selektion begonnen.

2.2.4.3 siRNA-Transfektion mittels Lipofektion

Durch die Transfektion von spezifischen *small interfering RNAs* (siRNAs) wurde der *Knock-Down* einzelner lncRNAs erreicht. Die Zellen wurden wie unter 2.1.4.1 beschrieben in 6-Well-Platten ausgesät. Die lyophilisierten siRNAs wurden in 1x siRNA-Puffer (nach Dharmacon, siehe 1.4) gelöst um eine Stock-Konzentration von 20 μM zu erhalten. Als Transfektionsreagenz wurde *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent* verwendet. Für die Transfektion wurde die siRNA derart in 250 μl OptiMEM-Medium verdünnt, dass eine Endkonzentration von 10 nM erreicht wird. In einem weiteren Gefäß wurden pro zu transfizierendes Well 5 μl Lipofectamine in 245 μl OptiMEM-Medium verdünnt. Die verdünnte siRNA wurde in das Gefäß mit Transfektionsreagenz überführt und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Zellen mit 1.5 ml Medium pro Well gewechselt. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und diese 24 bis 72 Stunden später geerntet. Der siRNA-vermittelte *Knockdown* wurde mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen.

2.2.4.4 stabile Transfektion durch Antibiotika-Selektion

Um stabil transfizierte Klone zu erhalten wurden Urothelkarzinom-Zelllinien bzw. die HBLAK-Zelllinie zunächst wie zuvor beschrieben mit lncRNA-Überexpressionskonstrukten (in pcDNA4/TO-Vektor) im 6-Well-Format transfiziert. Die Urothelkarzinom-Zelllinien wurden am Folgetag durch Trypsinieren vereinzelt in 10-cm-Schalen weiterkultiviert. Dem Medium wurde am selben Tag, nachdem die Zellen in den Schalen adhärent geworden sind, Zeocin als Selektionsantibiotikum in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Selektion wurde je eine untransfizierte Kontrolle mitgeführt und ebenfalls mit Antibiotikum behandelt. Die HBLAK-Zellen wurden 96 Stunden nach Transfektion direkt im 6-Well mit Zeocin behandelt mit einer Anfangskonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen wurde alle zwei Tage das Medium mit einer aufsteigenden Zeocin-Konzentration erneuert, solange bis alle Zellen in der untransfizierten Kontrolle gestorben waren und resistente Kolonien gut sichtbar waren (bis zu 400 $\mu\text{g/ml}$ bei den Urothelkarzinomzelllinien, bis zu 50 $\mu\text{g/ml}$ bei den HBLAK-Zellen). Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt und die lncRNA-Expression auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR bestimmt.

2.2.5 In vitro Differenzierung

2.2.5.1 In vitro Differenzierung von HBLAK

Wie unter 2.1.1.2 beschrieben wurden die HBLAK-Zellen zunächst mit Hilfe von Accutase gelöst. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in frischem CnT-PR-Medium aufgenommen und auf 6-Well-Platten aufgeteilt (2 ml Medium/Well). Dabei wurde eine T75-Flasche, die zu etwa 90% konfluent ist, auf vier bis fünf Wells aufgeteilt. Bei Erreichen der Konfluenz in den Wells (meist am Folgetag) wurde pro Well der jeweilige Differenzierungsstimulus ins Medium gegeben. Zur Induktion der Differenzierung wurden drei verschiedene Stimuli verwendet. Zum einen wurden die Zellen mit 2 mM Calciumchlorid und Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) in einem Volumen-Anteil im Medium von 5% inkubiert. Alternativ wurden die Zellen mit Calciumchlorid ohne FCS inkubiert. Der dritte Stimulus war die Behandlung der Zellen mit 1 μ M Troglitazone (EGFR-Inhibitor) und 1 μ M PD153035 (PPAR γ -Agonist). Troglitazone und PD153035 wurden in einer Stock-Konzentration von 1 mM in DMSO gelöst aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert und die Differenzierung wie beschrieben stimuliert. Im Zeitraum von 7-12 Tagen wurden die Zellen für weitere Analysen geerntet. Phänotypische Veränderungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten lichtmikroskopisch beobachtet und ggf. photographisch dokumentiert. Im Laufe der Arbeit wurde ein speziell für *in vitro*-Differenzierungen-optimiertes Medium (CnT-PR-2D) von der Firma Cellntec auf den Markt gebracht. Bei Verwendung dieses Medium wurden die Zellen zunächst wie beschrieben in CnT-PR in 6-Well-Platten ausgesät. Am Folgetag bzw. bei einer Konfluenz der Zellen von über 90% wurde das Medium zu CnT-PR-2D gewechselt. Einen weiteren Tag später wurde die Differenzierung der Zellen mit den zuvor beschriebenen Stimuli induziert. Medium und Differenzierungsstimulus wurden alle zwei bis drei Tage erneuert, soweit nicht anders angegeben.

2.2.5.2 In vitro Differenzierung von HaCaT

Für *in vitro* Differenzierungsversuche wurden HaCaT-Zellen wie unter 2.1.1.4 beschrieben passagiert und dabei in 2 ml DMEM-Medium pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Sobald die Zellen in den Wells vollständig konfluent waren, wurden 1.4 mM Calciumchlorid bzw. 1 μ M Troglitazone und 1 μ M PD153035 ins Medium dazugegeben. Das Medium inklusive dem jeweiligen Differenzierungsstimulus wurde alle zwei bis drei

Tage in einem Zeitraum von etwa einer Woche erneuert. Phänotypische Veränderungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten lichtmikroskopisch beobachtet und ggf. photographisch dokumentiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA-Isolation

RNA wurde mit dem *RNeasy-Mini-Kit* nach Herstellerangaben wie folgt isoliert. Aus Zellkulturversuchen mit Karzinomzelllinien wurden die Zellen in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert und anschließend auf *Shredder*-Säulen gegeben. Die Säulen wurden für zwei Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss mit einem gleichen Volumen an 70%-igem Ethanol gemischt. Differenzierungsversuche in HBLAK oder HaCaT wurden in *QIAzol Lysis Reagent* für zehn Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Proben wurden anschließend mit Chloroform im Verhältnis 1:5 versetzt und gut gemischt. Nach drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 15.000xg bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen, im Verhältnis 1:1 mit 70%-igem Ethanol gemischt und auf die *RNeasy-Mini*-Säulen gegeben und die RNA nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA-Konzentration wurde anschließend am Nanodrop bestimmt. Bei zu geringer RNA-Konzentration wurde die RNA mit dem *RNA Clean & Concentrator-Kit* aufkonzentriert und die RNA-Konzentration erneut am Nanodrop bestimmt. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.2.6.2 Fraktionierte RNA-Isolation

Die fraktionierte RNA-Isolation wurde nach dem Protokoll im Handbuch des *RNeasy Mini Kit* (Version 06/2001) wie folgt durchgeführt. Die Zellen wurden aus dem 6-Well mit Trypsin oder Accutase (HBLAK) wie zuvor beschrieben abgelöst und für fünf Minuten bei 200xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal in PBS gewaschen um Trypsin- bzw. Accutase-Reste zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 175 μ l RLN-Puffer aufgenommen, gevortext und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für zwei Minuten bei 4°C und 300xg abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die cytoplasmatische RNA-Fraktion enthält, wurde großzügig abgenommen (ca. 150 μ l) und mit 600 μ l RLT-Puffer, welcher frisch im Verhältnis 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt

wurde, gemischt. Das Gemisch wurde mit 430 µl 100%igem Ethanol vermischt und auf die *RNeasy Mini*-Säule gegeben und die RNA entsprechend der Herstellerangaben weiter aufgereinigt. Das übrige Pellet, welches die Zellkerne enthält, wurde in 100 µl RLN-Puffer resuspendiert, gevortext und für zwei Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 100 µl RLN-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Durch diesen zweiten Waschschrift sollten Rückstände der Cytoplasma-Fraktion entfernt werden. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und in 600 µl RLT-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) aufgenommen und auf eine *QIA Shredder*-Säule gegeben. Nach zwei Minuten Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Durchfluss mit 600 µl 70%-igem Ethanol vermischt und auf die *RNeasy Mini* Säulen gegeben und entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA-Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt.

2.2.6.3 Reverse Transkription

Standardmäßig wurden 1000 ng RNA aus Gesamtzelllysaten aus Zellkulturversuchen in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl mit dem *Quantitect Reverse Transcription Kit* nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Konnte nicht ausreichend RNA isoliert werden, wurden in einzelnen Fällen nur 500 ng RNA aus allen Proben einer Versuchsreihe umgeschrieben. Der im Kit enthaltene DNase-Verdau wurde durchgeführt. Die Inkubationszeit der Reversen Transkriptase betrug 30 Minuten, wie im Kit für lange RNAs beschrieben. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert und 1:10 mit Wasser verdünnt in der qRT-PCR eingesetzt. Das verwendete Kit enthält eine Mischung aus *random*-Primern und Oligo-dT-Primern.

RNA aus Gewebeproben aus Düsseldorf und Aachen wurden wie oben beschrieben umgeschrieben.

2.2.6.4 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Primer-Sequenzen für qRT-PCRs wurden selbst entworfen oder der Literatur entnommen. Alle Sequenzen wurden *in silico* durch BLAST-Analysen auf ihre Spezifität hin untersucht. Die Etablierung neuer Primer-Assays erfolgte durch Testläufe über mehrere Zelllinien hinweg. Es wurde jeweils eine Zelllinie mit einer möglichst robusten Expression des jeweiligen Transkripts als Referenzprobe für eine Standardkurve

ausgewählt. Anhand der Standardkurve wurde u.a. die PCR-Effizienz bestimmt, die im Bereich 1.9-2.1 liegen sollte. Es wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt um auszuschließen, dass mehr als ein Produkt amplifiziert wird und um Primer-Dimere zu erkennen. Für Assays zur Detektion von lncRNA-Transkripten wurden zudem einzelne Amplifikate ausgewählt und auf einem Agarosegel aufgetragen sowie Sanger-sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden wiederum durch BLAST-Analysen auf ihre Richtigkeit überprüft.

Die qRT-PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl mit 1x *QuantiTect SYBR Green* und 10 pmol jeden Primers durchgeführt. Es wurden 1-2 µl cDNA eingesetzt, die zuvor 1:10 in Wasser verdünnt wurden. Das PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen:

15'	95°C	}	40x
20sec	94°C		
20sec	X°C		
30sec	72°C		
Schmelzkurvenanalyse			

Wie zuvor beschrieben wurde die *Annealing*-Temperatur für jedes Primer-Paar individuell bestimmt. Für jeden Lauf wurde eine Standardkurve sowie eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, anhand derer die PCR-Effizienz sowie der durchschnittliche Schmelzpunkt über alle Proben hinweg bestimmt wurde. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Für jede Probe wurde ein Konzentrationswert anhand der Standardkurve errechnet, der in Relation zu dem Wert eines oder mehrerer Referenzgene (*Housekeeper*) gesetzt wurde. Wurde mehr als ein Referenzgen verwendet, wurde das geometrische Mittel aller Konzentrationswerte der verwendeten Referenzgene berechnet.

2.2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurde in 0.7-2.0%-igen Agarosegelen (in 1x TAE-Puffer) entsprechend der erwarteten Größe der DNA-Fragmente durchgeführt. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler DNA Ladder Mix* verwendet. Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Fragmente bei 120 V in 1x TAE-Puffer wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-haltigem Bad gefärbt und anschließend unter UV-Licht fotografiert. Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Gelen wurden die

Fragmente wie zuvor beschrieben aufgetrennt und unter schwachem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit dem Monarch DNA Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.7 Klonierung von lncRNA-Überexpressionskonstrukten

2.2.7.1 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden 1-5 µg Plasmid-DNA bzw. das gesamte aufgereinigte PCR-Produkt aus einer Reaktion in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20-30 µl eingesetzt. Es wurde 1X CutSmart-Puffer verwendet und jeweils 1-2 U der Restriktionsenzyme. Die Restriktionsansätze wurden für eine Stunde bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion entweder durch Erhitzen (individuelle Temperatur für jedes Enzym) inaktiviert oder die Ansätze wurden direkt auf Eis gestellt. Wurde die geschnittene DNA für Ligationen oder andere enzymatische Reaktionen weiterverwendet, erfolgte eine Aufreinigung mit dem *DNA Clean & Concentrator*-Kit nach Herstellerangaben.

2.2.6.2 Plasmid-Dephosphorylierung

Für die Dephosphorylierung von 5'-Überhängen bei linearisierten Plasmiden wurden das aufgereinigte Plasmid nach dem Restriktionsverdau (~2.5 µg) in einem Volumen von 20 µl mit 1X Reaktionspuffer und 1 U alkaliner Phosphatase nach Herstellerangaben gemischt und für 30 Minuten bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA erneut mit dem *DNA Clean & Concentrator*-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.7.2 Ligation

Die Ligation von Insert mit geschnittener Plasmid-DNA wurde in einem molaren Verhältnis von Vektor:Insert von 1:3 durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 50 ng Vektor mit der entsprechend errechneten Insert-Menge vermischt. Es wurde 1 U T4 DNA-Ligase und einfach konzentrierter Ligase-Puffer verwendet. Der Ligationsansatz wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend direkt auf Eis gestellt und in Bakterien transformiert.

2.2.7.3 Bakterientransformation

Für die Transformation von *XL2-Blue Ultracompetent Cells* wurden 25 µl Bakterien mit 0.5 µl β-Mercaptoethanol gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Für die Transformation von *OneShot TOP10 Chemically Competent Cells* wurde je ein Aliquot verwendet. Es wurden je 1 µl Plasmid bzw. bis zu 4 µl Ligationsansatz zu den Bakterien dazugegeben und diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Bakterien für zwei Minuten auf Eis inkubiert und mit 500 µl SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden für eine Stunde bei 37°C und 250rpm Schütteln inkubiert zur Ausbildung der jeweiligen Antibiotika-Resistenz. Es wurden 100-200 µl Bakterien auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7.4 Plasmidisolation

Für Mini-Kulturen wurden Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurden ca. 2 ml der Kultur bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep Classic-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für Maxikulturen wurden zunächst Vorkulturen entweder aus Einzelkolonien oder aus Mini-Kulturen über Tag angelegt (ca. 3 ml LB-Medium inkl. Antibiotikum). Aus diesen Vorkulturen wurde die Hauptkultur angesetzt (200 ml LB-Medium inkl. Antibiotikum) und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 6000xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA aus dem Zellpellet mit Hilfe des *QIAfilter Plasmid Maxi Kits* unter Verwendung der *QIAfilter Cartridge* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Plasmid-Pellet wurde entsprechend der Größe in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Plasmid-Sequenzen wurden mittels Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese sowie Sanger-Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.7.5 Klonierung von DANCR

Für die Klonierung der langen nicht-codierenden RNA DANCR wurde das Transkript mit Hilfe einer *long range PCR* mit cDNA einer Tumorzelllinie als Template amplifiziert (siehe

2.2.4). Die Amplifizierungsprimer enthielten die entsprechenden Überhänge einer *EcoRI*- und einer *XbaI*-Schnittstelle für eine gerichtete Klonierung. Der Zielvektor pcDNA4/TO sowie das aufgereinigte PCR-Produkt wurden mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten. Sowohl Vektor als auch das PCR-Produkt wurden nach dem Restriktionsverdau mit dem *DNA Clean & Concentrator*-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit der T4 DNA Ligase ligiert. Der Ligationsansatz wurde in XL2-Blue-Zellen transformiert. Am Folgetag wurden Einzelkolonien gepickt und Mini-Kulturen angeimpft. Die aufgereinigten Plasmide aus den Mini-Kulturen wurden ebenfalls mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetragen. Von den positiven Klonen wurde einer für eine Maxi-Kultur ausgewählt. Das Plasmid aus dieser Maxikultur wurde durch Sanger-Sequenzierung überprüft und anschließend für Überexpressionsversuche in der Zellkultur eingesetzt.

2.2.7.6 Klonierung von TINCR

Für die Erstellung eines TINCR-Überexpressionskonstruktes wurde der kommerziell erhältliche cDNA-Klon 5261222 (Dharmacon) erworben. Die cDNA liegt im Vektor pBluescriptR vor (5': BamHI, 3': XhoI). Von dem Vektor wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation erstellt, die mit einem *BamHI/XhoI*-Doppelverdau kontrolliert wurde. Zunächst erfolgte eine Umklonierung in pEGFP-C1 in zwei Schritten. Dazu wurden beide Vektoren mit *EcoRI* und *Acc65I* geschnitten. Da die TINCR-Sequenz (insgesamt 3.7 kb) ebenfalls eine *EcoRI*-Schnittstelle hat, entstehen so zwei Fragmente mit einer Länge von 2.4 kb und 1.3 kb. Beide Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und das 2.4 kb große Fragment mit der T4 DNA-Ligase in den linearisierten pEGFP-C1-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in XL2-Blue-Zellen transformiert und diese auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Es wurden mehrere Einzelklone gepickt und Plasmid-DNA aus den Minikulturen isoliert. Die korrekte Ligation wurde durch einen Verdau mit *EcoRI* und *Acc65I* kontrolliert. Ein Klon wurde für eine Plasmid-Maxipräparation ausgewählt. Dieser Vektor wurde erneut mit *EcoRI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Nach einem Aufreinigungsschritt erfolgte die Ligation mit dem 1.3 kb-großen Fragment aus dem ersten Verdau. Der Ligationsansatz wurde wie zuvor in XL2-Blue-Zellen transformiert und Plasmid-DNA aus Mini-Kulturen von Einzelkolonien isoliert. Da in diesem Fall ungerichtet kloniert wurde, erfolgte ein asymmetrischer Verdau der Plasmide mit *NotI* und *Acc65I*. Bei Insertion in richtiger Orientierung ergaben sich Fragmente mit einer Größe von 4.8 kb und 3.5 kb. Ein

Klon mit richtiger Orientierung wurde für eine Plasmid-Maxipräparation ausgewählt. Das nun vollständige TINCR-Insert wurde durch Sanger-Sequenzierung mit mehreren überlappenden Sequenzierungsprimern kontrolliert.

Da es sich bei pEGFP-C1 um ein Fusionskonstrukt mit EGFP handelt, welches in gewissem Maße toxisch für die Zellen ist, wurde die TINCR-Sequenz in pcDNA4/TO umklontiert. Dazu wurde der Vektor mit *KpnI* und *HindIII* geschnitten und das 3.7 kb große Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und in den gleichermaßen linearisierten und aufgereinigten pcDNA4/TO-Vektor ligiert. Nach Transformation in XL2-Blue-Zellen und Ausstreichen auf Ampicillin-haltigen Agarplatten wurden mehrere Einzelkolonien gepickt. Die aus Mini-Kulturen isolierten Plasmide wurden mit *KpnI* und *HindIII* verdaut. Von den korrekten Klonen wurde ein Klon für eine Plasmid-Maxi-Präparation ausgewählt.

2.2.8 *In silico*-Analysen

2.2.8.1 Analyse von lncRNA-Expression und DNA-Methylierung in öffentlichen Datensätzen

Die Expression verschiedener lncRNAs in RNA-Sequenzierungsdaten für das Urothelkarzinom (BLCA) sowie Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich (HNSC), die von *The Cancer Genome Association (TCGA)* erhoben wurden, wurden mit Hilfe der TANRIC-Datenbank sowie der *cbioportal*-Website analysiert. In der TANRIC-Datenbank wurde im „*My lncRNA*“-tool die jeweilige Tumorentität ausgewählt (BLCA: N=19, T= 252; HNSC: N=42, T=426) und die jeweilige lncRNA über den annotierten Namen bzw. die genomische Lokalisation in hg19 für linc-UBC1 (chr1:205404014-205425214) und ncRAN (chr17:74553846-74561430) abgefragt. Die lncRNA-Expressionsdaten wurden als log₂ RPMK (*reads per kilobase per million mapped reads*) entnommen und in R als Boxplots dargestellt. Kaplan-Meier-Kurven wurden direkt aus der TANRIC-Datenbank entnommen. Im *cbioportal* wurde für das UC die *TCGA Provisional*-Studie mit 413 Proben und für das HNSC die *TCGA Provisional*-Studie mit 530 Proben (Stand März 2018) ausgewählt. Als Expressionswerte wurden die *mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)* mit einem Schwellenwert von 2.0 ausgewählt und für den annotierten Gennamen heruntergeladen. Bei der Berechnung der z-Scores werden als Referenz alle Tumore, die diploid für das jeweilige Gen sind, gewählt.

Für die Analyse des DNA-Methylierungsmusters verschiedener lncRNAs wurden zunächst die ENCODE CpG-Methylierungsdaten im UCSC Genome Browser (hg19) betrachtet. Diese basieren auf einer *Methyl 450K Bead Array*-Analyse verschiedener Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben (GM12787, H1-4ESC, K562, HeLa-S3, HepG2, HUVEC). Der Grad der Methylierung ist dabei durch eine Farbcodierung für die einzelnen CpG-Stellen innerhalb einer CpG-Insel angegeben. In diesem ersten Screen konnten lncRNAs identifiziert werden, die möglicherweise differentiell methyliert sind. Für diese lncRNAs sollte der Grad an Methylierung zwischen Tumor- und Normalgewebe in Patientendaten ermittelt werden. Dazu wurden die Methylierungsdaten der *Methyl 450K Bead-Array*-Analyse der TCGA-Kohorte für das Harnblasenkarzinom (BLCA) über den UCSC-Xena-Browser abgerufen. Innerhalb des Xena-Browsers wird der Grad der Methylierung für einzelne CpG-Stellen angezeigt. Für einige Gene waren diese bereits hinterlegt; für die übrigen Gene wurden diese anhand der genomischen Lokalisation dem UCSC Genome Browser (hg19) entnommen. Der Grad an Methylierung über alle Gewebeproben hinweg wurde tabellarisch als Median angegeben. Als differentiell methyliert wurde eine lncRNA bei $p \leq 0.05$ (*Wilcoxon-Rank-Sum-Test* in R) gewertet.

2.2.8.2 Analyse von Microarray- und RNA-Sequenzierungsanalysen

Bei der Auswertung der Microarray-Ergebnisse wurde für jedes Paar RNAs und jeden Identifier die Differenz zwischen Proben aus differenzierten und undifferenzierten Zellen gebildet. Für alle Paare, die in dieselbe Richtung verändert sind, wurde das arithmetische Mittel aller drei Paare angegeben.

Bei der Auswertung der RNA-Sequenzierungsanalyse wurden die Expressionswerte der einzelnen Gene als *Counts per million mapped reads* (CPM) bestimmt. Daraus berechnet sich der Logarithmus des *fold change* (logFC) als Quotient aus CPM-Wert der differenzierten Probe und CPM-Wert der undifferenzierten CPM-Probe, der widerspiegelt wie stark ein Gen differentiell exprimiert ist. Ein Gen wurde dann als statistisch signifikant differentiell exprimiert identifiziert, wenn die *false discovery rate* (FDR) nach Bonferroni-Korrektur < 0.05 war.

2.2.8.3 Statistik

Als nichtparametrischer Test zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der *Mann-Whitney-U-Test* in SPSS bzw. der *Wilcoxon-Rank-Sum-Test* in R durchgeführt. Zur Auswertung des

Gesamtüberlebens bzw. des Krankheits-spezifischen Überlebens wurde eine univariate Cox-Analyse sowie eine Kaplan-Meier log rank-Analyse durchgeführt. Lag in der univariaten Analyse ein p-Wert ≤ 0.05 vor, wurde eine multivariate Analyse mit Hilfe des *Cox proportional hazards regression model* durchgeführt. Die Berechnung für die lncRNA-Expression des Gewebesets aus Essen wurde von Dr. Tibor Szarvas durchgeführt. In allen Analysen wurde ein p-Wert ≤ 0.05 als statistisch signifikant gewertet.

ROC-Kurven-Analysen, Berechnung der *Area under the Curve* (AUC) sowie dem *best cut-off* wurden mit R unter Verwendung des pROC-package durchgeführt.

2.2.8.4 Hierarchische Clusteranalyse

Hierarchische Clusteranalysen öffentlich zugänglicher Datensätze wurden mit Hilfe des *Morpheus*-Online-Tools (bereit gestellt vom Broad Institute) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Ergebnisse der RNA-Sequenzierungsanalysen der TCGA-Daten für das Urothelkarzinom und für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome über die *cbioportal*-Website heruntergeladen. Für die zu analysierenden Gene wurden die Expressionsdaten ausgewählt und in das *Morpheus*-Online-Tool hochgeladen. Die hierarchische Clusteranalyse wurde als „One minus pearson correlation“ mit „Average“ als Linkage-Methode durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Literaturrecherche zur Identifizierung von lncRNAs als Biomarker-Kandidaten im UC

Für eine Reihe von lncRNAs sind in der Literatur Expressionsveränderungen in Urothelkarzinomen beschrieben, die von diagnostischer und prognostischer Bedeutung sein könnten (vgl. Einleitung). Da in einigen Studien nur eine kleine Anzahl an Gewebeproben untersucht wurde und es bisher wenig Validierungsstudien gibt, sollte die Expression dieser potentiellen Biomarker für das UC in einer größeren Serie von Tumorgewebeproben und Normalgewebeproben mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) bestimmt werden. Darüber hinaus wurden die Expressionsveränderungen mit RNA-Seq Daten der *The Cancer Genome Association* (TCGA) verglichen. Für diese Analysen wurden sieben lncRNAs ausgesucht, nämlich UCA1, MALAT1, H19, GAS5, TUG1, ncRAN (SNHG16), und linc-UBC1 (BLACAT1) (84, 85, 87–91). Expressionsveränderungen in Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe wurden für UCA1 und linc-UBC1 zuerst im Urothelkarzinom beschrieben, die übrigen der genannten lncRNAs sind laut der Literatur auch in weiteren Tumorentitäten überexprimiert.

3.2 Expressionsbestimmung in Tumor- und Normalgewebe mittels quantitativer PCR im Vergleich zu TCGA-Daten

Für die Etablierung der qRT-PCR-Assays zur Expressionsbestimmung wurden Primersequenzen entweder selbst entworfen oder der vorhandenen Literatur entnommen. Die Sequenzen wurden *in silico* durch eine BLAST-Analyse auf ihre Spezifität überprüft. Die Spezifität des PCR-Produktes wurde durch Schmelzpunktanalyse, Gelelektrophorese und Sequenzierung bestätigt. In einigen Fällen war es nicht möglich Intron-überspannende Primer zu verwenden (u. A. für MALAT1). Um eine Kontamination der PCR durch genomische DNA auszuschließen und den DNase-Verdau im Zuge der Reversen Transkription zu überprüfen, wurden in diesen Fällen einige RNA-Proben ohne Zugabe von Enzym revers transkribiert. In diesen Fällen konnte in der anschließenden qRT-PCR keine Expression nachgewiesen werden, sodass eine Kontamination durch genomische DNA ausgeschlossen werden kann (s. Abb.3.1). Wie von Vandesompele et al. vorgeschlagen, wurden zwei Referenzgene, *SDHA* und *TBP*, zur Normalisierung der

Expressionswerte gemessen (117). Diese sind die am stabilsten exprimierten Referenzgene im Urothelkarzinom (118). Aus den Expressionswerten der beiden Referenzgene, die jeweils anhand der Standardkurve bestimmt wurden, wurde das geometrische Mittel berechnet. Dieser als Normalisierungsfaktor bezeichnete Wert wurde dann zur Berechnung der relativen lncRNA-Expression verwendet

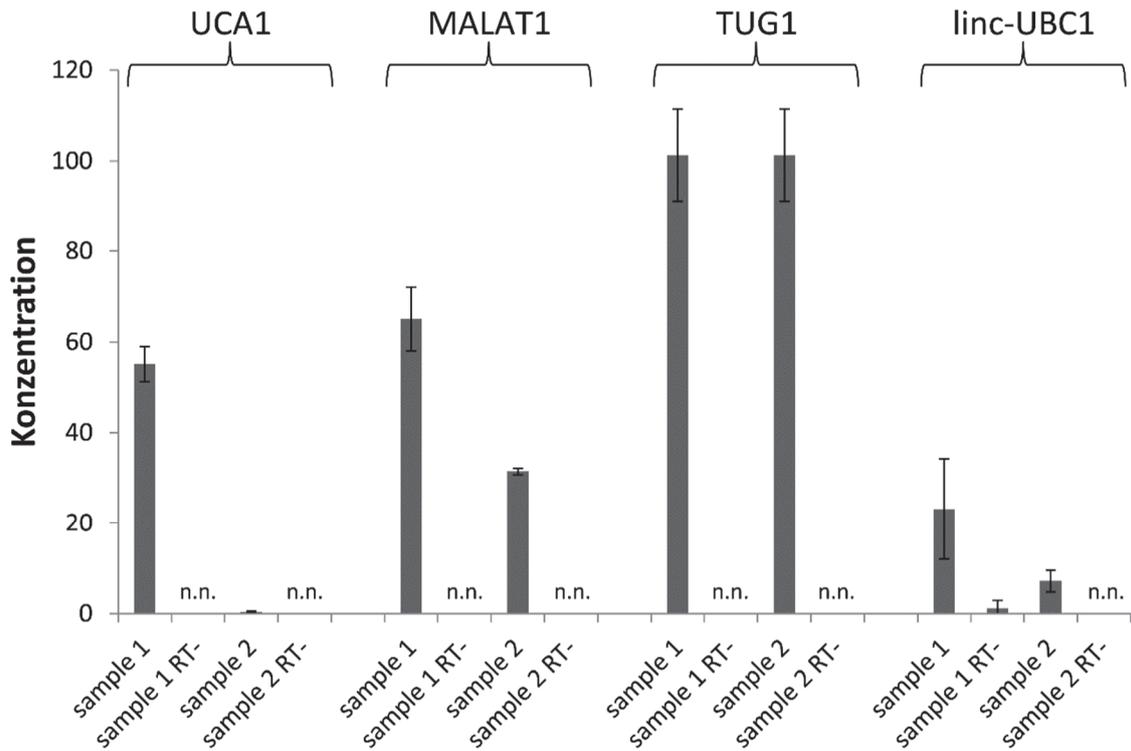


Abb.3.1: Ausschluss der Kontamination der qRT-PCR-Analysen durch genomische DNA. Für nicht-Intron-spannende Primerpaare war die lncRNA-Expression in RNA-Extrakten, die ohne Zugabe von Enzym revers transkribiert wurden (RT-), nicht detektierbar (n.n.=nicht nachweisbar).

Bei den verwendeten RNAs aus der Gewebeserie (im Weiteren auch als „Set 1“ bezeichnet) handelt es sich um 106 Tumorproben und 10 benigne Kontrollen, die überwiegend aus Zystektomien stammen (vgl. auch 2.1.1.2). Für die Tumorproben wurde nur Gewebe verwendet mit einem Tumoranteil von mindestens 70%, wie exemplarisch an H&E-Färbungen von Gewebeschnitten in Abbildung 2.2 dargestellt ist. Zudem wurde mittels qRT-PCR die Expression des Proliferationsmarkers MKI67 bestimmt, dessen

Expression erwartungsgemäß in den Tumorproben gegenüber den benignen Geweben signifikant erhöht war (Abb.3.2).

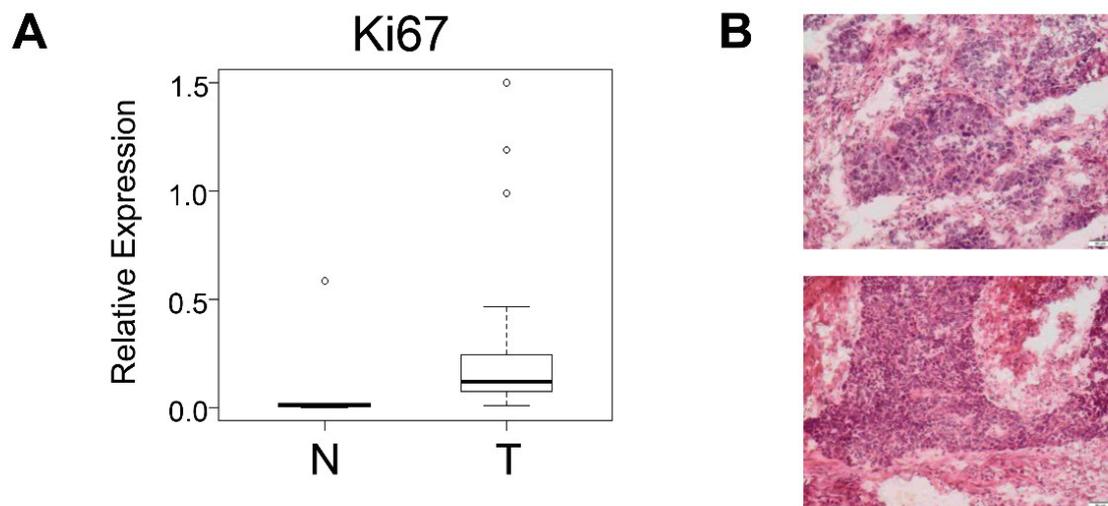


Abb.3.2: Charakteristika der Gewebeserie für die qRT-PCR-Analyse. **A** Relative mRNA-Expression des Proliferationsmarkers MKI67 in 106 Tumorproben (T) und 10 benignen Gewebeproben (N). **B** Beispielhafte Darstellung von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Tumorgewebeproben. Für die Studie wurden Proben ausgewählt, die einen Tumoranteil von über 70% hatten.

Die Expressionsdaten der lncRNAs sind als Boxplots für Normal- und Tumorgewebe zusammengefasst unter Gewebeset 1 in Abbildung 3.3 dargestellt. Mit Ausnahme von MALAT1 und H19 war in allen Fällen die lncRNA-Expression in den Tumoren gegenüber den benignen Kontrollen erhöht, jedoch sind die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in keinem Fall signifikant. Im Falle von MALAT1 und H19 war die Expression in den Tumoren gegenüber den Normalgeweben entgegen der Beschreibung in der Literatur (87, 89) vermindert.

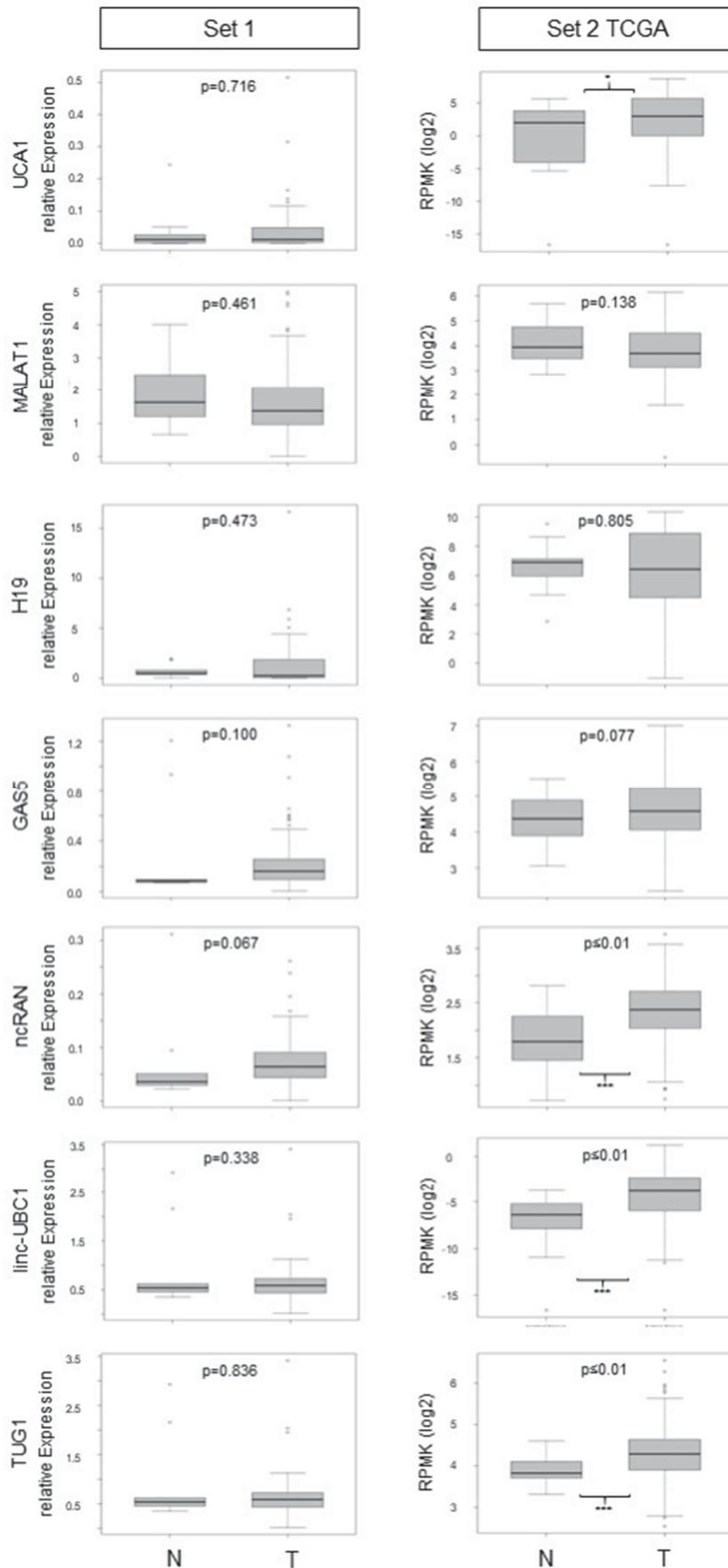


Abb.3.3: lncRNA-Expression im Urothelkarzinom
 Die Expression der lncRNAs UCA1, MALAT1, H19, GAS5, ncRAN, linc-UBC1 und TUG1 wurde mittels qRT-PCR in 106 Tumorgewebeprobe (T) und 10 Normalgeweben (N, Set 1) bestimmt. Als Vergleich ist die Expression in den TCGA-Daten aus RNA-Seq-Messungen bestehend aus 252 Tumorproben (T) und 19 Normalproben (N) dargestellt (Set 2).

Als weitere Referenzkohorte wurde die Expression der lncRNAs in RNA-Seq-Daten der TCGA für die Urothelkarzinom-Kohorte (BLCA) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 als „Set 2“ ebenfalls als Boxplots dargestellt. Diese Kohorte setzt sich aus 252 Tumorproben und 19 Normalgewebeproben zusammen. Die Expressionsdaten aus den RNA-Sequenzierungsanalysen wurden der TANRIC-Datenbank wie unter Kapitel 2.2.8.1 beschrieben entnommen, wobei die Expression jeweils als RPKM-Werte (*reads per kilobase per million mapped reads*) angegeben werden. Für alle analysierten lncRNAs konnten die in Set 1 beobachteten Expressionsveränderungen zwischen Tumor- und Normalgeweben in der Tendenz bestätigt werden. Bei den lncRNAs ncRAN, linc-UBC1 und TUG1 war die erhöhte lncRNA-Expression statistisch signifikant mit einem p-Wert von $p \leq 0.01$; im Falle von UCA1 mit einem p-Wert ≤ 0.05 . Die auch in diesem Set verminderte Expression von MALAT1 und H19 in den Tumor- gegenüber den Normalproben ist nicht statistisch signifikant. Für alle analysierten lncRNAs sind die medianen Expressionsveränderungen nur gering, insbesondere bei UCA1 (1.5-fach Erhöhung der Expression). Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Expressionsunterschiede auf eine erhöhte Expression in bestimmten Tumorgruppen, v.a. nicht-muskelinvasiven bzw. muskelinvasiven Tumoren, zurückzuführen sind, wurden die Expressionen auch in diesen Gruppen als Boxplots in beiden Kohorten dargestellt. Im Vergleich von nichtmuskelinvasiven und muskelinvasiven Tumoren wies lediglich MALAT1 in Gewebeset 1 eine erhöhte Expression auf. Dieser Befund bestätigt sich in Gewebeset 2 jedoch nicht (s.Abb.3.4).

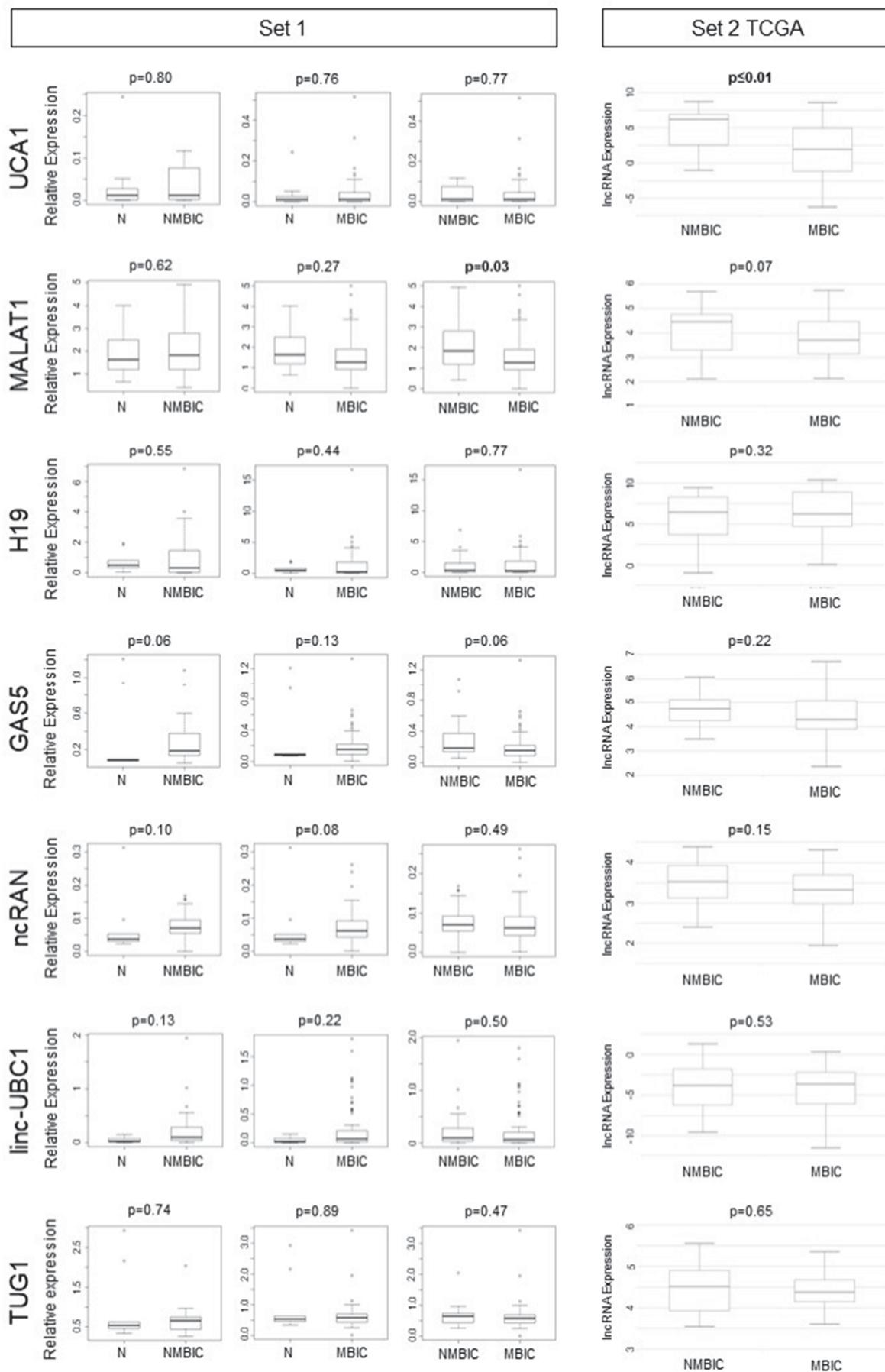


Abb.3.4: lncRNA-Expression in nicht-muskelinvasivem (NMBIC) und muskelinvasivem Urothelkarzinom (MIBC). Die Expression der lncRNAs UCA1, MALAT1, H19, GAS5, ncRAN, linc-UBC1 und TUG1 ist als Boxplots zwischen NMBIC und MBIC in Set 1, bestimmt mittels qRT-PCR, und Set 2, bestimmt mittels RNA-Seq, dargestellt.

Zusätzlich wurde die lncRNA-Expression in einem Panel aus 12 UC-Zelllinien sowie TERT-NHUC als benigner Kontrolle bestimmt. Die Hauptisoform von MALAT1 enthält keine intronischen Sequenzen, es sind jedoch weitere Isoformen in der ensembl-Datenbank annotiert, die sich vor allem im 5'- und 3'-Bereich unterscheiden. Daher wurden für MALAT1 zunächst zwei Primerpaare ausgewählt, mit denen Isoformen im 5'-Bereich sowie im 3'-Bereich des Gens amplifiziert werden können. Die Expressionsmessungen mit diesen beiden Primerpaaren in den Zelllinien ergab, dass die Expressionen der unterschiedlichen Isoformen miteinander korreliert (s. Abb.3.5). Daher wurde für die Messung in der Gewebeserie das Primerpaar, welches den 3'-Bereich des Gens erfasst, ausgewählt; dieses wurde auch in den grundlegenden Arbeiten der AG Diederichs verwendet (119).

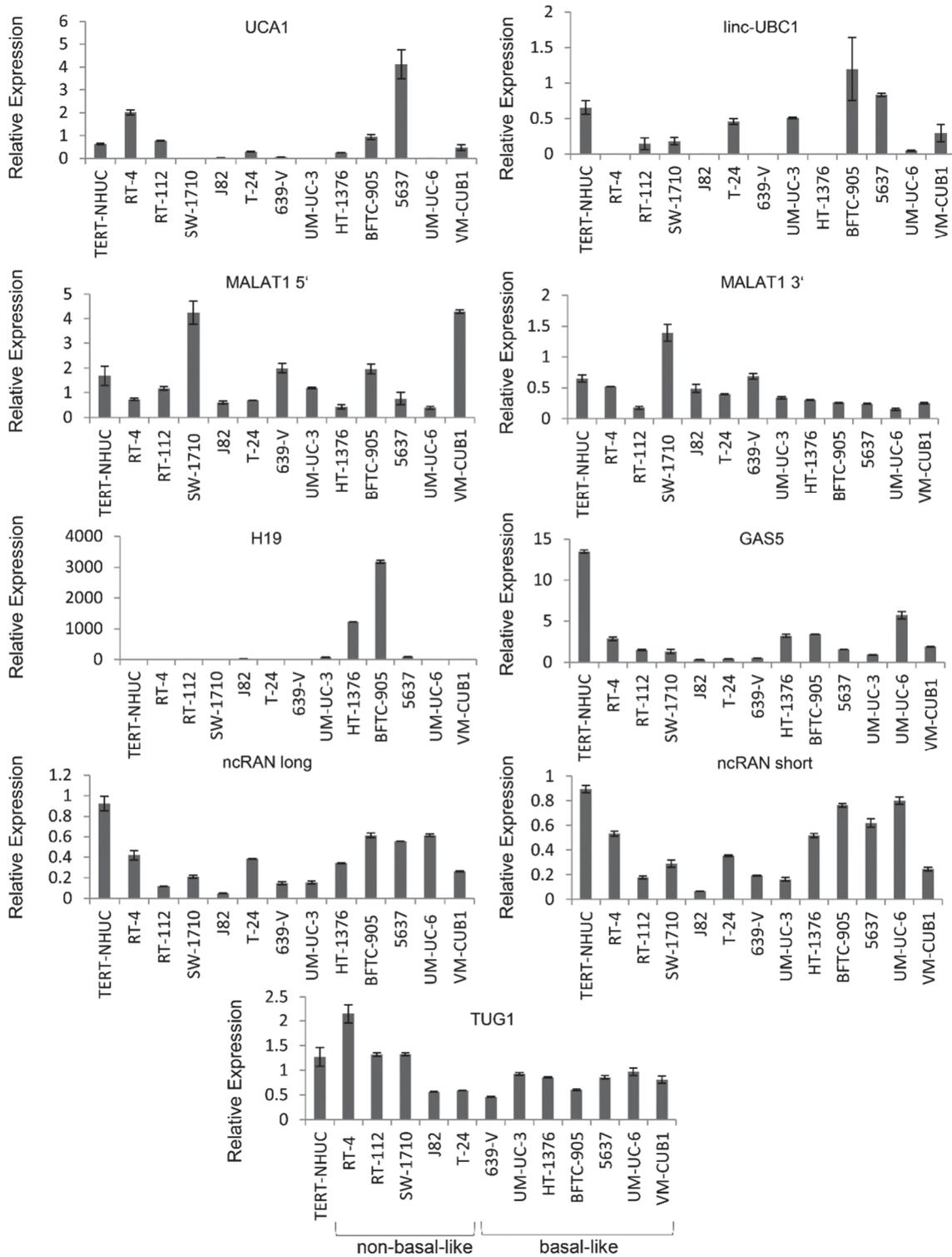


Abb.3.5: lncRNA-Expression in Urothelkarzinomzelllinien. Die Expression der sieben lncRNAs wurde in einem Panel aus zwölf Urothelkarzinomzelllinien, die sich in non-basal-like und basal-like (s. unterste Grafik) einteilen lassen, sowie TERT-NHUC als benigne Kontrollzelllinie. Für MALAT1 wurde die Expression mit zwei Primerpaaren bestimmt, welche Isoformen sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich des Gens abdecken.

3.3 Korrelation der lncRNA-Expression mit klinischen Parametern

Die Expressionswerte für die einzelnen lncRNAs in den Tumorproben wurden mit klinischen Parametern der Patienten in Set 1 korreliert und soweit möglich mit Set 2 (TCGA) verglichen. Cox-Regressionsanalysen in der univariaten Analyse in Set 1 zeigen ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher UCA1-Expression (HR: 0.56, CI: 0.367-0.876, vgl. Tabelle 12). Dies bestätigte sich in den Kaplan-Meier-Analysen sowie der multivariaten Analyse. In Set 2, für welche eine Kaplan-Meier-Analyse aus der TANRIC-Datenbank abgerufen wurde, bestätigt sich dieser Zusammenhang nicht.

Ähnliche Zusammenhänge konnten für MALAT1 und TUG1 gefunden werden. Eine hohe Expression von MALAT1, dessen Expression in den Tumorgeweben gegenüber Normalgewebe nicht verändert ist, geht laut univariater Analyse einher mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben in univariater und multivariater Analyse in Set 1. Dieser Befund lässt sich anhand der Kaplan-Meier-Analysen in beiden Gewebesets jedoch nicht bestätigen.

Auffällig ist, dass eine erhöhte TUG1-Expression sowohl laut univariater als auch multivariater Analyse in Set 1 mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert ist. Dies ist der einzige Befund, der sich auch in den Kaplan-Meier-Analysen in beiden Sets bestätigen lässt, wie in Abb. 3.6 dargestellt. Dies bedeutet, dass es eine Untergruppe an Patienten mit niedriger TUG1-Expression gibt, die eine schlechtere Prognose haben, obwohl TUG1 über alle Tumore hinweg eher erhöht exprimiert ist.

Tabelle 11: Assoziation der lncRNA-Expression mit klinischen und histopathologischen Parametern in Gewebet 1

Variablen	UCA1 *100		UBC1 *100		TUG1 *10		ncRAN *100		MALAT1 *10		H19 *10		GASS *10		
	n	Median (range)	p	Median (range)	p	Median (range)	p	Median (range)	p	Median (range)	p	Median (range)	p	Median (range)	p
Alter															
≤ 65	54	1.04 (0.00 - 51.55)	0.184	7.58 (0.00 - 111.83)	0.937	5.88 (0.19 - 19.52)	0.752	5.80 (0.14 - 26.16)	0.072	16.53 (0.06 - 49.94)	0.300	3.74 (0.03 - 68.49)	0.582	1.53 (0.22 - 13.27)	0.383
> 65	52	1.43 (0.02 - 31.48)		6.07 (0.00 - 3361.76)		5.88 (2.67 - 34.14)		7.70 (0.55 - 23.92)		12.93 (4.14 - 45.59)		2.10 (0.06 - 166.48)		1.79 (0.05 - 10.79)	
Geschlecht															
männlich	76	1.50 (0.00-31.48)	0.337	7.83 (0.00-194.30)	0.257	6.06 (2.58-20.41)	0.326	6.53 (0.55-26.16)	0.736	13.99 (4.54-49.94)	0.088	3.59 (0.03-68.49)	0.068	1.66 (0.22-10.79)	0.643
wiblich	30	0.41 (0.01-51.55)		5.74 (0.00-3361.76)		5.00 (0.19-34.14)		5.96 (0.14-14.77)		11.39 (0.06-36.73)		0.81 (0.06-166.48)		1.54 (0.05-13.27)	
Stage															
Ta	13	1.57 (0.00-9.58)	0.801	18.48 (0.00-194.30)	0.479	6.51 (2.67-8.90)	0.243	6.39 (0.78-14.43)	0.186	18.95 (7.03-49.25)	0.579	7.97 (0.16-68.49)	0.139	1.75 (0.55 - 9.13)	0.545
T1	13	1.15 (0.04-11.61)	0.902	6.88 (0.84-101.54)	0.229	7.11 (3.73-20.41)	0.341	7.07 (3.12-16.79)	0.059	16.77 (4.14-38.91)	0.742	0.92 (0.13-35.62)	0.805	1.86 (0.65 - 10.79)	0.113
T2	17	1.25 (0.04-16.52)	0.949	15.31 (1.22-180.38)	0.004	5.81 (2.82-11.25)	0.688	4.38 (1.32-15.30)	0.104	16.81 (6.97-33.65)	0.143	1.85 (0.03-29.44)	0.077	1.65 (0.32-6.05)	0.652
T3	44	1.57 (0.02-51.55)	0.077	4.31 (0.00-111.83)	0.193	5.58 (2.58-9.20)	0.237	6.35 (0.55-26.16)	0.611	11.84 (3.37-45.70)	0.323	4.54 (0.06-166.48)	0.214	1.44 (0.46-4.93)	0.309
T4	19	0.28 (0.01-12.84)		8.45 (0.05-3361.71)		5.85 (0.19-34.14)		5.33 (0.14-23.92)		13.68 (0.06-49.94)		1.31 (0.10-58.70)		2.15 (0.05-13.27)	
Nicht-inasiv	26	1.36 (0.00-11.61)	0.552	9.27 (0.00-194.30)	0.331	6.58 (2.67-20.41)	0.419	6.92 (0.78-16.79)	0.318	17.55 (4.14-49.25)	0.050	4.33 (0.13-68.49)	1.000	1.85 (0.55-10.79)	0.052
invasiv	80	1.19 (0.01-51.55)		6.33 (0.00-3361.76)		5.78 (0.19-34.14)		6.16 (0.14-26.16)		12.65 (0.06-49.94)		2.57 (0.03-166.48)		1.51 (0.05-13.27)	
Grade															
G1	7	2.37 (0.01-9.58)	0.707	9.49 (1.62-55.40)	0.530	6.84 (2.81-8.90)	0.680	6.93 (0.78-15.88)	0.872	16.84 (7.03-46.59)	0.680	8.41 (0.16-68.49)	0.484	2.78 (0.68-3.89)	0.872
G2	32	1.48 (0.00 - 11.61)	0.600	14.93 (0.00-194.30)	0.002	6.35 (2.67-11.25)	0.098	7.42 (1.32-23.92)	0.125	14.49 (4.14-49.25)	0.887	2.21 (0.03-58.70)	0.708	1.74 (0.32-9.13)	0.540
G3	67	1.12 (0.01-51.55)		3.72 (0.00-3361.76)		5.52 (0.19-34.14)		5.93 (0.14-26.16)		13.58 (0.06-49.94)		2.58 (0.06-166.48)		1.55 (0.05-13.27)	
Low-grade (G 1-2)	39	1.57 (0.00-11.61)	0.489	14.55 (0.00-194.30)	0.001	6.51 (2.67-11.25)	0.065	7.07 (0.78-23.92)	0.150	15.04 (4.14-49.25)	0.736	3.13 (0.03-68.49)	0.930	1.75 (0.32-9.13)	0.441
High-grade (G 3)	67	1.12 (0.01-51.55)		3.72 (0.00-3361.76)		5.52 (0.19-34.14)		5.93 (0.14-26.16)		13.58 (0.06-49.94)		2.58 (0.06-166.48)		1.55 (0.05-13.27)	
Lymphknoten															
N0/Nx/M0/Mx	78	1.47 (0.00-51.55)	0.576	7.66 (0.00-2261.8)	0.717	5.78 (2.67-34.14)	0.562	6.64 (0.78-19.58)	0.552	14.28 (4.14-49.94)	0.971	2.51 (0.03-166.44)	0.903	1.57 (0.05-10.79)	0.333
N + / M+	28	1.03 (0.01-16.52)		5.09 (0.00-111.83)		6.14 (0.19-10.04)		5.70 (0.14-26.16)		13.38 (0.06-45.70)		3.22 (0.06-58.70)		1.75 (0.33-13.27)	
Raucher															
nein	29	1.60 (0.01-51.55)	0.511	6.87 (0.24-194.30)	0.257	6.56 (0.19-20.41)	0.214	8.48 (0.14-23.92)	0.238	12.69 (0.06-45.70)	0.589	2.35 (0.06-58.70)	0.292	2.03 (0.46-13.27)	0.130
ja	58	0.90 (0.00-31.48)		5.63 (0.00-111.83)		5.82 (2.58-9.66)		6.95 (0.78-26.16)		13.67 (4.14-49.25)		4.00 (0.08-166.48)		1.78 (0.05-9.13)	
unbekannt	19														
Kontrolle															
Kontrolle	10	1.19 (0.02-24.41)	0.716	2.87 (0.13-6217.9)	0.338	5.36 (3.47-29.25)	0.836	3.63 (2.29-31.20)	0.067	16.26 (6.54-40.11)	0.461	4.94 (0.42-19.40)	0.473	0.85 (0.71-12.07)	0.100
Tumor	106	1.20 (0.00-51.55)		6.67 (0.00-3361.76)		5.88 (0.19-34.14)		6.46 (0.14-26.16)		13.67 (0.06-49.94)		2.60 (0.03-166.48)		1.60 (0.05-13.27)	

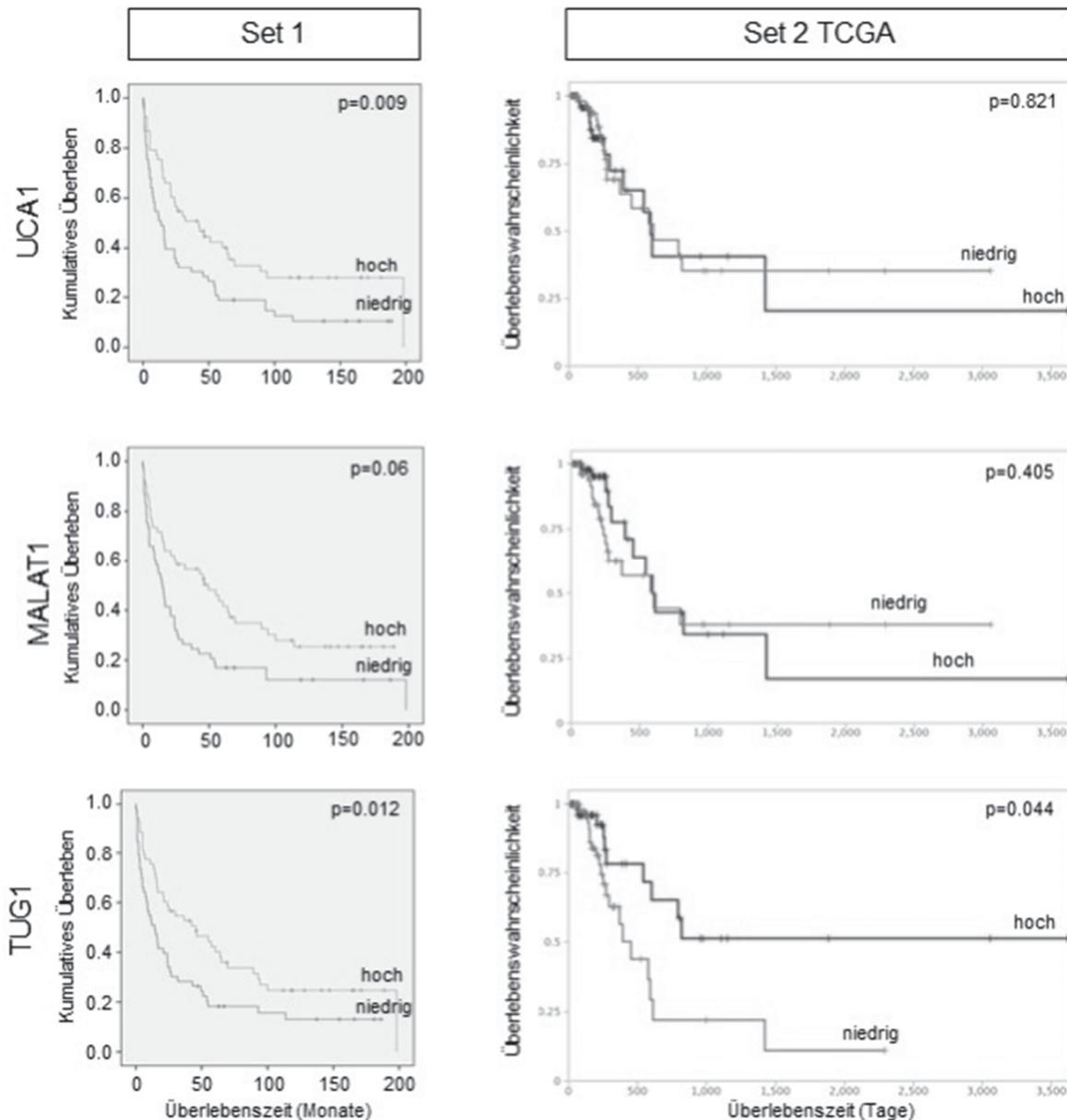


Abb.3.6: Einfluss der lncRNA-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten in Set 1 und 2. Kaplan-Meier-Kurven für Tumorgewebe aus Set 1, die eine signifikante Assoziation der lncRNA-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patienten aufweisen. Die Patienten wurden anhand der medianen lncRNA-Expression in Gruppen mit hoher und niedriger Expression eingeteilt. Der p-Wert ist für Cox-Regressionsanalysen angegeben, die Überlebenszeit in Monaten. Kaplan-Meier-Kurven für Set 2 wurden der TANRIC-Datenbank entnommen.

Für die übrigen analysierten lncRNAs wurde in beiden untersuchten Kohorten keine signifikante Assoziation mit klinischen Parametern gefunden.

Tabelle 12: Univariate Analyse der prognostischen Wertigkeit von klinischen Parametern und lncRNA Expression in Gewebeset 1

Variablen	Gesamtüberleben			Krankheits-spezifisches Überleben		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Alter						
≤ 65	ref.			ref.		
> 65	1.015	0.659 - 1.562	0.948	0.929	0.563-1.533	0.774
Geschlecht						
weiblich	ref.			ref.		
männlich	0.650	0.410-1.030	0.067	0.655	0.384-1.117	0.121
Stage						
Ta-T1	ref.			ref.		
T2-T3	2.187	1.277-3.742	0.004	5.167	2.219-12.034	<0.001
Grade						
G1-G2	ref.			ref.		
G3	2.458	1.512-3.996	<0.001	4.091	2.125-7.877	<0.001
Lymphknotenstatus						
pNx / N0	ref.			ref.		
pN+	3.551	2.161-5.837	<0.001	5.106	2.952-8.832	<0.001
UCA1 exp. 50%						
niedrig	ref.			ref.		
hoch	0.567	0.367-0.876	0.011	0.657	0.398-1.084	0.100
Linc-UBC1 exp. 50%						
niedrig	ref.			ref.		
hoch	0.953	0.619-1.468	0.828	0.966	0.587-1.592	0.893
TUG1 exp 50%						
low	ref.			ref.		
high	0.579	0.375-0.895	0.014	0.588	0.356-0.972	0.038
ncRAN exp. 50%						
niedrig	ref.			ref.		
hoch	0.416	0.543-1.287	0.836	0.605	0.365-1.003	0.052
MALAT1 exp. 50%						
niedrig	ref.			ref.		
hoch	0.547	0.353-0.848	0.007	0.591	0.357-0.78	0.041
H19 exp. 50%						
niedrig	ref.			ref.		
hoch	0.904	0.587-1.390	0.644	0.925	0.562-1.523	0.761
GAS5 exp. 50%						
niedrig	ref.			ref.		
hoch	0.707	0.459-1.091	0.118	0.697	0.423-1.150	0.158

Tabelle 13: Multivariate Analyse der prognostischen Wertigkeit von klinischen Parametern und lncRNA Expression in Gewebeset 1

Variablen	Gesamtüberleben			Krankheits-spezifisches Überleben		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Alle Fälle (Ta-T4)						
<i>Stage (T2-T4)</i>	1.329	0.697-2.536	0.388	2.547	0.982-6.603	0.054
<i>Grade (G3)</i>	1.784	1.001-3.178	0.050	2.200	1.052-4.598	0.036
Lymphknotenmetastasen (N+)	2.982	1.748-5.085	<0.001	3.652	2.050-6.504	<0.001
UCA1 (> 50%)	0.573	0.366-0.897	0.015	0.669	0.400-1.121	0.127
Gesamtüberleben						
Variablen	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Alle Fälle (Ta-T4)						
<i>Stage (T2-T4)</i>	1.217	0.646-2.296	0.543	2.412	0.941-6.183	0.067
<i>Grade (G3)</i>	1.734	0.969-3.104	0.064	2.119	1.008-4.456	0.048
Lymphknotenmetastasen (N+)	3.196	1.883-5.427	<0.001	3.865	2.176-6.857	<0.001
TUG1 (> 50%)	0.616	0.392-0.967	0.035	0.656	0.390-1.103	0.112
Gesamtüberleben						
Variablen	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Alle Fälle (Ta-T4)						
<i>Stage (T2-T4)</i>	1.156	0.604-2.211	0.662	2.199	0.843-5.738	0.107
<i>Grade (G3)</i>	2.007	1.126-3.575	0.018	2.264	1.075-4.768	0.032
Lymphknotenmetastasen (N+)	3.017	1.778-5.120	<0.001	3.784	2.129-6.724	<0.001
ncRAN (> 50%)	1.003	0.637-1.580	0.991	0.789	0.466-1.334	0.376
Gesamtüberleben						
Variablen	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Alle Fälle (Ta-T4)						
<i>Stage (T2-T4)</i>	1.073	0.564-2.044	0.830	2.206	0.852-5.713	0.103
<i>Grade (G3)</i>	1.954	1.108-3.448	0.021	2.365	1.141-4.899	0.021
Lymphknotenmetastasen (N+)	2.963	1.748-5.023	<0.001	3.608	2.038-6.388	<0.001
MALAT1 (> 50%)	0.625	0.400-0.976	0.039	0.765	0.459-1.276	0.304

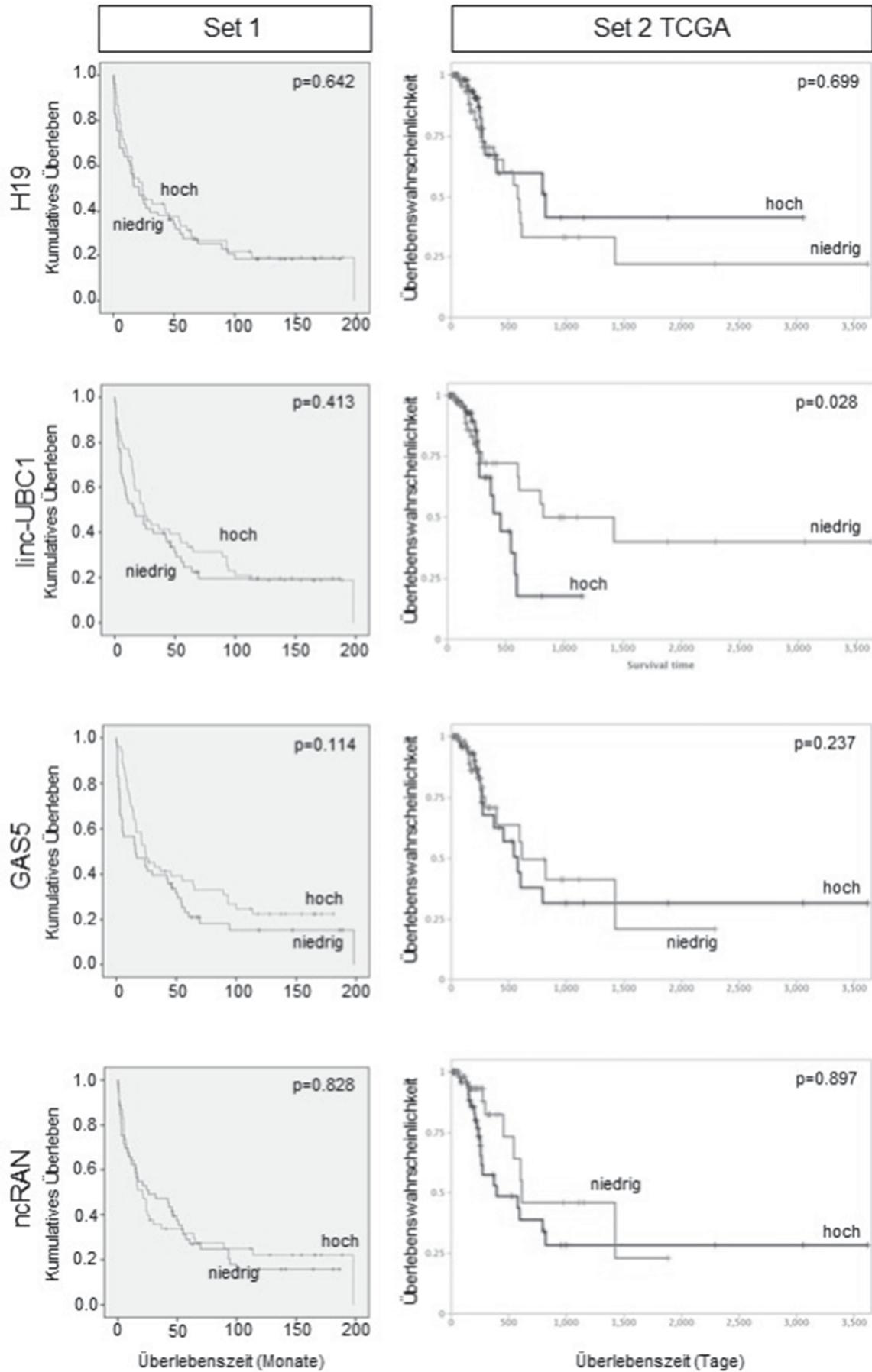


Abb.3.7: Einfluss der lncRNA-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten in Set 1 und 2. Kaplan-Meier-Kurven für Tumorgewebe aus Set 1, die keine signifikante Assoziation der lncRNA-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patienten aufweisen. Die Patienten wurden anhand der medianen lncRNA-Expression in Gruppen mit hoher und niedriger Expression eingeteilt. Der p-Wert ist für Cox-Regressionsanalysen angegeben, die Überlebenszeit in Monaten. Kaplan-Meier-Kurven für Set 2 wurden der TANRIC-Datenbank entnommen.

3.4 TUG1 als Marker für Urothelkarzinome mit BASQ-Subtyp

Der Befund, dass Patienten, deren Tumore eine niedrige TUG1-Expression haben, gegenüber solchen mit höherer Expression eine schlechtere Prognose haben, ließ vermuten, dass es eine Assoziation mit bestimmten molekularen Subtypen des Urothelkarzinoms geben könnte. Um dies herauszufinden, wurde die TUG1-Expression in Tumorproben des erweiterten Gewebesets der TCGA (n=408) analysiert. Die Expressionen über alle Tumorproben hinweg wurden als z-scores in einem Waterfallplot in Abb.3.8 A dargestellt. Bei der Berechnung der z-scores werden als Referenz diploide Proben verwendet. In einem Teil der Tumoren wird TUG1 hoch exprimiert (n=166, 40.7%), eine größere Anzahl an Tumoren (n=242, 59.3%) weist jedoch eine niedrige Expression auf.

Der „basal-squamous-like“ Subtyp (BASQ), der mit einer schlechteren Prognose einhergeht (27), ist durch eine erhöhte Expression von squamösen Markergenen (*KRT5*, *KRT14*, *KRT6A*) und eine verminderte Expression luminaler Markergene (*FOXA1* und *GATA3*) gekennzeichnet. Um eine mögliche Assoziation der Expression dieser Gene mit TUG1 innerhalb der erweiterten TCGA-Kohorte zu erkennen, wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit Hilfe des Morpheus-Online-Tools durchgeführt. Daraus ergab sich, dass sich die Tumore basierend auf ihrer Expressionsverteilungen in drei Gruppen einteilen lassen: Tumore mit niedriger, hoher und „gemischter“ TUG1-Expression. Die Gruppe mit niedriger Expression zeigt dabei eindeutig eine Assoziation mit erhöhter Expression der squamösen Marker *KRT5*, *KRT14* und *KRT6A* bei gleichzeitig vermindelter Expression der luminalen Marker *FOXA1* und *GATA3*. Entsprechend wiesen Tumore mit hoher TUG1-Expression eine niedrige Expression von squamösen Markern auf bei gleichzeitig hoher Expression von luminalen Markern. Eine dritte Gruppe, als „gemischt“ bezeichnet, die in etwa ein Drittel der analysierten Proben ausmacht, lässt sich nicht eindeutig zuweisen. Die Auftragung der Markergenexpression für Tumore mit

niedriger bzw. hoher TUG1-Expression als Boxplots in Abb. 3.8 verdeutlicht nochmals diesen Zusammenhang.

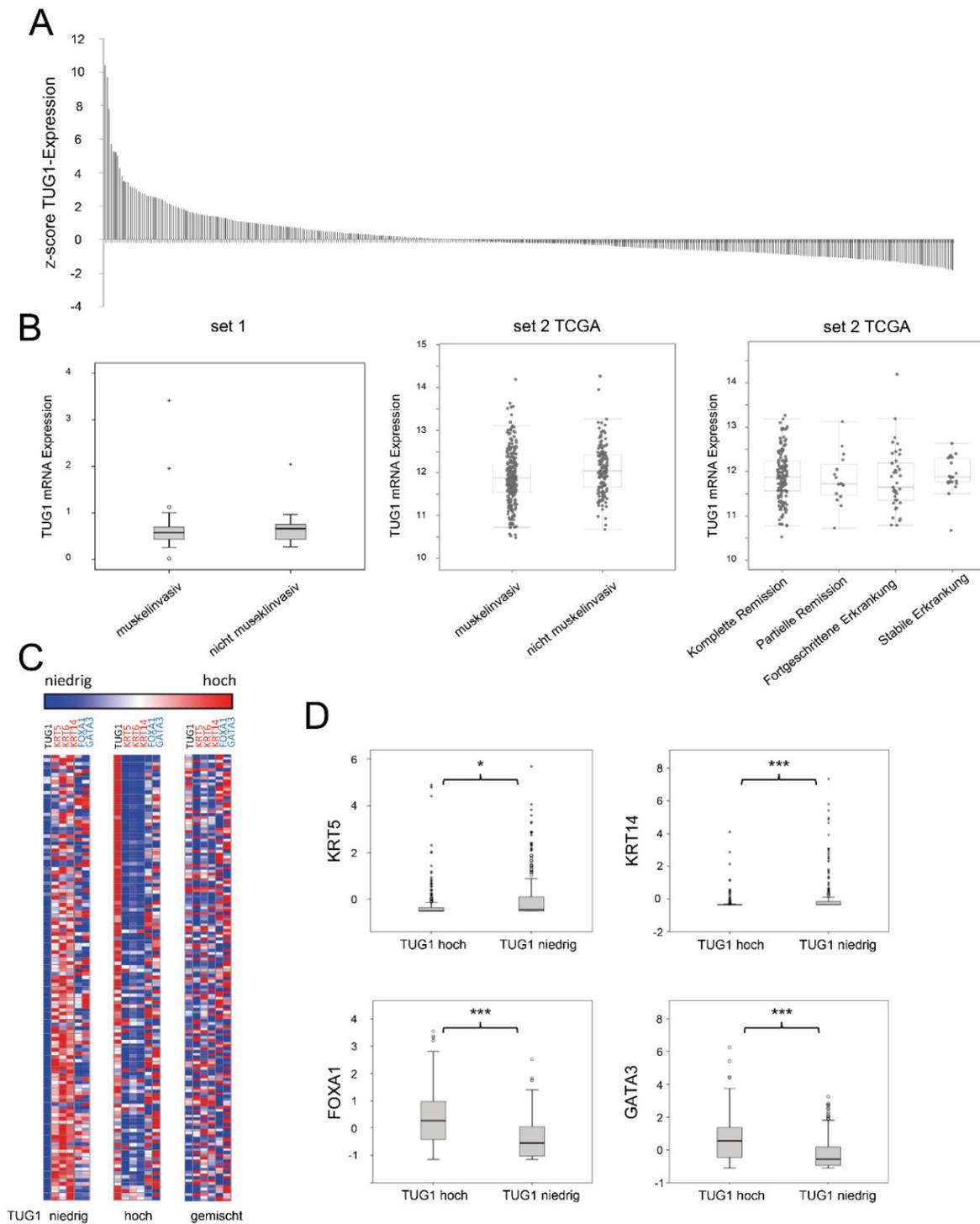


Abb.3.8: Korrelationen zwischen TUG1-Expression im Urothelkarzinom und dem basal-squamous-like Subtyp. **A** Der Wasserfall-Plot zeigt die Verteilung der TUG1-Expression im erweiterten TCGA-Set (n=408). TUG1-Expression ist angegeben als z-Score. **B** Die Boxplots zeigen die Expression von TUG1 in nicht-muskelinvasiven Tumoren im Vergleich zu muskelinvasiven Tumoren in Set 1 und dem erweiterten TCGA-Set 2. **C** Hierarchische Cluster-Analyse der TUG1-Expression mit der von KRT5, KRT6, KRT14, GATA3 und FOXA1 innerhalb der TCGA-Kohorte. Die

Expressionsstärke ist als Farbgradient zwischen niedriger (blau) und hoher (rot) Expression angegeben. Das Panel links zeigt das Cluster von Proben mit niedriger TUG1-Expression, das in der Mitte Proben mit hoher Expression und das Panel rechts Proben ohne eindeutige Zuordnung (gemischt). **D** Boxplot-Darstellung der Expression von KRT5, KRT14, FOXA1 und GATA3 in Tumoren mit hoher und niedriger TUG1-Expression (p-Werte mit Mann-Whitney-U-Test berechnet, * $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.001$).

Darüber hinaus wurde die hierarchische Clusteranalyse auf alle untersuchten lncRNAs und ein ebenfalls erweitertes Set von insgesamt 30 Markergenen zur molekularen Subtypisierung ausgeweitet, basierend auf der Publikation von Dadhania et al. (29). Die Assoziation von niedriger TUG1-Expression mit dem BASQ-Subtyp konnte in dieser Analyse bestätigt werden (Abb. 3.9). Darüber hinaus deutete sich eine ähnliche Assoziation für UCA1 und MALAT1 an, d.h. niedrige lncRNA-Expression in Tumoren mit BASQ-Subtyp.

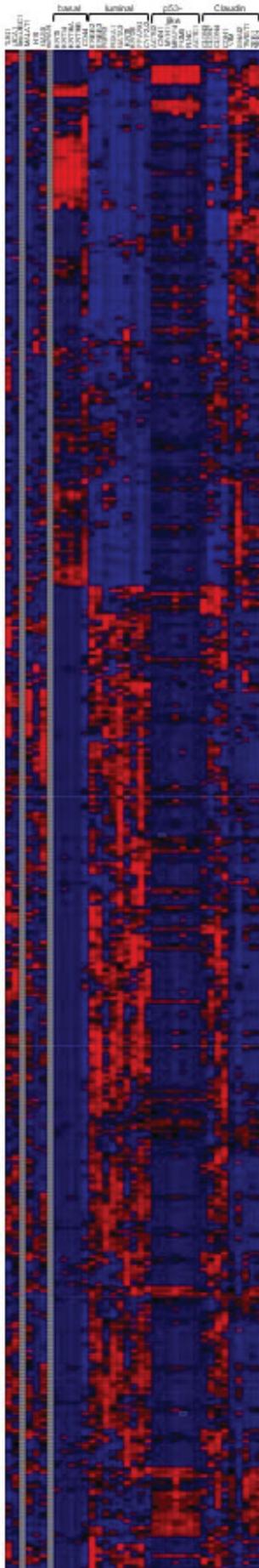


Abb.3.9: Assoziationen von lncRNA-Expressionen mit molekularen Subtypen im Urothelkarzinom. Hierarchische Clusteranalyse durchgeführt mit Genesis 1.0 der lncRNA-Expressionsdaten des erweiterten TCGA-Sets (n=408) und Genen, die molekulare Subtypen muskelinvasiven Urothelkarzinomen nach Dadhania et al. charakterisieren (basal, luminal, p53-like, Claudin) (29). Die Expressionsdaten sind als z-scores angegeben. Für ncRAN und linc-UBC1 konnten keine Expressionsdaten in dem erweiterten TCGA-Set ermittelt werden.

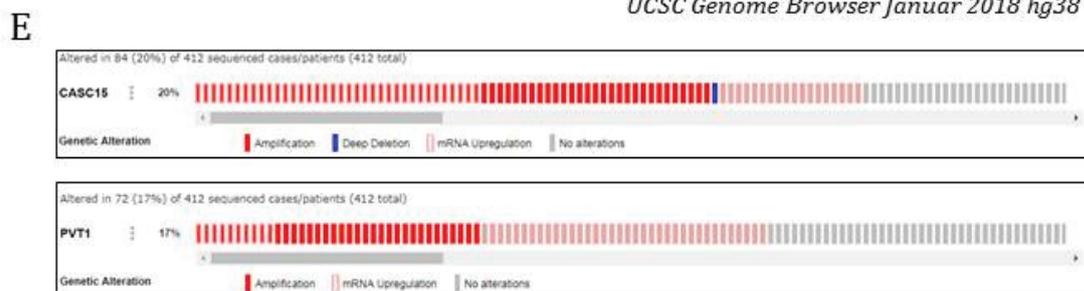
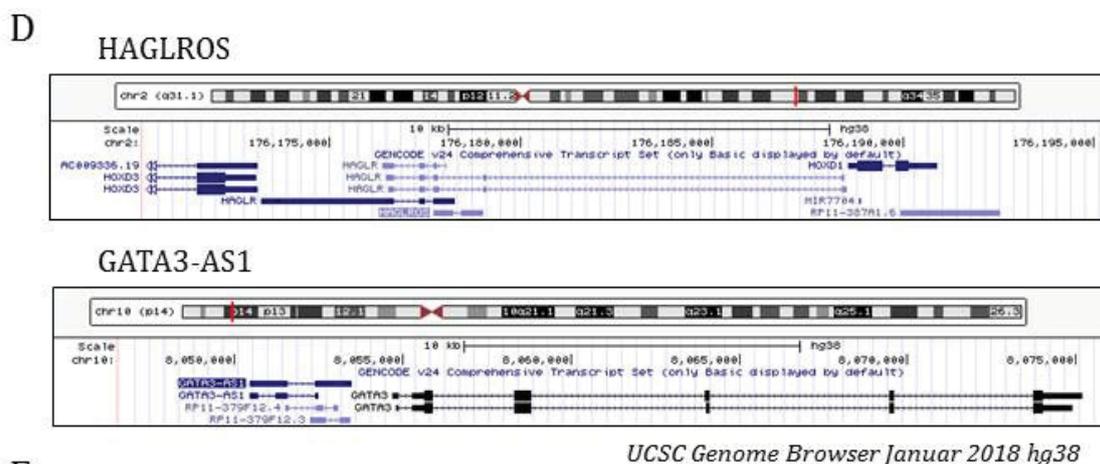
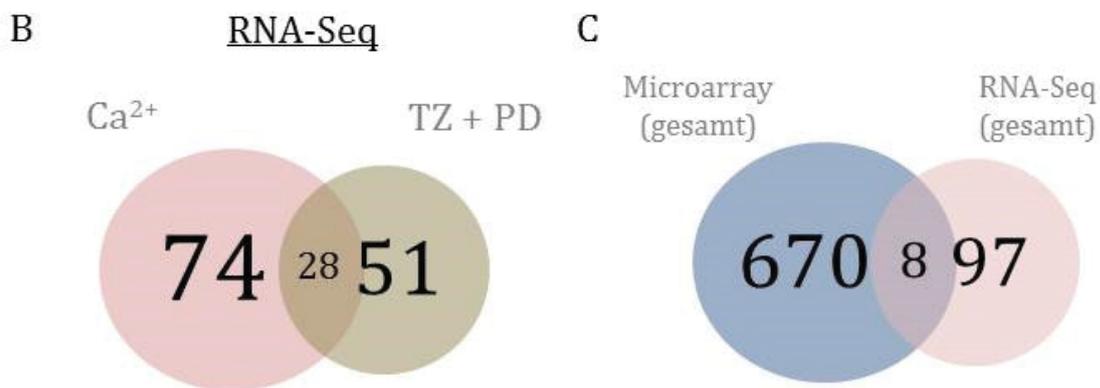
3.5 *In vitro*-Differenzierung von urothelialen Zellen: Analyse von Microarray- und RNA-Seq-Daten

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Genexpressionsstudien mit Proben aus *in vitro*-differenzierten UP-Kulturen durchgeführt (vgl. Einleitung). Es wurden *Microarray*-Expressionsanalysen mit RNA aus drei verschiedenen UP-Kulturen durchgeführt, die jeweils zu Beginn (t0), und jeweils nach elf (t11), 14 (t14) und 15 (t15) Tagen nach Stimulation durch Calciumchlorid isoliert wurden. Darüber hinaus wurden RNA-Sequenzierungsanalysen (RNA-Seq) durchgeführt mit Kulturen, die ebenfalls mit Calciumchlorid stimuliert wurden, und solchen, die durch Aktivierung von PPAR γ und gleichzeitiger Inhibition von EGFR stimuliert wurden. Diese Genexpressionsstudien sollten Aufschluss darüber geben, welche Gene im Zuge der Differenzierung differentiell exprimiert werden und somit an der Regulation von Differenzierungsprozessen beteiligt sein könnten. Dies sollte insbesondere auch Unterschiede zwischen reiner urothelialer Differenzierung und gemischter Differenzierung mit plattenepithelialen Anteilen aufzeigen. Die Auswertung sollte Hinweise auf differentiell exprimierte lncRNAs geben, die an der Feinregulation von Differenzierungsprozessen im Urothel beteiligt sein könnten. Eine aberrante lncRNA-Expression könnte dadurch wesentlich zu einer aberranten Differenzierung (insbesondere plattenepitheliale Differenzierung) innerhalb des Urothels beitragen.

Die Auswertung der Microarrays ergab, dass insgesamt 670 lncRNAs differentiell exprimiert sind zwischen – durch Erhöhung der Calciumchloridkonzentration - differenzierten und undifferenzierten UP-Kulturen, wovon 380 lncRNAs in den differenzierten gegenüber den undifferenzierten Proben herunter und 290 herauf reguliert waren.

Die RNA-Sequenzierungsanalyse ergab eine deutlich geringere Anzahl an differentiell exprimierten lncRNAs gegenüber den Ergebnissen aus dem Microarray. In den mit Calciumchlorid stimulierten Kulturen waren lediglich 74 lncRNAs differentiell exprimiert gegenüber den undifferenzierten Kulturen, in den mit Troglitazone und PD153035 behandelten Kulturen waren es lediglich 51. Da 28 lncRNAs in beiden Differenzierungsprotokollen verändert waren, konnten durch die RNA-Seq-Analyse so insgesamt 97 lncRNAs als allgemein Differenzierungs-assoziiert identifiziert werden.

Vergleicht man die Ergebnisse aus Microarray- und RNA-Seq-Analyse sind es jedoch nur acht lncRNAs, die bei beiden als differentiell exprimiert gefunden wurden.



cbioportal.org > Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, Provisional), Februar 2018

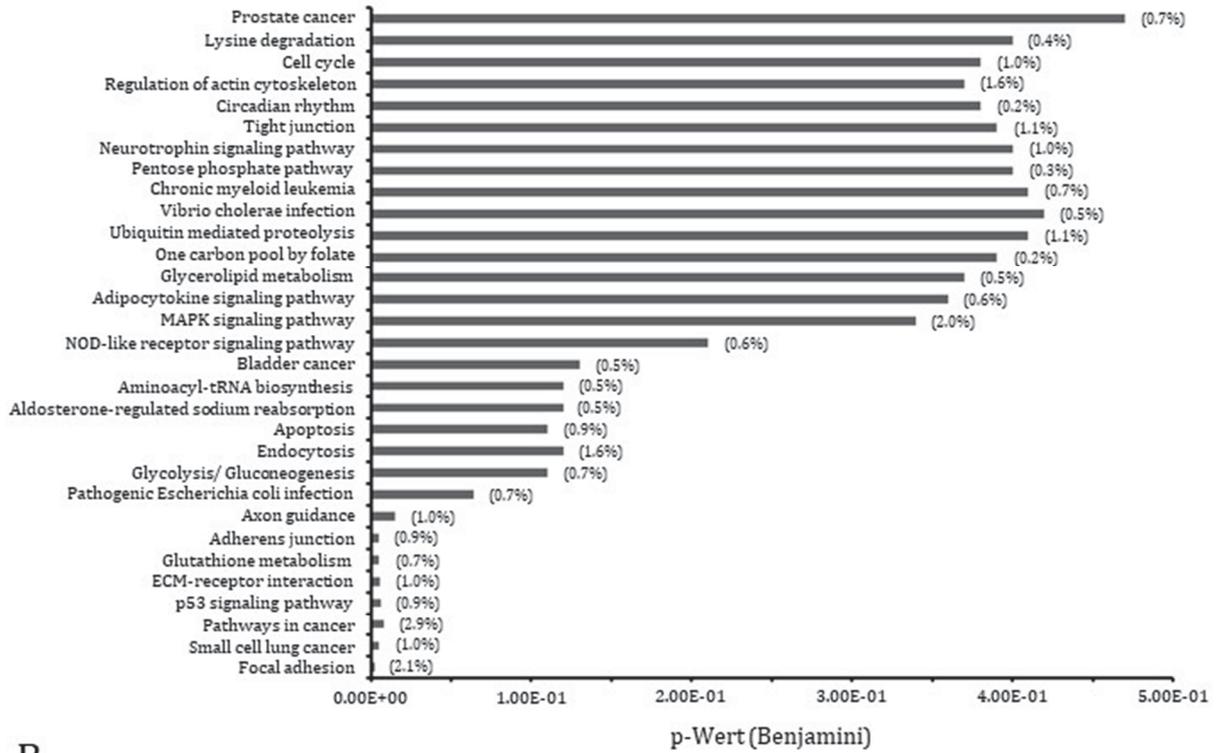
Abb.3.10: Differentiell exprimierte lncRNAs in der urothelialen Differenzierung *in vitro*. **A** Anzahl differentiell-exprimierter lncRNAs in der Microarray- und RNA-Sequenzierungsanalyse (mit den unterschiedlichen *in vitro* Differenzierungsprotokollen). Die Pfeile geben die Richtung der Expressionsregulation an. **B** Das Venn-Diagramm stellt die differentiell exprimierte lncRNAs der beiden RNA-Sequenzierungsanalysen dar. **C** Das Venn-Diagramm zeigt den Vergleich von differentiell exprimierten lncRNAs, die in der Microarray- und der RNA-Sequenzierungsanalyse identifiziert wurden. **D** Die *Screenshots* aus dem *UCSC Genome Browser* zeigen die genomische Lokalisation der *Antisense*-Transkripte HAGLROS und GATA3-AS1. **E** Die *Screenshots* aus dem *cbioportal* stellen Veränderungen der lncRNAs CASC15 und PVT1 in der TCGA-Kohorte dar.

Um eine nähere Auswahl an lncRNAs treffen zu können, die weiter näher untersucht werden sollten, wurde die genomische Lokalisation der lncRNAs, die in der RNA-Seq-Analyse identifiziert wurden, als Auswahlkriterium hinzugenommen. Es ist bekannt, dass lncRNAs häufig an der Regulation (*in cis*) der Gene beteiligt sind, die im Genom direkt benachbart liegen [120]. Das bedeutet, dass die genomische Lokalisation bereits einen Hinweis auf ihre funktionelle Bedeutung geben kann. Darüber hinaus wurde auch geschaut, ob es bereits Publikationen gibt, die Anhaltspunkte für eine mögliche funktionelle Bedeutung enthalten.

Um besser einschätzen zu können, welche Prozesse während der Differenzierung wichtig sind und dadurch auch die Auswahl an lncRNAs, die an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sein könnten, besser eingrenzen zu können, wurden auch differentiell exprimierte proteincodierende Gene analysiert, die in der RNA-Seq-Analyse auffielen. Es wurde mit Hilfe der *DAVID Bioinformatics Resources*-Datenbank *Gene Ontology*-Terme abgefragt, die eine Auflistung der überrepräsentierten KEGG-Signalwege (*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*) ergeben. Diese Analyse ergab, dass bei der *in vitro*-Differenzierung mit Calciumchlorid 31 KEGG-Signalwege signifikant verändert sind, bei der Differenzierung mit Troglitazone und PD153035 41. Es gibt 14 KEGG-Signalwege, die bei beiden *in vitro*-Differenzierungsprotokollen betroffen sind. Diese beinhalten zentrale zelluläre Signalwege, die direkt die Funktion des Epithels beeinflussen wie die Regulation des Aktin-Zytoskeletts oder die *Adhärens-Junction*-Verknüpfungen, aber insbesondere auch Stoffwechsel-Signalwege wie Glycolyse/Gluconeogenese und Glutathion-Metabolismus. Durch die Zugabe von Troglitazone wird der PPAR γ -Signalweg pharmakologisch aktiviert, was sich auch in einer Veränderung der Genexpression innerhalb des Signalweges in der RNA-Seq-Analyse widerspiegelt. Darüber hinaus sind weitere Signalwege, die mit dem Fettstoffwechsel assoziiert sind, verändert, darunter der

Fettsäuremetabolismus und der Insulinsignalweg. Beide werden bekanntermaßen durch PPAR γ beeinflusst (121).

A



B

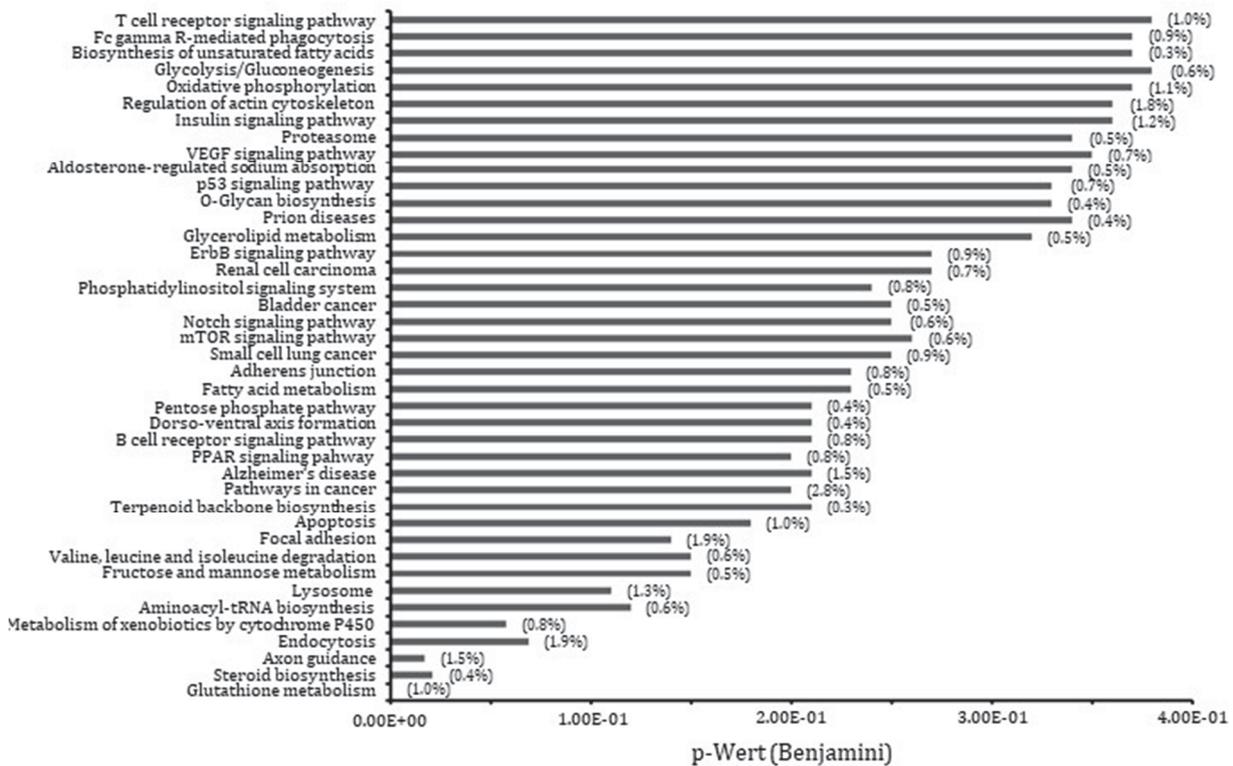


Abb.3.11: GO-Analyse differentiell exprimierter kodierender Gene nach in vitro-Differenzierung von UP-Kulturen durch Calciumchlorid-Stimulus (A) und durch Stimulus mit Troglitazone und PD153035 (B). Die GO-Analyse wurde mit Hilfe des *DAVID Bioinformatics Online-Tools* durchgeführt. Als differentiell exprimiert wurden solche Gene angesehen, die in der RNA-Sequenzierungsanalyse eine *False Discovery Rate* (FDR) ≤ 0.05 aufwiesen. Angegeben sind die *KEGG pathways* mit der höchsten Signifikanz nach Benjamini-Hochberg-Korrektur. Der in Klammern angegebene Wert entspricht dem prozentualen Anteil an veränderten Genen im jeweiligen *KEGG pathway*.

Zusätzlich wurde in der Literatur recherchiert, welche Erkenntnisse es bereits über differentiell exprimierte lncRNAs bei der epithelialen Differenzierung bzw. in Harnblasenkarzinomen gibt. Aus diesen Informationen wurde die als Tabelle 14 zusammengefasste Liste an möglichen Kandidaten-Genen erstellt.

Tabelle 14: Differentiell exprimierte lncRNAs in der urothelialen Differenzierung. Die lncRNAs wurden bei *in vitro* Differenzierungen von UP-Kulturen durch Zugabe von Calciumchlorid (Ca^{2+}) oder Troglitazone und PD153035 (TZ+PD) in Microarray- und RNA-Sequenzierungs-Analysen als differentiell exprimiert identifiziert. Weitere Auswahlkriterien waren Publikationen, Veränderungen in der TCGA-Kohorte (Bladder Urothelial Carcinoma) sowie die genomische Lokalisation.

lncRNA	Lokalisation	Analyse	Protokoll	Weitere Informationen
TINCR	19p13	RNA-Seq	Ca^{2+}	Kretz et al., Nature, 2013 (44)
DANCR	4q12	-	-	Kretz et al., Genes Dev, 2012 (64)
MALAT1	11q13	RNA-Seq	Ca^{2+}	Han et al., Urology, 2013 (87)
UCA1	19p13	Microarray	Ca^{2+}	Wang et al., Clin Cancer Res, 2006 (83)
MEG3	14q32	RNA-Seq	TZ+PD	Greife et al., Clin Epigenetics, 2014 (92)
LINC01503	9q34	RNA-Seq, Microarray	Ca^{2+} , TZ+PD	Gao et al., Biomed Res Int, 2014 (HNSC) (122)
CASC15	6p22	RNA-Seq, Microarray	Ca^{2+}	TCGA (18)
PVT1	8q24	RNA-Seq, Microarray	Ca^{2+}	TCGA (18), Lokalisation (benachbart zu MYC)
GATA3-AS1	10p14	RNA-Seq, Microarray	Ca^{2+} , TZ+PD	Lokalisation (<i>Antisense-Transkript</i> zu GATA3)
LINC01116	2q31	RNA-Seq, Microarray	Ca^{2+}	Lokalisation (HOXD-Lokus)
HAGLROS	2q31	RNA-Seq	Ca^{2+}	Lokalisation (HOXD-Lokus)
NEAT1	11q13	RNA-Seq	Ca^{2+}	Lokalisation (benachbart zu MALAT1)

Insbesondere wurde die lncRNA TINCR als differentiell exprimiert in der RNA-Seq Analyse identifiziert in den Zellen, die mit Calciumchlorid stimuliert wurden. Kretz et al. beschrieben diese lncRNA als wichtigen posttranskriptionellen Regulator in der epidermalen Differenzierung. Die Expression von TINCR wird im Zuge der Differenzierung hochreguliert, wobei TINCR im Zytoplasma an weitere Differenzierungs-assoziierte mRNAs bindet und diese über einen Staufen1-vermittelten Mechanismus stabilisiert (44). Eine weitere Studie von Kretz et al. beschrieb die lncRNA DANCR, die gegenläufig zu TINCR in Epithelien in basalen Zellen exprimiert ist. Dort ist sie an der Aufrechterhaltung der undifferenzierten Vorläuferzellen beteiligt (64).

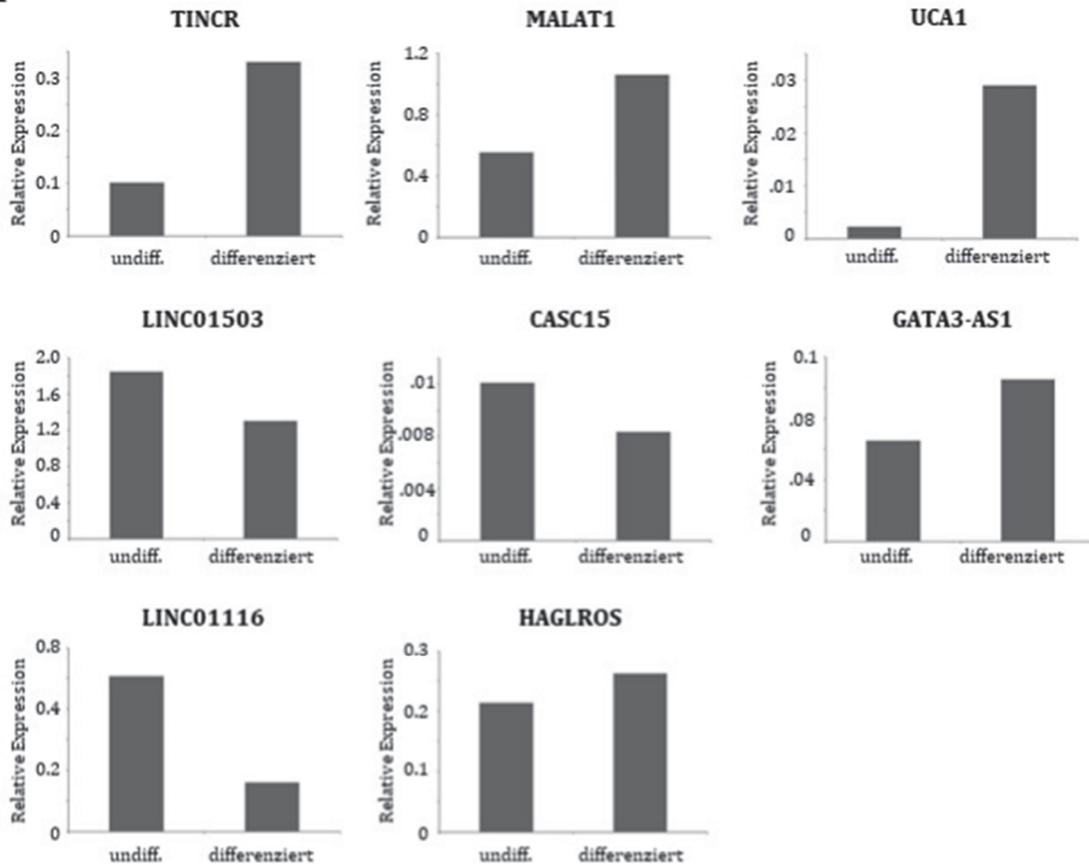
MALAT1 wurde ebenfalls über die RNA-Seq-Analyse in den Calciumchlorid-stimulierten Zellen als differentiell exprimiert gefunden. Diese lncRNA ist, wie bereits unter 3.1. ausgeführt, als potentieller Biomarker für das Urothelkarzinom und weitere maligne Erkrankungen in der Literatur beschrieben (87). MALAT1 ist im Nucleus lokalisiert und dort an der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl an Genen beteiligt, auch solchen, die für die Metastasierung wichtig sind. Zwei weitere lncRNAs, die in einer der beiden Analysen auftauchten, sind ebenfalls bereits als potentielle Biomarker im Urothelkarzinom beschrieben, nämlich UCA1 und MEG3 (83, 92). UCA1 ist die am stärksten hochregulierte lncRNA in der Microarray-Analyse. MEG3, welches in den mit Troglitazone und PD153035 behandelten Zellen differentiell exprimiert gefunden wurde, ist im Urothelkarzinom herunterreguliert.

In allen drei Analysen wurde LINC01503 als differentiell exprimiert gefunden. Zudem wurde diese lncRNA von Gao et al. als dereguliert in Plattenepithelkarzinomen der Zunge beschrieben (122), was zusammen genommen auf eine funktionelle Bedeutung auch in aberranter Differenzierung des Urothels hinweisen könnten. Die anderen lncRNAs, die in beiden Analysen gefunden wurden und in die Liste potentieller Kandidaten aufgenommen wurden, sind CASC15, PVT1, GATA3-AS1 und LINC01116. In der Kohorte der *The Cancer Genome Association* mit 413 Harnblasen-Tumorgewebeproben, deren Genexpression ebenfalls durch RNA-Seq-Analysen bestimmt wurde, ist die CASC15-Expression in 20% aller Proben verändert, verursacht überwiegend durch Amplifikationen (Stand Januar 2018). Auch die in verschiedenen Tumorentitäten als potentielles Onkogen identifizierte lncRNA PVT1, die vermutlich an der Regulation des auf Chromosom 8 benachbart liegenden MYC beteiligt ist, ist in 17% aller Harnblasen-Tumorproben in der TCGA-Kohorte durch Amplifikationen verändert (Stand Januar 2018). GATA3-AS1 ist ein

Antisense-Transkript, welches divergent zum Transkriptionsstart des Transkriptionsfaktors GATA3 auf Chromosom 10 liegt. Bei GATA3 handelt es sich um einen wichtigen Regulator epidermaler und urothelialer Differenzierung, der auch ein wichtiger Faktor bei der Subtypisierung von Urothelkarzinomen ist (24). LINC0116 wurde in beiden Analysen (RNA-Seq und Microarray) gefunden, in denen die Zellen mit Calciumchlorid stimuliert wurden. Zudem befindet sich sein Genlocus auf Chromosom 2q31 in der Nähe des HOXD-Clusters. Ebenfalls primär aufgrund ihrer chromosomalen Lokalisation ausgewählt wurden die lncRNAs HAGLROS und Neat1, die nach der RNA-Seq-Analysen ebenfalls Calciumchlorid-reguliert sind. HAGLROS wird wie LINC0116 im HOXD-Lokus auf Chromosom 2q31 kodiert und wird als Antisense-Transkript zu *HAGLR* transkribiert. Bei HAGLROS handelt es sich ebenfalls um eine lncRNA, welche divergent zu *HOXD1* exprimiert wird. NEAT1 ist auf Chromosom 11q13 in der Nähe zu *MALAT1* lokalisiert.

3.6 Validierung der identifizierten lncRNAs mittels quantitativer PCR

A



B

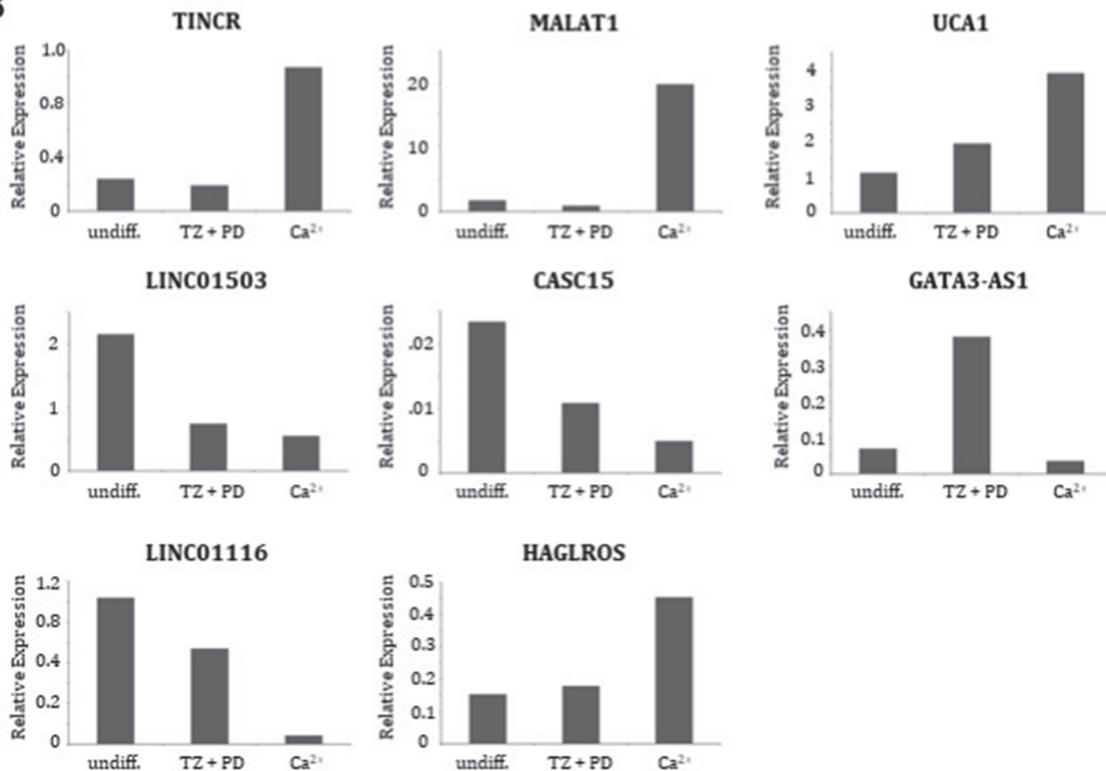


Abb.3.12: Validierung differentiell exprimierter lncRNAs in der urothelialen Differenzierung mittels qRT-PCR. Eine Auswahl der identifizierten lncRNAs wurde in den RNA-Proben aus *in vitro* Differenzierungsversuchen aus UP-Kulturen, die in die Microarray-Analyse (A) bzw. in die RNA-Sequenzierungsanalyse (B) eingegangen sind, mittels qRT-PCR validiert. Die Expression ist relativ zu der Expression des *Housekeeper*-Gens TBP angegeben.

Ein Teil der lncRNAs, die in den unter Kapitel 2.2.8.2 beschriebenen Microarray- und RNA-Sequenzierungsanalysen als differentiell exprimiert im Laufe der urothelialen Differenzierung identifiziert wurden, wurde mittels quantitativer PCR (qRT-PCR) in den RNA-Proben, die für die Analysen verwendet wurden, validiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die in den ursprünglichen Analysen gefundenen Expressionsveränderungen konnten bestätigt werden. Die Expression von UCA1 wird in der Calciumchlorid-vermittelten Differenzierung deutlich induziert, was durch die qRT-PCR in beiden Versuchen nachgewiesen werden konnte. Als differentiell exprimiert wurde UCA1 jedoch nur in der Microarray-Analyse gefunden. Auch die Expression von MALAT1 wird in der Calciumchlorid-vermittelten Differenzierung induziert, was sich in der qRT-PCR bestätigen lässt. Insbesondere in den Proben, die mittels RNA-Seq analysiert wurden, war die Induktion von MALAT1 deutlich stärker als erwartet. TINCR wurde ebenfalls in der RNA-Seq als durch Calciumchlorid-induziert identifiziert. Dies bestätigt sich auch in den Proben, die für die Microarray-Analyse verwendet wurden. LINC01503 wurde in allen drei Analysen als herunterreguliert identifiziert. Dies konnte durch die qRT-PCR bestätigt werden. CASC15 wurde als herunterreguliert in der Calciumchlorid-vermittelten Differenzierung gefunden. Dies zeigte sich in der qRT-PCR zusätzlich in der TZ+PD-vermittelten Differenzierung. Die Induktion von GATA3-AS1 durch Calciumchlorid konnte in den Proben der Microarray-Analyse bestätigt werden, nicht jedoch in denen der RNA-Seq. In der RNA-Seq wurde GATA3-AS1 als durch TZ+PD-Behandlung induziert identifiziert, was durch die qRT-PCR bestätigt werden konnte. LINC01116 wurde in beiden Analysen als durch Calciumchlorid herunterreguliert identifiziert. Auch dies konnte in der qRT-PCR validiert werden. HAGLROS wurde in der RNA-Seq als durch Calciumchlorid-Behandlung induziert gefunden. Dies konnte in der qRT-PCR bestätigt werden, auch in den Proben, die für den Microarray verwendet wurden. In diesen Proben war die Induktion jedoch weniger stark. Dies könnte erklären, warum es in dieser Analyse nicht als signifikant differentiell exprimiert identifiziert werden konnte.

3.7 Differentiell exprimierte lncRNAs im Urothelkarzinom im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Im Folgenden wurde die Expression der identifizierten lncRNAs in einer Serie von Normal- und Tumorgewebeproben sowohl aus Urothelkarzinomen als auch aus Kopf-Hals-Tumoren mittel qRT-PCR gemessen. Die Ergebnisse wurden verglichen mit RNA-Sequenzierungsdaten aus der TCGA-Kohorte, die über die TANRIC-Datenbank abgerufen wurden. Die Ergebnisse sind als Boxplots in Abbildung 3.13 dargestellt. Insgesamt sind die Expressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe innerhalb der mittels qRT-PCR analysierten Gewebeserien gering. Im Falle der Kopf-Hals-Karzinome ist keiner der Unterschiede statistisch signifikant; im Falle der Urothelkarzinome sind CASC15 und HAGLROS signifikant überexprimiert in den Tumorproben gegenüber den Normalproben. Dies ließ sich innerhalb der TCGA-Kohorte jedoch nicht bestätigen. In der überwiegenden Zahl der Fälle war die lncRNA-Expression in den Tumorproben gegenüber den Normalproben im Median erhöht. MALAT1 ist sowohl in den Tumorproben aus Urothelkarzinomen als auch aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs vermindert exprimiert. Dies bestätigt sich auch in den TCGA-Daten für das Urothelkarzinom. In der TCGA-Kohorte der Kopf-Hals-Tumore ist es jedoch signifikant überexprimiert in den Tumorgeweben. Vermindert exprimiert in den Tumorgeweben in Kopf-Hals-Tumoren sind dagegen die lncRNAs UCA1 und NEAT1. UCA1 ist in der TCGA-Kohorte für das Urothelkarzinom signifikant in den Tumorproben erhöht. NEAT1 dagegen ist in der TCGA-Kohorte für Kopf-Hals-Karzinome signifikant überexprimiert in den Tumorproben gegenüber den Normalproben. In den übrigen Fällen ist die Richtung der Expressionsänderung der lncRNAs zwischen den Geweben, die mit qRT-PCR analysiert wurden, und den RNA-Seq Daten der TCGA gleich. Ebenfalls signifikant überexprimiert sind demnach in dieser Kohorte die lncRNAs MALAT1, LINC01503, CASC15, PVT1 und LINC01116, wobei in allen Fällen die Differenz in der medianen Expression zwischen Tumor- und Normalgeweben gering ist. Die mittels RNA-Seq detektierte Expression von LINC01503 und LINC01116 ist in beiden TCGA-Kohorten insgesamt niedrig. Auffällig ist der Unterschied zwischen qRT-PCR und RNA-Seq bei HAGLROS: in der qRT-PCR konnte die Expression von HAGLROS zuverlässig nachgewiesen werden, in der RNA-Seq wurde diese lncRNA jedoch nur vereinzelt detektiert.

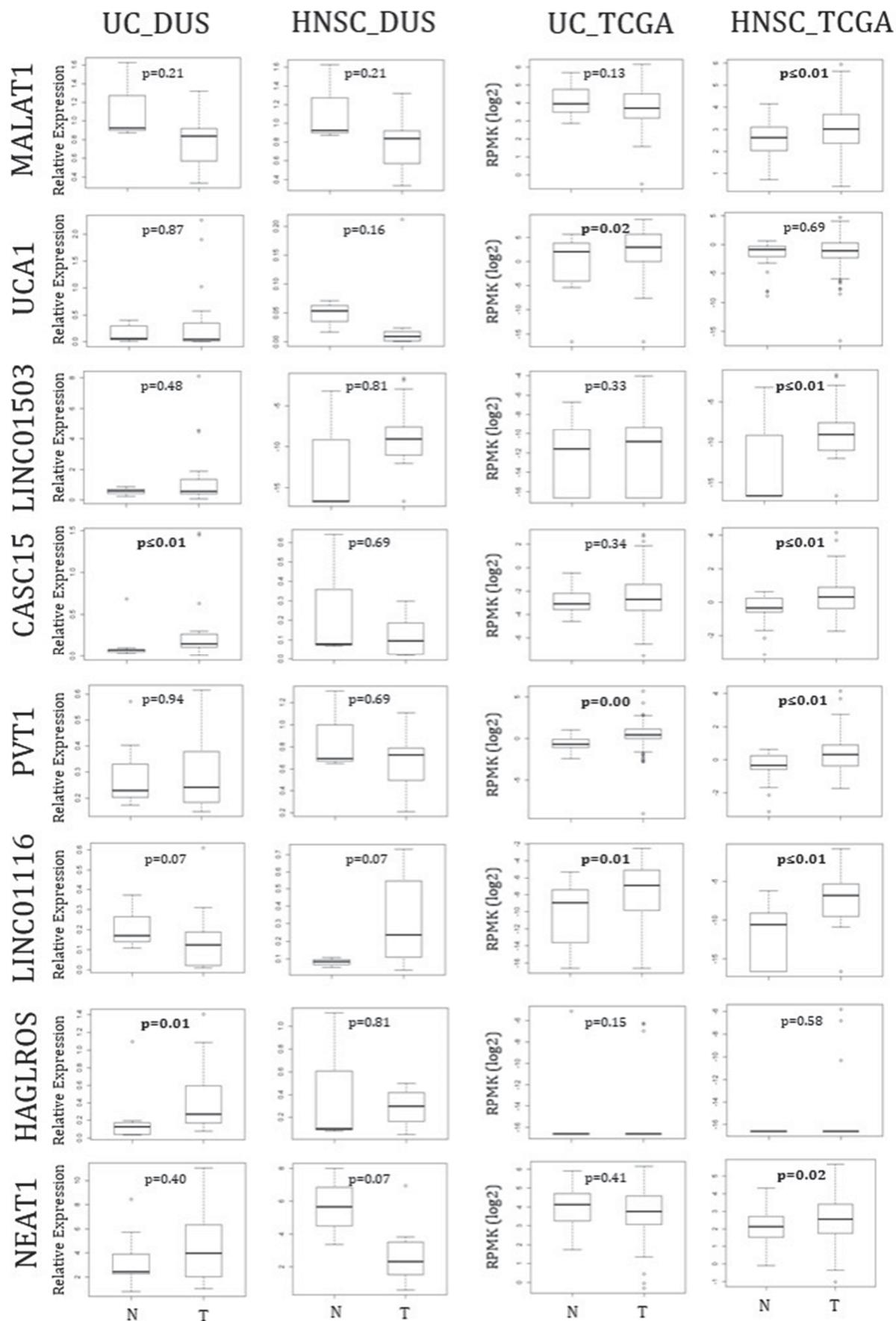


Abb.3.13: lncRNA Expression in UC und HNSC. Die Expression der lncRNAs MALAT1, UCA1, LINC01503, CASC15, PVT1, LINC01116, HAGLROS und NEAT1 wurde mittels qRT-PCR in Gewebeproben des Urothelkarzinoms (UC_DUS, N=10, T=19) und Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich (HNSC_DUS, N=3, T=10) gemessen. Die Expression ist relativ zu dem geometrischen Mittel der Expression von *SDHA*, *TBP* und *GAPDH* angegeben. Im Vergleich sind die RNA-Seq-Daten der TCGA für beide Kohorten (BLCA, HNSC), angegeben als RPMK, dargestellt. Die p-Werte wurden mittels *Wilcoxon-Rank-Sum*-Test berechnet.

Des Weiteren wurde die Expression einzelner lncRNAs in Zelllinien aus Urothelkarzinomen sowie von Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich mittel qRT-PCR gemessen. Die Expression in den Karzinomzelllinien wurde für das UC mit der in benignen TERT-NHUC-Zellen, für das HNSC mit normalen humanen Keratinozyten (NHEK) und HaCaT-Zellen verglichen. Die mit einem Plus-Zeichen markierten HNSC-Zelllinien sind HPV-positiv (UD-SCC-2, UD-SCC-47, UD-SCC-104). Bei den HNSC-Zelllinien UD-SCC-10, UM-SCC-14 und UM-SCC-17 handelt es sich um Paare aus Primärtumor (A) und Metastase (B) desselben Patienten.

Die Expression in den Zelllinien wurde zudem mit Daten verglichen aus der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), die ebenfalls über die TANRIC-Datenbank abgefragt wurden, soweit verfügbar. Die mittels qRT-PCR und RNA-Seq (CCLE) erhobenen Expressionsdaten sind in weiten Teilen vergleichbar. Dies wird besonders deutlich in Bezug auf TINCR, da beide Analysen eine hohe Expression in RT-112 und HT1376 ergaben.

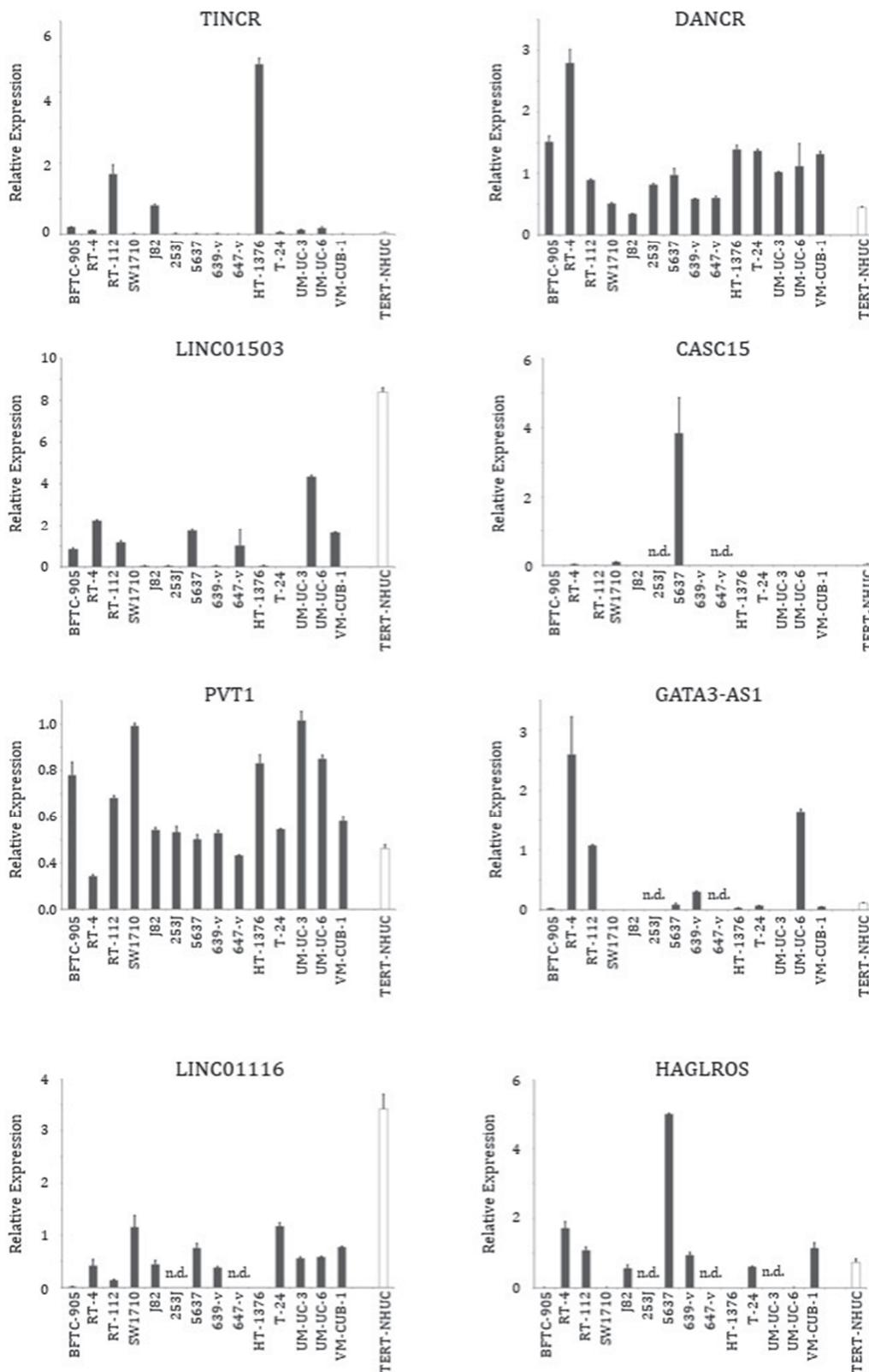


Abb.3.14: lncRNA-Expression in Urothelkarzinomzelllinien. Die Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und ist relativ zu dem geometrischen Mittel aus *SDHA*, *TBP* und *GAPDH* angegeben, soweit nicht anders angegeben (n.d. = nicht detektierbar). Als benigne Kontrollzelllinie wurde TERT-NHUC verwendet.

	TINCR	DANCR	MALAT1	linc-UBC-1	UCA1	CASC15	PVT1	NEAT1	GATA3-AS1	TUG1
647-V	-4,529	4,12	3,131		5,729	-4,013	1,072	1,964	-3,642	4,005
RT-112	2,581	4,233	3,973		5,958	-6,876	1,387	3,75	1,9	4,711
639-V	-3,877	5,095	5,523		2,384	-8,117	0,789	3,532	-0,29	4,61
253J	-5,145	2,751	4,77		3,138	0,121	2,62	3,106	-0,427	4,456
T24	-4,33	3,873	4,943		-2,813	-9,666	1,036	3,65	-16,61	4,456
BFTC-905	0,609	3,054	5,313		5,901	-3,182	2,744	4,072	-6,369	3,884
SCaBER	-1,46	3,125	4,476		5,215	-7,711	1,437	4,396	-5,866	4,297
J82	0,008	3,619	5,737		2,777	-7,197	1,566	4,64	-4,293	4,03
HT-1376	4,465	3,733	4,229		5,002	-3,447	1,141	4,733	-2,022	4,954
UM-UC-3	-2,226	3,896	6,146		-5,212	-7,776	1,24	4,186	-16,61	3,901
SW-1710	-4,365	2,355			2,275	-3,359	-0,033	5,233	-6,98	3,595

Abb.3.15: lncRNA-Expression in Urothelkarzinomzelllinien (CCLE). lncRNA-Expressionsdaten aus RNA-Sequenzierungen (RPMK log₂) von Urothelkarzinom-Zelllinien der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) wurden der TANRIC-Datenbank entnommen. Die Farbcodierung gibt dabei die Stärke der Expression an, wobei grün schwach exprimiert und rot stark exprimiert darstellt. Für linc-UBC1 waren zum Zeitpunkt der Abfrage keine Daten hinterlegt.

Die lange nicht-codierende RNA TINCR ist zumeist nur schwach exprimiert; es gibt jedoch in beiden Entitäten einzelne Zelllinien, die eine hohe Expression aufweisen. Die Expression von DANCR ist hingegen in allen analysierten Zelllinien beider Entitäten nachweisbar. LINC01503 ist - mit der Ausnahme von UM-SCC-14B - in den Karzinomzelllinien beider Entitäten vermindert exprimiert gegenüber den jeweiligen benignen Kontrollen. CASC15 und GATA3-AS1 sind ebenfalls nur in einzelnen Zelllinien schwach exprimiert und ansonsten nicht nachweisbar. Die Expression von PVT1 ist ähnlich wie bei DANCR in allen Zelllinien nachweisbar. Dabei ist kein deutlicher Unterschied gegenüber den jeweiligen benignen Kontrollen erkennbar. LINC01116 ist in den UC-Zelllinien deutlich vermindert exprimiert gegenüber TERT-NHUC. In den HNSC-Zelllinien ist LINC01116 mit Ausnahme von UD-SCC-6 höher exprimiert im Vergleich zu den Keratinozyten und HaCaT. HAGLROS ist bis auf 5637 in den UC-Zelllinien ähnlich stark exprimiert wie in TERT-NHUC. In den HNSC-Zelllinien - mit Ausnahme von UM-SCC-17 - ist diese lncRNA stärker exprimiert als in den benignen Kontrollen.

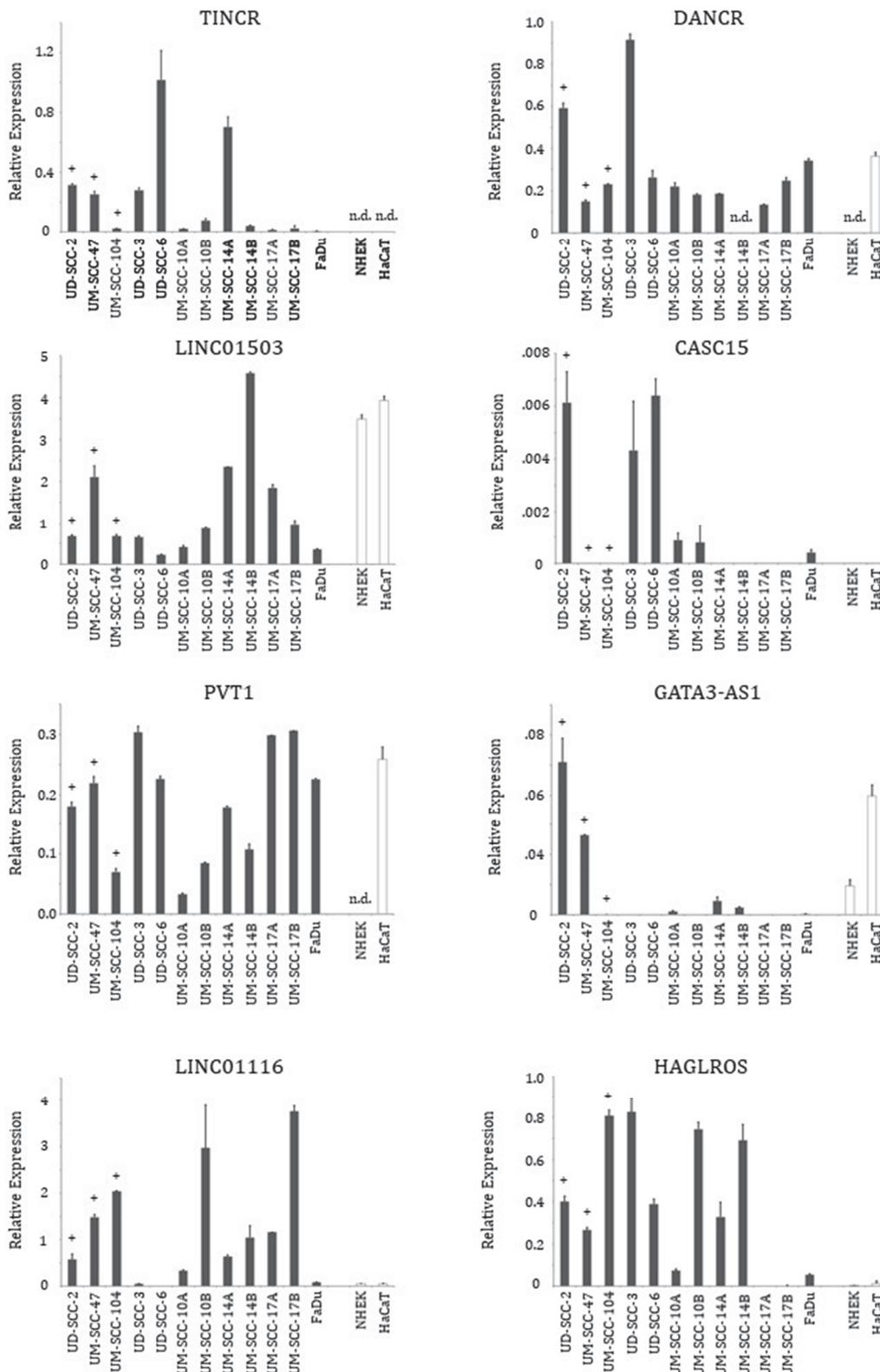


Abb.3.16: lncRNA-Expression in Kopf-Hals-Karzinomzelllinien. Die Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und ist relativ zu dem geometrischen Mittel aus *SDHA*, *TBP* und *GAPDH* angegeben (n.d. = nicht detektiert). Als benigne Kontrollzelllinien wurden normale humane Keratinozyten (NHEK) und HaCaT verwendet. Die mit einem Plus-Zeichen markierten Zelllinien sind HPV-positiv. Bei den Zelllinien UD-SCC-10, UM-SCC-14 und UM-SCC-17 handelt es sich um Paare aus Primärtumor (A) und Metastase (B) eines Patienten.

3.9 *In silico* Analyse des Methylierungsmusters differentiell exprimierter lncRNAs im UC

Eine mögliche Erklärung für Expressionsveränderungen der lncRNAs zwischen Tumor- und Normalgeweben könnte ein verändertes DNA-Methylierungsmuster sein. Um dies zu überprüfen wurden öffentlich zugängliche Datensätze auf eine differentielle Methylierung hin ausgewertet. Die ENCODE CpG-Methylierungsdaten im UCSC Genome Browser (hg19) verschiedener Zelllinien unterschiedlicher Gewebe gaben einen ersten Hinweis auf eine mögliche differentielle Methylierung ausgewählter lncRNAs, die in Tabelle 15 zusammengefasst sind.

Tabelle 15: Methylierungsmuster einzelner lncRNAs im Gewebevergleich in den ENCODE-Daten im UCSC Genome Browser (hg19)

lncRNA	ENCODE Methylierung	CpG-Insel
LINC01116	differentiell	chr2:177502241-177502910
LINC01503	leicht differentiell	chr9:132099124-132099616
HAGLROS	differentiell	chr2:177042752-177043444
CASC15		
NEAT1	einheitlich	chr11:65189464-65190295
GATA3-AS1	differentiell	chr10:8091375-8098329
MALAT1	einheitlich	chr11:65264958-65265398
TINCR	leicht differentiell	chr19:5567519-5567939
PVT1	einheitlich	chr8:128747806-128751279
DANCR	einheitlich	chr4:53578359-53579238
linc-UBC1	differentiell	chr1:205424830-205426556
GAS5	einheitlich	chr1:173837173-173837917
ncRAN	einheitlich	chr17:74553221-74553912
TUG1	differentiell	chr22:31364565-31365575

Eine differentielle DNA-Methylierung zwischen Tumor- und Normalgewebe bei Urothelkarzinompatienten könnte eine Ursache für die differentielle Expression der lncRNA-Gene sein. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden die Methylierungsdaten der *Methyl 450K Bead-Array*-Analyse der TCGA-Kohorte für das Blasenkarzinom (BLCA) über den UCSC-Xena-Browser ausgewertet. Neben den Methylierungen von TUG1, linc-UBC1, HAGLROS, GATA3-AS1 und LINC01116 wurden außerdem die für UCA1, TINCR und DANCR erfasst. Die entsprechenden Methylierungsdaten einzelner CpG-Stellen waren für die Gene UCA1, TUG1 und TINCR bereits hinterlegt; für die übrigen Gene wurden die CpG-Stellen anhand der genomischen Lokalisation ausgewählt wie exemplarisch in Abb. 3.17 dargestellt. Für GATA3-AS1

wie in Tabelle 16 aufgeführt, ist lediglich TINCR über alle analysierten CpG-Stellen hinweg in den Tumoren gegenüber den Normalgeweben hypomethyliert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Hypomethylierung zu der Überexpression von TINCR in Tumoren gegenüber Normalgeweben beiträgt.

Tabelle 16: Mediane Methylierung verschiedener lncRNA-Gene in Tumor- (T) und Normal-Proben (N) über alle analysierten CpG-Stellen hinweg. Die Werte wurden dem UCSC XenaBrowser für die TCGA-Kohorte des Blasenkarzinoms (BLCA, 433 samples, N=21, T=412) entnommen. Der p-value wurde mittels Wilcoxon-Rank-sum-Test in R berechnet.

	Median N	Median T	p-value
UCA1	0.056	0.039	0.383
TUG1	0.767	0.807	0.753
TINCR	0.244	0.153	0.038
LINC01116	0.089	0.048	0.439
lincUBC1	0.061	0.085	0.945
GATA3	0.109	0.061	0.051
DANCR	0.029	0.025	0.259
HAGLROS	0.067	0.047	0.259

Die Ergebnisse der Methylierung für die einzelnen analysierten CpG-Stellen können Tabelle I im Anhang entnommen werden.

3.10 Modelle der urothelialen Differenzierung *in vitro*

3.10.1 Identifizierung von Markergenen der squamösen Differenzierung *in vitro*

Im Laufe der Arbeit wurden *in vitro* Modelle der urothelialen Differenzierung verwendet bzw. weiterentwickelt (siehe auch Abschnitt 3.5). Um die aberrante Differenzierung mit plattenepithelialen Anteilen durch Calciumchlorid-Stimulation besser beschreiben zu können, sollten squamöse Markergene unter Berücksichtigung der Literatur identifiziert werden, die an der Entwicklung dieses Phänotyps beteiligt sind.

Keratin 14 (KRT14) gehört zu den Typ-I-Keratinen der Intermediärfilamente, welches im Zytoskelett epithelialer Zellen zu finden ist. Im Urothel ist KRT14 in wenigen Basalzellen

exprimiert, die vermutlich Vorläuferzellen bei der Differenzierung der weiteren Urothelschichten darstellen. In *lineage-tracing*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl Intermediärzellen als auch Deckzellen aus KRT14-positiven Basalzellen hervorgehen und darüber hinaus der Ursprung für die Entstehung von Urothelkarzinomen sein können (123). Innerhalb der Urothelkarzinome ist die Expression von KRT14 neben der von KRT5/6 ein Charakteristikum des Basal-Squamösen-Subtyps (BASQ) (27). Daher wurden auch die Keratine 6 A und B in die Liste der squamösen Markergene aufgenommen. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Intermediärfilamente, die jedoch zu den Typ-II-Keratinen gehören. Es gibt insgesamt drei Keratin 6-Isoformen, wobei Keratin 6C vermutlich nicht exprimiert wird und Keratin 6A die höchste Expression aufweist (124). Die Lokalisation von Keratin 6 in Urothelkarzinomen korreliert mit der Lokalisation von Arealen mit plattenepithelialer Differenzierung. Indes wird die Expression von Keratin 6 durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors, der in Urothelkarzinomen häufig überexprimiert ist, induziert (124, 125).

Involucrin (IVL) ist neben Loricrin (LOR) ein Marker für terminale Differenzierung in Keratinozyten. Beide Gene gehören zum Epidermalen Differenzierungskomplex (EDC) auf Chromosom 1q21 und sind als Zielgene der lncRNA TINCR in der Keratinozyten-Differenzierung beschrieben (44). Es war nicht möglich die Expression von Loricrin in UC-Zelllinien mittels qRT-PCR nachzuweisen. Dies stimmt mit öffentlich zugänglichen RNA-Sequenzierungsdaten dieser beiden Gene über verschiedene Gewebe hinweg überein (GTEx-Daten, abgerufen über den USCS Genome Browser) wie in Abbildung 3.18 dargestellt. Demnach ist zwar Involucrin in der Blase schwach exprimiert, Loricrin jedoch gar nicht.

Wie Involucrin und Loricrin gehört auch Psoriasin (*S100A7*) zu den Genen innerhalb des epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC) auf Chromosom 1q21. Wie alle Proteine der S100-Familie verfügt es über zwei Calcium-bindende EF-Hand-Motive. Obwohl *S100A7* ursprünglich in psoriatischen Keratinozyten entdeckt wurde, gilt es als allgemeiner Marker für Plattenepithelkarzinome. Trotz eines sehr heterogenen Expressionsmusters fördert es in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien die Zellproliferation und verhindert die vollständige Differenzierung der Zellen *in vitro* und *in vivo* (126). Bereits in älteren Publikationen konnte *S100A7* auch in Urothelkarzinomen als Marker für squamöse Tumore nachgewiesen werden, das möglicherweise von den Zellen externalisiert und somit in den Urin abgegeben wird (127, 128).

Als weiteres Gen zur Charakterisierung squamöser Differenzierung in Urothelkarzinomen, das ebenfalls innerhalb des EDC kodiert ist, wurde *SPRR1B* ausgewählt. *SPRR1B* ist exklusiv in epithelialen Geweben wie Ösophagus und der Haut exprimiert. Eine erhöhte Expression dieses Faktors könnte auch in möglichen Tumorstammzellen bei Mundhöhlen-Tumoren zu finden sein und mit einer erhöhten Proliferation einhergehen (129).

Eine weitere Komponente des *Cornified Envelope*, einer molekularen Struktur der oberen Schichten der Epidermis, ist Sciellin (*SCEL*). Obwohl eine homozygote Deletion dieses Gens in Mäusen nicht zu einem veränderten Phänotyp führt und eine weitere Studie keine Assoziation mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus gefunden hat, wurde dieser Faktor als möglicher Indikator für epidermale Differenzierung ausgewählt (130, 131).

Eine wichtige Rolle in der Funktion der Epidermis nehmen *adherens junctions* und Desmosomen ein, die sich aus den speziellen Cadherinen Desmocollinen und Desmogleinen zusammensetzen. In den unterschiedlichen Zellschichten der Epidermis werden dabei spezifische Isoformen dieser desmosomalen Cadherine exprimiert, die auch den Differenzierungsstatus des jeweiligen Zelltyps widerspiegeln. Für dieses Projekt wurde Desmocollin 3 (*DSC3*) ausgewählt, welches am stärksten in den proliferierenden Basalzellen exprimiert wird und dessen Expression im Laufe der Differenzierung abnimmt (132).

Die Expression der ausgewählten Gene wurde in einer Reihe von Urothelkarzinomzelllinien im Vergleich zu einzelnen Zelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich mit qRT-PCR bestimmt und ist in den Balkendiagrammen in Abbildung 3.19

dargestellt. Bei den UC-Zelllinien wurde für diese Analyse die Zelllinie SCaBER eingeschlossen, die aus einem squamösen Tumor der Harnblase stammt. Als Kontrolle für benigne Zellen ist neben TERT-NHUC auch die Expression exemplarisch in der Primärkultur UP242 aufgeführt. Für Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich wurden die Zelllinien UD-SCC-6 und FaDu ausgewählt; als benigne Kontrollen HaCaT und normale humane Keratinozyten (NHEK).

Erwartungsgemäß waren die squamösen Markergene in den UC-Zellen schwächer exprimiert als in den Kopf-Hals-Zelllinien. Auffällig ist, dass UP242 einzelne Gene besonders stark exprimierte (SCEL, SPRR1B und INV), was die bekannte große Heterogenität von *in vitro* kultivierten UPs illustriert (133). Auffällig war außerdem die Zelllinie UD-SCC-6, die für mehrere Gene die höchste Expression innerhalb der analysierten Zelllinien zeigt (KRT6B, SPRR1B, DSC3 und S100A7). Innerhalb der Kopf-Hals-Tumorzelllinien war UD-SCC-6 auch die Zelllinie mit der höchsten Expression der lncRNA TINCR.

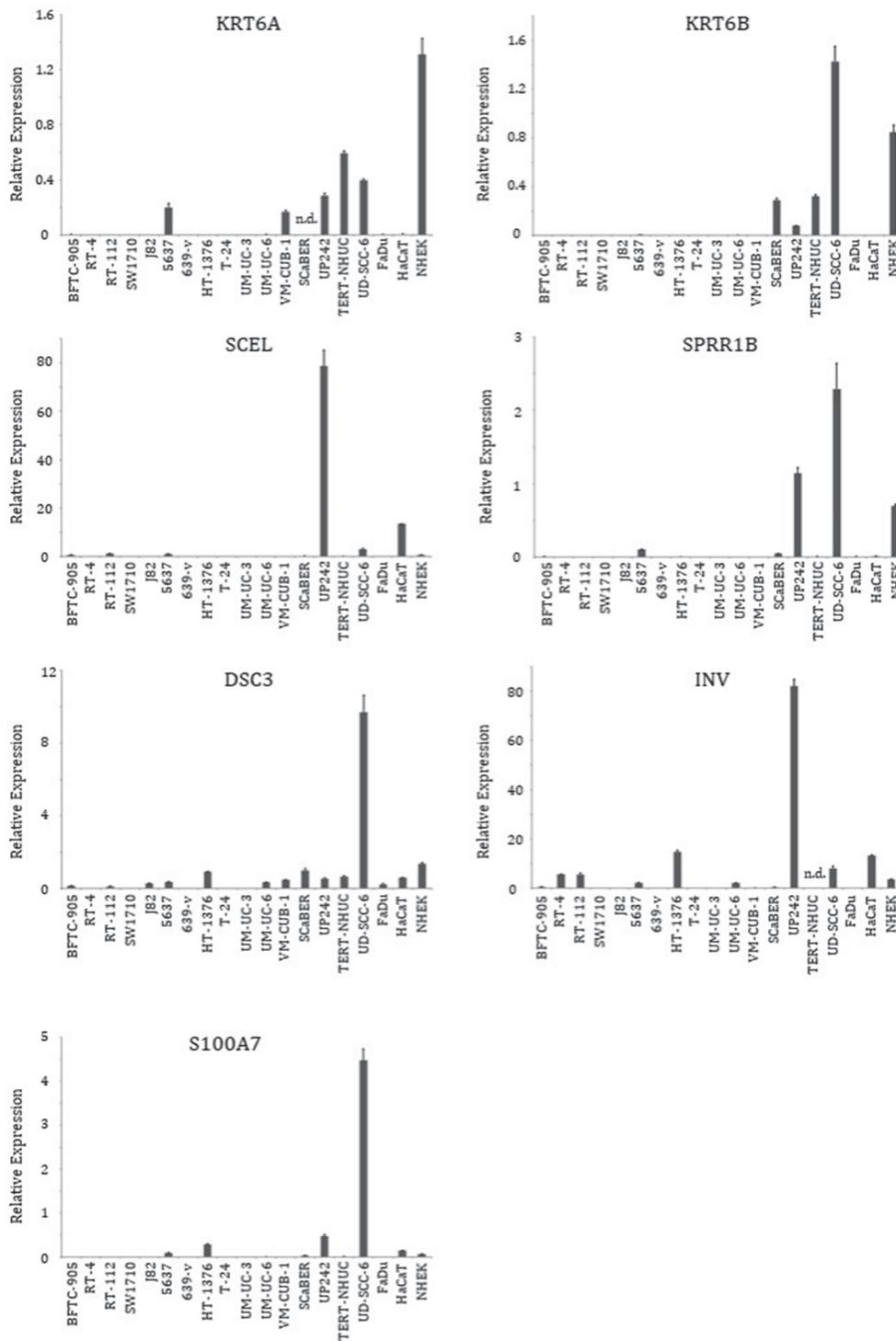


Abb.3.19: Expression squamöser Markergene in Urothelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien. Die Expression wurde durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zu dem geometrischen Mittel der *TBP*, *SDHA*, und *GAPDH* Expression angegeben. Als benigne Kontrollen zu den Urothelkarzinom-Zelllinien wurde die Expression in UP242 und TERT-NHUC bestimmt. Im Vergleich zum Urothelkarzinom wurden zudem die Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien UD-SCC-6 und FaDu sowie die Keratinozyten-Zelllinien HaCaT und normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) in die Analyse eingeschlossen.

Um die Zelllinien im Hinblick auf ihre squamösen Eigenschaften besser charakterisieren zu können, wurden die Expressionswerte als *heatmap* dargestellt (siehe Tabelle 17). Dabei wurde die Expression prozentual zu der Expression in den Keratinozyten aufgetragen; grün stellt eine schwache Expression im Verhältnis zu Keratinozyten dar, rot eine starke. Aus dieser Auftragung wird deutlich, dass die Zelllinie SCaBER tatsächlich ein hohes Maß an squamösen Eigenschaften aufweist. Neben SCaBER zeigen auch die UC-Zelllinien BFTC905, RT112, 5637, HT1376, UM-UC-6 und VM-CUB1 eine gewisse Expression squamöser Gene, wobei einzelne Expressionswerte dieser Zelllinien die von SCaBER durchaus übertrafen. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den analysierten Keratinozyten nicht um terminal differenzierte handelt und diese somit nicht die optimale Referenz darstellen. Dies wird dadurch deutlich, dass mit Ausnahme von KRT6A die Expression aller gemessenen Gene in UD-SCC-6 deutlich höher liegt.

Tabelle 17: Expression squamöser Markergene in Urothelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien. Die Expressionswerte squamöser Markergene von Urothelkarzinomzelllinien und Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (vgl. Abb.3.19) sind normiert auf die Expression in normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) angegeben. Die Farbcodierung spiegelt die Expressionsstärke wider, wobei grün einer schwachen und rot einer starken Expression entspricht.

	KRT6A	KRT6B	SCEL	SPRR1B	DSC3	INV	S100A7
BFTC-905	0.21	0.08	116.53	0.82	10.89	13.81	1.75
RT-4	0.00	0.01	0.32	0.01	0.00	158.37	0.00
RT112	0.00	0.00	206.54	0.12	8.17	156.18	0.12
SW-1710	0.00	0.03	2.43	0.00	0.00	0.00	0.00
J82	0.00	0.00	0.02	0.00	20.31	0.00	0.02
5637p	15.26	0.67	184.20	14.68	27.08	60.81	129.55
639-V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HT-1376	0.00	0.01	0.96	0.58	68.74	416.57	408.77
T-24	0.00	0.00	0.03	0.00	0.12	0.05	0.00
UM-UC-3	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
UM-UC-6	0.29	0.28	2.20	0.15	24.87	57.35	6.94
VM-CUB1	12.81	0.01	5.30	0.41	35.62	3.81	0.00
SCaBER		34.25	36.39	7.01	73.61	7.43	52.60
TERT-NHUC	45.36	37.77	25.02	0.93	48.63		19.00
UD-SSC-6	30.36	168.48	529.77	329.24	719.77	225.99	6340.12
FaDu	0.27	0.01	2.52	0.97	16.62	0.00	1.27
HaCaT	0.64	0.00	2368.93	1.71	43.28	376.79	213.45
NHEK	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

3.10.2 Molekulare Charakterisierung der urothelialen Differenzierung

Für diese Arbeit wurde die spontan immortalisierte, jedoch benigne Zelllinie HBLAK für *in vitro* Differenzierungsversuche verwendet. Die *in vitro*-Differenzierung dieser Zellen orientiert sich an den etablierten Protokollen für die Differenzierung von UP-Kulturen (109). Zunächst wurden die *in vitro*-Differenzierungen in CnT-PR-Medium (Cellntec), das auch für die Routine-Kultivierung der Zelllinie verwendet wird, durchgeführt. Wie bereits von Hoffmann et al. beschrieben, führt die pharmakologische Inhibition von EGFR durch Zugabe von Troglitazone und gleichzeitiger pharmakologischer Aktivierung von PPAR γ durch PD153035 nicht wie bei UP-Kulturen zu einer Hochregulation der urothelialen Markergene UPK2 und KRT20 auf RNA-Ebene, obwohl eine phänotypische Veränderung der Zellen stattfindet. Die Behandlung der Zellen mit Calciumchlorid führt zu einer Stratifizierung der Zellen, die auf eine squamöse Differenzierung hindeutet. Eine Induktion urothelialer Markergene findet nicht statt. Versetzt man das Medium zusätzlich zu Calciumchlorid mit 5% fötalem Kälberserum (FCS), wird die Stratifizierung der Zellen unterdrückt, die urothelialen Markergene UPK2 und KRT20 werden hochreguliert (109).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein speziell für *in vitro*-Differenzierungen optimiertes Medium von Cellntec auf den Markt gebracht (Cnt-PR-2D). Unter Verwendung dieses Mediums sollten die molekularen Eigenschaften der unterschiedlichen Differenzierungsprotokolle näher charakterisiert werden, insbesondere im Hinblick auf den Anteil squamöser Differenzierung und die Bedeutung der lncRNAs TINCR und DANCR. Neben den beiden lncRNAs wurde eine Reihe von Genen ausgewählt, die in Tabelle 2.8 zusammengefasst sind. Zur Charakterisierung der urothelialen Differenzierung wurden die etablierten Marker UPK2 und KRT20 sowie, mit Hinblick auf luminale Subtypen des Urothelkarzinoms, FOXA1 und GATA3 ausgewählt (24) (134). Von den in Kapitel 3.2 näher beschriebenen squamösen Markergenen wurden KRT14, Involucrin und S100A7 ausgewählt. Zusätzlich sollte auch die Expression des Transkriptionsfaktors ZNF750 analysiert werden. Während Involucrin ein Zielgen von TINCR in der Keratinozyten-Differenzierung ist, ist ZNF750 an der transkriptionellen Regulation von TINCR selbst beteiligt. ZNF750 ist allgemeiner an der Regulation der epidermalen Homöostase beteiligt. Eine verminderte Expression dieses Transkriptionsfaktors trägt zur Entstehung squamöser Tumore im Ösophagus bei (68).

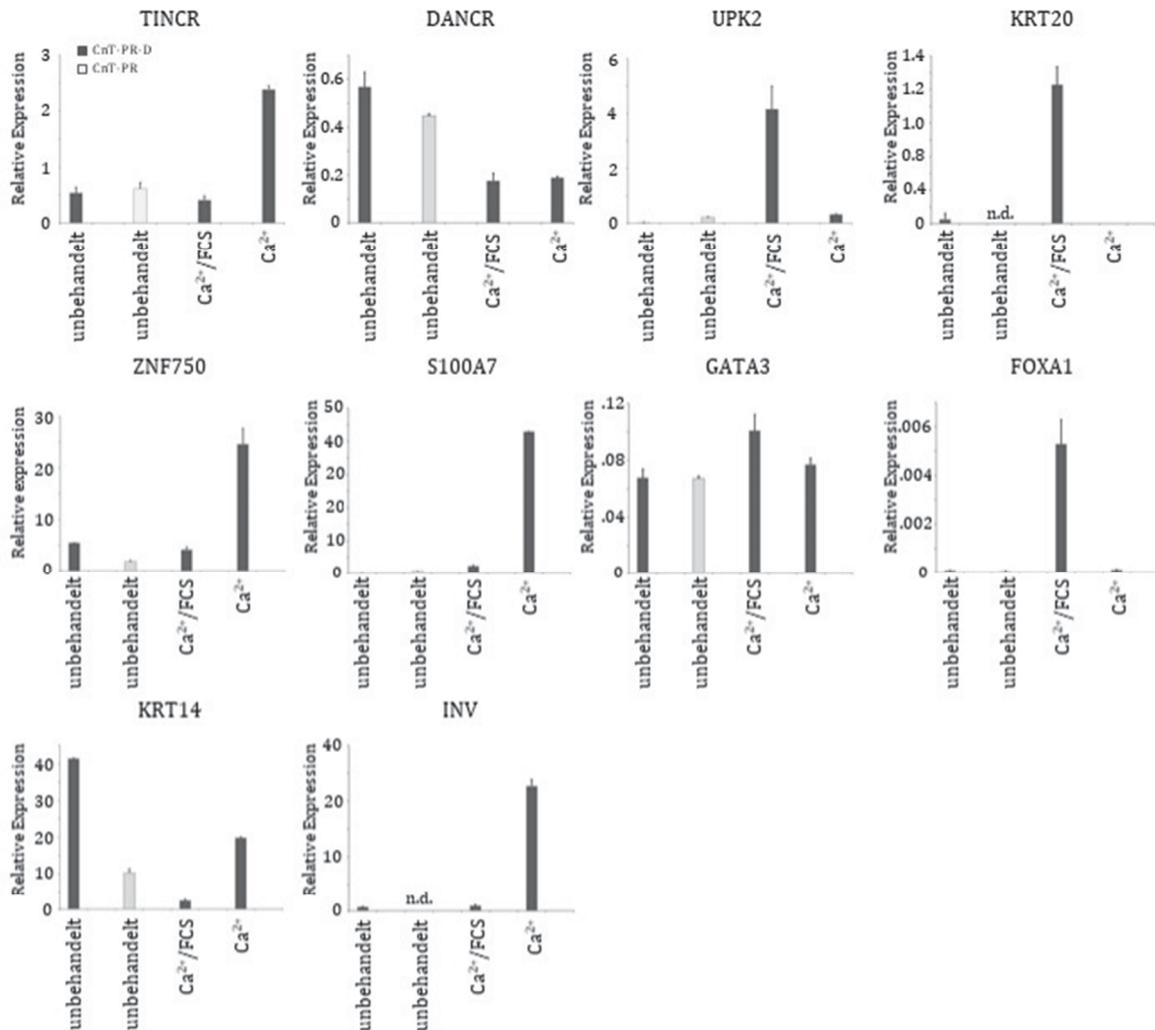
Tabelle 18: Differenzierungs-assoziierte Gene zur molekularen Charakterisierung der urothelialen Differenzierung *in vitro*.

Gen	Beschreibung	Referenz
TINCR	Marker für Terminale Differenzierung in Keratinozyten	Kretz et al., (44)
DANCR	Marker für basalen Status in Keratinozyten	Kretz et al. (64)
UPK2	Marker für terminale Differenzierung im Urothel	Olsborough et al., 2002 (45)
KRT20	Marker für terminale Differenzierung im Urothel	Riedel et al., 2005 (46)
FOXA1	Marker für luminalen Subtyp im Urothelkarzinom	Warrick et al., 2016 (24)
GATA3	Marker für luminalen Subtyp im Urothelkarzinom	Warrick et al., 2016 (24)
KRT14	Marker für basal-squamösen Subtyp im Urothelkarzinom	Papafotiou et al., 2016 (123)
INV	Marker für terminale Differenzierung in Keratinozyten; Zielgen von TINCR	Kretz et al. (44)
S100A7	Marker für squamöse Urothelkarzinome	Ostergaard et al. (127)
ZNF750	Transkriptioneller Regulator von TINCR in epidermaler Homöostase	Hazawa et al. (68)

In einem ersten Versuch wurden die HBLAK-Zellen mit den verschiedenen Protokollen unter Verwendung des CnT-PR-2D-Mediums über den Zeitraum von einer Woche differenziert. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen in einem Well mit CnT-PR-Medium (nicht für Differenzierung optimiert) ohne Differenzierungsstimulus kultiviert. Die Expression der in Tabelle 18 aufgeführten Markergene wurde zum Ende der Differenzierung bestimmt und ist relativ zur Expression von *TBP* in Abbildung 3.20A dargestellt. Es muss darauf hingewiesen werden, dass auch die Expression von *TBP* und anderen *Housekeeper*-Genen durch die Differenzierungsprozesse beeinflusst wird (nicht dargestellt). Phänotypische Veränderungen sind in Abbildung 3.20B zum Ende der Differenzierung dargestellt. Bereits in den nicht-stimulierten Zellen, die über eine Woche konfluent kultiviert wurden, sind phänotypische Veränderungen gegenüber den regelmäßig passagierten (nicht dargestellt) Zellen zu beobachten: die Zellen verlieren ihre typisches regelmäßiges „Kachel“-Muster und werden länglicher. Die Ca^{2+} /FCS-stimulierten Zellen werden insgesamt größer; Zell-Zell-Verbindungen treten deutlicher hervor. Die TZ/PD-stimulierten Zellen werden granulöser und scheinen ihre Zell-Zell-Kontakte sogar zu verlieren bis hin zum Ablösen der Zellen. Bei den Zellen, die nur mit Calciumchlorid stimuliert wurden, zeigt sich im Laufe der Differenzierung eine deutliche Stratifizierung. Nach einer Woche hat sich eine Art „Häutchen“ gebildet, das in

regelmäßigen Strukturen „aufzureißen“ scheint, sodass die darunterliegende Zellschicht sichtbar wird. Diese deutliche Stratifizierung konnte in dem nicht für die Differenzierung optimierten CnT-PR-Medium unter Calciumchlorid-Stimulus nicht beobachtet werden (nicht dargestellt).

A



B

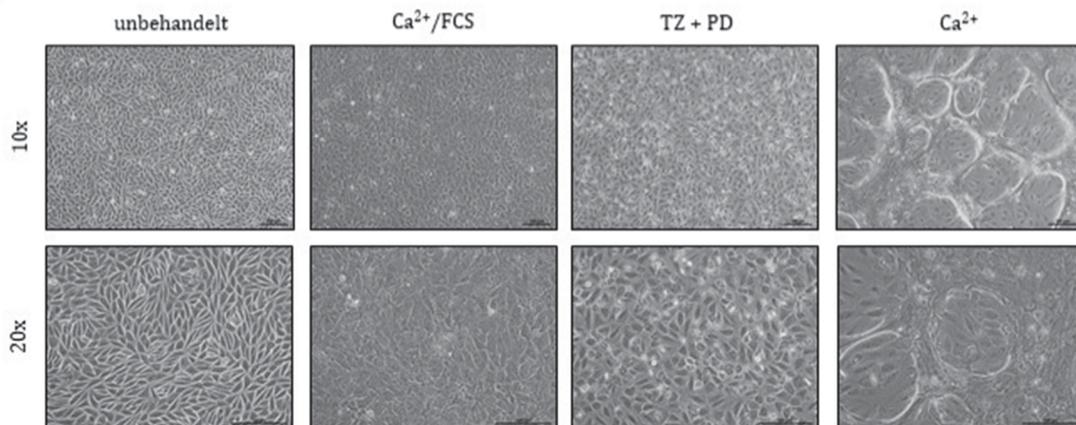


Abb.3.20: Molekulare und morphologische Charakterisierung der urothelialen Differenzierung in HBLAK Zellen in vitro. HBLAK-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz unter Verwendung des Kultivierungsmediums (CnT-PR) und eines Differenzierungs-spezifischen Mediums (CnT-PR-D) für eine Woche unter Verwendung verschiedener Stimuli (Ca^{2+} /FCS, TZ+PD, Ca^{2+}) *in vitro* differenziert. Die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene wurde durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zur Expression des Referenzgens *TBP* angegeben **(A)**. Morphologische Veränderungen sind durch lichtmikroskopische Aufnahmen dargestellt **(B)**.

Auf die Expression von TINCR hat die Verwendung der beiden unterschiedlichen Medien ohne Differenzierungsstimulus keinen Einfluss. Auch die Differenzierungsinduktion durch Ca^{2+} /FCS hat keinen Einfluss auf die Expression von TINCR. In diesem Experiment wurde die Expression sowohl durch die Inkubation der Zellen mit TZ/PD als mit Calciumchlorid alleine induziert. Die Expression von DANCR wurde in diesem Experiment insbesondere durch Ca^{2+} /FCS und Ca^{2+} alleine vermindert. Erwartungsgemäß konnte die Expression der beiden Markergene für urotheliale Differenzierung, *UPK2* und *KRT20*, nur durch Ca^{2+} /FCS induziert werden. Ebenfalls nur durch Ca^{2+} /FCS induziert wurde die Expression von *FOXA1*. Die Expression von *GATA3*, dem anderen Marker für eine luminale Differenzierung in Urothelkarzinomen, verändert sich unter den verschiedenen Differenzierungsprotokollen kaum. Die Expression wird nur durch Ca^{2+} /FCS erhöht, aber viel schwächer als für *FOXA1*. Ein deutlicher Unterschied ist in der Expression von *KRT14* zwischen den beiden verwendeten Medien im unstimulierten Zustand zu sehen. Bereits zuvor wurde beschrieben, dass die HBLAK-Zelllinien im Vergleich zu UP-Kulturen ein hohes basales *KRT14*-Expressionsniveau aufweist (109). Die Expression ist im Differenzierungs-optimierten CnT-PR-2D-Medium deutlich höher gegenüber dem CnT-PR-Medium. Die mit Calciumchlorid-stimulierten Zellen haben eine niedrigere Expression, die TZ/PD-behandelten Zellen ein vergleichbares Expressionsniveau. Die niedrigste *KRT14*-Expression findet sich in den Ca^{2+} /FCS-stimulierten Zellen. Dies könnte bedeuten, dass *KRT14* in diesen Modellen kein optimaler Marker ist um eine squamöse Differenzierung zu identifizieren. Die beiden anderen Markergene für squamöse Differenzierung, *S100A7* und *Involucrin*, werden dagegen nur durch den Stimulus mit Ca^{2+} alleine stark induziert. Diese Beobachtung passt zu der beobachteten Stratifizierung der Zellen. Auch die Expression des Transkriptionsfaktors *ZNF750* wird am stärksten durch Ca^{2+} -Stimulierung induziert. Die Stimulation durch TZ/PD führt ebenfalls zu einer Induktion von *ZNF750*.

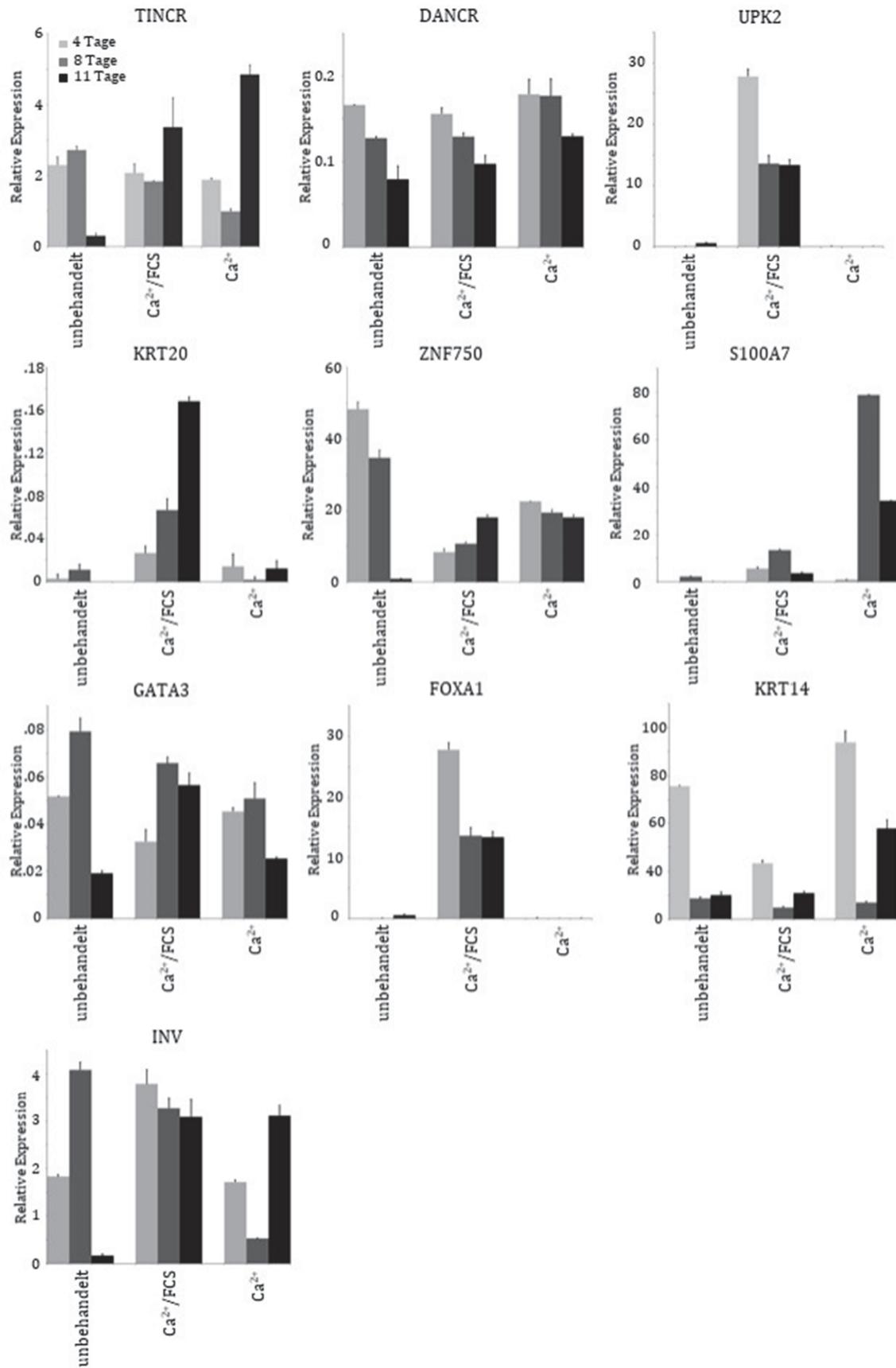


Abb.3.21: Molekulare Charakterisierung der Differenzierung in HBLAK Zellen *in vitro* zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten. HBLAK-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz unter Verwendung eines Differenzierungs-spezifischen Mediums (CnT-PR-D) für 11 Tage unter Verwendung verschiedener Stimuli (Ca^{2+} /FCS, TZ+PD, Ca^{2+}) *in vitro* differenziert. Die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (4 Tage, 8 Tage, 11 Tage) im Zuge der Differenzierung durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zur Expression des Referenzgens *TBP* angegeben.

Da in diesem Experiment nur die Expressionsveränderungen der Markergene zum Ende der Differenzierung nach einer Woche erfasst wurden, wurde das Experiment wiederholt und RNA nach vier, acht und elf Tagen geerntet. Allgemein ist der zeitlich limitierende Faktor in diesen Experimenten die Stimulation der Zellen durch TZ/PD. Durch das fortlaufende Ablösen der Zellen im Differenzierungsprozess und dem mehrfachen Mediumwechsel wären bei einem längeren Zeitraum nicht mehr genügend Zellen vorhanden um ausreichende RNA-Mengen zu isolieren. Die phänotypischen Veränderungen in diesem Experiment waren identisch mit den zuvor beschriebenen. In diesem Experiment wurde die Expression von TINCR vor allem in den mit TZ/PD-stimulierten Zellen induziert und bleibt im Zeitverlauf konstant. In den Ca^{2+} -stimulierten Zellen wurde TINCR in diesem Experiment erst nach elf Tagen induziert. Die Expression in den nicht-stimulierten Zellen war nach 11 Tagen deutlich vermindert gegenüber den vorigen beiden Zeitpunkten. Die Expression von DANCR wurde in diesem Experiment ebenfalls durch TZ/PD stimuliert, nahm jedoch in allen Konditionen über den Zeitverlauf hinweg ab. Wie zuvor beobachtet wurde die Expression von UPK2, KRT20 und FOXA1 nur durch Ca^{2+} /FCS-Stimulation induziert. Bei UPK2 und FOXA1 war sie dabei an Tag 4 am höchsten und sank dann wieder auf ein konstantes Niveau ab. KRT20 nahm im Zeitverlauf dagegen kontinuierlich zu. Die Expression von GATA3 war in diesem Experiment kaum verändert, am deutlichsten in den nicht-stimulierten Zellen: am höchsten wurde GATA3 an Tag 8 exprimiert und sank anschließend sogar unter dem Niveau von Tag 4. KRT14 war in allen Konditionen an Tag 4 am höchsten exprimiert. Die Expression sank daraufhin deutlich ab. Am niedrigsten war die KRT14-Expression in den Ca^{2+} /FCS-stimulierten Zellen. Die Expression von S100A7 wurde wie zuvor vor allem durch Ca^{2+} induziert, wobei die Expression an Tag 8 am höchsten war. Involucrin wurde in diesem Experiment nur durch TZ/PD induziert, nicht jedoch durch Ca^{2+} . Involucrin ist als Zielgen von TINCR beschrieben (44). Da in diesem Fall auch TINCR nicht durch Ca^{2+} induziert wurde, könnte dies eine Erklärung sein, warum dies auch für Involucrin der Fall war. Unter TZ/PD-Stimulation stieg die Expression von Involucrin dagegen im Zeitverlauf kontinuierlich an.

Auch die Expression von ZNF750 wurde durch TZ/PD kontinuierlich induziert. In den nicht-stimulierten Zellen war die Expression von ZNF750 an Tag 4 auf einem ähnlich hohen Niveau wie unter TZ/PD-Stimulation, sank dann aber kontinuierlich ab.

A

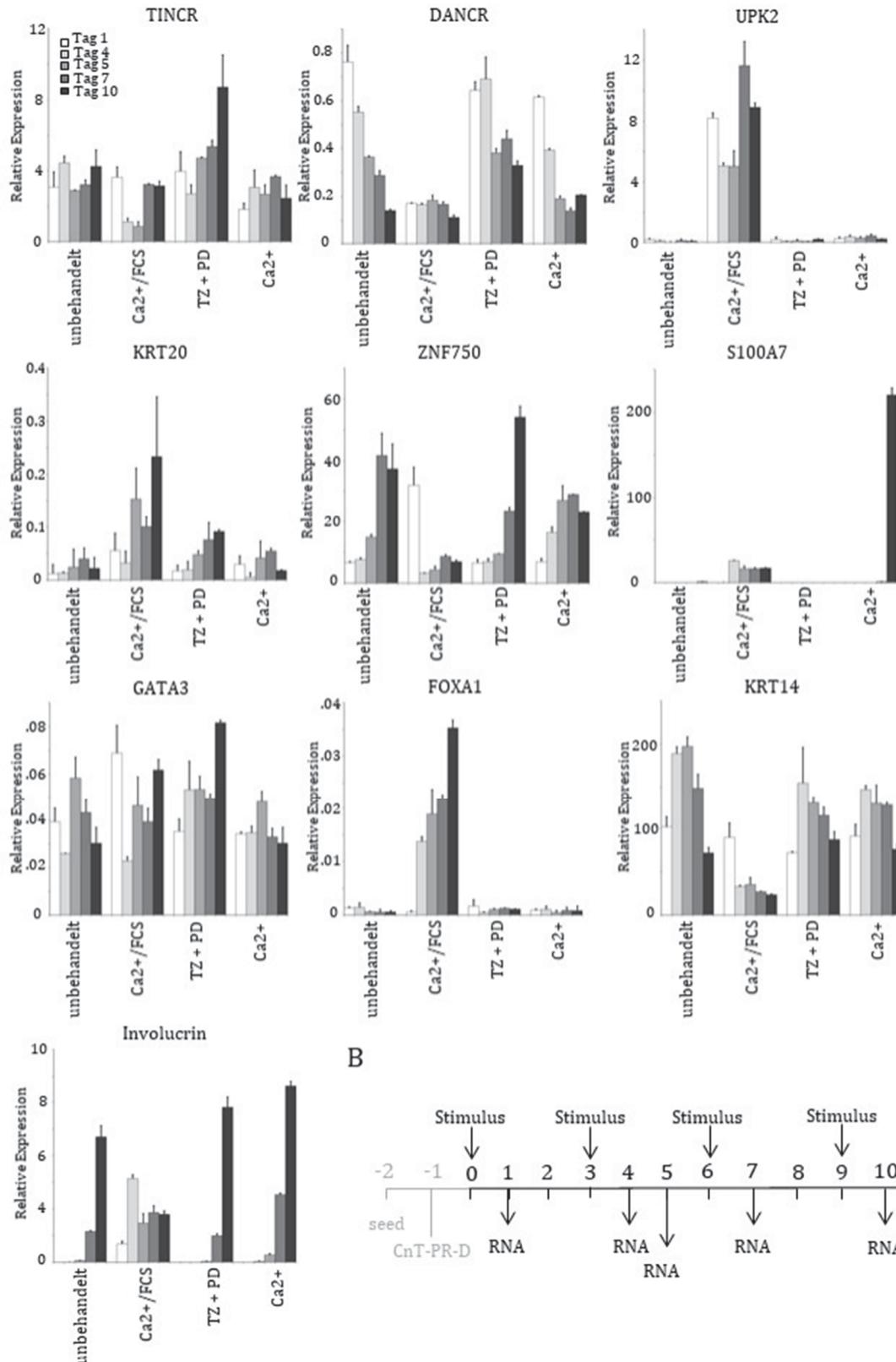


Abb.3.22: Molekulare Charakterisierung der Differenzierung in HBLAK Zellen *in vitro* zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten. HBLAK-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz unter Verwendung eines Differenzierungs-spezifischen Mediums (CnT-PR-D) für 10 Tage Verwendung verschiedener Stimuli (Ca^{2+} /FCS, TZ+PD, Ca^{2+}) *in vitro* differenziert. Die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Zuge der Differenzierung durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zur Expression des Referenzgens TBP angegeben (A). Der genaue Zeitverlauf in Bezug auf Stimulusgabe und RNA-Extraktion ist in (B) schematisch aufgeführt.

Die in diesem Experiment beobachteten Expressionsschwankungen deuteten darauf hin, dass die Zeitpunkte der jeweiligen Stimulusgabe und die Zeitpunkte der RNA-Isolation kritische Faktoren sind. Diese Faktoren wurden daher in den folgenden Experimenten vereinheitlicht wie in Abbildung 3.22B dargestellt. Mediumwechsel und Differenzierungsstimulus erfolgten alle drei Tage, die RNA-Isolation jeweils am darauffolgenden Tag, sodass über einen Zeitraum von zehn Tagen insgesamt vier Mal stimuliert wurde. Die phänotypischen Veränderungen erfolgten auch in diesem Experiment wie zuvor beschrieben. Die Expression von TINCR wurde wiederum nur durch Stimulation der Zellen mit TZ/PD induziert. In den nicht-stimulierten Zellen veränderte sich die TINCR-Expression im Zeitverlauf nicht wesentlich. Ebenso hatte auch die Stimulation mit Calciumchlorid in diesem Experiment keinen Einfluss auf die TINCR-Expression. In den Zellen, die mit Ca^{2+} /FCS stimuliert wurden, wurde die TINCR-Expression insbesondere nach Tag vier und fünf herunter reguliert. Die Expression von DANCR nahm in allen Konditionen mit Ausnahme von Ca^{2+} /FCS im Zeitverlauf mit gewissen Schwankungen ab. Bei den mit Ca^{2+} /FCS-stimulierten Zellen war die DANCR-Expression bereits einen Tag nach der ersten Stimulation sehr niedrig und blieb im Zeitverlauf auf diesem Niveau. Wie in den Versuchen zuvor wurde die Expression von UPK2, KRT20 und FOXA1 auch in diesem Versuch nur durch Ca^{2+} /FCS induziert. Die Expression von GATA3 wurde nicht wesentlich durch die unterschiedlichen Differenzierungs-Stimuli beeinflusst. KRT14 wurde vor allem bei Stimulation durch Ca^{2+} /FCS im Zeitverlauf vermindert. Die Expression von S100A7 wurde wie zuvor durch Ca^{2+} /FCS induziert, eine besonders starke Steigerung wurde aber nur durch Stimulation mit Calciumchlorid allein hervorgerufen. Dabei wurde der höchste Wert nach zehn Tagen erreicht. Die ZNF750-Expression stieg in allen Konditionen mit Ausnahme von Ca^{2+} /FCS über die Zeit hinweg an, wobei die größte Steigerung durch Stimulation mit TZ/PD erreicht wurde. In den Ca^{2+} /FCS-stimulierten Zellen war die Expression am ersten Tag am höchsten, fiel darauf hin jedoch auf einen konstant niedrigen Wert. Auch die Expression

von Involucrin stieg in allen Konditionen, auch in den nicht-stimulierten Zellen, über die Zeit hinweg an. Nur in den Ca^{2+} /FCS-stimulierten Zellen blieb die Involucrin-Expression auf einem konstanten Niveau erhalten.

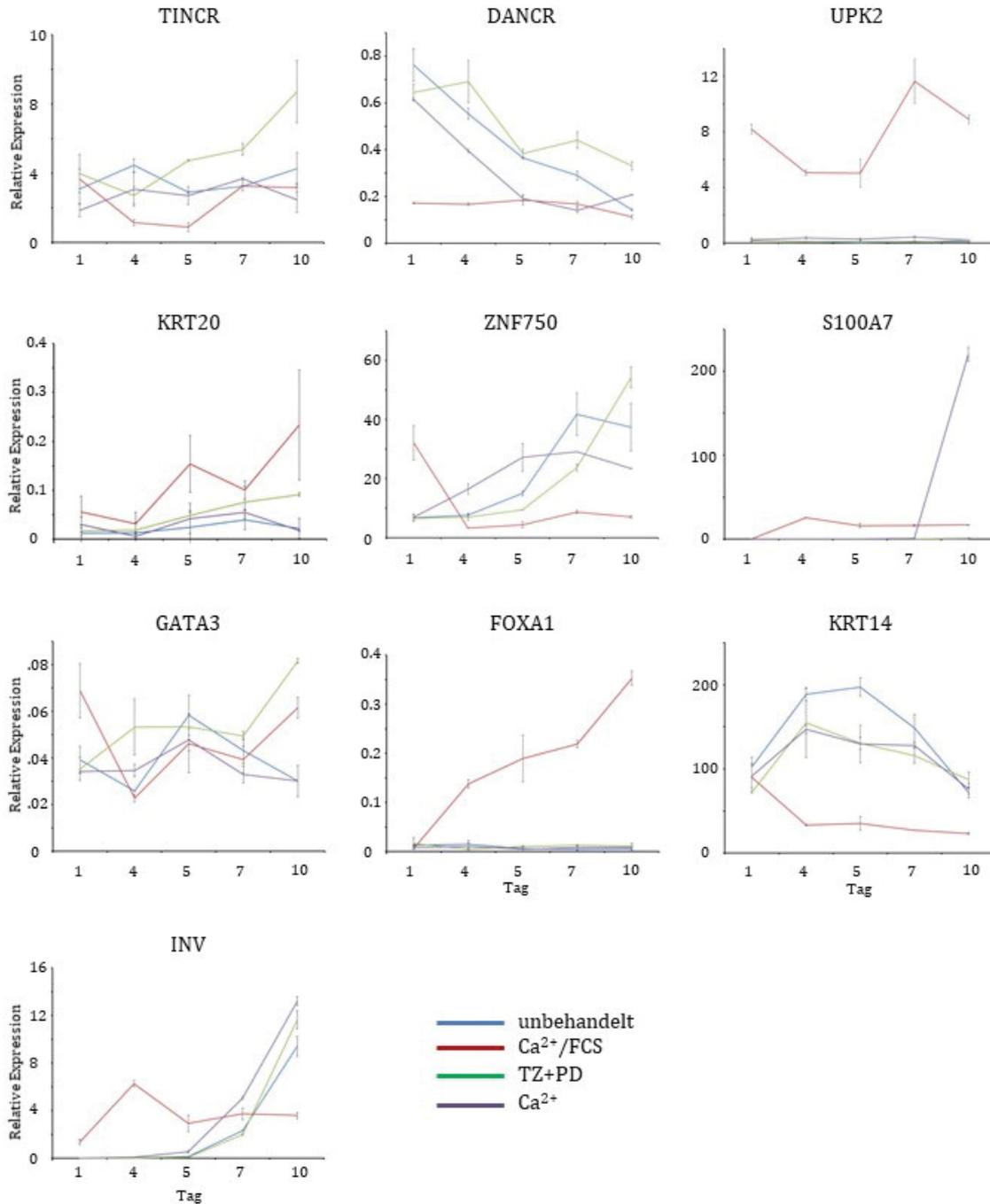


Abb.3.23: Expressionsänderungen Differenzierungs-assoziiertes Markergene im Zeitverlauf. Die in Abb. 3.22 dargestellte Expression Differenzierungs-assoziiertes Markergene im Zuge der *in vitro*-Differenzierung von HBLAK-Zellen wurden normalisiert zu der unbehandelten Kontrolle an Tag 1 im Zeitverlauf aufgetragen.

Zur besseren Übersicht der Veränderungen im Zeitverlauf wurde die Expression der einzelnen Markergene in Abbildung 3.23 zusätzlich als Zeitkurven dargestellt. In dieser Auftragung fallen die abweichenden Expressionsveränderungen einzelner Markergene unter Ca^{2+} /FCS-induzierter Differenzierung gegenüber den anderen Differenzierungsprotokollen besonders auf. Während die Expression von lncRNA DANCR unter den verschiedenen Stimuli zu Beginn (Tag 1) hoch ist und im Zeitverlauf abnimmt, ist die Expression unter Ca^{2+} /FCS-Behandlung bereits zu Beginn niedrig und ändert sich im Zeitverlauf nicht. Im Gegensatz dazu ist die Expression von ZNF750 unter den verschiedenen Stimuli zu Beginn niedrig und nimmt im Zeitverlauf unterschiedlich stark zu mit Ausnahme der Ca^{2+} /FCS-induzierten Differenzierung: in diesem Fall verläuft die Expressionsänderung genau umgekehrt. Involucrin wird von den Zellen zu Beginn nicht exprimiert, wird jedoch während im Zeitverlauf deutlich induziert, auch in den unbehandelten Zellen. Anders in der Ca^{2+} /FCS-induzierten Differenzierung, wo bereits einen Tag nach Start des Experiments die Expression induziert wurde und sich im Zeitverlauf auf einem gewissen Niveau stabilisiert. Dabei wird jedoch nicht dieselbe Expressionshöhe erreicht wie durch die anderen Kultivierungsbedingungen.

3.10.3 Vergleich urothelialer Differenzierung mit Keratinozyten-Differenzierung anhand des HaCaT-Modells

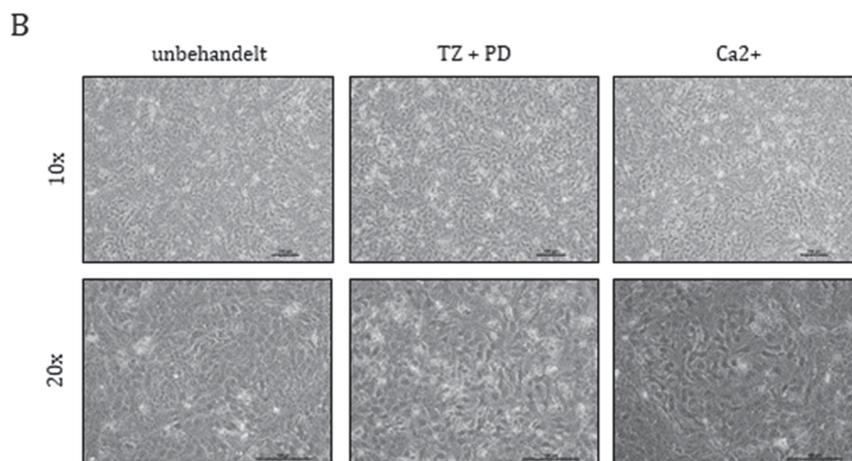
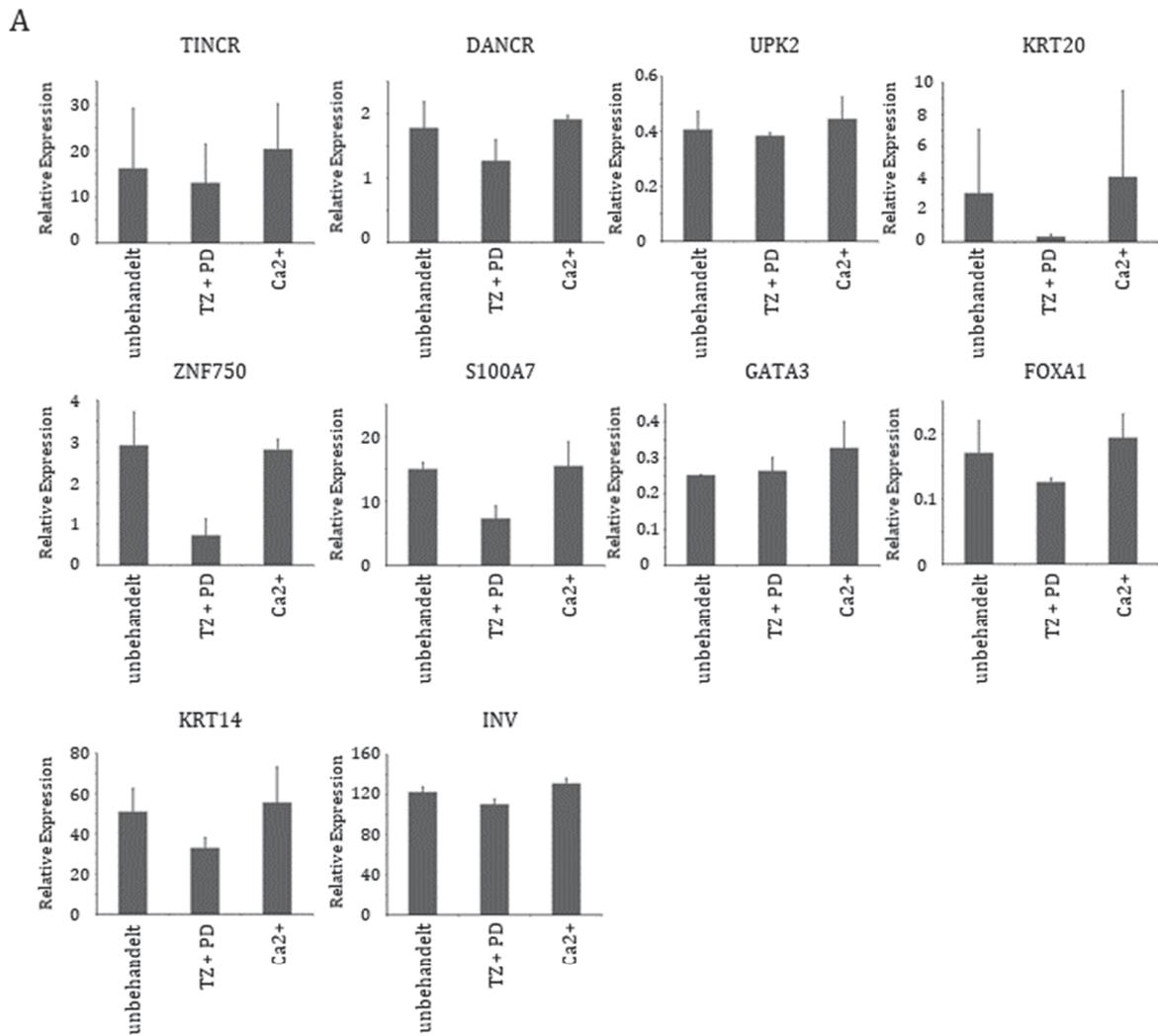


Abb.3.24: Molekulare Charakterisierung der in vitro Keratinozyten-Differenzierung in HaCaT-Zellen. HaCaT-Zellen wurden für eine Woche unter konfluenten Bedingungen kultiviert und im Vergleich zur urothelialen Differenzierung ebenso mit Troglitazone und PD153035 (TZ+PD) sowie einer erhöhten Calcium-Konzentration zur Differenzierung stimuliert. Morphologische Veränderungen sind durch lichtmikroskopische Aufnahmen dargestellt (B). Die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene aus zwei unabhängigen Versuchen wurde durch qRT-PCR bestimmt und ist relativ zu der Expression des Referenzgens *TPB* angegeben (A).

Da ein wesentlicher Fokus dieses Projektes auf der plattenepithelialen Fehldifferenzierung des Urothels lag, wurde auch „echte“ plattenepitheliale Differenzierung anhand des HaCaT-Modells untersucht. HaCaT-Zellen differenzieren, wenn sie länger als 24 Stunden konfluent sind sowie durch einer erhöhten Calcium-Konzentration im Medium (135). Die Differenzierung ist dabei vor allem morphologisch durch das Auftreten von mehrlagigen Zellschichten gekennzeichnet wie es in Abb.3.24B ansatzweise zu erkennen ist. Zusätzlich wurden die Zellen mit Troglitazone und PD153035 wie in den Modellen der urothelialen Differenzierung behandelt. Die Behandlung mit TZ/PD führt dazu, dass die Zellen deutlich weniger mehrschichtige Strukturen bilden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen sowie den Calcium-behandelten Zellen (Abb.3.24B). Die Differenzierung wurde in zwei unabhängigen Versuchen über einen Zeitraum von jeweils einer Woche durchgeführt. Die Ergebnisse der Expressionsmessung auf RNA-Ebene für die verschiedenen Differenzierungs-assoziierten Gene sind in Abb. 3.24A aufgeführt. Zwischen den unbehandelten und den Calcium-behandelten Zellen gibt es über alle untersuchten Gene hinweg keine Unterschiede mit Ausnahme der Expression von *TINCR*. In diesem Fall schwankt die Expression in beiden Versuchen über alle Bedingungen hinweg. Die deutlichsten Veränderungen der Expression der Differenzierungs-assoziierten Gene wurden durch TZ/PD-Behandlung beobachtet. Davon betroffen sind insbesondere Gene, die im Zusammenhang mit plattenepithelialer Differenzierung stehen: *ZNF750*, *S100A7* und *KRT14* wurden unter TZ/PD-Behandlung deutlich herunterreguliert gegenüber unbehandelten und Calcium-behandelten Zellen.

3.11. Bedeutung der lncRNAs TINCR und DANCR während der urothelialen Differenzierung und Karzinogenese

3.11.1 TINCR-/DANCR-Expression im Urothelkarzinom im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Bereits in Abschnitt 3 wurde auf Veränderungen der beiden lncRNAs TINCR und DANCR während der urothelialen Differenzierung eingegangen. In diesem Abschnitt soll es darum gehen, welchen Einfluss beide lncRNAs auf die urotheliale Karzinogenese ausüben. Dazu wurde die Expression beider lncRNAs mittels qRT-PCR in einer größeren Gewebeserie gemessen und mit RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA sowohl für das Urothelkarzinom (BLCA) als auch für Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich (HNSC) verglichen. Darüber hinaus wurden die Expressionsdaten wie zuvor mit den klinischen Daten der Patienten korreliert. Neben der größeren Gewebeserie mit Tumorproben aus Urothelkarzinomen, stand für diese Untersuchung auch eine kleinere Serie (n=12) mit Proben zur Verfügung, bei denen es sich um reine plattenepitheliale Karzinome der Harnblase (UC-SCC) handelt.

Die Expressionsmessung in diesen Gewebeserien ergab, dass beide lncRNAs im Urothelkarzinom überexprimiert sind, wobei dieser Befund im Falle von TINCR nur in der TCGA-Kohorte statistisch signifikant ist. Die Hochregulation der Expression in den Tumorproben gegenüber den benignen Kontrollen ist auch in den squamösen Urothelkarzinomen zu finden (UC-SCC). Bei den Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich sind beide lncRNAs in den Tumorproben tendenziell niedriger exprimiert gegenüber den Normalproben, jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Korrelation der Expressionsdaten aus der größeren Gewebeserie, die mittels qRT-PCR analysiert wurde, ergab keinen Zusammenhang zwischen lncRNA-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten, wie auch aus den Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 3.25B hervorgeht. Dieser Befund bestätigte sich in den TCGA-Daten. Die Kaplan-Meier-Kurven wurden über die TANRIC-Datenbank abgerufen. Sowohl aus der univariaten als auch der multivariaten Analyse geht jedoch hervor, dass eine hohe TINCR-Expression mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf das Metastasen-freie Überleben einhergeht.

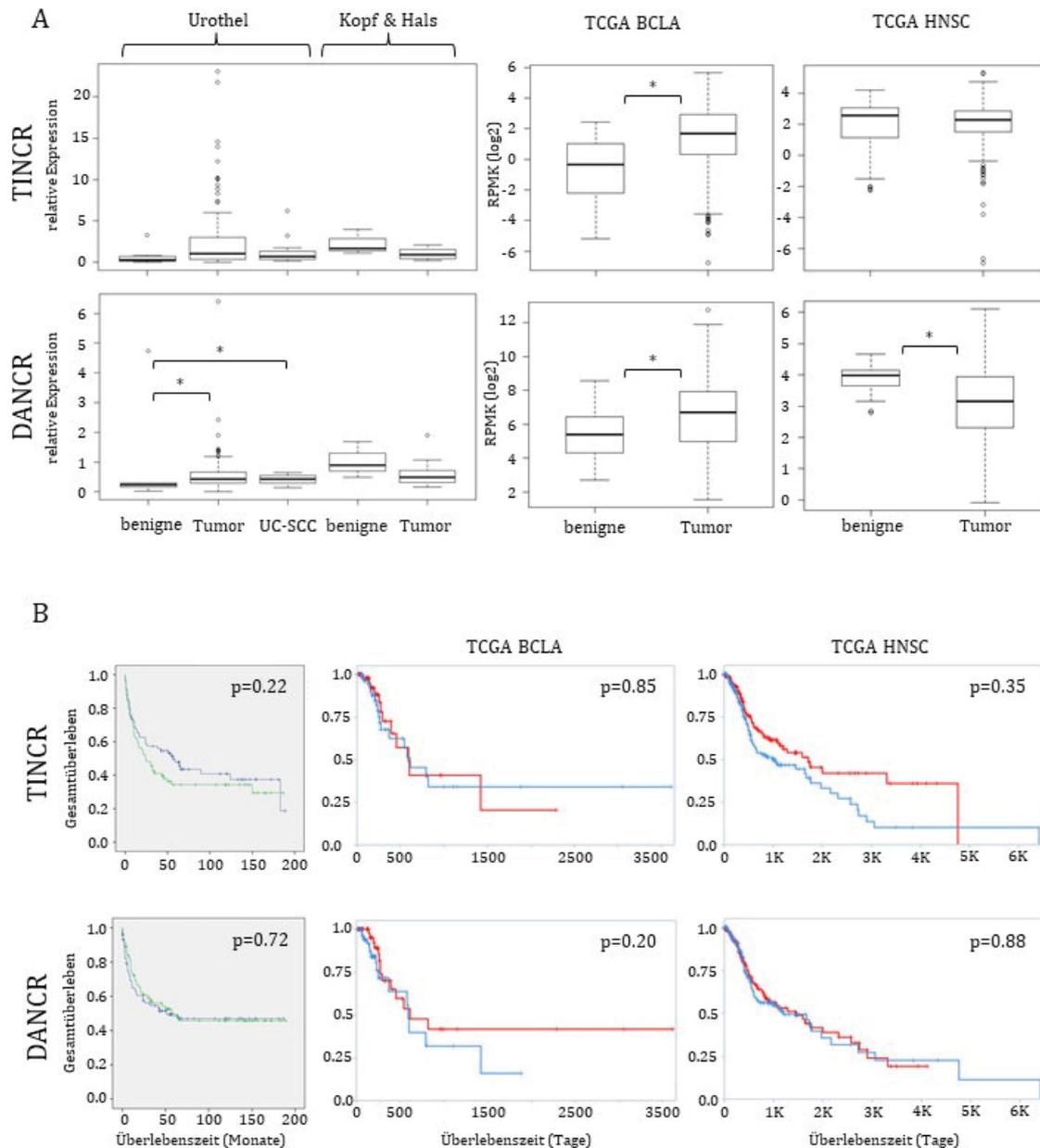


Abb.3.25: TINCR-/DANCR-Expression in Urothelkarzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen. Die Expression der lncRNAs TINCR und DANCR wurde mittels qRT-PCR in acht benignen Urothelgeweben, 161 Geweben von Urothelkarzinomen, 12 Geweben von Plattenepithelkarzinomen der Harnblase und drei benignen Schleimhautgeweben aus dem Kopf-Hals-Bereich sowie sieben Kopf-Hals-Tumorgewebeproben ermittelt. **(A)** Die Expression ist relativ zu dem geometrischen Mittel der *TBP* und *SDHA* Expression aufgetragen. Im Vergleich wurde für beide Tumorentitäten RNA-Seq-Daten, angegeben als Logarithmus der *reads per million mapped reads* (RPMK), aus der TCGA-Kohorte über die TANRIC-Datenbank abgerufen. Diese umfasst 19 benigne und 252 Tumor-Gewebe für das Blasenkarzinom (BLCA) sowie 42 benigne und 426 Tumor-Gewebe für die Kopf-Hals-Tumore (HNSC). **(B)** Es wurden Kaplan-Meier-Kurven für Tumorgewebe, die mittels qRT-PCR analysiert wurden, erstellt. Die Patienten wurden anhand der medianen lncRNA-Expression in hohe (grün) und niedrige (blau) Expression eingeteilt. Der p-Wert ist für Cox-Regressionsanalysen angegeben, die Überlebenszeit in Monaten. Kaplan-Meier-Kurven für die TCGA-Kohorten beider Tumorentitäten (BCLA, HNSC) wurden der TANRIC-Datenbank entnommen (rot=hohe Expression, blau=niedrige Expression).

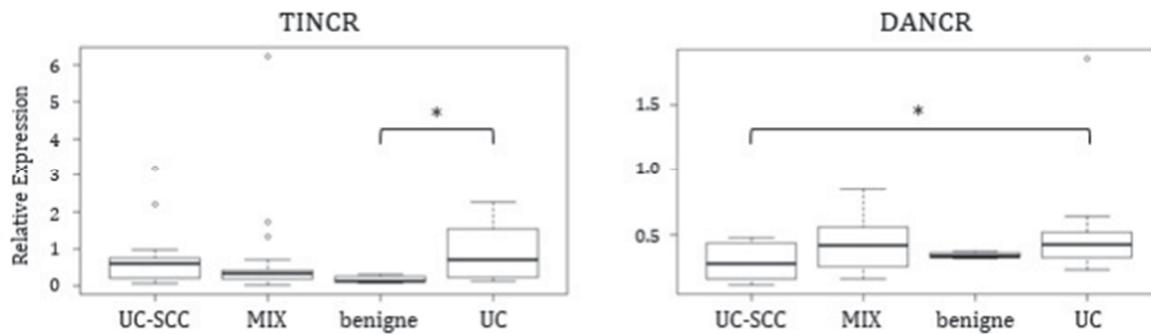


Abb.3.26: TINCR-/DANCR-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Harnblase. Die Expression der lncRNAs TINCR und DANCR wurde mittels qRT-PCR in 14 reinen Plattenepithelkarzinomen der Harnblase (UC-SCC), 17 Tumoren mit einem plattenepithelialen Anteil (MIX), vier benignen urothelialen Geweben sowie elf Urothelkarzinomen ermittelt. Die Expression ist relativ zu dem geometrischen Mittel der TBP- und SDHA-Expression aufgetragen

Die lncRNA-Expression, ermittelt via qRT-PCR, in einem kleineren Gewebeset mit Fokus auf plattenepithelialer Differenzierung zeigt, dass es durchaus einen Unterschied in der medianen Expression geben könnte zwischen Tumoren, die eine rein plattenepitheliale Histologie aufweisen gegenüber Tumoren mit gemischter Histologie, auch wenn die Unterschiede weder für die TINCR noch für die DANCR Expression statistisch signifikant sind (Abb.3.26). Statistisch signifikant in dieser kleinen Gewebeserie ist jedoch der Unterschied zwischen der DANCR-Expression in UC-SCC-Tumoren im Vergleich zu Urothelkarzinomen: in UC-SCC-Tumoren ist DANCR schwächer exprimiert, auch wenn der Unterschied marginal ist.

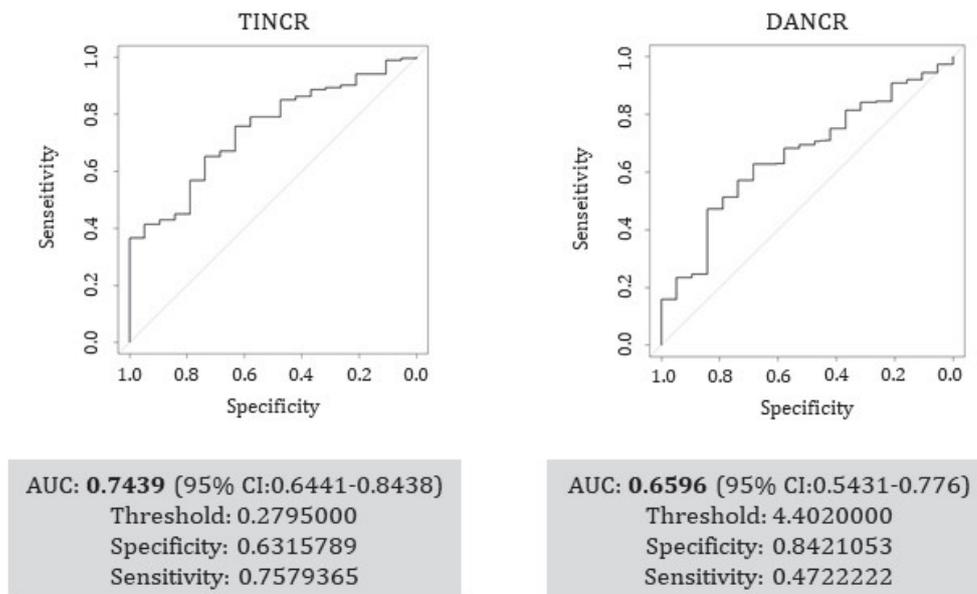


Abb.3.27: Eignung der TINCR- bzw. DANCR-Expression als diagnostische Biomarker im Urothelkarzinom. Es wurden ROC-Kurven-Analysen für die Expression von TINCR bzw. DANCR aus den RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA-Kohorte für das UC zur Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe durchgeführt. Angegeben ist jeweils die *Area under the Curve* (AUC) mit dem dazugehörigen 95 %igen Konfidenzintervall (CI). Angegeben ist zudem der berechnete *beste Cut-off-Wert (Threshold)* mit der jeweiligen Spezifität und Sensitivität.

Um zu analysieren, ob die gefundene Überexpression der beiden lncRNAs im Blasenkarzinom als Diagnosekriterium geeignet ist, wurde eine *Receiver-Operating-Kurven-Analyse* (ROC-Analyse), auch Grenzwertoptimierungskurve genannt, für die Expressionswerte der TCGA-Kohorte, die über die TANRIC-Datenbank abgefragt wurden, durchgeführt. Dabei soll überprüft werden, ob ein und welcher Expressionswert geeignet ist zwischen Tumor- und Normalgewebe zu unterscheiden. Die *Area Under the Curve* (AUC) beträgt für TINCR 0.74 und für DANCR 0.65. In beiden Fällen liegt dieser Wert innerhalb des 95%-igen Konfidenzintervalls. Die Berechnung des besten Trennwertes aus dieser ROC-Analyse ergab für TINCR einen Wert von 0.28 und für DANCR 4.40 (relative Expression). In beiden Fällen liegt dieser Wert deutlich unterhalb des ermittelten Medians der Tumorproben.

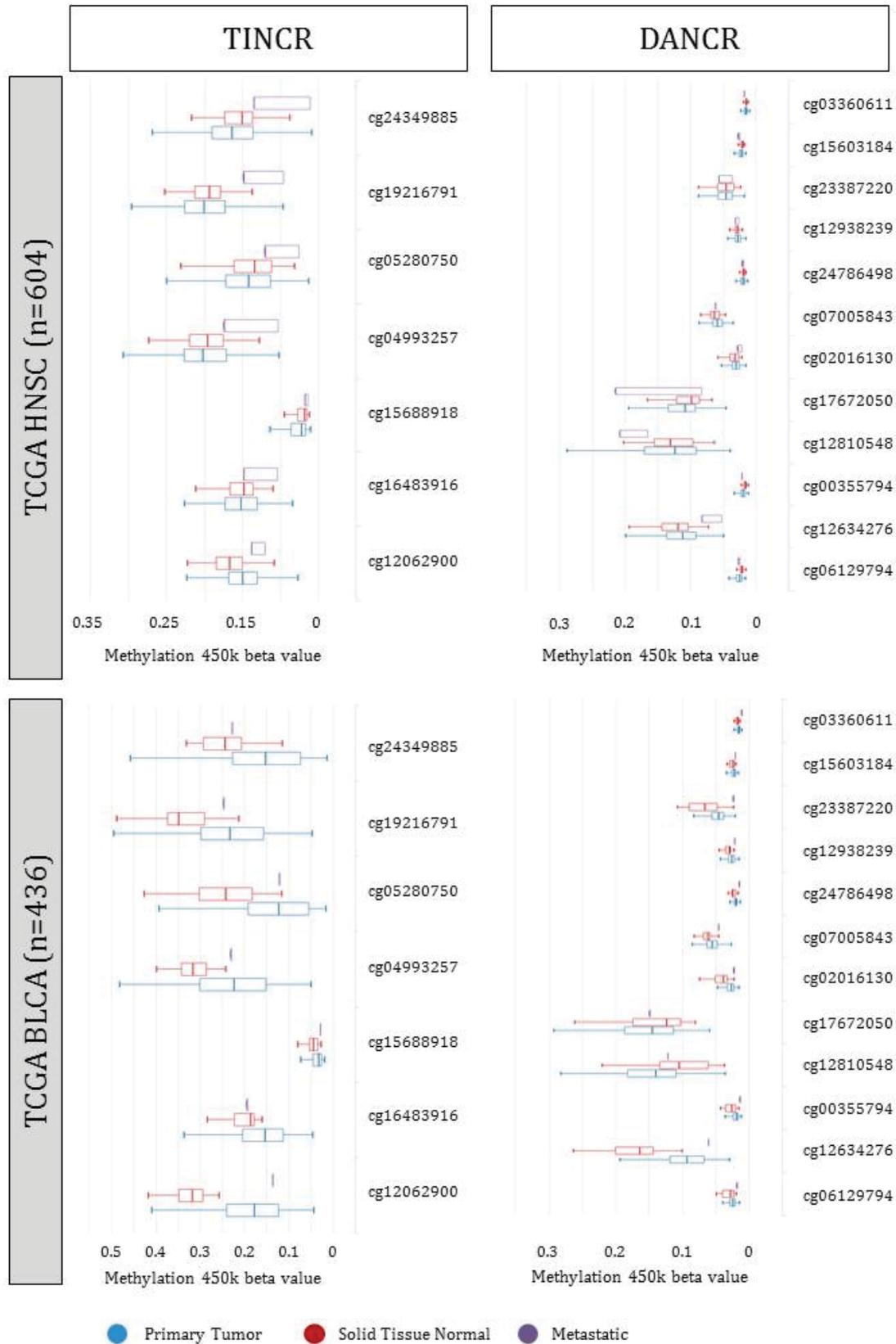


Abb.3.28: DNA-Methylierungsgrad einzelner CpG-Stellen für TINCR und DANCR in Gewebeproben der TCGA-Kohorten für Blasenkarzinome (BLCA) und Kopf-Hals-Tumor (HNSC). Die Boxplots für primäre Tumor (blau), Normalgewebe (rot) und Metastasen (violett) wurden dem UCSC-Xena-Browser entnommen und stellen den DNA-Methylierungsgrad als *beta-value* dar. Stand Juli 2018

Des Weiteren wurde die *in silico* Analyse des DNA-Methylierungsmusters (vgl. 3.9) von TINCR und DANCR auf die TCGA-Kohorte der Kopf-Hals-Tumore ausgeweitet. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse basierend auf 450k-Methylierungsarray-Daten für einzelne CpG-Stellen sind in Abb. 3.28 dargestellt. Bei der anschließenden statistischen Analyse über die Mediane aller betrachteten CpG-Stellen für das jeweilige Gen in der jeweiligen Kohorte hinweg bestätigte sich das Ergebnis aus Kapitel 3.9, dass nur im Falle von TINCR im Urothelkarzinom eine Hypomethylierung vorliegt, wie bereits in den Boxplots der einzelnen CpG-Stellen zu erkennen ist. Für Kopf-Hals-Tumore trifft diese Beobachtung nicht zu. Eine Ausnahme in beiden Tumorentitäten bildet cg15688918, die in beiden Entitäten sowohl in Tumoren als auch im Normalgewebe eine deutlich verminderte Methylierung gegenüber den übrigen CpG-Stellen aufweist. Hierbei handelt es sich um eine CpG-Stelle in der vermuteten Promotorregion von TINCR, die von allen in dieser Region befindlichen CpG-Stellen dem Transkriptionsstart am nächsten gelegen ist.

Tabelle 19: Mediane DNA-Methylierung der TINCR- und DANCR-Gene in Tumor- (T) und Normalgewebe-Proben (N) über alle analysierten CpG-Stellen hinweg. Die Werte wurden dem UCSC XenaBrowser für die TCGA-Kohorten des Blasenkarzinoms (BLCA, 436 samples) und der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSC, 604 samples) entnommen. Der p-Wert wurde mittels Wilcoxon-Rank-sum-Test in R berechnet.

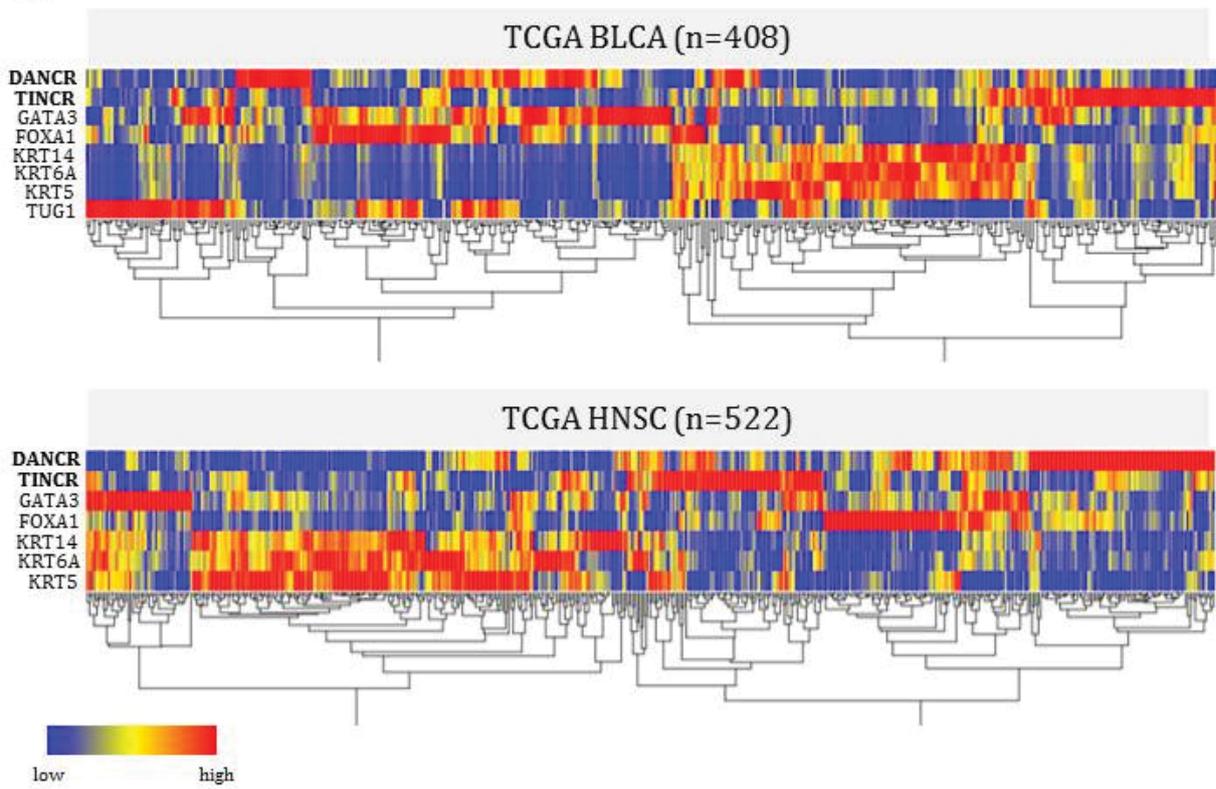
		Median N	Median T	Wilcox p
BLCA	TINCR	0.244	0.153	0.038
	DANCR	0.029	0.025	0.259
HNSC	TINCR	0.199	0.202	0.71
	DANCR	0.029	0.028	0.887

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der lncRNAs und dem Auftreten von plattenepithelialen Tumoren näher zu betrachten, wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit den TCGA-Daten in Bezug auf den basal-squamösen-Subtyp des Urothelkarzinoms durchgeführt. Dieser molekulare Subtyp ist durch eine hohe Expression der squamösen Markergene KRT14, KRT6 und KRT5 bei gleichzeitig niedriger Expression der luminalen Markergene FOXA1 und GATA3 charakterisiert. Die Expressionsdaten aus der RNA-Sequenzierungsanalyse der TCGA wurden über die cbiportal-Website heruntergeladen und hierarchische Clusteranalysen mit dem Morpheus-Online-Tool des *Broad Institute* durchgeführt. Aus dieser Analyse ergab sich tatsächlich ein Zusammenhang der TINCR-Expression mit dem BASQ-Subtyp: Tumore, die

diesen Subtyp aufweisen, haben eine intermediäre TINCR-Expression. Tumore, die eine besonders hohe TINCR-Expression aufweisen, haben diesen Subtyp dagegen nicht. Als interne Kontrolle wurde die Expression der lncRNA TUG1 mit einbezogen, die in Tumoren mit BASQ-Subtyp niedrig exprimiert ist, wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Obwohl TINCR und DANCR über alle Tumore hinweg betrachtet hochreguliert sind, ist die Expression innerhalb individueller Tumore eher gegenläufig: Tumore mit hoher TINCR-Expression haben eher eine niedrige DANCR-Expression und umgekehrt. Die beschriebenen Zusammenhänge bestätigen sich auch bei einer hierarchischen Clusteranalyse der in Kapitel 3 beschriebenen Differenzierungs-assoziierten Markergene. Das bedeutet, dass Tumore mit einer hohen TINCR-Expression und niedriger DANCR-Expression eine hohe Expression der squamösen Markergene KRT14, S100A7 und ZNF750 aufweisen bei gleichzeitig niedriger Expression von FOXA1 und GATA3. Die urothelialen Markergene KRT20 und UPK2 sind in fast allen Tumorproben exprimiert, wenn auch unterschiedlich stark.

Als Vergleich wurden die Analysen auch mit den RNA-Seq Daten für Kopf-Hals-Karzinome (TCGA HNSC) durchgeführt. Eine gegenläufige Expression von TINCR und DANCR ist in dieser Tumorentität nicht zu finden. Auffällig ist, dass Tumoren dieser Entität mit hoher Expression von KRT14, KRT6A und KRT5 eine niedrige Expression der beiden lncRNAs aufweisen (Abb. 3.29A). Dieser Zusammenhang für KRT14 bleibt auch bestehen, analysiert man die Expression in Bezug auf die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene (Abb. 3.29B). Ein ganz ähnliches Muster weist auch die Expression von S100A7 auf.

A



B

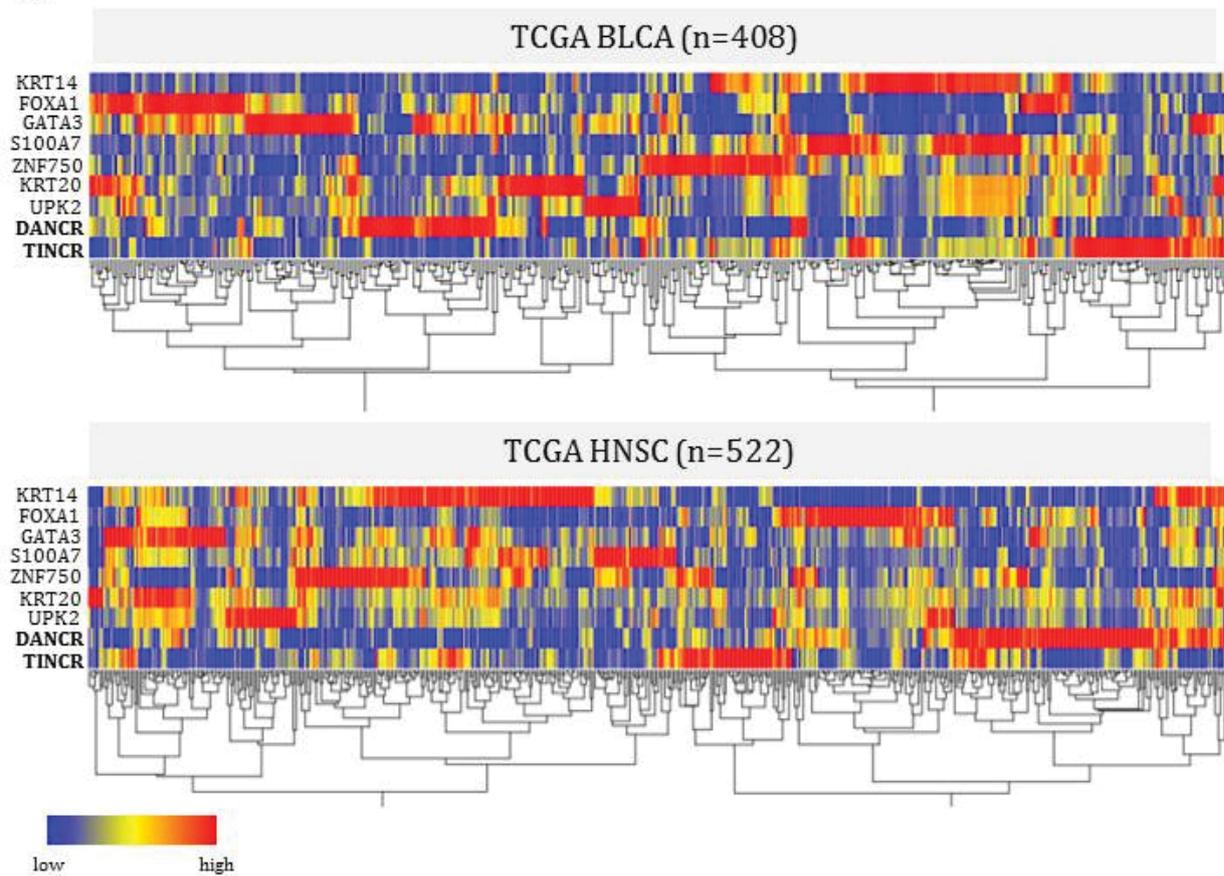


Abb.3.29: Clusteranalyse der Expression von TINCR & DANCR mit Differenzierungs-assoziierten Genen. Mit Hilfe des *Morpheus*-Online-Tools wurden hierarchische Clusteranalysen der RNA-Seq-Expressionsdaten aus den TCGA-Kohorten für das Harnblasenkarzinom (BLCA) und Kopf-Hals-Tumore (HNSC) für TINCR/DANCR und die Gene, die den basal-squamösen Subtyp (BASQ) in Urothelkarzinomen charakterisieren (A), und den Differenzierungs-assoziierten Genen, die im Zuge dieser Arbeit identifiziert wurden (B). Eine blaue Färbung steht dabei für eine niedrige Expression innerhalb einer Tumorprobe, rot für eine hohe.

Um eine mögliche Assoziation der Expression der beiden lncRNAs mit anderen molekularen Subtypen des Urothelkarzinoms zu finden, wurde eine hierarchische Cluster-Analyse der lncRNA-Expression (inkl. TUG1) für das Markergen-Panel für den basalen, den luminalen, den p53-like und den Claudin-assoziierten Subtypen (entsprechend Dadhania et al., (29)) durchgeführt (Abb.3.30). In dieser Analyse zeigt sich eine heterogene Expression von TINCR, die keinem der molekularen Subtypen eindeutig zugeordnet werden kann. DANCR hingegen ist in Tumoren mit basalem Subtyp eher niedrig exprimiert. Eine höhere DANCR-Expression findet sich hingegen in Tumoren, die dem luminalen Subtyp zuzuordnen sind.

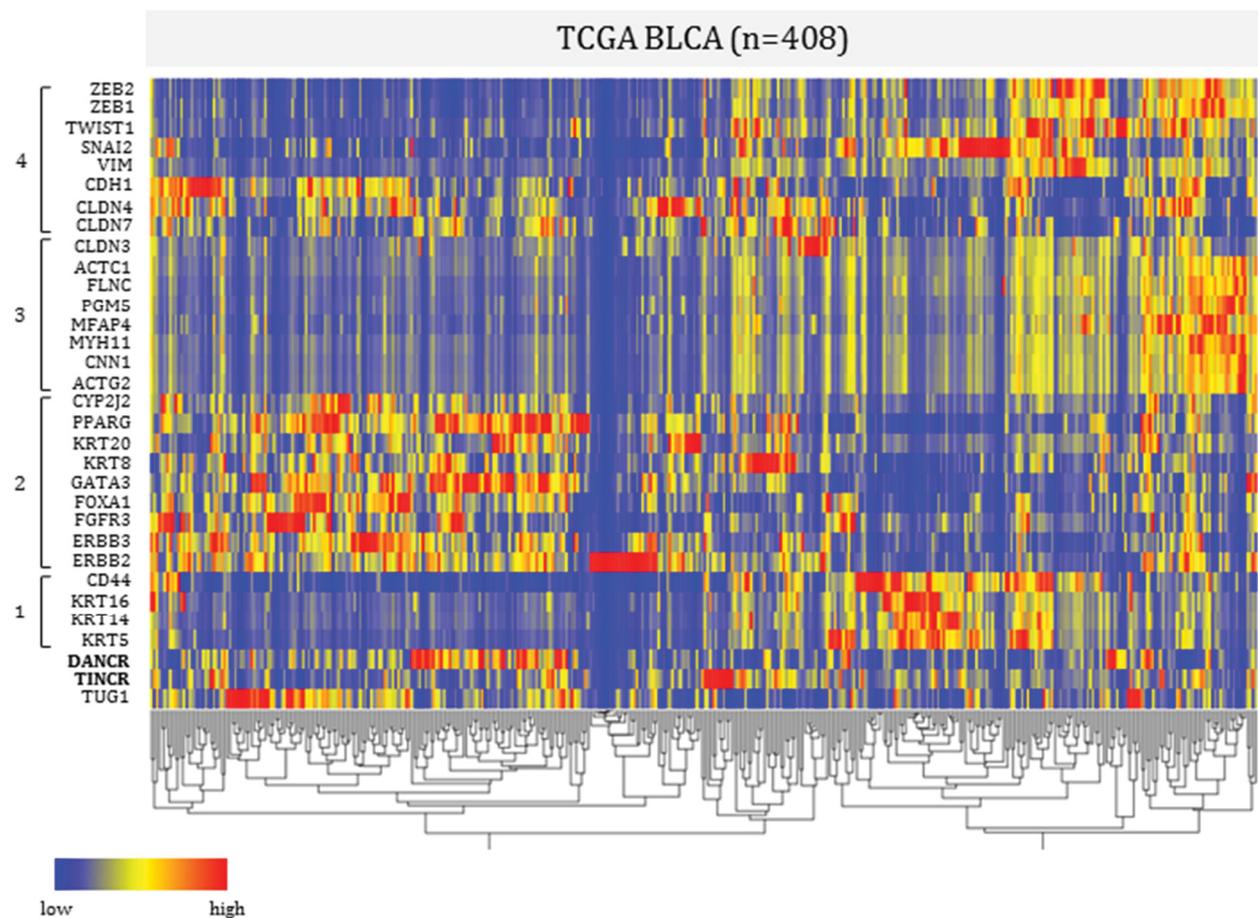


Abb.3.30: Clusteranalyse der Expression von TINCR & DANCR mit Subtypen-assoziierten Genen. Mit Hilfe des *Morpheus*-Online-Tools wurden hierarchische Clusteranalysen der RNA-Seq-Expressionsdaten aus den TCGA-Kohorten für das Harnblasenkarzinom (BLCA) für TINCR/DANCR und Genen erstellt, die nach Dhadania et al. unterschiedliche molekulare Subtypen des Harnblasenkarzinoms charakterisieren (1=basal, 2=luminal, 3=p53-like, 4=Claudin-like). Eine blaue Färbung steht dabei für eine niedrige Expression innerhalb einer Tumorprobe, rot für eine hohe.

Über die TANRIC-Datenbank wurde zudem abgefragt, dass keine Assoziation der lncRNA-Expression mit einer HPV-Infektion in Kopf-Hals-Tumoren vorliegt (nicht dargestellt).

3.11.2 TINCR/DANCR-Expression in verschiedenen Tumorentitäten

Trotz ihrer wichtigen Rolle in der Homöostase der epidermalen Differenzierung sind die lncRNAs TINCR und DANCR in Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich im Gegensatz zum Urothelkarzinom nicht differentiell exprimiert. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die beiden lncRNAs auch in anderen Tumorentitäten differentiell exprimiert sind. Dazu wurde die Expression in allen in der TANRIC-Datenbank zur Verfügung stehenden Datensätzen analysiert und als Boxplots in den Abbildungen 3.31 und 3.32 dargestellt. Eine Zusammenfassung über die ausgewerteten Datensätze befindet sich in Tabelle 18.

Tabelle 20: Übersicht über die Tumorentitäten, die für die pan-Cancer-Analyse für die TINCR- bzw. DANCR-Expression herangezogen wurden. Angegeben ist jeweils die Anzahl an Normalgewebeproben (#N) und Tumorproben (#T).

Abkürzung	Tumorentität	#N	#T
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma	19	252
HNSC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	42	426
BRCA	Breast Invasive Carcinoma	105	837
CEC	Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma	3	196
KICH	Kidney Chromophobe	25	66
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma	67	448
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma	30	198
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma	50	200
LUAD	Lung Adenocarcinoma	58	488
LUSC	Lung Squamous cell carcinoma	17	220
PRAD	Prostate Adenocarcinoma	52	374
STAD	Stomach Adenocarcinoma	33	285
THCA	Thyroid Carcinoma	59	497
UCEC	Uterine Corpus endometroid carcinoma	4	316

Tatsächlich sind beide lncRNAs in einem Großteil der analysierten Tumorentitäten differentiell exprimiert, wobei sowohl Überexpression als auch Herunterregulation auftreten. Einen Hinweis, dass TINCR oder DANCR nur in bestimmten Tumorarten differentiell exprimiert sind, lässt sich aus dieser Analyse nicht ableiten. Jedoch ist die lncRNA-Expression in einigen Tumorentitäten wie im Harnblasenkarzinom gleichsinnig verändert. So sind TINCR und DANCR auch in Brustkrebs (BRCA) und Plattenepithelkarzinomen der Lunge (LUSC) überexprimiert gegenüber gesundem Gewebe. In zwei Nierenzellkarzinomentitäten, KICH und KIRP, sind die beiden lncRNAs dagegen vermindert exprimiert gegenüber dem Normalgewebe.

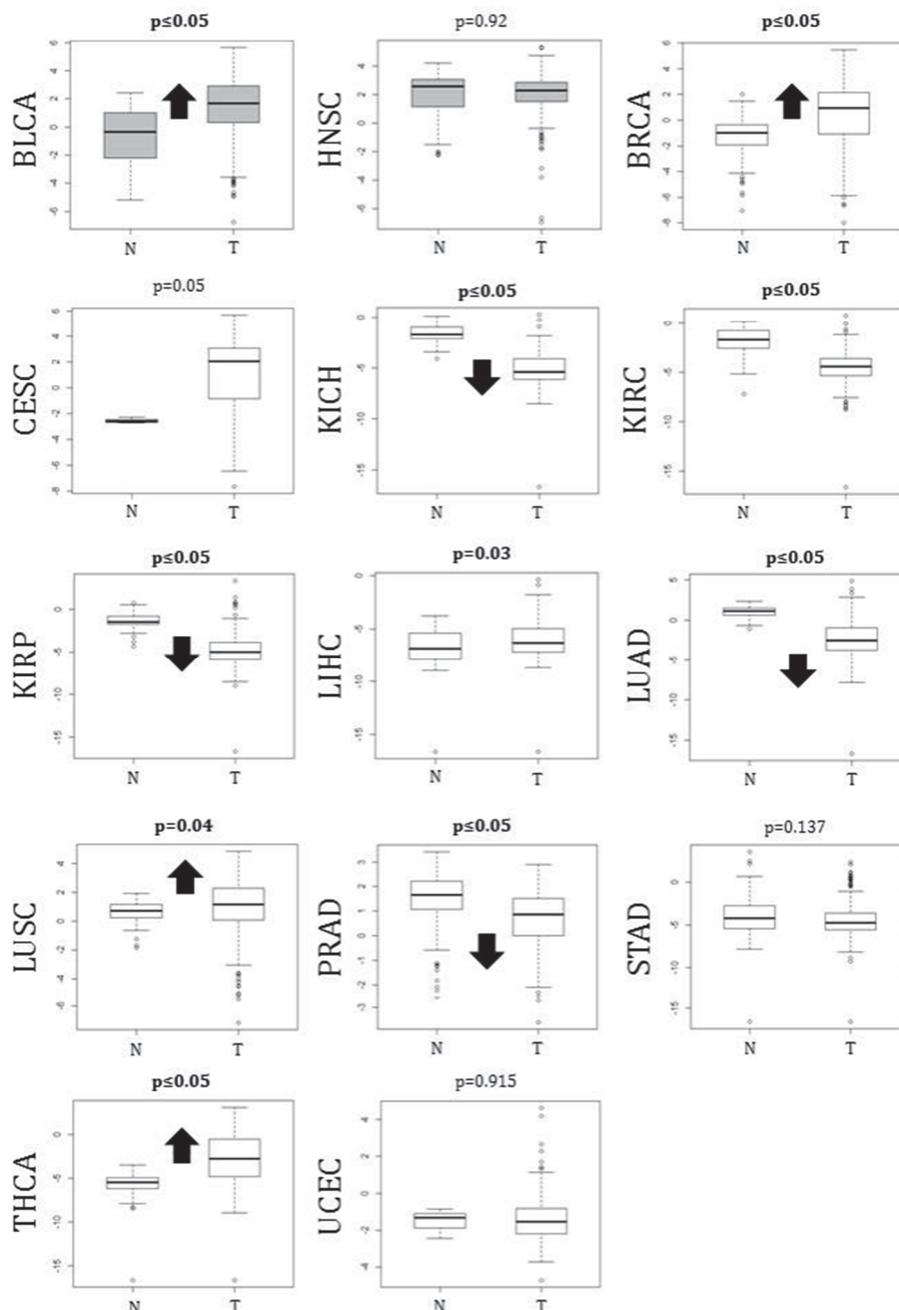


Abb. 3.31: Pan-Cancer-Analyse der TINCR-Expression in verschiedenen Tumorentitäten. Die Expression der lncRNA TINCR ist aus RNA-Sequenzierungsdaten verschiedener Tumorentitäten aus TCGA-Studien über die TANRIC-Datenbank als log₂ der *reads per million mapped reads* (RPMK) für Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) dargestellt. Die Pfeile geben die Richtung einer signifikanten Veränderung (Wilcoxon-Rangsummentest, $p \leq 0.05$) an.

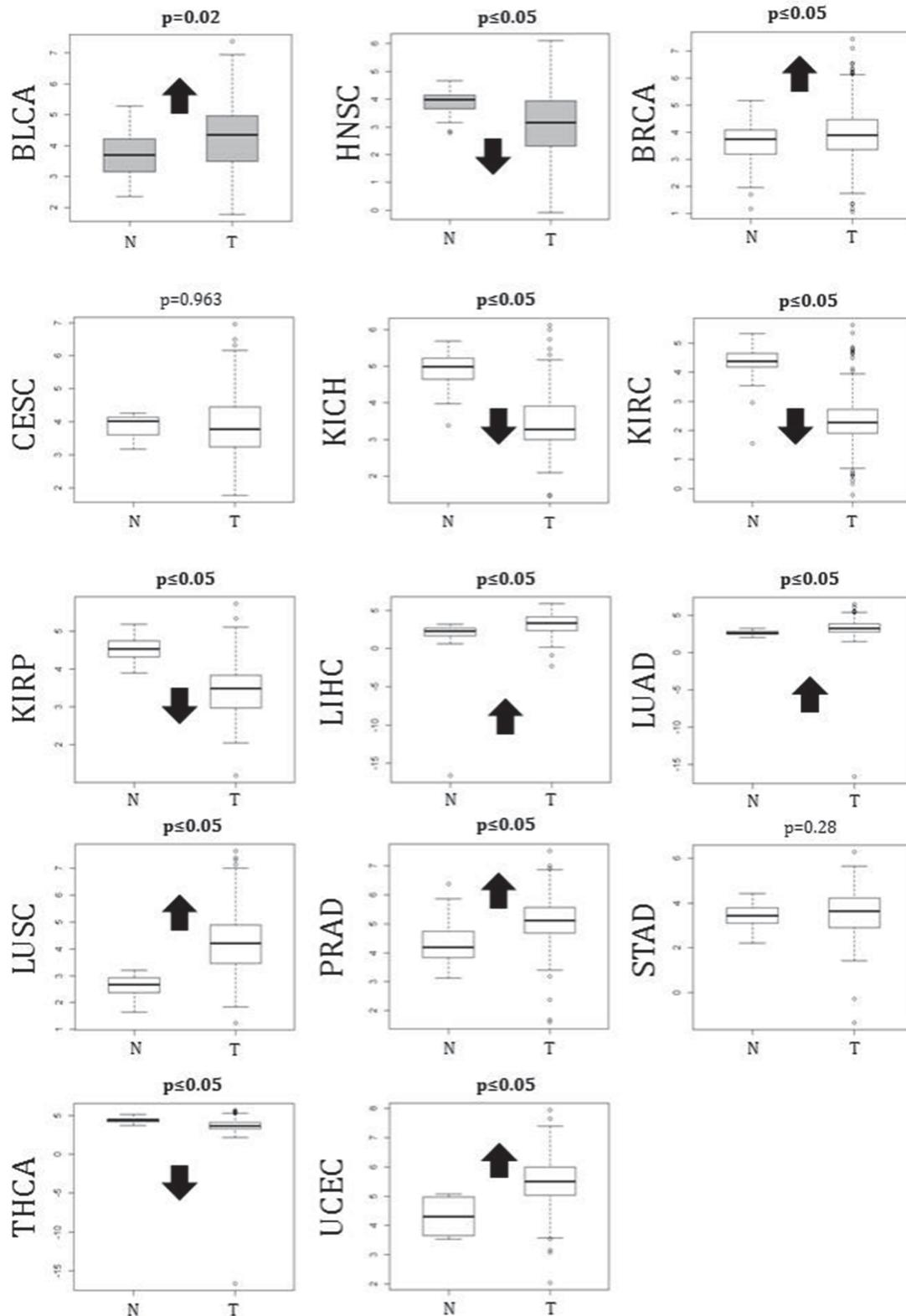


Abb. 3.32: Pan-Cancer-Analyse der DANCR-Expression in verschiedenen Tumorentitäten. Die Expression der lncRNA DANCR ist aus RNA-Sequenzierungsdaten verschiedener Tumorentitäten aus TCGA-Studien über die TANRIC-Datenbank als log₂ der *reads per million mapped reads* (RPMK) für Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) dargestellt. Die Pfeile geben die Richtung einer signifikanten Veränderung (Wilcoxon-Rangsummentest, $p \leq 0.05$) an.

3.11.4 Subzelluläre Lokalisation von TINCR/DANCR während der urothelialen Differenzierung

Aus der epidermalen Differenzierung in Keratinozyten ist bekannt, dass TINCR vorrangig im Cytoplasma lokalisiert ist. Um die subzelluläre Lokalisation von TINCR und DANCR während der urothelialen Differenzierung zu bestimmen, wurde nach Induktion der Differenzierung durch Ca²⁺/FCS in der HBLAK-Zelllinie eine fraktionierte RNA-Aufreinigung durchgeführt und die lncRNA-Expression in den beiden Fraktionen (Nucleus und Zytoplasma) mittels qRT-PCR durchgeführt. Für diese RNA-Fraktionierung können die Zellen nicht direkt im Well lysiert werden, sondern müssen wie unter 2.2.6.2 beschrieben zunächst durch Accutase-Behandlung abgelöst werden. Dies war mit Zellen, die mit TZ+PD zur Differenzierung stimuliert wurden, nicht möglich, denn bei der Inkubation der Zellen mit Accutase oder Trypsin platzten diese auf.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Fraktionierung wurde die Expression von KCNQT10T1 (LIT1) bestimmt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine lncRNA, die mit Chromatin interagiert und somit nicht im Zytoplasma vorliegt (136). Die Ergebnisse in Abbildung 3.33 sind nicht normalisiert auf ein *Housekeeper*-Gen dargestellt, sondern als Ct-Werte aufgetragen. Die Fraktionierung der RNA war erfolgreich, da das Transkript von KCNQT10T1 nur in der nukleären Fraktion nachweisbar ist, nicht jedoch in der cytoplasmatischen. TBP-mRNA hingegen ist in beiden Fraktionen nachweisbar, wobei der cytoplasmatische Anteil etwas größer ist. Wie zuvor beschrieben, ändert sich die Expression von TINCR auf das gesamte Zelllysate (RNA total) durch die Differenzierung mit Ca²⁺/FCS nicht, jedoch steigt der Anteil im Cytoplasma. Dies geht jedoch nicht mit einer Verringerung des Anteils im Nucleus einher. Dies lässt darauf schließen, dass es nicht zu einer Verschiebung der subzellulären Lokalisation kommt, TINCR jedoch für einen gewissen Zeitraum im Cytoplasma stabilisiert wird. DANCR ist ebenfalls sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus lokalisiert, wobei sich der größere Anteil im Cytoplasma befindet. Zu einer Verschiebung der subzellulären Lokalisation während der Differenzierung kommt es nicht.

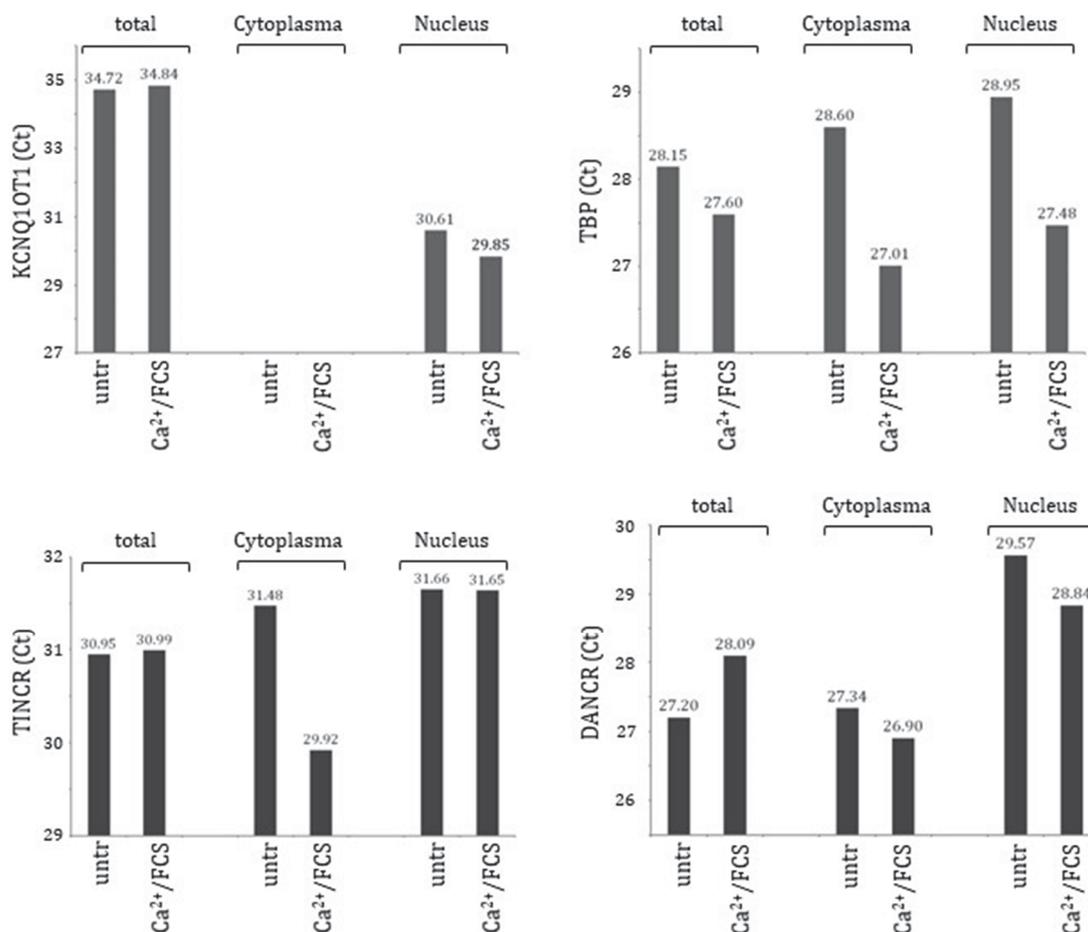


Abb. 3.33: Subzelluläre Lokalisation von TINCR und DANCR. Es wurde eine fraktionierte RNA-Extraktion in unbehandelten und durch Calcium und FCS differenzierten HBLAK durchgeführt. In totalen RNA-Extrakten, Extrakten der cytoplasmatischen und der nukleären Fraktion wurden über qRT-PCR die Transkripte für KCN1OT1 als Kontrolle für eine ausschließlich nukleär vorkommende RNA, TBP als Kontrolle für eine überwiegend cytoplasmatisch vorkommende RNA und TINCR und DANCR nachgewiesen. Die relative Transkriptmenge ist als Ct-Wert aufgetragen, der zudem als Zahlenwert über den Balken angegeben ist.

3.12 Modulation der TINCR-Expression in Tumorzelllinien

3.12.1 siRNA-vermittelte Herunterregulation von TINCR

Um den Einfluss von TINCR auf die Eigenschaften von Urothelkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden Zelllinien mit einer stabilen Expression der lncRNA ausgewählt (RT-112 und BFTC-905, vgl. 3.7) und mit einem spezifischen siRNA-Pool gegen TINCR behandelt. Als Vergleich wurde darüber hinaus die Kopf-Hals-Tumorzelllinie UD-SCC-6 hinzugenommen. Diese hat nicht nur die höchste TINCR-Expression von den in dieser

Arbeit verwendeten Kopf-Hals-Tumorzelllinien, sondern auch eine auffällig hohe Expression an squamösen Markergenen. Die Expressionsmessung ergab, dass ein *Knockdown* von TINCR nach 48 Stunden erreicht wurde, wie in Abb. 3.34 anhand der Mittelwerte für zwei unabhängige Experimente dargestellt ist.

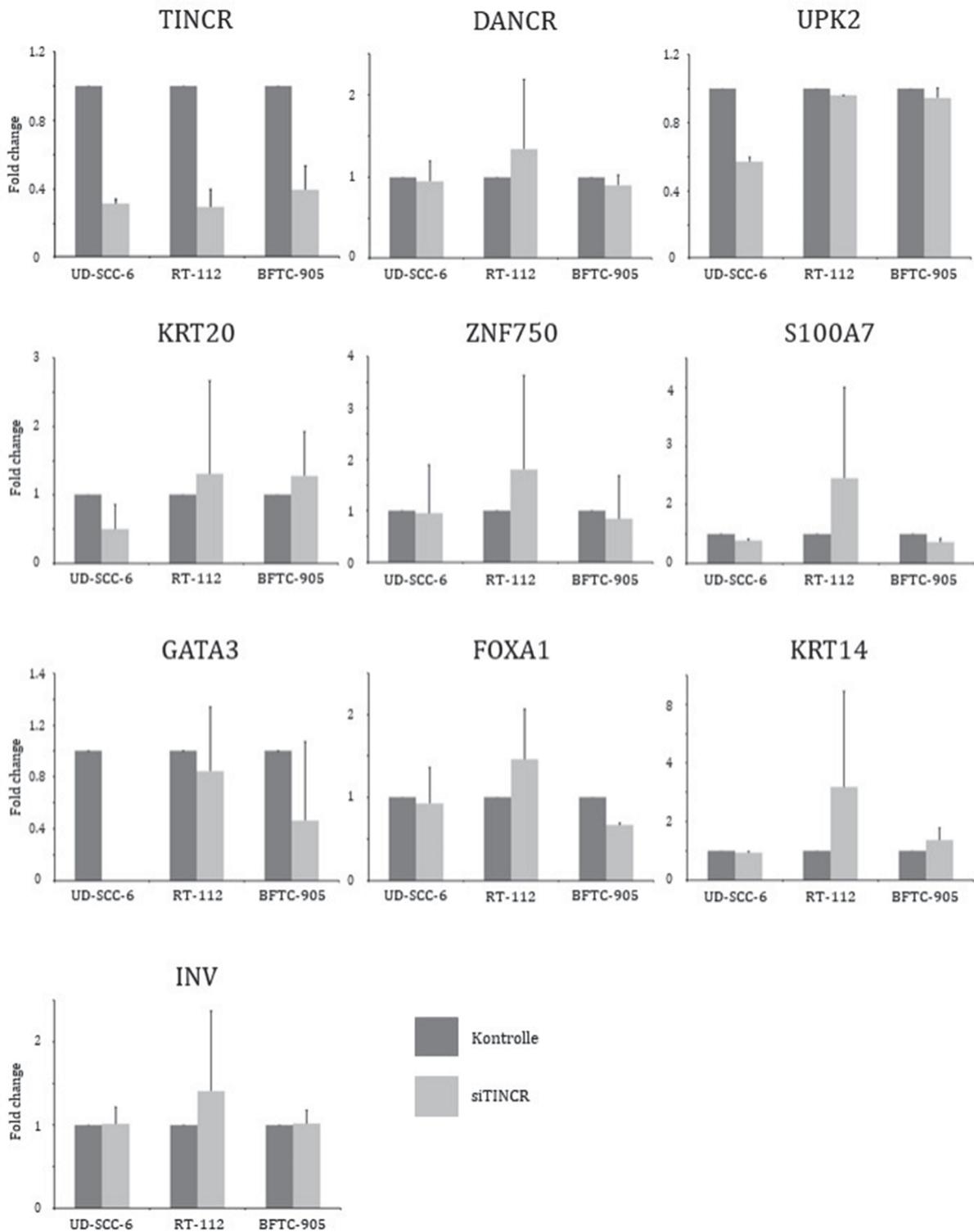


Abb.3.34: Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene in Tumorzelllinien nach siRNA-vermitteltem TINCR-Knockdown. In den Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien UD-SCC-6 und den beiden Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112 und BFTC-905 wurde für 48 Stunden ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von TINCR in zwei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Expression von TINCR, DANCR und weiteren Differenzierungs-assoziierten Markergenen wurde durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zur Expression von TBP als *fold change* dargestellt. Die Expressionswerte für die jeweilige Zelllinie, die mit einem siRNA-Pool gegen TINCR behandelt wurde (hellgrau), wurde normalisiert gegen Zellen, die mit einer *non-targeting* Kontroll-siRNA behandelt wurde (dunkelgrau).

Wie in Abb. 3.34 dargestellt, wurde ebenfalls die Expression der Differenzierungs-assoziierten Markergene 48 Stunden nach TINCR-Knockdown gemessen. Dies ergab, dass insbesondere in RT-112 keine konsistente Regulation dieser Gene stattfindet, sondern die Expression in den beiden Experimenten stark unterschiedlich ist. Davon sind sowohl die Gene betroffen, die an der urothelialen Differenzierung beteiligt sind wie KRT20 und FOXA1, als auch Gene, die charakteristisch sind für plattenepitheliale Differenzierung wie ZNF750, S100A7, FOXA1 und INV. In BFTC-905 führt der TINCR-Knockdown nicht zu Expressionsänderungen. In der Kopf-Hals-Tumorzelllinie DU-SCC-6 führt der TINCR-Knockdown zu einer starken Abnahme der GATA3-Expression und zur einer geringfügigen Herunterregulation von UPK2.

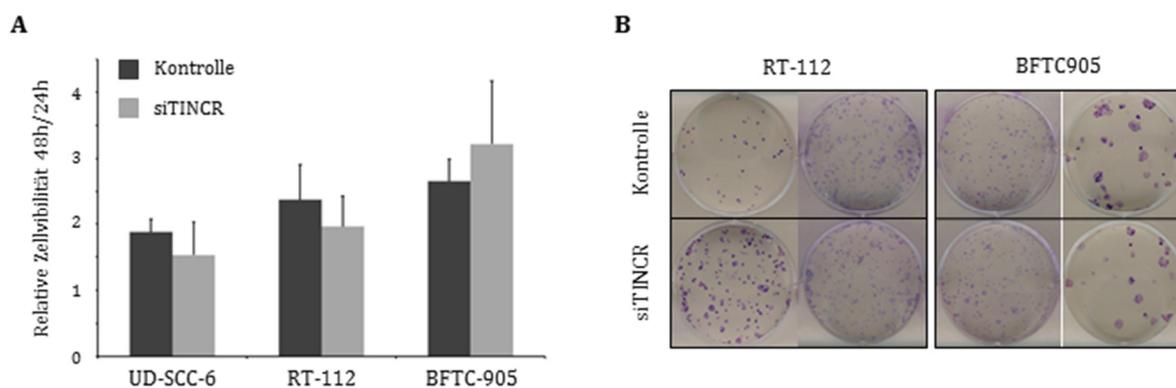


Abb.3.35: Zelluläre Eigenschaften von Tumorzelllinien nach siRNA-vermitteltem TINCR-Knockdown. In den Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien UD-SCC-6 und den beiden Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112 und BFTC-905 wurde für 48 h ein siRNA-vermittelter Knockdown von TINCR in zwei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Nach weiteren 24 bzw. 48 h wurde mittels MTT-Assay die Zellviabilität bestimmt. Die Zellviabilität nach 48 h ist relativ zur Zellviabilität nach 24 h für Zellen, die mit einer *non-targeting* Kontroll-siRNA (dunkelgrau) und Zellen, die mit einem siRNA-Pool gegen TINCR (hellgrau) dargestellt (A). 48 h nach siRNA-vermitteltem TINCR-Knockdown wurden die Zellen in Einzelzellsuspension ausgesät und somit die Klonogenität bestimmt (B).

Neben Änderungen in der Genexpression wurde auch der Einfluss der TINCR-Expression auf zelluläre Eigenschaften betrachtet. Dazu gehörte die relative Zellviabilität 48 Stunden nach TINCR-Knockdown, wie in Abbildung 3.35A gezeigt. In keiner der analysierten Zelllinien (UD-SCC-6, RT-112, BF7C-905) war eine Veränderung der Zellviabilität nach TINCR-Knockdown festzustellen. Die Zellen wurden 48 Stunden nach erfolgtem Knockdown für den MTT-Assay ausgesät und jeweils 24 bzw. 48 Stunden später wurde die Zellviabilität gemessen. Die relative Zellviabilität ist als Quotient dieser beiden Werte angegeben. Die Ergebnisse des Klonogenitäts-Assays (dargestellt in Abb. 3.35B) sind heterogen für die beiden Zelllinien RT-112 und BF7C-905. Ein eindeutiger Unterschied ist nicht zu erkennen. Die Zelllinie UD-SCC-6 war in der stark verdünnten Einzelzellsuspension nicht mehr dazu in der Lage Klone zu bilden unabhängig von der TINCR-Expression.

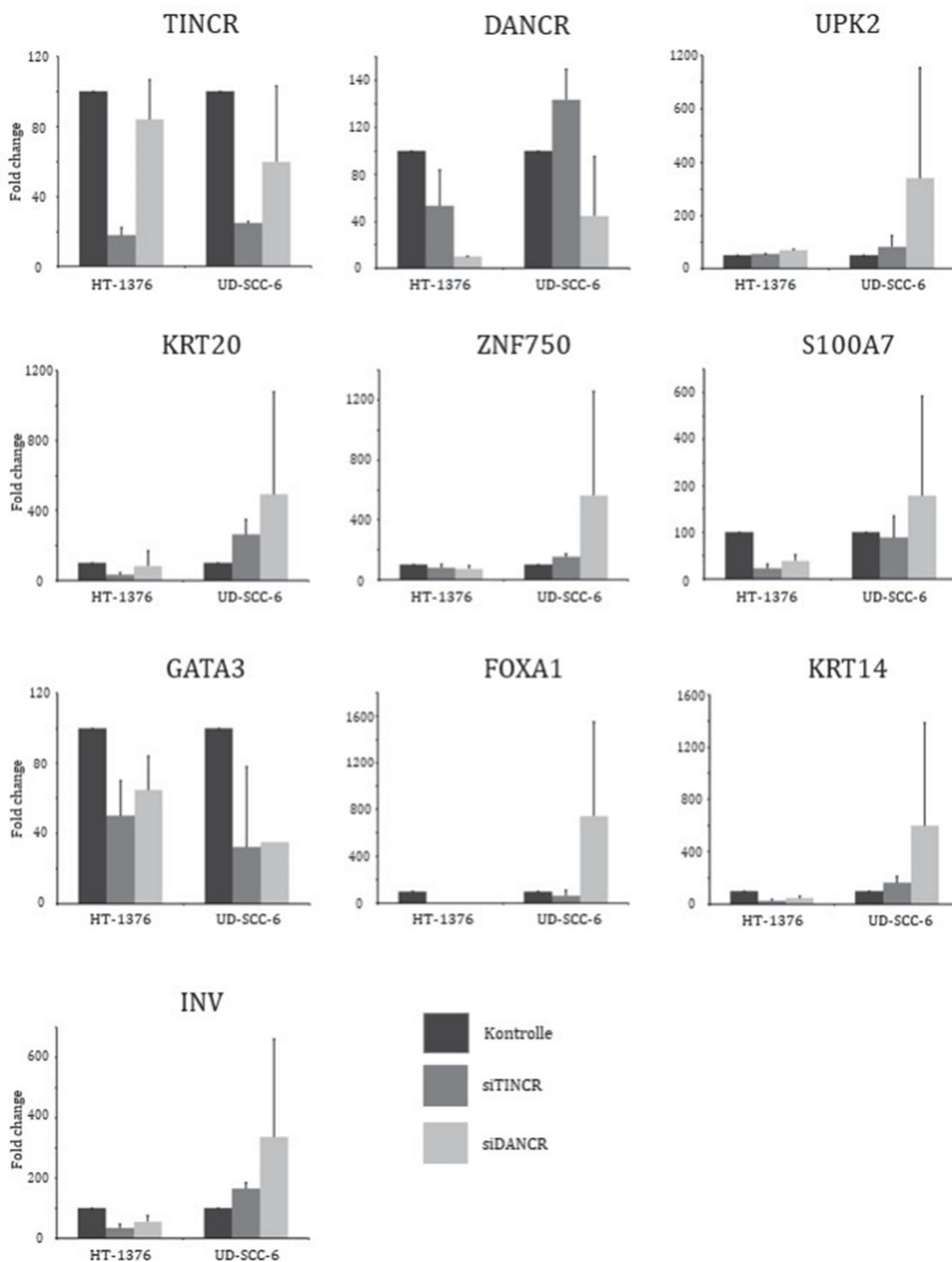


Abb.3.36: Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene in Tumorzelllinien nach siRNA-vermitteltem TINCR- bzw.DANCR-Knockdown. In den Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien UD-SCC-6 und der Urothelkarzinom-Zelllinien HT-1376 wurde für 72 Stunden ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von TINCR und DANCR in zwei voneinander unabhängigen Versuchen mit je einem technischen Replikat pro Bedingung durchgeführt. Die Expression von TINCR, DANCR und weiteren Differenzierungs-assoziierten Markergenen wurde durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zur Expression von *TBP* dargestellt. Die Expressionswerte für die jeweilige Zelllinie, die mit einem siRNA-Pool gegen TINCR bzw. DANCR behandelt wurde, wurde normalisiert gegen Zellen, die mit einer *non-targeting* Kontroll-siRNA behandelt wurde.

Eine längere Behandlung der Zelllinien HT-1376 und UD-SCC-6 mit einem siRNA-Pool gegen TINCR über 72 Stunden rief keine deutliche Veränderung der Expression der Markergene hervor. Wurde ein siRNA-Pool gegen DANCR für 72 Stunden in die Zelllinien transfiziert, wurde in der Zelllinie UD-SCC-6 die Expression von DANCR nicht zuverlässig herunterreguliert, sodass in diesem Fall eine Veränderung der Markergenexpression nicht beurteilt werden kann. In der Zelllinie HT-1376 führte der *Knockdown* von DANCR über 72 Stunden ebenfalls nicht zu einer veränderten Markergenexpression.

3.12.2 Stabile TINCR-Überexpression

Um ein Konstrukt zur Überexpression von TINCR zu erstellen wurde das Volllängen-Transkript von TINCR (3.7 kb) in den pcDNA4/TO-Vektor mit seinem CMV-Promotor inkloniert. Dieser Vektor wurde ausgewählt, da er auch über eine Zeocin-Resistenz verfügt, über die Urothelkarzinom-Zelllinien mit stabiler TINCR-Überexpression selektiert werden können. Mit T-24 und 253J wurden Zelllinien ausgewählt, die endogen eine besonders niedrige TINCR-Expression aufweisen sowie RT-112, die endogen eine intermediäre TINCR-Expression besitzt.

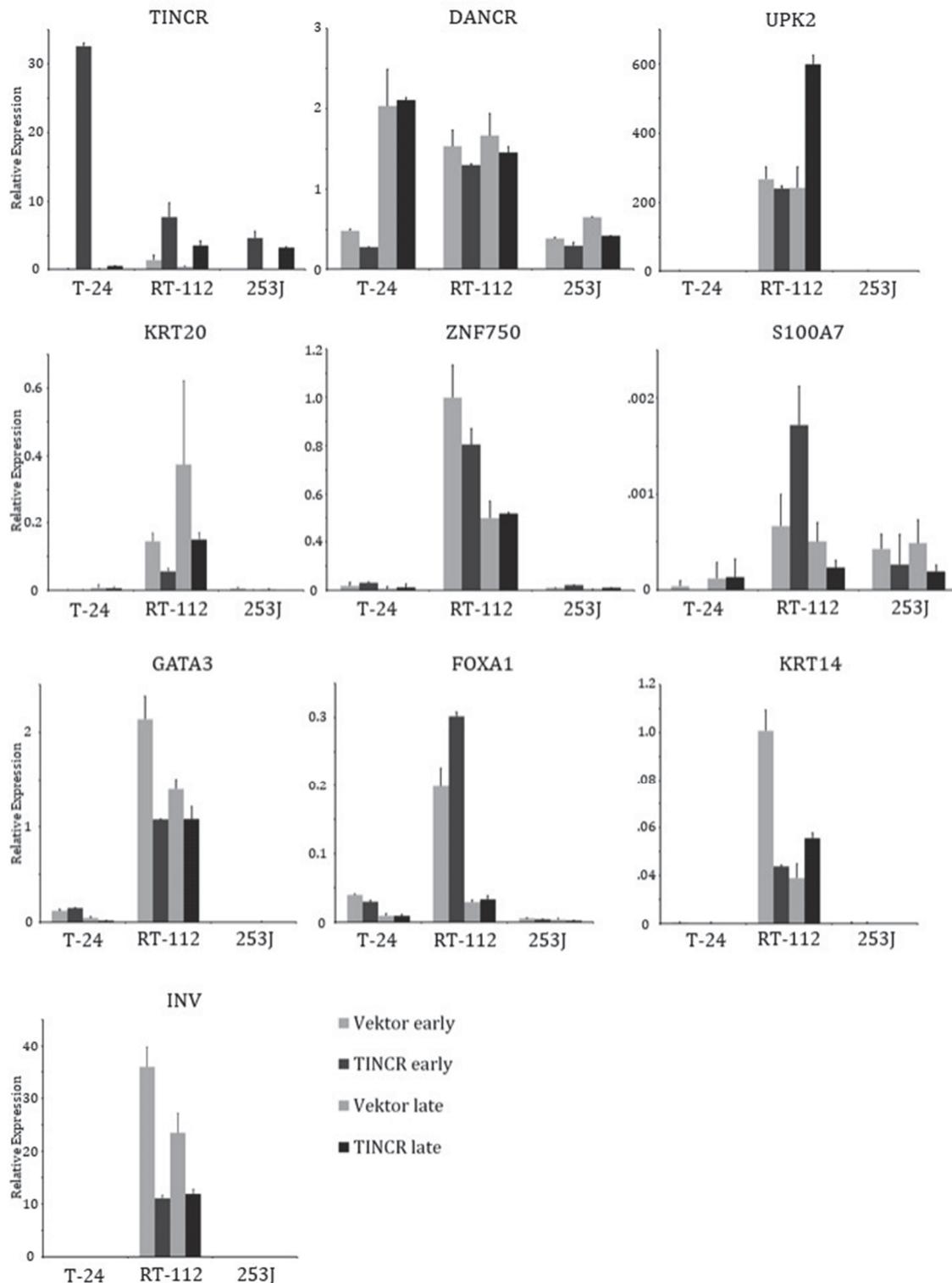
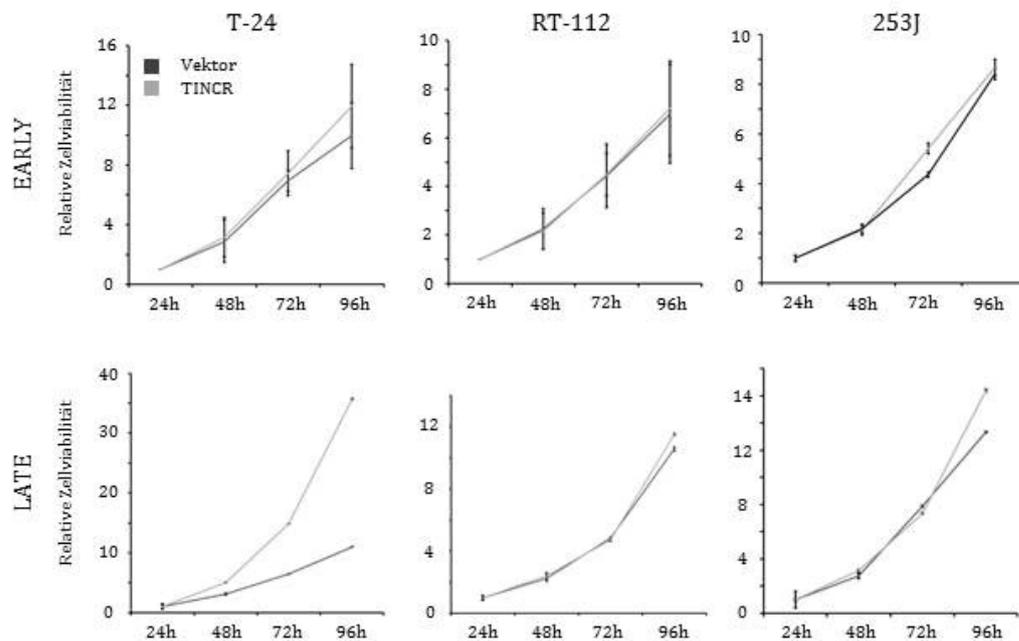


Abb.3.37: Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene in Tumorzelllinien nach stabiler TINCR-Überexpression. In die Urothelkarzinom-Zelllinien T-24, RT-112 und 253J wurde die lncRNA TINCR durch Selektion Zeocin-resistenter Zellen stabil transfiziert (Pools). Es wurde RNA in frühen Passagen (Early, $p \leq 5$) und späten Passagen (Late, $p \geq 10$, schraffiert) nach erfolgter Zeocin-Selektion extrahiert. Die Expression von TINCR, DANCR und weiteren Differenzierungs-assoziierten Markergenen wurde durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zur Expression von *TBP* dargestellt.

Abbildung 3.37 ist zu entnehmen, dass in allen drei Zelllinien eine stabile Überexpression erreicht werden konnte, die im Falle von RT-112 und 253J auch über eine längere Kultivierungsdauer (>10 Passagen) erhalten bleibt. In T-24 wurde zu Beginn eine besonders hohe Überexpression erzielt, die aber bei längerer Kultivierung nicht erhalten blieb. Wie zuvor wurde die Expression der Differenzierungs-assoziierten Markergene nach TINCR-Expressionsmodulation gemessen. Um Expressionsveränderungen im Zeitverlauf aufzuzeigen, wurde RNA zu zwei verschiedenen Zeitpunkten aus den Zelllinien aufgereinigt, nämlich direkt nach erfolgreicher Selektion Zeocin-resistenter Zellen und nach längerer Kultivierungsdauer (>10 Passagen). Die deutlichsten Expressionsänderungen sowohl nach TINCR-Modulation als auch in Bezug auf die Kultivierungsdauer waren bei der Zelllinie RT-112 zu beobachten. Die Expression der lncRNA DANCR, welche im Laufe der Keratinozyten-Differenzierung als gegenläufig zu TINCR exprimiert beschrieben wurde, veränderte sich nach TINCR-Überexpression in den Zelllinien nicht. Lediglich in T-24 schwankt die DANCR-Expression im Laufe der Kultivierungsdauer. Dies scheint jedoch unabhängig von der TINCR-Expression zu sein. Die Expression von UPK2 ist in den Zelllinien T-24 und 253J an der Nachweisgrenze und wird durch TINCR-Überexpression in diesen Zelllinien auch nicht induziert. In der RT-112 jedoch steigt die UPK2-Expression nach TINCR-Überexpression über eine längere Kultivierungsdauer deutlich an. Auch die Expression von KRT20 ist in den Zelllinien T-24 und 253J kaum messbar, in RT-112 ist die Expression nach TINCR-Überexpression etwas reduziert gegenüber der des Leervektors. Auch die Gene ZNF750, S100A7 und GATA3 sind am stärksten in der RT-112-Zelllinie exprimiert. Ihre Expressionen weisen eine gewisse Schwankung im Zeitverlauf auf, werden jedoch nicht wesentlich durch die TINCR-Überexpression beeinflusst. FOXA1, ebenfalls in RT-112 am stärksten exprimiert, wird unabhängig von der TINCR-Überexpression sowohl in T-24 als auch in RT-112 nach längerer Kultivierung herunterreguliert. Die Expression von KRT14 ist nur in RT-112 nachweisbar. Das Cytokeratin-Gen ist dort zu Beginn in den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, besonders stark exprimiert, geht aber im Laufe der Kultivierung auf das Niveau der TINCR-überexprimierenden Zellen zurück. Auch die Expression von INV ist nur in RT-112 nachweisbar und ist in den TINCR-überexprimierenden Zellen zu beiden erfassten Zeitpunkten reduziert gegenüber den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden.

A



B

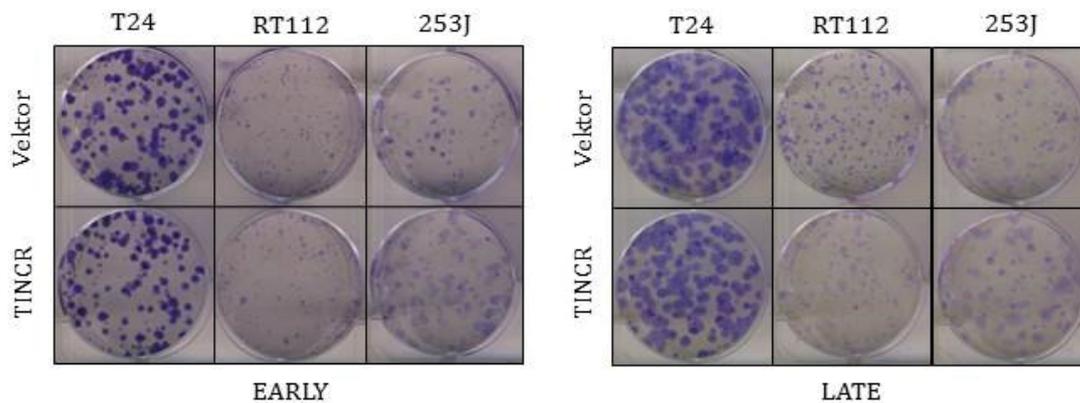


Abb.3.38: Zelluläre Eigenschaften der TINCR-überexprimierenden Zellen zu verschiedenen Passagierungszeitpunkten. In die Urothelkarzinom-Zelllinien T-24, RT-112 und 253J wurde die lncRNA TINCR durch Selektion Zeocin-resistenter Zellen stabil transfiziert (Pools). Die Proliferation der Zellen, die den Leervektor (dunkelgrau) und Zellen, die das TINCR-Plamid (hellgrau) tragen, wurde mittels MTT-Assay als relative Zellviabilität über einen Zeitraum von 96 Stunden im Abstand von jeweils 24 Stunden bestimmt (A). Die Klonogenität wurde ermittelt, indem die Zellen in Einzelzellsuspension in niedriger Dichte ausgesät wurden (B). Proliferation und Klonogenität wurde für Zellen in einer frühen Passage (Early, $p \leq 5$) und Zellen in einer späten Passage (Late, ≥ 10) bestimmt.

Wie auch bei den siRNA-behandelten Zellen wurden bei den TINCR überexprimierenden Zellen zelluläre Eigenschaften wie Proliferation und Klonogenität unter Berücksichtigung

der Kultivierungsdauer untersucht. Die Proliferation wurde in diesem Fall über einen Zeitraum von 96 Stunden im Abstand von je 24 Stunden gemessen. Dies ergab, dass in allen drei untersuchten Zelllinien bereits nach kurzer Kultivierungsdauer die TINCR-überexprimierenden Zellen gegenüber den Zellen, die den Leervektor enthalten, tendenziell etwas stärker proliferieren. Dies bestätigte sich nach längerer Kultivierungsdauer jedoch nur in der T-24, obwohl in dieser, wie zuvor beschrieben, die TINCR-Expression nach längerer Kultivierung abgeschwächt wurde. In der Klonogenität kann kein Unterschied zwischen den Vektor-transfizierten und den TINCR-überexprimierenden Zellen festgestellt werden unabhängig von der Kultivierungsdauer. Zusammen genommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Überexpression von TINCR keinen nennenswerten Einfluss auf die zellulären Eigenschaften der Zelllinien hat.

3.12.3 Transiente vs. stabile DANCR-Überexpression

Ähnlich wie lncRNA-TINCR wurde eine um 42 Basen verkürzte Variante der lncRNA DANCR in dem pcDNA4/TO-Vektor unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert. Bei einer transienten Transfektion dieses Konstruktes für 72 bzw. 48 Stunden in die UC-Zelllinien T-24, RT-112 und BFTC-905 führte dies zu einer Überexpression der lncRNA gegenüber Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren (Abb.3.39A). Wurde 48 Stunden nach Transfektion eine Zeocin-Selektion der Zellen durchgeführt, wurden die Zellen wie erwartet Zeocin-resistent, die Überexpression von DANCR blieb jedoch nicht erhalten wie aus den unveränderten Ct-Werten in Tabelle B aus Abb. 3.39 hervorgeht.

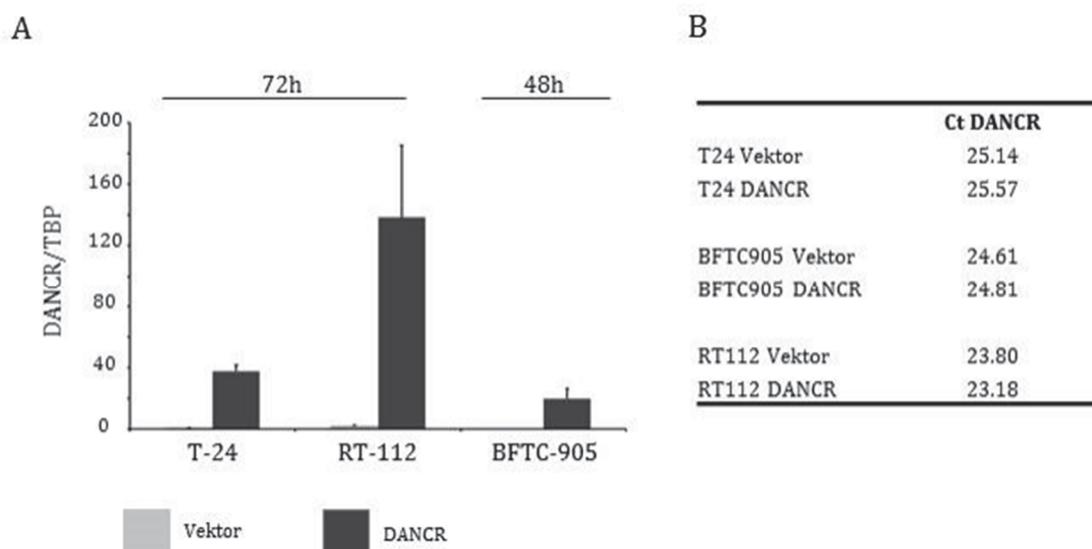


Abb.3.39: Überexpression von DANCR in Urothelkarzinomzelllinien. (A) In den UC-Zelllinien T-24, RT-112 und BFTC-905 wurde die lncRNA DANCR transient für 72 bzw. 48 Stunden überexprimiert. Die relative Expression der DANCR-überexprimierenden Zellen (dunkelgrau) ist gegenüber den Leervektor-transfizierten Zellen (hellgrau) dargestellt. In (B) sind die Ct-Werte der DANCR-Expression nach erfolgreicher Zeocin-Selektion, die 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt wurde, aufgeführt.

3.12.4 Modellierung der TINCR-Expression in der urothelialen Differenzierung

Zusätzlich zu den Urothelkarzinom-Zelllinien wurde TINCR auch in der HBLAK-Zelllinie stabil überexprimiert. In diesem Fall konnte das TINCR-Konstrukt durch Lipofektion nur transient in die Zellen eingebracht werden. Eine anschließende Selektion Antibiotikaresistenter Zellen erwies sich als nicht möglich, vermutlich da die Transfektionseffizienz nicht hoch genug ist. Durch die Antibiotika-Selektion werden die Zellen dann zu stark ausgedünnt. Um diese Schwierigkeit zu umgehen wurde statt Lipofektion eine Nucleofektion durchgeführt. Der Erfolg wurde durch eine parallel durchgeführte Nucleofektion eines GFP-Konstruktes überprüft (nicht dargestellt). Anschließend erfolgte die Selektion stabil transfizierter Zellen durch Zeocin-Behandlung. Die erfolgreiche Überexpression von TINCR ist in Abb.3.40 relativ zur Expression von TBP dargestellt.

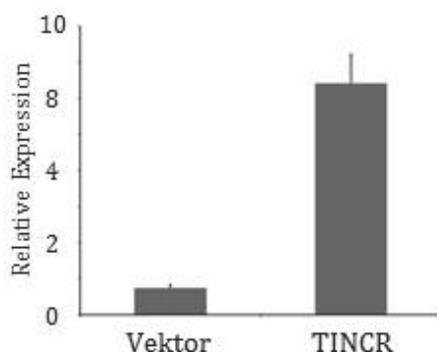


Abb.3.40: Überexpression von TINCR in stabil-transfizierten HBLAK-Zellen

Zunächst wurde der Einfluss von TINCR auf Proliferation und Klonogenität der Zellen bestimmt, wie in Abb. 3.40 dargestellt. Die Klone der TINCR überexprimierenden Zellen wachsen deutlich kompakter als die eher diffus wachsenden Klone der Leervektor-Kontrolle. Dies ist besonders deutlich in den lichtmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen (Abb.3.40A). Die Messung der relativen Zellviabilität über 96 Stunden hinweg deutet darauf hin, dass die TINCR überexprimierenden Zellen einen geringen Wachstumsvorteil gegenüber den Leervektor-Zellen haben (Abb.3.40B).

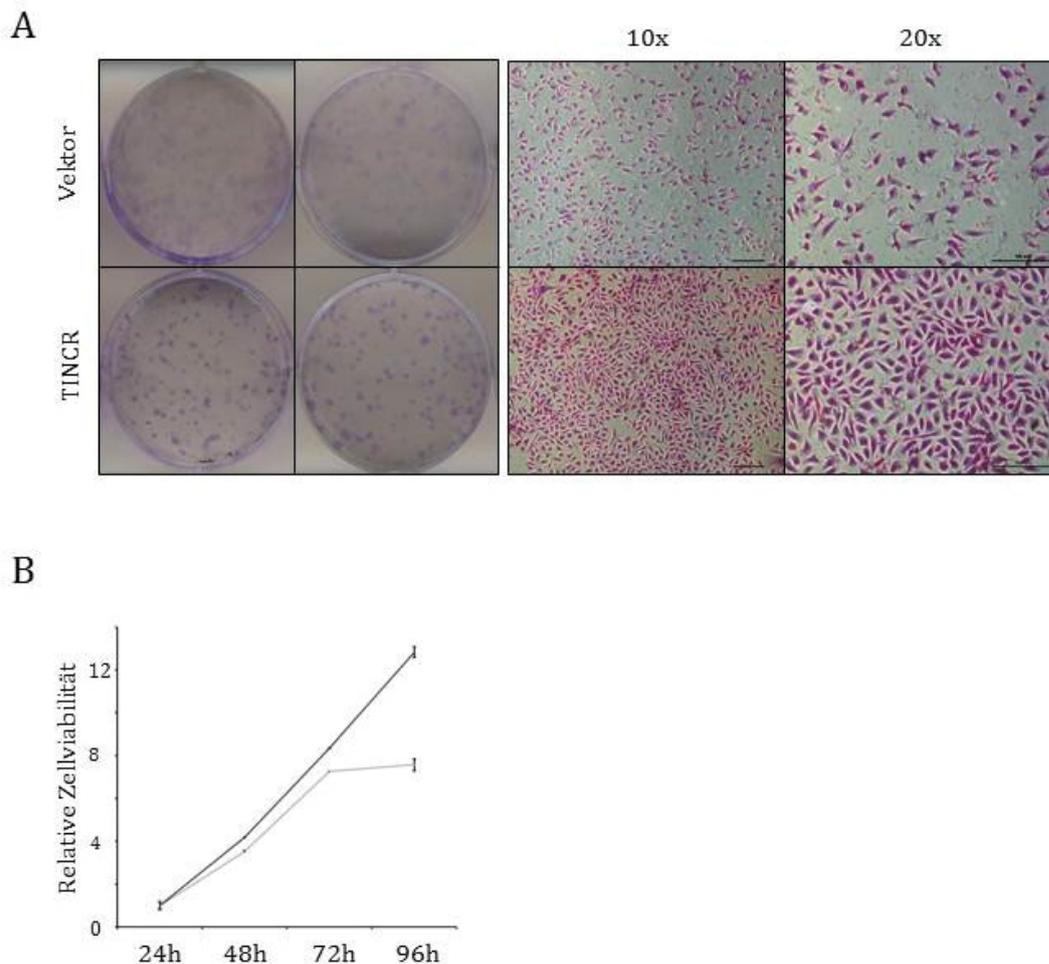


Abb.3.41: Zelluläre Eigenschaften der TINCR-überexprimierenden HBLAK-Zellen. In die prä-neoplastische Urothelzelllinie HBLAK wurde die lncRNA TINCR durch Selektion Zeocin-resistenter Zellen stabil transfiziert (*Pool*). Die Klonogenität wurde ermittelt, indem die Zellen in Einzelsuspension ausgesät wurden. Die Morphologie der Zellklone ist zusätzlich als lichtmikroskopische Aufnahme in 10-facher und 20-facher Vergrößerung abgebildet. **(A)** Die Proliferation der Zellen, die den Leervektor (hellgrau) oder das TINCR-Plamid (dunkelgrau) tragen, wurde mittels MTT-Assay als relative Zellviabilität über einen Zeitraum von 96 Stunden im Abstand von jeweils 24 Stunden bestimmt **(B)**.

Die stabil-transfizierten HBLAK-Zellen wurden nach den unterschiedlichen zuvor beschriebenen Protokollen differenziert (s. Abschnitt 2.2.5). Es wurden zwei unabhängige Versuche in unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Die phänotypischen Veränderungen nach abgeschlossener Differenzierung sind in Abb. 3.42 gezeigt. Ein auffälliger Unterschied zwischen den TINCR- und Leervektor-transfizierten Zellen ist bereits in der unbehandelten Kontrolle erkennbar: die TINCR-überexprimierende Zelllinie enthält deutlich mehr abgerundete und nicht mehr adhärente Zellen. Dagegen sind in den Zellen, die mit Calcium und FCS behandelt wurden, kaum Unterschiede zu

erkennen. Ebenfalls deutlich mehr abgerundete und nicht mehr adhärente Zellen treten zudem in den mit TZ+PD-induzierten Zellen auf. Besonders deutlich ist die Veränderung in den Zellen, die nur mit Calcium stimuliert wurden. Die Leervektorzellen stratifizieren wie zuvor beschrieben mit den charakteristisch erkennbaren verschiedenen Zellschichten. Diese deutliche Stratifizierung ist in den TINCR-überexprimierenden Zellen weitgehend aufgehoben.

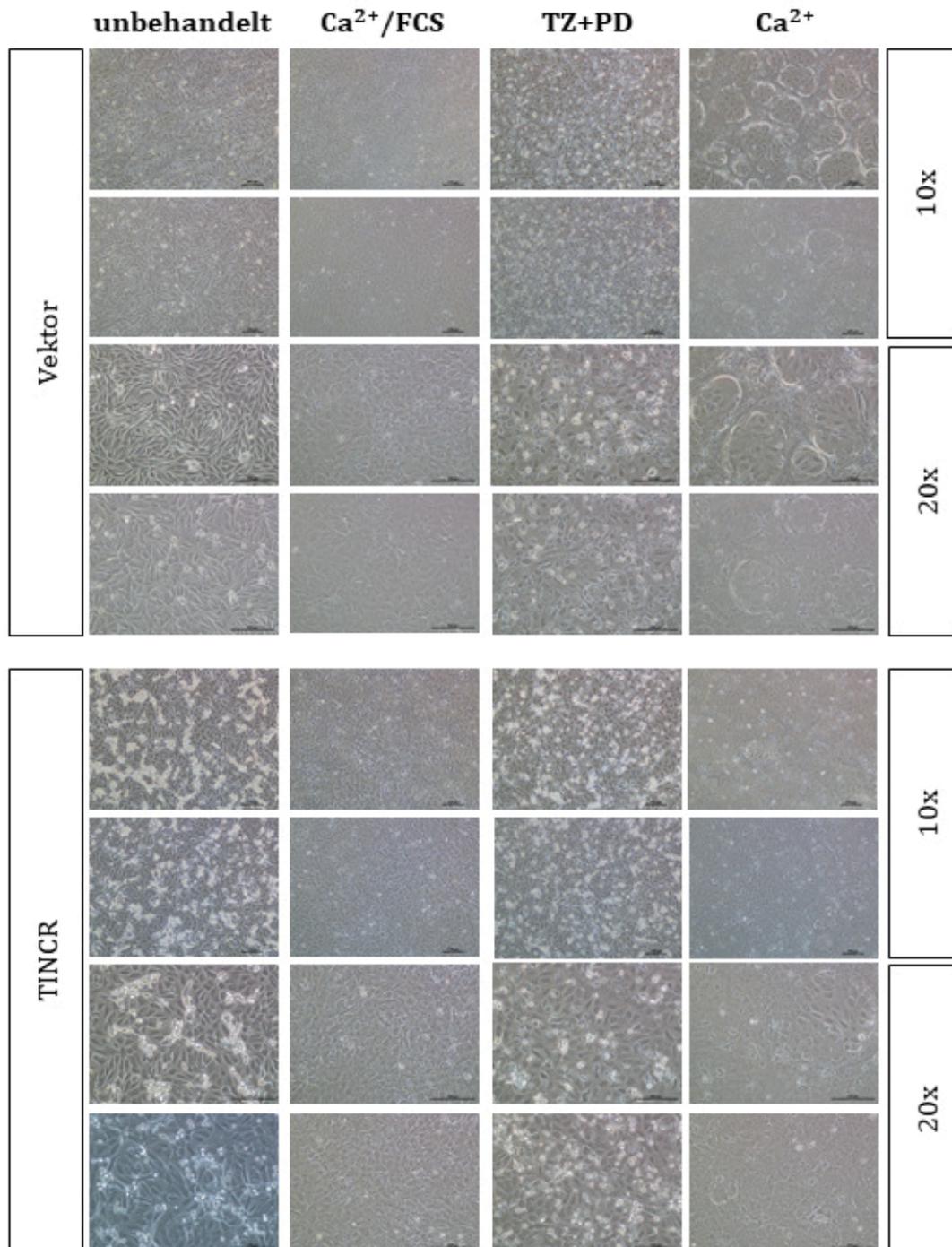


Abb.3.42: Morphologische Veränderungen TINCR-überexprimierender HBLAK-Zellen nach 10 Tagen Differenzierungs-Induktion. HBLAK-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz 10 Tage unter Verwendung verschiedener Stimuli (Ca^{2+} /FCS, TZ+PD, Ca^{2+}) in vitro differenziert. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Morphologische Veränderungen sind durch lichtmikroskopische Aufnahmen für beide Versuche in 10-facher und 20-facher Vergrößerung dargestellt.

Die Expression der Differenzierungs-assoziierten Markergene wurde nach 10 Tagen der Differenzierung bestimmt und als *Fold Change* in Bezug auf die jeweils unbehandelte Kontrolle über beide Experimente gemittelt dargestellt (Abb. 3.43). Obwohl die beiden Experimente phänotypisch konsistent waren, zeigt sich in der Expression der Markergene eine sehr hohe Varianz. Die unbehandelte Kontrolle belegt zunächst, dass die TINCR-Überexpression über die 10 Tage Kultivierungsdauer bei vollständiger Konfluenz erhalten bleibt. Durch die Behandlung mit Calcium und FCS wird die TINCR-Expression jedoch auf das Niveau der Vektor-Zellen herunterreguliert. Die TZ+PD-Behandlung dagegen führt dagegen zu einer Verstärkung der TINCR-Induktion in den überexprimierenden Zellen, auch wenn dieser Effekt in den beiden Versuchen unterschiedlich stark ist. In den Calcium-stimulierten Zellen verändert sich die TINCR-Expression gegenüber den unbehandelten Zellen nicht.

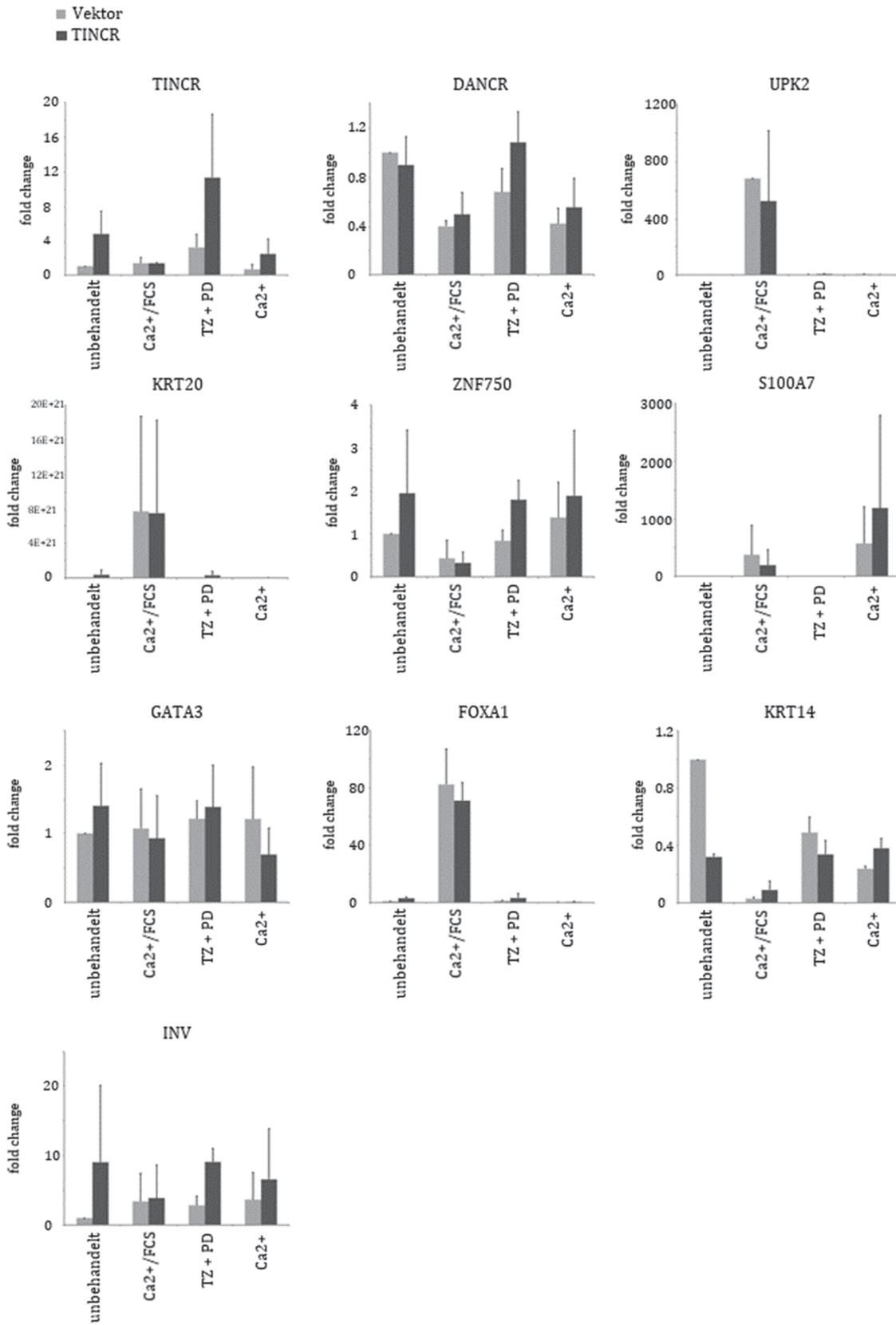


Abb.3.43: Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene in HBLAK-Zellen nach stabiler TINCR-Überexpression. In die prä-neoplastische Urothelzelllinie HBLAK wurde die lncRNA TINCR durch Selektion Zeocin-resistenter Zellen stabil transfiziert (*Pools*). In zwei voneinander unabhängigen Versuchen wurden die Zellen unter Verwendung verschiedener Differenzierungsstimuli (Ca^{2+} /FCS, TZ+PD, Ca^{2+}) für 10 Tage *in vitro* differenziert. Nach Abschluss der Differenzierung wurden RNA-Lysate gewonnen und die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene gemessen. Die Expression ist als arithmetisches Mittel des *fold changes* aus beiden Versuchen bezogen auf die unbehandelte Vektorkontrolle dargestellt.

Die TINCR-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die DANCR-Expression. Diese ist in beiden Subzelllinien in den Calcium und FCS-behandelten sowie den nur mit Calcium-behandelten Zellen herunterreguliert gegenüber den unbehandelten Zellen. Auch die Expression der Markergene für urotheliale Differenzierung UPK2 und KRT20 erscheint unabhängig von der TINCR-Expression. Wie zuvor wurde die Expression beider Gene nur durch die Stimulation mit Calcium und FCS induziert, wobei sich insbesondere die Stärke der KRT20-Induktion zwischen beiden Experimenten stark unterscheidet. Ein konsistenter Unterschied zwischen Leervektor- und TINCR-transfizierten Zellen zeigt sich in der Expression von ZNF750, welches bei TZ+PD-Stimulation in den TINCR-überexprimierenden Zellen verstärkt exprimiert wird. Durch Calcium und FCS-Behandlung wird die ZNF750-Expression in beiden Subzelllinien gegenüber unbehandelten Zellen vermindert. Auch die Expression von S100A7, GATA3 und FOXA1 wird von der TINCR-Expression nicht beeinflusst, wobei FOXA1 erneut nur durch Calcium und FCS-Behandlung induziert werden konnte. Die TINCR-Überexpression hat dagegen einen deutlichen Effekt auf die KRT14-Expression in den unbehandelten Zellen, welche in beiden Versuchen in den TINCR-überexprimierenden Zellen deutlich vermindert ist, ähnlich wie in differenzierten Zellen. Die stärkste Verminderung der KRT14-Expression wird durch Calcium und FCS-Stimulation hervorgerufen. Dies ist jedoch unabhängig von der TINCR-Expression. Besonders heterogen ist die Regulation von Involucrin durch TINCR innerhalb der beiden Differenzierungsexperimente. Konsistent ist jedoch der Effekt bei TZ+PD-induzierter Differenzierung: hier vermittelt die TINCR-Überexpression auch eine deutliche Induktion von Involucrin im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen.

4. Diskussion

4.1 lncRNAs als Biomarker im Urothelkarzinom

Als wichtige Eigenschaft langer nicht-codierender RNAs wird ihre Gewebe-spezifische Expression angesehen, da sie auf spezifische regulatorische Funktionen hindeutet (137). Im Laufe der Tumorentstehung kann es ebenfalls zu einer differentiellen Expression von lncRNAs gegenüber gesundem Gewebe kommen, wodurch lncRNAs als potenzielle diagnostische oder prognostische Biomarker für Tumorerkrankungen in Frage kommen. Für viele Tumorentitäten sind bereits einzelne lncRNAs als solche Biomarker beschrieben worden; einige davon wurden durch Screening bei RNA-Expressionsstudien entdeckt (138). So wurde beispielsweise in Tumorgeweben mehrerer Tumorentitäten die lncRNA HOTAIR überexprimiert gegenüber den gesunden Geweben gefunden (38).

Auch für das Urothelkarzinom ist die Entwicklung neuer diagnostischer und prognostischer Biomarker erstrebenswert, um Krankheitsverlauf und Therapieerfolg - und damit letztlich das Überleben der Patienten - besser verfolgen und verbessern zu können. Es gibt bereits Studien, die einzelne differentiell exprimierte lncRNAs als geeignete Biomarker für das UC propagiert haben. Zwei dieser lncRNAs, UCA1 und linc-UBC1, sind in diesem Kontext erstmalig beschrieben worden (83, 85). Speziell UCA1 wurde als möglicher Urin-Biomarker vorgeschlagen, da eine erhöhte Transkript-Menge in Urinsedimenten von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Personen gefunden wurde. Es gibt ein großes Interesse an der Etablierung neuer Urin-basierter Biomarker für die Diagnose und Prognose von Harnblasenkrebs, da auf diese Weise die Notwendigkeit von teuren und für die Patienten unangenehmen Zystoskopien verringert werden könnte. Bisher etablierte Urin-basierte Biomarker für diese Tumorart basieren auf dem Nachweis von Proteinen, die von Tumorzellen in den Urin freigesetzt werden wie *Nuclear matrix protein 22* (NMP22) oder dem Nachweis von spezifischen chromosomalen Aneuploidien über *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*-(FISH) (139). Mehrere Arbeitsgruppen haben Tests entwickelt, die auf dem Nachweis von mRNAs mehrerer Gene in Urinproben beruhen (140, 141). Als RNA-basierte Marker werden auch microRNAs diskutiert, da diese sowohl in FFPE-Geweben als auch im Urin stabiler sind als die mRNAs Protein-codierender Gene (142). Obwohl einige Urintests von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkannt wurden und kommerziell erhältlich sind, hat sich

ihre Nutzung im klinischen Alltag nicht etabliert, da sie keinen generellen Vorteil gegenüber klassischer Urinzytologie und Zystoskopie bringen, sondern nur ergänzend eingesetzt werden können (139).

Ein essentielles Kriterium für die Eignung von RNA-basierten Biomarkern zur klinischen Anwendung ist, dass diese stark überexprimiert sind. Diese Überexpression sollte zudem zuverlässig in großen, unabhängigen Patientenkohorten zu finden sein und möglichst mit histopathologischen und klinischen Parametern korrelieren, so dass sie auch für die Prognose genutzt werden kann. Die meisten bisherigen Untersuchungen zu lncRNAs als UC-Biomarker waren vor allem durch kleine Patientenkollektive in ihrer Aussagekraft limitiert. Daher sollten in dieser Arbeit bereits beschriebene Kandidaten in einer größeren eigenen Kohorte validiert und diese Ergebnisse zusätzlich mit denen der umfangreichen TCGA-Kohorte verglichen werden. Entsprechend wurde die Expression von UCA1 und linc-UBC1 sowie von MALAT1, GAS5, TUG1, ncRAN, und H19 in RNA-Extrakten aus 106 Tumorgeweben und 10 benignen Geweben mittels qRT-PCR gemessen. Die genannten lncRNAs wurden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, aufgrund ihrer Beschreibung in der Literatur ausgewählt. Die Expressionswerte der TCGA-Kohorte stammen aus RNA-Seq-Analysen von 252 Tumorgeweben und 19 benignen Geweben. Eine spezifische Schwierigkeit bei der Verwendung von lncRNAs als Biomarker ist ihre häufig schwache Expression, was die Detektion selbst mit sehr sensitiven PCR-basierten Verfahren erschweren, aber auch die Aussagekraft von RNA-Sequenzierungsdaten begrenzen kann (137, 143). Auch aus diesem Grund sollte durch den Vergleich der beiden Kohorten berücksichtigt werden, dass die verwendete Analysemethode Einfluss auf das Ergebnis haben könnte.

Tatsächlich konnten die in der Literatur berichteten lncRNA-Expressionsänderungen in Tumoren gegenüber gesundem Gewebe in keiner der beiden analysierten Kohorten in vollem Umfang bestätigt werden. Die beobachteten Expressionsänderungen waren für keine der analysierten lncRNAs in beiden Kohorten statistisch signifikant und zudem im besten Falle moderat. Eine Eignung für die klinische Anwendung erscheint von daher fraglich. Darüber hinaus wurde keine deutliche Assoziation mit klinischen Parametern gefunden, die für eine erhebliche prognostische Relevanz spräche. Im Falle von MALAT1 und GAS5 wurde zudem eine deutliche Diskrepanz gegenüber den in der Literatur beschriebenen Expressionsveränderungen beobachtet. Während MALAT1 in der Literatur als überexprimiert in Tumoren beschrieben war (87), ist es beiden Analysen

dieser Studie zufolge in Urothelkarzinomen eher vermindert exprimiert, wenn auch nicht statistisch signifikant. Dagegen wurde im Fall von GAS5 in der Literatur eine Herunterregulation der Expression in Tumoren berichtet (90), wogegen in dieser Studie die lncRNA in beiden Kohorten eher überexprimiert zu sein schien.

Ein möglicher Grund für die gefundenen Abweichungen zwischen dieser Analyse und den in der Literatur beschriebenen Daten könnte in der großen Heterogenität von Urothelkarzinomen liegen. Dies gilt speziell für Unterschiede zwischen muskel-invasiven (MIBC) und nicht-muskelinvasiven Karzinomen (NMIBC). Bei einem Großteil der Gewebe in beiden untersuchten Kohorten dieser Arbeit handelt es sich um muskelinvasive Tumore, während viele vorherige Studien auch einen großen Anteil von NMIBC enthalten. Ein Vergleich der lncRNA-Expressionsdaten dieser Arbeit zwischen NMIBC und MIBC ergab jedoch keine deutlichen Unterschiede, mit Ausnahme von MALAT1. Für diese lncRNA wurde in den mit qRT-PCR analysierten Geweben eine verminderte Expression in MIBC gegenüber NMIBC gefunden. Ebenfalls im UC herunterreguliert ist die lncRNA MEG3 (92), die laut Cabili et al. im Nucleus mit MALAT1 co-lokalisiert vorliegt (143).

Während der unterschiedliche Anteil von MIBC und NMIBC die Diskrepanzen zwischen vorherigen Publikationen und den aktuellen Ergebnissen nicht zureichend erklären kann, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass unterschiedliche Anteile von molekularen Subtypen des UC erheblich sein könnten. Diese Fragestellung wird in Abschnitt 4.1.2 genauer behandelt.

Dieser Aspekt betrifft auch TINCR und DANCR, zwei weitere lncRNAs, die in dieser Arbeit auf ihre Eignung als Biomarker im UC hin untersucht wurden. TINCR wurde in dieser Arbeit als differentiell exprimiert in der urothelialen Differenzierung im UP-Modell identifiziert (vgl. 4.2). Da TINCR bereits als wichtiger Regulator der Keratinozyten-Differenzierung beschrieben wurde und ihre Expression in diesem Prozess gegenläufig zu der von DANCR verläuft, wurde die Expression beider lncRNAs nicht nur im Urothelkarzinom sondern auch in Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich genauer untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1.1 TINCR und DANCR im Urothelkarzinom

Die Analyse der Expression von TINCR und DANCR in UC-Geweben gegenüber benignen Geweben ergab, dass beide lncRNAs im UC überexprimiert sind, trotz ihrer beschriebenen

gegenläufigen Expression im Laufe der Keratinozytendifferenzierung (44, 64). Dies wurde mittels qRT-PCR in zwei voneinander unabhängigen Gewebeserien ermittelt. In der größeren der beiden UC-Gewebeserien war TINCR in den Tumoren gegenüber den benignen Geweben deutlich überexprimiert, allerdings nicht statistisch signifikant. In der zweiten, kleineren Gewebeserie war der Unterschied jedoch statistisch signifikant. Die lncRNA DANCR war hingegen in allen drei untersuchten Blasenkarzinom-Kohorten (auch in den reinen Plattenepithelkarzinomen) statistisch signifikant erhöht. Die fehlende Signifikanz der TINCR-Überexpression ist wahrscheinlich auf die geringe Anzahl an benignen Proben gegenüber den Tumorproben zurückzuführen. Genauso bestätigte sich die Überexpression für beide lncRNAs im UC in den *RNA-Seq*-Daten der umfangreichen TCGA-Studie. DANCR gehört zudem zu den lncRNAs, deren Expression auch in der aktuellen Studie der TCGA als erhöht beschrieben wurde (26). Auch eine weitere Studie in einem kleinen Patientenkollektiv von 33 Patienten fand eine erhöhte TINCR-Expression in Harnblasentumoren (144). Betrachtet man die hierarchischen Clusteranalysen der Tumore aus der BLCA-TCGA-Kohorte, wird deutlich, dass TINCR und DANCR innerhalb einer Tumorprobe durchaus gegenläufig exprimiert sein können, d.h. Tumore mit einer hohen DANCR-Expression haben oft eine niedrige TINCR-Expression; die gemeinsame Tendenz zur Überexpression findet sich also nur in der Gesamtkohorte, nicht notwendig in einzelnen Tumoren.

Obwohl beide lncRNAs zunächst über ihre Funktion in der Differenzierung von Keratinozyten entdeckt wurden, wurde keine differentielle Expression in den Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen gefunden, die mittels qRT-PCR analysiert wurden. Dabei ist zu beachten, dass dieses Gewebeset zu klein ist um bei geringen Expressionsunterschieden statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Jedoch stimmt die Tendenz mit den *RNA-Seq*-Daten der deutlich größeren TCGA-Kohorte (HNSC) überein. Beide lncRNAs sind demnach in den Tumoren gegenüber dem Normalgewebe eher vermindert exprimiert, für DANCR ist dies in der TCGA-Kohorte auch statistisch signifikant. Dazu passend wurde auch in den wenigen reinen plattenepithelialen Blasentumoren (UC-SCC) eine verminderte DANCR-Expression ermittelt, die trotz der geringen Probenzahl gegenüber UCs statistisch signifikant ist.

Eine *pan-Cancer*-Analyse aller in der TANRIC-Datenbank verfügbaren Tumorentitäten zeigte, dass das Blasenkarzinom nicht die einzige Tumorentität ist, in der beide lncRNAs in dieselbe Richtung differentiell exprimiert sind. In Brustkrebs (BRCA) und

Plattenepithelkarzinomen der Lunge (LUSC) sind beide lncRNAs hochreguliert, in zwei histologischen Subtypen von Nierentumoren (*Kidney Chromophobe Renal Cell Carcinoma*, KICH, und *Kidney Renal Papillary Carcinoma*, KIRP) dagegen vermindert exprimiert. Im Lungenadenokarzinom ist die Expressionsveränderung der beiden lncRNAs dagegen unterschiedlich: während TINCR vermindert exprimiert ist, ist DANCR überexprimiert. Die Überexpression von TINCR in Mammakarzinomen wurde in zwei weiteren Studien bestätigt, wobei die Probenzahl in diesen Studien jeweils sehr gering war (n=30 bzw. n=24) (43, 145). In der Literatur sind für Lungenkarzinome unterschiedliche Expressionsveränderungen von TINCR beschrieben. In einer Arbeit von Liu et al. wurde eine verminderte Expression von TINCR in Lungenkarzinomen gegenüber angrenzendem Normalgewebe gefunden, wobei aus der Arbeit nicht hervor geht, ob es sich um Adeno- oder Plattenkarzinome handelt. Außerdem ist auch dieses Patientenkollektiv mit 45 Patienten verhältnismäßig klein (72). Eine weitere Untersuchung von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen berichtet ebenfalls eine Überexpression in Tumoren gegenüber Normalgewebe; in dieser Arbeit war das Patientenkollektiv mit n=98 deutlich größer (146). Zusammen genommen deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass eine differentielle TINCR-Expression in Tumoren durchaus mit unterschiedlichen Subtypen einer Entität zusammenhängen kann. Diese Heterogenität in der Gewebeexpression passt zu der allgemeinen Annahme, dass lncRNAs an der „Feinregulation“ gewebespezifischer Prozesse beteiligt sein können. Eine Reihe von Arbeiten hat zudem eine Überexpression von TINCR in Magenkarzinomen gefunden, die eine Eignung der TINCR-Expression als Biomarker für diese Tumorentität nahe legen (70, 147–149). Diese Tumorentität wurde in der *pan-Cancer*-Analyse nicht erfasst, da sie in der TANRIC-Datenbank zum Zeitpunkt der Analyse nicht verfügbar war.

Inwieweit die gefundene TINCR-Überexpression im UC tatsächlich als Biomarker zur Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe geeignet sein könnte, wurde durch eine ROC-Kurvenanalyse geprüft. Die errechnete AUC beträgt 0.74. Dies liegt deutlich unter dem Wert von 0.86, der von Srivastava et al. (150) für den Nachweis der lncRNA UCA1 in Urinsedimenten gefunden wurde, so dass der alleinige Nachweis von TINCR in Gewebeproben als Diagnosekriterium gegenüber der Urinzytologie keine Verbesserung darstellen würde (84). Die TINCR-Expression in Urinsedimenten wurde allerdings bisher nicht untersucht.

Ungeklärt ist weiterhin die Frage nach den mechanistischen Ursachen für die gefundenen Expressionsveränderungen von lncRNAs in den Geweben. In dieser Arbeit wurde diese Frage durch *in silico*-Analysen von DNA-Methylierungsdaten der TCGA-Kohorten für das UC (BLCA) und Kopf-Hals-Tumore (HNSC) angegangen. Man geht allgemein davon aus, dass die Methylierung von Cytosinen an CpG-Stellen in der Promotorregion eines Gens mit dessen transkriptioneller Repression korreliert. Differentielle DNA-Methylierung in der Promoterregion eines Gens bei Differenzierungsprozessen, aber ebenso während der Karzinogenese, stellt somit einen wichtigen Faktor in der Transkriptionsregulation dar (151). Genomweite DNA-Methylierungsanalysen, wie sie hier ausgewertet wurden, ermöglichen daher einen Blick auf Genregulationsprozesse, die durch Methylierungsveränderungen hervorgerufen oder unterstützt werden (150).

Aus diesen Analysen ergab sich, dass im UC eine DNA-Hypomethylierung zu einer TINCR-Überexpression beitragen könnte. Eine mögliche Einschränkung für diese Hypothese ist, dass die CpG-Stelle cg15688918, die am nächsten zum Transkriptionsstart von TINCR lokalisiert ist, als einzige der analysierten CpG-Stellen nicht differentiell methyliert ist. Zudem steht die experimentelle Validierung der gefundenen DNA-Methylierungsveränderungen in einem unabhängigen Gewebeset aus. Die gefundenen Expressionsveränderungen von DANCR können dagegen zumindest anhand dieser *in silico*-Analyse nicht auf eine differentielle Methylierung zurückgeführt werden. In Bezug auf die Regulation beider Gene ist zudem auffällig, dass laut Annotation im UCSC-Genome Browser (hg19) DANCR deutlich mehr Transkriptionsfaktor-Bindestellen innerhalb der putativen Promotorregion und auch in Teilen des Genkörpers aufweist als TINCR. Im Falle des Magenkrebs wurde postuliert, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors E2F1, für den eine putative Bindestelle in der Nähe des Transkriptionsstartes (TSS) von TINCR annotiert ist, die Transkription von TINCR induziert (147). Auch in invasiven UC ist E2F1 häufig überexprimiert (152, 153), sodass eine Aktivierung der TINCR-Expression durch eine erhöhte E2F1-Expression denkbar ist. Ebenfalls für das Magenkarzinom wurde eine Regulation von TINCR durch den Transkriptionsfaktor SP1 postuliert. Laut dieser Arbeit befinden sich in der postulierten Promotorregion von TINCR drei Bindestellen für SP1 (69). Eine Regulation von TINCR im UC durch SP1 im Zusammenhang mit DNA-Methylierungsveränderungen ist denkbar, da eine Interaktion von SP1 mit der DNA-Methylierung lange bekannt ist. Während der Embryogenese verhindern nämlich Sp1-Bindungsstellen eine *de novo*-Methylierung an bestimmten Promotoren, sodass SP1

Veränderungen der DNA-Methylierung steuern könnte (154). Speziell führte die Behandlung der Blasenkarzinomzelllinie EJ mit dem demethylierenden Agenz Decitabin zu einer Demethylierung der Promotorregion von *BTG2*, die dann für eine SP1-Aktivierung zugänglich ist (155).

4.1.2 Assoziation der lncRNA-Expression mit molekularen Subtypen des UC

Nachdem in den vergangenen Jahren molekulare Subtypen des UC identifiziert wurden, die von hoher prognostischer und prädiktiver Bedeutung für die Patienten sein können (18, 21, 25–27, 29), müssen diese bei der Auswahl an Biomarkern für das UC berücksichtigt werden. Da keine der analysierten lncRNAs ein geeigneter diagnostischer Biomarker für das UC insgesamt zu sein scheint, wurde daher in dieser Arbeit analysiert, ob die Expression mit molekularen Subtypen assoziiert ist und somit von prognostischer Relevanz sein könnte. Dieser Aspekt wurde insbesondere durch *in silico* Analysen von öffentlichen zugänglichen Datensätzen des TCGA-Konsortiums bearbeitet. In der aktuellsten Publikation des TCGA-Konsortiums zu MIBC sowie in einer umfassenden Arbeit zur Genexpression in NMIBC (26, 156) sind Veränderungen in der lncRNA-Expression in Abhängigkeit von molekularen Subtypen analysiert worden.

Unter den lncRNAs, die aufgrund ihrer Beschreibung in der Literatur untersucht worden waren, war die Expression von TUG1 im UC besonders auffällig: obwohl die lncRNA generell eher überexprimiert ist, ist eine niedrige TUG1-Expression mit dem Auftreten des Basal-Squamösen Subtyps (BASQ) assoziiert, einer Untergruppe an Tumoren, die mit einer schlechten Prognose einhergeht. Der BASQ-Subtyp ist durch eine hohe Expression bestimmter Cytokeratine (KRT14, KRT5) und niedriger Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren (FOXA1, GATA3) charakterisiert (27). Eine Reihe von Meta-Analysen hat sich mit der Eignung von TUG1 als prognostischem Biomarker über mehrere Tumorentitäten hinweg beschäftigt. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gefundenen Assoziationen kommen diese Meta-Analysen zu dem Schluss, dass eine erhöhte TUG1-Expression in der Mehrzahl der Tumorentitäten auch mit einem verschlechterten Gesamtüberleben der Patienten einhergeht. Allerdings sind bereits die Studien, die diesen Metaanalysen zugrunde liegen, sehr heterogen. Außerdem wurden mögliche Assoziationen mit molekularen Subtypen einzelner Tumorentitäten nicht berücksichtigt (157–160). Im Brustkrebs wurde ebenfalls eine verminderte TUG1-Expression in Tumoren gegenüber Normalgewebe gefunden, die *in vitro* mit einer erhöhten Migration

und Invasion von Tumorzellen einhergeht. Allerdings war auch in diesem Fall das Patientenkollektiv (n = 58) klein (161). Eine weitere Studie analysierte die *RNA-Seq*-Daten aus der Brustkrebs-TCGA-Kohorte und fand eine erhöhte TUG1-Expression in HER2-positiven und basalen Subtypen im Vergleich zu luminalen Subtypen (162). In der ursprünglichen Studie zum UC (163) wurden mögliche Assoziationen der TUG1-Expression mit molekularen Subtypen nicht untersucht. Dagegen wurde eine Assoziation mit *High Grade* Tumoren in MIBC gefunden, die sich in den hier untersuchten Kohorten nicht bestätigte.

Auch für die Beurteilung der aberranten TINCR bzw. DANCR Expression im UC war wichtig, inwieweit diese mit molekularen Subtypen assoziiert ist. Hierbei lag der Fokus ebenfalls auf dem BASQ Subtyp, der molekular Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (HNSC) ähnelt. Hierarchische Clusteranalysen von *RNA-Seq*-Daten der TCGA-Kohorte ergaben, dass im UC Tumore des BASQ-Subtyps eine intermediäre TINCR- sowie eine niedrige DANCR-Expression aufweisen. Tumore mit eher luminalem Subtyp haben umgekehrt eine höhere DANCR- und niedrigere TINCR-Expression. Eine weitere Gruppe Tumore mit besonders hoher TINCR-Expression kann nicht eindeutig einem dieser beiden übergeordneten Subtypen zugeordnet werden. Trotz dieser Assoziation der Expression mit molekularen Subtypen ist eine Zuordnung über die lncRNA-Expression nicht ohne weiteres möglich, da eine Unterscheidung zwischen intermediärer und hoher TINCR-Expression schwierig ist. Ein etwas anderes Bild zeigt sich bei dem Vergleich mit Kopf-Hals-Tumoren, für die über die Abgrenzung der HPV-positiven Tumoren hinaus – eine Einteilung der Tumore in molekulare Subtypen auf Basis Genom-weiter Sequenzierungs- und Expressionsstudien noch im Prozess ist (164). Die Gegenläufigkeit der Expression von TINCR und DANCR war in dieser Tumorentität nicht zu erkennen. Dennoch ist auch in Kopf-Hals-Tumoren mit Ausnahme einer kleinen Subgruppe die Expression der Keratine gegenläufig zu der der Transkriptionsfaktoren GATA3 und FOXA1 wie es für den BASQ-Subtyp beschrieben wurde. Besonders auffällig ist, dass Tumore mit einer hohen Keratin- und niedrigen TF-Expression eine niedrige Expression beider lncRNAs aufweisen. Um auszuschließen, dass die Expression beider lncRNAs darüber hinaus mit anderen molekularen Subtypen des UC assoziiert ist, wurde eine weitere hierarchische Clusteranalyse mit den von Dhadania et al. (29) definierten Subtypen durchgeführt. Hier war jedoch keine weitere Zuordnung über die bereits beschriebenen hinaus erkennbar.

Die Uneinheitlichkeit der unterschiedlichen Expressionsstudien verdeutlicht, dass für eine klinische Implementation von lncRNAs als diagnostische Biomarker sehr umfangreiche Validierungsstudien notwendig sind. Die Expression von lncRNAs kann jedoch von prognostischer Bedeutung sein, wenn man sie in die Bestimmung molekularer Subtypen mit einbezieht (26). Für die Anwendung in der klinischen Diagnostik wird die technische Applikation der lncRNA-Expressionsanalyse in Geweben zu optimieren sein. Methoden für die Detektion von RNA wie RNA-*in-situ*-Hybridisierung (RNA-ISH) an FFPE-Gewebe und die Detektion aus RNA-Extrakten mittels *NanoString nCounter*-Systemen, die Multiplex-Reaktionen ermöglichen und ohne Reverse Transkription auskommen, sind für mRNAs Protein-codierender Gene bereits etabliert (165, 166). Ob sich diese Methoden auch auf lncRNAs übertragen lassen ist aufgrund ihrer Beschaffenheit (niedrigere Expression, weniger Exone und mehr repetitive Sequenzen als PCGs) eine wichtige Frage. Insbesondere zur Analyse molekularer Subtypen im Blasenkarzinom, wie sie in dieser Arbeit mit TUG1 und TINCR assoziiert gefunden wurden, sind Multiplex-Verfahren zur parallelen Detektion mehrerer Gene sinnvoll. Ob TUG1 oder TINCR auch in Urin- oder Blutproben von Tumorpatienten nachgewiesen werden können, wurde bisher nicht untersucht. Eine Studie konnte per qRT-PCR TUG1 neben einer Reihe weiterer lincRNAs im Blut von Arbeitern aus Kupferschmelzen nachweisen, die gleichzeitig eine erhöhte Arsen-Konzentration im Blut aufwiesen (167).

4.1.3 Identifikation differentiell exprimierter lncRNAs in der urothelialen Differenzierung

Neben der möglichen Nutzung von lncRNAs als Biomarker im UC war ein Hauptziel dieser Arbeit weitere lncRNAs zu identifizieren, die die urotheliale Differenzierung und somit auch Tumorentstehung und -progression beeinflussen könnten. Dazu wurden *RNA-Seq*- und *Microarray*-Daten von *in vitro* differenzierten UP-Kulturen im Hinblick auf differentiell exprimierte lncRNAs ausgewertet. Daraus ergaben sich in den *Microarray*-Daten insgesamt 670 und in der *RNA-Seq* 74 lncRNAs, deren Expression durch Calcium-Behandlung verändert wurden, sowie 51, die durch TZ+PD-Behandlung in ihrer Expression verändert wurden. Im Vergleich wurden mittels *RNA-Seq* 258 annotierte, verändert exprimierte lncRNAs in der Keratinozyten-Differenzierung identifiziert (44). In der urothelialen Differenzierung sind im Verhältnis deutlich mehr mRNAs von Protein-codierenden Genen differentiell exprimiert, was sich in einer Vielzahl veränderter

zellulärer Prozesse widerspiegelt. Ein ähnlicher Unterschied zwischen lncRNAs und PCGs wurde auch in Differenzierungsprozessen anderer Gewebe gefunden. Während der osteogenen Differenzierung wurden 290 mRNAs als hoch und 194 mRNAs herunter reguliert beschrieben, während nur 17 lncRNAs hoch und 31 herunter reguliert wurden (168). Eine andere Arbeit identifizierte 1887 differentiell exprimierte mRNAs und 960 lncRNAs bei der osteogenen Differenzierung (169). Das könnte daraufhin deuten, dass lncRNAs zwar an Differenzierungsprozessen beteiligt sind, ihre Bedeutung aber nicht vergleichbar ist mit der Protein-codierender Gene. Zudem ist es denkbar, dass eine einzelne lncRNA - ähnlich wie dies bei microRNAs der Fall ist - die Expression mehrerer anderer Gene beeinflusst. In dieser Arbeit ist auch der Unterschied zwischen beiden Analyseplattformen zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene sehr hoch; nur acht lncRNAs wurden über beide Analysen als verändert identifiziert. Um aus den insgesamt gefundenen spezifische lncRNAs für weitere Analysen auszuwählen, wurden zusätzliche Kriterien wie genomische Lokalisation und - soweit vorhanden - funktionelle Beschreibungen aus der Literatur hinzugezogen. Anders als in der zuvor beschriebenen Validierungsstudie zu potentiellen Biomarkern fielen dabei große Unterschiede zwischen den qRT-PCR-Daten in den hiesigen kleinen Gewebeserien für UC und HNSC im Vergleich zu den *RNA-Seq*-Daten der TCGA auf. Besonders auffällig waren hierbei LINC01116 und NEAT1. Während sich die Überexpression von LINC01116 in HNSC-Geweben gegenüber Normalgewebe auch in der TCGA-Kohorte bestätigte, war diese lncRNA in der kleinen UC-Gewebeserie vermindert exprimiert, in der entsprechenden TCGA-Kohorte jedoch überexprimiert. Bei NEAT1 fand sich für das UC in keiner analysierten Kohorte ein Unterschied, in der kleinen HNSC-Gewebeserie war die lncRNA in den Tumoren gegenüber Normalgewebe vermindert exprimiert, in der TCGA-Kohorte jedoch überexprimiert. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von Validierungsstudien in größeren Patientenkollektiven. Über die Expression von LINC01116 in anderen Geweben bzw. Tumorentitäten ist bisher wenig bekannt, ebenso über ihre mögliche funktionelle Bedeutung. Eine Arbeit deutet darauf hin, dass LINC01116 in Brustkrebs überexprimiert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (170).

Die lncRNA NEAT1 ist nahezu ubiquitär exprimiert und trägt wesentlich zur Struktur und Anzahl sogenannter *Paraspeckles* bei (33). Dabei handelt es sich um dynamische Strukturen innerhalb des Zellkerns, die vermutlich an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, indem sie dazu beitragen, dass RNAs im Zellkern zurückgehalten werden

(171). Darüber hinaus wurde eine Überexpression von NEAT1 in verschiedenen Tumorentitäten gefunden, u. A. auch im Harnblasenkarzinom (172, 173). Diese Überexpression konnte in den in dieser Arbeit untersuchten Geweben nicht bestätigt werden, obwohl in der aktuellen Studie der TCGA ebenfalls eine erhöhte Expression gefunden wurde (26). NEAT1 reguliert während der Adipocyten-Differenzierung durch Bindung an SRp40 das Spleißen von PPAR γ 2, so dass eine Beteiligung an der durch ebenfalls durch PPAR γ -Aktivierung vermittelten urothelialen Differenzierung möglich erscheint (174).

Eine differentielle Expression von CASC15 in den analysierten Geweben beider Tumorentitäten konnte nicht eindeutig belegt werden. In der Literatur gibt es Hinweise auf einen Beitrag zur Entwicklung bestimmter Hauttumore wie Basalzell-Karzinome und Melanome (175, 176). CASC15 liegt auf Chromosom 6p22, einer Region, die sowohl in Melanomen als auch in Harnblasenkarzinomen häufig amplifiziert ist (176, 177). Für Urothelkarzinome wurden in zwei Zelllinien (1A6 und 5637) Fusionen des *CASC15* Gens mit *PPARG* gefunden (26). Dies steht im Einklang damit, dass in dem in dieser Arbeit analysierten Zelllinien-Set 5637 die Zelllinie mit der höchsten CASC15-Expression ist.

Mit MALAT1 und UCA1 wurden zudem lncRNAs als differentiell exprimiert identifiziert, die bereits als Biomarker für das UC in der Literatur beschrieben wurden (vgl. auch 4.1). Insbesondere für MALAT1 ergab sich in der zuvor beschriebenen Validierungsstudie kein einheitliches Muster in Bezug auf die Gewebeexpression, sodass aus diesen Untersuchungen zusammengenommen keine eindeutige Aussage über die Bedeutung dieser lncRNA für die urotheliale Differenzierung getroffen werden kann. Über die Funktion von MALAT1 ist bekannt, dass diese lncRNA häufig Genregulationsprozesse über die Bindung von microRNAs beeinflusst. In der osteogenen Differenzierung erhöht MALAT1 beispielsweise die Expression des Osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktor Osterix, indem es miRNA-143 bindet (178).

4.2 Molekulare Charakterisierung der urothelialen Differenzierung *in vitro*

Die urotheliale Differenzierung *in vitro* im HBLAK-Modell unterscheidet sich gegenüber dem UP-Modell durch die deutlich eingeschränkte Wirkung der Kombination von pharmakologischer PPAR γ -Aktivierung und EGFR-Inhibition (109). Eine mögliche

Erklärung dafür ist, dass die pharmakologische Inhibition des EGFR-Signalweges nicht ausreicht, um die Wirkung des im Medium enthaltenen EGFs oder autokriner EGF-ähnlicher Faktoren zu blockieren. Eine weitere mögliche Erklärung bestünde darin, dass PPAR γ in dieser Zelllinie nicht funktional ist. Mutationen des Gens sind für diese Zelllinie jedoch nicht bekannt (109) und das Protein ist nachweisbar. PPAR γ induziert Differenzierungsprozesse über eine Dimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor α (RXR α). Dieser Weg wird möglicherweise auch durch die Ca²⁺/FCS-Behandlung aktiviert, da sie FOXA1 induziert, welches als Zielgen von PPAR γ /RXR α beschrieben ist (179). PPAR γ ist also vermutlich in HBLAK-Zellen funktional. UC-Zelllinien reagieren unterschiedlich stark auf unterschiedliche PPAR γ -Agonisten (180). Es ist also denkbar, dass Troglitazone nicht der geeignete Agonist für das HBLAK-Modell ist, obwohl es sich um einen der stärksten Agonisten handelt. Allerdings wurde speziell Troglitazone in der Arbeit von Goldstein et al. (180) nicht untersucht und die Analysen waren auf Tumorzelllinien beschränkt, die Mutationen in PPAR γ oder RXR α enthalten können.

Eine weitere Frage ist, wie die Zugabe von FCS zusätzlich zu Calciumchlorid den squamösen Phänotyp hin zu einem urothelialen verschiebt. Auch dies hängt möglicherweise mit einer Aktivierung von RXR α zusammen, denn es ist bekannt, dass FCS bzw. Seren aus Säugetieren im Allgemeinen 1-2% Vitamin A bzw. Retinoide enthalten, die die Liganden für RXR α liefern (181). Darüber hinaus wird die Stabilität von Retinoiden durch Zugabe von FCS erhöht (182). Ob sich die Induktion der Differenzierung im Ca²⁺/FCS-Modell wirklich allein durch eine Aktivierung von PPAR γ bzw. RXR α erklären lässt, ist fraglich, da in diesem Modell eine Inhibition von EGFR vermutlich nicht stattfindet (54).

Obwohl die urotheliale Differenzierung in HBLAK-Zellen durch Ca²⁺/FCS-Stimulation zu einer deutlichen Expression von Markern terminaler urothelialer Differenzierung wie UPK2 und KRT20, aber auch FOXA1 führt, bleibt die erwartete Induktion des Transkriptionsfaktors GATA3 (183) aus. Es ist denkbar, dass GATA3 in HBLAK-Zellen bereits auf einem hohen Niveau exprimiert ist und nicht weiter induziert werden kann. Dies könnte ein möglicher Grund für die eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen im Vergleich zu UP-Kulturen sein (109).

Eine grundlegende Hypothese dieser Arbeit war, dass die lncRNA TINCR in der urothelialen Differenzierung eine ähnliche Rolle wie innerhalb der Keratinozyten-

Differenzierung einnehmen könnte und so zu der Ausprägung eines squamösen Phänotyps beiträgt. Eine Induktion von TINCR durch Calciumchlorid-Behandlung wurde jedoch nur in den Differenzierungsversuchen bei UP-Kulturen beobachtet, die dem initialen *Microarray*- bzw. *RNA-Seq-Screen* zugrunde liegen. In der HBLAK-Zelllinie kommt es dagegen durch Calciumchlorid-Behandlung nicht zu einer TINCR-Induktion. Eine Induktion von TINCR wird in diesen Zellen vielmehr durch eine TZ+PD-Behandlung erzielt, die keine squamöse Differenzierung auslöst. Durch Ca²⁺/FCS-Behandlung wird die TINCR-Expression eher vermindert, wie es auch in UP-Kulturen der Fall ist. Auch dieser Befund verdeutlicht, dass die urotheliale Differenzierung von HBLAK-Zellen durch TZ+PD gegenüber UP-Kulturen gestört ist. Eine Beteiligung von TINCR an der urothelialen Differenzierung ist dennoch auch in HBLAK nicht ganz auszuschließen, da noch die Möglichkeit besteht, dass alternative Spleißformen von TINCR involviert sind. Diese wären mit den für die qRT-PCR-Analyse gewählten Primern nicht erkannt worden. Alternatives Spleißen von TINCR kann zur Inklusion von zusätzlichen TINCR-Box-Motiven führen, was wiederum die Stabilität der Ziel-mRNAs beeinflusst. Diese funktionellen Änderungen wurden in einer Genexpressionsstudie an immortalisierten Keratinozyten im Kontext von Psoriasis-Erkrankungen beschrieben (184). Kürzlich wurde in einem *in vitro*-Modell belegt, dass TINCR auch während der adipogenen Differenzierung hochreguliert wird. Diese Hochregulation wird durch den Transkriptionsfaktor C/EBP α ausgelöst, der die Transkription durch Bindung an zwei Stellen innerhalb des *TINCR* Promoters induziert. Anders als in der Keratinozyten-Differenzierung bindet TINCR in der adipogenen Differenzierung nicht an mRNAs, sondern an die microRNA miR-31-5p, deren Zielgen wiederum C/EBP α selbst ist. Darüber hinaus ging aus *Knockdown*-Experimenten hervor, dass TINCR auch den Proteinspiegel von PPAR γ beeinflusst. Der genaue Mechanismus ist nicht beschrieben, eine direkte Interaktion ist allerdings aufgrund unterschiedlicher zellulärer Lokalisation unwahrscheinlich. Ob weitere Zielgene von TINCR in der adipogenen Differenzierung eine Rolle spielen ist nicht bekannt (185). Dennoch deutet diese Arbeit daraufhin, dass TINCR durchaus Einfluss auf PPAR γ haben kann, was wiederum zu dem Befund passt, dass TINCR in HBLAK-Zellen vor allem durch TZ+PD-Behandlung induziert wird. Über die Bedeutung von C/EBP α im Urothel bzw. im Urothelkarzinom ist derzeit wenig bekannt. Punktmutationen in der Bindestelle von C/EBP α in der Promoterregion von *UCA1* führen zu einer erhöhten Expression von *UCA1* in Harnblasenkarzinom-Zelllinien, insbesondere

in 5637 (186). Das passt zu dem Befund aus dieser Arbeit, dass 5637 die Zelllinie mit der höchsten UCA1-Expression ist. Aus Harnblasenkarzinom-Zelllinien ist weiterhin bekannt, dass C/EBP β PPAR γ induzieren (187). Ob auch C/EBP β die Expression von TINCR reguliert ist bislang nicht untersucht.

Die Expression von DANCR hingegen wird in HBLAK-Zellen im Laufe der Differenzierung kontinuierlich herunterreguliert, was daraufhin deutet, dass DANCR auch im urothelialen Kontext Differenzierungsprozessen entgegenwirkt. Dies belegt insbesondere der Verlauf nach Stimulation durch Ca²⁺/FCS, denn in diesem Fall ist die Expression von DANCR bereits einen Tag nach Stimulation sehr niedrig und verändert sich nicht weiter.

Die Expression von TINCR in Plattenepithelkarzinomen wird durch den Transkriptionsfaktor ZNF750 induziert (68). ZNF750 reguliert im Zusammenspiel mit TINCR die epidermale Differenzierung. So wird die mRNA von *CALML5*, einem Zielgen von ZNF750, durch die Bindung an TINCR im Zytoplasma stabilisiert (67). Wie eine PCR-Array-Analyse ergab, beeinflusst die Überexpression von ZNF750 in der Plattenepithelkarzinomzelllinie CAL-27 auch den PPAR γ -Signalweg indirekt (188). Ein solches Zusammenspiel von ZNF750 und TINCR in der urothelialen Differenzierung scheint nach den Daten dieser Arbeit unwahrscheinlich. Beide Gene werden in HBLAK-Zellen durch die Ca²⁺/FCS-Stimulation nicht induziert. Lediglich während der unvollständigen - Differenzierung durch TZ+PD-Stimulation kann es zu einer Induktion beider Gene kommen.

Der squamöse Phänotyp, der durch Calciumchlorid-Stimulation hervorgerufen wird, manifestiert sich besonders in der ausgeprägten Induktion der Expression von S100A7, einem Calcium-bindenden Protein, welches zunächst in Psoriasis-Erkrankungen beschrieben wurde. Diese Induktion wird durch die zusätzliche Behandlung mit FCS unterdrückt. Veränderungen der S100A7 Expression sind in der Literatur auch in HaCaT-Differenzierungsexperimenten beschrieben. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Unterschied zwischen mit Calciumchlorid behandelten und unbehandelten HaCaT-Zellen beobachtet werden. Möglicherweise hat bereits die hohe Zelldichte in den unbehandelten Zellen zu einer deutlichen Expression geführt, die durch Behandlung mit Calciumchlorid nicht mehr beeinflusst wird, da die Konfluenz der Zellen in HaCaT zu einer deutlich stärkeren S100A7 Expression führt als Calciumchlorid-Stimulation (189). Dies verdeutlicht, dass das hier gewählte Modell in HaCaT-Zellen in Bezug auf die Zelldichte

optimiert werden sollte um den Calcium-Einfluss auf die Zellen besser erfassen zu können. In HBLAK-Zellen genügt die Konfluenz der Zellen offensichtlich nicht um eine S100A7 Expression zu induzieren. Auffällig ist jedoch, dass die Induktion von S100A7, aber auch anderer Differenzierungs-assoziiertes Gene wie ZNF750 schwächer ausfällt, wenn die Zellen durch TZ+PD stimuliert werden. Dieses Verhalten ähnelt dem von normalen Schleimhautzellen aus der Wange. In diesen Zellen konnte mit TZ+PD keine urotheliale Differenzierung induziert werden, da die Transkriptionsfaktoren GATA3, FOXA1 und PPAR γ nicht exprimiert werden; erst nach experimenteller Überexpression von PPAR γ konnten auch GATA3 und FOXA1 induziert werden (183).

Obwohl DANCR der Differenzierung in der Epidermis entgegenwirkt, scheint es die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knorpel zu fördern. Dabei wird die Expression von DANCR durch den Transkriptionsfaktor SOX4 induziert (190). SOX4 ist in Harnblasenkarzinomen aufgrund seiner chromosomalen Lokalisation in der häufig amplifizierten Region 6p22.3 oft überexprimiert (191). Ob *DANCR* tatsächlich auch im UC ein Zielgen von SOX4 ist, wurde nicht untersucht. Neben der Regulation durch SOX4 wurde *DANCR* in Prostatakarzinomzellen auch als Zielgen von MYC identifiziert. Die Induktion von DANCR durch MYC führte wiederum zu einer Repression des Zellzyklusinhibitors p21 (74).

Die subzelluläre Lokalisation ist ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Funktion einer lncRNA. Eine fraktionierte RNA-Aufreinigung ergab, dass beide lncRNAs sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus detektiert werden können. In HBLAK-Zellen ist DANCR sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektierbar. Die Lokalisation ändert sich während der Differenzierung nicht. In der Literatur ist für DANCR dagegen eine Anreicherung im Zytoplasma von Colonkarzinomzellen beschrieben (192). Der Nachweis von DANCR sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus stimmt jedoch mit den Ergebnissen von Cabili et al. überein, die DANCR mit RNA-FISH ebenfalls in beiden Zellkompartimenten von HeLa-Zellen detektieren konnten (143). In der urothelialen Differenzierung wird die Expression von DANCR herunterreguliert wie auch in der epidermalen und Osteoblasten-Differenzierung (64, 65). In der Osteoblasten-Differenzierung bindet DANCR an EZH2, der katalytischen Untereinheit des Polycomb-Komplexes PRC2, und soll dadurch an der Repression von RUNX2 beteiligt sein, einem Faktor, der wesentlich für die Induktion der Differenzierung verantwortlich ist (65). Inwieweit die Bindung von DANCR an EZH2 jedoch spezifisch ist, ist fraglich, da EZH2 eine

generelle hohe Bindungsaffinität an RNA hat (193). In einigen Tumorentitäten soll DANCR die Tumorprogression fördert, indem es kompetitiv microRNAs bindet und dadurch die Expression anderer Gene beeinflusst (76, 194–196). Die Voraussetzungen für die effektive Bindung von lncRNAs an microRNAs sind die subzelluläre Lokalisation der lncRNA im Cytoplasma und ihre Zugänglichkeit zum *RNA-induced-silencing-complex* (RISC), der für die microRNA-vermittelte Genregulation essentiell ist (197). Zusammengenommen könnte dies darauf hinweisen, dass die Funktion von DANCR stark von der subzellulären Lokalisation abhängt: Einfluss auf Differenzierungsprozesse nimmt DANCR eher im Zellkern, andere zelluläre Prozesse wie Proliferation und Migration könnte es im Zytoplasma beeinflussen. Inwieweit sich dieser Aspekt der subzellulären Lokalisation in der Überexpression im UC bzw. HNSC widerspiegelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Inwieweit sog. *competing endogenous RNAs* (ceRNA) tatsächlich unter physiologischen Bedingungen microRNAs binden können, wird kontrovers diskutiert. Neben der subzellulären Lokalisation spielt das stöchiometrische Verhältnis von ceRNA zu microRNAs eine entscheidende Rolle. Da viele lncRNAs eine sehr geringe Abundanz aufweisen, ist fraglich, ob dies ausreicht um kompetitiv an microRNAs zu binden (198). Möglicherweise führt aber die Überexpression von DANCR im UC bzw. HNSC zu einer Veränderung des stöchiometrischen Verhältnisses, die eine Funktion als ceRNA begünstigt.

Unter der Ca^{2+} /FCS-vermittelten Differenzierung von HBLAK-Zellen kam es dagegen zu einer gewissen Verschiebung der TINCR-Transkripte in das Cytoplasma. Die fraktionierte RNA-Aufreinigung in den behandelten Zellen unterlag jedoch technischen Limitationen; vor allem war es nicht möglich eine fraktionierte RNA-Aufreinigung von TZ+PD-behandelten Zellen durchzuführen. Um ein vollständiges Bild der subzellulären Lokalisation in den Zellen und etwaigen Veränderungen im Zuge der Differenzierung zu erfassen, wäre eine zusätzliche Methode wie RNA-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (RNA-FISH) notwendig. Die durch Ca^{2+} /FCS-Stimulation ausgelöste Verschiebung von TINCR in das Zytoplasma in HBLAK-Zellen deutet jedenfalls darauf hin, dass die TINCR lncRNA möglicherweise doch eine funktionelle Bedeutung in diesem Differenzierungsmodell besitzen könnte, auch wenn ihre Expression generell nicht induziert wird. Diese Beobachtung passt zu der ursprünglichen Beschreibung in der Keratinozyten-Differenzierung, wonach TINCR im Cytoplasma mRNAs Differenzierungs-assoziiierter Gene stabilisiert (44).

4.2.1 Funktionelle Bedeutung von TINCR und DANCR im Urothel

Um nach der deskriptiven Beschreibung der TINCR- und DANCR-Expression im UC und in der urothelialen Differenzierung ihre Funktion besser erfassen zu können, wurde ihre Expression sowohl in Tumorzelllinien als auch in HBLAK-Zellen moduliert. Zunächst wurden verschiedene Tumorzelllinien mit einem siRNA-Pool gegen TINCR behandelt und auf verschiedene zelluläre Eigenschaften hin untersucht. Deutliche Effekte auf wichtige zelluläre Eigenschaften wie Klonogenität oder Viabilität wurden dabei nicht beobachtet. Auch die Auswirkungen auf die Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene waren sehr heterogen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Chen et al., die durch eine RNAi-basierte Methode zum *Knockdown* von TINCR eine verminderte Proliferation und Induktion von Apoptose beobachteten, obwohl die Effizienz des *Knockdowns* schlechter waren als die in dieser Arbeit erreichten (144). Möglicherweise ist dies Ausdruck der Komplexität der Regulation durch lncRNAs, die insbesondere im Falle von TINCR von der genauen Expressionsstärke abhängig sein könnte (vgl. 4.1). Die Effizienz der Depletion von lncRNAs durch Antisense-Oligonucleotide (ASO) oder siRNA hängt wesentlich von der subzellulären Lokalisation der jeweiligen lncRNA ab. Für nukleär lokalisierte lncRNAs ist die Verwendung von ASOs effizienter als siRNA (199). Da TINCR in HBLAK-Zellen in beiden Zellkompartimenten nachweisbar ist, ist es nicht auszuschließen, dass ein funktioneller Anteil an TINCR-Transkripten im Nucleus erhalten bleibt. Eine Möglichkeit solch technische Limitationen von siRNA-vermitteltem *Knockdown* bei lncRNAs zu umgehen, bietet die Verwendung der CRISPR/Cas9-Technik. Dennoch gibt es auch hier technische Hürden, die in der Struktur von lncRNAs begründet sind. Anders als bei Protein-codierenden Genen ist es bei lncRNAs nicht ausreichend kleinere Deletionen oder Insertionen durch die CRISPR/Cas9-Technik einzufügen, wie sie zu einem nicht-funktionsfähigen Protein führen. Bei lncRNA-Genen können dennoch funktionsfähige Genprodukte erhalten bleiben. Um einen vollständigen Funktionsverlust der lncRNA zu gewährleisten ist es vielmehr notwendig unter Verwendung mehrerer *guide*-RNAs große Fragmente des Genkörpers oder der Promotorregion zu deletieren (200, 201). Derartige Experimente könnten die Diskrepanzen zwischen den siRNA-basierten Ergebnissen klären.

Ähnlich war nach stabiler Überexpression von TINCR in verschiedenen Zelllinien im Zeitverlauf kaum ein Einfluss auf zelluläre Eigenschaften zu beobachten. Auch auf die

Expression der Differenzierungs-assoziierten Markergene hatte die Überexpression keinen wesentlichen Einfluss; die Expression einzelner Gene variierte nur allgemein im Zeitverlauf. Dies ist ein Hinweis, dass es weitere Faktoren geben muss, die Einfluss auf die Expression der Markergene in den Tumorzellen nehmen. Ein solcher Faktor könnte die Zelldichte zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion sein. Zudem war die erreichte Überexpression in den Zelllinien z. T. stark unterschiedlich, was wiederum Einfluss auf die Funktionalität von TINCR haben könnte. Eine systematische Analyse möglicher weiterer Zielgene wurde in dieser Arbeit wegen der insgesamt geringen Effekte nicht vorgenommen.

Allerdings wurde die Expression von Involucrin durch TINCR-Überexpression in RT-112 konstant herunter reguliert. Da Involucrin als Zielgen von TINCR beschrieben ist, deutet dies darauf hin, dass das eingebrachte TINCR-Transkript korrekt gebildet wird (44). In der Keratinozyten-Differenzierung wird Involucrin durch TINCR allerdings stabilisiert, über einen Stau1-vermittelten Mechanismus. Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene hängen direkt mit der Gewebe-spezifischen Funktion der Zellen zusammen wie Involucrin in der Epidermis oder Uroplakine im Urothel. Man kann daher vermuten, dass sich der Mechanismus, über den TINCR auf Zielgene einwirkt, in UC-Zellen von dem in Keratinozyten unterscheidet. In T-24 und 253J Zellen wird Involucrin nicht exprimiert, was sich auch durch TINCR-Überexpression nicht ändert. Es ist bekannt, dass TINCR über Stau1-Bindung in der epidermalen Differenzierung die Transkriptionsfaktoren MAF:MAFB stabilisiert, die dann wiederum in Kooperation mit p63 weitere Transkriptionsfaktoren wie ZNF750 und KLF4 aktivieren (66). Dass TINCR zumindest in der TZ+PD-vermittelten Differenzierung in HBLAK-Zellen die Expression von ZNF750 beeinflusst, ist demnach möglich. Für die urotheliale Differenzierung spielt dieser Transkriptionsfaktor jedoch keine Rolle, da er durch Calcium/FCS-Behandlung ebenso wenig wie TINCR induziert wird. Die für die urotheliale Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren GATA3 und FOXA1 werden von TINCR dagegen nicht aktiviert. Über den Einfluss von MAF-Transkriptionsfaktoren auf die urotheliale Differenzierung ist wenig bekannt; in *Microarray*-Analysen wurde eine deregulierte Expression von MAFG in Harnblasenkarzinomen festgestellt (202). Ob der Einfluss von TINCR auf Zielgene im Urothel ebenfalls über Stau1 vermittelt wird, wurde in dieser Arbeit ebenfalls nicht untersucht. Die Bindung von Stau1 an die 3'-UTR von mRNAs führt in den meisten Fällen zu einer RNA-Degradation und nicht zu einer Stabilisierung. Es ist bekannt, dass

lncRNAs als Transaktivatoren für eine solche Stau1-vermittelte RNA-Degradation (*Stau1-mediated mRNA-decay*, SMD) fungieren können (203). Es ist also denkbar, dass TINCR in UC-Zelllinien als ein solcher Transaktivator wirkt und es somit zur Abnahme von Involucrin in RT-112 nach TINCR-Überexpression kommt.

Für andere Tumorentitäten, in denen TINCR als verändert exprimiert beschrieben ist, sind weitere Funktionsmechanismen beschrieben. Dabei unterscheidet sich die postulierte Rolle als Onkogen oder Tumorsuppressorgen je nach untersuchter Tumorentität. Für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) wird TINCR eine Rolle als Onkogen zugeschrieben, in dem es durch Interaktion mit BRAF dessen Aktivität verstärkt (146). Im Unterschied dazu wird im Kolonkarzinom eine Rolle als Tumorsuppressor postuliert, indem die Bindung von TINCR an EpCAM dessen Hydrolyse verhindert. Dieser Vorgang wiederum soll die Aktivierung des Wnt-Signalwegs verhindern (204). Außerdem wird in zwei weiteren Arbeiten eine Funktion von TINCR als Regulator von microRNAs beschrieben (70, 72). Gemeinsam ist all diesen beschriebenen Mechanismen, dass sie eine Lokalisation von TINCR im Zytoplasma voraussetzen, wie sie zumindest in der urothelialen Differenzierung wahrscheinlich ist (vgl. 4.3).

Eine eindeutige Beurteilung über die Funktion von TINCR im Urothelkarzinom bzw. in der urothelialen Differenzierung lässt sich an dieser Stelle nicht treffen. Vieles deutet darauf hin, dass die Funktion von TINCR im Urothel sich von der in der Epidermis unterscheidet und entgegen der ursprünglichen Hypothese dieser Arbeit TINCR in keinem direkten Zusammenhang mit aberranter squamöser Differenzierung im Urothel steht. Im Gegenteil: eine Überexpression von TINCR führt eher zu einer Unterdrückung des squamösen Phänotyps. Dagegen spricht die gefundene Assoziation mit dem BASQ-Subtyp in Urothelkarzinomen. Wahrscheinlicher erscheint eine Beteiligung von TINCR an der urothelialen Differenzierung, die über PPAR γ vermittelt wird. Der genaue Mechanismus sowie die Regulation von TINCR selbst bleiben jedoch weitgehend ungeklärt. Dies ist im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass das *in vitro*-Modell der urothelialen Differenzierung durch pharmakologische PPAR γ -Aktivierung in HBLAK-Zellen unzureichend ist. Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass nicht bekannt ist, welche die Zielgene von TINCR im Urothel sind. Dazu gehört, dass in dieser Arbeit lediglich mRNAs Protein-codierender Gene betrachtet wurden, nicht aber andere Klassen nicht-codierender RNAs, insbesondere microRNAs.

Literaturverzeichnis

1. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017; 71(1):96–108.
2. Yamany T, van Batavia J, Mendelsohn C. Formation and regeneration of the urothelium. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19(3):323–30.
3. McKiernan J, Asafu-Adjei D. Perspective: Bridging the gender gap. *Nature* 2017; 551(7679):S39.
4. van Osch FH, Jochems SH, van Schooten F-J, Bryan RT, Zeegers MP. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol* 2016; 45(3):857–70.
5. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F et al. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103(24):1827–39.
6. Antonova O, Toncheva D, Grigorov E. Bladder cancer risk from the perspective of genetic polymorphisms in the carcinogen metabolizing enzymes. *J BUON* 2015; 20(6):1397–406.
7. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström P-U, Choi W et al. Bladder cancer. *Lancet* 2016; 388(10061):2796–810.
8. Alfred Witjes J, Lebet T, Compérat EM, Cowan NC, Santis M de, Bruins HM et al. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol* 2017; 71(3):462–75.
9. Zheng Y-L, Amr S, Saleh D'aA, Dash C, Ezzat S, Mikhail NN et al. Urinary bladder cancer risk factors in Egypt: a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(3):537–46.
10. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(1):25–41.
11. Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 2011; 333(6045):1039–43.
12. Balbás-Martínez C, Sagrera A, Carrillo-de-Santa-Pau E, Earl J, Márquez M, Vazquez M et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet* 2013; 45(12):1464–9.
13. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amorós A, Tardón A et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24(22):3664–71.
14. Beothe T, Zubakov D, Kovacs G. Homozygous losses detected by array comparative genomic hybridization in multiplex urothelial carcinomas of the bladder. *Cancer Genet* 2015; 208(9):434–40.
15. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* 2013; 45(9):977–83.

16. Glaser AP, Fantini D, Wang Y, Yu Y, Rimar KJ, Podojil JR et al. APOBEC-mediated mutagenesis in urothelial carcinoma is associated with improved survival, mutations in DNA damage response genes, and immune response. *Oncotarget* 2018; 9(4):4537–48.
17. Hughes LAE, Melotte V, Schrijver J de, Maat M de, Smit, Vincent T H B M, Bovée, Judith V M G et al. The CpG island methylator phenotype: what's in a name? *Cancer Res* 2013; 73(19):5858–68.
18. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014; 507(7492):315–22.
19. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(8):3110–5.
20. van Batavia J, Yamany T, Molotkov A, Dan H, Mansukhani M, Batourina E et al. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nat Cell Biol* 2014; 16(10):982–91, 1–5.
21. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2014; 11(7):400–10.
22. Biton A, Bernard-Pierrot I, Lou Y, Krucker C, Chapeaublanc E, Rubio-Pérez C et al. Independent component analysis uncovers the landscape of the bladder tumor transcriptome and reveals insights into luminal and basal subtypes. *Cell Rep* 2014; 9(4):1235–45.
23. Varley CL, Southgate J. Effects of PPAR agonists on proliferation and differentiation in human urothelium. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 60(6):435–41.
24. Warrick JI, Walter V, Yamashita H, Chung E, Shuman L, Amponsa VO et al. FOXA1, GATA3 and PPAR γ cooperate to drive luminal subtype in bladder cancer: a molecular analysis of established human cell lines. *Sci Rep* 2016; 6:38531.
25. Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18(12):3377–86.
26. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell* 2017; 171(3):540–556.e25.
27. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, Chan KS, Kim WY, Radvanyi F et al. Bladder cancer molecular taxonomy: summary from a consensus meeting. *Bladder Cancer* 2016; 2(1):37–47.
28. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* 2014; 158(4):929–44.
29. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A et al. Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine* 2016; 12:105–17.
30. Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell* 2018; 172(3):393–407.

31. Schlackow M, Nojima T, Gomes T, Dhir A, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Distinctive patterns of transcription and RNA processing for human lincRNAs. *Mol Cell* 2017; 65(1):25–38.
32. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012; 22(9):1775–89.
33. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell* 2009; 33(6):717–26.
34. Kawaguchi T, Tanigawa A, Naganuma T, Ohkawa Y, Souquere S, Pierron G et al. SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(14):4304–9.
35. Beltran M, Puig I, Peña C, García JM, Alvarez AB, Peña R et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev* 2008; 22(6):756–69.
36. Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet* 2016; 17(5):272–83.
37. Battistelli C, Cicchini C, Santangelo L, Tramontano A, Grassi L, Gonzalez FJ et al. The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 2017; 36(7):942–55.
38. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291):1071–6.
39. Heubach J, Monsior J, Deenen R, Niegisch G, Szarvas T, Niedworok C et al. The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells. *Mol Cancer* 2015; 14:108.
40. Cerase A, Pintacuda G, Tattermusch A, Avner P. Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biol* 2015; 16:166.
41. Xiong Y, Wang L, Li Y, Chen M, He W, Qi L. The Long Non-Coding RNA XIST Interacted with MiR-124 to Modulate Bladder Cancer Growth, Invasion and Migration by Targeting Androgen Receptor (AR). *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(1):405–18.
42. Hoffmann MJ, Dehn J, Droop J, Niegisch G, Niedworok C, Szarvas T et al. Truncated isoforms of lncRNA ANRIL are overexpressed in bladder cancer, but do not contribute to repression of INK4 tumor suppressors. *Non-Coding RNA* 2015; 1(3):266–84.
43. Xu S, Kong D, Chen Q, Ping Y, Pang D. Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer. *Mol Cancer* 2017; 16(1):129.
44. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature* 2013; 493(7431):231–5.
45. Olsburgh J, Weeks R, Selby P, Southgate J. Human uroplakin lb gene structure and promoter analysis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1576(1-2):163–70.
46. Riedel I, Liang F-X, Deng F-M, Tu L, Kreibich G, Wu X-R et al. Urothelial umbrella cells of human ureter are heterogeneous with respect to their uroplakin composition: different

- degrees of urothelial maturity in ureter and bladder? *Eur J Cell Biol* 2005; 84(2-3):393–405.
47. Romih R, Korosec P, Mello W de, Jezernik K. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res* 2005; 320(2):259–68.
48. Lazzeri M. The physiological function of the urothelium--more than a simple barrier. *Urol Int* 2006; 76(4):289–95.
49. Al-Kurdi B. Hierarchical transcriptional profile of urothelial cells development and differentiation. *Differentiation* 2017; 95:10–20.
50. Sen GL, Boxer LD, Webster DE, Bussat RT, Qu K, Zarnegar BJ et al. ZNF750 is a p63 target gene that induces KLF4 to drive terminal epidermal differentiation. *Dev Cell* 2012; 22(3):669–77.
51. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(4):328–40.
52. Bikle DD, Xie Z, Tu C-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2012; 7(4):461–72.
53. Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab Invest* 1994; 71(4):583–94.
54. Varley CL, Stahlschmidt J, Lee W-C, Holder J, Diggle C, Selby PJ et al. Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 10):2029–36.
55. Yan W, Wistuba II, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Squamous cell carcinoma - similarities and differences among anatomical sites. *Am J Cancer Res* 2011; 1(3):275–300.
56. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(5):269–82.
57. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(1):24–35.
58. Husain N, Neyaz A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. *J Oral Biol Craniofac Res* 2017; 7(3):198–205.
59. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517(7536):576–82.
60. Campbell JD, Yau C, Bowlby R, Liu Y, Brennan K, Fan H et al. Genomic, pathway network, and immunologic features distinguishing squamous carcinomas. *Cell Rep* 2018; 23(1):194–212.e6.
61. Park BJ, Lee SJ, Kim JI, Lee CH, Chang SG, Park JH et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 2000; 60(13):3370–4.
62. Karni-Schmidt O, Castillo-Martin M, Shen TH, HuaiShen T, Gladoun N, Domingo-Domenech J et al. Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *Am J Pathol* 2011; 178(3):1350–60.
63. Cohen I, Birnbaum RY, Leibson K, Taube R, Sivan S, Birk OS. ZNF750 is expressed in differentiated keratinocytes and regulates epidermal late differentiation genes. *PLoS ONE* 2012; 7(8):e42628.

64. Kretz M, Webster DE, Flockhart RJ, Lee CS, Zehnder A, Lopez-Pajares V et al. Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR. *Genes Dev* 2012; 26(4):338–43.
65. Zhu L, Xu P-C. Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(4):612–7.
66. Lopez-Pajares V, Qu K, Zhang J, Webster DE, Barajas BC, Saprashvili Z et al. A LncRNA-MAF:MAFB transcription factor network regulates epidermal differentiation. *Dev Cell* 2015; 32(6):693–706.
67. Sun BK, Boxer LD, Ransohoff JD, Saprashvili Z, Qu K, Lopez-Pajares V et al. CALML5 is a ZNF750- and TINCR-induced protein that binds stratifin to regulate epidermal differentiation. *Genes Dev* 2015; 29(21):2225–30.
68. Hazawa M, Lin D-C, Handral H, Xu L, Chen Y, Jiang Y-Y et al. ZNF750 is a lineage-specific tumour suppressor in squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2017; 36(16):2243–54.
69. Xu T-P, Liu X-X, Xia R, Yin L, Kong R, Chen W-M et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene* 2015; 34(45):5648–61.
70. Chen Z, Liu H, Yang H, Gao Y, Zhang G, Hu J. The long noncoding RNA, TINCR, functions as a competing endogenous RNA to regulate PDK1 expression by sponging miR-375 in gastric cancer. *Onco Targets Ther* 2017; 10:3353–62.
71. Mao Z, Li H, Du B, Cui K, Xing Y, Zhao X et al. LncRNA DANCR promotes migration and invasion through suppression of lncRNA-LET in gastric cancer cells. *Biosci Rep* 2017; 37(6).
72. Liu X, Ma J, Xu F, Li L. TINCR suppresses proliferation and invasion through regulating miR-544a/FBXW7 axis in lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2018; 99:9–17.
73. Zheng Y, Yang C, Tong S, Ding Y, Deng W, Song D et al. Genetic variation of long non-coding RNA TINCR contribute to the susceptibility and progression of colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8(20):33536–43.
74. Lu Y, Hu Z, Mangala LS, Stine ZE, Hu X, Jiang D et al. MYC Targeted Long Noncoding RNA DANCR Promotes Cancer in Part by Reducing p21 Levels. *Cancer Res* 2018; 78(1):64–74.
75. Hao Y-P, Qiu J-H, Zhang D-B, Yu C-G. Long non-coding RNA DANCR, a prognostic indicator, promotes cell growth and tumorigenicity in gastric cancer. *Tumour Biol* 2017; 39(6):1010428317699798.
76. Jiang N, Wang X, Xie X, Liao Y, Liu N, Liu J et al. lncRNA DANCR promotes tumor progression and cancer stemness features in osteosarcoma by upregulating AXL via miR-33a-5p inhibition. *Cancer Lett* 2017; 405:46–55.
77. Zhang J, Tao Z, Wang Y. Long non-coding RNA DANCR regulates the proliferation and osteogenic differentiation of human bone-derived marrow mesenchymal stem cells via the p38 MAPK pathway. *Int J Mol Med* 2018; 41(1):213–9.
78. Sha S, Yuan D, Liu Y, Han B, Zhong N. Targeting long non-coding RNA DANCR inhibits triple negative breast cancer progression. *Biol Open* 2017; 6(9):1310–6.

79. Li Z, Dong M, Fan D, Hou P, Li H, Liu L et al. LncRNA ANCR down-regulation promotes TGF- β -induced EMT and metastasis in breast cancer. *Oncotarget* 2017; 8(40):67329–43.
80. Li Z, Hou P, Fan D, Dong M, Ma M, Li H et al. The degradation of EZH2 mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer. *Cell Death Differ* 2017; 24(1):59–71.
81. Nohata N, Abba MC, Gutkind JS. Unraveling the oral cancer lncRNAome: Identification of novel lncRNAs associated with malignant progression and HPV infection. *Oral Oncol* 2016; 59:58–66.
82. Martens-Uzunova ES, Böttcher R, Croce CM, Jenster G, Visakorpi T, Calin GA. Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *Eur Urol* 2014; 65(6):1140–51.
83. Wang X-S, Zhang Z, Wang H-C, Cai J-L, Xu Q-W, Li M-Q et al. Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(16):4851–8.
84. Srivastava AK, Singh PK, Rath SK, Dalela D, Goel MM, Bhatt MLB. Appraisal of diagnostic ability of UCA1 as a biomarker of carcinoma of the urinary bladder. *Tumour Biol* 2014; 35(11):11435–42.
85. He W, Cai Q, Sun F, Zhong G, Wang P, Liu H et al. linc-UBC1 physically associates with polycomb repressive complex 2 (PRC2) and acts as a negative prognostic factor for lymph node metastasis and survival in bladder cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(10):1528–37.
86. Martínez-Fernández M, Feber A, Dueñas M, Segovia C, Rubio C, Fernandez M et al. Analysis of the Polycomb-related lncRNAs HOTAIR and ANRIL in bladder cancer. *Clin Epigenetics* 2015; 7:109.
87. Han Y, Liu Y, Nie L, Gui Y, Cai Z. Inducing cell proliferation inhibition, apoptosis, and motility reduction by silencing long noncoding ribonucleic acid metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2013; 81(1):209.e1-7.
88. Han Y, Liu Y, Gui Y, Cai Z. Long intergenic non-coding RNA TUG1 is overexpressed in urothelial carcinoma of the bladder. *J Surg Oncol* 2013; 107(5):555–9.
89. Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett* 2013; 333(2):213–21.
90. Liu Z, Wang W, Jiang J, Bao E, Xu D, Zeng Y et al. Downregulation of GAS5 promotes bladder cancer cell proliferation, partly by regulating CDK6. *PLoS ONE* 2013; 8(9):e73991.
91. Zhu Y, Yu M, Li Z, Kong C, Bi J, Li J et al. ncRAN, a newly identified long noncoding RNA, enhances human bladder tumor growth, invasion, and survival. *Urology* 2011; 77(2):510.e1-5.
92. Greife A, Kniewel J, Ribarska T, Niegisch G, Schulz WA. Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma. *Clin Epigenetics* 2014; 6(1):29.
93. Gutschner T, Richtig G, Haemmerle M, Pichler M. From biomarkers to therapeutic targets-the promises and perils of long non-coding RNAs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2018; 37(1):83–105.

94. Chen X, Dai M, Zhu H, Li J, Huang Z, Liu X et al. Evaluation on the diagnostic and prognostic values of long non-coding RNA BLACAT1 in common types of human cancer. *Mol Cancer* 2017; 16(1):160.
95. Tzeng CC, Liu HS, Li C, Jin YT, Chen RM, Yang WH et al. Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Res* 1996; 16(4A):1797–804.
96. Rigby CC, Franks LM. A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *Br J Cancer* 1970; 24(4):746–54.
97. Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S et al. Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res* 1986; 46(7):3630–6.
98. Kyriazis AA, Kyriazis AP, McCombs WB, Peterson WD. Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 1984; 44(9):3997–4005.
99. O'Toole C, Price ZH, Ohnuki Y, Unsgaard B. Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer* 1978; 38(1):64–76.
100. Elliott AY, Cleveland P, Cervenka J, Castro AE, Stein N, Hakala TR et al. Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53(5):1341–9.
101. Fogh J. Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors. *Natl Cancer Inst Monogr* 1978; (49):5–9.
102. Elliott AY, Bronson DL, Cervenka J, Stein N, Fraley EE. Properties of cell lines established from transitional cell cancers of the human urinary tract. *Cancer Res* 1977; 37(5):1279–89.
103. Rasheed S, Gardner MB, Rongey RW, Nelson-Rees WA, Arnstein P. Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58(4):881–90.
104. Bubeník J, Baresová M, Viklický V, Jakoubková J, Sainerová H, Donner J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer* 1973; 11(3):765–73.
105. Grossman HB, Wedemeyer G, Ren L, Wilson GN, Cox B. Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *J Urol* 1986; 136(4):953–9.
106. Williams RD. Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol* 1980; 17(5):359–63.
107. O'Toole C, Nayak S, Price Z, Gilbert WH, Waisman J. A cell line (SCABER) derived from squamous cell carcinoma of the human urinary bladder. *Int J Cancer* 1976; 17(6):707–14.
108. Chapman EJ, Hurst CD, Pitt E, Chambers P, Aveyard JS, Knowles MA. Expression of hTERT immortalises normal human urothelial cells without inactivation of the p16/Rb pathway. *Oncogene* 2006; 25(36):5037–45.
109. Hoffmann MJ, Koutsogiannouli E, Skowron MA, Pinkerneil M, Niegisch G, Brandt A et al. The new immortalized uroepithelial cell line HBLAK contains defined genetic aberrations typical of early stage urothelial tumors. *Bladder Cancer* 2016; 2(4):449–63.

110. Hoffmann TK, Sonkoly E, Hauser U, van Lierop A, Whiteside TL, Klussmann JP et al. Alterations in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008; 44(12):1100–9.
111. Tang AL, Hauff SJ, Owen JH, Graham MP, Czerwinski MJ, Park JJ et al. UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Head Neck* 2012; 34(10):1480–91.
112. Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1972; 29(1):117–21.
113. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106(3):761–71.
114. Li J, Han L, Roebuck P, Diao L, Liu L, Yuan Y et al. TANRIC: An Interactive Open Platform to Explore the Function of lncRNAs in Cancer. *Cancer Res* 2015; 75(18):3728–37.
115. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6(269):p11.
116. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011; 12:77.
117. Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7):RESEARCH0034.
118. Ohl F, Jung M, Radonić A, Sachs M, Loening SA, Jung K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J Urol* 2006; 175(5):1915–20.
119. Eißmann M, Gutschner T, Hämmerle M, Günther S, Caudron-Herger M, Groß M et al. Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development. *RNA Biol* 2012; 9(8):1076–87.
120. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009; 136(4):629–41.
121. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM et al. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 1996; 10(8):974–84.
122. Gao W, Chan JY-W, Wong T-S. Long non-coding RNA deregulation in tongue squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* 2014; 2014:405860.
123. Papafotiou G, Paraskevopoulou V, Vasilaki E, Kanaki Z, Paschalidis N, Klinakis A. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. *Nat Commun* 2016; 7:11914.
124. Cao L, Zhou XD, Sens MA, Garrett SH, Zheng Y, Dunlevy JR et al. Keratin 6 expression correlates to areas of squamous differentiation in multiple independent isolates of As(+3)-induced bladder cancer. *J Appl Toxicol* 2010; 30(5):416–30.

125. Slusser-Nore A, Garrett SH, Zhou XD, Sens DA, Sens MA, Somji S. The expression of keratin 6 is regulated by the activation of the ERK1/2 pathway in arsenite transformed human urothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017; 331:41–53.
126. Qi Z, Li T, Kong F, Li Y, Wang R, Wang J et al. The characteristics and function of S100A7 induction in squamous cell carcinoma: heterogeneity, promotion of cell proliferation and suppression of differentiation. *PLoS ONE* 2015; 10(6):e0128887.
127. Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Orntoft TF, Wolf H et al. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 1997; 57(18):4111–7.
128. Celis JE, Rasmussen HH, Vorum H, Madsen P, Honoré B, Wolf H et al. Bladder squamous cell carcinomas express psoriasin and externalize it to the urine. *J Urol* 1996; 155(6):2105–12.
129. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Fujino J, Tamura Y et al. Small proline-rich protein-1B is overexpressed in human oral squamous cell cancer stem-like cells and is related to their growth through activation of MAP kinase signal. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 439(1):96–102.
130. Baden HP, Champlaud M-F, Sundberg JP, Viel A. Targeted deletion of the sciellin gene resulted in normal development and maturation. *Genesis* 2005; 42(4):219–28.
131. Corona W, Karkera DJ, Patterson RH, Saini N, Trachiotis GD, Korman LY et al. Analysis of Sciellin (SCEL) as a candidate gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24(3a):1417–9.
132. Hardman MJ, Liu K, Avilion AA, Merritt A, Brennan K, Garrod DR et al. Desmosomal cadherin misexpression alters beta-catenin stability and epidermal differentiation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(3):969–78.
133. Sun T-T. Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(1):21.
134. Fishwick C, Higgins J, Percival-Alwyn L, Hustler A, Pearson J, Bastkowski S et al. Heterarchy of transcription factors driving basal and luminal cell phenotypes in human urothelium. *Cell Death Differ* 2017; 24(5):809–18.
135. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y et al. HaCaT cells as a reliable in vitro differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017; 2017:7435621.
136. Murakami K, Oshimura M, Kugoh H. Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1. *J Hum Genet* 2007; 52(11):926–33.
137. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* 2011; 25(18):1915–27.
138. Wiczorek E, Reszka E. mRNA, microRNA and lncRNA as novel bladder tumor markers. *Clin Chim Acta* 2018; 477:141–53.
139. Duquesne I, Weisbach L, Aziz A, Kluth LA, Xylinas E. The contemporary role and impact of urine-based biomarkers in bladder cancer. *Transl Androl Urol* 2017; 6(6):1031–42.

140. O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, Davidson P, Gilling P, Cambridge L et al. A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol* 2012; 188(3):741–7.
141. Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Buset M, Fernández PL et al. Validation study of a noninvasive urine test for diagnosis and prognosis assessment of bladder cancer: Evidence for improved models. *J Urol* 2014; 191(1):261–9.
142. Ochoa AE, Choi W, Su X, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney C et al. Specific micro-RNA expression patterns distinguish the basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget* 2016; 7(49):80164–74.
143. Cabili MN, Dunagin MC, McClanahan PD, Biaisch A, Padovan-Merhar O, Regev A et al. Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome Biol* 2015; 16:20.
144. Chen Z, Liu Y, He A, Li J, Chen M, Zhan Y et al. Theophylline controllable RNAi-based genetic switches regulate expression of lncRNA TINCR and malignant phenotypes in bladder cancer cells. *Sci Rep* 2016; 6:30798.
145. Liu Y, Du Y, Hu X, Zhao L, Xia W. Up-regulation of ceRNA TINCR by SP1 contributes to tumorigenesis in breast cancer. *BMC Cancer* 2018; 18(1):367.
146. Zhu Z-J, He J-K. TINCR facilitates non-small cell lung cancer progression through BRAF-activated MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497(4):971–7.
147. Xu T-P, Wang Y-F, Xiong W-L, Ma P, Wang W-Y, Chen W-M et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death Dis* 2017; 8(6):e2837.
148. Zhang K, Shi H, Xi H, Wu X, Cui J, Gao Y et al. Genome-wide lncRNA microarray profiling identifies novel circulating lncRNAs for detection of gastric cancer. *Theranostics* 2017; 7(1):213–27.
149. Ma X, Huang C, Luo D, Wang Y, Tang R, Huan X et al. Tag SNPs of long non-coding RNA TINCR affect the genetic susceptibility to gastric cancer in a Chinese population. *Oncotarget* 2016; 7(52):87114–23.
150. Marques CJ, Henrique R, Jerónimo C. Profiling DNA methylation based on next-generation sequencing approaches: new insights and clinical applications. *Genes (Basel)* 2018; 9(9).
151. Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; 14(3):204–20.
152. Lee J-S, Leem S-H, Lee S-Y, Kim S-C, Park E-S, Kim S-B et al. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28(16):2660–7.
153. Weilandt M, Koch A, Rieder H, Deenen R, Schwender H, Niegisch G et al. Target genes of recurrent chromosomal amplification and deletion in urothelial carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* 2014; 11(3):141–53.
154. Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V et al. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 1994; 371(6496):435–8.

155. Devanand P, Kim SI, Choi YW, Sheen SS, Yim H, Ryu MS et al. Inhibition of bladder cancer invasion by Sp1-mediated BTG2 expression via inhibition of DNA methyltransferase 1. *FEBS J* 2014; 281(24):5581–601.
156. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* 2016; 30(1):27–42.
157. Liu J, Lin J, Li Y, Zhang Y, Chen X. Prognostic role of lncRNA TUG1 for cancer outcome: Evidence from 840 cancer patients. *Oncotarget* 2017; 8(30):50051–60.
158. Li N, Shi K, Kang X, Li W. Prognostic value of long non-coding RNA TUG1 in various tumors. *Oncotarget* 2017; 8(39):65659–67.
159. Zhou Y, Lu Y, Li R, Yan N, Li X, Dai T. Prognostic role of long non-coding RNA TUG1 expression in various cancers: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(59):100499–507.
160. Ma P-J, Guan Q-K, Meng L, Qin N, Zhao J, Jin B-Z. Long non-coding RNA TUG1 as a potential prognostic biomarker in human cancers: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(37):62454–62.
161. Fan S, Yang Z, Ke Z, Huang K, Liu N, Fang X et al. Downregulation of the long non-coding RNA TUG1 is associated with cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2017; 95:1636–43.
162. Gradia DF, Mathias C, Coutinho R, Cavalli IJ, Ribeiro, Enilze M S F, Oliveira JC de. Long non-coding RNA TUG1 expression is associated with different subtypes in human breast cancer. *Non-Coding RNA* 2017; 3(4).
163. Iliev R, Kleinova R, Juracek J, Dolezel J, Ozanova Z, Fedorko M et al. Overexpression of long non-coding RNA TUG1 predicts poor prognosis and promotes cancer cell proliferation and migration in high-grade muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(10):13385–90.
164. Beck TN, Golemis EA. Genomic insights into head and neck cancer. *Cancers Head Neck* 2016; 1.
165. Kulkarni MM. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. *Curr Protoc Mol Biol* 2011; Chapter 25:10.
166. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Neumeister VM, Rimm DL. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab Invest* 2015; 95(4):385–96.
167. Wen W, Lu L, He Y, Cheng H, He F, Cao S et al. LincRNAs and base modifications of p53 induced by arsenic methylation in workers. *Chem Biol Interact* 2016; 246:1–10.
168. Zheng Y, Li X, Huang Y, Jia L, Li W. Time series clustering of mRNA and lncRNA expression during osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *PeerJ* 2018; 6:e5214.
169. Gu X, Li M, Jin Y, Liu D, Wei F. Identification and integrated analysis of differentially expressed lncRNAs and circRNAs reveal the potential ceRNA networks during PDLSC osteogenic differentiation. *BMC Genet* 2017; 18(1):100.
170. Hu H-B, Chen Q, Ding S-Q. LncRNA LINC01116 competes with miR-145 for the regulation of ESR1 expression in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(7):1987–93.

171. Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF et al. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 2005; 123(2):249–63.
172. Fang J, Qiao F, Tu J, Xu J, Ding F, Liu Y et al. High expression of long non-coding RNA NEAT1 indicates poor prognosis of human cancer. *Oncotarget* 2017; 8(28):45918–27.
173. XianGuo C, ZongYao H, Jun Z, Song F, GuangYue L, LiGang Z et al. Promoting progression and clinicopathological significance of NEAT1 over-expression in bladder cancer. *Oncotarget* 2014.
174. Cooper DR, Carter G, Li P, Patel R, Watson JE, Patel NA. Long non-coding RNA NEAT1 associates with SRp40 to temporally regulate PPAR γ 2 splicing during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Genes (Basel)* 2014; 5(4):1050–63.
175. Sand M, Bechara FG, Sand D, Gambichler T, Hahn SA, Bromba M et al. Long-noncoding RNAs in basal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2016; 37(8):10595–608.
176. Lessard L, Liu M, Marzese DM, Wang H, Chong K, Kawas N et al. The CASC15 long intergenic noncoding RNA locus is involved in melanoma progression and phenotype switching. *J Invest Dermatol* 2015; 135(10):2464–74.
177. Hurst CD, Tomlinson DC, Williams SV, Platt FM, Knowles MA. Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification. *Oncogene* 2008; 27(19):2716–27.
178. Gao Y, Xiao F, Wang C, Wang C, Cui P, Zhang X et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes osterix expression to regulate osteogenic differentiation by targeting miRNA-143 in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2018; 119(8):6986–96.
179. DeGraff DJ, Cates JM, Mauney JR, Clark PE, Matusik RJ, Adam RM. When urothelial differentiation pathways go wrong: implications for bladder cancer development and progression. *Urol Oncol* 2013; 31(6):802–11.
180. Goldstein JT, Berger AC, Shih J, Duke FF, Furst L, Kwiatkowski DJ et al. Genomic activation of PPARG reveals a candidate therapeutic axis in bladder cancer. *Cancer Res* 2017; 77(24):6987–98.
181. Chen Y, Derguini F, Buck J. Vitamin A in serum is a survival factor for fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(19):10205–8.
182. Klaassen I, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJ. Considerations for in vitro retinoid experiments: importance of protein interaction. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1427(2):265–75.
183. Hustler A, Eardley I, Hinley J, Pearson J, Wezel F, Radvanyi F et al. Differential transcription factor expression by human epithelial cells of buccal and urothelial derivation. *Exp Cell Res* 2018.
184. Szlavicz E, Olah P, Szabo K, Pagani F, Bata-Csorgo Z, Kemeny L et al. Analysis of psoriasis-relevant gene expression and exon usage alterations after silencing of SR-rich splicing regulators. *Exp Dermatol* 2018; 27(6):656–62.
185. Liu Y, Wang Y, He X, Zhang S, Wang K, Wu H et al. LncRNA TINCR/miR-31-5p/C/EBP- α feedback loop modulates the adipogenic differentiation process in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res* 2018; 32:35–42.

186. Xue M, Li X, Wu W, Zhang S, Wu S, Li Z et al. Upregulation of long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 by CCAAT/enhancer binding protein α contributes to bladder cancer cell growth and reduced apoptosis. *Oncol Rep* 2014; 31(5):1993–2000.
187. Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Szymanski K, Rocha J, Aldousari S et al. A novel mechanism of PPAR gamma induction via EGFR signalling constitutes rational for combination therapy in bladder cancer. *PLoS ONE* 2013; 8(2):e55997.
188. Pan L, Yang H, Tang W, Xu C, Chen S, Meng Z et al. Pathway-focused PCR array profiling of CAL-27 cell with over-expressed ZNF750. *Oncotarget* 2018; 9(1):566–75.
189. Martinsson H, Yhr M, Enerbäck C. Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation. *Exp Dermatol* 2005; 14(3):161–8.
190. Zhang L, Chen S, Bao N, Yang C, Ti Y, Zhou L et al. Sox4 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cell via activation of long noncoding RNA DANCR. *J Mol Histol* 2015; 46(6):467–73.
191. Shen H, Morrison CD, Zhang J, Underwood W, Yang N, Frangou C et al. 6p22.3 amplification as a biomarker and potential therapeutic target of advanced stage bladder cancer. *Oncotarget* 2013; 4(11):2124–34.
192. van Heesch S, van Iterson M, Jacobi J, Boymans S, Essers PB, Bruijn E de et al. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome Biol* 2014; 15(1):R6.
193. Davidovich C, Zheng L, Goodrich KJ, Cech TR. Promiscuous RNA binding by Polycomb Repressive Complex 2. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(11):1250–7.
194. Wang Y, Zeng X, Wang N, Zhao W, Zhang X, Teng S et al. Long noncoding RNA DANCR, working as a competitive endogenous RNA, promotes ROCK1-mediated proliferation and metastasis via decoying of miR-335-5p and miR-1972 in osteosarcoma. *Mol Cancer* 2018; 17(1):89.
195. Wang Y, Lu Z, Wang N, Feng J, Zhang J, Luan L et al. Long noncoding RNA DANCR promotes colorectal cancer proliferation and metastasis via miR-577 sponging. *Exp Mol Med* 2018; 50(5):57.
196. Zhen Q, Gao L-N, Wang R-F, Chu W-W, Zhang Y-X, Zhao X-J et al. LncRNA DANCR Promotes Lung Cancer by Sequestering miR-216a. *Cancer Control* 2018; 25(1):1073274818769849.
197. Du Z, Sun T, Hacısuleyman E, Fei T, Wang X, Brown M et al. Integrative analyses reveal a long noncoding RNA-mediated sponge regulatory network in prostate cancer. *Nat Commun* 2016; 7:10982.
198. Sirey T, Ponting CP. Complexities of post-transcriptional regulation and the modeling of ceRNA crosstalk. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2018; 53(3):231–45.
199. Lennox KA, Behlke MA. Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(2):863–77.
200. Ho T-T, Zhou N, Huang J, Koirala P, Xu M, Fung R et al. Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(3):e17.
201. Aparicio-Prat E, Arnan C, Sala I, Bosch N, Guigó R, Johnson R. DECKO: Single-oligo, dual-CRISPR deletion of genomic elements including long non-coding RNAs. *BMC Genomics* 2015; 16:846.

202. Wang J-P, Leng J-Y, Zhang R-K, Zhang L, Zhang B, Jiang W-Y et al. Functional analysis of gene expression profiling-based prediction in bladder cancer. *Oncol Lett* 2018; 15(6):8417–23.
203. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* 2011; 470(7333):284–8.
204. Zhang Z-Y, Lu Y-X, Zhang Z-Y, Chang Y-Y, Zheng L, Yuan L et al. Loss of TINCR expression promotes proliferation, metastasis through activating EpCAM cleavage in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7(16):22639–49.

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Übersicht ausgewählter molekularer Subtypen des Urothelkarzinoms.....	11
Abb.1.2: Vergleich urotheliale und epidermale Differenzierung.....	15
Abb.3.1: Ausschluss der Kontamination der qRT-PCR-Analysen durch genomische DNA.	56
Abb.3.2: Charakteristika der Gewebeserie für die qRT-PCR-Analyse.....	57
Abb.3.3: lncRNA-Expression im Urothelkarzinom.....	58
Abb.3.4: lncRNA-Expression in nicht-muskelinvasivem (NMBIC) und muskelinvasivem Urothelkarzinom (MIBC).....	61
Abb.3.5: lncRNA-Expression in Urothelkarzinomzelllinien.....	62
Abb.3.6: Einfluss der lncRNA-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten in Set 1 und 2.....	65
Abb.3.7: Einfluss der lncRNA-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten in Set 1 und 2.....	69
Abb.3.8: Korrelationen zwischen TUG1-Expression im Urothelkarzinom und dem basal- squamous-like Subtyp.	70
Abb.3.9: Assoziationen von lncRNA-Expressionen mit molekularen Subtypen im Urothelkarzinom.....	72
Abb.3.10: Differentiell exprimierte lncRNAs in der urothelialen Differenzierung <i>in vitro</i>	75
Abb.3.11: GO-Analyse differentiell exprimierter kodierender Gene nach <i>in vitro</i> - Differenzierung von UP-Kulturen durch Calciumchlorid-Stimulus (A) und durch Stimulus mit Troglitazone und PD153035 (B).	77
Abb.3.12: Validierung differentiell exprimierter lncRNAs in der urothelialen Differenzierung mittels qRT-PCR.....	81
Abb.3.13: lncRNA Expression in UC und HNSC.....	84
Abb.3.14: lncRNA-Expression in Urothelkarzinomzelllinien.....	85
Abb.3.15: lncRNA-Expression in Urothelkarzinomzelllinien (CCLE).....	86
Abb.3.16: lncRNA-Expression in Kopf-Hals-Karzinomzelllinien.	87
Abb. 3.17: Auswahl von CpG-Stellen für die DNA-Methylierungsanalyse.....	89
Abb.3.18: Expression von Ivolucrin und Loricrin in humanen Geweben.....	92
Abb.3.19: Expression squamöser Markergene in Urothelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien.....	95
Abb.3.20: Molekulare und morphologische Charakterisierung der urothelialen Differenzierung in HBLAK Zellen <i>in vitro</i>	100

Abb.3.21: Molekulare Charakterisierung der Differenzierung in HBLAK Zellen in vitro zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten.	102
Abb.3.22: Molekulare Charakterisierung der Differenzierung in HBLAK Zellen in vitro zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten.	104
Abb.3.23: Expressionsänderungen Differenzierungs-assoziierter Markergene im Zeitverlauf.	105
Abb.3.24: Molekulare Charakterisierung der in vitro Keratinozyten-Differenzierung in HaCaT-Zellen.	108
Abb.3.25: TINCR-/DANCR-Expression in Urothelkarzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen.	110
Abb.3.26: TINCR-/DANCR-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Harnblase.	111
Abb.3.27: Eignung der TINCR- bzw. DANCR-Expression als diagnostische Biomarker im Urothelkarzinom.	112
Abb.3.28: DNA-Methylierungsgrad einzelner CpG-Stellen für TINCR und DANCR in Gewebeproben der TCGA-Kohorten für Blasenkarzinome (BLCA) und Kopf-Hals-Tumor (HNSC).	113
Abb.3.29: Clusteranalyse der Expression von TINCR & DANCR mit Differenzierungs-assozierten Genen.	117
Abb.3.30: Clusteranalyse der Expression von TINCR & DANCR mit Subtypen-assozierten Genen.	118
Abb. 3.31: Pan-Cancer-Analyse der TINCR-Expression in verschiedenen Tumorentitäten.	120
Abb. 3.32: Pan-Cancer-Analyse der DANCR-Expression in verschiedenen Tumorentitäten.	121
Abb. 3.33: Subzelluläre Lokalisation von TINCR und DANCR.	122
Abb.3.34: Expression Differenzierungs-assoziierter Markergene in Tumorzelllinien nach siRNA-vermitteltem TINCR-Knockdown.	124
Abb.3.35: Zelluläre Eigenschaften von Tumorzelllinien nach siRNA-vermitteltem TINCR-Knockdown.	124
Abb.3.36: Expression Differenzierungs-assoziierter Markergene in Tumorzelllinien nach siRNA-vermitteltem TINCR- bzw.DANCR-Knockdown.	126
Abb.3.37: Expression Differenzierungs-assoziierter Markergene in Tumorzelllinien nach stabiler TINCR-Überexpression.	128
Abb.3.38: Zelluläre Eigenschaften der TINCR-überexprimierenden Zellen zu verschiedenen Passagierungszeitpunkten.	130
Abb.3.39: Überexpression von DANCR in Urothelkarzinomzelllinien.	132
Abb.3.40: Überexpression von TINCR in stabil-transfizierten HBLAK-Zellen.	132
Abb.3.41: Zelluläre Eigenschaften der TINCR-überexprimierenden HBLAK-Zellen.	133

Abb.3.42: Morphologische Veränderungen TINCR-überexprimierender HBLAK-Zellen nach 10 Tagen Differenzierungs-Induktion.....135

Abb.3.43: Expression Differenzierungs-assoziiierter Markergene in HBLAK-Zellen nach stabiler TINCR-Überexpression.....137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenkollektiv Urothelkarzinom UK Essen 1.....	24
Tabelle 2: Patientenkollektiv Urothelkarzinom UK Essen 2.....	25
Tabelle 3: Tumorgewebeproben Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich	27
Tabelle 4: Urothelkarzinom-Zelllinien.....	27
Tabelle 5: Tumorzelllinien Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.....	28
Tabelle 6: Primer qRT-PCR Housekeeper.....	34
Tabelle 7: Primer qRT-PCR lncRNA.....	35
Tabelle 8: Primer qRT-PCR Protein-codierende Gene.....	36
Tabelle 9: Sequenzierungsprimer.....	37
Tabelle 10: Plasmide.....	38
Tabelle 11: Assoziation der lncRNA-Expression mit klinischen und histopathologischen Parametern in Gewebeset 1.....	64
Tabelle 12: Univariate Analyse der prognostischen Wertigkeit von klinischen Parametern und lncRNA Expression in Gewebeset 1.....	66
Tabelle 13: Multivariate Analyse der prognostischen Wertigkeit von klinischen Parametern und lncRNA Expression in Gewebeset 1.....	67
Tabelle 14: Differentiell exprimierte lncRNAs in der urothelialen Differenzierung.....	77
Tabelle 15: Methylierungsmuster einzelner lncRNAs im Gewebevergleich in den ENCODE-Daten im UCSC Genome Browser (hg19).....	88
Tabelle 16: Mediane Methylierung verschiedener lncRNA-Gene in Tumor- (T) und Normal-Proben (N) über alle analysierten CpG-Stellen hinweg.....	90
Tabelle 17: Expression squamöser Markergene in Urothelkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien.....	96
Tabelle 18: Differenzierungs-assoziierte Gene zur molekularen Charakterisierung der urothelialen Differenzierung <i>in vitro</i>	98
Tabelle 19: Mediane DNA-Methylierung der TINCR- und DANCR-Gene in Tumor- (T) und Normalgewebe-Proben (N) über alle analysierten CpG-Stellen hinweg.....	114
Tabelle 20: Übersicht über die Tumorentitäten, die für die pan-Cancer-Analyse für die TINCR- bzw. DANCR-Expression herangezogen wurden.....	118

Abkürzungsverzeichnis

ANRIL	antisense non-coding RNA in the INK4 locus
APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ASO	Antisense Oligonucleotide
AUC	area under the curve
BASQ	Basal-Squamös
BLACAT1	Bladder Cancer Associated Transcript 1
BLCA	bladder carcinoma
C/EBP α	CCAAT/Enhancing binding Protein α
CALML5	Calmodulin like 5
CASC15	Cancer Susceptibility 15
CCL	cancer cell line encyclopedia
CDH3	Cadherin 3
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	complementary DANN
ceRNA	competing endogenous RNA
CIS	Carcinoma in-situ
CNA	copy number alteration, Kopienzahlveränderung
Ct	threshold cycle
DANCR	Differentiation antagonizing non-protein coding RNA
DSC3	Desmocollin 3
EDC	epidermal differentiation complex, epidermaler Differenzierungskomplex
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ERBB2/HER2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FDA	Food and Drug Administration
FDR	false discovery rate

FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
FOXA1	forkhead box A1
FSC	fetal calf serum, fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GAS5	Growth Arrest Specific 5
GATA3	GATA binding protein 3
GATA3-AS1	GATA3-Antisense 1
GO	gene ontology
GTEX	The Genotyp-Tissue Expression project
H3K27	Histon 3 Lysin 27
H3K4	Histon 3 Lysin 4
HAGLROS	HAGLR Opposite Strand
HNSC	head & neck squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA
HPV	humane Papilloma Viren
HR	Hazard Ratio
IRES	internal ribosomal entry site
IVL	Involucrin
KCNQ10T1	KCNQ1 Opposite Strand/Transcript 1
KDM6A	Lysin Demethylase 6A (UTX)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KICH	Kidney Chromophobe
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma
KLF4	Kruppel like Factor 4
LCE	late cornified envelope
lncRNA	long non-coding RNA, lange nicht-kodierende RNA
LOR	Loricrin
LSD1	Lysin Demethylase 1

LUSC	Lung Squamous Cell Carcinoma
MALAT1	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MEG3	Maternally Expressed 3
MIBC	muscle-invasive bladder carcinoma, Muskelinvasives Blasenkarzinom
MKI67	Marker of Proliferation Ki-67
MLL2/3	Lysin Methyltransferase 2/3
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stem cell, Mesenchymale Stammzelle
NAT	natural antisense transcript
ncRNA	non-coding RNA, nicht-kodierende RNA
NEAT1	Nuclear Enriched Abundant Transcript 1
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NHEK	normal human epidermal keratinocytes, normale humane epidermale Keratinozyten
NMIBC	non muscle invasive bladder carcinoma, Nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom
NMP22	Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1
NSCLC	non-small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
ORF	open reading frame, Offener Leserahmen
PCG	protein-coding gene, Protein-codierendes Gen
PCR2	polycomb repressive complex 2
PECA	Plattenepithelkarzinom
PI3	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
piRNA	Piwi-interacting RNA
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RB1	Retinoblastoma-Associated Protein 1
RNAi	RNA-Interferenz
RNA-ISH	RNA-in situ-Hybridisierung

RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROC	Receiver Operating Characteristic
RPKM	Reads per Kilobase Million
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
RXR α	Retinoid X Rezeptor α
SCEL	Sciellin
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A
siRNA	small interfering RNA
SNX31	Sorting Nexn 31
SOX2	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2
SP1	Specificity Protein 1
SPRR1B	small prolein rich protein 1B
STAG2	Stromal Antigen 2
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
SUZ12	Suppressor Of Zeste 12 Protein Homolog
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TBP	TATA-box binding protein
TCGA	The Cancer Genome Association
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGM1	Transglutaminase 1
TINCR	terminal differentiation induced non-coding RNA
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TP53	Tumor Protein 53
TSS	transcriptional start site, Transkriptionsstartstelle
TUG1	Taurine-upregulated 1
TUR	Transurethrale Resektion
TZ/PD	Troglitazone/PD153035
UC	urothelial carcinoma, Urothelkarzinom
UCA1	Urothelial Carcinoma Associated 1
UCEC	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma

UC-SCC	urothelial carcinoma with squamous cell carcinoma
UP	urothelial progenitor cell culture, urotheliale Primärkultur
UPK1A/2	Uroplakin 1A/2
XIC	X inactivation center
XIST	X inactive specific transcript
ZNF750	zinc finger protein 750

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau **Prof. Dr. Henrike Heise** danken für die Übernahme der Begutachtung.

Ein großer Dank geht an die **Düsseldorf School of Oncology**, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Dabei möchte ich insbesondere **Dr. Cornelia Höner** danken, die sich immer im besonderen Maße für die Finanzierung von Publikationen und Kongressreisen eingesetzt hat.

Der größte Dank geht natürlich an die gesamte Arbeitsgruppe im urologischen Forschungslabor:

Allen voran **Prof. Dr. Wolfgang Schulz**, der mir das Projekt überhaupt erst anvertraut hat. Lieber Wolfgang, du hast mich nicht nur durch deine Fülle an Ideen immer wieder motiviert weiterzumachen, auch, wenn mal wieder der Wurm drin war, sondern auch durch viele angeregte Diskussionen, die oft über das Wissenschaftliche hinausgingen, meinen Horizont erweitert.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Dr. Michèle Hoffmann**, die das Projekt maßgeblich mitgestaltet hat. Liebe Michèle, du hast durch deine vielen Ideen und deine Hilfe bei der Auswertung von Datenwust und Excellisten wie kaum sonst jemand zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, du hast zudem auch immer die Zeit gefunden mich durch persönliche Worte zu unterstützen.

Liebe **Maggi**, niemand hat die Zeit im Labor so geprägt wie du! Wir haben nicht nur die kleinen Katastrophen des Laboralltags stets humorvoll gemeistert, sondern auch darüber hinaus unglaubliches geschafft: die Eröffnung des urologischen Reisebüros (eine Fahrt mit dem Breakdancer buche ich aber nicht noch einmal!), eine Medaille im Theatermarathon geholt und sogar Züge auf Hüten fahren lassen! Und sollte es mit der Biologie mal nicht mehr so laufen, eröffnen wir einfach eine Backstube.

Liebe **Christiane**, was hätte ich nur ohne dich gemacht?! Du hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und so manch angeregte Diskussion hat selbst die Mittagspausen spannend gemacht.

Liebe **Madeleine**, dir gebührt natürlich ganz besonderer Dank dafür, dass ich dich bei deiner Doktorarbeit begleiten durfte. Auch, wenn sich vieles mal wieder als tückischer herausgestellt hat als ursprünglich gedacht, hat es mir großen Spaß gemacht. Klonierst du noch oder transfizierst du schon?

Ein herzlicher Dank geht an **Dr. Wolfgang Göring**. Ohne dich könnte ich wahrscheinlich bis heute keine Primer designen. Du bist der einzige Mensch, mit dem man ganze Konversationen mit Zitaten eines kommunistischen Beuteltiers bestreiten kann. Karpfe diem!

Maria, Marija, Judith, Alex, der Erste und Alex, der Zweite, Aline, Andreas, Merlin, Juliana, Jenny, Nicky, Chanchai, Lia und Michi: ihr alle seid von Kollegen zu Freunden geworden. Euer Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit kann gar nicht überschätzt werden!

Ich möchte mich zudem bei PD Dr. Günter Niegisch bedanken für die Möglichkeit am KFO-Projekt mitzuwirken. Dies hat mir nochmal eine ganze andere Sichtweise auf die Krankheit Blasenkrebs gezeigt.

Ein großer Dank geht auch an das Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik, die maßgeblich an diesem Projekt beteiligt waren: **PD Dr. Kathrin Scheckenbach** für die intensive Begleitung des Projektes, **Dr. Katharina Roellecke** und **Dr. Constanze Wiek** für die Hilfe beim Klonieren und die Einführung in die Geheimnisse der lentiviralen Transduktion, sowie **Dr. Vera Okpanyi** für die Hilfe mit den Gewebeproben.

In besonderem Umfang zu dieser Arbeit beigetragen hat **PD Dr. Tibor Szarvas** vom Uniklinikum Essen ohne dessen Bereitstellung von Gewebeproben und statistischer Analysen diese Arbeit um einige Seiten dünner wäre.

Auch, wenn sich diese Arbeit mit den kleinen Molekülen im Inneren unserer Zellen beschäftigt, durfte ich durch die vielen Gäste im Labor über den großen Tellerrand schauen. ขอบคุณ **Amp**, I now have a thai friend, too! Köszönöm **David** for introducing me to the exotic culture of the Bundesliga. ありがとう **Makoto** for teaching me how to be polite in every circumstance. நன்றி **Anand, Mani and Adarsh** for letting me get a deep insight into tamil culture. I will never forget our visit to the temple. Namaste! Grazie Mille **Alessandro**! Ich habe echt Schwein gehabt, dich kennen lernen zu dürfen.

Prof. Dr. Dr. Nadine Gaisa aus der Uniklinik Aachen hat durch die Bereitstellung von Gewebeproben wesentlich zur Analyse plattenepithelialer Blasenkarzinome beigetragen.

Ein weiterer wichtiger Dank geht an **Dr. Vera Grotheer** aus dem Forschungslabor der Hand- und Unfallchirurgie für die Hilfe bei der Nucleofektion.

Einen ganz besonders wichtigen Beitrag gleich zu Beginn des Projektes hat **Dr. Andreas Klötgen** aus der Pädiatrischen Onkologie durch seine Hilfe bei der Auswertung von RNA-Seq-Daten geleistet.

Danke sagen möchte ich auch **Dr. Teodora Ribarska**. Deine Betreuung meiner Masterarbeit hat maßgeblich dazu beigetragen mich für eine Promotion zu entscheiden.

Darüber hinaus haben auch meine Freunde in besonderem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, indem sie alle Höhen und Tiefen begleitet haben, immer ein offenes Ohr für mich hatten und wir gemeinsam viel gelacht haben.

Allen voran natürlich **Daniel**: wahrscheinlich hat niemand in den letzten Jahren so viel Anteil an den Höhen und Tiefen dieser Arbeit wie du gehabt. Ich blicke zurück auf so viele schöne gemeinsame Erlebnisse, dass es unmöglich wäre, alle aufzuzählen. Sorry, aber das muss jetzt einmal sein: *Soulmates never die!* ;)

Ein großes Dankeschön geht auch an dich, **Sophie**. Das gemeinsame Masterstudium verbindet einfach, auch, wenn sich die beruflichen Wege getrennt haben.

Wer hätte gedacht, dass man ausgerechnet samstagsmorgens im Englischkurs Freunde fürs Leben findet? Liebe **Steffi**, du hast immer ein offenes Ohr für mich gehabt und mir Mut gemacht. Mit niemandem lache ich so gerne beim PubQuiz über die eigene Dummheit

wie mit dir! Das gilt natürlich auch für dich, liebe **Kathy**. Gemeinsam findet man immer einen Weg, auch, wenn er noch so schlecht ausgeschildert ist.

Lieber **Stefan**: nach vielen Jahren des WG-Lebens sind wir immer noch Freunde, obwohl ich nach langen Labortagen oft keine Lust mehr hatte das Bad zu putzen. Aber es ist ja auch einfach schöner gemeinsam Enten an der Düssel zu beobachten oder neue Restaurants im Viertel zu testen. Vielen Dank für die entspannte Zeit!

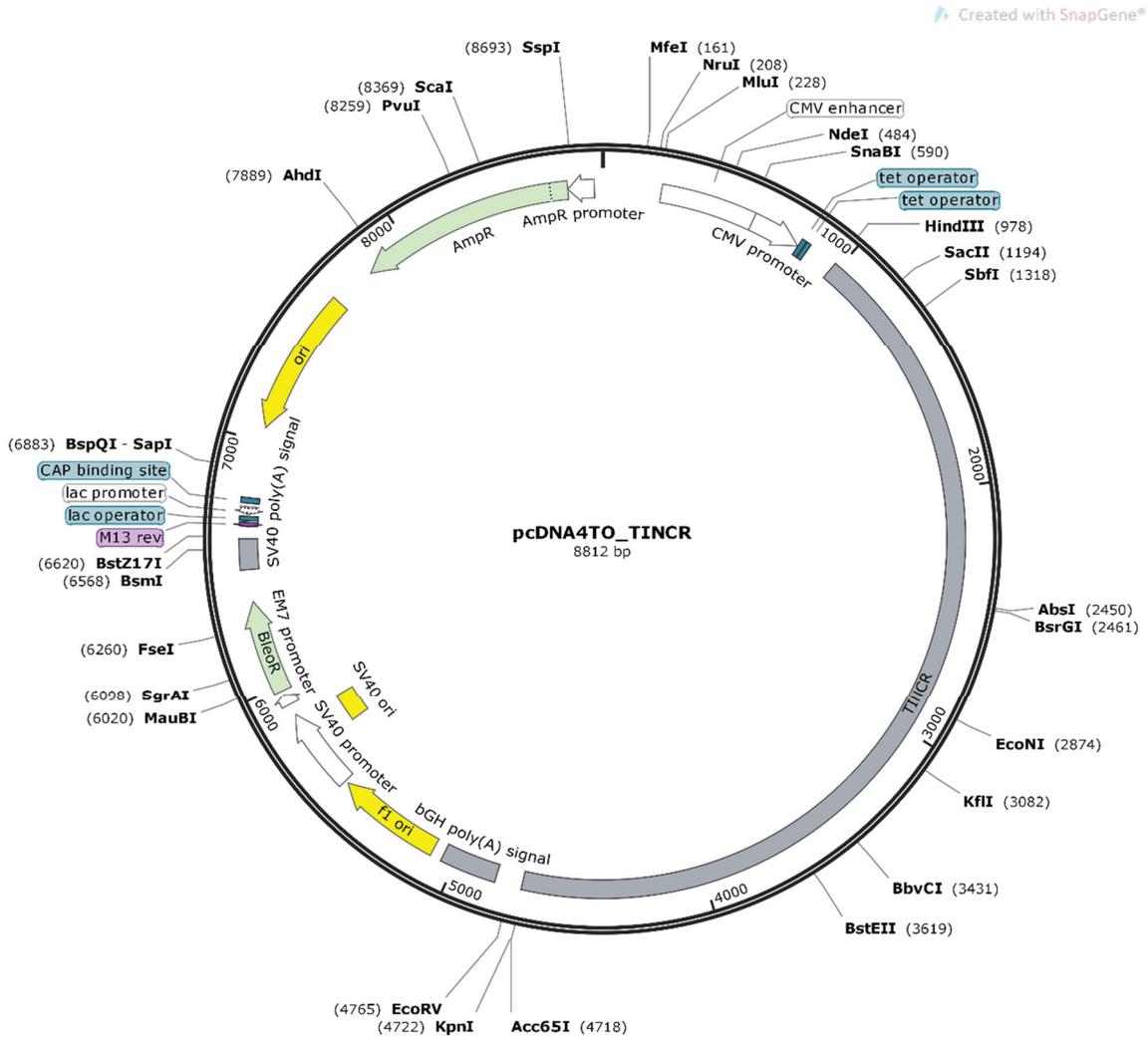
Auf zahllosen Konzerten habe ich so viele Freunde gefunden, die dafür gesorgt haben, dass ich den Kopf auch mal frei kriege: **Malte, Sven, Judith, Sandra, Lisa, Hannah & Co.** Danke für die wunderschönen Stunden in der Christuskirche, die Wegbiere, nächtlichen Zugfahrten und alles darüber hinaus!

Nicht unerwähnt bleiben dürfen auch die Nerdlinge von der Pathogang: **Ninon, Sarah, Sandra, Nicky, Veve, Nora und Katja**. Mit euch hat meine „Forscherkarriere“ begonnen. Wir haben nicht nur über die Jahre den Kontakt gehalten und die Wege der anderen begleitet, es sind vielmehr tiefe Freundschaften entstanden. Unvergessen die Reise mit **Sandra** nach Irland, die unzähligen Flohmarktbesuche und natürlich die vielen, vielen Stunden bei **Ninon, Lilith und Kai** in Hilden, sei es bei Schokobrunnen und Singstar oder beim Grillen im Garten.

Last, but not least: meine Familie!

Takk.

Plasmidkarten



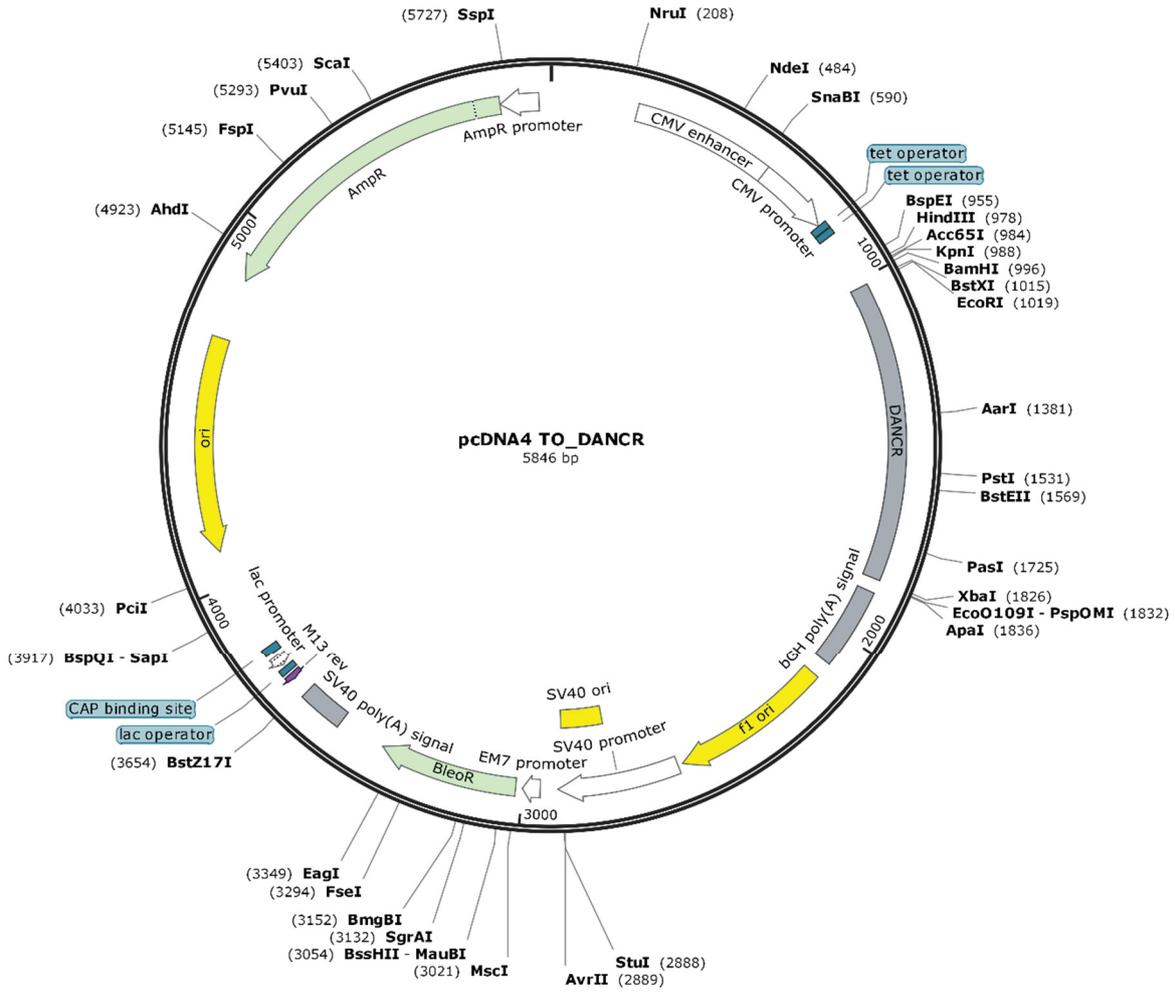


Tabelle I: Mediane DNA-Methylierung verschiedener lncRNA-Gene in Tumor- (T) und Normal-Proben (N) für alle analysierten CpG-Stellen. Die Werte wurden dem UCSC XenaBrowser für die TCGA-Kohorte des Blasenkarzinoms (BLCA, 433 samples, N=21, T=412) entnommen. Der p-Wert wurde mittels Wilcoxon-Rank-sum-Test in R berechnet.

Gene	CpG	Median N	Stabw N	Median T	Stabw T	p-Wert	Median N	Median T	p-Wert
UCA1	cg18352648	0,791	0,116	0,458	0,232	0,000	0,056	0,039	0,383
	cg08405284	0,056	0,020	0,039	0,021	0,000			
	cg02932691	0,061	0,010	0,055	0,013	0,027			
	cg22885777	0,115	0,064	0,051	0,040	0,000			
	cg17274953	0,020	0,004	0,017	0,004	0,048			
	cg25016865	0,024	0,007	0,024	0,009	0,471			
	cg24011441	0,040	0,010	0,034	0,015	0,001			
TUG1	cg08087379	0,912	0,023	0,892	0,180	0,025	0,767	0,807	0,753
	cg05373339	0,623	0,102	0,722	0,226	0,164			
	cg04270033	0,911	0,028	0,893	0,181	0,034			
	cg25806456	0,016	0,003	0,016	0,003	0,615			
	cg02551882	0,024	0,006	0,020	0,005	0,020			
	cg12376277	0,032	0,005	0,029	0,007	0,097			
	cg15282331	0,938	0,011	0,923	0,041	0,000			
	cg23120976	0,954	0,013	0,945	0,017	0,014			
TINCR	cg12062900	0,317	0,044	0,177	0,089	0,000	0,244	0,153	0,038
	cg16483916	0,185	0,046	0,153	0,068	0,001			
	cg15688918	0,044	0,030	0,032	0,035	0,005			
	cg04993257	0,315	0,067	0,223	0,097	0,000			
	cg05280750	0,242	0,081	0,122	0,093	0,000			
	cg19216791	0,349	0,063	0,232	0,103	0,000			
	cg24349886	0,244	0,073	0,152	0,106	0,000			
LINC01116	cg12148129	0,190	0,049	0,089	0,129	0,000	0,089	0,048	0,439
	cg02077100	0,089	0,024	0,048	0,108	0,000			
	cg04637598	0,020	0,003	0,018	0,035	0,148			
	cg04739123	0,053	0,014	0,037	0,098	0,001			
	cg22696982	0,045	0,019	0,042	0,068	0,234			
	cg17839314	0,027	0,007	0,026	0,050	0,392			
	cg00215551	0,043	0,006	0,042	0,039	0,540			
	cg07077965	0,301	0,083	0,174	0,159	0,001			
	cg08474164	0,092	0,034	0,079	0,108	0,173			
	cg05509190	0,343	0,076	0,294	0,154	0,091			
	cg01881966	0,618	0,064	0,722	0,151	0,003			
lincUBC1	cg11980944	0,332	0,071	0,382	0,152	0,155	0,061	0,085	0,945
	cg24339193	0,037	0,011	0,045	0,158	0,005			
	cg06849719	0,018	0,002	0,017	0,071	0,699			
	cg14221039	0,061	0,021	0,055	0,050	0,448			
	cg06968878	0,174	0,030	0,148	0,138	0,014			
	cg17928286	0,454	0,138	0,645	0,196	0,000			
	cg02520707	0,844	0,056	0,673	0,204	0,000			
	cg12656740	0,620	0,032	0,496	0,159	0,000			
	cg06174882	0,805	0,075	0,352	0,215	0,000			

	cg02999711	0,896	0,034	0,823	0,167	0,000			
	cg05362417	0,054	0,011	0,048	0,093	0,509			
	cg01966390	0,127	0,025	0,085	0,053	0,000			
	cg25202407	0,864	0,022	0,809	0,119	0,000			
	cg19503168	0,545	0,071	0,515	0,200	0,267			
	cg13061767	0,911	0,069	0,691	0,223	0,000			
	cg02954735	0,040	0,015	0,038	0,128	0,748			
	cg02952078	0,243	0,034	0,175	0,058	0,000			
	cg14203032	0,024	0,008	0,025	0,102	0,104			
	cg15651650	0,035	0,013	0,044	0,130	0,008			
	cg07902473	0,059	0,016	0,066	0,121	0,136			
	cg23570590	0,055	0,016	0,088	0,143	0,001			
	cg05707458	0,032	0,021	0,160	0,248	0,000			
	cg05764240	0,028	0,007	0,038	0,109	0,000			
	cg01790367	0,030	0,006	0,028	0,053	0,574			
	cg03349767	0,052	0,017	0,041	0,061	0,165			
	cg08749736	0,084	0,014	0,070	0,103	0,091			
	cg15889017	0,041	0,011	0,036	0,086	0,095			
	cg24797840	0,158	0,071	0,092	0,140	0,002			
	cg05721515	0,078	0,018	0,059	0,029	0,000			
	cg06870728	0,156	0,046	0,093	0,056	0,000			
	cg13543854	0,090	0,026	0,048	0,031	0,000			
	cg06022942	0,070	0,036	0,018	0,029	0,000			
	cg07907745	0,148	0,033	0,097	0,040	0,000			
	cg11018337	0,040	0,020	0,014	0,030	0,000			
	cg13814485	0,032	0,030	0,014	0,025	0,000			
	cg07516470	0,022	0,007	0,017	0,031	0,000			
	cg01166071	0,026	0,007	0,021	0,036	0,001			
	cg22647713	0,036	0,020	0,018	0,034	0,000			
	cg23943136	0,028	0,008	0,021	0,024	0,002			
	cg08707112	0,118	0,028	0,078	0,032	0,000			
	cg17566118	0,025	0,009	0,021	0,031	0,007			
	cg18187680	0,091	0,036	0,044	0,050	0,000			
	cg26292521	0,017	0,010	0,012	0,021	0,000			
GATA3	cg05671070	0,041	0,019	0,028	0,014	0,001	0,109	0,061	0,051
	cg23058185	0,055	0,022	0,033	0,030	0,000			
	cg12730771	0,029	0,008	0,022	0,018	0,000			
	cg11731114	0,062	0,015	0,049	0,026	0,002			
	cg04050331	0,039	0,019	0,025	0,015	0,001			
	cg17891011	0,049	0,015	0,033	0,029	0,000			
	cg04641787	0,080	0,025	0,045	0,024	0,000			
	cg13431023	0,082	0,025	0,057	0,027	0,000			
	cg09728012	0,030	0,012	0,026	0,019	0,008			
	cg24647276	0,040	0,014	0,031	0,021	0,042			
	cg05356738	0,023	0,008	0,018	0,026	0,058			
	cg01224891	0,018	0,009	0,014	0,028	0,001			
	cg15187550	0,016	0,014	0,012	0,029	0,005			
	cg15852223	0,013	0,002	0,010	0,013	0,000			
	cg19894747	0,026	0,005	0,020	0,013	0,000			
	cg04847548	0,028	0,007	0,022	0,013	0,001			
	cg20314737	0,066	0,013	0,057	0,015	0,010			

cg19315863	0,015	0,006	0,012	0,023	0,006				
cg07578663	0,019	0,006	0,017	0,022	0,000				
cg19679989	0,030	0,020	0,019	0,032	0,000				
cg08347183	0,023	0,009	0,019	0,047	0,002				
cg04982951	0,068	0,029	0,046	0,034	0,000				
cg06230736	0,065	0,046	0,039	0,059	0,000				
cg15330117	0,028	0,028	0,016	0,047	0,000				
cg14098681	0,030	0,042	0,019	0,053	0,003				
cg18599069	0,119	0,029	0,062	0,048	0,000				
cg10008757	0,088	0,026	0,061	0,036	0,000				
cg14327531	0,225	0,055	0,106	0,085	0,000				
cg13409449	0,100	0,037	0,038	0,066	0,000				
cg17124583	0,453	0,034	0,342	0,097	0,000				
cg15267232	0,296	0,066	0,116	0,127	0,000				
cg19883813	0,411	0,054	0,177	0,104	0,000				
cg12181459	0,785	0,088	0,446	0,133	0,000				
cg11430077	0,512	0,157	0,184	0,186	0,000				
cg01255894	0,371	0,138	0,116	0,108	0,000				
cg16267979	0,764	0,092	0,506	0,251	0,000				
cg10089865	0,760	0,123	0,429	0,269	0,000				
cg03935183	0,748	0,152	0,450	0,258	0,000				
cg11679455	0,835	0,152	0,456	0,286	0,000				
cg22770911	0,492	0,115	0,313	0,181	0,000				
cg10163955	0,684	0,148	0,435	0,252	0,000				
cg04492228	0,464	0,146	0,235	0,213	0,000				
cg17489908	0,525	0,154	0,233	0,221	0,000				
cg03669298	0,283	0,118	0,170	0,149	0,000				
cg22892607	0,520	0,152	0,220	0,227	0,000				
cg00463367	0,525	0,122	0,304	0,198	0,000				
cg04213746	0,835	0,120	0,733	0,267	0,206				
cg15043723	0,763	0,088	0,668	0,197	0,104				
cg12405139	0,788	0,100	0,672	0,210	0,124				
cg27409129	0,830	0,030	0,682	0,186	0,000				
cg01522692	0,919	0,016	0,908	0,109	0,002				
cg07989490	0,948	0,010	0,925	0,131	0,035				
cg23687654	0,936	0,013	0,921	0,076	0,634				
cg04249642	0,880	0,031	0,851	0,091	0,591				
cg07441319	0,591	0,054	0,572	0,163	0,000				
cg03479211	0,634	0,095	0,688	0,212	0,000				
cg24284640	0,739	0,089	0,786	0,071	0,000				
cg10332864	0,709	0,107	0,829	0,068	0,000				
cg00797058	0,567	0,113	0,704	0,109	0,000				
cg01263407	0,720	0,182	0,836	0,146	0,001				
cg07240413	0,615	0,144	0,221	0,267	0,000				
cg12515684	0,443	0,087	0,481	0,122	0,012				
DANCR	cg06129794	0,027	0,010	0,024	0,009	0,084	0,029	0,025	0,259
	cg12810548	0,105	0,051	0,139	0,054	0,000			
	cg12634276	0,164	0,042	0,093	0,050	0,001			
	cg00355794	0,026	0,009	0,019	0,008	0,001			
	cg00355794	0,026	0,009	0,019	0,008	0,001			
	cg17672050	0,123	0,063	0,145	0,057	0,365			

	cg02016130	0,038	0,013	0,026	0,024	0,000			
	cg07005843	0,061	0,011	0,055	0,011	0,005			
	cg24786498	0,024	0,004	0,020	0,003	0,002			
	cg12938239	0,029	0,008	0,025	0,011	0,002			
	cg23387220	0,065	0,025	0,045	0,020	0,000			
	cg15603184	0,024	0,004	0,022	0,005	0,069			
	cg03360611	0,016	0,003	0,015	0,003	0,007			
HAGLROS	cg03401519	0,554	0,128	0,421	0,210	0,002	0,067	0,047	0,259
	cg03152288	0,058	0,020	0,048	0,083	0,099			
	cg10305451	0,074	0,031	0,041	0,090	0,000			
	cg14324370	0,030	0,006	0,026	0,114	0,311			
	cg13092806	0,038	0,015	0,032	0,133	0,050			
	cg09355771	0,067	0,026	0,052	0,076	0,003			
	cg25347419	0,089	0,041	0,047	0,081	0,000			