

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

Expression und Bedeutung des HOXB-Locus beim
Urothelkarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von
Juliana Monsior
2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom (UC) stellt, durch seine hohe Rezidivrate und Progressionsneigung zu invasiven Karzinomen mit schlechter Prognose, eine Herausforderung an das Gesundheitssystem dar; Behandlung und Nachsorge erfordern regelmäßige Zystoskopien, operative Maßnahmen und Chemotherapie. Neben klassischen histopathologischen und klinischen Kriterien zur Stadieneinteilung und Risikoabschätzung werden in Zeiten der *targeted therapy* zunehmend molekulare Klassifikationsmodelle interessant, die auch zum Verständnis von Tumorentstehung und tumorfördernder Prozesse beitragen. So konnte im UC bereits ein „BASQ“-Subtyp mit häufiger plattenepithelialer Differenzierung und Expression „basaler“ Differenzierungsmarker definiert werden. Weitere „luminale“ Subtypen sind durch Biomarker urothelialer Differenzierung charakterisiert. Für den UroA Subtypen wurde eine erhöhte Expression anteriorer HOXA- und HOXB-Gene berichtet. HOX-Gene wurden bereits in verschiedenen Tumoren untersucht und ihre differentielle Expression mit Tumorprogression verknüpft. Die meisten bisherigen Daten zu HOX-Genen im UC ergeben sich aus Untersuchungen zur DNA-Methylierung und Expression in UC-Geweben. Bisher liegen keine Daten zur Expression dieser Gene in UC-Zelllinien und den Auswirkungen ihrer differentiellen Expression auf Zelleigenschaften *in vitro* vor.

Um die Expression der HOXB-Gene und nicht-kodierender Transkripte des HOXB-Locus in UC-Zelllinien zu ermitteln, wurde ihre Expression in 13 UC-Zelllinien und zwei uroepithelialen Kontrollen mittels qRT-PCR (quantitative reverse Transkription Polymerasekettenreaktion) bestimmt und verglichen. Die Expression nicht-kodierender Transkripte des HOXB-Locus wurde mit möglichen Zielgenen der HOX-Cluster korreliert; die HOXB-Gene wurden mit bekannten urothelialen Differenzierungsmarkern korreliert. Ergänzend erfolgte ein Expressionsvergleich von HOXB-Genen in Ösophaguskarzinomzellen und -geweben mittels qRT-PCR bzw. Datenbankanalysen.

Eine Vielzahl von Genen, wie auch nicht-kodierender Transkripte des HOXB-Locus, waren in den UC-Zelllinien vermindert exprimiert und häufig positiv miteinander korreliert. Die Ergebnisse sprechen für eine epigenetische Co-Regulation der HOXB-Gene in UC-Zelllinien und vermutlich auch Geweben, welche vereinbar ist mit Erkenntnissen zur vermehrten DNA-Methylierung der HOX-Loci in UC-Geweben.

HOXB2, *HOXB13* und die lncRNA (lange nicht-kodierende RNA) *HOXB-AS5* waren in einigen UC-Zelllinien vermehrt exprimiert und wurden funktionell untersucht. Zusätzlich erfolgte deren Expressionsbestimmung in UC-Geweben; diese ergab für *HOXB13* und *HOXB-AS5* deutliche Unterschiede zwischen UC-Zelllinien und Geweben.

HOXB2-Expression korrelierte in UC-Zelllinien mit epithelial mesenchymaler Transition (EMT). Die experimentelle Expressionsmodulation von *HOXB2* hatte jedoch weder Auswirkungen auf EMT, noch auf Proliferations- oder Migrationsvermögen der Zellen.

Expressionsmodulation von *HOXB13* in UC-Zelllinien mittels Transfektion von siRNA resultierte dagegen in veränderter Morphologie und Verhalten der Zellen. Veränderte Viabilität, Migration und Klonogenität von Zelllinien nach Modulation mittels Expressionsvektor sprechen für eine onkogene Wirkung von *HOXB13* im UC.

Für die lncRNA *HOXB-AS5* konnten maßgebliche Funktionen in UC-Zelllinien ausgeschlossen werden. Weitere Transkripte wurden in dieser Arbeit nicht funktionell untersucht und eröffnen weitere Forschungsmöglichkeiten; beispielsweise ergaben sich Hinweise negativer Auswirkungen der lncRNA *HOXB-AS4* auf Differenzierungsprozesse. Zusammenfassend bestätigte sich eine differentielle Expression einiger HOXB-Gene in UC-Zelllinien und insbesondere für *HOXB13* wurden funktionelle Auswirkungen aberranter HOXB-Expression im UC deutlich. Auf Grund eingeschränkter Übertragbarkeit von Expressionsdaten in Zelllinien und Geweben sollte zukünftig auch die Lokalisation der Proteine und RNAs in Zellen und Gewebe bestimmt werden.

Summary

Due to frequent recurrences and risk of progression to invasive carcinoma with poor prognosis, urothelial carcinoma (UC) presents a severe challenge to health care systems. Treatment and follow-up require substantial resources for surgery, chemotherapy and regular cystoscopy. In the era of targeted therapy, molecular classification models are becoming more and more interesting for the understanding of tumorigenesis and tumor-promoting processes in addition to classical histopathological criteria and clinical parameters for staging and risk assessment.

In UC, a "BASQ"-subtype expressing basal urothelial cell markers and often with squamous epithelial differentiation is already established. Further "luminal" subtypes are characterized by markers of urothelial differentiation. One of these subtypes, UroA, was found to have increased expression of anterior HOXA and HOXB genes.

HOX genes have already been studied in various tumors and their differential expression has been linked to tumor progression. Most data on HOX genes in UC so far are derived from studies on DNA methylation status and determination of their expression in UC tissues. Until now data on HOX gene expression patterns in UC cell lines and effects of their differential expression on cell properties in vitro are still lacking.

In order to determine expression of HOXB genes and non-coding transcripts of the HOXB locus in UC cell lines, their expression was measured in 13 UC cell lines and compared to two uroepithelial controls by qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). Correlation analysis of non-coding transcripts of the HOXB locus and possible HOX cluster target genes were performed; as well as for HOXB genes and known urothelial differentiation markers.

Additionally, expression patterns of HOXB genes were also determined in esophageal carcinoma cell lines and tissues by qRT-PCR and database analyses, respectively.

Many HOXB genes, as well as non-coding transcripts of the locus had reduced expression in the UC cell lines and were positively correlated with one another. The results support an epigenetic co-regulation of HOXB genes in UC cell lines and possibly also tissues which is consistent with evidence of increased DNA methylation of the HOX loci in UC tissues.

Expression of *HOXB2*, *HOXB13* and lncRNA (long noncoding RNA) HOXB-AS5 was elevated in some cell lines. Therefore functional studies were performed and their expression was also measured in UC tissues. Results for *HOXB13* and HOXB-AS5 revealed substantial differences between cell lines and tissues.

HOXB2, as in UC cell lines, showed enhanced expression also in some UC tissues; overexpression in cell lines was correlated with epithelial mesenchymal transition (EMT). However, experimental modulation of *HOXB2* expression had neither effects on EMT nor on the capacity of the cells to proliferate or migrate.

Modulation of *HOXB13* expression by siRNA resulted in altered morphology and behavior of the cells. Altered viability, migration and clonogenicity of cell lines after modulation suggest an oncogenic effect of HOXB13 in UC. LncRNA HOXB-AS5 showed no evidence of significant effects in UC cell lines. Other non-coding transcripts were not functionally investigated here, but there were, e. g., indications of a negative effect on differentiation processes for the lncRNA HOXB-AS4.

In summary, the differential expression of several HOX genes in UC cell lines was confirmed and especially *HOXB13* exemplifies functional implications of aberrant expression of HOXB genes in UC. As expression measurements in UC cell lines and tissue were quite divergent, future investigations should address the localization of HOXB proteins and RNAs in cells and tissue.

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR 5-Jahres-Überlebensrate

AS Aminosäure

BASQ *Basal-Squamous-like tumors*

BCG Bacillus Calmette-Guerin

BE Barrett-Ösophagus

Bp Basenpaar

BSA Bovines Serumalbumin

cDNA *Complementary DNA*

CGH *Comparative Genome Hybridisation*

Chr. Chromosom

CIS Carcinoma in situ

CK Zytokeratin

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO Dimethylsulfoxid

dNTPs Desoxyribonukleosidtriphosphat

dsDNA Doppelsträngige DNA

EAC Ösophageales Adenokarzinom

EC Ösophaguskarzinom

EMT Epithelial mesenchymale Transition

ESCC Ösophageales Plattenepithelkarzinom

EORTC *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

FCS Fetales Kälberserum

GEO *Gene Expression Omnibus*

lncRNA Lange nicht-kodierende RNA

MET Mesenchymal epitheliale Transition

MIUC Muskelinvasives Urothelkarzinom

mRNA *Messenger RNA*

MRES *Multiple regional epigenetic silencing*

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

ncRNAs Nicht-kodierende RNAs

NESC Ösophageales Plattenepithel

NMIUC Nicht muskelinvasives Urothelkarzinom

NSCLC Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom

NU Normal uroepithelial

PRC2 *Polycomb repressive complex 2*

PBS *Phosphate-buffered saline*

qRT-PCR quantitative reverse Transkription
Polymerasekettenreaktion

RISC *RNA-induced silencing complex*

rRNAs Ribosomale RNA

RT Reverse Transkription

SDS Natriumlaurylsulfat

siRNA *Small interfering RNA*

SNP *Single nucleotide polymorphism*

TBP *TATA-box binding protein*

TCGA *The Cancer Genome Atlas*

TRIS Trishydroxymethylaminomethan

tRNAs Transfer-RNA

TURB Transurethrale Blasenresektion

UC Urothelkarzinom

UpM Umdrehungen/Minute

WHO *World Health Organization*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einteilung, Inzidenz und Prognose des Urothelkarzinoms	1
1.2	HOX-Gene	4
1.2.1	Bisherige Erkenntnisse zu HOX-Genen im UC	6
1.2.2	HOXB-Locus	7
1.2.3	Nicht-kodierende RNAs und Regulation von HOX-Genen	9
1.3	Uroepitheliale Differenzierung	10
1.4	Ösophaguskarzinom	12
1.5	Ziele der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, Kits, Assays und andere Materialien	15
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	15
2.1.2	Zellkultur, RNA-Extraktion, Reverse Transkription, PCR.....	15
2.1.3	Antibiotika	16
2.1.4	Bakterienkultur und Klonierung	17
2.1.5	Plasmide	17
2.1.6	Protein-Extraktion, -Messung und Western Blot	18
2.1.7	Antikörper	19
2.2	Geräte	19
2.3	Software und Datenbanken	20
2.4	Zellkultur und Zelllinien	21
2.4.1	Urotheliale Primärkulturen	22
2.4.2	Transfektion von small interfering RNA (siRNA).....	22
2.4.3	Transfektion von Expressionsvektoren	24
2.4.4	Selektionierung stabil überexprimierender Zellen	24
2.5	Gewebe von UC und benignem Urothel	25
2.6	Klonierung der Expressionsvektoren	25

2.7	Immunzytochemische Färbung.....	27
2.8	RNA, DNA und Proteine	28
2.8.1	RNA-Extraktion und cDNA-Präparation.....	28
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	28
2.8.3	Quantitative <i>Real Time</i> reverse Transkription Polymerasekettenreaktion.....	28
2.8.4	Qualitative PCR.....	31
2.8.5	Herstellung von Proteinlysaten und Proteinbestimmung.....	31
2.8.6	Western Blot	31
2.9	Funktionelle Untersuchung von Zellen	33
2.9.1	MTT-Test zur Untersuchung der Viabilität	33
2.9.2	Ibidi-Wundheilungstest für das Migrationsverhalten	33
2.9.3	Untersuchung der Klonogenität	34
2.9.4	Seneszenzfärbung	34
3	ERGEBNISSE.....	36
3.1	Expression von HOXB-Genen und lncRNAs des HOXB-Locus in UC-Zelllinien und NU-Zelllinien... 36	36
3.2	Korrelationen zwischen HOXB-Genen und benachbarten lncRNAs.....	39
3.3	Korrelationen zwischen lncRNAs des HOXB-Locus und anderen HOX-Genen sowie Differenzierungsmarkern	41
3.4	Expression der microRNAs MIR196a und MIR10a des HOXB-Locus in UC-Zelllinien und NU-Zelllinien.....	43
3.5	Expression von <i>HOXB2</i>, <i>HOXB13</i> und <i>HOXBAS-5</i> in Geweben von UC und NU	44
3.6	Funktionelle Untersuchungen zu <i>HOXB2</i>, <i>HOXB13</i> und <i>HOXB-AS5</i>	45
3.6.1	<i>HOXB2</i> und epithelial mesenchymale Transition	45
3.6.2	SiRNA-vermittelte Herabregulation von <i>HOXB2</i> in UC-Zelllinien	47
3.6.2.1	Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen mit experimentell vermindertem <i>HOXB2</i>	49
3.6.2.2	Klonogenität von Zellen mit experimentell vermindertem <i>HOXB2</i>	51
3.6.3	Experimentelle Überexpression von <i>HOXB2</i> in UC-Zelllinien und Auswirkung auf Klonogenität	51
3.6.4	SiRNA-vermittelte Expressionshemmung von <i>HOXB13</i> in UC-Zelllinien	52
3.6.4.1	Phänotypische Veränderungen.....	53
3.6.4.2	Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen mit experimentell vermindertem <i>HOXB13</i>	55

3.6.4.3	Klonogenität von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB13	56
3.6.4.4	Seneszenzverhalten von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB13.....	57
3.6.5	Experimentelle Überexpression von <i>HOXB13</i> in UC-Zelllinien	58
3.6.5.1	Proliferations- und Migrationsverhalten von <i>HOXB13</i> -überexprimierenden Zellen	59
3.6.5.2	Klonogenität von <i>HOXB13</i> -überexprimierenden Zellen	60
3.6.6	SiRNA-vermittelte Expressionshemmung von HOXB-AS5 in UC-Zelllinien.....	60
3.7	Exkurs zu HOX-Genen im Ösophaguskarzinom	62
3.7.1	Expression von HOXB-Genen und ncRNAs des HOXB-Locus in EAC- und ESCC-Zelllinien	63
3.7.2	Statistische Analyse öffentlicher Genexpressionsdaten zur HOX-Genexpression im EC	65
3.7.3	HOX-Genexpression in EAC und ESCC der TCGA Kohorte	66
4	DISKUSSION.....	69
4.1	Aberrant exprimierte HOXB-Gene und nicht-kodierende Transkripte des HOXB-Locus im UC.....	69
4.2	HOXB2 als potenzieller Tumorsuppressor im UC.....	73
4.3	<i>HOXB13</i> als potenzielles Onkogen im UC.....	76
4.4	Fehlende Auswirkungen der lncRNA HOXB-AS5 in den funktionellen Tests	77
4.5	Aberrant exprimierte HOX-Gene im EC.....	78
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	81

1 Einleitung

1.1 Einteilung, Inzidenz und Prognose des Urothelkarzinoms

Tumorerkrankungen der Harnblase gehören weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten Malignomen (1). In Deutschland ist Harnblasenkrebs die vierthäufigste Tumorerkrankung des Mannes. Frauen sind mit Platz 14 aller Krebsneuerkrankungen etwas seltener betroffen, jedoch geht deren Erkrankung mit einer schlechteren Prognose einher. Bei Betrachtung der Krebssterberaten in Deutschland 2014 rangiert Harnblasenkrebs an der 10. beziehungsweise der 15. Stelle für Männer und Frauen (2). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei über siebzig Jahren und wichtigster Risikofaktor ist das Rauchen. Mit 95% machen Urothelkarzinome (UC) den Großteil der Harnblasenkarzinome aus. Lediglich 2% stellen Plattenepithelkarzinome und 1% Adenokarzinome dar. Zu den seltenen Tumorerkrankungen der Harnblase zählen gutartige Tumore wie Myome, Lipome und Hämangiome aber auch maligne Tumore wie Metastasen anderer Malignome, Sarkome, neuroendokrine Tumore, kleinzellige Tumore und Lymphome. Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung zur Einteilung des UC und zum Vorkommen anderer Blasentumoren. In dieser Arbeit soll im Weiteren das UC als Hauptmanifestation des Harnblasenkarzinoms im Fokus stehen.

90-95% aller UCs sind in der Harnblase lokalisiert und 5-10% manifestieren sich in anderen Abschnitten des Harntrakts, die von einem Urothel ausgekleidet sind. Diese vornehmlich im oberen Harntrakt auftretenden UCs der Harnleiter und des Nierenbeckens sind somit ebenfalls Forschungsgegenstand dieser Arbeit. UCs der proximalen Harnröhre sind extrem selten.

Bei der Erstdiagnose eines UC handelt es sich in der Mehrheit der Fälle um einen nicht muskelinvasiven Tumor (NMIUC) und damit um ein pTa oder ein pT1 Stadium oder um ein *Carcinoma in situ* (CIS). Therapie der Wahl ist die transurethrale Resektion der Blase (TURB).

Muskelinvasive Tumoren (MIUC) machen ca. 30% der Erstdiagnosen aus, gehen mit einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit sowie einer deutlich reduzierten 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) einher und machen eine radikale Zystektomie notwendig. Ergänzend kann eine platinhaltige Chemotherapie eingesetzt werden. Liegen Kontraindikationen für eine platinhaltige Chemotherapie vor, sind seit September 2017 die

Immunchekpoint-Inhibitoren Pembrolizumab und Atezolizumab für die Behandlung des metastasierten UC mit Nachweis erhöhter PD-L1-Expression zugelassen.

Therapiebestimmend ist neben dem T-Stadium vor allem der Differenzierungsgrad und weitere Risikofaktoren, welche im EORTC-Scoring erfasst werden. Je nach Risiko-Scoring schließt sich für NMIUC eine intravesikale Therapie mit Mitomycin C oder Bacillus Calmette-Guerin (BCG) an.

NMIUC mit hohem EORTC-Score können ebenfalls zur Zystektomie führen.

CIS-Läsionen folgen einem ähnlichen Behandlungsschema wie dem oberflächlicher high grade Tumore. Da sie ein noch höheres Risiko zur Progression aufweisen, kommt auch hier bei rezidivierenden Erkrankungsverläufen eine radikale Zystektomie in Betracht (3).

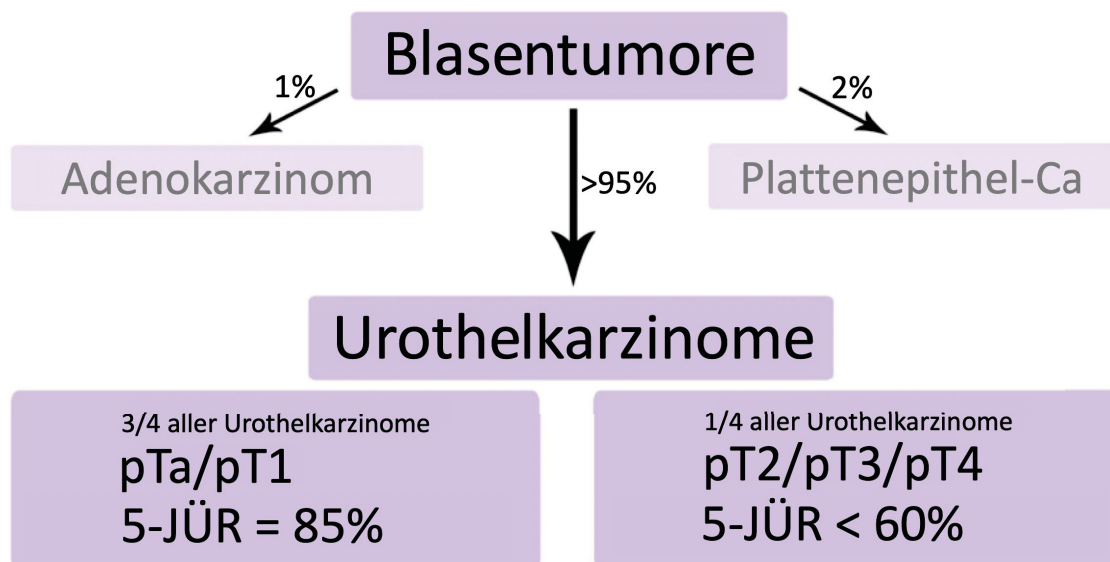


Abb. 1.1: Schematische Darstellung zur Einteilung des UC.

Die hohe Rezidivrate von NMIUC in 50-70 % der Fälle, die Progression von 10-20% *high grade* UC zu MIUC und die unzureichenden Therapiemöglichkeiten der MIUC mit beispielsweise einer 5-JÜR von 31% bei vorhandenem Lymphknotenbefall verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Forschungserkenntnisse zum Harnblasenkarzinom (4).

Häufige Zystoskopien zur Nachsorge und Resektionen von Rezidivtumoren stellen einen erheblichen Kostenfaktor im Gesundheitssystem dar, zu dem gerade auch die Tumore mit besserer Prognose beitragen. Marker zur Früherkennung mittels Urintests und gezielte medikamentöse Therapien sind bisher nicht in der Routine etabliert. Deshalb sind

molekulare Marker zur Diagnostik und Prognosestellung in Ergänzung klinischer Parameter sowie neue zielgerichtete Medikamente Gegenstand aktueller Forschung (5-7).

Es sind bereits viele molekulare Veränderungen bekannt, die zur Entstehung und Progression eines Harnblasenkarzinoms beitragen. Praktisch alle Harnblasenkarzinome weisen Mutationen oder Expressionsveränderungen in wenigstens einem Gen für Komponenten der Wachstumsregulation über die MAPK/PI3K-Signalwege (beispielsweise *FGFR3* oder *PTEN*), für die Regulation von Zellzykluskontrollpunkten (beispielsweise *RBI* oder *TP53*) oder für epigenetische Regulatoren (beispielsweise Komponenten der COMPASS- und SWI/SNF-Komplexe) auf (5, 8). *Low grade* Tumore beispielsweise haben in über der Hälfte der Fälle aktivierende Mutationen im *FGFR3* Gen oder exprimieren dieses vermehrt (5, 9, 10). Die fortgeschrittenen MIUC hingegen weisen deutlich häufiger inaktivierende Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *RBI*, *TP53* und *PTEN* und eine hohe chromosomale Instabilität auf (5). Deletionen von Chromosom 9 wiederum betreffen 50% aller UCs und scheinen ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein (5). Inaktivierende Mutationen epigenetischer Regulatoren sind öfter in NMIUC anzutreffen. Beispielsweise weist die Histondemethylase *KDM6A* (auch *UTX*) in über 50% der NMIUC Mutationen auf aber auch in MIUC sind *KDM6A* und die Histonmethyltransferasen *MLL2* und *MLL3* sowie der Chromatinmodifikator *ARID1A* in circa 25% der Fälle von Mutationen betroffen (5, 11). Eine DNA-Hypermethylierung von Promotor-Regionen im MIUC korreliert mit der Höhe des kumulierten Tabakkonsums, dem Hauptrisikofaktor des UC (8). Während in der Klinik die Einteilung des UC nach den Stadien der WHO gebräuchlich ist, gibt es Bemühungen verschiedener Forschungsgruppen zur molekularen Klassifizierung des UC (8, 12-18). Die Arbeitsgruppen identifizierten verschiedene Gensignaturen um Einteilungen in UC-Subtypen mit unterschiedlicher Prognose vorzunehmen. Ein aktueller internationaler Konsens definiert, unter Berücksichtigung der einzelnen Klassifikationssysteme, sechs molekulare Subtypen für das MIUC (*luminal papillary*, *luminal nonspecified*, *luminal unstable*, *stroma-rich*, *basal/squamous* und *neuroendocrine-like*) (19). Vornehmlich unterscheidet man einen basalen Subtyp mit teils plattenepithelialer Differenzierung und schlechter Prognose von luminal differenzierten Subtypen. Der basale Subtyp wird als BASQ (*Basal-Squamous-like tumors*) bezeichnet und ist charakterisiert durch den Nachweis der Zytokeratine (CK) CK5 und CK14 und Abwesenheit bzw. geringer Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3 und FOXA1 (20). In manchen UCs dieses Subtyps ist auch histologisch anteilig plattenepitheliale Morphologie erkennbar. Der BASQ-Subtyp ist streng von den selten vorkommenden Plattenepithelkarzinomen der Harnblase zu

unterscheiden (21) (Abb 1.1). Während ein Konsens bisher nur für MIUC getroffen ist, ergibt sich auch für NMIUC eine prognostische Relevanz einer Subtypisierung in luminal und basal (18, 22, 23). Damit sind die verschiedenen T-Stadien in einigen molekularen Subtypen übergreifend vertreten (13, 19).

Die zahlreichen Forschungsbemühungen zur Identifizierung neuer molekularer Marker und zur Subtypisierung von UCs zielen auf eine verbesserte individuelle Prognoseeinschätzung um Indikationen zur individuellen Behandlungseskalation stellen zu können und gegebenenfalls neue molekular gezielte Therapiestrategien im Sinne einer *targeted therapy* entwickeln zu können (12, 18, 24).

Einzelne Arbeiten lassen darauf schließen, dass die Fehlregulation von HOX-Genen für die Entstehung des UC relevant ist. Gemäß einem der aktuelleren Ansätze zur molekularen Subtypisierung des UC (Lund-University), welcher ebenfalls Berücksichtigung bei der Erstellung des internationalen Konsens fand, sind verschiedene HOX-Gene in weniger aggressiven Tumoren stärker exprimiert, jedoch in den aggressiveren Subtypen epigenetisch inaktiviert (14, 15, 25, 26). Bereits 2010 stellten Marsit et. al. eine vermehrte Methylierung und somit Inaktivierung des *HOXB2*-Promotors in MIUCs fest (27).

1.2 HOX-Gene

HOX-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren und beinhalten als charakteristisches Merkmal eine 183 Basenpaar (Bp) lange DNA-Sequenz, welche für eine 61 Aminosäuren (AS) lange DNA-Bindungsdomäne kodiert (28). Diese wird auch als Homeodomäne bezeichnet. Die klassischen HOX-Gene sind in Wirbeltieren in vier Clustern organisiert, welche höchstwahrscheinlich durch zwei Duplikationen der ursprünglichen Gen-Sequenzen in Nichtvertebraten entstanden sind (29). Sie entsprechen dem HOM-C-Cluster der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), dessen Funktion bisher am besten untersucht ist und dessen adäquate Expression zur korrekten Ausbildung der Körpersegmente notwendig ist (30).

Die menschlichen HOX-Cluster (auch als HOX-Loci bezeichnet) sind auf vier verschiedenen Chromosomen (Chr.) lokalisiert: HOXA, HOXB, HOXC und HOXD befinden sich, der Reihenfolge nach, in den Chromosomenabschnitten 7p15, 17q21, 12q13 und 2q31 und umfassen gemeinsam 39 HOX-Gene (31, 32). Die auf einem Locus befindlichen Gene 1-13 werden als paraloge Gruppen bezeichnet und in der embryonalen Entwicklung entlang der Körperachse unterschiedlich exprimiert. Die anterioren 3'-Gene

werden zeitlich früher und in kapitalen Regionen exprimiert, während im weiteren Verlauf die posterioren 5'-Gene in weiter aboralen Regionen zur Entstehung der thorakalen und kaudalen Körperregionen beitragen. Dieses Prinzip wird auch als spatiale und temporale Kolinearität bezeichnet (33). Eine schematische Darstellung der humanen HOX-Cluster zeigt Abb. 1.2.

Dysregulationen der HOX-Gene wurden bereits in einigen Tumorentitäten beobachtet und umfassen verschiedenartige genetische Veränderungen mit den entsprechenden resultierenden Mutationen, Deletionen und Amplifikationen sowie vor allem epigenetische Veränderungen. Beispielsweise charakterisieren HOXA9 Fusionsproteine, neben weiteren Mutationen und der Dysregulation anderer HOX-Gene, prognostisch unterschiedliche Formen von Leukämien (34).

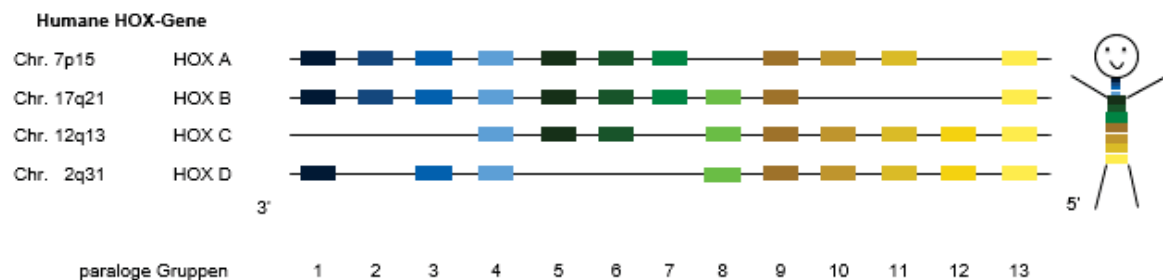


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des humanen HOX-Clusters. Die Zeichnung gibt die vorwiegende Lokalisation der Expression während der Embryonalentwicklung wieder.

Auch in soliden Tumoren wurden Dysregulationen von HOX-Genen beobachtet. Im Prostatakarzinom ist ein hereditärer Basenpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) von *HOXB13* assoziiert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko und Überexpression von *HOXB13* geht mit Tumorprogression trotz Androgendeprivation einher und in ähnlicher Weise mit Progression beim Tamoxifen-resistenten Mammakarzinom und beim Ovarialkarzinom (35-38). Gleichfalls beim Prostatakarzinom kann die Überexpression von *HOXC6* zur Detektion aggressiver Tumoren herangezogen werden und wird in Urintests zur Diagnosestellung erprobt, auch wenn der progressionsfördernde Mechanismus unklar ist (39-42). Vinarskaja et. al. sprechen in diesem Zusammenhang vom „*HOXC6 Paradox*“, da nachgeschaltete, potenziell tumorsuppressive Zielgene, negativ korreliert sind (42).

HOXB2 gilt als negativer prognostischer Marker beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (43). In zwei Arbeiten wurde über *HOXA5* als

Transkriptionsaktivator des Tumorsuppressorgens *TP53* berichtet und eine verminderte Expression von *HOXA5* im Mammakarzinom solle entsprechend mit mangelnder Apoptoseinduktion einher gehen (44, 45).

Diese Beispiele verdeutlichen, dass HOX-Gene Relevanz für Tumorentstehung und Progression haben. Die gewebespezifische Expression dieser Gene scheint essenziell für Gewebemöostase und Zellidentität zu sein, so dass ihre veränderte Expression in Tumoren aberrante Differenzierungsprozesse nach sich zieht (29, 46, 47).

1.2.1 Bisherige Erkenntnisse zu HOX-Genen im UC

Die meisten bisherigen Daten zu HOX-Genen im UC haben sich aus epigenetischen Untersuchungen zur Erfassung von DNA-Methylierungsveränderungen ergeben, in denen häufig HOX-Gene als differentiell methyliert identifiziert wurden. Darüber hinaus gibt es vereinzelt Daten zur Expression von HOX-Genen im UC, die aus gezielten mRNA-Bestimmungen oder immunhistochemischen Färbungen resultieren. So konnte auch unsere Arbeitsgruppe eine vermehrte Expression von *HOXC6* und *HOXC13* im UC beobachten (48). Des Weiteren sind verschiedene chromosomale Abschnitte, auf denen auch HOX-Gene lokalisiert sind, im UC durch Verluste oder Zugewinne charakterisiert. Bereits 1998 ergaben *Comparative Genome Hybridisation* (CGH)-Untersuchungen Zugewinne von Chromosom 7p und 17q sowohl in NMIUC als auch in MIUC und Verluste vom langem Arm von Chromosom 2 in pT1 Tumoren, die durch neuere *Array*-CGH-Untersuchungen bestätigt wurden (49-52). Die betroffenen HOX-Loci sind Abb. 1.2 zu entnehmen.

Marsit et. al. identifizierten eine Hypermethylierung des *HOXB2*-Promotors und die daraus resultierende verminderte Expression als statistisch signifikanten Marker invasiver UCs, während gesundes Blasengewebe und NMIUCs ähnliche Methylierungsgrade aufwiesen (27).

Verminderte *HOXA9*-Expression durch vermehrte DNA-Methylierung wurde in einer weiteren Studie nachgewiesen, in der 181 NMIUCs mit sechs Normalgeweben verglichen wurden, und in einem weiteren Probenet bestehend aus 18 NMIUCs und sechs Kontrollen als negativ prognostischer Marker für Rezidive getestet (53). Vallot et. al. beschrieben entsprechend einen neuen Phänotyp für einige UCs, der durch *multiple regional epigenetic silencing* (MRES) auffällt und in seiner Gensignatur einem CIS entspricht (54). Der MRES-Subtyp zeichnet sich dadurch aus, dass Abschnitte der HOXA-, HOXB- und HOXD-Loci durch vermehrte DNA-Methylierung inaktiviert sind. Wie weiter oben bereits erwähnt

gelangten auch Lauss et. al. (Lund-Universität) zu der Hypothese, dass Gene dieser HOX-Loci als Tumorsuppressoren wirken könnten und mit zunehmendem Tumorgrad durch vermehrte DNA-Methylierung inaktiviert werden (25). Entsprechend ist der prognostisch günstige UC-Subtyp der Lund-Universität UroA (*Urothelial-like A*; ursprünglich als Urobasal A bezeichnet), welcher sich durch hohe Expression urothelialer Differenzierungsmarker auszeichnet, durch höhere Expression anteriorer HOXA- und HOXB-Gene gegenüber weniger differenzierten UCs charakterisiert (14).

Cantile et. al. ermittelten 2003 die mRNA-Spiegel des gesamten HOX-Netzwerks in einem Set aus 15 UC-Geweben und angrenzendem Normalgewebe mittels RT-PCR und beschrieben eine Re-Aktivierung von *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXC6* und eine veränderte Expression paraloger HOX11-Gene in den UCs (55). Bis auf *HOXB2* und *HOXB3*, deren Expression in den UCs etwas häufiger detektiert wurde als in den Kontrollen, stellten die Autoren in dieser kleinen Kohorte keine Unterschiede in der RNA-Expression von HOXB-Genen fest. Hiervon abweichend beobachteten Marra und Cantile zehn Jahre später eine erhöhte Expression von *HOXB13* in UC-Geweben im Vergleich zu Normalkontrollen (56). Zusätzlich ergaben deren immunhistochemische Analysen, dass *HOXB13* in MIUCs gegenüber NMIUCs signifikant höher exprimiert war. Im Falle von NMIUC war eine Umverteilung von *HOXB13* in das Zytoplasma mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert. Eine andere Arbeitsgruppe berichtet von einer Überexpression von *HOXB5* in 70% von 35 untersuchten UC-Geweben und in einigen UC-Zelllinien (57).

1.2.2 HOXB-Locus

Diese Arbeit beschäftigte sich vor diesem Hintergrund mit dem HOXB-Locus.

Der HOXB-Locus ist, wie der Abb. 1.3 zu entnehmen, auf Chromosom 17q21.32 lokalisiert. Er umfasst eine Region von ca. 200.000 Bp auf denen 10 HOXB-Gene, 5 lncRNAs (lange nicht-kodierende RNAs) und 2 microRNAs kodiert werden. Die proteinkodierenden HOXB-Gene werden in 3' - nach 5'-Richtung mit aufsteigenden Zahlen benannt (*HOXB1*, *HOXB2* usw.). Die lncRNAs werden ebenso durchnummeriert (*HOXB-AS1*, *HOXB-AS2* usw.). Eine schematische Darstellung des HOXB-Locus mit der Lokalisation aller in dieser Arbeit relevanten Transkripte ist in Abb. 1.3 zu sehen.

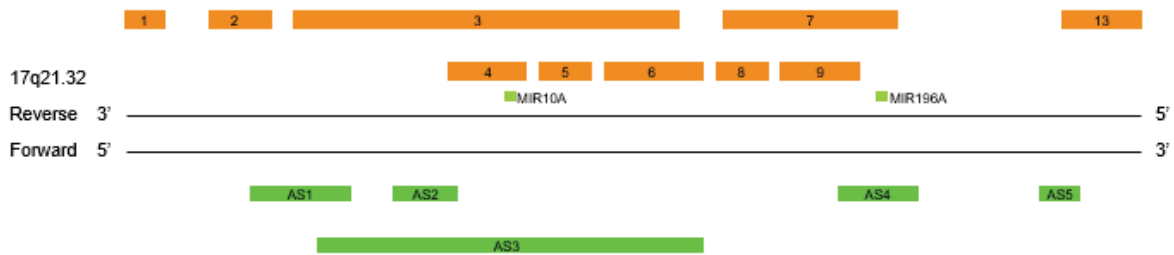


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des HOXB-Locus. HOXB-Gene sind in orange dargestellt (1=*HOXB1*, 2=*HOXB2* etc.). Grüne Balken entsprechen lncRNA-Genen (AS1=*HOXB-AS1* etc.), die beiden microRNA-Gene sind als grüne Boxen dargestellt. Lage und Länge der Balken sind den Gensequenzen nachempfunden und entsprechen etwa dem Maßstab.

In anderen Tumorentitäten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen HOXB-Genen und erhöhter zellulärer Proliferationsfähigkeit und Invasionsvermögen hergestellt werden. Vermehrte Expression von *HOXB7* in Zellen des kolorektalen Karzinoms und oralen Karzinomen führte zu erhöhter Proliferation (58, 59). Im Ovarialkarzinom sind Zellen mit erhöhter Expression von *HOXB7* oder *HOXB13* invasiver (60). Wie weiter oben bereits erwähnt, ist *HOXB13* mit Progression des Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinoms assoziiert (36-38) und *HOXB2* ist mit ungünstiger Prognose beim NSCLC assoziiert (43, 44). Aberrante HOXB-Expression kann somit Auswirkungen auf Eigenschaften von Tumoren wie Aggressivität und Differenzierungsgrad haben.

Wie bereits geschildert, wurde auch im UC für einzelne HOXB-Gene eine aberrante Expression berichtet, welche mit vermehrter Invasion und folglich mit dem MIUC - gegenüber dem NMIUC - assoziiert wurde (27, 54, 56, 57). In der Lund-Klassifikation zur molekularen Subtypisierung anhand von Gensignaturen kennzeichnet die Expression anteriorer HOXB-Gene den gut differenzierten Subtyp UroA (14).

Nicht bekannt ist bisher, ob HOXB-Gene in UC-Zelllinien gegenüber uroepithelialen Zellen ebenfalls aberrant exprimiert sind und ob eine veränderte Expression Auswirkungen auf Zelleigenschaften hat. Zur Expression und Wirkung nicht-kodierender Transkripte des HOXB-Locus und eventueller „Effekte“ auf aberrante Differenzierungsprozesse im UC lagen bisher keine Publikationen vor.

1.2.3 Nicht-kodierende RNAs und Regulation von HOX-Genen

Zu den nicht-kodierenden RNAs zählen alle RNA-Sequenzen die zwar transkribiert werden, jedoch nicht als mRNA zur Proteintranslation dienen. Nur ca. 1% des menschlichen Genoms kodiert tatsächlich für Proteine. Die Transkription zahlreicher nicht-kodierender Transkripte legt nahe, dass sie dennoch Funktionen ausüben. Daher geraten diese zunehmend in das Blickfeld der Forschung. Neben den gut untersuchten rRNAs und tRNAs unterscheidet man vorwiegend zwischen kurzen RNAs, wie zum Beispiel microRNAs und langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs), die ca. 200 bis mehrere 1000 Basen umfassen. Während microRNAs an mRNAs binden und damit deren Translation verhindern oder zu deren Abbau beitragen sind die Eigenschaften der lncRNAs vielfältiger.

Tatsächlich sind verschiedene denkbare Mechanismen für die Funktion von lncRNAs bereits für einzelne Vertreter dieser Gruppe nachgewiesen worden. Beispielsweise wird angenommen, dass manche lncRNAs durch Interaktion mit Proteinkomplexen epigenetische Auswirkungen auf Chromatinmodifikationen haben können, was sowohl aktivierend als auch inaktivierend größere DNA-Abschnitte betreffen kann. Dies kann als Wirkung *in cis* erfolgen, wenn der Effekt der lncRNAs auf benachbarte Gene innerhalb eines DNA-Abschnitts gerichtet ist, oder als Wirkung *in trans* mit Effekten auf Gene entfernterer DNA-Abschnitte oder Chromosomen. Zudem können lncRNAs ähnlich wie microRNAs zur Inaktivierung von mRNAs oder aber zu deren Stabilisierung beitragen (postranskriptionelle Prozessierung) (61-64).

Das streng regulierte Muster der gewebespezifischen HOX-Genexpression wird unter anderem durch Methylierungs- und Acetylierungsmodifikationen von Histonen und damit durch die Chromatinstruktur gesteuert, so dass eine regulatorische Funktion von chromatinregulierenden lncRNAs bei der differentiellen Expression von HOX-Genen und der Zelldifferenzierung anzunehmen ist (65). Auch die HOX-Loci kodieren für einige nicht-kodierende RNAs, die wiederum *in cis* oder *in trans* zu deren Regulation beitragen könnten, aber bisher wenig untersucht sind. Für die lncRNA HOTAIR des HOXC-Clusters konnte eine Interaktion mit chromatinmodifizierenden Proteinen der Polycomb-Gruppe und eine Wirkung auf HOX-Gene *in trans* bereits gezeigt werden (66, 67). Die nicht-kodierenden Gene des HOXB-Locus sind Abb. 1.3 zu entnehmen.

Im vergangenen Jahr untersuchten Xiong et. al. die Wirkung von HOXB-AS5 in Zelllinien des Glioblastoms und beobachteten eine Polycomb-vermittelte Methylierung des *HOXB13*-Promotors durch HOXB-AS5-vermittelte Bindung und Rekrutierung der Methyltransferase

EZH2 (68). EZH2 führt als Komponente des *polycomb repressive complex 2* (PRC2) zur Trimethylierung von Lysin 27 an Histon 3 (H3K27me3) und wirkt somit epigenetisch inaktivierend.

Auch für die microRNAs MIR10 und MIR196 des HOXB-Clusters konnte eine expressionshemmende Wirkung auf HOX-Gene in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. MIR196 reprimiert Hoxb8 in Mäusen, HOXC8 in Melanomzellen und HOXA9 in Leukämie-Zellen, während miR10 Hoxb1 und Hoxb3 im Zebrafisch reprimiert (69-72). Über öffentlich zugängliche Datenbanken werden für die beiden microRNAs noch weitere HOX-Gene sowie *GATA6* als Zielgene postuliert.

Deswegen stellt sich in UC-Zelllinien neben der Frage nach der HOXB-Expression ebenfalls die, nach der Expression nicht-kodierender Transkripte des HOXB-Locus, ihrer Beziehung zueinander und zu potentiellen Zielgenen. *Loss of function* Experimente zur Untersuchung der nicht-kodierenden Transkripte sind geeignet, um Auswirkungen auf HOX-Gene zu untersuchen und funktionelle Veränderungen zu erfassen.

1.3 Uroepitheliale Differenzierung

Der anatomische Aufbau des Urothels, bestehend aus einer Basalzellschicht gefolgt von einer mehrere Schichten umfassenden Intermediärzellschicht und schließlich der Superfizialzellschicht mit den Deckzellen, ähnelt dem von Plattenepithelien und äußert sich ebenfalls in der differentiellen Expression von Zytokeratinen (CK) und Transmembranproteinen. Während Deckzellen Uroplakine und Zytokeratin 20 (CK20) exprimieren, findet man in der Basalzellschicht CK5 und in einem kleinen Anteil der Zellen zusätzlich CK14, sowie den Transkriptionsfaktor p63. Die Intermediärzellschicht wiederum ist durch einen vollständigen Verlust von CK14 gekennzeichnet, stattdessen finden sich dort Marker differenzierterer Zellen wie CK8 und CK18. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 1.4.

Volkmer et. al. veröffentlichten 2012 eine Einteilung von UCs in drei Entwicklungsstadien, die durch die Expression der Zytokeratine CK14, CK5 und CK20 gekennzeichnet ist (73). Auch andere neuere Subklassifizierungsansätze von UCs nutzen diese CKs als valides Charakterisierungskriterium (13, 16). So ist der prognostisch ungünstige SCC-like UC-Subtyp der Lund-Klassifikation, welcher dem BASQ entspricht, durch die Abwesenheit von CK20 und Expression von CK5 und CK14 gekennzeichnet (13, 20).

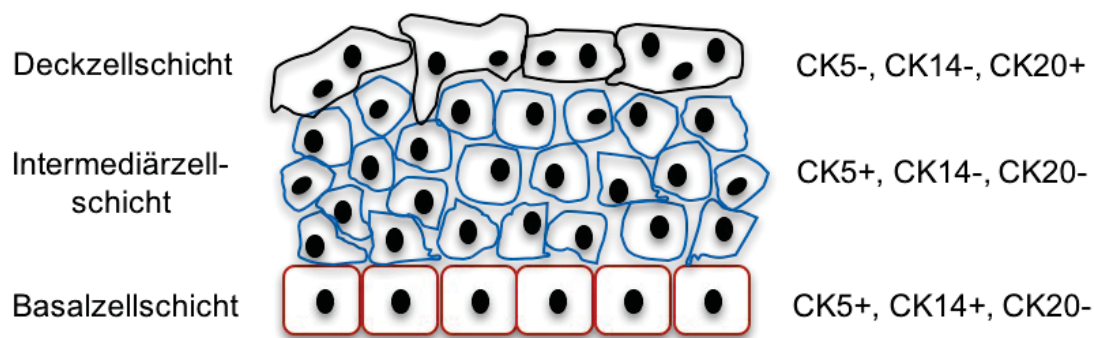


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des anatomischen Aufbaus normalen Urothels und Expression von Zytokeratinen (CKs).

Für den Transkriptionsfaktor p63, der typischerweise in basalen epithelialen Zellen vorkommt, konnte gezeigt werden, dass die Isoform $\Delta Np63\alpha$ in UC-Zelllinien eine epithelial mesenchymale Transition (EMT) verhindern kann (74). Dieser Effekt wird über eine Transkriptionsaktivierung von *miR200* vermittelt, dessen repressive Wirkung auf EMT-induzierende Faktoren wie TGF- β und ZEB für weitere Karzinome bekannt ist (75, 76). EMT ist charakterisiert durch einen Zugewinn mesenchymaler Eigenschaften, wie spindelförmige Morphologie, verminderte Haftung im Zellverbund, und vermehrte Fähigkeit zur Migration von Zellen die eigentlich epithelialen Ursprungs sind. Bei Karzinomen ist EMT mit Invasions- und Metastasierungspotential verbunden und geht mit einer Erhöhung EMT-typischer Transkriptionsfaktoren des TGF- β -Signalwegs sowie ZEB1, ZEB2 und SNAIL (auch SLUG) einher, dem eine Abnahme epithelialer Marker, wie E-Cadherin, und eine Erhöhung mesenchymaler Marker, wie Vimentin und N-Cadherin, folgt (77). Zur schematischen Veranschaulichung dient Abb. 1.5.

Expressionsbestimmungen der genannten Zytokeratine und Differenzierungsmarker können zur Ermittlung veränderter Zelldifferenzierung herangezogen werden. Die ektopische Expression von $\Delta Np63$ dient in dieser Arbeit der Induktion des Umkehrmechanismus von EMT, soll also mesenchymal epitheliale Transition (MET) in den Zellen bewirken. Sowohl $\Delta Np63$ als auch *miR200* können, durch deren EMT-hemmende Wirkung, als weitere epitheliale Marker dienen.

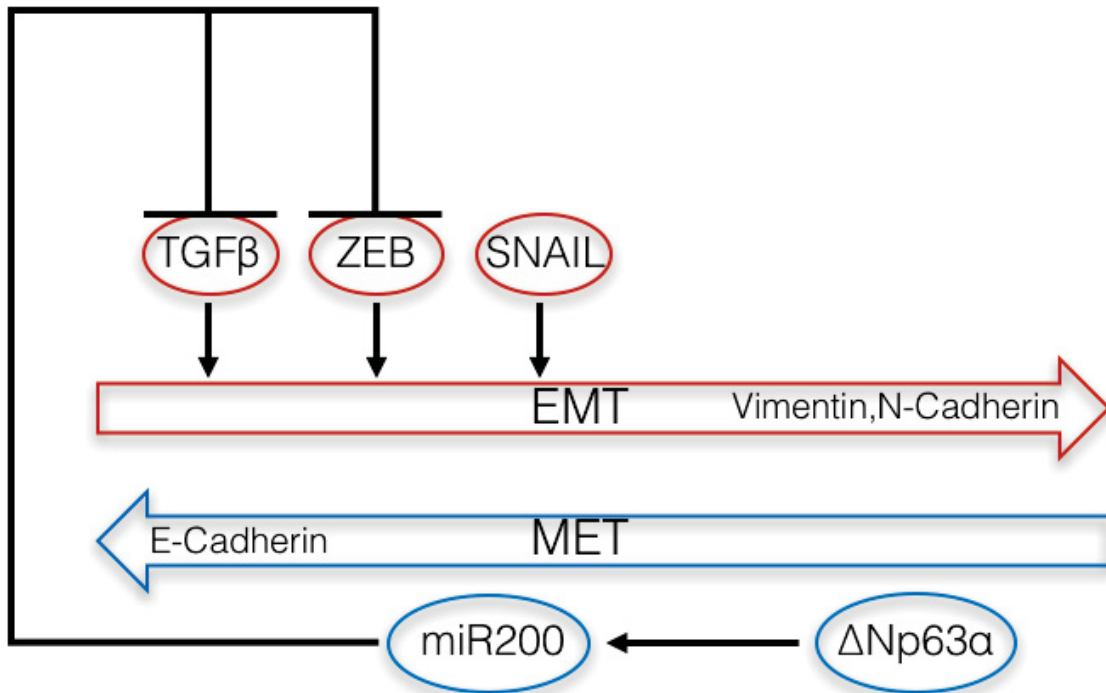


Abb. 1.5: Schematische Darstellung EMT-fördernder Faktoren, EMT-Inhibition durch Δ Np63 und entsprechende Differenzierungsmarker Vimentin, N-Cadherin und E-Cadherin.

1.4 Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom (EC) gehört in Deutschland zu den weniger häufigen Tumoren, zeichnet sich jedoch durch eine schlechte Prognose auf Grund später Diagnosestellung aus. Ursächlich ist das Fehlen von Frühsymptomen, so dass Patienten häufig erst bei zunehmenden Beschwerden, wie Dysphagie, Hallitosis, Kachexie oder Blutungskomplikationen, mit fortgeschrittenen Karzinomen den Arzt aufsuchen. Mit etwa 6500 Neuerkrankungen und 5200 Sterbefällen im Jahr 2012 und einer 5-JÜR von unter 25% zählt der Speiseröhrenkrebs zu den schlecht behandelbaren Krebserkrankungen (2).

Man unterscheidet zwei Entitäten, die in Pathogenese und somit auch Risikofaktoren und Patientenpopulationen differieren. Bei ca. 40-50% der ECs handelt es sich um ein Adenokarzinom (EAC) und damit um einen Tumor der unteren Speiseröhre, der sich im Rahmen einer gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD) entwickelt. Eine fakultative Präkanzerose bei dieser Erkrankung stellt der Barrett-Ösophagus (BE), eine intestinale Metaplasie, dar.

Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (ESCC) betrifft dagegen vorwiegend den oberen Teil der Speiseröhre und entsteht im Zusammenhang mit Noxen wie Alkohol und Tabakrauch.

Die Therapiemöglichkeiten umfassen Chirurgie, Chemotherapie, Bestrahlung sowie im Frühstadium auch andere interventionelle Maßnahmen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Im Falle einer HER2-Positivität fortgeschrittener EAC, welche in 20 % der Fälle vorkommt, wird die palliative Chemotherapie um Trastuzumab ergänzt.

HER2 (auch *ERBB2*) ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert, welches im EAC durch häufige Zugewinne gekennzeichnet ist und auf dem sich ebenfalls der *HOXB*-Locus befindet (78). In CGH-Untersuchungen, an 60 isolierten disseminierten EC-Tumorzellen, stellten sich Amplifikationen von 17q12.21 als häufigste chromosomale Veränderung heraus; sie betraf 11% der ESCC- und 58% der EAC-Zellen (79).

Wie in zahlreichen anderen Tumoren wurde im Ösophaguskarzinom nach veränderter Expression von *HOX*-Genen geforscht. Im EAC ist eine erhöhte Expression der nicht-kodierenden RNA *MIR196a* des *HOXB*-Locus mit Apoptoseinduktion und erhöhter Wahrscheinlichkeit hoher Dysplasiegrade des BE assoziiert (80, 81). Zusätzlich ist eine Dysregulation von 11 *HOX*-Genen im ESCC beschrieben (82).

Die Arbeitsgruppe um Di Pietro et. al. publizierten 2012 Ergebnisse einer Microarray-Untersuchung zu *HOX*-Dysregulationen im BE, der Vorstufe des EAC. Für *HOXB5*, *HOXB6* und *HOXB7* wurde eine erhöhte Expression im BE gegenüber Vergleichsgeweben aus angrenzender Speiseröhre und Magen detektiert, welche in unabhängigen Probensets bestätigt werden konnte. Experimentelle Überexpressionsversuche der drei Transkripte *HOXB5/6/7* in der Zelllinie NES aus normalem Speiseröhren-Plattenepithel führte wiederum tatsächlich zur Induktion intestinaler Marker (83).

In einer vergleichenden Microarray-Untersuchung von normalem Plattenepithel des Ösophagus (NESC) zum BE und zu den beiden Entitäten EAC und ESCC konnte ebenfalls erhöhte Expression von *HOXB5* und *HOXB6* im BE und EAC detektiert werden (84). Kimchi et al nutzen *HOXB7* in Kombination mit *GATA6* und *SPRR3* zur Differenzierung zwischen NESC, BE, und EAC (85).

1.5 Ziele der Arbeit

Klassische HOX-Gene sind entscheidend an der Bestimmung von Zellschicksalen beteiligt und gewebespezifisch exprimiert. In Tumoren ist ihre Expression häufig verändert und in einzelnen Tumorarten wurde nachgewiesen, dass die Expressionsänderungen bestimmter HOX-Gene für Tumorentstehung und -progression funktionell bedeutsam sind. Im UC gibt es ebenfalls Hinweise auf Veränderungen in der Expression von HOX-Genen, aber weder systematische Analysen dieser Veränderungen noch funktionelle Untersuchungen zu ihrer Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es daher, Expressionsveränderungen und mögliche Funktion der HOXB-Gene im UC näher zu beleuchten. Zusätzliches Augenmerk wurde dabei auf die nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs) im HOXB-Locus gelegt.

Wichtige Fragen im Einzelnen waren:

1. Sind HOXB-Gene und benachbarte nicht-kodierende RNAs in UC-Zelllinien im Vergleich zu normalen uroepithelialen Zellen differentiell exprimiert?
2. Lassen sich Ergebnisse aus Zelllinien auf UC-Gewebe übertragen?
3. Finden sich Zusammenhänge zwischen der Expression von ncRNAs des HOXB-Locus und anderen HOX-Genen *in cis* oder *in trans*?
4. Welche Auswirkungen haben Expressionsmodulationen der aberrant exprimierten Gene auf uroepitheliale Differenzierungsmarker?
5. Welche Auswirkungen haben Expressionsmodulationen der aberrant exprimierten Gene auf die Eigenschaften von Tumorzellen?

Auf Grund der oben beschriebenen (1.4) chromosomalen Zugewinne von Chromosom 17q im Adenokarzinom des Ösophagus (EAC), sollte in einem Exkurs dieser Arbeit zusätzlich die HOXB-Gen Expression in EAC-/ und ESCC-Zelllinien verglichen werden. Anhand vorhandener Microarray-Daten sollte ein Vergleich der HOX-Genexpression in BE, EAC und ESCC zu NESC erfolgen, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Sind HOXB-Gene und ncRNAs des HOXB-Locus in ESCC-Zelllinien niedriger exprimiert als in EAC-Zelllinien?
2. Sind HOX-Gene in den zwei Entitäten des EC und der Präkanzerose des EAC, dem BE, aberrant exprimiert?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, Kits, Assays und andere Materialien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Natriumchlorid	(Merck)
Magnesiumchlorid	(Merck)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	(Merck)
Dinatriumhydrogenphosphat	(Merck)
Natriumcitrat	(Merck)
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	(Merck)
Kaliumhexacyanidoferrat (II)	(Merck)
Glycin	(Merck)
Tween ® 20	(Sigma)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	(Merck)
Formaldehyd 37%	(Merck)
Glutaraldehyd 25%	(Merck)
Ethanol	(Merck)
Methanol	(Merck)
2-Propanol	(Merck)
Salzsäure 25%	(Merck)
DMSO	(Sigma)
TritonX100	(Sigma)

2.1.2 Zellkultur, RNA-Extraktion, Reverse Transkription, PCR

Dulbecco Modified Eagle Medium	(gibco)
GlutaMAX™	(gibco)
Fetales Kälberserum (FCS)	(gibco)
Dulbecco Phosphate-buffered saline (PBS)	(Biochrom AG)
0,25% Trypsin+EDTA	(gibco)
Optimem™	(gibco)

Lipofectamine RNAiMAX	(Invitrogen)
DharmaFECT1	(Thermo Scientific)
X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent	(Roche)
Trizol/Qiazol	(Qiagen)
Direct-zol RNA MiniPrep	(Zymo Research)
RNase-Free DNase Set	(Qiagen)
Aqua ad injectabilia	(DeltaSelect)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	(Qiagen)
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	(Qiagen)
miScript Reverse Transcription Kit	(Qiagen)
miScript SYBR® Green PCR Kit	(Qiagen)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen)
HOT Star Taq DNA Polymerase Kit	(Qiagen)
Q-Solution™	(Qiagen)
GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus	(Fermentas)
6x DNA Ladepuffer	(ThermoScientific)
10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs)	(ThermoScientific)
50x TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	(Eppendorf)
Agarose	(Sigma)

2.1.3 Antibiotika

Ampicillin	(Invitrogen)
Kanamycin	(ThermoScientific)
Penicillin	(Sigma)
Streptomycin	(Sigma)
Zeocin	(InvivoGen)
Blasticidin	(PAA)

2.1.4 Bakterienkultur und Klonierung

LB-Medium:

25g Difco Luria Agar Base ad 1L dH₂O (Becton Dickinson)

LB-Agar:

30g Difco Luria Broth Base ad 1L dH₂O (Becton Dickinson)

Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

ZR Plasmid Miniprep-Classic (Zymo Research)

S.O.C. Medium (Invitrogen)

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) 126 mM (Merck)

5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol (X-Gal) 49 mM (Merck)

10x FastDigest Buffer (Fermentas)

10x Ligase Buffer (Fermentas)

Fast Digest BamH1 (Fermentas)

Fast Digest Xho1 (Fermentas)

T4 DNA Ligase (Fermentas)

XL2-Blue Ultracompetent Cells (Agilent Technologies)

One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen)

2.1.5 Plasmide

Plasmid 8552/B2 PET 28 (Addgene)

pCR4-TOPO (Invitrogen)

pcDNA4/TO (Invitrogen)

pcDNA4/TO/+*HOXB2* (siehe Klonierung)

pcDNA3/+ Δ Np63:

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Jean-Christophe Bourdon (Dundee).

Δ Np63 ist an der Schnittstelle BamH1 in den Vektor kloniert.

pEF-DEST51/+*HOXB13*:

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch RZPD German Resource Center for Genome Research (Heidelberg).

HOXB13 cDNA ist an den Rekombinationssequenzen attR1 und attR2 in den Vektor kloniert.

pEF-DEST51/+ Δ *HOXB13*:

Entspricht dem Vektor pEF-DEST51/+*HOXB13*, jedoch wurde in der *HOXB13*-exprimierenden Region, durch Schnitt mit den Restriktionsenzymen EheI und MssI und anschließender Religation, eine Leserastermutation eingefügt.

2.1.6 Protein-Extraktion, -Messung und Western Blot

RIPA Puffer: 150 mM NaCl, 1% Nonidet-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,6

6xLaemmli Puffer: 348 mM Tris-HCl, 10% SDS, 30% Glycerol, 216 mM DTT, 0,1% Bromphenolblau

Sammelgel: 30% PAA, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS pH 7,2, 10% APS, 1% TEMED

Trenngel: 30% PAA, 1 M Tris pH 6,8, 10% SDS pH 7,2, 10% Ammoniumpersulfat, 1% TEMED

Blotting Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol

Waschpuffer/TBST: 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% Tween

Stripping buffer: 1,5 % Glycin, 0,1 % SDS, 1 % Tween 20, pH 2,2

Protease Inhibitor Cocktail	(Sigma-Aldrich)
Pierce BCA Protein Assay Kit	(ThermoScientific)
BSA	(ThermoScientific)
PageRuler Prestained Protein Ladder	(Thermo)
Elektrophoresepuffer: 10x Tris,Glycin,SDS Buffer	(Bio-Rad)
Milchpulver	(Drogeriemarkt)
Immobilon-P Transfer Membran	(Millipore)
WesternBright Quantum HRP	(Advansta)
Amersham Hyperfilm ECL	(GE Healthcare)

2.1.7 Antikörper

HOXB13 (F-9) sc-28333 monoclonal IgG	(Santa Cruz Biotechnology)
HOXB2 polyclonal IgG C16300	(Assay bioTech)
Goat anti-mouse IgG-HRP	(Santa Cruz Biotechnology)
Goat anti-rabbit IgG-HRP	(Santa Cruz Biotechnology)
Rabbit anti- α -Tubulin	(Abcam)
Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG	(Invitrogen)
Rhodamine Phalloidin	(Cytoskeleton, Inc.,)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	(Roche)

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper mit Angabe von verwendetem Medium und Verdünnung.

	Verdünnung	Medium
Primäre Antikörper		
HOXB2	1:1.000	5 % Milch
HOXB13	1:200	5 % Milch
Phalloidin	1:1.000	1 % BSA
DAPI	1:1.000	PBS
α -Tubulin	1:50.000	5 % Milch
Sekundäre Antikörper		
Anti-rabbit	1:5.000 gegen HOXB2	5 % Milch
Anti-mouse	1:10.000 gegen HOXB13	5 % Milch
Anti-rabbit	1:50.000 gegen α -Tubulin	5 % Milch
Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG	1:500 gegen HOXB13	1 % BSA

2.2 Geräte

ABI Prism 7900HT	(Applied Biosystems)
T3 Thermocycler	(Biometra)
Trio-Thermoblock	(Biometra)
Thermomixer 5436	(Eppendorf)
Thermomixer comfort	(Eppendorf)

Innova 4200 Incubator Shaker	(New Brunswick Scientific)
Centrifuge 5415C	(Eppendorf)
Centrifuge 5415D	(Eppendorf)
Centrifuge 5810	(Eppendorf)
Allegra 25R Centrifuge	(Beckman Coulter)
Allegra 21R Centrifuge	(Beckman Coulter)
Avanti 30 Centrifuge	(Beckman Coulter)
Kelvitron t	(Heraeus)
HERAcell 150i CO ₂ Incubator	(Thermo Scientific)
BSB4A	(GELAIRE)
Luminometer: VICTOR ² 1420 Multilabel Counter	(WALLAC)
Power Pac 200	(BIO-RAD)
Power Pac Basic	(BIO-RAD)
Mini-PROTEAN Tetra System	(BIO-RAD)
Owl EasyCast	(ThermoScientific)
NanoDrop 2000	(ThermoScientific)
FLUOstar OPTIMA	(bMG)
Curix 60	(Agfa)
Vortexer	(Neolab)

2.3 Software und Datenbanken

Die Auswertung der durch den ABI Prism 7900HT ermittelten Daten erfolgte mit der Software SDS v2.4.

Für statistische Analysen und graphische Darstellungen wurden die Programme *IBM SPSS Statistics* und *Microsoft Excel* verwendet.

Es wurden Daten der Datenbank *Gene Expression Omnibus* (GEO) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verwendet.

Daten des Cancer Genome Atlas (TCGA) wurden mittels der Software *Morpheus* des Broad Institute (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) verarbeitet.

Potentielle Zielgene der microRNAs wurden über die Datenbanken „<http://genes.mit.edu/targetscan/>“ und „<http://c1.accurascience.com/miRecords/>“ ermittelt.

Als Literaturverwaltungsprogramm diente *Thomson Reuters EndNote X8*.

2.4 Zellkultur und Zelllinien

Die Kultivierung der Urothelkarzinomzelllinien erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 %. Die verwendeten Zelllinien sind in Tab. 2.2 und Tab. 2.3 aufgelistet. Die Zellen wuchsen in 25 cm² oder 75 cm² Kulturflaschen mit je 8 ml oder 12 ml Medium bestehend aus DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) + 10 % hitzeinaktiviertem FCS. Alle 2-4 Tage wurden die Zellen passagiert indem das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend bei 37°C abtrypsinisiert wurden. Die abgelösten Zellen wurden erneut mit Medium suspendiert und in geeigneter Menge zur Weiterkultivierung in neue Kulturflaschen oder zur Expressionsmodulation in 6-Well-Platten mit frischem Medium überführt. Die Zellzählung erfolgte mit Neubauer Zählkammern. Die Ernte expressionsmodulierter Zellen erfolgte 72 h nach Transfektion entsprechend den Beschreibungen zur Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten.

Tabelle 2.2: Verwendete UC-Zelllinien mit ergänzender Information zur Herkunft und klinischen Parametern.

Urothelkarzinomzelllinien				
Zelllinie	Tumorgrad/-stadium	Geschlecht	Weitere Information	Referenz
BFTC-905	UC, G3, papillär	W, 51 J.	Primärtumor, Blase	Tzeng et al., 1996
RT-4	UC, G1, T2	M, 63 J.	Rezidiv, behandelt, Blase	Rigby and Franks, 1970
RT-112	UC, G2, papillär	W	Primärtumor, unbehandelt, Blase	Masters, 2000
SW-1710	UC, G3, papillär	W, 84 J.	Blase	Kyriazis et al., 1984
J82	UC, wenig differenziert, papillär	M	Primärtumor, behandelt, Blase	O'Toole et al., 1978
253J	UC, G4, T4	M	Metastasierender Tumor, Lymphknoten	Elliott et al., 1974; Masters, 2000
5637	UC	M, 68 J.	Primärtumor, Blase	Williams, 1980
639-V	UC, G3	M, 69 J.	Primärtumor, Ureter	Elliot et al., 1976
HT-1376	UC, G3	W, 58 J.	Unbehandelt, Blase	Rasheed et al., 1977
T-24	UC, G3	W, 81 J.	Primärtumor, unbehandelt, Blase	Williams, 1980
UM-UC-3	UC	M	Blase	Grossmann et al., 1986
VM-CUB1	UC	M	Primärtumor, Blase	Williams, 1980
UM-UC-6	UC	M		

Tabelle 2.3: Verwendete EC-Zelllinien mit ergänzender Information zu klinischen Parametern.

Ösophaguskarzinomzelllinien			
Zelllinie	Tumorgrad/-stadium	Geschlecht	Weitere Informationen
PT1590	Adenokarzinom		Primärtumor
LN1590	Metastase		Lymphknotenmetastase
OE-19	Adenokarzinom	M, 72 J.	Primärtumor
OE-33	Adenokarzinom	W, 73 J.	Primärtumor
COLO-680N	Plattenepithelkarzinom	W, 57 J.	Von einer 57-jährigen Afroamerikanerin 1985 nach Passage durch ein Nacktmaus-Xenograft
KYSE-30	Plattenepithelkarzinom	M, 64 J.	Invasiv, gut differenziert
KYSE-270	Plattenepithelkarzinom	M, 79 J.	Invasiv, gut differenziert
KYSE-410	Plattenepithelkarzinom	M, 51 J.	Invasiv, wenig differenziert
KYSE-520	Plattenepithelkarzinom	W, 58 J.	Invasiv, mäßig differenziert

2.4.1 Urotheliale Primärkulturen

Die urothelialen Primärkulturen, welche als normale uroepitheliale Kontrolle (NU) dienen, wurden aus Harnleitern nephrektomierter Patienten der Urologischen Klinik gewonnen. Eine ausführliche Beschreibung der Kultivierungsprozedur gibt folgende Veröffentlichung (86). Die Verwendung erfolgte mit entsprechendem Ethikvotum mit der Studiennummer 1788.

2.4.2 Transfektion von small interfering RNA (siRNA)

Small interfering RNA (siRNA) sind kurze doppelsträngige Oligonukleotidsequenzen. Sie binden als Einzelstrang eine zur siRNA komplementäre RNA-Sequenz in einem *induced silencing complex* (RISC). Dieser blockiert die Translation und führt zum Abbau der Ziel-RNA.

Bei der Lipofektion kommt es nach Anlagerung des zu transfizierenden Agens an die Zellmembran zur Aufnahme in die Zelle durch Endozytose.

Zur Transfektion von siRNA wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach 24 h die siRNA mit dem Lipofektionsreagenz entsprechend dem unten aufgeführten Protokoll zugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Nach weiteren 48 Stunden

wurden die Zellen geerntet oder nach 24 Stunden für funktionelle Testungen entsprechend weiterverwendet.

Für jeden Knockdown der Zielgene *HOXB2*, *HOXB13* und *HOXB-AS5* wurde parallel eine entsprechende Behandlung der jeweiligen Zelllinie mit einer *non-targeting* siRNA durchgeführt, welche als Negativkontrolle verwendet wurde.

Eine Auflistung der verwendeten siRNA gibt Tabelle 2.4.

Tabelle 2.4: Verwendete siRNA zur künstlichen Verminderung der Zielgen-RNA und entsprechende Kontroll-siRNA.

siRNA			
Zielgen	Produkt	Negativ Kontrolle	Firma
<i>HOXB2</i>	ON-TARGET plus SMART pool Human HOXB2 (L-011695-00)	ON-TARGET plus Control siRNA D-001810-01-05	Thermo Scientific Dharmacon
<i>HOXB13</i>	ON-TARGET plus SMART pool Human HOXB13 (L-012226-00)	ON-TARGET plus Control siRNA D-001810-01-05	Thermo Scientific Dharmacon
<i>HOXB-AS5</i>	Lincode SMART pool Human HOXB13-AS1 (R-032890-00)	Lincode Non-targeting Pool D-001320-10-05	Thermo Scientific Dharmacon

Die Transfektion von siRNA erfolgte mit Lipofectamine RNAiMAX nach folgendem Lösungsansatz:

Lösung A Optimem 249 μ L
 siRNA (20 μ M) 1 μ L (10 nM Endkonzentration)

Lösung B Optimem 245 μ L
 Lipofectamine 5 μ L

Lösung A wurde zu Lösung B gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wurde danach tropfenweise auf die mit frischem Medium versehenen Zellen gegeben.

2.4.3 Transfektion von Expressionsvektoren

Expressionsvektoren dienen der Einschleusung von Fremd-DNA in eine Wirtszelle, um die Expression des entsprechenden Gens in der Zelle zu erhöhen. In diesem Fall wurden Plasmide zur Expressionsmodulation genutzt. Diese doppelsträngige, ringförmige DNA kommt physiologisch in Bakterien vor. Sie werden unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert. Eine Promotorregion, meist viralen Ursprungs, dient zur Initiation der Transkription durch eine RNA-Polymerase.

Die Vektoren wurden mittels Lipofektion in die Wirtszelle eingeschleust. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und nach 24 h entsprechend dem aufgeführten Protokoll mit X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent behandelt, um nach weiteren 72 h geerntet zu werden oder sie wurden nach 24 h für funktionelle Tests eingesetzt.

Parallel zur ektoptischen Expression von *ΔNp63*, *HOXB2* und *HOXB13* wurden Zellen jeweils als Kontrolle mit dem entsprechenden Kontrollvektor transfiziert. Bei *ΔNp63* und *HOXB2* entsprach dies dem Leervektor. Für *HOXB13* ist dieser 2.1.5 zu entnehmen.

Transfektion mit X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent:

Optimem	100 µL
X-tremeGENE	3 µL
Plasmid-DNA	1 µg

Die Transfektionslösung wurde tropfenweise auf die mit frischem Medium versehenen Zellen gegeben.

2.4.4 Selektionierung stabil überexprimierender Zellen

Zellen mit ektoptischer Überexpression von *HOXB13* wurden entsprechend ihres Resistenzgens mit Zelllinien-spezifischen Dosierungen von Blasticidin (5 µg/ml für HT-1376 und 20 µg/ml für UM-UC-3) behandelt.

Zellen mit ektoptischer Überexpression von *HOXB2* wurden entsprechend ihres Resistenzgens mit Zelllinien-spezifischen Dosierungen von Zeocin (250 µg/ml) behandelt. Die erfolgreiche Selektion und Überexpression wurde anschließend mittels Western Blot überprüft.

2.5 Gewebe von UC und benignem Urothel

Die RNA-Extrakte aus UC-Gewebe und normalem Blasengewebe (NU) waren im Labor vorhanden und entstammen Geweben der Gewebekbank der Urologischen Klinik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Diese Nutzung wurde durch ein Ethikvotum mit der Studiennummer 3836 gestattet, das vor Beginn der Arbeiten vorlag.

Eine Auflistung der verwendeten Gewebe gibt Tabelle 2.5.

Tabelle 2.5: Verwendetes Gewebe von NU und UC und wichtige klinische Parameter.

Blasennormalgewebe		Urothelkarzinomgewebe		
Gewebe	Geschlecht	Gewebe	Geschlecht	Tumorgrad-/stadium
BN274	M, 67J.	BT41	W, 46J.	G2, pTa, NX
BN273	M, 64J.	BT105	M, 73J.	G2, pTa, NX
BN276	M, 62J.	BT120	M, 57J.	G2, pT2, N0
BN357	W, 72J.	BT170	W, 55J.	G3, pT2, N0
BN363	M, 75J.	BBT67	W, 84J.	G3, pT2, NX
BN365	M, 65J.	BT12	M, 60J.	G3, pT3a, N0
BN369	M, 83J.	BT115	M, 65J.	G3, pT3a, N2
BN373	M, 86J.	BT168	M, 58J.	G3, pT3a, N2
BN374	M, 63J.	BT172	M, 65J.	G3, pT3a, N0
		BT3	M, 66J.	G2, pT3b, N0
		BT61	M, 69J.	G3, pT3b, N0
		BT69	M, 68J.	G3, pT3b, N0
		BT28	M, 61J.	G3, pT3b, N0
		BT62	W, 70J.	G2, pT3b, N0
		BT111	M, 63J.	G2/3, pT3b, N0
		BT6	M, 68J.	G3, pT3b, N2
		BT322	M, 71J.	G3, pT4a, N0
		BT364	M, 75J.	G3, pT4a, N1
		BT55	M, 74J.	G3, pT4a, N1

2.6 Klonierung der Expressionsvektoren

Die Expressionsvektoren für *ANp63* und *HOXB13* waren bereits im Labor vorhanden.

Das Design für den *HOXB2*-Expressionsvektor wurde eigens erstellt. Hierzu wurden Primer zur Amplifikation der kodierenden Sequenz des *HOXB2*-Gens entworfen. Zusätzlich wurden eine *BamHI* und eine *XhoI* Erkennungssequenz in die Primersequenz integriert, um anschließend gerichtet klonieren zu können.

Als Template für die *HOXB2*-Amplifikation diente das mit Qiagen Plasmid Maxi Kit aufgereinigte Plasmid 8552 von addgene.

Das PCR-Produkt wurde nach Protokoll mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in den pCR4-TOPO Vektor ligiert.

Ligationsansatz:

H ₂ O	2 µL
HOXB2 PCR-Produkt	2 µL
Vektor pCR4-TOPO	1 µL
Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1 µL

Der Ligationsansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation der chemisch kompetenten One Shot TOP10 E. coli Bakterien erfolgte nach Herstellerangaben. Zum Einsatz kamen 2 µL Ligationprodukt.

Es wurden 100 µL der transformierten Zellen auf eine Ampicillin LB Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Klone in 4 mL LB-Medium + 4 µL Ampicillin (100 mg/ml) überführt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep-Classic Kits extrahiert und für einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XhoI* eingesetzt. Positive Klone wurden später in einem größeren Ansatz LB-Medium + Ampicillin bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi-Kit aus den Bakterienkulturen extrahiert.

Für die spätere Umklonierung wurde das *HOXB2*-Insert mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XhoI* ausgeschnitten, auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction-Kits extrahiert. Analog wurde der Zielvektor pcDNA4/TO mit denselben Enzymen geöffnet. Die Ligation mit T4 DNA Ligase erfolgte mit 50 ng des extrahierten Inserts und 50 ng des geschnittenen Vektors 1 h bei Raumtemperatur.

Zur Transformation der XL2-Blue Ultracompetent Cells wurden 25 µL der kompetenten Zellen mit 0,5 µL β-Mercaptoethanol und 25 ng DNA vermischt und die Transformation nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurden 100 µL der transformierten Zellen auf eine Ampicillin LB Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Verifizierung von Bakterienklonen sowie die Anzucht und DNA-Präparation erfolgte wie bereits oben beschrieben. Final wurde das generierte Expressionskonstrukt *HOXB2/pcDNA4/TO* mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

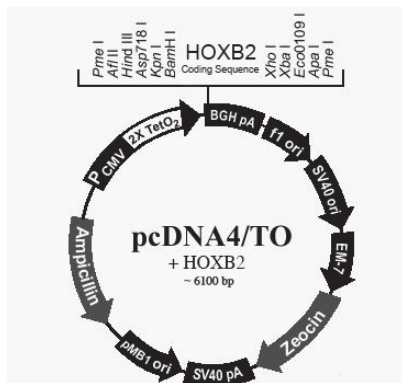


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des klonierten Expressionsvektors für *HOXB2*.

2.7 Immunzytochemische Färbung

Die Fixierung der T-24 HOXB13 Knockdown- und Kontrollzellen erfolgte 72 Stunden nach Transfektion. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde 10 Minuten mit 4 %-igem Formaldehyd fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Es folgte eine dreiminütige Inkubation mit 0,5 % TritonX-100 in PBS. Anschließend wurde dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit 1 %-igem BSA in PBS blockiert. Daraufhin wurde eine Stunde der HOXB13-Antikörper (1:50 Verdünnung) ebenfalls in 1 % BSA in PBS inkubiert. Es folgte die erneute Waschung dreimal fünf Minuten mit PBS und die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 anti-mouse (1 mg/ml; 1:500) und TRITC-Phalloidin (14 μ M; 1:1000) zur Gegenfärbung in 1 % BSA in PBS. Erneut wurde dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellkerne fünf Minuten mit DAPI (5mg/ml, 1:1000) in PBS gefärbt. Zuletzt wurde zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und die Deckgläschen wurden mit Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Die Lagerung erfolgte abgedunkelt bei 4°C.

Jeweils bei einem Kontroll- und einem HOXB13 Knockdown-Ansatz wurde auf die Zugabe des Primärantikörpers verzichtet, um das Ausmaß der Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindung des Zweitantikörpers bestimmen zu können.

2.8 RNA, DNA und Proteine

2.8.1 RNA-Extraktion und cDNA-Präparation

Zur Expressionsbestimmung mittels quantitative reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde RNA aus den Urothelkarzinomzelllinien isoliert.

Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Qiazol fünf Minuten lang lysiert. Die RNA-Purifikation erfolgte danach mit dem Direct-zol RNA MiniPrep-Kit. Dieses Kit ermöglicht es auch die kurzen, nicht für Proteine kodierenden, microRNAs aus dem Zelllysat zu extrahieren. Als zusätzlicher Schritt wurde der optionale DNase-Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit in cDNA umgeschrieben. Zum Einsatz kamen 1 µg RNA und es wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 42°C gewählt.

Zur reversen Transkription (RT) der RNA-Extrakte, in denen die Expression von microRNAs gemessen werden sollte, wurde gemäß der Anleitung des miScript Reverse Transcription- Kits vorgegangen. Bei dieser Art der RT erhält man ebenfalls eine zur Ursprungs-RNA komplementäre dsDNA, diese ist jedoch am 3' Ende um eine Poly-A-Sequenz und eine dem miScript Universal Primer komplementäre Basenabfolge verlängert.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von RNA und DNA wurde photometrisch am NanoDrop 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.8.3 Quantitative *Real Time* reverse Transkription Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR am ABI Prism 7900HT. Hierfür wurde das QuantiTect SYBR Green PCR-Kit verwendet. Eingesetzt wurden 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA und Primer in einer Endkonzentration von 0,2 µM. Zur Detektion der microRNA-Expression wurden 1 µl der 1:20 verdünnten cDNA und miScript Primer in einfacher Konzentration verwendet.

Die qRT-PCR ermöglicht eine Quantifizierung der zur Amplifikation eingesetzten DNA-Menge und beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch Erhitzung auf 95°C kommt es zur Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge. Bei Erreichen der optimalen Anlagerungstemperatur kommt es zur Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende cDNA. Eine im SYBR Green-Mix enthaltene hitzestabile DNA-Polymerase führt, bei einem Temperaturoptimum von 72°C, zur Elongation der entsprechenden cDNA. Ein Zyklus besteht also aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Elongation der DNA-Sequenz. Um auch geringe Mengen cDNA ausreichend zu amplifizieren werden mehrere Zyklen durchlaufen.

Das SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und seine verstärkte Fluoreszenzemission, nach Anregung mit einer Wellenlänge von 494 nm, ist bei einer Wellenlänge von 521 nm messbar. Die wiederholte Amplifikation der cDNA führt zur Fluoreszenzzunahme, welche nach jedem Zyklus gemessen wird. Sobald die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs die Hintergrundstrahlung übertrifft, wird der entsprechende Zyklus mit dem Ct-Wert angegeben. Aus einer Standardreihe, die in jedem Versuch mitgeführt wird, lässt sich für jeden Ct-Wert die eingesetzte relative DNA-Menge ermitteln. Eine relative Quantifizierung erfolgt weiter durch Vergleich mit einem Referenzgen welches ebenfalls mittels qRT-PCR in den Proben gemessen wird. Für das Referenzgen wird in allen Zellen und somit in allen Proben eine gleichmäßige Expression angenommen, daher kann es zur Normierung durch Division genutzt werden. Als Referenzgen für die Quantifizierung normaler mRNAs und langer nicht-kodierender RNAs (lncRNAs) diente das Haushaltsgen *TATA-box binding protein (TBP)*. Zur Quantifizierung von microRNAs wurde *RNU6B-2* als Referenzgen genutzt.

Zur internen Kontrolle der Pipettiergenauigkeit wurden pro Probe zwei Wells angesetzt und somit Doppelwerte ermittelt. Bei Abweichungen der Ct-Werte von über 0,5 wurde die Messung wiederholt. Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, um zu kontrollieren ob tatsächlich nur ein einziges, spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde. Zusätzlich wurden PCR-Produkte aufgereinigt und mittels Sanger-Sequenzierung die spezifische Amplifikation des gewünschten Genabschnitts bestätigt.

Eine Auflistung der verwendeten Primersequenzen für die jeweiligen Zielgene und ermittelte Anlagerungstemperaturen ergibt Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: Verwendete Primersequenzen und Anlagerungstemperaturen.

PCR-Primer			
Zielgen	5'Primer	3'Primer	Anlagerung
<i>TBP</i>	ACA ACA GCC TGC CAC CTT A	GAA TAG GCT GTG GGG TCA GT	55 °C
<i>HOXB1</i>	GGA CCT TCG ACT GGA TGA AG	TTC CAG TTC TGT CAG CTG CC	Konnte nicht etabliert werden
<i>HOXB2</i>	CGA GTT CCC TTG GAT GAA AGA G	CGG CAG TCC CAG GCC AT	59 °C
<i>HOXB3</i>	CAC CAA CTC CAC CCT CAC C	GCC ACC ACA GCC CTC TG	59°C
<i>HOXB4</i>	TGG ATG CGC AAA GTT CAC GTG	GTG TCA GGT AGC GGT TGT AG	55°C
<i>HOXB5</i>	CCT GGA TGA GGA AGC TTC ACA TC	GGT CAG GTA GCG GTT GAA GTG	57°C
<i>HOXB6</i>	GAC TGC GCG CAG GAC AAG	GTA ACG TGT GTA TGT CTG GCG	59°C
<i>HOXB7</i>	GCC GAG AGT AAC TTC CGG ATC	GCG TCA GGT AGC GAT TGT AGT G	61°C
<i>HOXB8</i>	CCT ACC AGC AGA ACC CGT G	GCT TGC AGT CTG CGT ACT GC	56°C
<i>HOXB9</i>	CCA ACT GGC TGC ACG CTC	CGG TCC CTG GTG AGG TAC	55°C
<i>HOXB13</i>	CAGCCA GAT GTG TTG CCA GG	CAA CTG CCC CTT GCT GTA CG	61°C
<i>HOXB-AS1</i>	GAT GAG TGA GGA TCT CCG C	GGT TTC TTC CAC GAA ACC TAA ACT	55°C
<i>HOXB-AS2</i>	CAT CTG GAT GCA CCA GAA GAG	CTG GCT TAT TGG AGA GCT GG	Konnte nicht etabliert werden
<i>HOXB-AS3</i>	GTT GCT TGT CTG GAG ATG GAG	CTG GGC TTA GAT AAG AGC GAT G	55°C
<i>HOXB-AS4</i>	GGC CAG ACC TTT GCC CAG	CCT TCA GGC CTT GGG AGT C	56°C
<i>HOXB-AS5</i>	GAA CCT CCT TGC CTT CTT CC	GTG GGT ACT GAG CTG CGT G	55°C
<i>HOXB2 zur Klonierung</i>	CCC GGA TCC ATG AAT TTT GAA TTT GAG AGG GAG	GGG CTC GAG TTA GGG AAA CTG CAG GTC	59°C
<i>GATA4</i>	ACC TGA ATA AAT CTA AGA CAC CAG C	TTG ATG GGA CGC ATC TCC TC	57°C
<i>GATA6</i>	CAG CAA GAT GAA CGG CCC AG	TGC ACA CGG GTT CAC CCT C	59°C
<i>ΔNp63</i>	TAC CTG GAA AAC AAT GCC CAG ACT	AGC CGT TCT GAA TCT GCT GGT C	57°C
<i>TP63</i>	AAA CCC CAG CTC ATT TCT CTT	CGC CAT GCC TGT CTA CAA AA	52°C
<i>RNU6B-2</i>	MiScript Primer Assay Hs_RNU6B_2	miScript Universal Primer Mat. No. 1046471	55°C

<i>MIR196A</i>	miScript Primer Assay Hs_miR-196a_2 Cat. No. MS00031563	miScript Universal Primer Mat. No. 1046471	55°C
<i>MIR10A</i>	miScript Primer Assay Hs_miR-10a_2 Cat. No. MS00031262	miScript Universal Primer Mat. No. 1046471	55°C

2.8.4 Qualitative PCR

Die qualitative Bestimmung der Genexpression der revers transkribierten RNA durch PCR erfolgte mit der HOTstar Taq DNA Polymerase von Qiagen im Thermocycler von Biometra. Amplifiziert wurde 1 µl der 1/10 verdünnten cDNA in einem Ansatz mit 15 µM dNTPs und 0,2 µM Primern. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde in einem Ethidiumbromidbad inkubiert und die amplifizierte cDNA unter UV-Licht detektiert. Als Größenkontrolle diente GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus.

2.8.5 Herstellung von Proteinlysaten und Proteinbestimmung

Zum Nachweis der Proteinexpression von HOXB2 und HOXB13 mittels Western Blot Analyse wurden Proteinextrakte hergestellt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit RIPA-Puffer und Protease Inhibitor Cocktail im Verhältnis 1:1000 inkubiert. Der Zellrasen wurde anschließend abgeschabt und fünf Minuten bei 4°C und 13.000 Umdrehungen/Minute (UpM) zentrifugiert um den Zelldetritus von dem Proteinlysat zu trennen. Die Lagerung des Überstands als fertiges Proteinlysat erfolgte bei 80°C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Pierce BCA Protein Assay-Kit nach Herstellerangaben. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

2.8.6 Western Blot

Zur vergleichenden Proteinanalyse diente die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ein anschließender Immunblot auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zur Detektion. Das SDS-Gel wurde je nach Größe des zu detektierenden Proteins auf 10 % oder 12 % angesetzt.

Aufgetragen wurden 20 µg Protein, welches versetzt mit 1-fachem Lämmli-Puffer zuvor fünf Minuten bei 95 °C erhitzt wurde. Dies dient der Denaturierung der Proteine und damit

der Auflösung von Proteinstrukturen, so dass diese im Gel nach Größe aufgetrennt werden. Als Größenkontrolle wurde immer ein Standard von 7 μ l Prestained Protein Ladder in eine der Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für die ersten 15 Minuten bei 100 Volt und später bei 200 Volt auf Eis.

Zum Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf die Detektionsmembran wurde diese 30 Sekunden in Methanol aktiviert und 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Der Transfer erfolgte über 75 Minuten in einer Nassblot-Kammer bei 70 V in eisgekühltem Blotting-Puffer.

Die Membran wurde im Anschluss eine Stunde lang in 5 %-iger Lösung aus Magermilchpulver in TBST blockiert.

Die Inkubation eines geeigneten Primär-Antikörpers gegen das zu detektierende Protein erfolgte in TBST Waschpuffer mit 5 % Milch über Nacht bei 4°C. Die Zugabe des passenden Sekundär-AK erfolgte nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten ebenfalls mit Waschpuffer für eine Stunde. Der HOXB13-AK wurde im Verhältnis 1:200 und der passende anti-mouse-AK im Verhältnis 1:10.000 inkubiert. Der HOXB2-AK wurde im Verhältnis 1:1.000 und der passende anti-rabbit-AK 1:5.000 verwendet. Der α -Tubulin-AK und der anti-rabbit Zweitantikörper wurden jeweils 1:50.000 für eine Stunde inkubiert.

Um auf einer Membran ein weiteres Protein detektieren zu können wurde diese vor der Inkubation eines weiteren Primär-AK mittels *stripping buffer* von den zuvor aufgetragenen Primär- und Sekundär-AK gereinigt und erneut geblockt. Das *Stripping* erfolgte zweimal 8 Minuten mit mildem *stripping buffer* und dreimaligem 10-minütigem Waschen in Waschpuffer.

Die Detektion erfolgte mit WesternBright Quantum HRP Substrat. Zum Einsatz kamen jeweils 300 μ l und die Membran wurde luftblasenfrei in lichtgeschützte Mappen überführt und mit durchsichtiger Folie bedeckt. In der Dunkelkammer erfolgte die Belichtung der Filme und die anschließende Entwicklung.

Die Belichtungszeit variierte von 10 Sekunden im Falle von α -Tubulin zu 2 bis 10 Minuten bei HOXB2 und HOXB13.

2.9 Funktionelle Untersuchung von Zellen

2.9.1 MTT-Test zur Untersuchung der Viabilität

Der MTT-Test ist ein Test zur Bestimmung der Zellviabilität und gibt damit indirekt Aufschluss über die Proliferationsaktivität von Zellen. Lebende Zellen verstoffwechseln das auf die Zellen gegebene MTT-Reagenz und reduzieren den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein bläulich-violettes Formazan. Anschließend werden die Zellen lysiert und die Absorption bei 550 nm gemessen. Eine Zunahme der optischen Dichte entspricht somit einer größeren Anzahl vitaler Zellen. Zur Testung der Proliferationsaktivität wurden die Zellen pro Ansatz in vier Wells einer 96-Well-Platte ad 100 µl Medium ausgesät. Für die Zelllinien 639-V, BFTC-905, UM-UC-3 und T-24 erfolgte dies mit jeweils 1500 Zellen. Die Zelllinie HT-1367 wurde mit 2500 Zellen pro Well ausgesät. Als Leerkontrolle wurden ebenfalls vier Wells mit 100 µl Medium ohne Zellen befüllt. Pro Messtag wurde eine Platte in dieser Weise befüllt.

Für die MTT-Messung wurden 10 µl MTT-Reagenz pro Well hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Danach wurde das Medium-MTT-Gemisch verworfen und die Zellen mittels Zugabe von 50 µl DMSO lysiert und eine halbe Minute auf einem Schüttler bei 10 UpM gemischt. Auch der Leerkontrolle wurden MTT und DMSO zugesetzt.

Die Absorptionsmessung erfolgte bei 550 nm am FLUOstar Taq OPTIMA von BMG. Eine weitere Messung bei 750 nm diente der Erfassung der Hintergrundstrahlung und wurde vom zuvor ermittelten Wert subtrahiert. Aus den vier Ansätzen pro Zellansatz wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Die Werte aller Messtage wurden durch den Wert des ersten Messtages dividiert, um auf die zu Beginn vitalen Zellen zu normieren.

2.9.2 Ibidi-Wundheilungstest für das Migrationsverhalten

Im klassischen Wundheilungstest wird ein konfluent gewachsener Zellrasen mit einem sauberen Kratzer versehen und beobachtet, wie schnell dieser wieder bedeckt wird. Es wird also die Migration der Zellen auf die frei gewordene Fläche gemessen.

Zur Migrationstestung wurden Ibidi Silikon Einsätze verwendet, welche in 24-Well-Platten platziert wurden. Nach dem Abheben der Einsätze entsteht eine Lücke zwischen den Zellfronten, welche gleichmäßig und somit besonders gut vergleichbar unter den einzelnen

Testansätzen ist. Die Einsatzhälften wurden jeweils mit 30.000 Zellen befüllt. Zur Messung an definierten Stellen wurden Markierungen auf dem Deckel gesetzt, welche der objektiven Auffindung der Messstellen dienen. Es wurden Vierfachwerte mit einer Messstelle pro Ansatz erhoben. Hieraus wurde später der Mittelwert zum entsprechenden Messzeitpunkt ermittelt. Die Lückengröße zum Zeitpunkt Null, direkt nach dem Abheben der Ibidi Einsätze, wurde mit 100% definiert.

2.9.3 Untersuchung der Klonogenität

Werden Zellen stark verdünnt ausgesät, können nur Zellen mit der entsprechenden Kapazität Kolonien bilden. Diese Fähigkeit besitzen Stammzellen und viele maligne transformierte Zellen. Für die Analyse wurden Zellen mit künstlich verminderter bzw. erhöhter Expression mit Kontrollzellen verglichen. Es wurden 500-1000 Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und in gewohntem Medium weiterkultiviert. Nach 10 bis 28 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa gefärbt. Untereinander zu vergleichende Ansätze wurden immer zum selben Zeitpunkt fixiert und gefärbt.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS, dann mit Methanol 50% in PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten mit Methanol fixiert. Es folgte eine zweiminütige Inkubation mit Giemsa-Lösung und daraufhin ebenfalls zweiminütige Applikation von destilliertem Wasser. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Platten 30 Minuten in destilliertem Wasser stehen gelassen und daraufhin getrocknet.

2.9.4 Seneszenzfärbung

Seneszente Zellen weisen eine hohe lysosomale Aktivität auf und haben daher eine höhere Aktivität der in den Lysosomen vorkommenden sauren β -Galaktosidase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von β -Galaktosylpyranosiden. Bei der Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose entsteht ein blauer, wasserunlöslicher Indigo-Farbstoff, welcher somit seneszente Zellen erkennbar macht.

Zur Anwendung kam diese Färbung bei HOXB13 Knockdown- und Kontrollzellen. Die transfizierten Zellen wurden 24 h nach Transfektion zu 80.000 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach weiteren 48 h gefärbt. Es erfolgten zwei Waschungen mit PBS und die Fixation mit 2 % Formalin und 0,2 % Glutaraldehyd in PBS mit anschließender erneuter Waschung (zweimalig mit PBS). Daraufhin wurde 21 h mit X-Gal Färbelösung in unten

genannter Zusammensetzung bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis der Seneszenzfärbung wurde anschließend dokumentiert.

X-Gal Färbelösung:	Natriumchlorid	150 mM
	Magnesiumchlorid	2 mM
	Kaliumhexacyanidoferrat (III)	5 mM
	Kaliumhexacyanidoferrat (II)	5 mM
	X-Gal	1 mg/ml
ad	Citrat-/Phosphatpuffer (pH 6)	50 ml

3 Ergebnisse

3.1 Expression von HOXB-Genen und lncRNAs des HOXB-Locus in UC-Zelllinien und NU-Zelllinien

Um einen Eindruck von der Expressionsaktivität der HOXB-Gene in normalem und maligne entartetem Urothel zu gewinnen, wurde ihre mRNA-Expression in 13 Urothelkarzinom-Zelllinien (UC-Zelllinien) und zwei normalen uroepithelialen Zelllinien (NU-Zelllinien) mittels qRT-PCR bestimmt. Ebenso wurde die Expression der nicht-kodierenden Transkripte HOXB-AS1, HOXB-AS2, HOXB-AS3 und HOXB-AS5 ermittelt.

Das Expressionsniveau von *HOXB1*, HOXB-AS1 und HOXB-AS2 war im Allgemeinen sehr niedrig und die Transkripte konnten nicht oder nur in einzelnen Zelllinien detektiert werden. Daher erfolgte für HOXB-AS1 ein qualitativer Expressionsvergleich des Probensets (Abb. 3.1). Keine bis sehr niedrige Expression zeigten die Zelllinien BFTC-905, RT-112, J82, 5637 und HT-1376. Für *HOXB1* und HOXB-AS2 wurden keine weiteren Messungen durchgeführt.

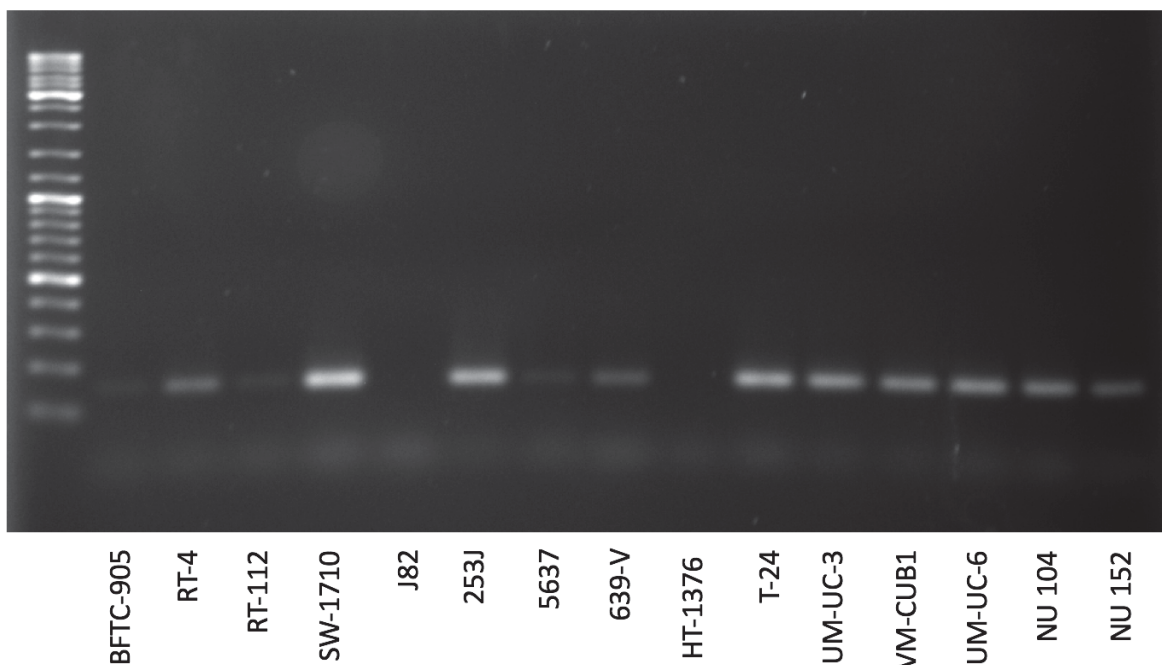


Abb. 3.1: Expression von HOXB-AS1 in UC-Zelllinien und Kontrollen. HOXB-AS1 cDNA wurde mittels qualitativer PCR amplifiziert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Vergleich dienten uroepitheliale Primärkulturen (NU).

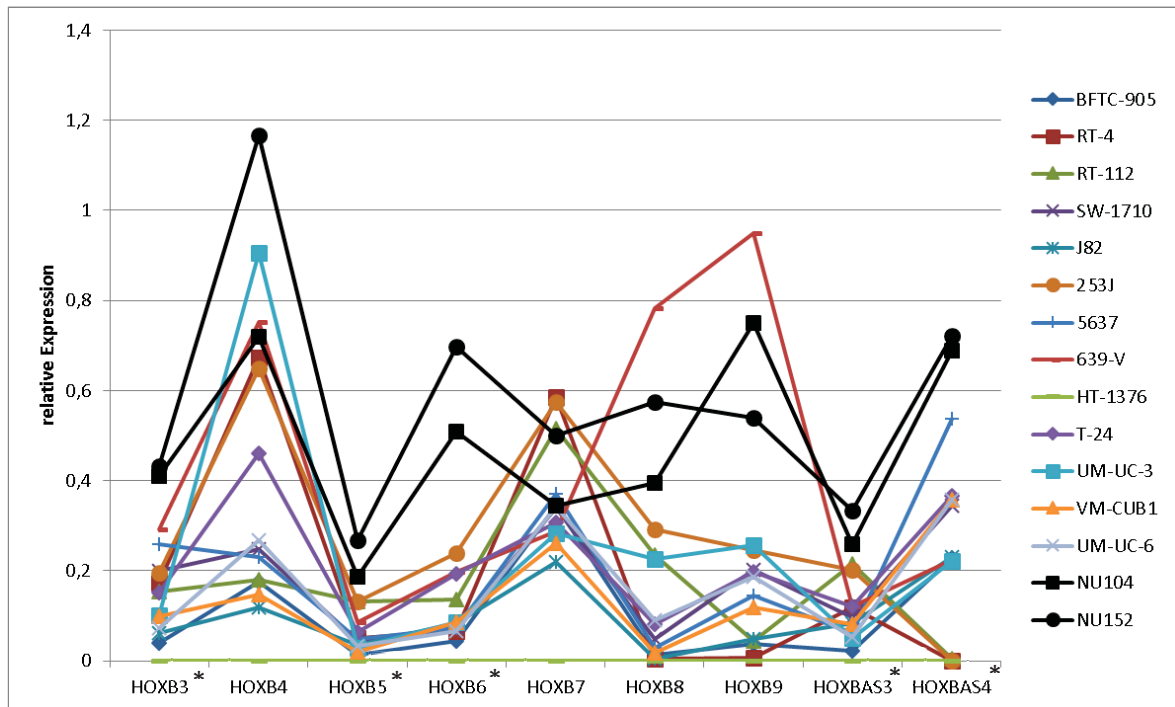


Abb. 3.2: RNA-Expression ausgewählter HOXB-Gene und HOXB-lncRNAs relativ zu TBP. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Das Expressionsniveau von UC-Zelllinien ist farblich dargestellt, NU-Zelllinien sind schwarz markiert. Mit einem* gekennzeichnete Gene unterscheiden sich signifikant in ihrer Expression in NU und UC. Testung nach Mann-Whitney U, $p < 0,05$.

Die Expression von *HOXB3*, *HOXB4*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB7*, *HOXB8*, *HOXB9*, *HOXB-AS3* und *HOXB-AS4* konnte dagegen mit qRT-PCR sicher erfasst werden; sie ist in Abb. 3.2 dargestellt. Alle diese Gene waren mit wenigen Ausnahmen in UC-Zelllinien niedriger exprimiert als in den uroepithelialen Kontrollen. Für die Gene *HOXB3*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB-AS3* und *HOXB-AS4* konnte über alle UC-Zelllinien hinweg eine statistisch signifikant verminderte Expression im Vergleich zu den Normalkontrollen berechnet werden. Auffällig war, dass HT-1376 als einzige Zelllinie keines der gemessenen Transkripte exprimierte.

Vereinzelt wiesen Zelllinien eine hohe Expression einzelner Gene auf. In der Zelllinie 639-V waren *HOXB4*, *HOXB7*, *HOXB8* und *HOXB9* deutlich stärker exprimiert als in den Normalkontrollen; weitere Beispiele sind UM-UC-3 mit hohem Niveau an *HOXB4* und RT-4, RT-112 und 253J mit deutlicher Expression von *HOXB7*.

Drei der gemessenen Transkripte, *HOXB2*, *HOXB13* und *HOXB-AS5*, zeigten umgekehrt eine niedrige Expression in NU-Zellen und eine erhöhte Expression in einigen UC-Zelllinien; die Ergebnisse für diese Gene sind gesondert grafisch dargestellt (Abb. 3.3 und Abb. 3.5).

HOXB2 war in den Urothelkarzinomzelllinien uneinheitlich exprimiert. In etwa der Hälfte der gemessenen UC-Zelllinien war die Expression im Vergleich zu der in den Kontrollzelllinien deutlich erniedrigt. Die übrigen UC-Zelllinien exprimierten *HOXB2* auf einem mit den normalen Kontrollen vergleichbaren Niveau oder sogar bis zu zweifach erhöht. Hierzu gehörten die Zelllinien SW-1710, 253-J, 639-V, T-24, UM-UC-3.

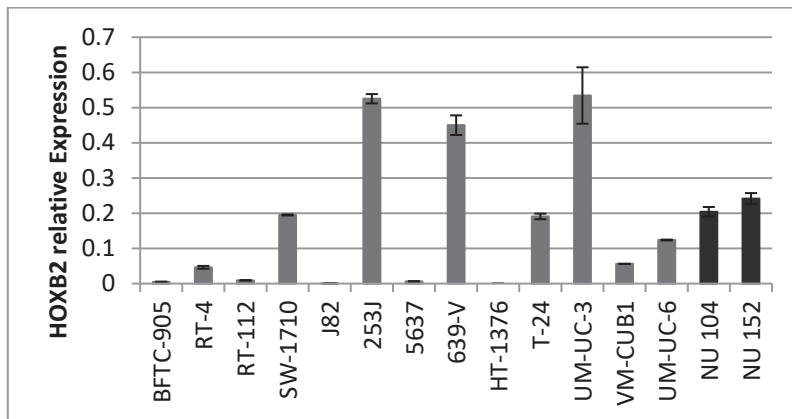


Abb. 3.3: RNA-Expression von *HOXB2* in UC- und NU-Zelllinien relativ zu TBP. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert.

Um zu untersuchen, ob ein erhöhtes Transkriptionsniveau von *HOXB2* auch zu einer verstärkten *HOXB2*-Proteinexpression führt, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.4).

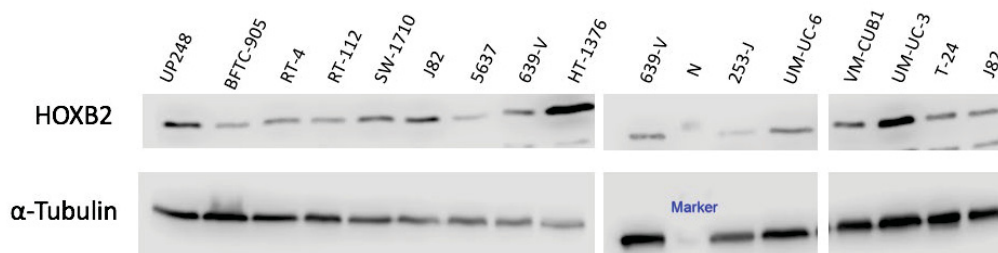


Abb. 3.4: *HOXB2* Protein in UC-Zelllinien und einer uroepithelialen Kontrolle. Aufgetragen wurden 20 µg Protein pro Zelllinie. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von α -Tubulin. Die NU Kontrolle ist UP248. N ist die Spur mit dem Proteingrößenmarker.

Viel deutlicher war die Überexpression von *HOXB13* und der lncRNA *HOXB-AS5*. *HOXB13* war in zahlreichen UC-Zelllinien im Vergleich zu den Normalkontrollen 25- bis 250-fach höher exprimiert, in der UC-Zelllinie 639-V sogar 700-fach höher (Abb. 3.5).

Die Expressionsdaten von *HOXB-AS5* ergaben eine ähnliche, jedoch weniger drastische Tendenz. Hier war die Expression in HT-1376, UM-UC-3 und SW-1710 kaum bis gar nicht

detektierbar und im Konzentrationsbereich der Kontrollen anzusiedeln, wohin gegen die weiteren Zelllinien 3- bis 100-fache erhöhte Expression aufwiesen (Abb. 3.5).

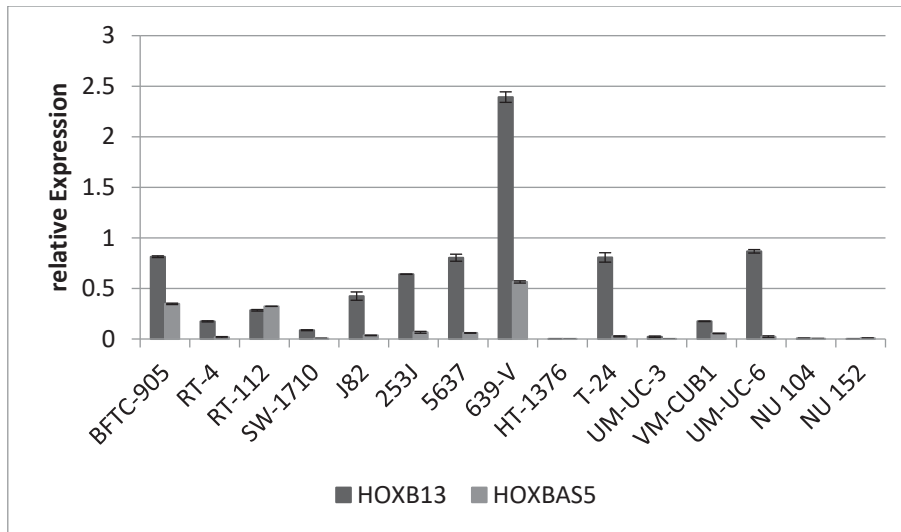


Abb. 3.5 RNA-Expression von *HOXB13* und *HOXB-AS5* in UC-Zelllinien und NU-Kulturen relativ zu TBP. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert.

Zur Validierung der erhobenen PCR-Daten erfolgte auch hier die Detektion von HOXB13 auf Proteinebene. Analog zu den Expressionsdaten aus den RNA-Messungen war HOXB13 Protein deutlich in BFTC-905, 639-V und T-24 und in geringem Maße in UM-UC-6 zu detektieren (Abb. 3.6).

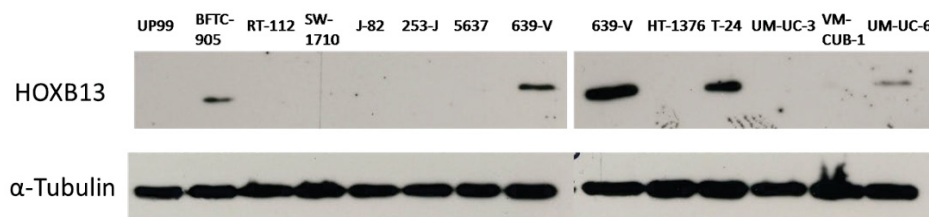


Abb. 3.6: HOXB13 Protein in UC-Zelllinien und einer uroepithelialen Kontrolle. Aufgetragen wurden 20 µg Protein pro Zelllinie. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von α-Tubulin. Die NU-Zellkultur war UP99.

3.2 Korrelationen zwischen HOXB-Genen und benachbarten lncRNAs

Da lncRNAs sich auf die Transkription benachbarter Gene auswirken können, wurden die Pearson Korrelationskoeffizienten für die Expression von HOXB- und HOXB-AS-Genen berechnet. Für mehrere HOXB-Gene ergaben sich starke positive Korrelationen zu nahe

gelegenen lncRNAs, darunter auch *HOXB13* (Tab. 3.1). Die Lagebeziehungen der HOXB-Gene zu lncRNAs des HOXB-Locus sind Abb. 1.3 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Pearson Korrelationskoeffizient für HOXB-Gene und lncRNAs des HOXB-Locus. Fett gedruckte Werte sind signifikant, $p < 0,05$.

<i>Pearson</i>	HOXB-AS3	HOXB-AS4	HOXB-AS5
<i>HOXB2</i>	0,27	0,01	0,1
<i>HOXB3</i>	0,81	0,7	0
<i>HOXB4</i>	0,63	0,36	-0,06
<i>HOXB5</i>	0,98	0,5	-0,03
<i>HOXB6</i>	0,9	0,68	-0,13
<i>HOXB7</i>	0,63	-0,03	0,06
<i>HOXB8</i>	0,63	0,3	0,47
<i>HOXB9</i>	0,51	0,5	0,34
<i>HOXB13</i>	-0,14	-0,1	0,8

Hier ergab sich für *HOXB13* und HOXB-AS5 nach Pearson eine signifikante positive Korrelation von $r = 0,8$, $p < 0,01$. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass wie für andere lncRNAs bekannt, entweder die lncRNA HOXB-AS5 an der Expressionsregulation von *HOXB13* beteiligt ist oder aber beide Gene durch einen übergeordneten Mechanismus gleichsinnig reguliert werden. Daher wurde dieser Zusammenhang im Weiteren durch siRNA-vermittelte Knockdown-Versuche von HOXB13 und HOXB-AS5 in den Zelllinien 639-V und BFTC-905 untersucht (Abb. 3.7). Zur Evaluation von unspezifischen Effekten durch die siRNA-Transfektion als solche wurden parallel Kontrollen mitgeführt, die mit einer nicht-spezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

Nach Knockdown von HOXB-AS5 blieb die Expression von *HOXB13* in beiden getesteten Zelllinien unverändert. Nach Knockdown von HOXB13 ließ sich kein einheitlicher Effekt in der Expression von HOXB-AS5 darstellen. Je nach Zelllinie kam es zu einer statistisch signifikanten Verdreifachung bzw. Halbierung der HOXB-AS5-Expression.

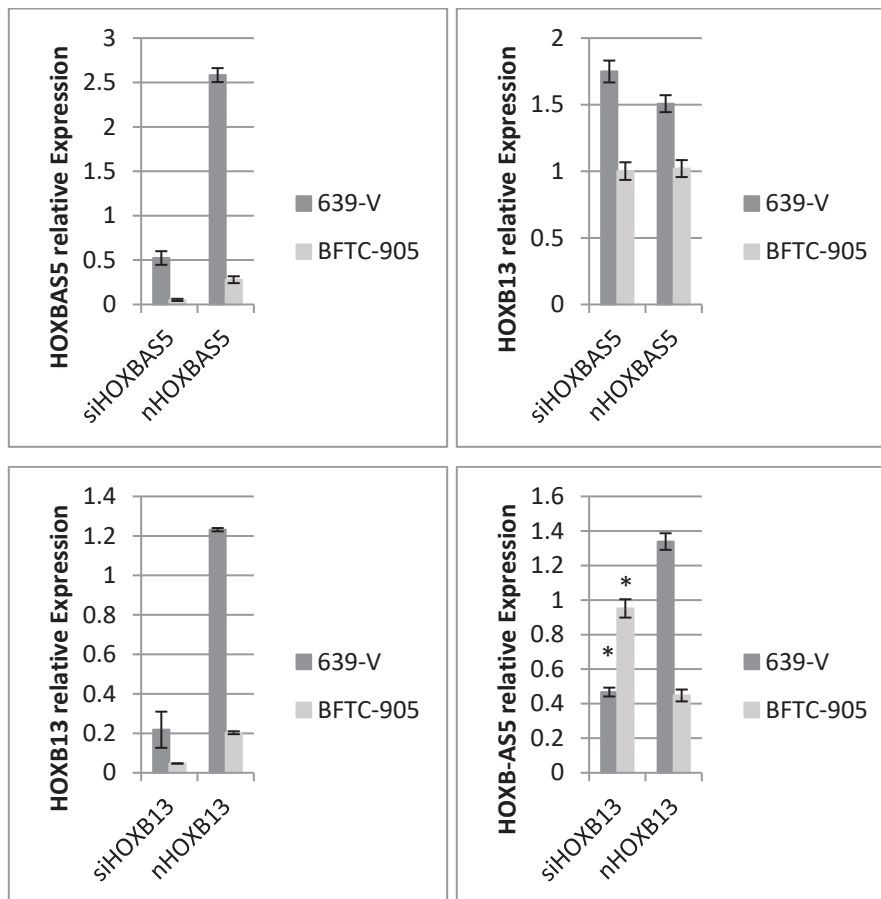


Abb. 3.7: RNA-Expression von *HOXB13* und *HOXB-AS5* relativ zu *TBP* in UC-Zelllinien 639-V und BFTC-905 nach künstlicher Herabregulation eines der Gene mittels siRNA-Knockdown. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Negativ-Kontrollen sind mit nHOX, Zellen mit der spezifischen siRNA sind mit siHOX benannt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

3.3 Korrelationen zwischen lncRNAs des HOXB-Locus und anderen HOX-Genen sowie Differenzierungsmarkern

Da für manche lncRNAs Wirkungen *in trans* beschrieben sind, wurden die lncRNAs HOXB-AS3, HOXB-AS4 und HOXB-AS5 auf eventuelle transkriptionsregulierende Effekte *in trans* untersucht. Hierzu wurden deren Korrelationen nach Pearson mit bereits in anderen Projekten der Arbeitsgruppe erhobenen Expressionsdaten zu HOX-Genen anderer Loci (A, C, D) berechnet (48). Zusätzlich erfolgte die Korrelationsanalyse der HOX-Gene mit uroepithelialen Differenzierungsmarkern. Eine Auflistung der Ergebnisse zeigt Tabelle 3.2. Signifikante Korrelationen ergaben sich für HOXB-AS3 mit *HOXA1*, HOXB-AS4 mit *HOXD10*, *CK5* und *CK20*, sowie HOXB-AS5 mit *HOXC5* und *HOXC11* (Tab. 3.2). Die deutlich positive Korrelation der RNA-Expression von HOXB-AS5 und *HOXC11* mit $r = 0,85$, $p < 0,01$ gab Anlass zur Erfassung der *HOXC11*-Expression in HOXB-AS5

Knockdown-Zellen und Kontrollen. Zellen in denen HOXB-AS5 herunterreguliert wurde zeigten jedoch keine veränderte Expression von *HOXC11* (Abb. 3.8).

Tabelle 3.2: Pearson Korrelationskoeffizienten für die Expression von lncRNAs des HOXB-Locus und weitere HOX-Gene sowie der Zytokeratine CK5 und CK20. Fett gedruckte Werte sind signifikant, $p < 0,05$.

<i>Pearson</i>	HOXB-AS3	HOXB-AS4	HOXB-AS5
<i>HOXA1</i>	0,65	0,29	-0,22
<i>HOXA5</i>	0,2	-0,34	-0,13
<i>HOXA7</i>	0,06	-0,19	-0,14
<i>HOXA9</i>	-0,05	-0,17	-0,14
<i>HOXA11</i>	-0,01	-0,03	-0,01
<i>HOXA13</i>	-0,03	-0,34	-0,12
<i>HOXC5</i>	-0,06	0,03	0,62
<i>HOXC6</i>	0,07	-0,29	0,31
<i>HOXC11</i>	-0,11	-0,21	0,85
<i>HOXC12</i>	-0,31	-0,14	0,38
<i>HOXC13</i>	-0,02	-0,52	0,38
<i>HOXD10</i>	0,44	0,63	-0,07
<i>HOXD11</i>	0,14	-0,03	0,28
<i>HOXD12</i>	-0,02	-0,07	-0,06
<i>HOXD13</i>	-0,37	0,15	0,29
<i>CK5</i>	0,31	0,7	-0,03
<i>CK20</i>	-0,13	- 0,62	0,03

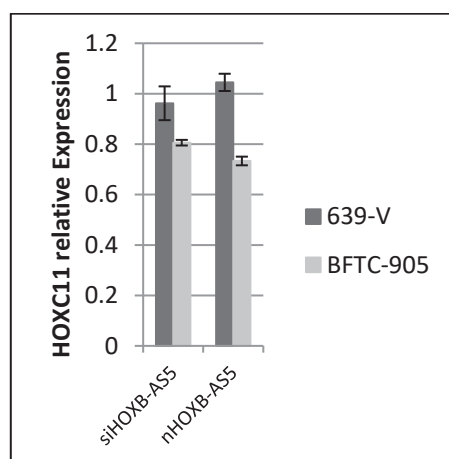


Abb. 3.8: RNA-Expression von *HOXC11* relativ zu *TBP* in UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB-AS5. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Negativ-siKontrollen sind mit nHOXB-AS5, Zellen mit der spezifischen siRNA sind mit siHOXB-AS5 benannt.

3.4 Expression der microRNAs MIR196a und MIR10a des HOXB-Locus in UC-Zelllinien und NU-Zelllinien

Die im HOXB-Locus kodierten microRNA-Gene *MIR196a* und *MIR10a* wurden ebenfalls mittels qRT-PCR auf ihre Expression im selben Set von UC-Zelllinien und NU-Zellen untersucht. Als Referenzgen zur relativen Konzentrationsbestimmung diente *RNU6B-2*. Beide microRNAs wiesen in den UCs niedrigere Konzentrationen als in den NUs auf (Abb. 3.9). Für *MIR10a* ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen UC und NU. Es wurde auf Korrelationen mit in Datenbanken postulierten Zielgenen und benachbarten HOXB-Genen geprüft (Tabelle 3.3). Hierzu dienten eigenständig erhobenen Daten zu HOXB-Genen und im Labor durch andere Projekte verfügbare Daten zu weiteren HOX-Genen. Die Expression von *GATA6* als potenzielles Zielgen der beiden microRNAs wurde zusätzlich in dieser Arbeit bestimmt (Abb. 3.9).

GATA6 war in den UC-Zelllinien höher exprimiert als in den NU-Zellkulturen. Die Expression von *GATA6* korrelierte nur schwach mit der von *MIR196a* oder *MIR10a*. Auch für die weiteren möglichen Zielgene ergaben sich keine signifikant negativen Korrelationen in den UC-Zelllinien. Im Fall von *MIR196a* ergab sich bei den potentiellen Zielgenen *HOXB6* und *HOXB8* jedoch eine signifikant positive Korrelation. Ebenso war die Expression von *MIR10a* mit der Expression benachbarter HOXB-Gene signifikant positiv korreliert.

Tabelle 3.3: Pearson Korrelationskoeffizienten für die Expression von MIR10a sowie MIR196a und benachbarter Gene des HOXB-Locus und potenziellen Zielgenen. Fett gedruckte Werte sind signifikant, $p < 0,05$.

<i>Pearson</i>	MIR10a	<i>Pearson</i>	MIR196a
<i>GATA6</i>	-0,42	<i>GATA6</i>	-0,27
<i>HOXB3</i>	0,69	<i>HOXA5</i>	-0,15
<i>HOXB4</i>	0,75	<i>HOXA7</i>	-0,03
<i>HOXB5</i>	0,76	<i>HOXA9</i>	-0,17
<i>HOXD10</i>	0,36	<i>HOXB6</i>	0,64
		<i>HOXB7</i>	0,05
		<i>HOXB8</i>	0,58
		<i>HOXB9</i>	0,79
		<i>CK5</i>	0,43

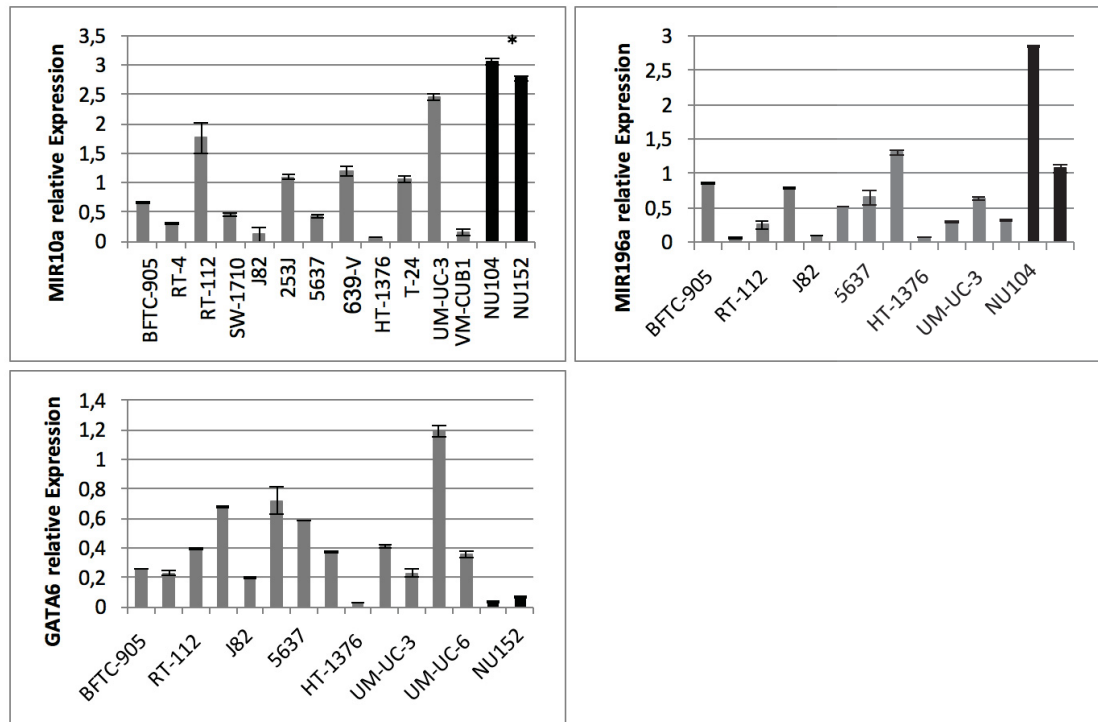


Abb. 3.9: Expression von MIR10a und MIR196a relativ zu *RNU6B* und Expression von *GATA6* relativ zu *TBP* in UC-Zelllinien und NU-Zellen. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Signifikante Unterschiede zwischen UC und NU sind durch * gekennzeichnet. Testung nach Mann-Whitney U, $p < 0,05$.

3.5 Expression von *HOXB2*, *HOXB13* und *HOXBAS-5* in Geweben von UC und NU

Zur Evaluation, ob sich die in den Zelllinien beobachteten Expressionsveränderungen von *HOXB2*, *HOXB13* und *HOXB-AS5* auch in UC-Geweben wiederfinden, wurde deren RNA-Expression in Gewebeproben bestimmt. Es erfolgten qRT-PCR Messungen von 19 UC-Geweben und vergleichend 10 benignen Gewebeproben der Harnblase, welche Tabelle 2.5 zu entnehmen sind. Insgesamt ergab sich eine inhomogene Expressionsverteilung.

HOXB2 war in den Tumorgeweben höher exprimiert, jedoch ohne statistisch relevante Signifikanz. Es fielen drei Tumorgewebe auf (BT41, BT120 und BT67), welche als Ausreißer besonders hohe Expression von *HOXB2* aufwiesen.

Wie in Abb. 3.10 zu sehen, unterlag die Expression von *HOXB13* und *HOXB-AS5* sowohl in Tumor- als auch in Normal-Geweben einer breiten Streuung. Beide Gene waren in Tumoren tendenziell vermindert exprimiert. Für *HOXBAS5* war dieser Unterschied sogar signifikant ($p < 0,05$). In Analogie zu den Daten aus Zelllinien ergab sich auch in Geweben eine positive Korrelation für diese Gene mit $r = 0,84$, $p < 0,01$. Sowohl *HOXB13* als auch

HOXB-AS5 waren in den gesunden Geweben deutlicher exprimiert als in den uroepithelialen Kontrollen der Zelllinien. Als Vergleich dient Abb. 3.5.

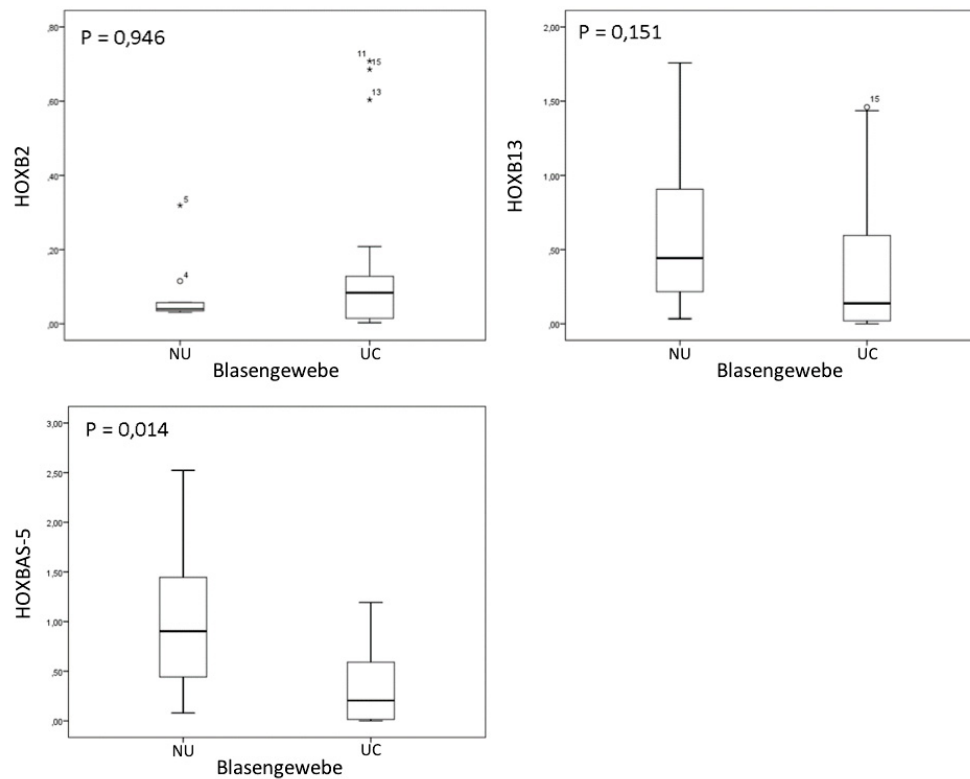


Abb. 3.10: RNA-Expression von *HOXB2*, *HOXB13* und *HOXB-AS5* in Blasengewebe. NU umfasst 10 gesunde Blasengewebe, UC umfasst 19 UC-Gewebe. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. *TBP* diente als Referenzgen. p-Werte ergeben sich aus Testung nach Mann-Whitney U.

3.6 Funktionelle Untersuchungen zu *HOXB2*, *HOXB13* und *HOXB-AS5*

3.6.1 *HOXB2* und epithelial mesenchymale Transition

Für die Zelllinien SW-1710, 253-J, 639-V, T-24 und UM-UC-3 wurde eine erhöhte Expression von *HOXB2* nachgewiesen. Da es sich bei diesen Zelllinien ausschließlich um solche mit mesenchymalem Phänotyp handelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass *HOXB2* eine Bedeutung bei der Regulation der epithelial mesenchymalen Transition (EMT) haben könnte und eine Überexpression somit zu einem aggressiveren Tumorwachstum führen könnte.

Da in vorherigen Projekten die UC-Zelllinien bereits für Faktoren, die EMT induzieren können, und assoziierte Marker charakterisiert wurden, konnten diese Daten zum Vergleich herangezogen werden. Dabei fiel auf, dass *HOXB2* in vielen UC-Zelllinien auf mRNA-

Ebene eine gegensätzliche Verteilung im Vergleich zum epithelialen Marker $\Delta Np63$ zeigte (Abb. 3.11). Entsprechend exprimierten Zelllinien mit hohen Werten an $HOXB2$ kein oder weniger $\Delta Np63$. Die quantitative Korrelationsanalyse nach Pearson ergab mit $r = -0,39$ eine schwach negative Korrelation.

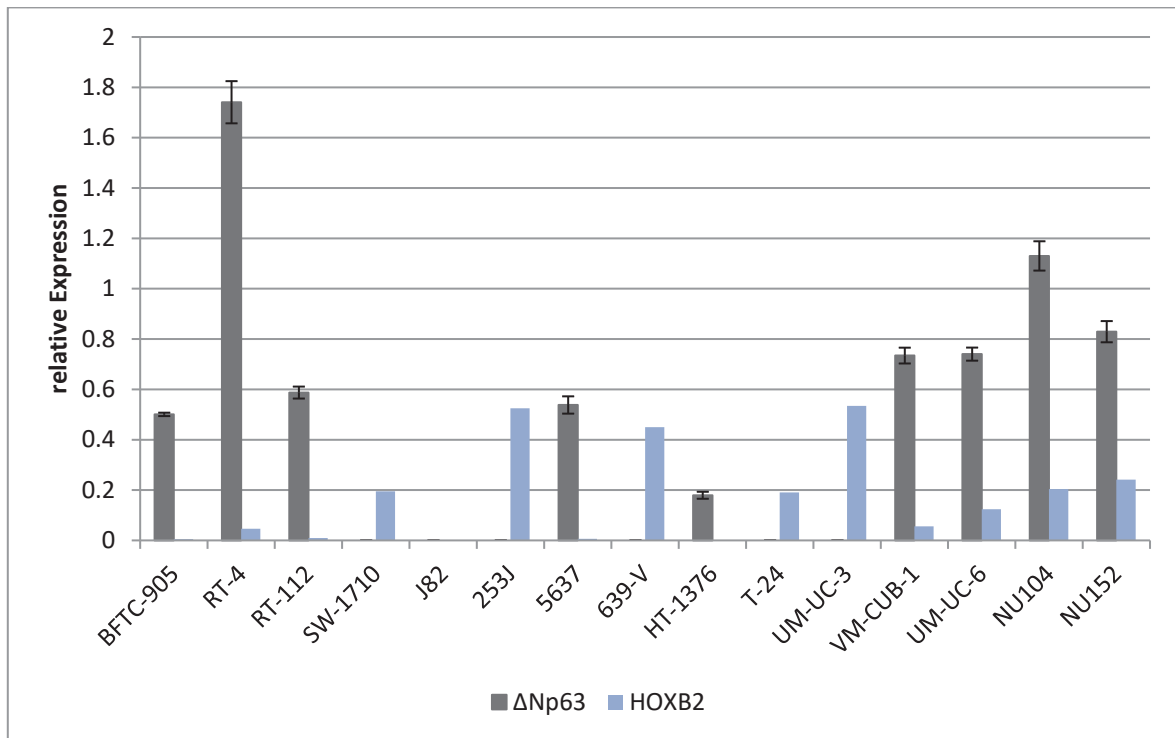


Abb. 3.11: Gegenüberstellung der RNA-Expression von $HOXB2$ und $\Delta Np63$ in UC- und NU-Zelllinien relativ zu TBP . cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert.

Um einen potentiellen regulatorischen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden die Auswirkungen von $\Delta Np63$ auf die Expression von $HOXB2$ untersucht. Hierfür wurde $\Delta Np63$ in den Zelllinien 253-J, 639-V und T-24 mittels Plasmidtransfektion ektopisch überexprimiert (Abb. 3.12). Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden. Ein signifikanter Effekt auf die $HOXB2$ -Expression war nach $\Delta Np63$ -Überexpression lediglich für die Zelllinie 639-V zu verzeichnen. Hier nahm die $HOXB2$ -Expression ab (Abb. 3.12).

Weitere Korrelationsanalysen von $HOXB2$ mit vorhandenen Daten zur Expression der epithelialen Differenzierungsmarker E-Cadherin und miR-200c in den Zelllinien ergaben ebenfalls negative Korrelationen nach Pearson. Eine signifikante positive Korrelation in den Zelllinien ergab sich dagegen zwischen dem mesenchymalem Marker Vimentin und $HOXB2$. Die Daten sind Tabelle 3.4 zu entnehmen.

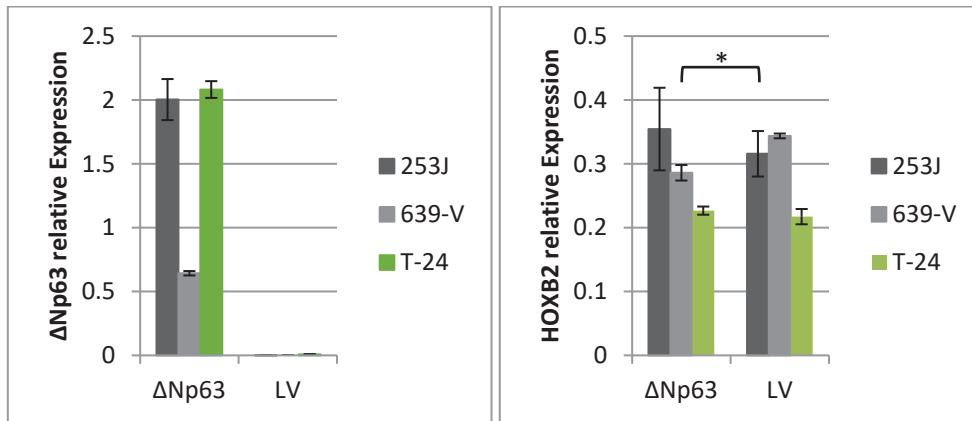


Abb. 3.12: RNA-Expression von $\Delta Np63$ und $HOXB2$ relativ zu TBP in UC-Zelllinien mit experimenteller Überexpression von $\Delta Np63$. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Zellen nach Transfektion eines $\Delta Np63$ -Expressionsvektors sind mit $\Delta Np63$, Kontrollen sind mit LV benannt. Signifikante Unterschiede sind mit* gekennzeichnet. Testung nach Mann-Whitney U ($p < 0,05$).

Tabelle 3.4: Pearson Korrelationskoeffizient für $HOXB2$ mit mesenchymalen und epithelialen Markern in UC-Zelllinien.

Pearson	Vimentin	E-Cadherin	miR200c
HOXB2	0,58	-0,42	-0,55
p-Wert:	< 0,05	0,17	0,06

3.6.2 SiRNA-vermittelte Herabregulation von $HOXB2$ in UC-Zelllinien

Es schlossen sich siRNA-vermittelte Knockdown-Versuche in Urothelkarzinom-Zelllinien an, um mögliche Auswirkungen von $HOXB2$ auf Phänotyp und Zytokeratinexpression der transfizierten Zelllinien zu ermitteln. Hierzu wurden in den siRNA-transfizierten Zelllinien die Expression von *Vimentin* und *E-Cadherin* gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen derselben Zelllinie, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, die keine mRNA erkennt (Abb. 3.13). Zusätzlich wurden die Zytokeratine CK5, CK14 und CK20 als urotheliale Differenzierungsmarker in den Zelllinien 639-V und UM-UC-3 erfasst.

Zellen in denen $HOXB2$ herunterreguliert wurde, zeigten trotz morphologischer Veränderungen zu einem epithelialeren Phänotyp keinen Rückgang der *Vimentin*-Expression (Abb. 3.13). Ebenso ergab sich in 639-V und UM-UC-3 keine Veränderung in der Expression von *CK14*, *CK5* oder *CK20* (Daten nicht gezeigt).

Die erfolgreiche Expressionsmodulation sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene ist in Abb. 3.13 und 3.14 zu sehen. Auf dem Proteinniveau war die Abnahme nur schwach und

am deutlichsten für die Zelllinie T-24. Ebenso in Abb. 3.14 dargestellt ist die starke Überexpression von *HOXB2* in mit Plasmid transfizierten Zellen der Linie BFTC-905.

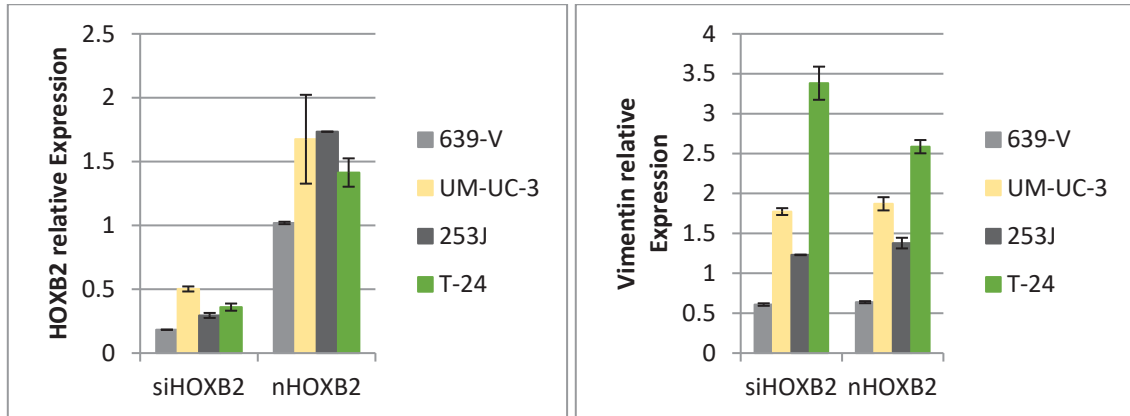


Abb. 3.13: RNA-Expression von *HOXB2* und *Vimentin* relativ zu *TBP* in UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem *HOXB2*. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Zellen mit spezifischer siRNA gegen *HOXB2* sind mit siHOXB2, Kontrollen sind mit nHOXB2 benannt.

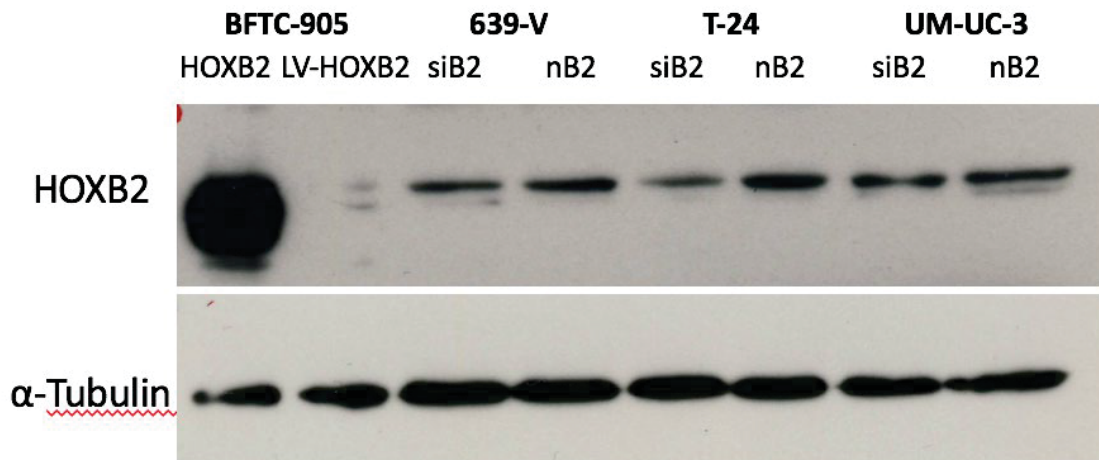


Abb. 3.14: *HOXB2* Protein in UC-Zelllinien mit experimentell verminderter oder erhöhter Expression von *HOXB2*. Si bezeichnet Zellen, die mit siRNA gegen *HOXB2* behandelt wurden. Negativ siKontrollen sind mit n bezeichnet. BFTC-905-Zellen nach Transfektion eines *HOXB2*-Expressionsvektors sind mit *HOXB2* benannt, bei LV-*HOXB2*-Zellen wurde ein Leervektor verwendet. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von α -Tubulin.

3.6.2.1 Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB2

Zellen nach experimentell verminderter Expression von *HOXB2* wuchsen in kompakteren Zellverbänden mit geringerem mesenchyalem Charakter und zeigten eine Tendenz zur stärkeren Proliferation (Abb. 3.15). Dies gab Anlass zu weiteren funktionellen Untersuchungen. Daher wurde der Effekt der siRNA-vermittelten Expressionshemmung von *HOXB2* auf das Proliferationsverhalten sowie das Migrationsverhalten untersucht.

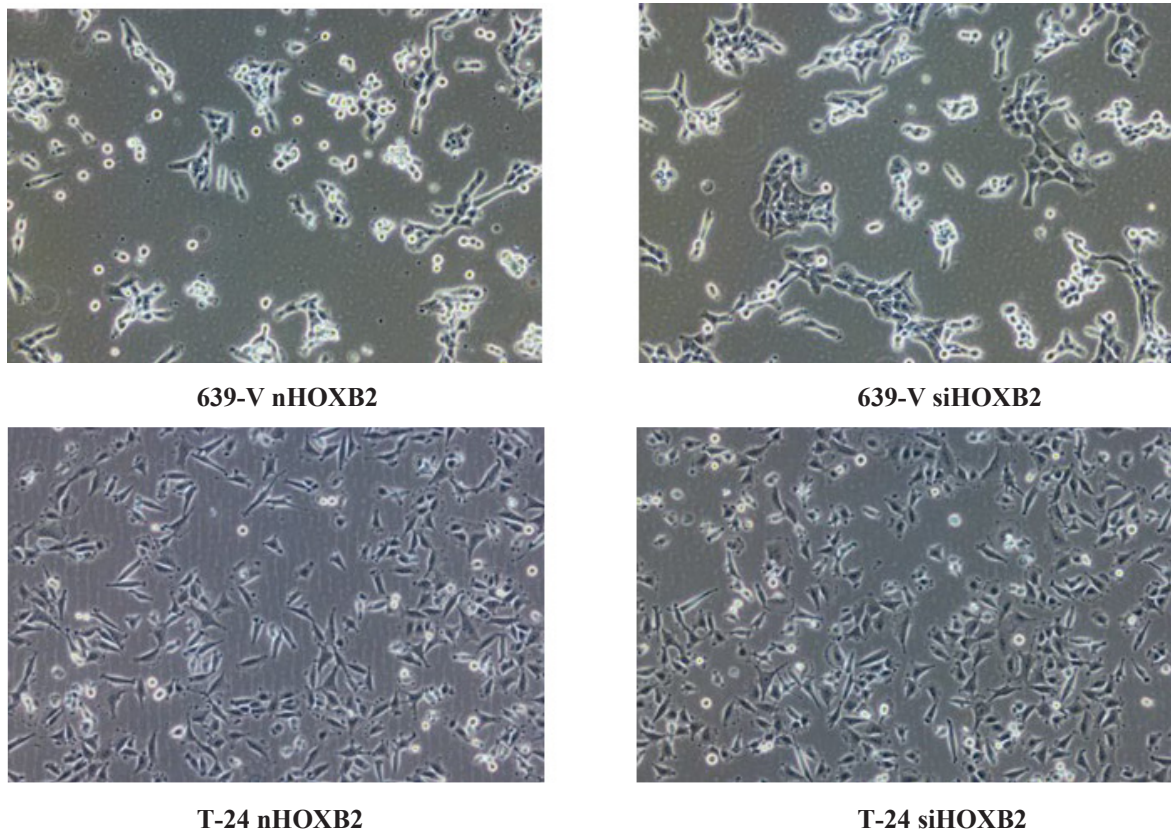


Abb. 3.15: Morphologie von UC-Zelllinien 639-V und T-24 mit experimentell vermindertem HOXB2. siHOXB2 bezeichnet Zellen, die mit spezifischer siRNA gegen HOXB2 behandelt wurden. Kontrollen sind mit nHOXB2 bezeichnet. Bilder in vierfacher Vergrößerung.

Zur Testung der proliferativen Aktivität von UC-Zelllinien nach experimenteller Herabregulation von HOXB2 dienten MTT-Tests, welche für die Zelllinien 639-V, T-24 und UM-UC-3 durchgeführt wurden. Als Kontrolle wurden hier mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfizierte Zellen derselben Zelllinie verwendet.

Nach Knockdown waren zelllinienabhängige Unterschiede im Proliferationsverhalten der Zellen zu verzeichnen. Während bei 639-V die vitalen Zellen eher abnahmen, wuchsen

analog behandelte UM-UC-3 Zellen tendenziell schneller. Die Zelllinie T-24 lieferte uneinheitliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Wie in der Abbildung ersichtlich, ist hier nur die Nennung von Tendenzen möglich, da die Endpunkte häufig nahe beieinanderliegen, zelllinienabhängige Unterschiede vorliegen und die Wachstumskurven und damit Proliferationsunterschiede erst ab dem dritten Tag divergierten (Abb. 3.16).

In den Migrationstests zu HOXB2 in den Zelllinien 639-V und T-24 konnten ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zwischen mit spezifischer siRNA und mit Kontroll-RNA transfizierten Zellen gemessen werden (Abb. 3.17).

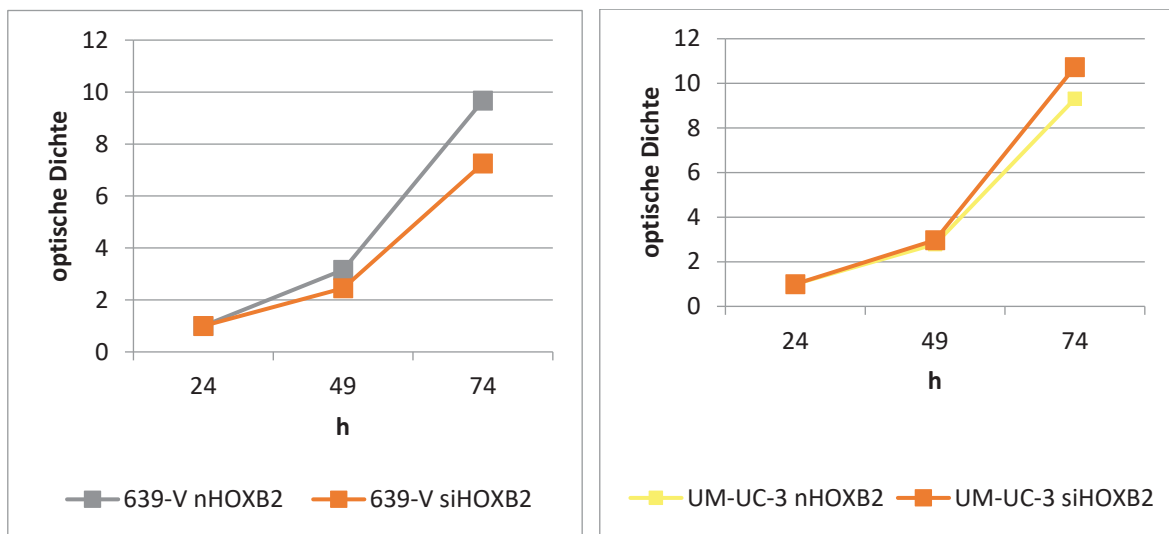


Abb. 3.16: Zellviabilität (optische Dichte) von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB2. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB2 sind mit siHOXB2, Kontrollen sind mit nHOXB2 bezeichnet.

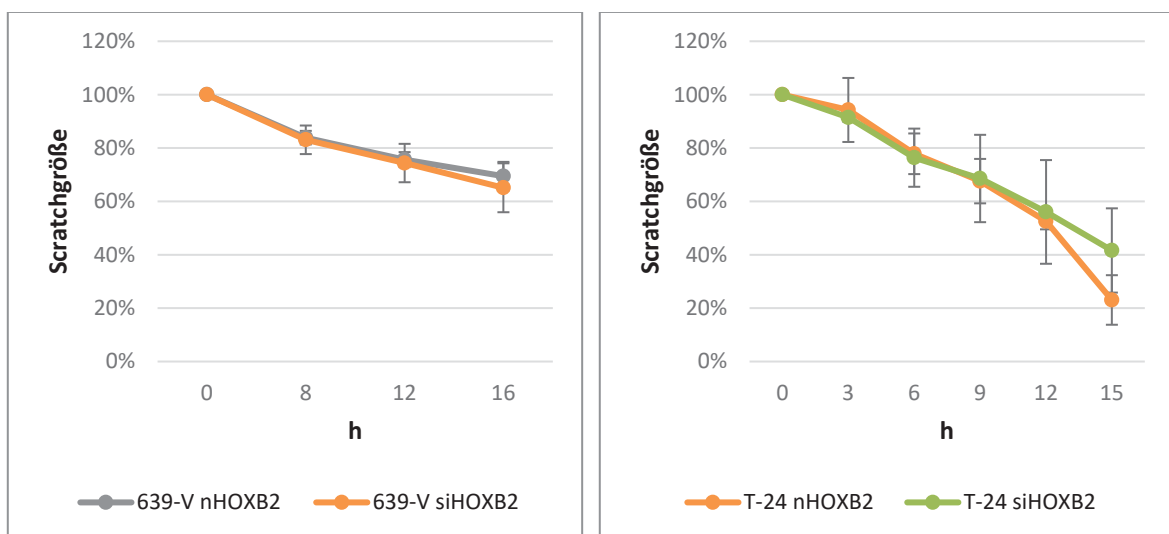


Abb. 3.17: Migrationsvermögen (Scratchgröße) von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB2. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB2 sind mit siHOXB2, Kontrollen sind mit nHOXB2 bezeichnet.

3.6.2.2 Klonogenität von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB2

Trotz der geringen Auswirkungen der gezielten Herabregulation der *HOXB2*-Expression auf Proliferation und Migration von UC-Zellen bestand der Verdacht, dass die erhöhte Expression von *HOXB2* mit einem Überlebensvorteil der betroffenen Zellen einhergeht. Um eventuelle Vorteile in der Koloniebildungsfähigkeit zu ermitteln wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Diese ergaben in T-24 und 639-V Zelllinien einen Unterschied zwischen mit siRNA gegen HOXB2 behandelten Zellen und den Kontrollen. Abb. 3.18 zeigt exemplarisch die Tendenz zur besseren Koloniebildungsfähigkeit von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB2. UM-UC-3 Zellen wiesen keinen Unterschied in ihrer Koloniebildungsfähigkeit auf.

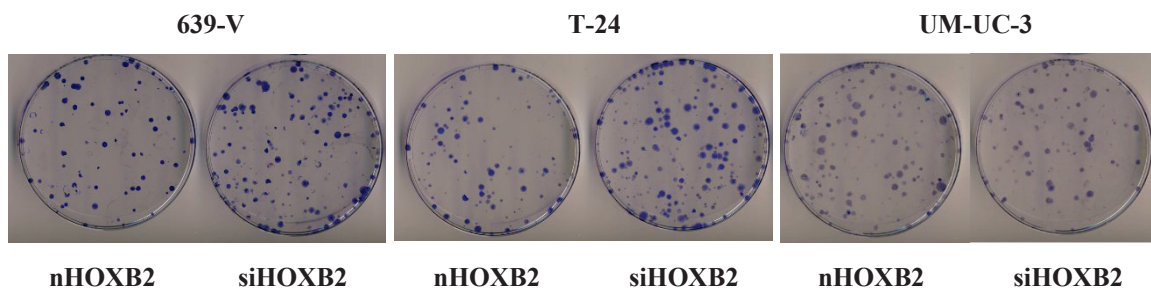


Abb. 3.18: Koloniebildungstest von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB2 und Kontrollen. Zellen die mit siRNA gegen HOXB2 behandelt wurden sind mit siHOXB2, Kontrollen sind mit nHOXB2 bezeichnet.

3.6.3 Experimentelle Überexpression von *HOXB2* in UC-Zelllinien und Auswirkung auf Klonogenität

Um die bei HOXB2 Knockdown-Versuchen beobachteten Effekte validieren zu können wurde ein Plasmidkonstrukt zur ektopischen Überexpression von *HOXB2* in Urothelkarzinomzelllinien hergestellt. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA4/TO. Auf RNA-Ebene war die Reexpression von *HOXB2* durch Plasmidtransfektion gut zu detektieren. Der Proteinnachweis ergab eine deutliche Expression von *HOXB2* in BFTC-905. Für HT-1376 war die Expressionsmodulation auf Proteinebene geringer ausgeprägt (Abb. 3.19).

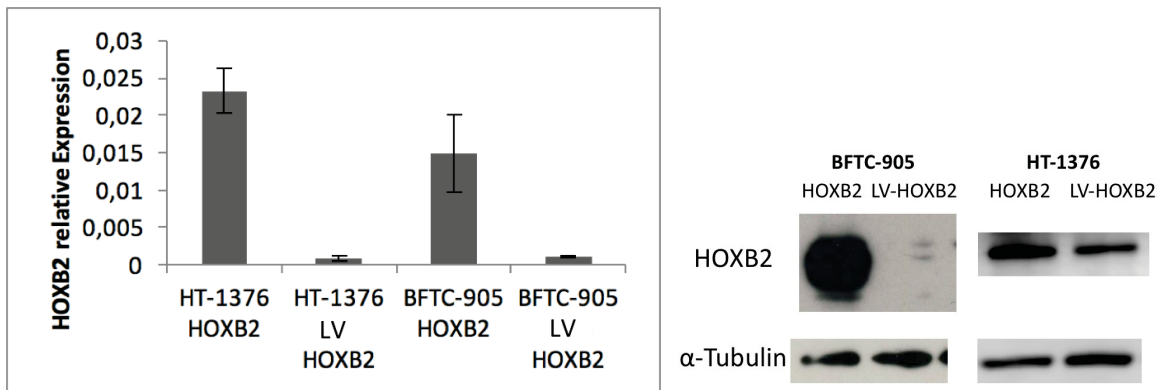


Abb. 3.19: Experimentelle Überexpression von *HOXB2* in UC-Zelllinien. Links RNA-Expression von *HOXB2* relativ zu *TBP* in HT-1376 und BFTC-905 mit künstlicher Überexpression von *HOXB2* und Kontrollen. Rechts *HOXB2* Protein in HT-1376 und BFTC-905 mit künstlich stabiler Überexpression von *HOXB2*. Zellen mit Transfektion eines *HOXB2*-Expressionsvektors sind mit *HOXB2* benannt. Kontrollen sind mit LV-*HOXB2* bezeichnet. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Als Ladungskontrolle im Western Blot diente α -Tubulin.

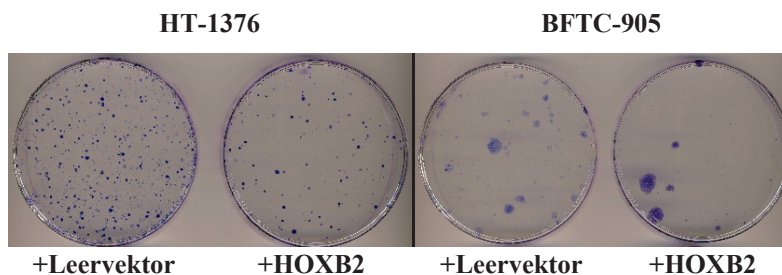


Abb. 3.20: Koloniebildungstest von UC-Zelllinien mit experimenteller Überexpression von *HOXB2* und Kontrollen. Zellen mit Transfektion eines *HOXB2*-Expressionsvektors sind mit +*HOXB2* benannt. Kontrollen sind mit +Leervektor bezeichnet.

Sowohl HT-1376 als auch BFTC-905 mit Überexpression von *HOXB2* bildeten weniger Kolonien als Kontrollzellen mit unveränderter *HOXB2*-Expression (Abb. 3.20). Die wenigen Kolonien waren aber teilweise stark vergrößert.

3.6.4 SiRNA-vermittelte Expressionshemmung von *HOXB13* in UC-Zelllinien

Zur weiteren Untersuchung des in einigen UC-Zelllinien stark exprimierten *HOXB13* wurde dieses in 639-V, T-24 und BFTC-905 mittels siRNA-Transfektion herunterreguliert. Der Knockdown war für die drei untersuchten Zelllinien effizient und führte zum vollständigen Verlust des Proteins (Abb. 3.21). Es schlossen sich funktionelle Tests an.

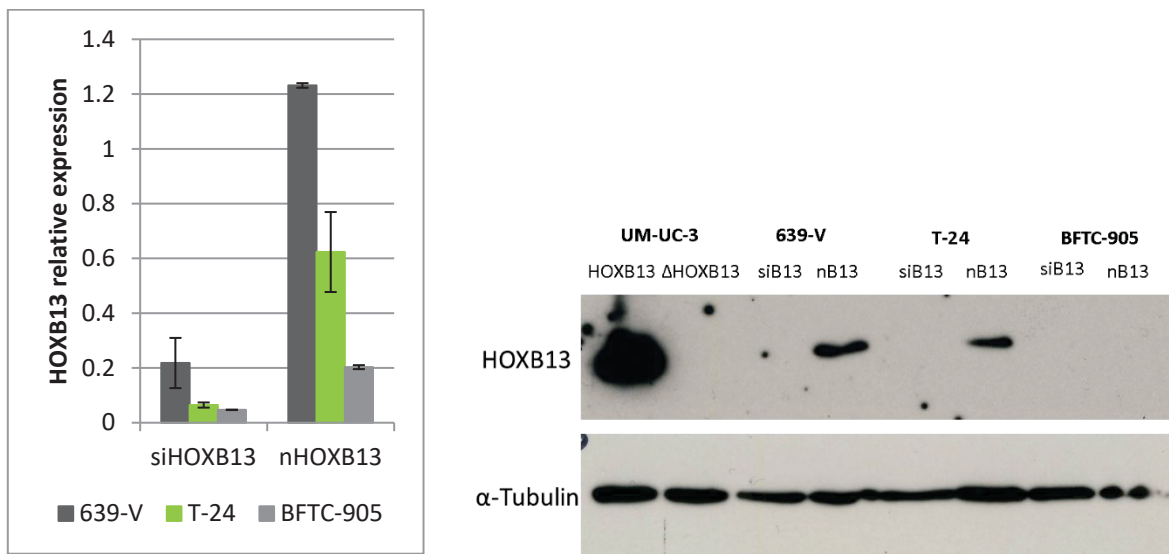


Abb. 3.21: Si-RNA-vermittelter Knockdown von HOXB13 in UC-Zelllinien und experimentelle Überexpression von HOXB13 in UM-UC-3-Zellen. Links RNA-Expression von *HOXB13* relativ zu *TBP*. Rechts HOXB13 Protein in UC-Zelllinien mit künstlich verminderter oder erhöhter Expression von *HOXB13*. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert Als Ladungskontrolle im Western Blot diente die Detektion von α -Tubulin. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siHOXB13 benannt. UM-UC-3-Zellen mit Transfektion eines *HOXB13*-Expressionsvektors sind mit HOXB13 benannt. Kontrollen sind mit n bzw. Δ gekennzeichnet.

3.6.4.1 Phänotypische Veränderungen

Nach erfolgreicher Transfektion fielen morphologische Unterschiede zwischen HOXB13 Knockdown- und Kontrollzellen auf. In der Kultivierung zeigten sich weniger, anscheinend langsamer proliferierende Zellen in der 639-V Zelllinie mit erniedrigter *HOXB13*-Expression. Bei der Passage zur Weiterkultivierung mussten diese Zellen weniger stark verdünnt werden. T-24 Zellen mit HOXB13 Knockdown fielen durch zahlreiche abgerundete Zellen und einen ansonsten stärker epithelialen Charakter mit kompakteren Zellverbänden auf. In stärkerer Vergrößerung waren deutlich vergrößerte Nucleoli erkennbar und auffällig viele mehrkernige Zellen (Abb. 3.22).

Um die Hypothese zu prüfen, dass sich in T-24 Zellen mit HOXB13 Knockdown häufiger polynukleäre Zellen finden, wurde eine immunzytochemische Färbung angefertigt. Es erfolgte die Färbung der Zellkerne, des Zytoskeletts und von HOXB13 in T-24 Knockdown- und Kontrollzellen. Dieses Experiment bestätigte die Vermutung einer höheren Rate an polynukleären Zellen in T-24 HOXB13 Knockdown-Zellen. Während 1,5% der mit Kontroll-siRNA gegen HOXB13 behandelten T-24 Zellen mehrkernig waren, wiesen 9,8% der mit siRNA gegen HOXB13 transfizierten Zellen mehrere Kerne auf (Abb. 3.23).

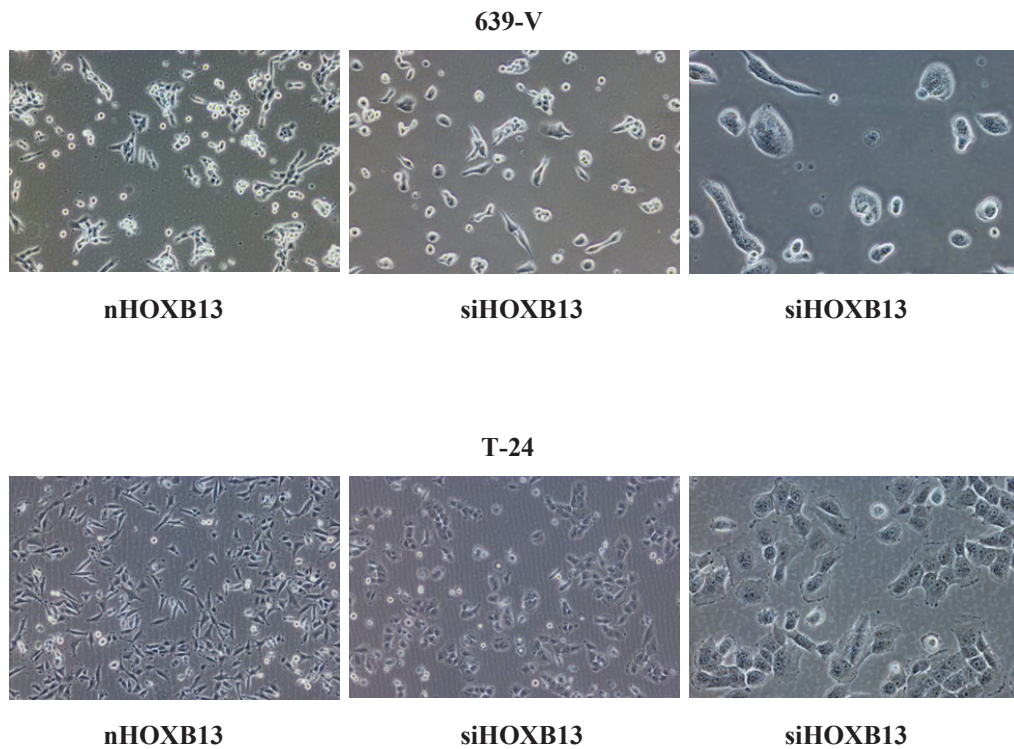


Abb. 3.22: Morphologie von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB13. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siHOXB13, Kontrollen sind mit nHOXB13 bezeichnet. Zellbilder links in vierfacher, ganz rechts in zehnfacher Vergrößerung.

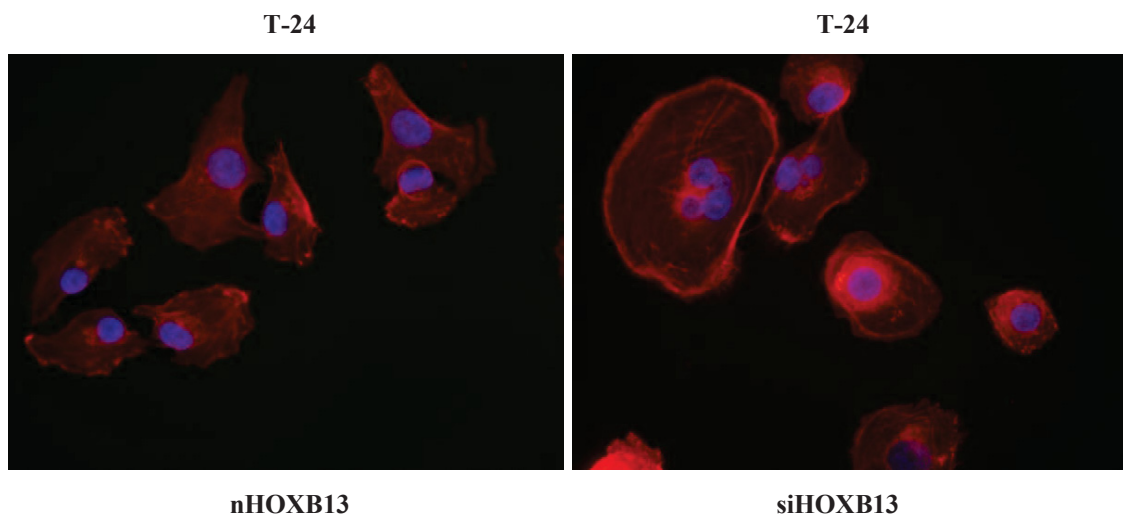


Abb. 3.23: Überlagertes Bild immunzytochemischer Färbung von Zellkernen und Zytoskelett in T-24 Zellen mit siRNA-vermitteltem Knockdown von HOXB13 und Kontrollen. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siHOXB13, Kontrollen sind mit nHOXB13 benannt.

3.6.4.2 Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB13

In Analogie zum Vorgehen bei HOXB2 schlossen sich funktionelle Test an, um die Wirkung von HOXB13 auf den Phänotyp und Zelleigenschaften von UC-Zellen näher zu charakterisieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.24 und 3.25 dargestellt. Die Proliferation der Zelllinien 639-V, T-24 und BFTC-905 veränderte sich nach siRNA-vermittelter Repression von HOXB13 einheitlich. Bei allen Zelllinien war die Proliferationsaktivität im MTT-Test verringert. Die Proliferationsabnahme nach Knockdown von HOXB13 fiel in der 639-V Zelllinie milder aus, als in den Zelllinien T-24 und BFTC-905. Im Migrationstest waren die milderen Auswirkungen des HOXB13 Knockdowns auf die Zelllinie 639-V ebenfalls zu verzeichnen. Sowohl in 639-V als auch T-24 Zellen mit erniedrigtem HOXB13 war die Migrationsfähigkeit herabgesetzt. Bei der BFTC-905 Zelllinie ergab sich kein Unterschied im Migrationsverhalten, bei starken Schwankungen innerhalb der Vergleichsgruppen.

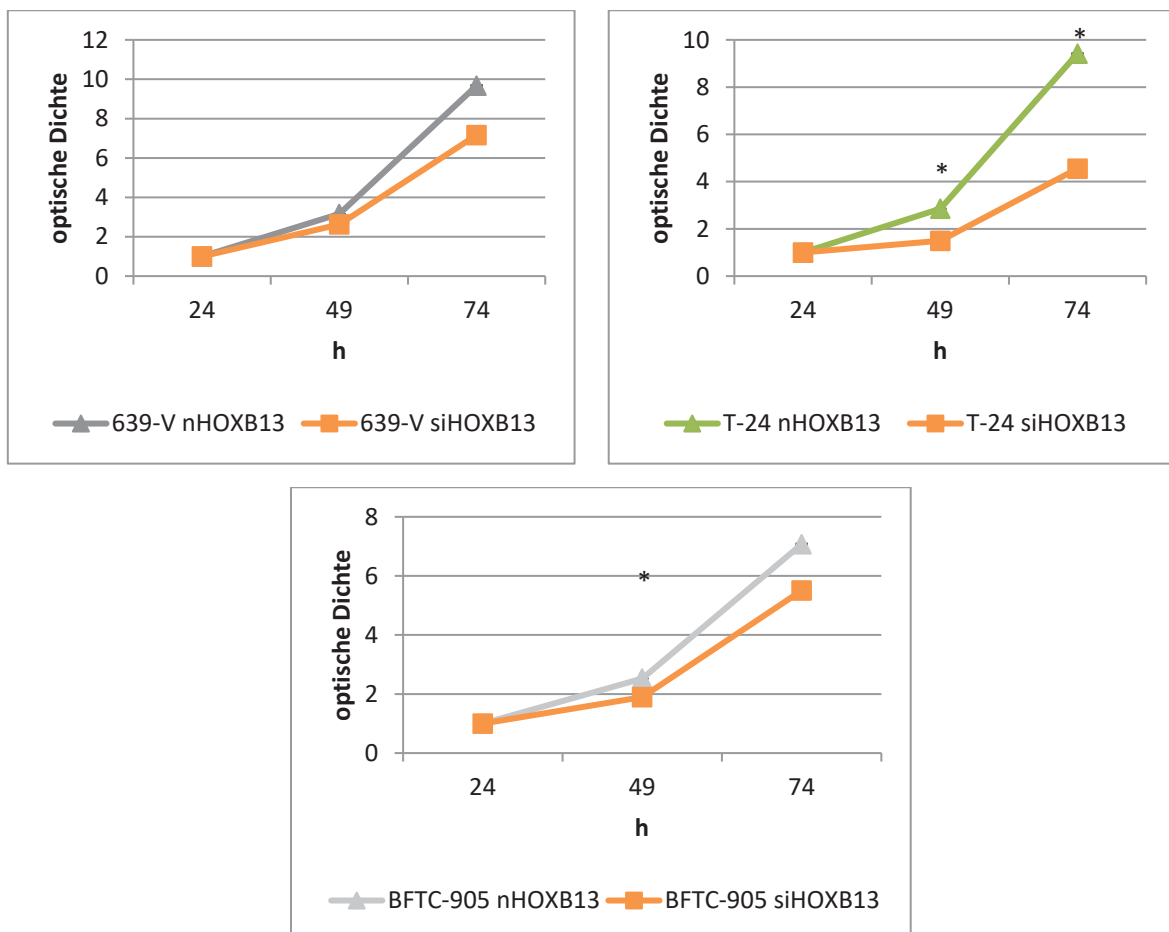


Abb. 3.24: Zellviabilität (optische Dichte) von UC-Zelllinien mit siRNA-vermitteltem Knockdown von HOXB13. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siHOXB13, Kontrollen sind mit nHOXB13 bezeichnet. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

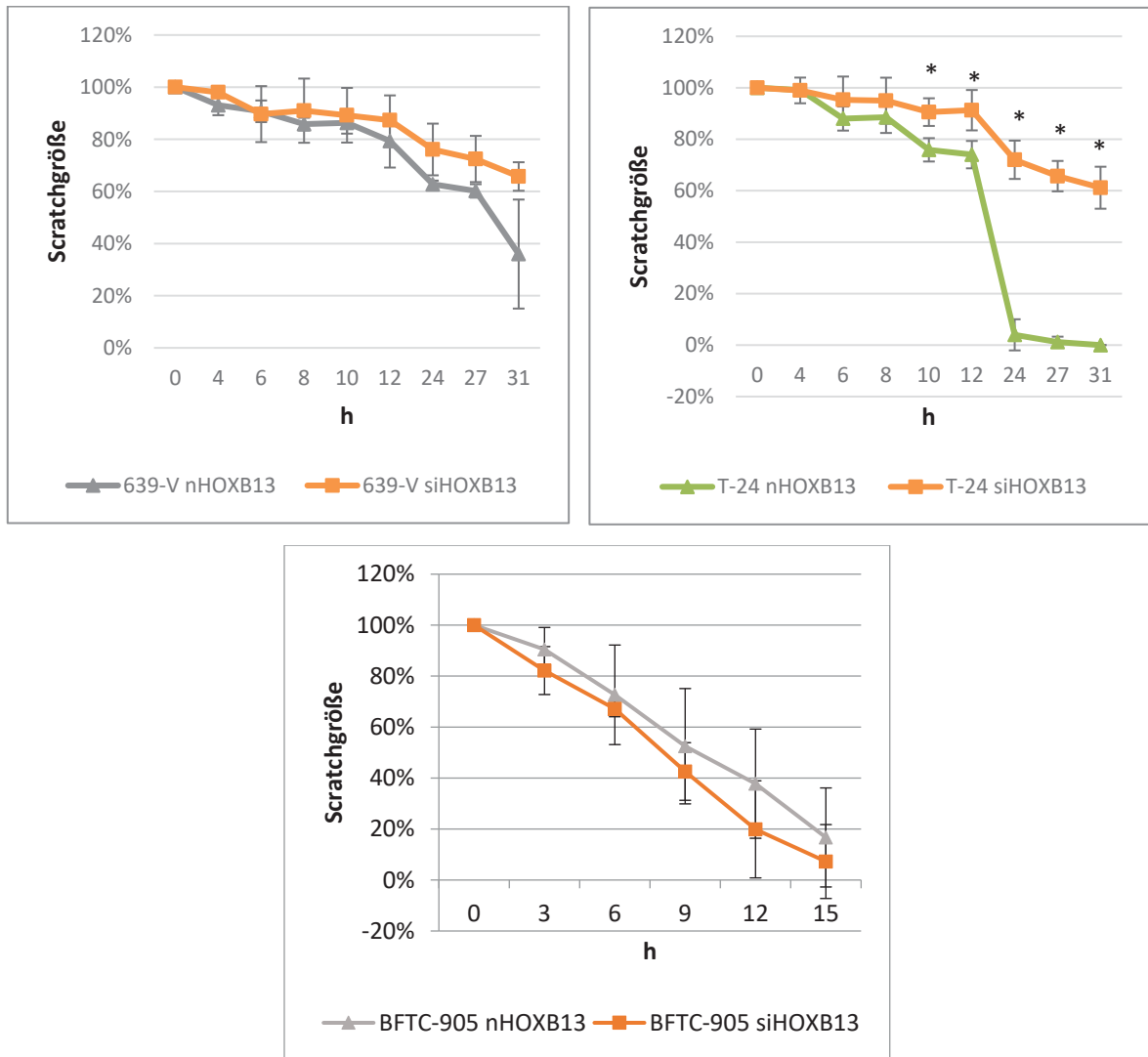


Abb. 3.25: Migrationsvermögen (Scratchgröße) von UC-Zelllinien mit siRNA-vermitteltem Knockdown von HOXB13. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siHOXB13, Kontrollen sind mit nHOXB13 bezeichnet. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

3.6.4.3 Klonogenität von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB13

Die verminderte Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Zellen mit siRNA-vermitteltem Knockdown von HOXB13 gaben Anlass für die Durchführung von Koloniebildungstests. Hier konnte ein Langzeit-Effekt auf das Proliferationsverhalten von Zellen mit künstlich reduziertem HOXB13 festgestellt werden. Zellen mit HOXB13 Knockdown bildeten in allen drei getesteten Zelllinien weniger Kolonien, mit jeweils geringerem Durchmesser (Abb. 3.26).

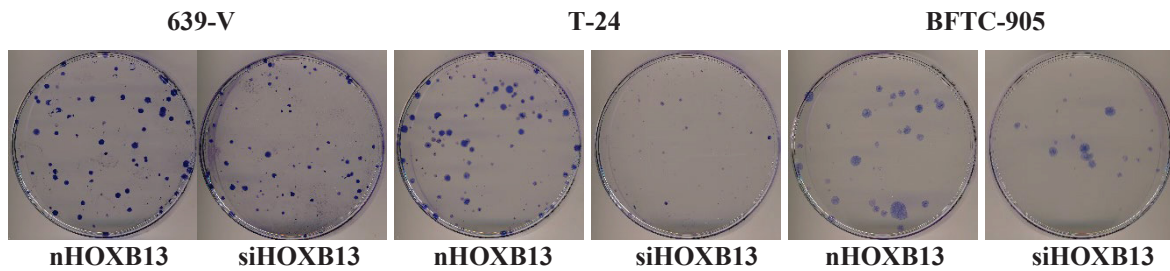


Abb. 3.26: Koloniebildungstest von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB13 und Kontrollen. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siHOXB13, Kontrollen sind mit nHOXB13 bezeichnet.

3.6.4.4 Seneszenzverhalten von Zellen mit experimentell vermindertem HOXB13

Die bisher erzielten Ergebnisse legten den Verdacht nahe, dass sich ein Knockdown von HOXB13 inhibitorisch auf den Zellzyklus auswirken könnte. Die Beobachtung von vielen abgerundeten Zellen nach der Behandlung legten sogar die Induktion von Apoptose nahe; das Auftreten großer, polynukleärer Zellen könnte auf Seneszenz hindeuten. Daher wurde überprüft, ob in Zellen nach experimenteller Expressionshemmung von *HOXB13* Seneszenzinduktion nachgewiesen werden konnte. In mit siRNA gegen HOXB13 behandelten Zellen konnte eine geringe Zunahme der gefärbten Zellen, durch Aktivität des Seneszenzmarkers Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase, detektiert werden (Abb. 3.27). Am deutlichsten war dieser Effekt in der Zelllinie 639-V zu sehen.

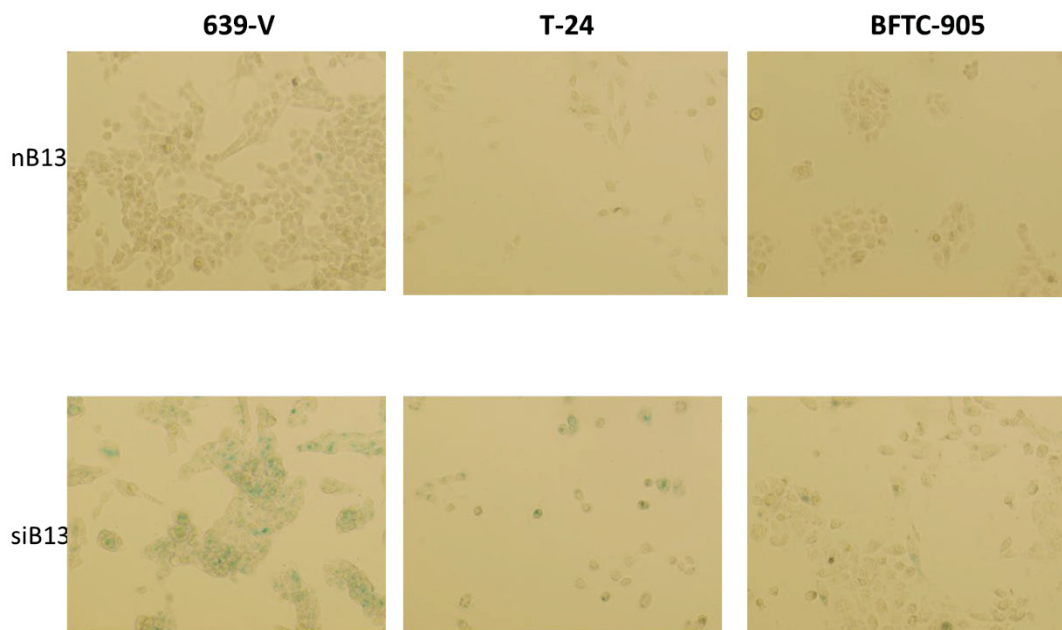


Abb. 3.27: Seneszenzfärbung von UC-Zelllinien mit HOXB13 Knockdown. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB13 sind mit siB13, Kontrollen sind mit nB13 benannt.

3.6.5 Experimentelle Überexpression von *HOXB13* in UC-Zelllinien

Der Verlust neoplastischer Eigenschaften der Karzinomzellen nach Knockdown von *HOXB13* legt die Vermutung nahe, dass umgekehrt die Überexpression in einigen Zelllinien mit ursprünglich niedriger Expression die Proliferation und andere neoplastische Eigenschaften der Zellen fördern könnte. Folglich wurde überprüft, ob die experimentelle Überexpression von *HOXB13* in solchen Zelllinien zu gesteigerter Proliferation, Migration und Klonogenität führt, indem die Zelllinien HT-1376 und UM-UC-3 stabil mit *HOXB13* überexprimiert wurden (Abb. 3.28). Als Kontrolle diente ein Kontrollvektor mit Leserastermutation in der *HOXB13*-exprimierenden Region. Den Nachweis der vermehrten Expression auf Proteinebene zeigt Abb. 3.29.

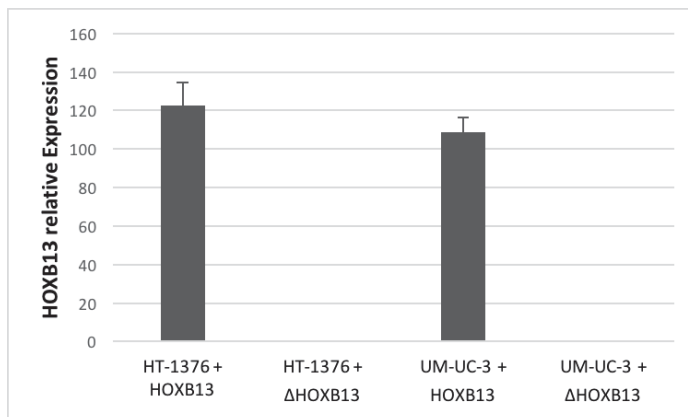


Abb. 3.28: RNA-Expression von *HOXB13* relativ zu *TBP* in HT-1376 und UM-UC-3 mit experimenteller Überexpression von *HOXB13*. Zellen mit Transfektion eines *HOXB13*-Expressionsvektors sind mit +HOXB13, Kontrollen sind mit +ΔHOXB13 bezeichnet.

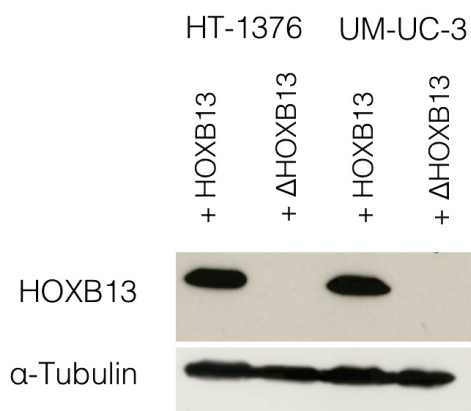


Abb. 3.29: *HOXB13* Protein in UC-Zelllinien mit experimenteller Überexpression von *HOXB13*. Zellen mit Transfektion eines *HOXB13*-Expressionsvektors sind mit +HOXB13, Kontrollen sind mit +ΔHOXB13 benannt. Als Ladungskontrolle diente α-Tubulin.

3.6.5.1 Proliferations- und Migrationsverhalten von *HOXB13*-überexprimierenden Zellen

Proliferationstests erfolgten in Analogie zu den Knockdown-Versuchen. Verglichen wurden stabil *HOXB13*-überexprimierende Zellen mit Zellen, die mit dem entsprechenden Kontrollvektor transfiziert wurden. Eine stärkere Proliferation war in HT-1376 und UM-UC-3 Zellen mit Überexpression von *HOXB13* bereits ab dem 2. Tag der Messungen deutlich erkennbar (Abb. 3.30).

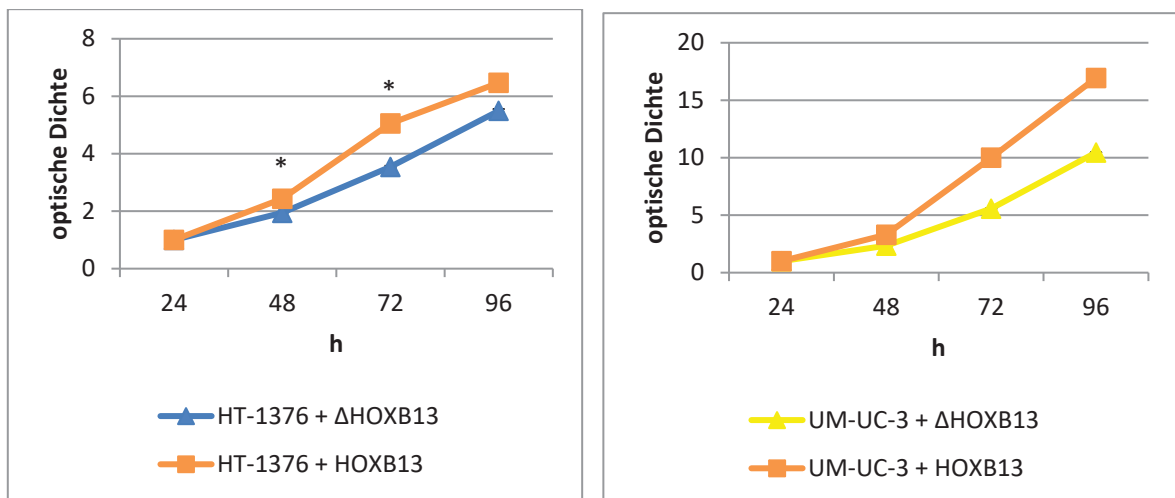


Abb. 3.30: Zellviabilität von UC-Zelllinien mit experimenteller Überexpression von *HOXB13*. Zellen mit Transfektion eines *HOXB13*-Expressionsvektors sind mit +HOXB13, Kontrollen sind mit +ΔHOXB13 bezeichnet. Signifikante Unterschiede sind mit* gekennzeichnet.

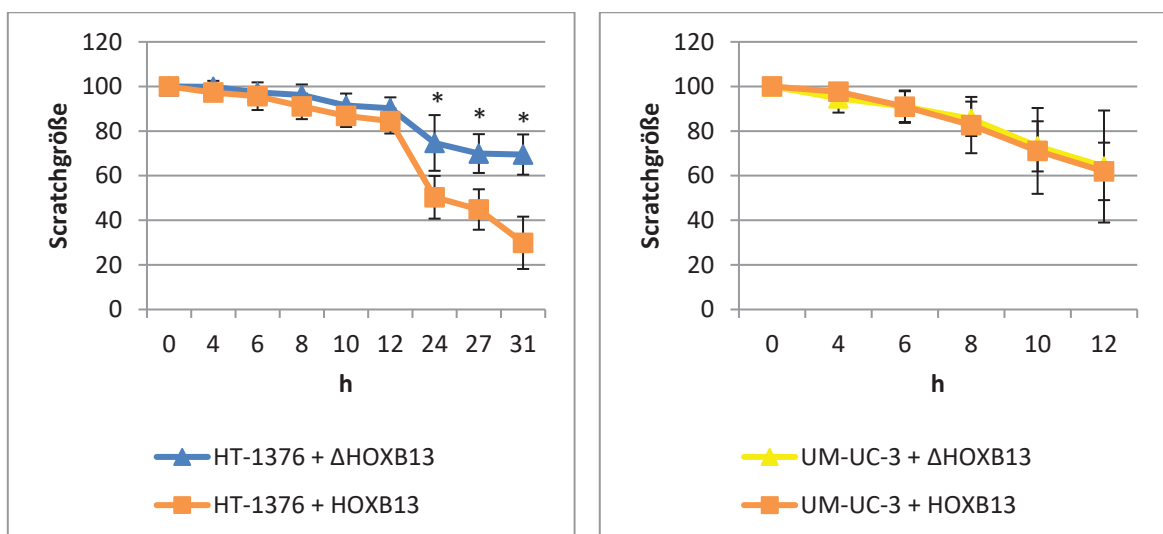


Abb. 3.31: Migrationsvermögen von UC-Zelllinien mit experimenteller Überexpression von *HOXB13*. Zellen mit Transfektion eines *HOXB13*-Expressionsvektors sind mit +HOXB13, Kontrollen sind mit +ΔHOXB13 bezeichnet. Signifikante Unterschiede sind mit* gekennzeichnet.

Im Migrationstest zeigten HT-1376 Zellen mit hoher *HOXB13*-Expression eine stärkere Aktivität als die Kontrollzellen (Abb. 3.31). Weniger deutlich fielen die Ergebnisse für die Zelllinie UM-UC-3 aus, die schneller proliferiert und migriert als HT-1376. Eindeutige Veränderungen ergaben sich hier nicht.

3.6.5.2 Klonogenität von *HOXB13*-überexprimierenden Zellen

In den Koloniebildungstests bildeten HT-1376 Zellen mit *HOXB13*-Überexpression vermehrt Kolonien. Die Kolonien der *HOXB13*-überexprimierenden Zellen wiesen zudem größere Durchmesser auf als die Kontrollen. UM-UC-3 Zellen zeigten im Klonogenitätstest keinen Unterschied zwischen *HOXB13*-überexprimierenden und mit Kontrollvektor transfizierten Zellen (Abb. 3.32).

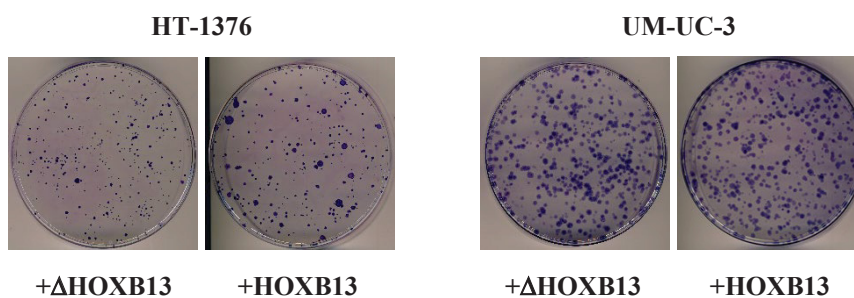


Abb. 3.32: Koloniebildungstest von UC-Zelllinien mit experimenteller Überexpression von *HOXB13*. Zellen mit Transfektion eines *HOXB13*-Expressionsvektors sind mit +*HOXB13*, Kontrollen sind mit + Δ *HOXB13* bezeichnet.

3.6.6 SiRNA-vermittelte Expressionshemmung von *HOXB-AS5* in UC-Zelllinien

Zur Überprüfung veränderter Zelleigenschaften nach siRNA-Knockdown von *HOXB-AS5* (Abb. 3.33) wurden Proliferationstests mittels MTT sowie Migrationstests und Koloniebildungstests durchgeführt.

Der MTT-Test erbrachte zelllinienspezifische Unterschiede (Abb. 3.34). Während in der 639-V Zellen mit erniedrigtem *HOXB-AS5* weniger Zellvermehrung erkennbar war, gab es keinen reproduzierbaren Unterschied zwischen Knockdown und Kontrolle bei BFTC-905 Zellen.

Für das Migrationsverhalten ergab sich in den Zelllinien 639-V und BFTC-905 ebenfalls keine Unterschiede zwischen Zellen mit vermindertem HOXB-AS5 und Kontrollen (Abb. 3.35).

Klonogenitätstests für die Zelllinien 639-V und BFTC-905 zeigten keinerlei Unterschiede zwischen mit siRNA gegen HOXB-AS5 und mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (Abb. 3.36).

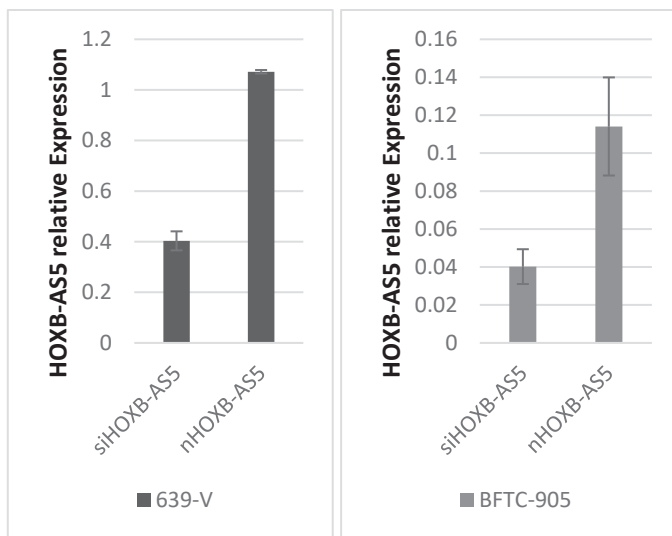


Abbildung 3.33: Experimentelle Verminderung von HOXB-AS5 in UC-Zelllinien. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB-AS5 sind mit siHOXB-AS5, Kontrollen sind mit nHOXB-AS5 benannt. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Dargestellt sind Expressionswerte relativ zu *TBP*.

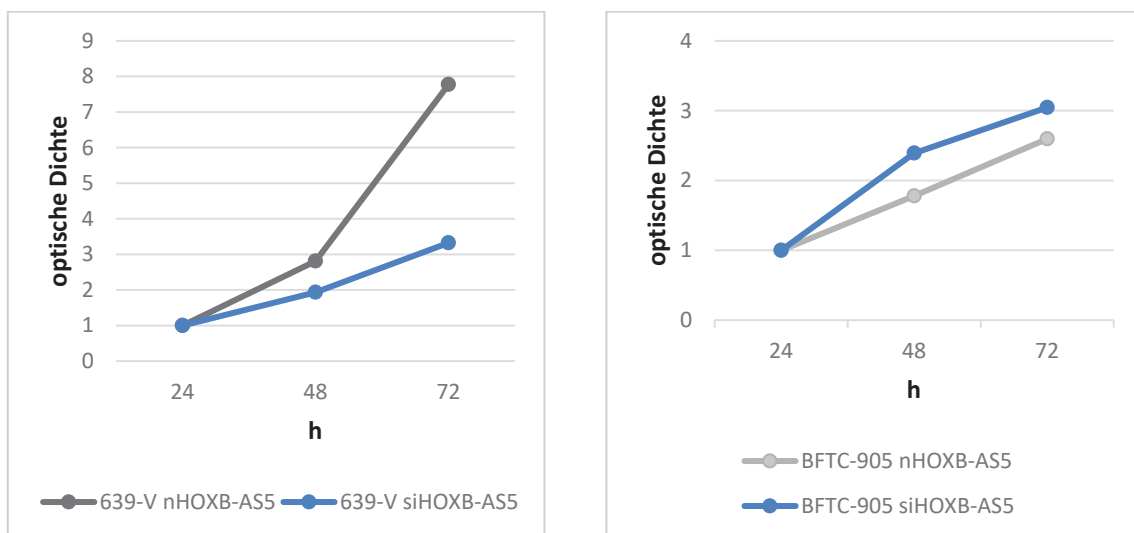


Abb. 3.34: Zellviabilität (optische Dichte) von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB-AS5. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB-AS5 sind mit siHOXB-AS5, Kontrollen sind mit nHOXB-AS5 bezeichnet. Signifikante Unterschiede sind mit* gekennzeichnet.

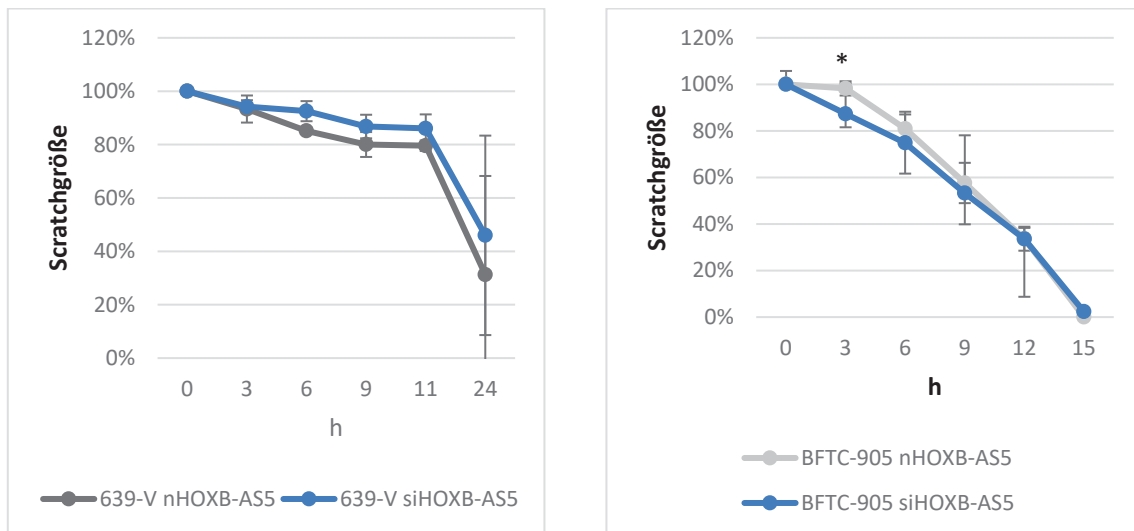


Abb. 3.35: Migrationsvermögen (Scratchgröße) von UC-Zelllinien mit experimentell vermindertem HOXB-AS5. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB-AS5 sind mit siHOXB-AS5, Kontrollen sind mit nHOXB-AS5 bezeichnet. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

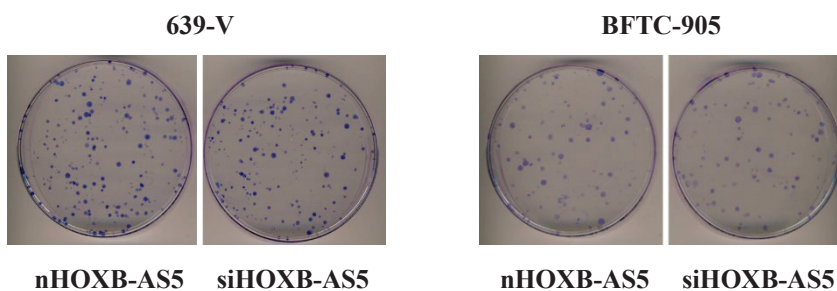


Abb. 3.36: Koloniebildungstests von UC-Zelllinien mit HOXB-AS5 Knockdown. Zellen mit spezifischer siRNA gegen HOXB-AS5 sind mit siHOXB-AS5, Kontrollen sind mit nHOXB-AS5 bezeichnet.

3.7 Exkurs zu HOX-Genen im Ösophaguskarzinom

Zur Untersuchung der Rolle der HOX-Gene im Ösophaguskarzinom stehen Microarray Daten im *Gene Expression Omnibus* (GEO) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) zur Verfügung, anhand derer die HOX-Genexpression in den verschiedenen Geweben verglichen wurde (Abb. 3.40).

Zur ergänzenden Bewertung erfolgte die Veranschaulichung der HOX-Genexpression in EAC und ESCC anhand von Daten des Cancer Genome Atlas (TCGA) mittels Erstellung einer *Heatmap*. Dies erfolgte mittels der Software *Morpheus* des Broad Institute; <https://software.broadinstitute.org/morpheus/> (Abb. 3.41).

Zusätzlich wurden in einem kleinen Probenet von Zelllinien bestehend aus 4 EAC-Zelllinien (OE-19, OE-33, PT1590 und LN1590) und 5 ESCC-Zelllinien (COLO-680N, KYSE-30, KYSE-270, KYSE-410 und KYSE-520) die HOXB-Gene und ncRNAs des HOXB-Locus mittels quantitativer RT-PCR auf RNA-Ebene bestimmt und verglichen (Abb. 3.37 - 3.39). LN1590 stammt aus einer Lymphknotenmetastase der EAC-Zelllinie PT1590.

3.7.1 Expression von HOXB-Genen und ncRNAs des HOXB-Locus in EAC- und ESCC-Zelllinien

Der Expressionsvergleich von HOXB-Genen und lncRNAs des HOXB-Locus in EAC- zu ESCC-Zelllinien ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Expression der HOXB-Gene unterlag sowohl in EAC- als auch in ESCC-Zelllinien einer starken Streuung. In den EAC-Zellen war diese etwas ausgeprägter. Häufige Ausreißer unter den ESCC-Zellen waren COLO-680N mit vermehrt hoher Expression und KYSE-30 mit häufiger niedriger Expression der Gene. Tendenziell waren HOXB-Gene und lncRNAs des HOXB-Locus in den EAC-Zellen höher exprimiert als in den ESCC-Zellen. Dies betraf *HOXB4*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB8*, *HOXB9*, *HOXB-AS3* und *HOXBAS-4*. Die Abbildung 3.37 veranschaulicht die erhobenen Daten. Ausnahmen mit vergleichbarem Mittelwert in EAC und ESCC bildeten *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB7*, *HOXB13* und *HOXB-AS5*. Davon waren *HOXB3*, *HOXB6* und *HOXB13* im ESCC im Vergleich zu den anderen HOX-Genen höher exprimiert. *HOXB-AS5* war in allen ESCC-Zelllinien nur sehr gering exprimiert.

Es fällt auf, dass die HOXB-Expression in LN1590 in nahezu allen Fällen, ausgenommen von *HOXB-AS4* und *HOXB13*, stark von der in der Schwesterzelllinie PT1590 gemessenen abweicht; die Expression der jeweiligen Gene und lncRNAs war in der Zelllinie aus der LK-Metastase durchgehend vermindert (Abb. 3.38).

Die microRNAs des HOXB-Locus waren in den EAC-Zellen ebenfalls stärker zu detektieren als in den ESCC-Zellen. Auch hier zeigten PT1590 und LN1590 starke Unterschiede in der Expression. LN1590 wies die stärkste Expression an *MIR196a* auf (Abb. 3.39).

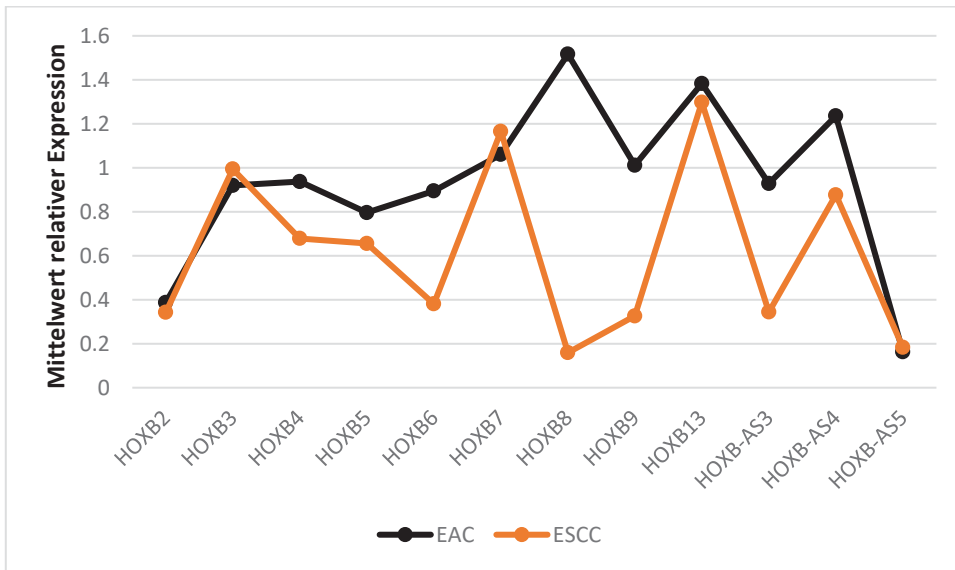


Abb. 3.37: RNA-Expression von HOXB-Genen und lncRNAs des HOXB-Locus in EAC- und ESCC-Zelllinien relativ zu *TBP*. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte aus EAC- und ESCC-Zelllinien.

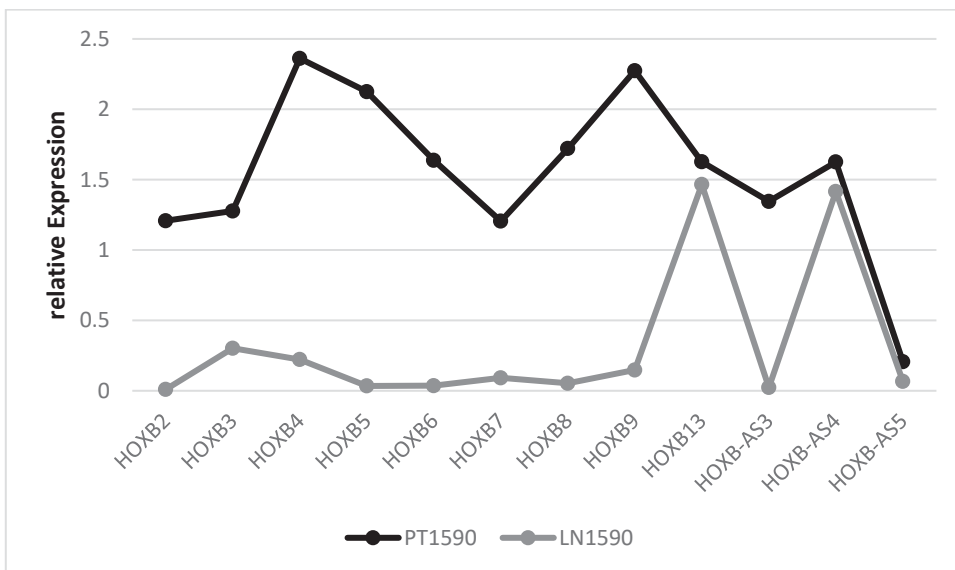


Abb. 3.38: RNA-Expression von HOXB-Genen und lncRNAs des HOXB-Locus in der EAC-Zelllinie PT1590 und zugehöriger LK-Metastase LN1590 relativ zu *TBP*. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert.

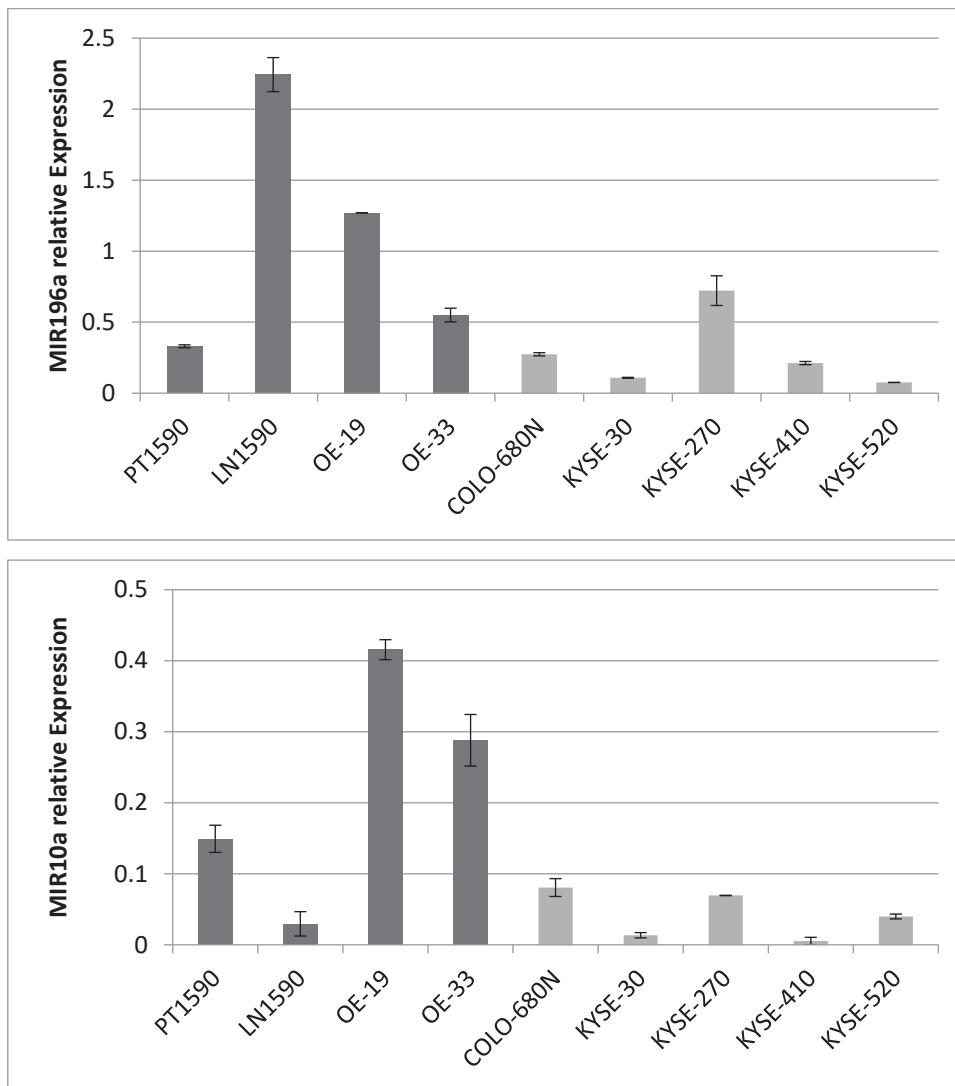


Abb. 3.39: RNA-Expression von MIR196a und MIR10a in EAC- und ESCC-Zelllinien relativ zu *RNU6B*. cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert.

3.7.2 Statistische Analyse öffentlicher Genexpressionsdaten zur HOX-Genexpression im EC

Die öffentlichen GEO Daten (GSE26886) bestehen aus RNA-Expressions-Daten von Microarray-Untersuchungen in Gewebeproben von 20 BEs, 21 EACs, 9 ESCCs und 19 N ESCs, die aus der Charité Berlin stammen und von der Arbeitsgruppe um Qing Wang erhoben wurden. Mit diesen Daten führte ich eine statistische Analyse zum Vergleich der HOX-Genexpression in den verschiedenen Geweben durch und verglich BE, EAC und ESCC mit NESC. Zusätzlich wurde auf Unterschiede zwischen EAC und ESCC getestet. Zu *HOXA9* waren keine Array-Messungen erfolgt, so dass diese nicht in die Datenverarbeitung einfließen konnten. Die Testung nach Mann-Whitney-U ergab signifikante Unterschiede (mit $p < 0,05$) in einer Vielzahl von Tumoren und Metaplasien gegenüber dem

Normalgewebe, sowie zwischen EAC und ESCC, die der Abbildung 3.40 zu entnehmen sind. In einigen Fällen wurden mehrere Sonden zur Detektion eines Genes verwendet. Hierbei ist auffällig, dass diese nicht immer zu einheitlichen Ergebnissen kamen.

Außer für die Gene *HOXA6* und *HOXC5*, für die keinerlei veränderte Expression festzustellen war, finden sich zahlreiche Dysregulationen einzelner Gene gegenüber dem Normalgewebe. Zehn von 38 HOX-Genen zeigten einheitlich in allen drei Entitäten einen signifikanten Unterschied zum Normalgewebe, der sich entweder in gesteigerter oder verminderter Expression äußert. Hierzu zählen die *HOXA* Gene *1*, *2*, *10*, *11* und *13*, die *HOXB*-Gene *7* und *13*, die *HOXC*-Gene *9* und *10* sowie *HOXD11*.

Bei sechs weiteren Genen, *HOXA3*, *HOXB3*, *HOXB6*, *HOXB8*, *HOXD1* und *HOXD9*, hingen die Ergebnisse stark von den jeweiligen Sonden ab.

Zusätzlich wurde, wie im Zelllinienversuch, auf Unterschiede zwischen EAC und ESCC getestet. Mittlere *HOXB*-Gene zeigten bis auf *HOXB5* keine erhöhte Expression im EAC gegenüber ESCC. In EAC und ESCC unterschied sich die Expression von 13 HOX-Genen signifikant voneinander. Dabei waren 11 von 13 Genen im Adenokarzinom niedriger exprimiert. Insbesondere das *HOXD*-Cluster fiel durch eine einheitlich verminderte Expression im EAC gegenüber ESCC auf. Dagegen ergaben sich im Expressionsvergleich des *HOXC*-Clusters innerhalb beider Entitäten keine Unterschiede, mit der Ausnahme von *HOXC13*, obwohl *HOXC4*, *HOXC6*, *HOXC11* und *HOXC12* in EAC und ESCC differentiell gegenüber dem Normalgewebe exprimiert waren.

3.7.3 HOX-Genexpression in EAC und ESCC der TCGA Kohorte

Anhand öffentlich zugänglicher TCGA Expressionsdaten für das EC wurde die Expression der HOX-Gene in EAC und ESCC in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 3.41). Jede Spalte entspricht einer Probe. Die Expression der angegebenen HOX-Gene sind zeilenweise abzulesen. Die Farbskala gibt das Expressionsniveau innerhalb einer Zeile wieder und dient auch dem Vergleich von EAC (Abb. 3.41 oben) und ESCC (Abb. 3.41 unten).

Auch hier fällt das *HOXD*-Cluster durch eine geringere Expression im EAC auf.

Die weiteren HOX-Gene sind im EAC tendenziell vermehrt gegenüber den sieben NEC-Proben exprimiert. *HOXC4* und *HOXC5* bilden hier eine Ausnahme. Die hohe Expression mittlerer *HOXB*-Gene im EAC ist besonders auffällig.

Von den mittleren *HOXB*-Genen ist *HOXB7* im ESCC deutlich exprimiert. Für *HOXD10*, *HOXD11*, und *HOXD13* ergibt sich im ESCC ebenfalls eine starke Expression.

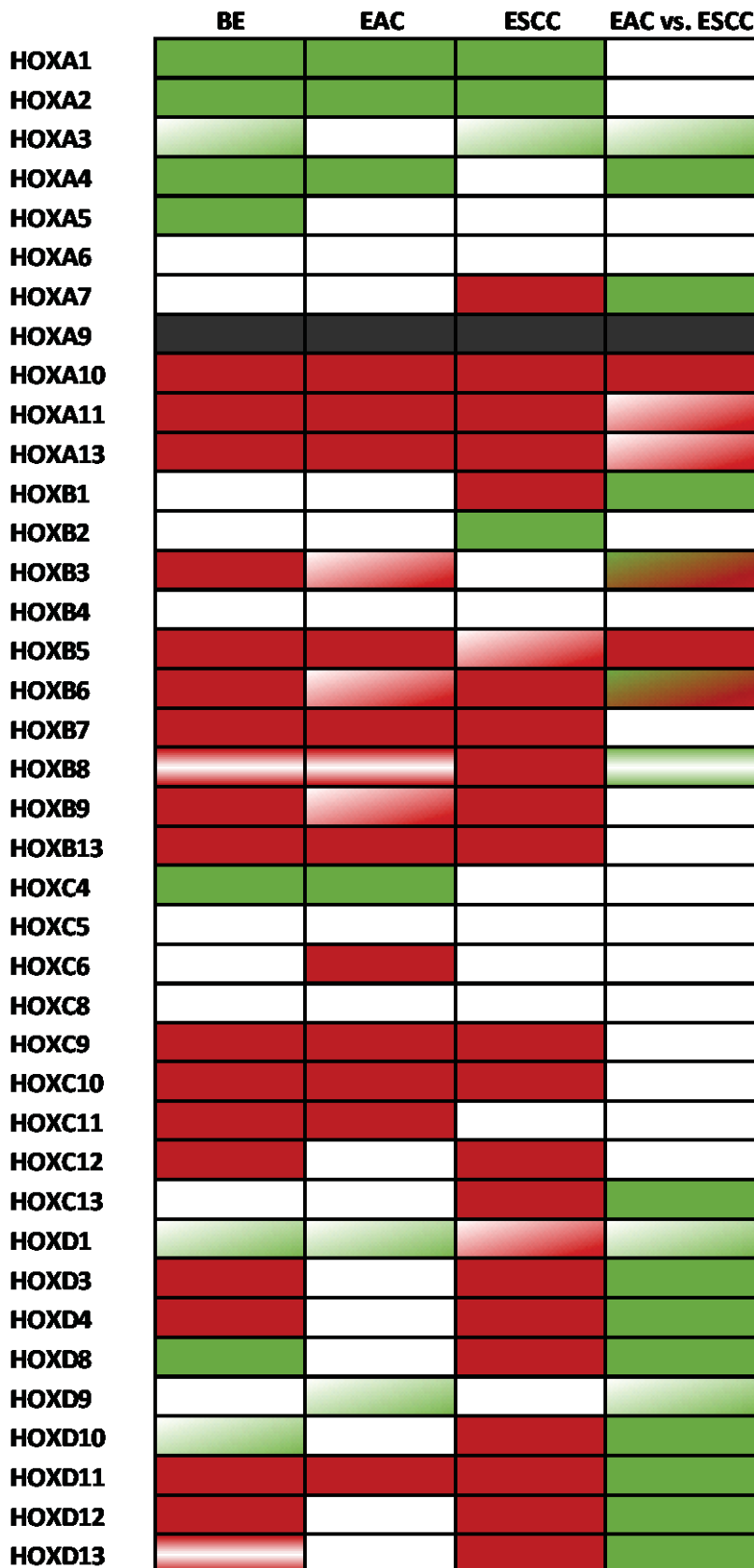


Abb. 3.40: *Heatmap* der vergleichenden RNA-Expression in Ösophagusgeweben öffentlicher GEO-Daten (GSE26886). BE, EAC und ESCC wurden mit NESC verglichen. Die letzte Spalte vergleicht EAC mit ESCC. Statistische Testung erfolgte nach Mann-Whitney U, $p < 0,05$. Rote (erhöhte Expression) und grüne (verminderte Expression) Felder bedeuten signifikanten Unterschied zum NESC bzw. ESCC. Teilweise gefärbte Felder zeigen sondenspezifisch unterschiedliche Ergebnisse an (diagonale Färbung=Hälfte der Sonden signifikant; horizontale Färbung=Drittel der Sonden signifikant). Zu grauen Feldern lagen keine Daten vor.

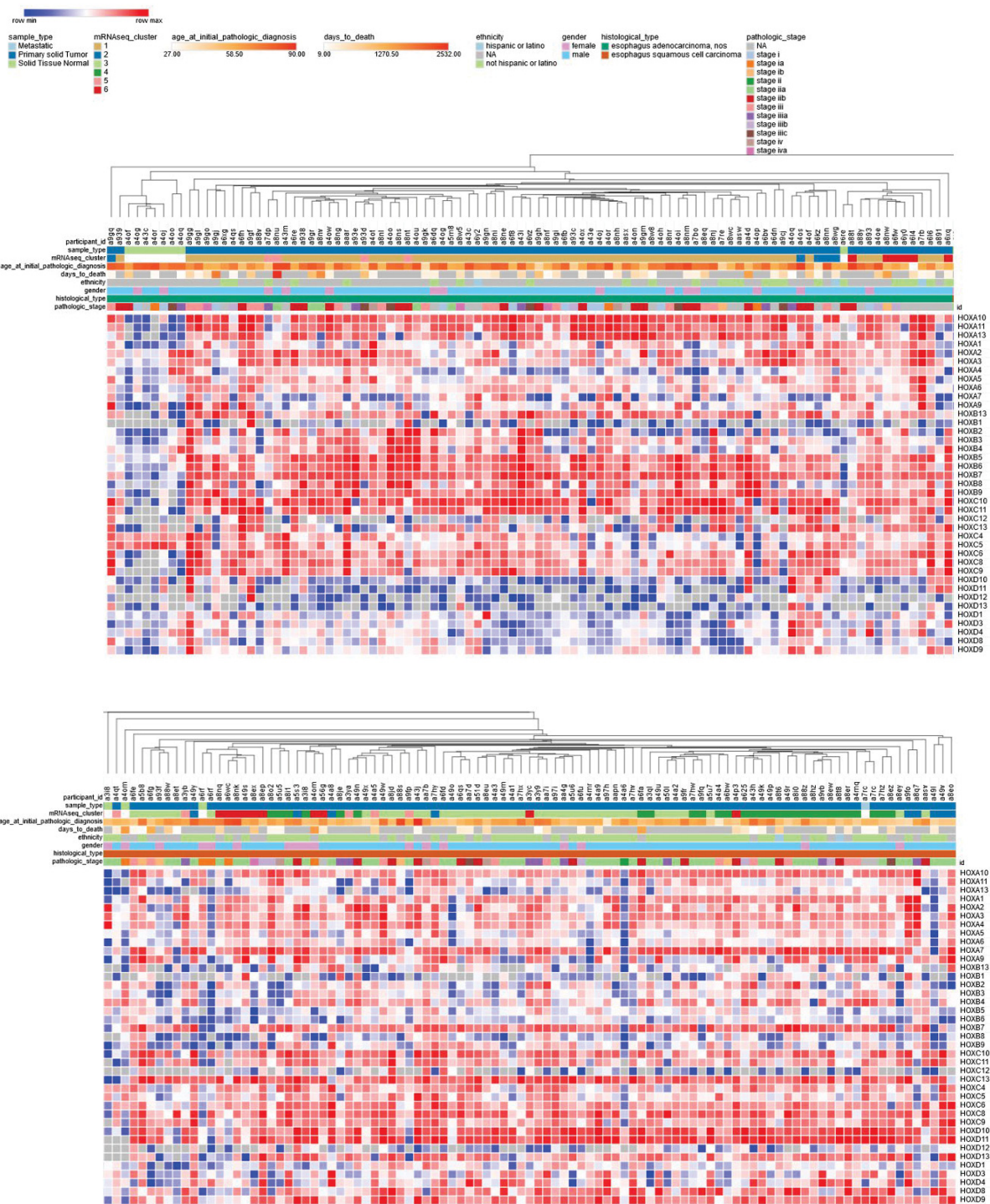


Abb. 3.41: *Heatmap* der HOX-Genexpression in EAC (oben) und ESCC (unten) anhand von TCGA Daten. Jede Spalte ist einem Patienten zugeordnet. Jede Zeile gibt die Expression des rechtsseitig angegebenen HOX-Gens wieder. Rote Felder = erhöhte Expression und blaue Felder = verminderte Expression. Die erste Farbzeile (*sample type*) definiert NESC (grün) und EAC bzw. ESCC (blau).

4 Diskussion

4.1 Aberrant exprimierte HOXB-Gene und nicht-kodierende Transkripte des HOXB-Locus im UC

Eine grundlegende Frage dieser Arbeit war, ob HOXB-Gene und benachbarte nicht-kodierende RNAs in UC-Zelllinien, im Vergleich zu normalen uroepithelialen Zellen, differentiell exprimiert sind. Der Expressionsvergleich für die einzelnen HOXB-Gene zwischen 13 UC-Zelllinien gegenüber zwei NU-Zelllinien ergab drei kodierende HOXB-Gene und zwei lncRNAs welche in UC-Zelllinien verändert exprimiert sind. Die proteinkodierenden Gene *HOXB3*, *HOXB5* und *HOXB6*, die microRNA MIR10a sowie die lncRNAs HOXB-AS3 und HOXB-AS4 waren in den getesteten Zelllinien signifikant geringer exprimiert. Die Zelllinie HT-1376 zeigte keine Expression von HOXB-Genen. Tatsächlich ist diese Zelllinie durch einen Verlust von Genkopien auf Chromosom 17q gekennzeichnet (87).

Die signifikant verminderte Expression der oben genannten Gene ist vereinbar mit Ergebnissen von Vallot et. al. und Aine et.al., die eine verstärkte DNA-Methylierung im Promotorbereich der Gene *HOXB3*, *HOXB4*, *HOXB5*, aber auch anderer HOX-Regionen in UC-Geweben nachweisen konnten; verstärkte DNA-Methylierung in Promoterbereichen lässt eine verminderte transkriptionelle Aktivität vermuten (26, 54). Zusätzlich hat sich gezeigt, dass Hypermethylierungen der HOX-Gene in undifferenzierten und aggressiven UCs trotz erhöhter DNA-Kopienzahl in verminderter Expression resultieren; für den BASQ-Subtyp konnte eine spezifische Hypermethylierung mit einem Expressionsverlust von HOXA- und HOXB-Genen detektiert werden (25, 26). Der Verlust der HOX-Genexpression könnte somit ein Tumor-assoziiertes Mechanismus sein, welcher sich als signifikant verminderte Expression in den oben genannten HOXB-Genen und verminderter Expression ohne Signifikanz in vier weiteren (*HOXB4*, *HOXB7*, *HOXB8* und *HOXB9*) sowie der ncRNA MIR196a niederschlägt.

HOXB2 und *HOXB13* fielen durch eine erhöhte Expression in einigen Zelllinien auf, welche für *HOXB13* besonders deutlich ausgeprägt war. Diese beiden Gene sind somit nicht von der epigenetischen Herabregulation mittlerer HOXB-Gene betroffen. Tatsächlich handelt es sich um die am weitesten 3' und 5' gelegenen Gene des HOXB-Locus mit entsprechender örtlicher Entfernung zu den Nachbargenen, nämlich 91 kBp im Falle von *HOXB13* und 3 kBp im Falle von *HOXB2*.

Beide Gene sind bekannt für tumorfördernde Effekte in anderen Entitäten (35-38, 43, 44). Die aberrante *HOXB2*- und *HOXB13*-Expression in den Zelllinien wurde daher näher untersucht, inklusive Proteinbestimmung und funktioneller Untersuchung nach gezielter Expressionsveränderung (siehe 4.2 und 4.3).

Korrelationsanalysen von lncRNAs des HOXB-Locus mit weiteren HOXB-Genen erbrachten sowohl positive, als auch negative Korrelationen. Die lncRNA HOXB-AS3 war signifikant mit den mittleren HOXB-Genen korreliert. Die stärksten Korrelationen waren positive Assoziationen zwischen HOXB-AS5 und HOXB13, HOXB-AS3 und HOXB3 sowie HOXB5 und HOXB6 mit Pearson Korrelationskoeffizienten zwischen 0,8 und 0,98. So wurde *HOXB13* als mögliches Zielgen von HOXB-AS5 *in cis* identifiziert und exemplarisch untersucht. Auswirkungen auf die Expression von *HOXB13* konnten nicht detektiert werden und machen eine entsprechende regulatorische Funktion von HOXB-AS5 *in cis* unwahrscheinlich. Vielmehr scheint auch hier ein ähnliches Expressionsmuster benachbarter Gene zu bestehen, das auf eine gemeinsame Regulation hinweist. Hinweise auf einen Mechanismus epigenetischer Inaktivierung der *HOXB13*-Promoterregion durch HOXB-AS5, wie sie kürzlich für Glioblastomzellen beschrieben wurde, ergaben sich nicht (68).

Für die microRNAs des HOXB-Locus wurden ebenfalls erniedrigte Expressionen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Entgegen dem zu erwartenden Mechanismus war ihre Expression positiv mit ihren möglichen Zielgenen im Locus korreliert. So war MIR10a mit HOXB3, HOXB4 und HOXB5 und MIR196a mit HOXB6, HOXB8 und HOXB9 signifikant positiv korreliert.

In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen zu funktionellen Wirkungen der HOXB-Gene in soliden Tumoren, mit Ausnahme von *HOXB13* (siehe 4.3). In anderen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom, dem oralen Plattenepithelkarzinom oder Zelllinien des malignen Melanoms sind *HOXB3*, *HOXB7*, *HOXB8* und *HOXB9* verstärkt exprimiert und ihnen wird eine onkogene Wirkung zugeschrieben (58, 59, 88, 89). Während *HOXB7* als Zielgen von MIR196a in Zelllinien des Malignen Melanoms nach verminderter MIR196a-Expression zur Aktivierung des TGF- β -Signalwegs führt, scheint dieser Mechanismus für UC-Zelllinien unwahrscheinlich (89), denn zwischen *HOXB7* und MIR196a ergab sich keine Korrelation. Zum anderen war MIR196a niedriger exprimiert, so dass eine konsekutive Erhöhung von Zielgenen, durch mangelnde Translationshemmung, zu erwarten wäre. Bisher sind in der Literatur onkogene Wirkungen durch erhöhte Expression

von MIR196a vordergründig (90). Dennoch wird eine verminderte Expression ebenfalls Auswirkungen auf die Expression nachgeschalteter Gene haben, so dass eine tumorsuppressive Wirkung durch erniedrigte Expression denkbar ist. Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass niedrigere Expression von MIR10a mit besserem Gesamtüberleben und rezidivfreiem Überleben beim Urothelkarzinom einhergeht (91).

Die parallelen Expressionsmuster benachbarter Gene, teils entgegen der zu erwartenden negativen Korrelation im Falle der microRNAs und ihrer Zielgene, sowie die fehlende Wirkung der lncRNA HOXB-AS5 *in cis* stützen die Annahme einer Inaktivierung einer größeren genomischen Region, besonders markant in HT-1376, wobei hier auch genetische Verluste auf Chromosom 17q zur fehlenden HOXB-Expression beitragen könnten. Mögliche Ursache könnte ansonsten eine epigenetische Inaktivierung sein, auf die - wie oben erwähnt - bereits Hinweise vorliegen (25, 26, 54). Solch eine gemeinsame epigenetische Repression würde erklären, warum insbesondere HOXB-AS3 mit allen HOXB-Genen von *HOXB3* bis *HOXB9* signifikant positiv korreliert. Spezifische Untersuchungen zum DNA-Methylierungsgrad der HOXB-Gene in UC-Zelllinien könnten die Hypothese stützen, dass mittlere HOXB-Gene und HOXB-lncRNAs durch DNA-Hypermethylierung geringer exprimiert werden. Ebenso stellt sich die Frage nach dem übergeordneten Mechanismus, welcher zum epigenetischen *Silencing* führt.

Die von Luo et. al. beobachtete erhöhte Expression von *HOXB5* in den Zelllinien 5637, T-24, RT-4, und HT-1376 bestätigte sich in dieser Arbeit nicht. Dies ist möglicherweise durch die unterschiedliche experimentelle Normalkontrolle zu erklären. Während in dieser Arbeit normale Urothelzellen als Vergleich dienten, nutzten Luo et al. HEK-293T Zellen, also menschliche embryonale Nierenzellen, die mit Genen des SV-40-Virus immortalisiert sind, als Normalkontrolle (57).

Aus Korrelationsanalysen von lncRNAs des HOXB-Locus mit HOX-Genen anderer Loci ergaben sich potenzielle Zielgene zur Prüfung einer Wirkung der lncRNAs *in trans*. Exemplarisch erfolgte die Untersuchung einer Wirkung von HOXB-AS5 *in cis* auf *HOXB13*; die Ergebnisse sprechen jedoch eher für eine Co-Regulation (s. o.). Ebenfalls auf Grund positiver Korrelation wurde die Hypothese einer möglichen Transkriptionsaktivierung von *HOXC11* durch HOXB-AS5 gestellt. Die experimentelle Modulation von HOXB-AS5 beeinflusste auch die Expression von *HOXC11* nicht signifikant, so dass eine Wirkung der lncRNA *in trans* auf dieses Gen nicht bestätigt werden konnte. Auch HOXB-AS3 und

HOXB-AS4 zeigte positive Korrelationen mit HOX-Genen anderer Loci, welche auf Funktionen *in trans* deuten; diese wurden jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

HOXB-AS4 wies zusätzlich als einziges der Transkripte des HOXB-Locus eine Korrelation mit uroepithelialen Differenzierungsmarkern auf. Es ergab sich eine positive Korrelation mit CK5 und eine inverse Korrelation mit CK20. Da CK20 als Marker gut differenzierter uroepithelialer Zellen und CK5 als Marker basaler Zellen gilt, ist die gegensätzliche Korrelation mit HOXB-AS4 interessant in Hinblick auf den Differenzierungszustand. Es könnte sein, dass diese lncRNA einen Marker für basale Differenzierung und den BASQ-Subtyp des UC darstellt, der durch CK5+/CK20- gekennzeichnet ist.

Insgesamt war HOXB-AS4 in den UC-Zelllinien vermindert exprimiert gegenüber den uroepithelialen Kontrollen. Wenn auch oftmals schwächer, exprimierten bis auf HT-1376 alle Zelllinien mit basalem Phänotyp HOXB-AS4. Solche Zelllinien sind BFTC-905, 5637, VM-CUB1 und HT-1376 (92). Auf einen Verlust jeglicher HOXB-Expression in der HT-1376 wurde bereits weiter oben hingewiesen. Interessanterweise exprimierten die beiden Zelllinien mit „luminaler“ Genexpression, RT-4 und RT-112, HOXB-AS4 nicht (92). Fehlende Expression von HOXB-AS4 im UC könnte somit mit einer „luminalen“ Differenzierung einhergehen.

Die Untersuchung möglicher Funktionsmechanismen wie auch die Bestimmung der HOXB-AS4-Expression in einem größeren Probenset, vor allem im Gewebe, könnten hier weiteren Aufschluss bringen.

Weiterführend wurden HOXB2, HOXB13 und HOXB-AS5 funktionell untersucht (s. u.). Bei diesen Genen wurde auch die RNA-Expression in Tumor- und Normalgeweben gemessen. Hier wurde jedoch nur im Fall von HOXB2 ein konsistentes Ergebnis zu den Messungen in den Zelllinien detektiert (s.u.). Die Expression von *HOXB13* und HOXB-AS5 divergierte jedoch deutlich und war in UC-Geweben niedriger als in Normal-Geweben; HOXB-AS5 war in UC-Geweben sogar signifikant niedriger exprimiert. Dieser Effekt ist vor allem der unterschiedlichen Expression in den Kontrollen zu schulden. Während in den uroepithelialen Kontrollzellen nahezu keine Expression an *HOXB13* und HOXB-AS5 ermittelt werden konnte, wiesen die Normalgewebe eine deutliche Expression auf.

Abweichend zu diesen Ergebnissen beschrieben Marra et. al. eine erhöhte Expression von *HOXB13* in einem Probenset von 18 UC-Geweben, welche in MIUCs am stärksten ausgeprägt war (56). Als Referenzgen diente dort β -Aktin anstatt *TBP*. Zehn Jahre zuvor

konnte mit dem qualitativen PCR-Verfahren noch kein quantitativer Unterschied in der Expression von *HOXB13* in 15 untersuchten Gewebepaaren erfasst werden (55).

Diese deutlich abweichenden Ergebnisse zwischen Zelllinien und Gewebe und in der Detektion der *HOXB13*-Expression in verschiedenen Gewebe-Sets werfen Fragen auf. Ähnliche Probleme mit der Übertragbarkeit der HOX-Genexpression von Zelllinien auf Gewebe ergaben sich als Cantile et. al. 2003 die Expression von *HOXB3* untersuchten. In den UC-Zelllinien war *HOXB3* signifikant niedriger exprimiert als im Urothel. In 15 UC-Geweben und angrenzendem Normalgeweben wurde *HOXB3* mittels qualitativer RT-PCR detektiert. Es ergab sich eine Expression in 4 von 15 UCs während das Normalgewebe nun keine Expression aufwies (55). Auch hier ergab sich die Divergenz in der Expressionsbestimmung der Kontrolle.

Auf Grund der abweichenden Ergebnisse in Gewebe und Zelllinien sollte die Übertragung von Ergebnissen der HOXB-Expression zurückhaltend erfolgen und es bedarf der Expressionsbestimmung dieser Gene in einem umfangreichen Probenstet an Tumor- und Normalgewebe. Hier könnten ergänzende immunhistochemische Färbungen Aufschluss bringen, in welchen Zellpopulationen die entsprechenden HOXB-Gene bzw. -Proteine vorherrschen, da Expressionsmessungen aus Gewebe-Extrakten immer Mischpopulationen erfassen. Dies gilt auch speziell in Hinblick auf die potenziellen Auswirkungen einer erhöhten *HOXB13*-Expression (s. u.).

4.2 HOXB2 als potenzieller Tumorsuppressor im UC

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an UC-Zelllinien ergaben keinen einheitlichen Unterschied in der *HOXB2*-Expression zwischen UC-Zelllinien und Normalkontrollen. Zelllinien mit mesenchyalem Phänotyp wiesen allerdings in den RNA-Messungen eine höhere *HOXB2*-Expression auf als Zellen mit epitheliale Phänotyp. In den Geweben war die Expression von *HOXB2* in den Tumoren tendenziell höher, jedoch ohne statistische Signifikanz, was womöglich durch eine geringe Probenzahl bedingt ist. Auf die bedingte Übertragbarkeit von HOX-Genexpressionsbestimmungen zwischen Zelllinien und Geweben, unter anderem auf Grund des Vorliegens von Mischpopulationen in den Geweben, und die Notwendigkeit ergänzender immunhistochemischer Färbungen, wurde weiter oben bereits hingewiesen.

Eine hohe Expression an *HOXB2* in den Zelllinien SW-1710, 253-J, 639-V, T-24 und UM-UC-3 ließ sich auf Proteinebene nur bedingt reproduzieren. Dies ist unter anderem der

erschweren die Detektion mit dem im Handel erhältlichen Antikörper geschuldet. Entsprechend war auch der Nachweis einer reduzierten Proteinexpression nach Transfektion von siRNA gegen HOXB2 schwierig. Während der RNA-Nachweis von HOXB2 nach siRNA-vermitteltem Knockdown deutlich reduziert war, war die Reduktion an HOXB2-Protein in geringerem Maße nachweisbar. Es ist möglich, dass eine effektivere Reduktion von HOXB2 auf Proteinebene auch deutlichere Auswirkungen auf die durchgeführten funktionellen Untersuchungen gehabt hätte.

Neben der Beobachtung vermehrter *HOXB2*-Expression in mesenchymalen Zelllinien, ergaben Korrelationsanalysen mit Differenzierungsmarkern eine signifikant positive Korrelation nach Pearson von HOXB2 mit dem mesenchymalen Marker Vimentin. Die epithelialen Marker E-Cadherin und miR200c waren entsprechend negativ korreliert und ließen auf einen Zusammenhang von hoher *HOXB2*-Expression mit EMT schließen. Eine direkte Beeinflussung der *Vimentin*-Expression durch Verminderung von HOXB2 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Ebenso ergaben sich keine Expressionsänderungen von *CK5*, *CK14* und *CK20*.

Weiterhin resultierte die ektopische Expression von $\Delta Np63$ zur Induktion von MET in 639-V Zellen tatsächlich in einer signifikanten Verminderung der *HOXB2*-Expression. In T-24 und 253-J Zellen blieb die erhöhte Expression von $\Delta Np63$ jedoch ohne Auswirkungen auf die *HOXB2*-Expression, so dass hier ein lediglich zelllinienspezifischer Effekt vorliegt.

Trotz der fehlenden Auswirkungen künstlich verminderter *HOXB2*-Expression auf messbare Differenzierungsmarker deuten die Korrelationsanalysen weiterhin auf eine enge Beziehung zwischen HOXB2 und EMT. Die positive Korrelation könnte daher rühren, dass sowohl EMT, als auch HOXB2 durch einen gemeinsamen Faktor reguliert werden.

Die Zellen mit künstlich erniedrigtem HOXB2 fielen morphologisch durch einen epithelialeren Charakter auf und konnten in der Routinekultivierung stärker verdünnt werden, so dass sich der Verdacht einer stärkeren Proliferationskapazität von Zellen mit HOXB2 Knockdown ergab. In den weiterführenden funktionellen Tests zu HOXB2 ergaben sich dennoch keine eindeutigen Veränderungen im Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen mit künstlich herabreguliertem HOXB2 im Vergleich zur Kontrolle.

In den längerfristigen Koloniebildungstests zeigte sich jedoch ein leicht gesteigertes Potenzial von Zellen mit erniedrigtem HOXB2. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass Zellen mit experimentell erhöhter *HOXB2*-Expression eine verminderte Koloniebildungsfähigkeit aufweisen. Insgesamt fielen die Unterschiede jedoch nur moderat aus. Die längerfristigen Effekte eines HOXB2-Verlustes im Koloniebildungstest deuten also

auf eine schwache tumorfördernde Wirkung verringerter *HOXB2*-Expression und umgekehrt. Es stellt sich die Frage, ob ein stabiler Knockdown auch deutlichere Unterschiede in Proliferations- und Migrationskapazität erbrächte. Proliferations- und Migrationstestung wurden 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Die Auswirkungen eines längerfristigen Knockdowns oder einer experimentellen Deletion („Knockout“) von *HOXB2* auf Proliferation und Migration sollten zukünftig untersucht werden. Zusätzlich wären Proliferations- und Migrationstests künstlich *HOXB2*-überexprimierender Zellen zu ergänzen. Wie oben bereits erwähnt, muss ebenso in Betracht gezogen werden, dass eine effektivere Reduktion des *HOXB2*-Proteins, stärkere funktionelle Auswirkungen haben könnte.

Die geschilderten Ergebnisse zu *HOXB2* stehen teilweise im Kontrast zu denen anderer Arbeitsgruppen an anderen Tumoren und sprechen für eine tumorspezifische Wirkung. *HOXB2* wurde als negativ prognostischer Marker im Adenokarzinom der Lunge und des Pankreas eingestuft (43, 93, 94). Zelllinienversuche an Mammakarzinomzelllinien ergaben demgegenüber verminderte Proliferation von Zellen mit hoher *HOXB2*-Expression (95). Im Urothelkarzinom scheint *HOXB2*, ähnlich wie im Mammakarzinom, eher eine tumorsuppressive Wirkung zu haben. Marsit et. al. beschrieben eine verminderte Expression von *HOXB2* als Folge einer DNA-Hypermethylierung des Promotors entsprechend als Risikofaktor für das Vorliegen eines invasiven UCs (27).

Demgegenüber stellten Cantile et. al. bereits 2003, analog zu der Tendenz erhöhter *HOXB2*-Expression im aktuell gemessenen Probenstet von UC-Gewebe, mittels RT-PCR Messungen in 15 Gewebepaaren eine häufige Überexpression von *HOXB2* in tumorhaltigen UC-Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe fest (55).

Wie lassen sich nun die Beobachtungen aus den Tumorgeweben mit denen in den Zelllinien in Einklang bringen? Zusammenfassend ist ein tumorsuppressiver Effekt von *HOXB2* im UC denkbar. Zellen mit erhöhter Expression von *HOXB2* haben die Tendenz zur verminderten Koloniebildungsfähigkeit; Zellen mit erniedrigter *HOXB2*-Expression reagierten gegensätzlich. Diese Beobachtung ist konsistent mit der erniedrigten Expression von *HOXB2* in invasiven UCs (27). Dennoch ist *HOXB2* in einigen Tumoren vermehrt exprimiert und es ergeben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *HOXB2* und EMT, welche sich in Korrelationsanalysen, veränderter Zellmorphologie und zelllinienspezifischen Effekten mit erniedrigter Expression von *HOXB2* nach experimenteller Überexpression von $\Delta Np63$ äußern. EMT wird aber durch Modulation der *HOXB2*-Expression nicht konsistent beeinflusst.

Entsprechend ist die Interpretation der teils widersprüchlichen Ergebnisse zu HOXB2 schwierig. Der Zusammenhang zwischen EMT und tumorsuppressiven Eigenschaften von HOXB2 im UC bleibt unklar. Nähere Untersuchungen zur Wirkungsweise und zu Zielgenen könnten weitere Klärung bringen. Hier bieten sich Microarray-Analysen nach gezielter Expressionsveränderung an, wie sie von Inamura et. al. im Adenokarzinom der Lunge bereits durchgeführt wurden (43).

4.3 *HOXB13* als potenzielles Onkogen im UC

HOXB13 war in vielen UC-Zelllinien gegenüber den Kontrollen höher exprimiert. Durch das gehäufte Auftreten eines SNP in diesem Gen beim hereditären Prostatakarzinom gehört *HOXB13* zu den bestuntersuchten Vertretern des HOXB-Locus. Demnach ist eine erhöhte Expression von *HOXB13* im Prostatakarzinom sowie im Mammakarzinom mit Resistenz gegenüber antihormoneller Therapie assoziiert (36, 37). Im UC konnten Marra et. al. 2013 erstmals eine signifikant erhöhte Expression von *HOXB13* in MIUCs gegenüber NMIUCs durch immunhistochemische Färbung ermitteln (56).

Die erhöhte Expression von *HOXB13* in einigen UC-Zelllinien ließ sich auch auf Proteinebene nachweisen. Ebenso äußerte sich eine Expressionshemmung von *HOXB13* durch siRNA in einer Reduktion von HOXB13.

Um die Auswirkungen erhöhter *HOXB13*-Expression im UC näher einzuschätzen, wurden funktionelle Tests mit künstlicher Verminderung bzw. Erhöhung der *HOXB13*-Expression durchgeführt. Durch ektopische Überexpression von *HOXB13* erwarben die UC-Zellen einen aggressiveren Phänotyp mit gesteigertem Proliferations- und Migrationspotential, sowie erhöhter Klonogenität. Analog waren zwei von drei Zelllinien nach künstlicher Verminderung der Expression von *HOXB13* durch siRNA-Transfektion signifikant weniger proliferativ und migrationsfähig; die dritte getestete Zelllinie wies zumindest dieselbe Tendenz auf. Die Koloniebildungsfähigkeit war ebenfalls vermindert und es gab eine moderat erhöhte Anzahl seneszenten Zellen.

Da unklar ist, wie diese beobachteten Effekte vermittelt werden, erscheint eine Erfassung von Zielgenen von HOXB13 sinnvoll, da diese im UC weitgehend unbekannt sind. In der Literatur sind Interaktionen mit dem Androgen- und Östrogenrezeptor sowie weiteren Homeobox-Genen wie *ALX4*, *MEIS1* und Induktionen des Zink-Output-Transporters *ZnT4*, *IL-6* und *SLUG*, einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der EMT induzieren kann, beschrieben (37, 96-99). Induktion von SLUG und Förderung von EMT durch hohe

Expression von *HOXB13* sind im UC ebenfalls denkbar. Zellen mit experimenteller *HOXB13* Verminderung erwarben einen stärker epithelialen Phänotyp und es traten gehäuft seneszente Zellen auf. In T-24 Zellen wurde ein höherer Anteil polynukleärer Zellen beobachtet, wobei hier am ehesten von Mitose ohne Zytokinese auszugehen ist. Mit dem epithelialen Marker E-Cadherin ergab sich eine geringe negative Korrelation nach Pearson ($r = -0,3$).

Eine Bindung von *HOXB13* an den *SLUG*-Promoter ist kürzlich an Adenokarzinomzellen der Lunge und zuvor an Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen worden (97, 99). Insbesondere beim NSCLC trägt eine *HOXB13*-Expression und konsekutive *SLUG*-Induktion zur Resistenz gegenüber einer Chemotherapie mit Cisplatin bei (99). Die Auswirkungen erhöhter *HOXB13*-Expression auf Cisplatin-Sensibilität im UC sind von großem Interesse und bieten einen weiteren Forschungsgegenstand mit potenziellen pharmakologischen Angriffspunkten.

Gänzlich gegensätzlich zu den Expressionsbestimmungen in den UC-Zelllinien konnte in UC-Gewebe keine erhöhte Expression von *HOXB13* ermittelt werden. Wie weiter oben bereits erörtert, wurde in den gesunden Kontrollgeweben eine deutliche Expression detektiert, welche sich in den uroepithelialen Zellen nicht nachweisen ließ. Gewebe stellen einen komplexen Zellverband dar, so dass die Frage naheliegt, in welchen Zellen des Normalgewebes *HOXB13* exprimiert wird (s. o.). Auch die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle ist relevant. Eine Dislokation von *HOXB13* in das Zytoplasma, mit folglich Verlust transkriptionsaktivierender Funktionen trotz erhöhter Expression, ist für *HOXB13* beschrieben worden und geht mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für Muskelinvasion und Rezidive einher (56). Dieses Ergebnis widerspricht dem naheliegenden Mechanismus der möglichen Aktivierung von EMT via *SLUG*-Promoter Bindung als Folge erhöhter Expression und somit Aktivität von *HOXB13*. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit ergänzender immunhistochemischer Färbungen sowie weiterer Untersuchungen von Zielgenen und Wirkmechanismen.

4.4 Fehlende Auswirkungen der lncRNA *HOXB-AS5* in den funktionellen Tests

Über die Zelllinien und Gewebe hinweg korrelierte die Expression von *HOXB-AS5* deutlich mit der von *HOXB13*. Die experimentelle Herabregulation der lncRNA ergab jedoch keine Veränderung in der Expression von *HOXB13*, so dass wie oben diskutiert eine Co-

Regulation wahrscheinlich ist. Umgekehrt veränderte jedoch die experimentelle Herabregulation von HOXB13 die HOXB-AS5-Expression signifikant, allerdings gegensätzlich orientiert in den beiden getesteten Zelllinien. Während in 639-V die Expression von HOXB-AS5 vermindert war, war in BFTC-905 eine Erhöhung zu verzeichnen.

Die Proliferations- und Migrationseigenschaften nach experimenteller Herabregulation von HOXB-AS5 blieben ohne deutliche Konsequenzen. Im Migrationsverhalten wurden lediglich T-24 Zellen signifikant aktiver. Die wenig eindeutigen Veränderungen nach HOXB-AS5-Modulation sowie die zelllinienspezifischen Ergebnisse zur Migration machen eine Aussage zur Wirkung der lncRNA schwierig. Für die lncRNA HOTAIR konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass diese zelllinienabhängig unterschiedlich wirkt (48). Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch gegen eine maßgebliche Funktion von HOXB-AS5 im UC.

4.5 Aberrant exprimierte HOX-Gene im EC

Der Vergleich der Expression von HOXB-Genen und ncRNAs des HOXB-Locus in EAC- zu ESCC-Zelllinien erfolgte über die Gegenüberstellung von Mittelwerten. Hier zeigte sich eine höhere Expression der meisten HOXB-Gene im EAC. Auch wenn es sich nur um ein sehr kleines Probenstet mit vier EAC- und fünf ESCC Zelllinien handelt, ist dieses Ergebnis kongruent mit Erkenntnissen anderer Arbeiten, welche eine Aktivierung mittlerer HOXB-Gene im BE und EAC ergaben (83, 84). Interessant war, dass die Lymphknotenmetastase der EAC-Zelllinie PT1590 bis auf *HOXB13* und *HOXB-AS4* eine niedrigere Expression aufwies. Es kam sogar zum nahezu vollständigen Verlust der Expression aller HOXB-Gene von *HOXB2* bis *HOXB9*. Abgesehen von einer Triploidie ist keine Chromosomenaberration im Sinne einer Deletion von Chromosom 17 für LN1590 bekannt, so dass ein epigenetischer Effekt wahrscheinlich ist (100). Von einer Einzelbeobachtung aus wäre es übereilt einen Bezug zwischen dem Expressionsverlust dieser Gene und Förderung lymphatischer Metastasierung zu ziehen. Dennoch lohnen sich zur Überprüfung dieser Hypothese entsprechende weiterführende Untersuchungen. Ebenso von Bedeutung könnte sein, dass MIR196a als bekannt negativ prognostischer Marker in der Lymphknotenmetastase am höchsten exprimiert war (81).

HOXB3, *HOXB7* und *HOXB13* fielen in den ESCC-Zelllinien durch hohe Expression im Vergleich zu anderen HOX-Genen auf. Da kein Vergleich zu normalen Zellen in Kultur

möglich war, kann die niedrige Expression von HOXB-AS5 sowie die hohe Expression von *HOXB3*, *HOXB7*, *HOXB13* und HOXB-AS4 in den EC-Zelllinien nur untereinander betrachtet werden.

Beim Vergleich der HOX-Genexpression in BE-, EAC- und ESCC-Geweben zu NESC-Geweben ergaben sich eine Vielzahl aberrant exprimierter HOX-Gene im EC.

Für *HOXB7* und *HOXB13* bestätigte sich in allen drei Entitäten die erhöhte Expression, welche als Tendenz im Zelllinienversuch erkennbar war. Weitere Gene mit einheitlich vermehrter Expression gegenüber NEC sind *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXC9*, *HOXC10* und *HOXD11*. *HOXA1* und *HOXA2* waren vermindert exprimiert. Die TCGA-Daten wiesen entsprechende Tendenzen auf.

Mittlere HOXB-Gene waren im EAC höher exprimiert als im gesunden Gewebe. Die Expression der mittleren HOXB-Gene im ESCC war jedoch bis auf *HOXB5* nicht geringer als im EAC. Vielmehr waren mittlere und posteriore HOXB-Gene auch im ESCC vermehrt exprimiert im Vergleich zum Normalgewebe. Eine Dysregulation mittlerer HOXB-Gene wie sie von di Pietro et. al. beschrieben worden ist, scheint somit auch im EAC und ESCC vorzuliegen (83). Vermehrte Zugewinne von Chromosom 17 im EAC wirken sich nicht differentiell auf die HOXB-Expression gegenüber ESCC aus. Trotz der unterschiedlichen Histologie und Ätiologie zeigen EAC (bzw. BE) und ESCC also Ähnlichkeiten in der aberranten Expression von HOX-Genen.

Im weiteren Vergleich von EAC zu ESCC ergaben sich jedoch auch Unterschiede. Das HOXD-Cluster fiel durch eine verminderte Expression im EAC auf. Auch die TCGA-Daten tendierten zu hoher Expression von *HOXD10*, *HOXD11* und *HOXD13* im ESCC.

HOXB3 war im Gewebe nur im BE höher exprimiert; die Expression variierte abhängig von der verwendeten Sonde im EAC. Solche Variationen werden gemeinhin als Hinweis auf Unterschiede zwischen Spleißvarianten interpretiert.

Die vorliegende Beobachtung einer ähnlichen HOXB-Expression in EAC und ESCC steht im Widerspruch zu 2007 erfolgten Microarray-Untersuchungen an 128 Tumorgeweben und Kontrollen, in denen *HOXB5* und *HOXB6* in ESCC keine vermehrte Expression gegenüber NESC aufwiesen (84). In Übereinstimmung hierzu sind in der TCGA-Kohorte mittlere HOXB-Gene, mit Ausnahme von *HOXB7*, im ESCC geringer exprimiert als im EAC. Auch die Expression von *HOXB13* im ESCC ist in den TCGA-Daten weniger ausgeprägt, obwohl weitere Arbeiten eine erhöhte Expression von *HOXB13* im ESCC bestätigen und eine hohe *HOXB13*-Expression als unabhängigen negativ prognostischen Marker identifizieren (101,

102). Li et. al. bestätigten solch eine Überexpression von *HOXB13* immunhistologisch, so wie es für zukünftige Untersuchungen zu empfehlen ist (s. o.). Möglicherweise sind ebenfalls Spleißvarianten oder eventuelle Normierungsfehler eine Erklärung für differierende Ergebnisse der Microarray-Untersuchungen.

Für das EC ergibt sich, ebenso wie für das UC, die Notwendigkeit genauerer Erkenntnisse zur Funktionsweise von *HOXB13*, auch in Hinblick auf mögliche Vermittlung einer Resistenz gegenüber platinhaltige Zytostatika.

5 Literaturverzeichnis

1. Alfred Witjes J, Lebet T, Comperat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *European urology*. 2017; 71(3): 462-475 PMID: 27375033.
2. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Robert Koch Institut. 2017; 11. Auflage.
3. Zieger K, Marcussen N, Borre M, Orntoft TF, Dyrskjot L. Consistent genomic alterations in carcinoma in situ of the urinary bladder confirm the presence of two major pathways in bladder cancer development. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009; 125(9): 2095-103. PMID: 19637316.
4. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001; 19(3): 666-75. PMID: 11157016.
5. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature reviews Cancer*. 2015; 15(1): 25-41. PMID: 25533674.
6. Kiss B, Wyatt AW, Douglas J, Skuginna V, Mo F, Anderson S, et al. Her2 alterations in muscle-invasive bladder cancer: Patient selection beyond protein expression for targeted therapy. *Scientific reports*. 2017; 7: 42713-23. PMID: 28205537.
7. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016; 387(10031): 1909-20. PMID: 26952546.
8. Cancer Genome Atlas Research. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014; 507(7492): 315-22. PMID: 24476821.
9. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *The American journal of pathology*. 2001; 158(6): 1955-9. PMID: 11395371.
10. Tan TZ, Rouanne M, Tan KT, Huang RY, Thiery JP. Molecular subtypes of urothelial bladder cancer: Results from a meta-cohort analysis of 2411 tumors. *European urology*. 2019; 75(3): 423-32. PMID: 30213523.
11. Hurst CD, Alder O, Platt FM, Droop A, Stead LF, Burns JE, et al. Genomic subtypes of non-invasive bladder cancer with distinct metabolic profile and female gender bias in KDM6A mutation frequency. *Cancer cell*. 2017; 32(5): 701-15 PMID: 29136510.
12. 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): 540-56 PMID: 28988769.
13. Sjordahl G, Lauss M, Lovgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the american association for cancer research*. 2012; 18(12): 3377-86. PMID: 22553347.
14. Eriksson P, Aine M, Veerla S, Liedberg F, Sjordahl G, Hoglund M. Molecular subtypes of urothelial carcinoma are defined by specific gene regulatory systems. *BMC medical genomics*. 2015; 8: 25-39. PMID: 26008846.
15. Marzouka NA, Eriksson P, Rovira C, Liedberg F, Sjordahl G, Hoglund M. A validation and extended description of the lund taxonomy for urothelial carcinoma using the TCGA cohort. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 3737-48. PMID: 29487377.

16. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer cell*. 2014; 25(2): 152-65. PMID: 24525232.
17. 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. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 2014; 111(8): 3110-5. PMID: 24520177.
18. Mo Q, Nikolos F, Chen F, Tramel Z, Lee YC, Hayashi K, et al. Prognostic power of a tumor differentiation gene signature for bladder urothelial carcinomas. *Journal of the national cancer institute*. 2018; 110(5): 448-59. PMID: 29342309.
19. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y, Sjudahl G, Robertson AG, Seiler R, et al. A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *European urology*. 2019. Epub 2019/09/30; <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.09.006>. PMID: 31563503.
20. 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. PMID: 27376123.
21. Gellert LL, Warrick J, Al-Ahmadie HA. Urothelial carcinoma with squamous differentiation-the pathologists perspective. *Urologic oncology*. 2015; 33(10): 437-43. PMID: 26321057.
22. Patschan O, Sjudahl G, Chebil G, Lovgren K, Lauss M, Gudjonsson S, et al. A molecular pathologic framework for risk stratification of stage T1 urothelial carcinoma. *European urology*. 2015; 68(5): 824-32. PMID: 25770486.
23. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Hoyer S, Ulhoi BP, et al. Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma. *Cancer cell*. 2016; 30(1): 27-42. PMID: 27321955.
24. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, van Rhijn BWG, Winters B, Douglas J, et al. Impact of molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer on predicting response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *European urology*. 2017; 72(4): 544-54. PMID: 28390739.
25. Lauss M, Aine M, Sjudahl G, Veerla S, Patschan O, Gudjonsson S, et al. DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status. *Epigenetics*. 2012; 7(8): 858-67. PMID: 22705924.
26. Aine M, Sjudahl G, Eriksson P, Veerla S, Lindgren D, Ringner M, et al. Integrative epigenomic analysis of differential DNA methylation in urothelial carcinoma. *Genome medicine*. 2015; 7(1): 23-42. PMID: 25810763.
27. Marsit CJ, Houseman EA, Christensen BC, Gagne L, Wrensch MR, Nelson HH, et al. Identification of methylated genes associated with aggressive bladder cancer. *Plos one*. 2010; 5(8): e12334. PMID: 20808801.
28. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annual review of genetics*. 1986; 20: 147-73. PMID: 2880555.
29. Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature reviews cancer*. 2002; 2(10): 777-85. PMID: 12360280.
30. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *The journal of pathology*. 2005; 205(2): 154-71. PMID: 15643670.
31. Scott MP. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell*. 1992; 71(4): 551-3. PMID: 1358459.
32. Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfroy B, Poupon MF, Dutrillaux B. Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenetics and cell genetics*. 1996; 73(1-2): 114-5. PMID: 8646877.

33. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*. 1992; 68(2): 283-302. PMID: 1346368.
34. Collins CT, Hess JL. Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets. *Oncogene*. 2016; 35(9): 1090-8. PMID: 26028034.
35. Witte JS, Mefford J, Plummer SJ, Liu J, Cheng I, Klein EA, et al. HOXB13 mutation and prostate cancer: studies of siblings and aggressive disease. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2013; 22(4): 675-80. PMID: 23396964.
36. Kim YR, Oh KJ, Park RY, Xuan NT, Kang TW, Kwon DD, et al. HOXB13 promotes androgen independent growth of LNCaP prostate cancer cells by the activation of E2F signaling. *Molecular cancer*. 2010; 9: 124-37 PMID: 20504375.
37. Shah N, Jin K, Cruz LA, Park S, Sadik H, Cho S, et al. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ERalpha and inducing IL-6 expression. *Cancer research*. 2013; 73(17): 5449-58. PMID: 23832664.
38. Miao J, Wang Z, Provencher H, Muir B, Dahiya S, Carney E, et al. HOXB13 promotes ovarian cancer progression. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 2007; 104(43): 17093-8. PMID: 17942676.
39. Van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, et al. Detection of high-grade prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score. *European urology*. 2016; 70(5): 740-8. PMID: 27108162.
40. Leyten GH, Hessels D, Smit FP, Jannink SA, de Jong H, Melchers WJ, et al. Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer. *Clinical cancer research*. 2015; 21(13): 3061-70. PMID: 25788493.
41. Haese A, Trooskens G, Steyaert S, Hessels D, Brawer M, Vlaeminck-Guillem V, et al. Multicenter optimization and validation of a 2-Gene mRNA urine test for detection of clinically significant prostate cancer before initial prostate biopsy. *The journal of urology*. 2019; 202(2): 256-63. PMID: 31026217.
42. Vinarskaja A, Yamanaka M, Ingenwerth M, Schulz WA. DNA methylation and the HOXC6 paradox in prostate cancer. *Cancers*. 2011; 3(4): 3714-25. PMID: 24213107.
43. Inamura K, Togashi Y, Ninomiya H, Shimoji T, Noda T, Ishikawa Y. HOXB2, an adverse prognostic indicator for stage I lung adenocarcinomas, promotes invasion by transcriptional regulation of metastasis-related genes in HOP-62 non-small cell lung cancer cells. *Anticancer research*. 2008; 28(4B): 2121-7. PMID: 18751384.
44. Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, et al. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*. 2000; 405(6789): 974-8. PMID: 10879542.
45. Yan W, Liu S, Xu E, Zhang J, Zhang Y, Chen X, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8. *Oncogene*. 2013; 32(5): 599-609. PMID: 22391568.
46. Li B, Huang Q, Wei GH. The role of HOX transcription factors in cancer predisposition and progression. *Cancers*. 2019; 11(4): 528-52 PMID: 31013831.
47. Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers. *Journal of molecular medicine*. 2014; 92(8): 811-23. PMID: 24996520.
48. 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. *Molecular cancer*. 2015; 14: 108-24. PMID: 25994132.
49. Simon R, Burger H, Brinkschmidt C, Bocker W, Hertle L, Terpe HJ. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *The Journal of pathology*. 1998; 185(4): 345-51. PMID: 9828832.
50. Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, et al. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative

genomic hybridization. *The american journal of pathology*. 1998; 153(5): 1615-21. PMID: 9811354.

51. Zhao J, Richter J, Wagner U, Roth B, Schraml P, Zellweger T, et al. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer research*. 1999; 59(18): 4658-61. PMID: 10493521.

52. Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, et al. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clinical cancer research*. 2005; 11(19 Pt 1): 7012-22. PMID: 16203795.

53. Kim YJ, Yoon HY, Kim JS, Kang HW, Min BD, Kim SK, et al. HOXA9, ISL1 and ALDH1A3 methylation patterns as prognostic markers for nonmuscle invasive bladder cancer: array-based DNA methylation and expression profiling. *International journal of cancer*. 2013; 133(5): 1135-42. PMID: 23436614.

54. Vallot C, Stransky N, Bernard-Pierrot I, Herault A, Zucman-Rossi J, Chapeaublanc E, et al. A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression. *Journal of the national cancer institute*. 2011; 103(1): 47-60. PMID: 21173382.

55. Cantile M, Cindolo L, Napodano G, Altieri V, Cillo C. Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. *Oncogene*. 2003; 22(41): 6462-8. PMID: 14508527.

56. Marra L, Cantile M, Scognamiglio G, Perdona S, La Mantia E, Cerrone M, et al. Deregulation of HOX B13 expression in urinary bladder cancer progression. *Current medicinal chemistry*. 2013; 20(6): 833-9. PMID: 23276138.

57. Luo J, Cai Q, Wang W, Huang H, Zeng H, He W, et al. A microRNA-7 binding site polymorphism in HOXB5 leads to differential gene expression in bladder cancer. *Plos one*. 2012; 7(6): e40127. PMID: 22768238.

58. Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clinical cancer research*. 2011; 17(11): 3569-78. PMID: 21474578.

59. De Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, et al. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *International journal of oncology*. 2010; 36(1): 141-9. PMID: 19956843.

60. Yamashita T, Tazawa S, Yawei Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K, et al. Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *International journal of oncology*. 2006; 28(4): 931-8. PMID: 16525643.

61. Zhang Q, Su M, Lu G, Wang J. The complexity of bladder cancer: long noncoding RNAs are on the stage. *Molecular cancer*. 2013; 12(1): 101-8. PMID: 24006935.

62. Petruk S, Sedkov Y, Riley KM, Hodgson J, Schweisguth F, Hirose S, et al. Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. *Cell*. 2006; 127(6): 1209-21. PMID: 17174895.

63. Sanchez-Elsner T, Gou D, Kremmer E, Sauer F. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit drosophila Ash1 to Ultrabithorax. *Science*. 2006; 311(5764): 1118-23. PMID: 16497925.

64. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews genetics*. 2016; 17(1): 47-62. PMID: 26666209.

65. Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, et al. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*. 2007; 449(7163): 731-4. PMID: 17713478.

66. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007; 129(7): 1311-23. PMID: 17604720.
67. 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. PMID: 20393566.
68. Xiong Y, Kuang W, Lu S, Guo H, Wu M, Ye M, et al. Long noncoding RNA HOXB13-AS1 regulates HOXB13 gene methylation by interacting with EZH2 in glioma. *Cancer medicine*. 2018; 7(9): 4718-28. PMID: 30105866.
69. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004; 304(5670): 594-6. PMID: 15105502.
70. Mueller DW, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. *International journal of cancer*. 2011; 129(5): 1064-74. PMID: 21077158.
71. Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nature communications*. 2012; 3: 688-711. PMID: 22353710.
72. Woltering JM, Durston AJ. MiR-10 represses HoxB1a and HoxB3a in zebrafish. *Plos one*. 2008; 3(1): e1396. PMID: 18167555.
73. Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV, et al. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 2012; 109(6): 2078-83. PMID: 22308455.
74. Tran MN, Choi W, Wszolek MF, Navai N, Lee IL, Nitti G, et al. The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288(5): 3275-88. PMID: 23239884.
75. Jiang J, Yi BO, Ding S, Sun J, Cao W, Liu M. Demethylation drug 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced upregulation of miR-200c inhibits the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of clear cell renal cell carcinoma. *Oncology letters*. 2016; 11(5): 3167-72. PMID: 27123083.
76. Wiemer EA. Stressed tumor cell, chemosensitized cancer. *Nature medicine*. 2011; 17(12):1552-4. PMID: 22146456.
77. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews molecular cell biology*. 2014; 15(3): 178-96. PMID: 24556840.
78. Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM, et al. Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *The american journal of pathology*. 2000; 156(2): 555-66. PMID: 10666385.
79. Stoecklein NH, Knoefel WT. Disseminierte Tumorzellen bei gastrointestinalen Karzinomen – Molekulargenetische Analyse der relevanten Tumorzellen zum Aufsuchen therapeutischer Zielstrukturen für effektive adjuvante Therapien. 2006 in; *Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2005/2006*: 137-147. ISBN 3-9808514-4-3.
80. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene*. 2008; 27(52): 6667-78. PMID: 18663355.
81. Maru DM, Singh RR, Hannah C, Albarracin CT, Li YX, Abraham R, et al. MicroRNA-196a is a potential marker of progression during barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. *The american journal of pathology*. 2009; 174(5): 1940-8. PMID: 19342367.

82. Chen KN, Gu ZD, Ke Y, Li JY, Shi XT, Xu GW. Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*. 2005; 11(3): 1044-9. PMID: 15709170.
83. Di Pietro M, Lao-Sirieix P, Boyle S, Cassidy A, Castillo D, Saadi A, et al. Evidence for a functional role of epigenetically regulated midcluster HOXB genes in the development of Barrett esophagus. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. 2012; 109(23): 9077-82. PMID: 22603795.
84. Greenawalt DM, Duong C, Smyth GK, Ciavarella ML, Thompson NJ, Tiang T, et al. Gene expression profiling of esophageal cancer: comparative analysis of barrett's esophagus, adenocarcinoma, and squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*. 2007; 120(9): 1914-21. PMID: 17236199.
85. Kimchi ET, Posner MC, Park JO, Darga TE, Kocherginsky M, Karrison T, et al. Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer research*. 2005; 65(8): 3146-54. PMID: 15833844.
86. Swiatkowski S, Seifert HH, Steinhoff C, Prior A, Thievensen I, Schliess F, et al. Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines. *Experimental cell research*. 2003; 282(1): 48-57. PMID: 12490193.
87. Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodriguez-Santiago B, Mendez-Pertuz M, Auer H, et al. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics*. 2015; 16: 403-17. PMID: 25997541.
88. Kanai M, Hamada J, Takada M, Asano T, Murakawa K, Takahashi Y, et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. *Oncology reports*. 2010; 23(3): 843-51. PMID: 20127028.
89. Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cellular and molecular life sciences*. 2010; 67(20): 3535-48. PMID: 20480203.
90. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011; 15(1): 14-23. PMID: 21091634.
91. Browne BM, Stensland KD, Patel CK, Sullivan T, Burks EJ, Canes D, et al. MicroRNA expression profiles in upper tract urothelial carcinoma differentiate tumor grade, stage, and survival: Implications for clinical decision-making. *Urology*. 2019; 123: 93-100. PMID: 30315887.
92. Warrick JI, Walter V, Yamashita H, Chung E, Shuman L, Amponsa VO, et al. FOXA1, GATA3 and PPAR cooperate to drive luminal subtype in bladder cancer: A molecular analysis of established human cell lines. *Scientific reports*. 2016; 6: 38531. PMID: 27924948.
93. Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. *Clinical & experimental metastasis*. 2010; 27(6): 389-97. PMID: 20225084.
94. Segara D, Biankin AV, Kench JG, Langusch CC, Dawson AC, Skalicky DA, et al. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clinical cancer research*. 2005; 11(9): 3587-96. PMID: 15867264.
95. Boimel PJ, Cruz C, Segall JE. A functional in vivo screen for regulators of tumor progression identifies HOXB2 as a regulator of tumor growth in breast cancer. *Genomics*. 2011; 98(3): 164-72. PMID: 21672623.
96. Whittington T, Gao P, Song W, Ross-Adams H, Lamb AD, Yang Y, et al. Gene regulatory mechanisms underpinning prostate cancer susceptibility. *Nature genetics*. 2016. PMID: 26950096.

97. Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Chen D, Shibata K, Hamaguchi M, et al. HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 6(15): 13359-70. PMID: 25944620.
98. Kim YR, Kim IJ, Kang TW, Choi C, Kim KK, Kim MS, et al. HOXB13 downregulates intracellular zinc and increases NF-kappaB signaling to promote prostate cancer metastasis. *Oncogene*. 2014; 33(37): 4558-67. PMID: 24096478.
99. Zhan J, Wang P, Li S, Song J, He H, Wang Y, et al. HOXB13 networking with ABCG1/EZH2/Slug mediates metastasis and confers resistance to cisplatin in lung adenocarcinoma patients. *Theranostics*. 2019; 9(7): 2084-99. PMID: 31037158.
100. Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, et al. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer research*. 2000; 60(24): 6836-40. PMID: 11156375.
101. Li RC, Ke S, Meng FK, Lu J, Zou XJ, He ZG, et al. CiRS-7 promotes growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of miR-7/HOXB13. *Cell death & disease*. 2018; 9(8): 838-50. PMID: 30082829.
102. Zhang E, Han L, Yin D, He X, Hong L, Si X, et al. H3K27 acetylation activated-long non-coding RNA CCAT1 affects cell proliferation and migration by regulating SPRY4 and HOXB13 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Nucleic acids research*. 2017; 45(6): 3086-101. PMID: 27956498.

Danksagung

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz und meiner Co-Betreuerin Priv.-Doz. Dr. Michèle Hoffmann aussprechen, die mich jederzeit und in allen Fragen und Belangen unterstützt haben.

Weiterhin bin ich dankbar für den starken Rückhalt durch meine Familie und meinen Partner, die mir das Durchhaltevermögen und die Kraft geben meine Ziele zu erreichen.

Zusätzlich hat das freundschaftliche und unterstützende Klima im urologischen Forschungslabor maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ich danke der Düsseldorf School of Oncology (DSO) für die Unterstützung meiner Forschungsarbeit durch ein Stipendium.