

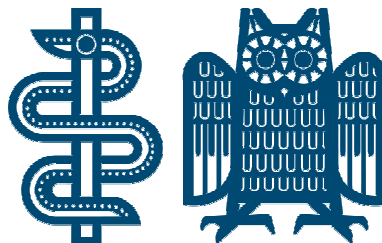
IDENTIFIZIERUNG METASTASIERUNGSSPEZIFISCHER UNTERSCHIEDE IM DNA-METHYLIERUNGSMUSTER MUSKELINVASIVER HARNBLASENTUMORE

*Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014



vorgelegt von Diplom-Biologin Beatrice Stubendorff
geboren am 07.05.1985 in Weimar

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlicher Mitteilungen und der angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle eingesetzten Methoden wurden selbstständig etabliert. Die Erhebung eines Teils der Rohdaten für die Validierung mittels qPCR Analysen von Gefrierproben erfolgte unter meiner persönlichen Anleitung, Einweisung und Kontrolle im Rahmen einer Masterarbeit im Bereich Molekulare Medizin von Kerstin Wilhelm. Die immunhistochemischen Färbungen der TMAs wurden im Forschungslabor der Klinik für Urologie Dresden durchgeführt. Alle weiteren Experimente und sämtliche Auswertungen wurden persönlich und selbstständig durchgeführt.

Die Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 16.10.2014

Beatrice Stubendorff

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Harnblasenkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Symptomatik und Diagnosestellung	1
1.1.3 Pathophysiologie und molekulare Charakterisierung	2
1.1.4 Metastasierung des Harnblasenkarzinoms	5
1.1.5 Therapie.....	6
1.2 Epigenetik.....	7
1.3 DNA-Methylierung	8
1.3.1 Mechanismus der Genexpressionsregulation mittels DNA-Methylierung	8
1.3.2 Biologische Funktion und Bedeutung der DNA-Methylierung	10
1.3.3 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Tumorgenese	11
1.3.4 Einfluss der DNA-Methylierung auf das Harnblasenkarzinom	14
1.4 Zielstellung	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	18
2.1.4 Antikörper, Enzyme und Laborreagenzien	18
2.1.5 Kits	19
2.1.6 Oligonukleotide	19
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.8 Datenbanken und Computersoftware.....	20
2.1.9 Patientenmaterial.....	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	22
2.2.2 Allgemeine Zellkulturmethoden	25
2.2.3 DNA-Methylierungsanalysen.....	28
2.2.4 mRNA-Expressionsanalysen.....	36
2.2.5 Immunhistochemische Expressionsanalysen unter Verwendung von <i>Tissue Microarrays</i>	37
2.2.6 Funktionelle Analysen	38
2.2.7 Statistik	42

3	Ergebnisse	44
3.1	Detektion metastasierungsspezifischer Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster muskelinvasiver Harnblasentumore	44
3.1.1	Microarrayanalyse	44
3.1.2	Selektion von Kandidatengenomen	45
3.2	Validierung des DNA-Methylierungsstatus und Entwicklung eines Vorhersagemodells zur Bewertung des Metastasierungsrisikos.....	45
3.2.1	Etablierung der quantitativen Methylierungsanalyse und einer internen Referenz.....	45
3.2.2	DNA-Methylierung der Kandidatengene im primären Harnblasentumorgewebe	47
3.2.3	DNA-Methylierung der Kandidatengene in verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien	51
3.2.4	Entwicklung eines Vorhersagemodells sowie Validierung an einem unabhängigen Patientenkollektiv	53
3.2.5	Korrelation der Vorhersage zum progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben ...	56
3.3	Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Expression.....	62
3.3.1	Einfluss von 5-Aza-2'-deoxycytidin auf DNA-Methylierung und mRNA-Expression in Harnblasenkarzinom-Zelllinien	62
3.3.2	Bestimmung der mRNA-Expression im primären Harnblasentumorgewebe	67
3.3.3	Bestimmung der Proteinexpression im primären Harnblasentumorgewebe	70
3.4	Funktionsanalysen.....	72
3.4.1	Transiente KISS1R-Überexpression	72
3.4.2	Transiente Inhibierung der SEPT9-Expression	76
4	Diskussion	79
4.1	Verwendung genomweiter DNA-Methylierungsanalysen zur Identifizierung neuer Prognosemarker des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms	79
4.2	Etablierung einer Methode zur Validierung des Methylierungsstatus der Kandidatengene	82
4.3	Promotorhypermethylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD zur Prognosebewertung des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms	85
4.3.1	Validierung des DNA-Methylierungsstatus der Kandidatengene im Primärtumorgewebe sowie in Harnblasenkarzinom-Zelllinien	85
4.3.2	Physiologische und pathologische Funktionen der Kandidatengene.....	86
4.3.3	Entwicklung eines Vorhersagemodells zur Prognosebewertung	89
4.3.4	Korrelation des Lymphknotenstatus und des Vorhersagemodells zum Progressionsrisiko und Gesamtüberleben	92
4.4	Auswirkungen der DNA-Methylierung auf die Genexpression	96
4.4.1	Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression	96
4.4.2	Auswirkungen auf die Proteinexpression	104
4.5	Funktioneller Einfluss der Kandidatengene auf metastasierungsassoziierte Prozesse	106

4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	111
5	Literaturverzeichnis	113
6	Abbildungsverzeichnis.....	129
7	Tabellenverzeichnis.....	131
8	Abkürzungsverzeichnis.....	132
9	Anhang	135
	Publikationsliste	153
	Danksagung	155

Zusammenfassung

Aberrationen im DNA-Methylierungsmuster stellen ein Hauptmerkmal von Tumorzellen dar und sind geeignete molekulare Marker für die Tumordiagnostik und Prognosebewertung. Eine individuelle Bewertung des Metastasierungsrisikos bildet die Grundlage für die Therapieentscheidung von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom. Da die gezielte Selektion von Patienten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko derzeit nicht möglich ist, bestand das Hauptziel der vorliegenden Arbeit in der Identifizierung von Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster primärer Harnblasenkarzinome in Korrelation zum Metastasierungsstatus für die Etablierung neuer Prognosemarker. Des Weiteren sollten neue Erkenntnisse bezüglich der Expressionsregulation der Kandidatengene gewonnen werden und deren Funktion in metastasierungsassoziierten Prozessen analysiert werden.

Der genomweite Nachweis von Unterschieden im DNA-Methylierungsmuster primärer Harnblasentumorgewebe zwischen Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen erfolgte unter Verwendung einer antikörper-basierten Anreicherungsmethode methylierter Fragmente (MeDIP). Die anschließende Hybridisierung auf CpG-Insel-Microarrays und statistische Auswertung ermöglichte die Selektion differenziert methylierter Regionen für weitere Validierungsuntersuchungen. Dafür wurde eine unabhängige Methode zur Quantifizierung der Methylierung auf Einzelgenebene etabliert. Unter Verwendung der quantitativen Analyse der DNA-Methylierung mittels real-time PCR (qAMP) konnte ein signifikanter Unterschied im Methylierungsgrad der Promotorregionen von KISS1R, SEPT9 und CSAD zwischen den Patientengruppen bestätigt werden. Die Kombination der drei Gene in einem Vorhersagemodell belegte den Zusammenhang zwischen Promotorhypermethylierung und erhöhtem Metastasierungsrisiko und ermöglichte die Vorhersage der Lymphknotenmetastasierung am Primärtumor in zwei unabhängigen Patientenkollektiven mit einer Genauigkeit von 79 % bzw. 73 %.

In Überlebenszeitanalysen wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Modellvorhersage und dem Lymphknotenstatus bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens verdeutlicht. Aufgrund der Vorselektion von Hochrisikopatienten in Kollektiv 1 konnte sowohl für den pN-Status als auch für das Vorhersagemodell aus KISS1R, SEPT9 und CSAD keine Überlebensunterschiede gezeigt werden. Hingegen wiesen sowohl pN-Status als auch das Vorhersagemodell einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens der Patienten aus Kollektiv 2 auf, welche keiner zusätzlichen Selektion unterlagen.

Der Zusammenhang zwischen Promotorhypermethylierung und Genexpression der potenziellen Prognosemarker wurde an etablierten Zelllinien mittels 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung sowie im Primärtumorgewebe untersucht. Für KISS1R bestätigte sich eine

direkte Korrelation zwischen erhöhter Methylierung und Expressionsverlust, welcher durch Inhibierung der DNA-Methyltransferase im Zellkulturmodell umkehrbar war. Dieser direkte Einfluss konnte auch durch Messungen der Expression auf mRNA- und Proteinebene im Primärtumor bestätigt werden.

Die Expressionsanalysen von SEPT9 offenbarten zunächst die Existenz und differenzierte Regulation verschiedener Transkriptvarianten. Dabei wurde SEPT9v3 als die Transkriptvariante identifiziert, deren Expression durch DNA-Methylierung im fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom reguliert wird. Ein direkter Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression konnte ebenfalls in Zelllinien belegt werden. Im Primärtumorgewebe war eine tendenzielle Korrelation zwischen erhöhter Methylierung und verminderter SEPT9v3-mRNA-Expression nachweisbar. Aufgrund der mangelnden Spezifität von SEPT9-Antikörpern bezüglich verschiedener Transkriptvarianten erfolgten keine Proteinexpressionsuntersuchungen für SEPT9v3.

Das Kandidatengen CSAD zeigte nur eine schwache Korrelation zur Expression in einer Zelllinie, jedoch keinen Unterschied zwischen den Patientengruppen im Tumorgewebe.

In Funktionsanalysen wurde bestätigt, dass der Expressionsverlust von KISS1R und SEPT9v3 einen direkten Einfluss auf das Metastasierungspotential von Harnblasenkarzinom-Zelllinien besitzt. Dabei wurde für KISS1R eine Wirkung auf die Zellmigration bestätigt. Der SEPT9v3-Funktionsverlust war mit einem signifikanten Anstieg der Zellmigration und -invasion assoziiert.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass metastasierungsspezifische Unterschiede des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms an Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster des Primärtumors nachweisbar sind. Die Kombination aus KISS1R, SEPT9 und CSAD ermöglicht eine zuverlässige Vorhersage des individuellen Risikos der Lymphknotenmetastasierung muskelinvasiver Primärtumore und könnte somit ein geeignetes Modell zur Prognosebewertung darstellen. Die Übertragung des Modells auf Präparate der transurethralen Resektion könnte eine frühzeitige Selektion von Hochrisikopatienten ermöglichen, die im Rahmen der Zystektomie einer ausgedehnten Lymphadenektomie unterzogen werden und eine individuell angepasste Therapie erhalten. Die Daten implizieren außerdem, dass ein entsprechendes Vorhersagemodell auf Basis von Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster entwickelt werden kann, um die Risikobewertung bezüglich der Fernmetastasierung zu ermöglichen und den gezielten Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie einzuleiten und die Überlebensraten zu verbessern. Der bestätigte Einfluss auf metastasierungsassoziierte Prozesse erlaubt außerdem die Annahme, dass die identifizierten potentiellen Prognosemarker als Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieansätze genutzt werden können.

Summary

Aberrations in the DNA methylation pattern are one of the major characteristics of malignant tumour cells and are a suitable molecular biomarker for cancer diagnostics and prognosis. Individual assessment of the metastatic risk of primary muscle-invasive bladder cancer is the basis for therapy choice for bladder cancer patients. However, currently an accurate prediction of patients with high metastatic risk is not possible. Therefore, the major aim of the present thesis was the identification of changes in the DNA methylation pattern of primary bladder tumours in correlation to the metastatic state and the establishment of novel prognostic biomarkers. Furthermore, new insight into the regulation of candidate genes expression and their function in metastatic-associated processes should be provided.

The genome-wide detection of differences in the DNA methylation pattern of primary bladder tumour tissues between patients with and without lymph node metastases was carried out using an antibody-based enrichment method for methylated DNA fragments (MeDIP). Subsequent hybridisation on CpG island microarrays and statistical analysis enabled the selection of differentially methylated regions for further validation. Therefore, an independent method for quantification of methylation on the single gene level was established. Using the quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR (qAMP), a significant difference in the DNA methylation level of three genes - KISS1R, SEPT9 and CSAD - was shown.

The combination of these three genes in a prediction model confirmed the correlation between promoter hypermethylation and increased metastatic risk. This enabled the prediction of lymph node metastases based on the primary tumour tissue in two independent patient cohorts with an accuracy of 79% and 73%, respectively.

Survival time analysis revealed a direct connection between the model of prediction and the lymph node status regarding progression-free survival and overall survival. Due to the composition of the patients in cohort 1 being only high risk patients, lymph node status as well as the prediction model of KISS1R, SEPT9 and CSAD showed no differences in survival time, whereas both lymph node status and prediction model exhibited a significant difference in progression-free survival in patients in cohort 2 including all muscle-invasive stages.

The correlation between promoter hypermethylation and gene expression of these three potential prognostic biomarkers was analysed in bladder cancer cell lines using 5-Aza-2'-deoxycytidin as well as in primary tumour tissue. KISS1R had a direct correlation with increased methylation resulting in loss of KISS1R expression was detectable, which was reversible by DNA methyltransferase inhibition. This direct impact was also confirmed on mRNA and protein level in primary tumour tissue.

Expression analysis of SEPT9 revealed the existence and differentiated regulation of several transcript variants. SEPT9v3 was identified as the one transcript variant whose expression is regulated by DNA methylation in advanced bladder cancer. A correlation between methylation and expression was confirmed in bladder cancer cell lines. In primary bladder tumours a tendency to reduced expression was measurable. Verification on protein level was not possible due to the lacking specificity of commercially available SEPT9 antibodies for different transcript variants.

The methylation of candidate gene CSAD showed only a weak correlation to expression in one cell line and there was no difference between the patient groups in tumour tissues.

Functional analysis confirmed that a loss of KISS1R and SEPT9v3 expression has an impact on the metastatic potential of bladder cancer cell lines. KISS1R influenced the cell migration, whereas SEPT9v3 loss was associated with a significant increase of cell migration and invasion.

This thesis demonstrates that specific differences of muscle-invasive bladder cancer in correlation to the metastatic potential are detectable based on changes in the DNA methylation pattern of the primary tumour, a finding that has yet to be reported. The combination of KISS1R, SEPT9 and CSAD enables a reliable prediction of the individual risk for the development of lymph node metastases and could serve as a suitable model for the prognosis assessment. An application on specimen of transurethral resection could lead to an early selection of high risk patients for extended lymphadenectomy and individual adapted therapy. Furthermore, the data imply that an analogous model based on changes in DNA methylation could be developed for the risk assessment of distant metastases with the aim of a specific initiation of adjuvant chemotherapy and thus potentially improve survival rates. The results of the functional analysis suggest that the identified potential prognostic biomarkers could serve as novel targets for the development of innovative target-therapies.

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom stellt weltweit mit ca. 357.000 Neuerkrankungen die neunthäufigste Tumorerkrankung dar [1]. Nach Angaben des Robert-Koch Institutes erkrankten im Jahr 2010 in Deutschland etwa 28.790 Menschen an einem Harnblasenkarzinom. Etwa 75 % der Betroffenen waren Männer. Dies zeigt, dass das Erkrankungsrisiko bei Männern um etwa das Dreifache erhöht ist. Es verstarben insgesamt 5.516 Menschen an den Folgen der Erkrankung. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 75 Jahren [2].

Die Hauptursache für die Entstehung von Harnblasentumoren ist das Rauchen. Das Erkrankungsrisiko ist bei Rauchern um etwa das Vierfache erhöht [3]. Auch die Exposition gegenüber Tabakrauch führt zu einer Zunahme des Erkrankungsrisikos um etwa das Dreifache [4].

An zweiter Stelle der Risikofaktoren steht die beruflich bedingte Exposition gegenüber aromatischen Aminen, die vor allem in der Chemie-, Farbstoff- und Metallindustrie vorzufinden sind. Ungefähr 20 % der Harnblasenkarzinome sind mit diesem Risikofaktor assoziiert [5]. Aufgrund wachsender Sicherheitsvorkehrungen hat sich das Ausmaß der Exposition gegenüber diesen Karzinogenen in den letzten Jahren vermindert, doch aufgrund einer Latenzzeit von bis zu 40 Jahren werden aminbedingte Harnblasenkarzinome noch immer registriert.

Des Weiteren können genetische Faktoren, wie z.B. Sequenzvariationen auf Chromosom 4p16.3, mit der Entstehung von Harnblasentumoren einhergehen [6]. Zudem ist beschrieben, dass Polymorphismen im NAT2-Gen die Empfindlichkeit gegenüber Karzinogenen des Tabakrauches zusätzlich erhöhen [7]. Jedoch ist die Assoziation zwischen erblichen Ursachen und der Tumorentstehung in der Harnblase bisher noch weitgehend ungeklärt.

In Entwicklungsländern zählen ebenso chronische Entzündungen des harnableitenden Systems sowie Infektionen durch den Erreger *Schistosoma haematobium* zu den Risikofaktoren. Diese führen meist zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen.

1.1.2 Symptomatik und Diagnosestellung

Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Hämaturie. Bei bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankungen können zudem obstruktive Miktionsbeschwerden oder Beckenschmerzen auftreten. Für die Diagnosestellung werden eine endoskopische Untersuchung der Harnblase (Zystoskopie) sowie eine Urinzytologie durchgeführt. Der

Nachteil der Zystoskopie liegt in der Invasivität des Diagnoseverfahrens und in der geringen Sensitivität für die Detektion mikropapillärer Tumore und *Carcinoma in situ*-Läsionen. Die Zytologie dient der lichtmikroskopischen Beurteilung der Urothelzellen anhand ihres Differenzierungsgrades. Die Diagnosestellung unterliegt hier der subjektiven Entscheidung des Betrachters und somit einer gewissen Variabilität. Das Verfahren ist hochspezifisch, jedoch ist die Sensitivität bei gut differenzierten Tumoren gering. Des Weiteren existieren immunologische Tests (NMP-22, BTA), deren Ergebnisse aufgrund der großen Schwankungsbreite hinsichtlich Sensitivität und Spezifität unbefriedigend sind [8]. Die fluoreszenz-basierte Untersuchung chromosomaler Veränderungen in Zellen des Urins mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) stellt hingegen eine geeignetere Methode zur Detektion von Harnblasentumoren dar [9-11].

Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom erfolgt zunächst die transurethrale Resektion und histologische Begutachtung des Präparats durch einen Pathologen.

1.1.3 Pathophysiologie und molekulare Charakterisierung

Ausgehend von den äußeren Epithelzellen stellt das Urothelkarzinom mit über 90 % die häufigste Form der Harnblasentumore dar. Deutlich geringer ist der Anteil an Plattenepithelkarzinomen (<5 %), die durch Entzündungsreaktionen einer Schistosomiasis hervorgerufen werden können. Sehr selten treten Adenokarzinome (<1 %) auf.

Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens existieren unterschiedliche Formen des Harnblasenkarzinoms. Etwa 80 % der Tumore sind zum Zeitpunkt der Diagnose nicht-muskelinvasiv (Stadium Ta und T1). Sie zeichnen sich durch eine gute Prognose aus, weisen jedoch hohe Rezidivraten auf. Ebenso nicht-muskelinvasiv, jedoch deutlich aggressiver ist das *Carcinoma in situ* (CIS), welches durch eine fortgeschrittene Dedifferenzierung der Zellen gekennzeichnet ist und ein erhöhtes Potential zur Progression zum muskelinvasiven Tumor aufweist [12]. 20 % der Harnblasentumore sind bei Diagnosestellung bereits muskelinvasiv. Sie sind dann bereits in die Muskelschicht eingedrungen (Stadium T2), erstrecken sich über die Blasenwand (Stadium T3) oder in benachbarte Organe (Stadium T4) (Abb. 1).

Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom weisen eine schlechte Prognose auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 50 %. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorprogression zum metastasierten Stadium liegt bei ca 50 % [13]. Bei vorliegender regionaler oder Fernmetastasierung sinkt die 5-Jahresüberlebensrate auf 33 % bzw. 6 % [14].

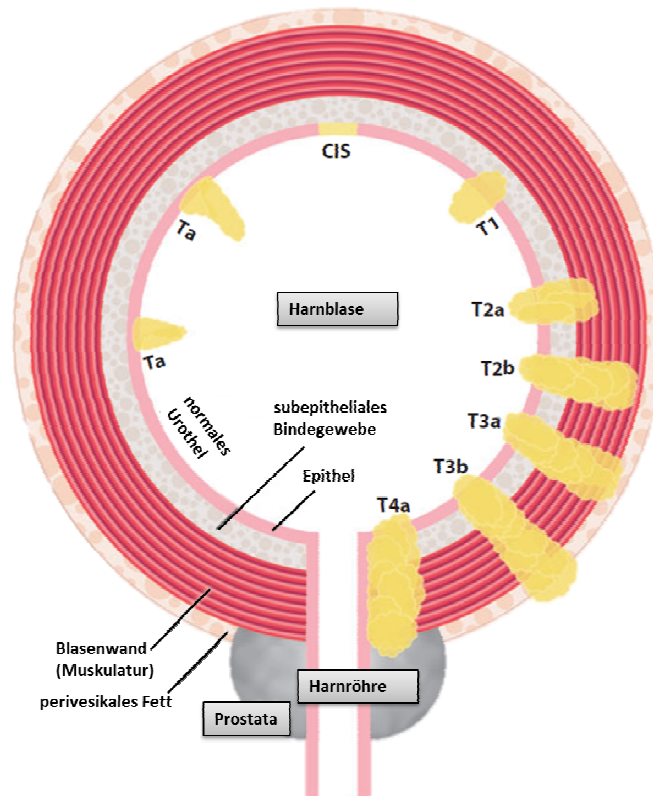


Abbildung 1 Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms

Ausgehend vom normalen Urothel entstehen papilläre Tumore (Ta), Carcinoma in situ (CIS) und T1 Tumore, die zu den nicht-muskelinvasiven Harnblasentumoren zählen. Ab Stadium T2 spricht man von muskelinvasiven Tumoren (modifiziert nach Mitra [15]).

Die Schwierigkeit bezüglich der individuellen Behandlung des Harnblasenkarzinoms besteht somit in der Vorhersage eines Tumorrezidivs beim nicht-muskelinvasiven Tumor bzw. in der Risikobewertung und Therapieentscheidung bei muskelinvasiven Tumoren. Molekularbiologische Untersuchungen konnten bereits zur Aufklärung der molekularen Pathogenese des Harnblasenkarzinoms beitragen. Unabhängig von der Invasivität ist der Großteil (>50 %) der Harnblasentumore durch Verluste auf dem Chromosom 9 gekennzeichnet.

Nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome entstehen aus einer Hyperplasie des Urothels und sind am häufigsten durch aktivierende Mutationen im FGFR3-Gen (>60 %) bzw. durch eine FGFR3-Überexpression gekennzeichnet [16, 17]. Ein geringerer Anteil (ca. 15 %) trägt RAS-Mutationen. Innerhalb eines Tumors schließen sich FGFR3- und RAS-Mutationen gegenseitig aus [18]. Nicht-invasive Tumore sind als genetisch stabil beschrieben. Synchron und metachron auftretende Tumore eines Patienten zeigen überwiegend identische genetischen Alterationen [19].

Im Gegensatz dazu sind muskelinvasive Tumore durch das Auftreten zahlreicher genetischer Veränderungen charakterisiert. Dazu zählen einerseits die Überexpression von Onkogenen, wie z.B. der Rezeptortyrosinkinasen ERBB2 und EGFR [20, 21]. Dies kann eine verstärkte

Einleitung

Aktivierung des Ras-MAPK-Signalwegs zur Folge haben und somit das Zellwachstum stimulieren. Andererseits sind muskelinvasive Harnblasentumore stark mit Mutationen des Tumorsuppressorgens TP53 assoziiert [22, 23]. Die physiologische Funktion von p53 besteht in der Zellzyklusregulation. Bei Erkennung von DNA-Schäden reguliert p53 die Expression anderer Gene und es kommt zur Einleitung des Zellzyklusarrestes, so dass ein entstandener Schaden vor der Zellteilung repariert werden kann. Wird ein Schaden nicht behoben, ist p53 an der Initiation der Apoptose beteiligt [24, 25].

Des Weiteren führen Expressionsverlust bzw. Hyperphosphorylierungen des Retinoblastom (Rb)-Proteins zur verstärkten Zellproliferation von muskelinvasiven Harnblasentumoren. Verminderte Expression oder Hyperphosphorylierung verhindern die Interaktion von Rb mit dem Transkriptionsfaktor E2F, so dass dieser frei vorliegt und die Transkription von Genen initiiert, die die Zellproliferation vorantreiben [26]. Sarkar *et al.* konnten zeigen, dass eine Inaktivierung beider Signalwege (p53 und Rb) die Entstehung invasiver Harnblasentumore fördert [27].

Einen Überblick über molekulare Veränderungen während der Harnblasentumorgenese zeigt Abbildung 2.

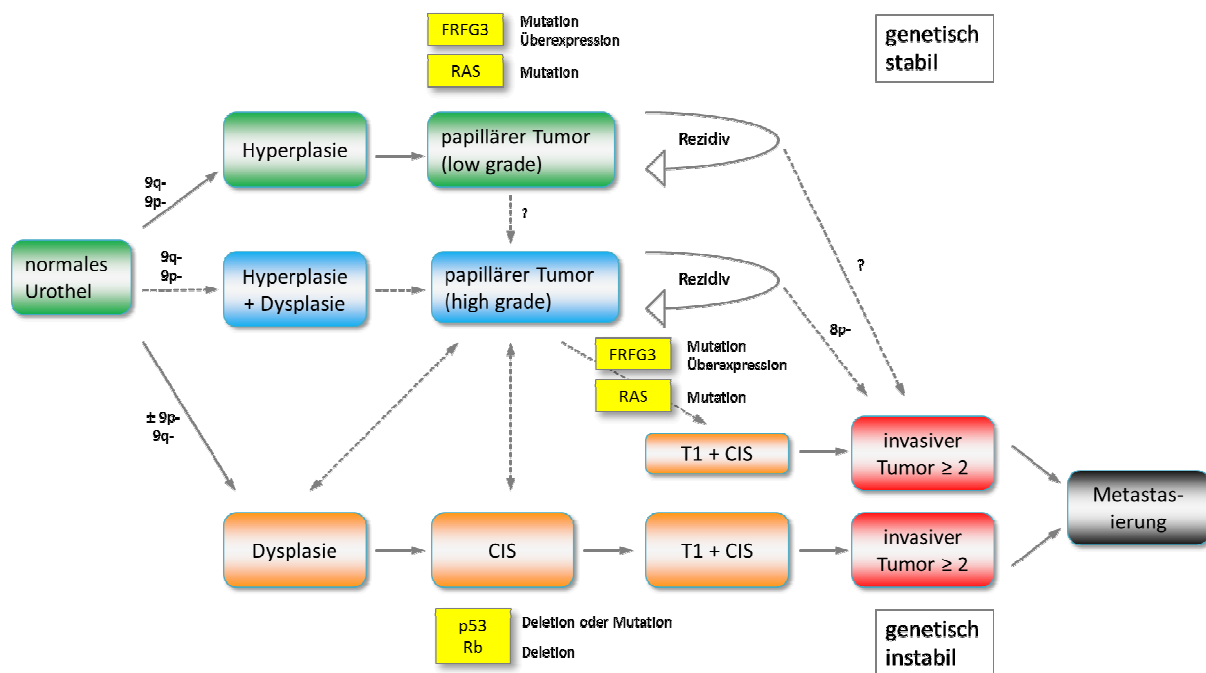


Abbildung 2 Entstehungswege des Harnblasenkarzinoms

Molekulare Unterschiede weisen auf die Existenz von drei verschiedenen Entstehungswegen hin. Nicht-muskelinvasive low-grade Tumore (oben) sind durch Verluste des Chromosoms 9 und FGFR3/RAS-Mutationen gekennzeichnet. Muskelinvasive Tumore (unten) entstehen aus CIS und sind durch frühzeitige TP53- und Rb-Mutationen charakterisiert. Die Entstehung papillärer high-grade Tumore aus Dysplasien (Mitte) ohne TP53-Mutationen jedoch mit hohem Progressionsrisiko stellt einen dritten Signalweg dar. Gefüllte Pfeile zeigen Verbindungen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit stattfinden; unterbrochene Pfeile deuten auf unbestimmte Verbindungen hin (modifiziert nach Goebel [28] und Knowles [29]).

In einer aktuellen Untersuchung von Choi *et al.* konnten drei weitere Subtypen von muskelinvasiven Harnblasentumoren anhand spezifischer molekularer Eigenschaften definiert werden. Demnach unterteilen sich muskelinvasive Harnblasentumore in einen basalen, luminalen und „p53-ähnlichen“ Subtyp. Basale Tumore weisen sarkomatoide Eigenschaften und eine plattenepitheliale Differenzierung auf. Sie sind ähnlich den basalen Mammakarzinomen durch die Expression mesenchymaler Biomarker (TWIST1/2, SNAI2, ZEB2, VIM) gekennzeichnet. Dagegen weisen die luminalen Tumore eine verstärkte Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin und der miR200-Familie auf. Sie sind weiterhin durch FGFR3- und PPAR γ -Aktivierungen charakterisiert. Kennzeichnend für den „p53-ähnlichen“ Subtyp ist eine Wildtyp-p53-Genexpressionssignatur und die Resistenz gegenüber neoadjuvanter Chemotherapie. Diese Subtypisierung muskelinvasiver Harnblasenkarzinome besitzt eine hohe Bedeutung für die Prognosebewertung sowie die Verwendung zielgerichteter Therapieansätze [30].

1.1.4 Metastasierung des Harnblasenkarzinoms

Der Prozess der Metastasierung verläuft in mehreren Schritten und erfordert eine Veränderung molekularer Parameter, zusätzlich zu denen, die an der Entstehung des Primärtumors beteiligt sind. So konnte z.B. für das bereits erwähnte Tumorsuppressorgen TP53, dessen Mutation die Tumorentstehung fördert, keine Assoziation zur Lymphknotenmetastasierung von Patienten mit fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden [31].

Einer der ersten Schritte des Metastasierungsprozesses besteht im Verlust der interzellulären Adhäsion und somit in der Beeinträchtigung der epithelialen Integrität. Diese Störungen betreffen häufig Adhäsionsmoleküle (z.B. Cadherine und Integrine), die den Verbund zwischen Zellen desselben Zelltyps vermitteln. Der Verlust der E-Cadherin-Expression ist eines der Schlüsselereignisse der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT), die durch einen Phänotypwechsel und eine gesteigerte Zellinvasion und –migration charakterisiert ist [32]. Im Harnblasenkarzinom konnte gezeigt werden, dass eine Umstellung der E-Cadherin-Expression zu N- oder P-Cadherin (Cadherin-Switch) ein spätes Ereignis der Harnblasentumorgenese darstellt und an der Invasion und Migration beteiligt ist [33] und dass eine verminderte E-Cadherin-Expression mit der Invasivität und der Lymphknotenmetastasierung einhergeht [34].

Ein weiterer Schritt während der Metastasierung ist die Modulierung von Basalmembran und extrazellulärer Matrix. An diesem Prozess sind u.a. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt, deren Funktion als Endopeptidasen die Degradierung von Makromolekülen bewirkt und den Abbau der zellulären Barrieren begünstigt. Somit erlangen die Tumorzellen die Fähigkeit aus dem Zellverbund des Organs auszutreten, sich über verschiedene

Metastasierungswege auszubreiten und an anderer Stelle Sekundärtumore auszubilden. Eine erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 ist mit einem erhöhten Invasionspotential von Harnblasentumoren assoziiert [35, 36], zeigt jedoch keinen Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus [37]. Für MMP-7 konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Expressionslevel in Gewebe und Serum mit dem Metastasierungsrisiko der Patienten korreliert [38].

Während des Metastasierungsprozesses spielt ebenso die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) eine zentrale Rolle. Diese neuen Gefäße unterstützen die Sauerstoffversorgung des Primärtumors und die Verbreitung von Tumorzellen. VEGF ist ein wichtiger proangiogener Faktor, der durch Bindung an den Tyrosinkinase-Rezeptor (VEGFR) die Proliferation und Migration von Endothelzellen stimuliert [39]. Im Harnblasenkarzinom wurde gezeigt, dass eine erhöhte VEGF-Expression mit der Metastasierung korreliert [40, 41] und dass das VEGF-Serumlevel eine Differenzierung zwischen metastasierten und lokal begrenzten muskelinvasiven Harnblasentumoren ermöglicht [42].

Vogt *et al.* konnten im Harnblasenkarzinom eine Überexpression von Fascin nachweisen und außerdem zeigen, dass diese im Vergleich zu anderen Karzinomen des Urogenitaltraktes spezifisch für das metastasierte Urothelkarzinom ist [43]. Eine Überexpression von BLT2 spielt ebenso eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung der Harnblasentumore. Im Mausversuch wurde die Metastasierung der 253J BV-Zelllinie durch Blockade von BLT2 unterdrückt [44]. Eine weitere Arbeit beschreibt, dass eine erhöhte Rac1-Aktivität und eine damit verbundene Überexpression von Pak1 mögliche prognostische Marker für die lymphovaskuläre Invasion sowie Lymphknotenmetastasen darstellen [45]. In Untersuchungen an den Harnblasentumorzelllinien T24 (nicht-metastasiert) und T24T (hoch invasiv und metastasiert) wurde das Protein RhoGDI2 anhand seiner verstärkten Expression in T24 Zellen als mutmaßliche Metastasensuppressor identifiziert. Eine verminderte Expression von RhoGDI2 korreliert mit erhöhter Invasivität und Metastasierung in T24T Zellen [46]. Diese Daten konnten in humanen Tumorgeweben nicht bestätigt werden.

1.1.5 Therapie

In Abhängigkeit vom Tumorstadium des Harnblasenkarzinoms existieren unterschiedliche Therapieoptionen. Bei nicht-muskelinvasiven Harnblasentumoren mit geringem Progressionsrisiko erfolgt eine lokale Therapie mit Organerhalt. Dabei wird mittels transurethraler Resektion (TUR) der Tumor endoskopisch abgetragen. Standardmäßig wird nach 4-6 Wochen eine zweite Resektion durchgeführt. Zusätzlich erfolgt zur Rezidivprophylaxe eine intravesikale Instillation eines Chemotherapeutikums bzw. abgeschwächter Tuberkulosebakterien (*Bacillus Calmette-Guérin*-Therapie).

Bei Patienten mit erhöhtem Progressionsrisiko oder lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom wird eine radikale Zystektomie durchgeführt. Dabei erfolgt eine komplette Entfernung der Harnblase inklusive Prostata, Samenblase und Samenleiter beim Mann bzw. Gebärmutter, Scheidenvorderwand und ggf. Eierstöcken bei der Frau. Sind regionale Lymphknotenmetastasen nachweisbar, ist eine perioperative, neoadjuvante oder eine adjuvante Chemotherapie indiziert.

Patienten mit inoperablen bzw. metastasierten Harnblasenkarzinom werden mittels systemischer Chemotherapie behandelt. Dabei hat sich die kombinierte Polychemotherapie aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin (=Doxorubicin) und Cisplatin (MVAC) bzw. Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin und Cisplatin (MVEC) etabliert, die gute Ansprechraten (>70 %) aufweist. Der Anteil an Komplettremissionen liegt jedoch bei nur 9 % [47]. Es handelt sich somit um eine rein palliative Behandlung. Aufgrund eines beträchtlichen Nebenwirkungsspektrums ist die Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin überlegen. Bei vergleichbaren Ansprechraten zeigt diese Kombination ein günstigeres Nebenwirkungsprofil.

1.2 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ wurde 1939 von dem Evolutionsbiologen Conrad H. Waddington geprägt. Er beschrieb damit erstmals den Zusammenhang zwischen Genen und deren Produkten und verdeutlichte die Entstehung unterschiedlicher Phänotypen trotz identischer genetischer Information [48]. Eine zeitgemäße Definition beschreibt die Epigenetik als erbliche und reversible Veränderung der Genexpression, die nicht durch Änderung der DNA-Sequenz ausgelöst wird [49].

Epigenetische Ereignisse umfassen komplexe Mechanismen, die die Modifikation von DNA-Basen bzw. Histonproteinen und somit die Chromatinstruktur und Genexpression beeinflussen. Sie sind essentiell für die Entwicklung, Zelldifferenzierung und Aufrechterhaltung der genomischen Integrität [50].

Bereits 1975 wurde von Holliday *et al.* und Riggs die enzymatische Methylierung der Cytosinbasen der DNA als molekulares Modell beschrieben, das die Genaktivität reguliert. Bereits damals wurde angenommen, dass die DNA-Methylierung einen starken Einfluss auf die Genexpression hat, welcher hochspezifisch ist und nach der Zellteilung aufrechterhalten wird [51, 52].

Die reversible Modifikation spezifischer Aminosäuren der Histonproteine stellt einen weiteren bedeutenden epigenetischen Regulationsmechanismus dar. Ein häufig beschriebener Vorgang ist die Histonacetylierung. Diese Modifikation bewirkt eine Auflockerung der eng gepackten Chromatinstruktur, sodass die DNA für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht wird. Dabei wirken Histonacetyltransferasen als transkriptionelle Aktivatoren und Histondeacetylasen als transkriptionelle Repressoren. Neben der Acetylierung existieren

zahlreiche weitere Histonmodifikationsmechanismen, wie beispielsweise Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung [53].

Beide epigenetische Mechanismen sind zwangsläufig miteinander verknüpft. Die Hypermethylierung kann beispielsweise die Deacetylierung von lokalen Histonen initiieren. Zusätzlich kommt es zur Interaktion mit regulatorischen Proteinen und nicht-kodierenden RNAs. All diese Mechanismen können die Chromatinstruktur und Genaktivität beeinflussen [54]. In der vorliegenden Arbeit richtet sich der Fokus auf Veränderungen auf DNA-Methylierungsebene.

1.3 DNA-Methylierung

1.3.1 Mechanismus der Genexpressionsregulation mittels DNA-Methylierung

Neben den DNA-Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin tritt im menschlichen Genom ebenso 5-Methylcytosin (5mC) auf. 5mC entsteht durch kovalente Bindung einer Methylgruppe an die Position 5 des Pyrimidinringes einer Cytosinbase. Diese Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl donor dient (Abb. 3). DNMT3A und DNMT3B besitzen eine hohe Affinität gegenüber unmethylierter DNA und sind für die Etablierung neuer Methylierungsmuster („*De novo*“-Methylierung) verantwortlich [55]. Diese Muster werden anschließend über viele Zellzyklen aufrechterhalten („*Maintenance*“-Methylierung). Dieser Schritt wird von der DNMT1 katalysiert, die vorzugsweise hemi-methylierte DNA methyliert und somit nach der Replikation bestehende Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Tochterstrang überträgt [56].

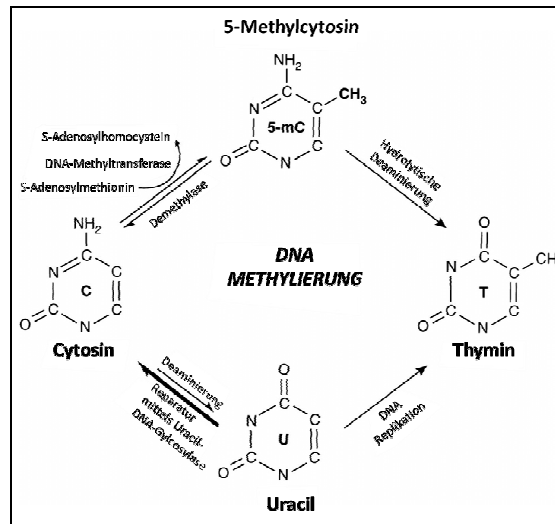


Abbildung 3 Möglichkeiten der biochemischen Modifikation von Cytosin

Durch Methylierung von Cytosin entsteht 5-Methylcytosin (5mC) (katalysiert durch DNA-Methyltransferasen). Durch spontane hydrolytische Deaminierung von 5mC entsteht Thymin. Aufgrund der chemischen Instabilität kann Cytosin deaminiert werden, welches von der Uracil-DNA-Glycosylase erkannt und repariert wird (modifiziert nach Singal und Ginder [57]).

Die Methylierung erfolgt vorwiegend an Cytosinbasen, die an der 5'-Position einer Guaninbase lokalisiert sind – sog. CpG-Dinukleotide. Im Genom von Säugerzellen liegt ein Großteil (~75 %) aller CpG-Dinukleotide methyliert vor. In normalen Zellen dient dies der Unterdrückung genomischer Sequenzen, wie beispielsweise integrierte Virussequenzen und Transposons [58].

Genomische Bereiche, die einen hohen Anteil an CpG-Dinukleotiden aufweisen, werden als CpG-Inseln (CpGI) bezeichnet. CpGI werden definiert als Regionen mit einer Länge von mindestens 500 bp und einem CG-Anteil >55 % [59]. Innerhalb des Genoms sind diese CpG-reichen Regionen ungleichmäßig verteilt und treten vorwiegend in Promotorregionen und im ersten Exon spezifischer Gene sowie in Introns auf [60]. Die Cytosine der CpG-Inseln sind im Normalgewebe in der Regel unmethyliert.

Die bedeutendste molekulare Funktion der DNA-Methylierung besteht in der Regulation der Transkription. Es existieren 2 Modelle, die die Hauptmechanismen der transkriptionellen Stilllegung beschreiben. Die Transkriptionshemmung kann einerseits direkt erfolgen, indem die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz innerhalb der Promotorregion durch die erhöhte Anzahl von 5mC-Basen verhindert wird (Abb. 4 A). Dabei unterscheidet man Transkriptionsfaktoren, deren Bindung durch DNA-Methylierung beeinträchtigt wird, sogenannte methylierungssensitive Transkriptionsfaktoren (z.B. NFκB, E2F und CREB), von methylierungsinsensitiven Transkriptionsfaktoren (z.B. Sp1 und CTCF), welche trotz methylierten CpG-Stellen an die Promotorregion binden können [61]. Andererseits erfolgt eine indirekte Transkriptionshemmung über Proteine, die sogenannte Methylbindedomänen (MBDs) aufweisen und somit in der Lage sind, methylierte DNA-

Sequenzen zu erkennen und daran zu binden. Zu diesen Proteinen zählen MeCP- (Methyl-CpG-binding domain protein) 1 und 2. MeCP-1 ist ein Multiproteinkomplex, der an DNA-Abschnitte mit mehreren methylierten CpG-Stellen bindet und somit die Transkription von stark methylierten Genen inhibiert [62]. MeCP-2 hingegen ist ein Einzelprotein, das in der Lage ist, an DNA zu binden, die einzelne methylierte CpG-Stellen enthält. Neben der Methylbindedomäne weist dieses Protein eine Transkriptionsrepressionsdomäne auf, die wiederum mit weiteren Korepressorkomplexen (Sin3A und Histondeacetylasen) interagiert und somit die Transkription inhibiert (Abb. 4 B) [63].

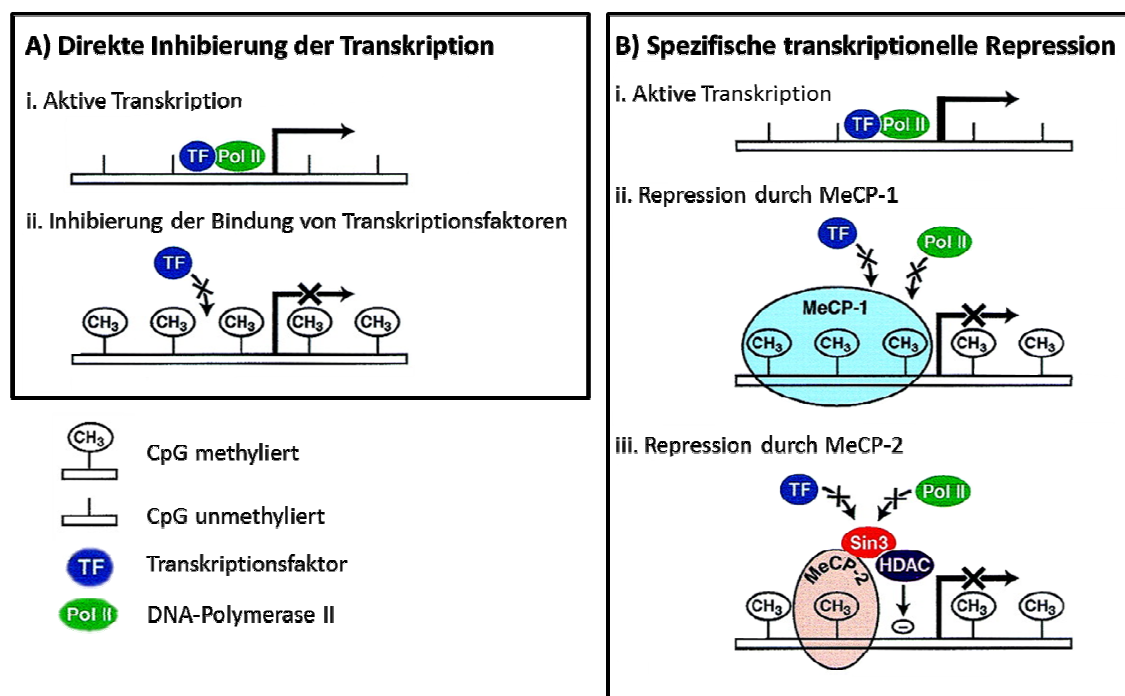


Abbildung 4 Inhibition der Genexpression durch DNA-Methylierung

Molekularer Mechanismus der direkten (A) und indirekten (B) Inhibition der Transkription (modifiziert nach Singal und Ginder [57]).

1.3.2 Biologische Funktion und Bedeutung der DNA-Methylierung

Generell ist eine verstärkte Methylierung der DNA mit transkriptioneller Repression des betroffenen Gens assoziiert. Eine exakte Kontrolle dieses Regulationsmechanismus ist bereits während der Embryonalentwicklung von zentraler Bedeutung. Während der Gametogenese und Embryogenese spielen sich drastische Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster ab. Reife Oozyten und Spermien weisen im Vergleich zu somatischen Zellen ein hoch methyliertes Genom mit spezifischen Unterschieden auf. Nach der Fertilisation kommt es zu einer Reprogrammierung dieser Methylierungsmuster. Dabei wird das paternale Genom zunächst aktiv demethyliert, während im maternalen Genom eine passive Demethylierung während der Replikation stattfindet. Etwa zum Zeitpunkt der

Implantation beginnt der Prozess der *De novo* Methylierung durch DNMT3A und DNMT3B. Die Etablierung spezifischer Methylierungs- und somit auch Expressionsmuster ermöglicht die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen innerhalb eines Organismus [64].

Einer dieser exakt kontrollierten Prozesse während der Entwicklung ist beispielsweise die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms bei weiblichen Individuen, die der Gendosiskompensation gegenüber männlichen Individuen dient. Die zentrale Rolle hat dabei das XIST-Gen, welches die Expression der Xist-RNA codiert. Die Xist-RNA bindet an eines der beiden X-Chromosomen und leitet somit die Inaktivierung einer Vielzahl von Genen dieses Chromosoms ein. Dieser Mechanismus unterliegt der strengen Regulation mittels DNA-Methylierung. In den Eizellen ist das XIST-Gen grundsätzlich methyliert und wird somit nicht exprimiert. Kommt nach der Befruchtung ein Y-Chromosom hinzu, bleibt XIST in der Zygote weiterhin methyliert. Die Xist-RNA wird nicht exprimiert, da eine X-Inaktivierung nicht erforderlich ist. Hingegen wird das XIST-Gen während der Spermatogenese konstitutiv exprimiert und liegt in unmethylierter Form vor. Wenn ein zweites X-Chromosom nach der Befruchtung hinzukommt, entsteht eine Xist-RNA, die zur X-Inaktivierung führt [65].

Ein weiterer entwicklungsrelevanter Mechanismus, der der DNA-Methylierung unterliegt, ist die genomische Prägung (*Imprinting*). Es existieren Gene, die einer monoallelischen Expression unterliegen, d.h. sie werden entweder nur vom maternalen oder paternalen Allel abgelesen. Die Expression des jeweilig anderen Allels wird durch erhöhte DNA-Methylierung inhibiert. Diese Methylierungsmuster werden bereits in den Keimzellen etabliert und unterliegen nicht der Demethylierung während der Embryogenese [64, 66]. Ein Beispiel für ein Gen mit maternaler Expression ist das H19-Gen, das eine tumorsuppressive Funktion besitzt. Beispiele für paternale Expression sind das bereits erwähnte XIST und der Wachstumsfaktor IGF2. Fehlerhaftes Imprinting steht im Zusammenhang mit der Entstehung genetischer Erkrankungen wie Prader-Willi- und Angelman-Syndrom [67].

1.3.3 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Tumorgenese

Während in normalen Zellen ein ideales Gleichgewicht zwischen den epigenetischen Regulationsmechanismen besteht, unterliegen Tumorzellen drastischen Veränderungen. Die Tumorgenese ist ein Prozess, an dem eine Vielzahl von Ereignissen beteiligt ist. Neben genetischen Alterationen wie Mutationen, Deletionen und Translokationen spielen bei der Tumorentstehung und -progression ebenso epigenetische Mechanismen eine Rolle [58]. Dabei können sowohl DNA-Methylierungsalterationen als auch Veränderungen der Histonmodifikationen Einfluss auf die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen haben und somit zum unkontrollierten Zellwachstum beitragen. Abbildung 5 zeigt im Überblick verschiedene Mechanismen, in denen DNA-Methylierung an der Tumorgenese beteiligt ist.

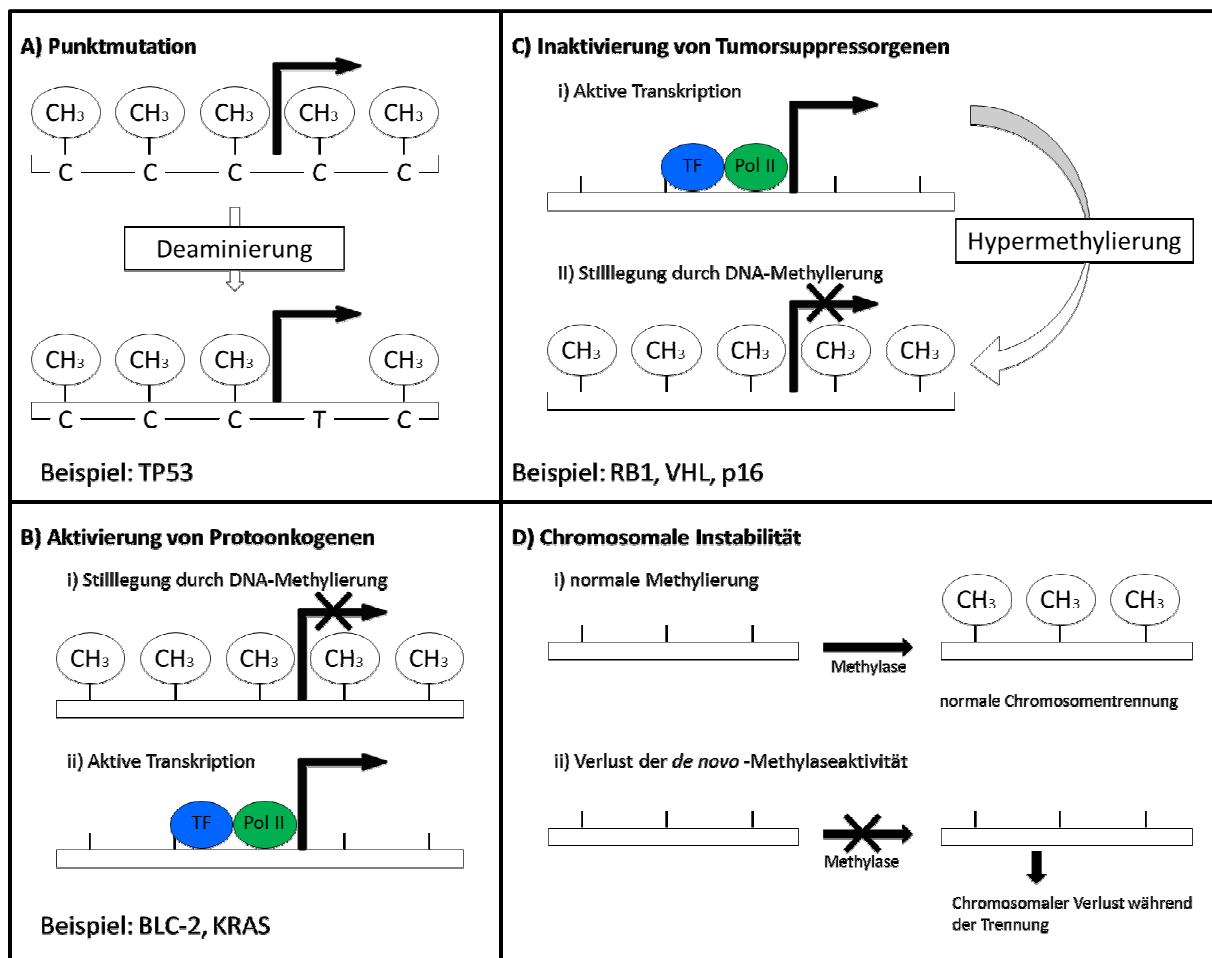


Abbildung 5 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Tumorgenese

(A) Spontane hydrolytische Deaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin als eines der beiden Ereignisse des „Two-Hit“ Modells bei der Entstehung von Tumoren. (B) Aktivierung von Protoonkogenen durch Hypomethylierung der Promotorregion. (C) Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Hypermethylierung der Promotorregion. (D) Verlust der Methylierung führt zur chromosomalen Instabilität und zu Verlusten während der Chromosomen- und Zellteilung (modifiziert nach Singal und Ginder [57]).

Zum einen besitzt 5mC eine hohe Anfälligkeit gegenüber der spontanen Deaminierung zu Thymin und kann somit als endogenes Mutagen bezeichnet werden (Abb. 5 A). Ein Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressorgen TP53. TP53 unterliegt nicht der Expressionsregulation durch DNA-Methylierung, sondern weist in über 50 % aller soliden Tumore Mutationen auf, die mit einem Funktionsverlust einhergehen [68].

Eines der Hauptmerkmale von Tumorzellen stellt die globale Hypomethylierung dar. Maligne Zellen zeigen 20-45 % weniger 5mC im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe [69]. Dabei kommt es häufig zu einer Hypomethylierung im Bereich der codierenden Regionen und Introns oder zur Demethylierung repetitiver Sequenzen [70]. Neben diesen globalen

Veränderungen kann jedoch ebenfalls die Expression spezifischer Gene (z.B. Protoonkogene) durch verminderte Methylierung aktiviert werden (Abb 5 B). Dies konnte beispielsweise für das antiapoptotische BCL2-Gen in der chronischen lymphatischen Leukämie gezeigt werden [71]. Zusätzlich kann der Verlust der Methylaseaktivität in Tumorzellen zur chromosomalen Instabilität beitragen. Die perizentromerischen Regionen eines Chromosoms weisen einen hohen Grad an Methylierung auf, der die Stabilität und ordnungsgemäße Chromosomentrennung während der Replikation unterstützt [58]. Ein Verlust der Methylierung kann deshalb mit chromosomalen Verlusten einhergehen (Abb. 5 D).

Des Weiteren sind Tumorzellen durch Hypermethylierungen spezifischer Promotorregionen gekennzeichnet. Das Vorhandensein einer CpGI im Promotor eines Gens deutet darauf hin, dass dieses Gen eine regulatorische Rolle ausübt, die der DNA-Methylierung unterliegt. In normalen Zellen ist dieser Bereich in der Regel unmethyliert, so dass die Funktion des Gens ausgeführt werden kann. Eine aberrante CpGI-Promotormethylierung kann zum Expressionsverlust von Genen führen, die an den korrekten Abläufen von u.a. Zellteilung, DNA-Reparatur, Zelladhäsion und Apoptose beteiligt sind [49]. Ein bekanntes und oft beschriebenes Beispiel ist das Tumorsuppressorgen CDKN2A, das den Tumorsuppressor p16 kodiert (Abb. 5 C). Dessen Funktion besteht in der Regulation des Zellzyklus, welche in einer Vielzahl von Tumoren als verloren gegangen beschrieben ist [72-75]. Der Verlust der p16-Funktion, vermittelt durch verstärkte DNA-Methylierung, trägt somit zur Tumorprogression bei, indem es die Zellproliferation fördert [76].

Die Anzahl der bekannten Gene, deren Funktion während der Tumorgenese durch epigenetische Veränderungen inaktiviert wird, überschreitet die Anzahl der Gene, die einem Funktionsverlust durch Mutationen unterliegen. Mutationen in Tumorsuppressorgenen liegen meist rezessiv vor. Dies deutet darauf hin, dass ein vollständiger Verlust der Tumorsuppressorfunktion eine Inaktivierung beider Allele erfordert, um die Zelltransformation zu begünstigen [58].

Eine Besonderheit der Hypermethylierung von CpGI-Promotoren als Tumormerkmal besteht in der Spezifität bezüglich der verschiedenen Tumorentitäten. Während Hypomethylierungen auf genomweiter Ebene stattfinden, sind Hypermethylierungen auf spezifische Gene beschränkt und variieren zwischen den verschiedenen Tumorarten. So sind beispielsweise Tumore des Gastrointestinaltraktes durch ein stärkeres Methylierungsmuster bezüglich Anzahl der Gene sowie Methylierungslevel gekennzeichnet, während Ovarialkarzinome und Sarkome nur eine schwache Methylierung von Tumorsuppressorgenen aufweisen [77].

1.3.4 Einfluss der DNA-Methylierung auf das Harnblasenkarzinom

Auch beim Harnblasenkarzinom wurde der Mechanismus der Genexpressionsregulation durch DNA-Methylierung für zentrale Gene der Tumorgenese beschrieben. Der Hauptteil der Publikationen bezieht sich hierbei auf die genspezifische Analyse der Promotorregionen bereits bekannter Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise RASSF1A, p16, DAPK1, RAR β , RUNX3, APC und E-Cadherin. Die Untersuchungen ergaben, dass eine verstärkte DNA-Methylierung dieser Promotorregionen mit Rezidiventwicklung, Progression sowie schlechter Prognose für Patienten mit Harnblasenkarzinom korreliert [78-83].

Nakagawa *et al.* konnten belegen, dass auch die Invasivität der Harnblasentumore mit einer verstärkten Hypermethylierung assoziiert ist und dass dies mitunter auf eine Überexpression der DNA-Methyltransferase 1 zurückzuführen ist [84]. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Wolff *et al.*, die das Methylierungsmuster von 1370 Loci analysierten und nachweisen konnten, dass invasive Harnblasentumore durch eine stärkere DNA-Methylierung gekennzeichnet sind als oberflächliche Tumore [85].

Des Weiteren existieren Untersuchungen auf genomweiter Ebene mit dem Ziel der Identifizierung neuer Biomarker für die frühzeitige Diagnose des Harnblasenkarzinoms. Hierbei wurden spezifische Muster identifiziert, die eine nicht-invasive Diagnose im Blut oder Urin ermöglichen könnten [86, 87]. Kandimalla *et al.* ist es gelungen, mit Hilfe genomweiter Methylierungsanalysen ein Prognosemarkerpanel, bestehend aus 4 Genen (TBX2, TBX3, GATA2 und ZIC4), zu identifizieren, deren Methylierungsniveau mit der Progression oberflächlicher Tumore zum muskelinvasiven Harnblasenkarzinom assoziiert sind [88].

Bezüglich der Prognose muskelinvasiver Harnblasenkarzinome existieren kaum veröffentlichte Untersuchungen. Es ist beschrieben, dass die Methylierung des RUNX3 Gens einen Prädiktor für das Gesamtüberleben für Patienten mit muskelinvasivem Harnblasentumor darstellt [89].

Darüber hinaus könnte der bereits erwähnte Expressionsverlust von E-Cadherin in Kombination mit anderen Tumorsuppressorgenen eine große Bedeutung für die Progression von Harnblasentumoren haben. Der Expressionsverlust dieses Adhäsionsproteins ist stark mit der EMT assoziiert [90]. Wie bereits erwähnt, ist der Vorgang durch einen Adhäsionsverlust und eine verstärkte Invasivität und Migration der Zellen charakterisiert [91] und wird somit mit Progression und Metastasierung von Harnblasentumoren assoziiert [92, 93]. Folglich ist denkbar, dass die Expression zentraler Gene, welche an der EMT beteiligt sind, ebenfalls durch Veränderungen im Methylierungsmuster reguliert wird. Eine Metaanalyse von Wang *et al.* zeigt, dass die CDH1 Promotormethylierung an der Entstehung und Progression des Harnblasenkarzinoms beteiligt ist [94].

1.4 Zielstellung

Das Harnblasenkarzinom stellt die sechsthäufigste Tumorerkrankung in der westlichen Welt dar. Während Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasentumoren nach transurethraler Resektion sehr gute Überlebensraten zeigen, ist die Prognose von Patienten mit muskelinvasiven, lokal fortgeschrittenen Tumoren trotz radikaler Zystektomie wesentlich schlechter. Bei vorliegender extravesikaler Tumorausbreitung (pT3/pT4) und/oder pelvinem Lymphknotenbefall reduziert sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 20-40 %. Eine individuelle Prognoseeinschätzung bezüglich des Metastasierungsrisikos ist derzeit nicht möglich. Dies ist jedoch eine wesentliche Voraussetzung für eine differenzierte Therapieentscheidung, vor allem bezüglich einer adjuvanten Therapie.

Metastasierungsspezifische Alterationen der Tumorzellen können neben Veränderungen auf genetischer Ebene auch durch epigenetische Phänomene bedingt sein. Einen gut charakterisierten epigenetischen Regulationsmechanismus stellt die DNA-Methylierung dar. Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster gelten als hoch sensitiv und sind bereits frühzeitig nachweisbar.

Das Ziel dieser Arbeit besteht zunächst in der Identifizierung metastasierungsspezifischer Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster primärer Harnblasentumore und deren Korrelation zur RNA- und Proteinexpressionsebene. Des Weiteren sollen neue Erkenntnisse bezüglich metastasierungsassoziierter Prozesse gewonnen werden, die durch Veränderungen der DNA-Methylierung reguliert werden. Im Einzelnen sollen folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

- 1) Zunächst sollen genomweite, metastasierungsspezifische Methylierungsunterschiede von primären muskelinvasiven Harnblasentumoren unter Verwendung der Microarray-Technologie ermittelt werden. Damit sollen potentielle Prognosemarker zur individuellen Bewertung des Metastasierungsrisikos definiert werden.
- 2) Mittels genspezifischer, quantitativer PCR-Methoden sollen ausgewählte Kandidatengene validiert werden. Dies dient der Überprüfung, ob diese als robuste Biomarker zur Prognosebewertung des Metastasierungsrisikos geeignet sind.
- 3) Ein Vorhersagemodell bezüglich der Lymphknotenmetastasierung bestehend aus mehreren Kandidatengenomen soll an zwei unabhängigen Kollektiven validiert werden. Darüber hinaus soll eine Korrelation der Methylierung zu histopathologischen und klinischen Parametern überprüft werden.
- 4) Des Weiteren soll der Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Expression der Kandidatengene analysiert werden. Hierzu soll einerseits durch Inhibierung der

DNA-Methyltransferase der direkte Zusammenhang zwischen Methylierung und Genexpression in vitro belegt werden, andererseits erfolgt die Quantifizierung der mRNA-Expression im Primärtumorgewebe. Zusätzlich soll unter Verwendung von Tissue Microarrays und immunhistochemischer Färbungen die Expression der Kandidatengene auf Proteinebene überprüft werden.

- 5) Die Funktion der Kandidatengene in metastasierungsassoziierten Prozessen soll untersucht werden, indem eine spezifische Beeinträchtigung der Genexpression in etablierten Zelllinien durchgeführt wird, um anschließend das Verhalten der Zellen in Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agilent Hybridisierungssofen	Agilent Technologies, Böblingen, D
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau, D
DynaMag-2 <i>Magnetbeads</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
LightCycler® 480 System	Roche, Mannheim, D
Microarray C Scanner	Agilent Technologies, Böblingen, D
Microarray Hybridisierungskammer	Agilent Technologies, Böblingen, D
Microskop Axiovert S100	Carl Zeiss, Jena, D
Nanodrop ND-1000	PeqLab, Erlangen, Germany
Real-Time Cell Analyzer	ACEA Bioscience, San Diego, USA
Spektrophotometer Infinite® 200 PRO	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
StepOnePlus™ System	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg, D

2.1.2 Chemikalien

Acid-Phenol:Chloroform	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Essigsäure	Merck KgaA, Darmstadt, D
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Formamid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat, SDS	GE Healthcare, Freiburg, D
Natriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt, D
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Rinderserumalbumin, BSA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt, D

Tris Base	Merck KgaA, Darmstadt, D
Tris -HCl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

2.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte

Salzlösung (PBS)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O
	2 mM	KH ₂ PO ₄

TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0
	1 mM EDTA

TAE-Puffer	40 mM Tris
	20 mM Acetat
	1 mM EDTA

2.1.4 Antikörper, Enzyme und Laborreagenzien

3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Antikörper 5-Methylcytosin-	Eurogentec GmbH, Köln, D
Antikörper Anti-Kisspeptin (ab19028)	Abcam plc, Cambridge, UK
Antikörper AXOR12 (375-398)	Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, D
CpG Methyltransferase (M.SssI)	NEB, Frankfurt, Germany
Dynabeads® <i>Magnetbeads</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Human Cot-1 DNA®	Invitrogen, Karlsruhe, D
McrBC Restriktionsenzym	NEB, Frankfurt, Germany
Microcon YM-30 Filter Device	Merck Millipore KgaA, Darmstadt, D
Yeast tRNA	Invitrogen, Karlsruhe, D
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Germany
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Fisher Scientific, Schwerte, D
MegaTran 1.0 Transfection Reagent	OriGene Technologies, Inc, Rockville, MD, USA

2.1.5 Kits

Agilent Genomic DNA Labeling Kit Plus	Agilent Technologies, Böblingen, D
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Germany
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim, D
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega GmbH, Mannheim, D
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, D
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim, D
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Oligo aCGH Hybridization Kit	Agilent Technologies, Böblingen, D
ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System	Promega GmbH, Mannheim, D
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen, D
VECTASTAIN-ABC-KIT universal	Vector Laboratories, Burlingame, USA
PCR Aufreinigungsskit	Sequence Laboratories Göttingen, D

2.1.6 Oligonukleotide

AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden, Germany
SEPT9 MISSION® Pre-designed siRNA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
TrueClone™ KISS1R (untagged)-Human	OriGene Technologies, Inc, Rockville, MD,
KISS-1 receptor	USA

qPCR Primer für DNA-Methylierungsanalysen

Gen	Primersequenz (vorwärts & rückwärts)
KISS1R	5'-GCT CTC ACT CCG ACC TTG C-3'
	5'-AGC GTT TAT AGC CCG TGC C-3'
KISS1	5'-CGGGTTGGAAGTTTTAGC-3'
	5'-GCTTCGACAAACGAAAAAC-3'
CSAD	5'-CCA AGC TCA CCC GCT CTG-3'
	5'-GGG ACC GAG GCA AGT TTA CA-3'
SEPT9	5'-AAT CGC TGA CTT TCC AGG TC-3'
	5'-CCG AAG AGA ATC CGA AGA AAG-3'
SNPRN	5'-TAC ATC AGG GTG ATT GCA GTT CC-3'
	5'-TAC CGA TCA CTT CAC GTA CCT TCG-3'

g PCR Primer für Expressionsanalysen

Gen	Primersequenz (vorwärts & rückwärts)
KISS1R	5'-CGT GAC CAA CTT CTA CAT CGC-3' 5'-GGA TGT AGT TGA CGA ACT TGC AC-3'
KISS1	5'-ACT CAC TGG TTT CTT GGC AGC-3' 5'-ACC TTT TCT AAT GGC TCC CCA-3'
CSAD	5'-ATT CTT CTG CCT AGC CTT AGC C-3' 5'-GAG TCA GCC ATC AGG ATC TCT C-3'
SEPT9v3	5'-CGC CGC TGC TAA ATA TAT CC-3' 5'-GAC CTC CTC GAC CTC AAA AGA-3'
HMBS	5'-CTT CGC TGC ATC GCT GAA AG-3' 5'-TCC TCC AGT CAG GTA CAG TTG-3'
ATP5B	5'-TCT AGA CTC CAC CTC TCG TAT C-3' 5'-CTG GAG GGA TTT GTA GTC CTG-3'

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

96 Well PCR Platte, farblos, "Fast" Typ	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
BioCoat™ Matrigel™ Invasionskammern	BD Bioscience, Heidelberg, D
DNA LoBind Reaktionsgefäße (0.2, 0.5, 1.5, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, D
FKS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
MaXtract High Density	Qiagen, Hilden, Germany
Microarray gasket slides	Agilent Technologies, Böblingen, D
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Zellkultur Multiwellplatten	BD Bioscience, Heidelberg, D
Zellkulturflaschen	BD Bioscience, Heidelberg, D
Zellkulturmedien (DMEM, RPMI)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Zentrifugenröhrchen	BD Bioscience, Heidelberg, D

2.1.8 Datenbanken und Computersoftware

Agilent feature extraction 9.5.3	Agilent Technologies, Böblingen, D
Genomic Workbench 5	Agilent Technologies, Böblingen, D
Primer 3	http://primer3.ut.ee/
Qlucore 2.2	Qlucore Omics Explorer, Lund, Schweden
QuantPrime	http://www.quantprime.de/
SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, D

Relative Expression Software Tool (REST) Qiagen, Hilden, Germany; Technische
2009 Universität München

2.1.9 Patientenmaterial

Die verwendeten Gewebeproben stammen aus verschiedenen deutschen urologischen Einrichtungen. Es wurden Harnblasentumore von Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Zystektomie verwendet. Proben des Kollektivs 1 (n=54) stammen aus einer Studie der „Arbeitsgemeinschaft Urologischer Onkologie“. Kollektiv 2 (n=39) besteht aus Gewebeproben der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena. Für immunhistochemische Färbungen wurden TMAs aus dem Institut für Pathologie Erlangen (bestehend aus Gewebeproben der o.g. AUO-Studie =TMA 1; n=177) und der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden (TMA 2, n=116) zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung der Patientenkohorten bezüglich pT- und pN-Stadium ist in folgender Tabelle aufgelistet.

		Kollektiv 1	Kollektiv 2	TMAs 1	TMAs 2
pT-Stadium	2	2	1	9	6
	2a	2	7	6	51
	2b	1	1	11	15
	3	5	2	18	5
	3a	15	11	36	16
	3b	21	8	63	14
	4	2	2	10	2
	4a	5	6	23	7
	4b	0	0	1	0
pN-Stadium	N-negativ	22	25	80	104
	N-positiv	32	14	97	12

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Isolation

Genomische DNA wurde unter Verwendung des *Qiagen Blood & Tissue DNA Kits* (Qiagen) isoliert. Dafür wurden 10 mg Tumorgewebe mit 180 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K versetzt und bei 56°C inkubiert, um die Zell- und Kernmembranen aufzulösen sowie Proteine zu degradieren. Die Gegenwart einer hohen Konzentration chaotroper Salze (z.B. Guanidiniumthiocyanat) im Lysepuffer bewirkt den Entzug von Wasser aus den hydratisierten Nukleinsäuren im Zelllysats und ermöglicht die effiziente Bindung der DNA an die Siliziumdioxid-Membran des Zentrifugenröhrchens. Des Weiteren werden durch die Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen die Strukturen des Wassers verändert und Makromoleküle des Zelllysats denaturiert. Somit werden freiwerdende Nukleasen direkt zu Beginn der Zelllyse beseitigt und die Degradation der Nukleinsäuren verhindert [95]. Die Zelllysatsbestandteile wurden mittels Zentrifugation (1 min, 6.000 x g) entfernt und zwei Waschschrte gewährleisteten anschließend die Aufreinigung der gebundenen DNA und die Entfernung von Salzen, Proteinen und weiteren Zellbestandteilen. Die Elution der DNA von der Membran erfolgte durch Zugabe von 200 µl Nuklease-freiem Wasser. Unter Verwendung des NanoDrop ND-1000 wurde die DNA-Konzentration ermittelt.

2.2.1.2 RNA-Isolation

Zur Bestimmung des Expressionslevels verschiedener Gene aus Gewebematerial wurde RNA mittels des *mirVana™miRNA Isolation-Kits* (Life Technologies) unter Anwendung des Total RNA-Isolationsprotokolls isoliert. Dafür wurden 10 mg Tumorgewebe mit 100 µl Lyse-/Bindepuffer und 10 µl miRNA *Homogenate Additive* versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert, um die Zellverbände aufzulösen und die Zellen zu lysieren. Die im Bindepuffer enthaltenen chaotropen Salze gewährleisteten die spätere Bindung der Nukleinsäuren an die Membran des Zentrifugenröhrchens. Die Extraktion der RNA aus dem Zelllysats erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Phenol:Chloroform (5:1). Nach gutem Durchmischen und Zentrifugation für 15 s bei 10.000 x g entstehen zwei Phasen. Die untere organische Phase aus Chloroform enthält Proteine und die obere wässrige Phase aus Phenol beinhaltet Nukleinsäuren. Die Präzipitation der RNA erfolgte, indem die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,25 Volumen 100 % Ethanol versetzt wurde. Das Gemisch wurde in Zentrifugenröhrchen überführt. Die RNA-Moleküle wurden in drei Waschschrten aufgereinigt. Die Elution der RNA von der Membran des Zentrifugenröhrchens erfolgte mit 50 µl erhitzen (95°C) Nuklease-freiem Wasser.

Die RNA-Isolation aus Harnblasenkarzinom-Zelllinien erfolgte mit dem ReliaPrep™ RNA Cell Minprep System Kit (Promega). Das Zellpellet wurde zuerst mit 100 µl Lysepuffer inkl. chaotrophen Salzen versetzt. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 35 µl Isopropanol. Das Lysat wurde anschließend auf die Membran einer Aufreinigungssäule gegeben und durch einen Zentrifugationsschritt konnten die Nukleinsäuren direkt an die Membran binden, während die restlichen Zellbestandteile durchflossen und entfernt wurden. Im darauf folgenden Verdau mit DNase I Mix (24 µl Yellow Core Buffer, 3 µl 0,09 M MnCl₂, 3 µl DNaseI) wurde die genomische DNA abgebaut. In drei Waschschritten erfolgte die Beseitigung jeglicher Kontaminationen. Die RNA wurde mit 17 µl Nuklease-freiem Wasser von der Membran eluiert.

2.2.1.3 Bestimmung der RNA Qualität

Der sogenannte RIN (*RNA integrity number*)-Faktor ist ein Maß für die Intaktheit der RNA. Ein möglichst hoher RIN-Faktor ist somit von zentraler Bedeutung für die Erhebung von Genexpressionsdaten. Zur Bestimmung der RNA Qualität wurde die isolierte RNA unter Verwendung des Agilent RNA6000 Nano Kits in Mikrochips elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über laserinduzierte Fluoreszenzaufnahmen im Bioanalyzer 2100 (Agilent). Die zugehörige Software (2100 Expert, Agilent) berechnet und visualisiert das Verhältnis aus 28S und 18S rRNA und lässt somit Rückschlüsse auf die Intaktheit bzw. Degradation der RNA innerhalb einer Probe zu. Der RIN-Faktor kann zwischen 0 und 10 liegen, wobei eine Probe mit RIN = 0 komplett degradierte RNA aufweist und 10 die höchste Qualität darstellt. Da während des RNA-Isolationsvorgangs durch Freisetzung von z.B. Nukleasen aus Bindegewebszellen eine teilweise Degradation der RNA nicht vermieden werden kann, ist ein RIN von 10 im biologischen Material kaum erreichbar [96]. Ein RIN ≥ 5 wurde hier als Mindestmaß für geeignete RNA-Qualität festgelegt.

Die Bestimmung erfolgte entsprechend den Angaben der Agilent RNA6000 Nano Kit-Anleitung. Zunächst wurden 1 µl des Fluoreszenzfarbstoff-Konzentrats und 65 µl filtrierte Gelmatrix zusammengegeben, gut gemischt und 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. 9 µl des Gel-Farbstoff-Gemisches wurden in eine Vertiefung des Nano Chips pipettiert. In jede weitere Vertiefung wurden 5 µl des RNA6000 Markers gegeben. In die dafür vorgesehenen Vertiefungen wurde 1 µl Nukleotidgrößenmarker bzw. RNA-Probe pipettiert. Der Chip wurde 1 min bei 2.400 rpm zentrifugiert und die Messung im Bioanalyzer 2100 gestartet.

2.2.1.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) ist eine Technik, die zur Amplifikation gezielter DNA-Sequenzen eingesetzt wird. Die PCR verläuft in

3 Schritten: 1. Denaturierung, 2. Primeranlagerung (Annealing), 3. Elongation. Zu Beginn eines Zyklus wird der DNA-Doppelstrang durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen bei 95°C in Einzelstränge aufgetrennt. Durch Reduktion der Temperatur lagern sich entsprechend der Sequenzkomplementarität kurze Oligonukleotide von ca. 20 bp (Primer) an die DNA-Einzelstränge. Die DNA-Polymerase benötigt die Primer als Startmoleküle für die anschließende Verlängerung der Zielsequenz. Pro PCR-Reaktion werden ca. 40 Zyklen durchgeführt, in denen eine exponentielle Vervielfältigung der Zielregion erfolgt.

In der quantitativen PCR wird durch Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes ein Signal erzeugt, das proportional mit der Menge an PCR-Produkten zunimmt. Am Ende jedes Zyklus erfolgt eine Fluoreszenzmessung, so dass die Zunahme der Produkte in Echtzeit (daher: real-time PCR) verfolgt werden kann.

In der Startphase der PCR ist die DNA-Menge begrenzt und es sind keine eindeutigen Produkte messbar, während in der Endphase die Menge an PCR-Produkten so hoch ist, dass Produktfragmente häufig miteinander hybridisieren und die PCR-Reaktion hemmen. Die Zahl an Produkten nimmt dann nicht weiter zu und es stellt sich eine Plateauphase ein. Zwischen Start- und Plateauphase liegt die exponentielle Phase, in der eine optimale Verdopplung der Zielregion erfolgt. Zur Quantifizierung wird der Anfang der exponentiellen Phase genutzt und zwar der Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser wird als C_T -Wert (threshold cycle = Schwellenwertzyklus) bezeichnet.

Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green lagert sich in die kleine Furche der DNA und detektiert somit alle doppelsträngigen DNA-Moleküle im Reaktionsansatz wie z.B. auch Primer-Dimer und unspezifische Nebenprodukte. Im Anschluss an die PCR kann in einer Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der Reaktion überprüft werden. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung erfolgt eine Auftrennung aller Amplifikate und somit eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Entsprechend der DNA-Sequenz besitzt jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur, welche anhand des Fluoreszenzsignals ermittelt werden kann. Die Detektion eines einzelnen Schmelzkurvenpeaks zeigt die Reinheit des PCR-Produktes.

Die PCR wurde mit dem LightCycler®480 (Roche Applied Science) bzw. dem StepOnePlus™ (Life Technologies) in 96 Well-Platten durchgeführt. Für LightCycler®480 Analysen wurden der gebrauchsfertige Reaktionsmix SYBR Green I Master (Roche Applied Science) verwendet. Für Versuche mit dem StepOnePlus™ wurde der GoTaq®qPCR Master Mix (Promega) verwendet. Jede Probe wurde mittels Dreifachbestimmung in einem Reaktionsvolumen von 10 µl analysiert. Für jedes zu analysierende Gen wurde ein Master Mix entsprechend der Anzahl an Reaktionen hergestellt. Zu 8 µl PCR Master Mix wurden 2 µl

DNA oder cDNA bzw. H₂O als Negativkontrolle zum Ausschluss von möglichen Kontaminationen zugegeben. Die Reaktionsansätze und PCR-Programme wurden entsprechend der folgenden Angaben vorbereitet und durchgeführt.

PCR Master Mix

LightyCycler®480 System:	Volumen	Endkonzentration
SYBR Green I Master [2 x]	5 µl	1 x
Primer forward & reverse [10 µM]	0,25-0,5 µl	0,25-0,5 mM
Nuklease-freies H ₂ O	2,5-2,75 µl	-----

StepOnePlus™ System:	Volumen	Endkonzentration
GoTaq®qPCR Master Mix [2 x]	5 µl	1 x
Primer forward & reverse [10 µM]	0,25-0,5 µl	0,25-0,5 mM
CXR Reference Dye [30 µM]	0,1 µl	0,3 mM
Nuklease-freies H ₂ O	2,4-2,65 µl	-----

PCR Programm

Programmschritt		Zeit	Temperatur
1	<i>Hot-Start</i> Aktivierung	10 min	95°C
	Denaturierung	15 s	95°C
2	Amplifikation 43x	30 s	Primer spezifisch
	Elongation	30 s	72°C
3	Schmelzkurven	-----	65°C – 95°C

2.2.2 Allgemeine Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Verwendete Zelllinien

Zur Ermittlung der Methylierung und Expression von Kandidatengenomen sowie für die Funktionsanalysen wurden vier verschiedene Urothelkarzinom-Zelllinien verwendet. Tabelle 1 zeigt den Ursprung sowie die Wachstumsbedingungen der verwendeten Zelllinien.

Tabelle 1 Verwendete Urothelkarzinomzelllinien

Zelllinie	Ursprung		Kultivierungsbedingungen	
	Patient/Modell	Tumoreigenschaft	Medium/Zusatz	Verdopplungszeit
RT4	63 Jahre, männlich	Urothelkarzinom, Rezidiv, GI [100]	RPMI 1640 10 % FKS	ca. 80 h
RT112	Alter unbekannt, weiblich	Urothelkarzinom, GII [101]	RPMI 1640 10 % FKS	ca. 35 h
T24	81 Jahre, weiblich	Urothelkarzinom, GIII [102]	DMEM 10 % FKS	ca. 24 h
253J B-V	253J Zelllinie, (53 Jahre, männlich) orthotopes Mausmodel	Formation von Harnblasentumoren sowie Bildung von Lymphknoten-, Lungen- und Lebermetastasen in Nacktmäusen [103]	DMEM 10 % FKS	ca. 30 h

Die Zellkultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen mit mikroporösem Membranfilterdeckel zur Verringerung von Kontaminationen und zur Gewährleistung eines gleichmäßigen Gasaustausches.

2.2.2.2 Subkultivierung

Nach einer bestimmten Kultivierungsphase erreichen Zellen das Stadium der Konfluenz, d.h. der Boden der Zellkulturflasche ist vollständig mit Zellen bedeckt. Da den Zellen keine Oberfläche zum Bewachsen zur Verfügung steht, kommt es zu einer Inhibierung der Zellproliferation. Um dies zu vermeiden, müssen die Zellen vor dem Eintreten in das Konfluenzstadium (wenn ca. 80 % des Kulturflaschenbodens bedeckt ist) verdünnt werden. Dafür müssen die adhärenenten Zellen zunächst vom Boden gelöst werden. Dies erfolgte unter Verwendung von Trypsin-EDTA. Trypsin ist eine Endopeptidase, die durch den Abbau von Proteinen eine partielle Zerstörung der extrazellulären Matrix katalysiert. Durch die Zerstörung von Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen wird das Ablösen der Zellen bewirkt. Der Zusatz von EDTA gewährleistet die Komplexbildung von Calcium- und Magnesiumionen, deren Anwesenheit die Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Verbindung fördert. Nach Entnahme des alten Kulturmediums wurden die adhärenenten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um FKS-Rückstände vollständig zu entfernen und somit die Einwirkzeit der Protease zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37°C im Brutschrank für 5 min. Das Ablösen der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von 5 ml frischem Kulturmedium inklusive 10 % Serum wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 218 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und je nach Zelllinie in Verhältnis 1:2 bis 1:20 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum und zum Erhalt der Vitalität wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zunächst wurden die Zellen wie unter 2.2.4.2 beschrieben vom Boden der Kulturflasche gelöst. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein 2 ml Kryogefäß überführt. Dieses wurde zunächst für mindesten 24 h bei -80°C gelagert bevor es in den Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt wurde.

Das verwendete Einfriermedium besteht aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) inklusive 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO dient hier als Gefrierschutzmittel, indem es die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses verhindert und somit die Zellen vor der Zerstörung der Membran schützt. DMSO hat bei RT eine permeabilisierende Wirkung auf die Zellmembran, so dass bei längerer Einwirkung eine Zerstörung der Zellen stattfindet.

Für das Auftauen von kryokonservierten Zellen wurde das Kryogefäß im 37°C Wasserbad aufgetaut. Es wurde darauf geachtet, dass dieser Vorgang zügig abläuft, um die Zellen nur für einen möglichst kurzen Zeitraum mit dem zytotoxischen DMSO in Kontakt zu bringen. Der Inhalt des Kryogefäßes wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Kulturmedium inkl. 10 % FKS überführt und 3 min bei 218 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche mit der gewünschten Menge an Medium gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um potentiell tote Zellen, die nicht adhären wurden, zu entfernen.

2.2.2.4 Zellzählung

Zum Aussähen einer definierten Zellzahl wurde die Zellzahlbestimmung mittels Lichtmikroskop und Neubauer *improved* Zählkammer durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels Trypsin-EDTA abgelöst (siehe 2.2.4.2) und anschließend in einer definierten Menge Medium (1-5 ml je nach Größe des Zellpellets) aufgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden in die Zählkammer überführt. Die Zellzahl in den äußeren vier Großquadraten wurde bestimmt. Die Kantenlänge eines Großquadrates, bestehend aus 4 Kleinquadraten zur Orientierung beim Zählen, beträgt 1mm (Fläche = 1mm²). Bei einer Tiefe von 0,1mm ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat. Die Berechnung der Zellzahl pro ml Medium berechnet sich demnach wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{MW Zellzahl} * 10^4$$

Zur Berechnung von Volumina mit einer bestimmten Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$z = \frac{x * 10^3}{(y * 10^4)}$$

x = gewünschte Zellzahl; y = MW Zellzahl; z = Volumen mit gewünschter Zellzahl [μl]

2.2.2.5 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung

Die epigenetische Stilllegung eines Gens ist ein reversibler Vorgang. Die Behandlung von Zellen mit 5-Aza-2'deoxycytidin (5Aza-dC), einem DNMT-Inhibitor, resultiert in einer Reaktivierung der Expression. Somit kann eine Bewertung der methylierungsspezifischen Regulation der Kandidatengene sowie die Analyse der Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Genexpression *in vitro* erfolgen. 5Aza-dC ist ein Nukleosid-Analogon, das während der Replikation an Stelle von Cytosin in den DNA-Strang eingebaut wird. Es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen 5Aza-dC und dem aktiven Zentrum der DNA-Methyltransferase, deren Aktivität somit gehemmt wird. Bestehende DNA-Methylierungsmuster werden somit während der Replikation nicht auf die neu synthetisierten Tochterstränge weitergegeben und es kommt zu einer passiven Demethylierung der DNA.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in zwei Zellkulturflaschen ausgesät. Ein Ansatz wurde als unbehandelte Kontrolle (Mock) mitgeführt, der andere Ansatz wurde für die Behandlung mit 5Aza-dC verwendet. Nachdem die Zellen adhärent waren (ca. 4 h), wurde den Zellen des Behandlungsansatzes 5 μM 5Aza-dC zugegeben. Die Inkubation erfolgte in Abhängigkeit von der Verdopplungszeit der Zelllinie. Für die Gewährleistung einer hinreichenden DNA-Demethylierung wurden die Zelllinien über 2 Verdopplungsphasen mit 5Aza-dC behandelt. Das Medium wurde täglich gewechselt und erneut mit 5 μM 5Aza-dC versetzt.

2.2.3 DNA-Methylierungsanalysen

2.2.3.1 Microarrayanalyse

Anreicherung methylierter DNA-Fragmente mittels *Methylated DNA Immunoprecipitation* (MeDIP)

Eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse erfordert zunächst die Anreicherung methylierter DNA-Abschnitte. Die *Methylated DNA Immunoprecipitation* (MeDIP) stellt eine geeignete Methode dar, die die Anreicherung methylierter DNA-Fragmente ermöglicht. Dafür wird ein Antikörper verwendet, der gegen 5mC gerichtet ist. Die aufgereinigten DNA-Abschnitte können anschließend in genspezifischen sowie genomweiten Analyseverfahren

eingesetzt werden und erlauben z.B. die Detektion von methylierungsspezifischen Veränderungen zwischen zwei Patientenkollektiven.

Zunächst wird die isolierte genomische DNA mittels Ultraschallbehandlung fragmentiert, um die Länge der DNA-Abschnitte zu reduzieren. Die geeignete Länge der DNA-Fragmente liegt unter 1000 bp. Die Präzipitation erfolgt unter Verwendung des 5mC-Antikörpers, der an Magnetkugeln (*Beads*) gekoppelt ist und methylierte DNA-Fragmente bindet. Durch die Inkubation entstehen zwei Fraktionen, die methylierte bzw. unmethylierte DNA enthalten und anschließend z.B. mittels Microarray-Technologie detailliert analysiert werden können.

DNA-Fragmentierung

Pro Probe wurden 8 µg genomische DNA in 250 µl PBS resuspendiert und im Eiswasserbad mit folgenden Einstellungen ultraschallbehandelt:

Zyklusanzahl: 35

Zyklusdauer: 1 Minute (30 Sekunden an; 30 Sekunden Pause)

Nach jeweils 12 Zyklen wurde das Eiswasserbad erneuert.

Die Fragmentierung wurde anschließend auf einem 2,5 %igem Agarosegel kontrolliert.

Bindung des 5mC-Antikörpers an Magnetbeads

50 µl *Dynal Magnetbeads* (Invitrogen) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zunächst zweimal mit 750 µl Blockierungslösung 1 für 5 min bei 4°C unter Verwendung eines Rotators gewaschen. Anschließend wurden die *Beads* in 230 µl Blockierungslösung 2 resuspendiert und 5 µg 5mC-Antikörper zugegeben. Zur Kontrolle wurde parallel ein Ansatz mit IgG-Antikörper mitgeführt, welcher keine Spezifität zu DNA-Fragmenten aufweist. Die Bindung der Antikörper an die *Beads* erfolgte für mind. 6 h oder über Nacht unter ständiger Bewegung der Reaktionsgefäße auf dem Rotator bei 4°C. Die *Beads* wurden dreimal mit 750 µl Blockierungslösung 2 gewaschen und in 50 µl Blockierungslösung 2 resuspendiert.

Blockierungslösung 1:	1x	PBS
	0,5 % (w/v)	BSA

Blockierungslösung 2:	1x	PBS
	0,05 % (w/v)	BSA

Immunpräzipitation methylierter DNA-Fragmente

50 µl des Antikörper-Magnetbead-Gemisches wurden zu 200 µl der ultraschallbehandelten DNA gegeben. Die restlichen 50 µl der DNA verblieben als Referen-DNA, welche für die

Material und Methoden

Hybridisierung auf den Microarray benötigt wurde. Das Antikörper-Beads-DNA-Gemisch wurde mit 250 µl 2x IP-Puffer versetzt und über Nacht unter ständiger Bewegung bei 4°C inkubiert.

2x IP Puffer:	1x	PBS
	0,05 % (v/v)	TritonX-100
	50ng/µl	Yeast tRNA

Die *Magnetbeads* wurden am darauffolgenden Tag zweimal mit 1 ml IP-Waschpuffer gewaschen. Dieser Waschschrift erfolgte bei dreiminütiger Inkubation bei 4°C auf dem Rotator.

IP-Waschpuffer:	1x	PBS
	0,02 % (v/v)	TritonX-100

Durch Zugabe von 150 µl Elutionspuffer und Inkubation bei 65°C für 2,5 min wurden die gebundenen methylierten DNA-Fragmente freigesetzt, da das im Elutionspuffer enthaltene SDS die Denaturierung von Proteinen (hier des Antikörpers) bewirkt.

Elutionspuffer:	1x	TE-Puffer
	1 %	SDS

Der Überstand, der die immunpräzipitierte DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde einmal wiederholt.

Aufreinigung der immunpräzipitierten DNA und Referenz-DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

50 µl Referenz-DNA wurden mit 250 µl Elutionspuffer versetzt, um ein Gesamtvolumen von 300 µl zu erhalten, welches dem Volumen der immunpräzipitierten DNA-Probe entspricht. Beide DNA-Proben wurden mit 300 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Durch Zentrifugation entsteht eine 2-phäsige Lösung, wobei sich in der unteren organischen Phase aus Chloroform Proteine sammeln und die obere wässrige Phase aus Phenol Nukleinsäuren enthält. Zur Erleichterung der Phasentrennung wurden die Proben in *MaXtract high density extraction columns* (Qiagen) überführt und 5 min bei 14.000 x g bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration: 200 mM) und Glykogen (Endkonzentration: 75 ng/µl). Diesem Gemisch wurden 2 Volumen Ethanol zugegeben und die Fällung der DNA erfolgte bei -80°C für 30 min. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 20.000 x g bei 4°C wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol

gewaschen und erneut für 3 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 29 µl Nuklease-freiem H₂O resuspendiert.

Die Kontrolle der Anreicherung methylierter DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR unter Verwendung von Primern, die das EDNRB-Gen amplifizieren, welches in fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen als verstärkt methyliert beschrieben ist [82].

DNA-Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung auf 244K Agilent CpG Island Microarray

Die Fluoreszenzmarkierung der DNA-Fractionen erfolgte unter Verwendung des *Genomic DNA Labeling Kit PLUS* (Agilent). Zu 26 µl der aufgereinigten Proben (Referenz-DNA und 5mC IP-DNA) wurden 5 µl *Random primer* gegeben. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide mit zufälliger Basenreihenfolge, die sich während der Reaktion entsprechend der Sequenzkomplementarität an die DNA-Einzelstränge der Probe anlagern. Dafür erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt für 3 min bei 95°C zur Trennung des DNA-Doppelstrangs. Die Proben wurden anschließend für 5 min auf Eis inkubiert, um zu verhindern, dass sich die DNA-Stränge erneut zusammenlagern. Zu jeder Probe wurden 19 µl Labeling Master Mix zugegeben.

Labeling Master Mix

	Volumen	Endkonzentration
5 x Puffer	10 µl	1 x
10 x dNTPs	5 µl	1 x
Cyanin-3-dUTP [1 mM] zur Markierung der Referenz-DNA		
<u>ODER</u>	3 µl	60 µM
Cyanin-5-dUTP [1 mM] zur Markierung der 5mC IP-DNA		
Exo-Klenow-Fragment	1 µl	N/A

Der Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt bei 37°C für 2 Stunden. Dabei dienen die Randomprimer als Startpunkt für die Synthese des komplementären Strangs. Die Synthese wird durch das Exo-Klenow-Fragment katalysiert, welches ein Fragment der DNA-Polymerase I ist und die DNA in 3' Richtung synthetisiert. Allerdings besitzt es keine 5'→3' Exonuklease Aktivität, so dass bereits angelagerte Primer nicht abgebaut werden. Das Enzym wurde bei 65°C für 10 min inaktiviert. Unter Verwendung von *Microcon YM-30 Filtern* (Millipore) wurden die markierten Proben aufgereinigt. Dafür wurde die Probe zunächst mit

430 µl TE-Puffer versetzt und für 6 min bei 14.000 x g zentrifugiert und anschließend mit 480 µl TE-Puffer versetzt und für 12 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Filtereinsatz wurde umgedreht und erneut 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Das aufgefangene Volumen wurde ermittelt und gegebenenfalls auf 42 µl eingestellt. Zur Bestimmung der DNA-Menge der Proben sowie der spezifischen Aktivität erfolgte eine Messung mittels NanoDrop ND-1000.

$$DNA - Menge [\mu g] = DNA - Konzentration \left[\frac{ng}{\mu l} \right] * Gesamtvolumen [\mu l]$$

$$Spezifische Aktivität \left[\frac{pmol}{\mu g} \right] = \frac{eingebauter Farbstoff \left[\frac{pmol}{\mu l} \right] * Gesamtvolumen [\mu l]}{DNA - Menge [\mu g]}$$

Folgende Qualitätsparameter für eine erfolgreiche Microarrayanalyse wurden vom Hersteller vorgeschrieben:

DNA-Menge > 2,5 µg

Spezifische Aktivität: Cy 5: 7-20 pmol/µg; Cy 3: 18-25 pmol/µg

Unter Verwendung des *Oligo aCGH Hybridization Kits* (Agilent) wurden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente auf einen *1x244K Human CpG Island Microarray* (Agilent) hybridisiert. Die Oberfläche der Microarrays besteht aus 237,200 unmarkierten Sonden, die insgesamt 27,800 CpG-Inseln des menschlichen Genoms abdecken und somit eine genomweite Methylierungsanalyse ermöglichen. Dafür wurden die Cy3- und Cy5-markierten DNA-Fragmente einer Harnblasenkarzinom-Probe (Referenz-DNA: Cy3-markiert, IP-DNA: Cy5-markiert) in ein Reaktionsgefäß zusammengeführt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 80 µl aufgefüllt. Für den Hybridisierungsansatz wurden den Proben mit Cot-1 DNA®, 10 x Blockierungslösung (Agilent), 2 x Hybridisierungspuffer (Agilent) zugegeben. Die Cot-1 DNA® dient der Blockade unspezifischer Hybridisierungsreaktionen. Zusätzlich wurde deionisiertes Formamid verwendet, um die DNA-Einzelstränge während des Hybridisierungsprozesses zu stabilisieren.

Hybridisierungsmix

	Volumen	Endkonzentration
Cy3- und Cy5-markierte DNA	80 µl	
Cot-1 DNA® [1mg/ml]	50 µl	0,01 mg/ml
Blockierungslösung [10x]	52 µl	1 x
Deionisiertes Formamid	78 µl	15 %
Hybridisierungspuffer [2x]	260 µl	1 x

Zur Denaturierung wurden die Proben zuerst für 3 min bei 95°C und danach für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Hybridisierung auf Microarray-Objektträger erfolgte bei 67°C für 40 h im Hybridisierungssofen (Agilent) unter ständiger Bewegung bei 20 rpm. Die Microarray-Objektträger wurden anschließend für 5 min bei RT im *Oligo aCGH/ChIP-on-chip* Waschpuffer I sowie 5 min im vorgewärmten 37°C *Oligo aCGH/ChIP-on-chip* Waschpuffer II gewaschen. Danach wurden die Objektträger luftgetrocknet und unmittelbar unter Verwendung des Agilent C Scanners ausgelesen. Die Bildanalyse und Datenextraktion erfolgte mit Hilfe der *Feature Extraction Software* v9.5.3 unter Verwendung des Standard *ChIP*-Protokolls.

Datenauswertung

Die Datenanalyse dient der Reduktion der Datenfülle auf die Gene, die sich signifikant zwischen den beiden Patientengruppen unterscheiden. Für die Auswertung wurde zunächst die Software Genomic Workbench 5.0 (Agilent) genutzt, unter deren Verwendung eine Normalisierung der Fluoreszenzsignale erfolgte, sowie eine Generierung von Zahlenwerten, die die Signalintensitäten jeder Microarraysonde wiedergeben. Dieser Zahlenwert ($\log_2\text{ratio}$) wird wie folgt berechnet: $\log_2\text{ratio} = \text{Signal Cy5} / \text{Signal Cy 3}$. Der $\log_2\text{ratio}$ ermöglicht Rückschlüsse auf das Methylierungsniveau der Microarraysonden. Dabei repräsentiert ein positiver $\log_2\text{ratio}$ eine verstärkte Methylierung und ein negativer $\log_2\text{ratio}$ steht für eine schwächere Methylierung. Ist das Verhältnis der Farbstoffe = 0, bedeutet dies, dass die markierten Fragmente im selben Verhältnis an die Microarraysonde gebunden haben und keine Methylierungsunterschiede bestehen.

Die Daten der Reportdateien wurden anschließend in Microsoft Office Excel 2007 importiert. Für die Selektion von Genen, die sich bezüglich ihres Methylierungslevels zwischen beiden Patientengruppen unterscheiden, wurden verschiedene Kriterien definiert.

Zunächst wurde anhand aller $\log_2\text{ratios}$ für jede Probe 0,8 und 0,2 Quantil berechnet. Eine Sonde des Microarrays wurde dabei als hypermethyliert definiert, wenn ihr $\log_2\text{ratio}$ über dem 0,8 Quantil aller Arraysonden einer Probe lag. Eine Hypomethylierung ergab sich aus einem $\log_2\text{ratio}$ unterhalb des 0,2 Quantils. Im Anschluss wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der $\log_2\text{ratios}$ jeder Arraysonde innerhalb der Patientengruppe mit metastasierten (M+) und nicht-metastasierten (M-) Harnblasentumoren berechnet (=Rohdaten).

Da es sich bei den *CpG Island* Microarray um sog. *tiling arrays* handelt, d.h. mehrere Arraysonden umfassen eine zusammenhängende genomische Region (hier: CpG-Insel), wurden die nächst-benachbarten Sonden zusammengefasst, indem der Median aus insgesamt 20 Sonden berechnet wurde (=Median *tiling score*). Anschließend wurde mittels T-Test sowohl für die Rohdaten als auch für den *Median tiling score* der signifikante

Unterschied zwischen den beiden Gruppen errechnet. Zur weiteren Analyse wurden nur Sonden verwendet, welche sowohl für die Rohdaten als auch für den *Median tiling score* eine Signifikanz $p < 0.01$ aufwiesen. Eine weitere Bedingung für die Selektion bestand darin, dass der Mittelwert zwischen M+ und M- zwischen Rohdaten und den *Median tiling score* einen Unterschied von unter 20 % aufweist. Von den verbleibenden CpG-Inseln wurden zunächst diejenigen als Kandidaten ausgewählt, die mit einer Promotorregion assoziiert sind. Für eine hierarchische Clusteranalyse und die Visualisierung der Daten in einer *heatmap* wurde die Software Qluore Omics Explorer verwendet.

2.2.3.2 Quantitative Analyse der DNA-Methylierung

Die genomweite Analyse zur Identifizierung von Unterschieden zwischen zwei Patientengruppen bedingt eine Validierung initialer Ergebnisse. Die Methylierungsunterschiede von Regionen, die in den Microarray-Analysen als signifikant ermittelt wurden, müssen mit einer unabhängigen Methode und anhand eines erweiterten Patientenkollektivs bestätigt werden.

Dafür wurde eine von Oakes *et al.* beschriebene Methode angewandt, die unter Verwendung eines methylierungsabhängigen Restriktionsenzym und qPCR eine Quantifizierung der Methylierung der Ziel-DNA-Sequenz ermöglicht [97]. Für die Restriktion der DNA wurde das Enzym McrBc eingesetzt, welches DNA spaltet, wenn einer der beiden DNA-Stränge Methylcytosin enthält. Die Spaltung erfolgt zwischen zwei (G/A)^mC – Sequenzen, die für eine optimale Trennung 55-103 bp voneinander getrennt liegen. McrBc katalysiert keine Reaktion mit unmethylierter DNA [98].

Die PCR-basierte Quantifizierung der Methylierung einer Probe erfolgte durch den Vergleich von McrBc-verdauter DNA zu unbehandelter DNA (Mock). Da die gesamte DNA einer Probe mit dem Enzym behandelt wurde, konnte in der PCR durch Verwendung verschiedener Primer eine parallele Analyse mehrerer Zielsequenzen erfolgen. Die Primer wurden so entworfen, dass sie die genomische Region abdecken, welche in der Microarrayanalyse als signifikant unterschiedlich identifiziert wurden.

Pro Probe wurde 1 µg isolierte DNA auf ein Gesamtvolumen von 80 µl eingestellt und gleichermaßen (à 40 µl) auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Ein Ansatz wurde als Kontrolle mit einem Mock-Master Mix auf 50 µl aufgefüllt; der andere Ansatz wurde mit 10 µl des McrBc-Master Mix versetzt. Es folgten eine Inkubation bei 37°C für 4 h und ein Enzyminaktivierungsschritt bei 65°C für 20 min. Um Proteine und Salze zu entfernen, wurde die DNA mit einem PCR-Reinigungs-Kit (SeqLab) aufgereinigt.

Restriktionsansatz

	Volumen		Endkonzentration
	Mock-Mix	McrBc-Mix	
NEBuffer 2 [10 x]	5 µl	5 µl	1 x
BSA [100 x]	0,5 µl	0,5 µl	1 x
GTP [100 x]	-----	1 µl	2 x
McrBc [10 U/µl]	-----	1 µl	10 U
Nuklease-freies H ₂ O	4,5 µl	2,5 µl	-----

Anschließend erfolgte die quantitative Messung der Unterschiede zwischen Kontrolle und enzymbehandelter Probe anhand der C_T-Werte aus der qPCR (siehe 2.2.2.2). Die relative Methylierung wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta C_T = C_T \text{ McrBc} - C_T \text{ Mock}$$

$$\% \text{ Methylierung} = 1 - 2^{-\Delta C_T}$$

$$\text{Relative Methylierung der Zielsequenz} = 2^{\Delta C_T}$$

Als Kontrolle wurden zusätzlich zur Zielsequenz Primer mitgeführt, die einen Abschnitt des SNRPN-Gens amplifizieren. Dieses Gen befindet sich innerhalb einer Region, die dem genomischen Imprinting unterliegt und dient somit als Positivkontrolle für einen erfolgreichen Restriktionsverdau. Die Methylierung des Zielgens wurde auf die Methylierung des SNRPN-Referenzgens normalisiert und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{normalisierte Methylierung} = \frac{2^{\Delta C_T \text{ Zielgen}}}{2^{\Delta C_T \text{ Referenzgen (SNRPN)}}}$$

2.2.3.3 *In vitro* DNA-Methylierung

Zur Überprüfung der quantitativen Methylierungsanalyse wurden verschiedene Kontrollansätze verwendet. Als Methylierungs-Negativkontrolle wurde genomische DNA aus Lymphozyten einer gesunden Kontrollperson verwendet. Als Positivkontrolle wurde dieselbe DNA mittels enzymatischer Reaktion *in vitro* methyliert. Unter Verwendung der CpG-Methyltransferase *MSssI* werden alle Cytosinreste doppelsträngiger DNA methyliert [99]. Als Methylgruppensubstrat diente S-Adenosylmethionin (SAM). Der Reaktionsansatz (20 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

MSssI *in vitro* Methylierung:

	Volumen[μl]	Endkonzentration
genomische DNA [500 ng/μl]	2	50 ng/μl
NEBuffer 2 [10 x]	2	1 x
SAM [1,6 mM]	2	160 μM
MSssI Methyltransferase [4U/μl]	1	4 U
Nuklease-freies H ₂ O	13	-----

2.2.4 mRNA-Expressionsanalysen

Zur Analyse der Expression von Kandidatengenen wurde unter Verwendung des GoScript™ *Reverse Transcription System* (Promega) die RNA aus Gewebe bzw. Zelllinien in cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden qPCR erfolgte die spezifische Amplifikation, die die Berechnung der relative Expression der Gene erlaubt. Das Umschreiben von RNA in cDNA ist notwendig, da in der PCR eine DNA-abhängige Polymerase eingesetzt wird, die als Ausgangsmaterial DNA benötigt. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Zur Initiation der cDNA-Synthese wurden Random-Primer eingesetzt, die dem Enzym als Ausgangspunkt für die Reaktion dienen. In einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden 0,5-1 μg isolierte Total-RNA mit 0.5 μg Random Primer versetzt. Das Gemisch wurde bei 70°C für 5 min denaturiert und direkt auf 4°C überführt. Zu jeder Probe wurden 10 μl des RT-Reaktionsmix gegeben.

RT-Reaktionsmix

	Volumen	Endkonzentration im 20 μl Reaktionsansatz
GoScript™ Reaktionspuffer [5 x]	4 μl	1 x
MgCl ₂ [25 mM]	2 μl	2,5 mM
Nukleotid Mix [10 mM]	1 μl	0,5 mM
RNase Inhibitor [40 U/μl]	0,5 μl	20 U
Reverse Transkriptase	1 μl	N/A
Nuklease-freies H ₂ O	1,5 μl	-----

Die Proben wurden anschließend im Thermoblock inkubiert. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 25°C für 5 min und die Elongation bei 42°C für 60 min. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 15 min.

Die Analyse des Expressionslevels verschiedener Gene erfolgte mit Hilfe der qPCR (siehe 2.2.2.2).

Zusätzlich zum Zielgen wurde die Expression eines Referenzgens gemessen, um Variationen in der Ausgangskonzentration der eingesetzten Proben auszuschließen. Es erfolgte eine Normalisierung durch die Berechnung des ΔC_T -Wertes.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Bei optimaler PCR-Effizienz ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der relativen Expression des Zielgens:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta C_T}$$

Der Vergleich einzelner Gruppen (z.B. behandelte Zellen im Vergleich zur Kontrolle) wurde folgendermaßen berechnet:

$$1. \Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$2. \text{Verhältnis} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

2.2.5 Immunhistochemische Expressionsanalysen unter Verwendung von *Tissue Microarrays*

Die verwendeten *Tissue Microarrays* (TMAs) wurden vom Institut für Pathologie Erlangen und der Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe der TMAs, die aus Paraffinblöcken mit zahlreichen einzelnen Gewebestanzungen hergestellt werden, wird eine parallele histologische Analyse verschiedener Patientenproben ermöglicht. Von diesem Gewebeblock können histologische Schnitte angefertigt werden und anschließend auf einen Objektträger überführt werden. Dieser dient als Ausgangspunkt für eine immunhistochemische Färbung.

TMAs, die in Dresden angefertigt wurden, bestanden aus 135 Gewebestanzungen mit einem Durchmesser von 0,6 mm. Die Arrays lagen in Duplikaten vor, so dass vier bis sechs Replikate pro Patient vorhanden waren. Die Erlanger Arrays bestanden aus 60 Stanzungen, mit einer Stanze pro Patient.

Unter Verwendung unterschiedlicher Methoden kann durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen ein gezieltes Antigen in allen Gewebestanzungen nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit bietet die ABC (Avidin/Biotinylated enzyme complex)-Methode, bei der das Antigen zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper detektiert wird. Ein Spezies-spezifischer Sekundär-Antikörper, gekoppelt mit Biotin, erkennt den Primärantikörper. Das anschließend verwendete Glykoprotein Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und hat eine hohe Biotinaffinität. Durch Zugabe von biotinylierter Peroxidase entsteht ein Enzymkomplex, der das Substrat Diaminobenzidin (DAB) umsetzt. Die Enzymreaktion

bewirkt die Bildung eines unlöslichen Präzipitats mit brauner Färbung, das mittels Lichtmikroskopie detektierbar ist.

Zunächst müssen die Entfernung des Paraffins, eine Rehydrierung sowie eine Antigendemaskierung erfolgen, um das Gewebe für die Antikörper zugänglich zu machen und durch die Fixierung entstandene Proteinquervernetzungen aufzuheben. Dafür wurden die Objektträger im ersten Schritt zunächst 20 min und 15 min in Xylol, dann in einer absteigenden Ethanolreihe (96 %, 80 %, 50 %) und schließlich in Aqua dest. für je 5 min inkubiert. Die Demaskierung erfolgte für KISS-1 in 10 mM Citratpuffer (pH 6) bei 121°C für 15 min bzw. für KISS1R in 10mM Tris; 1mM EDTA (pH 9) bei 121°C für 10 min. Es folgte eine forcierte Abkühlung auf RT in 30 min. Eine Umpufferung und Blockierung von unspezifischer Peroxidase-Aktivität erfolgte für 10 min in TBS-Puffer (100 mM NaCl, 7,7 mM Tris HCl, pH 7,6) und 3 % H₂O₂ und zweimal 5 min in TBS-Puffer.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels des VECTASTAIN® ABC universal Kits (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben. Als Primärantikörper wurden Anti-Kisspeptin (1:200) (Abcam) bzw. Anti-AXOR12 (=KISS1R) (1:500) (Phoenix Pharmaceuticals) verwendet.

Als Positivkontrolle wurde Plazentagewebe mitgeführt, das eine hohe KISS-1 bzw. KISS1R-Expression aufweist. In der Negativkontrolle wurde kein Primärantikörper eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte unter Betrachtung der Stenzen im Lichtmikroskop. Es wurden Farbintensität sowie der Prozentsatz gefärbter Zellen bewertet. Die Farbintensität wurde in folgende Stufen eingeteilt: 0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = intermediäre Färbung, 3 = starke Färbung. Durch Multiplikation beider Faktoren wurde ein Farbindex berechnet. Im Fall der Dresdner Arrays wurde für jeden Patienten ein Endfarbindex aus dem Mittelwert der Stenzenreplikate gebildet.

2.2.6 Funktionelle Analysen

2.2.6.1 Transiente Überexpression von KISS1R

Die gezielte Überexpression von KISS1R erfolgte durch transiente Transfektion des TrueClone® cDNA-Vektors in T24-Zellen. Der verwendete pCMV6-XL5-Vektor enthält die vollständige cDNA-Sequenz des KISS1R-Gens. Durch das Einbringen in die Zellen erfolgt eine Überexpression von KISS1R und erlaubt Rückschlüsse auf dessen Funktion. In Abbildung 6 ist der Aufbau des verwendeten Vektor-Konstrukts dargestellt. Die KISS1R-cDNA befindet sich innerhalb der multiplen Klonierungssequenz (MCS=*multiple cloning site*). Durch die Anwesenheit einer Vielzahl von Restriktionsschnittstellen kann jede gewünschte Sequenz in die MCS eingebracht werden. Die Zielsequenz befindet sich hinter dem

CMV (Cytomegalievirus)-Promotor. Wird dieses Konstrukt in Säugerzellen eingebracht, erfolgt die Initiation der Transkription des KISS1R-Gens. Auf die MCS folgt das Poly-A-Signal, dass die Stabilität und Transfektionseffizienz der gebildeten mRNA gewährleistet.

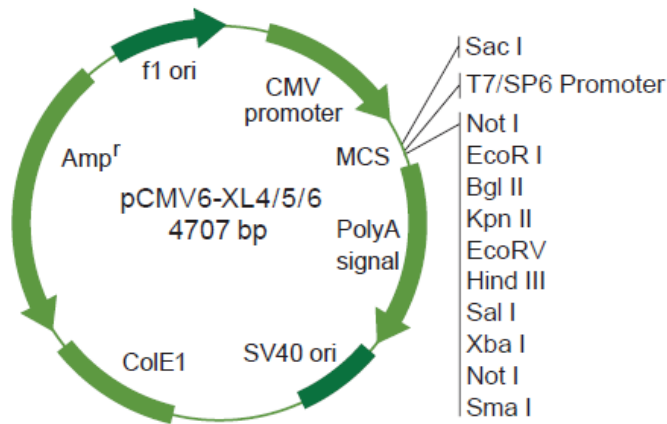


Abbildung 6 TrueClone® cDNA-Vektor für die transiente Überexpression von KISS1R

Als Transfektionsmedium wurde MegaTran 1.0 eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein nicht-lipidisches Polymer, das speziell für die Transfektion großer DNA-Konstrukte wie TrueClone®-Vektoren konzipiert ist. 24 h vor Zugabe der Transfektionsreagenzien wurden $8 \cdot 10^4$ T24-Zellen pro Ansatz in 12-*well*-Platten in 1 ml DMEM+10% FKS ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 0,1 ng TrueClone® cDNA und 0,75 µl MegaTran eingesetzt. Als Negativkontrolle (Mock) wurden T24-Zellen verwendet, denen kein cDNA-Vektor jedoch die gleiche Menge Transfektionsmedium zugegeben wurde. Die Mock-Ansätze wurden als Triplikate geführt und die Überexpression erfolgte in Duplikaten. Die Transfektionseffizienz wurde mittels qRT-PCR überprüft, indem die Quantifizierung der KISS1R-Expression in den MOCK-Ansätzen und in den Transfektionsansätzen erfolgte. Die Transfektionsversuche erfolgten in drei unabhängigen Experimenten.

2.2.6.2 Transiente Inhibierung von SEPT9

Für eine gezielte Herunterregulation der Genexpression (*knock down*) von SEPT9 wurden Zellen der Linie 253J B-V mit PDSIRNA (Sigma Aldrich) transfiziert. Die verwendeten synthetischen siRNAs (=small interfering RNAs) sind doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 bp. In Verbindung mit einem Transfektionsmedium werden sie in die Zellen gebracht. Dort bilden siRNA und RISC (*RNA-induced Silencing Complex*) einen siRNA-Multiproteinkomplex, welcher die gezielte Spaltung der zur siRNA-Sequenz komplementären mRNA induziert. Dieser Mechanismus (RNA Interferenz, RNAi) bewirkt eine spezifische Herunterregulation der Genexpression [104] und eignet sich somit für die

Aufklärung der Funktion der zu untersuchenden Gene. Die Transfektion der Zellen wurde mittels DharmaFECT 1 *Transfection Reagent* (DF1) durchgeführt. Dieses Transfektionsmedium besteht aus kationischen Polymeren, welche die siRNA umschließen und durch Fusion mit der Zellmembran den Transport der siRNA in die Zelle ermöglichen.

Die Zellen der Linie 253J B-V wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-well-Platten ausgesät, um eine Adhärenz zu gewährleisten. Pro *well* wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml DMEM+10 % FKS ausgesät. Neben der Transfektion mit mRNA-spezifischer siRNA wurde eine Negativkontrolle (NK) mit einer siRNA, die keinerlei Homologie zu bekannten Säugetiergenen aufweist (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen), mitgeführt. Jeder Ansatz wurde als Triplikat geführt.

Für die Transfektion wurden 75 nM NK- bzw. mRNA-spezifische-siRNA eingesetzt. Das Volumen des Transfektionsmediums betrug 3 µl pro *well*. Für jedes *well* wurde je ein separater Ansatz siRNA und Transfektionsmedium vorbereitet. Das verwendete OptiMEM-Medium ermöglicht die Kultivierung der Zellen unter reduzierten Serumbedingungen während der Transfektion. Der geringere Serumgehalt wird durch Substanzen wie Insulin, Transferrin, Hypoxanthin, Thymidin, Spurenelemente und einen höheren Gehalt an HEPES und Natriumbicarbonat ersetzt.

siRNA und Transfektionsmediumsansatz

	Ansatz siRNA	Ansatz Transfektionsmedium
NK-siRNA	50 µl 3µM siRNA Stock + 150 µl OptiMEM	3 µl DF1 + 197 µl OptiMEM
SEPT9-siRNA	50 µl 3µM siRNA Stock + 150 µl OptiMEM	3 µl DF1 + 197 µl OptiMEM

Die Ansätze wurden mittels Pipette gut durchmischt und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der siRNA Ansatz zum Transfektionsmedium gegeben. Nach dem Durchmischen erfolgte eine Inkubation bei RT für 20 min, um die Bildung des Transfektionskomplexes zu gewährleisten. Danach wurden zu jedem Ansatz 1,6 ml Komplettmedium (DMEM+10 % FKS) gegeben. Das alte Medium wurde von den Zellen abgenommen und in jedes *well* wurden 2 ml des entsprechenden Transfektionsansatzes pipettiert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank für 48 h. Zur Reduktion der Toxizität des Transfektionsmediums wurde dieses nach 24 h durch 2 ml Komplettmedium ersetzt.

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Ziel-mRNA quantifiziert, um die Effizienz der Transfektion zu kontrollieren. Expressionsunterschiede zwischen spezifisch transfizierten

Zellen und Negativkontrolle wurden unter Verwendung der REST-Software berechnet. Die Transfektionsversuche erfolgten in drei unabhängigen Experimenten.

2.2.6.3 Echt-Zeit Zellanalysen

Zur Ermittlung der Funktion der Kandidatengene in metastasierungsassoziierten Prozessen wurden Proliferation und Migration von transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Diese Untersuchungen erfolgten im *Real Time Cell Analyzer* (RTCA, ACEA Bioscience, Inc.). Unter Verwendung von Platten mit Vertiefungen, an deren Unterseite sich Goldelektroden befinden, können in Anwesenheit von Zellen Veränderungen der Impedanz gemessen werden. Je mehr Zellen sich auf einer Elektrode befinden bzw. je höher die Adhäsion der Zellen an die Elektrode ist, desto höher die Zunahme der Impedanz. Die Elektrodenimpedanz wird in Zellindexwerten wiedergegeben. Somit ermöglicht diese Technologie die Überwachung der Veränderung von Zellen hinsichtlich verschiedener Prozesse wie z.B. Zellzahl, Vitalität, Adhäsion und Proliferation in Echtzeit.

Proliferationsassay

Die Ermittlung der Zellproliferation erfolgte unter Verwendung von E-Plates 16 bestehend aus 16 Vertiefungen. Die Zellen der Transfektionsansätze (2.2.6.1 bzw. 2.2.6.2) wurden zunächst abtrypsiniert und gezählt. In jede Vertiefung wurden 10.000 Zellen in 200 µl Kompletmedium gegeben. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten geführt. Als *Blank* diente zellfreies Kompletmedium im Duplikat.

Die Analyse der Zellproliferation erfolgte über einen Zeitraum von 48 h. Die Messung des Zellindexes erfolgte innerhalb der ersten 4 h jeweils nach 30 sek, danach alle 30 min bis zum Versuchsende. Innerhalb der ersten 4 h erfolgte die Messung der Zelladhäsion, anschließend die Proliferation.

Migrationsassay

Unter Verwendung von CIM-Plates 16 erfolgte die Analyse der Zellmigration. Die Vertiefungen dieser Platten bilden ein Zwei-Kammer-System, welches durch eine poröse Membran (Porendurchmesser: 8 µm) gebildet wird. Die Messelektroden befinden sich an der Unterseite der Membran. In die untere Kammer wurden 160 µl Kompletmedium gegeben. Die obere Kammer wurde mit 20.000 Zellen in 100 µl serum-freiem Medium versetzt. Das enthaltene FKS der unteren Kammer dient hier als Lockstoff für die Zellen. Durch die Elektroden an der Unterseite der Membran kann die zunehmende Impedanz gemessen werden, die durch Zellmigration durch die Membranporen entsteht. Veränderungen der Impedanz werden als zunehmender Zellindex wiedergegeben. Die Belegung der 16 Vertiefungen erfolgte identisch zum Proliferationsassay.

Die Messung der Zellmigration erfolgte über einen Zeitraum von 8 h, wobei der Zellindex alle 30 sek vom Gerät erfasst wurde.

2.2.6.4 Invasionsassay

Veränderungen in der Invasionsfähigkeit der transfizierten Zellen wurden unter Verwendung von Matrigel™ Invasionskammer (BD, Bioscience) untersucht. Dabei handelt es sich um 24-*well*-Platten mit Einsätzen mit einer porösen Membran (Porendurchmesser: 8 µm), welche mit einer Schicht Matrigel™ Matrix bedeckt sind. Diese Matrix fungiert als *in vitro* Basalmembran. Nur Zellen mit der Fähigkeit diese Matrix abzubauen, können durch die Membran in das untere *well* migrieren und zeigen somit ein erhöhtes Invasionspotential.

In jedes *well* wurden zunächst 750 µl Komplettmedium pipettiert. Anschließend wurden die Matrigel™-Einsätze in die *wells* eingesetzt. Pro Einsatz wurden 50.000 Zellen in 500 µl serum-freiem Medium zugegeben. Die Platte wurde für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium aus den Einsätzen entfernt und diese zweimal in 500 µl Aqua dest. gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass die Unterseite der Einsätze nicht berührt wurde, da sich dort die invadierten Zellen befanden. Die Zellen wurden in 500 µl 75 % Ethanol bei 4°C für 20 min fixiert und danach zweimal in 500 µl Aqua dest. gewaschen. Die Innenseite der Einsätze wurde von Zellresten, Matrigel™ und Medium befreit und luftgetrocknet. Unter Verwendung von 0,1 %iger Kristallviolettlösung wurden die invadierten Zellen an der Einsatzunterseite für 5 min gefärbt. In zwei Waschschritten mit 500 µl Aqua dest wurde überschüssiges Kristallviolett entfernt. Die Einsätze wurden anschließend in 300 µl 10 % Essigsäure solange inkubiert, bis sich der Farbstoff vollständig aus den invadierten Zellen gelöst hatte. Aus jedem *well* wurden zweimal 100 µl Essigsäure-Farbstoff-Gemisch in ein neues *well* einer 96-*well*-Platte überführt und im TECAN-Plattenlesegerät bei 595 nm photometrisch vermessen. Als Blank wurde 10 % Essigsäure mitgeführt.

2.2.6.5 Auswertung der Funktionsanalysen

Zuerst wurden die Mittelwerte aus den Bestimmungen der Echt-Zeit Zellanalyse (Zellindex-Werte) bzw. der Invasionsmessung (Absorptionswerte) gebildet. Anschließend wurde der *blank*-Wert von den gebildeten Mittelwerten abgezogen. Der Mittelwert der Negativkontrolle wurde gebildet und gleich 100 % gesetzt. Der Mittelwert der Transfektionsansätze wurde in Relation zur Negativkontrolle prozentual berechnet.

2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software SPSS 19 (IBM Corp.). Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt und ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$

definiert. Nicht-parametrische kontinuierliche Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Parametrische, normalverteilte Daten wurden mittels T-Test analysiert.

Zur Bestimmung der Trennschärfe verschiedener Parameter zwischen zwei Patientengruppen wurden ROC-Kurven erstellt. Dabei wurde der Anteil an Patienten mit richtig positivem Ereignis (Sensitivität) gegen den Anteil falsch positiver Ereignisse (1-Spezifität) aufgetragen. Die Flächen unterhalb der ROC-Kurven (AUC) wurden bestimmt und Grenzwerte zur Differenzierung zwischen den Gruppen wurden ausgewählt. Zur Selektion von Grenzwerten diente der Youden-Index ($Y = \text{Sensitivität} + (\text{Spezifität} - 1)$). Für jeden Grenzwert wurden Sensitivität und Spezifität ermittelt.

Überlebenszeitanalysen wurden mit Hilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens durchgeführt. Dies erfolgte für das progressionsfreie Überleben (PFÜ) und das Gesamtüberleben (GÜ). Zur grafischen Darstellung dienten Überlebenskurven, in denen die Überlebenszeit gegen die Überlebenswahrscheinlichkeit aufgetragen wird. Es erfolgte eine Berechnung der medianen Überlebenszeit. Mit Hilfe des Log-Rang-Tests wurden Unterschiede in der Überlebenszeit zweier Gruppen untersucht.

3.1.2 Selektion von Kandidatengen

Für die Selektion von Kandidatengen als potentielle Prognosemarker wurden zunächst alle Sonden einer CpGI zusammengefasst, um das Methylierungsniveau der gesamten Region zu berechnen. Eine statistische Bewertung des Unterschieds zwischen den Gruppen erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Kandidatengene mit signifikanten Unterschieden, die für die weitere Validierung verwendet wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Liste der Kandidatengene

Kandidatengen				Median log ₂ ratio		p-Wert
Name		Chromosomale Lokalisation	CpG-Insel	N0	N+	
CSAD	<i>cysteine sulfinic acid decarboxylase</i>	12q13.11	108	0.36	1.03	0.005
SEPT9	<i>septin 9</i>	17q25	80	-0.28	0.31	0.002
KISS1	<i>KISS-1 metastasis suppressor</i>	1q32.1	24	-0.13	0.44	0.002
KISS1R	<i>KISS-1 receptor</i>	19p13.3	311	-0.05	0.57	0.017
MANF	<i>mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>	3p21.1	88	0.17	0.37	0.001

3.2 Validierung des DNA-Methylierungsstatus und Entwicklung eines Vorhersagemodells zur Bewertung des Metastasierungsrisikos

3.2.1 Etablierung der quantitativen Methylierungsanalyse und einer internen Referenz

Die Validierung der DNA-Methylierung erfolgte unter Verwendung eines methylierungsabhängigen Restriktionsenzym und qPCR. Zur Überprüfung der angewandten Quantifizierungsmethode wurden zunächst Kontrollversuche durchgeführt. Als unmethylierte Proben wurde DNA aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) einer gesunden Person verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Cytosinbasen aller CpG-Dinukleotide derselben DNA unter Verwendung des Enzyms Methyltransferase *MSssI* *in vitro* methyliert (IVD = *in vitro* methylierte DNA). Für diesen Versuch wurde das Kandidatengen KISS1R amplifiziert.

Ergebnisse

Anhand der C_T -Werte wurde die Differenz zwischen enzymbehandelter und unbehandelter DNA berechnet ($=\Delta C_T$ -Wert). Für die Negativkontrolle (NK) ergab sich eine Differenz von 0,21 Zyklen. Die Differenz der Positivkontrolle (PK) betrug 5,01 Zyklen. Die anschließende Berechnung der prozentualen Methylierung ergab 13,6 % (NK) bzw. 96,9 % (PK). Der Unterschied zwischen den beiden Kontrollansätzen ist in Abbildung 8 grafisch dargestellt.

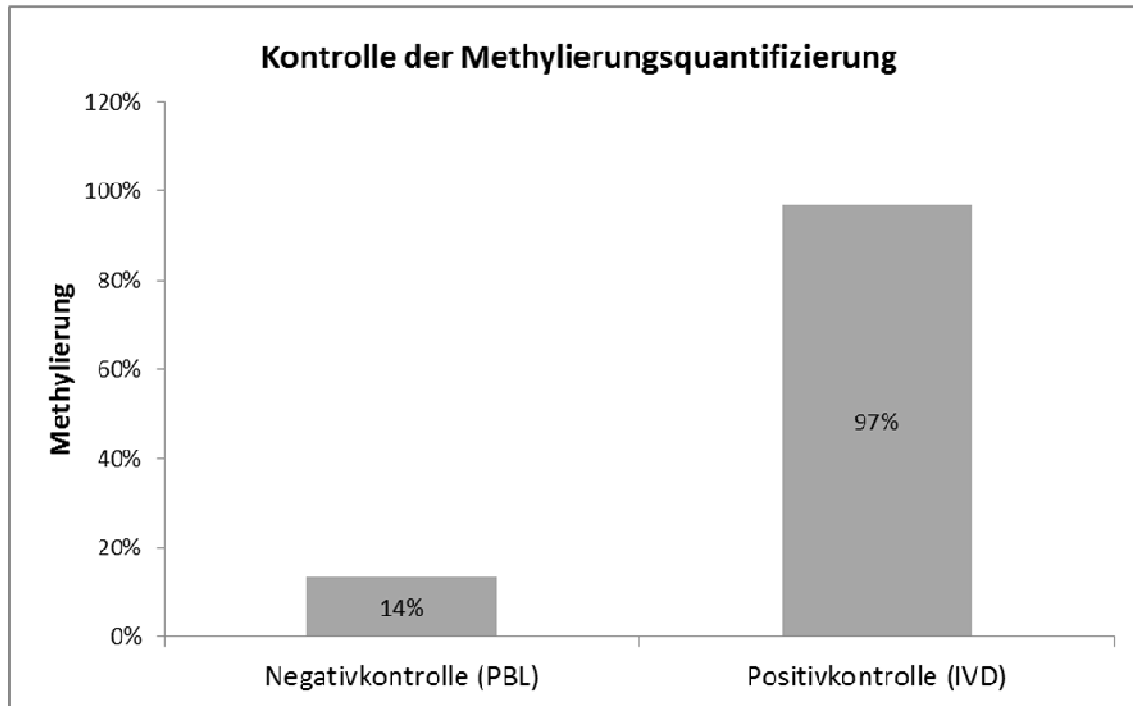


Abbildung 8 Quantifizierung der DNA-Methylierung von Negativ- und Positivkontrolle

Vergleich der relativen Methylierung von unmethylierter DNA (PBL) und *in vitro* methylierter DNA (IVD) anhand des KISS1R-Promotors.

Als Referenz wurde eine Sequenz des SNRPN-Gens amplifiziert. Dies diente aufgrund seiner Lokalisation innerhalb eines genomischen Imprinting-Bereichs als Kontrolle für den Restriktionsverdau. Für die Verwendung als geeignete Referenz ist es nötig, dass die Methylierung zwischen den Patientengruppen stabil ist.

Die Ermittlung der relativen Methylierung des SNRPN-Gens erfolgte an 88 Proben (33 nicht-metastasiert, 45 metastasiert). Die Daten wurden logarithmiert, um eine Normalverteilung der Werte zu erreichen und um Zusammenhänge innerhalb der kleineren Werte überschaubarer zu machen.

Der Mittelwert der relativen Methylierung betrug für beide Patientengruppen 2,31. Es bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,89$) zwischen den Gruppen (Tabelle 3). Im Box-Whisker-Plot (Abb. 9) ist die Verteilung der relativen Methylierungswerte dargestellt.

Tabelle 3 Relative Methylierung von SNRPN im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	relative Methylierung		
		Mittelwert (95 % KI)	STD	Signifikanz
nicht-metastasiert	33	2,31 (2,28-2,33)	0,08	0,89
metastasiert	45	2,31 (2,28-2,32)	0,07	

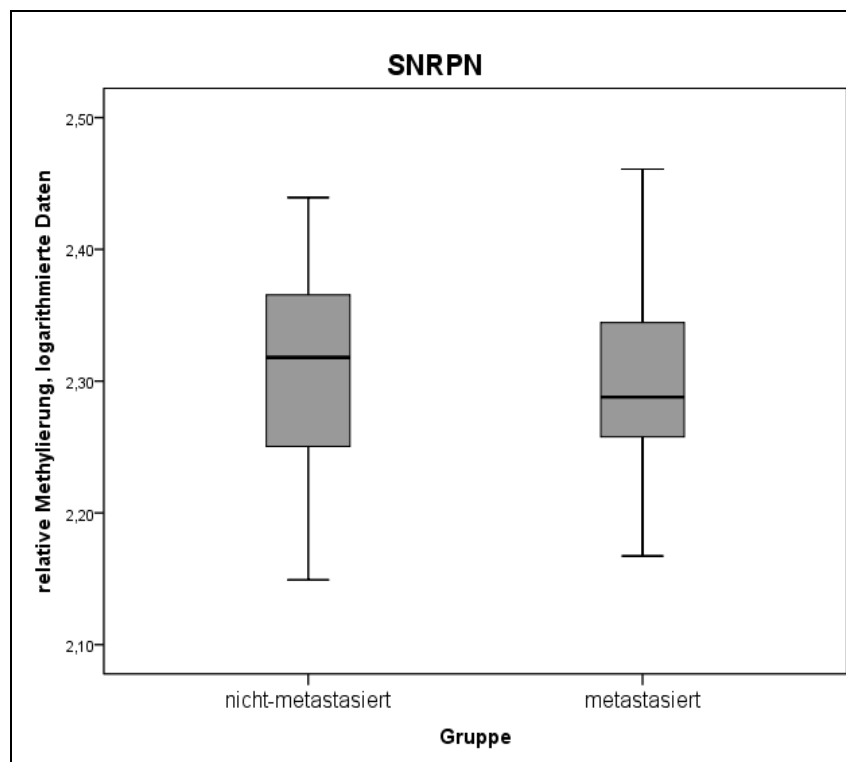


Abbildung 9 SNRPN-Methylierung als Referenzen zur Normalisierung

Box-Whisker-Plot der relativen SNRPN-Methylierung im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.2.2 DNA-Methylierung der Kandidatengene im primären Harnblasentumorgewebe

3.2.2.1 KISS1R

Die Ermittlung der relativen Methylierung des KISS1R-Promotors erfolgte an 30 Proben (21 nicht-metastasiert gegen 9 metastasiert). Die mittlere relative Methylierung betrug 1,76 für Patienten ohne Metastasen bzw. 2,00 für Patienten mit Metastasen. Mit einem p-Wert von 0,002 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden (Tabelle 4). Im Box-Whisker-Plot (Abb. 10) ist die Verteilung der Methylierungswerte dargestellt.

Tabelle 4 Relative Methylierung von KISS1R im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	relative Methylierung		
		Mittelwert (95 % KI)	STD	Signifikanz
nicht-metastasiert	9	1,76 (1,67-1,84)	0,13	0,002
metastasiert	21	2,00 (1,90-2,10)	0,25	

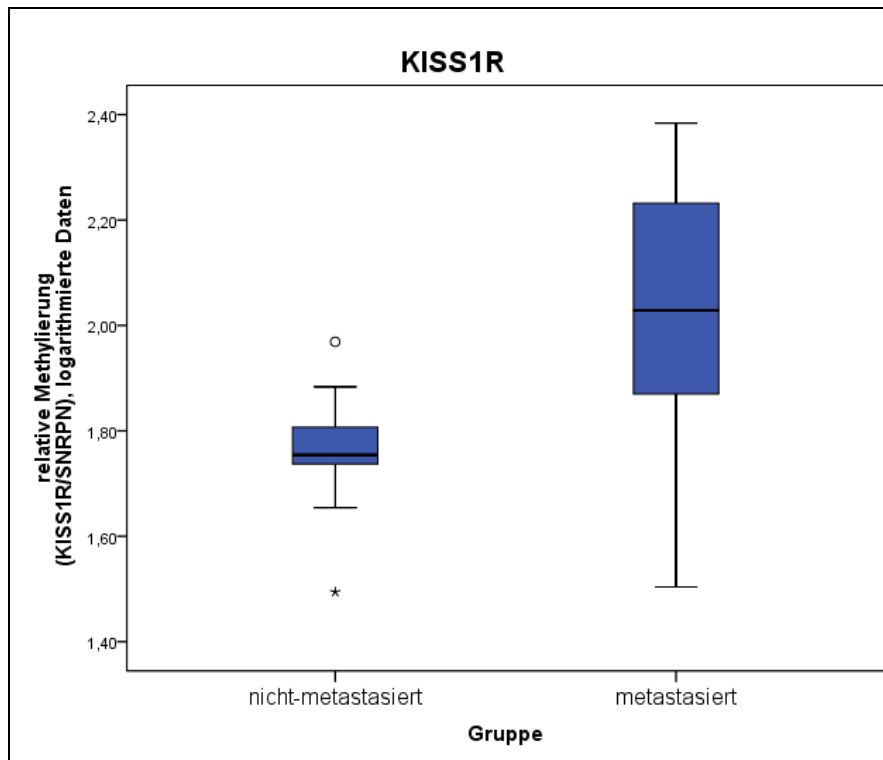


Abbildung 10 KISS1R-Methylierung im Gewebe

Box-Whisker-Plot der relativen KISS1R-Methylierung im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.2.2.2 SEPT9

An 52 Patientenproben (21 nicht-metastasiert gegen 31 metastasiert) wurde der Methylierungsstatus des SEPT9-Promotors validiert. Die Methylierung der Patientengruppe mit Metastasen (Mittelwert = 1,85) war signifikant höher als in der nicht-metastasierten Gruppe (Mittelwert = 1,72) ($p=0,002$) (Tabelle 5). Im Box-Whisker-Plot (Abb. 11) sind die Unterschiede grafisch dargestellt.

Tabelle 5 Relative Methylierung von SEPT9 im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	relative Methylierung		
		Mittelwert (95 % KI)	STD	Signifikanz
nicht-metastasiert	21	1,72 (1,67-1,76)	0,11	0,002
metastasiert	31	1,85 (1,79-1,91)	0,17	

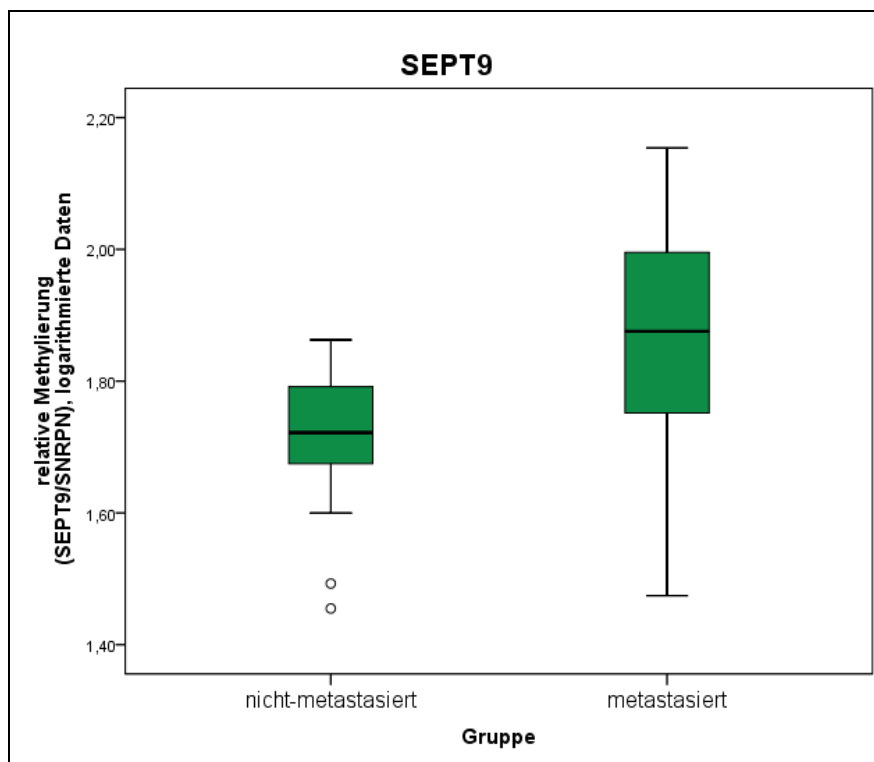


Abbildung 11 SEPT9-Methylierung im Gewebe

Box-Whisker-Plot der relativen SEPT9-Methylierung im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.2.2.3 CSAD

Die Ermittlung der relativen Methylierung des CSAD-Promotors erfolgte für 54 Proben (22 nicht-metastasiert gegen 32 metastasiert). Die mittlere relative Methylierung betrug 1,73 für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen und 1,86 für Patienten mit Metastasen. Mit einem p-Wert von 0,012 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden (Tabelle 6). Im Box-Whisker-Plot (Abb. 12) ist die Verteilung der Methylierungswerte dargestellt.

Tabelle 6 Relative Methylierung von CSAD im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	relative Methylierung		
		Mittelwert (95 % KI)	STD	Signifikanz
nicht-metastasiert	22	1,73 (1,67-1,78)	0,13	0,012
metastasiert	32	1,86 (1,78-1,93)	0,20	

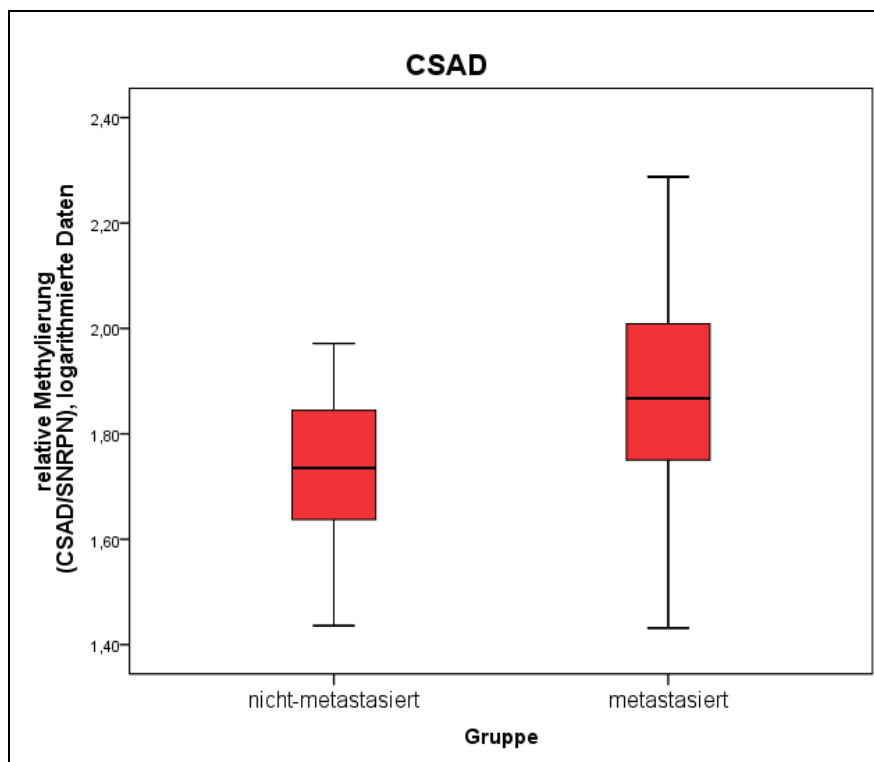


Abbildung 12 CSAD-Methylierung im Gewebe

Box-Whisker-Plot der relativen CSAD-Methylierung im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.2.2.4 KISS-1 und MANF

Die Validierung des Methylierungsstatus der Kandidaten KISS-1 und MANF ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,5$ bzw. $p=0,8$) (Tabelle 7). Die Verteilung der relativen Methylierungswerte im Box-Whisker-Plot (Abb. 13) zeigt ebenfalls, dass sich die Patientengruppen hinsichtlich der Methylierung beider Gene nicht unterscheiden.

Tabelle 7 Relative Methylierung von KISS-1 und MANF im Gewebe

		relative Methylierung			
Gen	Gruppe	Proben- anzahl	Mittelwert (95 % KI)	STD	Signifikanz
KISS1	nicht-metastasiert	20	1,35 (1,15-1,54)	0,43	0,486
	metastasiert	9	1,48 (1,18-1,80)	0,47	
MANF	nicht-metastasiert	6	1,69 (1,65-1,73)	0,59	0,800
	metastasiert	7	1,70 (1,64-1,77)	0,86	

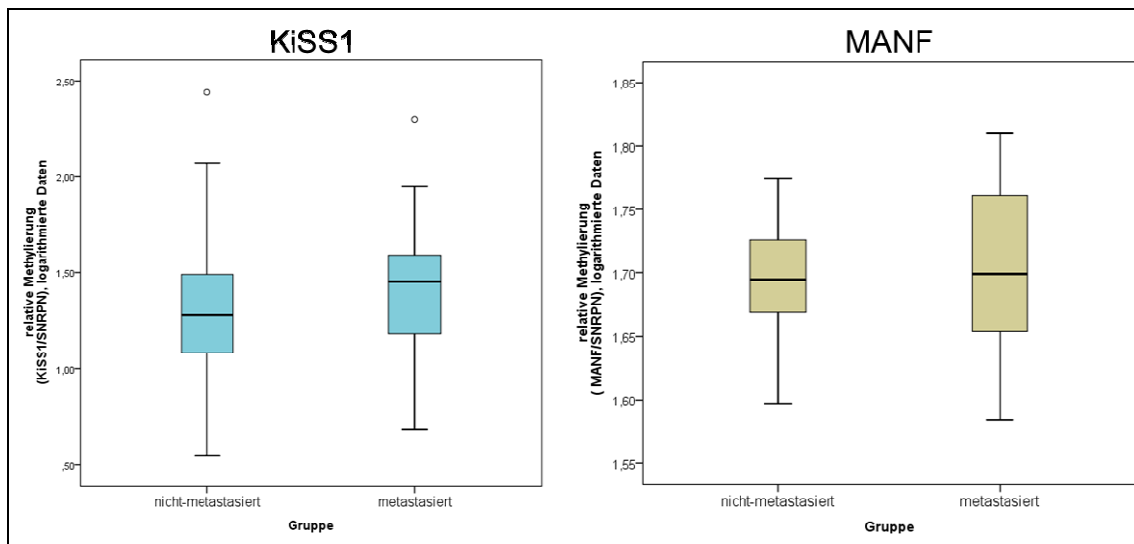


Abbildung 13 KISS-1 und MANF-Methylierung im Gewebe

Box-Whisker-Plot der relativen Methylierung der Kandidatengene KISS-1 und MANF im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.2.3 DNA-Methylierung der Kandidatengene in verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Eine Überprüfung des DNA-Methylierungsstatus der Kandidatengene in Harnblasenkarzinom (HBK)-Zelllinien erfolgte äquivalent zur Validierung im Gewebe mittels DNA-Restriktionsverdau und qPCR. Es wurden Zelllinien verschiedenen Ursprungs (Tabelle 1) miteinander verglichen.

Für die Promotorregion von KISS1R zeigte die Zelllinie RT4 eine Methylierung von 56 %, während die Zelllinien RT112 und 253J B-V eine nahezu vollständige Methylierung (>90 %) und T24 ein vollständige Promotormethylierung (100 %) aufwiesen. SEPT9 zeigte ebenfalls

Ergebnisse

den geringsten Methylierungsgrad (54 %) in der gut differenzierten Zelllinie RT4. Die Zelllinien mit geringerem Differenzierungsgrad (RT112, T24) bzw. hohem Metastasierungspotential (253J B-V) wiesen eine höhere Methylierung von 73 – 76 % auf. Für CSAD wurde die geringste Methylierung (14 %) in RT112-Zellen detektiert. RT4-Zellen zeigten ähnlich wie bei den anderen Kandidatengenen 43 % Methylierung. In den Zelllinien T24 und 253J B-V wurde eine Methylierung ≥ 65 % nachgewiesen (Tabelle 8).

Tabelle 8 DNA-Methylierung der Kandidatengene in HBK-Zelllinien

Zelllinie	KISS1R		SEPT9		CSAD	
	Methylierung	STD	Methylierung	STD	Methylierung	STD
RT4	56%	9%	54%	2%	32%	16%
RT112	95%	2%	76%	2%	14%	2%
T24	100%	0%	75%	5%	67%	15%
253J B-V	99%	0%	73%	5%	70%	13%

Abbildung 14 zeigt für alle untersuchten Zelllinien den Methylierungsstatus der Kandidatengene im Vergleich.

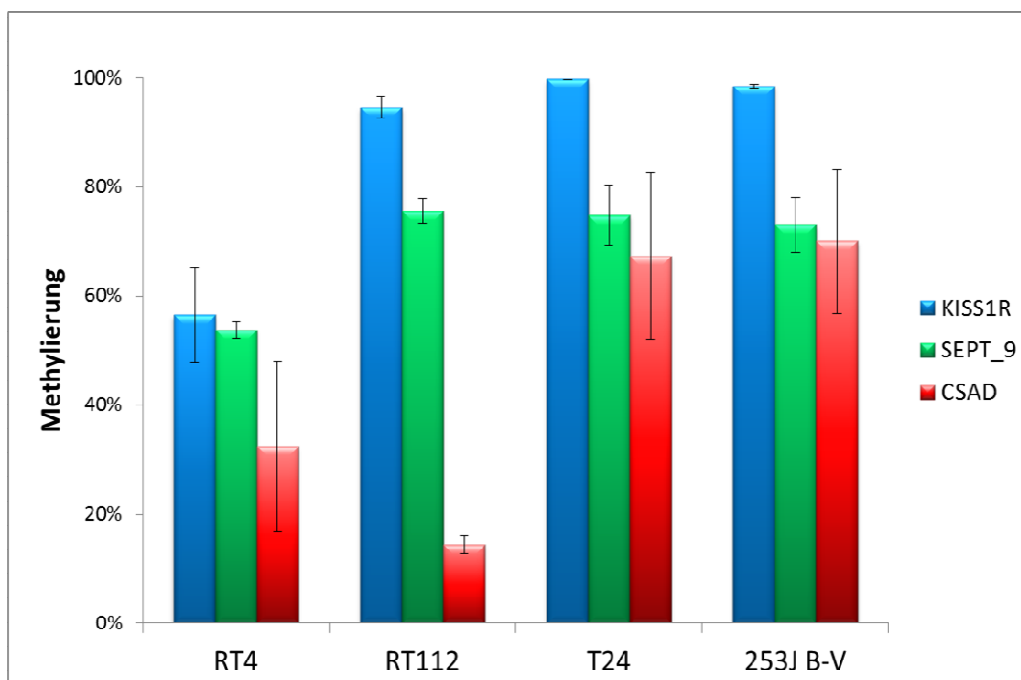


Abbildung 14 DNA-Methylierung der Kandidatengene in HBK-Zelllinien

Die Balken zeigen das prozentuale Methylierungsniveau der Promotorregionen der Kandidatengene KISS1R, SEPT9 und CSAD für verschiedene Harnblasenkarzinom-Zelllinien

3.2.4 Entwicklung eines Vorhersagemodells sowie Validierung an einem unabhängigen Patientenkollektiv

Im Anschluss an die Validierung der einzelnen Kandidatengene wurde überprüft, ob deren Methylierungsstatus im Primärtumor eine Vorhersage über das Metastasierungspotential des Tumors ermöglicht. Für die Etablierung eines Vorhersagemodells erfolgte zunächst eine ROC-Kurven-Analyse für die Gene KISS1R, SEPT9 und CSAD, welche signifikante Gruppenunterschiede aufwiesen. Anhand der Fläche unter der ROC-Kurve (=AUC, *area under the curve*) konnte ermittelt werden, ob und in wie fern die Gene eine Diskriminierung zwischen den Patientengruppen erlauben. Die AUC betrug für alle drei Gene einen Wert $> 0,75$ (Abb. 15).

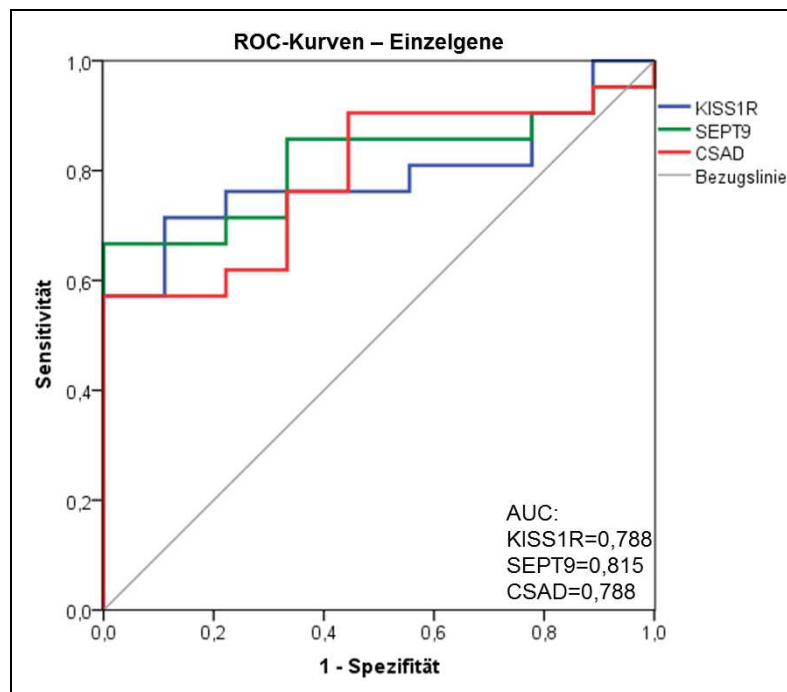


Abbildung 15 ROC-Kurven der Kandidatengene KISS1R, SEPT9 und CSAD

Anhand der Fläche unter der ROC-Kurve wurde ermittelt, ob der Methylierungsstatus der Gene eine Unterscheidung zwischen den Patientengruppen erlaubt. Die Bezugslinie (AUC=0,5) indiziert, dass kein Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt.

Anschließend erfolgte anhand der Koordinaten der ROC-Kurven (Anhang 5-7) die Berechnung des Youden-Indexes ($Y = \text{Sensitivität} + (\text{Spezifität} - 1)$). Der Wert dieses Indexes ermöglichte die Selektion von Grenzwerten für jedes Einzelgen, die mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität die Unterscheidung zwischen „nicht-metastasiert“ und „metastasiert“ zulassen. Tabelle 9 zeigt für die drei Kandidatengene die ermittelten Grenzwerte zur Gruppenunterscheidung sowie den Youden-Index, Sensitivität und Spezifität.

Ergebnisse

Tabelle 9 Ergebnisse der ROC-Kurven-Analyse der Einzelgene

Gen	AUC	Grenzwert	Youden Index	Sensitivität	Spezifität
KISS1R	0,788	1,8383	1,54	76,2 %	77,8 %
SEPT9	0,815	1,8010	1,41	64,5 %	76,2 %
CSAD	0,788	1,7976	1,34	65,6 %	68,2 %

Um die Genauigkeit der Vorhersage des Metastasierungspotentials zu steigern, wurden die drei Gene in einem Vorhersagemodell zusammengefasst. Durch Kombination der Gene konnte am selben Patientenkollektiv ein höherer AUC-Wert (0,868) und somit eine gesteigerte Differenzierungsfähigkeit zwischen den Gruppen erreicht werden (Abb. 16).

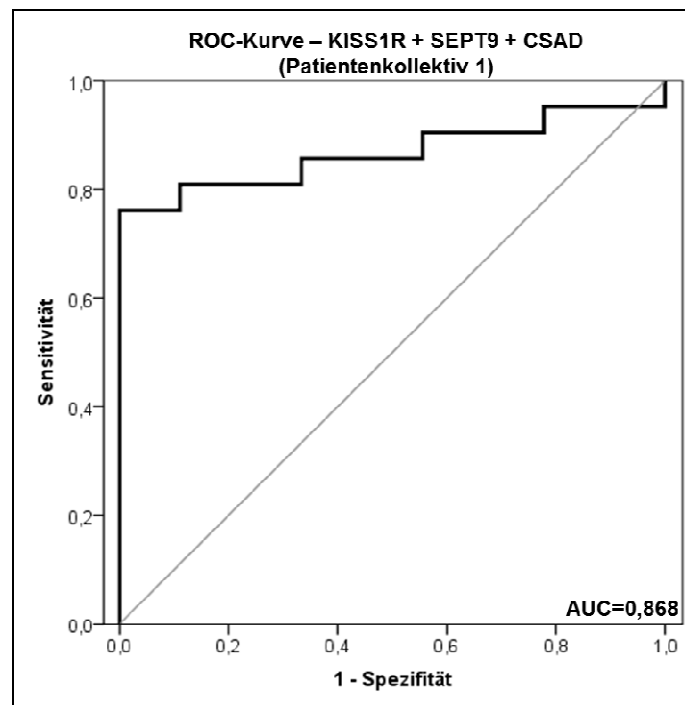


Abbildung 16 ROC-Kurve der Kombination von KISS1R, SEPT9 und CSAD am Patientenkollektiv 1

Die ROC-Kurve zeigt die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen den Patientengruppen durch die Kombination der relativen Methylierung aller drei Einzelgene.

Die Vorhersagegenauigkeit wurde anschließend anhand jedes Patienten des Kollektivs berechnet. Dafür wurde zunächst die Anzahl der Gene ermittelt, die eine Hypermethylierung aufwiesen. Eine Hypermethylierung war gegeben, wenn das Methylierungsniveau über dem ermittelten Grenzwert lag. Im Anschluss erfolgte für jeden Patienten eine Zuordnung zu einem negativen Testergebnis (=“nicht-metastasiert“), wenn keines der Gene einen Grenzwert überschritt bzw. zu einem positiven Testergebnis (=“metastasiert“), wenn ein bis drei Gene den Grenzwert überschritten. Die Testergebnisse wurden mit dem tatsächlichen

Ergebnisse

Zustand der Patienten (ohne bzw. mit Lymphknotenmetastasen) abgeglichen. Für Kollektiv 1 erfolgte die Bestimmung der Vorhersagegenauigkeit des Modells anhand von 30 Patienten. Von 21 Patienten mit tatsächlichen Lymphknotenmetastasen zeigten 18 Patienten ein positives Testergebnis (=richtig positiv). Daraus ergab sich für das Vorhersagemodell eine Sensitivität von 90 %. Für 6 von 9 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen wurde ein negatives Testergebnis errechnet (=richtig negativ). Dies ergab eine Spezifität von 67 % (Tabelle 10).

Tabelle 10 Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells am Patientenkollektiv 1

		tatsächlicher Zustand	
		metastasiert	nicht-metastasiert
Testergebnis	positiv	19	3
	negativ	2	6
		Sensitivität: 90 %	Spezifität: 67 %

Am zweiten, unabhängigen Patientenkollektiv wurde erneut zunächst eine ROC-Kurven-Analyse für dasselbe Vorhersagemodell durchgeführt. Diese ergab eine AUC von 0,788 (Abb. 17).

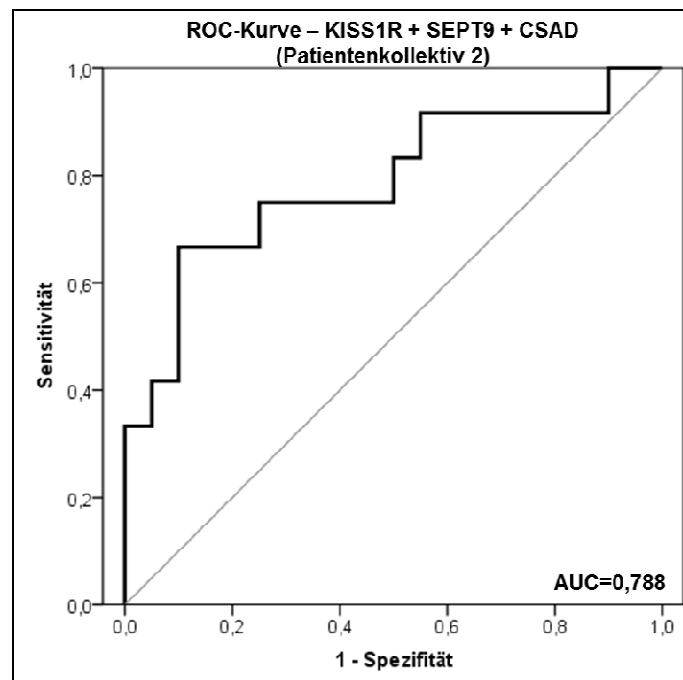


Abbildung 17 ROC-Kurve der Kombination von KISS1R, SEPT9 und CSAD am Patientenkollektiv 2

Die ROC-Kurve zeigt die Unterscheidung zwischen den Patientengruppen anhand der Kombination der relativen Methylierung der drei Einzelgene am unabhängigen Patientenkollektiv.

Anschließend wurde die Genauigkeit des Vorhersagemodells mit denselben Grenzwerten (Tabelle 9) durchgeführt. Patientenkollektiv 2 umfasst 32 Patienten. 9 von 12 Patienten mit tatsächlichen Lymphknotenmetastasen zeigten ein richtig positives Ergebnis. Die Sensitivität für das unabhängige Kollektiv betrug somit 75 %. Ein richtig negatives Testergebnis lag bei 14 von 20 Patienten vor und ergab folglich eine Spezifität von 70 % (Tabelle 11).

Tabelle 11 Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells am Patientenkollektiv 2

		tatsächlicher Zustand	
		metastasiert	nicht-metastasiert
Testergebnis	positiv	9	6
	negativ	3	14
		Sensitivität: 75 %	Spezifität: 70 %

3.2.5 Korrelation der Vorhersage zum progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben

Im weiteren Verlauf der Auswertung der Methylierungsdaten stellte sich die Frage, ob das Vorhersagemodell aus KISS1R, SEPT9 und CSAD mit dem progressionsfreiem Überleben (PFÜ) und dem Gesamtüberleben (GÜ) der Patienten korreliert. Unter Verwendung der Kaplan-Meier-Analyse wurden Überlebenskurven erstellt. Die Überlebenszeitanalyse erfolgte für die Daten des Vorhersagemodells im Vergleich zum pN-Status.

3.2.5.1 Überlebenskurven des Patientenkollektivs 1

In Abbildung 18 sind die Überlebenskurven der Patienten des Kollektivs 1 in Bezug auf das PFÜ dargestellt. Die Abbildung zeigt die Kurven in Abhängigkeit zum Lymphknotenstatus (N0 oder N+) (A) und in Korrelation zur Vorhersage (metastasiert oder nicht-metastasiert) des Modells aus KISS1R, SEPT9 und CSAD (B). In Tabelle 12 sind die zugehörigen Fallzahlen, die medianen Überlebenszeiten und der Signifikanzwert des Log-Rang Tests aufgeführt.

Die Kurven zeigen, dass weder der pN-Status noch die Vorhersage einen Unterschied bezüglich des PFÜ aufweisen ($p=0,7$ bzw. $0,8$).

Ergebnisse

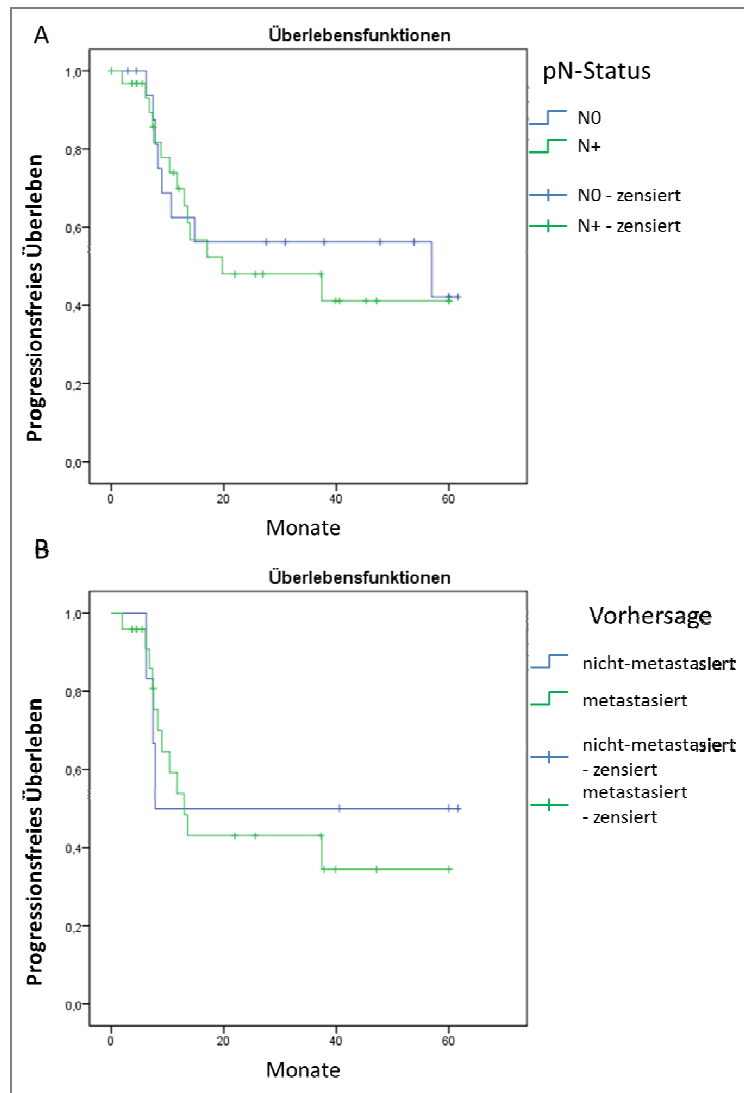


Abbildung 18 Progressionsfreies Überleben des Patientenkollektiv 1
Überlebenskurven in Korrelation zum pN-Status (A) und zum Vorhersagemodell (B)

Tabelle 12 Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (PFÜ) des Patientenkollektiv 1

		pN-Status		Vorhersage	
		N0	N+	nicht-metastasiert	metastasiert
Gesamtzahl		19	32	6	24
Anzahl der Ereignisse (Progression)		8	14	3	12
Zensierte Fälle	n	11	18	3	12
	%	58	56	50	50
Mediane progressionsfreie Überlebenszeit		57	20	8	13
Signifikanz p (Log Rang)		0,686		0,786	

Ergebnisse

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven unter Betrachtung des pN-Status (A) ($p=0,95$) und des Vorhersagemodells (B) ($p=0,94$). In Tabelle 13 sind die Fallzahlen aufgelistet.

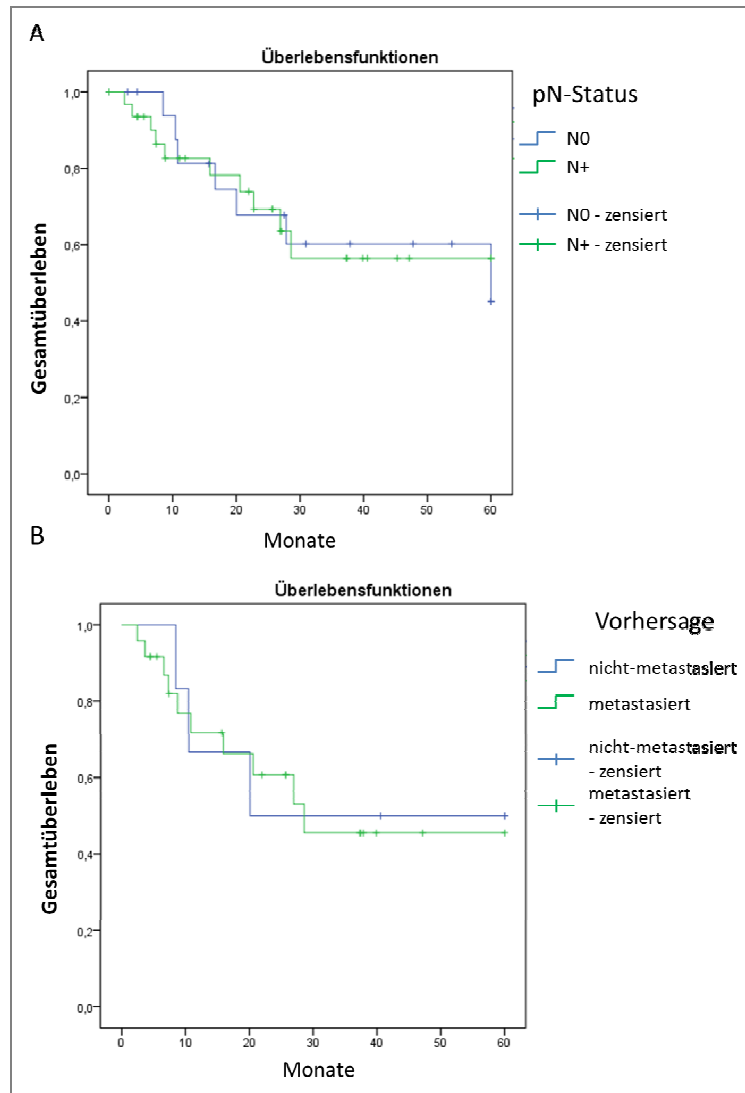


Abbildung 19 Gesamtüberleben des Patientenkollektiv 1
Überlebenskurven in Korrelation zum pN-Status (A) und zum Vorhersagemodell (B)

Ergebnisse

Tabelle 13 Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (GÜ) des Patientenkollektiv 1

		pN-Status		Vorhersage	
		N0	N+	nicht-metastasiert	metastasiert
Gesamtzahl		19	32	6	24
Anzahl der Ereignisse (Tod)		7	10	3	10
Zensierte Fälle	n	12	22	3	14
	%	63	69	50	58
Mediane Überlebenszeit		60	-	20	29
Signifikanz p (Log Rang)		0,952		0,935	

3.2.5.2 Überlebenskurven des Patientenkollektivs 2

Die Analyse des PFÜ am Patientenkollektiv 2 ergab hoch signifikante Unterschiede in Bezug auf den N-Status der Patienten zum Zeitpunkt der Zystektomie ($p < 0,001$) (Abb. 20 A). Patienten ohne Lymphknotenmetastasen wiesen ein längeres PFÜ auf und die mediane progressionsfreie Überlebenszeit wurde nicht erreicht. Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit Lymphknotenmetastasen ein deutlich höheres Progressionsrisiko. Die Hälfte der Patienten erlitt bereits nach 6 Monaten einen Progress (Tabelle 14).

Die Betrachtung des PFÜ anhand des Vorhersagemodells aus KISS1R, SEPT9 und CSAD zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p = 0,037$). Patienten, bei denen die Vorhersage „nicht-metastasiert“ getroffen wurde, zeigten ein deutlich längeres PFÜ (Abb. 20B). Auch hier wurde innerhalb des Betrachtungszeitraums die mediane progressionsfreie Überlebenszeit nicht erreicht. Über die Hälfte der Patienten mit der Vorhersage „nicht-metastasiert“ zeigte keine Progression. Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten mit der Vorhersage „metastasiert“ betrug 7 Monate (Tabelle 14).

Ergebnisse

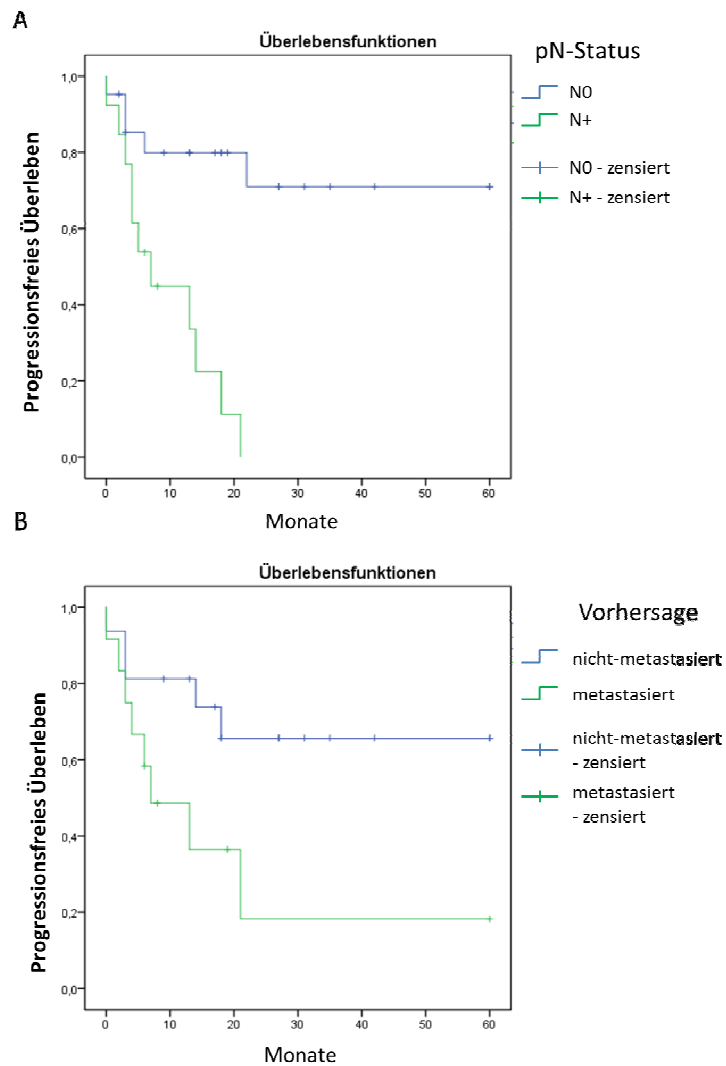


Abbildung 20 Progressionsfreies Überleben des Patientenkollektiv 2

Überlebenskurven in Korrelation zum pN-Status (A) und zum Vorhersagemodell (B)

Tabelle 14 Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (PFÜ) des Patientenkollektiv 2

		pN-Status		Vorhersage	
		NO	N+	nicht-metastasiert	metastasiert
Gesamtzahl		21	13	16	12
Anzahl der Ereignisse (Progression)		5	11	5	8
Zensierte Fälle	n	16	2	11	4
	%	76	15	69	33
Mediane progressionsfreie Überlebenszeit		-	6	-	7
Signifikanz p (Log Rang)		<0,001		0,037	

Ergebnisse

Die Analyse des GÜ am Patientenkollektiv 2 ergab einen signifikanten Unterschied in Bezug auf den N-Status der Patienten zum Zeitpunkt der Zystektomie ($p=0,005$) (Abb. 21 A). Patienten ohne Lymphknotenmetastasen wiesen ein deutlich längeres PFÜ auf und die mediane Überlebenszeit betrug 60 Monate. Im Gegensatz dazu hatten Patienten mit Lymphknotenmetastasen ein deutlich höheres Sterberisiko. Die Hälfte der Patienten verstarb bereits nach 14 Monaten (Tabelle 15).

Die Betrachtung des GÜ anhand des Vorhersagemodells aus KISS1R, SEPT9 und CSAD ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,357$) (Abb. 21 B). Jedoch ist ein Unterschied zwischen den medianen Überlebenszeiten zu vermerken. Diese betrug bei Patienten mit der Vorhersage „nicht-metastasiert“ 60 Monate, während die Hälfte der Patienten, bei denen die Vorhersage „metastasiert“ getroffen wurde, bereits nach 17 Monaten verstorben waren (Tabelle 15).

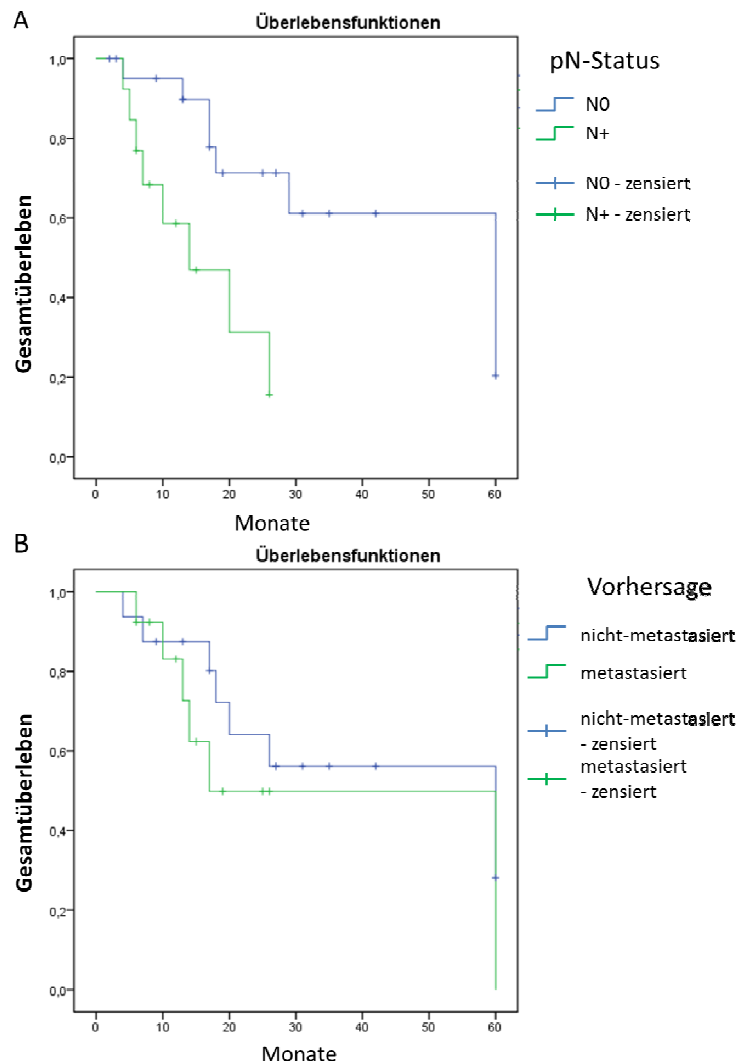


Abbildung 21 Gesamtüberleben des Patientenkollektiv 2
Überlebenskurven in Korrelation zum pN-Status (A) und zum Vorhersagemodell (B)

Tabelle 15 Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (GÜ) des Patientenkollektiv 2

		pN-Status		Vorhersage	
		N0	N+	nicht-metastasiert	metastasiert
Gesamtzahl		22	13	16	13
Anzahl der Ereignisse (Tod)		8	8	7	6
Zensierte Fälle	n	14	5	9	7
	%	64	39	56	57
Mediane Überlebenszeit		60	14	60	17
Signifikanz p (Log Rang)		0,005		0,357	

3.3 Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Expression

3.3.1 Einfluss von 5-Aza-2'-deoxycytidin auf DNA-Methylierung und mRNA-Expression in Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Die Behandlung von Zelllinien mit dem DNMT-Inhibitor 5Aza-dC ermöglicht Rückschlüsse auf die Korrelation zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression *in vitro*. Nach der Behandlung verschiedener HBK-Zelllinien mit 5Aza-dC wurden die Zellen geerntet, um Methylierungs- und Expressionsniveau der Kandidatengene zu analysieren.

3.3.1.1 KISS1R

Die Zugabe von 5Aza-dC bewirkte in den vier Zelllinien eine Reduktion der DNA-Methylierung sowie einen Anstieg der mRNA-Expression von KISS1R (Tabelle 16). Der Effekt ist in T24-Zellen am deutlichsten erkennbar. Dort wurde die Methylierung auf 44 % des Ausgangszustandes reduziert, während KISS1R um den Faktor 38.000 reexprimiert wurde.

Ergebnisse

Tabelle 16 DNA-Methylierung und mRNA-Expression von KISS1R in HBK-Zelllinien nach 5Aza-dC-Behandlung

Zelllinie	5µM 5Aza-dC	KISS1R	
		Methylierung	Expression
RT4	–	56 %	8,41E-04
	+	26 %	4,80E-02
RT112	–	95 %	3,49E-04
	+	82 %	3,82E-02
T24	–	100 %	3,14E-07
	+	43 %	1,20E-02
253J B-V	–	99 %	7,43E-05
	+	84 %	1,43E-02

In Abbildung 22 ist der Zusammenhang zwischen reduzierter DNA-Methylierung und erhöhter mRNA-Expression für KISS1R grafisch dargestellt.

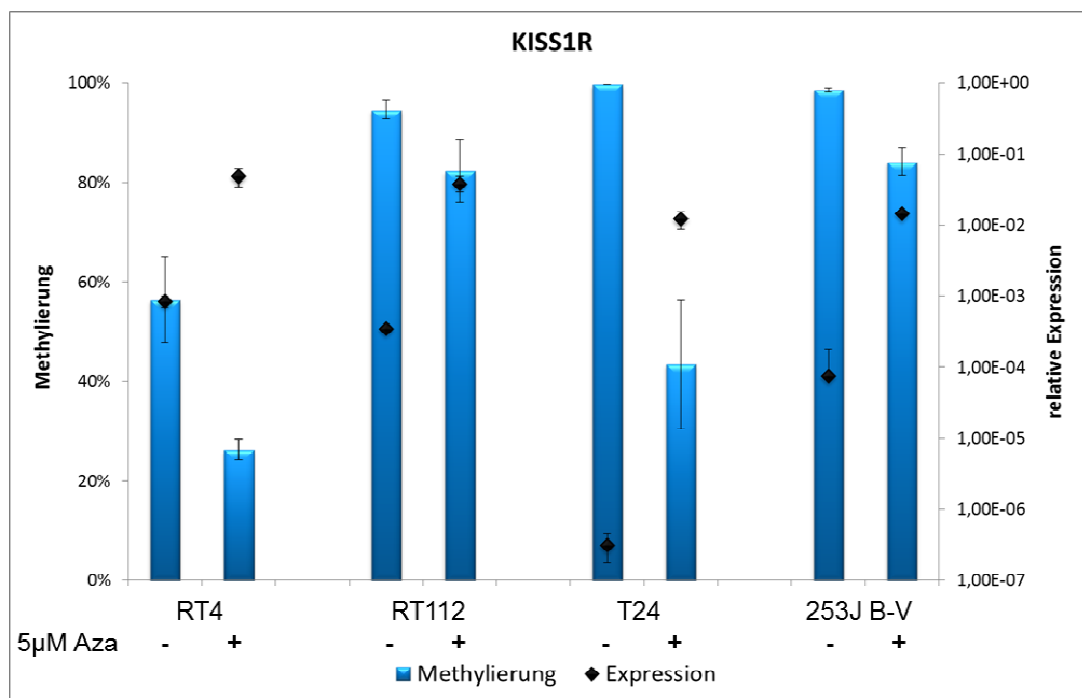


Abbildung 22 DNA-Methylierung und mRNA-Expression von KISS1R nach Behandlung mit 5Aza-dC

Die Balken zeigen die prozentuale Methylierung für verschiedene HBK-Zelllinien ohne (-) und mit (+) Behandlung mit 5Aza-dC. Die Quadrate zeigen die relative mRNA-Expression.

3.3.1.2 SEPT9

Laut NCBI Gene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) existieren sieben verschiedene Transkriptvarianten des SEPT9-Gens. Die Expressionsanalyse von Transkriptvariante 1 (SEPT9v1) zeigte keinen Unterschied zwischen unbehandelten T24-Zellen (Mock) und behandelten T24-Zellen (1 μ M bzw. 5 μ M 5Aza-dC). Im Gegensatz dazu konnte für die Transkriptvarianten 3 (SEPT9v3) und 4 (SEPT9v4) nach 5Aza-dC Behandlung ein erhöhtes mRNA-Expressionslevel im Vergleich zum Mock-Ansatz nachgewiesen werden. Die Expression des Transkripts 3 war 29-fach (1 μ M) bzw. 34-fach (5 μ M) höher als im Mock. Die Expression von SEPT9v4 betrug nach 5Aza-dC Behandlung das 112-fache (1 μ M) bzw. 104-fache (5 μ M). Die Expressionsunterschiede zwischen den analysierten SEPT9-Transkriptvarianten mit und ohne 5Aza-dC Behandlung sind in Abbildung 23 dargestellt.

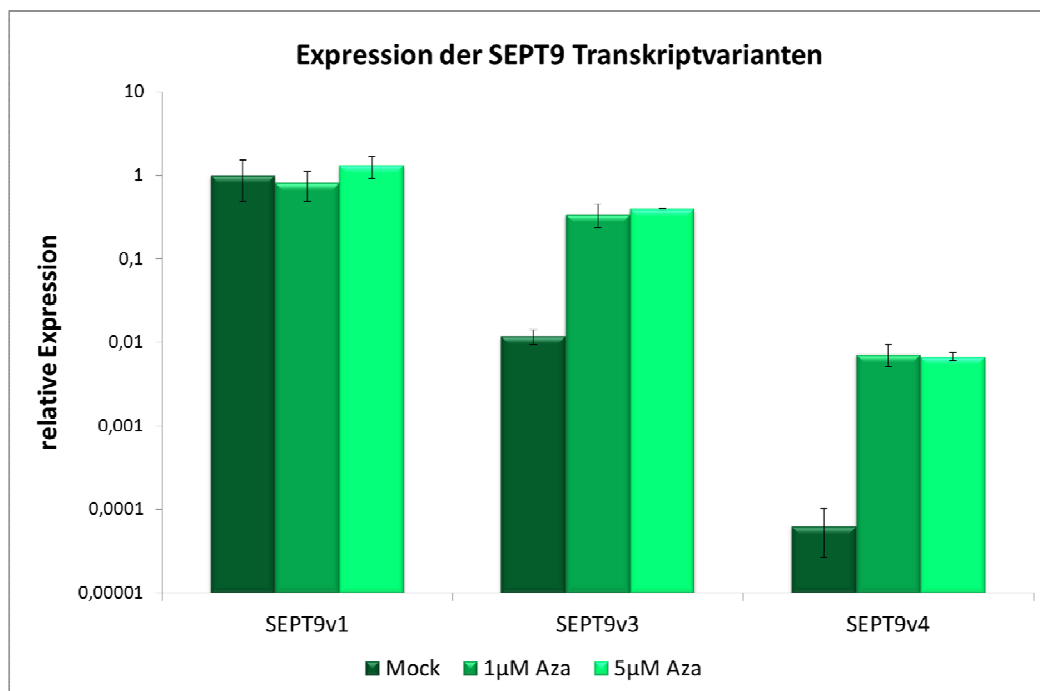


Abbildung 23 Relative mRNA-Expression der SEPT9 Transkriptvarianten 1, 3 und 4 in T24-Zellen nach Behandlung mit 5Aza-dC

Vergleich der mRNA-Expression von SEPT9v1, SEPT9v3 und SEPT9v4 zwischen unbehandelten T24-Zellen und T24-Zellen, die mit 1 μ M bzw. 5 μ M 5Aza-dC behandelt wurden.

Für die anderen Zelllinien, denen 5 μ M 5Aza-dC zugegeben wurde, erfolgte die SEPT9-Expressionsanalyse für Transkriptvariante 3. Nach der Behandlung konnte eine Reduktion der DNA-Methylierung gemessen werden, die in den Zelllinien fortgeschrittenen Ursprungs (T24 und 253J B-V) stärker war. In allen Zelllinien konnte SEPT9v3 reexprimiert werden, wobei der Expressionsanstieg in den RT4-Zellen am höchsten war (Tabelle 17 und Abb. 24).

Ergebnisse

Tabelle 17 DNA-Methylierung und mRNA-Expression von SEPT9v3 in HBK-Zelllinien nach 5Aza-dC-Behandlung

Zelllinie	5µM 5Aza-dC	SEPT9	
		Methylierung	Expression
RT4	–	54 %	8,54E-03
	+	43 %	4,92E-01
RT112	–	76 %	3,11E-02
	+	60 %	3,95E-01
T24	–	75 %	1,84E-02
	+	31 %	3,99E-01
253J B-V	–	73 %	5,97E-01
	+	28 %	7,96E-01

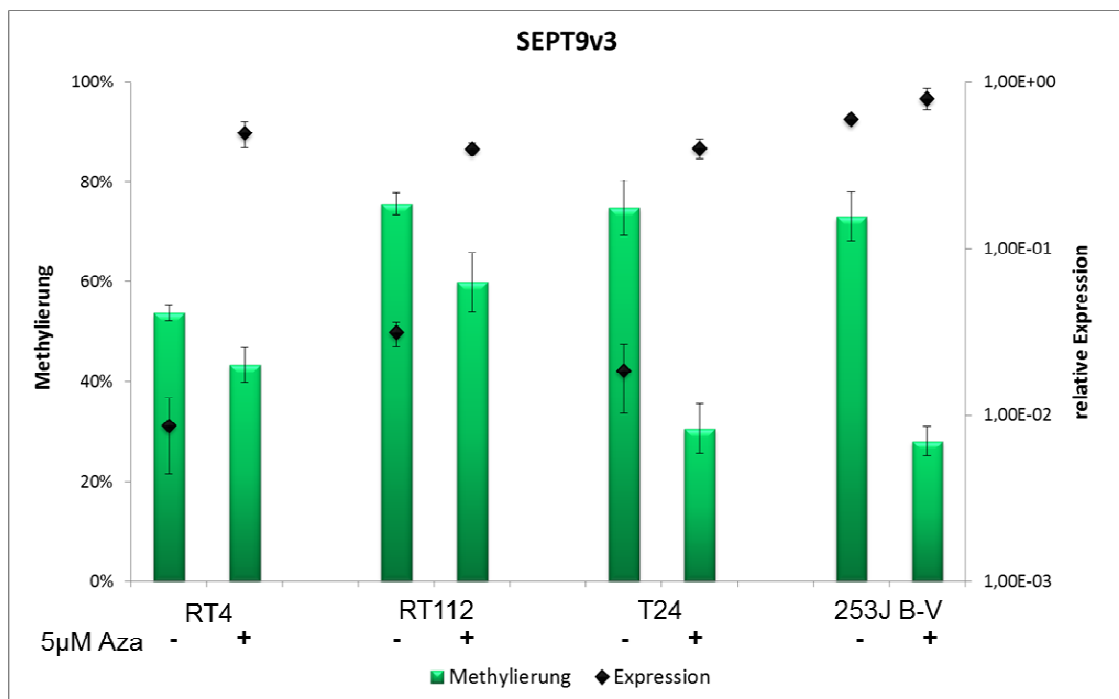


Abbildung 24 DNA-Methylierung und mRNA-Expression von SEPT9v3 nach Behandlung mit 5Aza-dC

Die Balken zeigen die prozentuale Methylierung für verschiedene HBK-Zelllinien ohne (-) und mit (+) Behandlung mit 5Aza-dC. Die Quadrate zeigen die relative mRNA-Expression der Transkriptvariante SEPT9v3.

3.3.1.3 CSAD

Nach 5Aza-dC Behandlung wurde DNA-Methylierung und mRNA-Expression des Kandidatengens CSAD in vier Harnblasenkarzinom-Zelllinien analysiert. Tabelle 18 zeigt, dass durch die Zugabe des DNMT-Inhibitors die Methylierung von CSAD reduziert wurde und die mRNA-Expression anstieg.

Ergebnisse

Tabelle 18 DNA-Methylierung und mRNA-Expression von CSAD in HBK-Zelllinien nach 5Aza-dC-Behandlung

Zelllinie	5µM 5Aza-dC	CSAD	
		Methylierung	Expression
RT4	–	32 %	6,87E-03
	+	26 %	3,67E-02
RT112	–	14 %	2,50E-02
	+	0 %	2,21E-02
T24	–	67 %	7,71E-03
	+	48 %	1,18E-02
253J B-V	–	70 %	2,62E-03
	+	52 %	2,58E-02

In Abbildung 25 ist der Zusammenhang zwischen verminderter DNA-Methylierung und erhöhter mRNA-Expression von CSAD dargestellt.

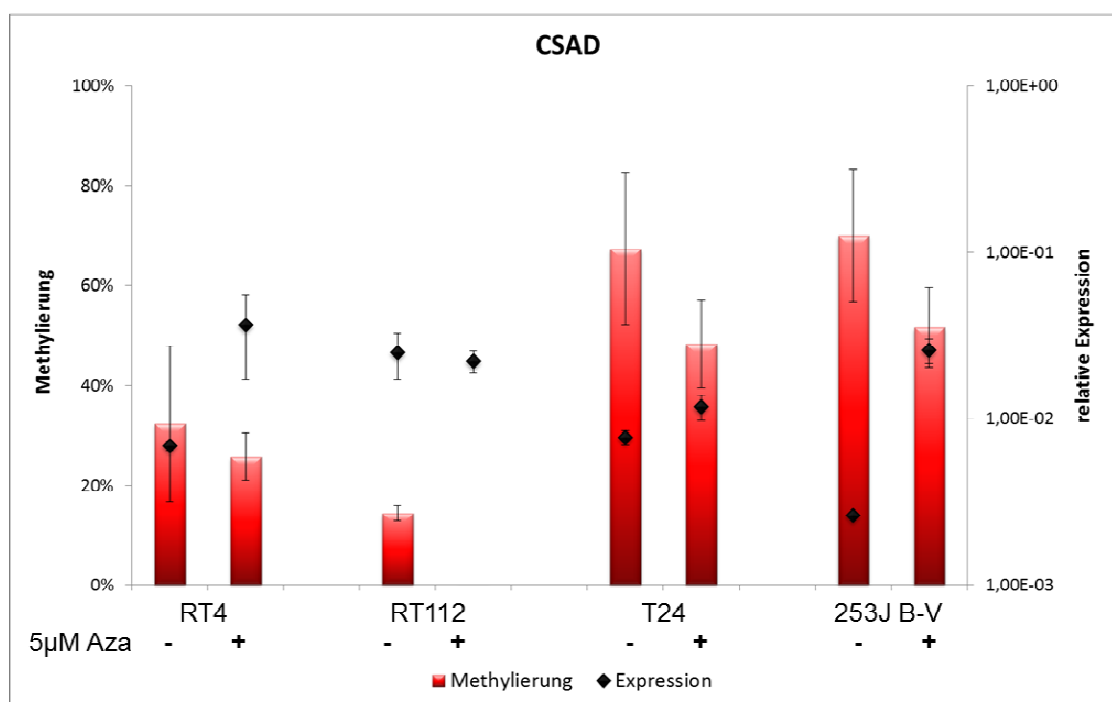


Abbildung 25 DNA-Methylierung und mRNA-Expression von CSAD nach Behandlung mit 5Aza-dC

Die Balken zeigen die prozentuale Methylierung für verschiedene HBK-Zelllinien ohne (-) und mit (+) Behandlung mit 5Aza-dC. Die Quadrate zeigen die relative mRNA-Expression.

3.3.2 Bestimmung der mRNA-Expression im primären Harnblasentumorgewebe

Die mRNA-Expressionsanalyse erfolgte an 11 Gewebeproben (5 nicht-metastasiert und 6 metastasiert). Um die Zusammenhänge zwischen den Werten besser darzustellen, wurden die relativen Expressionsergebnisse logarithmiert.

3.3.2.1 *KISS1R*

Die mittlere relative mRNA-Expression von *KISS1R* lag bei Patienten ohne Metastasen höher (-2,22) als bei Patienten mit Metastasen (-3,85). Der Unterschied zwischen den Gruppen war signifikant ($p=0,041$) (Tabelle 19). Die Verteilung der Expressionswerte zwischen den Patientengruppen ist in den Box-Whisker-Plots in Abbildung 26 dargestellt.

Tabelle 19 Relative mRNA-Expression von *KISS1R* im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	Mittelwert (95% KI)	relative Expression		
			STD	Median	Signifikanz
nicht-metastasiert	5	-2,22 (-2,75 - -1,71)	0,63	-2,14	0,041
metastasiert	6	-3,85 (-4,99 - -2,73)	1,46	-3,38	

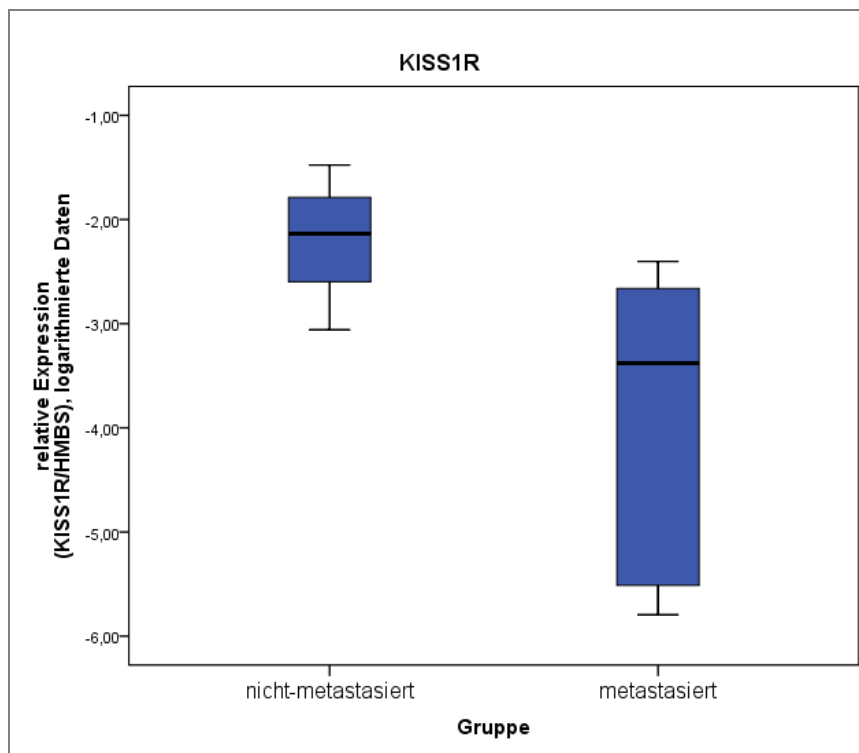


Abbildung 26 *KISS1R* mRNA-Expression im Gewebe

Der Box-Whisker-Plot zeigt die relative mRNA-Expression von *KISS1R* im Primärtumorgewebe von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.3.2.2 SEPT9

Die Expressionsanalyse von SEPT9 erfolgte für Transkriptvariante 3.

Die mittlere relative SEPT9v3 mRNA-Expression der Patientengruppe mit Metastasen (Mittelwert = -0,09) war geringer als in der nicht-metastasierten Gruppe (Mittelwert = 0,12), jedoch ist der Unterschied zwischen den Patientengruppen mit einem p-Wert von 0,55 nicht signifikant. (Tabelle 20).

Tabelle 20 Relative mRNA-Expression von SEPT9v3 im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	Mittelwert (95 % KI)	relative Expression		
			STD	Median	Signifikanz
nicht-metastasiert	5	0,12 (-0,34 - 0,44)	0,5	0,24	0,55
metastasiert	6	-0,09 (-0,56 - 0,93)	0,6	-0,12	

Im Box-Whisker-Plot (Abb. 27) ist die Verteilung der Expressionswerte von SEPT9v3 zwischen den Patientengruppen grafisch dargestellt.

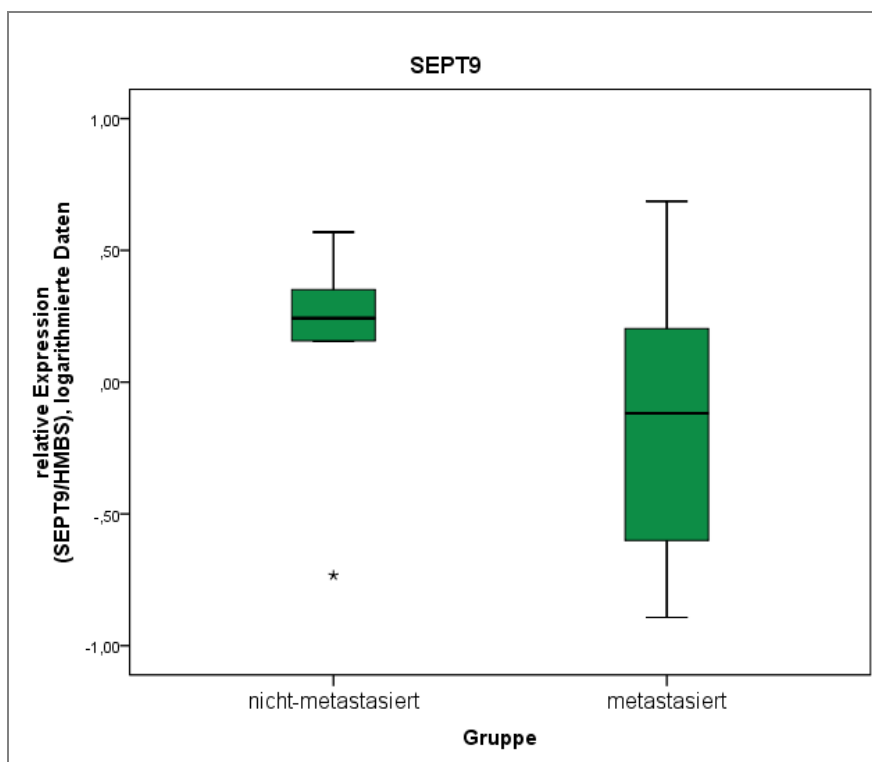


Abbildung 27 SEPT9v3 mRNA-Expression im Gewebe

Der Box-Whisker-Plot zeigt die relative mRNA-Expression von SEPT9v3 im Primärtumorgewebe von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

Ergebnisse

3.3.2.3 CSAD

Die mittlere relative Expression von CSAD betrug -1,54 für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen bzw. -1,36 für Patienten mit Metastasen. Mit einem p-Wert von 0,24 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden (Tabelle 21). Im Box-Whisker-Plot (Abb. 28) ist die Verteilung der Expressionswerte dargestellt.

Tabelle 21 Relative mRNA-Expression von CSAD im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	Mittelwert (95 % KI)	STD	relative Expression	
				Median	Signifikanz
nicht-metastasiert	5	-1,54 (-1,87 - -1,25)	0,36	-1,46	0,24
metastasiert	6	-1,36 (-1,44 - -1,15)	0,2	-1,40	

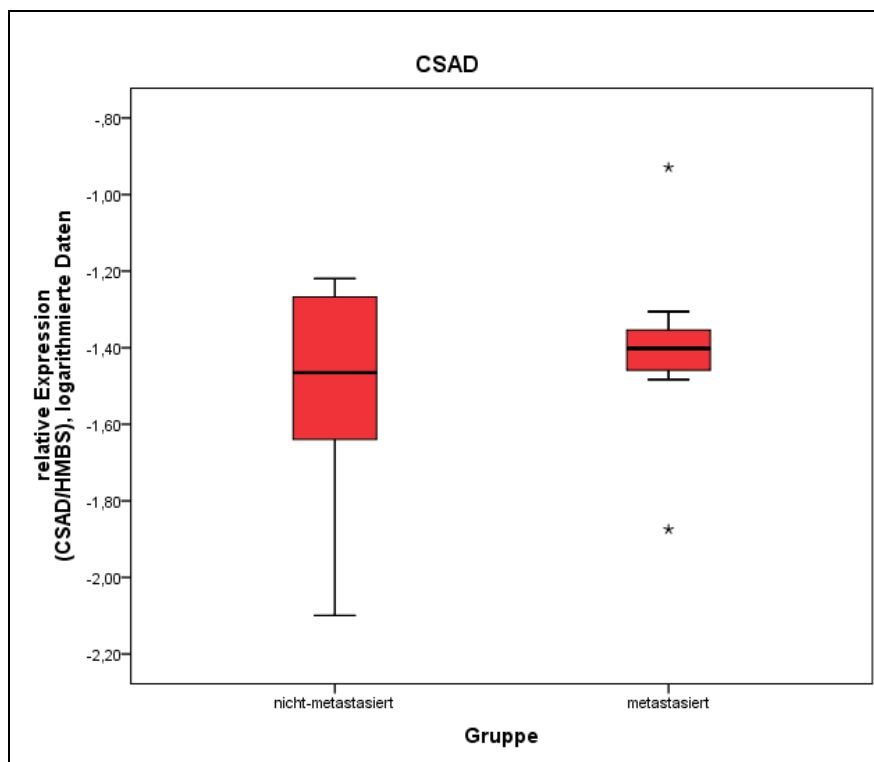


Abbildung 28 CSAD mRNA-Expression im Gewebe

Der Box-Whisker-Plot zeigt die relative mRNA-Expression von CSAD im Primärtumorgewebe von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.3.3 Bestimmung der Proteinexpression im primären Harnblasentumorgewebe

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte für das Kandidatengen KISS1R sowie für dessen Liganden KISS-1. Von den betrachteten *Tissue-Microarray*-Spots konnten 291 Spots (182 nicht-metastasiert, 109 metastasiert) ausgewertet werden.

Die Immunreaktivität wurde in drei Stufen eingeteilt – schwach, intermediär und stark. In Abbildung 29 sind repräsentative TMA-Spots für die Färbeabstufungen von KISS1R (A-C) und KISS-1 (D-F) dargestellt. Die Färbung der Positivkontrolle (Plazentagewebe) und Negativkontrolle (IHC ohne Primärantikörper) sind in Anhang 13 abgebildet.

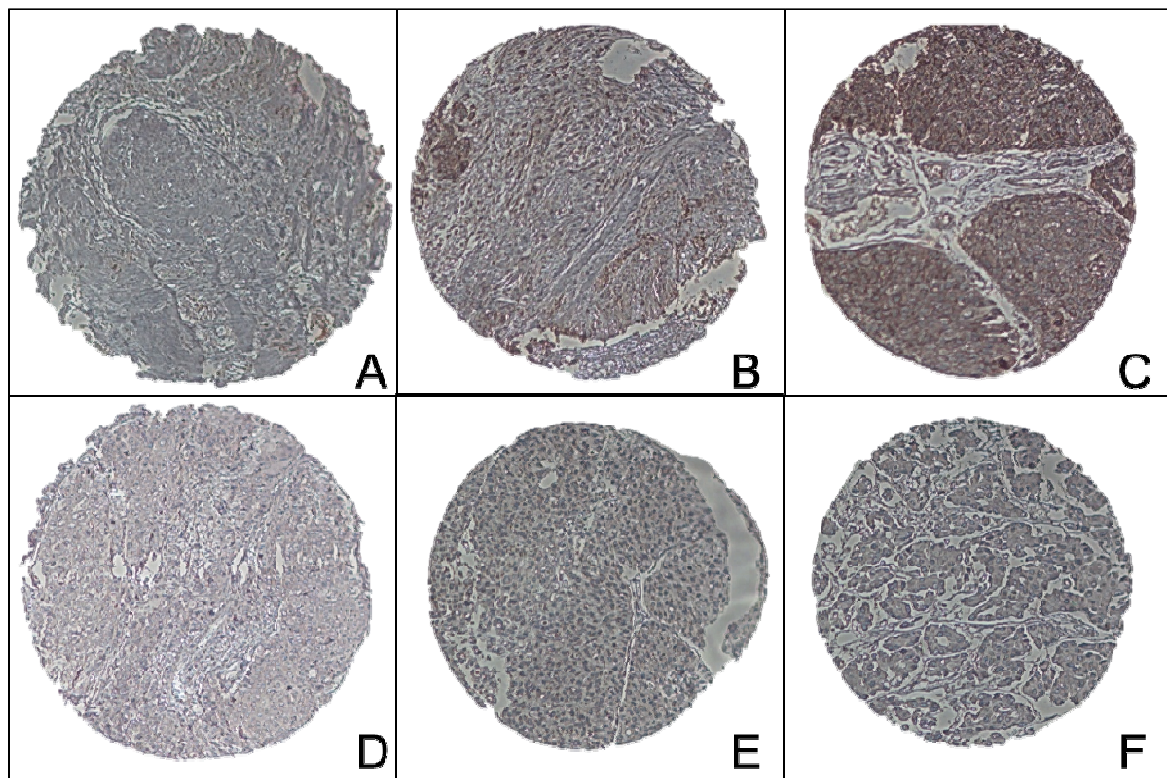


Abbildung 29 Immunhistochemischen Färbung von KISS1R und KISS-1

Immunreaktivität der Tissue Microarrays-Spots von KISS1R (A-C) und KISS-1 (D-F) in jeweils aufsteigender Reihenfolge (schwach – intermediär – stark)

KISS1R zeigte hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den Patientengruppen. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen wiesen eine höhere Proteinexpression von KISS1R im Gewebe auf als Patienten mit Lymphknotenmetastasen (Median des Färbeindexes 200 vs. 100) (Tabelle 22). Dieser Unterschied wird in Abbildung 30 grafisch dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 22 Proteinexpression von KISS1R im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	Mittelwert (95 % KI)	STD	Farbindex	
				Median	Signifikanz
nicht-metastasiert	182	190,89 (180-202)	74,69	200	<0,001
metastasiert	109	114,08 (101-128)	69,94	100	

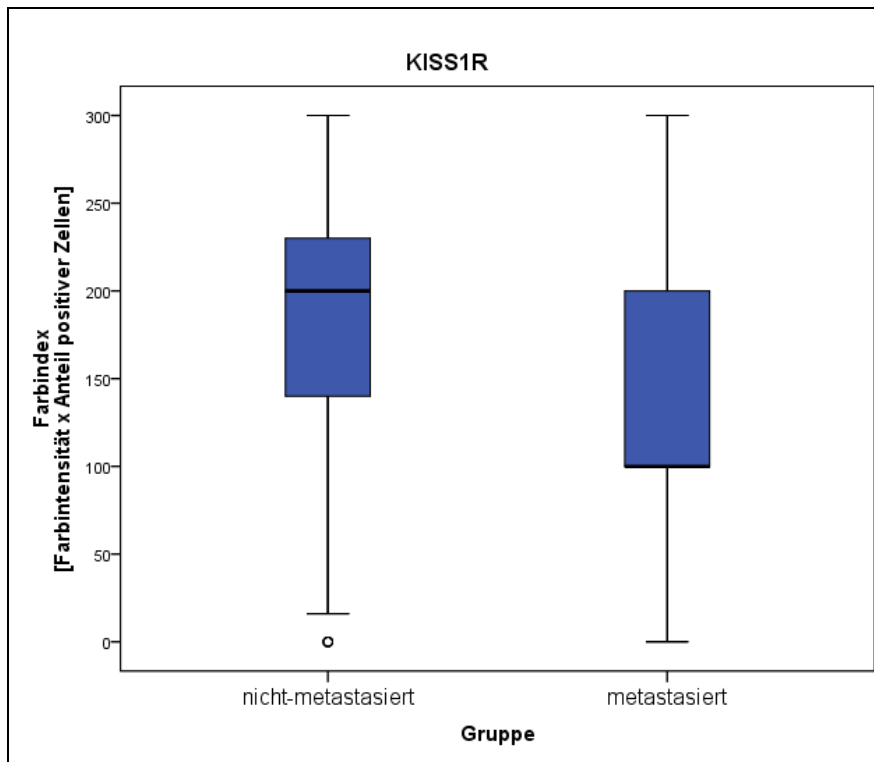


Abbildung 30 KISS1R Proteinexpression im Gewebe

Der Box-Whisker-Plot zeigt die Proteinexpression von KISS1R gemessen am Färbeindex nach immunhistochemischer Färbung der *Tissue-Microarrays* im Primärtumorgewebe von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

Die Proteinexpression von KISS-1 zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,443$) zwischen Patienten ohne Lymphknotenmetastasen und Patienten mit Metastasen (Median jeweils 100) (Tabelle 23). Die Verteilung der Farbindexwerte der TMA-Auswertung ist in Abbildung 31 gezeigt.

Tabelle 23 Proteinexpression von KISS-1 im Gewebe

Gruppe	Probenanzahl	Mittelwert (95 % KI)	STD	Farbindex	
				Median	Signifikanz
nicht-metastasiert	181	87,28 (76-99)	79,87	100	0,443
metastasiert	108	103,51 (85-124)	99,2	100	

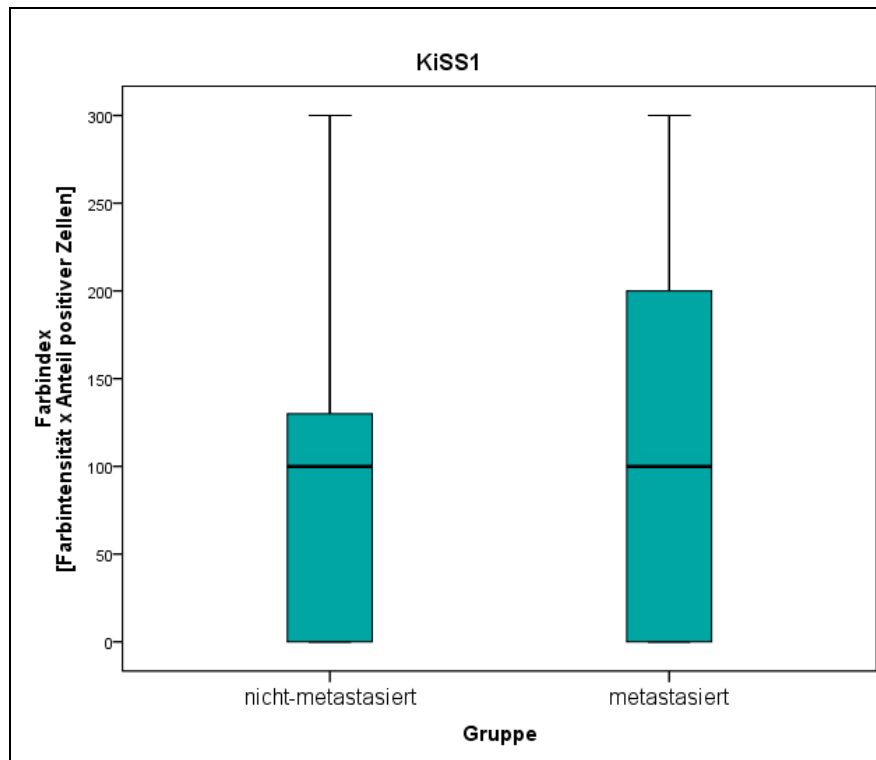


Abbildung 31 KiSS-1 Proteinexpression im Gewebe

Der Box-Whisker-Plot zeigt die Proteinexpression von KiSS-1 gemessen am Färbeindex nach immunhistochemischer Färbung der *Tissue-Microarrays* im Primärtumorgewebe von Patienten ohne und mit Lymphknotenmetastasen.

3.4 Funktionsanalysen

3.4.1 Transiente KiSS1R-Überexpression

3.4.1.1 Transfektionseffizienz

Die Funktionsanalysen von KiSS1R erfolgten nach transients Überexpression in T24-Zellen. Da KiSS1R in allen verwendeten HBK-Zelllinien sehr geringe Expressionswerte (relative Expressionswerte $<10^{-3}$) aufwiesen (Abb. 32), wurde die T24-Zelllinie für die Transfektionsversuche ausgewählt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Funktion von KiSS1R in diesen Zellen nicht ausgeführt wird. Deshalb erschien diese Zelllinie für die Überexpression und Funktionsanalysen sehr geeignet.

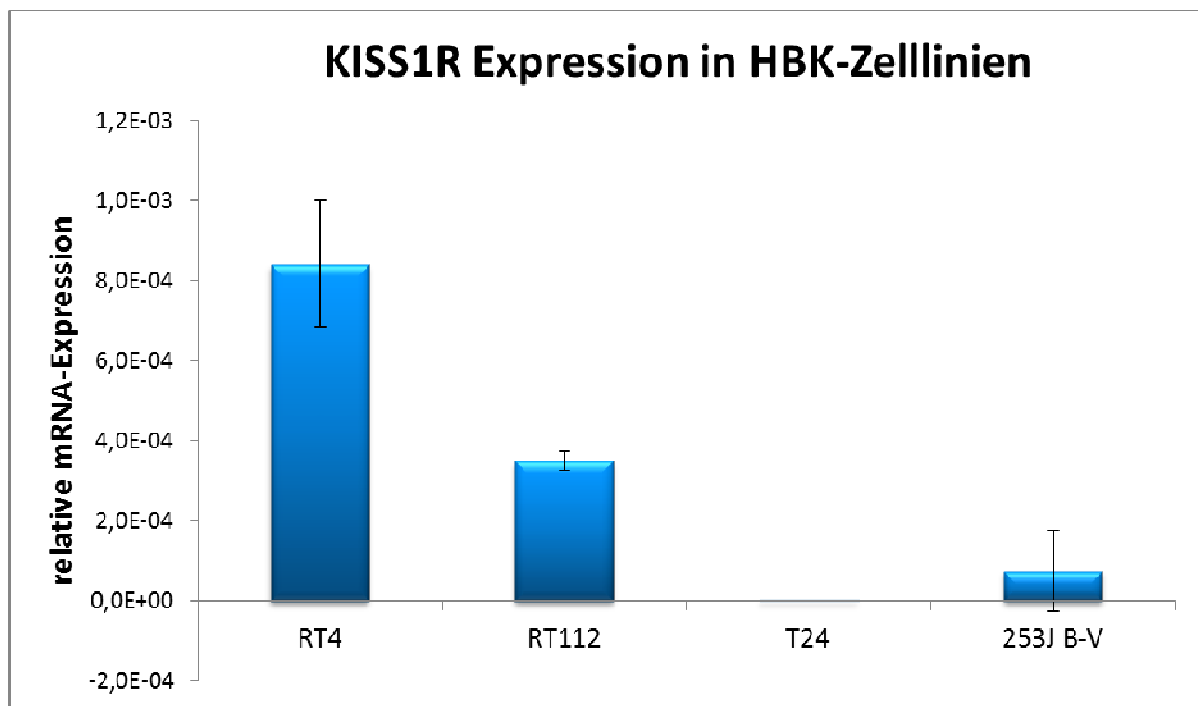


Abbildung 32 KISS1R-Expression in HBK-Zelllinien

Relative Expression von KISS1R in verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien. T24 zeigt keine KISS1R-Expression.

Um zu überprüfen, ob durch die transiente Transfektion die mRNA-Expression von KISS1R in den T24-Zellen erhöht werden konnte, wurde eine qPCR zur Bestimmung des mRNA Levels durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit verschiedenen cDNA-Vektor Mengen (0,25 ng und 0,75 ng) transfiziert und nach 48 h für die RNA-Isolation geerntet.

In Abbildung 33 sind die Amplifikationskurven der qPCR dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass im T24 Mock-Ansatz (grün) keine Amplifikation von KISS1R stattfand, da dieses Gen in den Zellen nicht exprimiert wird. Durch Zugabe des cDNA-Vektors konnte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der KISS1R-Expression erzielt werden. Unter Verwendung der Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen ($n=50$) ergibt die Berechnung des Expressionsniveaus im 0,25 ng Ansatz eine $1,6 \cdot 10^6$ -fach erhöhte Expression und im 0,75 ng Ansatz eine $2,5 \cdot 10^6$ -fach verstärkte Expression von KISS1R.

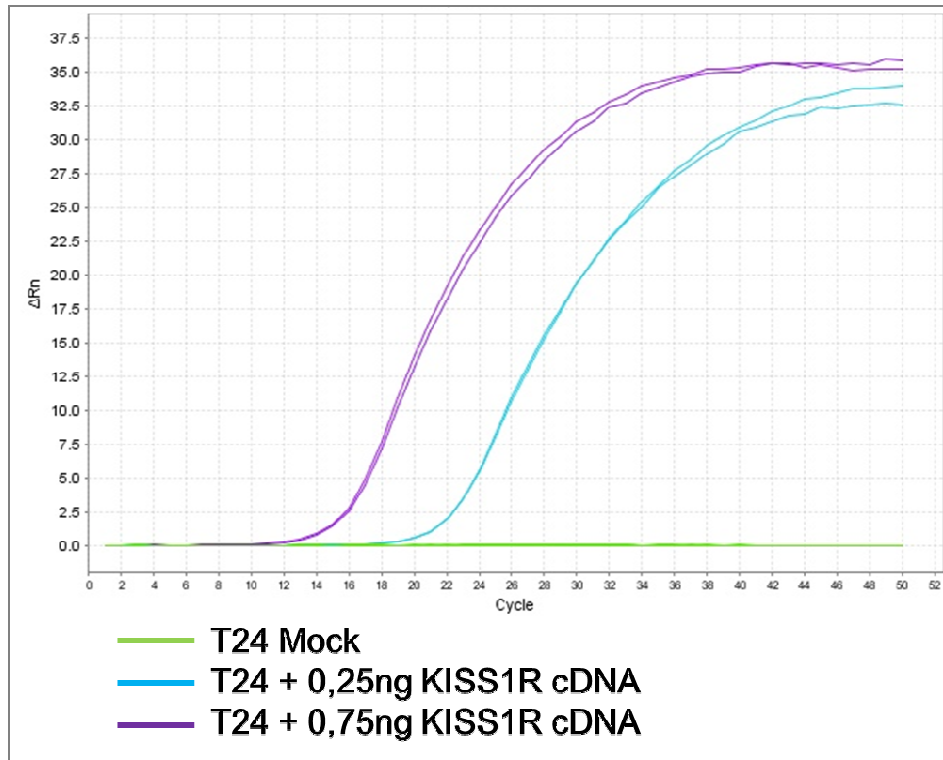


Abbildung 33 Amplifikationskurven der KISS1R-Expression nach transienter Transfektion

T24 Mock (grün) zeigt keine Expression von KISS1R (C_T -Wert > 50). Durch Transfektion der Zellen mit cDNA-Vektor ist eine Überexpression von KISS1R auf mRNA-Ebene nachweisbar. Die Transfektion mit 0,25 ng cDNA-Vektor (blau) ergab einen C_T -Wert = 17,6 und die Transfektion mit 0,75 ng cDNA-Vektor (violett) ergab einen C_T -Wert = 11,9.

3.4.1.2 Funktionsanalysen

Nachdem die Überexpression von KISS1R bestätigt werden konnte, erfolgten die Analysen bezüglich den Veränderungen von Zellproliferation, -migration und -invasion.

Die Messung der Zellproliferation erfolgte im Real-Time Cell Analyzer (RTCA) unter Verwendung von 10.000 Zellen pro Messung. Für die Ermittlung der optimalen Zellzahl wurden zuvor T24 Wachstumskurven erstellt (siehe Anhang). Für die Berechnung der Zellproliferation wurde der Zellindex zum Zeitpunkt 4 h nach Einsäen vom Zellindex nach 24 h subtrahiert, um die Adhäsionsphase der Zellen aus dem Ergebnis zu eliminieren.

Die Überexpression von KISS1R verminderte die Zellproliferation der T24 Zellen um 5%. Diese Reduktion zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,5$) gegenüber den Mock-Zellen (Abb. 34 A).

Die Migrationsversuche erfolgten unter Verwendung von 20.000 Zellen pro Messung im RTCA. Für die Berechnung der Migrationsrate der Zellen wurde der Zellindex 20 h nach Einsäen der Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 0 verwendet. Im Ergebnis zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,1$) zwischen transfizierten Zellen und Mock-Ansatz. Die

Ergebnisse

KISS1R-Überexpression führte zu einer Verminderung der Zellmigrationsrate um 25% (Abb. 34 B).

Für die Bestimmung der Veränderungen hinsichtlich des Invasionsverhaltens der Zellen erfolgte der Versuchsansatz in Matrigel™-beschichteten Invasionskammern mit jeweils 50.000 transfizierten Zellen. Zellen, die mit KISS1R cDNA-Vektor transfiziert wurden, zeigten eine verminderte Invasion von 5%. Die Verteilung der Werte zwischen den Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,7$) (Abb. 34 C).

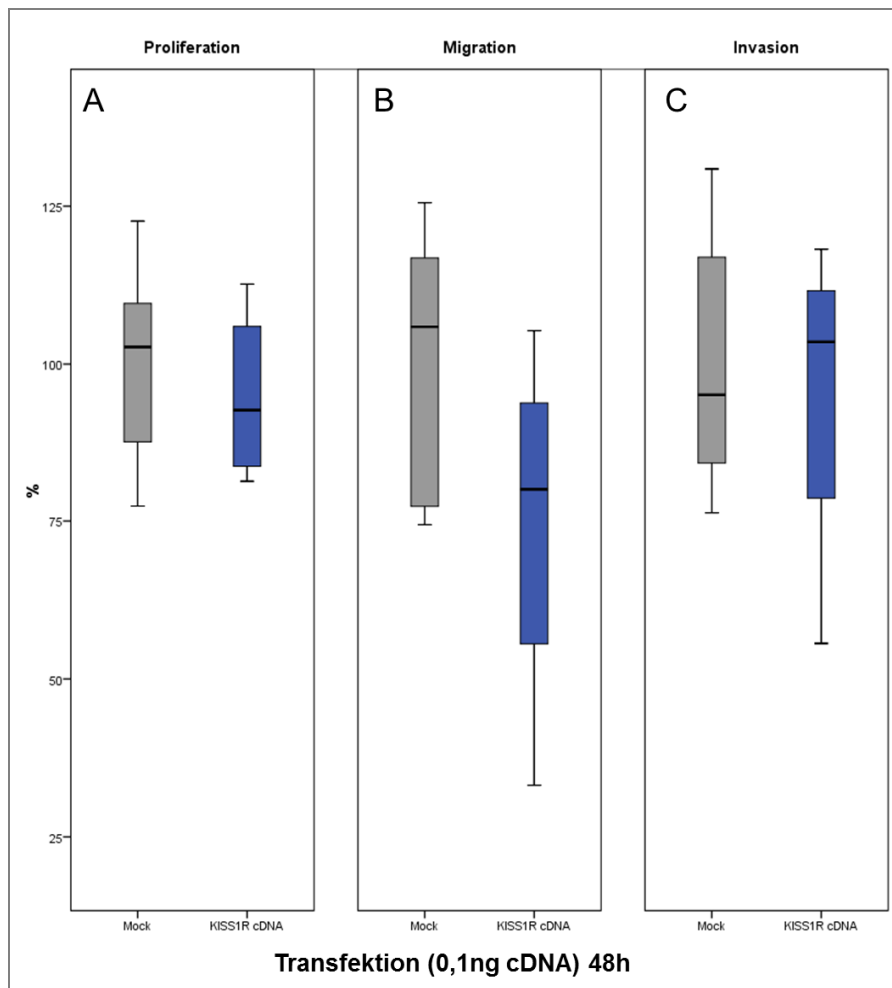


Abbildung 34 Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von T24 Zellen nach KISS1R-Überexpression

Die Box-Whisker-Plots zeigen die prozentuale Veränderung von Proliferation, Migration und Invasion nach transienter KISS1R cDNA-Transfektion (blau) im Vergleich zu Mock-Zellen, die nur mit Transfektionsmedium behandelt wurden (grau). Es wurde eine Reduktion der Zellproliferation um 5 % ($p=0,5$) (A), eine verminderte Zellmigration um 25 % ($p=0,1$) (B) und eine verminderte Zellinvasion um 5 % ($p=0,7$) (C) gemessen.

3.4.2 Transiente Inhibierung der SEPT9-Expression

3.4.2.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Analyse der SEPT9 Funktion im Metastasierungsprozess erfolgte nach transienter Transfektion einer HBK-Zelllinie mit spezifischer siRNA, die den Abbau der SEPT9v3 mRNA induziert.

Für die Transfektion wurde die Zelllinie 253J B-V verwendet, die im Vergleich zu den anderen Zelllinien die höchste SEPT9v3 Expression aufwies (Abb. 35).

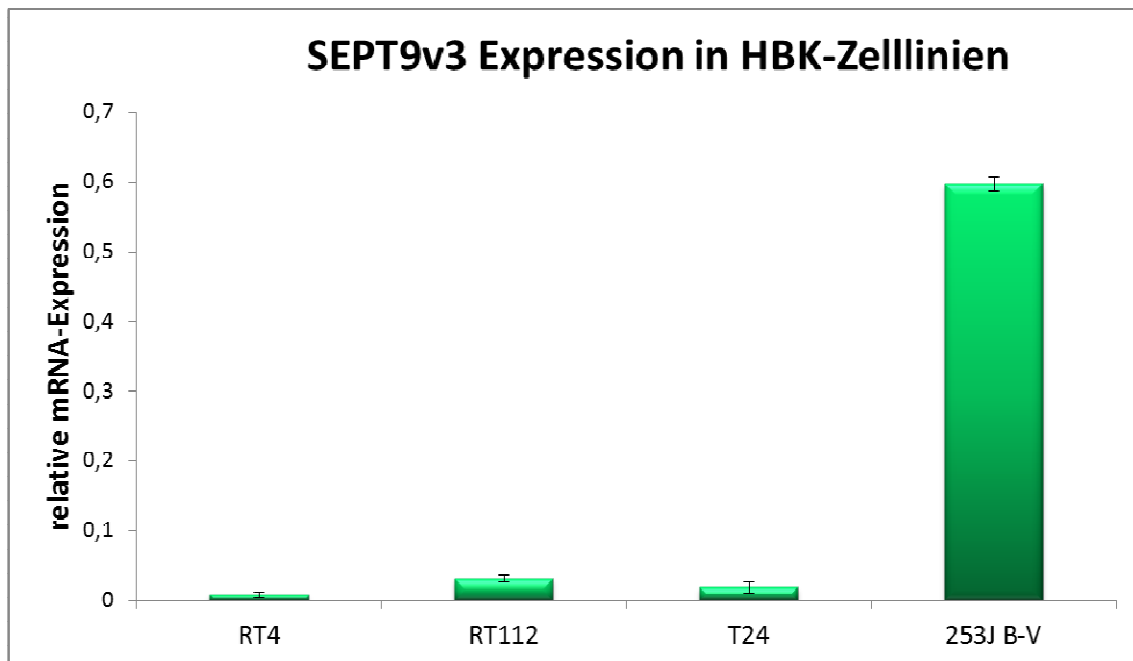


Abbildung 35 SEPT9v3-Expression in HBK-Zelllinien

Relative Expression von SEPT9v3 in verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien. 253J B-V zeigt die stärkste SEPT9v3-Expression.

253J B-V Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h mit 75 nM spezifischer siRNA bzw. Negativkontroll-siRNA transfiziert. Zur Überprüfung, ob die Expression von SEPT9v3 in den Zellen mittels siRNA inhibiert werden konnte, erfolgte eine mRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR. Die SEPT9v3-Expression wurde in jeweils 4 unabhängigen Transfektionsansätzen gemessen. Im Vergleich zur NK konnte eine signifikante Reduktion ($p=0,02$) der SEPT9v3-Expression in spezifisch transfizierten Zellen detektiert werden (Abb. 36). Die Expression konnte um das 4-fache, auf 25 % des ursprünglichen Expressionsniveaus herunterreguliert werden.

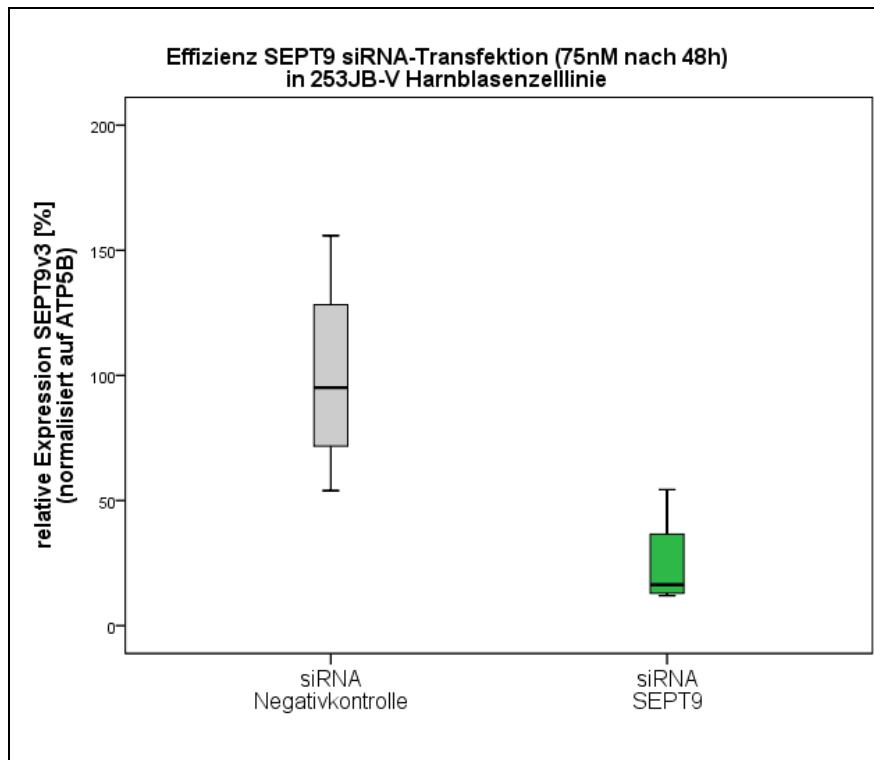


Abbildung 36 Effizienz der transienten Transfektion von 253J B-V Zellen mit SEPT9v3-siRNA

Relative Expression von SEPT9v3 in 253J B-V Zellen. Die Transfektion erfolgte mit 75 nM unspezifischer Kontroll-siRNA (Negativkontrolle) im Vergleich zu spezifischer SEPT9v3-siRNA (75 nM) für 48h. Die spezifische siRNA inhibierte die SEPT9v3-Expression um 75 %.

3.4.2.2 Funktionsanalysen

Nach erfolgreicher Transfektion und Reduktion der SEPT9v3 mRNA-Expression wurde ermittelt, welchen Einfluss dieser Expressions- und Funktionsverlust auf das Verhalten der Tumorzellen hinsichtlich Zellproliferation, -migration und -invasion einnimmt.

Die Messung der Zellproliferation erfolgte im *Real-Time Cell Analyzer* unter Verwendung von 10.000 Zellen pro Messung. Für die Ermittlung der optimalen Zellzahl wurden zuvor 253J B-V Wachstumskurven erstellt (siehe Anhang). Für die Berechnung der Zellproliferation wurde der Zellindex zum Zeitpunkt 4 h nach Einsäen vom Zellindex nach 24 h subtrahiert, um die Adhäsionsphase der Zellen aus dem Ergebnis zu eliminieren.

Die Transfektion mit spezifischer SEPT9-siRNA erhöhte die Zellproliferation der 253J B-V Zellen um 10 %. Dieser Anstieg zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,54$) gegenüber den Zellen, die mit NK-siRNA transfiziert wurden (Abb. 37 A).

Die Migrationsversuche erfolgten unter Verwendung von 20.000 Zellen pro Messung im RTCA. Für die Berechnung der Migrationsrate der Zellen wurde der Zellindex 8 h nach Einsäen der Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 0 verwendet. Im Ergebnis zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,039$) zwischen SEPT9-siRNA und NK-siRNA transfizierten

Ergebnisse

Zellen. Die Inhibierung der SEPT9-Expression führte zu einer Erhöhung der Zellmigrationsrate um 28 % (Abb. 37 B).

Für die Bestimmung der Veränderungen hinsichtlich des Invasionsverhaltens der Zellen erfolgte der Versuchsansatz in Matrigel™-beschichteten Invasionskammern mit jeweils 50.000 transfizierten Zellen. Zellen, die mit SEPT9-siRNA transfiziert wurden, zeigten ein verstärktes Invasionspotential von 22 %. Die Verteilung der Werte zwischen den Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied von $p=0,004$ (Abb. 37 C).

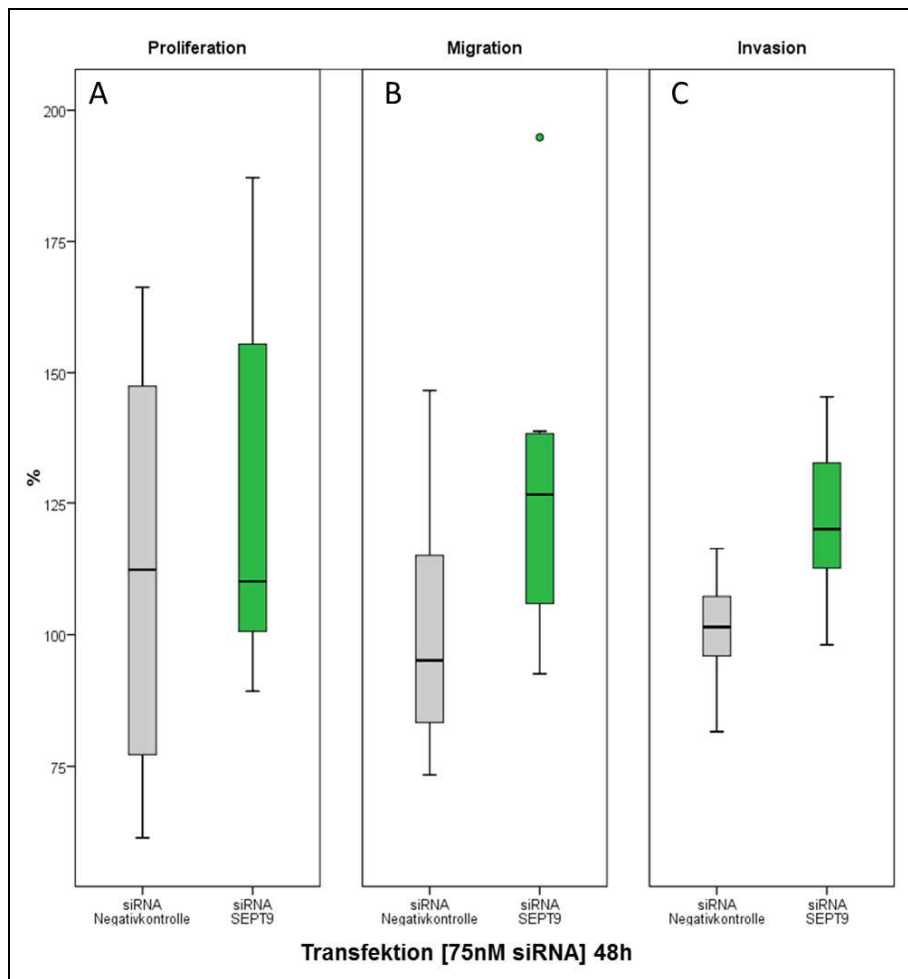


Abbildung 37 Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von 253J B-V Zellen nach SEPT9v3 Inhibierung

Die Box-Whisker-Plots zeigen die prozentuale Veränderung von Proliferation, Migration und Invasion nach transienter SEPT9v3-siRNA-Transfektion (grün) im Vergleich zu Zellen, die mit Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden (grau). Es wurde eine Steigerung der Zellproliferation um 10 % ($p=0,5$) (A), eine Steigerung der Zellmigration um 28 % ($p=0,04$) (B) und eine Steigerung der Zellinvasion um 22 % ($p=0,004$) (C) gemessen.

4 Diskussion

4.1 Verwendung genomweiter DNA-Methylierungsanalysen zur Identifizierung neuer Prognosemarker des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung neuer Prognosemarker, die bereits am Primärtumor eine Bewertung des Metastasierungsrisikos von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom ermöglichen. Derzeit sind klinische Parameter, wie Lymphknotenmetastasierung (LKM), lymphovaskuläre Invasion (LVI) und fortgeschrittenes T-Stadium (T3/T4), die einzigen Surrogatparameter, die für die Bewertung des Metastasierungsrisikos zur Verfügung stehen [105, 106].

Da Veränderungen epigenetischer Muster eines der charakteristischen Merkmale der Tumorgenese darstellen und maßgeblich an Entstehung und Progression beteiligt sind [107], erfolgte die Biomarkerdetektion auf genomweiter DNA-Methylierungsebene. Untersuchungen verschiedener Tumorentitäten, wie Bronchial- und Mammakarzinomgewebe, konnten belegen, dass DNA-Methylierungsveränderungen bereits im prämaligen Gewebe nachweisbar sind und mit der Aggressivität der später auftretenden Tumore korrelieren [108, 109]. Die Resultate derartiger Forschungsarbeiten zeigen, dass Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster besonders gut geeignet sind, um die Zielstellung dieser Arbeit zu realisieren und Prognosemarker für die Bewertung des Metastasierungspotentials zu ermitteln. Zunächst wurde ein gesamtgenomischer Vergleich von Primärtumorgewebe von Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen durchgeführt mit dem Ziel, Unterschiede der DNA-Methylierung zwischen den beiden Patientengruppen aufzuzeigen.

Die Detektion von genomweiten Unterschieden im DNA-Methylierungsmuster setzt zunächst die Vorbehandlung der genomischen DNA voraus. Dafür existieren im Wesentlichen drei methodische Ansätze. 1) Die Verwendung von methylierungssensitiven und/oder – insensitiven Restriktionsendonukleasen, die aufgrund ihrer Spezifität gegenüber unmethylierten bzw. methylierten DNA-Sequenzen eine Anreicherung von DNA-Fragmenten erlauben [110]. Die entstandenen Fragmente können anschließend z.B. zweidimensional mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden, um Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu identifizieren [111]. Der Nachteil dieser Methode besteht in der Begrenzung auf definierte Schnittstellen, die nur wenige CpG-Stellen berücksichtigt [112]. 2) Die chemische Modifikation genomischer DNA mit Natriumbisulfit führt zu einer hydrolytischen Deaminierung unmethylierter Cytosinbasen zu Uracil. Methylierte Cytosine sind gegenüber dieser Konvertierung resistent [113]. Der somit erzeugte Sequenzunterschied ermöglicht in nachfolgenden Untersuchungen die Analyse des Methylierungsstatus. Jedoch kann diese

Methode bei unvollständiger oder fehlerhafter Konvertierung zu falsch negativen bzw. falsch positiven Ergebnissen führen [114]. 3) Eine Anreicherung methylierter DNA-Fragmente kann unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch gegen 5-Methylcytosin gerichtet ist [115] (=MeDIP-Methode) bzw. mit Hilfe von Methylbindedomän-Proteinen wie MBD2/MBD3L1 oder MeCP2 [116, 117] (=MIRA bzw. Methyl-Cap-Methode) erfolgen. Der Vorteil dieser anreicherungsbasierten Methoden besteht darin, dass die DNA-Basen unmodifiziert bleiben und Fehler wie bei der Erzeugung von Sequenzunterschieden vermieden werden (vgl. 2.) Die Anreicherung ist nicht auf einzelne genomische Stellen (vgl. 1.) beschränkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb für die Ermittlung genomweiter Methylierungsunterschiede die MeDIP-Methode in Kombination mit der Microarray-Technologie angewendet. MeDIP wurde erstmals von Weber *et al.* beschrieben [118]. In deren Arbeit konnte unter Verwendung von MeDIP bestätigt werden, dass die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms der Frau durch Hypermethylierung verschiedener CpG-Inseln erfolgt. Des Weiteren konnten tumorspezifische Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster bestätigt werden. Keshet *et al.* konnten mit Hilfe von MeDIP und anschließender Microarrayanalyse im Kolon- und Prostatakarzinom Gene identifizieren, die im Tumorgewebe mit einer hypermethylierten CpG-Insel assoziiert sind [119]. Der Vergleich verschiedener affinitätsbasierter Anreicherungsmethoden von Bock *et al.* zeigt, dass die MeDIP-Methode akkurate DNA-Methylierungsdaten liefert [120].

Allerdings muss beachtet werden, dass unter Verwendung dieser Methode eine verstärkte Anreicherung von Fragmenten erfolgt, die einen hohen CpG-Anteil aufweisen, während Sequenzen mit geringer CpG-Dichte im Immunpräzipitationsschritt mehrheitlich verloren gehen [121]. Die Ursache hierfür liegt in der niedrigeren Anzahl an Bindungsstellen in Fragmenten mit geringer CpG-Dichte und der dementsprechend geringeren Bindungsaffinität des Antikörpers. Dieser methodische Nachteil stellte jedoch in dieser Arbeit kein Problem dar, da im Anschluss an die MeDIP-Anreicherung eine Hybridisierung der DNA-Fragmente auf CpG-Insel-Microarrays erfolgte, welche ohnehin nur die genomischen Regionen mit hohem CpG-Anteil abdecken.

Eine Limitation der Microarray-Technologie besteht in der relativ geringen Auflösung. Die Arraysonden der verwendeten CpG-Insel Microarrays der Firma Agilent bestehen aus Oligonukleotiden mit einer Länge von 60 bp. Somit ermöglicht die Microarrayanalyse lediglich die Detektion von Methylierungsunterschieden für den Bereich der Arraysonden und keine Betrachtung des Methylierungsstatus einzelner CpG-Stellen. Um eine basengenaue Auflösung zu erhalten, ist die Verwendung von genomweiten Sequenzierungsmethoden (inkl. Natriumbisulfit-Konvertierung) notwendig. Aufgrund der enorm hohen Kosten und des hohen Arbeitsaufwandes [122], die die Verwendung dieser Technologie bei der hier untersuchten Probenanzahl (n=23) mit sich gebracht hätte, wurde bei der Detektion von

Methylierungsunterschieden auf die hohe Auflösungsgenauigkeit verzichtet. Bei den verwendeten Arrays handelt es sich um sogenannte „tiling“ Arrays, was bedeutet, dass die Oligonukleotidsequenzen teilweise überlappend angeordnet sind. Somit kann sichergestellt werden, dass alle CpG-Inseln vollständig abgedeckt sind und analysiert werden können. Für die Selektion hypermethylierter Kandidatengene zur Prognosemarkeridentifizierung ist die verwendete Microarray-Methode daher ausreichend.

Im Ergebnis zeigt die genomweite Microarrayanalyse, dass im DNA-Methylierungsmuster von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom Unterschiede nachweisbar sind, die mit dem Metastasierungspotential des Primärtumors korrelieren. Da das Vorliegen einer regionalen Lymphknotenmetastasierung oder lymphovaskulären Invasion als Parameter für ein erhöhtes Progressionsrisiko sowie eine schlechte Prognose gilt [123, 124], wurde hier der Lymphknotenstatus als Metastasierungsparameter gewählt.

Die Microarrayanalyse diente neben der Detektion genomweiter Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen ebenso der Selektion von Kandidatengenen, deren Methylierungsstatus und -unterschied im weiteren Verlauf an größeren Fallzahlen bestätigt werden sollte.

Bei der Auswahl dieser Kandidaten mussten folgende zwei Kriterien erfüllt sein: 1) Die direkte Assoziation der CpG-Insel mit einer Promotorregion, da bereits vielfach beschrieben wurde, dass die Hypermethylierung des Promotors die Expression des betroffenen Gens inhibiert [125]. Somit könnte eine mögliche Korrelation zur Expression sowie zur Funktion des Kandidatengens bestehen und in späteren Funktionsuntersuchungen analysiert werden. 2) Die CpG-Insel sollte in der metastasierten Patientengruppe hypermethyliert sein. Der Grund hierfür bestand darin, dass die Hypermethylierung ein wichtiges Ereignis der frühen Onkogenese ist und bestehende Veränderungen bis in die späten Tumorstadien aufrechterhalten werden. Dagegen ist die Hypomethylierung ein fortschreitender Prozess, der eines der Hauptmerkmale hochmaligner Tumore und Metastasen darstellt [126]. Für die Fragestellung dieser Arbeit ist somit die Hypermethylierung von zentraler Bedeutung, da die gesuchten Prognosemarker eine Vorhersage des Metastasierungsrisikos zu einem frühen Zeitpunkt ermöglichen sollen.

Die Auswertung der Microarrayanalyse reduzierte die Gesamtzahl auf 24 hypermethylierte CpG-Inseln. Aufgrund des hochsignifikanten Unterschieds zwischen den Patientengruppen sowie der erhöhten Hypermethylierung in der N+-Gruppe wurden CSAD, SEPT9, KISS1, KISS1R und MANF als Kandidatengene ausgewählt.

Aufgrund der Komplexität des Metastasierungsprozesses ist es unwahrscheinlich, dass einzelne Marker die individuelle Einschätzung des Metastasierungsrisikos von Tumoren ermöglichen. Deshalb ist die Verwendung gesamtgenomischer *Screening*-Ansätze und die

Entwicklung von Signaturen aus mehreren molekularen Markern für die Etablierung neuer Biomarker von großer Bedeutung.

In einer groß angelegten Studie von Smith *et al.* wurde ebenfalls ein genomweiter *Screening*-Ansatz gewählt, um ein mögliches Risiko der Lymphknotenmetastasierung von Harnblasenkarzinom-Patienten am Primärtumor vorherzusagen und somit Hochrisikopatienten für den Einsatz einer neoadjuvanten Chemotherapie zu selektionieren. Die Autoren konzentrierten sich hierbei auf Genexpressionsanalysen und konnten für diese Fragestellung ein Model aus 20 Genen etablieren [127]. Diese Arbeit ist von besonderer Bedeutung, da neben einer großen Fallzahl und Validierung an unabhängigen Kollektiven darauf geachtet wurde, dass das Model sowohl an FFPE als auch an kryokonserviertem Material sowie an TUR- und Zystektomiegewebe validiert werden konnte. Dies zeigt die Robustheit und Validität dieses Modells und deutet darauf hin, dass die Gene als Prognosemarker für die Lymphknotenmetastasierung und somit zukünftig möglicherweise als Selektionskriterium für die neoadjuvante Therapie geeignet sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls N+ und N0 Patienten verglichen, um eine molekulare Signatur auf DNA-Methylierungsebene zu finden, die die Vorhersage des Metastasierungsrisikos hinsichtlich des Einsatzes der adjuvanten Chemotherapie erlaubt. Obwohl die analysierte Fallzahl in dieser Arbeit deutlich geringer war, konnte auch hier die genomweite Analyse zur Selektion potentieller Prognosemarker beitragen. Die Anwendung genomweiter *Screening*-Methoden stellt somit eine ausgezeichnete Grundlage zur Biomarkeridentifizierung dar und kann dazu beitragen, die derzeitige Situation bezüglich des Mangels an Prognosemarkern zu verbessern und die Risikobewertung und gezielte Therapieentscheidung für Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom zu ermöglichen.

4.2 Etablierung einer Methode zur Validierung des Methylierungsstatus der Kandidatengene

Im Anschluss an die Ermittlung genomweiter Unterschiede im Methylierungsmuster der Patientengruppen und Selektion von Kandidatengenen erfolgte die Validierung des Methylierungsstatus dieser Gene. Mit diesem Schritt soll bestätigt werden, dass zwischen den Patientengruppen tatsächlich ein signifikanter Unterschied im DNA-Methylierungsniveau besteht.

Zunächst musste eine Methode ausgewählt und etabliert werden, die für eine spezifische Betrachtung einzelner Gene sowie zur Quantifizierung des DNA-Methylierungsniveaus geeignet ist.

Es existiert eine Vielzahl von Methoden, die eine spezifische Analyse der DNA-Methylierung definierter genomischer Regionen ermöglicht [128]. Einen weit verbreiteten Ansatz stellt die

Bisulfit-Sequenzierung (Abschnitt 4.1). Diese ermöglicht die Bestimmung der Methylierung jedes CpG-Dinukleotids und liefert somit die bestmögliche Auflösung und den höchsten Informationsgehalt über die analysierte Region. Diese Methode ist jedoch aufgrund der hohen Kosten und des enormen Arbeitsaufwands für die Untersuchung mehrerer Loci an einer Vielzahl von Patientenproben ungeeignet. Wie bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben, können außerdem Fehler bei der Bisulfitkonvertierung zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Des Weiteren kommt es bei der Behandlung mit Natriumbisulfit häufig zu einem Verlust an DNA [129].

Weitere Methoden sind Methylation-Sensitive Single Nucleotide Primer Extension (Ms-SNuPE) und Combined Bisulfite Restriction Analys (COBRA) [130, 131], deren Grundlage ebenfalls die Erzeugung methylierungsspezifischer Sequenzunterschiede mit Natriumbisulfit ist und somit die bereits erwähnten Nachteile mit sich bringen. Beide Methoden ermöglichen die Betrachtung einzelner CpG-Dinukleotide, setzen jedoch die Bekanntheit der CpG-Stellen, die einer veränderten Methylierung unterliegen, voraus. Dies kann wiederum nur durch vorherige Sequenzierungsversuche bestimmt werden. Im Fokus dieser Arbeit stand jedoch die Analyse der CpG-Inseln, die mit der Microarray-Technologie zuvor als signifikant unterschiedlich ermittelt wurden und somit die Betrachtung mehrerer CpG-Stellen.

Die quantitative methylierungsspezifische PCR (qMSP) ist eine PCR-basierte Methode zur Bestimmung des Methylierungsniveaus, die durch gezieltes Primerdesign die Abdeckung mehrerer CpG-Stellen erlaubt [132]. Die Verwendung von Natriumbisulfit sowie die geringe Auflösung stellen die Nachteile dieser Methode dar. Des Weiteren kann die Oligonukleotid-Bindung der qMSP-Reaktion unspezifisch erfolgen, wenn die PCR-Bedingungen nicht ausreichend stringent sind und einzelne Nukleotidunterschiede (*mismatch*) auftreten. Eine akkurate Bestimmung der Methylierung ist dann nicht möglich. Des Weiteren werden qMSP-Primer üblicherweise so ausgewählt, dass entweder mehrere methylierte oder mehrere unmethylierte CpGs gebunden werden. Dies erlaubt keine exakte Bindung der Primer an intermediär methylierte Ausgangssequenzen.

Oakes *et al.* beschreiben in ihrer Publikation die qAMP-Methode (quantitative Analys of DNA Methylation using real-time PCR) zur quantitativen Untersuchung des Methylierungsniveaus ohne den Einsatz von Natriumbisulfit [97]. Diese Arbeit zeigt, dass die Verwendung methylierungsabhängiger Restriktionsenzyme in Verbindung mit der quantitativen PCR reproduzierbare Ergebnisse liefert, die den Resultaten der Goldstandard-Methode Bisulfitsequenzierung entsprechen ($\pm 5\%$). Die Vorteile der qAMP-Methode gegenüber der Bisulfitsequenzierung bestehen in der Kosteneffizienz sowie in der Zeit- und Aufwandsersparnis. Im Vergleich zur qMSP kann durch die Verwendung von Restriktionsenzymen bei qAMP eine höhere Genauigkeit erreicht werden, da die Schnittstellen der Endonukleasen hochspezifisch sind.

Ein wichtiger Aspekt, der bei der Interpretation der qAMP Ergebnisse beachtet werden muss, ist die Anzahl der Restriktionsschnittstellen innerhalb der amplifizierten Region. Das verwendete Restriktionsenzym benötigt zwei methylierte Cytosinbasen, um dazwischen eine Spaltung des DNA-Doppelstrangs zu katalysieren. Wenn also nur wenige CpG-Stellen innerhalb der amplifizierten Region vorhanden sind, gibt es entsprechend weniger potentielle Schnittstellen. Bei der Berechnung würde dies in einer geringeren Methylierung resultieren und zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen, wenn Regionen mit unterschiedlicher CpG-Dichte analysiert werden. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Bereiche betrachtet, die innerhalb einer CpG-Insel liegen und einen hohen CpG-Anteil von über 60 % aufweisen. Je mehr methylierte Cytosinbasen in der amplifizierten Region vorhanden sind, desto mehr Spaltungen werden durch das Restriktionsenzym katalysiert. Bei hoher Methylierung wird folglich die DNA stärker gespaltet, so dass weniger Ausgangsmaterial für die qPCR-Reaktion vorhanden ist. Dies wird anhand des späteren C_T -Wertes in der qPCR deutlich, welcher für die exakte Berechnung der DNA-Methylierung der Promotorregion der Kandidatengene verwendet wurde.

Um zu belegen, dass die qAMP-Methode eine zuverlässige Quantifizierung der DNA-Methylierung ermöglicht, wurden zunächst Kontrollversuche mit DNA aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) und *in vitro* methylierter DNA (IVD) durchgeführt. Die PBL-DNA diente als Negativkontrollansatz, da beschrieben ist, dass die DNA der PBL unmethyliert ist und in einer Vielzahl von Publikationen ebenfalls als Negativkontrolle geführt wird [133, 134]. Im *in vitro* methylierten Ansatz sollte die Methylierung bei nahezu 100 % liegen, da die Cytosinbasen des gesamten Genoms durch die verwendete Methylase methyliert werden. Im Ergebnis konnten 14 % (PBL) und 97 % (IVD) Methylierung erzielt werden. Diese Werte liegen sehr nah an den Erwartungen (0 bzw. 100 %). Die Ursache für die Abweichung im Negativkontrollansatz besteht darin, dass im niedrigen Methylierungsbereich bereits geringste Schwankungen des ΔC_T -Wertes zwischen unbehandelter und enzymverdauter DNA eine auffällige Auswirkung auf das Ergebnis der prozentualen Methylierung besitzen. Oakes *et al.* beschreiben in Ihrer Publikation ebenfalls, dass bei einer erwarteten Methylierung < 10 % keine genauen Werte erzielt werden konnten und die berechneten Werte über den erwarteten liegen. Im Bereich zwischen 10 und 100 % konnten jedoch exakte Methylierungsergebnisse nachgewiesen werden [97].

Um diese Problematik zu umgehen, wurde für die spätere Bestimmung der Methylierung nicht die prozentuale, sondern die relative Methylierung in Bezug auf ein internes Referenzgen (SNRPN) berechnet. SNRPN erwies sich aus zwei Gründen als geeignete Referenz. 1) Aufgrund der Lokalisation innerhalb einer Imprintingregion diente es als Kontrolle dafür, dass das Restriktionsenzym die genomische DNA erfolgreich geschnitten hat. Bei erfolgreichem Verdau sollte die Berechnung der Methylierung 50 % ergeben. 2) Da

SNRPN im Harnblasenkarzinom keiner veränderten Methylierung unterliegt, konnte es für die Normalisierung des Methylierungsniveaus verwendet werden. Die Patientengruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Methylierung des SNRPN-Gens ($p=0,9$) und wiesen beide eine mittlere relative SNRPN-Methylierung von 2,3 auf. Dies entspricht einer prozentualen Methylierung von 50 % (siehe Anhang 1 und 2).

Die exakten Methylierungsergebnisse der Kontrollversuche und die erfolgreiche Etablierung eines internen Referenzgens belegen, dass die qAMP-Methode für die Validierung der Microarrayergebnisse hervorragend geeignet ist und eine genaue Quantifizierung des Methylierungsstatus der Kandidatengene ermöglicht.

4.3 Promotorhypermethylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD zur Prognosebewertung des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

4.3.1 Validierung des DNA-Methylierungsstatus der Kandidatengene im Primärtumorgewebe sowie in Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Die Validierung der Microarrayergebnisse ergab für die Gene KISS1R, SEPT9 und CSAD einen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen. Für alle drei Gene konnte in der Gruppe der Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine Promotorhypermethylierung im Primärtumor gemessen werden.

Die Untersuchungen bezüglich KISS-1 und MANF ergaben eine tendenziell höhere Methylierung, jedoch war der Gruppenunterschied nicht signifikant. Da die Microarray-Ergebnisse, die einen signifikanten Unterschied für beide Gene ergaben, auf dem Verhältnis von Fluoreszenzintensitäten beruhen, kann es zur Entstehung falsch positiver oder negativer Ergebnisse kommen. Während des Hybridisierungsprozesses können z.B. sterische Behinderungen auftreten, die die Bindung der DNA-Fragmente an die Arraysonden beeinflussen. Auch ein gewisser Anteil an Fehlhybridisierungen kann nicht ausgeschlossen werden [135]. Deshalb sind Validierungsuntersuchungen von großer Bedeutung, um den Methylierungsstatus der Einzelgene zu überprüfen. Da der signifikante Unterschied für KISS-1 und MANF nicht bestätigt werden konnte, wurde sie für die weiteren Analysen nicht in Betracht gezogen. Als potenzielle Prognosemarker wurden somit KISS1R, SEPT9 und CSAD ausgewählt.

Um den Methylierungsunterschied in einem weiteren Modell zu überprüfen, erfolgte die Bestimmung der DNA-Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD in verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien. Für diese Analyse wurden Linien unterschiedlichsten Ursprungs ausgewählt. Dies erlaubte die zusätzliche Validierung des Methylierungsstatus hinsichtlich verschiedener Tumorstadien bzw. Differenzierungsgrade.

Die Bestimmung des Methylierungsniveaus erfolgte mit derselben Methode, die auch für die Validierung im Gewebe verwendet wurde.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass alle drei Kandidatengene eine vergleichsweise niedrige Methylierung von ca. 50 % in der RT4-Zelllinie aufweisen. Das Ausgangsgewebe für die Etablierung dieser Zelllinie war ein gut differenziertes Tumorareal im T2-Stadium. Dieses Ergebnis entsprach somit den Erwartungen, dass die Kandidatengene im niedrigen Tumorstadium schwach methyliert sind.

Auffällig ist weiterhin, dass KISS1R insgesamt die stärkste Methylierung aufweist. Diese liegt in RT112-Zellen bei 95 %. Die aggressiveren Zellen T24 und 253J B-V zeigen sogar eine 99- bzw. 100 %-ige KISS1R-Methylierung.

Etwas geringer, aber ebenso deutlich zeigte SEPT9 einen Unterschied zwischen gut differenzierten und fortgeschrittenen Zelllinien, in denen die Methylierung bei 73-76 % liegt.

Entgegen den Erwartungen wurde die geringste CSAD-Methylierung nicht in den gut differenzierten RT4-Zellen, sondern in RT112 gemessen (14 %), welche laut Literaturangaben durch eine mäßige Differenzierung (G2) charakterisiert sind [101]. Anhand des Differenzierungsgrades kann somit kein Zusammenhang zur CSAD-Methylierung hergestellt werden. Die stärkste CSAD-Methylierung (>65 %) ist erwartungsgemäß in Zelllinien mit schlechter Differenzierung (T24) bzw. erhöhtem Metastasierungspotential (253J B-V) gemessen worden.

All diese Resultate verdeutlichen, dass Tumorzellen fortgeschrittener Tumore mit einer verstärkten Methylierung der Kandidatengene assoziiert sind. Da dieses Ergebnis eine Übereinstimmung zu den Methylierungsdaten im Patientengewebe belegt, kann geschlussfolgert werden, dass der erhöhte Methylierungsstatus der Kandidatengene KISS1R, SEPT9 und CSAD im Tumorgewebe mit dem fortgeschrittenem Stadium korreliert und demzufolge für die Bewertung des Metastasierungspotentials sehr gut geeignet ist.

4.3.2 Physiologische und pathologische Funktionen der Kandidatengene

4.3.2.1 KISS1R

KISS1R (auch bekannt unter GPR54, AXOR12 oder hOT7T175) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, dessen endogener Ligand das KiSS1-Protein ist. Eine der physiologischen Funktionen dieses Ligand-Rezeptor-Systems besteht in der Freisetzung des *Gonadotropin Releasing Hormons* (GnRH) und somit in der Einleitung der Pubertät [136]. GnRH führt zur Ausschüttung des follikelstimulierenden Hormons und des luteinisierenden Hormons in der Hirnanhangsdrüse, welche die Funktion der Eierstöcke bzw. Hoden regulieren. Ein Funktionsverlust durch Mutation im KISS1R-Gen führt zu idiopathischem hypogonadotropem Hypogonadismus und zu einem Ausbleiben der Pubertät [137]. KISS-1 und KISS1R zeigen ähnliche Expressionsmuster mit der höchsten Expression in Plazenta

und zentralem Nervensystem [138, 139]. Lee *et al.* konnten erstmals 1996 eine Korrelation der Funktion von KISS-1 und der Unterdrückung der Metastasenbildung im Melanom zeigen [140]. Der zugehörige Rezeptor KISS1R, der das KISS-1 Signal in das Zellinnere überträgt, wurde erstmals 1999 beschrieben [141].

Die Bindung von KISS-1 an KISS1R führt zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins an der Innenseite der Zellmembran. Dadurch erfolgt ein Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des Heterotrimers. Dieser Austausch bewirkt eine Konformationsänderung und es kommt zur Dissoziation des G-Proteins in die α und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Somit erfolgt die Weiterleitung des exogenen Signals in das Zellinnere [142]. Dort erfolgt durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) eine Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerine (DAG). IP_3 vermittelt die intrazelluläre Freisetzung von Calcium und kann somit die Differenzierung und Apoptose der Zelle induzieren. Über DAG kann die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt werden, die den MAPK-Signalweg anschaltet. Über die Degradation von NF κ B erfolgt eine Reduktion der MMP-Expression, welche zur Suppression der Tumormetastasierung beitragen kann [143].

Verschiedene Arbeiten konnten belegen, dass der oben beschriebene Signaltransduktionsweg zur Inhibierung von Tumorwachstum und -ausbreitung beiträgt. In *in vitro*-Analysen konnte ein erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration nach KISS1-Behandlung nachgewiesen werden [139, 144]. Dieser Calcium-Anstieg führte in einer Ovarialkarzinomzelllinie (CHO-K1) zu einer deutlichen Unterdrückung des Migrationspotentials und zur Induktion der Differenzierung und Apoptose der Tumorzellen [145]. Die Wirkung auf MMPs konnte von Yan *et al.* bestätigt werden, die nach induzierter KISS1-Überexpression eine Reduktion der von MMP-9 sowie einen MMP-9-Aktivitätsverlust nachweisen konnten, der mit einer verminderten Invasion von HT-1080-Fibrosarkomzellen korreliert [146].

Der Großteil der Publikationen, die die Funktion des KISS1-KISS1R-Systems in der Tumorgenese analysierten, untersucht den Einfluss auf das Zellmigrations- und Zellinvasionsverhalten anhand der induzierten KISS1-Überexpression oder durch Zugabe von exogenem Kisspeptin zum Zellkulturmedium [147, 148]. Es existiert eine Arbeit von Cebrian *et al.*, in der an 25 Harnblasentumoren das Methylierungsniveau von KISS-1 im Vergleich zum Normalgewebe analysiert und an 804 Patienten validiert wurde. Im Ergebnis belegt diese Studie die Methylierung von KISS-1 in 83 % aller analysierten primären Harnblasentumore und eine Korrelation zur Muskelinvasivität und zum Differenzierungsgrad. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen erhöhter Methylierung und verminderter Expression nachgewiesen. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen der KISS-1-Methylierung und dem tumorspezifischen Überleben. Hingegen war die Kombination

aus hoher Methylierung und verminderter Expression mit dem Überleben assoziiert [149]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde in dieser Publikation die Methylierung von KISS1R nicht betrachtet. Bezüglich KISS-1 erfolgte keine Betrachtung der Korrelation der Methylierungsdaten zum Lymphknotenstatus bzw. zur Tumorprogression. Da Gewebeprobe aller T-Stadien einbezogen wurden, könnten die Unterschiede im tumorspezifischen Überleben durch das T-Stadium bedingt sein.

Eine Hypermethylierung von KISS1R ist für Endometrium- sowie Magenkarzinom-Zelllinien belegt [150, 151]. Für das Harnblasenkarzinom existieren keine Publikationen bezüglich der Methylierung von KISS1R.

4.3.2.2 SEPT9

Das Kandidatengen SEPT9 (Septin 9) ist Mitglied der Septin-Familie, die aus insgesamt 14 Mitgliedern besteht. Aufgrund der Interaktion mit Aktin und Tubulin besteht die Hauptfunktion der Septine in der Regulation des Zytoskeletts während der Zellteilung. Durch ihre Eigenschaft zur Bildung von Homo- und Heterodimeren tragen sie zur Ausbildung von Filamenten bei und sind an einem breiten Spektrum zellulärer Prozesse beteiligt [152]. Dazu zählen Vesikeltransport, Chromosomensegregation, Aktinorganisation und Zellzyklusarrest [153-155].

Für SEPT9 sind in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Funktionen beschrieben. Zum einen kann SEPT9 als Tumorsuppressorgen fungieren, zum anderen auch onkogene Wirkungen aufweisen. Im Mamma- und Ovarialkarzinom ist SEPT9 durch die Lokalisation in einer LOH-Region mit einem Funktionsverlust während der Tumorentstehung assoziiert [156]. Hingegen fungiert SEPT9 während der T-Zell-Lymphogenese als Protoonkogen [157]. Im Kolonkarzinom wurde die Hypermethylierung als weiterer Regulationsmechanismus der SEPT9-Expression beschrieben [158-160]. Die verstärkte Methylierung deutet ebenfalls auf eine tumorsuppressive Funktion von SEPT9 hin. Die Autoren beschreiben, dass die Detektion von hypermethyliertem SEPT9 im Plasma die Diagnose des Kolonkarzinoms mit einer Sensitivität von 68-72 % und einer Spezifität von 89-90 % ermöglicht. Tóth *et al.* untersuchten und belegten die Korrelation zwischen erhöhter SEPT9-Methylierung und verminderter Expression auf mRNA- und Proteinebene [161]. Aufbauend auf der Vielzahl der Publikationen hinsichtlich der nicht-invasiven Diagnostik des Kolonkarzinoms anhand der Hypermethylierung von SEPT9 entwickelte die Firma Epigenomics AG den Bluttest Epi proColon® für die Früherkennung von Darmkrebs [162].

Unabhängig von den Untersuchungen im Kolonkarzinom konnte die Hypermethylierung von SEPT9 auch in weiteren Tumorentitäten bestätigt werden. Unter Verwendung der Array-Technologie konnte im Ösophagusplattenepithelkarzinom ein Muster, bestehend aus insgesamt 9 Genen, entdeckt werden, das zur Prognosebewertung dienen könnte. Darunter

befand sich auch SEPT9 [163]. In Plasmaproben von Lungenkarzinompatienten wurde untersucht, ob die Methylierung von SEPT9 eine Früherkennung des Lungenkarzinoms erlaubt. Bei 44,3 % der Patienten konnte eine Promotormethylierung nachgewiesen werden [164]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die SEPT9-Methylierung keinen spezifischen Marker für eine bestimmte Tumorentität darstellt. In Kombination mit anderen Genen kann die SEPT9-Promotormethylierung jedoch zur Diagnose bzw. Prognosebewertung eingesetzt werden.

Die Resultate in dieser Arbeit belegen, dass die Methylierung von SEPT9 ebenfalls im Harnblasentumorgewebe nachweisbar ist und eine Korrelation zur LKM aufweist.

4.3.2.3 CSAD

CSAD (*Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase*) ist ein Mitglied der Gruppe 2 Decarboxylasen. Dieses Enzym wird vorwiegend in der Leber exprimiert und die Hauptfunktion besteht in der Decarboxylierung von Cysteinsulfinat zu Hypotaurin während der Taurinsynthese [165]. Das Endprodukt dieses Biosyntheseweges, Taurin, besitzt eine entzündungshemmende und immunregulatorische Wirkung [166]. Störungen im Cysteinmetabolismus stehen in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen [167].

Im Zusammenhang mit der Entstehung bzw. Progression von Tumoren ist keine spezifische Funktion von CSAD beschrieben. Zitzelsberger *et al.* konnten chromosomale Aberrationen im Schilddrüsenkarzinom nachweisen, die auch die CSAD-Region betreffen. Neben 20 weiteren Genen wurde CSAD als potentieller Diagnosemarker für das follikuläre Schilddrüsenkarzinom identifiziert [168].

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung der Microarray-Technologie eine Promotormethylierung des CSAD-Gens detektiert werden. Obwohl es bisher in der Literatur keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen CSAD und dem Harnblasenkarzinom bzw. dem Metastasierungsprozess gibt, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Bestimmung des Methylierungsstatus von CSAD als neuer potentieller Marker zur Prognosebewertung dienen könnte.

4.3.3 Entwicklung eines Vorhersagemodells zur Prognosebewertung

Nachdem mit den Validierungsuntersuchungen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der DNA-Methylierung der Kandidatengene bestätigt werden konnte, wurde anschließend unter Verwendung statistischer Analysen ermittelt, ob und wie genau die Kandidatengene als Marker für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos geeignet sind.

Mit Hilfe von ROC-Kurven kann ermittelt werden, ob die relative Methylierung der Einzelgene eine gute Trennung zwischen den Patientengruppen ermöglicht. Dabei wird für jeden der Methylierungswerte der Anteil an Patienten mit richtig positivem Ereignis (Sensitivität) gegen

den Anteil falsch positiver Ereignisse (1-Spezifität) aufgetragen. Anhand der Fläche unter der Kurve (AUC) kann beurteilt werden, wie hoch die Genauigkeit des Kandidatengens zur Unterscheidung zwischen den Ereignissen (hier: N0 und N+) ist. Ein AUC-Wert von 0,5 bedeutet, dass der Anteil an richtig und falsch positiven Ereignissen gleich ist und entspricht somit einem zufälligen Ereignis. AUC-Werte zwischen 0,5 und 1 zeigen, dass die richtigen Zuordnungen überwiegen. Je größer der AUC-Wert ausfällt, desto besser ist die Trennschärfe eines potentiellen Markers. Für klinische Fragestellungen sollte ein Marker mindestens einen AUC-Wert von 0,7 aufweisen, um eine ausreichend gute Unterscheidung zwischen Patientengruppen zu gewährleisten. Ein AUC-Wert $> 0,85$ deutet auf eine sehr gute Differenzierung mit wenigen falschen Ereignissen hin [169].

Die Koordinaten der einzelnen ROC-Kurven dienten anschließend der Bestimmung von Grenzwerten, die zunächst für jedes Einzelgen eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität bezüglich der Korrelation zum Status der LKM aufweisen sollen.

Die Grenzwerte wurden zum einen nach einem möglichst hohen Youden-Index ausgewählt, zum anderen wurde darauf geachtet, dass Sensitivität und Spezifität einen Wert von mindestens 60 % aufwiesen, da Werte um 50 % keine ausreichend präzise Zuordnung erlauben, sondern einem zufälligen Ergebnis gleichen.

Die ROC-Kurven-Analyse der Einzelgene ergab, dass das Kandidatengen SEPT9 mit einer AUC von 0,82 die beste Trennschärfe zwischen den Patientengruppen aufweist. Die AUC-Werte von KISS1R und CSAD lagen mit jeweils 0,79 etwas niedriger, aber dennoch ausreichend gut, um Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen anhand der relativen DNA-Methylierung zu unterscheiden. Nach der Ermittlung von Grenzwerten nach o.g. Kriterien erzielte KISS1R die höchsten Sensitivitäts- und Spezifitätswerte (76 % bzw. 78 %). Die Ursache hierfür liegt in der bereits erwähnten Auswahl von möglichst hohen Prozentwerten für Sensitivität und Spezifität. Bei Betrachtung der ROC-Kurven sowie der zugehörigen Koordinaten (Tabelle 15 und Anhang 5-7) fällt auf, dass der Youden-Index von SEPT9 und CSAD durch eine hohe Spezifität gesteigert wird, dies aber mit einem geringeren Sensitivitätswert einhergeht. Für SEPT9 konnte eine Spezifität von 100 % erreicht werden, dagegen lag die Sensitivität dieser Grenzwerte unter 55 %. Auch bei CSAD zeigen sich Grenzwerte mit einer Spezifität über 90 %, hingegen liegt die Sensitivität unter 50 %. Da im Fokus dieser Arbeit die Identifizierung neuer Prognosemarker in Korrelation zur Metastasierung steht, sind möglichst hohe Sensitivitätswerte, die die Anzahl richtig positiver Ergebnisse vorhersagen, von großer Bedeutung. Die Selektion von Grenzwerten mit hoher Sensitivität resultierte in einer Reduktion der Spezifität.

Die Einzelgen-Analyse zeigt, dass der DNA-Methylierungsstatus eine gute Trennung zwischen den Patientengruppen ermöglicht. Jedoch kann jedes Gen einzeln nur eine bedingt ausreichende Vorhersage des Metastasierungsrisikos treffen, da entweder Sensitivität oder

Spezifität einen niedrigeren Wert aufweisen. Da die Metastasierung einen hoch komplexen Prozess darstellt, der eine Vielzahl verschiedener Signalwege umfasst, erschien es sinnvoll eine Kombination aller drei Kandidatengene zu erstellen, um die Aussagekraft zu erhöhen. Dafür wurden die Werte der relativen Methylierung addiert und einer erneuten ROC-Kurven-Analyse unterzogen. Die Kombination der Einzelgene konnte die Trennschärfe zwischen den Patientengruppen desselben Kollektivs im Vergleich zur Einzelgen-Analyse deutlich steigern. Die AUC erreichte einen Wert von 0,87. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Kombination mehrerer Gene für die Vorhersage des Metastasierungsrisikos besser geeignet ist.

Anschließend wurde ein Modell zur Vorhersage der LKM definiert, indem für jeden Patienten die Anzahl an Genen addiert wurde, die den Grenzwert überschritten. Wenn mindestens ein Kandidatengen in einer Patientenprobe den Grenzwert überschritt, wurde dies als positives Testergebnis und mit der Vorhersage „metastasiert“ bewertet. Für jeden Patienten wurde diese Vorhersage und der tatsächliche Zustand verglichen, um die Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Vorhersagen zu ermitteln und Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells zu berechnen.

Das Modell, bestehend aus dem Methylierungsstatus von KISS1R, SEPT9 und CSAD, konnte bei 19 von 21 Patienten, die tatsächlich zum Zeitpunkt der Zystektomie Lymphknotenmetastasen aufwiesen, ein richtig positives Testergebnis erzielen und erreichte somit eine Sensitivität von 90 %. Die Spezifität lag mit 67 % deutlich niedriger. Für die Ermittlung der Vorhersagegenauigkeit konnten in diesem Patientenkollektiv jedoch nur insgesamt 9 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen betrachtet werden. Die geringe Anzahl an Patienten ist darauf zurückzuführen, dass die PCR-basierte Methode, die zur Validierung des Methylierungsstatus der Kandidatengene verwendet wurde, nicht in jedem Fall ein Ergebnis erbrachte. Vor allem die PCR-Reaktion zur Amplifikation von KISS1R funktionierte lediglich in 30 Proben (21 metastasiert, 9 nicht metastasiert), während für SEPT9 und CSAD Ergebnisse von 52 bzw. 54 Patientenproben zur Verfügung standen. Trotz Wiederholung der Versuche konnte für das Kandidatengen KISS1R in 24 Proben kein bzw. nur ein sehr hoher C_T -Wert (>36) gemessen werden, der kein adäquates PCR-Produkt lieferte, sondern oftmals aus der Bildung von Primer-Dimeren resultierte. Die Ursache für die schlechte Amplifikation kann auf die Qualität der isolierten DNA zurückzuführen sein. Bei Patientenkollektiv 1 handelt es sich um DNA aus FFPE-Material, die bei der Messung mit dem NanoDrop ND-1000 oft Kontamination mit organischen Verbindungen, wie z.B. Phenol, aufwies. Dies könnte zu Störungen der PCR-Reaktionen geführt haben. Da die Amplifikation der SEPT9- und CSAD-Produkte in denselben Proben gut funktionierte, könnte die Ursache ebenfalls in der KISS1R Primer-Struktur liegen. Die Region, die in den qAMP-Reaktionen amplifiziert wurde, sollte mit der Position der Microarray-Sonden übereinstimmen, um zu gewährleisten, dass eine exakte Validierung der Ergebnisse erfolgt. Daher ergaben sich hier keine

Alternativen, die die richtige Position der Primer sowie optimale PCR-Bedingungen erlaubten. Da die Amplifikation von KISS1R an DNA aus Gefrierewebe (Patientenkollektiv 2) und Zelllinien sehr gute C_T -Werte ergab, kann man schlussfolgern, dass die Kombination aus schlechter DNA-Qualität und schwierigem Primerdesign die Ursache für die geringere Anzahl an KISS1R-Ergebnissen im Kollektiv 1 ist.

Da sich das Vorhersagemodell aus einer Kombination aller drei Kandidatengene zusammensetzt, konnte die Vorhersage nur für die Patientenproben berechnet werden, von denen der Methylierungsstatus aller drei Gene zur Verfügung stand. Für Patienten, bei denen aufgrund der genannten technischen Limitation kein Wert vorhanden war, konnte die Vorhersage nicht ermittelt werden. Für 6 der 9 Patienten, die für die Berechnung der Spezifität betrachtet wurden, konnte ein richtig negatives Testergebnis erzielt werden. Die Genauigkeit bezüglich der Spezifität könnte an einem größeren Patientenkollektiv noch erhöht werden.

Zur Überprüfung der Genauigkeit des Vorhersagemodells wurde eine weitere unabhängige Patientenkohorte betrachtet. Zunächst wurde eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt. Diese ergab einen AUC-Wert von 0,79, der zwar etwas unter dem Wert des ersten Patientenkollektivs liegt, jedoch kein schlechteres Ergebnis als die Einzelgen-Analyse aufweist. Die Überprüfung der Vorhersagegenauigkeit des Modells bezüglich des Metastasierungsrisikos am zweiten Patientenkollektiv ergab eine Sensitivität von 75 % und eine Spezifität von 70 %.

Die Ergebnisse dieser ROC-Kurven-Analysen sowie die Überprüfung der Vorhersagegenauigkeit anhand zwei unabhängiger Patientenkollektive zeigen, dass die Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD in Kombination ein geeignetes Modell zur Bewertung des Metastasierungsrisikos muskelinvasiver Harnblasenkarzinome darstellt.

In weiterführenden Untersuchungen müsste analysiert werden, ob das etablierte Methylierungsmuster an TUR-Präparaten angewendet werden kann und ebenso eine Korrelation zum pN-Status aufweist. Somit wäre eine Aussage über das Risiko der LKM möglich. Bei erhöhtem Risiko könnte der Einsatz der perioperativen Chemotherapie individuell angepasst werden und die Durchführung einer ausgedehnten Lymphadenektomie in Betracht gezogen werden.

4.3.4 Korrelation des Lymphknotenstatus und des Vorhersagemodells zum Progressionsrisiko und Gesamtüberleben

Für die Etablierung neuer Prognosemarker ist es von zentraler Bedeutung, dass eine Bewertung der Aussagekraft der potentiellen Marker in Bezug auf die Tumorprogression erfolgt. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass die Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD mit der LKM zum Zeitpunkt der Zystektomie korreliert. In einem weiteren Schritt

wurden die Verlaufsdaten der Patienten betrachtet. Dafür wurden der Zeitraum des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens der Patienten nach Zystektomie für eine Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier verwendet. Neben der Betrachtung des Vorhersagemodells, das in dieser Arbeit entwickelt wurde, erfolgte auch eine Überlebenszeitberechnung in Korrelation zum pN-Status. Da die LKM aus klinischer Sicht einen wichtigen Parameter zur Bewertung des Progressionsrisikos muskelinvasiver Harnblasentumore darstellt, sollte ein direkter Vergleich zwischen dem entwickelten Modell und dem Lymphknotenstatus erfolgen.

Die Funktionen des progressionsfreien Überlebens des Patientenkollektivs 1 in Korrelation zum pN-Status zeigen keinen Unterschied im Kurvenverlauf zwischen N0 und N+ ($p=0,7$). Dieses Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da regionale Lymphknotenmetastasen in der klinischen Praxis als Parameter für ein erhöhtes Progressionsrisiko dienen und den Einsatz einer perioperativen Chemotherapie indizieren [105]. In der Literatur ist beschrieben, dass ein positiver Lymphknotenstatus sowie die Anzahl positiver Lymphknoten mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Progressionsrate assoziiert sind [170, 171].

Die genauere Betrachtung der Zusammensetzung dieses Patientenkollektivs konnte jedoch zur Aufklärung dieser Unstimmigkeiten beitragen. Die Proben des Kollektivs stammen aus einer Studie der „Arbeitsgemeinschaft Urologischer Onkologie“ (AUO), die u.a. für die Untersuchung unterschiedlicher adjuvanter Chemotherapieansätze (CM gegen MVEC) auf das Überleben von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom verwendet wurden. Dafür wurden Proben verschiedener deutscher urologischer Kliniken gesammelt, die u.a. folgende Kriterien erfüllen mussten: histologisch bestätigtes Tumorstadium T3a-4a und/oder positiver Lymphknotenstatus [172]. Daraus ergibt sich, dass die Proben einer zusätzlichen Selektion von Hochrisikopatienten unterlagen und Kollektiv 1 somit ausschließlich aus fortgeschrittenen Tumoren besteht, die die Blasenwand überschreiten bzw. benachbarte Organe betreffen. Lediglich 5 Patienten wiesen Stadium T2 auf, waren jedoch N-positiv. Dies könnte folglich den hohen Progressionsanteil von 42 % (8 von 19 Patienten) der Patienten mit pathologischem N0-Status erklären, der dazu beiträgt, dass die Kurven der beiden Gruppen so nah aneinander liegen und keinen signifikanten Unterschied zeigen. Auch die Ergebnisse von Stein *et al.* belegen in ihrer Studie mit 1054 muskelinvasiven Harnblasentumoren, dass ein signifikanter Progressionsunterschied zwischen organbeschränkten ($T\leq 3a$, N0) und extravesikalen ($T\geq 3b$, N0) Tumoren besteht [172]. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Analyse dieses Patientenkollektivs in Betracht gezogen werden muss, ist der Einfluss der adjuvanten Chemotherapie, deren Ziel u.a. die Bekämpfung von Mikrometastasen und die Steigerung der Überlebensraten ist. Somit entsteht durch den Einsatz der Chemotherapie für alle Patienten ein Einfluss auf die Progressionsdaten.

Die Kaplan-Meier-Kurven des Kollektivs 1 unter Betrachtung der Vorhersage „metastasiert“ oder „nicht-metastasiert“ anhand der Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD zeigen ebenso wie der pN-Status keinen Unterschied im Verlauf ($p=0,8$). Da für die Etablierung des Modells der pN-Status als Endpunkt gewählt wurde, ist es nicht verwunderlich, dass beide Kaplan-Meier-Analysen ähnliche Resultate ergaben. Deshalb ist es für zukünftige Analysen von großer Bedeutung, dass die Methylierung der Kandidatengene an gezielt ausgewählten Patientenproben mit entsprechenden Verlaufsdaten überprüft wird.

Neben dem progressionsfreien Überleben wurde auch das Gesamtüberleben der Patienten in Bezug auf den pN-Status und die Modellvorhersage analysiert. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Kurvenverlauf beider Parameter beobachtet werden. Dieses Resultat ist nicht verwunderlich, da die Ereignisse Progression und Tod stark miteinander korrelieren. Von 22 Fällen mit Progress konnte bei 16 Patienten ebenfalls ein Todesereignis vermerkt werden, während bei Patienten ohne Progress lediglich 1 Todesfall auftrat. Folglich ist zu erwarten, dass der Kurvenverlauf und das Ereignis des Gesamtüberlebens ähnlich zum progressionsfreien Überleben ausfallen.

Wie bereits erwähnt erhielten alle Patienten der AUO-Studie und somit alle Patienten des Kollektivs 1 eine adjuvanten Chemotherapie. Beim Vergleich der beiden Patientenkollektive muss dieser Einfluss unbedingt beachtet werden, denn die exakten Daten bezüglich der Chemotherapie für Kollektiv 2 liegen nicht vor. Da jedoch bei positivem pN-Status die Indikation zur Chemotherapie besteht, kann davon ausgegangen werden, dass die pN+-Patienten nach Zustimmung eine Therapie erhielten, während für die pN0-Patienten keine Aussage getroffen werden kann. Somit entsteht zwischen den beiden Patientenkollektiven eine Verzerrung bezüglich der Progressionsdaten. Folglich muss beim Vergleich der Patientenkollektive die unterschiedliche Selektion und Chemotherapiebehandlung berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zum Kollektiv 1 zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied ($p<0,001$) im Progressionsverlauf der Patienten des Kollektivs 2. Das Ergebnis entspricht den Erwartungen und stimmt auch mit den Literaturdaten von Stein *et al.* überein.

Bei genauer Betrachtung der Zusammensetzung von Kollektiv 2 fällt auf, dass die Anzahl an N0-Patienten größer ist als N+-Patienten (21 gegen 13). Hingegen waren im Kollektiv 1 weniger N0- als N+-Patienten vertreten (19 gegen 32). Dieser Vergleich macht erneut den Unterschied der Kollektive bezüglich der Patientenselektion deutlich. Die Gewebeproben des Kollektivs 2 stammen aus der Tumordatenbank der Klinik für Urologie Jena. Die Auswahl von Gewebeproben für diese Arbeit erfolgte nur unter dem Kriterium Muskelinvasivität (T2-4). Es wurde keine weitere Selektion nach T-Stadium durchgeführt.

Bei 5 von 21 N0-Patienten (24 %) im Kollektiv 2 wurde ein Progress festgestellt. Im Gegensatz dazu hatten 11 von 13 N+-Patienten (85 %) einen Progress. Die geringe

Progressionsrate der N0-Patienten verdeutlicht, dass hier nicht ausschließlich Hochrisikopatienten betrachtet wurden. Demgegenüber steht eine hohe Progressionsrate bei pN+-Patienten. Aufgrund der fehlenden Daten kann keine Aussage bezüglich des Einsatzes einer Chemotherapie erfolgen. Es wäre möglich, dass diese Patienten nur schwach bzw. gar nicht auf eine Chemotherapie ansprachen, woraus das verschlechterte progressionsfreie Überleben gegenüber Kollektiv 1 resultieren könnte. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass pN+-Patienten ein deutlich geringeres progressionsfreies Überleben haben.

Genau wie der pN-Status korreliert auch die Vorhersage des Modells aus KISS1R, SEPT9 und CSAD mit dem progressionsfreien Überleben der Patient aus Kollektiv 2. Der Verlauf der Überlebenskurven bestätigt einen signifikanten Unterschied ($p=0,037$) zwischen den Patienten mit der Vorhersage „metastasiert“ und „nicht metastasiert“. Dieser Unterschied wird ebenfalls in den Ergebnissen des medianen progressionsfreien Überlebens deutlich, welches bei Patienten mit der Vorhersage „metastasiert“ bereits nach 7 Monaten erreicht wurde. Da der Progress bei weniger als 50 % der Patienten mit der Vorhersage „nicht-metastasiert“ eintrat, erreichte diese Gruppe das mediane progressionsfreie Überleben nicht. Unter Verwendung der Kaplan-Meier-Analyse konnte somit belegt werden, dass das entwickelte Vorhersagemodell aus KISS1R, SEPT9 und CSAD ebenso wie der pN-Status eine Korrelation zum progressionsfreien Überleben aufweist. Die Betrachtung beider Überlebensfunktionen verdeutlicht, dass mit Hilfe des Vorhersagemodells eine gleichwertige Aussage über das Progressionsrisiko der Patienten getroffen werden kann.

Die Auswertung der Gesamtüberlebens-Analyse ergab in Bezug auf den pN-Status ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p=0,005$). N0-Patienten weisen einen deutlichen Überlebensvorteil auf. Hingegen zeigte das Vorhersagemodell keine direkte Korrelation zum Gesamtüberleben ($p=0,357$). Hier ist jedoch anzumerken, dass bei Patienten mit der Vorhersage „nicht-metastasiert“ die Anzahl der Todesfälle ($n=7$) die Anzahl der Progressionsereignisse ($n=5$) übersteigt. Daten darüber, ob die Todesursache tumorbedingt war, liegen nicht vor. Bei der relativ geringen Probenanzahl haben die beiden Todesfälle einen starken Einfluss auf den Verlauf der Kaplan-Meier-Kurve und bewirken, dass die Kurve früher abfällt. Andererseits verläuft die Kurve der „metastasierten“ Gruppe flacher als beim progressionsfreien Überleben, da bei 4 von 8 Patienten mit Progress kein Todesereignis eintrat. Aus diesen Gründen wäre die Analyse weiterer Patientenproben mit entsprechenden Verlaufsdaten für eine genaue Aussage bezüglich des Gesamtüberlebens notwendig.

Zusammenfassend kann aus den Überlebenszeitanalysen geschlussfolgert werden, dass das Modell, bestehend aus dem Methylierungsstatus von KISS1R, SEPT9 und CSAD vergleichbare Ergebnisse zum pN-Status liefert. Für weitere Analysen sollten die Therapiebedingungen und Patientenselektion vereinheitlicht werden, um hier beschriebene Unstimmigkeiten zwischen den Patientenkollektiven zu vermeiden.

Der Vorteil des molekularen Modells gegenüber dem pN-Status besteht in der Verwendung von Grenzwerten, die eine exakte Bewertung des Metastasierungspotentials direkt am Primärtumor vornehmen lässt.

In weiteren Untersuchungen sollte unter Verwendung detaillierter Verlaufsdaten eine Korrelation der Methylierungsdaten in Bezug auf das Auftreten von Fernmetastasen überprüft werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus im Primärtumor und dem M-Status könnte die gezielte Therapieentscheidung für Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom erleichtern und zur Verbesserung der Überlebenszeiten beitragen.

4.4 Auswirkungen der DNA-Methylierung auf die Genexpression

4.4.1 Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression

Unter Verwendung von Expressionsanalysen sollte überprüft werden, ob durch erhöhte DNA-Methylierung die Regulation der potentiellen Prognosemarker beeinflusst wird und somit die Voraussetzung für eine mögliche funktionelle Rolle im Metastasierungsprozess erfüllt ist.

Zunächst erfolgte ein direkter Vergleich zwischen Methylierung und Expression in den vier Harnblasenkarzinom-Zelllinien. Für diesen Zweck wurden die Zellen mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt.

Bei der Betrachtung des Methylierungsniveaus von KISS1R fällt zunächst auf, dass entsprechend den Erwartungen in allen vier Zelllinien eine Verminderung der Methylierung nach 5Aza-dC-Behandlung nachgewiesen werden konnte, die jedoch zwischen den Zelllinien unterschiedlich stark ausfällt. Am deutlichsten ist diese Verminderung in den T24-Zellen erkennbar (56 %). Hingegen ist der Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Zellen in den Linien RT112 und 253J B-V gering ausgeprägt (13 bzw. 15 %).

Obwohl die Behandlung aller Zelllinien unter standardisierten Bedingungen erfolgte, zeigen sich diese Unterschiede im Ausmaß der Demethylierung. Die Inkubation mit 5µM 5Aza-dC erfolgte für jede Zelllinie über zwei Verdopplungszeiten, um einen ausreichenden Zeitraum für die Demethylierung zu gewähren. Bei dem Mechanismus, der diesem Experiment zu Grunde liegt, handelt es sich um keine aktive Demethylierung durch Abspaltung der Methylgruppe, sondern um einen passiven Prozess durch Inhibierung der DNA-Methyltransferase [173]. Die Demethylierung erfolgt demnach während der S-Phase des Zellzyklus. Für eine erfolgreiche Demethylierung ist es daher wichtig, dass der Zellzyklus vollständig durchlaufen wird, damit ein entsprechender Effekt von 5Aza-dC messbar ist. Je nach Ursprungsgewebe der Zelllinien weisen diese unterschiedliche Verdopplungszeiten auf

(Tabelle 1). Dementsprechend erfolgte die Inkubation mit 5Aza-dC über unterschiedliche Zeiträume.

Da trotz dieser einheitlichen Bedingungen (Konzentration und Behandlungszeit) Unterschiede in der Demethylierung des KISS1R-Gens auftreten, kann von einer unterschiedlichen Ansprechrate der Zelllinien auf 5Aza-dC ausgegangen werden. Es ist denkbar, dass die verwendete Konzentration von 5 μ M in den RT112 und 253J B-V Zellen nicht ausreichend hoch war, um den Effekt der Demethylierung nachzuweisen. Da 5Aza-dC eine toxische Wirkung auf Säugerzellen besitzt, wurde hier mit einer laut Literaturangaben üblichen Konzentration von 5 μ M gearbeitet [174, 175]. Um jedoch eine 5Aza-dC-Konzentration zu ermitteln, die ein exaktes Gleichgewicht zwischen möglichst geringer Toxizität und hohem demethylierenden Effekt besitzt, wäre die Bestimmung der IC₅₀-Konzentration für jede Zelllinie notwendig. Diese beschreibt die mittlere inhibitorische Konzentration einer Substanz. Da der demethylierende Effekt auf KISS1R jedoch in den Zelllinien RT4 und T24 eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde auf die Ermittlung einer geeigneten Konzentration für die anderen Zelllinien verzichtet.

Andere Arbeiten, in denen der Einfluss von 5Aza-dC auf DNA-Ebene in unterschiedlichen Zelllinien analysiert wurde, zeigen ebenfalls, dass die Wirkung von 5Aza-dC auf Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs nicht einheitlich ist. Untersuchungen der Promotormethylierung von OPCML in Harnblasenkarzinom-Zelllinien ergaben bei einer Konzentration von 5 μ M eine verminderte Methylierung in T24- und 5637-Zellen, während dieselbe Konzentration keinen Einfluss auf die Methylierung in J82-Zellen zeigte [176]. Auch in Gliom-Zelllinien konnte bei gleicher 5Aza-dC-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten SHG44-Zellen beobachtet werden. Hingegen wurde bei A172-Zellen nur eine marginale Verminderung von ca. 5 % erzielt [177]. Diese Publikationen belegen die Annahme, dass unterschiedliche Zelllinien keine einheitliche Ansprechrate auf die Behandlung mit 5Aza-dC besitzen.

Parallel zur Bestimmung der Demethylierung erfolgte die Untersuchung einer potentiellen Reaktivierung der Genexpression nach 5Aza-dC-Behandlung. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass die mRNA-Expression von KISS1R durch 5Aza-dC in allen Zelllinien ansteigt. Dieses Resultat entspricht ebenfalls der Erwartung, dass die Unterdrückung der Expression durch die passive Demethylierung aufgehoben wird. Besonders auffällig ist die Korrelation zwischen Methylierung und Expression in den T24-Zellen, in denen auch der stärkste Einfluss auf Methylierungsebene belegt wurde. Hier zeigt sich eine Reexpression um den Faktor 38.000. Zur Dimension dieses Wertes muss angemerkt werden, dass in T24 Mock-Zellen keine Expression von KISS1R nachgewiesen werden konnte, da über alle PCR-Zyklen kein Amplifikationssignal detektierbar war. Deshalb wurde für die Berechnung des Expressionsniveaus der letzte C_T-Wert der qPCR (n=43)

gewählt. Durch die 5Aza-dC-Behandlung erfolgte die Amplifikation von KISS1R bereits bei Zyklus 27. Aufgrund der enorm großen Differenz dieser beiden Werte ergibt sich dieser hohe Expressionsfaktor, der die Relation zu nicht exprimierten KISS1R in T24-Mock-Zellen ausdrückt. An diesem Ergebnis ist gut erkennbar, dass die Verwendung von 5Aza-dC geeignet ist, um die Korrelation zwischen erhöhter Methylierung und verminderter mRNA-Expression zu belegen. Außerdem konnte hier bestätigt werden, dass die erhöhte Methylierung von KISS1R mit einem Expressionsverlust in Harnblasenkarzinomzellen korreliert, der durch Inhibierung der DNMT rückgängig gemacht werden kann.

Bei Analysen der Genexpression nach 5Aza-dC-Behandlung muss jedoch beachtet werden, dass keine zielgerichtete Demethylierung von spezifischen Genen erfolgt, sondern dass die Inhibierung der DNMT einen Einfluss auf das gesamte Genom der Zellen hat. Bei alleiniger Betrachtung von Expressionsdaten können keine Rückschlüsse auf einen direkten Zusammenhang zur Methylierung des entsprechenden Gens getroffen werden. Die Reexpression kann ebenso durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TFs) bedingt sein, welche wiederum auf die Wirkung von 5Aza-dC zurückgeführt werden kann. Poplineau *et al.* haben diesen Einfluss von 5Aza-dC in ihrer Arbeit demonstriert. Zunächst konnten sie nach 5Aza-dC-Behandlung von HT1080-Fibrosarkomzellen einen 44-fachen Anstieg der Expression von MMP-1 nachweisen. Eine *in silico* Promotoranalyse ergab, dass innerhalb der Promotorregion von MMP-1 keine CpG-Insel vorhanden ist. 5Aza-dC hatte keinen Einfluss auf das Methylierungsprofil der einzelnen CpG-Stellen im Promotor. Expressionsanalysen nach 5Aza-dC-Behandlung ergaben für zwei TFs (Sp1 und Sp3) bereits nach 24 h einen nachweisbaren Anstieg auf Proteinebene. Des Weiteren belegten die Autoren, dass durch 5Aza-dC eine Rekrutierung von Sp1 sowie der Polymerase II zum MMP-1-Promotor erfolgte, die die Aktivierung der MMP-1-Transkription einleitet [178]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie wichtig es ist, den Einfluss von 5Aza-dC auf die DNA-Methylierung von Kandidatengenen zu analysieren. Nur die Untersuchung beider Ebenen ermöglicht eine exakte Bewertung des Zusammenhangs zwischen Methylierungs- und Expressionsniveau. Da in der vorliegenden Arbeit diese beiden Ebenen betrachtet wurden, kann glaubhaft bestätigt werden, dass die gemessenen Expressionsveränderungen durch DNA-Methylierung bedingt sind.

Ein weiterer Punkt, der bei den Expressionsdaten beachtet werden muss, ist die Tatsache, dass 5Aza-dC auch Auswirkungen auf die Chromatinstruktur hat, die ebenfalls Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität genomischer Regionen besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass 5Aza-dC beispielsweise eine Histonhyperacetylierung von zentromerischen Heterochromatin induziert, welches in unbehandelten Zellen methyliert und hypoacetyliert ist [179]. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Untersuchungen bezüglich möglicher Histonmodifikationen durchgeführt. Der Einfluss von 5Aza-dC auf die Aktivierung von TFs sowie auf die

Chromatinkondensation könnte jedoch erklären, warum beispielsweise RT112- und 253J B-V-Zellen, bei denen die Demethylierung nur in geringem Maß messbar war, eine starke Reexpression von KISS1R (109 bzw. 193 fach) aufweisen. Durch die mögliche Auflockerung von Heterochromatin können Transkriptionsfaktoren besser an die DNA binden und die Transkriptionsinitiation einleiten.

Die Ergebnisse bestätigen, dass eine erhöhte DNA-Methylierung mit einer verminderten Expression von KISS1R korreliert. Somit konnte der Beweis erfolgen, dass die DNA-Methylierung die KISS1R-Genexpression beeinflusst.

Bei der Suche nach geeigneten Primersequenzen für die Expressionsmessung von SEPT9 fiel auf, dass dieses Gen für insgesamt 7 Transkriptvarianten kodiert, da innerhalb der SEPT9-Sequenz mehrere Transkriptionsstartstellen (TSS) liegen [180]. Weitere Literaturrecherchen ergaben, dass beispielsweise SEPT9v1 und SEPT9v4* in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert sind [181, 182]. Für SEPT9v4 wurde beschrieben, dass die Überexpression zu einer Beeinträchtigung der Zellpolarität führt und somit die Zellmotilität erhöht [183]. Die Existenz verschiedener SEPT9-Isoformen könnte die Ursache der bereits in Punkt 4.3.2.2 beschriebenen unterschiedlichen Funktionen von SEPT9 zwischen den Tumorentitäten sein. Die Suche nach der Funktion weiterer SEPT9-Isoformen ergab, dass für SEPT9v3 eine Regulation durch Hypermethylierung in Mammakarzinom-Zelllinien beschrieben wird. Connolly *et al.* entdeckten eine CpG-Insel, die „upstream“ des SEPT9v3-Startkodons lokalisiert ist und stellten die Hypothese auf, dass diese Region einen alternativen Promotor für SEPT9v3 darstellt. Sie analysierten die DNA-Methylierung der Region in verschiedenen Zelllinien und stellten fest, dass sich die verwendeten Linien in zwei Gruppen aufteilen – eine hypomethylierte Gruppe (18 % mittlere Methylierung) und eine hypermethylierte Gruppe (76 % mittlere Methylierung). Es folgte ein Vergleich der mRNA-Expression von SEPT9v3 und SEPT9v1. Dieser ergab, dass SEPT9v1 in allen Zelllinien etwa konstant exprimiert wird, während ein signifikanter Unterschied im mRNA-Expressionslevel von SEPT9v3 gemessen wurde, der mit den Methylierungsdaten korrelierte. Eine Bestimmung der DNA-Methylierung im Patientengewebe erbrachte ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe [184].

Basierend auf den Ergebnissen dieser Publikation erfolgte zunächst ein Vergleich der dort beschriebenen Lokalisation der CpG-Insel mit den Daten der hier durchgeführten Microarrayanalyse. Dieser Vergleich ergab, dass es sich bei der hier analysierten CpG-Insel (=CpG 80; hg18 UCSC Genome Browser) um dieselbe Region handelt, die auch von Connolly *et al.* beschrieben wurde. Zur Verdeutlichung der Position der CpG-Inseln in Bezug auf den Transkriptionsstart der Transkriptvarianten ist in Abbildung 38 eine schematische Übersicht des Aufbaus verschiedener SEPT9-Transkriptionsvarianten dargestellt.

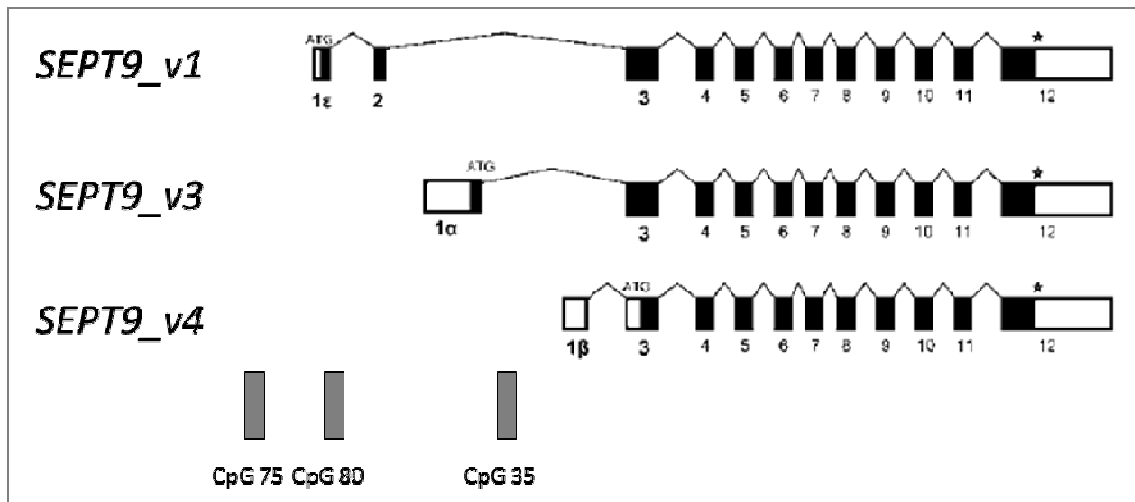


Abbildung 38 Schematischer Aufbau der SEPT9-Transkriptvarianten v1, v3 und v4

Alle SEPT9-Transkriptvarianten gleichen sich strukturell von Exon 4-12. Der Unterschied in der Entstehung verschiedener Isoformen besteht in der Position des Transkriptionsstarts sowie in der Variabilität in Exon 1-3. Die schwarzen Kästen stellen die Exons dar. ATG kennzeichnet die Position der Transkriptionsstartstelle. Mit Stern (*) markierte Stellen zeigen den Transkriptionsstopp. Die unteren grauen Kästen veranschaulichen die Position verschiedener CpG-Inseln (modifiziert nach Scott *et al.* [181]).

Um zu überprüfen, ob die Expressionsunterschiede der SEPT9-Isoformen auch in Harnblasenkarzinomzelllinien nachweisbar sind, wurde die Expression der Isoformen SEPT9v1, SEPT9v3 und SEPT9v4 in T24-Zellen ermittelt. Diese Isoformen wurden aufgrund ihrer Funktion in Korrelation zur Tumorgenese in den Literaturangaben ausgewählt.

Zunächst fällt bei der Betrachtung der Ergebnisse auf, dass unbehandelte T24-Zellen Unterschiede in der Expression der drei Varianten aufweisen. Dies verdeutlicht, dass im Harnblasenkarzinom ebenfalls ein Expressionsunterschied zwischen den unterschiedlichen SEPT9-Varianten existiert.

Um einen möglichen Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression der Isoformen zu bestimmen, erfolgte eine Behandlung von T24-Zellen mit 5Aza-dC. Aus der unveränderten Expression von SEPT9v1 nach DNMT-Inhibierung lässt sich ableiten, dass die CpG-Insel, die *upstream* vom TTS von SEPT9v1 lokalisiert ist (=CpG 75), im Harnblasenkarzinom nicht methyliert vorliegt. Daraus könnte auch die vergleichsweise hohe Expression resultieren.

Für SEPT9v3 konnte nach 5Aza-dC-Behandlung eine ca. 30fach erhöhte mRNA-Expression gemessen werden. In den Validierungsversuchen am Primärgewebe erfolgte bereits die Bestimmung des Methylierungsniveaus von CpG 80, da diese CpG-Insel zu den Kandidaten der Microarrayanalyse zählte. In Kombination mit den Expressionsanalysen konnte nun zusätzlich belegt werden, dass die Methylierung von CpG 80 die Expression von SEPT9v3 reguliert.

Der Anstieg der mRNA-Expression von SEPT9v4 belegt, dass die im *upstream*-Bereich lokalisierte CpG-Insel 35 ebenfalls methyliert vorliegt und die Regulation von SEPT9v4 beeinflusst. Es wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen der Methylierung dieser CpG-Insel durchgeführt, da diese im Microarray keinen Unterschied zeigte und für die Fragestellung dieser Arbeit nicht von Interesse war. Die Expressionsanalyse von SEPT9v4 diente lediglich dem Vergleich einer weiteren SEPT9-Isoform im Harnblasenkarzinom.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen verschiedener SEPT9-Isoformen in Kombination mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass CpGI 80 an der Regulation von SEPT9v3 beteiligt ist. Diese Erkenntnis ist von großer Wichtigkeit für anschließende Expressions- und Funktionsanalysen. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Korrelation zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression nach 5Aza-dC-Behandlung in verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien nur für SEPT9v3.

Dabei ergab sich, dass eine Demethylierung der Promotorregion von SEPT9v3 in allen vier HBK-Zelllinien detektiert werden konnte. Diese war wie bei KISS1R zwischen den Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Auf Expressionsebene fällt die vergleichsweise hohe Expression in 253J B-V-Zellen auf (ca. 30fach erhöht). Dieser Unterschied zu den anderen Zelllinien ist jedoch nicht durch die DNA-Methylierung erklärbar, da das Methylierungsniveau relativ konstant ist. Eine andere Regulationsmöglichkeit, die den Expressionsunterschied erklären könnte, ist die Modifikation von Histonproteinen, die die Chromatinstruktur beeinflusst und zur Aktivierung der Transkription beiträgt [185]. In 253J B-V-Zellen konnte durch 5Aza-dC lediglich ein Anstieg um das 1,3-fache gemessen werden. Dies belegt die Annahme, dass SEPT9v3 in diesen Zellen fortgeschrittenen Ursprungs nicht durch DNA-Methylierung reguliert wird. Da die Korrelation zwischen Methylierung und Expression anhand der anderen drei Zelllinien jedoch deutlich belegt werden konnte, wurde auf aufwendige Analysen der SEPT9v3-Regulation in 253J B-V Zellen verzichtet.

Die Behandlung mit 5Aza-dC ergab für CSAD in allen Zelllinien eine Reduktion der DNA-Methylierung. In RT112-Zellen, mit geringer CSAD-Methylierung (14 %), wurde nach 5Aza-dC-Behandlung keine Methylierung mehr detektiert. Der stärkste Einfluss konnte auch hier in T24 gemessen werden.

Auf Expressionsebene fällt auf, dass kaum Expressionsunterschiede zwischen den unbehandelten Zelllinien nachweisbar sind, obwohl die DNA-Methylierung deutliche Schwankungen aufweist. Die einzige Korrelation besteht in RT112-Zellen, bei denen die geringste Methylierung mit einer vergleichsweise erhöhten Expression assoziiert ist. Die Reaktivierung nach 5Aza-dC-Behandlung fällt im Vergleich zu den anderen Kandidatengen deutlich geringer aus. Während bei KISS1R und SEPT9 eine

Reexpression um Faktoren zwischen 17 und 144 (bzw. 38.000 bei KISS1R in T24) ermittelt wurde, liegen die Werte für CSAD im Bereich zwischen 0,9 und 9,9.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Auswirkung von 5Aza-dC auf die Expression von CSAD, obwohl die Demethylierung deutlich detektierbar war, besteht darin, dass Transkriptionsfaktoren, die die CSAD-Transkription initiieren, keine Sensitivität gegenüber der DNA-Methylierung besitzen und somit trotz hypermethylierter Promotorregion an die DNA binden können und die Expression des Gens vermitteln [61]. Dies würde auch erklären, warum beispielsweise zwischen RT4, T24 und 253J B-V kein CSAD-Expressionsunterschied besteht, obwohl die Promotorregion in T24 und 253J B-V nahezu doppelt so stark methyliert ist. Der Expressionsanstieg in RT4 und 253J B-V um den Faktor 5 bis 10 kann durch die Wirkung von 5Aza-dC auf die Chromatinstruktur bedingt sein, die wiederum zwischen den Zelllinien variieren kann [179].

Somit kann geschlussfolgert werden, dass eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression von CSAD in dieser Arbeit nur bedingt nachgewiesen werden konnte. Die Behandlung mit 5Aza-dC bewirkte einen nur schwachen reaktivierenden Effekt auf die Expression. Nur in RT112-Zellen mit schwacher Methylierung und marginal erhöhter CSAD-Expression konnte ein geringer Zusammenhang bestätigt werden. Hier müssten weitere HBK-Zelllinien untersucht werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

Die Transkriptionsebene stellte den nächsten Schritt dar, um den Einfluss der Methylierung der Kandidatengene im Primärgewebe von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom zu untersuchen.

Einzelsträngige mRNA-Moleküle sind aufgrund der ubiquitären Verbreitung von Nukleasen einem erhöhten Degradierungsrisiko ausgesetzt [186]. Deshalb ist es von großer Bedeutung, die RNA-Integrität einer Probe zu bestimmen, um sicherzustellen, dass die isolierte RNA aus den Gewebezellen zum Zeitpunkt der Untersuchung noch intakt ist.

Nach Bestimmung des RIN-Faktors reduzierte sich die Anzahl der Proben für die mRNA-Expressionsanalysen enorm, da 14 von 25 Proben einen RIN-Faktor unter 5 aufwiesen. Der niedrige RIN-Faktor deutet auf eine schlechte RNA-Qualität der Proben mit hoher Degradationsrate hin. Eine starke Degradierung der RNA könnte in einem schwachen Signal des PCR-Produktes resultieren und somit die Ergebnisse verfälschen.

Die Ursache für die starke Degradierung der RNA dieser Proben könnte in der Probenentnahme, Probenlagerung oder der RNA-Extraktion liegen [186]. Vor allem der Zeitraum zwischen Probenentnahme im OP bis zum Einfrieren des Gewebestücks hat einen großen Einfluss. Dieser Zeitraum ist bei den hier analysierten Proben unbekannt und könnte eine Ursache für die Degradierung darstellen. Ebenso unbekannt ist, wie oft die Gewebeproben zuvor bereits geschnitten wurden und einer Unterbrechung der Lagerung bei

-196°C sowie einem möglichen Einfluss von Nukleasen ausgesetzt waren. Da die Isolation der RNA einheitlich erfolgte, kann dieser Faktor als Ursache ausgeschlossen werden. Entsprechend den Empfehlungen von Fleige *et al.* [96] wurden nur Proben mit einem RIN größer 5 verwendet (siehe Anhang 11). Somit standen 11 Proben (5 pN0, 6 pN+) für die mRNA-Expressionsanalysen zur Verfügung.

Neben einem signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen konnte für KISS1R auf Expressionsebene auch eine Korrelation zur DNA-Methylierung bestätigt werden. Die Gruppe der metastasierten Patienten zeigte eine niedrigere KISS1R-Expression, die aus der erhöhten Promotormethylierung resultiert. Hingegen war die Expression in der nicht-metastasierten Patientengruppe höher, da eine geringe KISS1R-Methylierung vorlag. Mit diesem Ergebnis konnte zusätzlich zur Korrelation zwischen Methylierung und Expression bestätigt werden, dass die Auswirkungen der Methylierung bereits im Primärtumorgewebe von Harnblasenkarzinompatienten messbar sind und ebenfalls in Verbindung mit dem Metastasierungsrisiko stehen.

Für SEPT9 wurde die Expression der bereits in den Zelllinien analysierten Transkriptvarianten SEPT9v3 untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zur Methylierung auch im Gewebe zu belegen. Es war kein signifikanter Expressionsunterschied detektierbar. Bei Betrachtung der Verteilung der Expressionswerte im Box-Whisker-Plot fällt jedoch auf, dass Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine tendenziell niedrigere SEPT9v3-Expression aufweisen. Dies wird auch beim Vergleich der Medianwerte deutlich. Der Median der metastasierten Proben liegt mit -0,12 deutlich unter dem Wert der nicht-metastasierten Proben von 0,24. Da bereits eine signifikant höhere Methylierung in den metastasierten Proben nachgewiesen wurde, kann gefolgert werden, dass die reduzierte Expression aus der Promotorhypermethylierung von SEPT9v3 resultiert. Die Tatsache, dass der Unterschied hier nicht signifikant ist, könnte unter anderem an der geringen Probenanzahl aufgrund des niedrigen RIN-Faktors liegen. Andererseits ist nicht zu erwarten, dass die Dimension der Methylierung einen direkten Zusammenhang zum Ausmaß des Expressionsniveaus aufweist, da an der Regulation der Transkription auch andere Mechanismen, wie beispielsweise Histonmodifikationen oder deregulierte Transkriptionsfaktoren, beteiligt sein können [187, 188].

Die Daten der CSAD-Expressionsanalyse im Gewebe ergeben keinen Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen. Anhand der Werteverteilung im Box-Whisker-Plot ist auch keine Tendenz eines möglichen Expressionsunterschiedes ersichtlich. Die Mediane der Gruppen liegen sehr dicht beieinander (-1,40 und -1,46). Daraus ergibt sich, wie bereits zuvor in den Harnblasenkarzinomzelllinien, dass keine Korrelation zur DNA-Methylierung von CSAD bestätigt werden kann. Dies lässt erneut die Annahme zu, dass die Methylierung dieser Promotorregion keinen Einfluss auf die Expression von CSAD besitzt, da

die Transkription möglicherweise durch methylierungsinsensitive Transkriptionsfaktoren initiiert wird. Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen der Methylierung von CSAD nicht bis zur Expressionsebene nachweisbar sind. Eine größere Probenanzahl könnte zur eindeutigen Aufklärung dieser Problematik beitragen. Dennoch nimmt CSAD eine zentrale Bedeutung in der Bewertung des Metastasierungsrisikos muskelinvasiver Harnblasentumore ein, da die Methylierung von CSAD im Vorhersagemodell zur Erhöhung der Aussagekraft beiträgt. Dies verdeutlicht außerdem den Vorteil von DNA-Methylierungsanalysen für die Entdeckung neuer Biomarker gegenüber Genexpressionsanalysen. Veränderungen in der DNA-Methylierung unterliegen keinen zusätzlichen Regulationsmechanismen und stellen stabile Signale dar.

4.4.2 Auswirkungen auf die Proteinexpression

Um zu untersuchen, ob die Regulation der Kandidatengene durch DNA-Methylierung Auswirkung auf die Proteinebene hat, wurden immunhistochemische Färbungen von TMAs durchgeführt. Dafür standen zwei unabhängige Kollektive zur Verfügung. Es erfolgte eine Betrachtung der Proteinexpression von KISS1R und dem zugehörigen Liganden KISS1. Dieser direkte Vergleich des Expressionsniveaus, der bisher noch nicht für das Harnblasenkarzinom beschrieben wurde, könnte zusätzliche Rückschlüsse auf das Zusammenspiel zwischen Rezeptor und Ligand im Tumorentstehungs- bzw. Metastasierungsprozess des Harnblasenkarzinoms ermöglichen.

Im Ergebnis der immunhistochemischen Analyse von insgesamt 291 Patienten zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von KISS1R im Primärtumorgewebe in Korrelation zum Lymphknotenstatus ($p < 0,001$). Die Mediane der Farbindices zeigen eine deutliche Abstufung zwischen den Gruppen (200 in N0-Patienten gegenüber 100 in N+-Patienten). Dieses Resultat belegt, dass die signifikant veränderte Methylierung, neben der mRNA-Ebene auch Auswirkungen auf die Proteinexpression aufweist.

Die Proteinexpressionsanalyse des zugehörigen Liganden KISS-1 ergab hingegen keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Median der Farbindices beider Gruppen liegt bei 100). Anhand der Expressionsergebnisse beider Proteine kann man schlussfolgern, dass die epigenetische Regulation des Rezeptors und nicht des Liganden für die metastasensuppressive Wirkung des KISS1-KISS1R-Systems im Harnblasenkarzinom verantwortlich ist.

Es existiert eine Veröffentlichung, deren Ergebnisse aus immunhistochemischen Färbungen von KISS1R und KISS-1 in Endometriumkarzinom-Proben mit den hier erhobenen Resultaten vergleichbar sind. Kang *et al.* zeigen, dass ein signifikanter Unterschied in der KISS1R-Expression besteht, der mit der Überlebensrate von Patientinnen mit Endometriumkarzinom in Zusammenhang steht und mit einer Promotorhypermethylierung

von KISS1R assoziiert ist. Für KISS-1 konnte ebenso kein Unterschied nachgewiesen werden [150].

Andererseits ergaben Untersuchungen im Harnblasenkarzinom von Sanchez-Carbayo *et al.* und Cebrian *et al.*, dass eine verminderte Expression des KISS1-Proteins in Harnblasenkarzinom-Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [149, 189]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch keine Auswertung bezüglich des Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Zystektomie und es wurden alle T-Kategorien (Ta-T4a) einbezogen.

Im Urothelkarzinom des oberen Harntraktes sind ähnliche Ergebnisse beobachtet worden. Eine verminderte KISS1-Expression ist hier mit einem erhöhten Differenzierungsgrad, einem erhöhten T-Stadium sowie positiver LVI assoziiert und konnte des Weiteren als unabhängiger Prädiktor für die Metastasierung und das Gesamtüberleben identifiziert werden. Im Gegensatz zeigte diese Studie für KISS1R keine Korrelation zu den klinischen Parametern [190]. Obwohl Urothelkarzinome des oberen und unteren Harntraktes durch eine nahezu einheitliche Morphologie charakterisiert sind, konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass spezifische Unterschiede in der Gen- sowie Proteinexpression auftreten, die diese Urothelkarzinome mit unterschiedlicher Lokalisation voneinander unterscheiden [191, 192]. Catto *et al.* belegen genetische sowie epigenetische Unterschiede auf DNA-Methylierungsebene zwischen Urothelkarzinomen des oberen und unteren Harntraktes [193]. Diese molekularen Unterschiede zwischen dem Harnblasenkarzinom und dem Urothelkarzinom des oberen Harntraktes könnte die Diskrepanz zwischen den hier erhobenen Ergebnissen für KISS1R und KISS-1 zu den Literaturangaben erklären. Die Unstimmigkeiten, die bezüglich der Expression von KISS1R und KISS-1 zwischen den Publikationen unterschiedlicher Tumorentitäten auftreten, verdeutlichen, dass derzeit noch keine eindeutige Aussage über das Zusammenspiel dieses Rezeptor-Liganden Systems im Primärtumorgewebe getroffen werden kann.

Für Septin 9 existieren nur kommerziell erhältliche Antikörper, die keine ausreichende Spezifität gegenüber den unterschiedlichen Isoformen aufweisen. Eine Analyse aller Isoformen scheint im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit jedoch nicht sinnvoll, da hier sowie in diversen Publikationen gezeigt wurde, dass die Isoformen unterschiedlich reguliert und exprimiert vorkommen. Deshalb konnte hier keine Färbung zur Bestimmung der Korrelation zwischen Methylierung und SEPT9v3-Proteinexpression erfolgen.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Methylierung des CSAD-Promotors und der mRNA-Expression detektierbar ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst auf TMA-Färbungen für CSAD verzichtet.

Zusammenfassend können anhand der Ergebnisse der Expressionsanalysen der Kandidatengene folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden:

Für das Kandidatengen KISS1R existiert ein direkter Zusammenhang zwischen Promotorhypermethylierung und Expressionsverlust auf mRNA-Ebene, der durch die Inhibierung der DNMT in Zelllinien umgekehrt werden kann. Die Korrelation zur Methylierung ist über die mRNA-Ebene bis hin zur Proteinexpression auch im Primärtumorgewebe nachweisbar und ist ebenfalls signifikant mit dem Lymphknotenstatus der Patienten assoziiert. Der KISS1R-Rezeptor, der das Signal seines Liganden KISS-1 ins Zellinnere weiterleitet, unterliegt dem epigenetischen Regulationsmechanismus durch DNA-Methylierung und scheint somit bei der metastasensuppressiven Wirkung des KISS1-KISS1R-Systems die zentrale Position einzunehmen. Es lässt sich ebenso eine funktionelle Rolle von KISS1R im Metastasierungsprozess ableiten. Die Detektion von Unterschieden im Methylierungsmuster macht KISS1R zu einem idealen Prognosemarker für die Bewertung des Metastasierungsrisikos muskelinvasiver Harnblasentumore.

Die Untersuchung der Expression verschiedener Transkriptvarianten des Kandidatengens SEPT9 ergab, dass im Harnblasenkarzinom eine unterschiedliche Regulation dieser Isoformen erfolgt. SEPT9v3 wurde als diejenige Transkriptvariante identifiziert, die einer Regulation durch DNA-Methylierung im Metastasierungsprozess muskelinvasiver Harnblasentumore unterliegt. Die Korrelation zwischen Methylierung und Expression konnte sowohl in Zelllinien als auch im Gewebe auf mRNA-Ebene tendenziell bestätigt werden. Anhand mehrerer Proben mit guter RNA-Integrität sollte eine Validierung dieser Ergebnisse erfolgen. Aufgrund der mangelnden Existenz spezifischer Antikörper für SEPT9v3 erfolgten keine Proteinexpressionsanalyse. Es lässt sich jedoch schlussfolgern, dass die Regulation von SEPT9v3 ebenfalls einen funktionellen Einfluss auf das Metastasierungspotential von muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen besitzt.

Eine Korrelation von Methylierung und Expression von CSAD konnte nur in einer von vier Zelllinien tendenziell bestätigt werden. Im Gewebe besteht kein signifikanter Unterschied in Korrelation zum Lymphknotenstatus auf Expressionsebene. Deshalb liegt hier der Schluss nahe, dass der signifikante Methylierungsunterschied im Gewebe nur einen schwachen Einfluss auf das Expressionsniveau von CSAD hat und dass die Transkriptionsmaschinerie nicht durch die erhöhte Promotormethylierung inhibiert wird. Daraus kann man ableiten, dass CSAD keine funktionelle Rolle im Metastasierungsprozess einnimmt.

4.5 Funktioneller Einfluss der Kandidatengene auf metastasierungsassoziierte Prozesse

Die bisher diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die methylierungsbedingte Regulation einen Einfluss auf das Expressionsniveau der Kandidatengene KISS1R und

SEPT9v3 aufweist, die mit dem Metastasierungsrisiko der Patienten korreliert. Deshalb liegt es nah, die Funktion dieser beiden Kandidatengene im Metastasierungsprozess zu analysieren, um zu überprüfen, ob durch die epigenetische Regulation ein direkter Einfluss auf diesen Prozess ausgeübt wird. Da kein Expressionsunterschied von CSAD in Korrelation zum Metastasierungspotential des Harnblasenkarzinoms nachgewiesen werden konnte, scheint es nicht sinnvoll, die Funktion von CSAD im Metastasierungsprozess zu analysieren. Für die Analyse der Funktion der Kandidaten existieren verschiedene Ansätze, um eine gezielte Manipulation der Expression von Zielgenen zu induzieren und Rückschlüsse auf deren Funktion zu ermöglichen. Zum einen kann eine gezielte Überexpression mittels cDNA-Vektoren erfolgen. Die eingeschleuste cDNA kann im Zytoplasma in ein funktionsfähiges Protein umgeschrieben werden und somit in den Zellen die physiologische Funktion verstärken [194]. Andererseits kann unter Verwendung spezifischer siRNA-Moleküle ein gezielter Abbau von mRNAs in der Zelle eingeleitet werden. Dadurch wird die Translation in Proteine unterbunden, so dass die entsprechende Funktion eingeschränkt bzw. ausgeschaltet wird [195]. Ein direkter Vergleich zwischen normalen und transfizierten Zellen bezüglich Proliferation, Migration und Invasion ermöglicht anschließend Rückschlüsse auf die Funktion des Kandidatengens im Metastasierungsprozess.

Die Harnblasenkarzinomzelllinien, die in dieser Arbeit hinsichtlich Methylierungs- und Expressionsniveau bereits charakterisiert wurden, zeigen ein insgesamt schwaches Expressionsprofil von KISS1R. Deshalb erfolgte hier eine Überexpression des Zielgens. Dafür wurde die Zelllinie T24 ausgewählt, da diese keine Expression von KISS1R aufweist und folglich durch die Überexpression der stärkste funktionelle Effekt bezüglich des Zellverhaltens erwartet wurde. Nachdem die KISS1R-mRNA-Expression in den transfizierten Zellen erfolgreich bestätigt wurde, konnten diese Zellen für die Funktionsanalysen verwendet werden. Diese ergaben für KISS1R eine marginale Reduktion der Zellproliferation und -invasion um 5 % im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen. Die Migrationsrate der Zellen wurde durch die Überexpression von KISS1R um 25 % reduziert. Die Verteilung der gemessenen Werte aus drei unabhängigen Experimenten ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1$). Dennoch zeigt dieses Ergebnis, dass das gezielte Einbringen des KISS1R-cDNA-Vektors einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Harnblasenkarzinomzellen besitzt.

Es existieren vergleichbare Arbeiten, die zeigen, dass die Expression von KISS1R funktionelle Auswirkungen auf die Migrationsrate von Tumorzellen besitzt. In einem ähnlichen Versuchsansatz konnte eine stabile Überexpression von KISS1R in Schilddrüsenkarzinomzellen erzielt werden, die eine signifikante Reduktion der Migration bewirkte [196]. Im Mammakarzinom ist belegt, dass die Behandlung von Zellen mit erhöhter KISS1R-Expression mit dem Liganden KISS-1 zur Inhibierung der Zellmigration führt [197].

Eine weitere Arbeitsgruppe wählte den umgekehrten Weg und induzierte einen siRNA-bedingten Abbau der KISS1R-mRNA in Endometriumkarzinomzellen und zeigt eine signifikante Erhöhung der Zellmotilität im Wundheilungsassay. Dieser Effekt ist mit und ohne exogen zugeführtem KISS-1 zu beobachten und beeinflusst ebenso die Invasionsrate der Zellen [150]. Dies deutet erneut auf die zentrale Bedeutung von KISS1R für die Weiterleitung des KISS1-Signals hin, um die suppressive Wirkung auf das Metastasierungspotential der Zellen zu vermitteln. Unter Betrachtung der Literaturdaten im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass eine wichtige Funktion von KISS1R darin besteht, die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen zu unterdrücken.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von KISS1R auf Zellproliferation und -invasion bestätigt werden. Außerdem zeigen die Migrationsergebnisse nur einen tendenziellen Unterschied. Zum einen könnte die Wahl der verwendeten Zelllinie eine Ursache für die gering ausgeprägten Effekte auf alle drei Prozesse darstellen. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass T24-Zellen absolut keine Expression von KISS1R aufweisen, wäre es möglich, dass in dieser Zelllinie neben der Promotorhypermethylierung auch andere Faktoren, die die Expression von KISS1R beeinflussen, gestört bzw. vermindert exprimiert sind. Beispielsweise könnte innerhalb der Translationsmaschinerie ein Fehler vorliegen, der eine ausreichende Initiation der Proteinexpression unterbindet.

Die erfolgreiche Transfektion von KISS1R wurde nur auf mRNA-Expressionsebene überprüft, wodurch keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob diese auch in ein funktionelles Produkt umgeschrieben wurde. Unter Verwendung von Western-Blot-Versuchen könnte überprüft werden, ob in den T24-Zellen eine ausreichend hohe Proteinmenge von KISS1R nachweisbar ist, um einen starken Effekt auszulösen.

Wie bereits unter 4.3.2.1 beschrieben, wird durch die Aktivierung des KISS1-KISS1R-Systems eine Vielzahl von Signalwegkaskaden eingeleitet, die letztendlich eine Veränderung der Zelleigenschaften bewirkt, wie beispielsweise Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration oder Reduktion der MMP-9-Expression. Es wäre möglich, dass der hier verwendete Zeitraum zwischen Transfektion und Funktionsuntersuchungen von 48 h nicht ausreichte, um die vollständige Abfolge der Signalkaskade zu gewährleisten und einen ausreichenden Effekt zu messen. Durch eine tendenzielle Reduktion der Zellmigrationsrate um 25 % ist jedoch belegt worden, dass die Überexpression von KISS1R eine Verhaltensänderung der Tumorzellen auslösen konnte. Eine Optimierung der Transfektionsbedingungen sowie die Transfektion einer anderen Zelllinie könnten die Funktion von KISS1R im Harnblasenkarzinom noch besser verdeutlichen.

Die funktionelle Betrachtung von SEPT9v3 erfolgte nach spezifischer mRNA-Inhibierung mittels siRNA-Transfektion in 253J B-V-Zellen, da diese vergleichsweise die höchste

SEPT9v3-Expression aufweisen und somit erwartungsgemäß ausreichend Ziel-mRNA für eine effektive Inhibierung vorhanden ist, um einen größtmöglichen funktionellen Einfluss von SEPT9v3 zu messen. Die siRNA-Transfektion resultierte in einer Reduktion der SEPT9v3-Expression um 75 % im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Dies zeigt, dass eine starke Reduktion von SEPT9v3 induziert werden konnte, um geeignete Bedingungen für die Funktionsanalyse zu schaffen. Im Ergebnis konnte ein signifikanter Anstieg der Zellmigration um 28 % ($p=0,04$) und Zellinvasion um 22 % ($p=0,004$) erzielt werden. Die Auswirkung der SEPT9v3-Inhibierung ergab keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der 253J B-V-Zellen (mittlerer Anstieg um 10 %; $p=0,5$).

In der Literatur existiert nur eine Arbeit, in der das Verhalten von Zellen hinsichtlich mehrerer SEPT9-Isoformen untersucht wird. Die Arbeitsgruppe von Connolly *et al.* vergleicht das Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen nach stabiler Überexpression der Isoformen SEPT9v1-5. Im Ergebnis zeigt die SEPT9v1-Überexpression einen signifikanten promigratorischen Einfluss auf die Zellen. Im Migrationsverhalten nach Überexpression sind keine Unterschiede zwischen SEPT9v2-5 gezeigt worden [184]. Dieses Ergebnis verdeutlicht erneut die Unterschiede zwischen den SEPT9-Isoformen auch in funktioneller Hinsicht. Die Ursache dafür, dass keine Migrationsveränderungen durch Manipulation der SEPT9v3-Isoform nachweisbar sind, könnte darin begründet sein, dass eine andere Tumorentität analysiert wurde, in welcher das Zusammenspiel zwischen den Isoformen anders ausgeprägt ist. Alle anderen Arbeiten bezüglich spezifischer Funktionsanalysen für die unterschiedlichen Isoformen befassen sich ausschließlich mit SEPT9v1.

Es konnte weiterhin belegt werden, dass diese Transkriptionsvariante einen positiven Effekt auf Proliferation, Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen besitzt [198, 199]. Für SEPT9v3 existieren in der Literatur keine weiteren funktionellen Analysen. Daher ist ein weiterer Vergleich zu den hier erhobenen Ergebnissen nicht möglich. Aus den Literatordaten lässt sich jedoch ableiten, dass das Zusammenspiel der verschiedenen SEPT9-Isoformen einen hoch komplexen Mechanismus darstellt, der für die normale Zellfunktion von zentraler Bedeutung ist. Unregelmäßigkeiten im Verhältnis der einzelnen Isoformen resultieren in morphologischen und funktionellen Veränderung der Zellen und haben einen Einfluss auf die Tumorgenese [200].

Die spezifische Inhibierung von SEPT9v3 in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass der Funktionsverlust und das somit entstehende Ungleichgewicht zwischen den Isoformen einen Anstieg der Zellmigration und –invasion auslöst. SEPT9v3 besitzt eine antimigratorische und invasionshemmende Wirkung auf Harnblasenkarzinomzellen. Proliferative Effekte konnten hier nicht gezeigt werden, woraus abgeleitet werden kann, dass SEPT9v3 im Proliferationsverhalten keine zentrale Rolle einnimmt.

Wie bereits erwähnt, stellt die Metastasierung einen hoch komplexen Prozess dar, an dem eine Vielzahl von Molekülen beteiligt ist. Deshalb ist es durchaus denkbar, dass durch Expressionsveränderungen einzelner Gene kein komplexer Metastasierungsprozess induziert werden kann. Neben den Veränderungen intrazellulärer Signalwege spielen auch exogene Faktoren wie die Tumormikroumgebung eine bedeutende Rolle. Die Interaktion mit Stromazellen, immunologischen und hormonellen Faktoren sowie die Wechselwirkung mit Endothelzellen bei der Angiogenese sind an der Tumorausbreitung beteiligt [201].

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Funktionsanalysen in Kombination mit den Resultaten der Methylierungs- und Expressionsuntersuchungen im Primärtumorgewebe von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom sowie in HBK-Zelllinien, ergeben sich folgende Erkenntnisse:

Die verstärkte DNA-Methylierung von KISS1R resultiert in einer Verminderung der KISS1R-Expression. Dieser Expressionsverlust führt dazu, dass die Zellen des Primärtumors ein erhöhtes Migrationsverhalten aufweisen, das zum gesteigerten Metastasierungspotential des Tumors beiträgt. Die verminderte Expression von SEPT9v3 durch erhöhte Promotormethylierung steigert das Migrations- und Invasionspotential der Harnblasenkarzinomzellen und fördert ebenfalls die Ausbreitung des Primärtumors. Somit kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Promotorhypermethylierung von KISS1R und SEPT9 und deren Funktion im Metastasierungsprozess bestätigt werden.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster muskelinvasiver Harnblasentumore zu identifizieren, die in Korrelation zur Lymphknotenmetastasierung stehen. Daraus lässt sich ableiten, dass metastasierungsspezifische Unterschiede bereits im Primärtumor zum Zeitpunkt der Zystektomie nachgewiesen werden können.

Die Analyse des Methylierungsstatus von KISS1R, SEPT9 und CSAD erlaubt eine exakte Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen. Die Kombination aller drei Kandidatengene ermöglicht es, die Lymphknotenmetastasierung mit hoher Sensitivität und guter Spezifität an zwei unabhängigen Patientenkollektiven vorherzusagen. Eine direkte Korrelation des Methylierungsgrades der drei Gene zum pN-Status konnte ebenfalls in Bezug auf die Progressions- und Überlebensdaten der Patienten verdeutlicht werden. Folglich könnten KISS1R, SEPT9 und CSAD als potentielle Prognosemarker zur individuellen Bewertung des Risikos der Lymphknotenmetastasierung muskelinvasiver Harnblasenkarzinome in Betracht gezogen werden.

In weiterführenden Untersuchungen müsste analysiert werden, ob dieses Modell ebenfalls auf Präparate der transurethralen Resektion übertragen werden kann, um bereits frühzeitig eine Vorhersage der Lymphknotenmetastasierung vorzunehmen. Somit könnte durch eine ausgedehnte Lymphadenektomie im Rahmen der Zystektomie möglicherweise positive Lymphknoten entfernt werden, die beim limitierten Verfahren nicht betrachtet werden, um damit eine potenzielle Tumorausbreitung über das Lymphgefäßsystem einzuschränken oder zu verhindern. Ein weiterer Punkt, der bei positiver Vorhersage erwogen werden könnte, wäre die Selektion von Hochrisikopatienten für eine neoadjuvanten Chemotherapie, die aufgrund der mangelnden Datenlage bezüglich zuverlässiger Prognosemarker bisher noch nicht gezielt eingesetzt werden kann. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob ein entsprechendes Vorhersagemodell basierend auf der DNA-Methylierung für die Fernmetastasierung entwickelt werden kann. Damit könnte eine gezielte Einschätzung des Metastasierungsrisikos erfolgen, die den spezifischen Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie ermöglicht und die Überlebensraten verbessern könnte. Für diese weiteren Untersuchungen sollte darauf geachtet werden, dass eine einheitliche Definition der Einschlusskriterien der Patientenproben erfolgt.

Der Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression wurde für KISS1R und SEPT9v3 auf mRNA-Ebene in Zelllinien und im Primärtumorgewebe bestätigt. Um eine bessere Differenzierung zwischen den Patientengruppen zu erzielen, sollte eine größere Probenanzahl mit ausreichend gutem RNA-Integritätsfaktor untersucht werden. Für das Kandidatengen CSAD konnten keine Auswirkungen der erhöhten DNA-Methylierung auf die

Expressionsebene nachgewiesen werden. Trotz des fehlenden Effekts auf die Expression ist CSAD ein wichtiger potentieller Prognosemarker, der die Aussagekraft des Vorhersagemodells zur Bewertung des Metastasierungsrisikos erhöht. Dieses Ergebnis verdeutlicht außerdem, dass die DNA-Methylierung eine gute zusätzliche Ebene zur Biomarkerdetektion darstellt, die nicht durch andere Mechanismen reguliert wird.

Für KISS1R ist außerdem eine Korrelation zwischen erhöhter Promotormethylierung und verminderter Proteinexpression in lymphknotenpositiven Patienten bestätigt worden. Um dies ebenfalls für SEPT9v3 belegen zu können, bedarf es spezifischer Antikörper, die eine gezielte Detektion dieser SEPT9-Isoform ermöglichen. Derzeit existieren jedoch keine kommerziell erhältlichen SEPT9v3 Antikörper.

In Funktionsanalysen konnte abschließend gezeigt werden, dass Veränderungen der Expression von KISS1R und SEPT9v3 einen Einfluss auf die metastasierungsassoziierte Prozesse der Zellmigration und –invasion besitzen. Daraus lässt sich ableiten, dass die metastasierungsspezifischen Veränderungen im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom, die zunächst auf DNA-Methylierungsebene detektiert wurden, auch einen funktionellen Einfluss auf die Tumorprogression und Ausbreitung aufweisen. Somit könnten die potentiellen Prognosemarker KISS1R und SEPT9v3 einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Ploeg M, Aben KK, Kiemeney LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World journal of urology* 2009;27: 289-93.
2. Krebs in Deutschland 2009/2010. *Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV* 2013;9. Ausgabe: 100.
3. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2011;306: 737-45.
4. Bostrom PJ, Alkhateeb S, Trottier G, *et al.* Sex differences in bladder cancer outcomes among smokers with advanced bladder cancer. *BJU international* 2012;109: 70-6.
5. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, *et al.* Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European urology* 2013;63: 234-41.
6. Kiemeney LA, Sulem P, Besenbacher S, *et al.* A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nature genetics* 2010;42: 415-9.
7. Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C, Wu X. Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutation research* 2005;581: 97-104.
8. Tilki D, Burger M, Dalbagni G, *et al.* Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *European urology* 2011;60: 484-92.
9. Sullivan PS, Nooraie F, Sanchez H, *et al.* Comparison of ImmunoCyt, UroVysion, and urine cytology in detection of recurrent urothelial carcinoma: a "split-sample" study. *Cancer* 2009;117: 167-73.
10. Mian C, Lodde M, Comploj E, *et al.* Liquid-based cytology as a tool for the performance of uCyt+ and Urovysion Multicolour-FISH in the detection of urothelial carcinoma. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology* 2003;14: 338-42.
11. Huysentruyt CJ, Baldewijns MM, Ruland AM, *et al.* Modified UroVysion scoring criteria increase the urothelial carcinoma detection rate in cases of equivocal urinary cytology. *Histopathology* 2011;58: 1048-53.
12. Brandau S, Bohle A. Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *European urology* 2001;39: 491-7.
13. Williams SG, Stein JP. Molecular pathways in bladder cancer. *Urological research* 2004;32: 373-85.

14. Society AC. Cancer Facts and Figures 2013. 2013: 23.
15. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual review of pathology* 2009;4: 251-85.
16. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, *et al.* Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *The American journal of pathology* 2001;158: 1955-9.
17. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, *et al.* The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer research* 2001;61: 1265-8.
18. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, *et al.* FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24: 5218-25.
19. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, *et al.* Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer research* 1998;58: 5835-41.
20. Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, *et al.* Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *British journal of cancer* 1991;63: 601-8.
21. Neal DE, Sharples L, Smith K, *et al.* The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990;65: 1619-25.
22. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, *et al.* Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991;252: 706-9.
23. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, *et al.* Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer research* 1992;52: 1393-8.
24. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine* 2010;9: 145-52.
25. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008;27: 6507-21.
26. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & development* 1998;12: 2245-62.
27. Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, *et al.* Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer research* 2000;60: 3862-71.
28. Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urologic oncology* 2010;28: 409-28.

29. Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis* 2006;27: 361-73.
30. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, *et al.* Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nature reviews Urology* 2014;11: 400-10.
31. Lianes P, Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, *et al.* Biomarker study of primary nonmetastatic versus metastatic invasive bladder cancer. National Cancer Institute Bladder Tumor Marker Network. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1998;4: 1267-71.
32. McConkey DJ, Choi W, Marquis L, *et al.* Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer metastasis reviews* 2009;28: 335-44.
33. Bryan RT, Tselepis C. Cadherin switching and bladder cancer. *The Journal of urology* 2010;184: 423-31.
34. Byrne RR, Shariat SF, Brown R, *et al.* E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *The Journal of urology* 2001;165: 1473-9.
35. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, *et al.* Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 1998;82: 1359-66.
36. Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, *et al.* Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer research* 2000;20: 2009-13.
37. Seiler R, Thalmann GN, Fleischmann A. MMP-2 and MMP-9 in lymph-node-positive bladder cancer. *Journal of clinical pathology* 2011;64: 1078-82.
38. Szarvas T, Becker M, vom Dorp F, *et al.* Matrix metalloproteinase-7 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in bladder cancer. *Cancer science* 2010;101: 1300-8.
39. Crew JP. Vascular endothelial growth factor: an important angiogenic mediator in bladder cancer. *European urology* 1999;35: 2-8.
40. Inoue K, Slaton JW, Karashima T, *et al.* The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6: 4866-73.
41. Yang H, Kim C, Kim MJ, *et al.* Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in bladder cancer. *Molecular cancer* 2011;10: 36.

42. Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, *et al.* Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *The Journal of urology* 2001;166: 1275-9.
43. Vogt AP, Cohen C, Siddiqui MT. Fascin as an identifier of metastatic urothelial carcinoma: A retrospective study of fine-needle aspiration cell blocks and histologic tissue microarrays. *Diagnostic cytopathology* 2012;40: 882-6.
44. Kim EY, Seo JM, Kim C, *et al.* BLT2 promotes the invasion and metastasis of aggressive bladder cancer cells through a reactive oxygen species-linked pathway. *Free radical biology & medicine* 2010;49: 1072-81.
45. Kamai T, Shirataki H, Nakanishi K, *et al.* Increased Rac1 activity and Pak1 overexpression are associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis of upper urinary tract cancer. *BMC cancer* 2010;10: 164.
46. Seraj MJ, Harding MA, Gildea JJ, Welch DR, Theodorescu D. The relationship of BRMS1 and RhoGDI2 gene expression to metastatic potential in lineage related human bladder cancer cell lines. *Clinical & experimental metastasis* 2000;18: 519-25.
47. Lehmann J, Retz M, Stöckle M. Systemische Chemotherapie des metastasierten Urothelkarzinoms – eine kritische Analyse. Blasenkarzinom. 1. Auflage: Springer Medizin Verlag; 2005. p. 125-38.
48. Pennisi E. Behind the scenes of gene expression. *Science* 2001;293: 1064-7.
49. Hirst M, Marra MA. Epigenetics and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009;41: 136-46.
50. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 2003;33 Suppl: 245-54.
51. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975;187: 226-32.
52. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and cell genetics* 1975;14: 9-25.
53. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128: 693-705.
54. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation research* 2008;659: 40-8.
55. Reik W, Kelsey G, Walter J. Dissecting de novo methylation. *Nature genetics* 1999;23: 380-2.
56. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 2002;16: 6-21.

57. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93: 4059-70.
58. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England journal of medicine* 2003;349: 2042-54.
59. Plass C. Cancer epigenomics. *Human molecular genetics* 2002;11: 2479-88.
60. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* 1987;196: 261-82.
61. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current opinion in genetics & development* 1993;3: 226-31.
62. Boyes J, Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 1991;64: 1123-34.
63. Nan X, Ng HH, Johnson CA, *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393: 386-9.
64. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293: 1089-93.
65. Payer B, Lee JT. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annual review of genetics* 2008;42: 733-72.
66. Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. *European journal of human genetics : EJHG* 2002;10: 6-16.
67. Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W. Imprinting mechanisms. *Genome research* 1998;8: 881-900.
68. Rideout WM, 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990;249: 1288-90.
69. Lu LJ, Randerath E, Randerath K. DNA hypomethylation in Morris hepatomas. *Cancer letters* 1983;19: 231-9.
70. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009;1: 239-59.
71. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82: 1820-8.
72. Chakravarti A, Heydon K, Wu CL, *et al.* Loss of p16 expression is of prognostic significance in locally advanced prostate cancer: an analysis from the Radiation Therapy Oncology Group protocol 86-10. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003;21: 3328-34.

73. Demokan S, Chuang A, Suoglu Y, *et al.* Promoter methylation and loss of p16(INK4a) gene expression in head and neck cancer. *Head & neck* 2012;34: 1470-5.
74. Feng XL, Li L, Gao YN, *et al.* Overexpression of c-erbB-2 and loss of p16 have molecular diagnostic relevance but no prognostic value in lung cancer. *Medical oncology* 2011;28: 336-41.
75. Young RJ, Waldeck K, Martin C, *et al.* Loss of CDKN2A Expression is a Frequent Event in Primary Invasive Melanoma and Correlates with Sensitivity to the CDK4/6 Inhibitor PD0332991 in Melanoma Cell Lines. *Pigment cell & melanoma research* 2014.
76. Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, *et al.* Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *British journal of haematology* 2002;118: 1034-40.
77. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics* 2007;16 Spec No 1: R50-9.
78. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, *et al.* Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *The Journal of pathology* 2006;209: 336-43.
79. Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaitė K, *et al.* Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology* 2008;75: 145-51.
80. Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer biology & therapy* 2006;5: 993-1001.
81. Phe V, Cussenot O, Roupret M. Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU international* 2009;104: 896-901.
82. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, *et al.* Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13: 2046-53.
83. Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 2009;16: 17-22.
84. Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, *et al.* DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *The Journal of urology* 2005;173: 1767-71.
85. Wolff EM, Chihara Y, Pan F, *et al.* Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an

-
- epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer research* 2010;70: 8169-78.
86. Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, *et al.* DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29: 1133-9.
 87. Reinert T, Modin C, Castano FM, *et al.* Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17: 5582-92.
 88. Kandimalla R, van Tilborg AA, Kompier LC, *et al.* Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers. *European urology* 2012;61: 1245-56.
 89. Jeong P, Ha YS, Kim JS, *et al.* Runt-related transcription factor 3 methylation as a possible prognosticator in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 2011;10: 205-11.
 90. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer* 2007;7: 415-28.
 91. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 2009;119: 1420-8.
 92. Baumgart E, Cohen MS, Silva Neto B, *et al.* Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13: 1685-94.
 93. Yu Q, Zhang K, Wang X, Liu X, Zhang Z. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2010;29: 119.
 94. Wang Y, Kong CZ, Zhang Z, Yang CM, Li J. Role of CDH1 Promoter Polymorphism and DNA Methylation in Bladder Carcinogenesis: A Meta-Analysis. *DNA and cell biology* 2014.
 95. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18: 5294-9.
 96. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine* 2006;27: 126-39.
 97. Oakes CC, La Salle S, Robaire B, Trasler JM. Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent

- hr/>
- restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2006;1: 146-52.
98. Sutherland E, Coe L, Raleigh EA. McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *Journal of molecular biology* 1992;225: 327-48.
99. Renbaum P, Abrahamove D, Fainsod A, *et al.* Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the CpG DNA methylase from *Spiroplasma* sp. strain MQ1(M.Sssl). *Nucleic acids research* 1990;18: 1145-52.
100. Rigby CC, Franks LM. A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *British journal of cancer* 1970;24: 746-54.
101. Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, *et al.* Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer research* 1986;46: 3630-6.
102. Bubenik J, Baresova M, Viklicky V, *et al.* Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1973;11: 765-73.
103. Dinney CP, Fishbeck R, Singh RK, *et al.* Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *The Journal of urology* 1995;154: 1532-8.
104. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 2009;457: 396-404.
105. Bolenz C, Martini T, Michel MS. [Invasion patterns and metastasis of urothelial carcinoma. A challenge for translational research]. *Der Urologe Ausg A* 2013;52: 1242-7.
106. Booth CM, Siemens DR, Li G, *et al.* Perioperative chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: A population-based outcomes study. *Cancer* 2014;120: 1630-8.
107. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics* 2002;3: 415-28.
108. Sato T, Arai E, Kohno T, *et al.* DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PloS one* 2013;8: e59444.
109. van Hoesel AQ, Sato Y, Elashoff DA, *et al.* Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *British journal of cancer* 2013;108: 2033-8.

110. Bird AP, Southern EM. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *Journal of molecular biology* 1978;118: 27-47.
111. Plass C, Shibata H, Kalcheva I, et al. Identification of Grf1 on mouse chromosome 9 as an imprinted gene by RLGS-M. *Nature genetics* 1996;14: 106-9.
112. Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature reviews Genetics* 2004;5: 446-55.
113. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89: 1827-31.
114. Genreux DP, Johnson WC, Burden AF, Stoger R, Laird CD. Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic acids research* 2008;36: e150.
115. Mohn F, Weber M, Schubeler D, Roloff TC. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods in molecular biology* 2009;507: 55-64.
116. Rauch T, Pfeifer GP. Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2005;85: 1172-80.
117. Brinkman AB, Simmer F, Ma K, et al. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 2010;52: 232-6.
118. Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics* 2005;37: 853-62.
119. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nature genetics* 2006;38: 149-53.
120. Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nature biotechnology* 2010;28: 1106-14.
121. Jacinto FV, Ballestar E, Esteller M. Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome. *BioTechniques* 2008;44: 35, 7, 9 passim.
122. How Kit A, Nielsen HM, Tost J. DNA methylation based biomarkers: practical considerations and applications. *Biochimie* 2012;94: 2314-37.
123. Heck MM, Retz M, Nawroth R. [Molecular lymph node staging in prostate and bladder cancer]. *Der Urologe Ausg A* 2014;53: 484-90.

124. Margulis V, Lotan Y, Montorsi F, Shariat SF. Predicting survival after radical cystectomy for bladder cancer. *BJU international* 2008;102: 15-22.
125. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews Genetics* 2007;8: 286-98.
126. Zhuang J, Jones A, Lee SH, *et al.* The dynamics and prognostic potential of DNA methylation changes at stem cell gene loci in women's cancer. *PLoS genetics* 2012;8: e1002517.
127. Smith SC, Baras AS, Dancik G, *et al.* A 20-gene model for molecular nodal staging of bladder cancer: development and prospective assessment. *The lancet oncology* 2011;12: 137-43.
128. Tollefsbol TO. Methods of epigenetic analysis. *Methods in molecular biology* 2004;287: 1-8.
129. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic acids research* 2001;29: E65-5.
130. Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic acids research* 1997;25: 2529-31.
131. Brena RM, Auer H, Kornacker K, *et al.* Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. *Nucleic acids research* 2006;34: e17.
132. Lo YM, Wong IH, Zhang J, *et al.* Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer research* 1999;59: 3899-903.
133. Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, *et al.* Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27: 3880-8.
134. Bhatia K, Siraj AK, Hussain A, Bu R, Gutierrez MI. The tumor suppressor gene 14-3-3 sigma is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2003;12: 165-9.
135. Wei T, Pearson MN, Armstrong K, Blohm D, Liu J. Analysis of crucial factors resulting in microarray hybridization failure. *Molecular bioSystems* 2012;8: 1325-38.
136. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* 2003;349: 1614-27.
137. de Roux N, Genin E, Carel JC, *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of*

-
- the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100: 10972-6.
138. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001;411: 613-7.
 139. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, *et al.* AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *The Journal of biological chemistry* 2001;276: 28969-75.
 140. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute* 1996;88: 1731-7.
 141. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters* 1999;446: 103-7.
 142. Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior* 2009;4: 942-7.
 143. Ji K, Ye L, Mason MD, Jiang WG. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). *International journal of molecular medicine* 2013;32: 747-54.
 144. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biological chemistry* 2001;276: 34631-6.
 145. Hori A, Honda S, Asada M, *et al.* Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;286: 958-63.
 146. Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276: 1164-72.
 147. Jiang Y, Berk M, Singh LS, *et al.* KiSS1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha. *Clinical & experimental metastasis* 2005;22: 369-76.
 148. Zhang Y, Tang YJ, Li ZH, *et al.* KiSS1 inhibits growth and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the MAPK pathway. *European journal of histochemistry : EJH* 2013;57: e30.
 149. Cebrian V, Fierro M, Orenes-Pinero E, *et al.* KISS1 methylation and expression as tumor stratification biomarkers and clinical outcome prognosticators for bladder cancer patients. *The American journal of pathology* 2011;179: 540-6.

150. Kang HS, Baba T, Mandai M, *et al.* GPR54 is a target for suppression of metastasis in endometrial cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2011;10: 580-90.
151. Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer science* 2006;97: 64-71.
152. Kinoshita M. Assembly of mammalian septins. *Journal of biochemistry* 2003;134: 491-6.
153. Spiliotis ET, Hunt SJ, Hu Q, Kinoshita M, Nelson WJ. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *The Journal of cell biology* 2008;180: 295-303.
154. Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science* 2005;307: 1781-5.
155. Kremer BE, Adang LA, Macara IG. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell* 2007;130: 837-50.
156. Kalikin LM, Sims HL, Petty EM. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* 2000;63: 165-72.
157. Sorensen AB, Warming S, Fuchtbauer EM, Pedersen FS. Alternative splicing, expression, and gene structure of the septin-like putative proto-oncogene Sint1. *Gene* 2002;285: 79-89.
158. deVos T, Tetzner R, Model F, *et al.* Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clinical chemistry* 2009;55: 1337-46.
159. Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, *et al.* Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PloS one* 2008;3: e3759.
160. Lofton-Day C, Model F, Devos T, *et al.* DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical chemistry* 2008;54: 414-23.
161. Toth K, Galamb O, Spisak S, *et al.* The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathology oncology research : POR* 2011;17: 503-9.
162. Tetzner. An improvement of the blood-based Septin9 test Epi proColon enhance sensitivity for early stage colorectal cancer *United European Gastroenterology* 2011.

163. Kuo IY, Chang JM, Jiang SS, *et al.* Prognostic CpG methylation biomarkers identified by methylation array in esophageal squamous cell carcinoma patients. *International journal of medical sciences* 2014;11: 779-87.
164. Powrozek T, Krawczyk P, Kucharczyk T, Milanowski J. Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Medical oncology* 2014;31: 917.
165. Hope DB. Pyridoxal phosphate as the coenzyme of the mammalian decarboxylase for L-cysteine sulphinic and L-cysteic acids. *The Biochemical journal* 1955;59: 497-500.
166. Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochemical research* 2004;29: 117-26.
167. Liu P, Torrens-Spence MP, Ding H, Christensen BM, Li J. Mechanism of cysteine-dependent inactivation of aspartate/glutamate/cysteine sulfinic acid alpha-decarboxylases. *Amino acids* 2013;44: 391-404.
168. Zitzelsberger H, Thomas G, Unger K. Chromosomal aberrations in thyroid follicular-cell neoplasia: in the search of novel oncogenes and tumour suppressor genes. *Molecular and cellular endocrinology* 2010;321: 57-66.
169. Boyd JC. Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum* 1997;227: 46-63.
170. Herr HW, Bochner BH, Dalbagni G, *et al.* Impact of the number of lymph nodes retrieved on outcome in patients with muscle invasive bladder cancer. *The Journal of urology* 2002;167: 1295-8.
171. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, *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: 666-75.
172. Lehmann J, Retz M, Wiemers C, *et al.* Adjuvant cisplatin plus methotrexate versus methotrexate, vinblastine, epirubicin, and cisplatin in locally advanced bladder cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial (AUO-AB 05/95). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23: 4963-74.
173. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002;21: 5483-95.
174. Juttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91: 11797-801.

175. Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clinical epigenetics* 2013;5: 3.
176. Duarte-Pereira S, Paiva F, Costa VL, et al. Prognostic value of opioid binding protein/cell adhesion molecule-like promoter methylation in bladder carcinoma. *European journal of cancer* 2011;47: 1106-14.
177. Zhang QM, Shen N, Xie S, et al. MAGED4 expression in glioma and upregulation in glioma cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2014;15: 3495-501.
178. Poplineau M, Schnekenburger M, Dufer J, et al. The DNA hypomethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, enhances tumor cell invasion through a transcription-dependent modulation of MMP-1 expression in human fibrosarcoma cells. *Molecular carcinogenesis* 2013.
179. Takebayashi S, Nakao M, Fujita N, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces histone hyperacetylation of mouse centromeric heterochromatin by a mechanism independent of DNA demethylation. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;288: 921-6.
180. McIlhatton MA, Burrows JF, Donaghy PG, et al. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene* 2001;20: 5930-9.
181. Scott M, Hyland PL, McGregor G, et al. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene* 2005;24: 4688-700.
182. Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, Russell SE. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006;118: 1325-9.
183. Chacko AD, Hyland PL, McDade SS, et al. SEPT9_v4 expression induces morphological change, increased motility and disturbed polarity. *The Journal of pathology* 2005;206: 458-65.
184. Connolly D, Yang Z, Castaldi M, et al. Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast cancer research : BCR* 2011;13: R76.
185. Thorne JL, Campbell MJ, Turner BM. Transcription factors, chromatin and cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009;41: 164-75.
186. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010;50: 237-43.

187. Petty E, Pillus L. Balancing chromatin remodeling and histone modifications in transcription. *Trends in genetics : TIG* 2013;29: 621-9.
188. Prange KH, Singh AA, Martens JH. The genome-wide molecular signature of transcription factors in leukemia. *Experimental hematology* 2014.
189. Sanchez-Carbayo M, Capodieci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *The American journal of pathology* 2003;162: 609-17.
190. Takeda T, Kikuchi E, Mikami S, et al. Prognostic role of KiSS-1 and possibility of therapeutic modality of metastatin, the final peptide of the KiSS-1 gene, in urothelial carcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 2012;11: 853-63.
191. Joung JY, Yang SO, Jeong IG, et al. Identification of immunohistochemical factors that predict the synchronous or metachronous development of bladder tumors in patients with upper urinary tract tumors. *Urologia internationalis* 2008;81: 306-11.
192. Zhang Z, Furge KA, Yang XJ, Teh BT, Hansel DE. Comparative gene expression profiling analysis of urothelial carcinoma of the renal pelvis and bladder. *BMC medical genomics* 2010;3: 58.
193. Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23: 2903-10.
194. O'Banion MK, Winn VD, Young DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89: 4888-92.
195. Kumar LD, Clarke AR. Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from in vitro to in vivo applications. *Advanced drug delivery reviews* 2007;59: 87-100.
196. Stathatos N, Bourdeau I, Espinosa AV, et al. KiSS-1/G protein-coupled receptor 54 metastasis suppressor pathway increases myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005;90: 5432-40.
197. Olbrich T, Ziegler E, Turk G, et al. Kisspeptin-10 inhibits bone-directed migration of GPR54-positive breast cancer cells: Evidence for a dose-window effect. *Gynecologic oncology* 2010;119: 571-8.
198. Gonzalez ME, Makarova O, Peterson EA, Privette LM, Petty EM. Up-regulation of SEPT9_v1 stabilizes c-Jun-N-terminal kinase and contributes to

- its pro-proliferative activity in mammary epithelial cells. *Cellular signalling* 2009;21: 477-87.
199. Gonzalez ME, Peterson EA, Privette LM, *et al.* High SEPT9_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes. *Cancer research* 2007;67: 8554-64.
200. Stanbery L, Petty EM. Steps solidifying a role for SEPT9 in breast cancer suggest that greater strides are needed. *Breast cancer research : BCR* 2012;14: 101.
201. Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer growth and metastasis* 2014;7: 9-18.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms.....	3
Abbildung 2	Entstehungswege des Harnblasenkarzinoms	4
Abbildung 3	Möglichkeiten der biochemischen Modifikation von Cytosin.....	9
Abbildung 4	Inhibierung der Genexpression durch DNA-Methylierung	10
Abbildung 5	Einfluss der DNA-Methylierung auf die Tumorgenese.....	12
Abbildung 6	TrueClone® cDNA-Vektor für die transiente Überexpression von KISS1R ..	39
Abbildung 7	Clusterheatmap der metastasierungsspezifischen Methylierungsunterschiede muskelinvasiver Harnblasentumore.....	44
Abbildung 8	Quantifizierung der DNA-Methylierung von Negativ- und Positivkontrolle	46
Abbildung 9	SNRPN-Methylierung als Referenzgen zur Normalisierung	47
Abbildung 10	KISS1R-Methylierung im Gewebe	48
Abbildung 11	SEPT9-Methylierung im Gewebe	49
Abbildung 12	CSAD-Methylierung im Gewebe	50
Abbildung 13	KISS-1 und MANF-Methylierung im Gewebe	51
Abbildung 14	DNA-Methylierung der Kandidatengene in HBK-Zelllinien.....	52
Abbildung 15	ROC-Kurven der Kandidatengene KISS1R, SEPT9 und CSAD	53
Abbildung 16	ROC-Kurve der Kombination von KISS1R, SEPT9 und CSAD am Patientenkollektiv 1	54
Abbildung 17	ROC-Kurve der Kombination von KISS1R, SEPT9 und CSAD am Patientenkollektiv 2	55
Abbildung 18	Progressionsfreies Überleben des Patientenkollektiv 1.....	57
Abbildung 19	Gesamtüberleben des Patientenkollektiv 1.....	58
Abbildung 20	Progressionsfreies Überleben des Patientenkollektiv 2	60
Abbildung 21	Gesamtüberleben des Patientenkollektiv 2	61
Abbildung 22	DNA-Methylierung und mRNA-Expression von KISS1R nach Behandlung mit 5Aza-dC	63
Abbildung 23	Relative mRNA-Expression der SEPT9 Transkriptvarianten 1, 3 und 4 in T24-Zellen nach Behandlung mit 5Aza-dC	64
Abbildung 24	DNA-Methylierung und mRNA-Expression von SEPT9v3 nach Behandlung mit 5Aza-dC	65
Abbildung 25	DNA-Methylierung und mRNA-Expression von CSAD nach Behandlung mit 5Aza-dC	66
Abbildung 26	KISS1R mRNA-Expression im Gewebe.....	67
Abbildung 27	SEPT9v3 mRNA-Expression im Gewebe	68

Abbildung 28	CSAD mRNA-Expression im Gewebe.....	69
Abbildung 29	Immunhistochemischen Färbung von KISS1R und KISS1	70
Abbildung 30	KISS1R Proteinexpression im Gewebe.....	71
Abbildung 31	KISS-1 Proteinexpression im Gewebe	72
Abbildung 32	KISS1R-Expression in HBK-Zelllinien	73
Abbildung 33	Amplifikationskurven der KISS1R-Expression nach transienter Transfektion 74	
Abbildung 34	Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von T24 Zellen nach KISS1R-Überexpression	75
Abbildung 35	SEPT9v3-Expression in HBK-Zelllinien.....	76
Abbildung 36	Effizienz der transienten Transfektion von 253J B-V Zellen mit SEPT9v3- siRNA 77	
Abbildung 37	Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von 253J B-V Zellen nach SEPT9v3 Inhibierung.....	78
Abbildung 38	Schematischer Aufbau der SEPT9-Transkriptvarianten v1, v3 und v4	100

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Urothelkarzinomzelllinien.....	26
Tabelle 2	Liste der Kandidatengene	45
Tabelle 3	Relative Methylierung von SNRPN im Gewebe	47
Tabelle 4	Relative Methylierung von KISS1R im Gewebe.....	48
Tabelle 5	Relative Methylierung von SEPT9 im Gewebe	49
Tabelle 6	Relative Methylierung von CSAD im Gewebe.....	50
Tabelle 7	Relative Methylierung von KISS-1 und MANF im Gewebe	51
Tabelle 8	DNA-Methylierung der Kandidatengene in HBK-Zelllinien	52
Tabelle 9	Ergebnisse der ROC-Kurven-Analyse der Einzelgene.....	54
Tabelle 10	Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells am Patientenkollektiv 1	55
Tabelle 11	Sensitivität und Spezifität des Vorhersagemodells am Patientenkollektiv 2	56
Tabelle 12	Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (PFÜ) des Patientenkollektiv 1.....	57
Tabelle 13	Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (GÜ) des Patientenkollektiv 1.....	59
Tabelle 14	Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (PFÜ) des Patientenkollektiv 2.....	60
Tabelle 15	Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse (GÜ) des Patientenkollektiv 2.....	62
Tabelle 16	DNA-Methylierung und mRNA-Expression von KISS1R in HBK-Zelllinien nach 5Aza-dC-Behandlung	63
Tabelle 17	DNA-Methylierung und mRNA-Expression von SEPT9v3 in HBK-Zelllinien nach 5Aza-dC-Behandlung	65
Tabelle 18	DNA-Methylierung und mRNA-Expression von CSAD in HBK-Zelllinien nach 5Aza-dC-Behandlung	66
Tabelle 19	Relative mRNA-Expression von KISS1R im Gewebe	67
Tabelle 20	Relative mRNA-Expression von SEPT9v3 im Gewebe.....	68
Tabelle 21	Relative mRNA-Expression von CSAD im Gewebe.....	69
Tabelle 22	Proteinexpression von KISS1R im Gewebe	71
Tabelle 23	Proteinexpression von KISS-1 im Gewebe.....	71

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5mC	5-Methylcytosin
aCGH	Array Comparative genomic hybridization
APC	adenomatous polyposis coli
AUC	Area under the curve
AUO	Arbeitsgemeinschaft Urologischer Onkologie
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BLT2	Leukotriene B4 receptor 2
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BTA	bladder tumor antigen
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Complementary DNA
CGI	CpG Insel
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIS	Carcinoma in situ
CM	Cisplatin, Methotrexat
CpG	Cytosine-guanine dinucleotide
CREB	cAMP responsive element binding protein
CSAD	cysteine sulfinic acid decarboxylase
CTCF	CCCTC-binding factor
CXR	Carboxy-X-rhodamin
Cy3	Cyanin 3 / Fluoreszenzfarbstoff
Cy5	Cyanin 5 / Fluoreszenzfarbstoff
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerine
DAPK1	death-associated protein kinase 1
DF1	DharmaFECT 1 Transfection Reagent
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Deoxyribonucleotidtriphosphate
E2F	E2F transcription factor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gravitationsbeschleunigung
GATA2	GATA binding protein 2
gDNA	genomische DNA

GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GÜ	Gesamtüberleben
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HBK	Harnblasenkarzinom
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KISS-1	KiSS-1 metastasis suppressor
KISS1R	KISS-1 receptor
LKM	Lymphknotenmetastasierung
LOH	loss of heterozygosity
LVI	lymphovaskulären Invasion
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MeCP	Methyl-CpG-binding domain protein
MeDIP	Methylated DNA Immunoprecipitation
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger RNA
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin
MVEC	Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin, Cisplatin
N/A	Not available - nicht verfügbar
N+	"mit Lymphknotenmetastasen"
N0	"ohne Lymphknotenmetastasen"
NaCl	Natriumchlorid
NAT2	N-acetyltransferase 2
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Negativkontrolle
NMP-22	Nukleäres-Matrix-Protein 22
OPCML	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule
Pak1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFÜ	progressionsfreies Überleben
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PLC	Phospholipase C
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
qPCR	Quantitative PCR
RARβ	retinoic acid receptor, beta
RAS	Rat sarcoma
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
Rb	Retinoblastom
RhoGDI2	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) 2
RNAi	RNA-Interferenz

ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm	revolutions per minute
RPMI	RPMI 1640 / Kultivierungsmedium
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RUNX3	runt-related transcription factor 3
SAM	S-adenosylmethionine
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEPT9	Septin 9
Sin3A	SIN3 transcription regulator family member A
siRNA	Small interfering RNA
SNAI2	Snail Family Zinc Finger 2
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
Sp1	Sp1 transcription factor
STD	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline
TBX2	T-box 2
TBX3	T-box 3
TE	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TMA	Tissue Microarray
TP53	Tumor Protein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartstelle
TUR	Transurethrale Resektion
TWIST	Twist-related protein
U	Unit / Einheit der Enzymaktivität
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIM	Vimentin
XIST	X inactive specific transcript
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
ZIC	Zic family member 1

9 Anhang

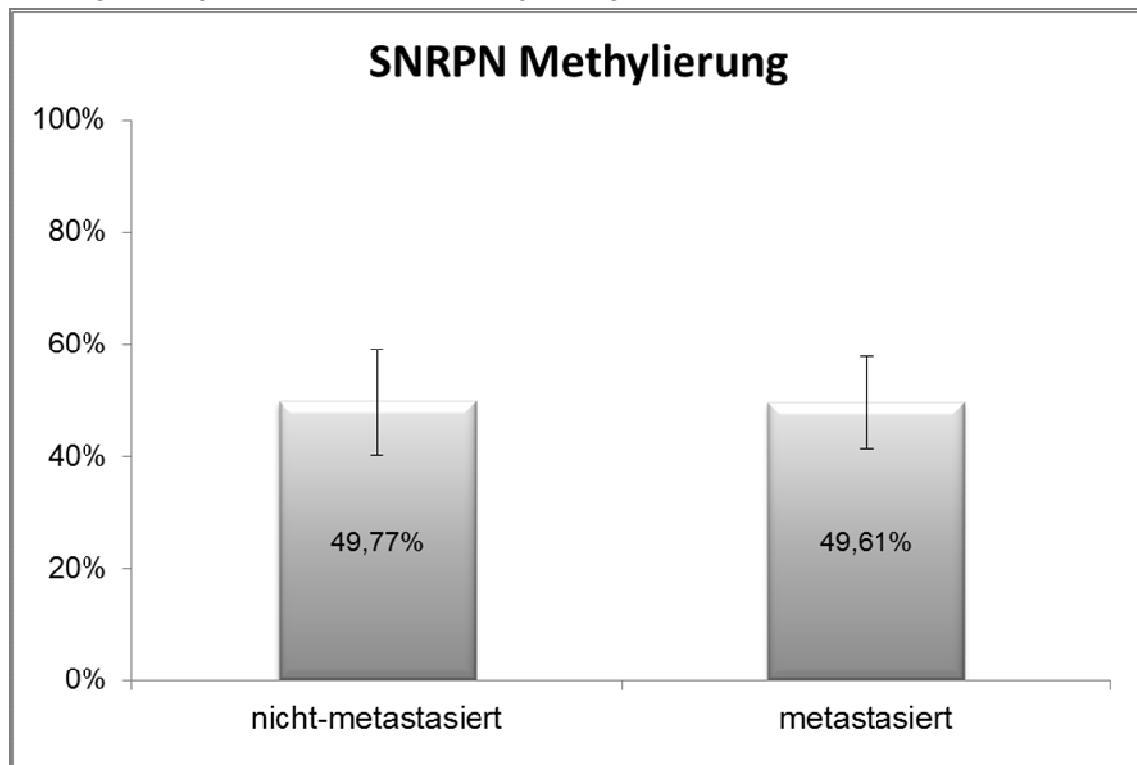
Anhang 1 ΔC_T -Werte und Berechnung der prozentualen und relativen Methylierung des Referenzgens SNRPN

Gruppe	Proben-ID	ΔC_T	Prozentuale Methylierung	relative Methylierung	Lg(SNRPN*100)
nicht-metastasiert	6549	1,01	50,3%	2,01	2,3
nicht-metastasiert	146	1,4	62,1%	2,64	2,42
nicht-metastasiert	5703	1,28	58,8%	2,43	2,39
nicht-metastasiert	6438	1,46	63,7%	2,75	2,44
nicht-metastasiert	4987	1,1	53,3%	2,14	2,33
nicht-metastasiert	6485	1,2	56,5%	2,3	2,36
nicht-metastasiert	4832	1,05	51,7%	2,07	2,32
nicht-metastasiert	5536	1,08	52,7%	2,11	2,32
nicht-metastasiert	5381	1,36	61,0%	2,57	2,41
nicht-metastasiert	4403	0,64	35,8%	1,56	2,19
nicht-metastasiert	3577	0,83	43,7%	1,78	2,25
nicht-metastasiert	5036	1,14	54,6%	2,2	2,34
nicht-metastasiert	17	0,54	31,2%	1,45	2,16
nicht-metastasiert	29	1,06	52,0%	2,08	2,32
nicht-metastasiert	77	0,6	34,0%	1,52	2,18
nicht-metastasiert	128	0,5	29,3%	1,41	2,15
nicht-metastasiert	134	0,71	38,9%	1,64	2,21
nicht-metastasiert	147	1,26	58,2%	2,39	2,38
nicht-metastasiert	149	1	50,0%	2	2,3
nicht-metastasiert	180	0,95	48,2%	1,94	2,29
nicht-metastasiert	188	1,03	51,0%	2,04	2,31
nicht-metastasiert	205	0,67	37,1%	1,59	2,2
nicht-metastasiert	224	1,08	52,7%	2,11	2,32
nicht-metastasiert	258	1,06	52,0%	2,09	2,32
nicht-metastasiert	305	0,71	38,9%	1,64	2,21
nicht-metastasiert	312	1,26	58,2%	2,39	2,38
nicht-metastasiert	321	0,83	43,7%	1,78	2,25
nicht-metastasiert	329	1,09	53,0%	2,12	2,33
nicht-metastasiert	407	1,36	61,0%	2,57	2,41
nicht-metastasiert	411	1,22	57,1%	2,32	2,37
nicht-metastasiert	474	0,8	42,6%	1,74	2,24
nicht-metastasiert	500	1,3	59,4%	2,47	2,39
nicht-metastasiert	502	0,98	49,3%	1,97	2,29
metastasiert	5758	1,05	51,7%	2,07	2,32
metastasiert	2739	0,81	43,0%	1,75	2,24
metastasiert	5797	0,95	48,2%	1,93	2,29
metastasiert	5278	1,22	57,1%	2,33	2,37
metastasiert	6502	0,75	40,5%	1,68	2,23

Anhang

metastasiert	3965	1,4	62,1%	2,64	2,42
Gruppe	Proben-ID	ΔC_T	Prozentuale Methylierung	relative Methylierung	Lg(SNRPN*100)
metastasiert	6454	0,87	45,3%	1,83	2,26
metastasiert	5668	1,09	53,0%	2,13	2,33
metastasiert	3423	1,06	52,0%	2,08	2,32
metastasiert	3809	0,9	46,4%	1,87	2,27
metastasiert	4751	0,83	43,7%	1,78	2,25
metastasiert	5890	0,94	47,9%	1,92	2,28
metastasiert	6010	0,94	47,9%	1,92	2,28
metastasiert	6443	0,82	43,4%	1,77	2,25
metastasiert	5935	0,74	40,1%	1,67	2,22
metastasiert	2629	0,87	45,3%	1,82	2,26
metastasiert	2246	1,36	61,0%	2,57	2,41
metastasiert	6904	0,88	45,7%	1,84	2,26
metastasiert	15	0,92	47,1%	1,9	2,28
metastasiert	33	1,42	62,6%	2,68	2,43
metastasiert	46	0,89	46,0%	1,85	2,27
metastasiert	106	1,3	59,4%	2,46	2,39
metastasiert	125	1,29	59,1%	2,45	2,39
metastasiert	151	1,49	64,4%	2,81	2,45
metastasiert	155	0,62	34,9%	1,53	2,18
metastasiert	157	0,6	34,0%	1,52	2,18
metastasiert	169	0,71	38,9%	1,64	2,21
metastasiert	310	1,19	56,2%	2,29	2,36
metastasiert	380	0,99	49,7%	1,98	2,3
metastasiert	394	0,92	47,1%	1,89	2,28
metastasiert	403	1,27	58,5%	2,41	2,38
metastasiert	409	1,53	65,4%	2,89	2,46
metastasiert	410	1,01	50,3%	2,01	2,3
metastasiert	442	1,41	62,4%	2,66	2,42
metastasiert	444	0,56	32,2%	1,47	2,17
metastasiert	481	0,72	39,3%	1,65	2,22
metastasiert	323	1,02	50,7%	2,03	2,31
metastasiert	406	0,86	44,9%	1,81	2,26
metastasiert	501	1,06	52,0%	2,09	2,32
metastasiert	531	1,01	50,3%	2,01	2,3
metastasiert	493	1,14	54,6%	2,21	2,34
metastasiert	494	0,95	48,2%	1,94	2,29
metastasiert	524	0,81	43,0%	1,76	2,25
metastasiert	534	1,14	54,6%	2,21	2,34
metastasiert	542	1,06	52,0%	2,09	2,32

Anhang 2 prozentuale SNRPN Methylierung im Gewebe



Anhang

Anhang 3 Relative Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD (bereits normalisiert auf SNRPN) Patientenkollektiv 1

Gruppe	Proben-ID	KISS1R		SEPT9		CSAD	
		relative Methylierung	Lg(KISS1R)	relative Methylierung	Lg(SEPT9)	relative Methylierung	Lg(CSAD)
metastasiert	8					0,73	1,86
metastasiert	15	1,07	2,03	0,6	1,77	0,74	1,87
metastasiert	26			0,8	1,9	1,2	2,08
metastasiert	33			0,74	1,87	0,47	1,67
metastasiert	46			0,99	2	0,79	1,89
metastasiert	69	1,76	2,25	1,02	2,01	1,94	2,29
metastasiert	106	0,47	1,68	0,53	1,73	0,85	1,93
metastasiert	125	0,9	1,95	0,65	1,81	0,58	1,76
metastasiert	151			1,43	2,15	0,48	1,68
metastasiert	155	1,49	2,17	1,04	2,02	0,73	1,87
metastasiert	157	2,42	2,38	1,13	2,05	1,81	2,26
metastasiert	169	1,11	2,05	0,88	1,94	1,15	2,06
metastasiert	248	1,71	2,23	0,79	1,89	0,8	1,9
metastasiert	310			0,3	1,47	0,27	1,43
metastasiert	380			0,51	1,7	0,82	1,91
metastasiert	394	0,52	1,72	0,98	1,99	0,45	1,66
metastasiert	403	1,88	2,27	0,57	1,75	0,61	1,78
metastasiert	409			0,35	1,54	0,28	1,44
metastasiert	410	0,32	1,5	0,89	1,95	0,66	1,82
metastasiert	442	0,74	1,87	0,41	1,61	0,38	1,58
metastasiert	444			1	2	0,9	1,95
metastasiert	481			0,56	1,75	0,55	1,74
metastasiert	323	1,98	2,3	0,49	1,69	0,64	1,81
metastasiert	406	0,89	1,95	0,75	1,88	0,64	1,8
metastasiert	501	0,88	1,95	0,68	1,83	1,04	2,02

Anhang

		KISS1R		SEPT9		CSAD	
Gruppe	Proben-ID	relative Methylierung	Lg(KISS1R)	relative Methylierung	Lg(SEPT9)	relative Methylierung	Lg(CSAD)
metastasiert	531	1,77	2,25	0,99	2	1,04	2,02
metastasiert	493	0,4	1,6	0,3	1,48	0,36	1,56
metastasiert	494	0,98	1,99	0,65	1,81	0,58	1,76
metastasiert	524			1,05	2,02	1,13	2,05
metastasiert	534	1,11	2,05	0,58	1,76	0,78	1,89
metastasiert	540	1,32	2,12	1,03	2,01	1	2
metastasiert	542	0,57	1,75	0,79	1,89	1,12	2,05
nicht-metastasiert	17			0,67	1,82	0,37	1,56
nicht-metastasiert	29	0,77	1,88	0,5	1,7	0,7	1,84
nicht-metastasiert	77			0,72	1,86	0,73	1,86
nicht-metastasiert	128					0,94	1,97
nicht-metastasiert	134	0,59	1,77	0,6	1,78	0,65	1,82
nicht-metastasiert	147			0,4	1,6	0,43	1,64
nicht-metastasiert	149			0,47	1,67	0,54	1,73
nicht-metastasiert	180			0,47	1,67	0,55	1,74
nicht-metastasiert	188	0,93	1,97	0,52	1,71	0,4	1,6
nicht-metastasiert	205			0,7	1,84	0,62	1,79
nicht-metastasiert	224	0,64	1,81	0,58	1,76	0,58	1,77
nicht-metastasiert	258			0,73	1,86	0,62	1,79
nicht-metastasiert	305			0,57	1,76	0,52	1,72
nicht-metastasiert	312			0,29	1,45	0,76	1,88
nicht-metastasiert	321	0,57	1,75	0,6	1,78	0,44	1,64
nicht-metastasiert	329			0,31	1,49	0,44	1,64
nicht-metastasiert	407	0,31	1,49	0,4	1,6	0,41	1,62
nicht-metastasiert	411	0,55	1,74	0,51	1,71	0,44	1,65
nicht-metastasiert	443	0,55	1,74	0,53	1,72	0,73	1,87

Anhang

		KISS1R		SEPT9		CSAD	
Gruppe	Proben-ID	relative Methylierung	Lg(KISS1R)	relative Methylierung	Lg(SEPT9)	relative Methylierung	Lg(CSAD)
nicht-metastasiert	474			0,65	1,81	0,77	1,89
nicht-metastasiert	500	0,45	1,65	0,49	1,69	0,38	1,58
nicht-metastasiert	502			0,62	1,79	0,27	1,44

Anhang 4 Relative Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD (bereits normalisiert auf SNRPN) Patientenkollektiv 2

		KISS1R		SEPT9		CSAD	
Gruppe	Proben-ID	relative Methylierung	Lg(KISS1R)	relative Methylierung	Lg(SEPT9)	relative Methylierung	Lg(CSAD)
metastasiert	2246	0,4033	1,6057	0,5708	1,7565	0,5038	1,7023
metastasiert	3423	0,4601	1,6628	0,3694	1,5675	0,3364	1,5269
metastasiert	3809	0,4414	1,6448	0,4084	1,6111	0,7799	1,8921
metastasiert	3965	0,7474	1,8736	0,7756	1,8896	0,4931	1,6929
metastasiert	4408	0,5932	1,7732				
metastasiert	5278	0,5322	1,7261	0,5434	1,7351	0,4204	1,6237
metastasiert	5758	1,5157	2,1806	0,5885	1,7697	0,5606	1,7486
metastasiert	5797	0,7579	1,8796	0,5606	1,7486	0,446	1,6493
metastasiert	5890			0,7776	1,8907	0,6229	1,7944
metastasiert	5935	0,6974	1,8435	0,6517	1,814	0,5348	1,7282
metastasiert	6443	1,257	2,0993	0,4704	1,6725	0,6715	1,827
metastasiert	6454	1,3566	2,1325	0,5704	1,7562	0,5625	1,7501
metastasiert	6502	1,3472	2,1294	0,6329	1,8013	0,6071	1,7833
metastasiert	6904	0,5905	1,7712	0,5219	1,7176	0,6373	1,8043
nicht-metastasiert	1993	0,5586	1,7471	0,6783	1,8314	0,6878	1,8374
nicht-metastasiert	2629			0,4873	1,6878	0,5663	1,753
nicht-metastasiert	2739	0,7579	1,8796	0,7071	1,8495	0,5625	1,7501
nicht-metastasiert	4751	0,6285	1,7983	0,5244	1,7197	0,482	1,6831

Anhang

		KISS1R		SEPT9		CSAD	
Gruppe	Proben-ID	relative Methylierung	Lg(KISS1R)	relative Methylierung	Lg(SEPT9)	relative Methylierung	Lg(CSAD)
nicht-metastasiert	5650	0,4475	1,6508	0,4622	1,6649	0,4897	1,6899
nicht-metastasiert	5668	0,6113	1,7863	0,6395	1,8058	0,4813	1,6824
nicht-metastasiert	6010	0,4061	1,6087	0,6454	1,8098	0,409	1,6117
nicht-metastasiert	146	0,5105	1,708	0,1975	1,2956	0,3345	1,5244
nicht-metastasiert	3577	0,4383	1,6418	0,4155	1,6186	0,4547	1,6577
nicht-metastasiert	4403	0,551	1,7411	0,4366	1,6401	0,5093	1,707
nicht-metastasiert	4832	0,717	1,8555	0,5346	1,7281	0,3333	1,5229
nicht-metastasiert	4987	0,5	1,699	0,5824	1,7652	0,3475	1,5409
nicht-metastasiert	5036	0,5176	1,714	0,5902	1,771	0,5957	1,775
nicht-metastasiert	5381	0,2031	1,3076	0,5105	1,708	0,4791	1,6804
nicht-metastasiert	5536	0,4763	1,6779	0,4824	1,6834	0,52	1,716
nicht-metastasiert	5563	0,4897	1,6899	0,4005	1,6026	0,3463	1,5394
nicht-metastasiert	5576	0,4147	1,6177				
nicht-metastasiert	5615	0,507	1,705				
nicht-metastasiert	5703	0,6462	1,8104	0,5887	1,7699	0,3622	1,559
nicht-metastasiert	5729	0,7684	1,8856				
nicht-metastasiert	6309	0,2774	1,4431	0,5803	1,7636	0,4772	1,6787
nicht-metastasiert	6438	0,4204	1,6237	0,5052	1,7035	0,5967	1,7757
nicht-metastasiert	6485	0,7526	1,8766	0,4527	1,6558	0,3686	1,5665
nicht-metastasiert	6537	0,5	1,699				
nicht-metastasiert	6549	0,5285	1,7231	0,5871	1,7687	0,3451	1,5379

Anhang

Anhang 5 Koordinaten der ROC-Kurve für KISS1R zur Ermittlung eines geeigneten Grenzwertes (ausgewählter Grenzwert rot umrahmt)

Positiv, wenn größer oder gleich	Sensitivität	1 - Spezifität	Spezifität	Y
1,9146	,714	,111	,889	1,603
1,9810	,571	,000	1,000	1,571
1,9472	,667	,111	,889	1,556
1,8383	,762	,222	,778	1,540
2,0108	,524	,000	1,000	1,524
1,9504	,619	,111	,889	1,508
1,8767	,714	,222	,778	1,492
2,0369	,476	,000	1,000	1,476
1,9604	,571	,111	,889	1,460
2,0455	,429	,000	1,000	1,429
1,7885	,762	,333	,667	1,429
2,0831	,381	,000	1,000	1,381
2,1466	,333	,000	1,000	1,333
1,7622	,762	,444	,556	1,317
2,2022	,286	,000	1,000	1,286
1,7466	,810	,556	,444	1,254
2,2385	,238	,000	1,000	1,238
1,7532	,762	,556	,444	1,206
2,2465	,190	,000	1,000	1,190
1,7392	,810	,667	,333	1,143
2,2608	,143	,000	1,000	1,143
1,6650	,905	,778	,222	1,127
1,4990	1,000	,889	,111	1,111
2,2857	,095	,000	1,000	1,095
1,6955	,857	,778	,222	1,079
1,5513	,952	,889	,111	1,063
2,3407	,048	,000	1,000	1,048
1,7262	,810	,778	,222	1,032
1,6265	,905	,889	,111	1,016
,4942	1,000	1,000	,000	1,000
3,3838	,000	,000	1,000	1,000

Anhang

Anhang 6 Koordinaten der ROC-Kurve für SEPT9 zur Ermittlung eines geeigneten Grenzwertes (ausgewählter Grenzwert rot umrahmt)

Positiv, wenn größer oder gleich	Sensitivität	1 - Spezifität	Spezifität	Y
1,8660	,548	,000	1,000	1,548
1,8724	,516	,000	1,000	1,516
1,8597	,548	,048	,952	1,501
1,8853	,484	,000	1,000	1,484
1,8503	,548	,095	,905	1,453
1,8293	,581	,143	,857	1,438
1,8998	,419	,000	1,000	1,419
1,8010	,645	,238	,762	1,407
1,8391	,548	,143	,857	1,406
1,8179	,581	,190	,810	1,390
1,9244	,387	,000	1,000	1,387
1,8106	,613	,238	,762	1,375
1,7838	,645	,286	,714	1,359
1,9467	,355	,000	1,000	1,355
1,8112	,581	,238	,762	1,343
1,7239	,806	,476	,524	1,330
1,9708	,323	,000	1,000	1,323
1,7756	,645	,333	,667	1,312
1,7374	,774	,476	,524	1,298
1,7697	,677	,381	,619	1,296
1,9937	,290	,000	1,000	1,290
1,7177	,806	,524	,476	1,283
1,7600	,710	,429	,571	1,281
1,7517	,742	,476	,524	1,266
1,7749	,645	,381	,619	1,264
1,9954	,258	,000	1,000	1,258
1,7642	,677	,429	,571	1,249
1,7097	,806	,571	,429	1,235
1,7555	,710	,476	,524	1,233
1,9985	,226	,000	1,000	1,226
1,7003	,839	,619	,381	1,220
1,6928	,871	,667	,333	1,204
2,0052	,194	,000	1,000	1,194
1,7050	,806	,619	,381	1,187
1,6950	,839	,667	,333	1,172
2,0109	,161	,000	1,000	1,161
1,6834	,871	,714	,286	1,157
2,0145	,129	,000	1,000	1,129
1,6716	,871	,762	,238	1,109
2,0177	,097	,000	1,000	1,097
1,6080	,903	,810	,190	1,094
2,0353	,065	,000	1,000	1,065
1,6406	,871	,810	,190	1,061
1,4645	1,000	,952	,048	1,048
1,6015	,903	,857	,143	1,046
2,1028	,032	,000	1,000	1,032
1,5159	,935	,905	,095	1,031
1,4778	,968	,952	,048	1,015
,4548	1,000	1,000	,000	1,000
3,1541	,000	,000	1,000	1,000
1,5695	,903	,905	,095	,998
1,4871	,935	,952	,048	,983

Anhang

Anhang 7 Koordinaten der ROC-Kurve für CSAD zur Ermittlung eines geeigneten Grenzwertes (ausgewählter Grenzwert rot umrahmt)

Positiv, wenn größer oder gleich	Sensitivität	1 - Spezifität	Spezifität	Y
1,8887	,469	,045	,955	1,423
1,8654	,531	,136	,864	1,395
1,8929	,438	,045	,955	1,392
1,8621	,563	,182	,818	1,381
1,8831	,469	,091	,909	1,378
1,8675	,500	,136	,864	1,364
1,8984	,406	,045	,955	1,361
1,8642	,531	,182	,818	1,349
1,7976	,656	,318	,682	1,338
1,8527	,563	,227	,773	1,335
1,8745	,469	,136	,864	1,332
1,9071	,375	,045	,955	1,330
1,7380	,781	,455	,545	1,327
1,8169	,594	,273	,727	1,321
1,8052	,625	,318	,682	1,307
1,9198	,344	,045	,955	1,298
1,7504	,750	,455	,545	1,295
1,7899	,656	,364	,636	1,293
1,8314	,563	,273	,727	1,290
1,6503	,875	,591	,409	1,284
1,7352	,781	,500	,500	1,281
1,9863	,281	,000	1,000	1,281
1,7741	,688	,409	,591	1,278
1,8105	,594	,318	,682	1,276
1,9396	,313	,045	,955	1,267
1,7616	,719	,455	,545	1,264
1,6650	,844	,591	,409	1,253
2,0087	,250	,000	1,000	1,250
1,7860	,656	,409	,591	1,247
1,6449	,875	,636	,364	1,239
1,7246	,781	,545	,455	1,236
1,9615	,281	,045	,955	1,236
1,7638	,688	,455	,545	1,233
1,6776	,813	,591	,409	1,222
2,0166	,219	,000	1,000	1,219
1,6425	,875	,682	,318	1,193
1,6978	,781	,591	,409	1,190
2,0329	,188	,000	1,000	1,188
2,0506	,156	,000	1,000	1,156
1,6390	,875	,727	,273	1,148
2,0561	,125	,000	1,000	1,125
1,6267	,875	,773	,227	1,102
2,0696	,094	,000	1,000	1,094
2,1683	,063	,000	1,000	1,063
1,6074	,875	,818	,182	1,057
1,5786	,906	,864	,136	1,043
2,2725	,031	,000	1,000	1,031
1,4377	,969	,955	,045	1,014
1,5904	,875	,864	,136	1,011
,4314	1,000	1,000	,000	1,000
3,2876	,000	,000	1,000	1,000
1,5693	,906	,909	,091	,997
1,4978	,938	,955	,045	,983
1,4338	,969	1,000	,000	,969
1,5599	,906	,955	,045	,952

Anhang

Anhang 8 C_T -Werte der quantitativen Methylierungsanalyse von KISS1R, SEPT9 und CSAD in Harnblasenkarzinom-Zelllinien sowie Berechnung des Methylierungsniveaus

Gen	Zelllinien	Verdau	C_T	ΔC_T (Verdau-Mock)	Methylierung[%]
KISS1R	RT4	Mock	27,22	0,98	49%
		McrBc	28,20		
	RT112	Mock	27,99	3,84	93%
		McrBc	31,83		
	T24	Mock	31,30	8,42	100%
		McrBc	39,71		
	253J B-V	Mock	33,43	6,57	99%
		McrBc	40,00		
SEPT9	RT4	Mock	25,70	1,09	53%
		McrBc	26,79		
	RT112	Mock	24,92	2,17	78%
		McrBc	27,08		
	T24	Mock	26,13	1,70	69%
		McrBc	27,83		
	253J B-V	Mock	26,31	1,79	71%
		McrBc	28,10		
CSAD	RT4	Mock	27,39	0,94	48%
		McrBc	28,33		
	RT112	Mock	25,13	0,25	16%
		McrBc	25,39		
	T24	Mock	27,95	2,54	83%
		McrBc	30,49		
	253J B-V	Mock	28,01	2,31	80%
		McrBc	30,32		

Anhang 9 ΔC_T -Werte und Berechnung der relativen Expression und Methylierung von KISS1R, SEPT9 und CSAD in Harnblasenkarzinom-Zelllinien ohne und mit Behandlung mit 5-Aza-2'deoxycytidin

Zelllinie (5Aza-dC Zugabe)	KISS1R						
	Expression			Methylierung			
	ΔC_T	relativ	fold change	ΔC_T	Methylierung [%]	relativ	fold change
RT4 (-)	9,94	1,02E-03	1,00	0,98	49%	1,98	1,00
RT4 (+)	4,38	4,79E-02	47,16	0,48	28%	1,39	0,71
RT112 (-)	11,56	3,31E-04	1,00	3,84	93%	14,35	1,00
RT112 (+)	4,39	4,78E-02	144,27	2,94	87%	7,70	0,54
T24 (-)	22,61	1,56E-07	1,00	8,42	100%	341,50	1,00
T24 (+)	6,67	9,81E-03	62992,37	0,61	35%	1,53	0,00
253J B-V (-)	12,35	1,92E-04	1,00	6,57	99%	94,68	1,00
253J B-V (+)	6,27	1,29E-02	67,39	2,77	85%	6,81	0,07
Zelllinie (5Aza-dC Zugabe)	SEPT9						
	Expression			Methylierung			
	ΔC_T	relativ	fold change	ΔC_T	Methylierung [%]	relativ	fold change
RT4 (-)	7,75	0,00	1,00	1,09	53%	2,12	1,00
RT4 (+)	0,75	0,59	127,33	0,87	45%	1,83	0,86
RT112 (-)	5,26	0,03	1,00	2,17	78%	4,49	1,00
RT112 (+)	1,20	0,44	16,79	1,37	61%	2,58	0,58
T24 (-)	5,69	0,02	1,00	1,70	69%	3,24	1,00
T24 (+)	1,16	0,45	23,03	0,58	33%	1,50	0,46
253J B-V (-)	0,76	0,59	1,00	1,79	71%	3,46	1,00
253J B-V (+)	0,17	0,89	1,50	0,51	30%	1,42	0,41
Zelllinie (5Aza-dC Zugabe)	CSAD						
	Expression			Methylierung			
	ΔC_T	relativ	fold change	ΔC_T	Methylierung [%]	relativ	fold change
RT4 (-)	7,10	0,01	1,00	0,94	48%	1,92	1,00
RT4 (+)	4,13	0,06	7,82	0,42	25%	1,33	0,69
RT112 (-)	5,95	0,02	1,00	0,25	16%	1,19	1,00
RT112 (+)	5,30	0,03	1,57	-0,46	-38%	0,73	0,61
T24 (-)	7,17	0,01	1,00	2,54	83%	5,83	1,00
T24 (+)	6,64	0,01	1,45	0,93	48%	1,91	0,33
253J B-V (-)	8,58	0,00	1,00	2,31	80%	4,95	1,00
253J B-V (+)	5,55	0,02	8,19	1,34	61%	2,53	0,51

Anhang 10 C_T-Werte und Berechnung der relativen Expression der SEPT9 Transkriptionsvarianten in T24 Zellen (Mock) und nach Behandlung mit 1µM und 5µM 5-Aza-2'deoxyctidin

Transkript-variante	5Aza-dC	Amplifikat	MW C _T	ΔC _T	relative Expression	fold-change
SEPT9v1	Mock	HMBS	20,98	-0,52	1,43E+00	1,00
		SEPT9v1	20,46			
	1µM Aza	HMBS	21,15	-0,22	1,16E+00	0,82
		SEPT9v1	20,93			
	5µM Aza	HMBS	20,98	-0,37	1,29E+00	0,90
		SEPT9v1	20,61			
SEPT9v3	Mock	HMBS	23,66	6,14	1,42E-02	1,00
		SEPT9v3	29,80			
	1µM Aza	HMBS	23,95	1,19	4,39E-01	30,98
		SEPT9v3	25,14			
	5µM Aza	HMBS	23,95	1,13	4,58E-01	32,30
		SEPT9v3	25,07			
SEPT9v4	Mock	HMBS	23,66	14,03	5,96E-05	1,00
		SEPT9v4	37,70			
	1µM Aza	HMBS	23,95	7,17	6,94E-03	116,43
		SEPT9v4	31,12			
	5µM Aza	HMBS	23,95	7,00	7,83E-03	131,29
		SEPT9v4	30,94			

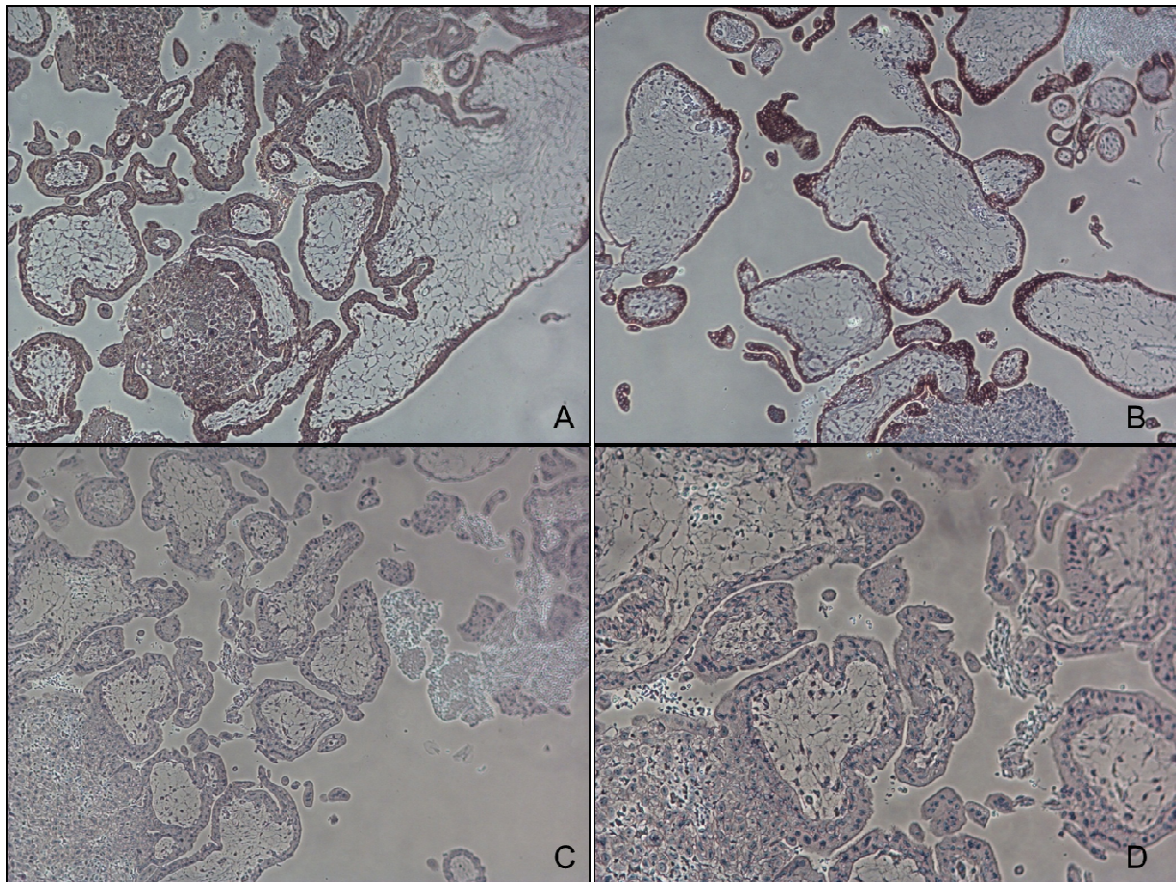
Anhang 11 Ergebnisse der RIN-Faktor Messung

Proben-ID	RIN-Faktor
4832	0
5703	0
6904	0
6438	1,7
4527	2,2
3809	2,4
3423	2,5
4403	2,5
3577	2,8
5650	3,1
4751	3,7
5935	4,2
5568	4,5
2246	4,9
5036	5,1
2629	5,5
5890	5,5
6010	5,5
2739	6,5
6309	6,5
6443	7,6
5381	7,8
5729	8,0
5563	9,1
5797	9,2

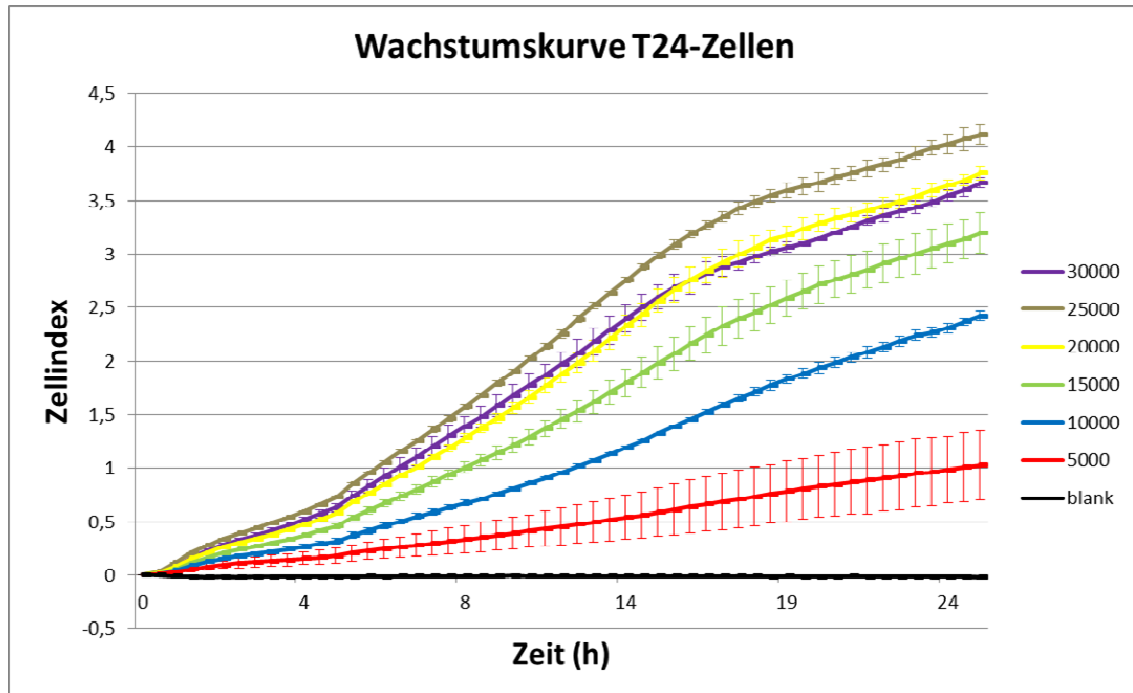
Anhang 12 Relative mRNA-Expression von KISS1R, SEPT9 und CSAD im Primärtumorgewebe

Gruppe	Proben-ID	KISS1R	SEPT9v3	CSAD
metastasiert	2629	3,1E-06	7,6E-01	4,9E-02
metastasiert	2739	1,6E-06	2,4E-01	3,7E-02
metastasiert	5797	7,9E-04	9,1E-01	1,2E-01
metastasiert	5890	4,0E-03	4,9E+00	3,3E-02
metastasiert	6010	2,2E-03	2,8E+00	4,0E-02
metastasiert	6443	2,2E-04	1,3E-01	4,0E-02
nicht-metastasiert	5036	2,5E-03	1,4E+00	6,0E-02
nicht-metastasiert	5381	7,3E-03	1,8E-01	8,0E-03
nicht-metastasiert	5563	8,8E-04	1,7E+00	3,4E-02
nicht-metastasiert	5729	1,6E-02	2,2E+00	5,4E-02
nicht-metastasiert	6309	3,3E-02	3,7E+00	2,3E-02

Anhang 13 **Positivkontrolle (A,B) und Negativkontrolle (C,D) der immunhistochemischen Färbungen von KISS1R (A,C) und KISS-1 (B,D)**



Anhang 14 Echtzeit-Zellanalyse Wachstumskurven T24 Zellen zur Ermittlung der geeigneten Zellzahl für Funktionsanalysen im RTCA-Gerät



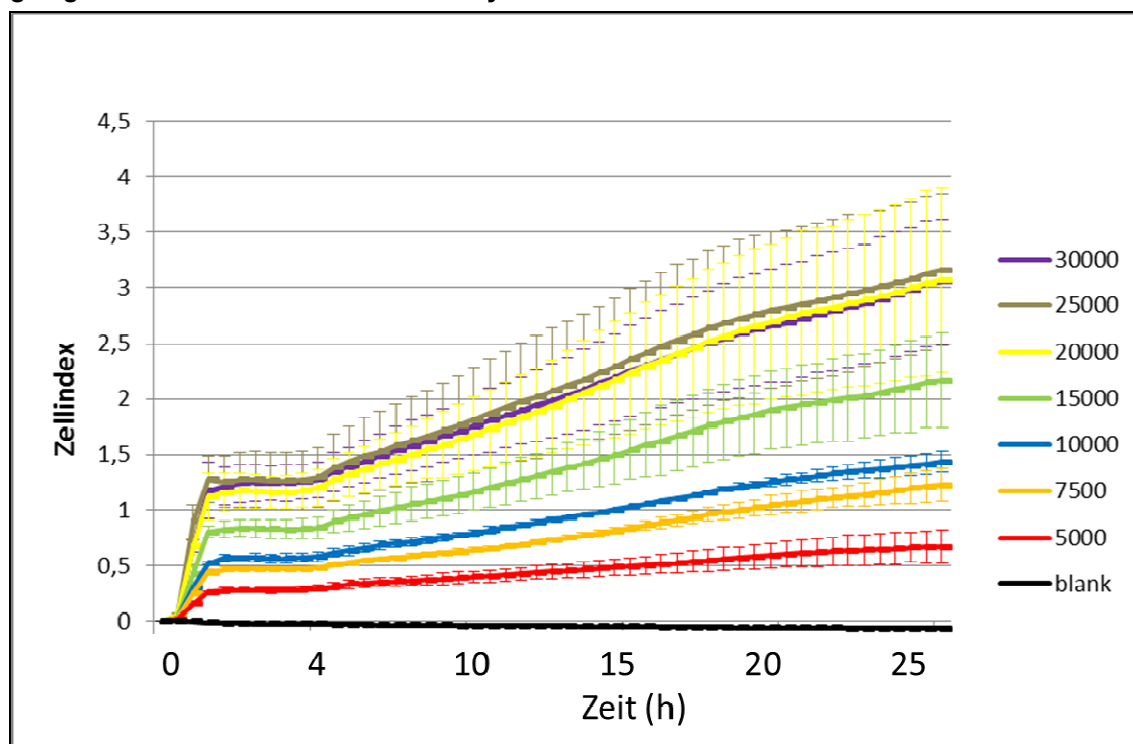
Anhang 15 Prozentuale Werte der Funktionsuntersuchungen nach KISS1R-Überexpression

Ansatz	Proliferation	Migration	Invasion
Mock	77,36	78,89	79,84
	122,64	121,11	120,16
	106,55	74,43	88,83
	80,80	125,54	97,48
	112,65	100,03	113,69
	94,57	111,77	92,81
	106,18	75,78	76,30
	99,25	112,45	130,90
KISS1R cDNA	86,19	82,43	55,63
	112,66	105,28	118,18
	112,65	93,28	238,99
	129,57	175,06	189,58
	99,25	77,96	105,05
	81,46	33,16	101,97

Anhang 16 Ergebnisse der SEPT9-mRNA-Expression nach siRNA Transfektion

PCR Ergebnisse						
	C _T ATP5B	Mittelwert	STD	C _T SEPT9	Mittelwert	STD
siRNA NK	15,36	14,90	0,36	21,31	20,96	0,50
	15,00			20,32		
	14,70			20,82		
	14,55			21,40		
siRNA SEPT9	15,14	14,70	0,30	24,16	22,96	1,14
	14,58			21,42		
	14,45			23,26		
	14,64			23,01		
Berechnung der relativen Expression						
	ΔC _T (SEPT9-ATP5B)	relative Expression	Expression [%]	Mittelwert	STD	
siRNA NK	5,95	0,016	100,70	100,00	42,22	
	5,32	0,025	155,84			
	6,12	0,014	89,50			
	6,85	0,009	53,96			
siRNA SEPT9	9,02	0,002	11,99	24,75	19,93	
	6,84	0,009	54,34			
	8,81	0,002	13,87			
	8,37	0,003	18,82			

Anhang 17 Echtzeit-Zellanalyse Wachstumskurven 253J B-V Zellen zur Ermittlung der geeigneten Zellzahl für Funktionsanalysen im RTCA-Gerät



Anhang 18 Prozentuale Werte der Funktionsuntersuchungen nach SEPT9- Expressionsinhibierung

Ansatz	Proliferation	Migration	Invasion
Negativkontroll-siRNA	77,24	115,04	85,06
	110,43	89,83	116,32
	112,34	95,12	98,61
	72,27	100,86	101,46
	166,27	115,81	102,56
	61,46	83,34	95,97
	147,45	73,39	81,58
	132,15	146,62	107,27
	159,16	80,00	111,15
SEPT9-siRNA	89,28	92,56	112,62
	110,11	133,76	138,40
	100,60	105,63	105,68
	102,63	105,90	98,05
	155,47	138,85	112,91
	187,17	194,85	130,83
	97,36	116,93	120,03
	121,79	138,41	132,79
	175,52	126,76	145,40

Publikationsliste

Erstautorschaft:

Stubendorff B, Finke S, Walter M, Kniemeyer O, von Eggeling F, Gruschwitz T, Steiner T, Ott U, Wolf G, Wunderlich H, Junker K.

Urine protein profiling identified alpha-1-microglobulin and haptoglobin as biomarkers for early diagnosis of acute allograft rejection following kidney transplantation

World Journal of Urology, 2014 Feb 19.

publizierte Abstracts

Vorhersage der Rejektion nach Nierentransplantation durch spezifische Proteinmuster in Serum und Urin

B. Stubendorff, R. Pilchowski, T. Steiner, U. Ott, O. Reichelt, J. Schubert, K. Junker
Urologe, 2009, Ausgabe 48, [Suppl 1], 7-131

Protein Profiling in Serum and Urine from Patients with Rejection after Kidney Transplantation

K. Junker, B. Stubendorff, R. Pilchowski, U. Ott, O. Reichelt, G. Wolf, J. Schubert, T. Steiner
European Urology Supplements, 2009, Volume 08, Issue 4, Page 268

Proteomic and Epigenetic Characterization of Tumor Associated Fibroblasts (TAF) in Urinary Bladder Carcinoma

A. Enkelmann, J. Heinzelmann, B. Stubendorff, D. Steinbach, H. Wunderlich, K. Junker
The Journal of Urology, 2010, Volume 183, Issue 4, e308

Proteinsignatur im Urin zeigt frühzeitige Rejektion nach Nierentransplantation

S. Finke, B. Stubendorff, T. Steiner, U. Ott, H. Wunderlich, T. Gruschwitz, F. von Eggeling, K. Junker
Urologe, 2010, Ausgabe 49, [Suppl 1], 9-145

Protein signature in urine indicates rejection after kidney transplantation at an early postoperative state

B. Stubendorff, S. Finke, T. Gruschwitz, T. Steiner, U. Ott, F. von Eggeling, H. Wunderlich, M. Grimm, K. Junker
European Urology Supplements, 2011, Volume 10, Issue 2, Page 137

Definition eines Methylierungsmusters zur Prognosebewertung von metastasierten Harnblasentumoren

Stubendorff B, Dudziec E, Bourghol G, Catto J, Wunderlich H, Gajda M, Junker K
Urologe, 2011, Ausgabe 50, 85-99

A specific DNA methylation pattern distinguishes between metastatic and non-metastatic bladder cancers

B. Stubendorff, E. Dudziec, J. Catto, J. Sanjmyatav, M. Gajda, M.-O. Grimm, K. Junker
The Journal of Urology, 2011, Volume 185, Issue 4, e348
Urologe, 2011, Ausgabe 50, [Suppl 1], 9-162
Urologe, 2012, Ausgabe 51, 99-118

Differences in DNA methylation pattern of primary bladder tumours correlate with their metastatic potential

B. Stubendorff, E. Dudziec, J. Catto, J. Sanjmyatav, M. Gajda, H. Wunderlich, M.-O. Grimm, K. Junker

Urologe, 2012, Ausgabe 51, [Suppl 1], 12-151

European Urology Supplements, 2012, Volume 11, Issue 1, Page e166

The Journal of Urology, 2012, Volume 187, Issue 4, e428-e429

Cancer Research, 2012, Volume 72

Differences in protein properties of postoperative urine samples enable the prediction of early allograft rejection

S. Finke, B. Stubendorff, M. Walter, Th. Steiner, Gunter Wolf, F. von Eggeling, T. Gruschwitz, M.-O. Grimm, K. Junker, H. Wunderlich

Urologe, 2012, Ausgabe 51, [Suppl 1], 12-151

European Urology Supplements, 2012, Volume 11, Issue 1, Page e210

The Journal of Urology, 2012, Volume 187, Issue 4, e862

Proteinsignatur im Urin ermöglicht eine nichtinvasive frühzeitige Vorhersage der Rejektion nach Nierentransplantation

S. Finke, B. Stubendorff, M. Walter, T. Steiner, G. Wolf, F. von Eggeling, T. Gruschwitz, M.-O. Grimm, K. Junker, H. Wunderlich

Urologe, 2012, Ausgabe 51, 99-118

Specific changes in the DNA methylation pattern enable an early assessment of the metastatic risk of primary bladder tumours

B. Stubendorff, K. Wilhelm, S. Dubey, E. Dudziec, J. Catto, M. Gajda, H. Wunderlich, M.-O. Grimm, K. Junker

Urologe, 2013, Ausgabe 52, [Suppl 1], 10-151

European Urology Supplements, 2013, Volume 12, Issue 1, Page e56

The Journal of Urology, 2013, Volume 189, Issue 4, e456

Promoter hypermethylation of KISS1R, KiSS1, SEPT9 and CSAD as a prognostic biomarker panel to assess the metastatic potential of muscle invasive bladder tumors

B. Stubendorff, K. Wilhelm, K. Posselt, J. Catto, A. Hartmann, S. Füssel, M. Gajda, H. Wunderlich, M.-O. Grimm, K. Junker

European Urology Supplements, 2014, Volume 13, Issue 1, e43

The Journal of Urology, 2014, Volume 191, Issue 4, e298

Urine protein profiling identified Alpha-1-microglobulin and Haptoglobin as biomarkers for early diagnosis of acute allograft rejection following kidney transplantation

B. Stubendorff, S. Finke, M. Walter, O. Kniemeyer, F. von Eggeling, T. Gruschwitz, T. Steiner, U. Ott, G. Wolf, H. Wunderlich, K. Junker

European Urology Supplements, 2014, Volume 13, Issue 1, Page e910

The Journal of Urology, 2014, Volume 191, Issue 4, e776-e777

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Prof. Dr. Kerstin Junker für die Möglichkeit der Anfertigung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie für die großzügige Unterstützung während all der Jahre und ausgezeichnete Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Unteregger bedanke ich mich für die Erstbegutachtung dieser Arbeit.

Außerdem gilt mein herzlichster Dank den Mitarbeitern der Forschungslabore in Jena, Sheffield und Homburg, mit denen die Zusammenarbeit immer großen Spaß gemacht hat und die mir stets fachlich und moralisch beigestanden haben.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für deren Unterstützungen in jeglicher Hinsicht bedanken.