

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Metastasierungsspezifische Veränderungen im DNA-  
Methylierungsmuster von KISS1R und EPHB3 im  
muskelinvasiven Harnblasenkarzinom**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Anja Nathalie Swienty  
geb. am 21.12.1990 in Saarlouis

Tag der Promotion: 21.11.2023

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Kerstin Junker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Lorenz Thurner

# Inhaltsverzeichnis

## I Zusammenfassung

## II Summary

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Harnblasenkarzinom .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie .....	1
1.1.3	Klinik und Diagnostik .....	2
1.1.4	Klassifikation .....	3
1.1.5	Pathologie .....	5
1.1.6	Therapie.....	6
1.1.7	Molekulare Entstehungswege des Harnblasenkarzinoms.....	7
1.2	Molekulare Subtypen des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms .....	10
1.3	Epigenetik .....	11
1.3.1	DNA-Methylierung.....	11
1.3.2	DNA-Methylierung in Tumoren .....	14
1.3.3	DNA-Methylierung im Harnblasenkarzinom.....	16
1.4	Zielstellung .....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Geräte .....	20
2.1.2	Chemikalien und Laborreagenzien .....	20
2.1.3	Kits.....	20
2.1.4	Oligonukleotide .....	20
2.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.6	Patientenmaterial .....	21
2.2	Methoden .....	23
2.2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden .....	23
2.2.1.1	Verwendete Zelllinien .....	23

2.2.1.2	Subkultivierung .....	23
2.2.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	24
2.2.1.4	Ernten von Zellen .....	24
2.2.1.5	Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin .....	25
2.2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2.1	RNA-Isolation .....	25
2.2.2.2	DNA-Isolation .....	26
2.2.2.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	26
2.2.3	mRNA-Expressionsanalysen.....	28
2.2.4	Quantitative Analyse der DNA-Methylierung .....	29
2.2.5	Funktionelle Analysen .....	30
2.2.5.1	Transiente Inhibierung von KISS1R.....	30
2.2.5.2	Echtzeit-Zellanalysen.....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Einfluss von 5-Aza-2'-deoxycytidin auf die mRNA-Expression von EPHB3 in Harnblasenkarzinomzelllinien .....	33
3.2	DNA-Methylierung der Kandidatengene in Harnblasenkarzinomzelllinien.....	34
3.3	DNA-Methylierung der Kandidatengene im primären Harnblasenkarzinomgewebe	36
3.3.1	EPHB3 .....	36
3.3.2	KISS1R .....	39
3.4	Funktionsanalysen .....	41
3.4.1	Transiente Inhibierung der Expression von KISS1R.....	41
3.4.2	Expression von KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien .....	41
3.4.3	Transfektionseffizienz.....	43
3.5	Funktionsanalysen .....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1	Physiologische Funktionen der Kandidatengene .....	49
4.1.1	EPHB3 .....	49
4.1.2	KISS1R .....	51

4.2	Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression in Harnblasenkarzinomzelllinien .....	53
4.2.1	EPHB3 .....	53
4.2.2	KISS1R .....	55
4.3	Korrelation der DNA-Methylierung der Kandidatengene im Primärtumorgewebe mit Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus .....	56
4.3.1	EPHB3 .....	56
4.3.2	KISS1R .....	56
4.4	Funktioneller Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse .....	59
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	62
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>83</b>

## I Zusammenfassung

Die epigenetische Inaktivierung von Genen durch Promotorhypermethylierung kann zur Entstehung und Metastasierung von Tumoren beitragen. Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster gelten als hoch sensitiv und sind bereits frühzeitig nachweisbar. Auch im Harnblasenkarzinom konnten diese Veränderungen nachgewiesen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse metastasierungsspezifischer Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster der beiden ausgewählten Gene EPHB3 und KISS1R im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom.

Der Zusammenhang zwischen Genexpression und Promotorhypermethylierung der beiden Gene wurde an Harnblasenkarzinomzelllinien und im Primärtumorgewebe untersucht.

Für EPHB3 zeigte sich nach Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-deoxycytidin eine signifikante Zunahme der Genexpression in der Zelllinie RT-112. Die Annahme, dass die passive Demethylierung der Promotorregion zu einer Reexpression des Gens führte, konnte in den anschließenden Methylierungsanalysen widerlegt werden. Die Ergebnisse wiesen auf eine unmethylierte Promotorregion von EPHB3 hin. Eine Untersuchung der Funktion von EPHB3 in metastasierungsassoziierten Prozessen schien daher nicht sinnvoll.

Die Methylierungsanalysen von KISS1R in der Zelllinie T24 deuteten auf eine methylierte Promotorregion des Gens hin. Nach Herabregulation der Genexpression von KISS1R in der Zelllinie 5637 konnte in Funktionsanalysen jedoch kein Einfluss auf metastasierungsassoziierte Prozesse nachgewiesen werden.

In Harnblasentumorgewebe aus Zystektomiepräparaten konnte eine Korrelation der relativen Methylierung von KISS1R zu positivem Lymphknotenstatus festgestellt werden. Mit Hilfe der derzeit verfügbaren diagnostischen Methoden ist eine individuelle Beurteilung des Metastasierungsrisikos und eine individuelle Prognoseeinschätzung für Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom nicht möglich. Der Methylierungsstatus von KISS1R könnte in Zukunft als prognostischer Marker zur Selektion von Patienten mit erhöhtem Risiko für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen eingesetzt werden, um so eine individuelle Therapieplanung zu ermöglichen.

## II Summary

Epigenetic silencing of genes by promoter hypermethylation may contribute to tumorigenesis and metastasis. Alterations in the DNA methylation pattern are considered highly sensitive and can be detected at an early stage. These changes could also be found in urinary bladder carcinoma.

The aim of the present study was to analyze metastasis-specific alterations in the DNA methylation pattern of the two selected genes EPHB3 and KISS1R in muscle-invasive bladder cancer.

The correlation between gene expression and promoter hypermethylation of the two genes was investigated in urinary bladder carcinoma cell lines and primary tumor tissue.

For EPHB3, the cell line RT-112 showed a significant increase in gene expression after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. The assumption that passive demethylation of the promoter region led to re-expression of the gene was disproven in subsequent methylation analyses. The results indicated a nonmethylated promoter region of EPHB3. Therefore, an investigation of the function of EPHB3 in metastasis-associated processes did not seem reasonable.

Methylation analyses of KISS1R in the T24 cell line indicated a methylated promoter region of the gene. However, after downregulation of KISS1R gene expression in cell line 5637, no effect on metastasis-associated processes was detected in functional analyses.

In urinary bladder tumor tissue taken at the time of cystectomy, a correlation of relative methylation of KISS1R to positive lymph node status was detected. Using currently available diagnostic methods, an individualized assessment of metastatic risk and prognosis assessment for patients with muscle-invasive bladder cancer is not possible. In the future, the methylation status of KISS1R could be used as a prognostic marker to select patients at increased risk for the occurrence of lymph node metastases, thus enabling individualized therapy planning.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist mit etwa 573.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die am zehnthäufigsten diagnostizierte Tumorerkrankung. Im Jahr 2020 verstarben weltweit schätzungsweise 213.000 Menschen krankheitsbedingt durch ein Harnblasenkarzinom [1]. Es gibt starke globale Unterschiede in der Inzidenz, wobei die Erkrankungsraten in hoch entwickelten Nationen am höchsten sind. Das Geschlechterverhältnis von Männern zu Frauen beträgt 4:1 [1]. In Deutschland erkrankten nach Angaben des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2018 etwa 18.270 Personen an einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom, wobei etwa ein Viertel davon Frauen waren [2]. 5638 Menschen verstarben 2019 an den Folgen der Erkrankung. Die Erkrankungsrate stieg mit dem Alter an. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 75 Jahren für Männer und 76 Jahren für Frauen. Bei Männern sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten seit 1990 rückläufig, was am ehesten auf eine Verringerung des Tabakkonsums und eine geringere berufliche Exposition gegenüber Karzinogenen zurückzuführen ist. Beide Raten verliefen bei Frauen über die Jahre hinweg konstant, wobei sie jedoch deutlich niedriger lagen als bei den Männern. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag bei Männern höher als bei Frauen (59 % vs. 48 %), was auf eine günstigere Verteilung der Tumorstadien zurückzuführen ist [2].

### 1.1.2 Ätiologie

Das Rauchen von Tabak gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Harnblasentumoren. Etwa 50 - 60 % der Fälle bei Männern und 20 - 30 % der Fälle bei Frauen sind auf Tabakkonsum zurückzuführen. Im Vergleich zu Nichtrauchern haben Raucher ein vierfach erhöhtes Risiko und ehemalige Raucher ein zweifach erhöhtes Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken [3]. Die Dauer des Tabakkonsums und die Menge an Zigaretten pro Tag korrelieren dabei linear mit dem Risiko für Harnblasenkarzinome. Nach Aufgabe des Rauchens sinkt das Risiko um 30 % nach 1 - 4 Jahren und um 60 % nach 25 Jahren, wobei das Risikolevel eines Nichtrauchers auch nach langer Karenz nicht erreicht wird [4]. Auch die Exposition gegenüber Tabakrauch im Kindesalter führt zu einer Erhöhung des Risikos, wohingegen für die Exposition im Erwachsenenalter kein Effekt festgestellt werden konnte [5].

Die berufsbedingte Exposition gegenüber aromatischen Aminen, polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen und Chlorkohlenwasserstoffen wird als zweitwichtigster Risikofaktor angesehen, mit dem etwa 20 % aller Harnblasenkarzinome assoziiert sind. In zahlreichen

Berufen, vor allem in der Chemie-, Farbstoff-, Leder- und Metallindustrie, kommt es häufig zu Kontakt mit diesen Kanzerogenen [6]. In den letzten Jahren konnte aufgrund von verbesserten Arbeitsbedingungen und Sicherheitsvorkehrungen das Ausmaß der Exposition zu diesen Stoffen verringert werden, aber aufgrund der langen Latenzzeit treten noch heute aminbedingte Harnblasenkarzinome auf.

Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und dem Auftreten von Harnblasenkarzinomen hergestellt werden. Sequenzvariationen auf den Chromosomen 8q24 und 4p16.3 führen zu einer erhöhten Anfälligkeit für Harnblasentumore [7; 8]. Aromatische Amine im Tabakrauch werden durch die N-Acetyltransferase 2 abgebaut. Durch Polymorphismen im NAT2-Gen treten Phänotypen mit verminderter Aktivität dieses Enzyms auf. Diese „langsamen Acetylierer“ weisen ein im Vergleich zu „schnellen Acetylierern“ ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf [9].

Ebenso können Strahlen- und Brachytherapie im kleinen Beckenbereich das Risiko für das Auftreten von Zweitmalignomen in der Harnblase erhöhen [10].

Chronische Entzündungen der ableitenden Harnwege oder die Bilharziose (eine chronische Infektion der Harnblase mit dem Parasit *Schistosoma haematobium*) sind ebenso Risikofaktoren, die zur Bildung von Plattenepithelkarzinomen in der Harnblase beitragen [6].

### **1.1.3 Klinik und Diagnostik**

Das klassische Leitsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie. Einige Erkrankungen verlaufen symptomlos und werden nur durch Abklärung einer Mikrohämaturie oder Leukozyturie diagnostiziert. Ebenso können länger andauernde zystitische Beschwerden oder unklare Miktionsbeschwerden wie Dysurie, Pollakisurie oder Urgesymptomatik durch Tumore der Harnblase verursacht werden und bedürfen weiterer Abklärung. Im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung kann es durch Verlegung der Harnleiterostien durch den Tumor zu Harnstauungsniere und damit verbundenen Flankenschmerzen kommen. Des Weiteren können im fortgeschrittenen Stadium tumorbedingte Beschwerden wie Gewichtsverlust und Nachtschweiß oder Knochenschmerzen bei ossärer Metastasierung auftreten.

Die Diagnostik beginnt typischerweise mit der Anamnese, in der unter anderem Hämaturie, Miktionsbeschwerden, Risikofaktoren und die beruflich bedingte Exposition gegenüber Karzinogenen erfragt werden sollten. Die körperliche Untersuchung sollte die Beurteilung der Nierenlager, die Palpation des Abdomens und die digital-rektale sowie bimanuelle vaginale Untersuchung zum Ausschluss einer Tumorfixation im kleinen Becken beinhalten. Mittels Sonographie von Nieren und Harnblase können differentialdiagnostisch ein Harnstau oder Nierensteine als Ursache der Hämaturie ausgeschlossen werden. Große, exophytisch wachsende Blasen-tumore können sonographisch bei voller Blase dargestellt werden. Kleine

Tumore sind meist selten zu erkennen, weshalb weitere diagnostische Maßnahmen unerlässlich sind.

Die Urethrozystoskopie stellt den Goldstandard in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms dar. Werden bei der Untersuchung Tumore in der Blase entdeckt, werden deren Anzahl und Lokalisation dokumentiert und eine transurethrale Resektion des Tumors (TUR-B) geplant. Durch Fluoreszenz-Zystoskopie kann die Erkennung von Ta- und T1-Läsionen verbessert werden [11]. Hierfür wird der Fluoreszenzfarbstoff Hexaminolävulinat für mindestens eine Stunde in die Blase instilliert und anschließend eine Zystoskopie mit Blaulicht (375 – 440 nm Wellenlänge) durchgeführt. Unklare Befunde in der Weißlichtendoskopie können so detektiert und gleichzeitig reseziert werden.

Bei Auftreten von Makrohämaturien und unauffälliger Urethrozystoskopie sollten weitere diagnostische Maßnahmen erfolgen. Hierzu gehören das Urogramm zur Beurteilung der ableitenden Harnwege sowie die Computertomographie, mit der die lokale Tumorausbreitung und die Infiltration von Nachbarorganen festgestellt werden können. Die Urinzytologie zählt zu den meist genutzten, nichtinvasiven Maßnahmen. Abgeschilferte Tumorzellen im Urin können dabei mikroskopisch nachgewiesen und ihr Differenzierungsgrad beurteilt werden. Das Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aber eine geringe Sensitivität aus. Die Urinzytologie ist sehr zuverlässig bei G2- und G3-Tumoren, wohingegen die Sensitivität bei G1-Tumoren gering ist. Die Untersuchung ist sehr subjektiv und abhängig von der Erfahrung des Betrachters [12]. Entzündungen der Blasenschleimhaut können zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Letztendlich wird die Diagnose des Harnblasenkarzinoms durch endoskopische Resektion des Tumors und nachfolgender Begutachtung der Gewebeproben durch einen Pathologen gestellt.

#### **1.1.4 Klassifikation**

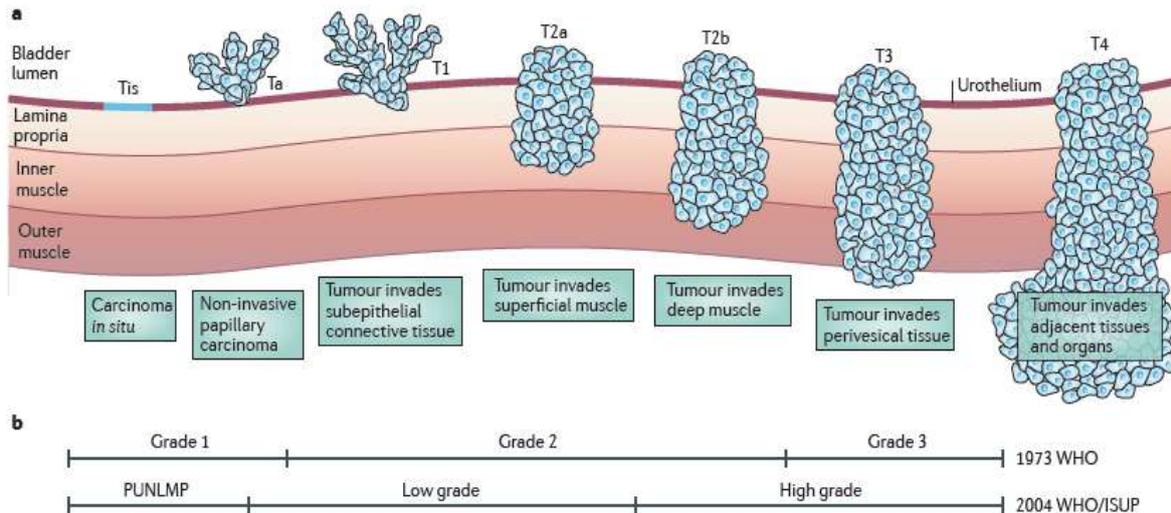
Die Stadieneinteilung von Harnblasentumoren erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (*Union internationale contre le cancer*). Unter anderem werden die Infiltrationstiefe des Tumors (T) und das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) beurteilt. Im klinischen Verlauf werden oberflächliche, nichtinvasive Blasenkarzinome (Ta, T1 und Tis) und muskelinvasive Blasenkarzinome (ab Stadium T2) unterschieden.

Neben der Infiltrationstiefe und der Ausbreitung des Tumors ist auch der histopathologische Differenzierungsgrad (Grading) wichtig für die Prognose und die Planung der Therapie. 2004 wurde von der *World Health Organisation* (WHO) in Zusammenarbeit mit der *International Society of Urological Pathology* (ISUP) eine neue Klassifikation herausgegeben, die papilläre Läsionen in low-grade und high-grade Harnblasenkarzinome einteilt. Die papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential (PUNLMP) wird als benigne angesehen und nicht

mehr zu den Karzinomen gezählt. Als PUNLMP werden Läsionen ohne zytologische Malignitätskriterien mit papillärer Konfiguration von normalen Urothelzellen bezeichnet. Sie weisen ein geringes Progressionsrisiko auf, neigen aber oft zu Rezidiven [13].

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms [14]**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	keine Aussage über den Primärtumor möglich
T0	keine Anzeichen eines Primärtumors
Ta	Nichtinvasives, papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ (Cis)
T1	Tumor infiltriert das subepitheliale Bindegewebe (Lamina submucosa)
T2	Infiltration der Harnblasenmuskulatur
T2a	Infiltration bis zur inneren Hälfte der Lamina muscularis
T2b	Infiltration bis zur äußeren Hälfte der Lamina muscularis
T3	Perivesikale Tumordinfiltration
T3a	mikroskopische perivesikale Infiltration
T3b	makroskopische perivesikale Infiltration
T4	Infiltration von Nachbarorganen
T4a	Infiltration von Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Infiltration von Becken- oder Bauchwand
<b>N</b>	<b>Lymphknotenbefall</b>
NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1	Einzelne solitäre LK-Metastase (hypogastrisch, obturatorisch, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
N2	multiple LK-Metastasen (hypogastrisch, obturatorisch, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
N3	LK-Metastasen entlang der Aa. iliaca communes
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in nichtregionalen Lymphknoten
M1b	sonstige Fernmetastasen



### Abbildung 1: Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms [15]

a: TNM-Klassifikation: Harnblasenkarzinome können anhand ihrer Infiltrationstiefe in zwei Gruppen eingeteilt werden. Oberflächliche Tumore überschreiten die Lamina propria nicht. Hierzu zählen papilläre Ta-Tumore, das Carcinoma in situ sowie T1-Tumore. Ab Stadium T2 werden Harnblasentumore als muskelinvasiv bezeichnet, da die Lamina propria überschritten und die Muskelschicht infiltriert wird.

b: Einteilung des Differenzierungsgrades (WHO/ISUP, 2004). Im Vergleich alte Einteilung der WHO, 1973.

#### 1.1.5 Pathologie

Den Hauptanteil aller Blasen Tumore machen mit 90 % Urothelkarzinome aus, welche gleichzeitig den häufigsten histologischen Typ in Westeuropa und den USA darstellen. Im Gegensatz dazu treten in Afrika vor allem Plattenepithelkarzinome auf, welche durch die Bilharziose, eine chronische Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma haematobium*, ausgelöst werden [16]. Adenokarzinome, welche häufig am Blasendach entstehen, sind sehr selten und machen 2 % der Fälle aus [17]. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen ca. 75 % der Patienten ein nichtinvasives Tumorstadium (pTa, pT1, Cis) auf [18]. Dabei liegt zu 70 % das Tumorstadium pTa vor, wohingegen das Stadium pT1 (10 %) und das *Carcinoma in situ* (20 %) seltener vorkommen [19]. Nichtinvasive Blasen Tumore weisen in der Regel eine gute Prognose auf, neigen jedoch zu Rezidiven. In etwa 45 % der Fälle kommt es innerhalb von 5 Jahren zur Progression zu einem muskelinvasiven Wachstum [20]. Beim *Carcinoma in situ* liegen hochgradig atypische Zellen im Urothel vor. Die flache, intraepitheliale Läsion ist hoch maligne und neigt zur Progression zu einem muskelinvasiven Tumor. Es tritt multifokal im gesamten Harntrakt auf. Bei der Zystoskopie kann das Cis leicht übersehen oder mit einer entzündlichen Läsion verwechselt werden, wenn es nicht biopsiert wird [21]. 25 % aller Harnblasenkarzinome haben bei Diagnosestellung bereits den Harnblasenmuskel infiltriert. Für alle Stadien zusammen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 77,1 %. Für nichtinvasive Harnblasentumoren beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 95,8 %, wohingegen sie bei

muskelinvasivem Wachstum nur bei 69,5 % liegt. Kommt es zum Auftreten von regionalen Lymphknoten- oder Fernmetastasen, sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 36,3 % bzw. 4,6 % [22].

### **1.1.6 Therapie**

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms erfolgt abhängig der Stadien-Klassifikation unter Berücksichtigung von Differenzierungsgrad, Multilokalität, Alter und Allgemeinzustand des Patienten. Die wichtigste Therapieform stellt die transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-B) dar, bei der zunächst der histologische Status des Tumors bestimmt und in Abhängigkeit davon weitere Therapieschritte geplant werden.

Nichtinvasive Tumore (Ta-T1, Tis) werden zunächst transurethral reseziert und anschließend mit einmaliger intravesikaler Instillation des Zytostatikums Mitomycin behandelt. Nach 4 - 6 Wochen sollte eine Nachresektion der Narbe erfolgen. Kleine, unilokuläre Ta low-grade Tumoren bedürfen keiner Nachresektion. Bei lokaler Tumorkontrolle sollten in regelmäßigen Abständen Kontroll-Zystoskopien durchgeführt werden. Je nach Rezidiv- und Progressionsrisiko sollte eine intravesikale Instillationstherapie mit Mitomycin oder dem attenuierten Tuberkuloseerreger *Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG) zur Rezidivprophylaxe erfolgen.

Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren ( $\geq$  pT2) oder bei erhöhtem Progressionsrisiko (pT1 G3) ist die radikale Zystektomie einschließlich pelviner Lymphadenektomie mit anschließender Harnableitung Therapie der Wahl. Diese kann offen, laparoskopisch oder Roboter-assistiert durchgeführt werden. Sie umfasst die komplette Entfernung der Harnblase mit distalen Ureteranteilen, gegebenenfalls die Entfernung der Urethra und beim Mann zusätzlich die Entfernung von Prostata und Samenblasen bzw. Entfernung von Uterus, Adnexen und vaginaler Vorderwand bei der Frau. Eine neoadjuvante Chemotherapie kann bei muskelinvasiven Tumoren in Betracht gezogen werden, wodurch die 5-jahres-Überlebensrate um 8 % gesteigert werden kann [23]. Bei Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen oder einem Tumorstadium  $>$  pT3 ist eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Die Erstlinientherapie erfolgt nach dem MVAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin, Cisplatin) oder mit Gemcitabine / Cisplatin (GC). Beide Therapien weisen ähnliche Ansprechraten auf (GC = 49 %, MVAC = 46 %) und können somit als gleichwertig angesehen werden [24]. Die Therapie mit Gemcitabine / Cisplatin weist jedoch ein geringeres Nebenwirkungsprofil auf, weshalb sie als Standard verwendet wird. Die 5-Jahres-Überlebensraten nach Therapie betragen jedoch nur 13 % bzw. 15 %, weshalb es sich nur um eine Therapie in palliativer Absicht handelt [25]. Aufgrund einer Niereninsuffizienz, eines schlechten Allgemeinzustandes oder anderen Komorbiditäten eignen sich jedoch nur etwa 30 - 50 % der Patienten für eine solche Chemotherapie [26].

Für Patienten mit lokal-fortgeschrittenem oder metastasiertem Harnblasenkarzinom stellt die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren eine neue Therapiemöglichkeit dar. Immun-Checkpoints sind Rezeptoren auf der Membranoberfläche von T-Lymphozyten, die einen hemmenden oder stimulatorischen Einfluss auf deren Immunantwort nehmen. Die Interaktion der Rezeptoren PD-1 und B7.1 mit dem Ligand PD-L1 stellt einen der wichtigsten hemmenden Signalwege dar. Durch Bindung von Immuncheckpoint-Inhibitoren an Checkpoints wird dieser Signalweg gehemmt und dadurch die Immunreaktion gegen die Tumorzelle verstärkt [27]. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom, die sich nicht für eine platinbasierte Chemotherapie eignen, kann als Erstlinientherapie eine Therapie mit dem PD-L1-Antikörper Atezolizumab (*Tecentriq*®) oder dem PD-1-Antikörper Pembrolizumab (*Keytruda*®) erfolgen. Beide Therapien weisen ähnliche Ansprechraten auf (ORR: Pembrolizumab = 29 % vs. Atezolizumab 23 %) [28]. Bei Patienten mit lokal-fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom, welche nach vorangegangener platinbasierter Chemotherapie einen Progress zeigen, kann als Zweitlinientherapie eine Therapie mit den Checkpointinhibitoren Pembrolizumab, Atezolizumab oder dem PD-1-Inhibitor Nivolumab (*Opdivo*®) erfolgen. Die Therapie mit Pembrolizumab weist im Vergleich zur Chemotherapie eine bessere Gesamtüberlebensrate auf (Pembrolizumab 10,3 Monate vs. Chemotherapie 7,4 Monate) [29]. Auch in der Erstlinien-Erhaltungstherapie nach erfolgter Chemotherapie kommen Immuntherapeutika zum Einsatz. Der monoklonale PD-L1-Antikörper Avelumab (*Bavencio*®) wird bei Patienten, die nach einer platin-basierten Chemotherapie progressionsfrei sind, als Mono-Therapie angewendet. Hierdurch konnte eine Verbesserung der medianen Gesamtüberlebenszeit (21 vs. 14 Monate) erzielt werden [30].

### **1.1.7 Molekulare Entstehungswege des Harnblasenkarzinoms**

Bei der Entstehung von Harnblasentumoren wird von zwei verschiedenen Hauptentstehungswegen ausgegangen, denen unterschiedliche molekulare Alterationen zu Grunde liegen. Verluste auf Chromosom 9 oder Monosomie 9 zählen zu den häufigsten Veränderungen und werden unabhängig von Tumorgrad und Stadium in mehr als der Hälfte aller Blasentumore gefunden [31].

Nichtinvasive, papilläre Tumoren gelten als genetisch stabil und entstehen aus einer Hyperplasie des Urothels, jedoch neigen sie zur Rezidivierung [15]. Etwa 70 % aller nichtinvasiven Tumore weisen aktivierende Mutationen im FGFR3-Gen auf, wohingegen diese im Cis und in invasiven Karzinomen eher selten sind [32]. Ebenso treten Mutationen im PIK3CA-Gen und STAG2-Gen häufiger in nichtinvasiven Tumoren auf [33].

Muskelinvasive Harnblasentumore gelten hingegen als genetisch instabil und weisen eine Vielzahl genetischer Veränderungen auf. Aus einer Dysplasie des Urothels entsteht zunächst das flache, nichtinvasive *Carcinoma in situ*, aus dem sich letztendlich ein solider, invasiv

wachsender Tumor entwickelt [34]. Die wichtigsten genetischen Unterschiede zu den nichtinvasiven Tumoren sind Alterationen in den Tumorsuppressorgenen TP53 und RB1. Verluste des Retinoblastom-Gens RB1 konnten in mehr als 50 % aller muskelinvasiven Tumoren nachgewiesen werden, jedoch nur in 4 % der nichtinvasiven Tumore [35]. Mutationen im p53-Gen sind in etwa der Hälfte aller muskelinvasiven Tumore als auch im Cis und in Urotheldysplasien vorzufinden, jedoch nur in etwa 3 % aller Ta-Tumore. Das Auftreten dieser Mutation in Dysplasien und im *Carcinoma in situ* könnte die Neigung dieser Läsion zur Progression erklären, da sie zu einer Instabilität des Genoms führt [36]. Des Weiteren sind muskelinvasive Tumore von einer Reihe genetischer Veränderungen betroffen. Hierzu zählen unter anderem die Überexpression von Onkogenen wie z.B. ERBB2 sowie die Mutation oder Deletion bestimmter Tumorsuppressorgene (z.B. PTEN) [37-39].

Mutationen in allen 3 RAS-Genen (HRAS, NRAS, KRAS2) werden in 15 % der Tumore unabhängig von Stadium und Tumorgrad gefunden. Die Aktivierung von FGFR3 führt durch Aktivierung des RAS-MAP-Kinase-Wegs zu einer verstärkten Proliferation und somit zu erhöhter Zelldichte [15].

RAS- und FGFR3-Mutationen schließen sich jedoch gegenseitig aus [40].

Viele weitere molekulare Veränderungen sind für die Metastasierung von Harnblasenkarzinomen verantwortlich. Zu den bedeutendsten gehören jedoch die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) und die verstärkte Expression von VEGF. Die EMT ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und mesenchymale Charakteristiken wie z.B. die Fähigkeit zur Migration und Invasion erhalten. Ein bedeutender Vorgang beim Ablauf der EMT ist der Verlust des Adhäsionsproteins E-Cadherin, welches für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten und die Aufrechterhaltung der Polarität von Epithelzellen wichtig ist. Die Konversion der Expression von E-Cadherin zu N- oder P-Cadherin (*Cadherin-Switch*) gilt als spätes Ereignis in der molekularen Pathogenese von Harnblasentumoren und führt zur Migration und Invasion von Tumorzellen [41; 42].

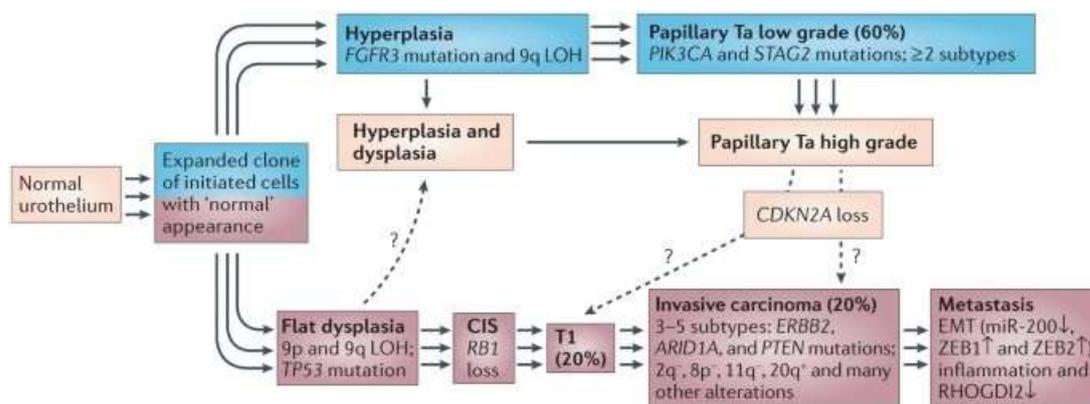
Bernardini *et al.* konnten nachweisen, dass die Serumlevel von VEGF in Probenmaterial von Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom wesentlich höher waren als bei Proben von lokal begrenzten oder invasiv wachsenden Tumoren, was eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Tumorstadien ermöglicht [43].

Im Vergleich zu anderen Karzinomen des Urogenitaltraktes zeichnet sich das Harnblasenkarzinom durch eine Überexpression von Fascin aus, was spezifisch für das metastasierte Stadium der Tumorerkrankung ist [44].

Kamai *et al.* konnten nachweisen, dass eine erhöhte Aktivität von Rac1 mit einer erhöhten Expression von Pak1 einhergeht. Im Urothelkarzinom des oberen Harntraktes konnte dies mit dem Auftreten von lymphovaskulärer Invasion und Lymphknotenmetastasen in

Zusammenhang gebracht werden, sodass diese beiden Veränderungen einen möglichen prognostischen Marker darstellen [45].

In präklinischen Studien an Harnblasenkarzinomzelllinien konnte RHOVDI2 als möglicher Metastasensuppressor identifiziert werden [46]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression von RHOVDI2 mit einer verkürzten 5-Jahres-Überlebensdauer sowie verkürztem Gesamtüberleben korreliert und somit einen Faktor zur Prognoseeinschätzung darstellt [47]. Griner *et al.* konnten belegen, dass eine Überexpression von RHOVDI2 mit einer verminderten Aktivität von RhoC assoziiert ist. RhoC fördert das Wachstum und die Invasion von Harnblasenkarzinomzellen. Bei immungeschwächten Mäusen konnte beobachtet werden, dass eine verminderte Aktivität von RhoC durch die Überexpression von RHOVDI2 die Lungenabsiedlung nach venöser Injektion von Harnblasenkarzinomzellen verhindert [48].



**Abbildung 2: Potentielle Entstehungswege bei der Pathogenese von Harnblasenkarzinomen (nach Knowles) [15]**

Der Entstehung von histopathologisch erkennbaren urothelialen Veränderungen geht eine klonale Expansion veränderter Zellen im Urothel voraus. Papilläre low-grade Tumore entstehen aus einer Hyperplasie und sind durch den Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 9 und durch aktivierende Mutationen des Fibroblast-growth-factor-Rezeptors (FGFR3), PIK3CA sowie des stromalen Antigens 2 (STAG2) gekennzeichnet. Flache Dysplasien und das Carcinoma in situ gelten als Vorstufen von invasiven Tumoren. Diese zeichnen sich durch TP53-Mutationen und Deletionen von Chromosom 9 aus, weisen jedoch keine FGFR3-Mutationen auf. Invasive Tumore mit vorliegender FGFR3-Mutation sowie Verlust von CDKN2A sind ein Hinweis auf eine mögliche Verbindung der beiden Entstehungswege und den Progress von nichtinvasiven papillären Tumoren zum invasiven Wachstum. Weiterhin sind Mutationen von PTEN oder ERBB2 für invasive Tumore charakteristisch. Zur Metastasierung von Harnblasenkarzinomen tragen die Epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) und eine verminderte Expression von RHOVDI2 bei.

## 1.2 Molekulare Subtypen des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Anhand von mRNA-Expressionsclustern lassen sich muskelinvasive Harnblasenkarzinome in 6 molekulare Subtypen einteilen:

luminal-papillär (24 % aller Tumore), luminal-instabil (15 %), luminal-nicht spezifiziert (8 %), stromareich (15 %), basal / squamös (35 %) und neuronal (3 %) [49]. Somit kann ein Großteil der muskelinvasiven Harnblasenkarzinome entweder einem luminalen oder einem nicht-luminalen (basalen) Subtyp zugeordnet werden. Die molekularen Eigenschaften dieser zwei Hauptgruppen reflektieren die Expressionssignaturen der Basalzellen sowie der Deckzellen (*umbrella cells*) des Urothels [50].

Basale Tumore zeichnen sich durch einen plattenepithelialen Phänotyp aus und weisen eine schlechtere Prognose auf [51]. Kennzeichnend für Tumore vom basal-squamösen Subtyp sind hohe Expressionslevel basaler Marker und Stammzellmarker (CD44, KRT5, KRT6A, KRT14) als auch Marker der plattenepithelialen Differenzierung (TGM1, DSC3, PI3). Viele dieser Tumore weisen eine hohe Expression von *Carcinoma in situ* Signaturgenen auf [52; 53]. TP53- und RB1-Mutationen sind häufig [49].

Im Gegensatz dazu haben luminal Tumore ein papilläres Erscheinungsbild und eine im Vergleich bessere Prognose. Charakteristisch für diese Gruppe sind hohe Expressionslevel von Uroplakinen, Keratin 20 und Marker der luminalen Differenzierung wie FOXA1, GATA3 und PPAR $\gamma$  [51]. Luminal-papilläre Tumore zeichnen sich durch Alterationen von FGFR3 aus. Außerdem weisen diese Tumore einen geringen Anteil an *Carcinoma in situ* Genexpressionssignaturen und ein insgesamt niedriges Level an Hypermethylierung auf.

Der luminal-papilläre Typ weist ebenso die beste Gesamtüberlebensrate auf [53]. Tumore vom luminal-infiltrierenden Subtyp besitzen aufgrund einer hohen Lymphozyten-Infiltrationsrate eine geringe Tumorreinheit. Vor allem Immunmarker wie PD-L1 und CTLA4 als auch Marker der Epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) werden verstärkt exprimiert. Tumore vom luminalen Typ exprimieren insbesondere Uroplakine (UPK1A, UPK2) sowie Gene, die in urothelialen Deckzellen exprimiert werden (KRT20, SNX31) auf. Neuronale Tumore weisen häufig keine neuroendokrine Morphologie auf, exprimieren jedoch Marker der neuronalen Differenzierung und neuroendokrine Marker in hohem Maße. TP53- und RB1-Mutationen treten häufig auf. Dieser Subtyp hat insgesamt die schlechteste Überlebensrate [52; 53].

### 1.3 Epigenetik

Der britische Entwicklungsbiologe Conrad Hal Waddington prägte im Jahr 1942 den Begriff der Epigenetik. Er beschrieb damit Phänomene, die nicht durch genetische Prinzipien erklärt werden konnten. Die Epigenetik wurde von ihm bezeichnet als „der Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen, untersucht.“ [54].

Aktuellere Definitionen der Epigenetik bezeichnen diese als die Gesamtheit aller meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderung der Genexpression, die nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können [55].

Die epigenetische Regulation umfasst eine Reihe von Mechanismen. Dazu zählen unter anderem die DNA-Methylierung (siehe Kapitel 1.2.2), die Modifikation von Histonen und Chromatinstrukturen oder nicht-codierende RNA-Moleküle. Diese Mechanismen interagieren miteinander und stabilisieren sich gegenseitig [56].

Epigenetische Mechanismen sind essenziell für eine normale Entwicklung und die Aufrechterhaltung der gewebespezifischen Expression bestimmter Gene. Sie werden während der Differenzierung von Zellen etabliert und über multiple Zellteilungen aufrechterhalten. So können Zellen trotz gleicher genetischer Information verschiedene Phänotypen aufweisen. Störungen dieser epigenetischen Prozesse können zu einer veränderten Genexpression führen und somit die maligne Entartung von Zellen begünstigen [57].

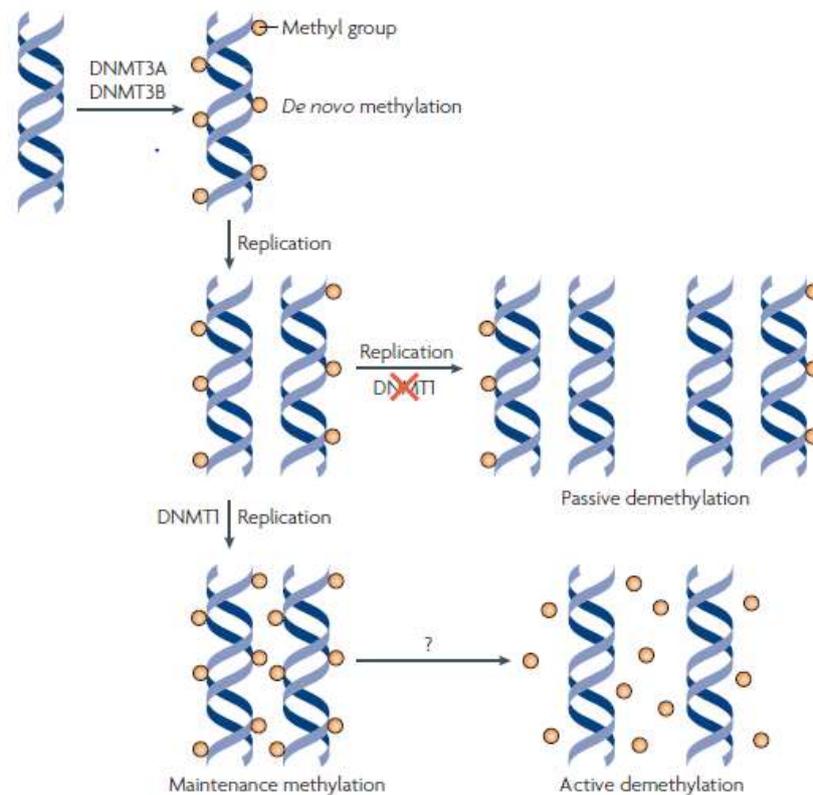
#### 1.3.1 DNA-Methylierung

Die Methylierung von DNA gilt als die am besten beschriebene epigenetische Veränderung, welche für die Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Dazu zählen unter anderem die embryonale Entwicklung, die Transkription, die Inaktivierung von X-Chromosomen, das genomische *Imprinting* und die Stabilität von Chromosomen [58].

Bei Säugern erfolgt die Methylierung der DNA nach der Replikation an Cytosinbasen, welche sich an 5'-Position einer Guaninbase befinden. Dieser zwei Nukleinbasen lange Bereich wird auch als CpG-Dinukleotid bezeichnet. Die Übertragung von Methylgruppen auf das Kohlenstoffatom C5 des Pyrimidinringes des Cytosins wird durch eine Reihe bestimmter Enzyme, die DNA-Methyltransferasen (DNMTs), katalysiert. S-Adenosyl-Methionin dient hierbei als Methyl donor [59].

Es werden zwei Gruppen von DNMTs unterschieden, welche entweder für die Neuentstehung oder die Aufrechterhaltung von Methylierungsmustern verantwortlich sind. Während der embryonalen Entwicklung werden neue Methylierungsmuster durch die beiden *de novo*-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b aufgebaut [60]. Diese besitzen eine hohe Affinität gegenüber unmethylierter und hemi-methylierter DNA. Sie weisen eine hohe Aktivität in embryonalen Stammzellen auf, während ihre Aktivität in differenzierten Zellen herabreguliert ist [61].

Die DNMT1 besitzt eine hohe Affinität gegenüber hemi-methylierter DNA. Sie ist zuständig für die Erhaltungs-Methylierung („*maintenance*“-Methylierung) nach der Zellteilung, wobei bereits vorhandene Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten, unmethylierten Tochterstrang übertragen werden.



### Abbildung 3: Mechanismus der DNA-Methylierung und De-Methylierung [60]

DNA-Methylierungsmuster werden initial durch die beiden *de novo*-DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b während der embryonalen Entwicklung etabliert. Nach Replikation und Zellteilung werden diese Methylierungsmuster in den Tochterzellen durch die DNMT1 aufrechterhalten („*maintenance*“-Methylierung). Bei einer Hemmung der DNMT1 können neu synthetisierte DNA-Stränge nach der Replikation nicht mehr methyliert werden, es kommt also zu einer passiven De-Methylierung der DNA.

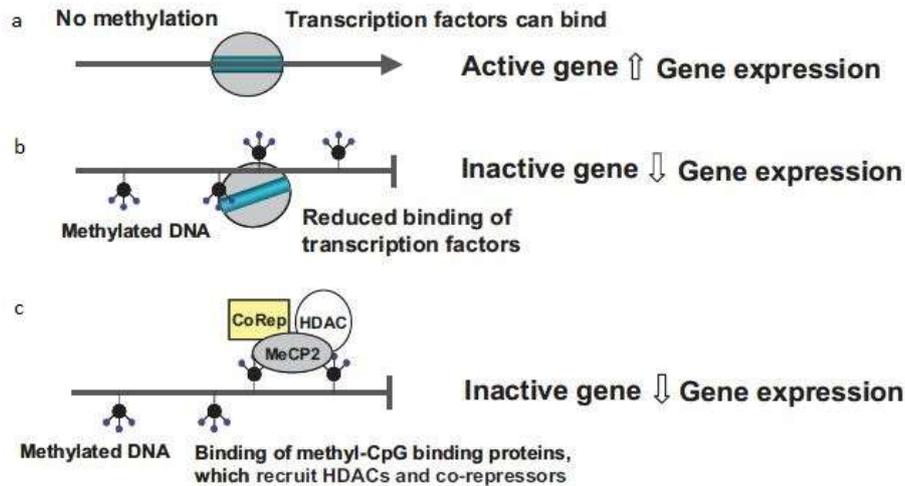
Im menschlichen Genom sind ca. 70 – 80 % aller CpG-Dinukleotide methyliert, der Anteil von 5-Methylcytosin an der Gesamtmenge aller Basen beträgt jedoch nur etwa 1 % [62]. Das menschliche Genom ist weitgehend arm an 5-Methylcytosin. Da dieses durch spontane Deaminierung in Thymin umgewandelt werden kann, wird angenommen, dass der Verlust an genomischem CpG auf die Deaminierung methylierter Sequenzen in der Keimbahn zurückzuführen ist [63].

Der Großteil der CpG-Dinukleotide befindet sich vereinzelt in relativ CpG-armen Regionen der DNA, wo sie vorwiegend methyliert vorliegen. Dabei sind die CpG-Dinukleotide vor allem auf parasitäre DNA-Sequenzen oder Retrotransposons verteilt. Hier dient die DNA-Methylierung

physiologisch als Abwehrmechanismus vor diesen Elementen und verhindert deren Expression und Ausbreitung im Genom [64].

Etwa 10 % der CpG-Dinukleotide konzentrieren sich auf sogenannte CpG-Inseln. Diese sind Genomabschnitte einer Länge von mehreren Hundert bis ca. 2000 Basenpaaren mit einem hohen Anteil an CpG. Sie sind häufig in der Promotorregion von Genen lokalisiert und im Normalgewebe überwiegend unmethyliert [65].

Etwa 70 % der Gene im menschlichen Genom weisen CpG-Inseln innerhalb ihrer Promotorregionen auf, wobei die CpG-Dinukleotide hier vorwiegend unmethyliert sind [66]. In Säugern dient die Methylierung CpG-reicher Promotoren dazu, die Transkription zu hemmen und bestimmte DNA-Abschnitte stillzulegen. Hierzu zählen unter anderem Gene, die dem genomischen *Imprinting* unterliegen, Gene auf dem inaktiven X-Chromosom und parasitäre DNA-Abschnitte [59]. Die DNA-Methylierung dient als Mechanismus der Genregulation und ist somit ein essenzieller Bestandteil für eine normale Entwicklung und Funktion im Organismus. Die Stilllegung der Genexpression durch die Methylierung der DNA kann durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Einerseits kann die Hemmung der Transkription direkt durch die Anwesenheit von methylierten Cytosin-Basen erfolgen, welche die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenzen verhindern [58]. Andererseits kann die Transkription indirekt durch die Bindung von sogenannten *Methyl-CpG-binding-Proteinen* (MBPs, z.B. MeCP2) an methylierte DNA-Abschnitte gehemmt werden. Diese interagieren mit Korepressorkomplexen und Histondeacetylasen und bewirken eine Modifikation des umgebenden Chromatins.



**Abbildung 4: Effekte der DNA-Methylierung auf die Genexpression (modifiziert nach Ling) [67]**

a: Transkriptionsfaktoren können an unmethylierte DNA-Stränge binden, was zu einer Aktivierung des Gens führt.

b: 5mC in der Promotorregion führt zu einer erschwerten Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz, wodurch das zugehörige Gen stillgelegt wird.

c: MBPs (*Methyl-CpG-binding* Proteine) binden an methylierte DNA-Abschnitte und verändern mit Hilfe von Histondeacetylasen und Korepressoren die Chromatinstruktur, was zur Inaktivierung des Gens führt.

### 1.3.2 DNA-Methylierung in Tumoren

Eine Reihe verschiedener Mechanismen ist an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt. Hierzu zählen einerseits rein genetische Veränderungen wie Punktmutationen, Deletionen sowie Translokationen, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Ebenso haben epigenetische Mechanismen, die zu einer Veränderung der Genexpression führen, einen Einfluss auf die Tumorgenese.

Im Vergleich zu gesunden Zellen zeichnen sich Tumorzellen durch eine genomweite Hypomethylierung aus [68]. Eine maligne entartete Zelle kann 20 – 60 % weniger 5mC im Genom enthalten als eine gesunde Zelle [69]. Hierbei betrifft die Hypomethylierung vor allem repetitive DNA-Abschnitte, Retrotransposons oder Introns, die in gesunden Zellen normalerweise methyliert vorliegen [57].

Die Tumorentstehung kann durch die Hypomethylierung der DNA auf 3 verschiedene Wege beeinflusst werden: die Erzeugung chromosomaler Instabilität, die Reaktivierung von Retrotransposons sowie der Verlust des *Imprintings*. Mitotische Rekombinationen sowie das Auftreten von Deletionen und Translokationen können durch den Verlust der Methylierung begünstigt werden, wodurch es zur chromosomalen Umstrukturierung kommt. Ebenso kann die Hypomethylierung zur Reaktivierung von Retrotransposons und repetitiven Elementen führen, welche dadurch transkribiert oder auf andere Abschnitte im Genom transloziert werden

können. Beide Mechanismen tragen zu einer Steigerung der genomischen Instabilität in Tumorzellen bei [70; 57]. Ebenso kann die Hypomethylierung zur Aktivierung von Proto-Onkogenen beitragen oder zum Verlust des *Imprintings* führen. Beispielsweise kann der Verlust des *Imprintings* beim IGF-2-Gen das Risiko für die Entstehung von Kolon-Karzinomen erhöhen oder zur Entstehung von Willms-Tumoren beitragen [70]. Der Verlust der Methylierung ist ein frühzeitiges Ereignis in der Tumorentstehung und korreliert in vielen Tumorarten mit der Schwere der Erkrankung sowie dem Potential der Metastasierung [58].

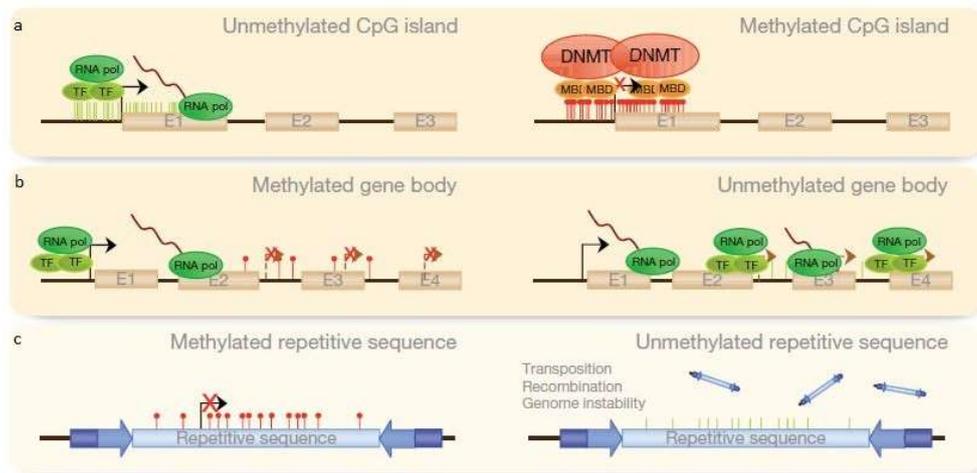
Neben der genomweiten Hypomethylierung zählt auch die Zunahme der Methylierung in den Promotorregionen spezifischer Gene zu den weiteren Merkmalen von Tumorzellen. Die Hypermethylierung betrifft hier vorwiegend CpG-Inseln in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, die in normalen Zellen unmethyliert vorliegen und durch die Methylierung inaktiviert werden [71]. Auch dieser Prozess tritt häufig im Frühstadium der Tumorgenese auf [72].

Nach Knudson's *Two-Hit*-Hypothese ist für den kompletten Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens die Inaktivierung beider Allele des betroffenen Gens erforderlich [73]. Dies kann entweder auf genetischer Ebene durch Mutation oder Verlust der Heterozygotie (LOH) erfolgen oder auf epigenetischer Ebene durch Stilllegung des betroffenen Gens durch Methylierung der betroffenen Promotorregion. Oft tritt auch eine Kombination beider Mechanismen auf [74].

Außerdem ist von der Hypermethylierung auch eine Reihe von Genen betroffen, welche an verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. dem Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Zelladhäsion und der Apoptose, beteiligt sind. Der Expressionsverlust dieser Gene kann wesentlich zur Tumorentstehung beitragen [70; 57]. Die Anzahl der Gene, deren Expression durch epigenetische Veränderungen stillgelegt wird, überschreitet die Anzahl derer, die durch Mutationen inaktiviert werden [75].

Obwohl in verschiedenen Tumorentitäten ähnliche Signalwege betroffen sein können, gibt es Unterschiede im Methylierungsmuster. DNA-Methylierungsmuster treten nicht zufällig auf, sondern sind spezifisch für jede Tumorart. Beispielsweise weisen Darmtumore oder Gliome ein hohes Methylierungslevel auf, wohingegen sich Kopf-Hals-, Brust- oder Hodentumore durch ein insgesamt niedriges Methylierungslevel auszeichnen [76].

Die Methylierung von Cytosinbasen kann auch auf genetischer Ebene Einfluss auf die Tumorgenese haben. 5-Methyl-Cytosin gilt als mutagen, da es durch spontane hydrolytische Deaminierung in Thymin umgewandelt werden kann. Beispielsweise sind etwa 50 % der inaktivierenden Punktmutationen im Tumorsuppressorgen TP53 auf methylierte Cytosine zurückzuführen [63].



### Abbildung 5: Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung (nach Portelo)[77]

Links im Bild dargestellt ist der Zustand einer normalen Zelle, rechts im Bild die Verhältnisse in einer Tumorzelle.

A: CpG-Inseln in Promotorregionen sind üblicherweise unmethyliert, wodurch die Transkription durch Bindung von Transkriptionsfaktoren stattfinden kann. In Tumorzellen verhindert die Methylierung der DNA innerhalb von Promotorregionen die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz und die Transkription wird gehemmt.

B: Tumorzellen zeichnen sich insgesamt durch eine genomweite Hypomethylierung aus. Dies führt einerseits zu einer Re-Expression von Proto-Onkogenen, die in gesunden Zellen typischerweise methyliert vorliegen.

C: Andererseits begünstigt die Hypomethylierung die Transposition und Rekombination von DNA-Abschnitten, was zu genomischer Instabilität führt. Ebenso können repetitive DNA-Sequenzen durch die fehlende Methylierung exprimiert werden.

### 1.3.3 DNA-Methylierung im Harnblasenkarzinom

Wie in vielen anderen Neoplasien konnten auch im Harnblasenkarzinom epigenetische Veränderungen nachgewiesen werden.

Die DNA-Hypomethylierung ist im Harnblasenkarzinom über alle Tumorstadien hinweg stark ausgeprägt [78]. Dies betrifft vor allem LINE-1-Sequenzen (*long interspersed nuclear element 1*), die etwa 15 % des menschlichen Genoms ausmachen [79]. Florl *et al.* konnten nachweisen, dass LINE-1 Sequenzen im Harnblasenkarzinom zu 95 % hypomethyliert vorlagen, während diese im Normalgewebe verstärk methyliert waren [80]. Auch eine Abnahme der Methylierung von HERV-K (humanes endogenes Retrovirus) konnte im Tumorgewebe beobachtet werden [81]. Moore *et al.* konnten nachweisen, dass die Hypomethylierung von Leukozyten-DNA mit einem erhöhten Risiko für Harnblasenkarzinome assoziiert ist [82].

Auch die epigenetische Stilllegung spezifischer Gene durch die Hypermethylierung von Promotorregionen spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Harnblasenkarzinomen. Mehrere Studien konnten belegen, dass die Promotormethylierung stark mit der Tumorentstehung, dem Tumorstadium, der Progression sowie der Überlebensrate assoziiert werden kann [83-87].

Beispielsweise konnten Maruyama *et al.* nachweisen, dass die Methylierung der Gene CDH1, RASSF1A, APC und CDH3 signifikant mit Parametern, die mit einer schlechten Prognose einhergehen, in Zusammenhang stehen (z.B. Tumorstadium, Wachstumsmuster, Muskelinvasion und Differenzierungsgrad) [86].

Ebenso konnte die Promotormethylierung von RASSF1A, CDH1, TNFSR 25, EDNRB und APC mit einem erhöhten Progressionsrisiko in Zusammenhang gebracht werden [87].

Yates *et al.* konnten signifikante Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster verschiedener Tumorsuppressorgene (RASSF1A, E-Cadherin, TNFSR25, EDNRB und APC) zwischen nichtinvasiven und muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen sowie im Normalgewebe nachweisen [87].

Muskelinvasive Harnblasentumore zeichnen sich im Vergleich zu nichtinvasiven Tumoren durch eine stärkere Methylierung der DNA aus. Somit konnte bestätigt werden, dass sich die Entstehungswege der beiden Tumorarten nicht nur auf genetischer, sondern auch zusätzlich auf epigenetischer Ebene unterscheiden [78]. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Nakagawa *et al.*, die belegen konnten, dass eine verstärkte Methylierung mit einem invasiven Wachstum der Harnblasentumore in Zusammenhang steht, was auf eine Überexpression der DNA-Methyltransferase 1 zurückgeführt werden kann [88].

Kim *et al.* konnten nachweisen, dass die Hypermethylierung des RUNX3-Promotors ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen darstellt und mit dem Gesamtüberleben korreliert, wodurch diese als prognostischer Marker angesehen werden kann [89]. Auch beim nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinom konnte die Methylierung von RSPH9 als prognostische Marker identifiziert werden [90].

## 1.4 Zielstellung

Im Gegensatz zu nichtinvasiven Harnblasentumoren, die nach transurethraler Resektion eine günstige Prognose aufweisen, sind die Überlebensraten bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen, muskelinvasiven Harnblasentumoren auch nach radikaler Zystektomie deutlich geringer. Bei Vorhandensein von regionalen Lymphknoten- oder Fernmetastasen reduziert sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 34 % bzw. 6 %. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose ist demnach entscheidend für die Prognose des Patienten. Eine individuelle Beurteilung des Metastasierungsrisikos und somit der individuellen Prognoseeinschätzung ist mit Hilfe der derzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden nicht möglich. Dies stellt jedoch einen entscheidenden Faktor bei der Therapieplanung von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom dar, vor allem im Hinblick auf eine adjuvante Chemotherapie.

Die Methylierung der DNA gilt als einer der am besten beschriebenen epigenetischen Regulationsmechanismen. Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster können frühzeitig nachgewiesen werden und zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus.

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Forschungsergebnissen von Stubendorff *et al.* [91]. Mittels Micro-Array wurden genomweite, metastasierungsspezifische Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster primärer muskelinvasiver Harnblasentumore ermittelt. Anhand dieser wurden Kandidatengene (u.a. KISS1R) ausgewählt, deren Methylierungsstatus und Expression in Zelllinien sowie im Gewebe bestimmt und deren Einfluss auf metastasierungsassoziierte Prozesse untersucht wurde.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Analyse metastasierungsspezifischer Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster der beiden ausgewählten Kandidatengene EPHB3 und KISS1R in primären Harnblasenkarzinomen.

Des Weiteren soll der Einfluss von Veränderungen der DNA-Methylierung von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse untersucht werden.

Folgende Aufgabenstellungen sollen im Einzelnen bearbeitet werden:

1. Zunächst soll die Quantifizierung der mRNA-Expression der Kandidatengene nach Inhibierung der DNA-Methyltransferase in Harnblasenkarzinomzelllinien im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien erfolgen.
2. Um den Zusammenhang zwischen Expression und DNA-Methylierung zu analysieren, soll die DNA-Methylierung der Kandidatengene unter Verwendung methylierungsspezifischer Restriktionsenzyme und *real-time*-PCR in Zelllinien sowie im Primärtumorgewebe quantifiziert werden.

3. Anhand eines unabhängigen Patientenkollektivs sollen die Kandidatengene validiert werden, um zu prüfen, ob diese als Biomarker zur Prognosebewertung des Metastasierungsrisikos geeignet sind.
4. Um den Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse zu untersuchen, soll in etablierten Zelllinien zunächst die Expression des Gens gezielt herabreguliert werden. Im Anschluss soll das Verhalten der Zellen in Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau, D
Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss, Jena, D
Nanodrop ND-1000	PeqLab, Erlangen, D
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
Thermocycler UNO II	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
VortexGenie ® 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Luna™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Annandale, USA
xCELLigence Real Time Cell Analyzer	ACEA Bioscience, San Diego, USA

#### 2.1.2 Chemikalien und Laborreagenzien

DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Essigsäure	Merck KgaA, Darmstadt, D
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt, D
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Aphidicolin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Fisher Scientific, Schwerte, D

#### 2.1.3 Kits

ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System	Promega GmbH, Mannheim, D
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim, D
EpiTect ® Methyl II DNA Restriction Kit	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect ® SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, D

#### 2.1.4 Oligonukleotide

AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden, D
---------------------------------	-------------------

qPCR-Primer für Expressionsanalysen

Gen	Primersequenz (vorwärts & rückwärts)
EPHB3	5' CGG AGA AGC TGC AGC AGT ACA TTG 3'
	5' TCT CCT TGG CAA ACT CCC GAA C-3'
KISS1R	5' GCT CTC ACT CCG ACC TTG C-3'
	5' AGC GTT TAT AGC CCG TGC C-3'
ATP5B	5'-TCT AGA CTC CAC CTC TCG TAT C-3'
	5'-CTG GAG GGA TTT GTA GTC CTG-3'

qPCR-Primer für Methylierungsanalysen

EpiTect Methyl II PCR Primer KISS1R, EPHB3 Qiagen, Hilden, D

**2.1.5 Verbrauchsmaterialien**

96 Well PCR Platte, farblos, "Fast" Typ	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Adhesive Clear qPCR Seals, Sheets	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
PCR SoftTubes 0,2 ml farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Reaktionsgefäße 2.0 ml, farblos, Low Binding	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
DNA LoBind Tube 0,5 ml; 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
FCS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Zellkulturflaschen	BD Bioscience, Heidelberg, D
BioCoat™ Matrigel™ Invasionskammer	BD Bioscience, Heidelberg, D
Zellkulturmedien (DMEM, RPMI)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Zentrifugenröhrchen	BD Bioscience, Heidelberg, D
CIM-Plate 16	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, USA
E-Plate 16	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, USA

**2.1.6 Patientenmaterial**

Die RNA- und DNA-Proben wurden im Rahmen der Forschungsarbeit von Stubendorff *et al.* aus kryokonserviertem Gewebe isoliert. Es wurde Harnblasentumorgewebe von Patienten mit bzw. ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Zystektomie verwendet. Die Gewebeproben stammten aus der Tumorbank der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena.

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung des Patientenkollektivs bezüglich T-, N- und M-Status.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des Patientenkollektivs bezüglich pT-, N- und M-Status**

		<b>EPHB3</b>	<b>KISS1R</b>
<b>pT-Stadium</b>	2	1	1
	2a	5	5
	2b	1	1
	3	2	2
	3a	10	9
	3b	5	3
	4	2	3
	4a	7	8
<b>Lymphknotenmetastasen</b>	(-)	22	21
	(+)	10	11
<b>Fernmetastasen</b>	(-)	20	18
	(+)	13	13
<b>Gesamt</b>		<b>33</b>	<b>32</b>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, T24, 5637, J82, UM-UC-3 und 253J B-V zum Einsatz, deren Ursprung und Kultivierungsbedingungen in Tabelle 3 dargestellt sind.

**Tabelle 3: Verwendete Urothelkarzinom-Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung		Kultivierungsbedingungen		
	Patient / Modell	Tumoreigenschaft	Medium	Verdopplungszeit	Temperatur CO <sub>2</sub>
<b>RT-112</b> [92]	Alter unbekannt weiblich	Urothelkarzinom, GII	RPMI 1640 + 10 % FCS	ca. 35 h	37 °C 5 % CO <sub>2</sub>
<b>T24</b> [93]	82 Jahre weiblich	Urothelkarzinom, GIII	DMEM + 10 % FCS	ca. 19 h	37 °C 5 % CO <sub>2</sub>
<b>J82</b> [94]	58 Jahre männlich	Urothelkarzinom, GIII, T3	RPMI 1640 + 10 % FCS	ca. 30h	37 °C 5 % CO <sub>2</sub>
<b>UM-UC-3</b> [95; 96]	Alter unbekannt männlich	Urothelkarzinom	DMEM + 10 % FCS	ca. 20 h	37 °C 5 % CO <sub>2</sub>
<b>253J B-V</b> [97]	Orthotopes Mausmodell der Zelllinie 253J 53 Jahre männlich	Formation von Harnblasentumoren in Nacktmäusen Bildung von Leber-, Lungen- und Lymphknotenmetastasen	DMEM +10 % FCS	ca. 41 h	37 °C 5 % CO <sub>2</sub>
<b>5637</b> [98; 99]	68 Jahre männlich	Urothelkarzinom, GII	RPMI + 10 % FCS	ca. 29 h	37 °C 5 % CO <sub>2</sub>

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen mit kontaminationssicherer Belüftungskappe und hydrophobem Filter für einen optimalen Gasaustausch.

#### 2.2.1.2 Subkultivierung

Bei Erreichen einer Zelldichte von ca. 80 % in den Kulturflaschen wurden die adhärent wachsenden Zellen in Abhängigkeit der Verdopplungszeit im Verhältnis von 1:3 bis 1:20

gesplittet. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA passagiert. Trypsin ist eine Endopeptidase, die Peptide am Carboxylende eines Lysin- oder Argininrestes spaltet. Dabei werden Zell-Matrix-Verbindungen gespalten und die Zellen von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst. EDTA fungiert als  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Chelator und löst die Zell-Zell-Verbindungen. Nach Absaugen des alten Kulturmediums wurden die adhärenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um Rückstände des serumhaltigen Mediums zu entfernen und die Wirksamkeit von Trypsin zu verbessern. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA versetzt und für 5 - 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde im Zentrifugenröhrchen für 3 min bei 1.100 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in gewünschtem Verdünnungsverhältnis in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

### **2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Für das Einfrieren von Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet, welches zusätzlich 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält, das als Frostschutzmittel wirkt. Es verhindert die Bildung von Eiskristallen innerhalb und außerhalb der Zellen, welche zur Zerstörung von Zellorganellen beitragen und zum Absterben der Zellen führen. Bei Raumtemperatur wirkt DMSO toxisch, weshalb darauf geachtet wurde, dass der Auftauprozess zügig ablief und die Zellen nur für kurze Zeit in Kontakt mit DMSO blieben. Aus einem mit 8 ml Kompletmedium gefüllten Falcon Röhrchen wurde mit einer gestopften Pasteurpipette ca. 0,5 ml serumhaltiges Medium über die gefrorene Zellsuspension im Kryoröhrchen gegeben, wieder abgesaugt und ins kalte, serumhaltige Medium überführt. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Zellsuspension im Kryoröhrchen komplett ins Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend bei 1.100 rpm für 3 min zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml Kompletmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Um adhärenen Zellen aus Kulturflaschen einzufrieren, wurden diese zunächst (wie in 2.2.1.2 beschrieben) vom Boden der Kulturflasche gelöst. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt, welches bei -80 °C gelagert wurde.

### **2.2.1.4 Ernten von Zellen**

Die Zellen wurden zunächst mit 1 ml PBS gewaschen, mittels 0,4 ml Trypsin/EDTA vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in 1 ml serumhaltigem Medium resuspendiert (siehe 2.2.1.2). Die Zellsuspension wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und für 3 min bei 1.100 rpm zentrifugiert. Das überständige Medium wurde vorsichtig abgesaugt und das erhaltene

Zellpellet jeweils zweimal in PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach Absaugen des PBS wurde das Zellpellet bis zur weiteren Behandlung bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.5 Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin**

5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) ist ein Nukleosidanalogen, welches anstelle von Cytosin während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Es wirkt als Inhibitor der DNA-Methyltransferase (DNMT), da es kovalent an das Enzym bindet und somit seine Aktivität hemmt. Es kommt zu einem passiven Verlust der Methylierung, da die Re-Methylierung des Tochterstranges während der Replikation durch die DNMT verhindert wird [100]. Die Behandlung mit 5-Aza-dC kann eine Reaktivierung der Expression von Genen initiieren, die durch Methylierung epigenetisch stillgelegt sind [101]. Auf diese Weise sollte der Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad und Expression der beiden Gene EPHB3 und KISS1R untersucht werden. In 6-Well Platten wurden pro Well 100.000 Zellen in 2 ml Kompletmedium eingesetzt. Nach ca. 3 – 4 Stunden wurden 5 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu den Zellen zugegeben. Jeweils 3 Wells dienten als unbehandelte Kontrolle, während die anderen 3 mit 5-Aza-dC behandelt wurden. Nach 24 h und 48 h wurde das Medium gewechselt und jeweils 5 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidin hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 72 h geerntet.

## **2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 RNA-Isolation**

Um die Expression der ausgesuchten Gene zu ermitteln, wurde mit Hilfe des ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep Systems (Promega) RNA aus den verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien isoliert. Das vorher (wie in 2.2.1.4 beschrieben) geerntete Zellpellet wurde dazu mit 100 µl Lysepuffer versetzt und mittels Pipette oder Vortexmischer gemischt. Die Zugabe von 35 µl Isopropanol führte zur Fällung der Nukleinsäuren. Im Puffer enthaltenes Guanidin-Thiocyanat (GCT) und 1-Thioglycerol dienten zur Inaktivierung der vorhandenen Ribonukleasen im Zellextrakt. GCT bricht Nukleoproteinkomplexe auf, sodass RNA frei wird und frei von Protein isoliert werden kann. Das Lysat wurde in Aufreinigungssäulen überführt und bei 13.500 x g für 30 s zentrifugiert. Chaotrope Salze im Puffer dienen zur Bindung der Nukleinsäuren an die Membran der Waschsäulen, wohingegen restliche Zellbestandteile durchfließen konnten. Auf die Membran wurden nun 30 µl DNase I-Mix bestehend aus 24 µl Yellow Core Buffer, 3 µl MnCl 0.09 M und 3 µl DNase I gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase I diente hierbei zum Verdau der ebenso in der Membran verbleibenden genomischen DNA. Um die Gesamt-RNA der Zellen von verunreinigenden Salzen, Proteinen und Zellbestandteilen zu befreien, schlossen sich 3 Waschdurchgänge an. Die aufgereinigte RNA wurde anschließend in 17 µl Nuklease-freiem

Wasser eluiert und deren Konzentration und Qualität mittels *NanoDrop ND-100* (PeqLab) ermittelt.

#### **2.2.2.2 DNA-Isolation**

Zur Isolation von genomischer DNA aus Harnblasenkarzinomzelllinien wurde das *Blood & Tissue DNA Kit* (Qiagen) verwendet. Hierzu wurde das Zellpellet mit 200 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K versetzt und für 10 min bei 56 °C im Thermomixer inkubiert, wodurch Zell- und Kernmembranen aufgelöst wurden. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (96 – 100 %) hinzugegeben, was zu einer Ausfällung der Nukleinsäuren führte. Durch das Enzym Proteinase K wurden Proteine im Zelllysate abgebaut und Nukleinsäuren freigesetzt. Durch Zentrifugation des Lysates für 1 min bei 6000 x g konnte DNA selektiv an die Membran des Zentrifugenröhrchens binden, während verunreinigende Zellbestandteile, Salze und Proteine durch zwei anschließende Waschschriffe entfernt wurden. Die DNA wurde durch Zugabe von 200 µl Nuklease-freiem Wasser von der Membran eluiert und die Konzentration mittels *NanoDrop ND-100* (PeqLab) bestimmt.

#### **2.2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Die real-time quantitative PCR ist eine Methode, die zur Amplifikation von bestimmten DNA-Sequenzen und zur Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels Fluoreszenzfarbstoff genutzt wird. In einem Thermocycler laufen ca. 30 - 50 Zyklen ab, wobei das Produkt jedes Zyklus als Ausgangsstoff für den nächsten Zyklus dient. Auf diese Weise findet eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts statt. Jeder Zyklus besteht aus 3 Schritten:

##### 1. Denaturierung (*Melting*):

Durch Erhitzen der DNA auf ca. 95 °C werden die DNA-Doppelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt. Im ersten Zyklus (Initialisierung) wird die DNA für längere Zeit erhitzt, um zu gewährleisten, dass sich die Doppelstränge der Ausgangs-DNA komplett voneinander getrennt haben.

##### 2. Primerhybridisierung (*Annealing*):

Durch Abkühlung auf eine für den Primer spezifische Temperatur kann dieser sich gezielt an den zugehörigen Genabschnitt anlagern.

##### 3. Elongation:

Bei 72 °C findet die Verlängerung der DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase statt, wobei die Primer dem Enzym als Startmolekül dienen.

Bei der Real-Time-PCR werden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen Signale erzeugt, welche am Ende jedes Zyklus gemessen werden. Die Intensität der Signalstärke steigt mit steigender Zykluszahl. Sie korreliert dabei quantitativ mit der Menge der erzeugten Produkte und kann in Echtzeit (*real time*) verfolgt werden.

Für die PCR-Versuche wurde das *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen) verwendet. Der darin enthaltene Farbstoff *SYBR-Green I* bindet an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle. Hierzu zählen z.B. auch Primer und unspezifische DNA-Produkte. Die Messung sollte in der exponentiellen Phase der PCR stattfinden, in der die optimale Verdopplung der Zielregion stattfindet. In der Frühphase der PCR ist die Konzentration an Produkten noch zu gering, sodass keine eindeutigen Signale messbar sind. Eine Quantifizierung der PCR-Produkte in der Endphase der PCR ist ebenfalls nicht möglich, da die Reaktion eine Plateauphase erreicht. Die Spezifität der Reaktion wurde im Anschluss an die PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse kontrolliert.

Die PCR wurde mit dem *StepOnePlus™* System (Life Technologies) durchgeführt. Hierfür wurden in 96-Well-Platten zu 8 µl PCR *Master Mix* 2 µl cDNA bzw. DNA gegeben. Als Negativkontrolle wurden 2 µl H<sub>2</sub>O anstelle von DNA zugegeben. Pro PCR wurde jede Probe dreifach analysiert.

#### PCR- Master Mix

	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
2 x QuantiTect® SYBR® Green PCR Mix	5 µl	1 x
Primer forward & reverse [10 µM]	0,25 – 0,5 µl	0,25 – 0,5 µM
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	2,5 – 2,75 µl	---

#### qPCR-Programm

##### 1. Expressionsanalysen

<b>Programmschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Hot Start Aktivierung	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	15 s
Amplifikation 40 x Annealing	Primer-spezifisch	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Schmelzkurven	60 °C – 95 °C	---

## 2. DNA-Methylierungsanalysen

Programmschritt	Temperatur	Zeit
Hot Start Aktivierung	95 °C	15 min
3 x	99 °C	30 s
	72 °C	60 s
40 x	97 °C	15 s
	72 °C	60 s
Schmelzkurven	60 – 95 °C	---

### 2.2.3 mRNA-Expressionsanalysen

Um das Expressionslevel der Kandidatengene zu ermitteln, wurde mit Hilfe des *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega) die Gesamt-RNA aus den Zelllinien in cDNA umgeschrieben. Dieser Schritt ist notwendig, da die in der PCR verwendete Polymerase DNA als Ausgangsmaterial benötigt. Für die reverse Transkription wurde das Enzym reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige Polymerase, eingesetzt. Dem Enzym dienen Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer als Ausgangspunkt. Diese bestehen aus 15 Desoxythymidinen, die komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind. In ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden 300 – 1000 ng Gesamt-RNA und 1 µl Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 70 °C für 5 Minuten im Thermoblock inkubiert und dadurch denaturiert. Zu dem Gemisch wurden jeweils 10 µl des *GoScriptReaction Mix* gegeben.

#### GoScriptReaction Mix

	Volumen in µl	Endkonzentration in 20 µl Reaktionsansatz
GoScript™ Reaktionspuffer [5 x]	4	1x
MgCl <sub>2</sub> , 25 Mm	2	2,5 mM
PCR Nukleotide Mix, 10 Mm	1	0,5 mM
Recombinant RNAsin® Ribonuclease Inhibitor	0,5	20 Units
Reverse Transkriptase	1	---
Nuklease-freies Wasser	1,5	---

Die Proben wurden im Thermoblock bei 25 °C für 5 min inkubiert, wodurch die Anlagerung der Primer (*Annealing*) erfolgte. Anschließend erfolgte die Elongation bei 42 °C für 60 min und die Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 min.

Das Expressionslevel der Gene wurde mit Hilfe der qPCR (siehe 2.2.3.3) bestimmt. Dabei wurde neben der Expression der Zielgene auch die Expression eines Referenzgens (ATP5B) bestimmt, sodass der  $\Delta Ct$ -Wert berechnet werden konnte.

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

Die relative Expression kann bei optimaler PCR-Effizienz folgendermaßen berechnet werden:

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

## 2.2.4 Quantitative Analyse der DNA-Methylierung

Um den Methylierungsstatus der Kandidatengene in den beiden Patientengruppen zu bestimmen, wurde das *EpiTect Methyl DNA Restriction Kit* (Qiagen) verwendet. Diese Methode basiert auf der Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, welche DNA entweder methylierungsunabhängig (Enzym A) oder methylierungsabhängig (Enzym B) verdauen. Zunächst wurde für jede Patientenprobe ein Mastermix bestehend aus 250 ng DNA, 26  $\mu$ l 5 x *Restriction Digestion Buffer* und Nuklease-freiem Wasser in 120  $\mu$ l Gesamtvolumen angesetzt. In vier verschiedenen Reaktionsansätzen wurde der DNA-Mastermix mit Reaktionsenzymen und Nuklease-freiem Wasser versetzt:

	Mo	Ms	Md	Msd
DNA-Mastermix [ $\mu$ l]	28	28	28	28
Methylierungsunabhängiges Enzym A [ $\mu$ l]	---	1	---	1
Methylierungsabhängiges Enzym B [ $\mu$ l]	---	---	1	1
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	2	1	1	---

In der methylierungsunabhängigen Verdauungsreaktion Ms wird unmethylierte oder nur teilweise methylierte DNA durch Enzym A verdaut. Enzym B im Reaktionsansatz Md verdaut nur methylierte DNA. Als Kontrolle der Reaktion diente der Ansatz Msd, welcher beide Reaktionsenzyme enthielt, wodurch die eingesetzte DNA komplett verdaut wurde. Die Proben wurden im Thermocycler bei 37 °C für mindestens 6 h verdaut und die Enzyme bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Mittels *real-time* qPCR erfolgte die Quantifizierung der Methylierung in Vergleich mit dem unbehandelten Reaktionsansatz Mo.

Die relative Methylierung wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Delta Ct = Ct \text{ Md} - Ct \text{ Mo} \quad \text{bzw.} \quad \Delta CT = Ct \text{ Ms} - Ct \text{ Mo}$$

$$\text{Relative Methylierung} = 2^{-\Delta Ct}$$

## 2.2.5 Funktionelle Analysen

### 2.2.5.1 Transiente Inhibierung von KISS1R

Um eine gezielte Herunterregulierung der Genexpression (*knock down*) von KISS1R zu erreichen, wurde die Methode des posttranskriptionellen *Gene silencing* verwendet, welche auf dem Prinzip der RNA-Interferenz basiert.

siRNAs (*small interfering RNAs*) sind doppelsträngige RNA-Moleküle einer Länge von 21 - 23 Basenpaaren. Mit Hilfe eines Transfektionsmediums werden sie in die Zellen eingebracht. Dies basiert auf dem Prinzip der Lipofektion. Kationische Lipide bestehen aus einer positiv geladenen Kopfgruppe und einem oder zwei ungeladenen Kohlenwasserstoffresten. Der negativ geladene Phosphatrest der siRNA interagiert mit der positiv geladenen Kopfgruppe der Lipide, was zur Ausbildung eines Lipid-RNA-Komplexes führt. Dieser sogenannte Lipoplex besitzt eine positiv geladene Oberfläche, die nun mit der negativ geladenen Zellmembran interagiert und deren Fusion ermöglicht. Mittels Endozytose wird der Lipid-DNA-Komplex in die Zelle aufgenommen. Nach Zerfall des Endosoms kommt es zur Freisetzung der siRNA im Zytoplasma [102], wo sie in den Multiproteinkomplex RISC (*RNA-inducing silencing complex*) eingebaut wird. Dieser bewirkt die endonukleolytische Spaltung der komplementären mRNA [103].

Für die Transfektionsversuche wurde die Harnblasenzelllinie 5637 ausgewählt.

In 6-Well-Platten wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in 2 ml RPMI + 10 % FCS ausgesät. Um eine Adhäsion der Zellen am Boden der Platten zu gewährleisten, wurde die Transfektion am darauffolgenden Tag durchgeführt. Für die Transfektion wurden die *FlexiTube siRNA KISS1R* (Qiagen) und die *AllStars Negative Control siRNA* (Qiagen) als Negativkontrolle (NC) verwendet, welche zu keinen bekannten Säugetiergenen homolog ist. Die siRNAs wurden in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Beide Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt. Pro Well wurden 3 µl Transfektionsmedium *DharmaFECT 1 Transfection Reagent* (Fisher Scientific) verwendet.

Pro Well wurde je ein Ansatz für das Transfektionsmedium und die siRNA vorbereitet.

	<b>Ansatz siRNA</b>	<b>Ansatz Transfektionsmedium</b>
<b>NC-siRNA</b>	50 µl 2 µM siRNA-Stock + 150 µl OptiMEM	3 µl DharmaFECT1 + 197 µl OptiMEM
<b>KISS1R-siRNA</b>	50 µl 2 µM siRNA-Stock + 150 µl OptiMEM	3 µl DharmaFECT1 + 197 µl OptiMEM

Die beiden Ansätze wurden zunächst durch Pipettieren gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde der siRNA-Ansatz zum Transfektionsmedium gegeben und das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 1,6 ml Komplettmedium RPMI + 10 % FCS hinzugegeben. Das alte Medium in

den 6-Well-Platten wurde abgesaugt und durch den vorbereiteten Transfektionsansatz ersetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und das Medium nach 24 h durch Komplettmedium ausgetauscht, um die toxische Wirkung des Transfektionsmediums zu reduzieren. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und für weitere Funktionsanalysen verwendet. Außerdem wurde im Anschluss aus den verbliebenen Zellen RNA isoliert, um mittels quantitativer RT-PCR die Expression des KISS1R zu bestimmen und die Effektivität der Transfektion zu ermitteln.

### **2.2.5.2 Echtzeit-Zellanalysen**

Der Einfluss der Inhibierung von KISS1R auf die Proliferation und Migration der transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde mit dem *xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA)* (ACEA Bioscience, Inc.) ermittelt. Die verwendeten *E-Plates 16* (Proliferationsassay) und *CIM-Plates 16* (Migrationsassay) besitzen Goldelektroden am Boden der Wells, die von einem Wechselstrom durchflossen werden, was zur Impedanzmessung genutzt wurde. Veränderungen der Impedanz entstehen durch Änderungen der Kontaktstellen zwischen Zellen und Goldelektrode. Sind die Goldelektroden nicht mit Zellen bewachsen, so entspricht die gemessene Impedanz dem Wechselstromwiderstand der Elektroden. Wenn Zellen auf der Oberfläche der Elektrode anhaften, steigt der Widerstand und damit auch die gemessene Impedanz an. Die Zunahme der Impedanz ist demnach proportional zur Adhäsion und Proliferation der Zellen auf der Elektrode. Die Impedanz wird in Zellindexwerten angegeben und kann mit einer hohen Zeitaufösung in Echtzeit gemessen werden. Diese Methode ermöglicht die kontinuierliche Analyse von Proliferation, Migration, Zellzahl und Vitalität.

#### **Proliferationsassay**

Für die Proliferationsanalysen wurden *E-Plates 16* verwendet. Die vorher transfizierten Zellen (siehe 2.2.6.1) wurden zunächst abtrypsiniert und mittels *Luna™ Automated Cell Counter* (Logos Biosystems) gezählt. Pro *Well* wurden 10.000 Zellen in 200 µl RPMI + 10 % FCS eingesetzt. Die Analyse der Proliferation erfolgte über einen Zeitraum von 42 h. In den ersten 4 h wurde die Adhäsion gemessen und im Anschluss die Proliferation. Die Messung des Zellindexes erfolgte in den ersten 4,5 h alle 30 s, danach bis zum Ende des Versuchs alle 30 min. Jeder Ansatz wurde als Triplikat geführt. Zellfreies Komplettmedium diente als Leerwert.

#### **Migrationsassay**

Die Analyse der Zellmigration erfolgte unter der Verwendung von *CIM Plates 16*. Diese stellen ein Zwei-Kompartiment-System dar, welches durch eine auf der Unterseite mit Goldelektroden beschichtete poröse Membran (8 µm Porengröße) gebildet wird. In die untere Kammer wurden

160 µl Komplettmedium RPMI + 10 % FCS gegeben. Das darin enthaltene FCS diente den Zellen als Lockstoff für die Migration in die untere Kammer. In die obere Kammer wurden 20.000 Zellen in 150 µl serumfreies Medium gegeben. Zusätzlich wurde das Medium mit dem Proliferationshemmer Aphidicolin versetzt. Aphidicolin ist ein selektiver Inhibitor der DNA-Polymerase  $\alpha$ , wodurch die Zellteilung verhindert wird [104].

Die Gesamtkonzentration von Aphidicolin in der oberen Kammer betrug 1 µg/ml. Zellen, die durch die Poren auf die Unterseite der Membran migrieren, können dort durch Zunahme der Impedanz identifiziert werden. Die Migration der Zellen wurde über einen Zeitraum von 12 h beobachtet. Die Messung des Zellindex erfolgte in den ersten 9 h alle 30 s, danach bis zum Ende des Experiments alle 30 min.

### **Invasionsassay**

Um den Einfluss der Inhibierung von KISS1R auf die Invasionsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurden *Biocoat<sup>TM</sup> Matrigel<sup>TM</sup>* Invasionskammern (BD, Bioscience) verwendet. Diese stellen ein in-vitro-System zur Untersuchung der Zellinvasion durch die Basalmembran dar. Die Einsätze dieser Multi-Well-Platten besitzen auf der Unterseite eine poröse Membran (Porendurchmesser 8 µm), die mit einer gleichmäßigen Schicht von *Matrigel<sup>TM</sup>* Matrix überzogen ist. Invasiv wachsende Zellen können diese Matrix abbauen und dadurch in den unteren Teil der Kammer gelangen. In jede Kammer wurden zunächst 750 µl Komplettmedium RPMI + 10 % FCS hineingegeben, bevor die mit *Matrigel<sup>TM</sup>* beschichteten Einsätze eingesetzt wurden. In den Einsatz wurden nun 50.000 Zellen in 500 µl serumfreies Medium eingefügt. Anschließend wurde die Platte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden die Einsätze vorsichtig mit einer Pinzette aus der Kammer genommen und das alte Medium entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die Unterseite der Einsätze nicht berührt wurde, da sich hier eventuell Zellen befanden, welche durch die Membran migriert waren. Anschließend wurden die Einsätze zweimalig mit 500 µl Aqua dest. gewaschen und in 500 µl 75 % Ethanol für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Die Böden der Einsätze wurden danach erneut zweimal in 500 µl Aqua dest. gewaschen. Mit einem Wattestäbchen wurden Zellreste, *Matrigel<sup>TM</sup>* und Medium von den Innenseiten der Einsätze entfernt. Die Zellen an der Unterseite der Einsätze wurden mit 0,1 % Kristallviolettlösung für 5 min gefärbt. Das überschüssige Kristallviolett wurde in 2 Waschschritten mit jeweils 500 µl Aqua dest. von den Einsätzen entfernt und trocknen gelassen. In 800 µl 10 % Essigsäure wurden die Zellen lysiert und der Farbstoff freigesetzt. Aus jeder Kammer wurden je 100 µl des Gemischs aus Essigsäure und Farbstoff in zwei Wells einer 96-Well Platte geführt und im Anschluss im TECAN-Plattenlesegerät bei 595 nm photometrisch gemessen. 10 % Essigsäure wurde als Blank verwendet.

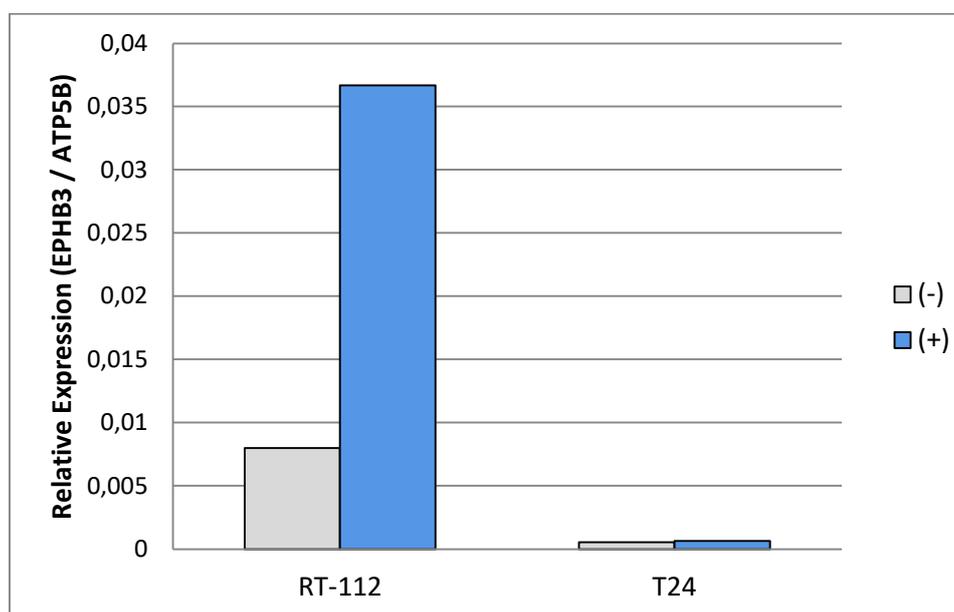
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von 5-Aza-2'-deoxycytidin auf die mRNA-Expression von EPHB3 in Harnblasenkarzinomzelllinien

Zunächst sollte das Expressionsniveau von EPHB3 in den beiden Harnblasenkarzinomzelllinien RT-112 und T24 untersucht werden.

Um eine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression zu analysieren, wurde in einem weiteren Ansatz das Expressionsniveau nach Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin bestimmt. Die Werte der mittleren relativen Expression Ms von EPHB3 ohne oder nach Zugabe von 5-Aza-dC sind in Tabelle 4 dargestellt.

In den beiden Zelllinien konnte eine Zunahme der Expression von EPHB3 nach Zugabe von 5-Aza-dC beobachtet werden. RT-112 zeichnete sich im Vergleich zu T24 durch ein deutlich höheres Expressionslevel von EPHB3 aus. Durch die Zugabe von 5-Aza-dC konnte die Expression in RT-112 um den Faktor 4,6 gesteigert werden. Im Gegensatz hierzu konnte sie in T24 nach 5-Aza-dC-Zugabe lediglich um den Faktor 1,2 gesteigert werden. Abbildung 6 zeigt die relative Expression von EPHB3 in den beiden Zelllinien RT-112 und T24 ohne und nach Behandlung mit 5-Aza-dC.



**Abbildung 6: Einfluss von 5-Aza-dC auf die Expression von EPHB3 in RT-112 und T24**  
Dargestellt ist die mittlere relative Expression von EBHB3 in den beiden Zelllinien RT-112 und T24 ohne (-) und nach Behandlung (+) mit dem DNMT-Inhibitor 5-Aza-dC.

**Tabelle 4: Mittlere relative Expression von EPHB3 nach Zugabe von 5-Aza-dC in RT-112 und T24**

Zelllinie	5-Aza-dCZugabe	Mittlere relative Expression	Fold change
RT-112	(-)	7,992E-03	1
	(+)	3,667E-02	4,6
T24	(-)	5,214E-04	1
	(+)	6,333E-04	1,2

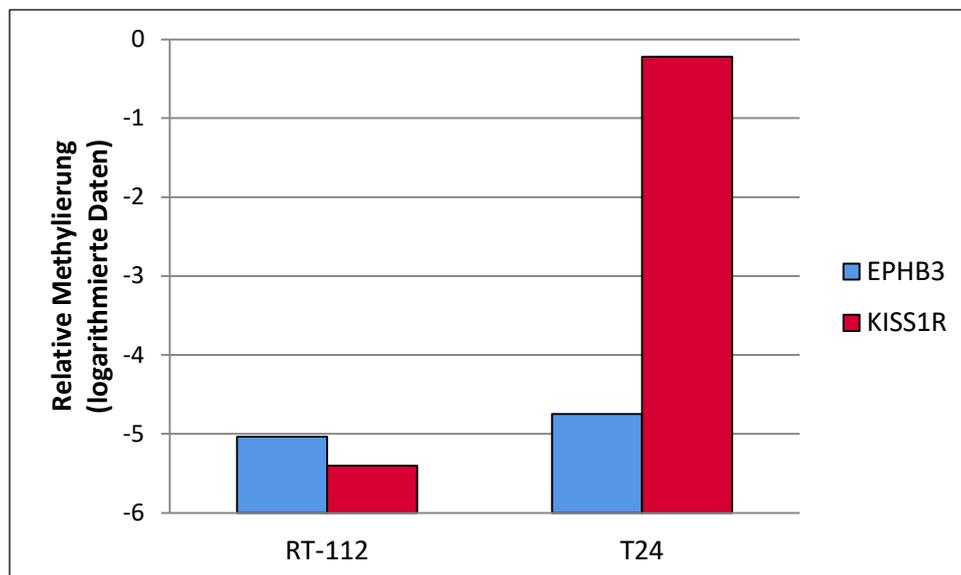
### 3.2 DNA-Methylierung der Kandidatengene in Harnblasenkarzinomzelllinien

Die Analyse des DNA-Methylierungsniveaus der Kandidatengene in den Harnblasenkarzinomzelllinien RT-112 und T24 erfolgte mittels DNA-Restriktionsverdau und qPCR. Hierfür wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet. Das methylierungsunabhängige Enzym A, welches nur unmethylierte und teilweise methylierte DNA schneidet, und das methylierungsabhängige Enzym B, welches nur methylierte DNA schneidet. Für das methylierungsunabhängige Enzym A zeigte sich in Patientenproben ein signifikanter Unterschied der Methylierung von KISS1R (siehe 3.3.2), sodass dieses Restriktionsenzym für die statistische Auswertung aller weiteren Untersuchungen der Methylierung ebenfalls verwendet wurde. Die Werte der relativen Methylierung von EPHB3 und KISS1R sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die Promotorregion von EPHB3 wies in den beiden Zelllinien RT-112 und T24 ein ähnlich niedriges Methylierungsniveau auf. In T24 war EPHB3 hierbei lediglich um den Faktor 1,06 stärker methyliert als in RT-112. Im Vergleich hierzu zeichnet sich die Promotorregion von KISS1R in den beiden Zelllinien durch größere Unterschiede in der Methylierung aus. KISS1R war dabei in T24 etwa 24-fach stärker methyliert als in RT-112. Insgesamt waren beide Kandidatengene in der Zelllinie T24 stärker methyliert als in RT-112 (siehe Abbildung 7).

**Tabelle 5: DNA-Methylierung der Kandidatengene in Harnblasenkarzinomzelllinien (normalisiert auf RT-112)**

Gen	Zelllinie	Relative Methylierung Ms	Fold change
EPHB3	RT-112	-5,035	1
	T24	-4,748	1,06
KISS1R	RT-112	-5,404	1
	T24	-0,221	24,45



**Abbildung 7: Relative DNA-Methylierung von EPHB3 und KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien**

Die Balken zeigen die relative Methylierung der Promotorregionen der Kandidatengene EPHB3 und KISS1R (normalisiert auf RT-112) in den Harnblasenkarzinomzelllinien RT-112 und T24.

### 3.3 DNA-Methylierung der Kandidatengene im primären Harnblasenkarzinomgewebe

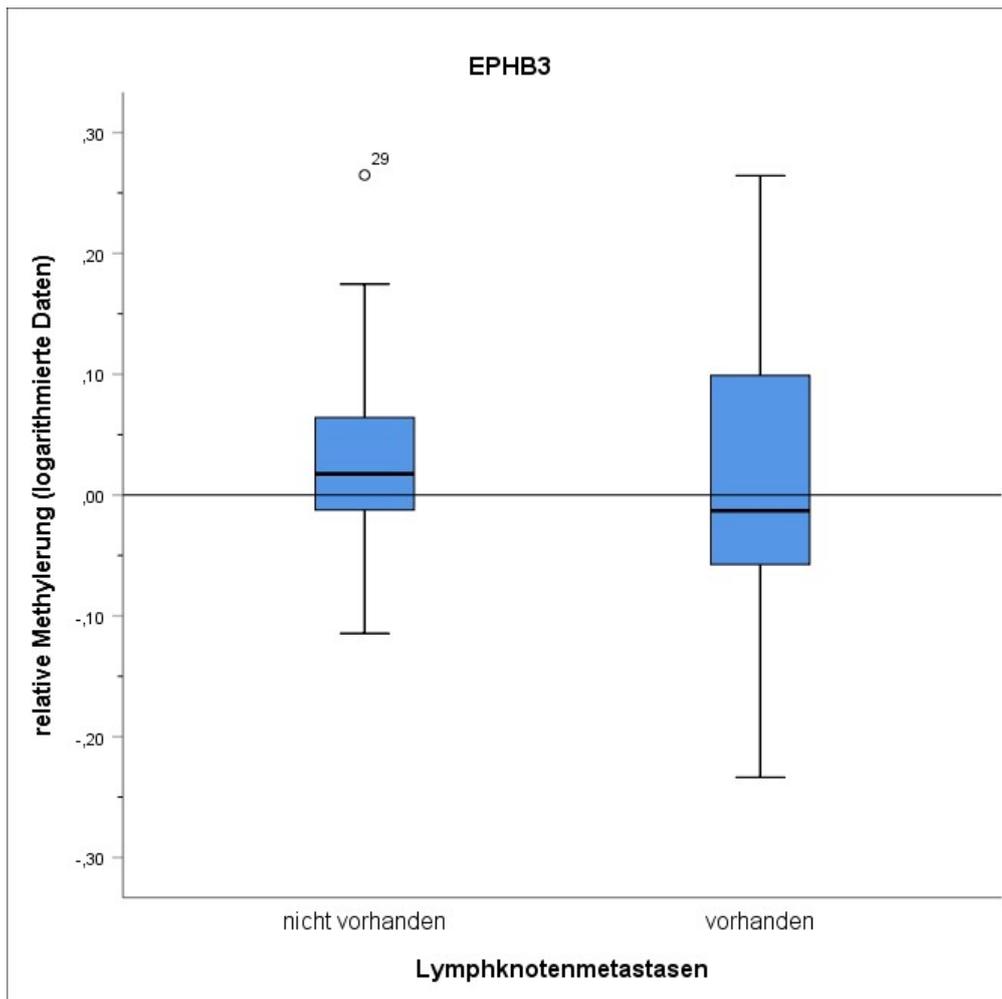
#### 3.3.1 EPHB3

Der Methylierungsstatus von EPHB3 wurde an 32 Patientenproben bezüglich des Lymphknotenstatus (10 Lymphknotenmetastasen vorhanden vs. 22 nicht vorhanden) und an 33 Proben in Hinblick auf Fernmetastasen (13 metastasiert vs. 20 nicht metastasiert) validiert. Für Patienten mit Lymphknotenmetastasen betrug die mittlere relative Methylierung 0,006 und für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen 0,024. Zwischen den beiden Gruppen konnte bei einem p-Wert von 0,764 kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die mittlere relative Methylierung für Patienten mit Fernmetastasen betrug 0,236 bzw. 0,164 für Patienten ohne Fernmetastasen. Auch hier konnte bei einem p-Wert von 0,957 kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf das Vorhandensein von Fernmetastasen festgestellt werden (siehe Tabelle 6). Die Verteilungen der Methylierungswerte sind in Box-Whisker-Plots dargestellt (Abbildung 8 und 9).

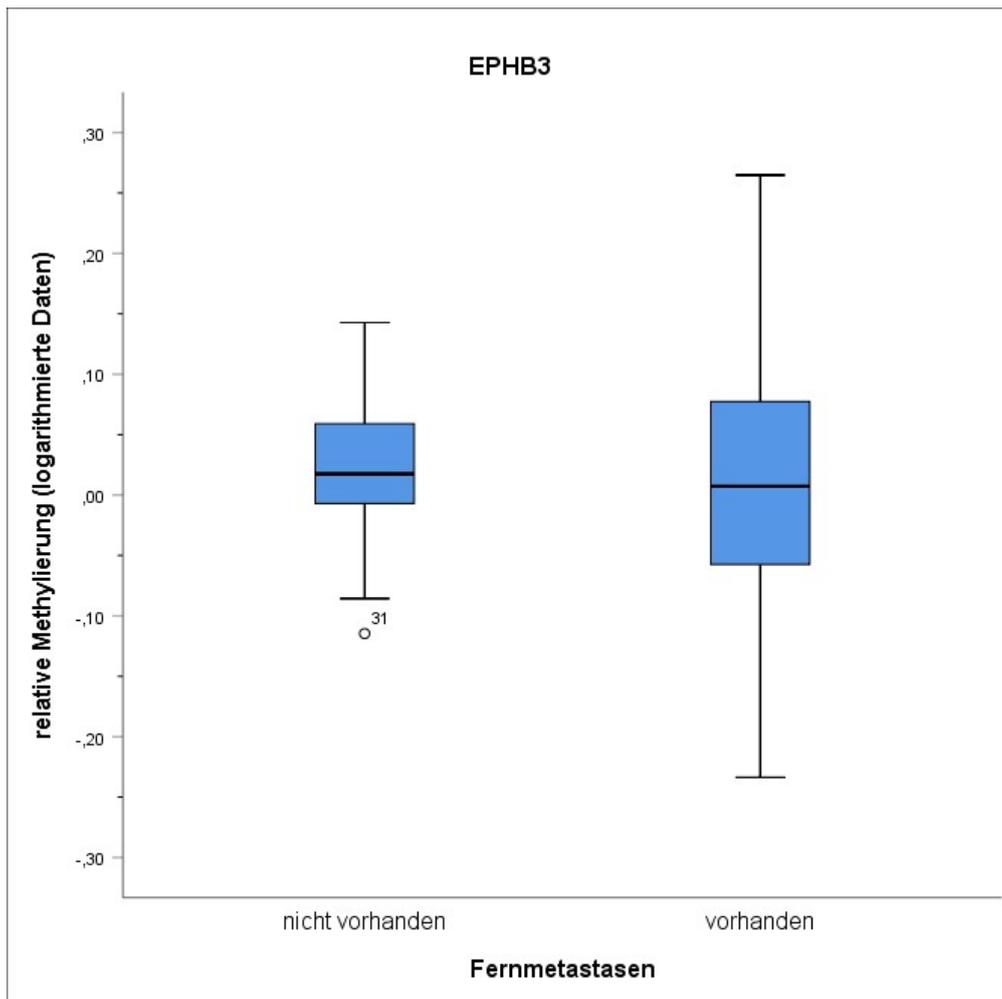
**Tabelle 6: Relative Methylierung von EPHB3 im Gewebe**

Gruppe	Probenzahl	Relative Methylierung Ms		
		Mittelwert	STD	p-Wert
Lymphknotenmetastasen	(-) 22	0,243	0,084	<b>0,764</b>
	(+) 10	0,007	0,145	
Fernmetastasen	(-) 20	0,164	0,063	<b>0,957</b>
	(+) 13	0,236	0,148	



**Abbildung 8: Methylierung von EPHB3 im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen**

Box-Whisker-Plot der relativen Methylierung von EPHB3 im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne (n = 22) bzw. mit (n = 10) vorhandenen Lymphknotenmetastasen.



**Abbildung 9: Relative Methylierung von EPHB3 im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Fernmetastasen**

Box-Whisker-Plot der relativen Methylierung von EPHB3 im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne (n = 20) bzw. mit (n = 13) vorhandenen Fernmetastasen.

### 3.3.2 KISS1R

Die Analyse der relativen Methylierung von KISS1R erfolgte an 32 Proben bezüglich des Lymphknotenstatus (11 Lymphknotenmetastasen vorhanden vs. 21 nicht vorhanden) und an 31 Proben bezüglich des Fernmetastasenstatus (18 metastasiert vs. 13 nicht-metastasiert).

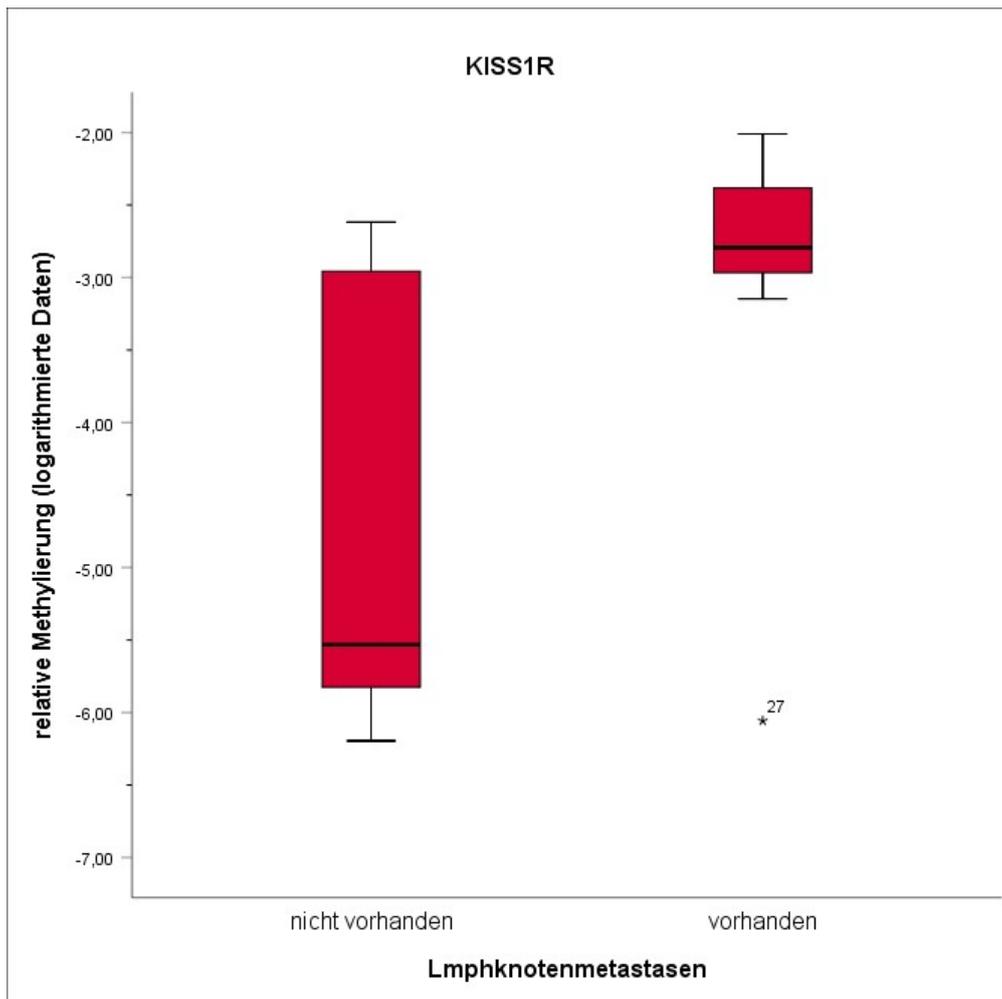
Die mittlere relative Methylierung für Patienten mit Lymphknotenmetastasen betrug -2,951 bzw. -4,774 bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war signifikant ( $p = 0,026$ ).

Für Patienten mit Fernmetastasen betrug die relative Methylierung -3,802 bzw. -4,480 für Patienten ohne Fernmetastasen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand nicht ( $p = 0,125$ ). (siehe Tabelle 7).

Die Verteilungen der Methylierungswerte sind im Box-Whisker-Plot (Abbildung 10 und 11) dargestellt.

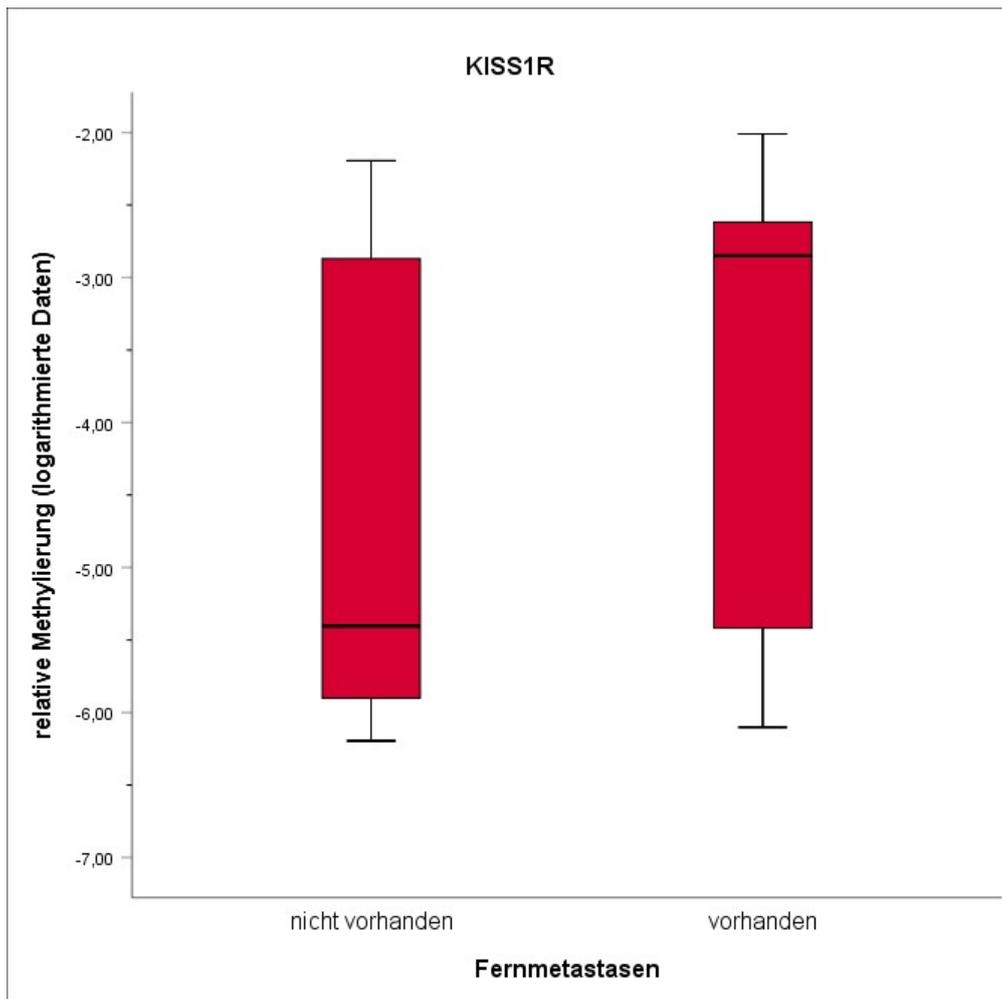
**Tabelle 7: Relative Methylierung von KISS1R im Gewebe**

Gruppe	Probenzahl	Relative Methylierung Ms		
		Mittelwert	STD	p-Wert
Lymphknotenmetastasen	(-) 21	-4,774	1,437	<b>0,026</b>
	(+) 11	-2,951	1,091	
Fernmetastasen	(-) 18	-4,480	1,560	<b>0,125</b>
	(+) 13	-3,802	1,582	



**Abbildung 10: Methylierung von KISS1R im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen**

Box-Whisker-Plot der relativen Methylierung von KISS1R im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne ( $n = 21$ ) bzw. mit ( $n = 11$ ) vorhandenen Lymphknotenmetastasen.



**Abbildung 11: Methylierung von KISS1R im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Fernmetastasen**

Box-Whisker-Plot der relativen Methylierung von KISS1R im Vergleich zwischen Primärtumoren von Patienten ohne (n = 18) bzw. mit (n = 13) vorhandenen Fernmetastasen.

### 3.4 Funktionsanalysen

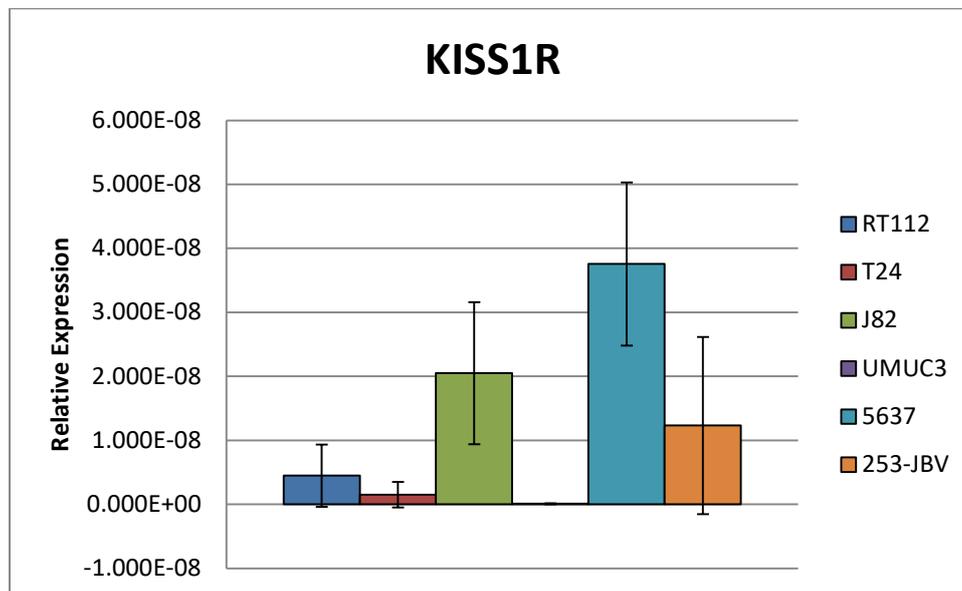
#### 3.4.1 Transiente Inhibierung der Expression von KISS1R

Der Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse sollte nach transienter Inhibierung des Gens analysiert werden. Hierzu erfolgte die Transfektion von Harnblasenkarzinomzelllinien mit spezifischer siRNA, die gezielt an die mRNA von KISS1R bindet und dadurch deren Abbau bewirkt.

#### 3.4.2 Expression von KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien

Um für die nachfolgenden Funktionsanalysen eine geeignete Zelllinie auszuwählen, die KISS1R in hohem Maße exprimiert, wurde das Expressionsniveau des Kandidatengens in

verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien mittels qPCR bestimmt. Die Expressionsunterschiede in den verschiedenen Zelllinien sind in Abbildung 12 dargestellt. KISS1R wurde in der Zelllinie UMUC3 am geringsten exprimiert. Tabelle 8 zeigt die relative Expression der verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien in Relation zur Expression von UMUC3. In RT-112 und T24 wurde KISS1R um den Faktor 38 bzw. 13 stärker exprimiert als in UMUC3. Die höchste Expression von KISS1R wurde in den Zelllinien 253J-BV und 5637 beobachtet. 253J-BV exprimierte KISS1R um den Faktor 107 stärker als in UMUC3. 5637 wies insgesamt die höchste Expression auf. KISS1R wurde hier 326-fach stärker exprimiert als in UMUC3. 5637 wurde somit für die Funktionsanalysen ausgewählt.



**Abbildung 12: Relative Expression von KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien**

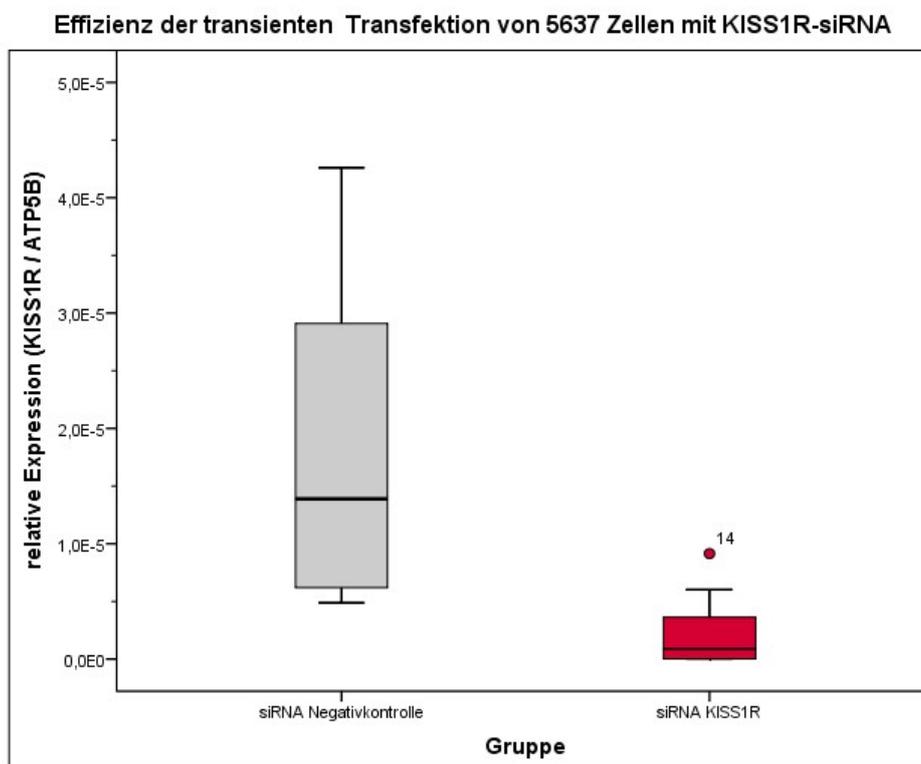
**Tabelle 8: Relative Expression von KISS1R in verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien (normalisiert auf UMUC3)**

Zelllinie	Relative Expression		Fold change
	Mittelwert	STD	
<b>RT-112</b>	4,483E-06	4,483E-06	38,9
<b>T24</b>	1,524E-06	1,976E-06	13,2
<b>UMUC3</b>	1,151E-07	7,252E-08	1
<b>5637</b>	3,756E-05	1,276E-05	326,3
<b>253J-BV</b>	1,233E-05	1,385E-05	107,3

### 3.4.3 Transfektionseffizienz

In insgesamt 3 Versuchsansätzen wurden die 5637-Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit jeweils 50 nM spezifischer KISS1R-siRNA bzw. unspezifischer Negativkontroll-RNA (NC) transfiziert. Pro Versuchsansatz erfolgten jeweils 3 Transfektionsansätze in Duplets. Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, erfolgte eine mRNA-Expressionsanalyse mittels qPCR. Durchschnittlich konnte die Expression auf 13 % des Ausgangswertes herabreguliert werden. Die Reduktion der KISS1R-Expression war signifikant ( $p = 0,001$ ). Tabelle 9 zeigt die Werte der mittleren relativen Expression von KISS1R nach transienter Transfektion.

Die Effizienz der transienten Transfektion von 5637-Zellen mit KISS1R-siRNA ist in Box-Whisker-Plots dargestellt (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Effizienz der transienten Transfektion von 5637 Zellen mit KISS1R-siRNA (50 nM nach 48 h)**

Dargestellt ist die relative Expression von KISS1R in 5637 Zellen nach Transfektion mit 50 nM unspezifischer Negativkontroll-siRNA bzw. 50 nM spezifischer KISS1R-siRNA nach einem Zeitraum von 48 h. Die Transfektion mit spezifischer KISS1R-siRNA führte zu einer Verringerung der Expression auf 13 % des ursprünglichen Expressionsniveaus.

**Tabelle 9: Mittlere relative Expression von KISS1R nach transienter Transfektion (siRNA 50  $\mu$ M nach 48 h)**

	Mittlere relative Expression (KISS1R / ATP5B)	STD	Fold change
<b>NC</b>	1,863E-05	1,344E-05	1
<b>KISS1R</b>	2,522E-06	3,211E-06	0,135

### 3.5 Funktionsanalysen

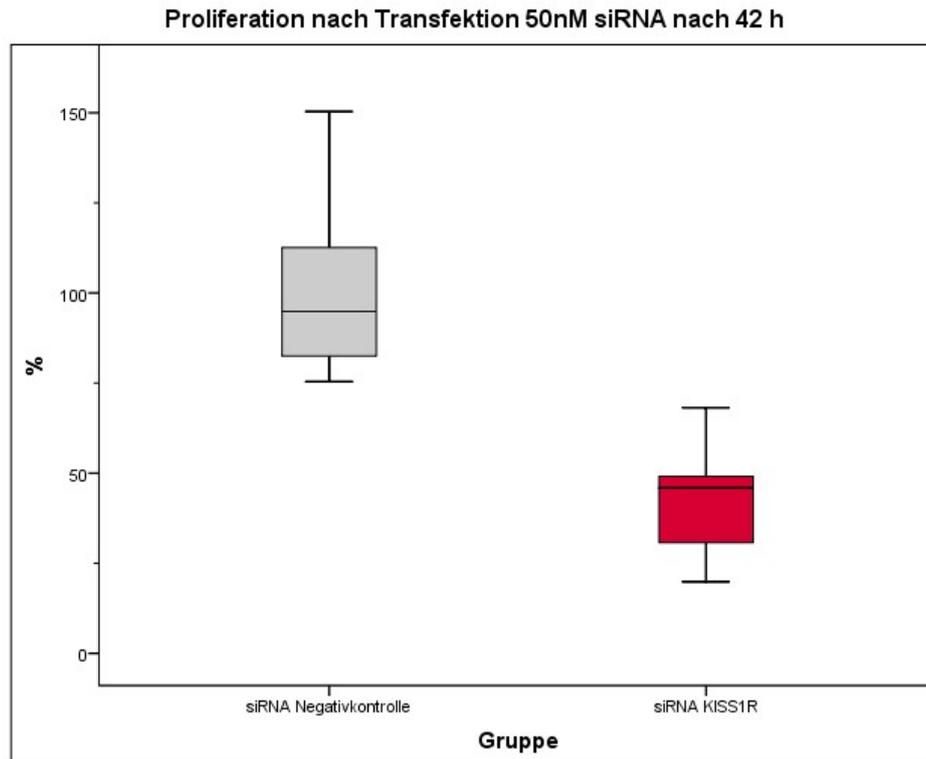
Nachdem bestätigt werden konnte, dass die Transfektion zu einer Herabregulation der Expression von KISS1R führte, wurde in Funktionsanalysen das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen untersucht.

Mit Hilfe des *Real-Time Cell Analyzer* wurde die Zellproliferation ermittelt. Um die optimale Zellzahl zu ermitteln, wurden zunächst 5637-Wachstumskurven erstellt (siehe Anhang 7). Pro Messung wurden 10.000 Zellen verwendet. Zur Berechnung der Zellproliferation wurde der Zellindex zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Aussaat vom Zellindex nach 42 Stunden subtrahiert, um die Adhäsionsphase auszuschließen. Die Transfektion mit spezifischer KISS1R-siRNA führte zu einer Verringerung der Zellproliferation auf 43 % des Ausgangsniveaus. Der Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle war signifikant ( $p = 0,000$ ).

Die Messung der Zellmigration erfolgte ebenso im *Real-Time Cell Analyzer* unter Verwendung von 20.000 Zellen pro Messung. Für die Berechnung der Migrationsrate wurde der Zellindex zum Zeitpunkt 4 Stunden vom Zellindex nach 12 Stunden subtrahiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,928$ ) zwischen den mit KISS1R-siRNA und NC-siRNA transfizierten Zellen festgestellt werden.

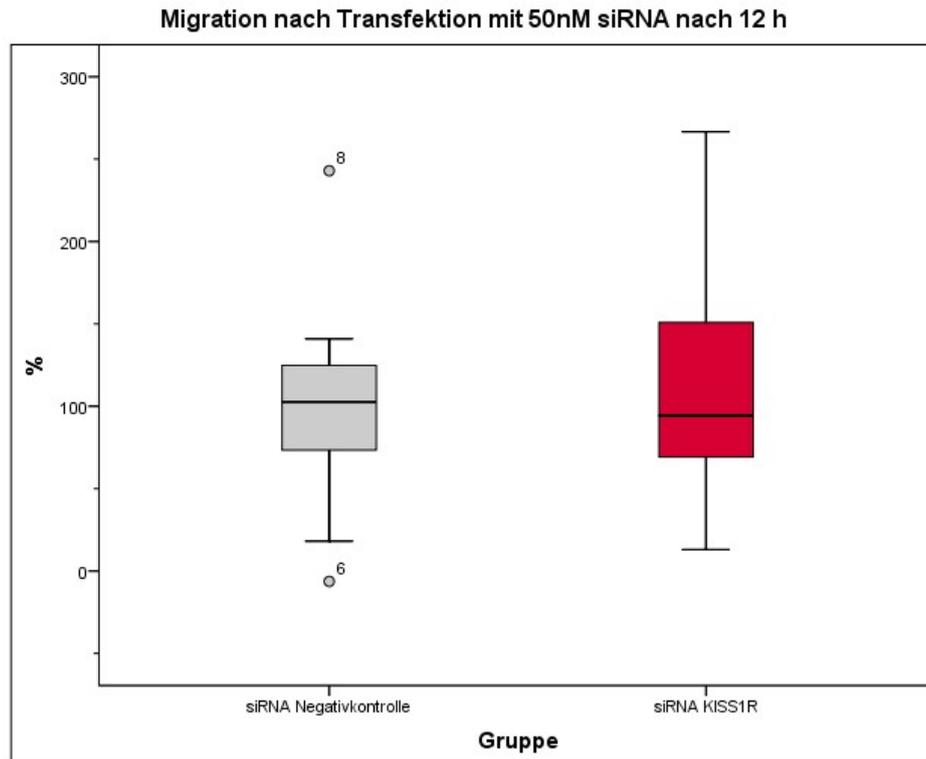
Um den Einfluss von KISS1R auf das Invasionsverhalten von 5637 zu ermitteln, wurden pro Versuchsansatz 50.000 transfizierte Zellen in mit *Matrigel*<sup>TM</sup> beschichtete Invasionskammern ausgesät. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des TECAN-Plattenlesegeräts. Die Verteilung der Werte zwischen den beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,827$ ).

Die prozentuale Änderung der Proliferation, Migration und Invasion von 5637-Zellen nach transienter Transfektion ist in Box-Whisker-Plots dargestellt (Abbildung 14 - 16).



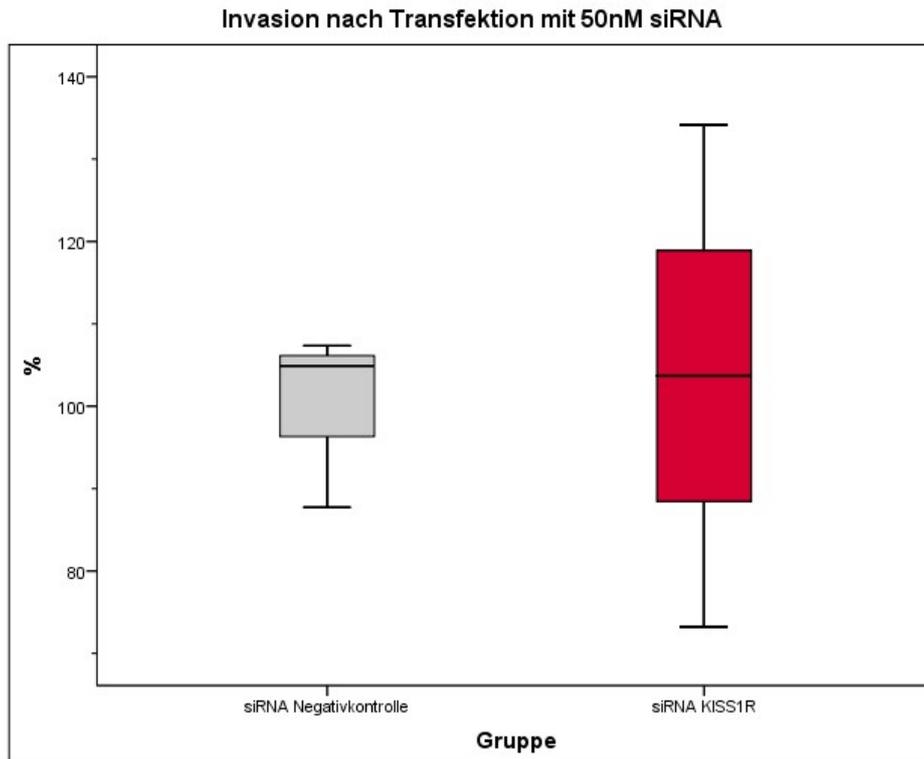
**Abbildung 14: Proliferationsverhalten nach Inhibierung von KISS1R**

Die Box-Whisker-Plots zeigen die prozentuale Veränderung der Proliferation nach transienter Transfektion mit KISS1R-siRNA (rot) im Vergleich zur Behandlung mit Negativkontroll-siRNA. Eine Verringerung der Zellproliferation auf 43 % des Ausgangsniveaus konnte gemessen werden ( $p = 0,000$ )



**Abbildung 15: Migrationsverhalten nach Inhibierung von KISS1R**

In den Box-Whisker-Plots ist die prozentuale Veränderung der Migration nach transienter Transfektion mit KISSR-siRNA (rot) im Vergleich zur Negativkontrolle (grau) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,928$ ).



**Abbildung 16: Invasionsverhalten nach Inhibierung von KISS1R**

In den Box-Whisker-Plots ist die prozentuale Veränderung der Migration nach transienter Transfektion mit KISSR-siRNA (rot) im Vergleich zur Negativkontrolle (grau) dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,827$ ).

## 4 Diskussion

Muskelinvasive Harnblasentumore neigen im Gegensatz zu nichtinvasiven Tumoren häufiger zur Metastasierung und weisen dadurch eine wesentlich schlechtere Prognose auf. Histopathologische Parameter wie ein fortgeschrittenes T-Stadium (T3, T4), das Vorhandensein einer lymphovaskulären Invasion (LVI), Lymphknotenmetastasen sowie ein positiver R-Status (R1, R2) sind derzeit die einzigen Parameter, die zur Beurteilung des Risikos der Metastasierung und Prognoseeinschätzung zur Verfügung stehen [105; 106].

Mit den derzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden ist eine individuelle Prognoseeinschätzung anhand des individuellen Metastasierungsrisikos nicht möglich. Dies stellt jedoch einen entscheidenden Faktor bei der Therapieplanung von Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom dar, insbesondere in Hinblick auf eine adjuvante Chemotherapie.

Mit Erforschung der molekularen Charakteristika des Harnblasenkarzinoms konnten zahlreiche molekulare Marker als Prognosefaktoren identifiziert werden. Hierzu zählen Zellzyklusregulatoren (z.B. p53, p21, p27 und Cyclin E), Proliferationsmarker (z.B. Ki-67) und Apoptosemarker (z.B. Survivin) sowie verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF-Familie) [107]. Durch Verwendung molekularer Marker kann die Prognoseeinschätzung in Hinblick auf Rezidivbildung und die krankheitsspezifische Mortalität im Vergleich zur Anwendung von klinisch-pathologischen Parametern potenziell verbessert werden [108]. Jedoch konnten diese Marker aufgrund unzureichender Validierung nicht in der klinischen Praxis angewendet werden.

Neben Mutationen spielen auch epigenetische Veränderungen wie die DNA-Methylierung eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung und Tumorprogression.

Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster gelten als hoch sensitiv und sind frühzeitig nachweisbar. Die Hypermethylierung von Promotorregionen stellt einen attraktiven Biomarker aggressiver Tumore dar, da sie meist in fortgeschrittenen Tumorstadien auftritt, aber bereits in Frühstadien oder im prämaligen Gewebe nachweisbar ist [109; 110; 107].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse metastasierungsspezifischer Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster der beiden ausgewählten Kandidatengene EPHB3 und KISS1R im primären Harnblasenkarzinom und deren Bedeutung für den Prozess der Metastasierung. Somit sollte geprüft werden, ob die DNA-Methylierung der beiden Kandidatengene EPHB3 und KISS1R als spezifischer Marker für das Metastasierungsrisiko von Harnblasentumoren geeignet und funktionell an Metastasierungsprozessen beteiligt ist.

## 4.1 Physiologische Funktionen der Kandidatengene

### 4.1.1 EPHB3

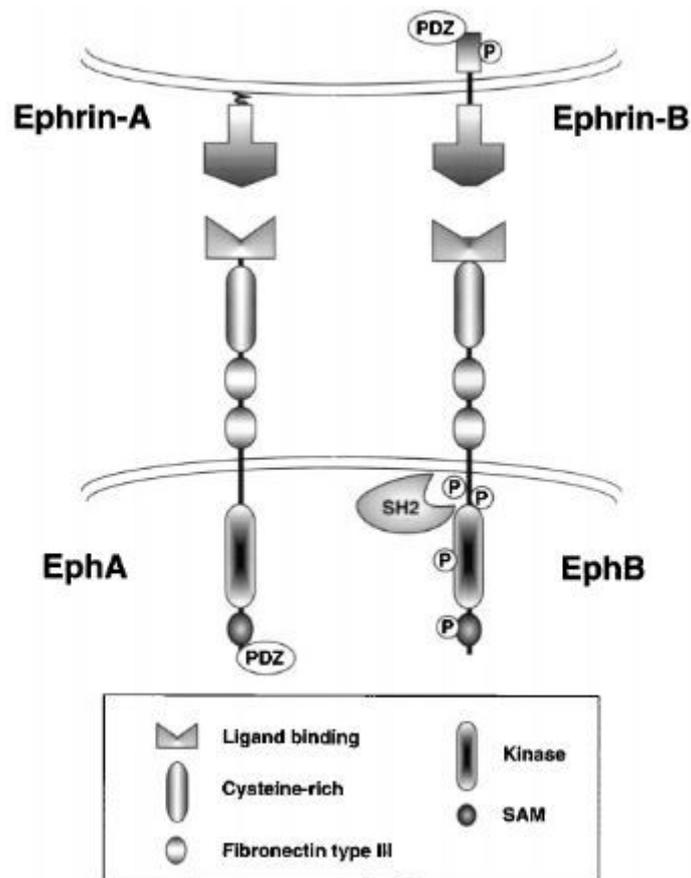
Der Ephrin-Typ B-Rezeptor 3 (EPHB3) gehört zur Gruppe der Ephrin-Rezeptoren, welche die größte bekannte Unterfamilie der Rezeptortyrosinkinasen bildet.

Die Gruppe der Ephrin-Rezeptoren wurde erstmals 1987 von Hirai *et al.* beschrieben und nach der Erythropoetin-produzierenden, hepatozellulären Karzinom-Zelllinie benannt, aus der die zugehörige cDNA isoliert werden konnte [111].

Beim Menschen konnten bisher 14 verschiedene Ephrinrezeptoren (Eph) sowie 6 entsprechende Liganden, die Ephrine, identifiziert werden. Bezüglich ihrer Bindungsaffinität zu Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Ephrin-A-Liganden oder zu transmembranen Ephrin-B-Liganden als auch anhand von Sequenzhomologien werden die Ephrin-Rezeptoren in 2 Subklassen, EphA und EphB, eingeteilt [112]. Bisher konnten beim Menschen 9 verschiedene EphA- (EphA1–8 und EphA10) und 5 EphB-Rezeptoren (EphB1–4 und EphB6) identifiziert werden.

Sowohl der Rezeptor als auch der Ligand sind membrangebunden, sodass für die Signaltransduktion ein direkter Zell-Zell-Kontakt benötigt wird [113]. Beide Rezeptortypen bestehen aus einer extrazellulären sowie einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus einer Ligandenbindestelle, einer Cystin-reichen Region sowie zwei Fibronectin (III)-Repeats zusammen. Der intrazelluläre Anteil besteht hingegen aus einer Juxtamembran- sowie einer Tyrosinkinase-Domäne, einem *sterile alpha motif* (SAM), sowie einer C-terminalen PDZ-Bindedomäne [114].

Die zugehörigen Liganden, die Ephrine, setzen sich aus einer Rezeptor-Bindedomäne und einem weiteren Bestandteil zusammen, der je nach Subklasse variiert. Ephrin-A-Liganden besitzen eine zusätzliche Membran-Bindedomäne und sind über einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker an die Zellmembran gebunden. Im Gegensatz dazu stellen Ephrin-B-Liganden Transmembranproteine dar [115]. Sie besitzen eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne, die aus einer Tyrosin-Phosphorylierungsstelle sowie einer PDZ-Bindedomäne aufgebaut ist. So können Ephrin-B-Liganden auf zwei verschiedene Weisen an Protein-Protein-Interaktionen teilnehmen [116]. Folglich kann in Zellen, die Ephrin-B exprimieren, eine bidirektionale Signalweiterleitung stattfinden, bei der ein interzelluläres Signal sowohl in der Rezeptor-tragenden Zelle (vorwärts gerichtete Signalweiterleitung) als auch in der Ligand-tragenden Zelle (reverse Signaltransduktion) erzeugt werden kann [117]. Die Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor führt zu dessen Autophosphorylierung an Tyrosinresten, was die Aktivierung seiner Kinaseaktivität bewirkt [118].



**Abbildung 17: Interaktionen und Signaltransduktion von Eph-Rezeptoren und Ephrinen (nach Dodelet) [119]**

Bei direktem Zell-Zell-Kontakt können Ephrine und Eph-Rezeptoren miteinander interagieren. GPI-verankerte Ephrin-A-Liganden binden an EphA-Rezeptoren, wohingegen Ephrin-B-Liganden an transmembrane Ephrin-B-Rezeptoren binden. Die Bindung des Ephrins an seinen entsprechenden Rezeptor führt zu dessen Aktivierung durch Autophosphorylierung an Tyrosinresten. Diese stellen Bindestellen für Signalproteine dar, welche SH2-Bindedomänen besitzen. Während der Rezeptorbindung werden Ephrin-B-Liganden ebenfalls phosphoryliert. Signalproteine, welche PDZ-Bindedomänen besitzen, binden an das Carboxyl-Ende der EphA-Rezeptoren und Ephrin-B-Liganden.

Im Allgemeinen binden die Ephrine an die Rezeptoren ihrer entsprechenden Subklasse, jedoch sind auch vereinzelt überkreuzende Bindungen zu anderen Subklassen möglich [120; 118]. Beispielsweise können EphB3-Rezeptoren alle Ephrin-B-Liganden binden, jedoch keine Ephrin-A-Liganden. Der zugehörige Ligand EphrinB3 weist die stärkste Bindungsaffinität gegenüber dem EphB3-Rezeptor sowie EphA4 auf. In geringerem Maße sind auch Bindungen an EphB1 und EphB2 möglich [121].

Im Großteil der Publikationen, die die Signaltransduktion des Ephrin-Ephrin-B-Rezeptor-Systems untersuchen, wurde die Funktion der vorwärts gerichteten Signalweiterleitung

analysiert. Die Funktion der reversen Signaltransduktion des EphrinB ist bisher noch unbekannt.

Die Expression der Ephrinrezeptoren ist dynamisch und räumlich-zeitlich komplex. Sie wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Beispielsweise wird durch den Transkriptionsfaktor Tcf-4, welcher selbst wiederum durch nukleares  $\beta$ -Catenin aktiviert wird, simultan die Expression bestimmter Ephrin-Rezeptoren hochreguliert, während die Expression ihrer Liganden herabreguliert wird [117].

Ephrin-Rezeptoren und ihre Liganden sind bedeutend für eine Vielzahl von zellphysiologischen Prozessen sowie die Pathogenese von Krankheiten. Das Eph-Ephrin-Rezeptor-System trägt zur Kontrolle von Zellmorphologie, Adhäsion, Migration und Invasion von Zellen bei, indem es die Organisation des Aktin-Zytoskeletts modifiziert und die Aktivität von Integrinen und interzellulären Adhäsionsmolekülen beeinflusst [113; 122].

Der bidirektionale Signalweg des Eph-Ephrin-Systems ist sowohl für die Zellkommunikation zwischen Neuronen als auch für die Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen von Bedeutung. Durch Aufbau neuronaler Verbindungen, axonale Wegführung sowie Regulation der Formation synaptischer Verbindungen sind Eph-Ephrin-assoziierte Signalwege für die Entwicklung und Organisation des Nervensystems entscheidend [122].

Für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems konnte eine Beteiligung des Eph-Ephrin-Signalweges nachgewiesen werden. Durch Kontrolle der Zuweisung von Zellen zum arteriellen bzw. venösen System ist es am angiogenen *Remodeling* beteiligt [123; 114].

#### **4.1.2 KISS1R**

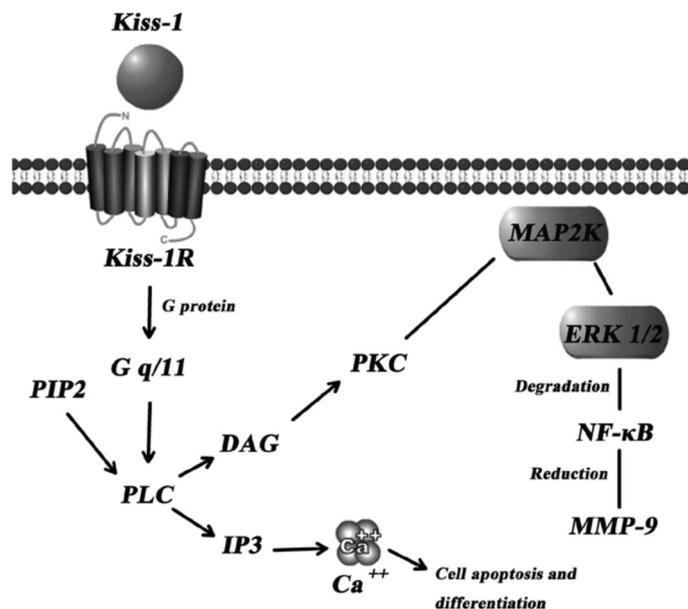
Der KISS1-Rezeptor (auch bekannt als GPR54, hOT7T175 oder AXOR12) ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, der erstmalig 1999 von Lee *et al.* beschrieben wurde [124]. 2001 wurde von 3 unabhängigen Arbeitsgruppen das Peptidhormon Kisspeptin, das Genprodukt des Metastasensuppressorgens KISS1, als endogener Ligand des KISS1-Rezeptors identifiziert [125-127]. KISS1R und KISS-1 weisen ein ähnliches Verteilungsmuster im Gewebe auf, wobei die höchsten Expressionen in Plazenta, Pankreas, Hypophyse, Brustdrüse und im zentralen Nervensystem gemessen werden konnten [125-127].

Physiologisch dient das KISS1-KISS1R-System zur Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und trägt über die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus zur Einleitung der Pubertät bei. GnRH regt den Hypophysenvorderlappen zur Produktion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) sowie luteinisierenden Hormons (LH) an, welche wiederum in Hoden und Eierstöcken die Freisetzung von Sexualhormonen und die Keimzellreifung fördern [128-130].

Mutationen im KISS1R-Gen führen zum Funktionsverlust des Rezeptors. Die daraus resultierende mangelnde Stimulation der Keimdrüsen durch FSH und LH führt zu deren

Unterfunktion, auch bezeichnet als idiopathischer hypogonadotroper Hypogonadismus, und somit zum Ausbleibender Pubertät [130].

Die Bindung des Kisspeptins an den KISS1-Rezeptor führt zu dessen Konformationsänderung, was die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins an der Innenseite der Zellmembran bewirkt. Dies führt zum Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins und zur Dissoziation des G-Proteins in die  $\alpha$ -Untereinheit sowie den  $\beta\gamma$ -Komplex, welche für die weitere Signaltransduktion verantwortlich sind [131]. Das KISS1-KISS1R-System aktiviert über die Untereinheit des G-Proteins den  $G\alpha_{q11}$ -Signalweg, welcher wiederum die Phospholipase C aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert.  $IP_3$  und DAG fungieren als *second messenger*, welche Signalwege aktivieren, die einen hemmenden Einfluss auf Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen besitzen. Der durch  $IP_3$  vermittelte intrazelluläre Anstieg der Kalziumkonzentration trägt zur Differenzierung und Einleitung der Apoptose von Tumorzellen bei. DAG aktiviert zunächst die Proteinkinase C, welche die Aktivierung des MAPK2-Signalweges vermittelt, was zur Hemmung der Tumormetastasierung beiträgt [132].



**Abbildung 18: Signalkaskade des KISS1-KISS1R-Systems [132]**

Durch Bindung des Kisspeptins an den KISS1-Rezeptor wird das heterotrimere G-Protein an der Innenseite der Zellmembran aktiviert und es kommt zur Dissoziation in seine  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Dadurch wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ ) in Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerine (DAG).  $IP_3$  bewirkt die intrazelluläre Freisetzung von Calcium-Ionen und induziert somit die Zelldifferenzierung und Apoptose. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum den MAPK2-Signalweg aktiviert. Durch den Abbau des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B kommt es zur Reduktion der Expression der Matrix-Metallopeptidase 9 (MMP-9) was zur Hemmung der Tumormetastasierung führt.

## **4.2 Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und mRNA-Expression in Harnblasenkarzinomzelllinien**

Um die Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierung und Genexpression der Kandidatengene zu untersuchen, wurden Harnblasenkarzinomzelllinien mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC), einem Inhibitor der DNA-Methyltransferase, behandelt.

5-Aza-dC wird als Nukleosidanalogen anstelle von Cytosin in den DNA-Strang eingebaut. Es bindet kovalent an die DNA-Methyltransferase, was zu deren Aktivitätshemmung führt. Es kommt demnach zu einer passiven Demethylierung des Gens [100].

Mit Hilfe von Expressionsanalysen sollte zunächst die Auswirkungen von 5-Aza-dC auf die Genexpression von EPHB3 in den behandelten Zellen beobachtet werden. Eine Zunahme des Expressionsniveaus würde hier für die mögliche Reaktivierung des Gens durch passive Demethylierung sprechen. Anschließend sollten nach Bestimmung des Methylierungsniveaus Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen Expression und DNA-Methylierung gezogen werden.

Für die Expressions- und Methylierungsanalysen wurden die beiden Harnblasenkarzinomzelllinien RT-112 und T24 ausgewählt, welche sich durch unterschiedliche Tumoreigenschaften und –differenzierungsgrade auszeichnen.

### **4.2.1 EPHB3**

Für das Gen EPHB3 konnte in beiden Zelllinien nach Behandlung mit 5-Aza-dC eine Zunahme der Expression beobachtet werden. Die Ergebnisse lassen annehmen, dass die passive Demethylierung des Gens die Unterdrückung der Expression durch Methylierung aufhebt, was zu dessen Re-Expression führt. Demnach wäre anzunehmen, dass die Zelllinie RT-112 eine stärkere Methylierung des EPHB3-Gens aufweist als die T24 Zelllinie.

Um die Korrelation zwischen Expression und DNA-Methylierung zu untersuchen, erfolgte im Anschluss die Bestimmung des relativen Methylierungsniveaus von EPHB3 in den beiden Harnblasenkarzinomzelllinien. Bei der Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich für beide Zelllinien ein insgesamt niedriges Methylierungsniveau der Promotorregion von EPHB3 im Vergleich zu KISS1R, wobei das Methylierungsniveau von EPHB3 in T24 höher lag. Die zuvor anhand der Ergebnisse der Expressionsanalysen gestellte Annahme, dass die Zelllinie RT-112 ein höheres Methylierungsniveau von EPHB3 als T24 aufweist, konnte demnach nicht bestätigt werden.

Bei der Verwendung von 5-Aza-dC in Expressionsanalysen muss beachtet werden, dass die Hemmung der DNA-Methyltransferase einen Einfluss auf das gesamte Genom einer Zelle nimmt. Es findet nicht nur die Demethylierung spezifischer Gene, sondern des gesamten Genoms statt. Hierbei werden unter anderem auch Transkriptionsfaktoren aktiviert, was zu einer erhöhten Expression des Zielgens beitragen kann. Die Expression der Ephrinrezeptoren

ist dynamisch und räumlich-zeitlich komplex. Sie wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Beispielsweise wird durch den Transkriptionsfaktor Tcf-4, welcher selbst wiederum durch nukleares  $\beta$ -Catenin aktiviert wird, simultan die Expression bestimmter Ephrin-Rezeptoren hochreguliert, während die Expression ihrer Liganden herabreguliert wird [117]. Es ist anzunehmen, dass durch die Demethylierung des gesamten Genoms auch die Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von EPHB3 steuern, beeinflusst werden. Somit erlaubt die ausschließliche Betrachtung der Expressionsdaten keine direkten Rückschlüsse vom Expressionsniveau auf den Methylierungsstatus des untersuchten Gens. Die Forschungsarbeit von Poplineau *et al.* konnte diesen Zusammenhang bestätigen. In der Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 konnte nach Behandlung mit 5-Aza-dC ein Anstieg der Expression des Gens MMP-1 auf das 44-fache des Ausgangswertes beobachtet werden. In einer Promotoranalyse konnte jedoch keine CPG-Insel innerhalb der Promotorregion von MMP-1 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte nach Behandlung mit 5-Aza-dC ein Anstieg der beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 auf Proteinebene belegt werden. Darüber hinaus konnten die Autoren aufzeigen, dass 5-Aza-dC die Rekrutierung von Sp1 sowie der Polymerase II zum MMP-1-Promotor bewirkt, wodurch die Transkription des Gens eingeleitet wird [133]. Dies könnte erklären, weshalb die Behandlung der beiden Zelllinien mit 5-Aza-dC trotz niedrigem Methylierungsniveau zu einer Steigerung der Genexpression von EPHB3 führte.

Die Expression von EPHB3 ist weiterhin auch abhängig von Tumorstadium. Battle *et al.* konnten nachweisen, dass EphB3 im Frühstadium des Kolonkarzinoms verstärkt exprimiert wird und dadurch die Tumorprogression hemmt. Diese Arbeit zeigt, dass Eph-Rezeptoren im Tumorfrühstadium hochreguliert sein können und in späteren Stadien stillgelegt sind, wodurch ihre tumorsuppressive Aktivität gehemmt wird. Hierdurch könnte erklärt werden, weshalb sowohl erhöhte als auch verringerte Expressionslevel von EPHB3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden konnten [134; 135]. Wu *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen verminderter Expression von EPHB3 und DNA-Methylierung in Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien. Hier konnte für die Promotorregion von EPHB3 keine Hypermethylierung festgestellt werden [136]. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Promotormethylierung von EPHB3 in der Tumorbologie nicht von Bedeutung ist.

#### 4.2.2 KISS1R

In der Forschungsarbeit von Stubendorff *et al.* [91] wurde der Methylierungsstatus von KISS1R an verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien untersucht. Nach Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-dC konnte hier eine Verminderung der Methylierung von KISS1R beobachtet werden. Die Analyse des Methylierungsstatus erfolgte dort durch Verwendung des methylierungsabhängigen Restriktionsenzym McrBc, welches nur methylierte DNA schneidet. Ebenso konnte aufgezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit 5-Aza-dC zu einer Erhöhung der Genexpression von KISS1R führte. Dies entspricht der Annahme, dass die passive Demethylierung zu einer Reaktivierung der Genexpression führt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Methylierungsstatus von KISS1R unter Verwendung eines methylierungsunabhängigen Restriktionsenzym überprüft werden. Dieses schneidet nur unmethylierte oder teilweise methyliert DNA.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich für die Harnblasenkarzinomzelllinie T24 im Vergleich zu RT-112 eine 24-fach stärkere Promotormethylierung des KISS1R-Gens. Die Zelllinie RT-112 weist einen mäßigen Differenzierungsgrad (G2) auf, wohingegen T24 durch ein aggressiveres Wachstum und einen geringen Differenzierungsgrad (G3) gekennzeichnet ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit der Erwartung, dass KISS1R im höheren Tumorstadium ein höheres Methylierungsniveau aufweist [93; 92].

In der Arbeit von Stubendorff *et al.* konnte in beiden Zelllinien eine ausgeprägte Promotormethylierung festgestellt werden. In RT-112 lag diese bei 95 %, wohingegen die aggressivere T24-Zelllinie eine 100-prozentige Methylierung aufwies. Im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass das Methylierungsniveau von KISS1R in RT-112 hier wesentlich niedriger lag. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der unterschiedlichen Inkubationszeit der Zellen mit 5-Aza-dC bei unterschiedlicher Verdopplungszeit der Zelllinien liegen. Für RT-112 liegt die Verdopplungszeit bei ca. 35 h, bei T24 jedoch wesentlich geringer bei nur ca. 19 h [93; 92]. Um einen ausreichenden Zeitraum für die passive Demethylierung durch Hemmung der DNMT zu erhalten, erfolgte die Inkubation der Harnblasenkarzinomzelllinien mit jeweils 5-Aza-dC über 72 h. Nach 24 und 48 h wurde das Medium jeweils gewechselt und erneut 5 µM 5-Aza-dC hinzugegeben. Die Behandlung von Zellen mit 5-Aza-dC kommt es durch Hemmung der DNMT zur passiven Demethylierung. Dieser Prozess findet in der S-Phase des Zellzyklus statt. Um eine erfolgreiche Demethylierung durch 5-Aza-dC zu erzielen, ist eine ausreichende Inkubationszeit der Zelllinien notwendig und der Zellzyklus sollte vollständig durchlaufen werden. Um für beide Zelllinien gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten, hätten beide Zelllinien nach ca. 2 Zellzyklen geerntet werden müssen.

Auch in anderen Tumorentitäten konnte eine epigenetische Regulation der Expression von KISS1R durch Promotormethylierung nachgewiesen werden.

Kang *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung von KISS1R und RNA-Expression im Endometriumkarzinom. Die nicht maligne Endometriumzelllinie hEM zeichnete sich durch eine geringe Expression von KISS1R aus, eine Promotormethylierung konnte hier nicht nachgewiesen werden. In 5 von 7 Endometriumkarzinom-Zelllinien konnte eine Promotormethylierung von KISS1R nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression war in diesen Zelllinien im Vergleich zu den Zelllinien ohne Promotormethylierung von KISS1R vermindert [137].

Auch im Magenkarzinom konnte eine epigenetische Stilllegung von KISS1R durch Promotormethylierung festgestellt werden [138].

### **4.3 Korrelation der DNA-Methylierung der Kandidatengene im Primärtumorgewebe mit Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus**

Für die Bestimmung des Methylierungsniveaus wurde die gleiche Methode verwendet, die auch zur Bestimmung der DNA-Methylierung in Harnblasenkarzinomzelllinien verwendet wurde.

#### **4.3.1 EPHB3**

Für die relative Methylierung von EPHB3 konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Vorhandenseins bzw. Nicht-Vorhandenseins von Lymphknoten- oder Fernmetastasen festgestellt werden. Wie bereits in den Methylierungsanalysen in Zelllinien festgestellt wurde, weisen diese Ergebnisse ebenso auf eine nicht methylierte Promotorregion von EPHB3 im Tumorgewebe hin. Aus diesem Grund schien es nicht sinnvoll, die Funktion von EPHB3 in metastasierungsassoziierten Prozessen zu untersuchen.

#### **4.3.2 KISS1R**

Nachdem die Promotormethylierung von KISS1R in Zelllinien nachgewiesen wurde, wurde im Anschluss an Gewebeproben überprüft, ob Unterschiede im Methylierungsstatus zwischen nicht-metastasierten und metastasierten Harnblasentumoren vorliegen.

Für die relative Methylierung von KISS1R konnte ein signifikanter Unterschied für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen festgestellt werden ( $p = 0,026$ ). Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungsergebnissen von Stubendorff *et al.* [91], wo für die Methylierungsanalysen ein methylierungsabhängiges Restriktionsenzym verwendet wurde. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen mit bzw. ohne

Lymphknotenmetastasen war hier ebenfalls signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine verstärkte Promotormethylierung von KISS1R mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert und somit zur Einschätzung des Potentials eines Tumors zur Lymphknotenmetastasierung geeignet ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für die relative Methylierung von KISS1R bezogen auf das Vorhandensein von Fernmetastasen zwar unterschiedliche Mittelwerte, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,125$ ).

Der Einfluss des KISS1-KISS1R-Systems auf metastasierungsassoziierte Prozesse wurde in einer Reihe von Forschungsarbeiten untersucht. Zunächst wurde der Ligand KISS1 als Metastasensuppressor im Mammakarzinom und malignen Melanom identifiziert [139; 140].

Sanchez-Carbayo *et al.* konnten in invasiv wachsenden Harnblasenkarzinomen eine signifikante Verminderung der Expression des Liganden KISS1 im Vergleich zum Normalgewebe feststellen. Weiterhin wiesen in dieser Studie alle Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen einen kompletten Expressionsverlust des Gens auf [141]. Cebrian *et al.* konnten in 83 % der Harnblasenkarzinome eine Promotorhypermethylierung von KISS1 nachweisen, welche mit Tumorgrad und Tumorstadium korrelierte [142].

Auch der Rezeptor KISS1R hat einen hemmenden Effekt auf die Metastasierung von Tumoren. Beispielsweise konnten Ikeguchi *et al.* aufzeigen, dass der Expressionsverlust von KISS1R im Ösophaguskarzinom mit positivem Lymphknotenstatus in Zusammenhang steht [143].

Kang *et al.* konnten im Endometriumkarzinom tumorsuppressive Effekte von KISS1R nachweisen. Eine erhöhte Expression korrelierte hier mit einer besseren Gesamtüberlebensrate sowie prognostischen Faktoren wie zum Beispiel einem niedrigen Tumorgrad oder FIGO-Stadium, während ein Expressionsverlust des Gens mit positivem Lymphknotenstatus assoziiert war. Der Expressionsverlust konnte hier auf eine hypermethylierte Promotorregion des Gens zurückgeführt werden [137].

Lymphknoten- und Fernmetastasen unterscheiden sich in ihren Entstehungswegen, an denen unterschiedliche zelluläre Prozesse beteiligt sind.

Für die Metastasierung ist das Ablösen von Tumorzellen aus dem Primärtumor und die anschließende Invasion in Blut- oder Lymphgefäße entscheidend. So können sich Tumorzellen entweder hämatogen oder lymphogen ausbreiten.

Bei der lymphogenen Metastasierung kommt es zur Absiedlung von Tumorzellen des Primärtumors über die abführenden Lymphgefäße in regionale und anschließend weiter entfernte Lymphknotenstationen. Durch Vermehrung der Tumorzellen in den Lymphknoten kommt es so zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen. Über den Ductus thoracicus können Tumorzellen über die V. subclavia in den Blutkreislauf gelangen und sich so in anderen

Organen absiedeln (hämatogene Aussaat). Durch Invasion von Blutgefäßen kann auch direkt eine hämatogene Aussaat stattfinden [144].

Lymphknotenmetastasen stellen in vielen Tumorentitäten den ersten Ort der Metastasenbildung da. Lymphkapillaren fehlen neben interendothelialen *tight junctions*, welche typischerweise in Blutgefäßen vorkommen, auch die umgebenden Schichten von Perizyten, glatter Muskulatur und der Basalmembran. Aus diesem Grund sind Lymphkapillaren anfälliger für die Invasion von Tumorzellen im Vergleich zu Blutgefäßen [145].

An beiden Metastasierungswegen sind komplexe molekulare und zelluläre Prozesse und Signalkaskaden beteiligt. Es ist anzunehmen, dass KISS1R am Prozess der lymphogenen Metastasierung beteiligt ist, aber kaum Einfluss auf die hämatogene Metastasierung hat.

Auch bei Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (pT2 - 4) stellen Lymphknotenmetastasen den häufigsten Metastasierungsort dar (69 %). Zu den häufigsten Orten der Fernmetastasierung zählen Knochen (47 %), Lunge (37 %), Leber (26 %) sowie das Peritoneum (16 %) [146].

Eine Veröffentlichung von Sengeløv *et al.* aus dem Jahr 1996 konnte aufzeigen, dass bei 20 % aller Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom an 3 oder mehr Stellen Metastasen aufzufinden waren [147]. In einer Studie von Shinagare *et al.* aus dem Jahr 2011 lag die Rate höher bei 45 %. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind auf eine Verbesserung der Qualität bildgebender Verfahren über die Jahre zurückzuführen, wodurch Fernmetastasen besser festgestellt werden konnten [146]. Im Vergleich hierzu lagen die Raten an Lymphknoten- und Fernmetastasen in einer von Wallmeroth *et al.* durchgeführten Autopsiestudie deutlich höher [148].

Die radikale Zystektomie mit gleichzeitiger pelviner Lymphadenektomie stellt den Standard der chirurgischen Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms dar.

Die Lymphadenektomie dient einerseits zum Staging, stellt jedoch auch einen therapeutischen Schritt in der Behandlung dar. Durch Entfernung metastatisch befallener Lymphknoten kann so eine weitere Ausbreitung verhindert werden. Bei der histopathologischen Untersuchung der Lymphknoten können so Mikrometastasen auffallen, welche zuvor im präoperativen Staging durch bildgebende Verfahren nicht entdeckt wurden. Durch die zusätzliche histopathologische Untersuchung der intraoperativ entfernten Lymphknoten können Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Fernmetastasen, welche hauptsächlich durch bildgebende Verfahren wie CT oder MRT diagnostiziert werden, häufiger detektiert werden.

Es ist anzunehmen, dass auch bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten an verschiedenen Orten Mikrometastasen vorhanden waren, welche durch bildgebende Verfahren zuvor nicht festgestellt werden konnten und somit auch nicht in die Einteilung in die TNM-Klassifikation berücksichtigt wurden. Dies könnte die unterschiedlichen Mittelwerte der relativen Methylierung von KISS1R in Bezug zum M-Status erklären.

Bei Vorhandensein von Mikrometastasen spielt die Fähigkeit zur Proliferation am Zielort eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Lymphknoten- und Fernmetastasen, welche durch bildgebende Verfahren detektiert werden können.

Der Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse wurde im Anschluss in Funktionsanalysen untersucht.

#### **4.4 Funktioneller Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Methylierung von KISS1R mit dem Metastasierungsrisiko muskelinvasiver Harnblasenkarzinome korreliert. Im Anschluss wurde überprüft, ob die epigenetische Regulation von KISS1R durch Herabregulation der Genexpression einen Einfluss auf metastasierungsassoziierte Prozesse nimmt. Durch die Verwendung von spezifischen siRNA-Molekülen, welche mittels Transfektion in die Zelle eingeschleust werden und dort den gezielten Abbau der entsprechenden mRNA bewirken, kann so durch Hemmung der Translation die Funktion des Gens ausgeschaltet werden [149]. Um letztendlich Rückschlüsse auf den Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse zu ziehen, wurde das Verhalten von mit siRNA transfizierten Zellen mit unbehandelten Zellen in Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays verglichen.

Für die nachfolgenden Analysen wurde demnach eine Harnblasenkarzinomzelllinie benötigt, die KISS1R in hohem Maße exprimiert, da hier der größte Effekt auf die Zellfunktion durch Herabregulation des Gens zu erwarten ist. Ausreichend hohe Mengen an Ziel-mRNA sind notwendig, um eine effiziente Inhibierung durch siRNA zu erreichen und dadurch angemessene Bedingungen für die Funktionsanalysen zu erhalten.

Das Expressionsniveau von KISS1R wurde in 6 verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien untersucht. Hierbei wies die Zelllinie 5637 das insgesamt höchste Expressionsniveau von KISS1R auf. Nachdem die signifikante Herabregulation der Genexpression des Gens durch transiente Transfektion der 5637-Zellen mittels KISS1R-siRNA bestätigt wurde, konnten die Zellen für die folgenden Funktionsanalysen verwendet werden. Die Expression von KISS1R konnte hierbei auf 13 % des Ausgangswertes herabreguliert werden.

##### Proliferation

Die Ergebnisse der Methylierungsanalysen zeigten eine Korrelation zwischen der Promotormethylierung von KISS1R und dem Metastasierungsrisiko muskelinvasiver Harnblasenkarzinome. Demnach wäre durch die Herabregulation des KISS1R-Gens durch siRNA, welche die Methylierung des Gens im Versuch simuliert, ein tumorfördernder Effekt und somit eine Zunahme der Proliferation zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit konnte

jedoch eine Verminderung der Proliferationsrate von 5637 auf 43 % des Ausgangswertes nach Behandlung mit KISS1R-siRNA festgestellt werden ( $p = 0,000$ ).

Das KISS1-KISS1R-System spielt eine Rolle bei der Reduktion von Migration und Invasion, der Modifikation von Adhäsionsprozessen sowie Änderungen im Zytoskelett und des chemotaktischen Verhaltens [150]. In diesem Zusammenhang gehen einige Studien von einem antiproliferativen Effekt von Kisspeptin sowie dessen Rolle in der Einleitung der Apoptose aus. Andererseits gibt es Studienergebnisse, die keinen Zusammenhang zwischen dem KISS1-KISS1R-System und der Zellproliferation erkennen konnten. Eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse könnte in der Verwendung verschiedener Zelllinien liegen, welche KISS1R in unterschiedlichem Maße exprimieren. Studien, die einen antiproliferativen Effekt von Kisspeptin nachweisen konnten, verwendeten Zelllinien, welche den zugehörigen Rezeptor KISS1R in hohem Maße exprimieren. Die Überexpression wurde hierbei durch Transfektion der Zellen mit KISS1R-cDNA erreicht [151; 152; 125; 153]. Beispielsweise konnte in Versuchen mit der CHO-Zelllinie (*Chinese Hamster Ovary*), in der eine Überexpression durch Zugabe von KISS1R-cDNA erzielt wurde, eine Reduktion der Zellproliferation und des Zellwachstums nach externer Zugabe von Kisspeptin beobachtet werden [152; 125]. In Zellen, welche KISS1R nur in geringem Maße exprimieren, konnte auch nach Zugabe von Kisspeptin kein Einfluss auf die Proliferation nachgewiesen werden [154; 155]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass antiproliferative Effekte nur in modifizierten Zellen nachgewiesen werden können, jedoch nicht in Zellen, die den Rezeptor endogen exprimieren.

In der Forschungsarbeit von Stubendorff *et al.* [91] wurde umgekehrt der Einfluss von KISS1R auf die Proliferation in der Zelllinie T24 nach Überexpression des Gens untersucht. Hier konnte eine geringe Reduktion der Proliferation beobachtet werden, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die transiente Transfektion mit siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der KISS1R-mRNA. Durch Hemmung der Translation des Gens können keine neuen Rezeptoren in die Zellmembran eingebaut werden. Die Transfektion hat jedoch keinen Einfluss auf die KISS1-Rezeptoren, die sich bereits auf der Zellmembran befinden. Auf diese Weise kann die Signaltransduktion ungehindert stattfinden. Um die bestehenden Rezeptoren funktionsunfähig zu machen und die Funktion komplett zu hemmen, hätte mit einem spezifischen Inhibitor des Rezeptors gearbeitet werden müssen.

### Migration und Invasion

Die transiente Transfektion der Zellen mit KISS1R-siRNA führte zu keiner Änderung des Migrations- oder Invasionsverhaltens im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p = 0,928$  bzw.  $p = 0,827$ ). In der Studie von Stubendorff *et al.* zeigte sich in den Funktionsanalysen für die

Harnblasenkarzinomzelllinie T24 nach Überexpression von KISS1R eine Reduktion der Migrationsrate um 25%, jedoch bestand keine statistische Signifikanz [91].

Es existiert eine Studie von Kang *et al.*, in der der Einfluss von KISS1R auf metastasierungsassoziierte Prozesse in Endometriumkarzinomzelllinien untersucht wurde [137]. Die Zugabe von Kisspeptin führte in Zellen, welche KISS1R in hohem Maße exprimieren, zur Hemmung von Migration und Invasion im Wundheilungsassay. Im Gegensatz hierzu konnte in Zellen, die nur eine geringe Expression des KISS1-Rezeptors aufwiesen als auch in Zellen, in denen durch transientes *knock down* eine Herabregulation des Gens induziert wurde, dieser inhibitorische Einfluss des Kisspeptin nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für ein ungehindertes Ablaufen der KISS1-KISS1R-Signalkaskade ausreichend hohe Konzentrationen von Ligand und Rezeptor notwendig sind. Durch Limitation einer der beiden Faktoren kann diese nicht in vollem Maße ablaufen und die tumorsuppressive Wirkung nicht in den Zellen vermittelt werden. Ein Effekt auf die Proliferation konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Cebrian *et al.* untersuchten mit Hilfe von methylierungsspezifischen PCR-Analysen den Methylierungsstatus von KISS1 in verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien. Hierbei zeigte sich eine Methylierung des KISS1-Gens in der Zelllinie 5637, welche auch für die Funktionsanalysen in der vorliegenden Arbeit verwendete wurde [142]. Es ist davon auszugehen, dass durch epigenetische Stilllegung des KISS1-Gens sowohl im Versuchsansatz als auch in der Negativkontrolle nur geringe Mengen des Liganden vorhanden sind, sodass in beiden Ansätzen die Signalkaskade nicht ungehindert durchlaufen werden kann.

Für die Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Funktionsanalysen hätte neben dem Expressionsniveau von KISS1R auch das Expressionslevel des Liganden KISS1 ein entscheidendes Kriterium darstellen müssen. Durch Zugabe gleich hoher Konzentrationen des Liganden Kisspeptin in beiden Ansätzen hätte dies vermieden werden können.

Die Metastasierung von Tumorzellen ist ein sehr komplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von zellulären Prozessen und Signalkaskaden beteiligt sind. Hierzu zählen neben epigenetischen und genetischen Veränderungen, die zur Veränderung der Eigenschaften der Tumorzelle führen, auch Interaktionen der Tumorzelle mit den umgebenden Stromazellen sowie der extrazellulären Matrix. Sowohl maligne Zellen als auch Stromazellen sind für die Tumor-assoziierte Inflammation, Tumorprogression und Metastasenbildung von Harnblasenkarzinomen verantwortlich [156]. Ebenso ist die Angiogenese ein entscheidender Schritt bei der Ausbildung von Metastasen. Eine erhöhte Expression des pro-angiogenen Faktors VEGF korreliert mit einer erhöhten Rezidivneigung, einer verstärkten Progression zu invasivem Wachstum sowie der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen [157; 158].

Es ist wahrscheinlich, dass der Expressionsverlust eines einzelnen Gens einen solch komplexen Prozess allein nicht induzieren kann.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse metastasierungsspezifischer Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster der beiden ausgewählten Kandidatengene EPHB3 und KISS1R in primären Harnblasenkarzinomen und deren Einfluss auf metastasierungsassoziierte Prozesse.

Die Inhibierung der DNA-Methyltransferase in Harnblasenkarzinomzelllinien führte zu einer gesteigerten mRNA-Expression von EPHB3. Die Annahme, dass die passive Demethylierung einer hypermethylierten Promotorregion eine Reaktivierung des Gens und somit eine gesteigerte mRNA-Expression bewirkt, konnte in den anschließenden Methylierungsanalysen widerlegt werden. Diese wiesen weder in Harnblasenkarzinomzelllinien noch im Tumorgewebe auf eine hypermethylierte Promotorregion von EPHB3 hin. Die Untersuchung der Funktion von EPHB3 in metastasierungsassoziierten Prozessen erscheint daher nicht sinnvoll.

Dem KISS1-KISS1R-System konnte in multiplen Tumorentitäten eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben werden. Durch epigenetische Inaktivierung des Gens kommt es zum Ausfall der tumorsuppressiven Eigenschaften, was die Tumorbildung und Metastasierung fördert. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Harnblasenkarzinomzelllinie T24 in den Methylierungsanalysen für KISS1R im Vergleich zu EPHB3 eine verstärkte Promotorhypermethylierung. Durch Methylierungsanalysen an Harnblasenkarzinom-Gewebeproben wurde überprüft, ob Zusammenhänge zwischen Promotorhypermethylierung von KISS1R und Metastasierung bestehen. Es bestand eine Korrelation der Promotormethylierung von KISS1R mit positivem Lymphknotenstatus. Ein statistisch relevanter Zusammenhang mit dem Fernmetastasenstatus bestand nicht. Die Untersuchungsergebnisse ließen eine Rolle von KISS1R in metastasierungsassoziierten Prozessen annehmen. Durch Wegfall der tumorsuppressiven Eigenschaften wäre hier eine Zunahme von tumorfördernden Zellfunktionen wie Proliferation, Migration und Invasion zu erwarten. Dies konnte in den Funktionsanalysen jedoch nicht bestätigt werden.

Für die Promotorregion von KISS1R konnte in der vorliegenden Arbeit ein Unterschied der DNA-Methylierung in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen in Bezug zum Lymphknotenstatus festgestellt werden. Diese Veränderung lässt sich bereits zum Zeitpunkt der Zystektomie im Primärtumor nachweisen. Somit könnte der Methylierungsstatus von KISS1R einen potenziellen Prognosemarker zur Einschätzung des individuellen Risikos für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen von Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen darstellen.

In weiteren Studien müsste untersucht werden, ob diese Veränderungen ebenso in Gewebeproben nachweisbar sind, welche während der transurethralen Resektion entnommen werden. So könnte bereits vor dem Zeitpunkt der Zystektomie frühzeitig eine individuelle Prognoseeinschätzung bezüglich des Risikos der Lymphknotenmetastasierung erfolgen. Dies ist insbesondere in Hinblick auf den Einsatz einer neoadjuvanten Chemotherapie von Bedeutung. Aktuell existieren keine geeigneten Marker für die Selektion von Patienten, welche von einer neoadjuvanten Chemotherapie profitieren. Die Promotormethylierung von KISS1R könnte hierbei zur Selektion Hochrisikopatienten eingesetzt werden.

Weiterhin könnten bei erhöhtem Risiko der Lymphknotenmetastasierung im Rahmen der radikalen Zystektomie eine extendierte Lymphadenektomie bis zur Aortenbifurkation durchgeführt werden. So könnten höher gelegene, möglicherweise befallene Lymphknoten entfernt werden, welche im Standard-Operationsverfahren nicht entfernt werden würden und eine weitere Tumorausbreitung über die Lymphknotenbahnen verhindert werden. Hierdurch könnte frühzeitig bereits zum Zeitpunkt der transurethralen Resektion anhand des KISS1R-Methylierungsstatus ein individuelles Therapiekonzept für Patienten erstellt werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209-249
2. Institut RK Krebs in Deutschland 2017/2018.
3. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC (2011) Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 306:737-745
4. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jockel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P (2000) Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86:289-294
5. Bjerregaard BK, Raaschou-Nielsen O, Sorensen M, Frederiksen K, Christensen J, Tjonneland A, Overvad K, Chapelon FC, Nagel G, Chang-Claude J, Bergmann MM, Boeing H, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Oikonomou E, Berrino F, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Kiemeneij L, Gram IT, Braaten T, Lund E, Gonzalez CA, Berglund G, Allen N, Roddam A, Bingham S, Riboli E (2006) Tobacco smoke and bladder cancer--in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 119:2412-2416
6. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeneij LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y (2013) Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 63:234-241
7. Kiemeneij LA, Sulem P, Besenbacher S, Vermeulen SH, Sigurdsson A, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Gudmundsson J, Zanon C, Kostic J, Masson G, Bjarnason H, Palsson ST, Skarphedinsson OB, Gudjonsson SA, Witjes JA, Grotenhuis AJ, Verhaegh GW, Bishop DT, Sak SC, Choudhury A, Elliott F, Barrett JH, Hurst CD, de Verdier PJ, Ryk C, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Vineis P, Polidoro S, Guarrera S, Sacerdote C, Campagna M, Placidi D, Arici C, Zeegers MP, Kellen E, Gutierrez BS, Sanz-Velez JI, Sanchez-Zalabardo M, Valdivia G, Garcia-Prats MD, Hengstler JG, Blaszkewicz M, Dietrich H, Ophoff RA, van den Berg LH, Alexiusdottir K, Kristjansson K, Geirsson G, Nikulasson S, Petursdottir V, Kong A, Thorgeirsson T, Mungan NA, Lindblom A, van Es MA, Porru S, Buntinx F, Golka K, Mayordomo JI, Kumar R, Matullo G, Steineck G, Kiltie AE, Aben KK, Jonsson E, Thorsteinsdottir U, Knowles MA, Rafnar T, Stefansson K (2010) A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 42:415-419
8. Kiemeneij LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KK, Stacey SN, Gudmundsson J, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Sigurdsson A, Blondal T, Witjes JA, Vermeulen SH, Hulsbergen-van de Kaa CA, Swinkels DW, Ploeg M, Cornel EB, Vergunst H, Thorgeirsson TE, Gudbjartsson D, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Kristinsson KT, Mouy M, Snorraddottir S, Placidi D, Campagna M, Arici C, Koppova K, Gurzau E, Rudnai P, Kellen E, Polidoro S, Guarrera S, Sacerdote C, Sanchez M, Saez B, Valdivia G, Ryk C, de Verdier P, Lindblom A, Golka K, Bishop DT, Knowles MA, Nikulasson S, Petursdottir V, Jonsson E, Geirsson G, Kristjansson B, Mayordomo JI, Steineck G, Porru S, Buntinx F, Zeegers MP, Fletcher T, Kumar R, Matullo G, Vineis P, Kiltie AE, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Rafnar T, Stefansson K (2008) Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 40:1307-1312
9. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardon A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Lloreta J, Castano-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Tora M, Fernandez F, Real FX, Rothman N (2005) NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 366:649-659

10. Nieder AM, Porter MP, Soloway MS (2008) Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. *J Urol* 180:2005-2009; discussion 2009-2010
11. Stenzl A, Burger M, Fradet Y, Mynderse LA, Soloway MS, Witjes JA, Kriegmair M, Karl A, Shen Y, Grossman HB (2010) Hexaminolevulinic acid guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 184:1907-1913
12. Tetu B (2009) Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol* 22 Suppl 2:S53-59
13. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Comperat E, Sylvester RJ, Kaasinen E, Bohle A, Palou Redorta J, Roupret M (2013) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 64:639-653
14. Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Comperat EM, Hernandez V, Kaasinen E, Palou J, Roupret M, van Rhijn BW, Shariat SF, Soukup V, Sylvester RJ, Zigeuner R (2016) EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*
15. Knowles MA, Hurst CD (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 15:25-41
16. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF (2018) The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep* 8:1129
17. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP (2008) Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol* 10:31-43
18. Youssef RF, Lotan Y (2011) Predictors of outcome of non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *ScientificWorldJournal* 11:369-381
19. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J (2005) Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66:4-34
20. van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, Witjes JA, Zlotta AR (2009) Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 56:430-442
21. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, Torres A, Watson R, Kurth KH (2005) High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology* 66:90-107
22. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA (2020) Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel)* 8
23. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA, Kaag M, Fransen van de Putte EE, Horenblas S, Drabick JJ (2016) Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist* 21:708-715
24. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF (2000) Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 18:3068-3077
25. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M (2005) Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 23:4602-4608
26. Dash A, Galsky MD, Vickers AJ, Serio AM, Koppie TM, Dalbagni G, Bochner BH (2006) Impact of renal impairment on eligibility for adjuvant cisplatin-based chemotherapy in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer* 107:506-513

27. Miller K, Gschwend JE, Merseburger A, Retz M, Stenzl A (2018) [Immunotherapy with checkpoint inhibitors in local advanced and metastatic urothelial carcinoma]. *Aktuelle Urol* 49:142-156
28. Ghatalia P, Zibelman M, Geynisman DM, Plimack E (2018) Approved checkpoint inhibitors in bladder cancer: which drug should be used when? *Ther Adv Med Oncol* 10:1758835918788310
29. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, Vogelzang NJ, Climent MA, Petrylak DP, Choueiri TK, Necchi A, Gerritsen W, Gurney H, Quinn DI, Culine S, Sternberg CN, Mai Y, Poehlein CH, Perini RF, Bajorin DF (2017) Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 376:1015-1026
30. Powles T, Park SH, Voog E, Caserta C, Valderrama BP, Gurney H, Kalofonos H, Radulovic S, Demey W, Ullen A, Loriot Y, Sridhar SS, Tsuchiya N, Kopyltsov E, Sternberg CN, Bellmunt J, Aragon-Ching JB, Petrylak DP, Laliberte R, Wang J, Huang B, Davis C, Fowst C, Costa N, Blake-Haskins JA, di Pietro A, Grivas P (2020) Avelumab Maintenance Therapy for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 383:1218-1230
31. Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA (1990) Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res* 50:44-47
32. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F (2001) Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 158:1955-1959
33. Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardon A, Serra C, Real FX (2006) PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* 66:7401-7404
34. Knowles MA (2008) Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 13:287-297
35. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991) Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 6:2305-2309
36. Spruck CH, 3rd, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS, Cote R, et al. (1994) Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 54:784-788
37. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA (1999) Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer* 80:904-908
38. Coombs LM, Pigott DA, Sweeney E, Proctor AJ, Eydmann ME, Parkinson C, Knowles MA (1991) Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 63:601-608
39. Goebell PJ, Knowles MA (2010) Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urol Oncol* 28:409-428
40. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA (2005) FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-5225
41. Bryan RT, Tselepis C (2010) Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol* 184:423-431
42. Yun SJ, Kim WJ (2013) Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol* 54:645-650
43. Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, Henry PC, Adessi G, Bittard H (2001) Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol* 166:1275-1279
44. Vogt AP, Cohen C, Siddiqui MT (2012) Fascin as an identifier of metastatic urothelial carcinoma: A retrospective study of fine-needle aspiration cell blocks and histologic tissue microarrays. *Diagn Cytopathol* 40:882-886

45. Kamai T, Shirataki H, Nakanishi K, Furuya N, Kambara T, Abe H, Oyama T, Yoshida K (2010) Increased Rac1 activity and Pak1 overexpression are associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis of upper urinary tract cancer. *BMC Cancer* 10:164
46. Harding MA, Theodorescu D (2007) RhoGDI2: a new metastasis suppressor gene: discovery and clinical translation. *Urol Oncol* 25:401-406
47. Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF, Jr. (2004) Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* 10:3800-3806
48. Griner EM, Dancik GM, Costello JC, Owens C, Guin S, Edwards MG, Brautigam DL, Theodorescu D (2015) RhoC Is an Unexpected Target of RhoGDI2 in Prevention of Lung Colonization of Bladder Cancer. *Mol Cancer Res* 13:483-492
49. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y, Sjudahl G, Robertson AG, Seiler R, Hoadley KA, Groeneveld CS, Al-Ahmadie H, Choi W, Castro MAA, Fontugne J, Eriksson P, Mo Q, Kardos J, Zlotta A, Hartmann A, Dinney CP, Bellmunt J, Powles T, Malats N, Chan KS, Kim WY, McConkey DJ, Black PC, Dyrskjot L, Hognlund M, Lerner SP, Real FX, Radvanyi F (2020) A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol* 77:420-433
50. Guo CC, Bondaruk J, Yao H, Wang Z, Zhang L, Lee S, Lee JG, Cogdell D, Zhang M, Yang G, Dadhania V, Choi W, Wei P, Gao J, Theodorescu D, Logothetis C, Dinney C, Kimmel M, Weinstein JN, McConkey DJ, Czerniak B (2020) Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer. *Sci Rep* 10:9743
51. Fong MHY, Feng M, McConkey DJ, Choi W (2020) Update on bladder cancer molecular subtypes. *Transl Androl Urol* 9:2881-2889
52. Inamura K (2018) Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology. *Cancers (Basel)* 10
53. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, de Sa Carvalho B, Chagas VS, Mungall KL, Sadeghi S, Peadarallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ, Weinstein JN, Kwiatkowski DJ, Lerner SP (2017) Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* 171:540-556 e525
54. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635-638
55. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21
56. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-463
57. Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27-36
58. Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6:597-610
59. Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3:253-266
60. Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:607-620
61. Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10:805-811
62. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10:2709-2721
63. Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13:484-492
64. Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1:11-19
65. Smith ZD, Meissner A (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 14:204-220

66. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39:457-466
67. Ling C, Groop L (2009) Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 58:2718-2725
68. Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-92
69. Esteller M (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 4:351-358
70. Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148-1159
71. Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21:5400-5413
72. Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17:330-339
73. Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1:157-162
74. Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167
75. Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042-2054
76. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24:132-138
77. Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* 28:1057-1068
78. Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G (2010) Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res* 70:8169-8178
79. Smit AF (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr Opin Genet Dev* 6:743-748
80. Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 80:1312-1321
81. Kreimer U, Schulz WA, Koch A, Niegisch G, Goering W (2013) HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol* 3:255
82. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, Garcia-Closas R, Chanock S, Tardon A, Serra C, Carrato A, Dosemeci M, Garcia-Closas M, Esteller M, Fraga M, Rothman N, Malats N (2008) Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* 9:359-366
83. Catto JWF, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC (2005) Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 23:2903-2910
84. Jeronimo C, Henrique R (2014) Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review. *Cancer Lett* 342:264-274
85. Kandimalla R, van Tilborg AA, Kompier LC, Stumpel DJ, Stam RW, Bangma CH, Zwarthoff EC (2012) Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers. *Eur Urol* 61:1245-1256
86. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF (2001) Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 61:8659-8663

87. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW (2007) Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 13:2046-2053
88. Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S (2005) DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J Urol* 173:1767-1771
89. Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ (2008) Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *Journal of Urology* 180:1141-1145
90. Kim YJ, Kang HW, Seo SP, Jang H, Kim T, Kim WT, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ (2016) RspH9 Methylation Pattern as a Prognostic Indicator in Patients with Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Journal of Urology* 195:E1131-E1131
91. Stubendorff B (2014) Identifizierung metastasierungsspezifischer Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster muskelinvasiver Harnblasenkarzinome.
92. Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, Highman WJ, Trejdosiewicz LK, Povey S, Parkar M, Hill BT, Riddle PR, Franks LM (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res* 46:3630-3636
93. Bubenik J, Baresova M, Viklicky V, Jakoubkova J, Sainerova H, Donner J (1973) Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer* 11:765-773
94. O'Toole C, Price ZH, Ohnuki Y, Unsgaard B (1978) Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer* 38:64-76
95. Grossman HB, Wedemeyer G, Ren L, Wilson GN, Cox B (1986) Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *J Urol* 136:953-959
96. McKeown SR, Robson T, Price ME, Ho ET, Hirst DG, McKelvey-Martin VJ (2003) Potential use of the alkaline comet assay as a predictor of bladder tumour response to radiation. *Br J Cancer* 89:2264-2270
97. Dinney CP, Fishbeck R, Singh RK, Eve B, Pathak S, Brown N, Xie B, Fan D, Bucana CD, Fidler IJ, et al. (1995) Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *J Urol* 154:1532-1538
98. Bender CM, Pao MM, Jones PA (1998) Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 58:95-101
99. Schnier JB, Nishi K, Goodrich DW, Bradbury EM (1996) G1 arrest and down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 by the protein kinase inhibitor staurosporine are dependent on the retinoblastoma protein in the bladder carcinoma cell line 5637. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5941-5946
100. Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21:5483-5495
101. Juttermann R, Li E, Jaenisch R (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11797-11801
102. Chesnoy S, Huang L (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:27-47
103. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:457-467
104. Spadari S, Sala F, Pedralinoy G (1982) Aphidicolin - a Specific Inhibitor of Nuclear-DNA Replication in Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 7:29-32
105. Shariat SF, Svatek RS, Tilki D, Skinner E, Karakiewicz PI, Capitanio U, Bastian PJ, Volkmer BG, Kassouf W, Novara G, Fritsche HM, Izawa JI, Ficarra V, Lerner SP, Sagalowsky AI, Schoenberg MP, Kamat AM, Dinney CP, Lotan Y, Marberger MJ,

- Fradet Y (2010) International validation of the prognostic value of lymphovascular invasion in patients treated with radical cystectomy. *BJU Int* 105:1402-1412
106. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG (2001) Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 19:666-675
  107. Soria F, Krabbe LM, Todenhofer T, Dobruch J, Mitra AP, Inman BA, Gust KM, Lotan Y, Shariat SF (2019) Molecular markers in bladder cancer. *World J Urol* 37:31-40
  108. Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Lerner SP, Palapattu GS, Cote RJ, Sagalowsky AI, Lotan Y (2008) Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. *Cancer* 112:315-325
  109. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM, Stephenson Y, Meuth M, Catto JW (2006) Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol* 209:336-343
  110. Kanai Y (2010) Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci* 101:36-45
  111. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238:1717-1720
  112. (1997) Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 90:403-404
  113. Pasquale EB (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:462-475
  114. Kandouz M (2012) The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion. *Cancer Metastasis Rev* 31:353-373
  115. Flanagan JG, Vanderhaeghen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21:309-345
  116. Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:475-486
  117. Murai KK, Pasquale EB (2003) 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116:2823-2832
  118. Pasquale EB (1997) The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol* 9:608-615
  119. Dodelet VC, Pasquale EB (2000) Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 19:5614-5619
  120. Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7:501-509
  121. Orioli D, Klein R (1997) The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet* 13:354-359
  122. Pasquale EB (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133:38-52
  123. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R (1999) Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 13:295-306
  124. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107
  125. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636
  126. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R,

- Philpott KL, Harrison DC (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276:28969-28975
127. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617
  128. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6609-6615
  129. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M, Ghatei MA, Bloom SR (2007) Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3958-3966
  130. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627
  131. Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7:79-94
  132. Ji K, Ye L, Mason MD, Jiang WG (2013) The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). *Int J Mol Med* 32:747-754
  133. Poplineau M, Schnekenburger M, Dufer J, Kosciarz A, Brassart-Pasco S, Antonicelli F, Diederich M, Trussardi-Regnier A (2015) 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. *Mol Carcinog* 54:24-34
  134. Battle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H (2005) EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435:1126-1130
  135. Pasquale EB (2010) Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* 10:165-180
  136. Wu Q, Lind GE, Aasheim HC, Micci F, Silins I, Trope CG, Nesland JM, Lothe RA, Suo Z (2007) The EPH receptor Bs (EPHBs) promoters are unmethylated in colon and ovarian cancers. *Epigenetics* 2:237-243
  137. Kang HS, Baba T, Mandai M, Matsumura N, Hamanishi J, Kharma B, Kondoh E, Yoshioka Y, Oishi S, Fujii N, Murphy SK, Konishi I (2011) GPR54 is a target for suppression of metastasis in endometrial cancer. *Mol Cancer Ther* 10:580-590
  138. Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T (2006) Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 97:64-71
  139. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737
  140. Lee JH, Welch DR (1997) Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57:2384-2387
  141. Sanchez-Carbayo M, Capodieci P, Cordon-Cardo C (2003) Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 162:609-617
  142. Cebrian V, Fierro M, Orenes-Pinero E, Grau L, Moya P, Ecke T, Alvarez M, Gil M, Algaba F, Bellmunt J, Cordon-Cardo C, Catto J, Lopez-Beltran A, Sanchez-Carbayo M (2011) KISS1 methylation and expression as tumor stratification biomarkers and clinical outcome prognosticators for bladder cancer patients. *Am J Pathol* 179:540-546

143. Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N (2004) Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:1379-1383
144. Wong SY, Hynes RO (2006) Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle* 5:812-817
145. Alitalo K, Carmeliet P (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1:219-227
146. Shinagare AB, Ramaiya NH, Jagannathan JP, Fennessy FM, Taplin ME, Van den Abbeele AD (2011) Metastatic pattern of bladder cancer: correlation with the characteristics of the primary tumor. *AJR Am J Roentgenol* 196:117-122
147. Sengelov L, Kamby C, von der Maase H (1996) Pattern of metastases in relation to characteristics of primary tumor and treatment in patients with disseminated urothelial carcinoma. *J Urol* 155:111-114
148. Wallmeroth A, Wagner U, Moch H, Gasser TC, Sauter G, Mihatsch MJ (1999) Patterns of metastasis in muscle-invasive bladder cancer (pT2-4): An autopsy study on 367 patients. *Urol Int* 62:69-75
149. Wu L, Belasco JG (2008) Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 29:1-7
150. Ziegler E, Olbrich T, Emons G, Grundker C (2013) Antiproliferative effects of kisspeptin10 depend on artificial GPR54 (KISS1R) expression levels. *Oncology Reports* 29:549-554
151. Becker JA, Mirjolet JF, Bernard J, Burgeon E, Simons MJ, Vassart G, Parmentier M, Libert F (2005) Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other Gq-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 326:677-686
152. Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Onda H, Kurokawa T, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 286:958-963
153. Stafford LJ, Xia C, Ma W, Cai Y, Liu M (2002) Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res* 62:5399-5404
154. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, Ito D, Peiper SC, Broach JR, Oishi S, Niida A, Fujii N, Imamura M (2004) Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315:85-92
155. Shoji S, Tang XY, Umemura S, Itoh J, Takekoshi S, Shima M, Usui Y, Nagata Y, Uchida T, Osamura RY, Terachi T (2009) Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with overexpression of metastin receptor. *Eur Urol* 55:441-449
156. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL (2015) Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 15:669-682
157. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL (1997) Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 57:5281-5285
158. Suzuki K, Morita T, Tokue A (2005) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 12:152-158

## 6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms .....	5
Abbildung 2: Potentielle Entstehungswege der Pathogenese von Harnblasenkarzinomen ....	9
Abbildung 3: Mechanismus der DNA-Methylierung und De-Methylierung .....	12
Abbildung 4: Effekte der DNA-Methylierung auf die Genexpression .....	14
Abbildung 5: Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung .....	16
Abbildung 6: Einfluss von 5-Aza-dC auf die Expression von EPHB3 in RT-112 und T24 .....	33
Abbildung 7: Relative DNA-Methylierung von EPHB3 und KISS1R in Harnblasenkarzinom- zelllinien .....	35
Abbildung 8: Methylierung von EPHB3 im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen .....	37
Abbildung 9: Relative Methylierung von EPHB3 im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Fernmetastasen .....	38
Abbildung 10: Methylierung von KISS1R im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen .....	40
Abbildung 11: Methylierung von KISS1R im Gewebe im Hinblick auf das Vorhandensein von Fernmetastasen .....	41
Abbildung 12: Relative Expression von KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien .....	42
Abbildung 13: Effizienz der transienten Transfektion von 5637 Zellen mit KISS1R-siRNA....	43
Abbildung 14: Proliferationsverhalten nach Inhibierung von KISS1R.....	45
Abbildung 15: Migrationsverhalten nach Inhibierung von KISS1R .....	46
Abbildung 16: Invasionsverhalten nach Inhibierung von KISS1R.....	47
Abbildung 17: Interaktionen und Signaltransduktion von Eph-Rezeptoren und Ephrinen.....	50
Abbildung 18: Signalkaskade des KISS1-KISS1R-Systems .....	52

## 7 **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms .....	4
Tabelle 2: Zusammensetzung des Patientenkollektivs bezüglich pT-, N- und M-Status.....	22
Tabelle 3: Verwendete Urothelkarzinom-Zelllinien .....	23
Tabelle 4: Mittlere relative Expression von EPHB3 nach Zugabe von 5-Aza-dC in RT-112 und T24.....	34
Tabelle 5: DNA-Methylierung der Kandidatengene in Harnblasenkarzinomzelllinien .....	35
Tabelle 6: Relative Methylierung von EPHB3 im Gewebe .....	36
Tabelle 7: Relative Methylierung von KISS1R im Gewebe .....	39
Tabelle 8: Relative Expression von KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien .....	42
Tabelle 9: Mittlere relative Expression von KISS1R nach transienter Transfektion .....	43

## 8 Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-dC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
5mC	5-Methyl-Cytosin
APC	Adenomatöse Polyposis-Coli
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
CD	Cluster of differentiation
CDH	Cadherin
CIS	Carcinoma in situ
CT	Computertomographie
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
DSC3	Desmocollin-3
dT	Desoxythymidin
EDNRB	Endothelin receptor type B
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EPHB3	Ephrin Typ-B-Rezeptor 3
ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FCS	Fetales Kälberserum
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FOXA1	Forkhead Box A1
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GATA3	GATA Binding Protein 3
GC	Gemcitabine/Cisplatin
GCT	Guanidin-Thiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
KRT	Keratin
LH	Luteinisierendes Hormon

LINE-1	Long interspersed nuclear element 1
LK	Lymphknoten
LOH	Loss of heterozygosity
LVI	Lymphovaskuäre Invasion
MAPK2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 2
MBP	Methyl-CpG-binding-Protein
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MMP	Metallopeptidase
MRT	Magnetresonanztomographie
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin, Cisplatin
NAT2	N-Acetyltransferase 2
NC	Negativkontrolle
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ORR	Objective response rate
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PI3	Peptidase inhibitor 3
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUNLMP	Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAS	Rat sarcoma
RASSF1A	Ras association domain-containing protein 1
RB	Retinoblastom
RhoC	Ras homolog gene family, member C
RHOGLI2	Rho GDP-dissociation inhibitor 2
RISC	RNA-inducing silencing complex
Rpm	Revolutions per minute
RSPH9	Radial Spoke Head Component 9
RT	Reverse Transkription
RUNX3	Runt-related transcription factor 3

SAM	Sterile alpha motif
siRNA	Small interfering RNA
SNX31	Sorting Nexin 31
SP1 SP2	Specificity protein
STAG2	Stromal Antigen 2
Tcf-4	Transcription factor 4
TGM1	Transglutaminase 1
TNFSR 25	Tumor necrosis factor soluble receptor 25
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
UPK	Uroplakin
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 9 Anhang

### Anhang 1: Expression von EPHB3 nach Behandlung von Zelllinien mit 5-Aza-dC

Zelllinie	5-Aza-dC Zugabe	$\Delta$ Ct	Relative Expression	Mittelwert	Fold change
RT-112	(-)	6,599	1,032E-02	7,992E-03	1
		6,223	1,339E-02		
		11,835	2,737E-04		
	(+)	4,564	4,226E-02	3,667E-02	4,589
		4,472	4,506E-02		
		4,079	5,918E-02		
		12,356	1,908E-04		
T24	(-)	10,521	6,804E-04	5,214E-04	1
		10,543	6,701E-04		
		10,971	4,983E-04		
		10,438	7,208E-04		
		14,711	3,729E-05		
	(+)	10,071	9,296E-04	6,333E-04	1,215
		12,207	2,115E-04		
		9,506	1,375E-03		
		15,862	1,679E-05		

### Anhang 2: $\Delta$ Ct-Werte, relative Methylierung und Lg (Methyl Ms) von EPHB3 und KISS1R in Zelllinien

Gen	Zelllinie	$\Delta$ Ct (Ms-Mo)	Relative Methylierung Ms	Lg (Methyl Ms)
EPHB3	RT-112	16,727	9,219E-06	-5,035
	T24	15,773	1,786E-05	-4,748
KISS1R	RT-112	17,951	3,946E-06	-5,404
	T24	0,735	6,010E-01	-0,221

### Anhang 3: $\Delta$ Ct-Werte, relative Methylierung und Lg (Methyl MS) von EPHB3 in Patientenproben

Proben-ID	$\Delta$ Ct (Md - Mo)	$\Delta$ Ct (Ms - Mo)	Relative Methylierung		Lg (Methyl Ms)	M	N
			Ms	Md			
6904	0,329	9,165	1,256	1,741E-03	0,099	0	1
6549	-0,006	7,698	0,996	4,815E-03	-0,002	0	0
6537	-0,231	9,144	0,852	1,768E-03	-0,070	0	0
6502	0,06	9,983	1,043	9,880E-04	0,018	0	0
6454	-0,112	9,096	0,926	1,827E-03	-0,033	1	1
6438	0,116	7,666	1,084	4,922E-03	0,035	0	0
6309	0,022	8,339	1,016	3,088E-03	0,007	0	0
6010	-0,191	7,531	0,876	5,406E-03	-0,057	1	0
5935	0,025	19,478	1,017	1,370E-06	0,007	1	1
5890	-0,487	7,5	0,714	5,524E-03	-0,146	1	1
5797	-0,165	6,496	0,892	1,108E-02	-0,050	1	1

5758	-0,191	7,912	0,876	4,152E-03	-0,057	0	1
5729	0,057	6,613	1,04	1,022E-02	0,017	0	0
5703	0,02	9,642	1,014	1,252E-03	0,006	0	0
5650	0,257	9,226	1,195	1,670E-03	0,077	1	0
5576	0,298	9,665	1,23	1,232E-03	0,090	0	0
5563	0,054	8,105	1,038	3,631E-03	0,016	0	0
5381	0,179	7,662	1,132	4,938E-03	0,054	0	0
5278	-0,776	5,498	0,584	2,213E-02	-0,234	1	1
5036	0,059	8,344	1,042	3,077E-03	0,018	0	0
4832	-0,041	6,622	0,972	1,015E-02	-0,012	0	0
4751	0,249	7,635	1,189	5,031E-03	0,075	1	1
4408	0,878	8,055	1,838	3,760E-03	0,264	1	1
4403	0,11	10,173	1,079	8,660E-04	0,033	0	
3809	-0,22	9,856	0,859	1,079E-03	-0,066	1	0
3577	0,213	19,613	1,159	1,250E-06	0,064	0	0
3423	0,474	8,905	1,389	2,086E-03	0,143	0	1
2739	0,233	7,901	1,175	4,183E-03	0,070	0	0
2629	0,879	18,513	1,84	2,670E-06	0,265	1	0
2246	0,58	18,439	1,495	2,810E-06	0,175	1	0
2150	-0,382	8,475	0,768	2,811E-03	-0,115	0	0
1993	0,099	7,573	1,071	5,251E-03	0,030	1	0
146	-0,285	18,464	0,821	2,770E-06	-0,086	0	0

**Anhang 4:  $\Delta$ Ct-Werte, relative Methylierung und Lg (Methyl Ms) von KISS1R in Patientenproben**

Proben-ID	$\Delta$ CT (Md-Mo)	$\Delta$ CT (Ms-Mo)	Relative Methylierung		Lg (Methyl Ms)	M	N
			Ms	Md			
6904	0,204	10,240	1,152	8,271E-04	-3,082	0	1
6549	0,755	9,057	1,687	1,877E-03	-2,727	0	0
6537	0,140	19,349	1,102	1,500E-06	-5,825	0	0
6502	0,242	18,378	1,183	2,940E-06	-5,532	0	0
6485	0,691	8,832	1,614	2,194E-03	-2,659		0
6454	0,081	9,466	1,058	1,414E-03	-2,850	1	1
6443	1,864	9,139	3,641	1,774E-03	-2,751	0	1
6438	0,567	9,533	1,482	1,350E-03	-2,870	0	0
6309	1,319	20,579	2,495	6,400E-07	-6,195	0	0
6010	0,398	17,997	1,318	3,820E-06	-5,418	1	0
5935	0,021	10,449	1,015	7,153E-04	-3,146	1	1
5890	0,557	9,278	1,471	1,611E-03	-2,793	1	1
5797	0,732	7,747	1,660	4,655E-03	-2,332	1	1
5758	0,328	7,289	1,256	6,394E-03	-2,194	0	1
5729	0,062	19,797	1,044	1,100E-06	-5,959	0	0

<b>5703</b>	0,675	19,007	1,596	1,900E-06	-5,722	0	0
<b>5650</b>	-0,221	19,010	0,858	1,890E-06	-5,723	1	0
<b>5576</b>	0,598	10,067	1,513	9,324E-04	-3,030	0	0
<b>5563</b>	0,207	19,708	1,154	1,170E-06	-5,933	0	0
<b>5381</b>	0,485	19,167	1,400	1,700E-06	-5,770	0	0
<b>5278</b>	0,134	6,676	1,097	9,776E-03	-2,010	1	1
<b>5036</b>	0,353	9,507	1,278	1,374E-03	-2,862	0	0
<b>4751</b>	1,181	8,084	2,267	3,685E-03	-2,434	1	1
<b>4408</b>	0,133	9,347	1,096	1,536E-03	-2,814	1	1
<b>3965</b>	1,016	19,598	2,022	1,260E-06	-5,900	1	0
<b>3809</b>	0,377	20,271	1,298	7,900E-07	-6,102	1	0
<b>3423</b>	0,783	20,122	1,720	8,800E-07	-6,057	0	1
<b>2739</b>	0,962	17,523	1,947	5,310E-06	-5,275	0	0
<b>2629</b>	1,551	19,190	2,931	1,670E-06	-5,777	1	0
<b>2246</b>	-1,192	17,967	0,438	3,900E-06	-5,409	1	0
<b>2150</b>	0,590	9,822	1,505	1,105E-03	-2,957	0	0
<b>1993</b>	0,469	8,694	1,384	2,415E-03	-2,617	1	0

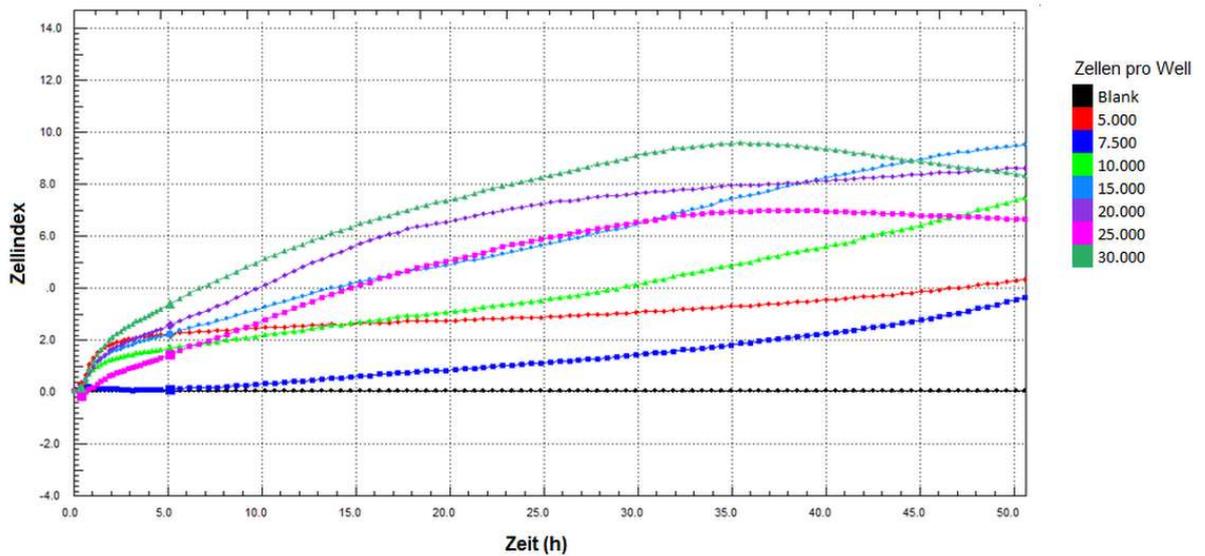
#### Anhang 5: Expression von KISS1R in Harnblasenkarzinomzelllinien

Zelllinie	$\Delta Ct$	Relative Expression	Mittelwert	Standartabweichung	Fold change
<b>RT-112</b>	16,604 18,674 19,904	1,00E-05 2,39E-06 1,02E-06	4,483E-06	4,483E-06	38,94
<b>T24</b>	22,910 18,385	1,27E-07 2,92E-06	1,524E-06	1,976E-06	13,24
<b>UMUC3</b>	22,263 23,798 23,609	1,99E-07 6,85E-08 7,82E-08	1,151E-07	7,252E-08	1
<b>5637</b>	15,268 14,740 14,265	2,53E-05 3,66E-05 5,08E-05	3,756E-05	1,276E-05	326,28
<b>253J-BV</b>	18,003 17,646 15,109	3,81E-06 4,88E-06 2,83E-05	1,233E-05	1,385E-05	107,08

### Anhang 6: Ergebnisse der KISS1R-mRNA-Expression nach siRNA Transfektion

	$\Delta Ct$	relative Expression	Mittelwert	STD	Fold change
<b>NC</b>	15,394	2,323E-05	1,863E-05	1,344E-05	1
	16,135	1,389E-05			
	17,643	4,884E-06			
	14,519	4,260E-05			
	15,069	2,910E-05			
	14,993	3,067E-05			
	17,303	6,186E-06			
	17,620	4,966E-06			
	16,330	1,214E-05			
<b>KISS1R</b>	26,010	1,480E-08	2,522E-06	3,211E-06	0,135
	18,738	2,288E-06			
	26,057	1,432E-08			
	18,070	3,633E-06			
	16,738	9,147E-06			
	17,338	6,034E-06			
	20,089	8,968E-07			
	26,944	7,746E-09			
	20,523	6,639E-07			

### Anhang 7: Echtzeit-Zellanalyse Wachstumskurven 5637-Zellen zur Ermittlung der geeigneten Zellzahl für Funktionsanalysen im real time cell analyzer



**Anhang 8: Prozentuale Werte der Funktionsuntersuchungen nach transienter Inhibierung von KISS1R**

<b>Ansatz</b>	<b>Proliferation</b>	<b>Migration</b>	<b>Invasion</b>
<b>NC</b>	82,52	102,62	
	93,23	76,42	
	75,67	106,55	
	122,83	98,69	
	75,42	115,72	87,74
	150,33	-6,30	107,37
	85,66	70,47	104,89
	105,20	242,91	
	96,55	18,11	
	112,60	133,86	
		140,94	
	<b>siKISS1R</b>	19,86	80,79
32,96		57,64	
41,72		83,41	
47,59		101,75	
46,63		164,19	134,14
68,16		86,90	103,69
28,00		12,99	73,21
45,90		137,40	
50,64		105,91	
28,55		183,46	
66,21		20,47	
		266,54	

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kerstin Junker für die Möglichkeit, die Arbeit unter ihrer Leitung durchführen zu können sowie die hilfreiche Unterstützung und konstruktiven Vorschläge.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Beatrice Stubendorff für ihre engagierte Betreuung und umfangreiche Hilfe bei Fragen jeglicher Art.

Ein weiterer Dank gilt auch dem gesamten Team des Forschungslabores der Klinik für Urologie und Kinderurologie für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Herzlicher Dank an meine Familie und Freunde für euren Beistand und die fortwährende Motivation.

## **11 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.