

Aus der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

Die Histondeacetylase 6 (HDAC6) als Zielmolekül für die Behandlung des
Urothelkarzinoms

Dissertation

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

vorgelegt von

Lorena Rosik

2015

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Schulz

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Fischer

*„Persönlichkeiten werden nicht
durch schöne Reden geformt,
sondern durch Arbeit und
eigene Leistung.“*

Albert Einstein

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rosik, L., Niegisch, G., Fischer, U., Jung, M., Schulz, W.A., Hoffmann, M.J., (2014), Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, (15), 742-757.

Rosik L., Hoffmann M.J., Schulz W.A., Niegisch G., (2014), Urothelial cancer cells are resistant to HDAC6 inhibition. *European Urology Supplements*, (13), e406

Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern und die achthäufigste bei Frauen in der westlichen Welt. Den größten Anteil stellen mit über 90 % Urothelkarzinome. Von diesen sind ca. 25 % muskelinvasive Tumoren, welche trotz aggressiver Therapie lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 30 und 60 % aufweisen.

Histoneacetylasen (HDACs) regulieren Genexpression, Proliferation und Migration von Zellen. HDAC-Inhibitoren wurden bereits bei verschiedenen Tumoren erfolgreich klinisch eingesetzt. HDAC6 nimmt unter den HDACs eine besondere Rolle ein. Es reguliert hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierte Proteine, die für die Zellproliferation und -migration von Tumoren wichtig sind, und trägt zur Stressresistenz von Zellen bei. Eine HDAC6-Hemmung beeinflusst die Vitalität normaler Zellen nicht wesentlich, während präklinisch bei verschiedenen Tumoren eine Hemmung von Zellproliferation und -migration beobachtet wurde. Für das Urothelkarzinom liegen bislang nur wenige Daten vor. Daher wurde mittels HDAC6-spezifischer Inhibitoren sowie siRNA-vermittelter Herunterregulation ("*knockdown*") von HDAC6 analysiert, ob Proliferation, Überleben und Migration von Urothelkarzinom-Zelllinien von HDAC6 abhängig sind und ob somit durch HDAC6-Inhibition ein therapeutischer Effekt erzielt werden könnte.

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene war HDAC6 sehr heterogen innerhalb der Urothelkarzinom-Zelllinien exprimiert. Die HDAC6-Inhibitoren Tubacin, Tubastatin A und ST-80 beeinträchtigten die Zellvitalität erst in hohen Konzentrationen. Dabei zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Stärke der HDAC6-Expression und dem Ansprechen auf die Inhibitoren. Tubacin erwies sich als wirksamster und spezifischster Wirkstoff. Nach stressinduzierenden Stimuli wurde keine erhöhte Abhängigkeit von HDAC6 beobachtet. Entsprechend ließen sich durch Kombinationstherapien mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG und dem Proteasominhibitor Bortezomib, welche in HDAC6-vermittelte Prozesse eingreifen, lediglich additive Effekte erzielen. Eine durchflusszytometrische Analyse nach Tubacin-Behandlung ergab bei den meisten Zelllinien keine deutliche Beeinflussung von Zellzyklus und Apoptose; nur bei einer Zelllinie (RT-112) wurden vermehrt apoptotische Zellen beobachtet. In einigen Zelllinien wurden hingegen signifikante Effekte auf die Zellmigration beobachtet.

Zusammenfassend stellte sich keine essenzielle Abhängigkeit der analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien von HDAC6 heraus. Demnach eignet sich HDAC6 nicht gut als Zielprotein für eine Therapie des Urothelkarzinoms.

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-Demethoxy-Geldanamycin
Abb.	Abbildung
Abl	<i>Abelson leukemia virus</i>
Ac	acetyliert
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
bp	Basenpaar
BRCA1	<i>breast cancer 1 gene</i>
BSA	Rinder-Serumalbumin
BZ	Bortezomib
Ca	Karzinom
CASPER	<i>caspase-8-related protein</i>
CDK1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
c-FLIP	<i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
c-Myc	<i>cellular homolog of avian myelocytomatosis virus oncogene</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CpG	<i>cytosine-phosphatidyl-guanosine</i>

CRC	kolorektales Karzinom
CRM1	<i>chromosomal region maintenance 1</i>
CTCL	<i>cutaneous T-cell lymphoma</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DBD	Dynein-bindende Domäne
DD	Deacetylatedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
E2F1	<i>E2 promotor-binding factor 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGR1	<i>early growth response-1</i>
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER α	<i>estrogen receptor α</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1β converting enzyme</i>
fwd	<i>forward</i>
G	<i>grade</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

Glu	Glutamat
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
H3	Histon H3
H4	Histon H4
halbk.	halbkonfluent
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HD M-VAC	<i>high-dose</i> M-VAC
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IC	Immunzytochemie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
iFLICE	<i>inhibitor of FLICE</i>
I κ B	<i>inhibitor of κB</i>
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Neg.	Negativkontrolle
NES	<i>nuclear export signal</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p21 ^{WAF1/CIP1}	<i>protein 21 wild-type p53-activated fragment 1/Cdk-interacting protein 1</i>
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PP _i	Pyrophosphat
PS	Phosphatidylserin
Prx	Peroxiredoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
Raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma-1</i>
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE14	<i>Ser-Glu-containing tetradecapeptide repeat domain</i>
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sirt	Sirtuin
SP	<i>specificity protein</i>
ST-80	(S)-2-(9-Hydroxycarbamoylnonanoylamino)-3-phenylpropionsäure-methylester
subk.	subkonfluent
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS mit Tween 20 versetzt
TCC	<i>transitional cell carcinoma</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan

TRX	Thioredoxin
TSA	Trichostatin A
TUR	Transurethrale Resektion
TXNIP	<i>thioredoxin-interacting protein</i>
Ub	Ubiquitin
unbeh.	unbehandelt
UP	urotheliale Primärkultur
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WB	Western-Blot
ZnF	Zinkfinger

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Urothelkarzinom	1
1.2 Epigenetik	4
1.3 Histone	4
1.4 Histonacetylasen und Histondeacetylasen	5
1.5 Die Histondeacetylase 6	7
1.5.1 Funktionen von HDAC6	8
1.5.2 HDAC6 und Angiogenese	11
1.5.3 HDAC6-Expression in Tumoren	11
1.6 Die Histondeacetylase 10	13
1.7 HDAC-Inhibitoren	14
1.7.1 Wirkung der HDAC-Inhibitoren auf Tumorzellen	15
1.7.2 Selektive HDAC6-Inhibitoren	16
1.7.3 Der Proteasominhibitor Bortezomib	18
1.7.4 Der HSP90-Inhibitor 17-AAG	19
1.7.5 HDAC6-Inhibitoren in Kombinationstherapie	19
1.8 Klinische Erprobung von HDAC-Inhibitoren und Kombinationstherapien	20
1.9 Ziel der Arbeit	21
2 MATERIAL UND METHODEN	- 23 -
2.1 Humane Zelllinien	- 23 -
2.1.1 Humane Urothelkarzinom-Zelllinien	- 23 -
2.1.2 Urotheliale Primärkulturen	- 24 -
2.2 Gewebeproben	- 24 -
2.3 Chemikalien	- 25 -
2.4 Enzyme	- 27 -
2.5 Molekularbiologische Kits	- 27 -
2.6 Verwendete Oligonukleotide und siRNAs	- 28 -
2.7 Antikörper	- 29 -
2.7.1 Primärantikörper	- 29 -

2.7.2	Sekundärantikörper	- 30 -
2.8	Medien, Puffer und Lösungen	- 30 -
2.8.1	Standardlösungen	- 30 -
2.8.2	Lösungen Western-Blot	- 31 -
2.8.3	Puffer für FACS-Analyse	- 32 -
2.9	Laborgeräte	- 32 -
2.10	Verbrauchsmaterialien	- 34 -
2.11	Software	- 34 -
2.11.1	Programme	- 34 -
2.11.2	Datenbanken	- 34 -
2.12	Kultivierung und Passagieren der Urothelkarzinomzellen	- 35 -
2.12.1	Zellzählung	- 35 -
2.12.2	Kryokonservierung und Rekultivierung der Urothelkarzinom-Zelllinien	- 35 -
2.12.3	Mykoplasmentest	- 36 -
2.12.4	Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Inhibitoren	- 37 -
2.13	Präparation von Nukleinsäuren aus humanen Zellen	- 37 -
2.13.1	RNA-Extraktion aus humanen Zellen mittels Trizol-Reagenz	- 37 -
2.13.2	RNA-Extraktion aus humanen Zellen mittels RNeasy Mini-Kit	- 38 -
2.13.3	Ermittlung der RNA-Konzentration	- 38 -
2.14	RT-PCR	- 38 -
2.14.1	Reverse Transkription mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit	- 38 -
2.14.2	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	- 39 -
2.15	Proteinanalyse-Verfahren	- 41 -
2.15.1	Herstellung von Proteinlysaten für die SDS-Gelelektrophorese	- 41 -
2.15.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	- 42 -
2.15.3	Western-Blot	- 42 -
2.16	Immunzytochemie	- 44 -
2.16.1	Probenvorbereitung	- 45 -
2.16.2	Immunzytochemische Färbung	- 45 -
2.17	siRNA-Transfektion	- 46 -
2.17.1	Vorversuche	- 46 -
2.17.2	Transfektion	- 46 -
2.18	Funktionelle Analysen	- 47 -
2.18.1	Vitalitätstests	- 47 -
2.18.2	Durchflusszytometrie	- 48 -
2.18.3	Klonogenitätsassay	- 50 -
2.18.4	Proliferationsassay	- 50 -
2.18.5	Scratch-Assay	- 51 -
3	ERGEBNISSE	- 52 -

3.1	Expressionsprofile der Histondeacetylasen 6 und 10 in Urothelkarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene	- 52 -
3.1.1	Expressionsprofil von HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 52 -
3.1.2	Expressionsprofil von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 53 -
3.1.3	Expressionsprofil der HDACs 6 und 10 in Gewebeproben auf mRNA-Ebene	- 54 -
3.2	Expressionsprofil von HDAC6 und HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien auf Proteinebene	- 56 -
3.2.1	Expressionsprofil von HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 56 -
3.2.2	Expressionsprofil von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 58 -
3.2.3	Expression von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien nach UV-Bestrahlung	- 58 -
3.3	Intrazelluläre HDAC6-Lokalisation in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 59 -
3.4	Medikamentöse Behandlung von Urothelkarzinom-Zelllinien mit den HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A	- 61 -
3.4.1	Effekte der HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A auf die α -Tubulin-Acetylierung sowie auf das HDAC6-Expressionsniveau in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 61 -
3.4.2	Veränderung der Histonacetylierung nach HDAC6-Inhibition in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 63 -
3.4.3	Medikamentöse Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit den HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A	- 64 -
3.4.4	Effekte eines Hitzeschocks unter Tubacin-Behandlung auf die Zellvitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien	- 69 -
3.5	Medikamentöse Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG	- 70 -
3.5.1	Veränderung von pERK, HSP70, PARP und E2F1 nach HSP90-Inhibition	- 70 -
3.5.2	Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit 17-AAG	- 72 -
3.5.3	Morphologische Veränderungen der Urothelkarzinom-Zelllinien nach 17-AAG-Behandlung	- 73 -
3.5.4	Kombinationstherapie der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Tubacin und 17-AAG	- 74 -
3.5.5	Dosiswirkungskurve einer Kombinationstherapie von Tubacin mit 17-AAG	- 76 -
3.6	Medikamentöse Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit dem Proteasominhibitor Bortezomib	- 77 -
3.6.1	Veränderung von c-FLIP und p21 nach Proteasominhibition	- 78 -
3.6.2	Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit Bortezomib	- 79 -
3.6.3	Kombinationstherapie der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Tubacin und Bortezomib	- 80 -
3.6.4	Dosiswirkungskurve einer Kombinationstherapie von Tubacin mit Bortezomib	- 82 -
3.7	Analyse der HDAC6-Funktion mittels siRNA-Analyse	- 83 -
3.7.1	Wirkung einer HDAC6-spezifischen siRNA auf die Zellvitalität	- 85 -
3.7.2	Wirkung eines Hitzeschocks auf Urothelkarzinom-Zelllinien nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC6	- 87 -
3.7.3	Wirkung einer siRNA-vermittelten Herunterregulation von HDAC6 auf die HDAC10-Expression	- 88 -
3.8	Einfluss von Tubacin, Bortezomib und einer HDAC6-spezifischen siRNA auf den Zellzyklus	- 89 -
3.9	Einfluss von HDAC6 auf die Zellmigration von Urothelkarzinom-Zelllinien	- 93 -
3.10	Untersuchung der Effekte von Tubacin und Bortezomib auf die Klonogenität von Urothelkarzinom-Zelllinien	- 97 -

3.11	Langfristige Proliferationsfähigkeit von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit Tubacin, 17-AAG oder Bortezomib	- 99 -
4	DISKUSSION	- 101 -
4.1	HDAC6-Expression im Urothelkarzinom	- 103 -
4.2	HDAC10-Expression im Urothelkarzinom	- 105 -
4.3	Lokalisation von HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien	- 106 -
4.4	Einfluss von HDAC6-Inhibitoren auf den Acetylierungsstatus von α -Tubulin und auf die HDAC6-Expression	- 107 -
4.5	Einfluss von HDAC6-Inhibitoren auf die Zellvitalität	- 109 -
4.6	Einfluss einer HDAC6-Inhibition auf die Stressantwort von Urothelkarzinom-Zelllinien	- 111 -
4.7	Effekte einer HSP90-Inhibition sowie einer kombinierten Inhibition von HSP90 und HDAC6 auf die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien	- 112 -
4.8	Effekte einer Proteasominhibition sowie einer kombinierten Inhibition von Proteasomen und HDAC6 auf die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien	- 114 -
4.9	Einfluss von HDAC6 auf die Zellmigration	- 120 -
4.10	Effekt von HDAC6 auf Proliferation und Klonogenität	- 120 -
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	- 122 -
6	DANKSAGUNG	- 138 -

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern und die achthäufigste bei Frauen in der westlichen Welt [1]. Mit steigendem Alter nimmt das Erkrankungsrisiko zu. Ein Großteil erkrankt um das 69. Lebensjahr [2]. Über 90 % der Blasenkarzinome sind Urothelkarzinome, die verbleibenden 5-10 % stellen Plattenepithel- und Adenokarzinome dar [1, 3].

Als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms gilt das Zigarettenrauchen, das bei 50 % der Männer und 35 % der Frauen für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht wird [4]. Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben Raucher ein etwa vierfach erhöhtes Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken [1]. Weitere Risikofaktoren stellen die in Färbemitteln enthaltenen aromatischen Amine, sowie bestimmte Medikamente wie Phenacetin, Cyclophosphamid oder Chlornaphazin dar [4]. Die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen wird mit der Bilharziose in Verbindung gebracht [5].

Hauptsymptome der frühen Stadien des Harnblasenkarzinoms sind eine asymptomatische Mikro- oder Makrohämaturie, Pollakisurie oder Dysurie. Körperliche Beschwerden wie Schmerzen am seitlichen Körperrumpf treten erst in fortgeschrittenen Tumorstadien auf [6].

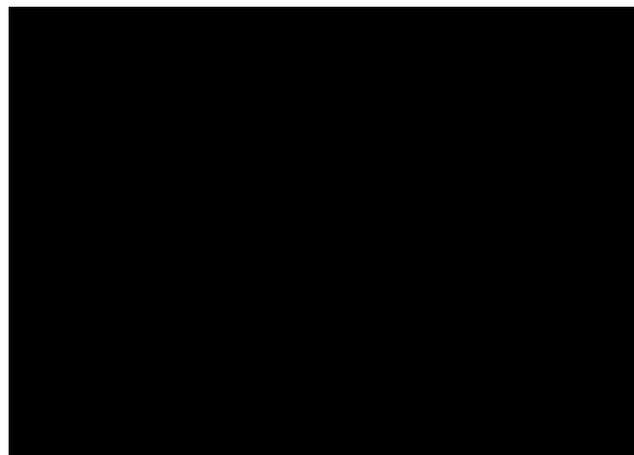
Die Stadieneinteilung des Urothelkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (*Union internationale contre le cancer*), die Einteilung des Differenzierungsgrades gemäß WHO-Klassifikation (siehe Tabelle 1.1 und Tabelle 1.2) [5, 7].

Zum Diagnosezeitpunkt sind ca. 80 % der Urothelkarzinome nicht muskelinvasive Tumoren (Ta, Tis, T1), von denen im weiteren Verlauf jedoch 10-15 % ein muskelinvasives Wachstum entwickeln [5, 8]. Da es in diesen Stadien nur selten zu einer Ausbildung von Metastasen kommt, sind die Heilungschancen günstig [9, 10]. Problematisch sind jedoch die hohen Rezidivraten, welche eine regelmäßige urologische Nachkontrolle erfordern [11]. Muskelinvasive Tumoren haben eine deutlich schlechtere Prognose. Ab dem Stadium T2a steigt die Wahrscheinlichkeit einer lymphnodalen oder Fernmetastasierung deutlich [10]. Die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten nach radikaler Zystektomie beträgt stadienabhängig bei pT2-Tumoren etwa 77 %, bei pT3a 64 %, bei pT3b 49 % und bei pT4 44 %. Liegt ein Lymphknotenbefall vor, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 31 % [12].

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms gemäß Einteilung der UICC 2009 (modifiziert nach [5]).

Stadium	Beschreibung
TX	keine Beurteilung des Primärtumors möglich
Ta	nicht invasiver papillärer Tumor
T1	Invasion des subepithelialen Bindegewebes
T2a	Infiltration der oberflächlichen Muskulatur
T3	Infiltration von perivesikalem Bindegewebe
T3b	makroskopisch
T4a	Infiltration von Prostata, Vagina oder Uterus
N: Lymphknoten	
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N2	Befall von multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens
M: Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen

Tabelle 1.2: Differenzierungsgrade des Urothelkarzinoms gemäß WHO-Klassifikation 1973 und 2004 (modifiziert nach [7]).



Die Therapie des Harnblasenkarzinoms richtet sich nach dem Tumorstadium. Die Entfernung eines nicht muskelinvasiven Urothelkarzinoms geschieht mittels transurethraler Resektion (TUR). Unmittelbar postoperativ sollte eine Frühinstillation von Mitomycin durchgeführt werden, welche die Rezidivrate nachweislich um bis zu 50 % senkt [13, 14]. Bei muskelinvasiven Tumoren (pT2–pT4) hingegen ist die radikale Zystektomie die Therapie der Wahl. Trotz radikaler Therapiemethoden liegt die Rezidivrate für muskelinvasive Karzinome bei ca. 50 % [15]. Einen Sonderfall stellen pT1G3- und Cis (*Carcinoma in situ*)-Tumoren dar, da bei alleiniger transurethraler Resektion ein Progressionsrisiko von 30-40 % besteht [14, 16]. Bestätigt sich bei pT1G3- bzw. Cis-Tumoren in einer Kontroll-TUR die vollständige Resektion des Tumors, folgt eine Instillation mit dem Tuberkulose-Impfstoff BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). BCG wird in die Tumorzellen aufgenommen und an deren Oberfläche präsentiert, was zu einer T-Zell-Aktivierung mit Bekämpfung der Tumorzellen führt [14, 17]. Findet sich hingegen nach Kontroll-TUR ein Residualtumor oder kommt es nach BCG-Instillation zu einem Rezidiv, wird eine radikale Zystektomie empfohlen [5, 18]. Optional kann insbesondere bei jüngeren Patienten auch bei einem pT1G3- oder einem Cis-Tumor eine unmittelbare Zystektomie ohne vorherige Instillationsbehandlung erfolgen [5, 14].

Bei Patienten mit T2-T4a-Tumoren, negativem Lymphknotenstatus und fehlenden Fernmetastasen wird eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. Diese wird Cisplatin-basiert als Kombinationstherapie durchgeführt. Jedoch zeigt sich bei einer Kombinationstherapie von Cisplatin, Methotrexat und Vinblastin eine Verbesserung der 10-Jahres-Überlebensrate von lediglich 5-10 %. Eine adjuvante Chemotherapie nach radikaler Zystektomie wird aufgrund nicht erwiesener Wirksamkeit derzeit selten durchgeführt [19].

Auch bei metastasiertem Harnblasenkarzinom wird eine Cisplatin-basierte Chemotherapie durchgeführt. Kombinationstherapien sind im Vergleich zu einer Cisplatin-Monotherapie im Hinblick auf das Gesamtüberleben deutlich effektiver. Dennoch beträgt die Langzeitüberlebensrate weniger als 20 %. Als Therapieregime haben sich eine Kombinationstherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin (Doxorubicin) und Cisplatin (M-VAC) sowie eine Kombination von Cisplatin und Gemcitabin etabliert. Zudem besteht die Möglichkeit einer intensivierten Therapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin in Kombination mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (HD-M-VAC). Aufgrund der geringeren Toxizität gegenüber dem M-VAC-Schema hat sich die Therapie mit Cisplatin und Gemcitabin als Standardtherapie durchgesetzt. Bei Patienten mit Kontraindikationen für Cisplatin wie Niereninsuffizienz oder schlechtem Allgemeinzustand

wird hauptsächlich eine Kombinationstherapie mit Carboplatin und Gemcitabin durchgeführt. [19].

Insgesamt ist die Effektivität der Therapiemöglichkeiten sowohl für das muskelinvasive als auch für das metastasierte Harnblasenkarzinom derzeit noch begrenzt. Daher ist es erforderlich, neue Therapieansätze zu entwickeln, um vor allem die Prognose für Patienten mit muskelinvasiven Karzinomen zu verbessern.

1.2 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik bezeichnet vererbare Änderungen in der Genexpression, die nicht auf eine Veränderung von DNA-Sequenzen zurückzuführen sind [20]. Beispiele für epigenetische Veränderungen stellen die posttranslationale reversible Modifikation von Histonen, sowie die Methylierung der DNA dar [21]. Diese Methylierung erfolgt hauptsächlich an der Base Cytosin innerhalb der Basenfolge CG. In manchen Bereichen der DNA ist diese Basenfolge überdurchschnittlich häufig vorhanden. Diese werden als CpG-Inseln (*cytosine-phosphatidyl-guanosine islands*) bezeichnet. Häufig überlappen CpG-Inseln Promotorbereiche von Genen. Liegt eine Hypermethylierung von CpG-Inseln vor, wird die Promotor-vermittelte Transkription des jeweiligen Gens verhindert [22–25]. Beispiele hierfür sind CDKN2A/p16 oder BRCA1 [26, 27]. Das epigenetisch vermittelte Abschalten von Genen, welche eine regulatorische Schlüsselfunktion für die Differenzierung besitzen, ist für die Entwicklung von Tumoren von wesentlicher Bedeutung [20].

Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind epigenetische Veränderungen reversibel, was eine pharmakologische Intervention zu therapeutischen Zwecken ermöglicht [28, 29].

1.3 Histone

Die DNA von menschlichen Zellen hat eine Länge von ca. 1,8 m. Im Zellkern muss sie daher entsprechend kondensiert vorliegen, was durch eine Assoziation mit Histonproteinen ermöglicht wird. Eine Einheit von Histonproteinen und DNA wird als Nukleosom bezeichnet [30]. Die Bindung zwischen Histonen und DNA wird durch elektrostatische Wechselwirkungen der negativ geladenen DNA und der positiv geladenen Aminosäuren der Histone ermöglicht. Die Gesamtheit der Nukleosomen bildet das Chromatin [31, 32].

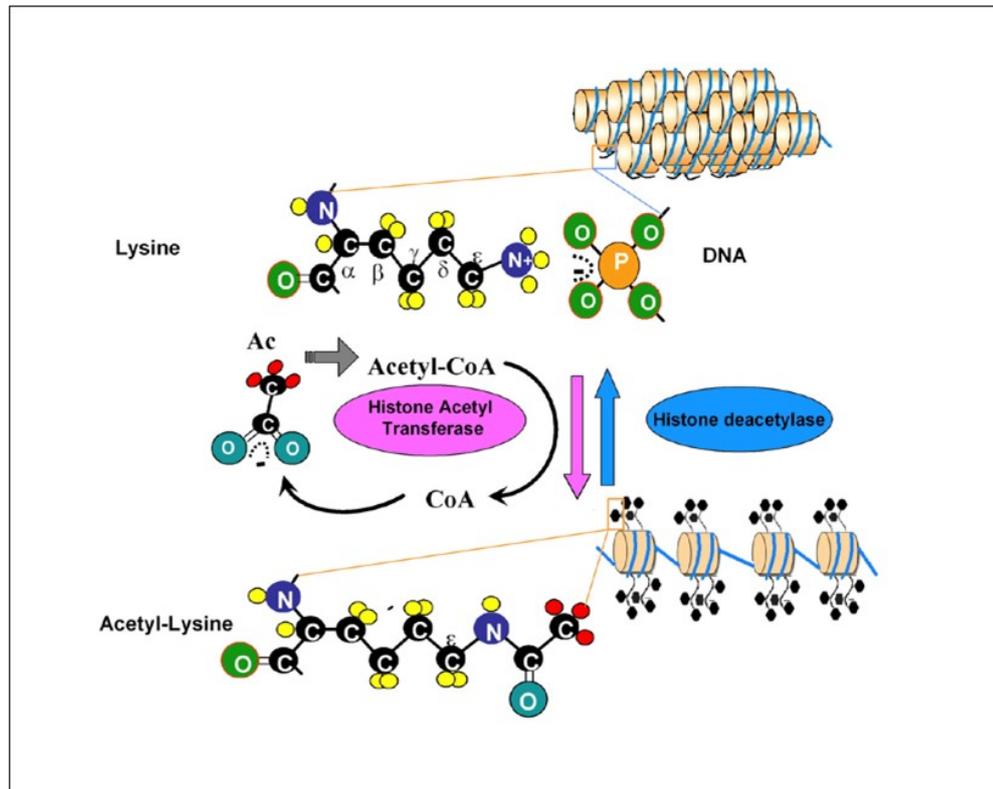


Abb. 1.1: Acetylierung und Deacetylierung von Histonen (modifiziert nach [33]).

Eine Interaktion von Proteinen mit Histonen zur Regulation der Genexpression wird über die N-terminalen Enden der Histonproteine ermöglicht. Zu den Histonmodifikationen gehören Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinierung [34, 35]. Bei der Acetylierung werden Acetylgruppen auf die ϵ -Aminogruppen von Lysinresten am N-Terminus der Histone H2A, H2B, H3 und H4 übertragen (siehe Abb.1.1). Diese posttranslationalen Modifikationen haben eine Auswirkung darauf, ob die auf der DNA enthaltenen Informationen zur Genexpression abgelesen werden können [31, 33, 36]. Bei der Methylierung werden Methylgruppen auf Lysin-, sowie Argininreste der Histone H3 und H4 übertragen [37]. Dabei werden beispielsweise Lysin 9 des Histons H3 sowie Lysin 4 und Lysin 27 des Histons H3 modifiziert [28].

1.4 Histonacetylasen und Histondeacetylasen

Solange die DNA eng um die Histone herum aufgewickelt ist, ist eine Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion mit nachfolgender Ablesung durch RNA-Polymerasen erschwert. Damit eine Transkription stattfinden kann, muss zunächst die Bindung zwischen der DNA und den Histonen gelockert werden. Dies wird durch eine

Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten am N-terminalen Ende der Histone erleichtert. Durch die Acetylierung wird die positive Ladung der ϵ -Aminogruppe neutralisiert, was eine Abschwächung der Bindung zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA zur Folge hat. Der entsprechende DNA-Abschnitt kann nun von Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Eine solche Acetylierung wird durch die Histonacetylasen (HATs) ermöglicht. Umgekehrt bewirkt eine Deacetylierung durch Histondeacetylasen (HDACs) über eine Wiederherstellung der positiven Ladung eine erhöhte Affinität der Histone für die DNA, was die Bindung zwischen Histonen und DNA verstärkt. Folge ist eine Transkriptionsrepression und somit eine verminderte Genexpression [31]. Zu den Genen, deren Expressionsstärke durch HDACs reguliert wird, gehören Zellzyklusregulatoren wie CDK1, sowie verschiedene proapoptotische Faktoren (Bim, Bax etc.), wodurch den HDACs eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren zukommt [38–40].

Histondeacetylasen werden in „klassische HDACs“ und Sirtuine eingeteilt. Zu den „klassischen HDACs“ gehören 11 verschiedene Isoenzyme, welche sich in Funktion und subzellulärer Lokalisation unterscheiden (siehe Tabelle 1.3). Die Histondeacetylasen werden analog ihrer Homologie zu den entsprechenden Proteinen der Hefe in die Klassen I-IV eingeteilt, wobei die Klasse II wiederum aus den Klassen IIa und IIb besteht. Hierbei umfasst die Klasse I die HDACs 1, 2, 3 und 8, die Klasse IIa die HDACs 4, 5, 7 und 9 und die Klasse IIb die HDACs 6 und 10. Zu der Klasse III werden die Sirtuine (SIRT1-7) gezählt [41]. Die 2002 erstmals beschriebene Histondeacetylase 11 wird der Klasse IV zugeordnet [41, 42]. Klassische HDACs stellen Zink-abhängige Enzyme dar, welche in ihrem Zentrum ein Zink-Ion besitzen. Im Gegensatz dazu sind die Sirtuine auf NAD^+ als Cofaktor angewiesen [41].

HDACs der Klasse I wirken im Wesentlichen im Zellkern und damit auf den Acetylierungsstatus von Histonen [43]. Darüber hinaus interagieren sie beispielsweise mit p53, Smad7 oder dem Androgen-Rezeptor [44]. Insbesondere HDACs der Klassen II und IV können sowohl intra- als auch extranukleär lokalisiert sein [43]. Intranukleär sind Interaktionen mit c-Myc [45] oder Survivin [46] beschrieben, extranukleär mit HSP90 oder α -Tubulin [47, 48].

Tabelle 1.3: Ausgewählte Charakteristika der HDAC-Mitglieder (modifiziert nach [41, 49, 50]).

HDAC	Intrazelluläre Lokalisation	Expression Normalgewebe	Expression Tumorgewebe
Klasse I			
HDAC1	Nukleus	ubiquitär	↑ Ösophagus, CRC, Pankreas, Magen
HDAC2	Nukleus	ubiquitär	↑ Prostata, CRC
HDAC3	Nukleus	ubiquitär	↑ Prostata, CRC, Magen
HDAC8	Nukleus	ubiquitär	↑ Neuroblastom
Klasse IIa			
HDAC4	Nukleus/Zytoplasma	Herz, Gehirn, glatte Muskulatur	↑ Mamma
HDAC5	Nukleus/Zytoplasma	Herz, Gehirn, glatte Muskulatur	↓ AML ↑ CRC
HDAC7	Nukleus/Zytoplasma	Herz, Plazenta, Pankreas, glatte Muskulatur	↑ CRC
HDAC9	Nukleus/Zytoplasma	glatte Muskulatur, Gehirn	↑ Astrozytom
Klasse IIb			
HDAC6	vorherrschend Zytoplasma	Niere, Leber, Herz, Pankreas	↑ Mamma
HDAC10	Nukleus/Zytoplasma	Leber, Milz, Niere	↑ HCC
Klasse IV			
HDAC11	Nukleus/Zytoplasma	Gehirn, Herz, glatte Muskulatur, Niere	↑ Mamma

1.5 Die Histondeacetylase 6

Die Histondeacetylase 6 (HDAC6) bildet zusammen mit HDAC10 die Klasse IIb der Histondeacetylasen [51]. Das entsprechende Gen ist auf Chromosom Xp11.23 lokalisiert [49]. HDAC6 besteht aus 1215 Aminosäuren [43]. Sie besitzt als einzige Histondeacetylase zwei katalytisch aktive Deacetylasedomänen [49], zwischen denen sich eine Dynein-bindende Domäne befindet [48]. Zudem ist HDAC6 durch einen C-terminal gelegenen Zinkfinger charakterisiert, welcher das Protein zur Ubiquitinbindung befähigt [49]. HDAC6 ist hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, was durch die Motive NES (*nuclear export signal*) und SE14 bedingt ist. SE14 stellt eine Serin- und Glutamat-reiche Region dar, welche aus

acht aufeinanderfolgenden Tetradekapeptiden besteht und zwischen der Deacetylasedomäne 2 und dem Zinkfinger lokalisiert ist [49, 51] (siehe Abb. 1.2).

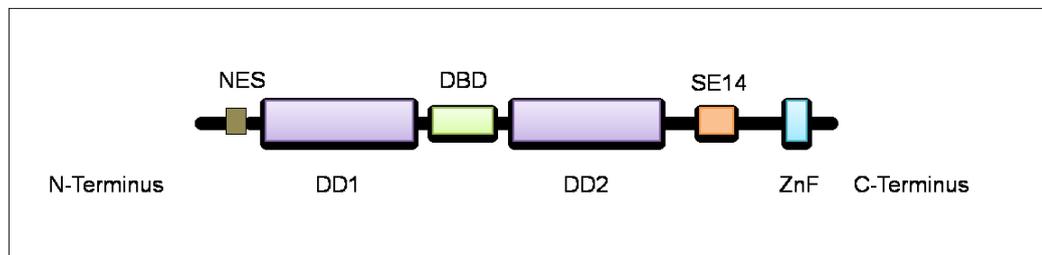


Abb. 1.2: **Struktureller Aufbau von HDAC6** (modifiziert nach [48, 49, 51]). NES: nuclear export signal; DD1: Deacetylasedomäne 1; DBD: Dynein-bindende Domäne; DD2: Deacetylasedomäne 2; SE14: Ser-Glu-containing tetradecapeptide repeat domain; ZnF: Zinkfinger

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass viele zytoplasmatisch lokalisierte Proteine wie α -Tubulin oder HSP90 zu wichtigen Substraten von HDAC6 zählen [52].

1.5.1 Funktionen von HDAC6

1.5.1.1 Deacetylierung von α -Tubulin

Ein Hauptsubstrat von HDAC6 stellt das zytoplasmatische Protein α -Tubulin dar. Dieses bildet mit β -Tubulin zusammen ein Dimer aus, welche die Grundeinheit der Mikrotubuli ausmacht [53, 54].

Die Mikrotubulistabilität wird über Acetylierung von α -Tubulin an der ϵ -Aminogruppe eines N-terminalen Lysinrestes mitbestimmt [55, 56]. Die Veränderung des Acetylierungsstatus geschieht bei Mikrotubuli posttranslational durch die Histondeacetylasen SIRT2 [57] und HDAC6 [58]. Hierbei geht eine Deacetylierung mit einer erhöhten Zellmotilität einher [58]. Im Gegensatz dazu vermag eine HDAC6-Inhibition durch den Inhibitor Tubacin die Zellmotilität über α -Tubulin-Acetylierung zu vermindern [59].

1.5.1.2 Interaktion von HDAC6 mit dem Ubiquitin-Proteasom-System

Intrazellulärer Stress kann über die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im Zytoplasma entstehen und in der Zelle apoptotische Signalwege auslösen [60]. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in der Lage, diese fehlgefaltete Proteine abzubauen und somit den intrazellulären Stress zu vermindern [61]. Um einen solchen Abbau zu ermöglichen, werden die entsprechenden Proteine kovalent mit Ubiquitin-Polymeren markiert und zum Proteasom transportiert. Dieses baut die fehlgefalteten Proteine ab [62]. Fallen zu große Mengen dieser fehlgefalteten Proteine an oder wird das Proteasom inhibiert, ist ein angemessener Abbau der

ubiquitinierten Proteine nicht mehr möglich. In einem solchen Fall kommt es zur Bildung von sogenannten Aggresomen [63, 64] (siehe Abb. 1.3). Diese sind perinukleär lokalisiert und stellen eine Ansammlung der fehlgefalteten und nicht über das Proteasom abgebauten Proteine dar [61, 64].

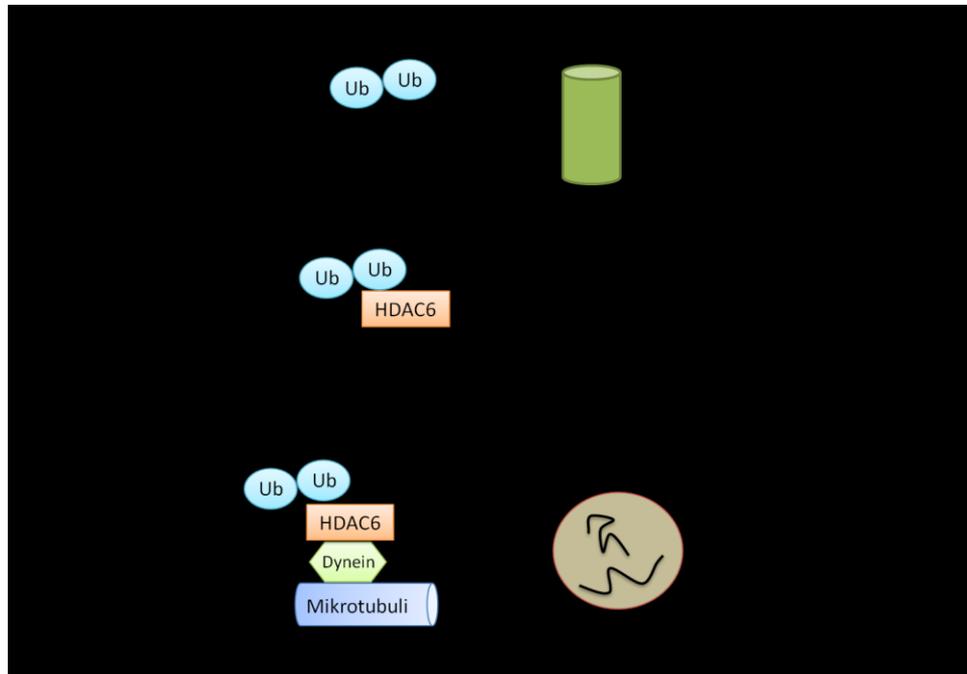


Abb. 1.3: **Funktion von HDAC6 bei der Aggresomenbildung (modifiziert nach [61]).** Fehlgefaltete Proteine werden im Normalfall polyubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Ist eine Proteindegradation über diesen Weg nicht möglich, bindet HDAC6 sowohl an die ubiquitinierten Proteine als auch an das Motorprotein Dynein. Die fehlgefalteten Proteine gelangen auf diesem Weg entlang der Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum nahe des Zellkerns, wo sie ein Aggresom ausbilden. Dieses kann durch Autophagolysosomen abgebaut werden.

HDAC6 bindet die ubiquitinierten Proteine über eine Zinkfinger-Domäne und geht gleichzeitig eine Bindung mit dem Protein Dynein ein [61]. Dyneine gehören zusammen mit den Kinesinen zu den Motorproteinen, welche mit den Mikrotubuli der Zelle assoziiert sind. Die Dyneine können sich vom Plus- zum Minuspol bewegen, so dass der Komplex aus HDAC6 und Dynein entlang der Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) gelangen kann [65, 66]. Hier werden die polyubiquitinierten Proteine einem Aggresom zugeführt. Das Aggresom wird letztendlich von Autophagosomen aufgenommen, welche wiederum mit Lysosomen fusionieren und somit einen Abbau der fehlgefalteten Proteine ermöglichen [67].

1.5.1.3 Deacetylierung von Cortactin

Cortactin stellt ein weiteres zytosolisch lokalisiertes Substrat von HDAC6 dar, welches neben den Mikrotubuli einen bedeutenden Einfluss auf die Zellmotilität besitzt [68]. Im deacetylierten Zustand bewirkt es durch Anlagerung an den Pluspol von F-Aktin eine Verlängerung der Aktinfilamente. Aktinfilamente befinden sich in den für die Migration bedeutsamen Ausläufern der Zellen, den Lamellipodien und Filopodien [68–70]. Neben der Zellmotilität ist F-Aktin für die Stabilisierung der Zellform und den intrazellulären Transport von Bedeutung [71].

1.5.1.4 Deacetylierung von HSP90

Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) ist ein Chaperon, welches noch reifende Proteine bei ihrer Faltung unterstützt und deren Degradation durch das Proteasom verhindert. Die Substrate von HSP90 werden auch als Klientproteine bezeichnet [72, 73].

HDAC6 kann HSP90 mittels Deacetylierung in seine aktive, funktionsfähige Form überführen. Diese aktivierte Form bindet Co-Chaperone wie p23 und unterstützt so die korrekte Faltung von Klientproteinen wie p53, HER2/ErbB2, Akt, Raf-1 oder HIF-1 α [74–76]. Wird HDAC6 inhibiert, führt dies zur Inaktivierung von HSP90 (siehe Abb. 1.4). Dieses löst sich daraufhin von seinem Klientprotein, welches nun der Degradation durch das Proteasom zugeführt wird [74].

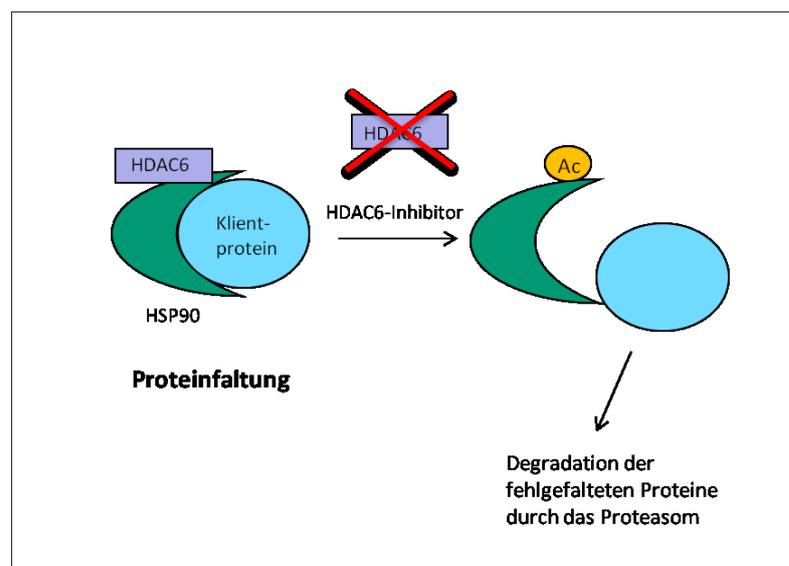


Abb. 1.4: **Interaktion von HDAC6 mit dem Hitzeschockprotein HSP90.** HSP90: Hitzeschockprotein 90; HDAC6: Histondeacetylase 6; Ac: acetyliert

Dieser Mechanismus ist beispielsweise bei K562-Leukämiezellen gezeigt worden. Hier bewirkt eine HDAC6-Inhibition über HSP90-Acetylierung eine proteasomale Degradation der Onkogen-Proteine Bcr-Abl, c-Raf und Akt [74].

1.5.2 HDAC6 und Angiogenese

Die Angiogenese ist für die Tumorprogression von wesentlicher Bedeutung. Sie wird durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) sowie dessen Rezeptoren (VEGFR1 und 2) beeinflusst. Nach Bindung des VEGF-Rezeptors wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) in Zellproliferation, Differenzierung und Migration mündet. Die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 werden durch HSP90 modifiziert. Wird HDAC6 gehemmt oder herunterreguliert, ist HSP90 nicht mehr fähig, die VEGF-Rezeptoren zu binden. Stattdessen binden diese an HSP70, mit der Folge der proteasomalen Degradation der Rezeptoren [77].

Über die Bindung von HDAC6 an HSP90 wird zudem die Funktion des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α beeinflusst. HIF- 1α stellt ebenfalls ein Klientprotein von HSP90 dar. Über die HDAC6-bedingte Deacetylierung von HSP90 werden Reifung und Faltung von HIF- 1α unterstützt, was wiederum Angiogenese und Proliferation fördert [78].

1.5.3 HDAC6-Expression in Tumoren

Der Einfluss von HDAC6 auf Zellmotilität, Zelladhäsion und Zellstress kann für Tumorzellen von wesentlicher Bedeutung sein. Eine Verringerung des Zellstresses ist insofern essenziell, als dass in Tumorzellen durch deren deregulierte Proliferationsaktivität vermehrt fehlgefaltete Proteine akkumulieren [79]. Erhöhung der Zellmotilität und Zelladhäsion spielen bei der Metastasierung eine wichtige Rolle [80, 81]. Daher ist es sinnvoll, die HDAC6-Expression in Tumoren näher zu charakterisieren und zu evaluieren, welche Tumorzellen verstärkt auf HDAC6 angewiesen sind und inwieweit HDAC6 die Tumorprogression beeinflusst.

Untersuchungen in oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC, *oral squamous cell carcinoma*) haben gezeigt, dass die HDAC6-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Vergleich zu normalen humanen Plattenepithelkarzinomzellen signifikant erhöht ist. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen Tumorstadium und Höhe der HDAC6-Expression nachgewiesen werden [82].

In hepatozellulären Karzinomzelllinien konnte bei einer Überexpression von HDAC6 *in vivo* eine massive Migration und Invasion der Tumorzellen beobachtet werden. [83]. Zudem ließ

sich auch hier ein positiver Zusammenhang zwischen einer HDAC6-Überexpression und dem Tumorstadium herstellen.

Untersuchungen mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 wiederum weisen darauf hin, dass HDAC6 über Beeinflussung des TGF- β -Signalweges einen entscheidenden Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition in Lungenkarzinomzellen nimmt [84].

Im Mammakarzinom wurde beobachtet, dass HDAC6 in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 mittels Östrogenbehandlung hochreguliert werden kann [85]. Zudem konnte in einer Studie mit 135 Patientinnen nachgewiesen werden, dass eine hohe HDAC6-Expression auf mRNA-Ebene mit einer geringen TumorgroÙe, einem niedrigen histologischen Tumorgrad sowie einem positiven ER α - und Progesteronrezeptorstatus korreliert und mit einer besseren Prognose und einer höheren Ansprechrate auf eine endokrine Therapie mit Tamoxifen assoziiert ist [85, 86].

Auch für andere Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass HDAC6 über verschiedene Mechanismen auf die Tumorzellen einwirkt [87]. Dabei scheint das Expressionsniveau von HDAC6 und deren Bedeutung für den Tumor je nach Tumorart unterschiedlich zu sein.

Zudem wurde im Mausmodell eine siRNA-vermittelte Herunterregulation („*knockdown*“) von HDAC6 durchgeführt und die Mäuse hinsichtlich pathologischer Veränderungen beobachtet [88]. Auffällig waren eine Hyperacetylierung von α -Tubulin und HSP90, sowie eine mäßig erhöhte Knochendichte. Die Mäuse waren jedoch trotz des Fehlens von HDAC6 lebensfähig. Bedeutende Entwicklungseinschränkungen konnten nicht festgestellt werden [88]. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich HDAC6-defiziente Mäuse durch Hyperaktivität und geringere Ängstlichkeit auszeichnen [89]. Zudem ließ sich durch eine siRNA-vermittelte Herunterregulation ein antidepressiver Effekt erzielen. Ähnliche Ergebnisse wurden durch eine medikamentöse HDAC6-Inhibition mit NCT-14b erzielt. Eine Einschränkung der Vitalität wurde auch hier nicht beobachtet.

Diese Erkenntnisse machen HDAC6 als Angriffspunkt für eine medikamentöse Therapie interessant, da sich durch HDAC6-Inhibition möglicherweise eine Beeinträchtigung von Tumorzellen erzielen lässt, mit nur unwesentlicher Beeinflussung von normalen Zellen.

1.6 Die Histondeacetylase 10

Über die Funktionen von HDAC10 ist bislang wenig bekannt. Sie gehört wie HDAC6 zur Klasse IIb der Histondeacetylasen und besitzt eine Deacetylasedomäne, welche zur Histondeacetylierung fähig zu sein scheint. Zudem ist HDAC10 durch eine Leucin-reiche Domäne am C-terminalen Ende und durch ein 14-3-3-bindendes Motiv charakterisiert [90]. In humanen Geweben werden von HDAC10 mehrere Transkripte exprimiert. Ein Transkript mit einer Größe von 3 kb wurde hauptsächlich in Leber, Niere, Milz und Pankreas nachgewiesen, wohingegen in Gehirn, Hoden und Herz nur eine geringe Expression dieses Transkripts gemessen werden konnte. Ein anderes Transkript mit einer Länge von 1,3 kb scheint vor allem in der Plazenta lokalisiert zu sein [90, 91].

Die Untersuchung von HeLa-, NIH-3T3- sowie HEK-293-Zelllinien deutet auf eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation von HDAC10 hin. Die hierfür verantwortlichen Domänen sind bislang unbekannt. Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass ein Fehlen der Leucin-reichen Domäne, welche einen Bereich für CRM1-abhängigen nukleären Export besitzt, eine panzelluläre Lokalisation von HDAC10 bewirkt. Durch Inhibition mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B, welcher bereits erfolgreich bei den Histondeacetylasen 4-7 eingesetzt worden war, ließ sich bei HDAC10 jedoch kein Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation beobachten [90].

Zudem wurden Untersuchungen zur Wechselwirkung von HDAC10 mit anderen Proteinen durchgeführt. Obwohl HDAC10 ein 14-3-3-bindendes Motiv besitzt, konnte keine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen nachgewiesen werden. Auch eine mögliche Assoziation mit anderen HDACs der Klasse II ließ sich bislang nicht nachweisen. Lediglich für HDAC3 lassen Co-Expressionen von HDAC10 und HDAC3 mit anschließender Immunopräzipitation auf eine mögliche Interaktion von HDAC10 mit HDAC3 schließen [90].

Funktionelle Analysen haben analog zu HDAC6 für HDAC10 eine Rolle bei der Regulation der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 aufgezeigt. In der Magenadenokarzinom-Zelllinie SNU-620 wurde nach einer siRNA-vermittelten Herunterregulation von HDAC10 eine verminderte Proteinexpression der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 beobachtet [77]. Zudem führte eine HDAC10-Inhibition sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einem erhöhten Expressionsspiegel des *thioredoxin-interacting proteins* (TXNIP). TXNIP ist ein Inhibitor des antioxidativ wirkenden Thioredoxin (TRX) [92]. Thioredoxin bindet reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und schützt die Zelle so vor oxidativem Stress [93]. Eine Hemmung

von Thioredoxin durch TXNIP führt somit über Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Aktivierung Apoptose-vermittelnder Signalmoleküle [93, 94].

1.7 HDAC-Inhibitoren

Der Begriff HDAC-Inhibitoren bezieht sich auf die Inhibition der „klassischen“ HDACs, also der Klassen I, II und IV [50]. Ihren Angriffspunkt stellt das Zink-Ion der Histondeacetylasen dar [95]. Die Sirtuine bleiben von den klassischen Inhibitoren meist unbeeinflusst, da sie keine Zink-abhängigen Enzyme darstellen, sondern NAD^+ als Cofaktor besitzen. HDAC-Inhibitoren stellen eine heterogene Substanzgruppe dar. Sie werden in Hydroxamsäuren, zyklische Peptide, kurzkettige Fettsäuren und Benzamide eingeteilt [50, 95]. Die chemische Struktur der HDAC-Inhibitoren hat einen entscheidenden Einfluss darauf, welche Potenz und Selektivität die HDAC-Inhibitoren im Hinblick auf die einzelnen Histondeacetylasen besitzen [96].

Beispiele für Hydroxamsäuren stellen die Pan-Inhibitoren Trichostatin A (TSA), LBH589 und die Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA, Vorinostat) dar, welche sich unselektiv gegen die HDACs der Klassen I und II richten. Kurzkettige Fettsäuren (Phenylbutyrat, Valproinsäure), zyklische Peptide (FK-228) und Benzamide (MS-275) weisen in höheren Konzentrationen eine geringere Aktivität gegenüber der Klasse II auf [50, 97]. Tabelle 1.4 gibt eine Übersicht über die verschiedenen HDAC-Inhibitoren [98–115].

Auch gegenüber einzelnen Mitgliedern der HDAC-Klassen sind die Substanzen unterschiedlich selektiv. Während MS-275 für die Inhibition von HDAC1 einen EC_{50} -Wert von 181 nM aufwies, musste für eine Inhibition der HDACs 2, 3 und 9 eine deutlich höhere Konzentration eingesetzt werden (EC_{50} im millimolaren Bereich). Die HDACs 4, 6, 7 und 8 wurden durch MS-275 nicht inhibiert [106, 116]. Apicidin hemmte die HDACs 2 und 3 sowie HDAC8 mit EC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich, wobei die Inhibition der HDACs 2 und 3 deutlich stärker ausfiel als die von HDAC8. Für HDAC1 sowie für die HDACs der Klasse II hingegen konnte durch Apicidin-Behandlung keine Inhibition erzielt werden. MGCD0103 wiederum zeigte für die HDACs 1 und 2 die höchste Selektivität, wohingegen HDAC3 deutlich schwächer inhibiert wurde. Eine Hemmung der HDACs der Klasse II sowie HDAC8 wurde hingegen nicht beobachtet. Auch die anderen HDAC-Inhibitoren sind unterschiedlich selektiv [106].

Tabelle 1.4: Übersicht über die verschiedenen HDAC-Inhibitoren sowie deren klinische Erprobung (modifiziert nach [111]).

Gruppe	HDAC-Inhibitor	Selektivität	Klinische Entwicklung	Referenz
Hydroxamsäuren	Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA, Vorinostat)	-	zugelassen (CTCL, 2006)	Mann et al., 2007 Tiffon et al., 2011
	Trichostatin A (TSA)	-	präklinisch	Gillespie et al., 2012 Sanderson et al., 2004
	LBH589 (Panobinostat)	-	Phase III	Minami et al., 2014 Moreau, 2013
	PXD-101 (Belinostat)	-	Phase II	Kirschbaum et al., 2014 Minami et al., 2014
Zyklische Peptide	Romidepsin (FK-228)	HDAC1, HDAC2	zugelassen (CTCL, 2009)	Kim et al., 2011
	Apicidin	HDAC2, HDAC3	präklinisch	Khan et al., 2008 Shin et al., 2014
Kurzkettenige Fettsäuren	Valproinsäure	Klasse I	Phase II	Khan et al., 2008 Kuendgen et al., 2005 Scherpereel et al., 2011
	Phenylbutyrat	Klasse I, IIa	zugelassen (Hyperammonämie)	Cudkovic et al., 2009 Dokmanovic et al., 2007 Xu et al., 2011
Benzamide	MS-275 (Entinostat)	HDAC1, HDAC2, HDAC3	Phase II	Kim et al., 2011 Yardley et al., 2013
	MGCD0103	Klasse I, Klasse IV	Phase II	Blum et al., 2009 Kim et al., 2011 Le Tourneau et al., 2008

Der Vergleich der verschiedenen HDAC-Inhibitoren verdeutlicht, dass HDAC6 von vielen der Inhibitoren nicht, oder erst in sehr hohen Konzentrationen gehemmt wird. Bei Inhibitoren wie Trichostatin A wiederum, welche auch HDAC6 potent inhibieren können, besteht die Schwierigkeit, dass die gleichzeitige Inhibition anderer HDACs zum Teil starke Toxizitäten zur Folge hat [106, 117]. Zudem lässt sich durch die Inhibition mehrerer HDACs nicht auf die spezifische Wirkung von HDAC6 rückschließen. Daher schien es sinnvoll, Inhibitoren zu entwickeln, die selektiv gegen einzelne HDACs gerichtet sind. Für HDAC6 zählen Tubacin, ST-80 und Tubastatin A dazu. Tubastatin A beispielsweise weist eine 1000-fache Selektivität für HDAC6 gegenüber HDAC1 auf [118].

1.7.1 Wirkung der HDAC-Inhibitoren auf Tumorzellen

Die Effekte von HDAC-Inhibitoren reichen von Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und Wachstumsinhibition bis hin zur Induktion von Zelldifferenzierung. Hierbei ist die Histon-Hyperacetylierung entscheidend, wahrscheinlich da diese die Transkription wichtiger Tumorsuppressorgene ermöglicht. Einen bedeutenden allgemeinen Mechanismus stellt die

Hochregulation des Zellzyklusregulators p21^{WAF1/CIP1} dar [119], jedoch unterscheiden sich die Wirkmechanismen der HDAC-Inhibitoren je nach Selektivität für die einzelnen Histondeacetylasen.

Trichostatin A beispielsweise induzierte in der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 eine Heraufregulation des proapoptotischen Proteins Bax, sowie eine Herunterregulation von Bcl-2. Zudem induzierte Trichostatin A die proteolytische Aktivierung der Caspasen 3 und 9 [120]. In Kolonkarzinom-Zelllinien ließ sich nach Trichostatin A-Behandlung ebenfalls eine p21^{WAF1/CIP1}-Akkumulation sowie ein G1-Zellzyklusarrest beobachten [121].

Nach Vorinostat-Therapie konnten in Mammakarzinom-Zelllinien ebenfalls erhöhte p21^{WAF1/CIP1}-Spiegel sowie ein G1-Zellzyklusarrest beobachtet werden [122].

Valproinsäure induzierte einen dosisabhängigen Anstieg der Acetylierung von Histon H3, sowie einen G1-Zellzyklusarrest. Zudem inhibierte es die Klonogenität und Wachstum von uvealen Melanomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Ein wesentlicher Einfluss auf die Zellvitalität wurde nicht beobachtet [123].

In Leukämiezellen wurde ein Zusammenhang zwischen einer HDAC-Inhibition und einer TRAIL-induzierten Apoptose sowie einer Herunterregulation von c-FLIP hergestellt, welche nach Aktivierung von Caspase 8, Spaltung von Bid sowie einem Einstrom von mitochondrialen Proteinen ins Zytosol über eine Aktivierung der Caspasen 9 und 3 in eine verstärkte Apoptose mündete [124].

Aufgrund der variablen Wirkung der HDAC-Inhibitoren auf verschiedene HDACs ist es kaum möglich, von den beobachteten Effekten Rückschlüsse auf beteiligte HDACs zu ziehen. Daher wurden mit der Zeit selektivere HDAC-Inhibitoren entwickelt, welche sich spezifisch gegen einzelne Histondeacetylasen richten. PCI-34051 beispielweise hemmt HDAC8 hochselektiv. Es induziert Apoptose in T-Zell-Lymphomzellen [125]. Auch für HDAC6 stehen entsprechende Inhibitoren zur Verfügung [118, 126–128]. Gegen HDAC3 wiederum richtet sich beispielsweise der selektive Inhibitor RGFP966 [129]. An der Entwicklung von Substanzen zur selektiven Hemmung anderer Histondeacetylasen wird derzeit geforscht.

1.7.2 Selektive HDAC6-Inhibitoren

Zur selektiven HDAC6-Inhibition stehen mehrere Substanzen zur Verfügung. Als erster reversibler HDAC6-Inhibitor gilt Tubacin (*tubulin acetylation inducer*), welcher 2003 von Stuart Schreiber's Arbeitsgruppe an der Harvard University entwickelt wurde [130, 131]. Den

Angriffspunkt von Tubacin stellt die C-terminal gelegene Deacetylasedomäne von HDAC6 dar. Es konnte gezeigt werden, dass Tubacin durch HDAC6-Hemmung eine Acetylierung von α -Tubulin bewirkt. Eine Histon-Hyperacetylierung wurde nicht beobachtet [131]. Für Tubacin wurde eine 350-fache Selektivität für HDAC6 im Vergleich zu HDAC1 bestimmt [126]. Für die Lungenkarzinom-Zelllinie A549 wurde eine EC_{50} von 2,5 μ M bestimmt [131]. Da die meisten HDAC-Inhibitoren eine Hochregulation der p21^{WAF1/CIP1}-Expression bewirken, wurden auch nach Tubacin-Behandlung entsprechende Expressionsanalysen durchgeführt. Eine Änderung der p21^{WAF1/CIP1}-Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [132], was die HDAC6-Selektivität von Tubacin unterstreicht. Durch HDAC6-Inhibition mittels Tubacin ließ sich bislang experimentell in verschiedenen Tumoren ein positiver Effekt erzielen. Eine Tubacin-Behandlung von Zelllinien des Multiplen Myeloms führte nach 72 h zu einer deutlichen Wachstumsinhibition, wobei sich zelllinienabhängig eine IC_{50} von 5-20 μ M ergab. Dieser Effekt war auch in chemotherapieresistenten Zelllinien zu beobachten. Interessanterweise konnte für Tubacin in normalen peripheren mononukleären Blutzellen kein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden [132]. In Prostatakarzinom-Zelllinien führte Tubacin zu einer Acetylierung der reduzierenden Enzyme Peroxiredoxin 1 und 2 (Prx 1 und 2). Die Acetylierung bewirkte eine Erhöhung der antioxidativen Aktivität von Prx 1 und 2, was wiederum eine verstärkte Elimination von Hydrogenperoxid (H_2O_2) zur Folge hatte [133]. Auch die Zellmotilität konnte durch Tubacin-Behandlung experimentell beeinflusst werden. Entsprechende Versuche wurden beispielsweise in NIH-3T3-Mäusefibroblasten durchgeführt. Hier führte die HDAC6-Inhibition zu einer deutlichen Reduktion der Zellmotilität. [59].

Die Hydroxamsäure ST-80 stellt einen weiteren HDAC6-selektiven Inhibitor dar. Er wurde von Scott et al. synthetisiert und in humanen Brustkrebs-Zelllinien näher charakterisiert. ST-80 wird in der Literatur als ähnlich selektiv wie Tubacin beschrieben; jedoch soll seine Potenz geringfügig höher sein als die von Tubacin [134]. Im Vergleich mit HDAC1 wies ST-80 hinsichtlich einer Inhibition der Deacetylaseaktivität eine 31-fach höhere Selektivität für HDAC6 auf. Zudem wurde selbst in hohen ST-80-Konzentrationen von 50 μ M eine nur geringe Steigerung der Acetylierung des Histons H4 am Lysinrest 12 beobachtet [134]. In verschiedenen humanen leukämischen Zelllinien konnte für ST-80 eine deutliche α -Tubulin-Acetylierung ab 1 μ M nachgewiesen werden. Zudem wurde in niedrigen mikromolaren Konzentrationen (1 und 5 μ M) nach 48 h ein antiproliferativer Effekt beobachtet. Die Zellvitalität wurde durch ST-80 nur wenig beeinflusst. Hinsichtlich einer Histonacetylierung

konnte nach einer 12-stündigen Inkubation mit ST-80 in einer Konzentration von 1 μM nur ein minimaler Effekt beobachtet werden. Ab 5 μM ST-80 sank die Selektivität für HDAC6 jedoch deutlich, was sich in einer verstärkten Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 äußerte [128]. Ein starker Anstieg der Histon-Hyperacetylierung wurde bei einer Konzentration von 10 μM nach einer Inkubationszeit von 3 h beobachtet. Dieser Effekt hielt bis 72 h nach ST-80-Inkubation an, wobei zeitabhängig ein Abfall der Histonacetylierung beobachtet werden konnte. Wie bei Tubacin wurde nach ST-80-Behandlung in den untersuchten Zelllinien keine Änderung der p21^{WAF1/CIP1}-Expression detektiert [128].

Der HDAC6-selektive Inhibitor Tubastatin A wurde 2010 von Butler et al. publiziert. Wie Tubacin und ST-80 gehört Tubastatin A zu den Hydroxamsäuren. Tubastatin A gilt als bislang selektivster Inhibitor für HDAC6, mit einer 57-fachen Selektivität gegenüber HDAC8 und einer 1000-fachen Selektivität gegenüber den anderen Histondeacetylasen. Für humanes HDAC6-Protein wurde nach Inhibition mit Tubastatin A eine IC₅₀ von 0,015 μM bestimmt [126]. Eine α -Tubulin-Hyperacetylierung wurde ab 2,5 μM beobachtet. Wie bei ST-80 nahm die Selektivität von Tubastatin A mit steigender Konzentration ab, wobei erst ab 10 μM eine leichte Histonacetylierung beobachtet wurde. Experimentell wurde Tubastatin A bereits in Konzentrationen von 5-10 μM zur Prävention der Homocystein-induzierten Neurodegeneration in kortikalen Neuronen eingesetzt [126]. Auch im Mausmodell wurde Tubastatin A im Rahmen eines therapeutischen Ansatzes zur Behandlung der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit bereits erfolgreich ausgetestet [135].

1.7.3 Der Proteasominhibitor Bortezomib

Bortezomib ist ein Proteasominhibitor, welcher reversibel und mit hoher Affinität an das 26S-Proteasom bindet [136, 137]. Im Jahr 2003 wurde Bortezomib als erster Proteasominhibitor für die klinische Anwendung zugelassen [136]. Vor allem für die Behandlung des rezidivierenden Multiplen Myeloms wurde durch Einsatz von Bortezomib ein deutlicher Überlebensvorteil im Vergleich zu der konservativen Therapie mit Dexamethason erzielt [138]. Über eine signifikante inhibitorische Aktivität gegenüber anderen Enzymen ist bislang nicht berichtet worden. Die Zytotoxizität von Bortezomib richtet sich in hohem Maße gegen Tumorzellen, wohingegen normale Zellen weniger beeinflusst werden, was Bortezomib für die klinische Anwendung interessant macht [136, 139]. Ein Beispiel für ein Protein, dessen Abbau durch das Proteasom reguliert wird, ist der kurzlebige Zellzyklusregulator p21^{WAF1/CIP1} [140, 141]. Wird eine Zelle DNA-schädigenden Agenzien wie Doxorubicin ausgesetzt, wird die Genexpression von p21^{WAF1/CIP1} durch das Tumorsuppressorgen p53 induziert, was einen

Zellzyklusarrest und somit eine Wachstumsinhibition zur Folge hat [142, 143]. Eine Induktion von p21^{WAF1/CIP1} ist allerdings auch über andere Faktoren wie zum Beispiel NF-κB möglich [144].

1.7.4 Der HSP90-Inhibitor 17-AAG

17-Allylamino-17-Demethoxy-Geldanamycin (17-AAG) ist ein Derivat der natürlichen Substanz Geldanamycin. 17-AAG bindet mit hoher Affinität an die NH₂-terminale Domäne von HSP90 [75]. Die Bindung von ATP an diese Domäne bewirkt normalerweise eine Formänderung von HSP90, welche eine Interaktion mit dessen Klientproteinen ermöglicht [145]. Durch Bindung von 17-AAG wird diese Interaktion verhindert und HSP90 somit in seiner Funktion eingeschränkt. Da einige dieser Klientproteine in onkogenen Signalwegen von Bedeutung sind, können durch eine HSP90-Inhibition Zellproliferation, Zellvitalität und Motilität negativ beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass die toxische Wirkung von 17-AAG bei verstärkter biologischer Aktivität und Stabilität deutlich geringer ausfällt als die von Geldanamycin, was es für die klinische Anwendung interessant macht [75].

1.7.5 HDAC6-Inhibitoren in Kombinationstherapie

Da HDAC6 mit verschiedenen zytosolischen Proteinen interagiert, kann es sinnvoll sein, die von HDAC6 beeinflussten intrazellulären Prozesse an verschiedenen Stellen zu inhibieren, um synergistische Effekte zu erzielen. Einen solchen Angriffspunkt stellt das Proteasom dar (siehe Abb. 1.5).

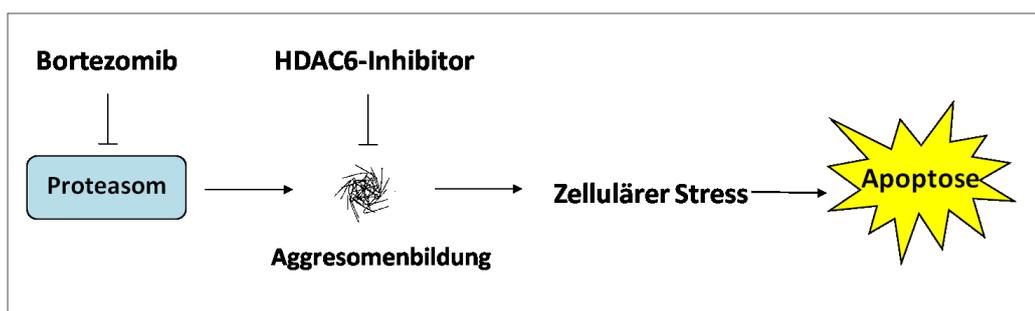


Abb. 1.5: *Auswirkungen einer kombinierten Proteasom- und HDAC6-Inhibition (modifiziert nach [146]). Durch parallele Inhibition des Proteasoms mittels Bortezomib und von HDAC6 kommt es zu einer verstärkten Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen. Diese Akkumulation hat einen vermehrten zellulären Stress zur Folge, welcher letztendlich in die Apoptose der Zelle mündet.*

Da HDAC6 bei Überlastung bzw. Fehlfunktion des Proteasoms eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Aggresomen übernimmt, wurde getestet, ob die Kombination eines HDAC6-selektiven Inhibitors mit einem Proteasominhibitor wie Bortezomib die

zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen steigern kann. Ein synergistischer Effekt der Kombination von Bortezomib mit Tubacin konnte bereits für Multiple Myelomzellen nachgewiesen werden [132]; er beruhte auf einer verstärkten Akkumulation von toxischen Proteinaggregaten.

Da HDAC6 mit dem Chaperon HSP90 interagiert, wurde zudem eine Kombination mit HSP90-Inhibitoren wie 17-AAG ausgetestet. Hier konnte gezeigt werden, dass die durch HDAC6-Inhibition induzierte HSP90-Hyperacetylierung die Bindung von 17-AAG an HSP90 verstärkte [76]. Zudem wurde beobachtet, dass eine Monotherapie mit 17-AAG die HDAC6-Bindung an HSP90 reduzierte und dessen proteasomale Degradation förderte, was HDAC6 als Klientprotein von HSP90 bestätigte. Eine Kombination von 1 μ M 17-AAG und 3 μ M Tubacin führte zu einer deutlich stärkeren Reduktion der Zellvitalität im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien [76].

1.8 Klinische Erprobung von HDAC-Inhibitoren und Kombinationstherapien

Derzeit werden Wirksamkeit und Verträglichkeit von verschiedenen HDAC-Inhibitoren in klinischen Studien getestet. Vorinostat wurde 2006 von der FDA (*Food and Drug Administration*) als erster HDAC-Inhibitor zur klinischen Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen [98]. Momentan laufen Studien bezüglich des Einsatzes von Vorinostat sowohl bei soliden Tumoren als auch bei hämatologischen Erkrankungen. In einer Phase-II-Studie mit 37 AML-Patienten sprach lediglich ein Patient gut auf die Vorinostat-Therapie an [147]. Eine weitere Phase-II-Studie mit Prostatakarzinompatienten musste aufgrund der hohen Toxizität von Vorinostat vorzeitig beendet werden [148]. Hingegen zeigte eine Phase-II-Studie mit Patienten mit Glioblastoma multiforme eine gute Verträglichkeit der Vorinostat-Therapie. Das progressionsfreie Überleben nach 6-monatiger Therapie betrug 15,2 % [149].

Panobinostat hat im Vergleich zu anderen HDAC-Inhibitoren wie Vorinostat und MGCD0103 die höchste inhibitorische Potenz bezüglich Zellproliferation und Vitalität [150]. Panobinostat ist oral verfügbar und wurde in einer Phase-II-Studie bereits erfolgreich bei Patienten mit Hodgkin-Lymphom getestet [151]. Auch bei Patienten mit Myelofibrose konnte ein Ansprechen auf eine Therapie mit Panobinostat beobachtet werden, wobei die Panobinostat-Therapie nur schlecht toleriert wurde [152].

Romidepsin wurde 2009 von der FDA zur Behandlung von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom zugelassen, die zuvor bereits mindestens eine systemische Therapie erhalten hatten. 2011 folgte die Zulassung zur Therapie des peripheren T-Zell-Lymphoms [153]. Weitere Beispiele für derzeit klinisch getestete HDAC-Inhibitoren sind Belinostat [104, 154], Givinostat [155], PCI-24781 [155], Entinostat [113] oder Valproinsäure [108]. Selektive HDAC-Inhibitoren sind hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften noch nicht ausgereift und werden daher gegenwärtig nur experimentell eingesetzt.

Für den HSP90-Inhibitor 17-AAG laufen derzeit unter anderem Phase-II-Studien bei Patienten mit metastasiertem Melanom [156, 157], sowie mit hormonrefraktärem metastasiertem Prostatakarzinom [158].

Der Proteasominhibitor Bortezomib wurde 2003 zur Behandlung des rezidivierenden Multiplen Myeloms bei Patienten mit mindestens zwei vorangegangenen Behandlungen zugelassen. Diese Zulassung wurde 2005 nach Daten der Phase-III-Studie APEX, die einen signifikanten Überlebensvorteil durch Bortezomib im Vergleich zu einer hochdosierten Dexamethason-Behandlung zeigte, auf Rezidivpatienten mit nur einer Vorbehandlung erweitert [138, 159]. Auch für das refraktäre Mantelzelllymphom wurde Bortezomib 2006 als Monotherapie zugelassen [160].

Kombinationstherapien von Bortezomib mit Pan-Inhibitoren wie beispielsweise Vorinostat oder Panobinostat wurden bereits in Phase-I/II-Studien bei Patienten mit refraktärem Multiplem Myelom erfolgreich erprobt [161, 162]. Eine 2013 veröffentlichte Phase-III-Studie mit Patienten mit Multiplem Myelom deutet jedoch darauf hin, dass eine Kombination von Vorinostat und Bortezomib das progressionsfreie Überleben im Vergleich zu einer Monotherapie mit Bortezomib nur geringfügig verlängert [163].

1.9 Ziel der Arbeit

Die Bedeutung von Histondeacetylasen für das Urothelkarzinom ist bislang nur wenig untersucht worden. Daten bezüglich der HDAC6-Expression sind zudem sehr heterogen. Vorarbeiten aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik deuten darauf hin, dass HDAC6 auf mRNA-Ebene in vielen Urothelkarzinom-Zelllinien herunterreguliert ist. Eine im Vergleich zu urothelialen Primärkulturen erhöhte HDAC6-Expression wurde in keiner Zelllinie detektiert. Die Proteinexpression von HDAC6 hingegen war zelllinienabhängig sehr

variabel [164]. In Urothelkarzinomgeweben wurde im Vergleich zu normalen Geweben keine signifikante Veränderung der HDAC6-Expression auf mRNA-Ebene detektiert. Die Auswertung von Microarray-Daten von Lee et al. aus dem Jahr 2010 hingegen ergab eine signifikante Überexpression von HDAC6 in Urothelkarzinomgeweben [165]. Zudem gibt es vielfältige Hinweise, dass HDAC6 allgemein für das Überleben und die Invasivität von Tumorzellen von Bedeutung ist. Da normale Zellen durch ein Fehlen von HDAC6 nur unwesentlich beeinträchtigt werden, scheint eine HDAC6-Inhibition für antitumoröse Therapien besonders interessant.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, HDAC6 im Urothelkarzinom genauer zu charakterisieren und zu untersuchen, welche Bedeutung HDAC6 für Vitalität, Proliferation, Klonogenität und Migration von Urothelkarzinomzellen hat. Hierfür wurden verschiedene Urothelkarzinom-Zelllinien sowie urotheliale Primärkulturen auf mRNA- und Proteinebene hinsichtlich ihrer HDAC6-Expressionsmuster analysiert.

Urothelkarzinom-Zelllinien mit im Vergleich zu urothelialen Primärkulturen erniedrigter, unveränderter und erhöhter HDAC6-Proteinexpression wurden für eine Therapie mit den selektiven HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A, sowie für eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC6 ausgewählt. Mittels HDAC6-Inhibition sowie siRNA-vermittelter Herunterregulation sollte evaluiert werden, ob diese die Vitalität der Zelllinien negativ beeinflussen und inwieweit das HDAC6-Expressionsniveau mit der Sensitivität der Zelllinien für eine HDAC6-Inhibition bzw. für eine siRNA-vermittelte Herunterregulation korreliert. Ein Einfluss von HDAC6 auf die Zellmigration wurde mittels Scratch Assay analysiert. Da in der Literatur für verschiedene Zelllinien synergistische Effekte von Kombinationsbehandlungen von HDAC6-Inhibitoren mit Proteasom- sowie HSP90-Inhibitoren auf die Reduktion der Zellvitalität beschrieben sind, sollte zudem in dieser Arbeit analysiert werden, ob ähnliche Effekte auch bei Urothelkarzinom-Zelllinien beobachtet werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Humane Zelllinien

2.1.1 Humane Urothelkarzinom-Zelllinien

Zur ausführlichen Charakterisierung von HDAC6 und HDAC10 im Urothelkarzinom wurden im Rahmen dieser Arbeit sechzehn humane Urothelkarzinom-Zelllinien analysiert (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Charakteristika der verwendeten Urothelkarzinom-Zelllinien. Ersichtlich sind Tumorstadium, Tumorgrad, Geschlecht und Alter der Patienten, aus denen die Linie angelegt wurde. Die Daten wurden von der Homepage des Leibniz-Instituts DSMZ bezogen sowie aus [166–180].

Blasenkarzinom-Zelllinie	Tumorstadium	Tumorgrad	Ursprung	Geschlecht	Alter des Patienten in Jahren	Referenz

m: männlich; w: weiblich

Die Urothelkarzinom-Zelllinien wurden von Dr. M. A. Knowles, ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds, UK, sowie von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, USA, über Herrn Prof. Dr. Schmitz-Dräger zur Verfügung gestellt und deren Identität von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) überprüft. Die Zelllinien wurden STR-typisiert und regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination überprüft.

2.1.2 Urotheliale Primärkulturen

Urotheliale Primärkulturen (UPs) wurden wie von Southgate et al. [181] beschrieben und mit den Modifikationen nach Swiatkowski [182] aus den Harnleitern nephrektomierter Patienten angelegt, die durch die Urologische Klinik zur Verfügung gestellt wurden. Aus diesen Kulturen gingen jeweils proliferierende Zellen uroepithelialen Ursprungs hervor.

2.2 Gewebeproben

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben stammten aus der Gewebebank der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (siehe Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3). Das Einverständnis der Patienten wurde vor Gewebeentnahme mittels Formblatt eingeholt. Ein entsprechendes Votum der Ethikkommission liegt vor (Studennummer 3683).

Tabelle 2.2: Charakteristika der verwendeten Blasennormalgewebe. Ersichtlich sind Geschlecht und Alter der Patienten.

Blasennormalgewebe	Geschlecht	Alter in Jahren

m: männlich; w: weiblich

-
- DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
 - Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
 - dNTP-Mix Fermentas St. Leon-Rot
 - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Invitrogen Karlsruhe
 - Ethanol Merck Darmstadt
 - Fötales Kälberserum Biowest Nuaille, Frankreich
 - Gener Ruler 100 bp Plus DNA Ladder Fermentas St. Leon-Rot
 - Glycerol Merck Darmstadt
 - Glycin Merck Darmstadt
 - HEPES Roth Karlsruhe
 - Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent Invitrogen Karlsruhe
 - Magermilchpulver Neuform Lüneburg
 - Methanol Merck Darmstadt
 - Opti-MEM Invitrogen Karlsruhe
 - Page Ruler Prestained Protein Ladder Fermentas St. Leon-Rot
 - PBS-Lösung Biochrom Berlin
 - Phosphataseinhibitor-Cocktail 3 Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
 - Propidiumjodid Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
 - Proteaseinhibitor-Cocktail Sigma-Aldrich Chemie Steinheim
 - Protein-Auftragspuffer Fermentas St. Leon-Rot
 - 10 x PCR-Puffer Qiagen Hilden
 - Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1) Roth Karlsruhe

-
- | | | |
|---------------------------------------|----------------------|------------------|
| • SAHA | Cayman | Michigan, USA |
| • SDS ultra pure | Roth | Karlsruhe |
| • 50 x TAE-Puffer | S-Prime | Hamburg |
| • TEMED | Sigma-Aldrich Chemie | Steinheim |
| • Tris Base | Merck | Darmstadt |
| • Triton-X-100 | Fluka | Deisenhofen |
| • Trizol Reagent | Invitrogen | Karlsruhe |
| • Trypsin/EDTA | Invitrogen | Karlsruhe |
| • Tubacin | Enzo Life Sciences | Lörrach |
| • Tubastatin A
Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie | Steinheim |
| • Tween 20 | Serva | Heidelberg |
| • 5 x Universal siMAX
siRNA Buffer | Eurofins MGW Operon | Ebersberg |
| • Vectashield Mounting
Medium | Vector Laboratories | Burlingame (USA) |

Verbrauchskemikalien wurden von Merck und Sigma käuflich erworben. Der HDAC6-Inhibitor ST-80 wurde uns von Prof. Dr. M. Jung aus dem Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg zur Verfügung gestellt.

2.4 Enzyme

- | | | |
|-------------------------------|--------|--------|
| • HotStart Taq-DNA-Polymerase | Qiagen | Hilden |
|-------------------------------|--------|--------|

2.5 Molekularbiologische Kits

- | | | |
|---|--------------|---------|
| • BCA™ Protein Assay | Pierce | Bonn |
| • ECL™ Advanced Western
Blotting Detection Kit | Amersham, GE | München |

- CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Promega Mannheim
- QuantiTect® Reverse Transcription Kit Qiagen Hilden
- QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit Qiagen Hilden
- RNeasy® Mini Kit Qiagen Hilden

2.6 Verwendete Oligonukleotide und siRNAs

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Primer und Primerassays.

Gen	Produkt-bezeichnung	Sequenz 5'–3'	Hersteller
HDAC6	QuantiTect Primer Assay (#QT00002709)	-	Qiagen
HDAC10	QuantiTect Primer Assay (#QT00007252)	-	Qiagen
TBP fwd	-	ACAACAGCCTGCCACCTTA	-
TBP rev	-	GAATAGGCTGTGGGTCAGT	-

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten siRNAs.

Gen	Produkt-bezeichnung	Sequenz 5'–3'	Hersteller
HDAC6	ON-TARGET ^{plus} SMARTpool siRNA (#J-003499-08-005)	GUUCACAGCCUAGAAUUA	Thermo Scientific Dharmacon
Negativ-kontrolle	ON-TARGET ^{plus} Non-targeting Pool (#D001810-10-05)	unbekannt	Thermo Scientific Dharmacon

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

Table 2.6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.

Spezifität	Wirt	Hersteller	Blockieren	Verwendung
α -Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:50 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT
acetyliertes α -Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:17 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT
acetyliertes Histon H3	Kaninchen	Active Motif	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:2000 in 5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T, 4 °C über Nacht
E2F1	Maus	Santa Cruz	3 % Magermilchpulver + 1 % BSA in 0,1 % TBS-T	WB: 1:500 in 3 % Magermilchpulver + 1 % BSA in 0,1 % TBS-T, 4 °C über Nacht
FLIP	Maus	Enzo Life Sciences	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:1000 in 5 % Magermilchpulver, 4°C über Nacht
GAPDH	Maus	Abcam	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:20 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT
HDAC6	Kaninchen	Santa Cruz	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:5000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T; 4 °C über Nacht IC: 1:100 in 1 % BSA in PBS, 1 h bei RT
HDAC10	Maus	Santa Cruz	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:500 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T; 4 °C über Nacht
Histon H3	Maus	CellSignaling	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	WB: 1:1000 in 5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T, 4 °C über Nacht
HSP70	Kaninchen	Upstate	3 % Magermilchpulver + 1 % BSA in 0,1 % TBS-T	WB: 1:1000 in 3 % Magermilchpulver + 1 % BSA in 0,05 % TBS-T; 4 °C über Nacht
p21	Maus	BD Pharmingen	4 % BSA in 0,1 % TBS-T	WB: 1:1000 in 4 % BSA in 0,1 % TBS-T, 4 °C über Nacht
PARP	Kaninchen	CellSignaling	5 % BSA in 0,1 % TBS-T	WB: 1:1000 in 5 % BSA in 0,1 % TBS-T, 4 °C über Nacht
Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	CellSignaling	5 % BSA in 0,1 % TBS-T	WB: 1:1000 in 5 % BSA in 0,1 % TBS-T, 4 °C über Nacht

IC: Immunzytochemie; WB: Western Blot

2.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.7: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.

Spezifität	Wirt	Hersteller	Verwendung
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Santa Cruz	WB acetyliertes Histon H3: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB HDAC6: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB HSP70: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB PARP: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204): 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT
Anti-Maus-HRP	Ziege	Santa Cruz	WB α -Tubulin: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB acetyliertes α -Tubulin: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB E2F1: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB FLIP: 1:100 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 ½ h bei RT WB GAPDH: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB HDAC10: 1:100 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB Histon H3: 1:200 000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBS-T, 1 h bei RT WB p21: 1:200 000 in 4 % BSA in 0,1 % TBS-T, 1 h bei RT

HRP: horseradish peroxidase; RT: Raumtemperatur; WB: Western Blot

2.8 Medien, Puffer und Lösungen

2.8.1 Standardlösungen

Ethidiumbromid-Lösung 0,5 mg/ml Ethidiumbromid

TE-Puffer 10 mM Tris/HCL pH 7,4
 1 mM EDTA pH 8,0

2.8.2 Lösungen Western-Blot

Blockieren	5 % Magermilchpulver in 0,1 % TBS-T	
10 x Elektrophoresepuffer	30,3 g	Tris Base
	133 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 L	
6 x Laemmli-Puffer	350 mM	Tris, pH 6,8
	350 mM	SDS
	30 %	Glycerol
	3,3 %	DTT
	1,2 mg	Bromphenolblau
Protein-Lysis-Puffer, „Ripa-Art“, pH 7,6	150 mM	NaCl
	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Desoxycholat
	1 %	NP-40
	0,1 %	SDS
	1 mM	EDTA
	50 mM	Tris (pH 7,6)
	1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail pro 10 ml (Zugabe vor Gebrauch)	
	Lagerung bei -20 °C	
Milder Stripping Buffer	1,5 %	Glycin
	0,1 %	SDS
	1 %	Tween 20
Sammelgel	1,4 ml	dH ₂ O
	0,25 ml	30%iges Acrylamid
	0,25 ml	1 M Tris (pH 6,8)
	20 µl	10%iges SDS
	20 µl	10%iges Ammoniumpersulfat
	2 µl	TEMED
SDS-Laufpuffer (Pierce)	100 mM	Tris
	100 mM	HEPES
	3 mM	SDS
	pH 8	
10 x TBS	12,11 g	Tris

	87,7 g	NaCl
	ad 1000 ml	dH ₂ O
	pH 7,4	
10 x Transferpuffer	6,06 g	Tris
	28,8 g	Glycin
	400 ml	Methanol
	ad 2 L	
Trenngel	1,1 ml	dH ₂ O
	2,5 ml	30%iges Acrylamid
	1,3 ml	1,5 M Tris (pH 6,8)
	50 µl	10%iges SDS
	50 µl	10%iges Ammoniumpersulfat
	2 µl	TEMED
5 x Western-Blot-Puffer	24,4 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	pH 8,3	
1 x Western-Blot-Puffer	200 ml	5 x Blotpuffer
	10 %	Ethanol
	ad 1000 ml	dH ₂ O
Waschpuffer	0,1 % Tween 20 in 1 x TBS	

2.8.3 Puffer für FACS-Analyse

Nicoletti-Puffer	0,1 %	Natriumcitrat
	0,1 %	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumjodid
Propidiumjodid-Lösung	2 µg/ml Propidiumjodid in PBS	

2.9 Laborgeräte

- ABI 7900HT Applied Biosystems Darmstadt
- Agilent Chip Agilent Technologies Waldbronn
- Blotkammer Biorad München
- Brutschrank, Typ B5061 Heraeus Hanau
- Centrifuge 5415D Eppendorf Hamburg
- Centrifuge 5810 Eppendorf Hamburg

-
- Coulter Allegra 212 Beckmann Krefeld
Centrifuge
 - Curix 60, Filmentwickler AGFA Köln
 - Elektrophoresekammer Biometra, Biorad Göttingen, München
 - ELISA Easy Reader SLT-Labinstruments Österreich
EAR 400 AT
 - Durchflusszytometer Becton Dickinson Heidelberg
FACS Scan
 - Lichtmikroskop, Leitz Wetzlar
Dialux 22EB
 - MS2 Minishaker IKA IKA Labortechniken Staufen
 - Mini-Zentrifuge 5415D Eppendorf Hamburg
 - Multipipette Eppendorf Hamburg
 - Nanodrop ND-1000 NanoDrop Technologies Wilmington, USA
 - Nikon Eclipse 400 Nikon Düsseldorf
 - pH-Meter WTW Weilheim
 - Roller SRT1 Stuart Scientific Manchester, UK
 - SDS-Page Whatman Maidstone, UK
Gelelektrophoreseapparatur
 - Thermomixer Eppendorf Hamburg
 - TRIO Thermoblock Biometra Göttingen
 - Roller SRT1 Stuart Scientific Manchester, UK
 - Wasserbad 1083 GFL Burgwedel
 - Victor 1420 Multilabel Wallac Turku, Finland
Counter
 - Zellkulturwerkbank Gelaire Meckenheim
 - Zentrifugen Avanti™30/Allegra 21R Beckman Coulter

2.10 Verbrauchsmaterialien

- Hyperfilm ECL Amersham Pharmacia Freiburg
- Immobilon™-P Millipore Bedford, USA
- Mini-PROTEAN TGX BioRad München
Precast Gel
- PVDF-Membran Millipore Eschborn
- Whatman Filterpapier Whatman Maidstone, UK
- Zellkulturflaschen 75 cm² Greiner Frickenhausen
- Zellkulturflaschen 25 cm² Greiner Frickenhausen
- Zellkulturtestplatten Greiner Frickenhausen
96-Loch Flachboden, klar

2.11 Software

2.11.1 Programme

- CellQuest Software, Becton Dickinson, Heidelberg
- Image J, National Institutes of Health, Bethesda, USA
- Lucia G Version 4.80, Laboratory Imaging s.r.o., Prag, CZ
- NIS-Elements D2-30, Nikon
- SigmaPlot 12, Systat Software Inc., San Jose, USA
- Zotero 4.0, George Mason University, Fairfax, USA

2.11.2 Datenbanken

- <http://www.ensembl.org>
- <http://expasy.org>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- <http://www.dsmz.de>

2.12 Kultivierung und Passagieren der Urothelkarzinomzellen

Zur Kultivierung der Urothelkarzinom-Zelllinien diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), welches mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde. Die Zellen wurden mit je 12 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Wasserdampfsättigung in 75 cm²-Zellkulturflaschen inkubiert. Zum Passagieren wurden die Zelllinien nach Absaugen des Mediums mit je 2 ml 0,25%igem Trypsin/EDTA pro 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C inkubiert, um eine Ablösung von der Gefäßwand zu ermöglichen. Nach Ablösung wurde 4 ml Medium hinzugefügt, resuspendiert und die Suspension anteilig in ein neues Gefäß überführt.

2.12.1 Zellzählung

Die anschließende Zellzählung erfolgte manuell mittels Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden pro Zelllinie 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau (0,25 %) versetzt, um abgestorbene Zellen zu erkennen. Von dieser Suspension wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert und mikroskopisch drei große Quadrate ausgezählt. Aus den ermittelten Zellzahlen pro Quadrat wurde der Mittelwert gebildet, welcher anschließend zur Ermittlung der Gesamtzellzahl pro Milliliter verwendet wurde.

$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert der ermittelten Zellzahlen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnung} \times 10\,000$
--

2.12.2 Kryokonservierung und Reaktivierung der Urothelkarzinom-Zelllinien

Die für die Kryokonservierung bestimmten Zellen wurden zunächst für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. Um eine Penetration des DMSO in die Zellen zu ermöglichen, wurden diese für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 24-stündige Lagerung bei -20 °C. Die Langzeitlagerung erfolgte in Stickstoff.

Zur Reaktivierung wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen möglichst kurz in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert und der DMSO-haltige Überstand abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und mehrere Tage unter Standardbedingungen kultiviert.

Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden die Zellen nach jedem Auftauen mittels PCR auf Mykoplasmen getestet.

2.12.3 Mykoplasmentest

Für den Mykoplasmentest wurden nach mehrtägigem adhärentem Zellwachstum pro Zellkulturflasche 250 μl Überstand entnommen und erhitzt. Für die PCR-Reaktion wurden 2 μl der jeweiligen Probe eingesetzt. H_2O diente als Negativkontrolle. Die Positivkontrolle wurde in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die PCR ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (siehe Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: **Reaktionsansatz für die Mykoplasmen-PCR.** Das Gesamtvolumen pro Ansatz beträgt 50 μl . Pro PCR werden 34 Zyklen durchlaufen.

Komponente	Volumen pro Ansatz in μl
H_2O	39,3
10 x Puffer Qiagen	5
Primermix 3' (5 μM)	1
Primermix 5' (5 μM)	1
dNTPs (10 mM)	0,5
Interne Kontrolle 1: 40 000	1
HotStart Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,2
Probe	2
Gesamtvolumen	50

Der anschließende PCR-Lauf wurde unter den in der Tabelle aufgeführten Bedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: **Bedingungen eines PCR-Zyklus.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte eines PCR-Zyklus mit Temperatur, Dauer und der jeweiligen Funktion.

Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit	Funktion
95	15 min	DNA-Denaturierung
94	30 sec	DNA-Denaturierung
65	45 sec	Annealing der Primer an die DNA
72	1 min	Elongation
72	10 min	
4	∞	Stop

} 34 Zyklen

Im Anschluss an die PCR erfolgte die Auftragung auf ein 1%iges Agarosegel mit anschließender Gelelektrophorese. Die auf Mykoplasmen hinweisende Bande besitzt eine Größe von 265 bis 278 bp.

2.12.4 Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Inhibitoren

Die medikamentöse Behandlung der Zelllinien erfolgte einmalig 24 h nach Aussaat. Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittel für alle eingesetzten Inhibitoren. Die Konzentrationen der Stocklösungen betragen 13,9 mM (Tubacin), 50 mM (ST-80), 26,9 mM (Tubastatin A), 17,1 mM (17-AAG), 200,2 mM (Bortezomib) und 10 mM (SAHA). Für die Experimente wurde die jeweilige Substanz mit der entsprechenden Menge *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Der Histondeacetylase-6-Inhibitor Tubacin wurde in Konzentrationen von 0,5 μM bis 10 μM eingesetzt. Analog erfolgte die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren Tubastatin A Hydrochlorid und ST-80 in Konzentrationen von 0,05 μM bis 10 μM bzw. 0,1 μM bis 100 μM . Neben den HDAC6-Inhibitoren wurden die Zellen außerdem mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG und dem Proteasominhibitor Bortezomib in Konzentrationen von 0,01 μM bis 10 μM sowie von 1 nM bis 1 μM behandelt. Bei den Vitalitätstests wurde als Positivkontrolle der Pan-HDAC-Inhibitor Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, bei der er stark zytotoxisch wirkt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO eingesetzt.

Um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die Experimente zwei- bis dreimal wiederholt. Für jeden einzelnen Ansatz wurden Vierfachwerte gewählt.

2.13 Präparation von Nukleinsäuren aus humanen Zellen

2.13.1 RNA-Extraktion aus humanen Zellen mittels Trizol-Reagenz

Um die gesamte RNA inklusive der microRNAs isolieren zu können, wurde eine Präparation der RNA aus den Urothelkarzinom-Zelllinien mittels Trizol-Reagenz des Herstellers Invitrogen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen bis zur gewünschten Konfluenz in 10 cm^2 -Zellkulturschalen kultiviert. Nach Absaugen des Mediums erfolgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit 2 ml kaltem PBS pro Schale. Für die Zellyse wurden die Zellen mit 1 ml Trizol pro 10 cm^2 - Schale für 5 min inkubiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgesäß pipettiert und resuspendiert. Zu dem Lysat wurde pro 1 ml Trizol 200 μl Chloroform hinzugegeben, das Reaktionsgefäß 5 sec gevortext und anschließend für ca. 15 sec kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 10.000 g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert, um eine Phasenseparation zu ermöglichen. Die

entstehende obere wässrige Phase mit der RNA wurde nach der Zentrifugation in ein neues Eppendorfggefäß überführt und mit 2-fachem Volumen 100%igem Ethanol pro 1 ml Trizol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 g bei 4 °C für 10 min. Der hierbei entstehende Überstand wurde abgekippt und das übrig gebliebene RNA-Präzipitat mit 250 µl 75%igem Ethanol pro 1 ml Trizol gewaschen. Anschließend wurde eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 4 °C bei 7500 g durchgeführt und der Überstand mittels Pipette möglichst vollständig entfernt. Das verbleibende Pellet wurde für 10 min im Heizblock getrocknet. Eine vollständige Austrocknung wurde hierbei vermieden, um ein Ablösen des Pellets vom Boden des Greiner-Röhrchens zu verhindern. Im letzten Schritt wurde das Pellet mit 20 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -70 °C.

2.13.2 RNA-Extraktion aus humanen Zellen mittels RNeasy Mini-Kit

War keine Isolation der microRNAs erforderlich, wurde die Isolation mit dem RNeasy Mini Kit des Herstellers Qiagen durchgeführt, welches Nukleinsäuren ab einer Länge von 200 Nukleotiden zu extrahieren vermag. Zur Zelllyse wurde der dem Kit zugehörige RTL-Puffer verwendet. Die Weiterbehandlung erfolgte nach Herstellerangaben. Als Elutionsvolumen wurden 30 µl RNase-freies Wasser gewählt.

2.13.3 Ermittlung der RNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde ein Nanodrop-Gerät verwendet. Parallel wurde die optische Dichte (OD) bei 280 und 260 nm gemessen, um die Nukleinsäuren auf Proteinkontamination untersuchen zu können. Eine Wellenlänge von 260 nm stellt das Absorptionsmaximum für RNA dar, wohingegen Proteine ein Maximum von 280 nm besitzen. Durch Bildung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} kann somit auf die Reinheit der Nukleinsäuren geschlossen werden, welcher bei geringer Kontamination zwischen 1,8 und 2,1 liegt. Für die Messung wurde jeweils 1 µl RNA-Lysat aufgetragen. Als Leerwert diente Aqua dest.

2.14 RT-PCR

2.14.1 Reverse Transkription mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit

Bei der Reversen Transkription erfolgt die Umwandlung von RNA zu cDNA mittels Reverser Transkriptase. Für die Reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit

des Herstellers Qiagen verwendet. Es wurden 1 µg RNA eingesetzt. Ein DNase-Verdau kontaminierender genomischer DNA wurde mit dem im Kit enthaltenen *gDNA Wipeout Buffer* durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach Herstellerangaben. Für die cDNA-Synthese wurde eine Inkubationszeit von 30 min bei 42 °C gewählt.

2.14.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) erfolgt eine Amplifikation mit gleichzeitiger Quantifizierung ausgewählter DNA-Abschnitte in Echtzeit, also während der PCR-Reaktion. Die Vervielfältigung der DNA wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase, katalysiert. Als Startpunkte für die Polymerase dienen synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer. Diese sind komplementär zu den DNA-Abschnitten, welche den zu amplifizierenden Bereich begrenzen, und ermöglichen der Polymerase eine Synthetisierung komplementärer DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung.

Ein PCR-Zyklus besteht aus den Schritten Denaturierung, Annealing der Oligonukleotid-Primer und der Elongation des Tochterstrangs (siehe Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: PCR-Bedingungen während eines Zyklus.

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	15 sec
Annealing	55 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec

} 45 Zyklen

Die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Abschnitte wird durch einen in die doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht, in dieser Arbeit SYBRGreen des Herstellers Qiagen. Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Hierbei steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur amplifizierten DNA-Menge an. SYBRGreen besitzt eine Anregungswellenlänge von 494 nm sowie eine Emissionswellenlänge von 521 nm. Die Messungen erfolgten in Mikrotiterplatten am ABI 7900HT.

Der zeitliche Ablauf einer Real-Time-PCR wird graphisch in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt, wobei die Abszisse die Zyklenanzahl und die Ordinate die Fluoreszenzintensität angibt. Die PCR-Kurve beginnt mit einer Darstellung der

Grundfluoreszenz. Es folgt die exponentielle Wachstumsphase mit Quantifizierung der jeweiligen PCR-Produkte. Durch zunehmende PCR-Produkt-Anzahl und Erschöpfung von Nukleotiden und Primern kommt es nach einer gewissen Zyklenanzahl zu einer Plateaubildung. Die Hintergrundfluoreszenz wird zur Festlegung einer sogenannten Basislinie oder „*threshold*“ genutzt. Unterhalb dieser Linie ist die Fluoreszenz der Reaktion nicht von der Hintergrundfluoreszenz des Farbstoffs zu unterscheiden. Je nach DNA-Gehalt ist eine unterschiedliche Anzahl PCR-Zyklen nötig, um die Intensität der Fluoreszenz so zu steigern, dass der Schwellenwert überschritten wird. Bei hohem Ausgangswert des gesuchten PCR-Produktes werden dementsprechend nur wenige Zyklen bis zur *threshold*-Überschreitung benötigt. Dieser Schnittpunkt von Basislinie und PCR-Kurve wird als CT-Wert („*threshold-cycle*“) bezeichnet [183]. Am Ende der PCR folgt eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die DNA durch kontinuierliche, langsame Temperaturerhöhung von 50 °C auf 95 °C aufgeschmolzen wird. Die Doppelstrangstruktur der jeweiligen DNA-Fragmente denaturiert hierbei bei einer für sie spezifischen Schmelztemperatur. Die DNA-Aufschmelzung wird von einer kontinuierlichen Fluoreszenzmessung begleitet. Bei Entstehung von zwei DNA-Einzelsträngen wird SYBRGreen I freigesetzt, was eine Fluoreszenzabnahme zur Folge hat. Eine Unterscheidung zwischen spezifischen PCR-Produkten und unspezifischen Primerdimeren wird durch deren unterschiedliche Schmelzpunkte ermöglicht, welche je nach Produktgröße variieren. Das zu detektierende Produkt stellt sich als scharfer *Peak* dar, wobei mit steigender Produktmenge die Amplitude des *Peaks* zunimmt.

Die qRT-PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit des Herstellers Qiagen durchgeführt. Für den Nachweis von HDAC6 und HDAC10 wurde ein entsprechender QuantiTect Primer Assay desselben Herstellers verwendet. Als Referenzgen diente das TATA-Box-bindende Protein (TBP). Dieses wurde mit eigens synthetisierten *forward*- und *reverse-Primern* nachgewiesen. Zunächst wurde ein Mastermix mit den qRT-PCR-Komponenten hergestellt (siehe Tabelle 2.11 und Tabelle 2.12) und jeweils 24 µl pro Vertiefung in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde die cDNA hinzugegeben.

Tabelle 2.11: **Komponenten der qRT-PCR zum Nachweis von HDAC6 und HDAC10 mittels QuantiTect Primer Assay.**

Komponente	Volumen
2 x QuantiTect SYBRGreen PCR Master Mix	12,5 µl
10 x QuantiTect Primer Assay	2,5 µl
dH ₂ O	9 µl
cDNA 1:10	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 2.12: **Komponenten der qRT-PCR zum Nachweis von TBP.**

Komponente	Volumen
2 x QuantiTect SYBRGreen PCR Master Mix	12,5 µl
Primer F (100 µM)	0,1 µl
Primer R (100 µM)	0,1 µl
dH ₂ O	11,3 µl
cDNA 1:10	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Für jede Messung wurden Zweifachwerte angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde vermischt und für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Bestimmung der CT-Werte wurde die relative Genexpression durch das Verhältnis von Zielgen zu Haushaltsgen bestimmt.

2.15 Proteinanalyse-Verfahren

2.15.1 Herstellung von Proteinlysaten für die SDS-Gelelektrophorese

Zur Präparation von Proteinlysaten wurden die Urothelkarzinomzellen zunächst in 10 cm-Schalen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl RIPA-Puffer inklusive 10 µl/ml Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) und 10 µl/ml Phosphataseinhibitor-Cocktail 3 (Sigma-Aldrich) 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Homogenisierung der Zellen mithilfe einer 20 G-Kanüle wurde das Lysat für 10 min bei

13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der hierdurch gewonnene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren. Das durch die Zentrifugation entstandene Pellet wurde verworfen.

2.15.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Messung des Proteingehaltes der isolierten Proteine erfolgte mit dem Pierce BCATM Protein Assay Kit mittels der kolorimetrischen Methode nach Bradford. Hierbei macht man sich zunutze, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250 (CBBG) in saurer Lösung an basische und aromatische Aminosäurereste, insbesondere Arginin, bindet. Durch diese Bindung verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs, was einen Farbumschlag zur Folge hat. Während die ungebundene kationische Form eine maximale Absorption bei ca. 465 nm aufweist, wird durch die Proteinbindung und der hierdurch folgenden Deprotonierung ein Absorptionsmaximum von 595 nm erreicht. Diese Absorption kann photometrisch gemessen werden und ist abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration.

Als Standard diente in RIPA-Puffer verdünntes Rinder-Serumalbumin (BSA). Die Stammlösung lag in einer Konzentration von 2 mg/ml vor. Aus dieser wurde eine Standardreihe in Konzentrationen von 2 mg/ml bis 32 µg/ml hergestellt. Die Proteinproben wurden zunächst entsprechend des zu erwartenden Proteingehaltes verdünnt und 10 µl von jedem Proteinlysate als Doppelwert in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Gemäß Herstellerangaben wurden anschließend 200 µl der in einem Verhältnis von 50:1 vermischten Reagenzien A und B in jede Vertiefung gegeben und die Mikrotiterplatte bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Absorptionsbestimmung mittels ELISA-Reader.

2.15.3 Western-Blot

2.15.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in vertikalen Gelkammern mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-Page*). SDS bindet an Aminosäurereste der Proteine. Hierdurch werden die Proteine denaturiert und deren Ladungen überdeckt, so dass eine alleinige Auftrennung nach Proteingröße möglich wird. Der negativ geladene SDS-Protein-Komplex wandert im elektrischen Feld zum Pluspol, der Anode, wobei kleine Proteine aufgrund des Molekularsiebeecktes eine kürzere Wanderungsstrecke aufweisen als größere Proteine.

Für die Elektrophorese wurden Fertiggele des Herstellers BioRad verwendet, welche aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammengesetzt sind. Die Auftrennung niedermolekularer Proteine erfolgte mit selbst gegossenen 15%igen Gelen (siehe Tabelle 2.13). TEMED wurde bei der Herstellung von Sammel- und Trenngel jeweils als letztes hinzugesetzt, da nach Zugabe von TEMED zeitnah die Polymerisation beginnt. Für die Herstellung der Gele wurde eine Gießvorrichtung des Herstellers BioRad verwendet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 100%igem Ethanol überschichtet. Anschließend erfolgte eine Polymerisation für 30 min bei Raumtemperatur, bevor das Ethanol abgegossen und Sammelgel auf das angetrocknete Trenngel pipettiert wurde. In das Sammelgel wurde ein Probenkamm gesteckt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 15 min konnte das Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des 5%igen Sammelgels und des 15%igen Trenngels für die Western-Blot-Analyse.

Chemikalien	Sammelgel 5 %	Trenngel 15 %
H ₂ O	1,4 ml	1,1 ml
30 % Acrylamid	0,25 ml	2,5 ml
1.0 M Tris pH 6,8	0,25 ml	-
1.5 M Tris pH 8,8	-	1,3 ml
10 % SDS	0,02 ml	0,05 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,02 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml

Für die Elektrophorese wurden je nach erwartetem Proteingehalt 10 bis 30 µg Protein pro Probe eingesetzt, welche mit einem entsprechenden Volumen 6 x Laemmli-Probenpuffer und RIPA-Puffer versetzt wurden. Dabei dienten 10 µl Prestained Protein Ladder (Fermentas) als Größenstandard. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 bis 150 V für ca. 60 bis 80 min auf Eis.

2.15.3.2 Blotting

Durch Elektrotransfer wurden die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Diese wurde zuvor für 5 min mit 100%igem Methanol inkubiert, um die Proteinbindungsstellen der Membran zu aktivieren. Das anschließende Blotten erfolgte in Blotting Puffer bei 180 mA für 60 bis

95 min auf Eis. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran je nach Primärantikörper mit Magermilch oder BSA inkubiert, welches in TBS mit 0,1 % Tween 20 gelöst war. Die Inkubationszeit betrug mindestens 1 Stunde auf dem Schüttler, um ein Blockieren unspezifischer Bindungsstellen zu ermöglichen. Nach dem Blocken wurde die Membran mit einem spezifischen Primärantikörper schüttelnd inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern folgte ein dreimaliges Waschen der Membran auf dem Schüttler in 0,1 % TBS-T für die Dauer von jeweils 10 min. Anschließend wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach einstündiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde erneut dreimal für jeweils 10 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen.

Die Antikörper-spezifischen Verdünnungen und Inkubationszeiten sind den Tabellen in Abschnitt 2.7 zu entnehmen.

2.15.3.3 Immundetektion

Die Immundetektion erfolgte mit dem ECLTM Advanced Western Blotting Detection Kit von GE Healthcare. Hierfür wurden je 300 µl der Reagenzien A und B miteinander vermischt und die Membran 30 sec darin inkubiert. Danach folgte die luftblasenfreie Verpackung in einer Filmkassette mit anschließender Exposition gegen Chemolumineszenzfilme in der Dunkelkammer. Die Belichtungsdauer lag je nach Signalstärke des Antikörpers zwischen 5 sec und 30 min. Entwicklung und Fixierung erfolgten mittels Entwicklermaschine.

2.15.3.4 Stripping der Western-Blot-Membranen

Um Proteine ähnlicher Größe auf der Membran darstellen zu können, musste die Membran von den jeweils zuvor gebundenen Antikörpern gereinigt werden. Hierfür wurde die Membran zweimal 10 min lang in einer „milden Stripping-Lösung“ inkubiert, wobei die Stripping-Lösung für die zweite Inkubation ausgewechselt wurde. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 0,1%igem TBS-T-Puffer für eine Dauer von jeweils 10 min. Die gestrippte Membran wurde dann erneut blockiert und mit einem neuen Primärantikörper inkubiert.

2.16 Immunzytochemie

Mithilfe der immunzytochemischen Analyse kann die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben bestimmt werden. Hierbei bindet ein Primärantikörper

spezifisch an ein Epitop des gesuchten Proteins. An diesen bindet wiederum ein Sekundärantikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und unter dem Mikroskop sichtbar wird.

2.16.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurden die Zellen auf autoklavierten Deckgläschen in einem 6-Well-Format in einer Zellzahl von 250 000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wuchsen über Nacht adhärent an.

2.16.2 Immunzytochemische Färbung

Am nächsten Tag wurden die auf den Deckgläschen angewachsenen Zellen einmalig mit PBS gewaschen und mit 4%igem Formaldehyd fixiert, welches zuvor in PBS entsprechend verdünnt worden war. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde das Formaldehyd wieder abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Permeabilisierung der Zellmembran mittels dreiminütiger Inkubation mit 0,5%igem Triton-X-100. Dieses wurde anschließend in einem zweifachen Waschschrift mit PBS entfernt. Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen nach dem Waschen für mindestens 30 min in 1%igem BSA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pro Deckglas mit 50 µl Primärantikörperlösung versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der HDAC6-Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die nach Ablauf der Inkubationszeit noch ungebundenen Antikörper wurden in einem dreifachen Waschschrift mit PBS entfernt. Nach dem Waschen folgte die Inkubation mit einem Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Sekundärantikörper. Parallel dazu wurde mit TRITC-Phalloidin inkubiert, um eine F-Aktin-Färbung zu ermöglichen. Die Sekundärantikörper wurden zuvor in 1%igem BSA verdünnt. Der FITC-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 und TRITC-Phalloidin in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, wobei das Gesamtvolumen der Antikörperlösung 50 µl betrug. Die Inkubation erfolgte 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut dreifach mit PBS gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation im Dunkeln mit DAPI-Lösung, um die DNA der Zellen anzufärben. Die Stockkonzentration der DAPI-Lösung (1 mg/ml) wurde hierfür 1:1000 verdünnt. Daraufhin wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Antrocknen der Deckgläschen wurden diese in Vectashield luftblasenfrei auf Objektträger eingedeckelt und fixiert. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Nikon Eclipse 400 und der Software NIS-Elements D2-30.

2.17 siRNA-Transfektion

Mittels Transfektion ist ein Einschleusen von Nukleinsäuren in ausgewählte Zellen möglich. Für die Transfektion wurde eine HDAC6-spezifische ON-TARGET_{plus} SMARTpool siRNA von Thermo Scientific Dharmacon verwendet, welche laut Herstellerangaben eine Inhibition von mindestens 75 % auf mRNA-Ebene aufweist. Die Aufbereitung der siRNA erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Stocklösung wurde eine Konzentration von 20 µM gewählt. Als Negativkontrolle diente ein ON-TARGET_{plus} Non-targeting Control Pool, welche ebenfalls von Thermo Scientific Dharmacon bezogen wurde. Diese wurden in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt.

Transfiziert wurde mit Hilfe des RNAiMAX Lipofectamins, welches von dem Hersteller Invitrogen bezogen wurde. Durch Vermengung des Lipofectamins mit der siRNA bilden sich Komplexe aus den im Lipofectamin enthaltenen Lipidmolekülen und den einzuschleusenden Nukleinsäuren aus. Diese Liposomen fusionieren mit der Zellmembran der Zielzellen und ermöglichen so eine Aufnahme der siRNA in die Zellen.

2.17.1 Vorversuche

Da keine Herstellerangaben hinsichtlich einzusetzender Konzentration und Inkubationszeit vorlagen, wurden siRNA-Konzentrationen von 10 und 50 nM, sowie die Inkubationszeiten 48 h und 72 h ausgetestet und der Effekt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mittels quantitativer RT-PCR und Western-Blot-Analyse ermittelt.

2.17.2 Transfektion

Zunächst wurden die zu transfizierenden Zellen in einem 6-Well-Format in einer Zellzahl von 2,0 bis 2,5 x 10⁵ Zellen pro Well ausgesät und eine Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Das Volumen des eingesetzten Mediums betrug 2 ml pro 6-Well. Die Transfektion wurde am Folgetag durchgeführt, wobei der zeitliche Abstand zwischen Aussaat und Transfektion so gering wie möglich gehalten wurde, um ein optimales Transfektionsergebnis zu erzielen. Für die Transfektion wurde die siRNA mit Opti-MEM auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Das Volumen betrug nach Empfehlung des Herstellers Invitrogen 250 µl. In einem weiteren Reaktionsansatz wurden 5 µl Lipofectamin mit 245 µl Opti-MEM versetzt. Die beiden Reaktionsansätze wurden miteinander vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 500 µl pro Well tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, um eine endozytotische Aufnahme zu ermöglichen.

2.18 Funktionelle Analysen

2.18.1 Vitalitätstests

2.18.1.1 Aussaat und Behandlung der Zellen für Vitalitätstests

Für die Durchführung von Vitalitätstests wurden die Zellen zunächst in einem Volumen von 100 µl pro Well in weißen 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Langsam wachsende Zelllinien (RT-112, 5637) wurden in einer Dichte von 4×10^3 Zellen pro Vertiefung ausgesät, schnell wachsende Zelllinien (639v, VmCub1, BFTC905, Umuc3, T-24, 253J) in einer Dichte von 3×10^3 Zellen, um eine ähnliche Konfluenz zu erhalten. Eine medikamentöse Behandlung wurde einen Tag nach Aussaat durchgeführt. Die jeweiligen Substanzen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO auf die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt. Für jede Konzentration wurden Vierfachwerte angesetzt. Das eingesetzte Volumen betrug 50 µl pro Vertiefung. Um nach der Lumineszenzmessung mittels Luminometer die Hintergrundlumineszenz von den gemessenen Werten subtrahieren zu können, wurde in vier Vertiefungen jeweils 100 µl reines Medium gegeben. Zudem wurden Zellen aus vier Vertiefungen ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, um einen zytotoxischen Effekt des Lösungsmittels auf die Zellen ausschließen zu können. Die eingesetzte DMSO-Menge entsprach hierbei der höchsten Konzentration, in der das jeweilige Medikament eingesetzt wurde, wobei die DMSO-Verdünnung mindestens 1:1000 betrug, um einen zytotoxischen Effekt sicher ausschließen zu können.

2.18.1.2 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Dieser Assay erlaubt eine Bestimmung des ATP-Gehaltes von metabolisch aktiven Zellen und somit indirekt eine Quantifizierung lebender Zellen. Nach Zugabe des Reagenz wird ATP durch Zellyse freigesetzt. Gleichzeitig werden endogene ATPasen inhibiert, so dass sich die ermittelte Gesamt-ATP-Menge proportional zu der Anzahl vitaler Zellen verhält. Die in dem Reagenz enthaltene thermostabile Luziferase vermag nun unter der Anwesenheit von Magnesium und Sauerstoff die Monooxygenierung von Luziferin zu Oxyluziferin zu katalysieren. Bei dieser Reaktion entsteht ein Lumineszenzsignal, welches mittels Luminometer gemessen werden kann. In Abb. 2.1 ist das Reaktionsschema der Luziferase-Reaktion dargestellt.

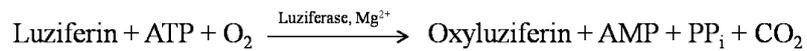


Abb. 2.1: **Reaktionsschema der Luziferase-Reaktion im Rahmen des CellTiter-Glo Lumineszenz Vitalitätstests.** Hierbei katalysiert die Luziferase unter Anwesenheit von ATP, Magnesium und Sauerstoff die Monoxygenierung von Luziferin zu Oxyluziferin. AMP: Adenosinmonophosphat; ATP: Adenosintriphosphat; CO₂: Kohlenstoffdioxid; O₂: Sauerstoff; PP_i: Pyrophosphat

Vor Durchführung des Tests wurde eine 30-minütige Equilibrierung der 96-Loch-Platten bei Raumtemperatur durchgeführt. Der CellTiter-Glo-Puffer wurde in einem Verhältnis von 1:1 in das lyophilisierte CellTiter-Glo-Substrat überführt. Von dem nun entstandenen CellTiter-Glo-Reagenz wurde nach Ablauf der Equilibrierungszeit ein 1-faches Volumen in jede Vertiefung pipettiert. Die Zellen wurden dann 2 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, um eine gleichmäßige Zelllyse mit ATP-Freisetzung und anschließender Luziferase-Reaktion zu ermöglichen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Stabilisierung des Chemolumineszenzsignals. Die Messung der Lumineszenz wurde am Victor Counter mit der Testwellenlänge 570 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm durchgeführt.

2.18.2 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie ist unter anderem eine Analyse von Zellen bezüglich Zellzyklus, Apoptoseinduktion, Größe oder Granularität möglich. Diese wurde mit dem FACS Scan (*fluorescence activated cell sorting*) von Becton Dickinson durchgeführt. Hierbei werden die Zellen zunächst in einem Flüssigkeitsstrom durch Erhöhung der Flussgeschwindigkeit vereinzelt und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Bei Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird Streulicht (*light scatter*) emittiert, welches von speziellen Photozellen erfasst wird. Zum einen ist es möglich, die Laserabsorption in einem Vorwärtsstreulicht-Kanal (FSC = *forward scatter*) zu bestimmen (siehe Abb. 2.2). Das Vorwärtsstreulicht nimmt mit wachsendem Zelldurchmesser zu und lässt somit auf die Größe einer Zelle schließen. Das Seitwärtsstreulicht hingegen wird in einem 90°-Winkel zum Einfallslichtstrahl gemessen und spiegelt hauptsächlich die Granularität einer Zelle wieder. Hierbei verhält sich das Seitwärtsstreulicht zur Zellgranularität proportional [184, 185].

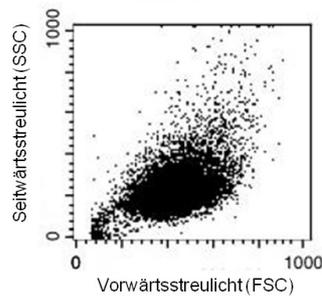


Abb. 2.2: **Dot-Plot-Diagramm.** Auf der Abszisse ist das Vorwärtsstreulicht (forward scatter: FSC) und auf der Ordinate das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter: SSC) dargestellt. Quelle: eigene Darstellung

Zudem ist es mittels FACS-Analyse möglich, die in einer Probe vorhandenen apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Annexin V-Markierung und Propidiumjodidfärbung zu detektieren. Annexin V, welches an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt vorliegt, bindet an Phosphatidylserin (PS). Dieses ist bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Geht eine Zelle in die Apoptose, transloziert Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, so dass eine Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin möglich wird [186]. Um apoptotische von nekrotischen Zellen differenzieren zu können, werden die Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt. Dieses kann lediglich durch die durchlässige Zellmembran von nekrotischen Zellen in die Zelle eindringen und in die DNA interkalieren. Die apoptotischen Zellen hingegen nehmen zunächst kein Propidiumjodid auf. Für die Zellzyklusanalyse werden die Zellsuspensionen mit Nicoletti-Puffer versetzt. Hierbei macht man sich zunutze, dass die DNA apoptotischer Zellen durch Endonukleasen gespalten wird. Wird nun die Zellmembran durch den hypotonen Nicoletti-Puffer lysiert, geht fragmentierte DNA verloren, wohingegen die hochmolekulare DNA weiterhin im Zellkern verbleibt. Dieser DNA-Gehalt ist jedoch viel geringer als in nichtapoptotischen Zellen. Das im Nicoletti-Puffer enthaltene Propidiumjodid interkaliert in die DNA, so dass der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch erfasst werden kann. Anschließend erhält man eine graphische Darstellung der Zellzyklusphasen. Hierbei repräsentiert der *G1-Peak* die Zellen mit einem einfachen und der *G2-Peak* die Zellen mit einem doppelten Chromosomensatz. Die S-Phase befindet sich zwischen den beiden Peaks. Die apoptotischen Zellen werden aufgrund ihres verminderten DNA-Gehalts graphisch vor dem *G1-Peak* dargestellt.

2.18.2.1 Probenvorbereitung

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen in 6 cm-Schalen in 3 ml Medium ausgesät und eine Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Pro Schale wurden 5×10^5 Zellen ausgesät. Für

jede Probe wurden Duplikate angefertigt. Einen Tag nach Aussaat wurden die Zellen mit den jeweiligen Substanzen behandelt und 48 h lang inkubiert. Hierbei wurden 25 nM Bortezomib, 5 μ M Tubacin und jeweils 10 nM der HDAC6-spezifischen siRNA oder des *Non-targeting Control Pools* eingesetzt. Zudem wurden zwei Ansätze mit DMSO behandelt. Zur Vorbereitung der Zellen auf die FACS-Analyse wurde das Medium aus den Schalen abgesaugt und in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA vom Schalenboden abgelöst, die Reaktion mit 2 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension zusammen mit dem zuvor abgesaugten Medium für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert, bevor die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurden.

2.18.2.2 Durchführung der FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse wurden die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen überführt. Jede Probe wurde hierbei auf zwei Röhrchen aufgeteilt, um eine parallele Messung von Zellzyklus und Apoptose zu ermöglichen. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Zu der einen Hälfte der Proben wurde dann Annexin V-FITC hinzugegeben, welches zuvor mit Annexin Binding Puffer und Propidiumjodid (2 μ g PI/ 1 ml Puffer) vermengt worden war. Die andere Hälfte wurde mit Nicoletti-Puffer versetzt. Für die Annexinmessung wurden 10 000 Zellen gezählt.

2.18.3 Klonogenitätsassay

Für den Klonogenitätsassay wurden die Zellen in einer 6-Loch-Platte in einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. 24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit 10 μ M Tubacin oder 50 nM Bortezomib behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Nach weiteren 24 h wurden pro 6-Loch-Vertiefung je 10 000 Zellen in 3 10 cm-Schalen überführt. Anschließend wurden die Zellen bis zur annähernden Konfluenz der DMSO-Kontrollen inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen drei Minuten lang unter leichtem Schütteln mit 1 ml Kristallviolettlösung pro Schale inkubiert. Anschließend wurden die Schalen zweimal mit Wasser ausgewaschen und bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet.

2.18.4 Proliferationsassay

Mit dem Proliferationsassay sollte überprüft werden, inwiefern eine einmalige Zugabe von Tubacin, 17-AAG oder Bortezomib die Proliferationsfähigkeit der Urothelkarzinom-Zelllinien einzuschränken vermag. Hierfür wurden die Zellen in einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$

in einem 6-Loch-Format in 2 ml Medium ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit 10 μM Tubacin, 1 μM 17-AAG oder 50 nM Bortezomib behandelt, welche zuvor mit Medium auf die jeweiligen Konzentrationen verdünnt wurden. Als Kontrolle diente DMSO. Für jede Konzentration sowie für die DMSO-Kontrolle wurden Triplikate angesetzt. 48 h nach Substanzzugabe wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:1 in eine 10 cm-Schale überführt. Die Zellen wurden dann täglich mikroskopisch untersucht und der Zeitpunkt vollständiger Konfluenz notiert. Ein Mediumwechsel wurde fünf Tage nach Expansion durchgeführt. Bei den mit Bortezomib behandelten Zellen der Linie 639v wurde das Medium erst am achten Tag gewechselt, da Bortezomib zu einer sehr starken Reduktion der Zellvitalität geführt hatte und den Zellen durch einen Mediumwechsel nicht die Signalstoffe entzogen werden sollten.

2.18.5 Scratch-Assay

Mittels Scratch-Assay wurde die Migrationsfähigkeit von Urothelkarzinomzellen nach medikamentöser HDAC6-Inhibition und siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC6 evaluiert. Um den Einfluss von Tubacin auf die Zellmigration bestimmen zu können, wurden die Zellen in 24-Loch-Platten als Triplikate in einem Volumen von 500 μl Medium ausgesät. Pro Vertiefung wurden 4×10^5 Zellen eingesetzt, um einen ausreichend dichten Zellrasen zu erhalten. Die Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert und am Folgetag mit 10 μM Tubacin versetzt. Als Negativkontrolle diente DMSO. Nach 24-stündiger Inkubation wurde mit einer sterilen 2-200 μl -Pipettenspitze ein glatt begrenzter Spalt durch den Zellrasen gezogen und das Medium ausgewechselt, wobei das neue Medium ebenfalls mit Tubacin versetzt wurde.

Die Zellen, welche mit einer HDAC6-spezifischen siRNA transfiziert werden sollten, wurden zunächst in einer Zellzahl von 2×10^5 in 6-Loch-Platten ausgesät. Die anschließende Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen. Am Folgetag wurden die Zellen mit der HDAC6-spezifischen siRNA in einer Konzentration von 10 nM inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein *Non-targeting Control Pool*. 24 h später wurden die Zellen als Triplikate in einer Zellzahl von 120 000 Zellen in ein 24-Loch-Format umgesetzt und weitere 24 h später ein Spalt durch den Zellrasen gezogen. Das Medium wurde abgesaugt und durch neues ersetzt.

Die Migration der Zellen wurde an definierten Zeitpunkten unter dem Mikroskop kontrolliert und dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsprofile der Histondeacetylasen 6 und 10 in Urothelkarzinom-Zelllinien auf mRNA-Ebene

3.1.1 Expressionsprofil von HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien

Um eine genaue Charakterisierung des Expressionsprofils von HDAC6 zu erhalten, wurden zehn Harnblasenkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichen Eigenschaften und Phänotypen mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Zelllinien RT-112, J-82, VmCub1, BFTC905, RT-4 und HT1376 weisen einen epithelialen Phänotyp auf, wohingegen die Zelllinien T-24, 253J, Umuc3 und SW1710 zu den mesenchymalen Urothelkarzinom-Zelllinien gezählt werden. Neben den Urothelkarzinom-Zelllinien wurden vier urotheliale Primärkulturen (UPs) mitgeführt, um die Expressionsmuster der Tumorzelllinien mit denen benignen Zellen vergleichen zu können. Die urothelialen Primärkulturen wurden aus Harnleitern von Nephrektomiepräparaten gewonnen.

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der HDAC6-Expression besteht, wurde bei jeder der zehn Urothelkarzinom-Zelllinien eine HDAC6-Expressionsanalyse von halb- und subkonfluent gewachsenen Zellen durchgeführt. Abb. 3.1 zeigt die relative HDAC6-Expression der Urothelkarzinom-Zelllinien. Als Referenzgen diente das TATA-Box-bindende Protein (TBP).

Bei der Expressionsanalyse wies ein Großteil der Zelllinien im Vergleich zu dem mittleren Expressionsniveau der urothelialen Primärkulturen ähnliche oder erniedrigte HDAC6-Expression auf. Die niedrigste HDAC6-Expression zeigte sich bei den Zelllinien VmCub1, BFTC905 und HT1376. Erhöhte HDAC6-Expression war lediglich bei der Zelllinie 253J sowie bei subkonfluenten SW1710-Zellen nachweisbar. Ein Zusammenhang zwischen dem morphologischen Phänotyp und der Höhe der HDAC6-Expression bestand nicht, da Zelllinien mit epithelalem Phänotyp ein vergleichbares Expressionsniveau aufwiesen wie Zelllinien mit mesenchymalem Charakter.

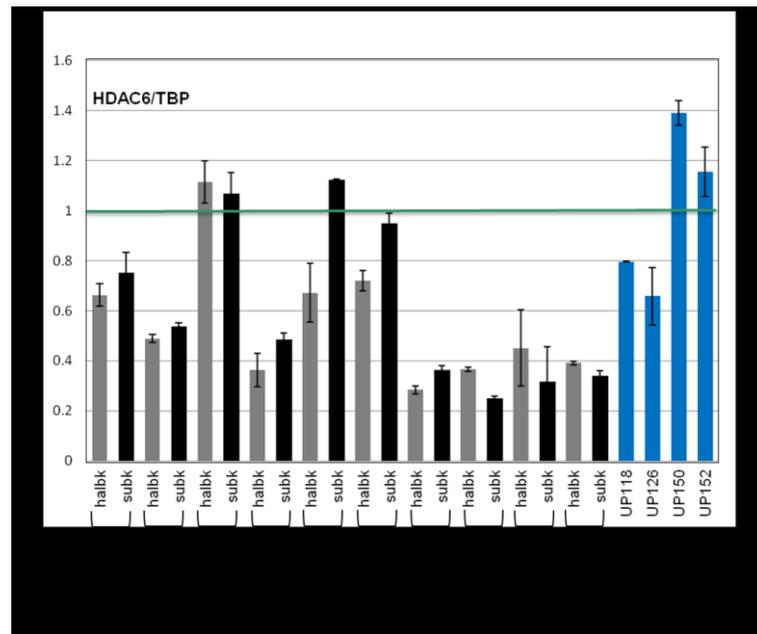


Abb. 3.1: *Relative HDAC6-Expression in Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112 bis HT1376) und urothelialen Primärkulturen (UP118 bis UP152) nach Normierung auf das Referenzgen TBP. Die Messungen wurden jeweils mit Zweifachwerten durchgeführt. Aus diesen wurde das arithmetische Mittel berechnet. Mit den Daten der vier urothelialen Primärkulturen wurde das mittlere Expressionsniveau ermittelt. Dieses wurde als Wert 1 festgesetzt (grüne Linie) und die Expressionswerte der Urothelkarzinom-Zelllinien hierzu in Beziehung gesetzt.*

Auch bezüglich der Konfluenzstadien und der Höhe der HDAC6-Expression ließ sich innerhalb der einzelnen Zelllinien kein einheitliches Muster erkennen. In den Zelllinien RT-112, T-24, Umuc3, SW1710, J-82, und VmCub1 konnte in den subkonfluenten Stadien eine im Vergleich zum halbkonfluenten Stadium höhere Expression nachgewiesen werden, wohingegen die Zelllinien 253J, BFTC905, RT-4 und HT1376 ein gegenläufiges Muster aufwiesen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Konfluenzstadium und HDAC6-Expressionsniveau konnte somit nicht festgestellt werden.

3.1.2 Expressionsprofil von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien

Da die Histondeacetylasen 10 und 6 eine vergleichbare molekulare Struktur besitzen, stellte sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von HDAC6 und HDAC10 in den jeweiligen Urothelkarzinom-Zelllinien besteht. Daher wurde wie für HDAC6 auch der HDAC10-Expressionspegel in den zehn ausgewählten Urothelkarzinom-Zelllinien bestimmt (siehe Abb. 3.2). Auch hier wurden vier urotheliale Primärkulturen (UPs) mitgeführt und die Expression nach der Messung auf das Haushaltsgen TBP normiert.

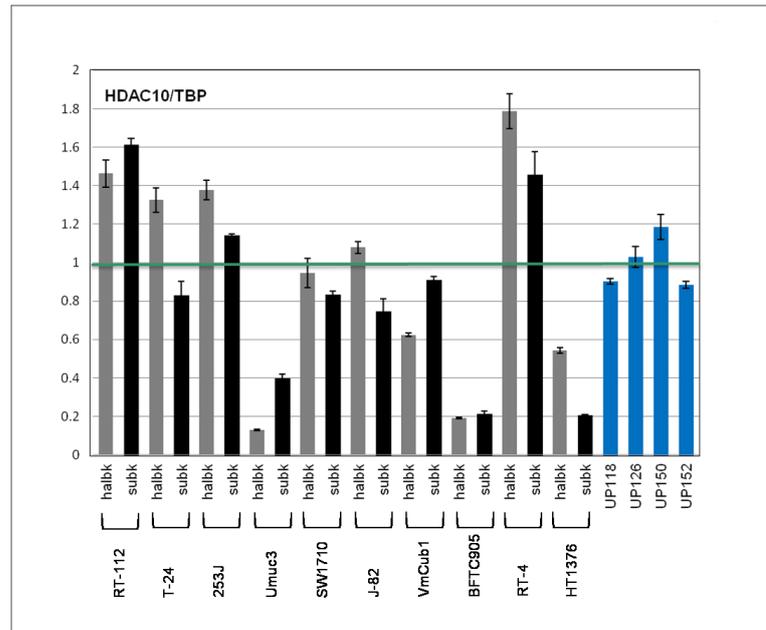


Abb. 3.2: *Relative HDAC10-Expression in Urothelkarzinom-Zelllinien und urothelialen Primärkulturen nach Normierung auf das Referenzgen TBP. Die Messungen wurden jeweils mit Zweifachwerten durchgeführt. Aus diesen wurde das arithmetische Mittel berechnet. Mit den Daten der vier urothelialen Primärkulturen wurde das mittlere Expressionsniveau ermittelt. Dieses wurde als Wert 1 festgesetzt (grüne Linie) und die Expressionswerte der Urothelkarzinom-Zelllinien hierzu in Beziehung gesetzt.*

Die RT-PCR ergab, dass die Urothelkarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer HDAC10-Expression ein sehr heterogenes Verteilungsmuster aufwiesen. Die geringste HDAC10-Expression war in den Zelllinien BFTC905, Umuc3 und HT1376 messbar, wohingegen die Zelllinien RT-112, 253J und RT-4, sowie das halbkongfluente Stadium der Zelllinie T-24, eine im Vergleich zu dem mittleren Expressionsniveau der urothelialen Primärkulturen erhöhte HDAC10-Expression aufwiesen. Eine Korrelation zwischen der Höhe der HDAC10- und der zuvor ermittelten HDAC6-Expression der jeweiligen Zelllinien bestand nicht ($p = 0,07$). Zudem war die Höhe der HDAC10-Expression auf mRNA-Ebene analog zu der HDAC6-Expressionsanalyse unabhängig von dem jeweiligen Phänotyp der Zelllinie. Eine Korrelation zwischen dem Konfluenzstadium und der Höhe der HDAC10-Expression stellte sich ebenfalls nicht dar, wobei halbkongfluent gewachsene Zelllinien meist ein stärkeres Expressionsniveau aufwiesen als im subkongfluenten Stadium (T-24, 253J, SW1710, J-82, RT-4, HT1376).

3.1.3 Expressionsprofil der HDACs 6 und 10 in Gewebeproben auf mRNA-Ebene

Um zu untersuchen, ob sich das HDAC6-Expressionsniveau in Gewebeproben von dem der Zelllinien unterscheidet, wurde bei neun benignen und neunzehn tumorhaltigen Gewebeproben ebenfalls eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Auch hier diente TBP als

Referenzgen. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden Boxplot-Diagramm (siehe Abb. 3.3) dargestellt.

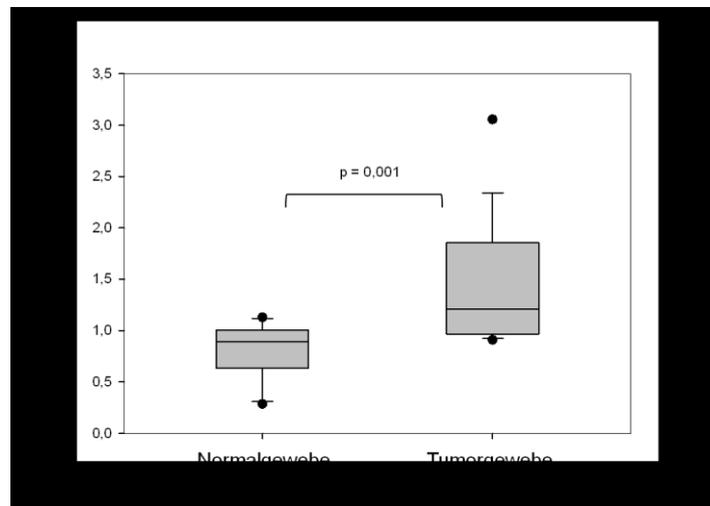


Abb. 3.3: HDAC6-Expression relativ zu TBP in Urothelkarzinomgeweben im Box-Whisker-Plot-Diagramm. Der HDAC6-Expressionsspiegel wurde mit quantitativer RT-PCR ermittelt. Die Messungen wurden für jede Probe mit Zweifachwerten durchgeführt. Aus diesen wurde das arithmetische Mittel berechnet. Als Referenzgen diente TBP.

Die durchgeführten Messungen ergaben eine moderate, jedoch signifikante Überexpression von HDAC6 in den Urothelkarzinomgeweben. Das Signifikanzniveau betrug hierbei $p = 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test.

Eine quantitative RT-PCR wurde analog auch für HDAC10 durchgeführt, ebenfalls mit TBP als Referenzgen (siehe Abb. 3.4).

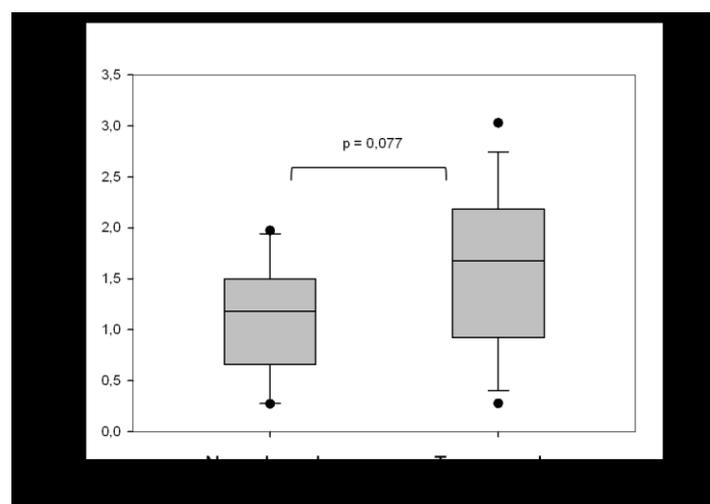


Abb. 3.4: HDAC10-Expression relativ zu TBP in Urothelkarzinomgeweben im Box-Whisker-Plot-Diagramm. Der HDAC10-Expressionsspiegel wurde mit quantitativer RT-PCR ermittelt. Die Messungen wurden für jede Probe mit Zweifachwerten durchgeführt. Aus diesen wurde das arithmetische Mittel berechnet. Als Referenzgen diente TBP.

Hier war keine signifikant erhöhte Expression von HDAC10 in Urothelkarzinomgeweben erkennbar ($p = 0,077$ im Mann-Whitney-U-Test).

3.2 Expressionsprofil von HDAC6 und HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien auf Proteinebene

3.2.1 Expressionsprofil von HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob Unterschiede zwischen der HDAC6-Expression auf mRNA- und Proteinebene bestehen, wurde das Expressionsniveau von HDAC6 auf Proteinebene in sechzehn verschiedenen Urothelkarzinom-Zelllinien mittels Western-Blot-Analyse untersucht (siehe Abb. 3.5). Es wurden sowohl Lysate der halb- als auch der subkonfluent gewachsenen Zellen aufgetragen. Um eine quantitative Beurteilung der Proteinexpression im Vergleich zu benignen Zelllinien durchführen zu können, wurde eine urotheliale Primärkultur als Vergleichskontrolle mitgeführt. Die Proteinbande für HDAC6 wurde auf einer Höhe von ca. 130 kDa erwartet. Das ca. 55 kDa große Protein α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

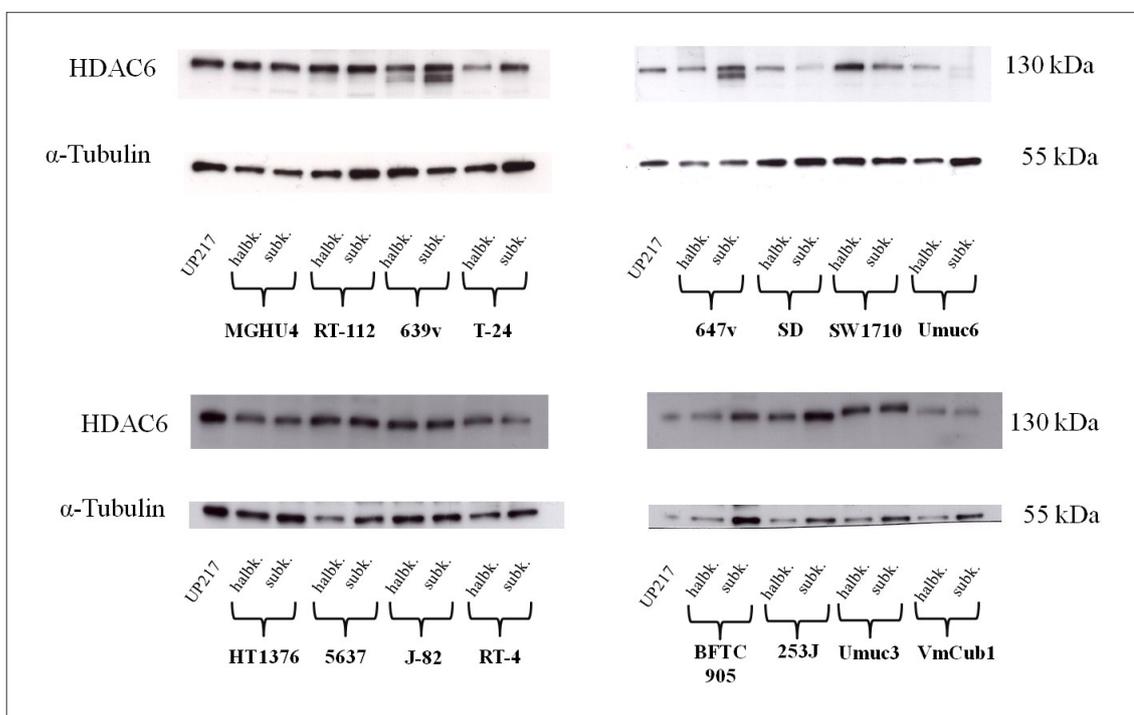


Abb. 3.5: **Western-Blot zum Nachweis der HDAC6 Expression auf Proteinebene.** Von jeder Zelllinie wurden 10 μ g der Proteinlysate aufgetragen. Analysiert wurden sowohl Lysate von halb- als auch von subkonfluent gewachsenen Zellen. Als Positivkontrolle wurde eine urotheliale Primärkultur (UP217) mitgeführt. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Interessanterweise war bei der Zelllinie 639v sowie bei der subkonfluenten Probe der Linie 647v eine Doppelbande in eine Höhe von knapp unter 130 kDa nachweisbar, welche als Spleißvariante von HDAC6 zu deuten ist [187]. Die Ergebnisse zeigen, dass auch auf Proteinebene kein direkter Zusammenhang zwischen dem Konfluenzstadium und der Höhe der HDAC6-Expression erkennbar ist, wobei die Proteinladung bedauerlicherweise nicht in allen Proben ausgeglichen war.

Zur besseren Übersichtlichkeit und direkten Vergleichbarkeit der HDAC6-Expression auf Proteinebene dient Abb. 3.6, welche nochmals die Western-Blot-Analyse der halbkonfluenten Proben darstellt.

Aus Abb. 3.6 wird deutlich, dass die Urothelkarzinom-Zelllinien MGHU4, RT-112, 639v, 253J, Umuc3 und 647v auf Proteinebene im Vergleich zu der urothelialen Primärkultur eine erhöhte HDAC6-Expression aufwiesen. Die stärkste Expression zeigte sich hierbei in den Linien RT-112, 253J und Umuc3. Die Zelllinien 5637 und SW1710 wiesen ein ähnlich hohes Expressionsniveau wie die urotheliale Primärkultur auf, wohingegen sich die Zelllinien T-24, J-82, VmCub1, BFTC905, RT-4, Umuc6, HT1376 und SD durch eine erniedrigte Expression auszeichneten. Die geringste HDAC6-Expression wurde in den Linien VmCub1, BFTC905, Umuc6 und SD gemessen.

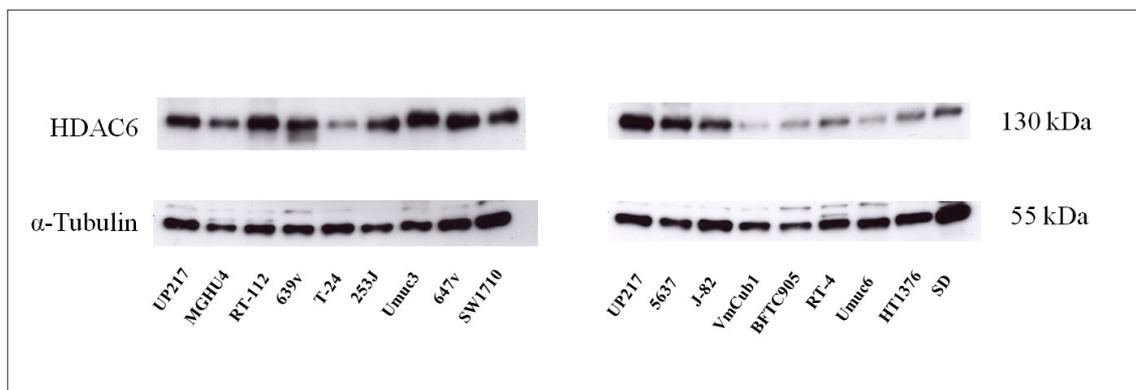


Abb. 3.6: **Western-Blot zum Nachweis der HDAC6 Expression auf Proteinebene.** Von jeder Zelllinie wurden 10 µg der Proteinlysate aufgetragen. Verwendet wurden die Lysate der halbkonfluenten Zelllinien. Als Kontrolle wurde UP217 verwendet. α-Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Die oben gezeigten Ergebnisse dienten als Grundlage für die Auswahl der Zelllinien, die für die medikamentösen Behandlungen verwendet wurden.

3.2.2 Expressionsprofil von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien

Analog wurde die Proteinexpression von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien bestimmt. Als Ladungskontrolle diente ebenfalls α -Tubulin (siehe Abb. 3.7).

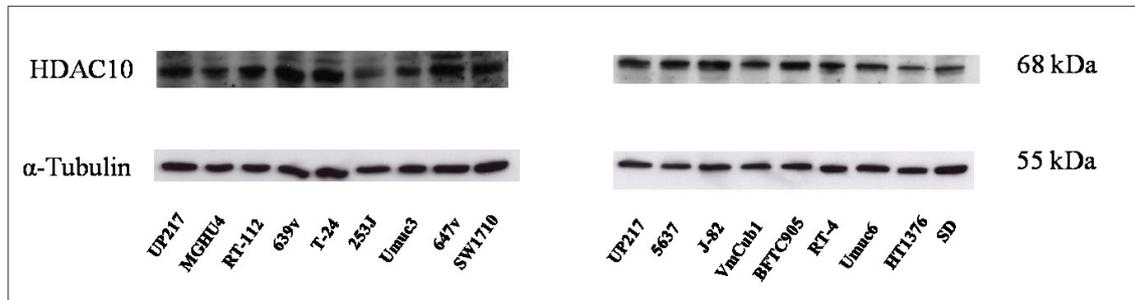


Abb. 3.7: *Western-Blot zum Nachweis der HDAC10 Expression auf Proteinebene.* Von jeder Zelllinie wurden 30 μ g der Proteinlysate aufgetragen. Verwendet wurden die Lysate der halbkonfluenten Zelllinien. Als Kontrolle wurde UP217 verwendet. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Abb. 3.7 zeigt, dass bei den meisten Zelllinien kein signifikanter Unterschied zwischen der HDAC10-Expression der Urothelkarzinom-Zelllinien und der urothelialen Primärkultur bestand. Lediglich die Zelllinien 253J, HT1376 und SD wiesen ein im Vergleich zur urothelialen Primärkultur erniedrigtes HDAC10-Expressionsniveau auf. Eine Korrelation zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene war nicht erkennbar.

3.2.3 Expression von HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien nach UV-Bestrahlung

In Vorversuchen wurde die HDAC10-Expression von Zelllinien verschiedener Entitäten wie NIH-3T3 und HeLa miteinander verglichen. Hierbei fiel auf, dass die Zelllinie NIH-3T3, welche zuvor mit UV-Licht bestrahlt worden war, eine starke HDAC10-Expression aufwies. Daher sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der UV-Bestrahlung und der HDAC10-Expression besteht. In der Literatur steht diesbezüglich beschrieben, dass eine HDAC10-Hemmung eine verstärkte Expression von TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*) zur Folge hat. TXNIP wiederum hemmt das antioxidativ wirkende Protein Thioredoxin (TRX), mit der Folge einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Untersuchungen, ob sich im Umkehrschluss durch Exposition der Zellen mit stressinduzierenden Faktoren wie UV-Licht über eine ROS-Induktion die HDAC10-Expression heraufregulieren lässt, liegen bislang nicht vor.

Für den Versuch wurden die Zelllinien RT-4, RT-112 und J-82 ausgewählt. Die Zellen wurden für 12 sec mit $0,04 \text{ J/cm}^2$ UV-Licht bestrahlt und dann 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Von den anschließend gewonnenen Proteinlysaten wurden 30 μ g für die Western-

Blot-Analyse aufgetragen. Parallel zu den UV-bestrahlten Zellen wurden unbehandelte Ansätze mitgeführt, um Vergleichbarkeit hinsichtlich der HDAC10-Expression zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 dargestellt.

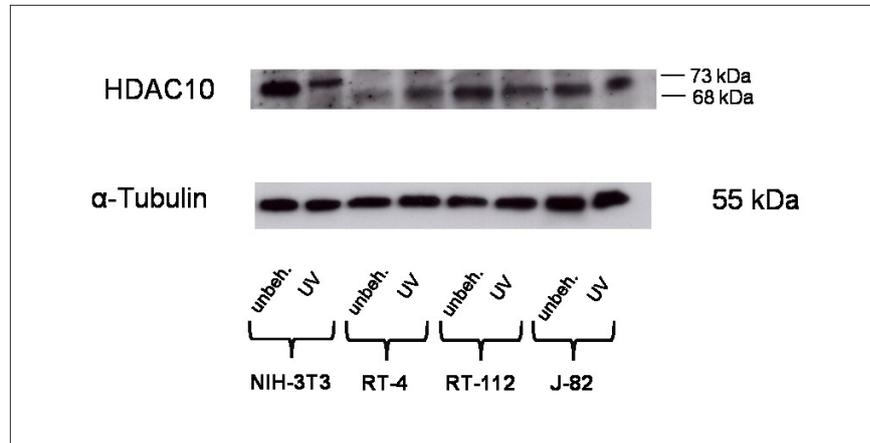


Abb. 3.8: **Western-Blot zum Vergleich der HDAC10-Expression in unbehandelten und UV-bestrahlten Zellen.** Es wurde die HDAC10-Expression der Urothelkarzinom-Zelllinien RT-4, RT-112 und J-82 bestimmt, sowie die der embryonalen Mäusefibroblasten-Zelllinie NIH-3T3. Von jeder Zelllinie wurden 30 µg der Proteinlysate aufgetragen. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Abb. 3.8 zeigt, dass durchaus Unterschiede in der HDAC10-Expression nach UV-Bestrahlung bestanden. Während sich bei den Zelllinien RT-112 und J-82 nach UV-Behandlung ein Abfall der HDAC10-Expression zeigte, war diese bei der Zelllinie RT-4 nach UV-Bestrahlung erhöht. Die Zelllinie NIH-3T3 zeigte nach UV-Bestrahlung ebenfalls eine Abnahme des HDAC10-Expressionsniveaus. Zudem fiel auf, dass sich die Höhe der HDAC10-Bande in den Urothelkarzinom-Zelllinien von der der Zelllinie NIH-3T3 unterschied. Die Größe des HDAC10-Proteins der Zelllinie NIH-3T3 kann auf 73 kDa geschätzt werden, da laut Literatur in der Maus zwei Isoformen existieren, welche eine Größe von 73,3 kDa und 51,7 kDa aufweisen.

3.3 Intrazelluläre HDAC6-Lokalisation in Urothelkarzinom-Zelllinien

Zur Charakterisierung der intrazellulären HDAC6-Lokalisation in verschiedenen Urothelkarzinom-Zelllinien wurde eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Hierfür wurden zwei Zelllinien mit hoher HDAC6-Expression (253J und 639v) sowie zwei Zelllinien mit niedriger HDAC6-Expression ausgewählt (BFTC905, HT1376). Für die Immunzytochemie wurden die Zelllinien auf Deckgläschen ausgesät und mit einem Antikörper gegen HDAC6 fluoreszenzgefärbt. Die Präparate wurden anschließend im

Fluoreszenzmikroskop mittels digitaler Bildbearbeitung analysiert. Im Folgenden sind sowohl die jeweiligen Einzelfärbungen der Zelllinien als auch eine Zusammenlagerung der einzelnen Farbkanäle aufgezeigt.

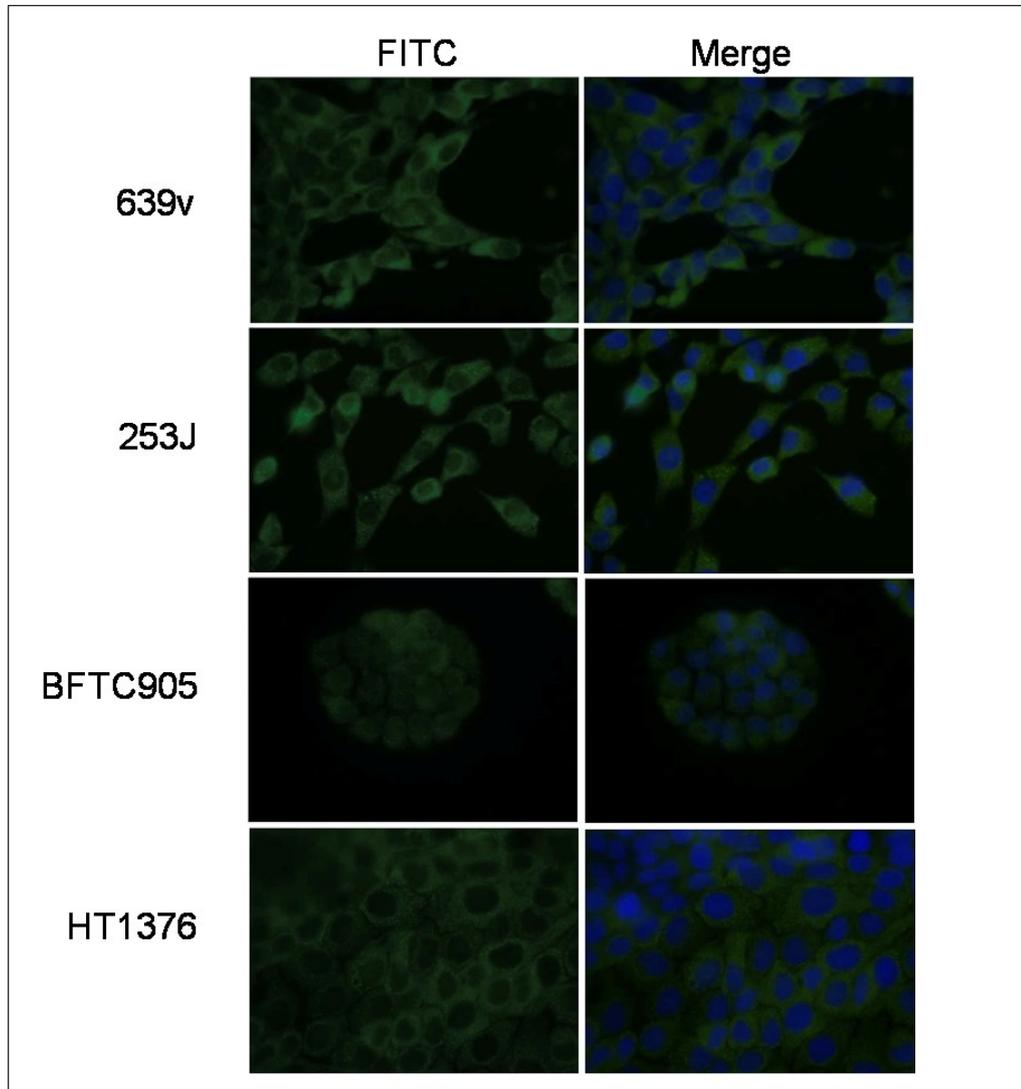


Abb. 3.9: Immunzytochemische Färbung von HDAC6 (grüne Fluoreszenz) in den Urothelkarzinom-Zelllinien 639v, 253J, BFTC905 und HT1376. Für jede Zelllinie wurden zudem die Farbkanäle überlagert. Die Aufnahmen wurden lichtmikroskopisch angefertigt.

Abb. 3.9 zeigt, dass HDAC6 erwartungsgemäß in allen analysierten Zelllinien zytoplasmatisch lokalisiert war. Lediglich bei der Zelllinie BFTC905 ließ eine Verdichtung im Bereich des Zellkerns auf eine deutliche intranukleäre Lokalisation von HDAC6 schließen. Bei der epithelialen Zelllinie HT1376 war der Zellkern fast vollständig von HDAC6 ausgespart. Zudem ist auffällig, dass bei den Zelllinien 253J und 639v das HDAC6-Protein auch in den zellulären Ausläufern anfärbbar war.

3.4 Medikamentöse Behandlung von Urothelkarzinom-Zelllinien mit den HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A

Im weiteren Verlauf sollte überprüft werden, ob sich durch eine Behandlung mit verschiedenen HDAC6-Inhibitoren antitumoröse Effekte erzielen lassen und ob sich Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit der Substanzen ergeben. Hierfür wurden die HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A ausgewählt.

3.4.1 Effekte der HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A auf die α -Tubulin-Acetylierung sowie auf das HDAC6-Expressionsniveau in Urothelkarzinom-Zelllinien

Zunächst sollte die Wirksamkeit verschiedener HDAC6-Inhibitoren auf Urothelkarzinom-Zelllinien miteinander verglichen werden. Als Marker für HDAC6-Inhibition wurde der Acetylierungsstatus des zytosolischen Proteins α -Tubulin gewählt, welches ein Hauptsubstrat von HDAC6 darstellt. Da sich die Acetylierung von α -Tubulin nach HDAC6-Inhibition recht schnell verändert, wurden bereits nach 24-stündiger Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor aus den behandelten Ansätzen Proteinlysate gewonnen und die α -Tubulin-Acetylierung mittels Western-Blot und Antikörperdetektion quantifiziert. Zudem wurde untersucht, ob eine HDAC6-Inhibition das Expressionsniveau des HDAC6-Proteins beeinflusst.

Für die Western-Blot-Analyse wurden zwei Zelllinien mit erhöhter HDAC6-Expression (639v, RT-112) und eine mit erniedrigter Expression (T-24) ausgewählt. Für Tubacin und Tubastatin A wurden die Konzentrationen 2,5 μ M und 10 μ M gewählt, da laut Literatur ab 2,5 μ M eine deutliche α -Tubulin-Acetylierung induziert wird. ST-80 wurde in den Konzentrationen 2,5 μ M und 50 μ M eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung (vgl. Abb. 3.10) dargestellt.

Erwartungsgemäß zeigte sich bei allen drei Medikamenten eine dosisabhängige Zunahme der α -Tubulin-Acetylierung von der DMSO-Kontrolle bis hin zur höchsten Konzentration des jeweiligen HDAC6-Inhibitors. Hierbei variierte die Stärke der α -Tubulin-Acetylierung jedoch je nach Zelllinie und Substanz. ST-80 zeigte von allen Substanzen die geringste Wirkung auf die α -Tubulin-Acetylierung. Nach Tubacin-Behandlung waren bei den Zelllinien 639v und RT-112, welche eine hohe HDAC6-Expression aufweisen, schon bei niedriger Konzentration deutliche Effekte erkennbar. Auffällig war zudem, dass die α -Tubulin-Acetylierung der Zelllinie T-24, welche von den drei analysierten Zelllinien die geringste HDAC6-Expression aufweist, nach HDAC6-Inhibition deutlich geringer ausfiel als bei den Zelllinien 639v und

RT-112. Hier war selbst nach 10 μM Tubacin nur eine geringe α -Tubulin-Acetylierung nachweisbar.

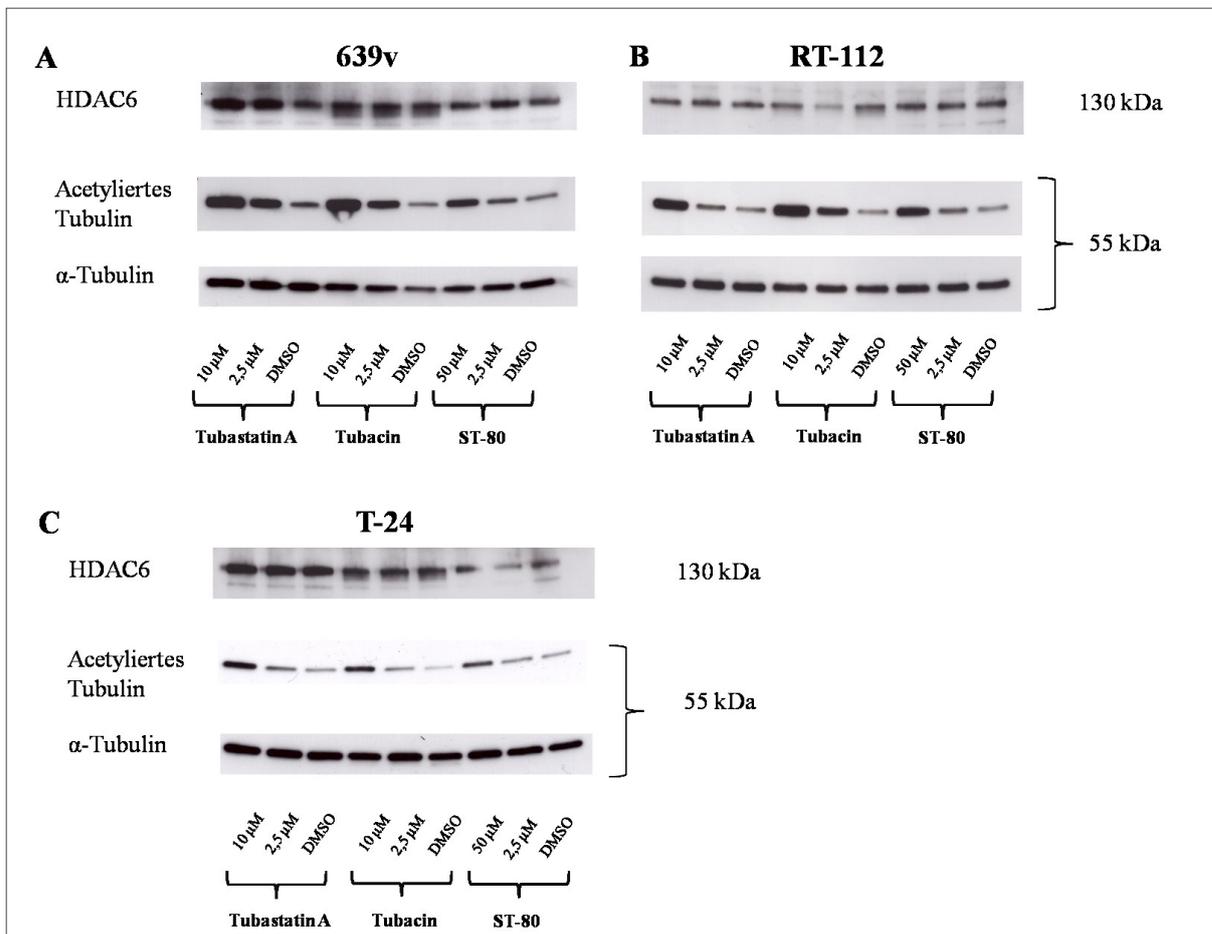


Abb. 3.10: Proteinblot zur Bestimmung der HDAC6-Expression sowie des Acetylierungsgrades von α -Tubulin nach Behandlung mit Tubastatin A, Tubacin oder ST-80 in den Urothelkarzinom-Zelllinien 639v (A), RT-112 (B) und T-24 (C). Diese wurden jeweils 24 h mit der entsprechenden Substanz behandelt. Aufgetragen wurden 10 μg Protein. Als Ladungskontrolle wurde totales α -Tubulin verwendet. Für Tubastatin A und Tubacin wurden die Konzentrationen 2,5 μM und 10 μM gewählt, für ST-80 die Konzentrationen 2,5 μM und 50 μM . DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle.

Hinsichtlich der HDAC6-Expression variierten die Ergebnisse je nach Zelllinie. Bei 639v konnte durch Tubastatin A-Behandlung ein Anstieg der HDAC6-Expression festgestellt werden. Auch nach 2,5 μM ST-80 stieg der HDAC6-Proteingehalt leicht an. Bei 50 μM ST-80 hingegen war die Bande vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle. Tubacin hatte bei der Zelllinie 639v keinen Effekt auf die HDAC6-Expression. Bei T-24 waren sowohl nach Tubastatin A- als auch nach Tubacin-Behandlung keine Effekte nachweisbar. Lediglich bei einer Behandlung mit 2,5 μM ST-80 schien die HDAC6-Expression leicht abzusinken. Bei RT-112 zeigte sich nach Tubastatin A- sowie ST-80-Behandlung kein signifikanter Unterschied in der HDAC6-Expression. Bei 2,5 μM Tubacin hingegen sank die HDAC6-

Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich ab. Bei 10 μM Tubacin wiederum ähnelte die Expression der von den unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich Tubastatin A und Tubacin im Vergleich mit ST-80 als deutlich potenter hinsichtlich einer α -Tubulin-Acetylierung erwiesen. Auch in hohen Konzentrationen war ST-80 deutlich weniger effektiv. Zudem zeigten die Western-Blot-Analysen, dass eine Behandlung der Zelllinien mit den jeweiligen Substanzen zu keiner deutlichen Veränderung der HDAC6-Expression führte.

3.4.2 Veränderung der Histonacetylierung nach HDAC6-Inhibition in Urothelkarzinom-Zelllinien

In der Literatur ist beschrieben, dass hauptsächlich zytoplasmatische Proteine wie α -Tubulin Substrate von HDAC6 darstellen. Einen wesentlichen Einfluss auf die Acetylierung von Histonen, welche wiederum Genexpression und -regulation beeinflussen, scheint HDAC6 nicht zu besitzen. In vergangenen Arbeiten wurde jedoch auch gezeigt, dass HDAC6-Inhibitoren je nach Selektivität und in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen auch unspezifisch auf andere Histondeacetylasen wirken und somit beispielsweise über die HDACs 1 und 2 eine Histonacetylierung induzieren können. Um dies zu überprüfen, wurde mittels Western-Blot die Histonacetylierung nach Behandlung mit den drei Inhibitoren analysiert. Zur Detektion der Histonacetylierung wurde ein Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 verwendet (siehe Abb. 3.11).

Die Abbildung zeigt, dass die HDAC6-Inhibitoren in den ausgewählten Zelllinien unterschiedliche Effekte auf die Histonacetylierung ausübten. Eine Inkubation mit Tubacin führte in keiner Zelllinie zu einer Histonacetylierung, wohingegen nach ST-80-Behandlung in einer Konzentration von 50 μM eine Induktion von acetyliertem Histon H3 detektierbar war. Nach Behandlung mit Tubastatin A war bei 2,5 μM bei beiden Zelllinien keine Wirkung auf die Histonacetylierung erkennbar. Bei 10 μM hingegen stieg die Histonacetylierung deutlich an.

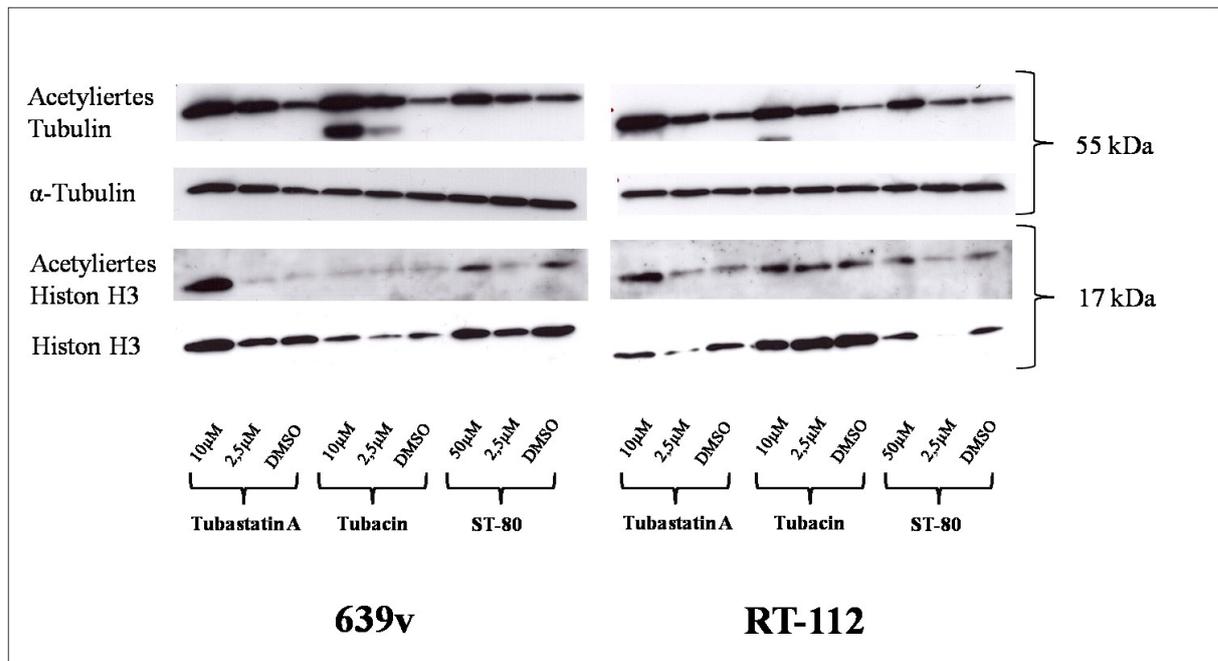


Abb. 3.11: Proteinblot zur Bestimmung des Acetylierungsgrades des Histons H3 nach Behandlung mit Tubastatin A, Tubacin oder ST-80 in den Urothelkarzinom-Zelllinien 639v und RT-112. RT-112 und 639v wurden jeweils 24 h mit der entsprechenden Substanz behandelt. Aufgetragen wurden 10 μ g Protein. Als Ladungskontrolle wurde totales Histon H3 verwendet. Für Tubastatin A und Tubacin wurden die Konzentrationen 2,5 μ M und 10 μ M und für ST-80 die Konzentrationen 2,5 μ M und 50 μ M gewählt.

Insgesamt lässt sich daher sagen, dass Tubacin von den drei ausgewählten HDAC6-Inhibitoren die höchste Spezifität für HDAC6 aufweist, da auch in hohen Konzentrationen keine Histonacetylierung beobachtet werden konnte.

3.4.3 Medikamentöse Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit den HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass Tubacin und Tubastatin A hinsichtlich einer Induktion der α -Tubulin-Acetylierung in Urothelkarzinom-Zelllinien der Substanz ST-80 deutlich überlegen waren. Um zu überprüfen, ob sich eine HDAC6-Inhibition auf die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien auswirkt, wurden ausgewählte Urothelkarzinom-Zelllinien einmalig mit Tubacin, ST-80 oder Tubastatin A behandelt und 48 h bzw. 72 h lang unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Für die Behandlung wurden Zelllinien mit hoher (RT-112, 639v, 253J, Umuc3), unveränderter (5637) und erniedrigter (T-24, VmCub1, BFTC905) HDAC6-Expression ausgewählt. Die Ergebnisse der Tubacin-Behandlung sind in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3.12) dargestellt.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Zelllinien unterschiedlich sensitiv auf eine Tubacin-Behandlung reagierten. Bis zu einer Konzentration von 1 μM war kein bedeutender Effekt auf die Zellvitalität nachweisbar. Lediglich bei Umuc3 konnte eine Reduktion der Vitalität auf ca. 70 % gemessen werden. Ab 5 μM war hingegen ein dosisabhängiger Abfall der Vitalität zu beobachten. Bei 5 μM schwankte die Zellvitalität je nach Zelllinie in einem Bereich von 56 bis 83 %. Die Vitalität der Zelllinien RT-112 und 253J hingegen blieb weiterhin unbeeinflusst. Eine Konzentration von 10 μM zeigte bei allen Zelllinien einen deutlichen zytotoxischen Effekt. Bei BFTC905 und Umuc3 ließ sich ein Abfall der Vitalität auf ca. 6 % beobachten und bei T-24 ein Abfall auf ca. 3 %. Auch VmCub1 zeigte mit einer Zellvitalität von 15 % eine deutliche Reaktion. Ein mäßiger Effekt war bei den Zelllinien 639v, RT-112 und 5637 zu beobachten, bei denen eine Vitalität von jeweils ca. 33, 46 und 45 % erhalten blieb. Die Zelllinie 253J zeigte wie zuvor bei 5 μM Tubacin die geringste Sensitivität mit einer Reduktion der Zellvitalität um insgesamt 28 %.

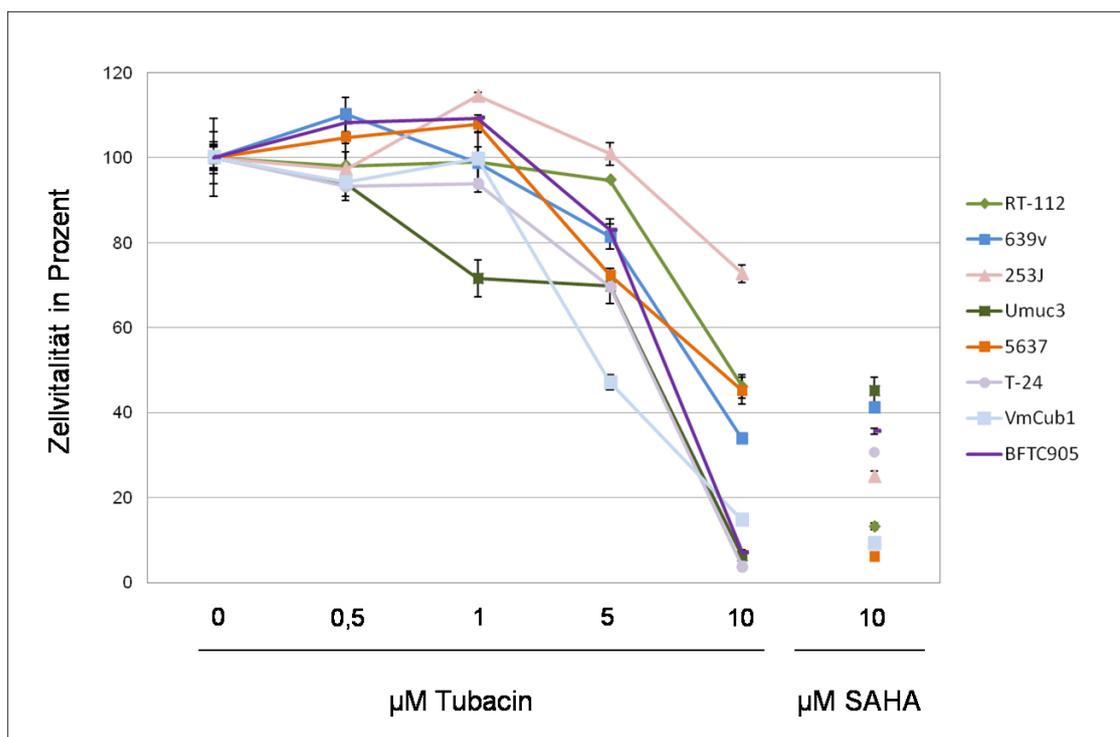


Abb. 3.12: CellTiter-Glo Assay zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Behandlung mit Tubacin von 8 Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112, 639v, 253J, Umuc3, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905). Die Inkubationszeit betrug 48 h. Für die Behandlung mit Tubacin wurden die Konzentrationen 0,5, 1, 5 und 10 μM ausgewählt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von Tubacin bzw. SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent abgebildet.

Insgesamt lässt sich sagen, dass VmCub1, Umuc3, T-24 und BFTC905 am deutlichsten auf eine Tubacin-Behandlung reagierten. Jedoch ließen sich auch hier erst ab 5 μM deutliche Effekte auf die Zellvitalität beobachten, mit Ausnahme der Zelllinie Umuc3, die schon bei 1 μM eine deutliche Reaktion zeigte. Die Zelllinie 253J sprach mit einer IC_{50} von 12,1 μM (siehe Tabelle 3.1) am wenigsten auf die Tubacin-Behandlung an. Bei den Zelllinien RT-112, 639v und 5637 zeigten sich eher mäßige Effekte.

Um zu überprüfen, ob die Inkubationszeit einen Einfluss auf die Effektivität von Tubacin hat, wurden Zelllinien mit erhöhter (RT-112, 639v), unveränderter (5637) und erniedrigter (T-24) HDAC6-Expression einmalig mit Tubacin behandelt und 72 h lang unter Standardbedingungen inkubiert. Die Ergebnisse nach Quantifizierung der Zellvitalität sind in der folgenden Abbildung dargestellt (siehe Abb. 3.13). Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Ergebnisse der Inkubationszeiten 48 h und 72 h gegenübergestellt.

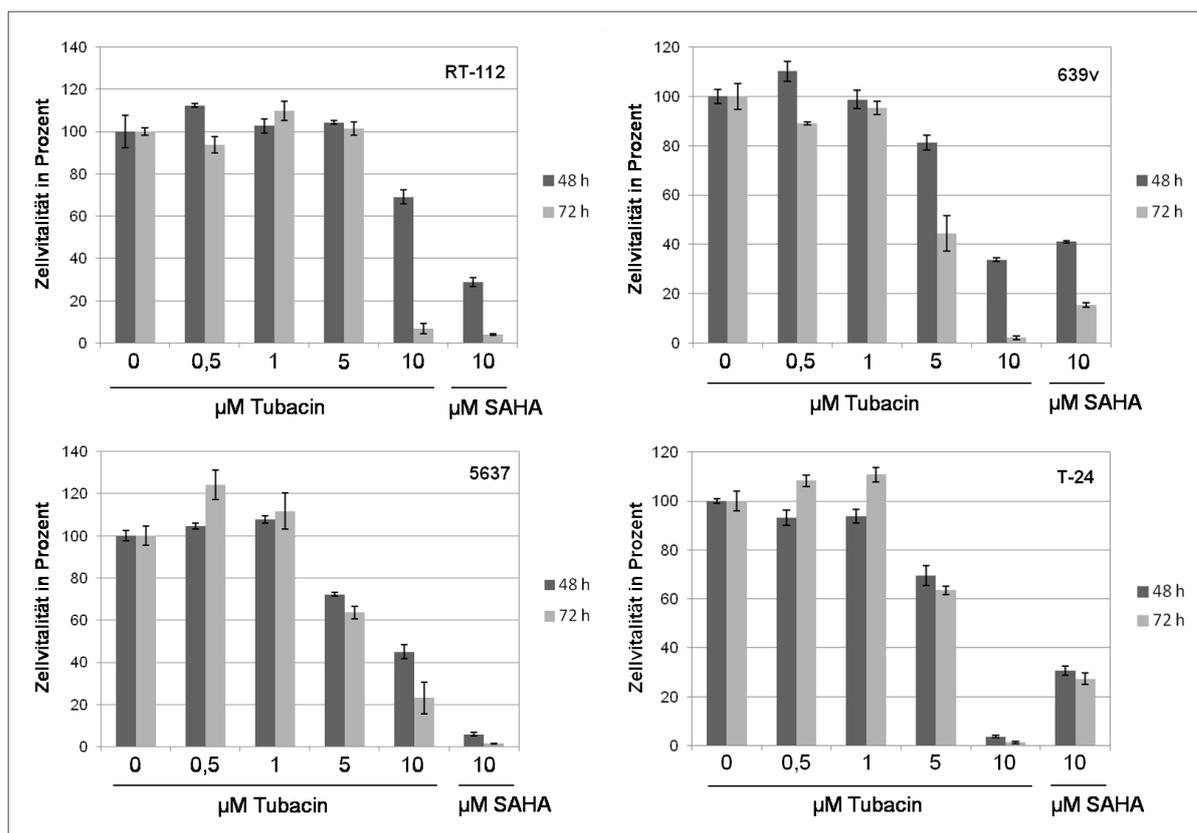


Abb. 3.13: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Behandlung mit Tubacin von 4 Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112, 639v, 5637 und T-24). Diese wurden 48 h (dunkelgraue Balken) oder 72 h (hellgraue Balken) mit Tubacin inkubiert. Für die Tubacin-Behandlung wurden die Konzentrationen 0,5, 1, 5 und 10 μM ausgewählt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von Tubacin bzw. SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent abgebildet.

Bei der Zelllinie RT-112 war in Konzentrationen bis 5 μM keine Reduktion der Vitalität mit steigender Inkubationszeit zu beobachten. Bei 10 μM Tubacin hingegen konnte nach 72 h eine ca. 62 % stärkere Vitalitätsreduktion gemessen werden als nach 48 h Inkubationszeit. Bei 639v konnte durch die verlängerte Inkubationszeit konzentrationsunabhängig eine Reduktion der Zellvitalität erreicht werden. Bei einer Konzentration von 5 μM führte eine verlängerte Inkubationszeit zu einer zusätzlichen Reduktion der Vitalität um ca. 37 % im Vergleich zu 48 h. Bei 10 μM war ein Abfall um ca. 30 % messbar. Bei der Zelllinie 5637 wurde erst ab 5 μM eine leichte Effektsteigerung um 10 % sichtbar. Diese stieg bei einer Behandlung mit 10 μM Tubacin auf 22 % an. Auch bei der Zelllinie T-24 führte eine verlängerte Inkubationszeit bei einer Konzentration von 5 μM zu einer nur leicht stärkeren Vitalitätsreduktion von ca. 6 %. Bei 10 μM waren kaum mehr Zellen lebensfähig.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sich bei RT-112 und 5637 bei 10 μM Tubacin eine verstärkte Wirkung in der 24 h längeren Inkubationszeit erkennen ließ. Bei 639v war dies schon nach 5 μM Tubacin zu beobachten. Auch für die SAHA-Kontrolle ließ sich nach 72 h eine erhöhte Reduktion der Zellvitalität feststellen.

Analog zu der Tubacin-Behandlung wurde eine Behandlung mit ST-80 durchgeführt.

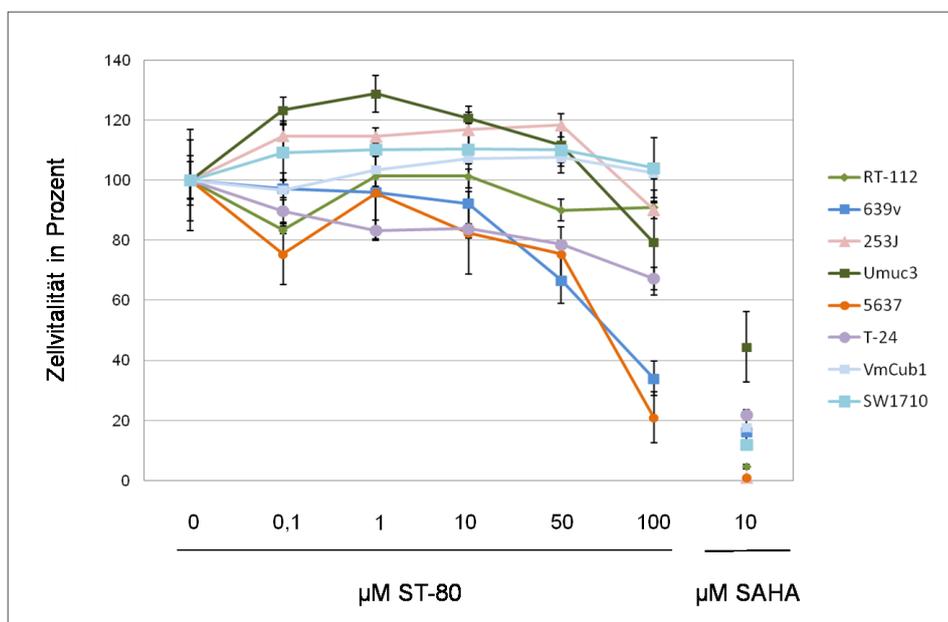


Abb. 3.14: CellTiter-Glo Assay zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Behandlung mit ST-80 von 8 Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112, 639v, 253J, Umuc3, SW1710, 5637, T-24 und VmCub1). Die Inkubationszeit betrug 72 h. Für die Behandlung mit ST-80 wurden die Konzentrationen 0,1, 1, 10, 50 und 100 μM ausgewählt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von ST-80 bzw. SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent abgebildet.

Abb. 3.14 zeigt, dass die Vitalität der Zellen bis 10 μM kaum reduziert wurde. Die Zelllinien SW1710 und VmCub1 zeigten sogar bei 100 μM keine Beeinträchtigung der Zellvitalität. Bei 253J und RT-112 konnte eine leichte Reduktion auf ca. 90 % beobachtet werden. Bei Umuc3 sank die Vitalität auf 80 % ab und bei T-24 auf ca. 67 %. Lediglich die Zelllinien 5637 ($\text{IC}_{50} = 74 \mu\text{M}$) und 639v ($\text{IC}_{50} = 75 \mu\text{M}$) zeigten bei 100 μM ST-80 eine stärkere Reaktion mit einer Abnahme der Vitalität um ca. 80 bzw. 66 %. Auch nach Behandlung mit geringeren Konzentrationen fiel die Reaktion von 5637 und 639v zusammen mit der Zelllinie T-24 etwas stärker aus als die der anderen Zelllinien. Die Effektivität von ST-80 blieb jedoch weit hinter der von Tubacin zurück.

Eine Behandlung mit Tubastatin A wurde mit den Zelllinien RT-112, 639v, 253J, Umuc3, 5637 und T-24 durchgeführt (siehe Abb. 3.15).

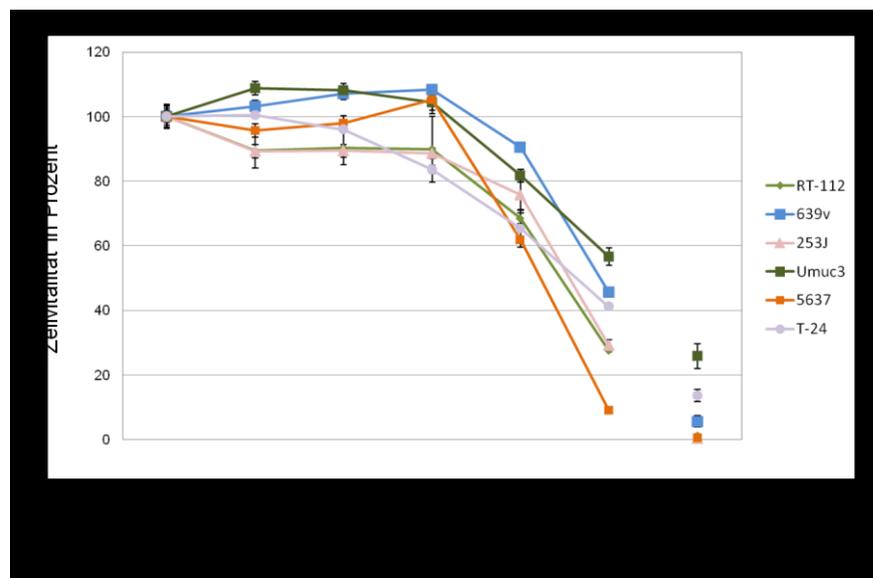


Abb. 3.15: *CellTiter-Glo Assay zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Behandlung mit Tubastatin A von 6 Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112, 639v, 253J, Umuc3, 5637 und T-24). Die Inkubationszeit betrug 72 h. Für die Behandlung mit Tubastatin A wurden die Konzentrationen 0,05, 0,25, 1, 5 und 10 μM ausgewählt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von Tubastatin A bzw. SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent abgebildet.*

Abb. 3.15 zeigt, dass Tubastatin A in hohen Konzentrationen die Zellvitalität weniger reduzierte als Tubacin. In niedrigeren Konzentrationen zeigte sich hingegen eine mit Tubacin vergleichbare Effektivität. Bis 1 μM wurde bei keiner Zelllinie eine Reduktion der Zellvitalität beobachtet; erst bei 5 μM zeigten sich deutliche zytotoxische Effekte. Hierbei erwies sich 5637 ($\text{IC}_{50} = 6,1 \mu\text{M}$) am sensitivsten, wohingegen Umuc3 am wenigsten auf Tubastatin A reagierte ($\text{IC}_{50} = 11,3 \mu\text{M}$).

Tabelle 3.1: IC₅₀-Werte der HDAC6-Inhibitoren Tubacin, ST-80 und Tubastatin A. Die IC₅₀-Werte wurden für die Zelllinien RT-112, 639v, 253J, Umuc3, 5637, T-24, VmCub1, BFTC905 und SW1710 berechnet. Die Inkubationszeit betrug 48 h (Tubacin) oder 72 h (ST-80 und Tubastatin A).

IC50	RT-112	639v	253J	Umuc3	5637	T-24	VmCub1	BFTC905	SW1710
Tubacin (µM)	9,6	8,3	12,1	6,6	9,1	6,4	4,7	7,1	-
ST-80 (µM)	761	75	133	126	74	173	193	-	212
Tubastatin A (µM)	7,2	9,5	7,8	11,3	6,1	8,1	-	-	-

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich Tubacin von den drei ausgetesteten HDAC6-Inhibitoren als spezifischste und zugleich potenteste Substanz erwiesen hat. Die Zellvitalität reduzierte sich dabei dosisabhängig mit der Stärke der HDAC6-Inhibition. Zelllinien mit erniedrigter HDAC6-Expression schienen hierbei im Allgemeinen besser auf eine Tubacin-Behandlung anzusprechen als Zellen mit erhöhter HDAC6-Expression. ST-80 war von den drei ausgetesteten Substanzen am wenigsten wirksam. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Tubacin für die weitere Austestung von Kombinationstherapien mit anderen antitumorös wirkenden Substanzen verwendet.

3.4.4 Effekte eines Hitzeschocks unter Tubacin-Behandlung auf die Zellvitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien

Da für einige Tumoren berichtet wurde, dass HDAC6 durch seine Mitwirkung bei der Aggresomenbildung eine wichtige Funktion bei der Reduktion von zellulärem Stress ausübt, sollte nun überprüft werden, ob sich über eine HDAC6-Inhibition mit Tubacin eine Sensitivierung der Zellen für stressinduzierende Stimuli, mit der Folge einer erhöhten Zytotoxizität, erzielen lässt. Als Stimulus für zellulären Stress wurde ein Hitzeschock gewählt. Hierfür wurden die Zellen einen Tag nach Aussaat mit Tubacin inkubiert und 24 h später ein Hitzeschock durchgeführt. Für den Hitzeschock wurden exemplarisch die Zelllinien RT-112, 5637, BFTC905 und VmCub1 ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16 dargestellt. Vergleicht man die Zellvitalität nach Hitzeschock mit der nach Tubacin-Behandlung, lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

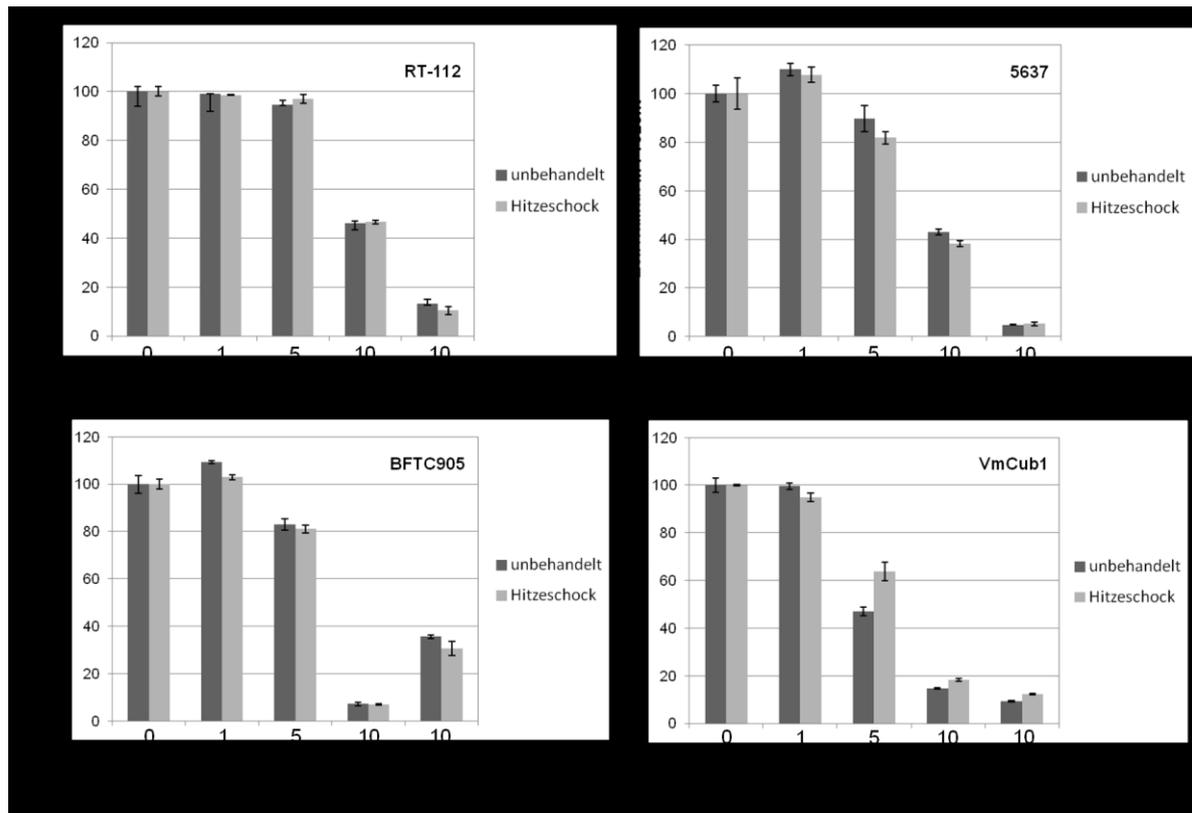


Abb. 3.16: *CellTiter-Glo Assay zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Behandlung mit Tubacin und Hitzeschock.* Bei den Zelllinien RT-112, 5637, BFTC905 und VmCub1 wurde 24 h nach Substanzzugabe ein Hitzeschock mittels 30-minütiger Inkubation in einem 42 °C warmen Wasserbad durchgeführt. Für die Behandlung mit Tubacin wurden die Konzentrationen 1, 5 und 10 μM ausgewählt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von Tubacin bzw. SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent dargestellt.

3.5 Medikamentöse Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG

In den nächsten Experimenten wurde untersucht, ob sich durch Kombination von Tubacin mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG eine synergistische Wirkung erzielen lässt.

3.5.1 Veränderung von pERK, HSP70, PARP und E2F1 nach HSP90-Inhibition

Um zunächst die Wirksamkeit von 17-AAG auf die ausgewählten Urothelkarzinom-Zelllinien nachzuweisen, wurde mittels Western-Blot-Analyse die Expressionsänderung verschiedener Proteine untersucht, welche bekanntlich durch HSP90-Inhibition beeinflusst werden (siehe Abb. 3.17). Hierfür wurden die Zelllinien RT-112 und VmCub1 für 24 h mit 0,1, 1 und 10 μM 17-AAG behandelt und anschließend Proteinlysate gewonnen. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

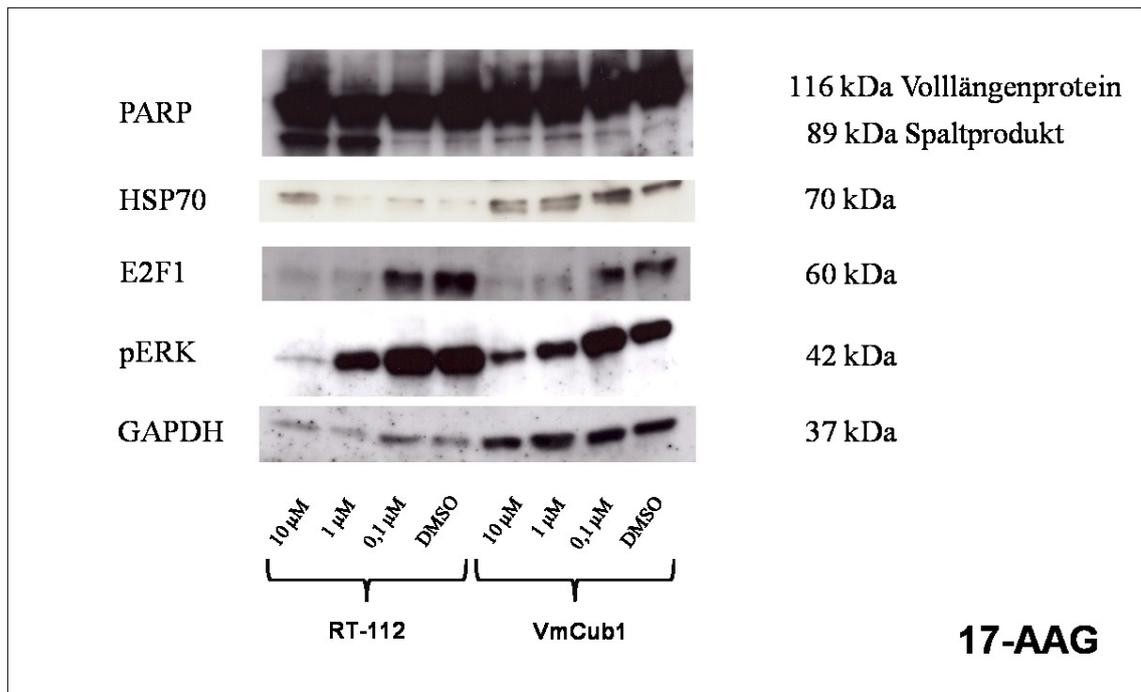


Abb. 3.17: Proteinblot zur Bestimmung der durch HSP90-Inhibition beeinflussten Proteine PARP, HSP70, E2F1 und pERK nach Behandlung mit 17-AAG. Analysiert wurden die Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112 und VmCub1. Diese wurden jeweils 24 h mit 17-AAG behandelt. Aufgetragen wurden 20 µg Protein. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Die Auswahl der Proteine, die im Western-Blot analysiert wurden, orientierte sich an den Arbeiten von Karkoulis et al. [75], welche für die drei Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, RT-4 und T-24 nach 17-AAG-Behandlung eine deutliche Reduktion der Zellvitalität, einen G1-Zellzyklusarrest sowie eine Apoptoseinduktion nachweisen konnten. Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose stellt die proteolytische Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) dar [188, 189]. In den untersuchten Zelllinien ließ sich eine gespaltene Form von PARP ab einer Konzentration von 1 µM 17-AAG in Höhe von 89 kDa detektieren. Diese war bei der Zelllinie RT-112 deutlich stärker ausgeprägt als bei VmCub1. Eine Expressionsänderung des Volllängenproteins wurde nicht detektiert.

ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) ist Bestandteil der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade. Diese Kaskade verläuft über das Raf-Protein. Dessen Interaktion mit HSP90 ist für seine Stabilität essenziell [190]. Wird HSP90 gehemmt, nimmt das Raf-Protein ab, mit der Folge einer verringerten Phosphorylierung von ERK. Analog sank in beiden analysierten Zelllinien ab einer Konzentration von 1 µM 17-AAG dosisabhängig die ERK-Phosphorylierung. Dieser Abfall war bei 1 µM für VmCub1 stärker ausgeprägt als für RT-112. Bei 10 µM hingegen ließ sich bei der Zelllinie RT-112 der deutlichere Effekt

beobachten. Eine geringe 17-AAG-Konzentration von 0,1 μM führte bei der Zelllinie RT-112 zu keiner Veränderung, bei VmCub1 hingegen zu einer deutlichen ERK-Phosphorylierung.

Des Weiteren wurde das HSP90-Cochaperon HSP70 untersucht. Wird HSP90 gehemmt, wird die Transkription von Genen induziert, die für Hitzeschockproteine wie HSP70 kodieren [191]. Entsprechend nahm in den untersuchten Zelllinien die Expression von HSP70 dosisabhängig mit steigender 17-AAG-Konzentration zu. Hierbei wies VmCub1 sowohl unbehandelt als auch unter 17-AAG eine deutlich höhere HSP70-Expression auf als RT-112. Der stärkste Effekt wurde erwartungsgemäß bei 10 μM 17-AAG beobachtet, wobei dieser bei RT-112 deutlich stärker ausfiel als bei VmCub1. Ein Spaltprodukt von HSP70 konnte in beiden Zelllinien mit steigender 17-AAG-Konzentration nachgewiesen werden.

Der Transkriptionsfaktor E2F1 ist wesentlich für die S-Phase des Zellzyklus. Da berichtet worden war, dass 17-AAG in den Zelllinien T-24, RT-112 und RT-4 zu einer Expressionsänderung bedeutender Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1, CDK4, RB1 und E2F1 führt [75], wurde überprüft, ob sich die Veränderung der E2F1-Expression für RT-112 replizieren und sich auch auf VmCub1 übertragen lässt. Tatsächlich war ab 1 μM 17-AAG eine deutliche Herunterregulation von E2F1 zu beobachten. Diese fiel bei 0,1 μM für die Zelllinie RT-112 etwas stärker aus als in den Arbeiten von Karkoulis et al. beschrieben.

3.5.2 Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit 17-AAG

Um die Wirksamkeit von 17-AAG auf die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien zu analysieren, wurde eine Monotherapie mit 17-AAG durchgeführt (siehe Abb. 3.18).

Wie aus Abb. 3.18 ersichtlich, führte 17-AAG bei allen Zelllinien zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellvitalität bei steigender Konzentration, wobei in den Konzentrationen 0,01 und 0,1 μM meist kein oder nur ein geringer Effekt erzielt werden konnte. Ab 1 μM sprachen alle Zelllinien deutlich auf die 17-AAG-Behandlung an. Die Zelllinie 5637 stellte sich mit einer IC_{50} von 0,9 μM als am wenigsten sensitiv heraus. Eine Korrelation zwischen der HDAC6-Expression der Zelllinien und der Reaktion auf 17-AAG konnte nicht hergestellt werden. Zwar erwies sich die Zelllinie VmCub1 als sehr sensitiv für eine 17-AAG-Behandlung. Jedoch konnte bei einer Zelllinie mit ähnlicher HDAC6-Expression wie BFTC905 kein vergleichbarer Effekt erzielt werden. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und dem Ansprechen auf eine HSP90-Inhibition war nicht erkennbar.

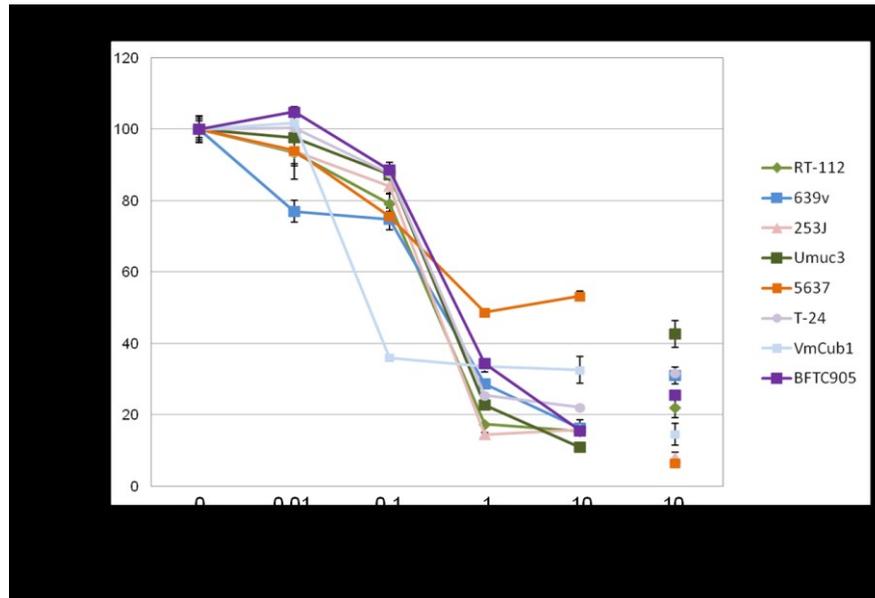


Abb. 3.18: *CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Behandlung mit 17-AAG von 8 Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112, 639v, 253J, Umuc3, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905). Alle Zelllinien wurden einmalig mit 17-AAG behandelt und 48 h inkubiert. Für 17-AAG wurden die Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 und 10 µM eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 µM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von 17-AAG bzw. SAHA in µM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent angegeben.*

3.5.3 Morphologische Veränderungen der Urothelkarzinom-Zelllinien nach 17-AAG-Behandlung

Parallel zur Monotherapie mit 17-AAG wurden die Zelllinien lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen hin untersucht (vgl. Abb. 3.19).

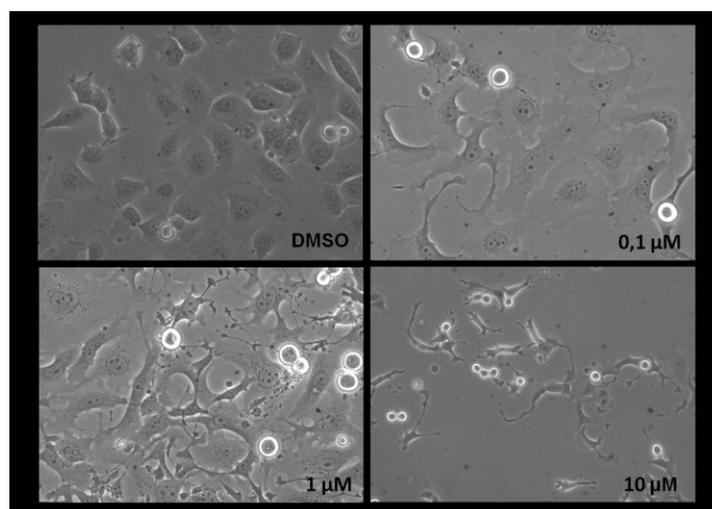


Abb. 3.19: *Lichtmikroskopische Darstellung der Urothelkarzinom-Zelllinie VmCub1 nach 17-AAG-Behandlung. Es wurden die Konzentrationen 0,1, 1 und 10 µM eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO gewählt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden 24 h nach Behandlung mit 17-AAG aufgenommen.*

Hierbei fiel auf, dass VmCub1, welche bei Monotherapie eine höhere Sensitivität für eine Behandlung mit 17-AAG gezeigt hat, dosisabhängig deutliche morphologische Auffälligkeiten aufwies. Schon bei $0,1 \mu\text{M}$ waren oft halbmondförmige Zellausläufer sichtbar. Zudem hatten sich bereits viele Zellen vom Schalenboden abgelöst. Diese Veränderungen nahmen mit zunehmender 17-AAG-Konzentration zu. Die anderen untersuchten Zelllinien waren morphologisch weniger auffällig, wobei auch hier apoptotisch bedingte Veränderungen nachweisbar waren. Exemplarisch ist RT-112 (siehe Abb. 3.20) dargestellt. Hier zeigte sich eine Auflockerung des Zellverbandes bei steigender 17-AAG-Konzentration, sowie eine zelltodbedingte Verkleinerung der Zellinseln. Aufgrund des massiven Zellsterbens hatten sich wie zuvor bei VmCub1 viele Zellen vom Schalenboden abgelöst und schwammen im Medium oben auf.

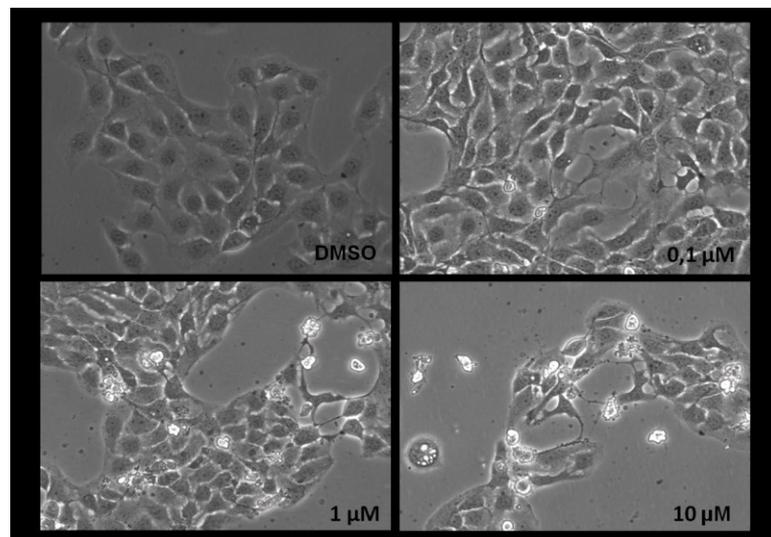


Abb. 3.20: *Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie RT-112 nach 17-AAG-Behandlung.* Es wurden die Konzentrationen $0,1$, 1 und $10 \mu\text{M}$ eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO gewählt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden 24 h nach Behandlung mit 17-AAG aufgenommen.

3.5.4 Kombinationstherapie der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Tubacin und 17-AAG

Nach Durchführung der Monotherapien wurden entsprechende Kombinationstherapien mit 17-AAG und Tubacin durchgeführt. Für die Analyse wurden die Zelllinien RT-112, 639v, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905 ausgewählt. Tubacin wurde in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ eingesetzt, da ab dieser Konzentration in den meisten Zelllinien eine deutliche Beeinflussung der Zellvitalität nachgewiesen werden konnte. Für 17-AAG wurden die Konzentrationen $0,1$ und $1 \mu\text{M}$ ausgewählt. Erstere stellt hierbei eine Konzentration dar, bei welcher im Rahmen der Monotherapie meist nur geringe Effekte nachweisbar waren, wohingegen $1 \mu\text{M}$ 17-AAG in allen Zelllinien eine deutliche Reduktion der Zellvitalität zur

Folge hatte. Eine Kombinationstherapie mit diesen Konzentrationen sollte zeigen, ob sich die Einzelwirkungen der beiden Substanzen aufaddieren oder sogar potenzieren. Die Ergebnisse der Kombinationstherapien sind im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien in Abb. 3.21 dargestellt.

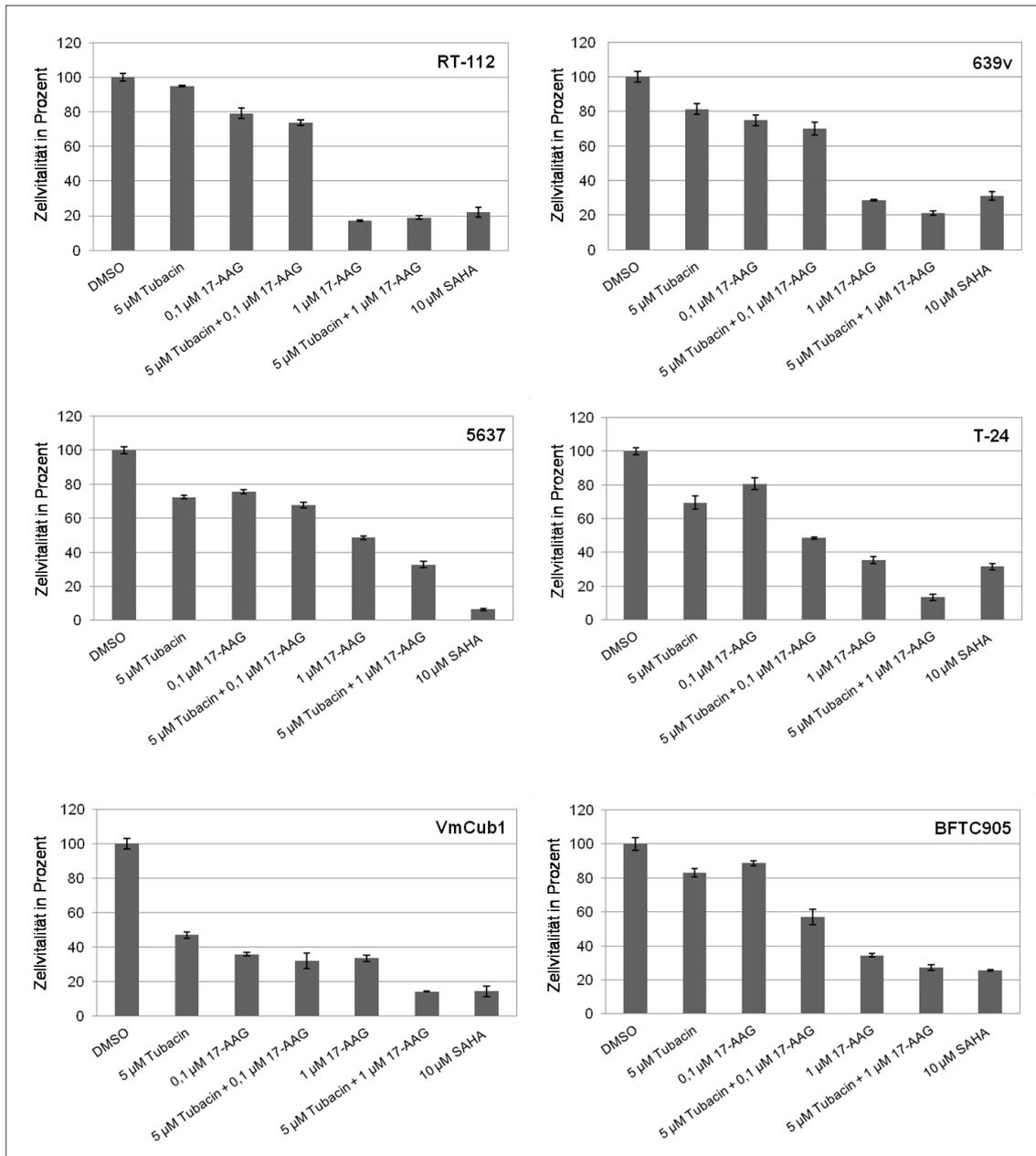


Abb. 3.21: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Behandlung mit 17-AAG und Tubacin von den Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, 639v, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905. Diese wurden 24 h nach Aussaat einmalig für 48 h mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Für 17-AAG wurden die Konzentrationen 0,1 und 1 μ M verwendet, für Tubacin 5 μ M. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μ M SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von 17-AAG, Tubacin und SAHA in μ M dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent dargestellt.

Die Abbildungen zeigen, dass die Zelllinien unterschiedlich auf eine Kombinationstherapie reagiert haben. Bei T-24 und BFTC905 konnte durch eine Kombination von 5 μM Tubacin mit 0,1 μM 17-AAG eine deutliche synergistische Wirkung erzielt werden. Bei RT-112, 639v und 5637 hingegen war in keiner der eingesetzten Konzentrationen ein vergleichbarer Effekt der Kombinationstherapie nachweisbar. Die Zelllinie VmCub1 erwies sich für eine Monotherapie mit beiden Substanzen als sehr sensitiv. Nach Behandlung mit 5 μM Tubacin war nur noch eine Zellvitalität von 47 %, nach 0,1 μM 17-AAG von 36 % und nach 1 μM 17-AAG von 34 % zu beobachten. Durch eine Kombination beider Substanzen ließ sich jedoch kein additiver Effekt erzielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in vielen Zelllinien durch eine Kombination von Tubacin und 17-AAG keine große zusätzliche Reduktion der Zellvitalität erzielen ließ. Auch VmCub1 erwies sich nicht als übermäßig sensitiv für eine Kombinationstherapie, obwohl sowohl nach Tubacin- als auch nach 17-AAG-Behandlung eine deutliche Reduktion der Zellvitalität festgestellt werden konnte. Lediglich bei den Zelllinien T-24 und BFTC905 deutete sich eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen an.

3.5.5 Dosiswirkungskurve einer Kombinationstherapie von Tubacin mit 17-AAG

Um mögliche durch Tubacin und 17-AAG erzielte Synergien besser erfassen zu können, wurden die Zelllinien 639v und VmCub1 mit einer größeren Zahl verschiedener Konzentrationen Tubacin und 17-AAG behandelt. Die Zelllinie VmCub1 wurde ausgewählt, weil sie zum einen eine sehr niedrige HDAC6-Expression aufweist, und zum anderen sowohl auf eine Behandlung mit Tubacin als auch mit 17-AAG sehr sensitiv reagiert hat. Die Linie 639v hingegen stellt eine Zelllinie mit hoher HDAC6-Expression dar. Auch sie hatte ein gutes Ansprechen auf Tubacin und 17-AAG gezeigt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.22 dargestellt. Für beide Zelllinien ist die Reduktion der Vitalität mit steigender Tubacin- bzw. 17-AAG-Konzentration erkennbar. Hierbei reagierte VmCub1 vor allem in niedrigen 17-AAG-Konzentrationen stärker auf eine Kombinationstherapie mit Tubacin als 639v. Ab 1 μM 17-AAG wurde dieser Effekt deutlich schwächer. Auch bei 639v war ab 1 μM 17-AAG durch Steigerung der Tubacinkonzentration kein deutlicher Einfluss mehr auf die Zellvitalität sichtbar.

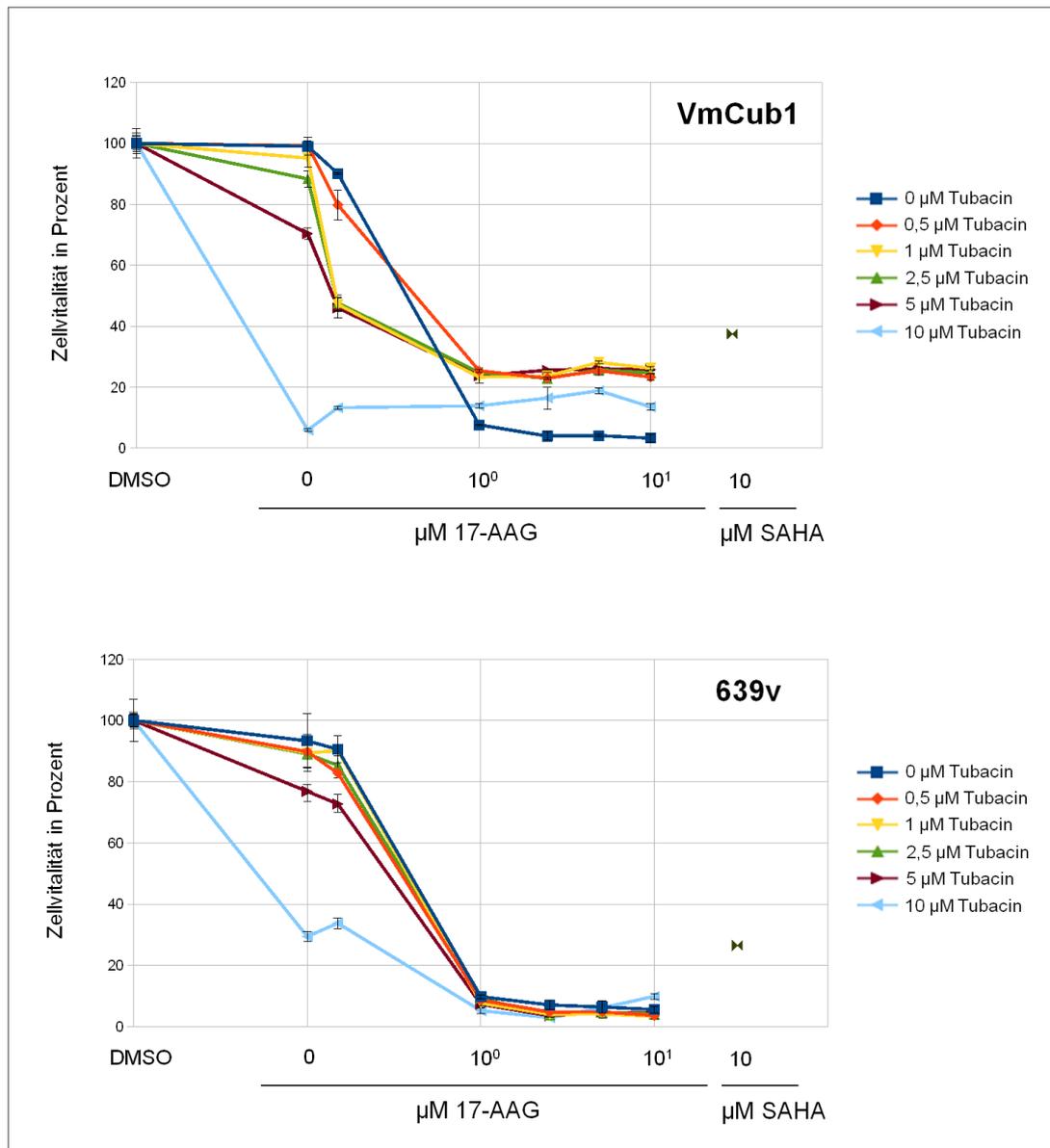


Abb. 3.22: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität der Urothelkarzinom-Zelllinien VmCub1 und 639v nach Behandlung mit 17-AAG und Tubacin. Diese wurden einmalig für 48 h mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Für Tubacin wurden die Konzentrationen 0, 0,5, 1, 2,5, 5 und 10 μM eingesetzt, für 17-AAG die Konzentrationen 0, 0,05, 1, 2,5, 5 und 10 μM . Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von 17-AAG in logarithmischem Maßstab bzw. von SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent angegeben.

3.6 Medikamentöse Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien mit dem Proteasominhibitor Bortezomib

Als zweite Substanz für eine Kombinationstherapie mit Tubacin wurde der Proteasominhibitor Bortezomib (PS-341, Velcade) ausgewählt. Bortezomib behindert den Abbau fehlgefalteter Proteine durch das Proteasom, mit der Folge einer Akkumulation dieser toxisch auf die Zelle wirkenden Proteine. Tubacin wiederum hemmt mittels HDAC6-

Inhibition den Transport dieser zytotoxisch wirkenden Proteine zu den Aggresomen. Beide erhöhen somit den intrazellulären Stress und können somit Apoptose induzieren. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien durch die Kombination von Bortezomib und Tubacin beeinflusst werden kann.

3.6.1 Veränderung von c-FLIP und p21 nach Proteasominhibition

Die Wirksamkeit von Bortezomib auf die ausgewählten Urothelkarzinom-Zelllinien wurde wie zuvor für 17-AAG mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Hierbei wurde die Expressionsänderung der Proteine c-FLIP und p21 nach Bortezomib-Behandlung detektiert (siehe Abb. 3.23).

Eine Behandlung mit Bortezomib wurde mit den Urothelkarzinom-Zelllinien VmCub1, 639v, J-82 und RT-4 durchgeführt (siehe Abb. 3.23). Bei der Zelllinie RT-4 war ein c-FLIP-Nachweis nach 1 μ M Bortezomib-Behandlung nicht möglich, da in dieser Konzentration alle Zellen abgestorben waren.

Die Western-Blot-Analyse zeigte bei allen Zelllinien eine dosisabhängige Herunterregulation von c-FLIP_L nach Bortezomib-Behandlung. Diese war in J-82 am deutlichsten. In RT-4 war nach 50 und 100 nM Bortezomib kein c-FLIP_L-Protein mehr nachweisbar, bei VmCub1 ab 100 nM. In der Zelllinie 639v war ein c-FLIP_L-Nachweis nicht möglich; lediglich bei der DMSO-Kontrolle war eine schwache Bande detektierbar.

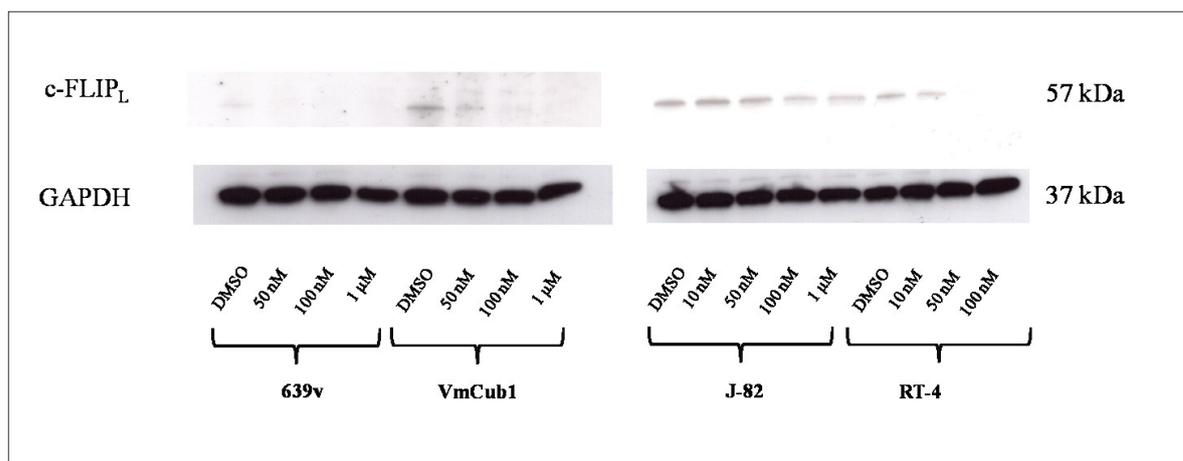


Abb. 3.23: Proteinblot zur Bestimmung von c-FLIP nach Behandlung mit Bortezomib in den Urothelkarzinom-Zelllinien 639v, VmCub1, J-82 und RT-4. Diese wurden jeweils 24 h einmalig mit Bortezomib behandelt. Aufgetragen wurden 10 μ g Protein. Für die Zelllinien 639v und VmCub1 wurden exemplarisch Lysate aufgetragen, welche zuvor mit 50 nM, 100 nM und 1 μ M Bortezomib behandelt worden waren. Für die Zelllinie J-82 wurden die Konzentrationen 10, 50 und 100 nM, sowie 1 μ M, und für RT-4 die Konzentrationen 10, 50 und 100 nM eingesetzt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Die Negativkontrolle wurde mit DMSO behandelt.

Analog wurden die Zelllinien J-82 und VmCub1 auf eine p21-Induktion hin untersucht (siehe Abb. 3.24).

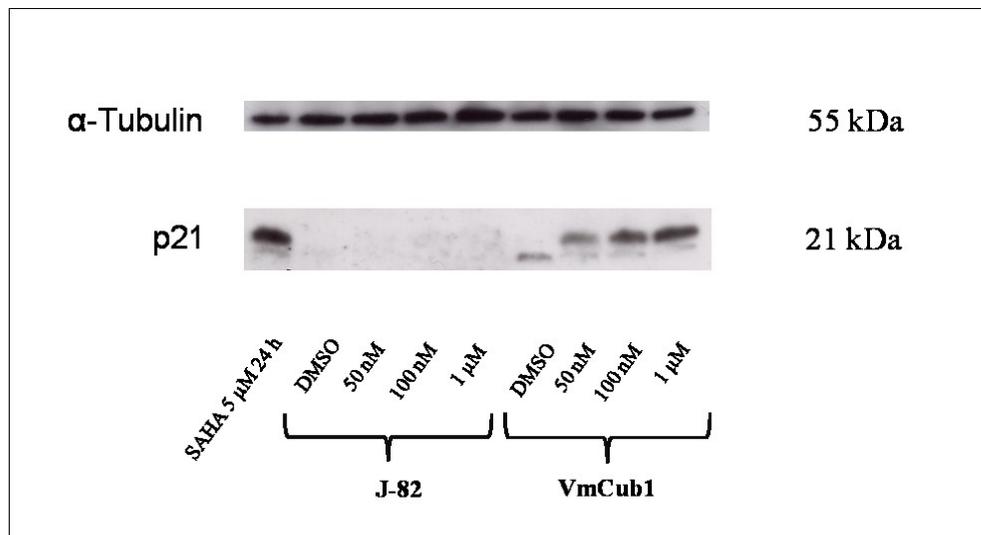


Abb. 3.24: **Proteinblot zur Bestimmung von p21 nach Behandlung mit Bortezomib in den Urothelkarzinom-Zelllinien J-82 und VmCub1.** Diese wurden jeweils 24 h mit Bortezomib in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 1 µM behandelt. Als Ladungskontrolle diente α-Tubulin, als Lösungsmittelkontrolle DMSO. Aufgetragen wurden 30 µg Protein. Als Positivkontrolle für eine p21-Induktion diente die Zelllinie VmCub1, welche zuvor 24 h mit 5 µM SAHA inkubiert worden war.

Bei VmCub1 konnte ab 50 nM eine p21-Induktion detektiert werden, welche dosisabhängig zunahm. In der Zelllinie J-82 hingegen war nach Bortezomib-Behandlung keine Induktion von p21 zu beobachten.

3.6.2 Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit Bortezomib

Der Effekt von Bortezomib auf die Zellvitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien wurde zunächst in einer Monotherapie analysiert. Hierfür wurden die Zelllinien RT-112, 639v, Umuc3, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905 ausgewählt (vgl. Abb. 3.25).

Die Abbildung zeigt, dass Bortezomibkonzentrationen bis 10 nM nur einen geringen Effekt auf die Zellvitalität hatten. Ab 50 nM war hingegen bei allen Zelllinien eine dosisabhängig stärker werdende Zytotoxizität nachweisbar. Bei 1 µM Bortezomib waren kaum mehr Zellen lebensfähig. Umuc3 besaß mit einer IC_{50} von 53,3 nM die geringste Sensitivität. RT-112 sprach vor allem in niedrigen Konzentrationen deutlich auf die Bortezomib-Behandlung an, da nach 10 nM bereits eine Vitalitätsreduktion von 50 % beobachtet werden konnte ($IC_{50} = 12,4$ nM).

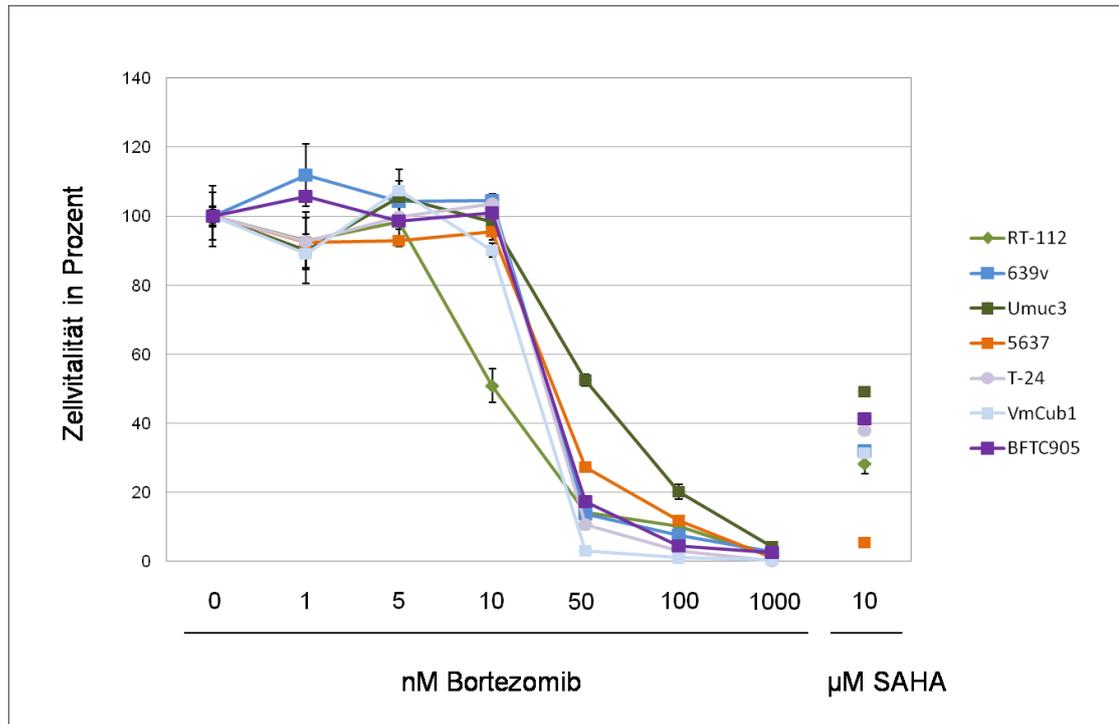


Abb. 3.25: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Behandlung mit Bortezomib von 8 Urothelkarzinom-Zelllinien (RT-112, 639v, Umuc3, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905). Alle Zelllinien wurden einmalig mit Bortezomib behandelt und anschließend 48 h lang inkubiert. Für die Bortezomib-Behandlung wurden die Konzentrationen 1, 5, 10, 50, 100 und 1000 nM eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 µM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von Bortezomib in nM sowie die eingesetzte SAHA-Konzentration in µM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent angegeben.

Nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib in den Konzentrationen 1, 5, 10, 50, 100 und 1000 nM wurden die Zellen außerdem lichtmikroskopisch untersucht. Die meisten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt bereits fragmentiert.

3.6.3 Kombinationstherapie der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Tubacin und Bortezomib

Ergänzend zu den Monotherapien wurden mit den Zelllinien 639v, T-24, VmCub1, RT-112, 5637 und BFTC905 Kombinationstherapien mit Bortezomib und Tubacin durchgeführt. Für Bortezomib wurden die Konzentrationen 10 nM und 50 nM ausgewählt, da nach 10 nM Bortezomib eine mäßige Einschränkung der Zellvitalität beobachtet werden konnte, wohingegen eine Konzentration von 50 nM stark zytotoxisch wirkte. Die Ergebnisse wurden mit der jeweiligen Monotherapie verglichen und überprüft, ob synergistische Effekte erkennbar waren (vgl. Abb. 3.26).

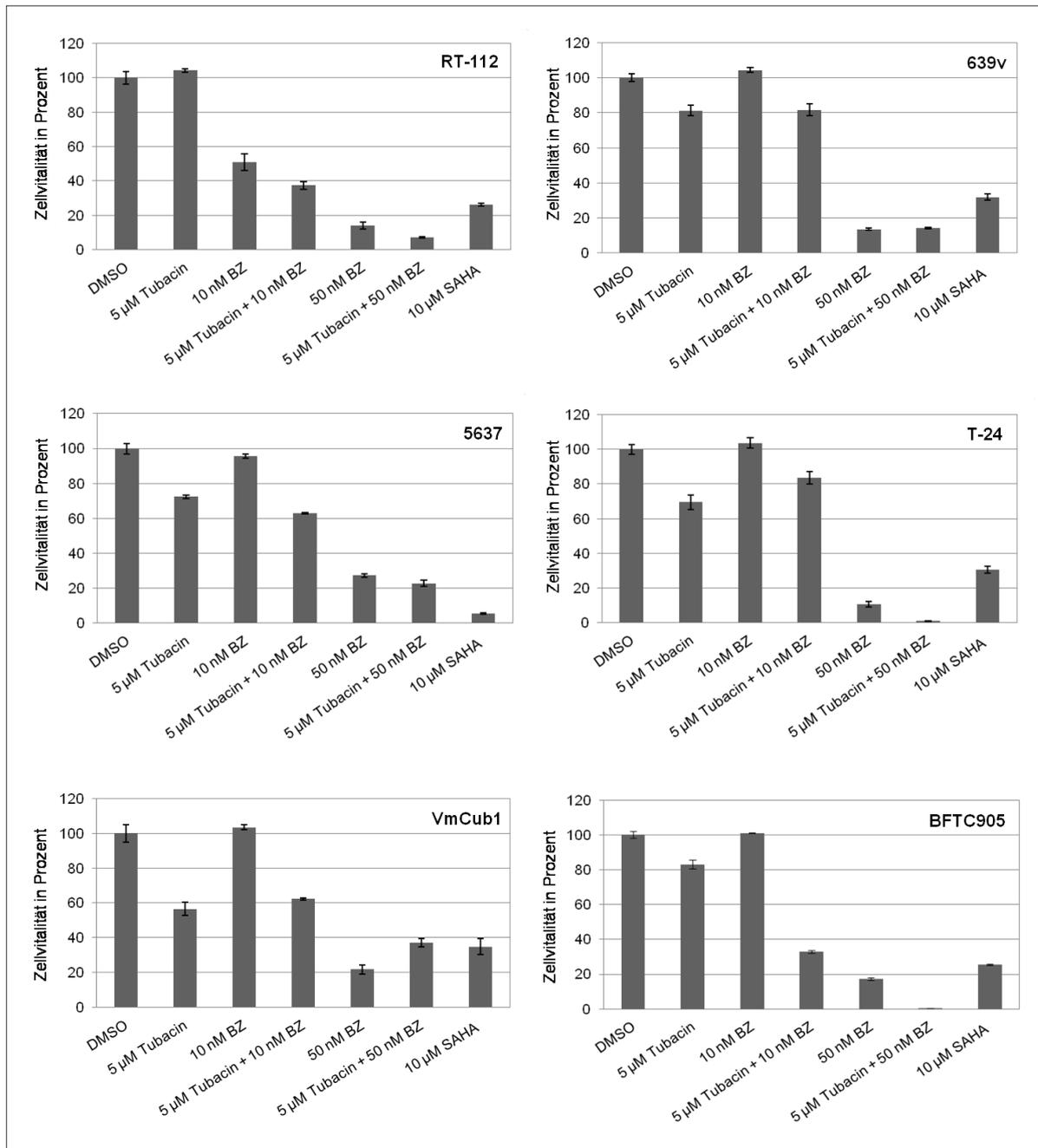


Abb. 3.26: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Behandlung mit Tubacin und Bortezomib von den Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, 639v, 5637, T-24, VmCub1 und BFTC905. Diese wurden einmalig mit den beiden Substanzen behandelt und 48 h lang inkubiert. Für Tubacin wurde eine Konzentration von 5 µM eingesetzt, für Bortezomib die Konzentrationen 10 nM und 50 nM. Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 µM SAHA behandelt. Auf der Abszisse sind die eingesetzten Konzentrationen von Tubacin und SAHA in µM, sowie für Bortezomib in nM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent angegeben.

Abb. 3.26 zeigt, dass bei BFTC905 durch die Kombinationstherapie der stärkste Effekt zu beobachten war. Bei 10 nM Bortezomib war keine Reduktion der Zellvitalität messbar. Eine Behandlung mit 5 µM Tubacin senkte die Vitalität um ca. 20 %. Durch Kombination beider

Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen sank die Zellvitalität auf ca. 33 % ab. Eine Monotherapie mit 50 nM Bortezomib reduzierte die Vitalität um ca. 80 %. Nach Kombination mit Tubacin waren keine Zellen mehr lebensfähig. Geringere synergistische Effekte ließen sich für die Zelllinien 5637 und RT-112 erzielen. Bei RT-112 konnte durch 10 nM Bortezomib eine Reduktion der Vitalität um 50 % erzielt werden, eine Behandlung mit 5 µM Tubacin führte hingegen zu keiner Einschränkung der Zellvitalität. Eine Kombination beider Substanzen senkte die Vitalität um weitere 10 %. Gleiches galt für 50 nM Bortezomib. Hier führte eine Monotherapie zu einer Restvitalität von ca. 14 %. Nach Kombination mit Tubacin waren nur noch 7 % der Zellen lebensfähig. Auch bei der Zelllinie 5637 konnte durch Kombination von 10 nM Bortezomib mit Tubacin eine additive Wirkung erzielt werden. Bei Kombination von 50 nM Bortezomib mit Tubacin hingegen ließ sich der Effekt von Bortezomib nur mäßig um ca. 5 % steigern. In den Zelllinien 639v und VmCub1 wiederum ließ sich durch die Kombinationstherapie kein synergistischer Effekt erzielen, bei T-24 zeigte sich lediglich ein geringer Effekt bei einer Kombination mit 50 nM Bortezomib.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein synergistischer Effekt bei BFTC905, RT-112 und 5637 erkennbar war. Das Ansprechen der Zelllinien auf die medikamentösen Behandlungen war somit unabhängig von der Höhe der HDAC6-Expression.

3.6.4 Dosiswirkungskurve einer Kombinationstherapie von Tubacin mit Bortezomib

Analog zu Abschnitt 3.5.5 wurde auch von Bortezomib und Tubacin eine detaillierte Dosiswirkungskurve für die Zelllinien 639v und VmCub1 erstellt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung (vgl. Abb. 3.27) dargestellt.

Für beide Zelllinien ist die Reduktion der Vitalität mit steigender Tubacin- bzw. Bortezomibkonzentration erkennbar. Bei Tubacinkonzentrationen bis 5 µM wurden beide Zelllinien vergleichbar beeinflusst. Ab 10 µM Tubacin erkennt man bei VmCub1 eine stärkere Vitalitätsreduktion im Vergleich zu 639v. Vergleicht man zudem den Verlauf der Vitalität in Abhängigkeit von der Bortezomibkonzentration, so wird deutlich, dass erst ab 50 nM Bortezomib eine deutliche Reduktion der Vitalität beobachtet werden kann.

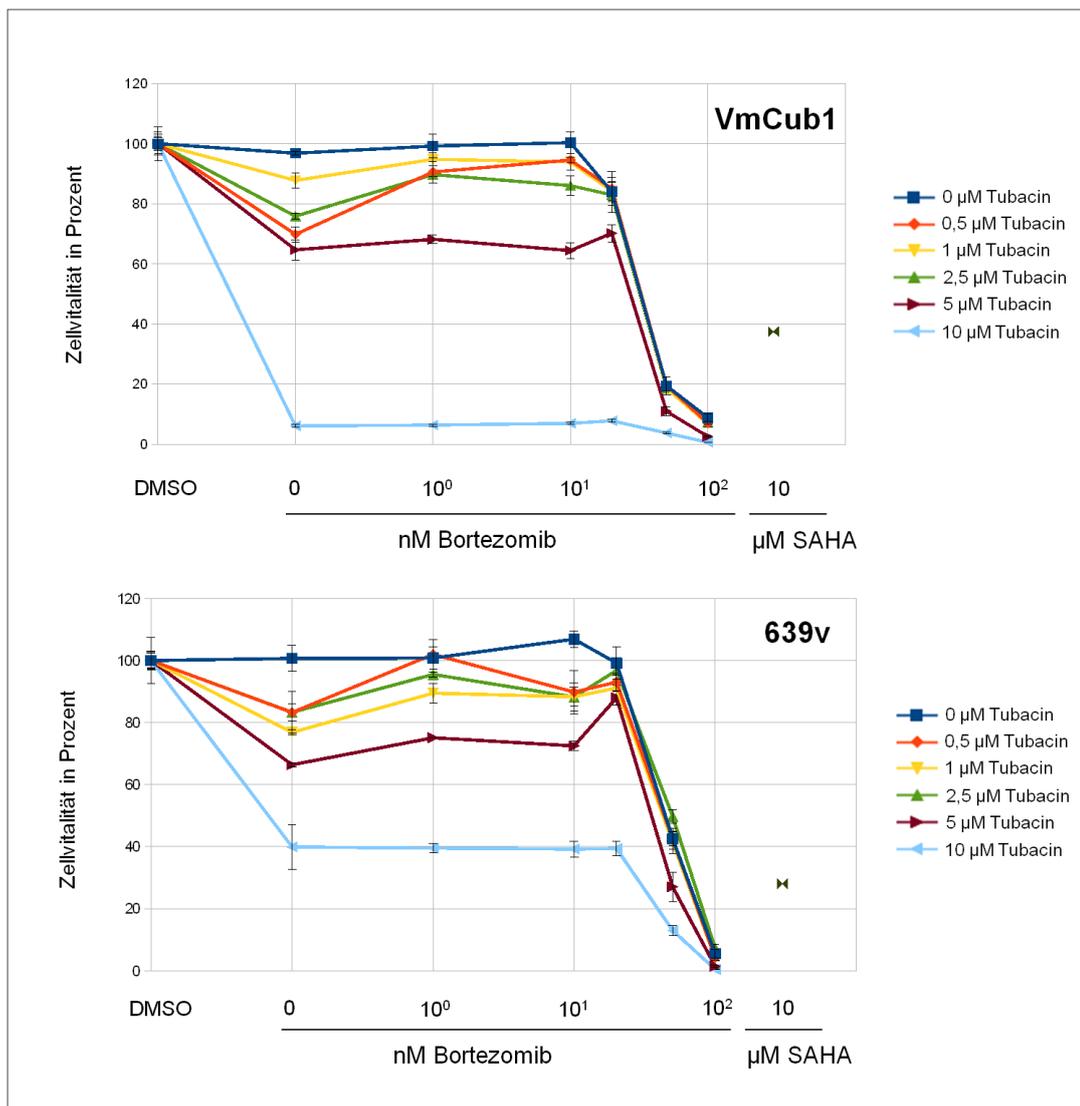


Abb. 3.27: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität der Urothelkarzinom-Zelllinien VmCub1 und 639v nach Behandlung mit Bortezomib und Tubacin. Diese wurden einmalig für 48 h mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Für Bortezomib wurden die Konzentrationen 0, 1, 10, 20, 50 und 100 nM eingesetzt, für Tubacin die Konzentrationen 0, 0,5, 1, 2,5, 5 und 10 μM . Als Lösungsmittelkontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen eingesetzt. Die Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis eines zytotoxischen Effektes wurden Zellen mit 10 μM SAHA behandelt. Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von Bortezomib in logarithmischem Maßstab in nM bzw. von SAHA in μM dargestellt, auf der Ordinate ist die Zellvitalität in Prozent angegeben.

3.7 Analyse der HDAC6-Funktion mittels siRNA-Analyse

Die HDAC6-Expression hatte sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zelllinienabhängig als sehr heterogen erwiesen. Nach Tubacin-Behandlung wurde zwar ab 5 μM eine deutliche Reduktion der Vitalität sichtbar, diese war jedoch unabhängig vom HDAC6-Expressionsniveau. Da durch Tubacin lediglich das HDAC6-Enzym gehemmt wird,

sollte untersucht werden, inwieweit eine Herunterregulation der HDAC6-Expression mittels siRNA die Zellvitalität beeinflusst. Die Transfektion wurde mit 639v durchgeführt, da diese zum einen auf Proteinebene eine deutlich erhöhte HDAC6-Expression aufwies, und sich zum anderen in Vorversuchen als gut transfizierbar erwiesen hatte. Die siRNA-Wirkung wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verfolgt. Die HDAC6-Expression auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Als interne Kontrolle wurde TBP verwendet (vgl. Abb. 3.28).

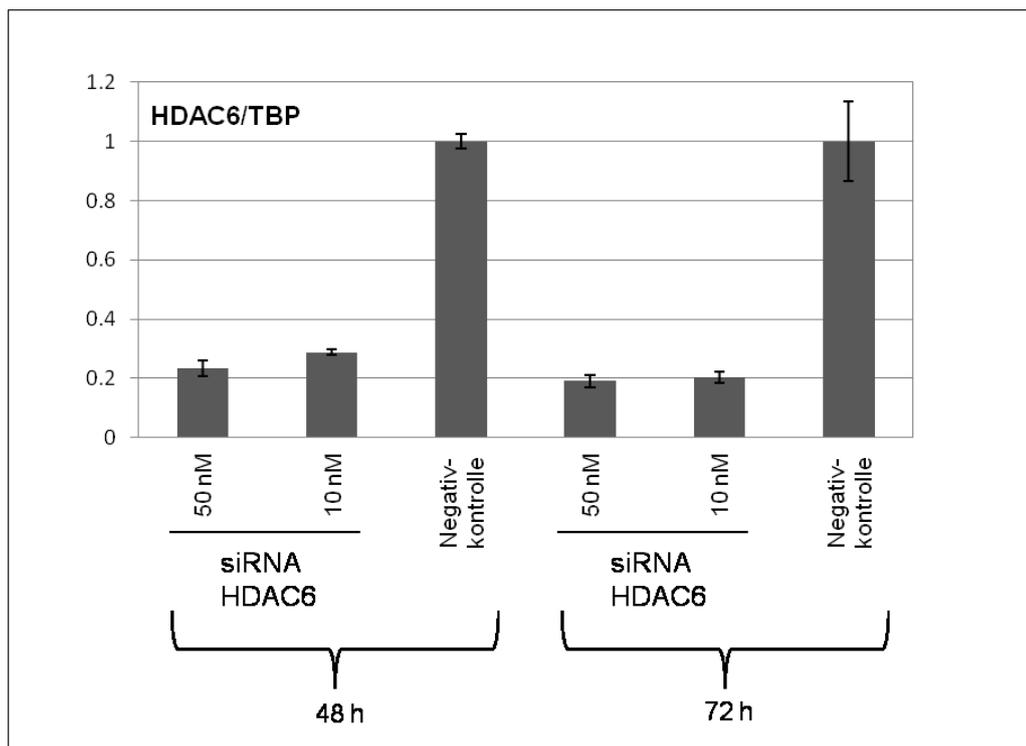


Abb. 3.28: **Relative HDAC6-Expression der Urothelkarzinom-Zelllinie 639v nach Transfektion einer HDAC6-spezifischen siRNA in den Konzentrationen 10 nM und 50 nM.** Die HDAC6-Expression auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Negativkontrolle wurde in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Als Referenzen wurde TBP gewählt und die Proben entsprechend normiert. Der Expressionsniveau der Negativkontrolle wurde als 1 gesetzt und die Expressionswerte der anderen Proben darauf bezogen.

Abb. 3.28 zeigt, dass die stärkste Expressionsverminderung bei einer Konzentration von 50 nM und einer Inkubationszeit von 72 h erzielt wurde.

Um zu überprüfen, ob die siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC6 auch auf Proteinebene nachgewiesen werden kann, wurden parallel von 639v entsprechend der oben genannten Konzentrationen und Inkubationszeiten Proteinlysate gewonnen und die HDAC6-Expression mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert (vgl. Abb. 3.29).

Der Western-Blot zeigt, dass auf Proteinebene nach 72 h in einer Konzentration von 10 nM die HDAC6-Expression am stärksten verringert war.

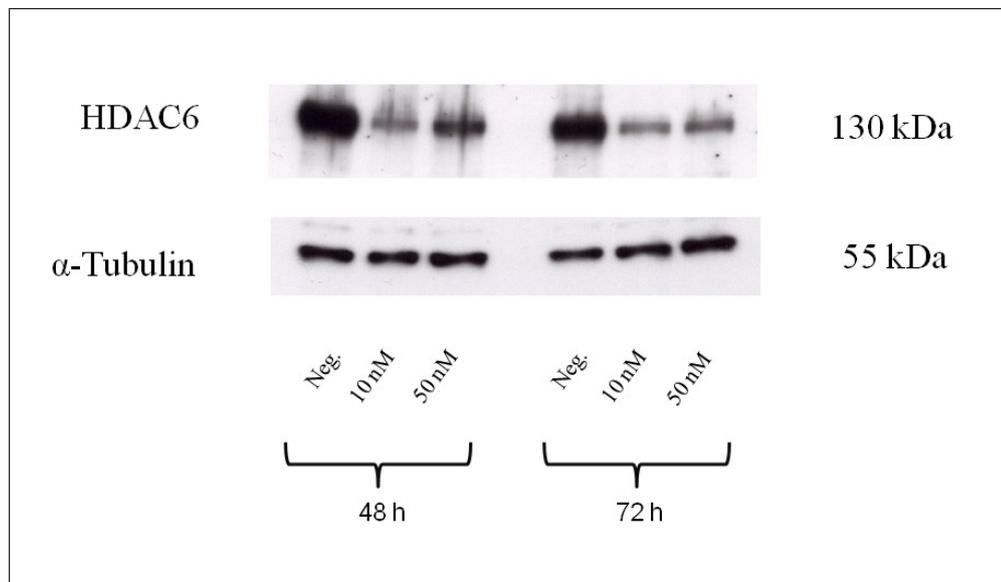


Abb. 3.29: **Proteinblot zur Bestimmung der Höhe der HDAC6-Expression in der Urothelkarzinom-Zelllinie 639v nach Transfektion mit einer HDAC6-spezifischen siRNA.** Diese wurde in den Konzentrationen 10 nM und 50 nM eingesetzt. Die Inkubationszeiten betragen 48 h und 72 h. Aufgetragen wurden 10 µg Protein. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin verwendet.

Da für die zelluläre Wirkung von HDAC6 vor allem das HDAC6-Protein von Bedeutung ist und eine medikamentöse HDAC6-Inhibition hauptsächlich einen Effekt auf Proteinebene aufweist, wurden für die folgenden siRNA-Experimente eine Konzentration von 10 nM sowie eine 72-stündige Inkubationszeit ausgewählt, um eine möglichst starke Herunterregulation des HDAC6-Proteins zu erzielen.

3.7.1 Wirkung einer HDAC6-spezifischen siRNA auf die Zellvitalität

Um zu überprüfen, ob eine siRNA-vermittelte HDAC6-Herunterregulation einen Effekt auf die Vitalität der Urothelkarzinom-Zelllinien besitzt und ob dieser sich von einer medikamentösen HDAC6-Inhibition mit Tubacin unterscheidet, wurden die Zelllinien 639v und RT-112 mit der zuvor ausgetesteten HDAC6-spezifischen siRNA (vgl. Abb. 3.30) transfiziert. Abb. 3.30 zeigt, dass eine Herunterregulation von HDAC6 mittels siRNA das Überleben der Zellen nicht signifikant beeinflusst hat.

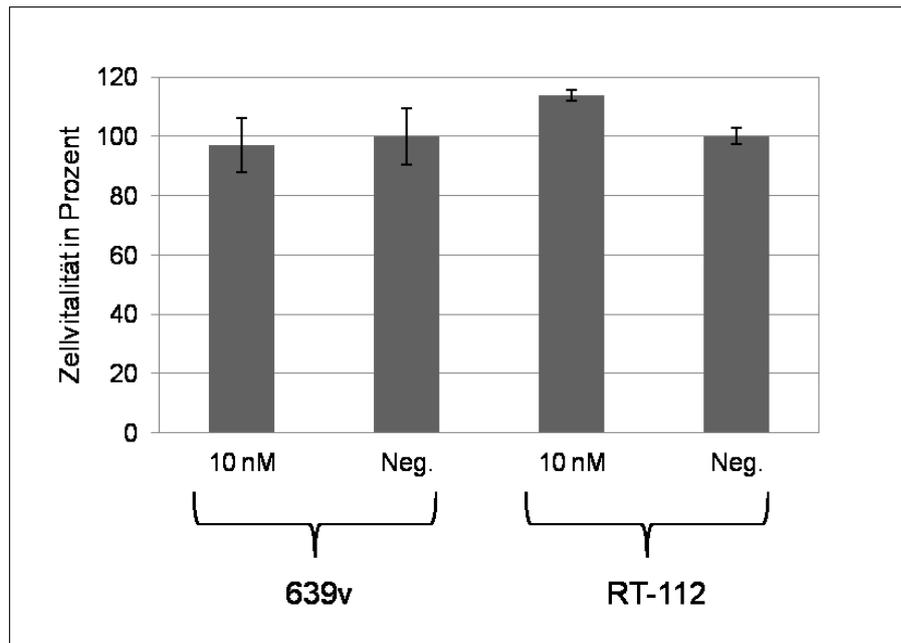


Abb. 3.30: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Transfektion der Urothelkarzinom-Zelllinien 639v und RT-112 mit einer HDAC6-spezifischen siRNA. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Die eingesetzte siRNA-Konzentration betrug 10 nM.

Parallel zur Messung der Zellvitalität wurden Proteinlysate angefertigt, um erneut mittels Western-Blot-Analyse eine erfolgreiche Herunterregulation des HDAC6-Proteins nachweisen zu können (siehe Abb. 3.31).

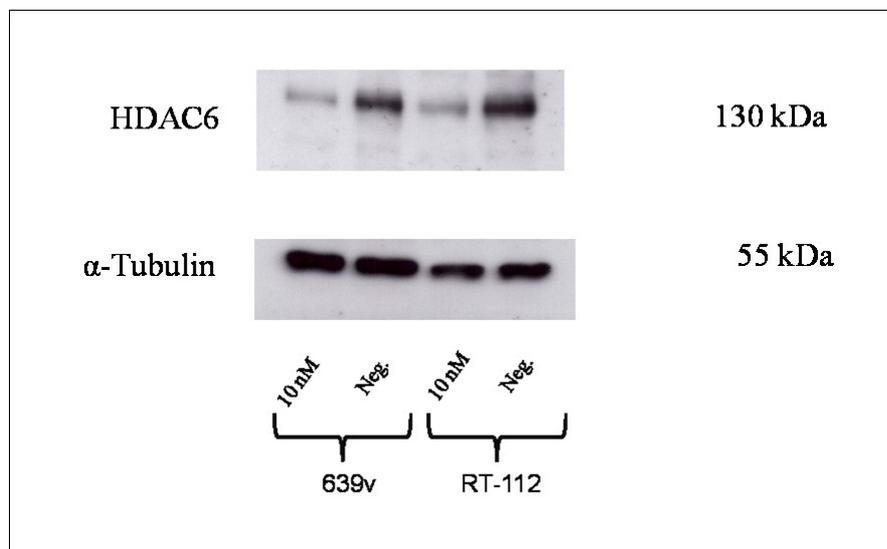


Abb. 3.31: Proteinblot zur Bestimmung der Höhe der HDAC6-Expression in den Urothelkarzinom-Zelllinien 639v und RT-112 nach Transfektion mit einer HDAC6-spezifischen siRNA. Diese wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Aufgetragen wurden 10 μ g Protein. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

3.7.2 Wirkung eines Hitzeschocks auf Urothelkarzinom-Zelllinien nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC6

Die vorherigen Versuche deuten darauf hin, dass Urothelkarzinom-Zelllinien unter normalen Bedingungen nicht essenziell auf HDAC6 angewiesen sind. Daher wurde untersucht, ob sich nach stressinduzierenden Stimuli eine erhöhte Abhängigkeit der Zelllinien von HDAC6 beobachten lässt, wie sie beispielsweise in leukämischen Zelllinien besteht. Grundlage dieser Überlegungen bildet die bekannte Interaktion von HDAC6 mit dem Ubiquitin-Proteasom-System. Als Stimulus für zellulären Stress wurde ein Hitzeschock gewählt (vgl. Abb. 3.32).

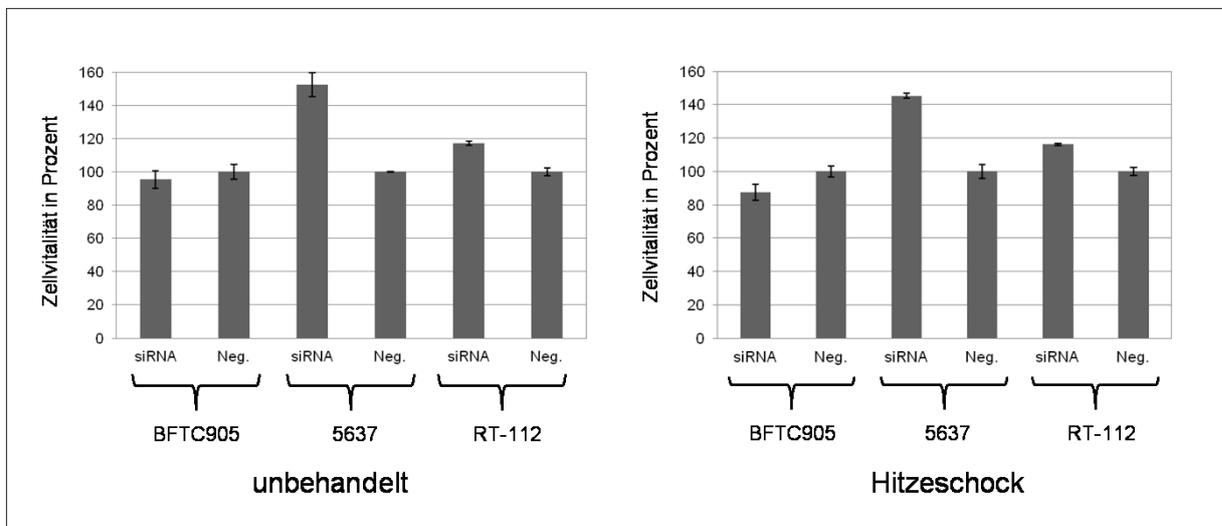


Abb. 3.32: CellTiter-Glo Assay zur Bestimmung der Zellvitalität nach Transfektion der Urothelkarzinom-Zelllinien BFTC905, 5637 und RT-112 mit einer HDAC6-spezifischen siRNA und einem Hitzeschock. Die Inkubationszeit betrug 72 h und die eingesetzte siRNA-Konzentration 10 nM. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat transfiziert und weitere 48 h später für 30 min in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurde die Zellvitalität mittels CellTiter-Glo Assay quantifiziert.

Abb. 3.32 zeigt, dass die Zellvitalität durch den Hitzeschock nicht signifikant reduziert wurde. Lediglich bei BFTC905 ließ sich nach siRNA-Transfektion bei den unbehandelten Zellen ein leichter Abfall der Zellvitalität von 5 % und bei den mit Hitzeschock behandelten Zellen um 13 % beobachten.

Für den Nachweis einer effektiven Herunterregulation von HDAC6 wurden parallel Proteinlysate gewonnen und das HDAC6-Protein mittels Western-Blot-Analyse dargestellt (siehe Abb. 3.33).

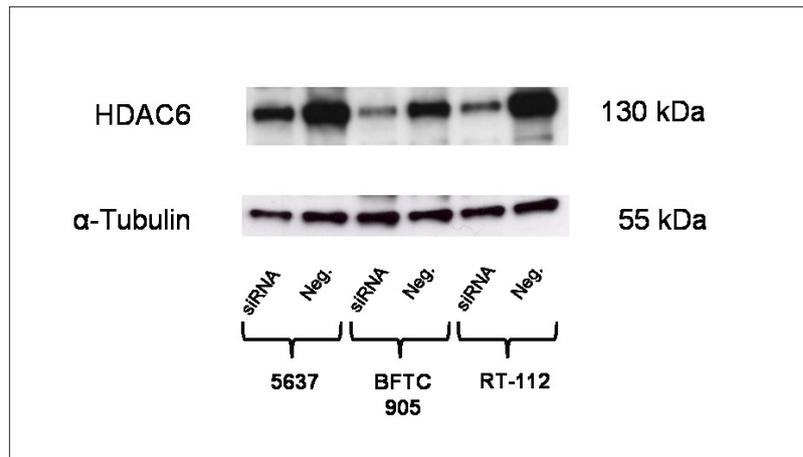


Abb. 3.33: Proteinblot zur Bestimmung der Höhe der HDAC6-Expression in den Urothelkarzinom-Zelllinien 5637, BFTC905 und RT-112 nach Transfektion mit einer HDAC6-spezifischen siRNA. Diese wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Aufgetragen wurden 10 µg Protein. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

3.7.3 Wirkung einer siRNA-vermittelten Herunterregulation von HDAC6 auf die HDAC10-Expression

Da HDAC6 und HDAC10 eine ähnliche molekulare Struktur aufweisen, ist es denkbar, dass bei Beeinträchtigung einer Histondeacetylase deren Funktionen durch das andere Enzym übernommen werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Zelllinien RT-112, 5637 und BFTC905 mit einer HDAC6-spezifischen siRNA transfiziert und mittels Western-Blot das HDAC10-Protein detektiert (vgl. Abb. 3.34).

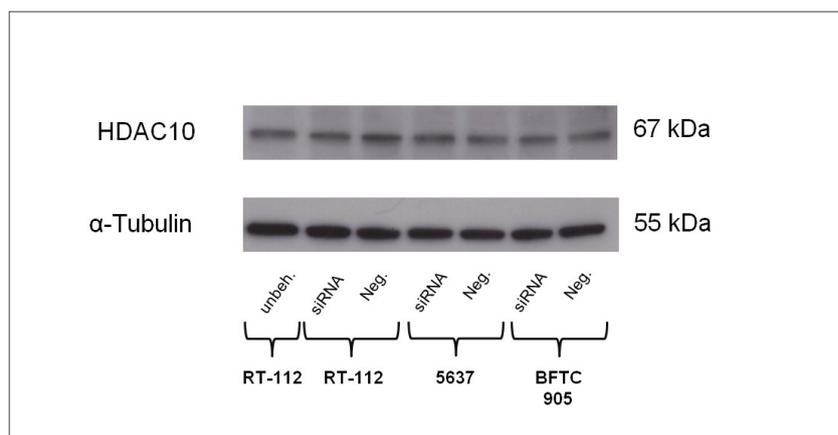


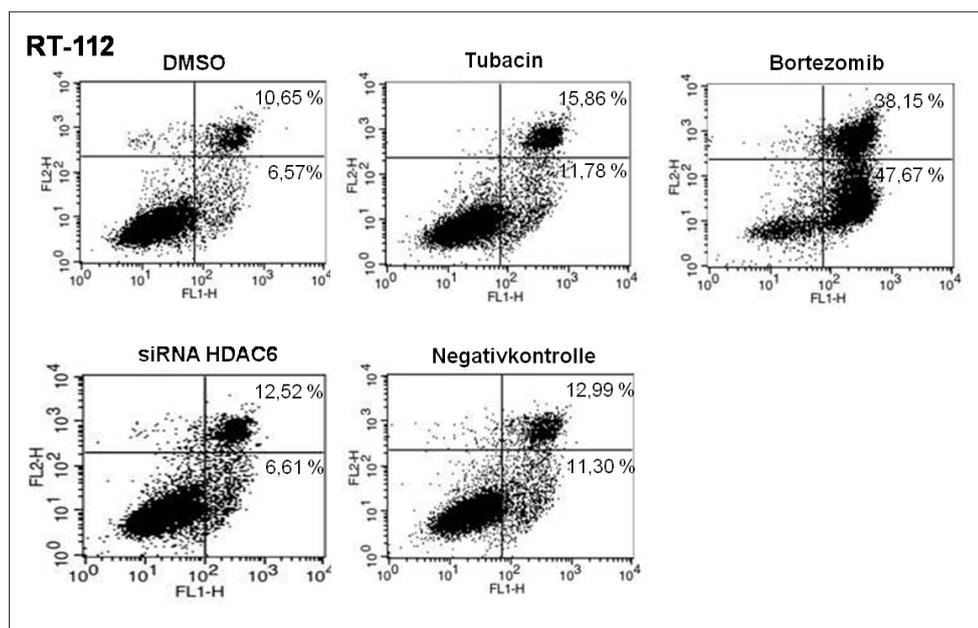
Abb. 3.34: Proteinblot zur Bestimmung der Höhe der HDAC10-Expression in den Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, 5637 und BFTC905 nach Transfektion mit einer HDAC6-spezifischen siRNA. Diese wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Aufgetragen wurden 10 µg Protein. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass eine Herunterregulation von HDAC6 mittels siRNA keine kompensatorische Erhöhung der HDAC10-Expression zur Folge hatte.

3.8 Einfluss von Tubacin, Bortezomib und einer HDAC6-spezifischen siRNA auf den Zellzyklus

Eine Behandlung mit Tubacin und Bortezomib führte zelllinien- und konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Zellvitalität. Nach Herunterregulation von HDAC6 mittels siRNA konnte kein Effekt auf die Vitalität beobachtet werden. Daran schloss sich die Frage an, welche zellulären Mechanismen der Zelltodinduktion zugrunde liegen und ob die Zellen in den programmierten Zelltod übergehen. Daher sollte mittels FACS-Analyse überprüft werden, ob eine Transfektion mittels HDAC6-spezifischer siRNA sowie eine Tubacin-Behandlung einen Einfluss auf Zellzyklus und Apoptoseinduktion der Urothelkarzinom-Zelllinien hat. Bortezomib wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

Abb. 3.35 zeigt, dass nach Bortezomib-Behandlung in allen Zelllinien eine massive Apoptoseinduktion beobachtet werden konnte. RT-112 reagierte hierbei am stärksten auf Bortezomib, Umuc3 war am wenigsten sensitiv. Eine Herunterregulation von HDAC6 mittels siRNA sowie eine medikamentöse Inhibition des Enzyms mit Tubacin führten hingegen in den meisten Zelllinien zu keiner verstärkten Apoptose. Lediglich bei RT-112 war nach Tubacin-Behandlung eine Verdopplung der Rate an frühapoptotischen Zellen von 6,6 auf 11,8 %, sowie eine Erhöhung der Rate an spätapoptotischen Zellen von 10,7 auf 15,9 % erkennbar. Eine Herunterregulation mittels siRNA erzielte keine vergleichbaren Veränderungen (vgl. Abb. 3.35).



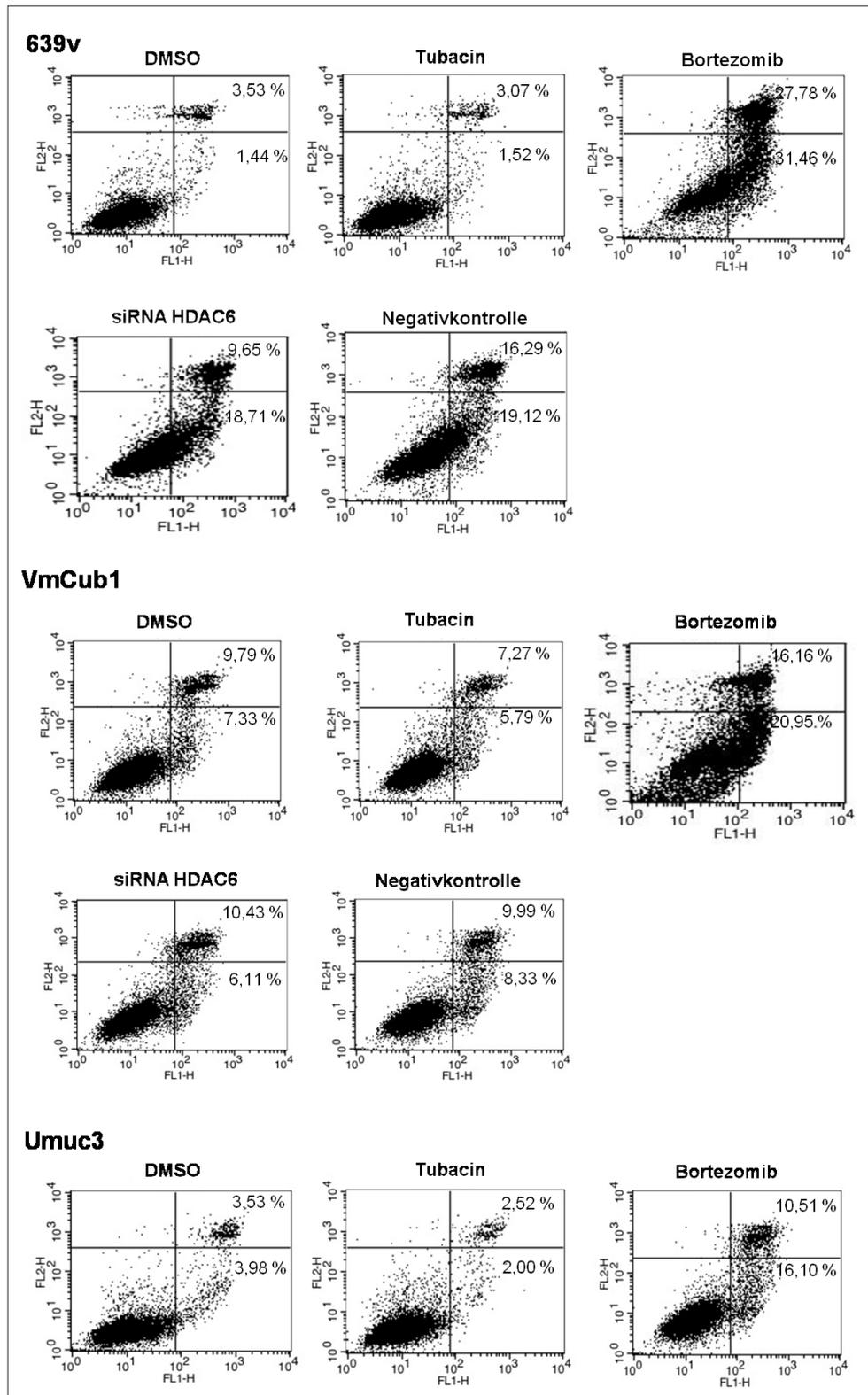
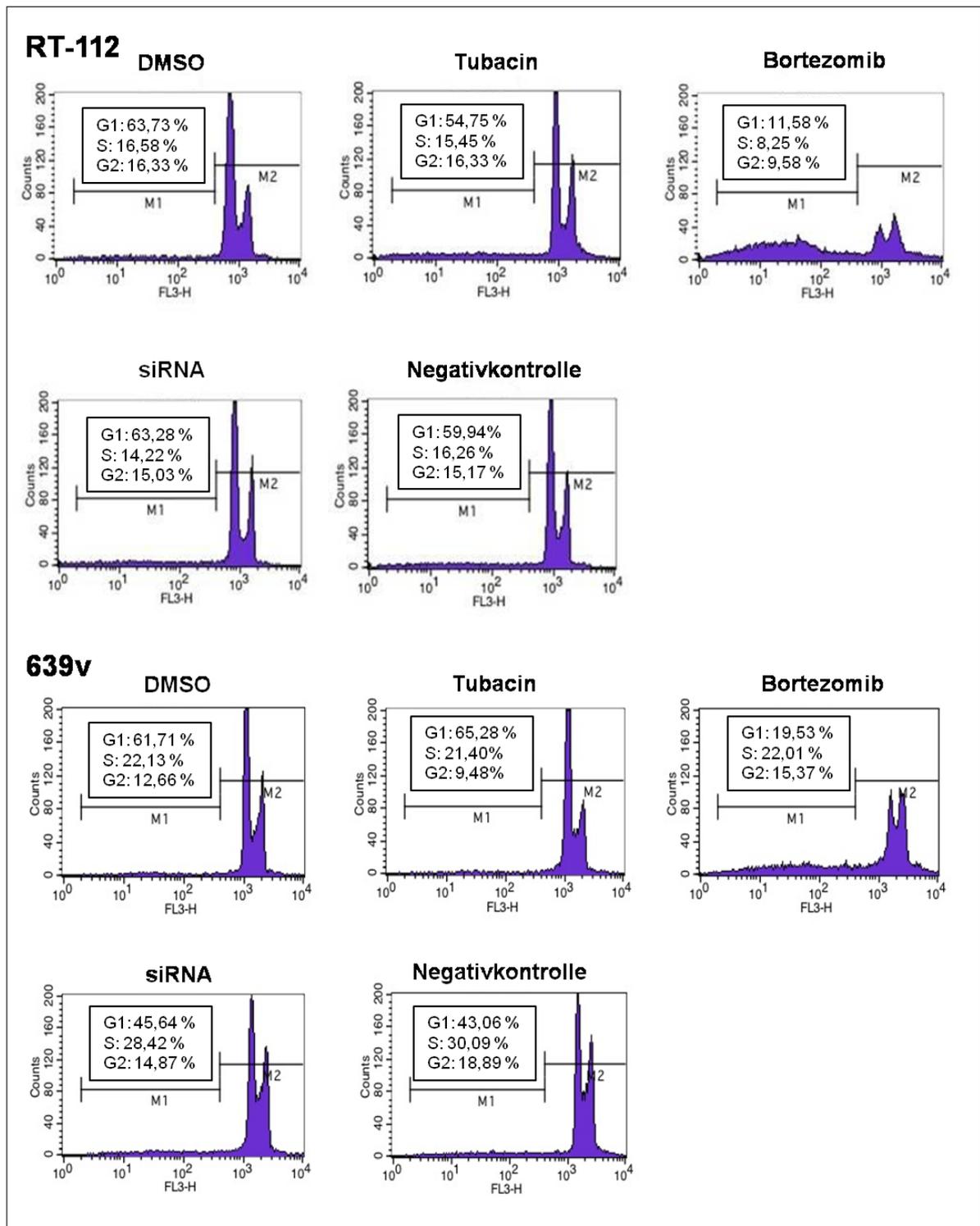


Abb. 3.35: FACS-Analyse der Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, 639v, VmCub1 und Umuc3. Obere Reihe (von links nach rechts): DMSO, Tubacin, Bortezomib. Untere Reihe (von links nach rechts): siRNA HDAC6, Negativkontrolle. Die frühapoptotischen Zellen sind im rechten unteren Quadranten dargestellt, die spätapoptotischen im rechten oberen Quadranten. Die Zellen wurden einmalig mit Tubacin oder Bortezomib behandelt und 48 h lang inkubiert. Tubacin wurde in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt, Bortezomib in einer Konzentration von 25 nM. Bortezomib wurde als Positivkontrolle eingesetzt, DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

Neben der Apoptosemessung wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt (siehe Abb. 3.36). Hier ließ sich in den Zelllinien sowohl nach Tubacin-Behandlung als auch nach einer Herunterregulation von HDAC6 mittels siRNA kein Effekt beobachten. Auch der Anteil der Zellen in der Sub-G1-Fraktion zeigte keine wesentliche Veränderung. Dieser Anteil stieg jedoch sehr stark nach Bortezomib-Behandlung an.



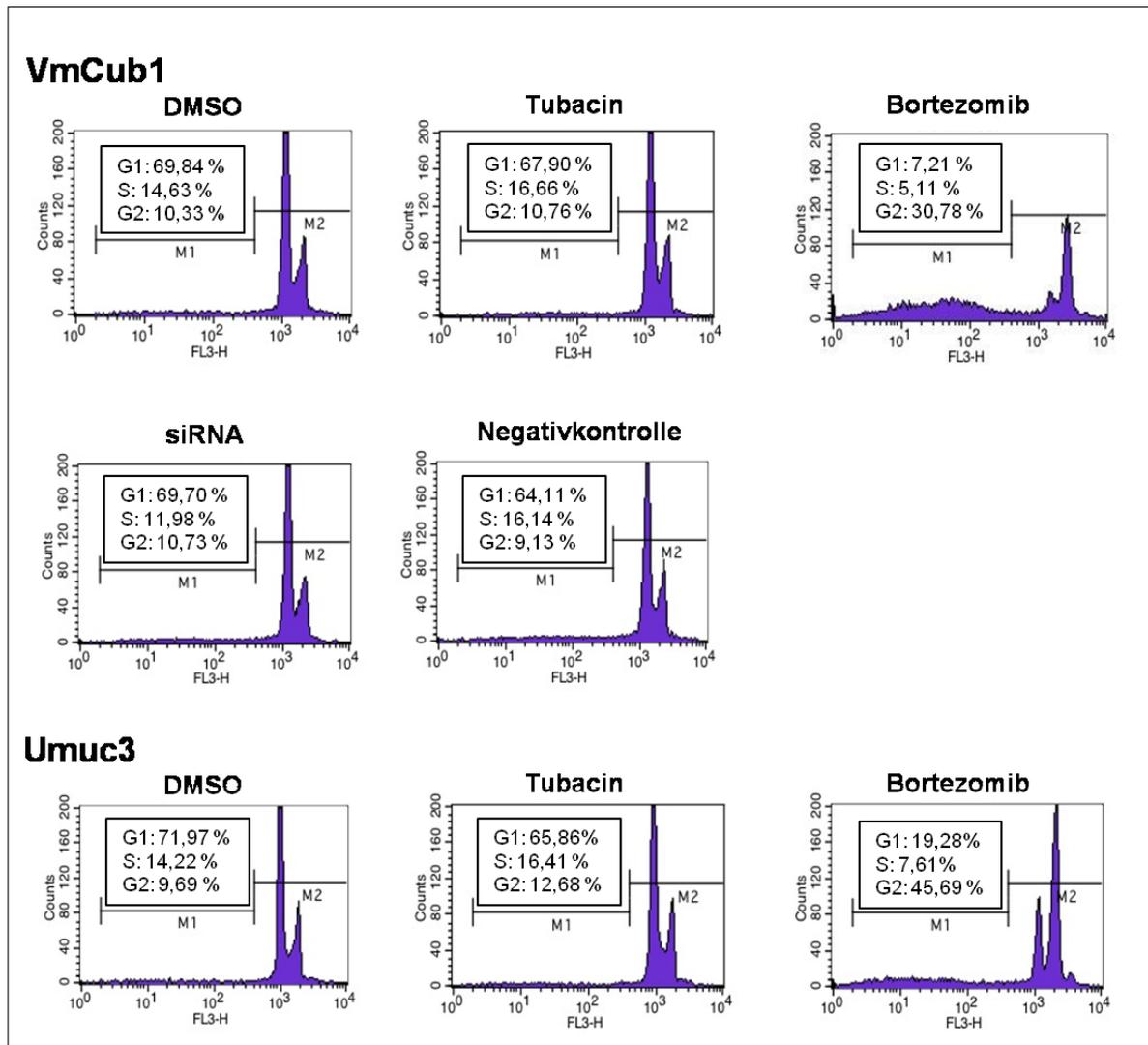


Abb. 3.36: **FACS-Analyse der Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, 639v, VmCub1 und Umuc3.** Obere Reihe (von links nach rechts): unbehandelt, 5 μ M Tubacin, 25 nM Bortezomib. Untere Reihe (von links nach rechts): siRNA HDAC6, Negativkontrolle. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen, auf der Ordinate die gemessene Zellzahl. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt.

Parallel zur FACS-Analyse wurden Proteinlysate für eine Western-Blot-Analyse angefertigt, um eine effektive Herunterregulation von HDAC6 nachzuweisen (siehe Abb. 3.37). Diese trat in VmCub1 und 639v auf. Bedauerlicherweise war in RT-112 keine Herunterregulation von HDAC6 zu beobachten.

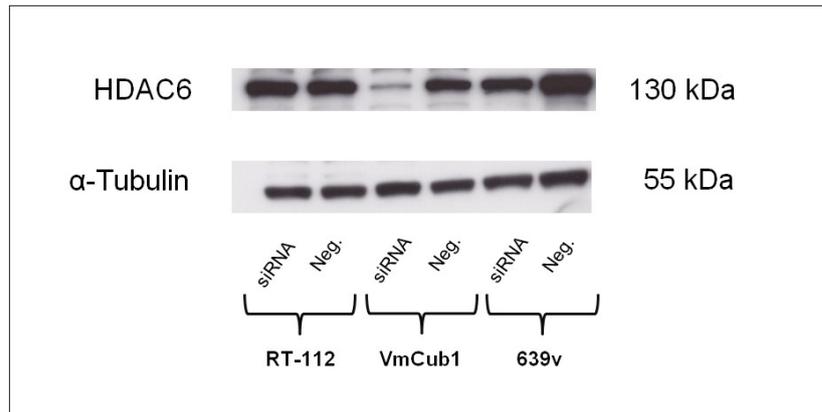


Abb. 3.37: **Proteinblot zur Bestimmung der Höhe der HDAC6-Expression in den Urothelkarzinom-Zelllinien RT-112, VmCub1 und 639v nach Transfektion mit einer HDAC6-spezifischen siRNA.** Diese wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 h. Aufgetragen wurden 10 µg Protein. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

3.9 Einfluss von HDAC6 auf die Zellmigration von Urothelkarzinom-Zelllinien

Da HDAC6 laut Literatur über Interaktion mit α -Tubulin und Cortactin die Zellmigration beeinflusst und eine HDAC6-Inhibition die Invasivität von Tumorzellen einschränkt, sollte überprüft werden, ob sich entsprechende Effekte auch in Urothelkarzinom-Zelllinien zeigen. Hierfür wurden die Zelllinien mit einer HDAC6-spezifischen siRNA transfiziert und ein Scratch-Assay durchgeführt. Die erste mikroskopische Beurteilung der Migrationsstrecke erfolgte nach 16 h, da Western-Blot-Analysen zu diesem Zeitpunkt (72 h nach Transfektion) die deutlichste siRNA-induzierte Herunterregulation von HDAC6 ergeben hatten. Abb. 3.38 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der drei verwendeten Zelllinien. Der Versuch wurde mit jeweils drei Ansätzen durchgeführt. In Abb. 3.39 sind die Migrationsstrecken der Zelllinien im Vergleich dargestellt.

Die Abbildungen zeigen, dass bei der Zelllinie BFTC905 sowohl die mit der *non-targeting*-siRNA als auch die mit HDAC6-siRNA transfizierten Zellen nach 40 h die Lücke geschlossen hatten. Die mit HDAC6-siRNA transfizierten Zellen haben nach ca. 16 h eine Strecke von 336 µm zurückgelegt, wohingegen die Zellen der Negativkontrolle um ca. 265 µm migriert sind. Die mit HDAC6-siRNA transfizierten Zellen haben somit ca. 47 % der Strecke in 16 h zurückgelegt, die Zellen der Kontrolle ca. 40 %. Eine signifikante Migrationshemmung konnte durch HDAC6-Inhibition somit nicht beobachtet werden.

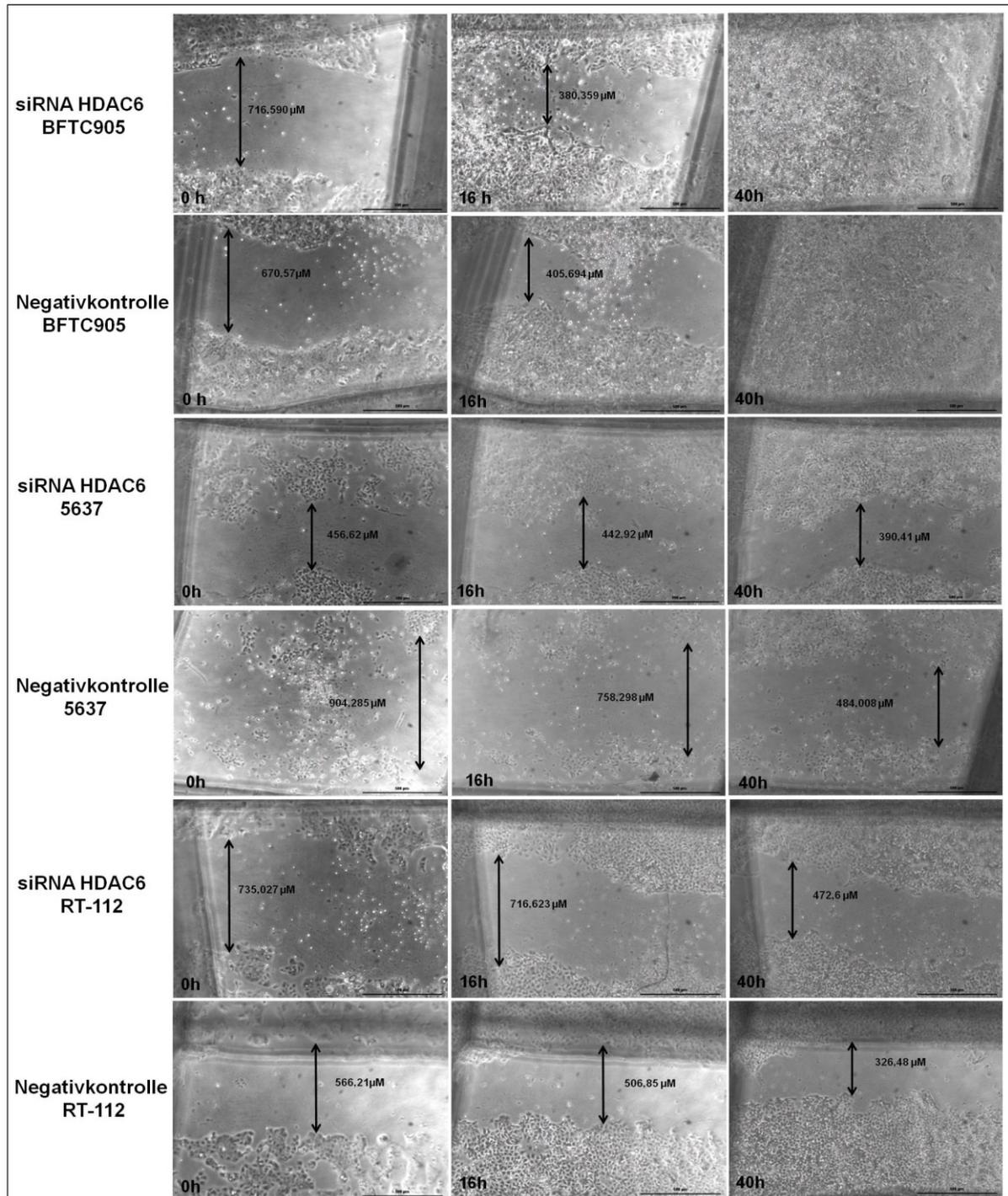


Abb. 3.38: Scratch-Assay zur Analyse der Migrationsfähigkeit nach Transfektion der Urothelkarzinom-Zelllinien BFTC905, 5637 und RT-112 mit einer HDAC6-spezifischen siRNA. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit einer entsprechenden non-targeting siRNA transfiziert worden waren. Die eingesetzte siRNA-Konzentration betrug 10 nM. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h, 16 h und 40 h lichtmikroskopisch untersucht und die Migrationsstrecke mittels 4x-Objektiv bestimmt. 0 h bezeichnet den Zeitpunkt direkt nach Setzen des Spaltes durch den Zellrasen.

Die Zelllinie 5637 wies eine deutlich geringere Wachstumsgeschwindigkeit als BFTC905 auf. Vergleicht man die zurückgelegten Strecken miteinander, so scheint die Motilität von 5637 durch die siRNA vermittelte Herunterregulation von HDAC6 deutlich negativ beeinflusst

worden zu sein. Auch bei RT-112 hat man den Eindruck, dass die siRNA bedingte Herunterregulation von HDAC6 eine leichte Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit zur Folge hatte.

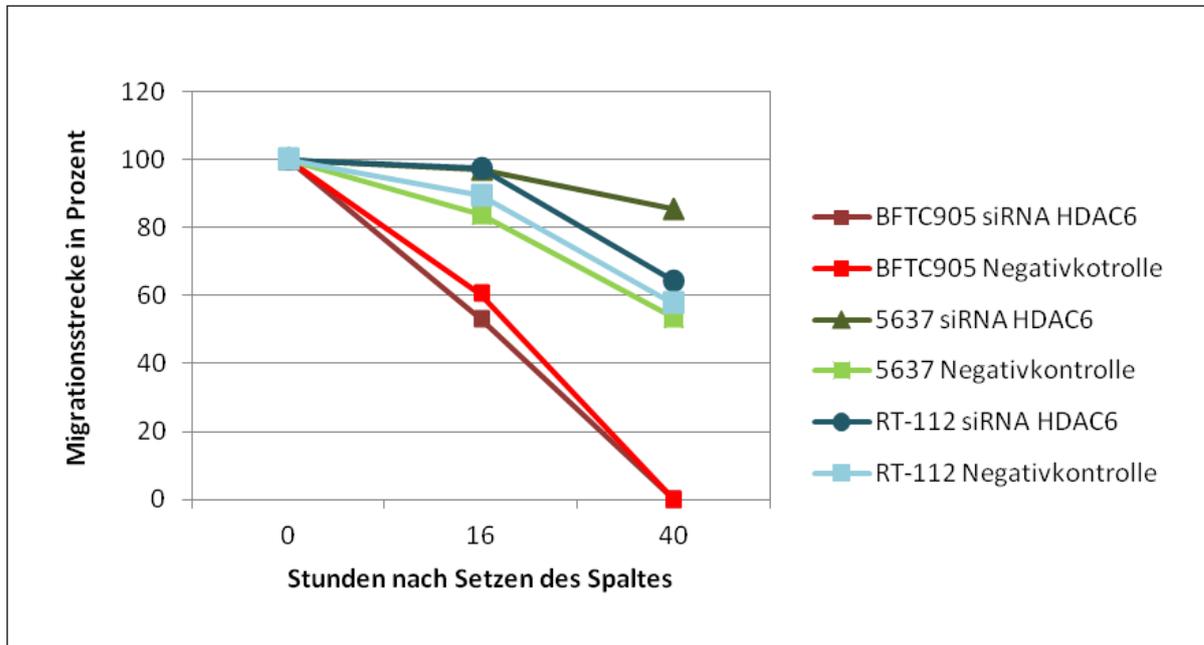


Abb. 3.39: *Scratch-Assay zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit nach Transfektion der Urothelkarzinom-Zelllinien BFTC905, 5637 und RT-112 mit einer HDAC6-spezifischen siRNA. Als Kontrolle dienten mit non-targeting siRNA transfizierte Zellen. Die Migrationsstrecke zum Zeitpunkt 0 h wurde als 100 % gesetzt und die an den folgenden Zeitpunkten gemessenen Werte darauf bezogen. Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach Setzen des Spaltes dargestellt, auf der Ordinate die Migrationsstrecke in Prozent.*

Um zu überprüfen, ob eine medikamentöse Inhibition des HDAC6-Proteins eine vergleichbare Wirkung auf die Migrationsgeschwindigkeit besitzt, wurden die Zelllinien außerdem mit 10 μ M Tubacin behandelt (siehe Abb. 3.40 und Abb. 3.41) und lichtmikroskopische Aufnahmen nach den Zeitpunkten 0, 4 und 20 h angefertigt. In Abb. 3.41 sind die Migrationsstrecken der einzelnen Zelllinien im Vergleich aufgeführt.

Aus den Abbildungen wird deutlich, dass eine Tubacin-Behandlung die Migrationsfähigkeit sowohl von BFTC905 als auch von 5637 nicht negativ beeinflusste.

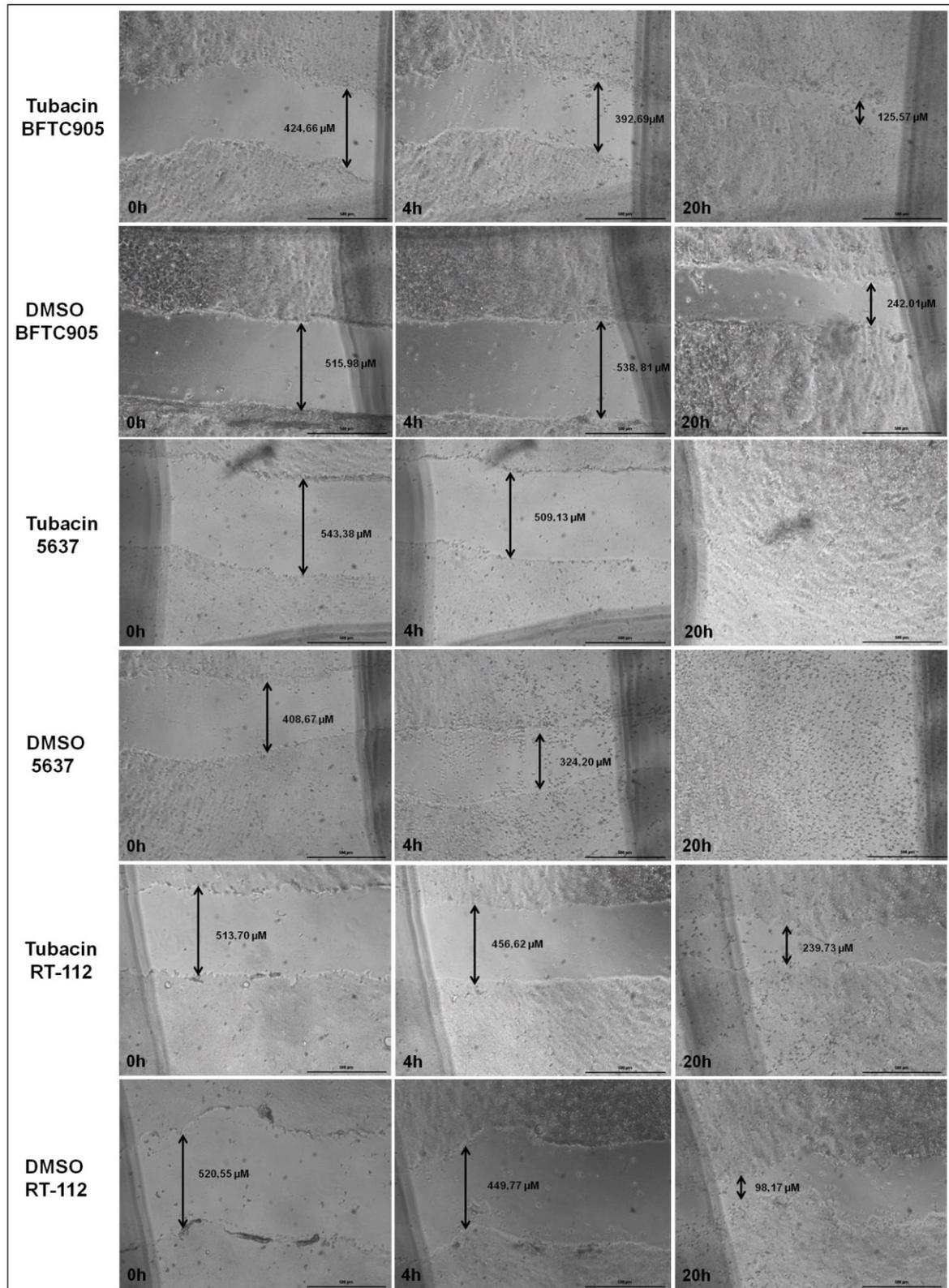


Abb. 3.40: *Scratch-Assay zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit nach Tubacin-Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien BFTC905, 5637 und RT-112. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die eingesetzte Tubacinkonzentration betrug 10 µM, die Inkubationszeit 24 h. Die Zellen wurden direkt nach dem Setzen des Spaltes durch den Zellrasen, sowie nach 4 und 20 h lichtmikroskopisch untersucht und die Migrationsstrecke mittels 4x-Objektiv bestimmt.*

Bei RT-112 war analog zu der Transfektion mit siRNA eine leichte Migrationshemmung zu beobachten. Nach 20 h hatten die mit DMSO behandelten Zellen 70 % der Strecke zurückgelegt, die mit Tubacin behandelten Zellen nur 53 %.

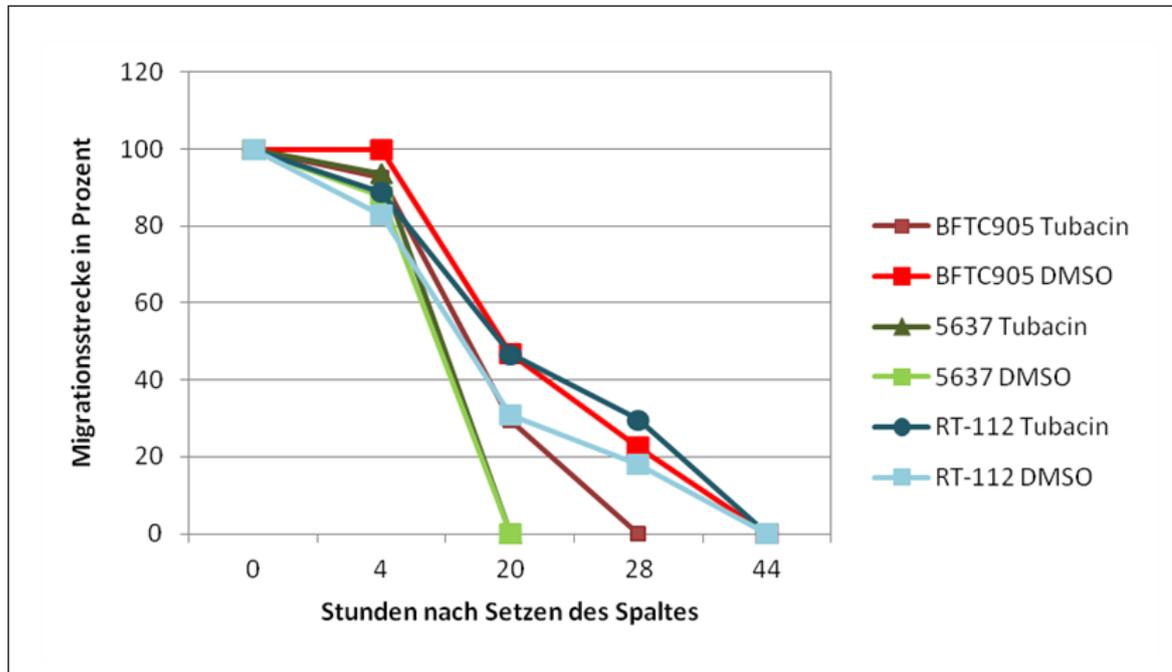


Abb. 3.41: *Scratch-Assay zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit nach Tubacin-Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien BFTC905, 5637 und RT-112. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die eingesetzte Tubacinkonzentration betrug 10 μ M. Die Migrationsstrecke zum Zeitpunkt 0 h wurde als 100 % gesetzt und die an den folgenden Zeitpunkten gemessenen Werte darauf bezogen. Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach Setzen des Spaltes dargestellt, auf der Ordinate die Migrationsstrecke in Prozent.*

Zusammenfassend führte eine Tubacin-Behandlung lediglich bei RT-112 zu einer leichten Hemmung der Zellmigration. Durch Transfektion mit siRNA war bei RT-112 und 5637 eine Migrationshemmung zu beobachten. Bei BFTC905 zeigte sich weder durch siRNA-Transfektion noch durch Tubacin-Behandlung ein Effekt.

3.10 Untersuchung der Effekte von Tubacin und Bortezomib auf die Klonogenität von Urothelkarzinom-Zelllinien

Mittels Klonogenitätsassay wurde untersucht, ob sich die einmalige Inkubation der Urothelkarzinom-Zelllinien mit Tubacin auf deren Fähigkeit zur Bildung von Zellklonen auswirkt (siehe Abb. 3.42). Bortezomib, für das bereits in anderen Tumorzellen eine Inhibition der Klonogenität nachgewiesen werden konnte [192], wurde zum Vergleich mitgeführt. Für den Klonogenitätsassay wurde 639v als Zelllinie mit hoher HDAC6-

Expression, sowie VmCub1 als Beispiel für eine Zelllinie mit niedrigem Expressionsniveau ausgewählt. Nach Substanzzugabe wurden die Zellen täglich mikroskopisch untersucht, bis die DMSO-Kontrollen annähernd konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt und fotografiert.

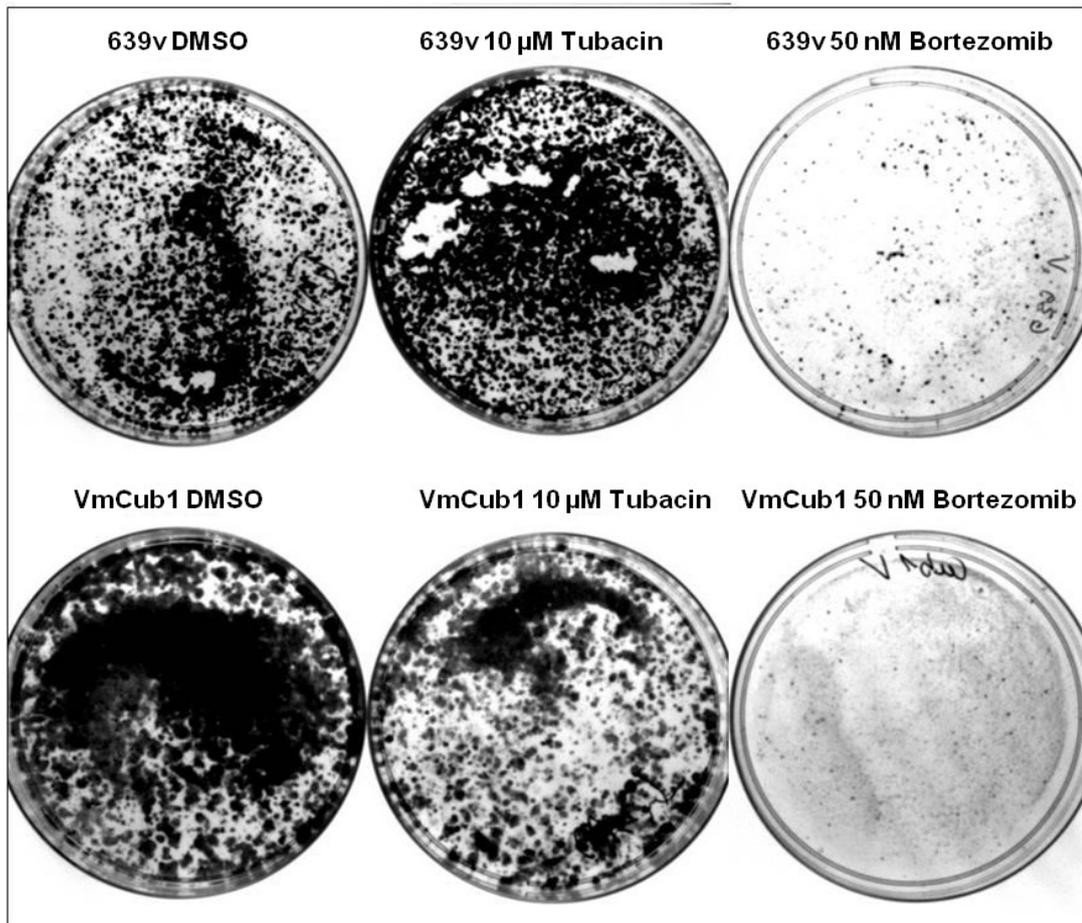


Abb. 3.42: **Giemsa-Färbung der Zelllinien VmCub1 und 639v nach Behandlung mit Tubacin oder Bortezomib.** Bortezomib und Tubacin wurden in Konzentrationen von jeweils 50 nM und 10 µM eingesetzt. Als Kontrolle wurde DMSO gewählt. Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem die DMSO-Kontrolle annähernd konfluent war.

Abb. 3.42 zeigt, dass Bortezomib die Klonogenität am stärksten inhibierte, da bei beiden Zelllinien kaum mehr Kolonien auf dem Schalenboden vorhanden waren. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Tubacin-Behandlung die Urothelkarzinom-Zelllinien wesentlich geringer in ihrer Klonogenität. Bei 639v war kein Abfall der Kolonienanzahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erkennbar. VmCub1 hingegen wurde deutlicher durch die Tubacin-Behandlung beeinflusst.

3.11 Langfristige Proliferationsfähigkeit von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit Tubacin, 17-AAG oder Bortezomib

Um zu überprüfen, ob Tubacin, 17-AAG und Bortezomib die Proliferationsfähigkeit der Urothelkarzinom-Zelllinien langfristig beeinträchtigen, wurden exemplarisch die Zelllinien 639v und VmCub1 jeweils als Triplikate mit Tubacin, 17-AAG oder Bortezomib behandelt und regelmäßig mikroskopisch auf Konfluenz hin überprüft. Die Zeiten, die die Zellen benötigten, um vollständige Konfluenz zu erreichen, sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (vgl. Tabelle 3.2). Die Zellen der Zelllinie 639v, die mit Bortezomib behandelt wurden, waren nach wenigen Tagen abgetötet, so dass die entsprechenden Schalen verworfen wurden.

Tabelle 3.2: Proliferationsassay. Dauer in Tagen bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz der Zelllinien 639v und VmCub1 nach Expansion. Die Zellen wurden zuvor einmalig mit den Substanzen Tubacin (10 μ M), 17-AAG (1 μ M) oder Bortezomib (50 nM) behandelt und für 48 h inkubiert. Als Kontrolle diente DMSO.

Zelllinie	Dauer bis Konfluenz in Tagen
639v DMSO	6
639v Tubacin	14
639v 17-AAG	8
639v Bortezomib	∞
VmCub1 DMSO	5
VmCub1 Tubacin	6
VmCub1 17-AAG	6
VmCub1 Bortezomib	14

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Zelllinien fiel auf, dass Bortezomib von allen eingesetzten Substanzen die Proliferation der Zellen am deutlichsten einschränkte. 639v wurde hierbei stärker beeinträchtigt als VmCub1. Auch mehrere Tage nach Zugabe von Bortezomib war keine Zellproliferation bei 639v erkennbar, so dass die Schalen am achten Tag nach Expansion verworfen wurden. Bei VmCub1 kam es nach Bortezomib-Behandlung ebenfalls zu einem massiven Zellsterben, der auch am 3. Tag nach Mediumwechsel noch beobachtet werden konnte. In der Folge erholten sich die Zellen jedoch zusehends, so dass die Schalen zwei Wochen nach Expansion konfluent gewachsen waren.

Auch nach Behandlung mit 10 μ M Tubacin konnte ein deutlicher Effekt auf die Zellproliferation beobachtet werden. Am sechsten Tag nach Expansion war bei der Zelllinie 639v eine hohe Rate an toten Zellen im Medium vorhanden. Da das Medium am Vortag

gewechselt worden war, spricht dies für einen längerfristigen toxischen Effekt von Tubacin. Insgesamt fiel das Verhältnis Zellproliferation zu Zelltod jedoch zugunsten der Proliferation aus, da die Zellen zunehmend konfluent wurden.

Bei den mit 17-AAG behandelten Zellen der Linie 639v war ebenfalls ein deutliches Zellsterben nach Mediumwechsel zu beobachten, welches jedoch geringer ausfiel als nach Tubacin-Behandlung. VmCub1 wurde hierbei von der Behandlung mit 17-AAG weniger beeinflusst als 639v.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Effekten nach medikamentöser Behandlung konnten bei VmCub1 morphologische Auffälligkeiten festgestellt werden, welche in Abb. 3.43 dargestellt sind.

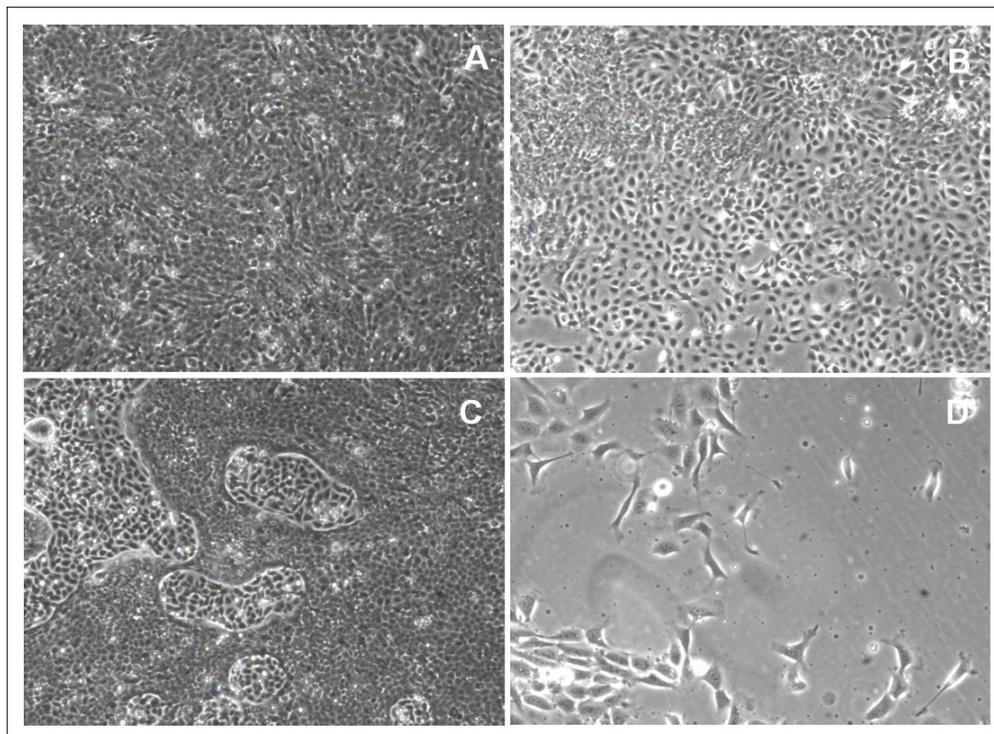


Abb. 3.43: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie VmCub1 nach Bortezomib-Behandlung (B-D). Dieses wurde in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Als Kontrolle wurde DMSO gewählt (A). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden 14 d nach Expansion aufgenommen.

Auffällig waren die zahlreichen kompakten Zellinseln, welche sich innerhalb des konfluenten Zellrasens gebildet hatten und von diesem deutlich abgegrenzt zu sein schienen (siehe Abb. 3.43 C). Zudem waren sowohl in den Zellinseln als auch in der Peripherie Zellen erkennbar, die durch lange, zum Teil sichelförmige, Zellausläufer charakterisiert waren (siehe Abb. 3.43 B, D).

4 Diskussion

Histonacetylasen (HATs) und -deacetylasen (HDACs) beeinflussen die Konformation des Chromatins und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Transkription von Genen. In Tumorzellen liegt gehäuft eine Dysregulation dieser Enzyme vor, was oftmals einen Einfluss auf Zellzyklus, Proliferation und Migration hat [38]. Die Regulation von HDACs durch HDAC-Inhibitoren wird bereits seit vielen Jahren intensiv erforscht. Der Hauptfokus wurde bislang auf die sogenannten Pan-Inhibitoren gelegt, also solche Inhibitoren, die gleichzeitig mehrere HDAC-Isoenzyme hemmen. Schon früh konnte dabei gezeigt werden, dass der Einsatz von HDAC-Inhibitoren wie Natriumbutyrat neben einer reversiblen Hyperacetylierung von Histonen zu einer Hemmung der Zellproliferation führt [193]. Für einen weiteren Pan-Inhibitor, Trichostatin A, konnte in Rattenfibroblasten eine Zellzyklusinhibition in der G1- sowie in der G2-Phase nachgewiesen werden, mit deutlicher Hemmung der Zellproliferation. Auch nach Trichostatin A-Behandlung wurde eine verstärkte Histonacetylierung in verschiedenen Säugerzelllinien beobachtet [194]. Mit der Zeit wurden weitere HDAC-Inhibitoren synthetisiert und ihre antitumoröse Wirkung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Bei einigen Tumorentitäten führte dies letztlich zur Zulassung von HDAC-Inhibitoren für eine medikamentöse Tumorthherapie, wie beispielsweise Vorinostat bei der Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms [195].

Problematisch beim Einsatz von Pan-HDAC-Inhibitoren zur Therapie von Malignomen ist jedoch zum einen deren geringe Spezifität durch Hemmung sowohl tumorfördernder als auch tumorhemmender Prozesse, als auch ein ausgeprägtes Toxizitätsprofil [41, 196]. Daher schien es sinnvoll, zum einen systematisch die Funktionen einzelner Histondeacetylasen in Tumoren zu untersuchen, und zum anderen zu überprüfen, welche Wirkung eine Inhibition der jeweiligen HDACs durch Isoenzym-spezifische HDAC-Inhibitoren auf Tumorzellen und nicht-maligne Zellen hat.

Für das Urothelkarzinom sind bislang hauptsächlich Untersuchungen mit Pan-Inhibitoren durchgeführt worden [197, 198]. Vorarbeiten in unserem Labor haben ergeben, dass eine Behandlung von Urothelkarzinom-Zelllinien mit dem Pan-Inhibitor Vorinostat dosisabhängig zu einer Aktivitätssteigerung der Caspasen 3 und 7 führt. Zellzyklusanalysen zeigten zudem eine nach Vorinostat-Behandlung signifikant erhöhte sub-G1-Population, sowie einen G2/M-Arrest [164]. Von Buckley et al. [199] wurden zudem Untersuchungen mit Belinostat sowohl in Urothelkarzinom-Zelllinien als auch im Mausmodell durchgeführt, welche eine

dosisabhängige Wachstumsinhibition sowie eine Hochregulation von p21^{WAF1/CIP1} ergeben haben. Auch in klinischen Studien werden Pan-Inhibitoren derzeit erprobt. Im Februar des Jahres 2012 ist das Ergebnis einer Phase-I-Studie publiziert worden, die die therapeutischen Effekte von Vorinostat in Kombination mit Docetaxel bei Patienten mit rezidivierendem Urothelkarzinom analysiert hat. Die Studie musste aufgrund der hohen Toxizität vorzeitig abgebrochen werden [198]. Auch eine Phase-II-Studie, die den Effekt von Vorinostat bei Urothelkarzinompatienten, die bereits mit einer platinbasierten Chemotherapie vorbehandelt waren, untersuchte, ergab eine deutliche Toxizität von Vorinostat bei nur geringer antitumoröser Effektivität [197]. Dieses ausgeprägte Toxizitätsprofil macht den klinischen Einsatz von Pan-Inhibitoren nur begrenzt möglich, so dass Untersuchungen mit Isoenzym-spezifischen HDACs und deren Inhibitoren durchgeführt wurden.

Bezüglich des Einsatzes von Isoenzym-spezifischen HDAC-Inhibitoren beobachteten Vallo et al. [200] eine Wachstumshemmung durch Behandlung von Urothelkarzinom-Zelllinien mit Valproinsäure, welche zudem eine Verminderung der HDAC3- und HDAC4-Expression bewirkte [200]. Karam et al. wiederum überprüften unter anderem die Wirkung des Klasse I-selektiven HDAC-Inhibitors FK-228 im Mausmodell [201]. Auch hier zeigte sich eine zeitabhängige Wachstumsinhibition.

Ein interessantes *target* für eine Isoenzym-spezifische HDAC-Inhibition ist HDAC6, insbesondere da eine Hemmung von HDAC6 bzw. dessen Herunterregulation keinen wesentlichen Einfluss auf Vitalität und Differenzierung von normalen Zellen besitzt [88]. Im Mausmodell wurde lediglich eine leicht erhöhte Knochendichte, sowie eine Erhöhung des Anteils an acetyliertem α -Tubulin beobachtet [88].

Als Zielmoleküle von HDAC6 wurden neben dem Hauptsubstrat α -Tubulin noch Cortactin, Peroxiredoxin sowie HSP90 identifiziert [49, 133]. Durch Inhibition von HDAC6 wurde in verschiedenen Tumorentitäten sowohl die Zellvitalität, als auch die Migrationsfähigkeit negativ beeinflusst. Für einige Mammakarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass diese durch eine starke HDAC6-Expression charakterisiert sind und HDAC6 für Zellwachstum und Invasivität von entscheidender Bedeutung ist [202–204].

Für Harnblasenkarzinom-Zelllinien sind bislang nur wenige Analysen hinsichtlich Expression und Funktion von HDAC6 publiziert worden. Daher sollten in dieser Arbeit entsprechende Expressions- und Funktionsanalysen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob sich HDAC6 als Zielmolekül für eine antitumoröse Therapie eignet. In diesem Zusammenhang

wurde die Beeinflussung von Zellvitalität, -proliferation und -migration nach HDAC6-Inhibition untersucht. Zudem sollte überprüft werden, ob eine Kombinationstherapie mit weiteren Substanzen die antitumoröse Wirkung einer HDAC6-Inhibition verstärken kann. Neben HDAC6 wurde auch die Histondeacetylase 10 untersucht. HDAC10 gehört wie HDAC6 zur Klasse Ib der Histondeacetylasen und weist strukturelle Gemeinsamkeiten mit HDAC6 auf. Ihre Funktionen in der Zelle sind bislang noch unklar. Daher sollte analysiert werden, in welchem Umfang HDAC10 in Urothelkarzinom-Zelllinien exprimiert ist und ob eine HDAC6-Hemmung durch HDAC10 kompensiert werden kann.

4.1 HDAC6-Expression im Urothelkarzinom

Die Untersuchung der Urothelkarzinom-Zelllinien hat ergeben, dass diese auf mRNA-Ebene im Vergleich zu normalen urothelialen Primärkulturen insgesamt durch eine verminderte HDAC6-Expression charakterisiert sind. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Arbeiten aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik überein [164]. Die stärkste Herunterregulation war bei den Zelllinien VmCub1, BFTC905, HT1376 und Umuc3 erkennbar. Hierbei ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Höhe der HDAC6-Expression und dem morphologischen Phänotyp oder dem Differenzierungsgrad feststellen.

Insgesamt korrelierte die Proteinexpression mit dem Expressionsmuster auf mRNA-Ebene. Die Zelllinien VmCub1, HT1376 und BFTC905 zeigten analog zu den qRT-PCR-Daten ein deutlich erniedrigtes Expressionsniveau. Bei der Zelllinie Umuc3 hingegen war auf Proteinebene eine höhere HDAC6-Expression sichtbar, als die qRT-PCR vermuten ließ. Dies weist darauf hin, dass die HDAC6-Expression nicht nur auf der Ebene der Transkription, sondern auch auf Proteinebene reguliert wird. In einer Publikation aus dem Jahr 2009 wurde von Deribe et al. bereits eine Reduktion der HDAC6-Deacetylaseaktivität mittels EGF-Rezeptor-vermittelter Phosphorylierung beschrieben [205]. In hippocampalen Neuronen scheint die HDAC6-Phosphorylierung über GSK3 β vermittelt zu werden, hier mit der Folge einer verstärkten Deacetylaseaktivität von HDAC6 [206]. In einer Arbeit von Liu et al. wurde von einer posttranslationalen Acetylierung von HDAC6 durch p300 berichtet [207].

Um den Einfluss der Zelldichte auf die HDAC6-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen nach Erreichen einer 50%igen- sowie 80%igen Konfluenz geerntet und die HDAC6-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Ein Zusammenhang zwischen Zelldichte und HDAC-Expression wurde bereits für HDAC1 gezeigt [208]. In unserer Arbeit

zeigten sich für HDAC6 zelllinienabhängig je nach Konfluenzstadium deutliche Unterschiede in der Expression. Einige Zelllinien wiesen in einem halbkonfluenten Stadium eine höhere HDAC6-Expression auf, andere in einem subkonfluenten Stadium. Ein einheitliches Muster war jedoch nicht abzulesen.

In Ovarialkarzinom-Zelllinien geht eine erniedrigte Proliferationsrate mit geringerem ER-Stress einher [209]. Da HDAC6 in einigen Tumoren mittels Aggresomenbildung für die Reduktion von zellulärem Stress von Bedeutung ist, wäre es denkbar gewesen, dass Zellen in einem halbkonfluenten Stadium aufgrund ihrer erhöhten Proliferationsrate und dem damit verbundenen erhöhten ER-Stress eine stärkere HDAC6-Expression aufweisen als die subkonfluenten Zellen. Dies war jedoch nicht in allen untersuchten Zelllinien der Fall.

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Tumorgewebeproben waren im Gegensatz zu den Zelllinien durch eine moderate, jedoch signifikant erhöhte Expression von HDAC6 im Vergleich zu den Normalgewebeproben charakterisiert. Ein Zusammenhang zwischen Tumorstadium und HDAC6-Expression war jedoch nicht erkennbar. Dagegen war in der Vorarbeit [164] bei vielen Tumorproben eine Herunterregulation von HDAC6 detektiert worden. Allerdings wurden von Niegisch et al. andere Gewebeproben zur HDAC6-Bestimmung verwendet als in der vorliegenden Arbeit. Eine große Variabilität hinsichtlich der Expression von HDAC6 in Tumorgewebeproben zeigte sich auch beim Vergleich verschiedener Microarray-Daten. Möglicherweise sind die Urothelkarzinome in ihrer HDAC6-Expression sehr heterogen, so dass die Auswahl der Gewebeproben für die unterschiedlichen Ergebnisse entscheidend war. Es wäre möglich, dass auch Faktoren wie Gewebsmediatoren, Hypoxie, Immunantwort oder Wachstumsgeschwindigkeit einen Einfluss auf die HDAC6-Expression im Tumorgewebe nehmen. Untersuchungen von hepatozellulären Karzinomen haben ebenfalls variable Ergebnisse hinsichtlich der HDAC6-Expression ergeben [83, 210, 211]. Ovarialkarzinom-Zelllinien wiesen im Vergleich zu immortalisierten normalen Ovarialepithelzellen eine erhöhte HDAC6-Proteinexpression auf; ähnliches wurde bei den aus Patienten gewonnenen Tumorgeweben im Vergleich zu benignen Geweben festgestellt [209]. Auch in Zelllinien aus oralen Plattenepithelkarzinomen ließ sich im Vergleich zu normalen Keratinozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine erhöhte HDAC6-Expression nachweisen. Zudem wurde beobachtet, dass die Höhe der HDAC6-Expression mit dem Tumorstadium korreliert und ein höheres Stadium mit einer erhöhten HDAC6-Expression einhergeht [82]. In Mammakarzinomgeweben hingegen konnte gezeigt werden,

dass eine erhöhte HDAC6-Expression auf mRNA-Ebene durch einen niedrigen Tumorgrad charakterisiert war [86].

Insgesamt legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Bedeutung von HDAC6 für das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen je nach Tumorentität variiert und dass HDAC6 gewebeabhängig unterschiedliche Funktionen ausübt. Hieraus ergibt sich die Frage, ob der HDAC6-Expressionspegel eines Tumors einen Hinweis auf die Sensitivität für HDAC6-spezifische Inhibitoren geben kann.

4.2 HDAC10-Expression im Urothelkarzinom

Die HDAC10-Expression unterscheidet sich je nach Tumorentität. Für Zervixkarzinome konnte gezeigt werden, dass die HDAC10-Expression bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen signifikant geringer ausfällt als bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen. Eine Induktion der HDAC10-Expression führt via Gensuppression der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 zu einer Inhibition von Zellmotilität und Invasivität [212]. Bei Neuroblastomzellen wiederum bedingt eine erhöhte HDAC10-Expression über Deacetylierung von Hitzeschockprotein 70 eine verstärkte Autophagie, mit der Folge einer verstärkten Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin [213].

In der vorliegenden Arbeit hat die durchgeführte qRT-PCR in Urothelkarzinom-Zelllinien ein sehr heterogenes Muster hinsichtlich der HDAC10-Expression auf mRNA-Ebene ergeben. Die niedrigste Expression war in den Zelllinien Umuc3, HT1376 und BFTC905 nachweisbar. RT-112, RT-4, 253J sowie das halbkongfluente Stadium der Linie T-24 waren hingegen durch eine erhöhte HDAC10-Expression charakterisiert. Analog zu den Ergebnissen bezüglich der HDAC6-Expression schien auch die Expression von HDAC10 weder vom Phänotyp der Zelllinie noch vom Konfluenzstadium abhängig zu sein. Auffällig war, dass das HDAC10-Expressionsniveau bei vielen Zelllinien in einem halbkongfluenten Stadium deutlich höher war als bei den subkongfluent gewachsenen Zellen. Eine Korrelation mit der HDAC6-Expression konnte nicht beobachtet werden.

Die Analyse der Expression von HDAC10 auf Proteinebene hat bei vielen Zelllinien ein im Vergleich zu urothelialen Primärkulturen unverändertes HDAC10-Expressionsniveau ergeben. Die Zelllinien 253J, HT1376 und SD hingegen wiesen eine erniedrigte HDAC10-

Expression auf. Allerdings war keine deutliche Korrelation zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene erkennbar.

In Tumorgewebeproben zeigte sich eine Überexpression von HDAC10, welche jedoch nicht signifikant war. Zudem wurde die HDAC10-Expression auf Proteinebene nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC6 bestimmt, um zu überprüfen, ob die HDAC10-Expression nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC6 kompensatorisch ansteigt. In den analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien konnte jedoch keine Veränderung der Expression beobachtet werden, was für eine voneinander unabhängige Regulation von HDAC6 und HDAC10 spricht.

4.3 Lokalisation von HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien

HDAC6 ist durch ein nukleäres Exportsignal (NES) sowie durch das SE14-Motiv charakterisiert, welches eine Serin- und Glutamat-reiche Region aus acht aufeinanderfolgenden Tetradekapeptiden darstellt [51]. Diese tragen maßgeblich dazu bei, dass HDAC6 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist [51, 214]. In einigen Zellen wurde dennoch eine nukleäre Lokalisation von HDAC6 beobachtet [46, 48, 86]. Auch die Beobachtung, dass HDAC6 nach Ausschalten der NES-Domäne in den Zellkern transloziert [214], spricht für einen Einfluss von HDAC6 auf die Transkription von Genen. Liu et al. [207] konnten außerdem zeigen, dass HDAC6 selbst durch Veränderung seines Acetylierungsstatus reguliert wird. Nach Inkubation von rekombinanter humaner HDAC6 mit p300 *in vitro* konnte eine Acetylierung des HDAC6-Proteins detektiert werden. Die Acetylierung von HDAC6 ging mit einer reduzierten Tubulin-Deacetylaseaktivität, einer verringerten Zellmotilität, sowie einer zytoplasmatischen Lokalisation von HDAC6 einher [207], wobei die Translokation in das Zytoplasma laut der Autoren durch Hemmung der Interaktion von HDAC6 mit dem nukleären Importprotein Importin- α erzielt wurde. Diese Inhibition wiederum beruhte auf einer Acetylierung von HDAC6 in der N-terminalen Region, welche in deacetyliertem Zustand mit Importin- α interagieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien mittels Immunzytochemie auf ihre intrazelluläre HDAC6-Lokalisation hin analysiert. Auffällig war hierbei die größtenteils zytoplasmatische Lokalisation von HDAC6. Lediglich bei BFTC905 konnte eine Verdichtung im Bereich des Zellkerns beobachtet werden. Zudem konnte HDAC6 in dieser Arbeit auch in den Filopodien von mesenchymalen Zelllinien (253J, 639v) detektiert werden. Epitheliale

Zelllinien hingegen zeichneten sich durch eine perinukleäre Akkumulation von HDAC6 aus, was der Lokalisation der Aggresomen entspricht [65]. Bei den mesenchymalen Zelllinien ist die Detektion von HDAC6 in Filopodien durch dessen Interaktion mit Cortactin und Aktin und deren Einfluss auf die Zellmigration erklärbar [68, 215]. Insgesamt stimmen unsere Beobachtungen, dass HDAC6 hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert ist, mit den bisherigen Beobachtungen überein, wonach eine Regulation der Transkription im Kern durch HDAC6 zwar möglich ist, HDAC6 jedoch im Allgemeinen keinen globalen Einfluss auf die Acetylierung von Histonen besitzt.

4.4 Einfluss von HDAC6-Inhibitoren auf den Acetylierungsstatus von α -Tubulin und auf die HDAC6-Expression

Der selektive HDAC6-Inhibitor Tubacin wurde 2003 von Haggarty et al. beschrieben. Er wurde während eines multidimensionalen Screens von ca. 7000 sogenannten „*small molecules*“ als Inhibitor von HDAC6 entdeckt. Während unselektive HDAC-Inhibitoren wie SAHA eine Hyperacetylierung der Histone 3 und 4 bewirken, führt Tubacin als selektiver HDAC6-Inhibitor vor allem zu einer Acetylierung des zytosolischen HDAC6-Substrats α -Tubulin [132].

Um die Spezifität einer Behandlung mit einem HDAC6-Inhibitor zu untersuchen, haben wir daher die Auswirkungen auf den Acetylierungsstatus von α -Tubulin gemessen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach 24-stündiger Behandlung mit Tubacin ab 2,5 μ M in verschiedenen Zelllinien eine dosisabhängige α -Tubulin-Acetylierung beobachtet werden konnte. Auch in anderen Arbeiten ist eine Änderung des α -Tubulin-Acetylierungsstatus bereits nach wenigen Stunden Tubacin-Inkubation beschrieben [131, 209]. Bei der humanen Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 bewirkte eine 5-stündige Behandlung mit Tubacin in Konzentrationen bis 20 μ M eine dosisabhängige Steigerung der α -Tubulin-Acetylierung; die EC_{50} für die α -Tubulin-Acetylierung lag bei 2,5 μ M [131]. Auch in Multiplen Myelomzellen konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Tubacin eine deutliche Acetylierung von α -Tubulin in den Konzentrationen 2,5 und 5 μ M beobachtet werden, welche dosisabhängig stärker wurde [132].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen haben zudem gezeigt, dass bei der Zelllinie T-24 deutlich geringere Effekte hinsichtlich der α -Tubulin-Acetylierung nachweisbar waren als bei RT-112 und 639v, welche eine deutlich höhere HDAC6-Expression aufwiesen.

Vergleichbare Ergebnisse sind auch für andere Zellarten beschrieben. Bei Plasmazellen im Knochenmark von Patienten mit Multiplem Myelom, welche ein höheres HDAC6-Expressionsniveau aufweisen als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, konnte nach Tubacin-Behandlung ebenfalls eine deutlich stärkere Acetylierung detektiert werden [132]. Dies spricht dafür, dass in Zellen mit hoher HDAC6-Expression mehr HDAC6-Protein in der Zelle gehemmt werden kann, mit der Folge einer stärkeren α -Tubulin-Acetylierung.

Um die Selektivität von Tubacin für HDAC6 in Urothelkarzinom-Zelllinien noch detaillierter zu analysieren, wurde in dieser Arbeit neben der α -Tubulin-Acetylierung auch der Grad der Histonacetylierung mittels Western-Blot dargestellt. Dabei zeigte sich, dass selbst hohe Tubacinkonzentrationen in den analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien keinen Einfluss auf die Histonacetylierung hatten. Dies wurde auch in Arbeiten von Hideshima et al. publiziert [132]. Gleiches wurde von Haggarty et al. berichtet, welche die Acetylierung von Histon H3 (K9 und K14) in A549-Zellen analysierten. Diese Beobachtung hat die Arbeitsgruppe auf eine selektive Hemmung der Tubulin-Deacetylasedomäne durch Tubacin zurückgeführt [131]. Neben dem Grad der α -Tubulin- und Histonacetylierung wurde in dieser Arbeit die HDAC6-Expression nach 24-stündiger Tubacin-Inkubation bestimmt. Da HSP90 ein Klientprotein von HDAC6 darstellt und die Reifung von HDAC6 wiederum durch HSP90 reguliert wird, sollte überprüft werden, ob durch die Tubacin-vermittelte Hyperacetylierung und somit Funktionseinschränkung von HSP90 eine unvollständige Reifung des HDAC6 Proteins mit nachfolgender Degradation durch das Proteasom erzielt werden kann [76]. Western-Blot-Analysen haben jedoch gezeigt, dass eine Tubacin-Behandlung bei den Zelllinien T-24 und 639v zu keiner Veränderung der HDAC6-Expression führt. Lediglich die Zelllinie RT-112 wies nach Behandlung mit 2,5 μ M Tubacin nach 24 h einen leichten Abfall des HDAC6-Proteins auf. Ähnliches wurde bei Tubacin-Behandlung von A549-Zellen beobachtet [132].

Neben Tubacin haben wir die Wirkung zweier weiterer Isoenzym-spezifischer HDAC6-Inhibitoren, ST-80 und Tubastatin A, untersucht.

ST-80 wurde in vergangenen Arbeiten als selektiver HDAC6-Inhibitor für AML-Zellen beschrieben [128]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine α -Tubulin-Acetylierung bei 2,5 μ M beobachtet, welche dosisabhängig anstieg. Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten von Hackanson et al. überein, in denen eine deutliche α -Tubulin-Acetylierung ab 1 μ M ST-80 beschrieben wurde. Hackanson et al. konnten zudem zeigen, dass eine Behandlung mit ST-80 in hohen Konzentrationen zu einer Histonacetylierung führt. Dies konnte in der vorliegenden

Arbeit nach 24-stündiger ST-80-Behandlung ebenfalls beobachtet werden und ist ein Zeichen der abnehmenden Selektivität von ST-80 in höheren Konzentrationen. Auffällig war zudem, dass selbst bei der hohen Konzentration von 50 μM ST-80 die α -Tubulin-Acetylierung der Urothelkarzinom-Zelllinien deutlich geringer ausfiel als unter 10 μM Tubacin oder 10 μM Tubastatin A, was für eine geringere Potenz von ST-80 im Vergleich zu Tubacin und Tubastatin A spricht.

Tubastatin A wurde von Butler et al. als HDAC6-Inhibitor beschrieben, welcher eine höhere Selektivität für HDAC6 im Vergleich zu Tubacin aufweist [126]. In unseren Western-Blot-Analysen war jedoch nach Tubacin-Behandlung die stärkste α -Tubulin-Acetylierung nachweisbar. Auch bei den durchgeführten Analysen der Zellvitalität nach HDAC6-Inhibition zeigte sich unter Tubacin der deutlichste Effekt.

4.5 Einfluss von HDAC6-Inhibitoren auf die Zellvitalität

Im weiteren Verlauf sollte überprüft werden, ob sich durch eine Behandlung mit HDAC6-Inhibitoren antitumoröse Effekte erzielen lassen und sich somit möglicherweise ein neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung des Urothelkarzinoms ergibt.

In anderen Tumorarten ist nach Tubacin-Behandlung bereits eine Reduktion der Vitalität beschrieben. Kawada et al. und Aldana-Masangkay et al. berichteten für EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zellen bzw. ALL-Zellen von einer erhöhten Zelltodinduktion durch Tubacin [216, 217]. In Multiplen Myelom-Zelllinien haben Hideshima et al. nach 72 h Inkubationszeit zelllinienabhängig eine IC_{50} von 5-20 μM Tubacin feststellen können [132]. Für normale Zellen ist bislang kein zytotoxischer Effekt von Tubacin beobachtet worden [132]. Bazzaro et al. haben beispielsweise die Sensitivität der Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV-3, TOV-21G und ES-2 für Tubacin mit der der immortalisierten Oberflächenepithel-Zelllinien IOSE-29 und IOSE-397 verglichen. Hierfür wurden die Zelllinien 24 bzw. 48 h lang mit den Tubacinkonzentrationen 5, 10, 15 und 20 μM inkubiert und die Vitalität mittels XTT-Assay quantifiziert. Während sich nach 24 h eine nur minimale Reduktion der Zellvitalität ergab, waren nach 48 h bei den Tumorzelllinien deutliche Effekte sichtbar. Nach Behandlung mit 5 μM Tubacin konnte bei den Ovarialkarzinom-Zelllinien eine Reduktion der Vitalität um ca. 25 % erzielt werden, nach 10 μM um ca. 40 %. Die immortalisierten Zelllinien hingegen wurden von der HDAC6-Inhibition kaum beeinflusst [209].

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Vitalität der Urothelkarzinom-Zelllinien in geringen Tubacinkonzentrationen kaum beeinträchtigt wurde. Erst bei Konzentrationen von 5 und 10 μM waren entsprechende Effekte zu beobachten. Lediglich die Zelllinie Umuc3 reagierte schon bei einer Konzentration von 1 μM sensitiv auf die Tubacin-Behandlung. Bei der Zelllinie VmCub1 reduzierte sich die Vitalität nach Behandlung mit 5 μM Tubacin auf ca. 50 %, bei anderen Zelllinien (5637, T-24) sank das Überleben auf ca. 70 %. Insgesamt zeigte sich die Tendenz, dass Zelllinien mit hoher HDAC6-Expression (RT-112, 253J) weniger sensitiv auf Tubacin reagieren, als Zelllinien mit wenig HDAC6-Expression (VmCub1, T-24). Dies legt den Schluss nahe, dass ein minimaler HDAC6-Spiegel für das Überleben der Zellen nötig ist. Diese Beobachtungen lassen sich jedoch nicht auf alle Zelllinien übertragen. Beispielsweise erwies sich Umuc3 trotz ihrer hohen HDAC6-Expression als relativ empfindlich für eine Tubacin-Behandlung. Es wäre denkbar, dass der endogene Stresslevel je nach Zelllinie variiert und die Reaktionen der einzelnen Zelllinien daher unterschiedlich ausfallen. Zwar scheinen Zelllinien mit niedriger HDAC6-Expression eher auf eine HDAC6-Inhibition anzusprechen als Zelllinien mit hoher HDAC6-Expression. Zusammenfassend muss man jedoch sagen, dass aus der Stärke der HDAC6-Expression nicht sicher auf die Sensitivität für eine Inhibition von HDAC6 geschlossen werden kann.

Die Tatsache, dass ein Großteil der in dieser Arbeit analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien erst ab 5 μM Tubacin erkennbar in seiner Vitalität eingeschränkt wurde, die α -Tubulin-Acetylierung aber bereits bei niedrigen Konzentrationen eintrat, wirft die Frage auf, welcher Mechanismus der Tubacin-induzierten Reduktion der Zellvitalität zugrunde liegt und warum die Vitalität nicht bereits in niedrigeren Konzentrationen durch das Tubacin beeinflusst wird. Scheinbar muss ausreichend viel HDAC6-Protein gehemmt werden, damit die Zellen eine Reaktion auf die HDAC6-Inhibition zeigen. Möglicherweise ist die Wirkung von Tubacin auf die indirekte Hemmung von HDAC6-Zielsubstraten wie HSP90 zurückzuführen, wodurch Klientproteine von HSP90 nicht vollständig prozessiert werden können. Zudem wäre es denkbar, dass die Selektivität von Tubacin in höheren Konzentrationen abnimmt und daher nicht nur HDAC6, sondern auch andere Histondeacetylasen gehemmt werden, was wiederum einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat.

Um den Wirkmechanismus von Tubacin näher zu analysieren, wurden die Urothelkarzinom-Zelllinien in dieser Arbeit mit Tubacin in einer Konzentration von 5 μM inkubiert und eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hier hat sich gezeigt, dass Tubacin keine deutliche Induktion von Apoptose bewirken konnte. Ähnliches ergab eine siRNA-vermittelte

Herunterregulation von HDAC6. Hideshima et al. [132] konnten bei einer Konzentration von 10 μM Tubacin in Multiplen Myelomzellen nach 12 und 24 h Inkubationszeit im Western-Blot deutliche Apoptosezeichen wie eine Spaltung von Caspase 8 und PARP nachweisen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die beobachteten Effekte nicht durch die abnehmende Selektivität für HDAC6 in hohen Tubacinkonzentrationen bedingt sind; allerdings wurden in der zitierten Arbeit keine Western-Blot-Analysen zur Evaluierung des Histon H3- und Histon H4-Acetylierungsstatus vorgenommen.

Neben Tubacin wurden die Urothelkarzinom-Zelllinien in dieser Arbeit mit ST-80 und Tubastatin A behandelt. Nach 72-stündiger Inkubation mit ST-80 konnte jedoch erst in hohen mikromolaren Konzentrationen ein deutlicher Einfluss auf die Zellvitalität festgestellt werden. Hackanson et al. wiederum haben eine ST-80-Behandlung bei AML-Zelllinien durchgeführt. Nach Behandlung mit 5 μM ST-80 und einer Inkubationszeit von 48 h konnte zelllinienabhängig eine Einschränkung der Vitalität um maximal 20-30 % beobachtet werden [128]. Tubastatin A zeigte in unserer Arbeit ebenfalls erst in Konzentrationen ab 5 μM einen Effekt auf die Zellvitalität. Diese Ergebnisse ähneln den Beobachtungen nach Tubacin-Behandlung. Insgesamt hat sich Tubacin im Vergleich zu ST-80 und Tubastatin A als potenteste Substanz erwiesen. Sowohl der α -Tubulin-Acetylierungsstatus als auch die Zellvitalität wurden durch Tubacin am stärksten beeinflusst. Jedoch waren auch nach Tubacininkubation erst in hohen Konzentrationen Effekte auf die Vitalität der analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien nachweisbar.

4.6 Einfluss einer HDAC6-Inhibition auf die Stressantwort von Urothelkarzinom-Zelllinien

Von HDAC6 ist bekannt, dass sie eine wichtige Funktion bei der Bildung von Aggresomen erfüllt. In bestimmten Tumoren ist diese Aggresomenbildung für die Reduktion von zellulärem Stress essenziell. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob Urothelkarzinom-Zelllinien nach HDAC6-Inhibition möglicherweise empfindlicher auf stressinduzierende Stimuli reagieren und ob durch Kombination eines solchen Stimulus und einer HDAC6-Inhibition eine verstärkte Zytotoxizität erzielt werden kann. Hierfür wurde ein Hitzeschock ausgewählt. Dieser hat in den analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien jedoch zu keiner erhöhten Reduktion der Zellvitalität nach Tubacin-Behandlung geführt. Dies lässt darauf schließen, dass sich durch den induzierten Zellstress keine erhöhte Abhängigkeit von

HDAC6 ergibt, wie dies beispielsweise bei Multiplen Myelomzellen beobachtet werden konnte [132]. Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, als dass in Urothelkarzinom-Zelllinien eine Bildung von Stressgranula nach Hitzeschock gezeigt werden konnte [218] und HDAC6 wiederum in diesen Stressgranula lokalisiert ist [219]. Wird eine Zelle zellulärem Stress ausgesetzt, kommt es über Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 α zu einer Blockierung der mRNA-Translation [219]. Diese blockierten mRNA-Abschnitte sind neben Initiationsfaktoren wie eIF3 oder eIF4E oder Translation-kontrollierende Proteinen wichtige Bestandteile der Stressgranula. Kwon et al. [219] haben gezeigt, dass eine HDAC6-Inhibition eine abgeschwächte Bildung der Stressgranula und somit eine Apoptoseinduktion zur Folge hat.

Dies wirft die Frage auf, über welchen Mechanismus es den Zellen möglich ist, mit verstärktem zellulärem Stress umzugehen. Es ist bekannt, dass Hitzeschock den H₂O₂-Gehalt der Zelle erhöht. Für die Elimination von H₂O₂ sind wiederum die Peroxiredoxine von Bedeutung [220]. Parmigiani et al. [133] haben die Peroxiredoxine 1 und 2 (Prx 1 und 2) in Prostatakarzinom-Zelllinien als HDAC6-Substrate identifiziert. Prx 1 und Prx 2 stellen wichtige Radikalfänger dar, welche beispielsweise H₂O₂ durch Disulfidbrückenbildung abfangen. Fällt zu viel H₂O₂ an, führt dies zu einer Überoxidation der Peroxiredoxine. Infolgedessen geht deren Fähigkeit zur Reduktion von H₂O₂ verloren. Nach Parmigiani et al. hat eine Acetylierung von Prx 1 eine verringerte Inaktivierung durch H₂O₂ zur Folge und erhöht stattdessen die H₂O₂-Reduktionsaktivität, mit dem Ergebnis einer erhöhten Resistenz gegenüber H₂O₂-induzierter Apoptose. Die Vitalität der Zellen nach zellulärem Stress wurde nach Inkubation mit dem HDAC6-Inhibitor Tubacin nach H₂O₂-Exposition entsprechend geringer beeinträchtigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Peroxiredoxin 1 im Urothelkarzinom mit einem hohen Tumorgrad einhergeht [221]. Es wäre möglich, dass die Urothelkarzinom-Zelllinien auf diesem Weg einer stressinduzierten Apoptose entgehen können.

4.7 Effekte einer HSP90-Inhibition sowie einer kombinierten Inhibition von HSP90 und HDAC6 auf die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien

Das Hitzeschockprotein HSP90 unterstützt die Reifung mehrerer Proteine, die in onkogenen Signalwegen von Bedeutung sind. Eine Inhibition von HSP90 hat somit einen negativen Effekt auf Zellvitalität und Proliferation. HSP90 wiederum wurde als Klientprotein von

HDAC6 identifiziert, dessen Aktivität via HDAC6-vermittelter Deacetylierung gesteigert werden kann [47, 76]. Kovacs et al. konnten für A549-, NIH-3T3-, sowie 293T-Zelllinien zeigen, dass eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC6 über Hyperacetylierung von HSP90 zu einem Verlust dessen Aktivität führt. Dieser Verlust war wiederum mit einer fehlenden Reifung und somit einem Funktionsverlust von HSP90-Klientproteinen wie dem Glukokortikoid-Rezeptor verbunden [47]. Ähnliche Ergebnisse wurden für AML- und CML-Zelllinien beschrieben [76]. Zudem wurde beobachtet, dass in leukämischen Zelllinien eine Kombination des HSP90-Inhibitors 17-AAG mit einer HDAC6-Inhibition im Vergleich zu einer alleinigen Hemmung von HSP90 die Zellvitalität stärker vermindert [76].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass durch Inhibition von HSP90 mittels 17-AAG in Urothelkarzinom-Zelllinien antitumoröse Effekte erzielt werden können. Bei den meisten Zelllinien war ab 1 μ M 17-AAG eine deutliche Reduktion der Zellvitalität sichtbar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Karkoulis et al. [75] überein, welche nach 17-AAG-Behandlung der Urothelkarzinom-Zelllinien RT-4, RT-112 und T-24 eine Herunterregulation von HSP90-Klientproteinen, sowie einen Zellzyklusarrest mit nachfolgender Apoptose beschrieben haben. Auch in AML-Zellen konnte nach 17-AAG-Behandlung eine verstärkte Apoptose beobachtet werden [222].

Durch eine Kombination von Tubacin und 17-AAG hingegen konnten in der vorliegenden Arbeit nur geringe synergistische Effekte erzielt werden. Diese waren unabhängig von der HDAC6-Expression der Zelllinien. Eine mögliche Ursache wäre, dass HSP90 und HDAC6 im Urothelkarzinom nicht miteinander interagieren, oder dass die Funktion von HSP90 durch Hyperacetylierung weniger eingeschränkt wird als in anderen Tumorentitäten. Bazzaro et al. [209] haben für Ovarialkarzinom-Zelllinien gezeigt, dass durch eine Tubacin-vermittelte HDAC6-Inhibition zwar eine Hyperacetylierung von α -Tubulin induziert wird, der Acetylierungsstatus der HDAC6-Substrate HSP90 und Cortactin hingegen unverändert bleibt. Dies würde dafür sprechen, dass Tubacin lediglich die α -Tubulin-Deacetylasedomäne von HDAC6 hemmt. Die Funktion von HSP90 wäre über eine medikamentöse HDAC6-Inhibition somit nicht beeinflussbar. Warum in unterschiedlichen Tumorentitäten verschiedene Beobachtungen hinsichtlich der Tubacinwirkung gemacht wurden, ist jedoch unklar.

4.8 Effekte einer Proteasominhibition sowie einer kombinierten Inhibition von Proteasomen und HDAC6 auf die Vitalität von Urothelkarzinom-Zelllinien

Fehlgefaltete Proteine entstehen durch erhöhten zellulären Stress sowie durch fehlerhafte Proteinkomplexbildung bzw. -modifikation. Auch eine erhöhte Syntheserate geht mit einer erhöhten Menge an fehlgefalteten Proteinen einher. Diese fehlgefalteten Proteine neigen zur Aggregatbildung, welche die normale zelluläre Funktion stören [223]. Für die Zelle ist es daher essenziell, die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen zu verhindern. Hitzeschockproteine beispielsweise sind in der Lage, ungefaltete sowie fehlgefaltete Proteine zu erkennen und die korrekte Bildung ihrer Tertiärstruktur zu fördern. Ist eine korrekte Proteinfaltung dennoch nicht möglich, werden diese Proteine mittels E3-Ligasen mit Ubiquitin markiert und somit ein Abbau durch das Proteasom ermöglicht [224]. Zudem ist das Proteasom für den Abbau von zellulären Proteinen wie p21 und I κ B verantwortlich [141, 225]. Tumoren sind aufgrund ihrer erhöhten Proteinsynthese sowie einer verstärkten Mutationsrate durch einen erhöhten Anfall an fehlgefalteten Proteinen gekennzeichnet. Zudem werden Zellwachstum und Überlebensfähigkeit von Tumorzellen durch das Proteasom gefördert, da ein Abbau von I κ B durch das Proteasom eine Aktivierung von NF- κ B zur Folge hat [225]. Die Hemmung des Proteasoms, z.B. durch Bortezomib, stellt somit einen Ansatzpunkt für die Antitumor-Therapie dar.

Bortezomib hemmt reversibel das 26S-Proteasom. Klinisch ist es bislang für die Behandlung des refraktären Multiplen Myeloms sowie des Mantelzelllymphoms zugelassen [139, 226]. Bortezomib kann in einigen Tumorarten wie dem Ovarialkarzinom *in vitro* selektiv gegen Tumorzellen eingesetzt werden, da normale Zellen in ihrer Vitalität nicht beeinträchtigt werden [139, 209]. Um die Wirksamkeit von Bortezomib auf die ausgewählten Urothelkarzinom-Zelllinien nachzuweisen, wurde das Expressionsniveau des Proteins c-FLIP mittels Western-Blot analysiert. c-FLIP, auch Casper, iFLICE oder Usurpin genannt [227, 228], ist antiapoptotisch wirksam, indem es mittels Bindung an FADD die Aktivierung der Caspasen 8 und 10 und so die über TNF- α , Fas-L und TRAIL induzierte Apoptose blockiert [229, 230]. In vielen Tumoren ist c-FLIP verstärkt exprimiert; Urothelkarzinom-Zelllinien hingegen scheinen durch eine moderate Expression von c-FLIP_L charakterisiert zu sein [231]. In humanen Zellen wird c-FLIP in den Isoformen c-FLIP_L (*long*), cFLIP_S (*short*) und als alternative allelische Form c-FLIP_R exprimiert [230, 232]. Die c-FLIP-Transkription kann durch Proteine wie NF- κ B, p63, SP1 oder EGR1 gesteigert werden, wohingegen c-Myc, c-Fos oder SP3 die c-FLIP-Expression reduzieren [233]. Abgebaut wird c-FLIP hauptsächlich

durch das Ubiquitin-Proteasom-System [233]. Folglich lässt sich durch eine proteasomale Inhibition mittels Bortezomib oder MG-132 ein Abbau von c-FLIP verhindern. In NSCLC-Zellen beispielsweise ließ sich nach Bortezomib-Behandlung eine erhöhte Proteinexpression von c-FLIP nachweisen [234].

Auf der anderen Seite wird durch Bortezomib ein Abbau des NF- κ B -Inhibitors I κ B durch das Proteasom verhindert. Infolgedessen bleibt NF- κ B an I κ B gebunden und kann nicht in den Zellkern translozieren, so dass Zielgene von NF- κ B wie c-FLIP nicht exprimiert werden können [139, 235]. Neben dem NF- κ B-Signalweg kann die Expression von c-FLIP auch über andere Faktoren wie c-Fos beeinflusst werden, welches c-FLIP zu reprimieren vermag. Arbeiten mit Progenitorzellen von Osteoklasten haben gezeigt, dass c-Fos ebenfalls durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert wird. Eine Proteasominhibition führt somit über c-Fos-Steigerung zu einem erniedrigten Expressionslevel von c-FLIP [236, 237].

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach Bortezomib-Behandlung sowohl eine verstärkte Expression von c-FLIP durch Hemmung seiner proteasomalen Degradation beobachtet worden ist, als auch eine Hemmung der c-FLIP-Transkription über I κ B und c-Fos.

In dieser Arbeit wurde die c-FLIP-Expression der Urothelkarzinom-Zelllinien 639v, VmCub1, RT-4 und J-82 analysiert. Die Auswahl von 639v und VmCub1 orientierte sich an deren unterschiedlichen HDAC6-Expressionsprofilen. J-82 wurde aufgrund der in den Arbeiten von Ewald et al. [231] beschriebenen erhöhten c-FLIP-Expression im Vergleich zu anderen Zelllinien ausgewählt. Für RT-4 wiederum ist in der Literatur eine hohe Sensitivität für eine Therapie mit Bortezomib in Form einer starken apoptoseassoziierten DNA-Fragmentation beschrieben [238]. Unsere Versuche haben gezeigt, dass die c-FLIP-Expression dosisabhängig mit steigender Bortezomibkonzentration in allen analysierten Zelllinien abfiel. Eine solche Herunterregulation wurde nach Bortezomibinkubation auch bei Hodgkin-Lymphomzellen [239], CLL-Zellen [240] oder AML-Zellen beobachtet [241]. Es stellt sich jedoch die Frage, warum die c-FLIP-Expression so stark abfällt, obwohl durch Bortezomib auch die Degradation von c-FLIP gehemmt wird. Es wäre möglich, dass c-FLIP nicht ausschließlich über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Arbeiten von Scudiero et al. [242] haben gezeigt, dass die c-FLIP_L-Expression in embryonalen Fibroblasten nach lysosomaler Inhibition mit Leupeptin und NH₄Cl wiederhergestellt werden kann. Auch eine Behandlung mit Cycloheximid, welches die lysosomalen Proteasen - die Cathepsine -

hemmt, führte zu einer Erhöhung der c-FLIP-Expression. Es ist möglich, dass auch in Urothelkarzinomzellen ähnliche Mechanismen existieren.

Um die Zytotoxizität von Bortezomib auf Urothelkarzinom-Zelllinien zu evaluieren, wurden diese 48 h lang mit Bortezomib behandelt und die Zellvitalität mittels CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Alle analysierten Zelllinien erwiesen sich als sensitiv gegenüber Bortezomib. Bis 10 nM wurde in den meisten Zelllinien keine Reaktion beobachtet. Ab 50 nM hingegen sank die Zellvitalität drastisch ab. Als sensitivste Zelllinie erwies sich RT-112. Umuc3 hingegen wurde am wenigsten beeinflusst. Analog hierzu konnte mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass in den Umuc3-Zellen nach Bortezomib-Behandlung eine im Vergleich zu anderen Zelllinien nur geringe Anzahl an apoptotischen Zellen detektierbar war. Zudem waren bei der Zelllinie RT-4 bereits nach 24-stündiger Inkubation mit 1 μ M Bortezomib kaum mehr Zellen lebensfähig. Ein Nachweis des c-FLIP-Proteins mittels Western-Blot-Analysen in mit 1 μ M Bortezomib behandelten Zellen war daher nicht möglich. Eine ähnlich starke Reaktion auf Bortezomib konnte auch nach einer Aussaat von höheren Zellzahlen beobachtet werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen von Kamat et al. [238], wonach die Zelllinie RT-4 nach Bortezomib-Behandlung eine sehr hohe Rate an apoptotischen Zellen aufwies.

Es stellt sich die Frage, welche zellulären Mechanismen der Sensitivität der Urothelkarzinom-Zelllinien gegenüber Bortezomib zugrunde liegen. Es ist bekannt, dass Bortezomib unter anderem den p53-Signalweg aktiviert [243]. Der Tumorsuppressor p53 ist jedoch beispielsweise in der Urothelkarzinom-Zelllinie Umuc3 mutiert [238], was mit einer erhöhten Resistenz für eine Bortezomib-Behandlung einhergehen könnte. Hingegen zeichnen sich die Zelllinien RT-112 und 253J durch Wildtyp-p53 aus [244]. Außerdem ist bekannt, dass bei der Plasmazelldifferenzierung die Proteasomexpression vermindert ist, mit der Folge einer erhöhten Sensitivität gegenüber Proteasominhibitoren [245]. Entsprechende Analysen von Urothelkarzinom-Zelllinien liegen bislang noch nicht vor. Für Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde außerdem gezeigt, dass diese je nach Konfluenzstadium unterschiedlich sensitiv auf eine Bortezomib-Behandlung reagieren [209]. Als mögliche Ursache nannten die Autoren eine Zellkontakt-bedingte Wachstumsinhibition der untersuchten Zellen, welche die Resistenz der Zellen gegenüber einer Bortezomib-Behandlung erhöhte. Analog dazu berichteten Kamat et al. [238], dass nach Bortezomib-Behandlung hauptsächlich eine negative Beeinflussung von Zellwachstum und Proliferation auftritt. Es wäre interessant zu erfahren, ob das

Konfluenzstadium auch in Urothelkarzinom-Zelllinien die Sensitivität für eine Bortezomib-Behandlung beeinflusst.

Zudem wäre es denkbar, dass die HDAC6-vermittelte Aggresomenbildung einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen für eine Proteasominhibition hat. Möglicherweise ist dieser Mechanismus nicht in allen Urothelkarzinom-Zelllinien ausgebildet. Folglich wären die Zelllinien, bei denen nach Proteasominhibition eine Aggresomenbildung möglich ist, resistenter als die Zelllinien, denen kein vergleichbarer Mechanismus zur Verfügung steht. Auf der anderen Seite wäre es denkbar gewesen, dass die Zellen mit einer erhöhten HDAC6-Expression aufgrund einer verstärkten Aggresomenbildung weniger sensitiv auf die Bortezomib-Behandlung reagieren. Diese Hypothese konnte jedoch in unseren Zellvitalitätsanalysen nicht bestätigt werden.

Neben der Monotherapie mit Bortezomib wurden die Urothelkarzinom-Zelllinien mit einer Kombination aus Bortezomib und dem HDAC6-Inhibitor Tubacin behandelt, um zu untersuchen, ob der zytotoxische Effekt von Bortezomib durch die Kombinationstherapie verstärkt werden kann. Grundlage hierfür war die Beobachtung, dass Proteine in eukaryotischen Zellen nicht nur über das Ubiquitin-Proteasom-System sondern auch über einen HDAC6-abhängigen Aggresomenweg abgebaut werden, insbesondere dann, wenn sich bereits Proteinaggregate gebildet haben, die vom Proteasom nicht mehr abgebaut werden können [223]. Kawaguchi et al. [65] haben gezeigt, dass HDAC6 ubiquitinierte Proteine binden kann und sie entlang der Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum transportiert, wo diese sich zu einem Aggresom formieren. Die Aggresomen werden letztendlich durch Autophagie degradiert. Auch hierfür scheint HDAC6 von Bedeutung zu sein, indem es durch Deacetylierung von Cortactin die Bildung eines Netzwerkes von F-Aktinfilamenten fördert, welches die Fusion von Autophagosom und Lysosom ermöglicht, um die im Autophagosom enthaltenen Komponenten enzymatisch abbauen zu können [246]. Bei einer siRNA-vermittelten Herunterregulation von HDAC6 ist eine Bildung von normal strukturierten Aggresomen nicht mehr möglich [65]. Diese Beobachtungen betonen nochmals die Bedeutung von HDAC6 und des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei der Elimination von akkumulierten Proteinen. Außerdem konnte in Multiplen Myelomzellen beobachtet werden, dass eine medikamentöse Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems oder dessen Überlastung zu einer verstärkten Aggresomenbildung führt, was die Abhängigkeit der Tumorzellen von HDAC6 nach Proteasominhibition unterstreicht [247]. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Bildung von Aggresomen vor allem dann von Bedeutung ist, wenn

Proteinaggregate in der Zelle akkumulieren, die über das Proteasom nicht mehr abgebaut werden können. Dabei scheint dieser Mechanismus jedoch nur in Tumorzellen von Bedeutung zu sein. Bazzaro et al haben gezeigt, dass normale Zellen auf eine Bortezomib-Behandlung nicht mit einer Aggresomenbildung reagieren [209]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die HDAC6-vermittelte Aggresomenbildung ohne verstärkten ER-Stress nur eine untergeordnete Rolle spielt [247].

Aus den oben beschriebenen Beobachtungen entwickelte sich der Gedanke, dass man durch eine gleichzeitige Hemmung von HDAC6 und des Ubiquitin-Proteasom-Systems eine synergistische Wirkung mit der Folge einer verstärkten Zytotoxizität erzielen könnte. Ein solcher Effekt ist bereits bei Ovarialkarzinom-Zelllinien, Multiplen Myelomzellen und Pankreaskarzinom-Zelllinien beobachtet worden [132, 209, 248]. Bazzaro et al. konnten zeigen, dass eine solche Kombinationstherapie einen massiven Anstieg von fehlgefalteten Proteinen mit nachfolgendem Zelltod zur Folge hat. In Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde der Proteasominhibitor Bortezomib mit dem HDAC6-Inhibitor NK84 kombiniert und die Zellen 24 h lang inkubiert. Nach Monotherapie mit einer submaximalen Dosis von 5 μ M NK84 war bei keiner der untersuchten Tumorzelllinien eine signifikante Vitalitätsreduktion zu beobachten. Eine Kombination von 10 nM Bortezomib mit 5 μ M NK84 hingegen führte zu einer Reduktion der Zellvitalität von ca. 50 % gegenüber der alleinigen Behandlung mit Bortezomib. Die Zellvitalität von CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen sowie von immortalisierten ovariellen Oberflächenepithel-Zelllinien wurde hingegen nicht beeinträchtigt, was zeigt, dass die Kombination von Bortezomib mit einem HDAC6-Inhibitor auf normale Zellen keinen toxischen Effekt ausübt.

In dieser Arbeit konnten in den meisten analysierten Urothelkarzinom-Zelllinien durch Kombination von Bortezomib mit Tubacin nur geringe synergistische Effekte beobachtet werden. Ein möglicher Grund wäre, dass die Aggresomenbildung keinen essenziellen Prozess für das Überleben der Zellen darstellt. Es wäre denkbar, dass die Proteine nach Proteasominhibition verstärkt über Autophagie abgebaut werden. Hierfür wäre es sinnvoll nachzuweisen, ob nach Behandlung mit Tubacin und Bortezomib in Urothelkarzinom-Zelllinien ein erhöhter Proteinabbau durch Autophagie beobachtet werden kann. Zudem wäre es sinnvoll zu analysieren, ob mit einer HDAC6-spezifischen siRNA behandelte Urothelkarzinom-Zelllinien bei Kombination mit Bortezomib analog zu den mit Tubacin und Bortezomib behandelten Zelllinien reagieren. Dies könnte klären, ob die Urothelkarzinomzellen tatsächlich nicht von HDAC6 abhängig sind oder ob Tubacin in

Urothelkarzinom-Zelllinien möglicherweise nur bestimmte Funktionen von HDAC6 wie die Aggresomenbildung hemmt. Für Multiple Myelomzellen konnten Hideshima et al. zeigen, dass durch eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC6 ähnliche Effekte wie durch Tubacin beobachtet werden können [132].

Um den Mechanismus, dem die Reduktion der Zellvitalität nach Bortezomib-Behandlung in Urothelkarzinom-Zelllinien zugrunde liegt, näher zu analysieren, wurden in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie entsprechende Analysen durchgeführt. Färbungen mit Annexin V und Propidiumjodid ergaben, dass die Verminderung der Vitalität durch Bortezomib auf Apoptoseinduktion beruht. Für Bortezomib ist in der Literatur eine Induktion von Apoptose in verschiedenen Tumorzellen wie Retinoblastom- oder CML-Zellen beschrieben worden [249, 250]. Papageorgiou et al. [251] haben in Urothelkarzinomzellen eine Apoptoseinduktion in Kombination mit IFN- α detektiert. Normale Zellen hingegen blieben von einer Bortezomib-Behandlung unbeeinflusst [252]. Es wurde gezeigt, dass die Apoptoseinduktion nach Bortezomib-Behandlung durch eine Erhöhung des zellulären ER-Stresses bedingt ist [247]. Es wäre möglich, dass der durch Bortezomib induzierte ER-Stress bei normalen Zellen für die Auslösung einer Apoptose nicht ausreicht, sondern stattdessen Signalwege aktiviert, die ein Überleben der Zellen sichern. Analog dazu konnte bei Behandlung von Tumorzellen mit Bortezomib und dem HDAC6-Inhibitor NK84, welche zuvor mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid behandelt worden waren, eine höhere Zellvitalität festgestellt werden als bei Zellen ohne Cycloheximid-Behandlung [209].

Kamat et al. [238] beobachteten bei den Urothelkarzinom-Zelllinien 253JB-V, RT4, KU7, UM-UC3 und UM-UC14, dass durch Bortezomib-Behandlung bereits in geringen Konzentrationen auf der einen Seite das Zellwachstum dosisabhängig inhibiert wurde, die Rate an apoptotischen Zellen jedoch zelllinienabhängig stark variierte. Dies ließ die Autoren darauf schließen, dass Bortezomib vor allem die Proliferation von Urothelkarzinomzellen inhibiert. Umuc3-Zellen, welche auch in dieser Arbeit analysiert wurden, zeigten in beiden Arbeiten eine schwache Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Bortezomib. Analog dazu konnte im CellTiter-Glo Assay herausgestellt werden, dass die Vitalität der Umuc3-Zellen im Vergleich zu den anderen Urothelkarzinom-Zelllinien am geringsten durch die Bortezomib-Behandlung beeinflusst wurde. Die Zelllinien RT-112, 639v und VmCub1, welche neben Umuc3 in dieser Arbeit analysiert worden waren, zeigten eine deutlich erhöhte Rate an apoptotischen Zellen nach Bortezomib-Behandlung.

4.9 Einfluss von HDAC6 auf die Zellmigration

HDAC6 ist in vielen Tumoren für Zellmigration und Zell-Zell-Kontakt-Bildung essenziell und beeinflusst die Invasivität von Zellen maßgeblich [85, 204, 253, 254]. Eine Inhibition von HDAC6 geht in vielen Tumorentitäten mit einer verringerten Motilität einher [59, 209]. Eine im Jahr 2012 veröffentlichte Arbeit deutet darauf hin, dass HDAC6 im Urothelkarzinom zusammen mit SIRT2 einen Einfluss auf die Migration hat [254].

Daher wurde die Migrationsfähigkeit von Urothelkarzinom-Zelllinien nach Tubacin- sowie siRNA-Behandlung mittels Scratch-Assay untersucht. Insgesamt wiesen die Zellen eine eher langsame Migrationsgeschwindigkeit auf. Bei BFTC905 konnten wir sowohl nach medikamentöser Inhibition als auch nach siRNA-Behandlung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Migrationsverhaltens feststellen. Bei der Zelllinie RT-112 hingegen ließ sich in beiden Fällen eine leichte Migrationshemmung beobachten. 5637-Zellen wiederum zeigten lediglich nach siRNA-Behandlung ein verändertes Migrationsverhalten. Auffällig war zudem, dass die Migrationsfähigkeit der mit siRNA-behandelten Zellen deutlich geringer war als nach Tubacin-Behandlung.

Bazzaro et al. konnten für Ovarialkarzinom-Zelllinien beobachten, dass konfluent gewachsene Zellen aufgrund ihrer durch Zell-Zell-Kontakt bedingten verminderten Proliferationsfähigkeit durch Tubacin weniger beeinflusst wurden als proliferierende Zellen [209]. Bazzaro et al. führten dieses Phänomen auf den mit einer erhöhten Proliferation verbundenen ER-Stress zurück, der die Abhängigkeit der Zellen von HDAC6 und dem Ubiquitin-Proteasom-System erhöht. Urothelkarzinom-Zelllinien sind hingegen stark in ihrem epithelialen Zellverband eingebunden. Für eine Zell-Zell-Kontakt-bedingte Wachstumsinhibition gibt es bislang nur wenig Hinweise.

4.10 Effekt von HDAC6 auf Proliferation und Klonogenität

Neben dem aktuellen Effekt auf die Zellvitalität wurde zudem die Wirkung von HDAC6 auf die langfristige Proliferation untersucht. Diese wurde durch Tubacin-Behandlung deutlich negativ beeinflusst, stärker in VmCub1- als in 639v-Zellen. Von einer negativen Beeinflussung der Proliferation von Tumorzellen durch Tubacin wurde bereits in mehreren Arbeiten berichtet [217]. Für Urothelkarzinom-Zelllinien liegen diesbezüglich bislang keine Daten vor.

Neben der Proliferationsfähigkeit nach HDAC6-Inhibition wurde auch die Klonogenität untersucht. Hierbei wurde Bortezomib, von welchem eine Inhibition der Klonogenität bereits bekannt ist, als Kontrolle mitgeführt. Von einer Beeinflussung der Klonogenität nach HDAC6-Inhibition ist in einer Arbeit mit der Darmkrebs-Zelllinie Caco-2 berichtet worden [255]. Analog wurde in dieser Arbeit für die Zelllinie VmCub1 eine deutliche Reduktion der Klonogenität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet. Bei der Zelllinie 639v hingegen waren keine entsprechenden Veränderungen sichtbar. Die Tatsache, dass die Klonogenität der Zelllinie VmCub1 durch Tubacin stärker negativ beeinflusst wurde als die der Zelllinie 639v, passt zu der Beobachtung, dass auch die Proliferationsfähigkeit der VmCub1-Zellen nach Tubacin-Behandlung geringer ausfiel als die der 639v-Zellen. Auffällig ist hierbei, dass das HDAC6-Expressionsniveau der Zelllinie VmCub1 deutlich niedriger liegt als das der Zelllinie 639v.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Wyszynski, A.; Tanyos, S. A.; Rees, J. R.; Marsit, C. J.; Kelsey, K. T.; Schned, A. R.; Pendleton, E. M.; Celaya, M. O.; Zens, M. S.; Karagas, M. R.; Andrew, A. S. Body mass and smoking are modifiable risk factors for recurrent bladder cancer. *Cancer* **2014**, *120*, 408–414.
2. Taylor, J. A.; Kuchel, G. A. Bladder cancer in the elderly: clinical outcomes, basic mechanisms, and future research direction. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2009**, *6*, 135–144.
3. Kipp, B. R.; Tyner, H. L.; Campion, M. B.; Voss, J. S.; Karnes, R. J.; Sebo, T. J.; Halling, K. C.; Zhang, J. Chromosomal alterations detected by fluorescence in situ hybridization in urothelial carcinoma and rarer histologic variants of bladder cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **2008**, *130*, 552–559.
4. Murta-Nascimento, C.; Schmitz-Dräger, B. J.; Zeegers, M. P.; Steineck, G.; Kogevinas, M.; Real, F. X.; Malats, N. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J. Urol.* **2007**, *25*, 285–295.
5. Babjuk, M.; Burger, M.; Zigeuner, R.; Shariat, S. F.; van Rhijn, B. W. G.; Compérat, E.; Sylvester, R. J.; Kaasinen, E.; Böhle, A.; Palou Redorta, J.; Rouprêt, M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur. Urol.* **2013**, *64*, 639–653.
6. Kirkali, Z.; Chan, T.; Manoharan, M.; Algaba, F.; Busch, C.; Cheng, L.; Kiemeny, L.; Kriegmair, M.; Montironi, R.; Murphy, W. M.; Sesterhenn, I. A.; Tachibana, M.; Weider, J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* **2005**, *66*, 4–34.
7. Cheng, L.; MacLennan, G. T.; Lopez-Beltran, A. Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal. *Hum. Pathol.* **2012**, *43*, 2097–2108.
8. Dorp, F. vom; Kausch, I.; Jocham, D. Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms: Teil 2 der Serie zum Harnblasenkarzinom. *Dtsch. Ärztebl.* **2007**, *104*, 797–802.
9. Nkwam, N.; Chen, T. F. Non-muscle invasive transitional cell carcinoma of the distal ureter and bladder with lung metastasis: a case report and literature review. *Int. J. Surg. Case Rep.* **2013**, *4*, 382–384.
10. Vishnu, P.; Mathew, J.; Tan, W. W. Current therapeutic strategies for invasive and metastatic bladder cancer. *Oncotargets Ther.* **2011**, *4*, 97–113.
11. Srinivasan, H.; Allory, Y.; Sill, M.; Vordos, D.; Alhamdani, M. S. S.; Radvanyi, F.; Hoheisel, J. D.; Schröder, C. Prediction of recurrence of non muscle-invasive bladder cancer by means of a protein signature identified by antibody microarray analyses. *Proteomics* **2014**, *14*, 1333–1342.
12. Stein, J. P.; Skinner, D. G. Results with radical cystectomy for treating bladder cancer: a “reference standard” for high-grade, invasive bladder cancer. *BJU Int.* **2003**, *92*, 12–17.
13. Addeo, R.; Caraglia, M.; Bellini, S.; Abbruzzese, A.; Vincenzi, B.; Montella, L.; Miragliuolo, A.; Guarrasi, R.; Lanna, M.; Cennamo, G.; Faiola, V.; Del Prete, S. Randomized phase III trial on gemcitabine versus mitomycin in recurrent superficial bladder cancer: evaluation of efficacy and tolerance. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 543–548.
14. Manoharan, M.; Soloway, M. S. Optimal management of the T1G3 bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.* **2005**, *32*, 133–145.
15. Heng, D. Y. C.; Garcia, J. A. High-risk bladder cancer: improving outcomes with perioperative chemotherapy. *Oncol. Rev.* **2008**, *2*, 4–8.
16. Zieger, K.; Jensen, K. M.-E. Long-term risk of progression of carcinoma in situ of the bladder and impact of bacille Calmette-Guérin immunotherapy on the outcome. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **2011**, *45*, 411–418.

17. Kawai, K.; Miyazaki, J.; Joraku, A.; Nishiyama, H.; Akaza, H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 22–27.
18. Zlotta, A. R.; Fleshner, N. E.; Jewett, M. A. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Can. Urol. Assoc. J.* **2009**, *3*, S199–205.
19. Witjes, J. A.; Compérat, E.; Cowan, N. C.; De Santis, M.; Gakis, G.; Lebet, T.; Ribal, M. J.; Van der Heijden, A. G.; Sherif, A. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur. Urol.* **2014**, *65*, 778–792.
20. Jones, P. A.; Baylin, S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* **2007**, *128*, 683–692.
21. Zhou, Y.; Kim, J.; Yuan, X.; Braun, T. Epigenetic modifications of stem cells: a paradigm for the control of cardiac progenitor cells. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1067–1081.
22. Bergbauer, M.; Kalla, M.; Schmeink, A.; Göbel, C.; Rothbauer, U.; Eck, S.; Benet-Pagès, A.; Strom, T. M.; Hammerschmidt, W. CpG-methylation regulates a class of Epstein-Barr virus promoters. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001114.
23. Deaton, A. M.; Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1010–1022.
24. Heberlein, A.; Muschler, M.; Frieling, H.; Behr, M.; Eberlein, C.; Wilhelm, J.; Gröschl, M.; Kornhuber, J.; Bleich, S.; Hillemacher, T. Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. *Addict. Biol.* **2013**, *18*, 508–510.
25. Zukiel, R.; Nowak, S.; Barciszewska, A.-M.; Gawronska, I.; Keith, G.; Barciszewska, M. Z. A simple epigenetic method for the diagnosis and classification of brain tumors. *Mol. Cancer Res.* **2004**, *2*, 196–202.
26. Baylin, S. B. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 687–692.
27. Shima, K.; Noshio, K.; Baba, Y.; Cantor, M.; Meyerhardt, J. A.; Giovannucci, E. L.; Fuchs, C. S.; Ogino, S. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: cohort study and literature review. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 1080–1094.
28. Santos-Rosa, H.; Caldas, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2381–2402.
29. Yoo, C. B.; Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 37–50.
30. Kamakaka, R. T.; Biggins, S. Histone variants: deviants? *Genes Dev.* **2005**, *19*, 295–310.
31. Mottet, D.; Castronovo, V. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clin. Exp. Metastasis* **2007**, *25*, 183–189.
32. Perico, A.; La Penna, G.; Arcesi, L. Electrostatic interactions with histone tails may bend linker DNA in chromatin. *Biopolymers* **2006**, *81*, 20–28.
33. Khan, S. N.; Khan, A. U. Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: an update. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 1401–1411.
34. Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 243–269.
35. Turner, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* **2000**, *22*, 836–845.
36. Bannister, A. J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **2011**, *21*, 381–395.
37. Sacconi, S.; Natoli, G. Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2219–2224.
38. Gloczak, M. A.; Seto, E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 5420–5432.
39. Rikiishi, H. Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 830260.

40. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–149.
41. Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett.* **2009**, *277*, 8–21.
42. Gao, L.; Cueto, M. A.; Asselbergs, F.; Atadja, P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25748–25755.
43. De Ruijter, A. J. M.; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 737–749.
44. Glozak, M. A.; Sengupta, N.; Zhang, X.; Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **2005**, *363*, 15–23.
45. Zhu, C.; Chen, Q.; Xie, Z.; Ai, J.; Tong, L.; Ding, J.; Geng, M. The role of histone deacetylase 7 (HDAC7) in cancer cell proliferation: regulation on c-Myc. *J. Mol. Med.* **2011**, *89*, 279–289.
46. Riolo, M. T.; Cooper, Z. A.; Holloway, M. P.; Cheng, Y.; Bianchi, C.; Yakirevich, E.; Ma, L.; Chin, Y. E.; Altura, R. A. Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates survivin for its nuclear export in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 10885–10893.
47. Kovacs, J. J.; Murphy, P. J. M.; Gaillard, S.; Zhao, X.; Wu, J.-T.; Nicchitta, C. V.; Yoshida, M.; Toft, D. O.; Pratt, W. B.; Yao, T.-P. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 601–607.
48. Li, Y.; Shin, D.; Kwon, S. H. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J.* **2013**, *280*, 775–793.
49. Aldana-Masangkay, G. I.; Sakamoto, K. M. The role of HDAC6 in cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 875824.
50. New, M.; Olzscha, H.; La Thangue, N. B. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol. Oncol.* **2012**, *6*, 637–656.
51. Bertos, N. R.; Gilquin, B.; Chan, G. K. T.; Yen, T. J.; Khochbin, S.; Yang, X.-J. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48246–48254.
52. Yao, Y.-L.; Yang, W.-M. Beyond histone and deacetylase: an overview of cytoplasmic histone deacetylases and their nonhistone substrates. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 146493.
53. Downing, K. H.; Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 16–22.
54. Mandelkow, E.; Mandelkow, E. M. Microtubular structure and tubulin polymerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2*, 3–9.
55. Matsuyama, A.; Shimazu, T.; Sumida, Y.; Saito, A.; Yoshimatsu, Y.; Seigneurin-Berny, D.; Osada, H.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Horinouchi, S.; Yoshida, M. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* **2002**, *21*, 6820–6831.
56. Piperno, G.; LeDizet, M.; Chang, X. J. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* **1987**, *104*, 289–302.
57. North, B. J.; Marshall, B. L.; Borra, M. T.; Denu, J. M.; Verdin, E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 437–444.
58. Hubbert, C.; Guardiola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A.; Nixon, A.; Yoshida, M.; Wang, X.-F.; Yao, T.-P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **2002**, *417*, 455–458.
59. Tran, A. D.-A.; Marmo, T. P.; Salam, A. A.; Che, S.; Finkelstein, E.; Kabarriti, R.; Xenias, H. S.; Mazitschek, R.; Hubbert, C.; Kawaguchi, Y.; Sheetz, M. P.; Yao, T.-P.;

- Bulinski, J. C. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 1469–1479.
60. Fribley, A.; Zhang, K.; Kaufman, R. J. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *559*, 191–204.
61. Hideshima, T. Intracellular protein degradation and its therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 8530–8533.
62. Mani, A.; Gelmann, E. P. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4776–4789.
63. Catley, L.; Weisberg, E.; Kiziltepe, T.; Tai, Y.-T.; Hideshima, T.; Neri, P.; Tassone, P.; Atadja, P.; Chauhan, D.; Munshi, N. C.; Anderson, K. C. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood* **2006**, *108*, 3441–3449.
64. Olzmann, J. A.; Li, L.; Chin, L. S. Aggresome formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 47–60.
65. Kawaguchi, Y.; Kovacs, J. J.; McLaurin, A.; Vance, J. M.; Ito, A.; Yao, T. P. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **2003**, *115*, 727–738.
66. Hirokawa, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **1998**, *279*, 519–526.
67. Rodriguez-Gonzalez, A.; Lin, T.; Ikeda, A. K.; Simms-Waldrup, T.; Fu, C.; Sakamoto, K. M. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2557–2560.
68. Zhang, X.; Yuan, Z.; Zhang, Y.; Yong, S.; Salas-Burgos, A.; Koomen, J.; Olashaw, N.; Parsons, J. T.; Yang, X.-J.; Dent, S. R.; Yao, T.-P.; Lane, W. S.; Seto, E. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 197–213.
69. Rodriguez, O. C.; Schaefer, A. W.; Mandato, C. A.; Forscher, P.; Bement, W. M.; Waterman-Storer, C. M. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 599–609.
70. Zhu, J.; Zhou, K.; Hao, J.-J.; Liu, J.; Smith, N.; Zhan, X. Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 807–817.
71. Mori, M.; Monnier, N.; Daigle, N.; Bathe, M.; Ellenberg, J.; Lénárt, P. Intracellular transport by an anchored homogeneously contracting F-actin meshwork. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 606–611.
72. Pratt, W. B.; Morishima, Y.; Peng, H.-M.; Osawa, Y. Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Exp. Biol. Med.* **2010**, *235*, 278–289.
73. Taipale, M.; Jarosz, D. F.; Lindquist, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 515–528.
74. Bali, P. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26729–26734.
75. Karkoulis, P. K.; Stravopodis, D. J.; Margaritis, L. H.; Voutsinas, G. E. 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 481.
76. Rao, R.; Fiskus, W.; Yang, Y.; Lee, P.; Joshi, R.; Fernandez, P.; Mandawat, A.; Atadja, P.; Bradner, J. E.; Bhalla, K. HDAC6 inhibition enhances 17-AAG-mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* **2008**, *112*, 1886–1893.

77. Park, J.-H.; Kim, S.-H.; Choi, M.-C.; Lee, J.; Oh, D.-Y.; Im, S.-A.; Bang, Y.-J.; Kim, T.-Y. Class II histone deacetylases play pivotal roles in heat shock protein 90-mediated proteasomal degradation of vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 318–322.
78. Kong, X.; Lin, Z.; Liang, D.; Fath, D.; Sang, N.; Caro, J. Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2019–2028.
79. Li, X.; Zhang, K.; Li, Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J. Hematol. Oncol.* **2011**, *4*, 8.
80. Behrens, J. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **1993**, *24*, 175–184.
81. Palmer, T. D.; Ashby, W. J.; Lewis, J. D.; Zijlstra, A. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 568–581.
82. Sakuma, T.; Uzawa, K.; Onda, T.; Shiiba, M.; Yokoe, H.; Shibahara, T.; Tanzawa, H. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2006**, *29*, 117–124.
83. Kanno, K.; Kanno, S.; Nitta, H.; Uesugi, N.; Sugai, T.; Masuda, T.; Wakabayashi, G.; Maesawa, C. Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 867–873.
84. Shan, B.; Yao, T.; Nguyen, H. T.; Zhuo, Y.; Levy, D. R.; Klingsberg, R. C.; Tao, H.; Palmer, M. L.; Holder, K. N.; Lasky, J. A. Requirement of HDAC6 for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 21065–21073.
85. Saji, S.; Kawakami, M.; Hayashi, S.-I.; Yoshida, N.; Hirose, M.; Horiguchi, S.-I.; Itoh, A.; Funata, N.; Schreiber, S. L.; Yoshida, M.; Toi, M. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* **2005**, *24*, 4531–4539.
86. Zhang, Z.; Yamashita, H.; Toyama, T.; Sugiura, H.; Omoto, Y.; Ando, Y.; Mita, K.; Hamaguchi, M.; Hayashi, S.-I.; Iwase, H. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6962–6968.
87. Li, Y.; Zhang, X.; Polakiewicz, R. D.; Yao, T.-P.; Comb, M. J. HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12686–12690.
88. Zhang, Y.; Kwon, S.; Yamaguchi, T.; Cubizolles, F.; Rousseaux, S.; Kneissel, M.; Cao, C.; Li, N.; Cheng, H.-L.; Chua, K.; Lombard, D.; Mizeracki, A.; Matthias, G.; Alt, F. W.; Khochbin, S.; Matthias, P. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 1688–1701.
89. Fukada, M.; Hanai, A.; Nakayama, A.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Rodriguiz, R. M.; Wetsel, W. C.; Yao, T.-P.; Kawaguchi, Y. Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One* **2012**, *7*, e30924.
90. Tong, J. J.; Liu, J.; Bertos, N. R.; Yang, X.-J. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1114–1123.
91. Fischer, D. D.; Cai, R.; Bhatia, U.; Asselbergs, F. A. M.; Song, C.; Terry, R.; Trogani, N.; Widmer, R.; Atadja, P.; Cohen, D. Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6656–6666.
92. Lee, J.-H.; Jeong, E.-G.; Choi, M.-C.; Kim, S.-H.; Park, J.-H.; Song, S.-H.; Park, J.; Bang, Y.-J.; Kim, T.-Y. Inhibition of histone deacetylase 10 induces thioredoxin-interacting protein and causes accumulation of reactive oxygen species in SNU-620 human gastric cancer cells. *Mol. Cells* **2010**, *30*, 107–112.

93. Cadenas, C.; Franckenstein, D.; Schmidt, M.; Gehrman, M.; Hermes, M.; Geppert, B.; Schormann, W.; Maccoux, L. J.; Schug, M.; Schumann, A.; Wilhelm, C.; Freis, E.; Ickstadt, K.; Rahnenführer, J.; Baumbach, J. I.; Sickmann, A.; Hengstler, J. G. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, R44.
94. Lane, T.; Flam, B.; Lockey, R.; Kolliputi, N. TXNIP shuttling: missing link between oxidative stress and inflammasome activation. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 50.
95. Johnstone, R. W.; Licht, J. D. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* **2003**, *4*, 13–18.
96. Bieliauskas, A. V.; Pflum, M. K. H. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1402–1413.
97. Qian, D. Z.; Kachhap, S. K.; Collis, S. J.; Verheul, H. M. W.; Carducci, M. A.; Atadja, P.; Pili, R. Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8814–8821.
98. Mann, B. S.; Johnson, J. R.; Cohen, M. H.; Justice, R.; Pazdur, R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* **2007**, *12*, 1247–1252.
99. Tiffon, C.; Adams, J.; van der Fits, L.; Wen, S.; Townsend, P.; Ganesan, A.; Hodges, E.; Vermeer, M.; Packham, G. The histone deacetylase inhibitors vorinostat and romidepsin downmodulate IL-10 expression in cutaneous T-cell lymphoma cells: histone deacetylase inhibitors in CTCL. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1590–1602.
100. Gillespie, J.; Savic, S.; Wong, C.; Hempshall, A.; Inman, M.; Emery, P.; Grigg, R.; McDermott, M. F. Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 418–422.
101. Sanderson, L.; Taylor, G. W.; Aboagye, E. O.; Alao, J. P.; Latigo, J. R.; Coombes, R. C.; Vigushin, D. M. Plasma pharmacokinetics and metabolism of the histone deacetylase inhibitor trichostatin a after intraperitoneal administration to mice. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1132–1138.
102. Minami, J.; Suzuki, R.; Mazitschek, R.; Gorgun, G.; Ghosh, B.; Cirstea, D.; Hu, Y.; Mimura, N.; Ohguchi, H.; Cottini, F.; Jakubikova, J.; Munshi, N. C.; Haggarty, S. J.; Richardson, P. G.; Hideshima, T.; Anderson, K. C. Histone deacetylase 3 as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia* **2014**, *28*, 680–689.
103. Moreau, P. Panobinostat to revert bortezomib resistance. *Blood* **2013**, *122*, 2292–2293.
104. Kirschbaum, M. H.; Foon, K. A.; Frankel, P.; Ruel, C.; Pulone, B.; Tuscano, J. M.; Newman, E. M. A phase 2 study of belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia or patients over the age of 60 with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a California Cancer Consortium Study. *Leuk. Lymphoma* **2014**, *Epub ahead of print*.
105. Kim, H.-J.; Bae, S.-C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* **2011**, *3*, 166–179.
106. Khan, N.; Jeffers, M.; Kumar, S.; Hackett, C.; Boldog, F.; Khramtsov, N.; Qian, X.; Mills, E.; Berghe, S. C.; Carey, N.; Finn, P. W.; Collins, L. S.; Tumber, A.; Ritchie, J. W.; Jensen, P. B.; Lichenstein, H. S.; Sehested, M. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 581–589.
107. Shin, B. S.; Yoo, S. D.; Kim, T. H.; Bulitta, J. B.; Landersdorfer, C. B.; Shin, J. C.; Choi, J. H.; Weon, K.-Y.; Joo, S. H.; Shin, S. Quantitative determination of absorption and first-pass metabolism of apicidin, a potent histone deacetylase inhibitor. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 974–982.

108. Kuendgen, A.; Knipp, S.; Fox, F.; Strupp, C.; Hildebrandt, B.; Steidl, C.; Germing, U.; Haas, R.; Gattermann, N. Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* **2005**, *84 Suppl 1*, 61–66.
109. Scherpereel, A.; Berghmans, T.; Lafitte, J. J.; Colinet, B.; Richez, M.; Bonduelle, Y.; Meert, A. P.; Dhalluin, X.; Leclercq, N.; Paesmans, M.; Willems, L.; Sculier, J. P.; European Lung Cancer Working Party (ELCWP) Valproate-doxorubicin: promising therapy for progressing mesothelioma. A phase II study. *Eur. Respir. J.* **2011**, *37*, 129–135.
110. Cudkowicz, M. E.; Andres, P. L.; Macdonald, S. A.; Bedlack, R. S.; Choudry, R.; Brown, R. H.; Zhang, H.; Schoenfeld, D. A.; Shefner, J.; Matson, S.; Matson, W. R.; Ferrante, R. J.; Northeast ALS and National VA ALS Research Consortiums Phase 2 study of sodium phenylbutyrate in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2009**, *10*, 99–106.
111. Dokmanovic, M.; Clarke, C.; Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.* **2007**, *5*, 981–989.
112. Xu, K.; Dai, X.-L.; Huang, H.-C.; Jiang, Z.-F. Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2011**, *2011*, 143269.
113. Yardley, D. A.; Ismail-Khan, R. R.; Melichar, B.; Lichinitser, M.; Munster, P. N.; Klein, P. M.; Cruickshank, S.; Miller, K. D.; Lee, M. J.; Trepel, J. B. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 2128–2135.
114. Blum, K. A.; Advani, A.; Fernandez, L.; Van Der Jagt, R.; Brandwein, J.; Kambhampati, S.; Kassis, J.; Davis, M.; Bonfils, C.; Dubay, M.; Dumouchel, J.; Drouin, M.; Lucas, D. M.; Martell, R. E.; Byrd, J. C. Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2009**, *147*, 507–514.
115. Le Tourneau, C.; Siu, L. L. Promising antitumor activity with MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2008**, *17*, 1247–1254.
116. Pan, L. N.; Lu, J.; Huang, B. HDAC inhibitors: a potential new category of anti-tumor agents. *Cell. Mol. Immunol.* **2007**, *4*, 337–343.
117. Furumai, R.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 87–92.
118. Dallavalle, S.; Pisano, C.; Zunino, F. Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 756–765.
119. Richon, V. M.; Sandhoff, T. W.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10014–10019.
120. Choi, Y. H. Induction of apoptosis by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, is associated with inhibition of cyclooxygenase-2 activity in human non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 473–479.
121. Chen, Y.; Fang, J.; Lu, J.; Qiu, D. Regulation of histone acetylation on the expression of cell cycle-associated genes in human colon cancer cell lines. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **2004**, *84*, 312–317.
122. Huang, L.; Pardee, A. B. Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Mol. Med.* **2000**, *6*, 849–866.

123. Landreville, S.; Agapova, O. A.; Matatall, K. A.; Kneass, Z. T.; Onken, M. D.; Lee, R. S.; Bowcock, A. M.; Harbour, J. W. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 408–416.
124. Shankar, S.; Singh, T. R.; Fandy, T. E.; Luetrakul, T.; Ross, D. D.; Srivastava, R. K. Interactive effects of histone deacetylase inhibitors and TRAIL on apoptosis in human leukemia cells: involvement of both death receptor and mitochondrial pathways. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16*, 1125–1138.
125. Balasubramanian, S.; Ramos, J.; Luo, W.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Buggy, J. J. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* **2008**, *22*, 1026–1034.
126. Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10842–10846.
127. Namdar, M.; Perez, G.; Ngo, L.; Marks, P. A. Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 20003–20008.
128. Hackanson, B.; Rimmele, L.; Benkíßer, M.; Abdelkarim, M.; Fliegau, M.; Jung, M.; Lübbert, M. HDAC6 as a target for antileukemic drugs in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 1055–1062.
129. Malvaez, M.; McQuown, S. C.; Rogge, G. A.; Astarabadi, M.; Jacques, V.; Carreiro, S.; Rusche, J. R.; Wood, M. A. HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 2647–2652.
130. Haggarty, S. J.; Koeller, K. M.; Wong, J. C.; Butcher, R. A.; Schreiber, S. L. Multidimensional chemical genetic analysis of diversity-oriented synthesis-derived deacetylase inhibitors using cell-based assays. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 383–396.
131. Haggarty, S. J.; Koeller, K. M.; Wong, J. C.; Grozinger, C. M.; Schreiber, S. L. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4389–4394.
132. Hideshima, T.; Bradner, J. E.; Wong, J.; Chauhan, D.; Richardson, P.; Schreiber, S. L.; Anderson, K. C. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8567–8572.
133. Parmigiani, R. B.; Xu, W. S.; Venta-Perez, G.; Erdjument-Bromage, H.; Yaneva, M.; Tempst, P.; Marks, P. A. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9633–9638.
134. Scott, G. K.; Marx, C.; Berger, C. E.; Saunders, L. R.; Verdin, E.; Schäfer, S.; Jung, M.; Benz, C. C. Destabilization of ERBB2 transcripts by targeting 3' untranslated region messenger RNA associated HuR and histone deacetylase-6. *Mol. Cancer Res.* **2008**, *6*, 1250–1258.
135. D' Ydewalle, C.; Krishnan, J.; Chiheb, D. M.; Van Damme, P.; Irobi, J.; Kozikowski, A. P.; Berghe, P. V.; Timmerman, V.; Robberecht, W.; Van Den Bosch, L. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 968–974.
136. Field-Smith, A.; Morgan, G. J.; Davies, F. E. Bortezomib (Velcade) in the treatment of multiple myeloma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2006**, *2*, 271–279.
137. Valentiner, U.; Haane, C.; Nehmann, N.; Schumacher, U. Effects of bortezomib on human neuroblastoma cells in vitro and in a metastatic xenograft model. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 1219–1225.
138. Richardson, P. G.; Sonneveld, P.; Schuster, M. W.; Irwin, D.; Stadtmauer, E. A.; Facon, T.; Harousseau, J.-L.; Ben-Yehuda, D.; Lonial, S.; Goldschmidt, H.; Reece, D.; San-Miguel,

- J. F.; Bladé, J.; Boccadoro, M.; Cavenagh, J.; Dalton, W. S.; Boral, A. L.; Esseltine, D. L.; Porter, J. B.; Schenkein, D.; Anderson, K. C. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2487–2498.
139. Chen, D.; Frezza, M.; Schmitt, S.; Kanwar, J.; Dou, Q. P. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 239–253.
140. Castedo, M.; Perfettini, J.-L.; Roumier, T.; Kroemer, G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 1287–1293.
141. Bloom, J.; Amador, V.; Bartolini, F.; DeMartino, G.; Pagano, M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* **2003**, *115*, 71–82.
142. Macleod, K. F.; Sherry, N.; Hannon, G.; Beach, D.; Tokino, T.; Kinzler, K.; Vogelstein, B.; Jacks, T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 935–944.
143. Gartel, A. L.; Radhakrishnan, S. K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3980–3985.
144. Wuerzberger-Davis, S. M.; Chang, P.-Y.; Berchtold, C.; Miyamoto, S. Enhanced G2-M arrest by nuclear factor- κ B-dependent p21waf1/cip1 induction. *Mol. Cancer Res.* **2005**, *3*, 345–353.
145. Pearl, L. H.; Prodromou, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 271–294.
146. Carew, J.; Giles, F.; Nawrocki, S. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 7–17.
147. Schaefer, E. W.; Loaiza-Bonilla, A.; Juckett, M.; DiPersio, J. F.; Roy, V.; Slack, J.; Wu, W.; Laumann, K.; Espinoza-Delgado, I.; Gore, S. D. A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **2009**, *94*, 1375–1382.
148. Bradley, D.; Rathkopf, D.; Dunn, R.; Stadler, W. M.; Liu, G.; Smith, D. C.; Pili, R.; Zwiebel, J.; Scher, H.; Hussain, M. Vorinostat in advanced prostate cancer patients progressing on prior chemotherapy (National Cancer Institute Trial 6862). *Cancer* **2009**, *115*, 5541–5549.
149. Galanis, E.; Jaeckle, K. A.; Maurer, M. J.; Reid, J. M.; Ames, M. M.; Hardwick, J. S.; Reilly, J. F.; Loboda, A.; Nebozhyn, M.; Fantin, V. R.; Richon, V. M.; Scheithauer, B.; Giannini, C.; Flynn, P. J.; Moore, D. F., Jr; Zwiebel, J.; Buckner, J. C. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2052–2058.
150. Atadja, P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Lett.* **2009**, *280*, 233–241.
151. Younes, A.; Sureda, A.; Ben-Yehuda, D.; Zinzani, P. L.; Ong, T.-C.; Prince, H. M.; Harrison, S. J.; Kirschbaum, M.; Johnston, P.; Gallagher, J.; Le Corre, C.; Shen, A.; Engert, A. Panobinostat in patients with relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma after autologous stem-cell transplantation: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2197–2203.
152. DeAngelo, D. J.; Mesa, R. A.; Fiskus, W.; Tefferi, A.; Paley, C.; Wadleigh, M.; Ritchie, E. K.; Snyder, D. S.; Begna, K.; Ganguly, S.; Ondovik, M. S.; Rine, J.; Bhalla, K. N. Phase II trial of panobinostat, an oral pan-deacetylase inhibitor in patients with primary myelofibrosis, post-essential thrombocythaemia, and post-polycythaemia vera myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* **2013**, *162*, 326–335.
153. Coiffier, B.; Pro, B.; Prince, H. M.; Foss, F.; Sokol, L.; Greenwood, M.; Caballero, D.; Borchmann, P.; Morschhauser, F.; Wilhelm, M.; Pinter-Brown, L.; Padmanabhan, S.; Shustov, A.; Nichols, J.; Carroll, S.; Balser, J.; Balser, B.; Horwitz, S. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 631–636.

154. Ramalingam, S. S.; Belani, C. P.; Ruel, C.; Frankel, P.; Gitlitz, B.; Koczywas, M.; Espinoza-Delgado, I.; Gandara, D. Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **2009**, *4*, 97–101.
155. Wagner, J. M.; Hackanson, B.; Lübbert, M.; Jung, M. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin. Epigenetics* **2010**, *1*, 117–136.
156. Pacey, S.; Gore, M.; Chao, D.; Banerji, U.; Larkin, J.; Sarker, S.; Owen, K.; Asad, Y.; Raynaud, F.; Walton, M.; Judson, I.; Workman, P.; Eisen, T. A phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 341–349.
157. Solit, D. B.; Osman, I.; Polsky, D.; Panageas, K. S.; Daud, A.; Goydos, J. S.; Teitcher, J.; Wolchok, J. D.; Germino, F. J.; Krown, S. E.; Coit, D.; Rosen, N.; Chapman, P. B. Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 8302–8307.
158. Heath, E. I.; Hillman, D. W.; Vaishampayan, U.; Sheng, S.; Sarkar, F.; Harper, F.; Gaskins, M.; Pitot, H. C.; Tan, W.; Ivy, S. P.; Pili, R.; Carducci, M. A.; Erlichman, C.; Liu, G. A phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7940–7946.
159. Kane, R. C.; Farrell, A. T.; Sridhara, R.; Pazdur, R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2955–2960.
160. Kane, R. C.; Dagher, R.; Farrell, A.; Ko, C.-W.; Sridhara, R.; Justice, R.; Pazdur, R. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5291–5294.
161. Badros, A.; Burger, A. M.; Philip, S.; Niesvizky, R.; Kolla, S. S.; Goloubeva, O.; Harris, C.; Zwiebel, J.; Wright, J. J.; Espinoza-Delgado, I.; Baer, M. R.; Holleran, J. L.; Egorin, M. J.; Grant, S. Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5250–5257.
162. Richardson, P. G.; Schlossman, R. L.; Alsina, M.; Weber, D. M.; Coutre, S. E.; Gasparetto, C.; Mukhopadhyay, S.; Ondovik, M. S.; Khan, M.; Paley, C. S.; Lonial, S. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood* **2013**, *122*, 2331–2337.
163. Dimopoulos, M.; Siegel, D. S.; Lonial, S.; Qi, J.; Hajek, R.; Facon, T.; Rosinol, L.; Williams, C.; Blacklock, H.; Goldschmidt, H.; Hungria, V.; Spencer, A.; Palumbo, A.; Graef, T.; Eid, J. E.; Hou, J.; Sun, L.; Vuocolo, S.; Anderson, K. C. Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 1129–1140.
164. Niegisch, G.; Knievel, J.; Koch, A.; Hader, C.; Fischer, U.; Albers, P.; Schulz, W. A. Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urol. Oncol.* **2013**, *31*, 1770–1779.
165. Lee, J.-S.; Leem, S.-H.; Lee, S.-Y.; Kim, S.-C.; Park, E.-S.; Kim, S.-B.; Kim, S.-K.; Kim, Y.-J.; Kim, W.-J.; Chu, I.-S. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2660–2667.
166. Elliott, A. Y.; Bronson, D. L.; Cervenka, J.; Stein, N.; Fraley, E. E. Properties of cell lines established from transitional cell cancers of the human urinary tract. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1279–1289.
167. Elliott, A. Y.; Cleveland, P.; Cervenka, J.; Castro, A. E.; Stein, N.; Hakala, T. R.; Fraley, E. E. Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 1341–1349.

168. Neveling, K.; Kalb, R.; Florl, A. R.; Herterich, S.; Friedl, R.; Hoehn, H.; Hader, C.; Hartmann, F. H.; Nanda, I.; Steinlein, C.; Schmid, M.; Tönnies, H.; Hurst, C. D.; Knowles, M. A.; Hanenberg, H.; Schulz, W. A.; Schindler, D. Disruption of the FA/BRCA pathway in bladder cancer. *Cytogenet. Genome Res.* **2007**, *118*, 166–176.
169. Williams, R. D. Human urologic cancer cell lines. *Invest. Urol.* **1980**, *17*, 359–363.
170. Williams, S. V.; Adams, J.; Coulter, J.; Summersgill, B. M.; Shipley, J.; Knowles, M. A. Assessment by M-FISH of karyotypic complexity and cytogenetic evolution in bladder cancer in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* **2005**, *43*, 315–328.
171. Tzeng, C. C.; Liu, H. S.; Li, C.; Jin, Y. T.; Chen, R. M.; Yang, W. H.; Lin, J. S. Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1797–1804.
172. Kyriazis, A. A.; Kyriazis, A. P.; McCombs, W. B.; Peterson, W. D. Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 3997–4005.
173. Sabichi, A.; Keyhani, A.; Tanaka, N.; Delacerda, J.; Lee, I.; Zou, C.; Zhou, J.; Benedict, W. F.; Grossman, H. B. Characterization of a panel of cell lines derived from urothelial neoplasms: genetic alterations, growth in vivo and the relationship of adenoviral mediated gene transfer to coxsackie adenovirus receptor expression. *J. Urol.* **2006**, *175*, 1133–1137.
174. Paulie, S.; Hansson, Y.; Lundblad, M. L.; Perlmann, P. Lectins as probes for identification of tumor-associated antigens on urothelial and colonic carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **1983**, *31*, 297–303.
175. Lin, C. W.; Lin, J. C.; Prout, G. R. Establishment and characterization of four human bladder tumor cell lines and sublines with different degrees of malignancy. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 5070–5079.
176. Masters, J. R.; Hepburn, P. J.; Walker, L.; Highman, W. J.; Trejdosiewicz, L. K.; Povey, S.; Parkar, M.; Hill, B. T.; Riddle, P. R.; Franks, L. M. Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 3630–3636.
177. Rasheed, S.; Gardner, M. B.; Rongey, R. W.; Nelson-Rees, W. A.; Arnstein, P. Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* **1977**, *58*, 881–890.
178. O’Toole, C.; Price, Z. H.; Ohnuki, Y.; Unsgaard, B. Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **1978**, *38*, 64–76.
179. Bubeník, J.; Baresová, M.; Viklický, V.; Jakoubková, J.; Sainerová, H.; Donner, J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int. J. Cancer* **1973**, *11*, 765–773.
180. Grossman, H. B.; Wedemeyer, G.; Ren, L.; Wilson, G. N.; Cox, B. Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *J. Urol.* **1986**, *136*, 953–959.
181. Southgate, J.; Hutton, K. A.; Thomas, D. F.; Trejdosiewicz, L. K. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab. Invest.* **1994**, *71*, 583–594.
182. Swiatkowski, S. Signaltransduktionswege in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen uroepithelialen Zellen. **2006**, Heinrich–Heine–Universität, Medizinische Fakultät Düsseldorf, Dissertation.
183. Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **1996**, *6*, 986–994.
184. Duran, E. M.; Shapshak, P.; Worley, J.; Minagar, A.; Ziegler, F.; Haliko, S.; Moleon-Borodowsky, I.; Haslett, P. A. J. Presenilin-1 detection in brain neurons and FOXP3 in

- peripheral blood mononuclear cells: normalizer gene selection for real time reverse transcriptase pcr using the deltadeltaCt method. *Front. Biosci.* **2005**, *10*, 2955–2965.
185. Terstappen, L. W.; Mickaels, R. A.; Dost, R.; Loken, M. R. Increased light scattering resolution facilitates multidimensional flow cytometric analysis. *Cytometry* **1990**, *11*, 506–512.
186. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39–51.
187. Zhuang, Y.; Nguyen, H. T.; Lasky, J. A.; Cao, S.; Li, C.; Hu, J.; Guo, X.; Burow, M. E.; Shan, B. Requirement of a novel splicing variant of human histone deacetylase 6 for TGF- β 1-mediated gene activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *392*, 608–613.
188. Oliver, F. J.; de la Rubia, G.; Rolli, V.; Ruiz-Ruiz, M. C.; de Murcia, G.; Murcia, J. M. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33533–33539.
189. Los, M. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 978–988.
190. Schulte, T. W.; Blagosklonny, M. V.; Ingui, C.; Neckers, L. Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24585–24588.
191. Zou, J.; Guo, Y.; Guettouche, T.; Smith, D. F.; Voellmy, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **1998**, *94*, 471–480.
192. Nawrocki, S. T.; Sweeney-Gotsch, B.; Takamori, R.; McConkey, D. J. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 59–70.
193. Kruh, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *42*, 65–82.
194. Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17174–17179.
195. Duvic, M.; Talpur, R.; Ni, X.; Zhang, C.; Hazarika, P.; Kelly, C.; Chiao, J. H.; Reilly, J. F.; Ricker, J. L.; Richon, V. M.; Frankel, S. R. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* **2007**, *109*, 31–39.
196. Pazolli, E.; Alspach, E.; Milczarek, A.; Prior, J.; Piwnica-Worms, D.; Stewart, S. A. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2251–2261.
197. Cheung, E.; Quinn, D.; Tsao-Wei, D. Phase II study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced transitional cell urothelial cancer (TCC) after platinum-based therapy: California Cancer Consortium/University of Pittsburgh nci/ctep-sponsored trial. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 16058S.
198. Schneider, B. J.; Kalemkerian, G. P.; Bradley, D.; Smith, D. C.; Egorin, M. J.; Daignault, S.; Dunn, R.; Hussain, M. Phase I study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, NSC 701852) in combination with docetaxel in patients with advanced and relapsed solid malignancies. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 249–257.
199. Buckley, M. T.; Yoon, J.; Yee, H.; Chiriboga, L.; Liebes, L.; Ara, G.; Qian, X.; Bajorin, D. F.; Sun, T.-T.; Wu, X.-R.; Osman, I. The histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) suppresses bladder cancer cell growth in vitro and in vivo. *J. Transl. Med.* **2007**, *5*, 49.

200. Vallo, S.; Xi, W.; Hudak, L.; Juengel, E.; Tsaour, I.; Wiesner, C.; Haferkamp, A.; Blaheta, R. A. HDAC inhibition delays cell cycle progression of human bladder cancer cells in vitro. *Anticancer Drugs* **2011**, *22*, 1002–1009.
201. Karam, J. A.; Fan, J.; Stanfield, J.; Richer, E.; Benaim, E. A.; Frenkel, E.; Antich, P.; Sagalowsky, A. I.; Mason, R. P.; Hsieh, J.-T. The use of histone deacetylase inhibitor FK228 and DNA hypomethylation agent 5-azacytidine in human bladder cancer therapy. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 1795–1802.
202. Lee, Y.-S.; Lim, K.-H.; Guo, X.; Kawaguchi, Y.; Gao, Y.; Barrientos, T.; Ordentlich, P.; Wang, X.-F.; Counter, C. M.; Yao, T.-P. The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 7561–7569.
203. Park, S. Y.; Jun, J. A.; Jeong, K. J.; Heo, H. J.; Sohn, J. S.; Lee, H. Y.; Park, C. G.; Kang, J. Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncol. Rep.* **2011**, *25*, 1677–1681.
204. Rey, M.; Irondelle, M.; Waharte, F.; Lizarraga, F.; Chavrier, P. HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 128–135.
205. Deribe, Y. L.; Wild, P.; Chandrashaker, A.; Curak, J.; Schmidt, M. H. H.; Kalaidzidis, Y.; Milutinovic, N.; Kratchmarova, I.; Buerkle, L.; Fetchko, M. J.; Schmidt, P.; Kittanakom, S.; Brown, K. R.; Jurisica, I.; Blagoev, B.; Zerial, M.; Stagljar, I.; Dikic, I. Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Sci. Signal.* **2009**, *2*, ra84.
206. Chen, S.; Owens, G. C.; Makarenkova, H.; Edelman, D. B. HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One* **2010**, *5*, e10848.
207. Liu, Y.; Peng, L.; Seto, E.; Huang, S.; Qiu, Y. Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 29168–29174.
208. Dangond, F.; Henriksson, M.; Zardo, G.; Caiafa, P.; Ekström, T. J.; Gray, S. G. Differential expression of class I HDACs: roles of cell density and cell cycle. *Int. J. Oncol.* **2001**, *19*, 773–777.
209. Bazzaro, M.; Lin, Z.; Santillan, A.; Lee, M. K.; Wang, M.-C.; Chan, K. C.; Bristow, R. E.; Mazitschek, R.; Bradner, J.; Roden, R. B. S. Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7340–7347.
210. Jung, K. H.; Noh, J. H.; Kim, J. K.; Eun, J. W.; Bae, H. J.; Chang, Y. G.; Kim, M. G.; Park, W. S.; Lee, J. Y.; Lee, S.-Y.; Chu, I.-S.; Nam, S. W. Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology* **2012**, *56*, 644–657.
211. Ding, G.; Liu, H.-D.; Huang, Q.; Liang, H.-X.; Ding, Z.-H.; Liao, Z.-J.; Huang, G. HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting P53 transcriptional activity. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 880–886.
212. Song, C.; Zhu, S.; Wu, C.; Kang, J. Histone deacetylase (HDAC) 10 suppresses cervical cancer metastasis through inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 expression. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 28021–28033.
213. Oehme, I.; Linke, J.-P.; Böck, B. C.; Milde, T.; Lodrini, M.; Hartenstein, B.; Wiegand, I.; Eckert, C.; Roth, W.; Kool, M.; Kaden, S.; Gröne, H.-J.; Schulte, J. H.; Lindner, S.; Hamacher-Brady, A.; Brady, N. R.; Deubzer, H. E.; Witt, O. Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E2592–E2601.
214. Verdel, A.; Curtet, S.; Brocard, M. P.; Rousseaux, S.; Lemerrier, C.; Yoshida, M.; Khochbin, S. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 747–749.

215. Kaluza, D.; Kroll, J.; Gesierich, S.; Yao, T.-P.; Boon, R. A.; Hergenreider, E.; Tjwa, M.; Rössig, L.; Seto, E.; Augustin, H. G.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S.; Urbich, C. Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J.* **2011**, *30*, 4142–4156.
216. Kawada, J.; Zou, P.; Mazitschek, R.; Bradner, J. E.; Cohen, J. I. Tubacin kills Epstein-Barr virus (EBV)-Burkitt lymphoma cells by inducing reactive oxygen species and EBV lymphoblastoid cells by inducing apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17102–17109.
217. Aldana-Masangkay, G. I.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Lin, T.; Ikeda, A. K.; Hsieh, Y.-T.; Kim, Y.-M.; Lomenick, B.; Okemoto, K.; Landaw, E. M.; Wang, D.; Mazitschek, R.; Bradner, J. E.; Sakamoto, K. M. Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* **2011**, *52*, 1544–1555.
218. Nikpour, P.; Baygi, M. E.; Steinhoff, C.; Hader, C.; Luca, A. C.; Mowla, S. J.; Schulz, W. A. The RNA binding protein Musashi1 regulates apoptosis, gene expression and stress granule formation in urothelial carcinoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1210–1224.
219. Kwon, S.; Zhang, Y.; Matthias, P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 3381–3394.
220. Rhee, S. G.; Yang, K.-S.; Kang, S. W.; Woo, H. A.; Chang, T.-S. Controlled elimination of intracellular H(2)O(2): regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 619–626.
221. Quan, C.; Cha, E.-J.; Lee, H.-L.; Han, K. H.; Lee, K. M.; Kim, W.-J. Enhanced expression of peroxiredoxin I and VI correlates with development, recurrence and progression of human bladder cancer. *J. Urol.* **2006**, *175*, 1512–1516.
222. Nimmanapalli, R.; O'Bryan, E.; Kuhn, D.; Yamaguchi, H.; Wang, H.-G.; Bhalla, K. N. Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax downstream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases. *Blood* **2003**, *102*, 269–275.
223. Yao, T.-P. The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 779–786.
224. Cyr, D. M.; Höhfeld, J.; Patterson, C. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 368–375.
225. McDade, T. P.; Perugini, R. A.; Vittimberga, F. J.; Callery, M. P. Ubiquitin-proteasome inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Surgery* **1999**, *126*, 371–377.
226. Rajkumar, S. V.; Richardson, P. G.; Hideshima, T.; Anderson, K. C. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 630–639.
227. Micheau, O. Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target? *Expert Opin. Ther. Targets* **2003**, *7*, 559–573.
228. Fricker, N.; Beaudouin, J.; Richter, P.; Eils, R.; Krammer, P. H.; Lavrik, I. N. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 377–389.
229. Krueger, A.; Schmitz, I.; Baumann, S.; Krammer, P. H.; Kirchhoff, S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20633–20640.
230. Safa, A. R.; Day, T. W.; Wu, C.-H. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 37–46.
231. Ewald, F.; Ueffing, N.; Brockmann, L.; Hader, C.; Teliëps, T.; Schuster, M.; Schulz, W. A.; Schmitz, I. The role of c-FLIP splice variants in urothelial tumours. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, e245.
232. Ueffing, N.; Singh, K. K.; Christians, A.; Thorns, C.; Feller, A. C.; Nagl, F.; Fend, F.; Heikau, S.; Marx, A.; Zotz, R. B.; Brade, J.; Schulz, W. A.; Schulze-Osthoff, K.; Schmitz, I.; Schwerk, C. A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein. *Blood* **2009**, *114*, 572–579.

233. Safa, A. R.; Pollok, K. E. Targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for cancer therapy. *Cancers* **2011**, *3*, 1639–1671.
234. Liu, X.; Yue, P.; Chen, S.; Hu, L.; Lonial, S.; Khuri, F. R.; Sun, S.-Y. The proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4981–4988.
235. Micheau, O.; Lens, S.; Gaide, O.; Avezopoulos, K.; Tschoep, J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 5299–5305.
236. Ito, Y.; Inoue, D.; Kido, S.; Matsumoto, T. c-Fos degradation by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in osteoclast progenitors. *Bone* **2005**, *37*, 842–849.
237. Li, W.; Zhang, X.; Olumi, A. F. MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2247–2255.
238. Kamat, A. M.; Karashima, T.; Davis, D. W.; Lashinger, L.; Bar-Eli, M.; Millikan, R.; Shen, Y.; Dinney, C. P. N.; McConkey, D. J. The proteasome inhibitor bortezomib synergizes with gemcitabine to block the growth of human 253JB-V bladder tumors in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 279–290.
239. Zhao, X.; Qiu, W.; Kung, J.; Zhao, X.; Peng, X.; Yegappan, M.; Yen-Lieberman, B.; Hsi, E. D. Bortezomib induces caspase-dependent apoptosis in Hodgkin lymphoma cell lines and is associated with reduced c-FLIP expression: a gene expression profiling study with implications for potential combination therapies. *Leuk. Res.* **2008**, *32*, 275–285.
240. Kabore, A. F.; Sun, J.; Hu, X.; McCreary, K.; Johnston, J. B.; Gibson, S. B. The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis* **2006**, *11*, 1175–1193.
241. Dijk, M. van; Murphy, E.; Morrell, R.; Knapper, S.; O'Dwyer, M.; Samali, A.; Szegezdi, E. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes AML with myelomonocytic differentiation to TRAIL mediated apoptosis. *Cancers* **2011**, *3*, 1329–1350.
242. Scudiero, I.; Zotti, T.; Ferravante, A.; Vessichelli, M.; Reale, C.; Masone, M. C.; Leonardi, A.; Vito, P.; Stilo, R. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 7 is required for TNF α -induced Jun NH2-terminal kinase activation and promotes cell death by regulating polyubiquitination and lysosomal degradation of c-FLIP protein. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6053–6061.
243. Williams, S. A.; McConkey, D. J. The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7338–7344.
244. Watanabe, J.; Nishiyama, H.; Matsui, Y.; Ito, M.; Kawanishi, H.; Kamoto, T.; Ogawa, O. Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines. *Oncogene* **2006**, *25*, 2500–2508.
245. Bianchi, G.; Oliva, L.; Cascio, P.; Pengo, N.; Fontana, F.; Cerruti, F.; Orsi, A.; Pasqualetto, E.; Mezghrani, A.; Calbi, V.; Palladini, G.; Giuliani, N.; Anderson, K. C.; Sita, R.; Cenci, S. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* **2009**, *113*, 3040–3049.
246. Lee, J.-Y.; Koga, H.; Kawaguchi, Y.; Tang, W.; Wong, E.; Gao, Y.-S.; Pandey, U. B.; Kaushik, S.; Tresse, E.; Lu, J.; Taylor, J. P.; Cuervo, A. M.; Yao, T.-P. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* **2010**, *29*, 969–980.
247. Nawrocki, S. T.; Carew, J. S.; Pino, M. S.; Highshaw, R. A.; Andtbacka, R. H. I.; Dunner, K., Jr; Pal, A.; Bornmann, W. G.; Chiao, P. J.; Huang, P.; Xiong, H.; Abbruzzese, J. L.; McConkey, D. J. Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3773–3781.

248. Nawrocki, S. T.; Carew, J. S.; Pino, M. S.; Highshaw, R. A.; Dunner, K., Jr; Huang, P.; Abbruzzese, J. L.; McConkey, D. J. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11658–11666.
249. Poulaki, V.; Mitsiades, C. S.; Kotoula, V.; Negri, J.; McMillin, D.; Miller, J. W.; Mitsiades, N. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in human retinoblastoma cell lines in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 4706–4719.
250. Heaney, N. B.; Pellicano, F.; Zhang, B.; Crawford, L.; Chu, S.; Kazmi, S. M. A.; Allan, E. K.; Jorgensen, H. G.; Irvine, A. E.; Bhatia, R.; Holyoake, T. L. Bortezomib induces apoptosis in primitive chronic myeloid leukemia cells including LTC-IC and NOD/SCID repopulating cells. *Blood* **2010**, *115*, 2241–2250.
251. Papageorgiou, A.; Kamat, A.; Benedict, W. F.; Dinney, C.; McConkey, D. J. Combination therapy with IFN- α plus bortezomib induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human bladder cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 3032–3041.
252. Shapovalov, Y.; Benavidez, D.; Zuch, D.; Eliseev, R. A. Proteasome inhibition with bortezomib suppresses growth and induces apoptosis in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 67–76.
253. Valenzuela-Fernández, A.; Cabrero, J. R.; Serrador, J. M.; Sánchez-Madrid, F. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell–cell interactions. *Trends Cell Biol.* **2008**, *18*, 291–297.
254. Zuo, Q.; Wu, W.; Li, X.; Zhao, L.; Chen, W. HDAC6 and SIRT2 promote bladder cancer cell migration and invasion by targeting cortactin. *Oncol. Rep.* **2012**, *27*, 819–824.
255. Mak, A. B.; Nixon, A. M. L.; Kittanakom, S.; Stewart, J. M.; Chen, G. I.; Curak, J.; Gingras, A.-C.; Mazitschek, R.; Neel, B. G.; Stagljar, I.; Moffat, J. Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 951–963.

6 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. A. Schulz für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, sein kontinuierliches Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit sowie die stetige Betreuung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. med. G. Niegisch danke ich für die Möglichkeit der Teilhabe am HDAC-Projekt, für seine Hilfestellungen vor allem in klinischen Fragen sowie für die Unterstützung bei statistischen Analysen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. M. J. Hoffmann für die intensive experimentelle Einarbeitung und die hervorragende Betreuung. Ihre stetige Unterstützung und konstruktive Kritik haben mir bei der Erstellung meiner Arbeit sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. med. P. Albers danke ich für die Möglichkeit zur Promotion im Forschungslabor der Urologischen Klinik.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Fischer danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Urologischen Forschungslabors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und konstruktive Zusammenarbeit.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen der Urologischen Klinik für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Jung danke ich für die Bereitstellung des HDAC6-Inhibitors ST-80.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. rer. nat. Ute Fischer aus der Kinderklinik für die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihre Unterstützung und stetige Motivation haben mich während meines gesamten Studiums begleitet und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum

Lorena Rosik