

Charakterisierung der Klasse I Histondeacetylasen als Zielmoleküle für die Therapie des Urothelkarzinoms

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Kumulative Dissertation, bestehend aus drei Publikationen

vorgelegt von

MARIA PINKERNEIL

aus Tekeli, Kasachstan

Düsseldorf, Juli 2017

aus dem Forschungslabor der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Referent: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz, Forschungslabor der Klinik für Urologie,
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

2. Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth, Biochemische Pflanzenphysiologie,
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2017

ZUSAMMENFASSUNG

Klasse I HDACs sind in vielen Krebsentitäten an der Entwicklung und Progression von Tumoren beteiligt. Ihre Inhibition führt oft zu starken antineoplastischen Effekten; es ist jedoch umstritten, ob für die Inhibition eher HDAC-Inhibitoren (HDACi) einzelner Enzyme oder pan-Inhibitoren geeignet sind. Im Urothelkarzinom der Harnblase (UC) sind Klasse I HDACs häufig überexprimiert. Basierend darauf war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob ihre Inhibition eine therapeutische Option im UC darstellen könnte. Die Aktivität der Klasse I HDACs wurde über siRNA-vermittelten Knockdown (HDAC1, 2, 1/2, 3 und 8) sowie über Isoform-spezifische HDACi (Romidepsin, Givinostat, Entinostat, Mocetinostat, 4SC-202, RGFP966, BG45, compound 2, 5 und 6) oder den pan-HDACi SAHA in bis zu sieben verschiedenen UC-Zelllinien (RT-112, 5637, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3 und T-24) moduliert. Diese Zelllinien repräsentieren die UC-Heterogenität und weisen distinkte HDAC-Expressionsmuster auf. Zur genauen Analyse der induzierten Effekte wurden verschiedene zelluläre Parameter sowie die Expression von HDACs und relevanten Zielgenen in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und den Kontrollzellen HBLAK (urothelial) und HEK-293 (nicht-urothelial) bestimmt. Ausgeprägte Phänotypen konnten vor allem bei HDAC1/2-Modulation (Doppelknockdown, Romidepsin und Givinostat) oder Inhibition von HDAC1-3 mit 4SC-202 beobachtet werden. Der HDAC1/2-Knockdown resultierte in apoptotischem Zelltod, wohingegen die Inhibition mit Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 primär zu Störungen der Zellzyklus-Progression führte. Die unterschiedliche Ausprägung dieser Effekte spiegelte sich in detaillierten RNA-Expressionsanalysen nach HDACi-Behandlung oder HDAC1/2-Knockdown wider. Die Zellzyklusstörung manifestierte sich in einer erhöhten G2/M-Fraktion, aberranten Mitosen und schließlich in einer Mischform aus apoptotischem und nekrotischem Zelltod. In den Kontrollzellen, insbesondere den urothelialen HBLAK Zellen, waren diese Effekte weniger stark ausgeprägt. Diese entwickeln eher einen zytostatischen Zellzyklusarrest, behalten aber ihre Fähigkeit zur Langzeitproliferation. Die Selektivität gegenüber transformierten Zellen scheint vor allem durch HDAC1/2-Inhibition bestimmt zu sein, weniger durch HDAC3-Inhibition. Insgesamt lässt sich der Schluss ziehen, dass eine kombinierte Inhibition von HDAC1 und 2 eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für das UC darstellt. Demgegenüber ergaben Knockdown und pharmakologische Inhibition von HDAC8 nur geringe signifikante Effekte auf Proliferation, Klonogenität und Migration, sodass HDAC8 kein optimales Zielmolekül im UC darzustellen scheint.

ABSTRACT

Class I HDACs contribute to the development and progression of many cancer entities. Inhibition of HDACs induces strong antineoplastic effects in many tumors but it is disputed whether HDAC inhibitors (HDACi) with selected enzyme targets or pan-HDACi are more useful. Class I HDAC expression is usually upregulated in urinary bladder urothelial carcinoma (UC). Based on this observation, the aim of this study was to investigate whether specific modulation of these enzymes might be a therapeutic option in UC. The activity of class I HDACs was modulated in up to seven different UC cell lines (RT-112, 5637, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3 and T-24) via siRNA-mediated knockdown (HDAC1, 2, 1/2, 3 and 8), isoform-specific HDACi (Romidepsin, Givinostat, Entinostat, Mocetinostat, 4SC-202, RGFP966, BG45, compounds 2, 5 and 6) or by the pan-HDACi SAHA. The selected cell lines cover the heterogeneity of UCs and display distinct HDAC expression patterns. For the detailed analysis of induced effects, various cellular parameters and expression of HDACs and relevant target genes were determined in the UC cell lines VM-CUB1 and UM-UC-3 and in the control cells HBLAK (urothelial) and HEK-293 (non-urothelial). Pronounced phenotypes were particularly observed after HDAC1/2 modulation (double knockdown, Romidepsin and Givinostat) or after pharmacological inhibition of HDAC1-3 by 4SC-202. Knockdown of HDAC1/2 induced apoptotic cell death, whereas pharmacological inhibition with Romidepsin, Givinostat and 4SC-202 primarily interfered with cell cycle progression. These differences were reflected in detailed RNA expression analyses after HDACi treatment or HDAC1/2 double knockdown. Cell cycle disturbances manifested in an increased G2/M-fraction, aberrant mitosis, and finally in a mixed apoptotic and necrotic cell death. These effects were less pronounced in control cells, especially in benign urothelial HBLAK cells which tended towards a cytostatic cell cycle arrest, retaining their ability for long-term proliferation. Selectivity for transformed cells appears to be determined mainly by inhibition of HDAC1/2, but less by targeting HDAC3. In conclusion, combined inhibition especially of HDAC1/2 seems to be a promising treatment for UC. In contrast, siRNA-mediated knockdown or pharmacological targeting of HDAC8 had few significant effects on proliferation, migration and clonogenicity of UC cell lines. HDAC8 seems not to constitute an optimal therapeutic target in UC.

PUBLIKATIONEN

Diese kumulative Dissertation stellt eine Zusammenfassung und übergreifende Diskussion der drei folgenden angegebenen Publikationen (Originalarbeiten) dar. Zusätzlich enthält diese Arbeit noch unveröffentlichte Daten zu HDAC3, die im Zusatzkapitel 6 ausführlich dargestellt sind. Des Weiteren sind Inhalte dieser Dissertation zuvor in einen Übersichtsartikel eingegangen und wurden dort ebenfalls vorgestellt und diskutiert (siehe weitere Publikationen, Pinkerneil et al. 2017). Für eine Beschreibung der eigenen Beiträge zu den verwendeten Publikationen siehe Anhang D. Für diese Dissertation wurde bei allen beteiligten Autoren und den entsprechenden Zeitschriften eine Erlaubnis zur Wiederverwendung der Daten und Inhalte der folgenden Originalarbeiten eingeholt:

Publikation 1: Lehmann et al. 2014

Lehmann M, Hoffmann MJ, Koch A, Ulrich SM, Schulz WA, Niegisch G: **Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2014, **33**:59. Doi: 10.1186/s13046-014-0059-8.

Publikation 2: Pinkerneil et al. 2016a

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Köhrer K, Arent T, Schulz WA, Niegisch G: **Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2016, **15**:299-312. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0618.

Publikation 3: Pinkerneil et al. 2016b

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Kohlhof H, Schulz WA, Niegisch G: **Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines.** *Targeted Oncology* 2016, **11**:783-798. Doi: 10.1007/s11523-016-0444-7.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-------|
| Zusammenfassung | I |
| Abstract..... | II |
| Publikationen..... | III |
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | XVII |
| Abbildungsverzeichnis | XVIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Urothelkarzinom und epigenetische Veränderungen..... | 1 |
| 1.2 Die humane Histondeacetylase-Familie | 3 |
| 1.3 Klasse I HDACs..... | 6 |
| 1.3.1 Struktur, Lokalisation und Aktivität von Klasse I HDACs | 6 |
| 1.3.2 Transkriptionsregulation durch Klasse I HDACs..... | 10 |
| 1.3.3 Nicht-transkriptionelle und zelluläre Effekte von Klasse I HDACs | 14 |
| 1.3.4 Maligne Expression von Klasse I HDACs | 16 |
| 1.3.5 Klasse I HDACs – Onkogene oder Tumorsuppressoren? | 16 |
| 1.4 HDAC-Inhibitoren | 18 |
| 1.4.1 Klinische Anwendung von HDACi | 18 |
| 1.4.2 Pharmakophor, Spezifität und Aktivität von HDACi..... | 18 |
| 1.4.3 Molekulare Mechanismen und Phänotypen von HDACi | 21 |
| 1.4.4 Limitationen von HDACi und mögliche Lösungsansätze | 25 |
| 1.4.5 Charakterisierung der verwendeten Klasse I HDACi..... | 28 |
| 1.5 Expression und Inhibition von HDACs im UC | 32 |
| 2 Zielsetzung | 33 |
| 3 Publikation 1 | 35 |
| 3.1 Zusammenfassung und Diskussion..... | 35 |
| 3.2 PUBLIKATION 1 | 40 |
| 4 Publikation 2 | 41 |
| 4.1 Zusammenfassung und Diskussion..... | 41 |
| 4.2 PUBLIKATION 2 | 47 |
| 5 Publikation 3 | 48 |
| 5.1 Zusammenfassung und Diskussion..... | 48 |
| 5.2 PUBLIKATION 3 | 54 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 6 | Zusatzkapitel HDAC3 | 55 |
| 6.1 | Funktion und Expression von HDAC3 im UC | 55 |
| 6.2 | Material und Methoden zur Untersuchung von HDAC3 | 56 |
| 6.3 | Ergebnisse und Diskussion – Expression und Modulation von HDAC3 in UC-Zelllinien..... | 60 |
| 7 | Diskussion | 69 |
| 7.1 | Optimales HDAC-Wirksamkeitsspektrum im UC..... | 69 |
| 7.2 | Knockdown und HDACi-vermittelte Inhibition von Klasse I HDACs - Gemeinsamkeiten und Unterschiede..... | 81 |
| 7.3 | Pharmakologische Inhibition von Klasse I HDACs - Gemeinsamkeiten und Unterschiede verschiedener HDACi..... | 87 |
| 7.4 | Weitere Zielmoleküle und Besonderheiten der verwendeten Klasse I HDACi | 96 |
| 7.5 | RNA-Expressionsstudien - Differentiell exprimierte Faktoren nach HDAC-Inhibition in UC-Zelllinien..... | 101 |
| 7.6 | Mögliche Kombinationen mit Klasse I HDACi und neue Therapieansätze für die Behandlung des UC..... | 119 |
| 7.7 | Fazit und Ausblick | 124 |
| 8 | Anhang | 125 |
| A | Eigenschaften und Charakterisierung von HDACi..... | 125 |
| B | Expression und Inhibition von HDACs im UC | 127 |
| C | Dosiswirkung von verwendeten Klasse I HDACi in UC-Zelllinien und Kontrollzellen | 132 |
| D | Eigener Beitrag zu den verwendeten Publikationen | 134 |
| | Literaturverzeichnis | 135 |
| | Kongressbeiträge | 173 |
| | Weitere Publikationen | 175 |
| | Danksagung | 176 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 177 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------|---|
| 53-BP1 | <i>p53-binding protein 1</i> |
| Ac | <i>acetyl</i> |
| ADM | <i>adrenomedullin</i> |
| ADNP | <i>activity dependent neuroprotector homeobox</i> |
| ADSS | <i>adenylosuccinate synthase</i> |
| AIF | <i>apoptosis inducing factor</i> |
| AKAP95 | <i>A-kinase anchor protein 95</i> |
| AKT | <i>v-akt murine thymoma viral oncogene</i> |
| ALDOC | <i>aldolase, fructose-bisphosphate C</i> |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| AML1-ETO | <i>acute myeloid leukemia 1-eight twenty one fusion protein</i> |
| ANP32A/B/E | <i>acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A/B/E</i> |
| APAF1 | <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i> |
| APF | <i>antiproliferative factor</i> |
| AR | Androgenrezeptor |
| ARID1A | <i>AT-rich interaction domain 1A</i> |
| ARRDC4 | <i>arrestin domain containing 4</i> |
| AS | Aminosäuren |
| ATF1/3 | <i>activating transcription factor 1/3</i> |
| Atg3 | <i>autophagy related 3</i> |
| ATM | <i>ataxia-telangiectasia mutated kinase</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATP10D | <i>ATPase phospholipid transporting 10D</i> |
| AURKA/B | <i>aurora kinase A/B</i> |
| Bad | <i>BCL2 associated agonist of cell death</i> |
| BAK1 | <i>BCL2-antagonist/killer 1</i> |
| BAX | <i>BCL2-associated X protein</i> |
| BAZ1A/B | <i>BRD adjacent to zinc finger domain 1A/B</i> |
| BCA | <i>bicinchoninic acid</i> |
| BCAT1 | <i>branched chain amino acid transaminase 1</i> |
| BCL2/6 | <i>B cell leukemia/lymphoma 2/6</i> |
| BCL2L1/2 | <i>BCL2-like 1/2</i> |
| Bcl-xL | <i>B cell leukemia/lymphoma-extra large</i> |
| Bcl-xS | <i>B cell leukemia/lymphoma-extra small</i> |
| BER | <i>base excision repair</i> |
| BET | <i>bromodomain and extraterminal</i> |
| BETi | BET-Inhibitoren |
| BH3 | <i>BCL2 homology domain 3</i> |
| BID | <i>BH3 interacting domain death agonist</i> |
| BIM | <i>BCL2-interactig mediator of cell death</i> |

| | |
|------------|---|
| BIRC3 | <i>baculoviral IAP repeat containing 3</i> |
| BLVRB | <i>biliverdin reductase B</i> |
| BMF | <i>Bcl2 modifying factor</i> |
| BNIP3L | <i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like</i> |
| BOK | <i>BCL2-related ovarian killer</i> |
| B-RAF | <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i> |
| BRCA1 | <i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i> |
| BRD | Bromodomäne |
| BRD1/2/3/4 | <i>bromodomain containing 1/2/3/4</i> |
| BRDT | <i>bromodomain containing protein testis specific</i> |
| BRET | <i>bioluminescence resonance energy transfer</i> |
| BSCL2 | <i>Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2, Seipin</i> |
| BSG | <i>basigin</i> |
| BUB1B | <i>BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B</i> |
| C | Cytoplasma (zelluläre Lokalisation) |
| CABIN1 | <i>calcineurin binding protein 1</i> |
| CAD | carbamoyl-phosphate synthetase 2 |
| CARD6 | <i>caspase recruitment domain family member 6</i> |
| CCNA2 | Cyclin A2 |
| CCNB1/2 | Cyclin B1/2 |
| CCND1/2 | Cyclin D1/2 |
| CCNE2 | Cyclin E2 |
| CCNG1/2 | Cyclin G1/2 |
| CD70 | <i>cluster of differentiation 70</i> |
| CDC20 | <i>cell division cycle 20</i> |
| CDC25C | <i>cell division cycle 25C</i> |
| CDC7/37 | <i>cell division cycle 7/37</i> |
| CDCA7 | <i>cell division cycle associated 7</i> |
| CDK1/2/4 | <i>cyclin-dependent kinase 1/2/4</i> |
| CDK2AP1 | <i>cyclin-dependent kinase 2 associated protein 1</i> |
| CDK5R1 | <i>cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit 1</i> |
| CDKN1A/B | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)/B (p27)</i> |
| CDKN2A | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| CENPA/F | <i>centromere protein A/F</i> |
| c-FLIP | <i>FLICE-like inhibitory protein</i> |
| Chk1 | <i>checkpoint kinase 1</i> |
| CK2 | <i>casein kinase 2</i> |
| CKAP4 | <i>cytoskeleton associated protein 4</i> |
| CLU | <i>clusterin</i> |
| c-MYC | <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> |
| COIL | <i>coilin</i> |
| CoREST | <i>corepressor RE1 silencing transcription factor</i> |
| CRADD | <i>CASP2/ RIPK1 domain containing adaptor with death domain</i> |

| | |
|--------------|--|
| CREBBP | <i>CREB (cAMP-response element binding protein) binding protein</i> |
| CSE1L | <i>chromosome segregation 1 like</i> |
| CTBP1/2 | <i>C-terminal binding protein 1/2</i> |
| CTCF | <i>CCCTC-binding factor</i> |
| CTCL | <i>cutaneous T-cell lymphoma</i> |
| CTGF | <i>connective tissue growth factor</i> |
| CtIP | <i>CtBP-interacting protein</i> |
| CTPS1 | <i>CTP (cytidine 5-triphosphate) synthase 1</i> |
| CUL4A | <i>cullin 4A</i> |
| CXCR4 | <i>CXC motif chemokine receptor 4</i> |
| CYP4F2 | <i>cytochrome P450 family 4 subfamily F member 2</i> |
| CYR61 | <i>cystein rich angiogenic inducer 61</i> |
| DAPK3 | <i>death-associated protein kinase 3</i> |
| DAVID | <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> |
| DAZAP1 | <i>DAZ associated protein 1</i> |
| DCK | <i>deoxycytidine kinase</i> |
| DDB1/2 | <i>damage specific DNA binding protein 1/2</i> |
| DHRS2 | <i>dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2</i> |
| DICER1 | <i>dicer 1, ribonuclease III</i> |
| DISC | <i>death-inducing signaling complex</i> |
| DLG5/7 | <i>discs large homolog 5/7</i> |
| DMCA | <i>2,3-dimethoxy-cinnamoyl azide</i> |
| DMSO | <i>Dimethylsulfoxid</i> |
| DNAJB1 | <i>dnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1</i> |
| DNAPK | <i>DNA-activated protein kinase</i> |
| DNMT1 | <i>DNA methyltransferase 1</i> |
| DNTTIP1 | <i>deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 1</i> |
| DR4/5 | <i>death receptor 4/5</i> |
| DSB | <i>DNA-Doppelstrangbruch</i> |
| DUSP1/5 | <i>dual specificity phosphatase 1/5</i> |
| E2F | <i>E2 factor</i> |
| E2F-1/3/5 | <i>E2F transcription factor 1/3/5</i> |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| EGR1 | <i>early growth response 1</i> |
| ELL2 | <i>elongation factor for RNA polymerase II 2</i> |
| EMT | <i>epithelial–mesenchymal transition</i> |
| ENPP2 | <i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i> |
| EP300/400 | <i>E1A binding protein p300/400</i> |
| EPC1 | <i>enhancer of polycomb homolog 1</i> |
| ER | <i>endoplasmatisches Retikulum</i> |
| ERBB2/3 | <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2/3</i> |
| Erk1/2 | <i>extracellular signal regulated kinases 1/2 (MAPK3/1)</i> |
| ERR α | <i>estrogen related receptor α</i> |

| | |
|-----------|---|
| ES | embryonale Stammzellen |
| EWSR1 | <i>EWS RNA binding protein 1</i> |
| EZH1/2 | <i>enhancer of zeste 1/2 polycomb repressive complex 2 subunit</i> |
| FAIM | <i>Fas apoptotic inhibitory molecule</i> |
| FAM117A | <i>family with sequence similarity 117, member A</i> |
| FAS | <i>Fas cell surface death receptor</i> |
| FASLG | <i>Fas ligand</i> |
| FBXW7 | <i>F-box and WD repeat domain containing 7</i> |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FDA | <i>US Food and Drug Administration</i> |
| FDR | <i>false discovery rate</i> |
| FEN1 | <i>flap structure specific endonuclease 1</i> |
| FGFR3 | <i>fibroblast growth factor receptor 3</i> |
| FGR | <i>Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog</i> |
| FKBP4 | <i>FK506 binding protein 4</i> |
| FOS | <i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> |
| FOXM1 | <i>forkhead box M1</i> |
| FUCA1 | <i>fucosidase alpha-L-1</i> |
| FWER | <i>familywise error rate</i> |
| GADD45B | <i>growth arrest and DNA damage inducible beta</i> |
| GAPDH | <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> |
| GATA1/3/4 | <i>GATA-binding protein 1/3/4</i> |
| GCCR | <i>glucocorticoid receptor</i> |
| GCN5 | <i>K acetyltransferase 2A (KAT2A)</i> |
| GEO | <i>gene expression omnibus</i> |
| GLRX | <i>glutaredoxin</i> |
| GNAT | <i>GCN5-related N-acetyltransferases</i> |
| GO | <i>gene ontology</i> |
| GPS2 | <i>G protein pathway suppressor 2</i> |
| GRN | <i>granulin</i> |
| GRP78 | <i>78 kDa glucose-regulated protein</i> |
| GSR | <i>glutathione-disulfide reductase</i> |
| GULP1 | <i>engulfment adaptor PTB domain containing 1</i> |
| H | Histon |
| H1F0 | <i>H1 histone family member 0</i> |
| H2AFY2 | <i>H2A histone family member Y2</i> |
| H2A.Z | <i>H2A histone family member Z</i> |
| H3F3B | <i>H3 histone, family 3B</i> |
| HA95 | <i>homologous to AKAP95</i> |
| HADHB | <i>hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein) beta</i> |
| HAT | Histonacetyltransferase |
| HBLAK | <i>spontaneously immortalized normal human bladder cell line</i> |

| | |
|------------------|--|
| Hda1 | <i>histone deacetylase 1</i> |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HDACi | HDAC-Inhibitor |
| HDGF | <i>hepatoma-derived growth factor</i> |
| HDGFRP3 | <i>hepatoma-derived growth factor, related protein 3</i> |
| HEK-293 | <i>human embryonic kidney cell 293</i> |
| HES6 | <i>hairy and enhancer of split 6</i> |
| HIF-1 α | <i>hypoxia inducible factor 1 alpha subunit</i> |
| HIST1H2BD | <i>histone cluster 1, H2bd</i> |
| HMGB3 | <i>high mobility group box 3</i> |
| HMGCR | <i>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase</i> |
| HMMR | <i>hyaluronan mediated motility receptor</i> |
| HNRNPA3 | <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i> |
| HOPX | <i>HOP homeobox</i> |
| HRAS | <i>harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i> |
| HR23B | <i>RAD23 homolog B</i> |
| HSP90 | <i>heat shock protein 90 kDa</i> |
| HSPA2 | <i>heat shock protein family A (Hsp70) member 2</i> |
| HSPB1 | <i>heat shock protein family B (small) member 1</i> |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| ID2 | <i>inhibitor of DNA binding 2</i> |
| IHC | Immunhistochemie |
| IGFBP3 | <i>insulin like growth factor binding protein 3</i> |
| IGF2 | <i>insulin-like growth factor 2</i> |
| IL1B | <i>interleukin 1 beta</i> |
| ILF3 | <i>interleukin enhancer binding factor 3</i> |
| ING2 | <i>inhibitor of growth 2</i> |
| IP4 | Inositoltetraphosphat |
| IRAK1 | <i>interleukin 1 receptor associated kinase 1</i> |
| ISG | Proteinmodifikation durch <i>interferon stimulated gene 15</i> |
| ITPKB | <i>inositol-trisphosphate 3-kinase B</i> |
| IVNS1ABP | <i>influenza virus NS1A binding protein</i> |
| JAK-STAT | <i>janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i> |
| JMJD2 | <i>jumonji domain-containing protein 2</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| K | Lysin (Aminosäure) |
| KCTD19 | <i>potassium channel tetramerization domain containing 19</i> |
| kDa | Kilodalton |
| KDM4/6A | <i>lysine (K)-specific demethylase 4/6A</i> |
| KIF11/4A | <i>kinesin family member 11/4A</i> |
| KLF4 | <i>kruppel like factor 4</i> |
| KPNB1 | <i>karyopherin subunit beta 1</i> |
| KRAS | <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> |

| | |
|------------------|---|
| Ku70 | <i>Lupus Ku autoantigen protein p70</i> |
| Ku80 | <i>Lupus Ku autoantigen protein p80, XRCC5</i> |
| LAMB1 | <i>laminin subunit beta 1</i> |
| LDH | <i>lactate dehydrogenase</i> |
| LIG3 | <i>DNA ligase 3</i> |
| LMNB1 | <i>lamin B1</i> |
| LSD1 | <i>lysine specific demethylase 1A</i> |
| LUC7L2 | <i>LUC7 like 2, pre-mRNA splicing factor</i> |
| M | Plasmamembran (zelluläre Lokalisation) |
| MAD2L1 | <i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1</i> |
| MAP1LC3B | <i>microtubule associated protein 1 light chain 3 beta</i> |
| MAPK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| MBD2/3 | <i>methyl-CpG binding domain protein 2/3</i> |
| MCL1 | <i>myeloid cell leukemia 1</i> |
| MCM | <i>minichromosome maintenance complex</i> |
| MDC1 | <i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i> |
| MDM2 | <i>MDM2 proto-oncogene</i> |
| MEF | <i>mouse embryonic fibroblast</i> |
| MEF2D | <i>myocyte enhancer factor 2D</i> |
| MEIS1/2 | <i>Meis homeobox 1/2</i> |
| MET | <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i> |
| Mi2 | <i>CHD3, chromodomain helicase DNA binding protein 3</i> |
| MiDAC | <i>mitotic deacetylase</i> |
| MIDEAS | <i>ELMSAN1, ELM2 and Myb/SANT domain containing 1</i> |
| mM | millimolar |
| MINA | <i>MYC induced nuclear antigen</i> |
| MKI67 | <i>marker of proliferation Ki-67</i> |
| MMP | <i>matrix metalloproteinase</i> |
| MRE11(A) | <i>meiotic recombination enzyme 11 (homolog A)</i> |
| MRPL9 | <i>mitochondrial ribosomal protein L9</i> |
| MSK1 | <i>mitogen- and stress-activated protein kinase1</i> |
| MT1X | <i>metallothionein 1X</i> |
| MTA1/2 | <i>metastasis-associated protein 1/2</i> |
| MTMR1 | <i>myotubularin related protein 1</i> |
| mTOR | <i>mechanistic target of rapamycin</i> |
| MTT | <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i> |
| MUS81 | <i>MUS81 structure-specific endonuclease subunit</i> |
| MYBL2 | <i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2</i> |
| MyoD | <i>myogenic differentiation 1</i> |
| MYST | <i>MOZ, Ybf2, Sas2, TIP60</i> |
| N | Nukleus (zelluläre Lokalisation) |
| NAD ⁺ | <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> |
| Nanog | <i>nanog homeobox</i> |

| | |
|---------|---|
| NBEA | <i>neurobeachin</i> |
| NBN | <i>nibrin</i> |
| N-CoR | <i>nuclear receptor corepressor</i> |
| NCOR1 | <i>nuclear receptor corepressor 1</i> |
| ncRNA | nicht-kodierende RNAs |
| NDRG1 | <i>N-myc downstream regulated 1</i> |
| NER | <i>nucleotide excision repair</i> |
| NEU1 | <i>neuraminidase 1</i> |
| NEXN | <i>nexilin F-actin binding protein</i> |
| NFIB | <i>nuclear factor I B</i> |
| NF-κB | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i> |
| NFKB1 | <i>nuclear factor kappa B subunit 1</i> |
| NGFR | <i>nerve growth factor receptor</i> |
| NHEJ | <i>non-homologous endjoining</i> |
| nM | nanomolar |
| NMI | <i>N-myc (and STAT) interactor</i> |
| NODE | <i>Nanog and Oct4-associated deacetylase</i> |
| Nox-1 | <i>NADPH oxidase 1</i> |
| NOXA | <i>PMAIP1, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> |
| NuA4 | <i>nucleosome acetyltransferase of H4</i> |
| NUC | <i>normal urothelial control</i> |
| NUF2 | <i>NDC80 kinetochore complex component</i> |
| nUkon | nicht-urotheliale Kontrollzelllinien |
| NuRD | <i>nucleosome remodeling deacetylase</i> |
| Oct4 | <i>octamer-binding transcription factor 4</i> |
| OPTN | <i>optineurin</i> |
| ORC1 | <i>origin recognition complex subunit 1</i> |
| P4HA2 | <i>prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2</i> |
| PAIP1 | <i>poly(A) binding protein interacting protein 1</i> |
| PARP1/2 | <i>poly (ADP-ribose) polymerase 1/2</i> |
| PBRM1 | <i>polybromo 1</i> |
| PCAF | <i>p300/CREBBP-associated factor</i> |
| PCDH9 | <i>protocadherin 9</i> |
| PDAC | <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> |
| PDK4 | <i>pyruvate dehydrogenase kinase 4</i> |
| PD-1 | <i>programmed cell death 1</i> |
| PHD | <i>plant homeodomain</i> |
| PHF2 | <i>PHD finger protein 2</i> |
| PHLDA2 | <i>pleckstrin homology like domain family A member 2</i> |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3 | <i>phosphatidylinositol 3</i> |
| PI3K | <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> |
| PIK3C3 | <i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i> |

| | |
|-------------------|---|
| PIK3CA | <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α</i> |
| PKA | <i>cyclic AMP-dependent protein kinase A</i> |
| PLAU | <i>plasminogen activator, urokinase</i> |
| PLK1 | <i>polo like kinase 1</i> |
| PLZF-RAR α | <i>promyelocyte leukemia zinc finger-retinoic acid receptor α</i> |
| PML-RAR α | <i>promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α</i> |
| PNN | <i>pinin, desmosome associated protein</i> |
| POGK | <i>pogo transposable element with KRAB domain</i> |
| POLE3 | <i>DNA polymerase epsilon 3, accessory subunit</i> |
| PP1 | <i>protein phosphatase 1</i> |
| PP2A | <i>protein phosphatase 2 phosphatase activator</i> |
| PRC2 | <i>polycomb repressive complex 2</i> |
| PRKAR1B | <i>protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit β</i> |
| PSMB10 | <i>proteasome subunit, beta type, 10</i> |
| PTBP1/2 | <i>polypyrimidine tract binding protein 1/2</i> |
| PTCL | <i>peripheral T-cell lymphoma</i> |
| PTM | <i>posttranslationale Modifikationen</i> |
| PTRF | <i>polymerase I and transcript release factor</i> |
| QK1 | <i>KH domain containing RNA binding</i> |
| QRT-PCR | <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> |
| RAB40B | <i>RAB (Ras-related in brain) 40B</i> |
| RAD21 | <i>RAD (radiation) 21 cohesin complex component</i> |
| RAD50 | <i>RAD (radiation) 50 homolog</i> |
| RAD51 | <i>RAD (radiation) 51 recombinase</i> |
| RAN | <i>ras-related nuclear protein</i> |
| RASGRP2 | <i>RAS guanyl releasing protein 2</i> |
| RB1 | <i>RB (retinoblastoma) transcriptional corepressor 1</i> |
| Rb | <i>Retinoblastom-Protein</i> |
| RbAp46/48 | <i>Rb-associated protein 46/48</i> |
| RBBP8 | <i>RB binding protein 8</i> |
| REEP6 | <i>receptor accessory protein 6</i> |
| RelA | <i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (p65)</i> |
| RFC5 | <i>replication factor C subunit 5</i> |
| RGL1 | <i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator like 1</i> |
| RGS16 | <i>regulator of G-protein signaling 16</i> |
| RHOBTB3 | <i>Rho related BTB domain containing 3</i> |
| RIF1 | <i>replication timing regulatory factor 1</i> |
| RIPA | <i>radioimmunoprecipitation assay</i> |
| RIPK1/3 | <i>receptor interacting serine/threonine kinase 1/3</i> |
| RLIM | <i>ring finger protein, LIM domain interacting</i> |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| Rpd3 | <i>reduced potassium dependency 3</i> |
| RRM2 | <i>ribonucleotide reductase regulatory subunit M2</i> |

| | |
|------------|---|
| RUNX3 | <i>runt related transcription factor 3</i> |
| S | Serin (Aminosäure) |
| SAHA | <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> |
| SAT1 | <i>spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1</i> |
| SAP18/30 | <i>Sin3A associated protein 18/30 kDa</i> |
| SDC4 | <i>syndecan 4</i> |
| SDS3 | <i>yeast SDS3 homolog, SIN3A corepressor complex component</i> |
| SENP6 | <i>SUMO1/sentrin specific peptidase 6</i> |
| SEPHS1 | <i>selenophosphate synthetase 1</i> |
| SERPINH/11 | <i>serpin family H/I member 1</i> |
| SFRP1 | <i>secreted frizzled-related protein 1</i> |
| SHIP1 | <i>spermatogenic cell HDAC-interacting protein 1</i> |
| SHP | <i>small heterodimer partner</i> |
| ShRNA | <i>short hairpin RNA</i> |
| SIAH1 | <i>siah E3 ubiquitin protein ligase 1</i> |
| Sin3 | <i>switch independent 3</i> |
| Sin3a/b | <i>SIN3 transcription regulator family member a/b</i> |
| Sir2 | <i>silent information regulator 2, NAD-dependent histone deacetylase</i> |
| SiRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SKP2 | <i>S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase</i> |
| SLC25A13 | <i>solute carrier family 25 member 13</i> |
| SLC38A1 | <i>solute carrier family 38 member 1</i> |
| SLC7A1 | <i>solute carrier family 7 member 1</i> |
| SMAC | <i>second mitochondria-derived activator of caspase</i> |
| SMAD3/7 | <i>SMAD family member 3/7</i> |
| SMARCA4/B1 | <i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a/b member 4/1</i> |
| SMC1A | <i>structural maintenance of chromosomes 1A</i> |
| SMC3 | <i>structural maintenance of chromosome 3</i> |
| SMRT | <i>silencing mediator of retinoic acid</i> |
| SOX4/9 | <i>SRY (sex determining region Y)-box 4/9</i> |
| Sp1/3 | <i>Sp1/3 transcription factor</i> |
| SP-B | Spiruchostatin B |
| SQSTM1 | <i>sequestosome 1</i> |
| SRC-3 | <i>steroid receptor coactivator-3</i> |
| STAG1/2 | <i>stromal antigen 1/2</i> |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| STC1 | <i>stanniocalcin 1</i> |
| SUMO | <i>small ubiquitin-like modifier</i> |
| SWI/SNF | <i>switch/sucrose non-fermentable</i> |
| SYNCRIP | <i>synaptotagmin binding cytoplasmic RNA interacting protein</i> |
| S1P | <i>sphingosine-1-phosphate</i> |
| TBL1 | <i>transducin beta-like 1X</i> |

| | |
|-------------|---|
| TBLR1 | <i>transducin beta-like 1X-related protein 1</i> |
| TBP | <i>TATA box binding protein</i> |
| TBP2 | <i>thioredoxin-binding protein-2</i> |
| Tbx2 | <i>T-box 2</i> |
| TCF | <i>T-cell factor</i> |
| TCF12 | <i>transcription factor 12</i> |
| TCRP1 | <i>tongue cancer resistance-associated protein 1</i> |
| TERT-NHUC | <i>hTERT-immortalised normal human urothelial cells</i> |
| TFDP1 | <i>transcription factor Dp-1</i> |
| TGFA | <i>transforming growth factor alpha</i> |
| TGFB1I1 | <i>transforming growth factor beta 1 induced transcript 1</i> |
| TGM2 | <i>transglutaminase 2</i> |
| TGIF | <i>TG-interacting factor</i> |
| TIA1 | <i>TLA1 cytotoxic granule associated RNA binding protein</i> |
| TIMELESS | <i>timeless circadian clock</i> |
| TLK1 | <i>tousled like kinase 1</i> |
| TMPO | <i>thymopoietin</i> |
| TNFRSF10A/B | <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a/b</i> |
| TNFRSF25 | <i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 25</i> |
| TNFSF9/10 | <i>tumor necrosis factor superfamily member 9/10</i> |
| TORC1 | <i>transducer of regulated CREB activity 1</i> |
| TP53 | <i>tumor protein p53</i> |
| TPM4 | <i>tropomyosin 4</i> |
| TPX2 | <i>targeting protein for Xklp2</i> |
| TRADD | <i>TNFRSF1A associated via death domain</i> |
| TRAIL | <i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i> |
| TRAILR1/2 | <i>TNF receptor superfamily member 10a/b (TNFRSF10A/B)</i> |
| TRIM8 | <i>tripartite motif containing 8</i> |
| TRIP13 | <i>thyroid hormone receptor interactor 13</i> |
| TRPM2 | <i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2</i> |
| Trx | <i>thioredoxin</i> |
| TrxR | <i>thioredoxin reductase</i> |
| TS | <i>Thymidylat-Synthase (s. TYMS)</i> |
| TSA | <i>Trichostatin A</i> |
| TSS | <i>Transkriptionsstartstelle</i> |
| TSP1 | <i>thrombospondin-1</i> |
| TTK | <i>T-cell Tat-associated kinase</i> |
| TUBA1A | <i>tubulin alpha 1a</i> |
| TUBGCP3 | <i>tubulin gamma complex associated protein 3</i> |
| TXNRD1/2 | <i>thioredoxin reductase 1/2</i> |
| TYMS | <i>Thymidylat-Synthase</i> |
| U2AF2 | <i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2</i> |
| Ubc8 | <i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 8</i> |

| | |
|------------|---|
| UBE2E1/3 | <i>ubiquitin conjugating enzyme E2 E1/3</i> |
| UBE2J1 | <i>ubiquitin conjugating enzyme E2 J1</i> |
| UBQLN2 | <i>ubiquilin 2</i> |
| UC | Urothelkarzinom der Harnblase |
| UKon | Urotheliale Kontrollzelllinien |
| UNG | <i>uracil DNA glycosylase</i> |
| USP4/7 | <i>ubiquitin-specific peptidase 4/7</i> |
| UUTUC | <i>upper urinary tract urothelial carcinoma</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGF-A | <i>vascular endothelial growth factor A</i> |
| VEGFR | <i>VEGF receptor</i> |
| VHF | Humane Vorhautfibroblasten, HFF (<i>human foreskin fibroblasts</i>) |
| Wee1 | <i>WEE1 G2 checkpoint kinase</i> |
| WNT | <i>wingless</i> |
| WSB2 | <i>WD repeat and SOCS box containing 2</i> |
| XIAP | <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i> |
| XRCC5 | <i>X-ray repair cross complementing 5 (Ku80)</i> |
| YY-1 | <i>YY-1 transcription factor</i> |
| ZAK | <i>sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK</i> |
| ZBG | Zink-bindende Gruppe |
| ZMYM6 | <i>zinc finger, MYM-type 6</i> |
| ZMYND11 | <i>zinc finger, MYND-type containing 11</i> |
| ZNF | Zink-Finger-Domäne |
| ZNF217/532 | <i>zinc finger protein 217/532</i> |
| ZWINT | <i>ZW10 interacting kinetochore protein</i> |
| µM | micromolar |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Übersicht der verglichenen RNA-Expressionsstudien nach pharmakologischer HDAC-Inhibition..... | 105 |
| Tabelle 2: Effekte und Mechanismen der HDACi-vermittelten p21-Induktion..... | 111 |
| Tabelle 3: Eigenschaften und Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten HDACi. | 125 |
| Tabelle 4: Studienübersicht zu HDACs und HDACi im UC. | 127 |
| Tabelle 5: Zelluläre IC ₅₀ -Werte der in dieser Arbeit verwendeten Klasse I HDACi nach 72-stündiger Behandlung..... | 132 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: Struktur und funktionelle Domänen der klassischen humanen HDACs... | 4 |
| Abbildung 2: Histon- und Nicht-Histon-Substrate von Klasse I HDACs und dadurch regulierte Prozesse. | 6 |
| Abbildung 3: Klasse I HDACs-Multiproteinkomplexe. | 9 |
| Abbildung 4: Epigenetische „writers“, „readers“ und „erasers“ zur Vermittlung der Chromatinacetylierung. | 11 |
| Abbildung 5: Potentielle PTMs von ϵ -Aminogruppen an Lysinen. | 12 |
| Abbildung 6: HDACi-Pharmakophor und charakteristische ZBGs. | 19 |
| Abbildung 7: HDACi-Mechanismen und zelluläre Phänotypen in malignen Zellen.... | 22 |
| Abbildung 8: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten HDACi. | 29 |
| Abbildung 9: Expression von HDAC3-mRNA und -Protein in UC-Zelllinien. | 61 |
| Abbildung 10: Effizienz und Kompensationsmechanismen der HDAC3 siRNA-Transfektion in UC-Zelllinien. | 62 |
| Abbildung 11: Inhibition der Viabilität und Klonogenität nach HDAC3 siRNA-Transfektion. | 63 |
| Abbildung 12: Zellzyklusanalysen nach HDAC3 siRNA-Transfektion. | 64 |
| Abbildung 13: HDAC3 siRNA-Transfektions-vermittelte Effekte auf Caspase-3/7-Aktivität, p21-Expression und PARP1-Spaltung. | 65 |
| Abbildung 14: Effekte einer pharmakologischen HDAC3-Inhibition mittels RGFP966 und BG45 auf die UC-Zelllinien und Kontrollzellen. | 68 |
| Abbildung 15: Übersicht über die Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Doppelknockdown und nach Klasse I HDACi-Behandlung mit Romidepsin und Givinostat. | 103 |

1 EINLEITUNG

1.1 Das Urothelkarzinom und epigenetische Veränderungen

Das Urothelkarzinom der Harnblase (UC), der viert- (Mann) bzw. elfthäufigste (Frau) Tumor weltweit, ist sehr heterogen und macht ca. 90 % der Harnblasenkarzinome aus [1-3]. Männliches Geschlecht, hohes Alter, Rauchen und Chemikalien, wie z.B. aromatische Amine, sind primäre UC-Risikofaktoren [1, 4-7]. Die UC-Heterogenität ist durch zwei Hauptentstehungswege, die prä-maligne Hyperplasie (Verdickung des Urothels auf mehr als zehn Zelllagen) und die Dysplasie (flache nicht-invasive prä-kanzeröse Läsion) bzw. *Carcinoma in situ*, und deren charakteristischen malignen Veränderungen bedingt [1, 2, 8]. Eine Hyperplasie führt häufig zu genomisch stabilen nicht-invasiven papillären Tumoren die sich durch aktivierende Mutationen (*FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*), *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α*), *HRAS* (*harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), *STAG2* (*stromal antigen 2*)) und übermäßige Signalweg-Aktivierung (*MAPK* (*mitogen-activated protein kinase*), *PI3K* (*phosphatidylinositol 3-kinase*)) auszeichnen [1-3, 7, 8]. Dysplasie bzw. *Carcinoma in situ* initiieren häufig genomisch instabile Muskel-invasive solide Tumore die durch chromosomale Alterationen, Zellzyklusstörungen, inaktivierende Mutationen (*TP53* (*tumor protein p53*), *RB1* (*RB (retinoblastoma) transcriptional corepressor 1*)) und Expressionsveränderungen (*E-Cadherin*, *ATF3* (*activating transcription factor 3*), *MMPs* (*matrix metalloproteinase*), *ERBB2* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), *MET* (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), *MDM2* (*MDM2 proto-oncogene*), *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*)) charakterisiert sind [1, 2, 9-12]. Darüber hinaus haben viele UCs initial Chromosom 9-Deletionen, die z.B. zu einem Verlust des wichtigen *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)-Gens im Abschnitt 9p21.3 führen [1, 2, 13].

Gut-differenzierte papilläre UCs haben eine gute Prognose und sind häufig gut behandelbar, schlecht-differenzierte Muskel-invasive UCs zeigen dagegen einen schlechten Verlauf mit niedrigerer Überlebensrate, metastasieren häufig und sind schwer therapierbar [1, 3, 7]. Die Standardtherapie für nicht-metastasierte Muskel-invasive UCs ist die radikale Zystektomie (Entfernung der Harnblase und lokoregionärer Lymphknoten); die Hälfte der Patienten bildet danach jedoch Metastasen aus oder ist bereits primär metastasiert [1, 3, 14]. Des Weiteren kann eine Cisplatin-basierte Chemo-

therapie perioperativ erfolgen, was jedoch nur zu einer leicht erhöhten Überlebensrate führt, oder als Erstlinientherapie nach Metastasierung [1, 3, 14, 15]. Metastasierte Patienten entwickeln jedoch oft eine Cisplatin-Resistenz und dann ein Rezidiv [16]. Dies wird über Prozesse wie reduzierte intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin, Aktivierung der DNA-Reparatur, erhöhte Oct4 (*octamer-binding transcription factor 4*)-Expression und AR (Androgenrezeptor)-Aktivität vermittelt [16-19].

Epigenetik beschreibt reversible Prozesse die zu stabilen Zellzuständen führen und beinhaltet vielfältige Mechanismen u.a. DNA- und RNA-Methylierung, posttranslationale Modifikationen (PTMs) an Histonen, Histonvarianten, nicht-kodierenden RNAs (ncRNA) und Chromatinremodellierung [20, 21]. Diese Mechanismen gewähren Kontext-spezifische Chromatin-Zugänglichkeit für Faktoren, die beispielsweise DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Transkription kontrollieren, und bewirken dadurch Veränderungen im zellulären Phänotyp [22, 23]. Sie sind stark voneinander abhängig, sodass die Deregulation eines einzelnen Vorgangs weitere Prozesse beeinflussen und so den Effekt potenzieren kann [23, 24]. Histon-PTMs kommen primär an N-terminalen Histonenden vor und stellen mit 16 bekannten reversiblen Typen und über 100 distinkten Modifikationen einen komplexen Mechanismus mit unterschiedlichen Effekten auf die Genexpression dar [23-26]. Lysine nehmen dabei eine Sonderrolle ein, da für sie vielfältige Modifikationen bekannt sind, wie z.B. Acetylierung und Mono-, Di- oder Trimethylierung [26]. Abhängig von Lokalisation und Kontext vermitteln PTMs diverse transkriptionelle Effekte, indem sie spezifische Bindungsstellen für Chromatin-modifizierende Proteine und Komplexe schaffen oder den Kondensationszustand des Chromatins verändern [22, 24]. Beispielsweise ist H3K4me3 mit transkriptioneller Aktivierung und H3K9me3 dagegen mit Inaktivierung assoziiert [25]. Insgesamt wurden 377 humane Faktoren identifiziert, die Histon-PTMs oder ihre Interaktionen regulieren und damit den epigenetischen Histoncode definieren [20].

Epigenetische Störungen sind an der malignen Transformation beteiligt. Sie assoziieren somit häufig mit der Initiation und Progression von Krebserkrankungen und liegen in nahezu allen getesteten Tumoren vor [20, 24]. Sie spielen auch eine Rolle in der UC-Pathogenese und -Progression und betreffen dort vor allem DNA-Methylierung, Histon-PTMs und Chromatinremodellierung (ausführlich beschrieben in [27, 28]). Hochdurchsatzstudien haben gezeigt, dass diverse Faktoren, die an der Regulation von Histon-PTMs (*KDM6A* (*lysine (K)-specific demethylase 6A*), *CABIN1* (*calcineurin binding*

protein 1), *CREBBP* (*CREB* (*cAMP-response element binding protein*) *binding protein*), *EP300* (*E1A binding protein p300*), *EP400* (*E1A binding protein p400*) und *NCOR1* (*nuclear receptor corepressor 1*) oder an der Chromatinremodellierung (*ARID1A* (*AT-rich interaction domain 1A*) und *SMARCA4* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a member 4*)) beteiligt sind, im UC deutlich häufiger durch Mutationen inaktiviert vorliegen als bei anderen Entitäten [29-31] (zit. aus [27, 28]). Mehrere dieser Mutationen betreffen die Regulation der Histonacetylierung über Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) z.B. in *CREBBP*, *EP300*, *EP400* und *NCOR1* [30, 31] (zit. aus [27]). Die Lysin-Acetylierung ist eine der häufigsten PTMs und ein wichtiger Regulator der Proteinfunktion [32]. Sie wird durch HATs katalysiert, die in die drei Hauptfamilien GNAT (*GCN5-related N-acetyltransferases*), MYST (*MOZ*, *Ybf2*, *Sas2*, *TIP60*) und p300/CREBBP eingeteilt werden, und wirkt im Allgemeinen transkriptionell aktivierend [24]. Die Acetylierung findet primär an N-terminalen Histonenden statt, allerdings können auch konservierte Residuen des Histonkerns acetyliert vorliegen, wie z.B. H3K56 [33] (zit. aus [24]). Zusätzlich ist die HDAC-Expression oft im UC verändert [27, 34]. Daher bieten sich HATs und HDACs als mögliche Zielmoleküle für die Therapie des UC an [27, 28].

1.2 Die humane Histondeacetylase-Familie

HDACs werden in allen Eukaryoten exprimiert und sind essentiell für die Regulation der Transkription und viele weitere Prozesse in die eine Chromatininteraktion involviert ist [35, 36]. Sie werden in zwei Superfamilien aufgeteilt: elf „klassische“ HDACs, die eine hoch konservierte Deacetylasedomäne mit einem katalytischen Zn^{2+} -Ion enthalten, und sieben Sirtuine, die einen NAD^+ (*nicotinamide adenine dinucleotide*)-Kofaktor besitzen [32]. Gregoretta et al. 2004 [37] teilten die Zn^{2+} -abhängigen HDACs, basierend auf ihrer Homologie zu den orthologen Hefe-Genen *Rpd3* (*reduced potassium dependency 3*) und *Hda1* (*histone deacetylase 1*), phylogenetisch in drei Klassen ein: Klasse I (*Rpd3*; HDAC1/2/3/8), Klasse IIa/b (*Hda1*; a-HDAC4/5/7/9, b-HDAC6/10) und Klasse IV (*Rpd3/Hda1*; HDAC11) [24, 38] (siehe Abb. 1). Sirtuine bilden die Klasse III und sind zu dem Hefegen *Sir2* (*silent information regulator 2*) homolog [20, 25, 35, 36].

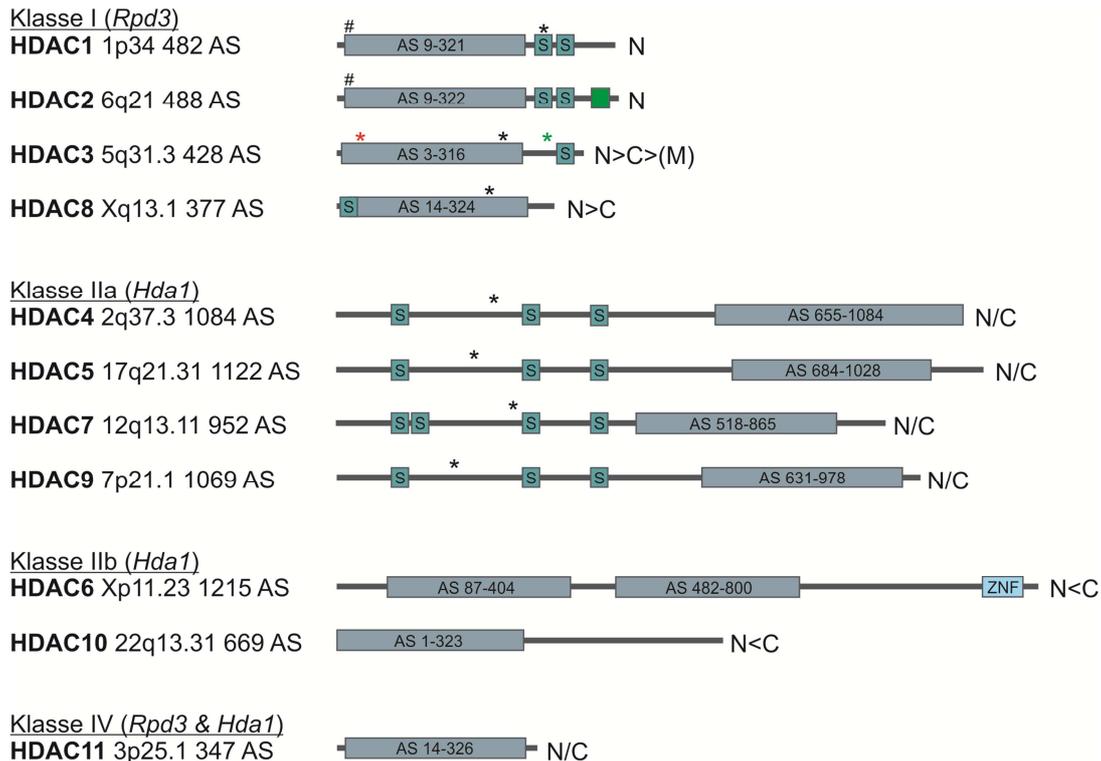


Abbildung 1: Struktur und funktionelle Domänen der klassischen humanen HDACs. Angegeben ist die Größe und Position der katalytischen Domäne (graue Kästchen), Gesamtgröße (Anzahl Aminosäuren (AS)), zelluläre Lokalisation (Nukleus (N), Cytoplasma (C), Plasmamembran (M)), Klasse und Genlokalisierung der elf humanen Zn^{2+} -abhängigen HDACs. Es ist jeweils die längste HDAC-Isoform gezeigt. HDAC6 besitzt zwei katalytische Domänen und eine Ubiquitin-bindende Zink-Finger-Domäne (ZNF). HDAC3 wurde bisher als einzige Isoform beschrieben, die auch in der Membran lokalisiert sein kann [39]. Die blauen Kästchen zeigen CK2- bzw. PKA-Serin-Phosphorylierungsstellen. Das grüne Kästchen zeigt die *Coiled-Coil*-Domäne von HDAC2. Rauten (#) markieren HDAC-Assoziationsdomänen. Sterne (*) markieren Kernlokalisierungssignale (schwarz) und das putative (rot) oder funktionelle (grün) nukleäre HDAC3-Exportsignal¹. Modifiziert bzw. zusammengefasst nach [20, 22, 35, 36, 40-43].

Die Zn^{2+} -abhängigen HDAC-Klassen bzw. -Isoformen variieren in ihrer Proteingröße, dreidimensionalen Struktur, enzymatischen Aktivität, Substratspezifität, Lokalisation, Funktion und ihrem Gewebe-Expressionsmuster [20, 35, 36, 40, 42]. Klasse I HDACs besitzen eine N-terminale katalytische Deacetylase-Domäne, werden in allen Geweben exprimiert, sind oberflächlich betrachtet primär im Nukleus lokalisiert und als katalytische Einheiten an verschiedenen Multiproteinkomplexen beteiligt [35, 40, 44] (siehe Kap. 1.3.1). Klasse II HDACs zeigen eine spezifische Gewebeverteilung und sind im Nukleus und Cytoplasma lokalisiert [36, 44]. Insbesondere Klasse IIb HDACs wirken primär im Cytoplasma und nicht-epigenetisch, z.B. durch Regulierung von

¹ Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology:
http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_HDAC3.html, zitiert am 14.03.2017.

Proteinfaltung und -turnover [25, 35]. Die Klasse II zeichnet sich des Weiteren durch einen N-terminalen regulatorischen Bereich (IIa) oder zwei katalytischen Domänen (IIb) aus [40]. Der regulatorische Bereich ermöglicht spezifische Protein-HDAC-Interaktionen und nukleär-cytoplasmatisches Pendeln [24, 32]. HDAC6 hat zwei aktive katalytische Domänen, HDAC10 eine aktive Domäne und eine inkomplette Domäne [25]. Klasse IIa HDACs haben *in vitro* nur eine niedrige enzymatische Aktivität [40].

Mechanismus der HDAC-katalysierten Deacetylierung

Alle HDACs haben für die Hydrolyse der acetylierten Substrate einen konservierten Mechanismus gemeinsam, der durch Zn^{2+} -Koordinierung charakterisiert ist [24, 36]. Vermutlich kann Fe^{2+} ebenfalls als katalytisches Metallion wirken [24, 45]. Die Hydrolyse wird über Zn^{2+} -Bindung an das N- ϵ -acetylierte Lysin vermittelt, wobei die Acetylgruppe durch ein Zn^{2+} -gebundenes H_2O -Molekül angegriffen und anschließend Acetat und unmodifiziertes Lysin freigesetzt wird [20]. Für diesen Vorgang werden bis zu vier detaillierte Mechanismen von Finnin et al. 1999, Gantt et al. 2010, Vanommeslaeghe et al. 2005 und Corminboeuf et al. 2006 vorgeschlagen [46-49], die in Bezug auf Zn^{2+} -Koordinierung, Substratbindung und reaktive Aminosäuren variieren [36, 40].

Grundsätzlich fungieren alle humanen HDACs als Lysin-Deacetylasen, jedoch liegt in *in vitro*-Analysen mit rekombinanten HDACs eine gestaffelte intrinsische Aktivität vor: HDAC2>1>6>3>4/5/7/8/10>11>9 [32]. Die *in vitro*-Aktivität von HDACs lässt sich jedoch nicht einfach auf die *in vivo*-Aktivität übertragen, da sie maßgeblich von ihrem Einbau in Multiproteinkomplexe abhängt [32]. Ein konserviertes Tyrosin, das für den nukleophilen Angriff entscheidend ist, könnte erklären, warum Klasse IIa HDACs insgesamt inaktiver sind als Klasse I HDACs, da dieses Tyrosin in Klasse IIa durch ein Histidin ersetzt ist [36, 50]. Zusätzlich zeigen Mutationsstudien, dass die HDAC4-Aktivität durch einen einzelnen Austausch des Histidins an Position 976 zu Tyrosin bis zu 1000-fach erhöht werden kann und dass ein Tyrosin zu Histidin Austausch an Position 298 in HDAC3 zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität führt [36, 50]. Für HDAC3 konnte zusätzlich zur Deacetylase-Aktivität *in vitro* im Komplex mit NCOR1 auch eine Decrotonylase-Aktivität nachgewiesen werden [51, 52].

1.3 Klasse I HDACs

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von Klasse I HDACs im UC. Einige ausgewählte Substrate von Klasse I HDACs und dadurch regulierte Prozesse sind in Abb. 2 gezeigt. Die folgenden einführenden Abschnitte dieses Kapitels (Struktur, Lokalisation, Aktivitätsregulation über Proteinkomplexe und PTMs, Transkriptionsregulation und Nicht-transkriptionelle Effekte) orientieren sich im Aufbau und/oder Inhalt an den ausgezeichneten Übersichtsartikeln von Moser et al. 2014 [53], der sich ausführlich speziell mit Klasse I HDACs beschäftigt, und an Seto & Yoshida, 2014 [36].

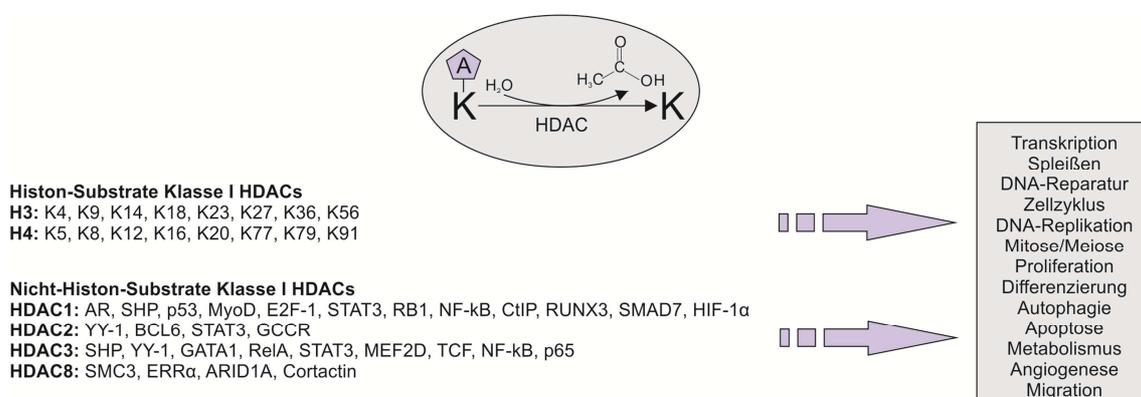


Abbildung 2: Histon- und Nicht-Histon-Substrate von Klasse I HDACs und dadurch regulierte Prozesse. Klasse I HDACs können vielfältige Substrate deacetylieren (Auswahl dargestellt) und so zur Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beitragen. Modifiziert nach [24, 25, 42, 53-59].

1.3.1 Struktur, Lokalisation und Aktivität von Klasse I HDACs

Struktur von Klasse I HDACs

Mit einer AS-Sequenzidentität von 45-94 % ist die katalytische Domäne von Klasse I HDACs durch eine ausgeprägte Homologie charakterisiert [36]. Dabei haben HDAC1 und 2 insgesamt die höchste AS-Sequenzidentität und die stärkste Strukturähnlichkeit zueinander [37, 53, 60]. Für diese beiden Proteine sind drei gemeinsame Domänen beschrieben: N-terminal eine katalytische Einheit und eine HDAC-Assoziationsdomäne, die Dimerbildung ermöglicht, und C-terminal Tandem-CK2 (*casein kinase 2*)-Phosphorylierungsstellen [37, 41, 43, 53]. HDAC1 besitzt zusätzlich ein C-terminales Kernlokalisierungssignal, wohingegen HDAC2 weiterhin durch eine *Coiled-Coil*-Domäne charakterisiert ist, die der Protein-Protein-Interaktion dient [37, 43, 53]. HDAC3 besitzt nur eine CK2-Phosphorylierungsstelle und zusätzlich nukleäre

Exportsignale [61-63] (zit. aus [41, 53]). Zu den Exportsignalen gehört ein putatives (AS 29-41) [62] und ein funktionelles (AS 180-313) [63]² Signal. HDAC8 hat eine N-terminale PKA (*cyclic AMP-dependent protein kinase A*)-Phosphorylierungsstelle [37, 64, 65] (zit. aus [41, 53]) (siehe Abb. 1).

Lokalisation von Klasse I HDACs

Klasse I HDACs sind, oberflächlich betrachtet, primär nukleäre Proteine [32]. Sie kommen jedoch auch im Cytoplasma oder speziellen zellulären Organellen vor, wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum (ER) [36, 53, 60]. HDAC3 und 8 können beispielsweise im Nukleus und Cytoplasma vorliegen [32]. Zusätzlich kann HDAC3 mit spezifischen Bindungspartnern auch in der Membran lokalisiert sein [39]. HDAC8 liegt dagegen überwiegend cytosolisch vor. Es wurde jedoch ein Expressions-abhängiger Mechanismus beschrieben, bei dem nach Überexpression eine nukleäre Translokation stattfindet [66, 67] (zit. aus [53]). Die subzelluläre Lokalisation wird häufig durch PTMs kontrolliert und kann die Zugänglichkeit zu Bindungspartnern oder Substraten limitieren [32].

Regulation der Klasse I HDAC-Aktivität

Wichtige Kontrollmechanismen der HDAC-Aktivität sind zum einen Protein-Protein-Interaktionen bzw. Inkorporation in definierte Proteinkomplexe und zum anderen PTMs [36]. Im Folgenden werden diese Kontrollmechanismen in Anlehnung an Van Dyke, 2014 [32], Seto & Yoshida, 2014 [36] und Moser et al. 2014 [53] detailliert beschrieben. Zusätzlich kann die HDAC-Aktivität über endogene HDAC-Inhibitoren (HDACi), wie etwa nukleäres S1P (*sphingosine-1-phosphate*), moduliert werden [35, 60]. Weitere weniger gut untersuchte Mechanismen sind die Regulation der HDAC-Expression, alternative Spleißvarianten, Einzelnukleotid-Polymorphismen, Kofaktor-Verfügbarkeit, subzelluläre Lokalisation und proteolytischer Abbau [20, 36].

² Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology:
http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_HDAC3.html, zitiert am 14.03.2017.

Regulation der Klasse I HDAC-Aktivität - Proteinkomplexe

HDACs besitzen kein DNA-Bindungsmotiv und sind daher auf andere Proteine angewiesen, um zu ihren spezifischen Chromatin-Bindungsstellen rekrutiert zu werden [41]. Zudem haben aufgereinigte HDACs außerhalb ihrer Komplexe nur eine sehr geringe Aktivität [36, 53]. Einige HDACs bilden einfache Komplexe mit Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren, andere dagegen liegen in Multiproteinkomplexen vor [32]. Durch Integration in diese Komplexe werden viele Eigenschaften der HDACs moduliert, wie z.B. die Aktivität, Substratspezifität, DNA- und Chromatinbindung [20, 53].

Abb. 3 stellt die bekannten Klasse I HDAC-Multiproteinkomplexe vor. HDAC1 und 2 sind Mitglieder der sechs Multiproteinkomplexe Sin3 (*switch independent 3*), NuRD (*nucleosome remodeling deacetylase*), CoREST (*corepressor RE1 silencing transcription factor*), NODE (*Nanog and Oct4-associated deacetylase*), SHIP1 (*spermatogenic cell HDAC-interacting protein 1*) und MiDAC (*mitotic deacetylase*) [32, 53]. Sin3, NuRD und CoREST stellen in humanen Zellen die häufigsten Formen dar [53]. NODE und SHIP1 wirken spezifisch in embryonalen Stammzellen (ES) und in der Spermatogenese, wohingegen MiDAC ein Mitose-spezifischer Komplex ist [68-71] (zit. aus [53, 60]). HDAC1 und 2 liegen als Homo- oder Heterodimere in den Komplexen vor und haben ohne ihre Bindungspartner nur eine sehr niedrige enzymatische Aktivität [36, 53, 60]. Die Komplexe Sin3 und NuRD besitzen einen gemeinsamen Kern, bestehend aus vier Proteinen: HDAC1 und 2 und die Histon-Bindeproteine RbAp46 und RbAp48 (*Rb-associated protein 46/48*) [32, 36]. Dieser Kernkomplex reicht nicht zur Ausbildung der vollen Aktivität aus, die vielmehr von zusätzlichen Kofaktoren abhängt [36].

HDAC3 komplexiert mit den transkriptionellen Repressoren N-CoR (*nuclear receptor corepressor*)/SMRT (*silencing mediator of retinoic acid*), wodurch die HDAC3-Aktivität erhöht wird, und weiteren Kofaktoren [72, 73] (zit. aus [36, 53]). Zusätzlich interagiert HDAC3 mit Klasse IIa HDACs [53, 60]. Die enzymatische Aktivität von HDAC4 und 7 hängt beispielsweise von der Interaktion mit HDAC3 ab [74, 75] (zit. aus [53]). Weiterhin wird postuliert, dass Klasse IIa HDACs primär als Bindeglied zwischen N-CoR/SMRT-Komplexen und Transkriptionsfaktoren fungieren [40] (siehe Abb. 3).

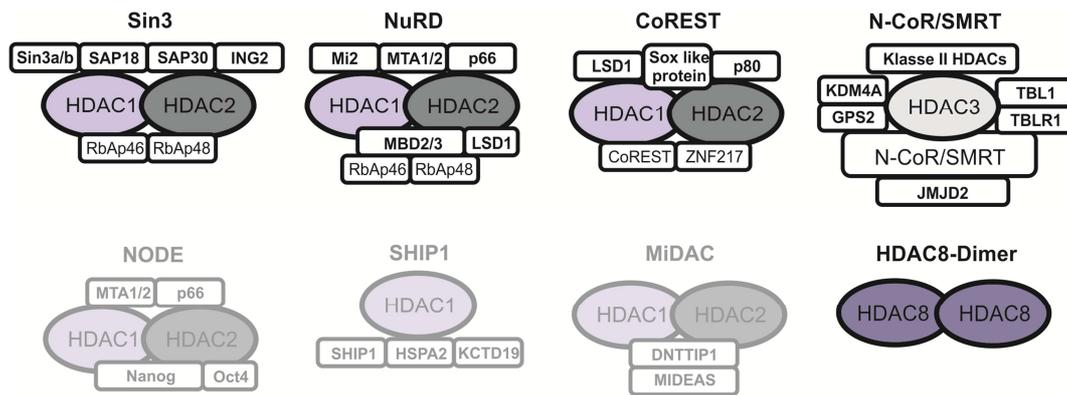


Abbildung 3: Klasse I HDACs-Multiproteinkomplexe. HDAC1-3 liegen in Multiproteinkomplexen vor. Dadurch werden die Aktivität, DNA- und Chromatinbindung und die Substratspezifität reguliert. HDAC8 liegt als Homodimer vor. Modifiziert hauptsächlich nach [53] und nach [41, 60, 68-71, 76, 77].

Die Zusammensetzung der Multiproteinkomplexe ist divers und Zelltyp-spezifisch, mit variierenden Untereinheiten in verschiedenen Zelltypen [35, 41, 60], wie z.B. Histon-Bindeproteinen (RbAp46), Histon-Erkennungsproteinen (ING2 (*inhibitor of growth 2*)), Erkennungsproteinen für methylierte DNA (MBD2/3 (*methyl-CpG binding domain protein 2/3*)), Histon-Demethylasen (LSD1 (*lysine specific demethylase 1A*)), DNA-Methyltransferasen (DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*)), ATP (Adenosintriphosphat)-abhängigen Chromatinremodellierungs-Proteinen (Mi2 (CHD3, *chromodomain helicase DNA binding protein 3*)) und transkriptionellen Repressoren (Sin3a/b (*SIN3 transcription regulator family member a/b*) und N-CoR) mit zentraler Rolle in Chromatinerkennung und Chromatinmodifizierung [32] (siehe Abb. 3). Eine wichtige Funktion bei Klasse I HDAC-Multiproteinkomplexen hat auch Inositoltetraphosphat (IP4) [53, 60]. IP4 reguliert die Interaktion von HDAC3/SMRT und HDAC1/MTA1 (*metastasis-associated protein 1*) im NuRD-Komplex, wodurch ihre Rekrutierung beeinflusst und die Deacetylase-Aktivität erhöht wird [78-80] (zit. aus [53]).

HDACs kommen auch in kleineren Komplexen mit individuellen Faktoren vor, wodurch ihre Stabilität, Lokalisation und transkriptionelle Aktivität beeinflusst wird [22, 32, 41]. Insbesondere die HDAC1/2-Aktivität wird durch die Bildung von kleineren Komplexen reguliert, wie z.B. HDAC1-Rb (Retinoblastom-Protein)-E2F (*E2 factor*), HDAC1-Tbx2 (*T-box 2*), HDAC1-Sp1 (*Sp1 transcription factor*), HDAC1/2-p63 und HDAC2-GATA4 (*GATA-binding protein 4*)-HOPX (*HOP homeobox*) [81-87] (zit. aus [41]). Der HDAC1-Rb-E2F-Komplex reprimiert beispielsweise die Expression von E2F-Zielgenen [41, 83]. Zusätzlich kann die HDAC1/2-Aktivität durch nukleäres Aktin reguliert werden [88]. Dabei führt eine Erhöhung der Aktin-Konzentration in

nukleären Extrakten zu einer verringerten HDAC-Aktivität, eine Aktin-Polymerisierung dagegen zu einer stärkeren Aktivität und schwächeren Histonacetylierung [88]. HDAC8 bildet ein Homodimer und ist die einzige Isoform, die nach Aufreinigung ohne weitere Proteine aktiv ist; passend dazu sind für HDAC8 keine Komplexe bekannt [53, 60, 64].

Regulation der Klasse I HDAC-Aktivität - PTMs

Die Aktivität, aber auch die Lokalisation und der Einbau der Klasse I HDACs in Komplexe werden durch verschiedene PTMs an HDACs oder ihren Bindungspartnern reguliert z.B. durch Phosphorylierung und verschiedene PTMs an Lysininen wie Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung, SUMOylierung (SUMO - *small ubiquitin-like modifier*) und Ubiquitinierung [32, 36, 53, 60]. Phosphorylierungen können sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken [36]. Die Phosphorylierung von HDAC1 an S421 und S423, katalysiert durch PKA und CK2, führt beispielsweise zu einer Aktivitätserhöhung [89, 90]; HDAC8 wird dagegen durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung an S39 inhibiert [65] (zit. aus [32, 36, 53, 60]). Weitere wichtige PTMs sind SUMOylierungen und Ubiquitinierungen [53]. Die HDAC1-SUMOylierung vermittelt z.B. eine komplexe Regulation der Enzymstabilität und -aktivität, indem durch eine Konjugation mit SUMO1 eine Ubiquitinierung von HDAC1 mit anschließendem Abbau vermittelt wird [91] (beschrieben in [53]). HDAC2 kann dagegen durch USP4 (*ubiquitin-specific peptidase 4*) deubiquitiniert, somit stabilisiert und in Zellen akkumuliert werden [92].

1.3.2 Transkriptionsregulation durch Klasse I HDACs

Acetylierung von Histonen - Veränderung der Chromatinkonformation

Die Transkriptionsregulation durch HDACs setzt voraus, dass diese die RNA-Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Genloci regulieren können [36]. Mechanistisch basiert dies auf dem Kondensationszustand der DNA, der von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA abhängt und durch HATs und HDACs reguliert wird [25, 35, 53]. HATs transferieren als „*writers*“ eine Acetylgruppe vom Kofaktor Acetyl-Coenzym A auf die ϵ -Aminogruppe von Histonlysinen [23, 56]. Die Neutralisierung der positiv geladenen Lysine führt zu einer schwächeren Bindung an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA und somit zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur [44, 53, 56]. Dadurch

wird diversen Faktoren der Transkriptionsmaschinerie erhöhter Zugang zur DNA ermöglicht [35, 44, 53]. Die durch HDACs („erasers“) katalysierte Deacetylierung führt dagegen zur Chromatinkondensation und transkriptioneller Repression [23, 35, 44] (siehe Abb. 4). Dabei deacetylieren HDAC1-3 viele Lysine gleich häufig, wie z.B. H3K4/9/14/27 und H4K5/8/12/16; eine Ausnahme ist H3K56, welches nur durch HDAC1 und 2 deacetyliert wird [22]. Allgemein wirken HATs also aktivierend und HDACs inhibierend auf die Expression [25, 53, 56]. Spezifische Acetylierungs-Markierungen können jedoch auch mit Repression und Chromatinkondensation korrelieren [93, 94] (zit. aus [44, 95]).

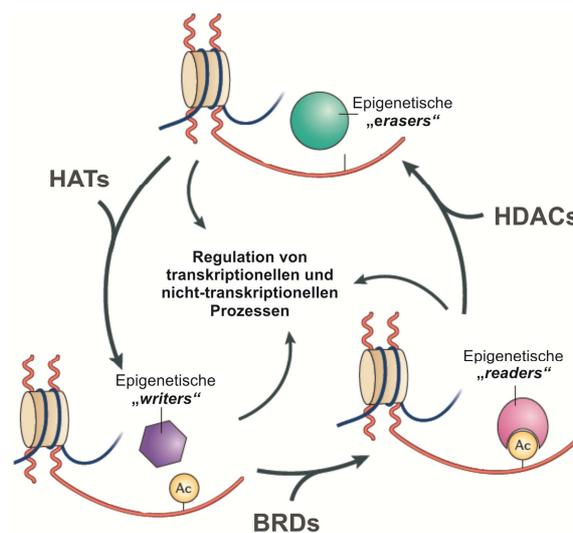


Abbildung 4: Epigenetische „writers“, „readers“ und „erasers“ zur Vermittlung der Chromatinacetylierung. HATs („writers“) katalysieren die spezifische Acetylierung von ϵ -Aminogruppen an Histonlysinen. BRDs („readers“) binden an acetylierte Lysine. HDACs („erasers“) können die Acetylierung wieder entfernen. Modifiziert nach [23].

Acetylierung von Histonen – Ein vielschichtiges regulatorisches System

Die spezifische Lysin-Acetylierung gehört zu einem vielschichtigen regulatorischen System, da die ϵ -Aminogruppe des Lysins viele weitere Modifikationen tragen kann [22, 36, 96] (siehe Abb. 5). HDACs können einen Zugang für zuvor acetylierte Lysine gewähren, sodass diese durch weitere PTMs markiert werden können [22, 36]. Eine Acetylgruppe eliminiert also nicht nur die positive Ladung des Histons, sondern schließt auch alternative PTMs an demselben Lysin aus [32, 36]. Diese Kreuzregulation ist für Acetylierung und Methylierung am besten charakterisiert; eine H3K9-Acetylierung führt beispielsweise zur Inhibition der reprimierenden H3K9-Methylierung und ermöglicht gleichzeitig eine aktivierende H3K4-Methylierung [22, 36].

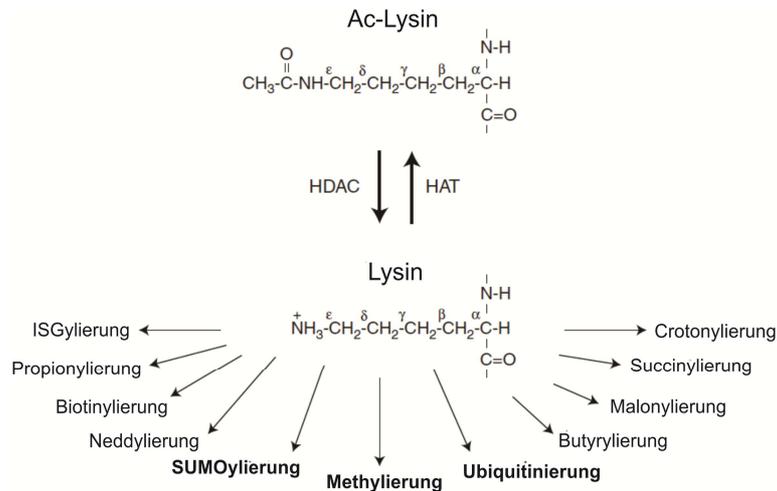


Abbildung 5: Potentielle PTMs von ε-Aminogruppen an Lysinen. SUMOylierung, Methylierung und Ubiquitinierung sind neben der Acetylierung die bekanntesten PTMs an ε-Aminogruppen von Lysinen. Modifiziert hauptsächlich nach [36] und [97].

Acetylierte Lysine dienen als Bindungsstellen für diverse Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren [41]. Sie werden durch kleine, hoch konservierte Protein-Interaktions-Module erkannt, die sogenannten Bromodomänen (BRD, „readers“) [95, 98] (im Folgenden in Anlehnung an Marmorstein & Zhou, 2014 [98]). Bisher sind 42 BRD-enthaltende humane Proteine mit 56 individuellen BRDs bekannt [98]. Die BET (*Bromodomain and extraterminal*)-Proteine BRD2-4 (*bromodomain containing 2/3/4*) und BRDT (*bromodomain containing protein testis specific*) sind wichtige BRDs, da sie vor allem als therapeutische Zielmoleküle charakterisiert sind [95, 99].

BRDs sind für das Andocken von Chromatin-assoziiierenden Proteinen an spezifische Chromatinstellen entscheidend [95]. Deshalb sind sie in vielen nukleären Faktoren vorhanden, wie z.B. in ATP-abhängigen Chromatinremodellierungs-Komplexen, Helikasen, Methyltransferasen, transkriptionellen Koaktivatoren, Repressoren und Mediatoren und auch in HATs selbst und anderen Proteinen mit Acetyltransferase-Aktivität, darunter PCAF (*p300/CREBBP-associated factor*), GCN5 (*K acetyltransferase 2A (KAT2A)*), p300/CREBBP und BRD1 (*bromodomain containing 1*) [95, 98, 99]. Zusätzlich erkennen und binden BRDs acetylierte Lysine von Nicht-Histon-Proteinen und interagieren mit weiteren Modulen um eine hohe Spezifität und Affinität zu gewährleisten [95, 98]. Insgesamt wurden über 15 Domänen identifiziert, die zusammen mit BRDs in den gleichen Proteinen vorliegen, darunter PHD (*plant homeodomain*), PWWP, B-Box-Typ-ZNF, RING-Finger und TAZ-ZNF Domänen [98]. Spezifische

Markierungen, wie H3K14ac, können jedoch auch durch andere Domänen gelesen werden, wie z.B. durch Tandem-PHD-Domänen [98, 100-102].

Weitere Mechanismen der Transkriptionsregulation

Weitere wichtige Möglichkeiten der Transkriptionsregulation durch HDACs sind Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren, Spleißen, RNA- und Proteinstabilität und micro-RNAs [36, 53, 60, 103]. Primär sind HDACs jedoch aktive Bestandteile von Korepressorkomplexen, deren Rekrutierung ein verbreiteter Mechanismus ist, um die Transkription zu regulieren [25, 36, 53]. Die Rekrutierung und Assoziierung mit dem Chromatin findet über verschiedene Faktoren statt, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, ncRNAs und Modulen mit Affinität zu bestimmten Histon-PTMs [53].

Im Allgemeinen vermutet man, dass HDACs an reprimierte Gene binden und für eine Genaktivierung durch HATs ersetzt werden; ihre Aktivität kann jedoch auch positiv mit der Aktivität von Genen korrelieren [36, 53]. So wurde in einer Genomweiten Chromatin-Immunopräzipitations-Analyse eine positive Korrelation zwischen HDAC-Bindung, Histonacetylierung und Transkription beobachtet [53, 104]. Diese Analyse zeigt, dass HATs und HDACs vor allem zu aktiv transkribierten Genen rekrutiert werden und dass eine hohe Expression insbesondere mit erhöhter Klasse I HDAC-Interaktion einhergeht [53, 104]. HDAC1 und 3 wurden dabei vor allem an Promotoren detektiert, wohingegen HDAC2 auch an andere Stellen des aktiven Gens bindet [36, 104]. Inaktive Gene sind jedoch durch das Fehlen beider Enzymgruppen charakterisiert; daher wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach HDACs und HATs gemeinsam zu aktiven Genen rekrutiert werden, um das Acetylierungsmuster und die Chromatinstruktur so zu verändern, dass eine Transkription stetig ablaufen kann [104] (beschrieben in [35, 53]).

Im Detail zeigten Wang et al. 2009 [104], dass HDACs zwei Hauptfunktionen haben (erläutert in [35]): Entfernung von Acetylgruppen einerseits an aktiven Genen, die von HATs während der Initiation und Elongation angehängt wurden, und andererseits an inaktiven Genen, um die durch Anbindung der RNA-Polymerase II vermittelte Initiation zu verhindern [35, 104]. Somit korrelieren HDACs nicht ausschließlich mit der Repression der Transkription; vielmehr wird nach HDAC-Inhibition auch eine Aktivierung der Transkription beobachtet [36]. Weitere Gründe dafür könnten sein, dass HDACs die Expression von Repressoren minimieren oder ihre Funktion bzw. Aktivität inhibieren und Effektoren aktivieren [36].

Spezifische Expressionsveränderungen nach HDAC-Modulation

Klasse I HDAC-Deletionen deregulieren spezifisch eine limitierte Anzahl von Genen [41]. HDACi dagegen beeinflussen die Transkription von bis zu 5-22 % der Gene in Leukämiezellen und Zellen von diversen soliden Karzinomen [22, 23, 36, 60, 105]. Dabei reaktivieren sie u.a. die Expression von spezifischen inaktiven Genen, wie beispielsweise den Zellzyklus-Regulator p21 (CDKN1A, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) [44]. Der Umfang der Expressionsveränderungen hängt maßgeblich von der Inkubationszeit, der Konzentration und der Art des Inhibitors ab [105]. Beispielsweise nimmt mit steigender Konzentration und Inkubationszeit die Anzahl veränderten Gene signifikant zu [105]. Grundsätzlich kann das Expressionsmuster ähnlich ausgeprägt sein, zeigt jedoch häufig HDACi- und Zelltyp-spezifische Unterschiede [22, 103, 105].

1.3.3 Nicht-transkriptionelle und zelluläre Effekte von Klasse I HDACs

Klasse I HDACs können auch nicht-transkriptionell agieren und so Prozesse, wie z.B. DNA-Replikation und -Reparatur, Mitose/Meiose, Spleißen, Zellzyklus, genomische Stabilität, Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose, Angiogenese, Autophagie, Metabolismus und Signaltransduktion, regulieren [22, 32, 53, 60]. Um nicht-transkriptionelle Prozesse zu vermitteln, kontrollieren HDACs die Acetylierung zahlreicher nukleärer, cytoplasmatischer und mitochondrialer Nicht-Histon-Substrate, u.a. Tumorsuppressoren, Chaperone, nukleäre Rezeptoren, DNA-Reparaturproteine, Strukturproteine, mitotische Proteine, Enzyme der RNA-Prozessierung und Replikations-Maschinerie, Metabolismus-assoziierte Enzyme, apoptotische Aktivatoren und Inhibitoren, virale Proteine und HATs und HDACs selbst. Damit modulieren HDACs ihre Funktionalität, Aktivität, Struktur, Stabilität und subzelluläre Lokalisation sowie ihre Interaktion mit Bindungspartnern [55, 106] (beschrieben in [20, 32, 53, 58, 60, 105]).

Mehrere Indizien und Studien deuten sogar darauf hin, dass die primären HDAC-Substrate Nicht-Histon-Proteine sind und ihre Hauptfunktion somit die Regulation von nicht-epigenetischen Prozessen ist [36, 53, 58, 60]. Zum einen existieren sehr viele potentielle Nicht-Histon-Substrate, da ein großer Anteil des eukaryotischen Proteoms reversible Lysin-Acetylierungen trägt [106, 107]; zum anderen lassen phylogenetische Analysen vermuten, dass die HDAC-Entstehung der Entwicklung von Histonen vorausgeht [37] (beschrieben in [36, 53, 58, 60, 105]). Über Nicht-Histon-Substrate können

HDACs auch indirekt epigenetisch wirken, indem sie Histon-Modifizierer, wie z.B. HDACs selbst, HATs, Histonmethyltransferasen und solche, die an der Etablierung der DNA-Methylierung beteiligt sind, wie z.B. DNMT1, regulieren [107] (zit. aus [36]).

Zelluläre Funktionen und Redundanz der Klasse I HDACs 1 und 2

HDAC1 und 2 haben komplexe Gewebe-übergreifende Schlüsselfunktionen in vielen zellulären Signalwegen und Prozessen [41]. Dies soll am Beispiel der Zellzyklusregulation verdeutlicht werden (angelehnt an [22, 25, 32, 41, 53]). HDAC1 und 2 liegen häufig co-exprimiert vor und können durch Kompensationsmechanismen funktionell redundant sein, da die genetische Inhibition einer Isoform zur erhöhten Expression und Übernahme der Funktion durch die andere Isoform führt und es so zu einer Phänotyp-Maskierung kommt [41, 53]. Dieser reziproke Mechanismus wurde in diversen Zelltypen beobachtet, wie etwa in embryonalen Fibroblasten der Maus (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF-Zellen), und ist dadurch charakterisiert, dass eine einzelne Inhibition von HDAC1 oder 2 keine oder nur milde Effekte induziert [53, 108]. HDAC1 und 2 können jedoch auch spezifisch wirken [41]. Yamaguchi et al. 2010 zeigten z.B. über Transkriptom- und Histon-PTM-Analysen, dass HDAC1 und 2 nur teilweise redundant sind [109]. Weiterhin deuten siRNA (*small interfering RNA*)-Versuche in Zellen verschiedenen Ursprungs, wie etwa Osteosarkom und Mammakarzinom, darauf hin, dass die Regulation der Zellzyklusprogression und Proliferation durch HDAC1 und 2 stark vom Zellkontext abhängt [41, 110].

HDAC1-Inaktivierungen induzieren häufig Proliferationsstopp, G1-Zellzyklusarrest, p21-Induktion, mitotische Defekte und/oder erhöhte HDAC2-Expression [109-111]. HDAC2-Inaktivierungen haben häufig deutlich schwächere antineoplastische Effekte zur Folge [108-110]. Eine kombinierte HDAC1/2-Inaktivierung potenziert dagegen oft die durch spezifische HDAC1- oder HDAC2-Inaktivierung vermittelten Effekte [53]. Häufig werden p21- und p27 (CDKN1B, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*)-Aktivierung, starker Zellzyklusarrest, starke Histon-Hyperacetylierung, genomische Instabilität, Akkumulation von DNA-Schäden, reduzierte Fähigkeit ihrer Reparatur und erhöhte Apoptose und Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien beobachtet [22, 25]. In MEF-Zellen induziert eine HDAC1/2-Deletion z.B. starken G1-Zellzyklusarrest und Apoptose, wohingegen Zellen, bei denen eine einzelne Isoform deletiert wurde, nur moderate oder keine Defekte zeigen [41, 109].

1.3.4 Maligne Expression von Klasse I HDACs

Sowohl in hämatologischen Krebserkrankungen als auch in diversen soliden Tumoren und malignen Zelllinien wurde eine Überexpression von einzelnen oder mehreren Klasse I HDACs auf RNA- und Proteinebene im Vergleich zum Normalgewebe oder Kontrollzellen beobachtet (im Folgenden teilweise entnommen aus [42, 54, 60, 112-115]). Die höchste Expression liegt oft in aggressiven, fortgeschrittenen, dedifferenzierten und stark proliferierenden Tumoren vor [21, 112]. Hämatologische Erkrankungen mit veränderter Klasse I HDAC-Expression sind multiple Myelome, Lymphome (Hodgkin-, diffuse großzellige B-Zell-, NK/T-Zell-, kutane und periphere T-Zell-Lymphome (CTCL/PTCL – *cutaneous/peripheral T-cell lymphoma*)) und die akute lymphoblastische sowie chronisch lymphatische Leukämie [116-125]. Solide Tumore mit differenter Expression sind das Kolorektal-, Leberzell-, Prostata-, Ovarial-, Endometrium-, Magen-, Pankreas-, Mamma-, Lungen-, Ösophagus-, Gallenblasen-, Schilddrüsen-, und Nierenzellkarzinom sowie das kindliche Glio- und Neuroblastom [114, 126-153].

Im Magen- und Ösophaguskarzinom liegt gleichzeitig eine Verringerung der Histonacetylierung vor [154, 155]. Zusätzlich wurde ein früher globaler Verlust der H4K16-Acetylierung während der Entstehung von Tumoren gezeigt [156]. Des Weiteren kann für einige Karzinome eine Subtypisierung aufgrund der HDAC-Expression oder des Acetylierungsmusters erfolgen [112, 140-142, 157]. Häufig korreliert eine hohe HDAC-Expression mit einer schlechten Prognose, wobei manchmal, wie etwa im Mammakarzinom [138-140], auch eine positive Korrelation zwischen der Expression bestimmter Klasse I HDACs und der Prognose beobachtet wurde [112]. Die Klasse I HDAC-Expression im UC wird in Kap. 1.5 ausführlich beschrieben.

1.3.5 Klasse I HDACs – Onkogene oder Tumorsuppressoren?

Aufgrund verschiedener Indizien wird postuliert, dass HDACs primär onkogen wirken und dass eine gewisse HDAC-Expression bzw. -Aktivität für das Überleben und die Proliferation von Krebszellen entscheidend ist [23]: (1) Erhöhte neoplastische Expression und Korrelation mit schlechter Prognose (siehe Kap. 1.3.4), (2) Überexpression bzw. erhöhte Aktivität kann zur Initiation und Progression von Tumoren führen, (3) HDACs können an onkogene Fusionsproteine binden und so aberrant zu

spezifischen Promotoren rekrutiert werden und damit zur malignen Transformation und insbesondere zur Leukämieentstehung beitragen, (4) siRNA-vermittelte oder genetische Inaktivierungen von HDAC1-3 und (5) HDACi können vielfältige antineoplastische Effekte, wie Apoptose und Zellzyklusarrest in Neoplasien, induzieren (Aufzählung aus [23, 115]).

Demgegenüber stehen Studien, die belegen, dass Klasse I HDACs auch tumorsuppressiv wirken können und somit eine duale Rolle haben [22, 23, 53, 115]. Zum einen können inaktivierende HDAC-Mutationen, wie etwa eine frame-shift-Mutation in HDAC2 [158], an der Tumorprogression beteiligt sein [115]. Zum anderen belegen Versuche mit Knockout- und Knockdown-Mäusen, dass Klasse I HDACs auch Tumorsuppressoren sein können [22, 23, 115]. Speziell für die Inaktivierung von HDAC1 und 2 wurde gezeigt, dass sie die maligne Transformation von Vorläuferzellen mit ersten onkogenen Merkmalen beschleunigen und zur Entwicklung und Progression von hämatologischen Neoplasien beitragen [159, 160] (beschrieben in [23, 115]). Eine Leber-spezifische HDAC3-Deletion führt ebenfalls zur Entstehung von Karzinomen [23, 53, 161]. Zusätzlich kann eine HDACi-Behandlung Migration und erhöhte Metastasierung induzieren [115, 162].

Insgesamt scheint der spezifische genetische Hintergrund der Zellen wichtig für die HDAC-Funktion als Onkogen oder Tumorsuppressor zu sein. So führt ihre Inhibition vor allem in benignen und prä-neoplastischen Zellen zur malignen Initiation und Progression [23]. In prä-leukämischen Mäusen führt ein Knockdown von HDAC1 und 2 beispielsweise zur beschleunigten Leukämie-Entstehung, wohingegen ein HDAC1-Knockdown in komplett transformierten leukämischen Zellen antineoplastische Effekte hat [22, 159]. Insbesondere HDAC1 scheint also eine duale Funktion zu haben: In prä-leukämischen Zellen wirkt HDAC1 tumorsuppressiv, indem es der Blockierung der Differenzierung, genomischer Instabilität und erhöhter Selbsterneuerung von hämatopoetischen Vorläuferzellen entgegen wirkt [159], wohingegen HDAC1 in terminal transformierten Zellen ein Onkogen und mögliches therapeutisches Ziel darstellt [22, 159].

1.4 HDAC-Inhibitoren

1.4.1 Klinische Anwendung von HDACi

Die in vielen Krebsentitäten überexprimierten HDACs scheinen besonders gute Kandidaten für eine epigenetische Therapie zu sein [32, 44]. Daher werden sehr viele klinische Studien mit verschiedenen HDACi als Mono- oder Kombinationstherapie durchgeführt oder sind bereits abgeschlossen [23, 60]. Der Schwerpunkt liegt dabei auf hämatologischen Neoplasien, da die bisherigen Ergebnisse zur Behandlung von soliden Tumoren, im Vergleich zu präklinischen Daten, sehr häufig enttäuschend waren [20, 23, 60]. Aktuell sind vier HDACi von der FDA (*US Food and Drug Administration*) zugelassen (siehe [20]): (1) SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*, Vorinostat, Zolinza®, Merck Research Laboratories, 2006, fortgeschrittenes CTCL in Zweit- und Drittlinien-Therapie [163]), (2) Romidepsin (FK228, Istodax®, Celgene, 2009, fortgeschrittenes CTCL in Zweit- und Drittlinien-Therapie und PTCL [164]), (3) Belinostat (PXD101, Beleodaq®, Spectrum Pharmaceuticals, 2014, refraktäres PTCL [165]) und (4) Panobinostat (LBH-589, Farydak®, Novartis Pharmaceuticals, 2015, multiples Myelom [166]).

1.4.2 Pharmakophor, Spezifität und Aktivität von HDACi

HDACi können nach drei verschiedenen Kriterien eingeteilt werden: Substanzklasse, Spezifität und Aktivität [20, 23, 36]. Es gibt vier etablierte Substanzklassen; zusätzlich unterscheidet man spezifische und unspezifische HDACi (pan-HDACi). Des Weiteren reichen die Konzentrationen, bei denen HDACi biologisch aktiv sind, vom nano- bis hin zum millimolaren-Bereich [44] (siehe auch [167]).

Pharmakophor-Modell und Substanzklassen von HDACi

Das HDACi-Pharmakophor setzt sich prinzipiell aus drei definierten Molekülgruppen zusammen, der sogenannten CAP-Gruppe (grün, in Abb. 6), dem Linker (blau) und der ZBG (Zink-bindende Gruppe, rot) [20, 23].

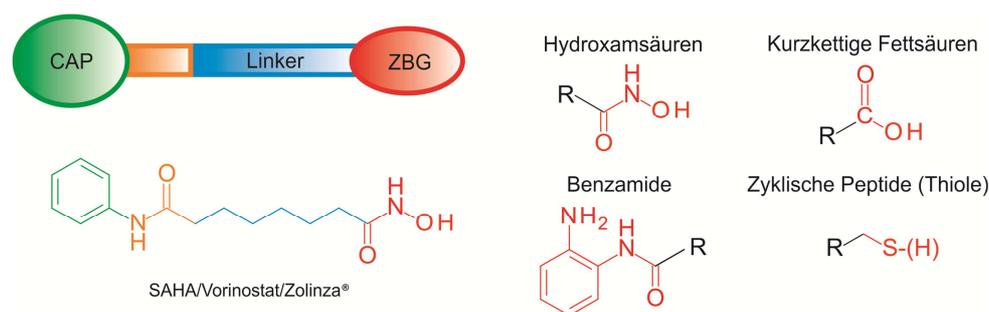


Abbildung 6: HDACi-Pharmakophor und charakteristische ZBGs. SAHA dient als Beispiel für den generellen Aufbau von HDACi, zusammengesetzt aus einer mit der Enzymoberfläche interagierenden CAP-Region (grün), einer Verbindungseinheit (optional, orange), einem Linker (blau) und einer Zinkbindenden Gruppe (ZBG, rot). Anhand der ZBG findet eine Einteilung in die Substanzklassen Hydroxamsäuren, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide und zyklische Peptide (Thiole) statt. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm Accelrys Draw Academic (San Diego, USA) erstellt. Modifiziert nach [20].

Die CAP-Gruppe besteht meistens aus einer aromatischen Struktur und ist überwiegend für die Selektivität der HDACi verantwortlich [20, 23]. Sie ist sehr variabel und kann stark modifiziert werden, daher dient sie häufig zur HDACi-Optimierung bezüglich Aktivität, Spezifität und Pharmakokinetik [21]. Die CAP-Region interagiert mit der externen HDAC-Oberfläche und mit räumlich nah gelegenen Mitgliedern der HDAC-Komplexe [23, 60]. Zur Interaktionsverstärkung besitzen einige HDACi eine zusätzliche Verbindungseinheit (orange) zwischen der CAP-Gruppe und dem Linker [20]. Der Linker, als Hauptverbindung zwischen CAP-Gruppe und ZBG, kann den tubulären Zugang zum Zn^{2+} -Atom der HDACs blockieren [20, 32]. Er kann ebenfalls zur Modulation der Selektivität genutzt werden, indem spezifische Modifikationen hinzugefügt werden [23]. Dadurch ist es z.B. gelungen HDACi mit spezifischer Bindung an und Selektivität für die stark homologen Isoformen HDAC1 und 2 zu synthetisieren [168]. ZBGs koordinieren das Zn^{2+} im aktiven Zentrum der HDACs [23, 40]. Die Zuordnung zu den vier gängigsten Substanzklassen, die gleichzeitig auch die klinisch relevantesten HDACi sind, wird über diese ZBGs definiert: Hydroxamsäuren, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide und zyklische Peptide bzw. Thiole [20, 103]. Kurzkettige Fettsäuren stellen die schwächste und Hydroxamsäuren die effektivste ZBG dar [20]. Die in dieser Arbeit verwendeten HDAC3-Inhibitoren RGFP966 und BG45 gehören zu einer neuen Klasse, den N-(o-Aminophenyl)-Carboxamiden [169-171].

Aktivität und Spezifität von HDACi

Die Mitglieder der vier gängigen HDACi-Klassen variieren wesentlich in Aktivität und Spezifität und können aufgrund dessen charakterisiert werden [23, 35].

Hydroxamsäuren: Hydroxamsäuren können verschiedene HDAC-Isoformen nicht unterscheiden [21, 40]. Daher inhibieren sie meistens als pan-HDACi relativ unspezifisch alle Mitglieder der Klasse I und II, teilweise jedoch auch Klasse IV, im niedrigen bis intermediären nM-Bereich [35, 36]. Bekannte Hydroxamsäuren sind SAHA, Belinostat, Panobinostat, Trichostatin A (TSA), Resminostat, Givinostat, Dacinostat und Pracinostat [25]. Drei von vier zugelassenen HDACi sind somit Hydroxamsäuren [20]. Man vermutet jedoch, dass sie aufgrund ihres unspezifischen Charakters und durch die Koordinierung von anderen Metalloenzymen vermehrt Nebenwirkungen und Off-Target-Effekte in Patienten induzieren können [40].

Kurzkettige Fettsäuren: Kurzkettige Fettsäuren wie z.B. Valproinsäure, Natrium-Butyrat und Pivanex [25, 36] inhibieren Klasse I und IIa HDACs und sind mit einer inhibitorischen Aktivität im mM-Bereich die am wenigsten potenten HDACi [35, 58].

Benzamide: Benzamide inhibieren primär Klasse I HDACs bei intermediären nM-Konzentrationen [35, 36]. Sie vermitteln häufig eine starke Zeit-abhängige zelluläre inhibitorische Aktivität bei nur mäßigen *in vitro* IC₅₀ (mittlere inhibitorische Konzentration)-Werten, da sie oft eine *slow-binding*-Aktivität haben, bei der vor der Zn²⁺-Koordinierung zunächst intramolekulare Wasserstoffbrücken gelöst werden müssen [36, 40, 172, 173]. Viele Benzamide haben eine hohe Potenz gegenüber HDAC1-3, aber nicht gegenüber HDAC8 [174]. Dies liegt vermutlich daran, dass das aktive Zentrum von HDAC1-3 hoch konserviert ist, HDAC8 jedoch im Vergleich erhebliche Strukturunterschiede aufweist [174]. In der präklinischen oder klinischen Forschung häufig verwendete Benzamid-HDACi sind Entinostat, Mocetinostat und Rocilinostat [25, 36].

Zyklische Peptide (Thiole): Zyklische Peptide sind die strukturell komplexesten HDACi [44, 58]. Bekannte Mitglieder sind Romidepsin, Apicidin und Trapoxin, wobei Romidepsin insgesamt am besten charakterisiert ist [25, 58]. Im niedrigen nM-Bereich inhibieren sie vorrangig HDACs der Klasse I, bei höheren Konzentrationen jedoch auch Klasse II HDACs [35]. Die Gruppe der zyklischen Peptide enthält verschiedene ZBGs, wobei Thiole, neben elektrophilen Ketonen, die häufigsten sind [36].

1.4.3 Molekulare Mechanismen und Phänotypen von HDACi

Die HDACi-Funktionsweise kann auf drei verschiedenen Ebenen betrachtet werden: Inhibition der HDAC-Enzymaktivität, dadurch induzierte molekulare Mechanismen und Veränderungen des zellulären Phänotyps. Die Ebenen werden sowohl durch kanonische epigenetische als auch durch indirekt- und nicht-epigenetische Prozesse reguliert [35].

Inhibition der HDAC-Enzymaktivität

HDACi sind kompetitive Inhibitoren, die an das katalytische Zentrum binden und so die enzymatische Funktion blockieren [32]. Hydroxamsäuren z.B. führen ihre aliphatische Kette in die tubuläre HDAC-Tasche ein und vermitteln die Inhibition durch zweifache Zn^{2+} -Koordinierung und durch Ausbildung von multiplen AS-Kontakten innerhalb des katalytischen Zentrums [36, 44, 46, 60]. Zusätzlich können CAP-Gruppen den Zugang blockieren oder die HDACi-Bindung ans aktive Zentrum verstärken [20, 23, 36, 40, 60].

Molekulare Mechanismen

Ursprünglich ging man davon aus, dass HDACi primär über eine kanonische epigenetische Modulation der Genexpression wirken und die Expression wichtiger reprimierter Schlüsselgene wiederherstellen [21, 22]. Dies würde die an der Karzinogenese beteiligten Signalwege spezifisch beeinflussen [44]. Inzwischen weiß man jedoch, dass auch nicht-epigenetische Effekte von HDACi entscheidend sind, wie etwa die Acetylierung von Nicht-Histon-Substraten [22, 44, 105].

Insgesamt wird der Einfluss von HDACi auf Zellen über die folgenden fünf miteinander interagierenden Mechanismen vermittelt: (1) Dekondensierung des Chromatins durch Histon-Hyperacetylierung und einhergehende Expressionsveränderungen, (2) Modifizierung des Acetylierungsstatus an Promotoren spezifischer Gene und anschließende Regulation der Genexpression, (3) Acetylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Regulation ihrer Aktivität, (4) Acetylierung weiterer Nicht-Histon-Substrate und Vermittlung nicht-transkriptioneller Effekte und (5) Interaktionsstörungen zwischen HDACs und Korepressoren bzw. Kofaktoren (Aufzählung aus [35]). Diese Mechanismen sind unterschiedlich stark beteiligt und vermitteln vielfältige Phänotypen, die von diversen Bedingungen abhängen [23] wie Zellkontext (Ursprung, genetische und epigenetische Anomalien), Inhibitor (Art, Substanzklasse, Konzentration bzw. Dosis), spezifisch inhibierte HDACs und HDAC-Komplexe, Hyperacetylierung definierter Substrate, Behandlungsdauer und extrazelluläre Umgebung [23, 41, 60, 105, 115].

Veränderungen des zellulären Phänotyps

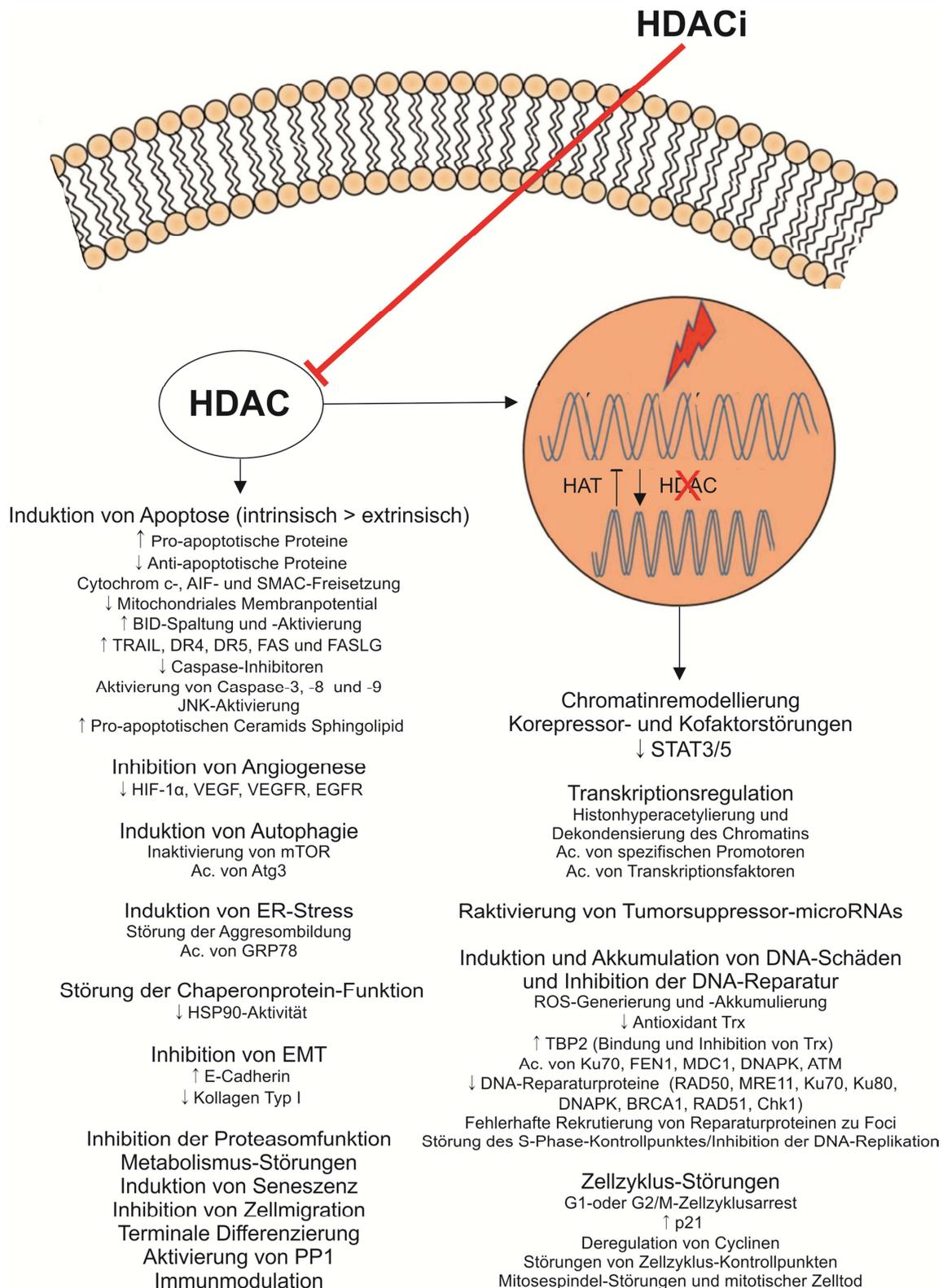


Abbildung 7: HDACi-Mechanismen und zelluläre Phänotypen in malignen Zellen. HDACi vermittelte Effekte auf maligne Zellen und die zu Grunde liegenden epigenetischen und nicht-epigenetischen Mechanismen. Hauptsächlich modifiziert nach [25] und nach [22, 23, 35, 44, 60, 103, 105, 175-177].

Häufige HDACi-vermittelte Phänotypen von malignen Zellen sind Inhibition der Proliferation, Zellzyklusarrest bzw. -störungen, terminale Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese-Inhibition [23, 40, 41, 60, 105]. Die Fähigkeit in malignen Zellen selektiv Apoptose zu induzieren wird häufig als primärer Grund für das therapeutische HDACi-Potential postuliert [36]. Zusätzlich kann Zelltod durch mitotische Katastrophe, Autophagie, Seneszenz und ROS (*reactive oxygen species*)-vermittelt auftreten [23, 25, 105, 178, 179]. Weitere bekannte Phänotypen sind in Abb. 7 dargestellt. Im Folgenden werden im Rahmen dieser Arbeit wichtige HDACi-Phänotypen und ihre Mechanismen erläutert (angelehnt an [23, 25, 35, 103, 105]).

Zellzyklusarrest und -störungen: HDACi stören die Zellzyklusprogression und induzieren einen G1- oder G2/M-Zellzyklusarrest, indem sie mit verschiedenen Zellzyklus-Regulatorproteinen interagieren oder ihre Expression verändern [25, 44]. Ein G1-Arrest wird dabei primär durch transkriptionelle Veränderungen induziert [23], u.a. wird häufig eine Cyclin-Deregulation, wie etwa Repression von Cyclin A und D1, und Induktion von endogenen Inhibitoren des Zellzyklus, wie p21, p15, p19, p16 und p57, beobachtet [23, 25, 35, 44, 103, 105]. Der HDACi-vermittelte G2/M-Arrest ist weniger gut verstanden [23]. Er assoziiert ebenfalls mit einer p21-Induktion; somit ist p21 nach HDACi-Behandlung sowohl an der Hemmung der G1-Progression und des G1/S-Überganges als auch am G2/M-Übergang beteiligt und ist der am häufigsten HDACi-induzierte Faktor [44, 105]. Die Entstehung eines G1- oder G2/M-Arrestes hängt vermutlich von der HDACi-Konzentration ab [105]. Niedrige Konzentrationen sollen primär einen G1- und hohe Konzentrationen sowohl einen G1- als auch G2/M-Arrest induzieren können [105]. Neben Expressionsänderungen haben auch Störungen von Zellzyklus-Kontrollpunkten, besonders Mitosespindel-Störungen mit folgendem mitotischen Zelltod [180, 181], eine wichtige Funktion bei den HDACi-vermittelten Zellzyklusstörungen (siehe [25, 103, 105]).

Apoptose: HDACi aktivieren und regulieren apoptotische Prozesse über verschiedene Faktoren und Signalwege [105], entweder indirekt über veränderte Expression wichtiger Gene oder direkt durch biochemische Veränderungen in der Zelle und Expressionsunabhängig [44]. Die intrinsische mitochondriale Apoptose stellt den Hauptmechanismus des HDACi-vermittelten Zelltods dar [105]. Zusätzlich tritt vermehrt der extrinsische Todesrezeptor-Signalweg auf [103]. Dieser ist durch eine erhöhte Expression von Todesrezeptoren (DR4/5 (*death receptor 4/5*), FAS (*Fas cell surface death receptor*)),

ihren Liganden (TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*), FASLG (*Fas ligand*)) und durch eine geringere c-FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*)-Expression charakterisiert [23, 25, 35, 36, 44, 105]. Bei der HDACi-vermittelten intrinsischen Apoptose kommt es dagegen zur Induktion pro-apoptotischer Faktoren, Inhibition anti-apoptotischer Faktoren sowie Cytochrom c-, AIF (*apoptosis inducing factor*)- und SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspase*)-Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum und Aktivierung von Effektorcaspasen [25, 35, 103, 105]. Zusätzlich zur Induktion klassischer intrinsischer und extrinsischer Apoptose wurden BID (*BH3 interacting domain death agonist*)-Spaltung und -Aktivierung, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)-Aktivierung und Induktion des pro-apoptotischen Ceramids Sphingolipid beobachtet [182-188] (beschrieben in [35, 44, 103]). Spaltung und Aktivierung von BID koppelt den intrinsischen und extrinsischen Weg miteinander [103].

Induktion und Akkumulation von DNA-Schäden und Inhibition der DNA-Reparatur:

HDACi-vermittelte DNA-Schäden werden durch multiple Mechanismen induziert wie ROS-Generierung, Inhibition der Transkription bzw. Funktion von antioxidanten Proteinen und DNA-Reparatur-Faktoren [35]. In malignen Zellen scheinen vor allem ROS-vermittelter oxidativer Stress und dadurch induzierte DNA-Schäden einen wichtigen Anteil an HDACi-Effekten zu haben, da der ROS-Generierung häufig Apoptose oder Seneszenz folgen [44, 182, 189, 190]. HDACi regulieren oxidativen Stress auf verschiedenen Ebenen z.B. durch reduzierte Expression von Radikalfängern wie Thioredoxin (Trx) und erhöhte TBP2 (*thioredoxin-binding protein-2*)-Expression [190, 191] (siehe [23, 25, 35, 44, 103, 105]). Durch die erhöhte TBP2-Expression wird Trx vermehrt gebunden und so zusätzlich inhibiert [105]. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der HDACi-vermittelten Induktion und Akkumulation von DNA-Schäden ist die DNA-Schadensantwort [35]. Häufig wird eine Interferenz mit verschiedenen DNA-Reparaturprozessen (homolog, nicht-homolog, BER (*base excision repair*)- und NER (*nucleotide excision repair*)) beobachtet, die auf transkriptioneller Repression, Acetylierungs-bedingter Inhibition oder fehlerhafter Rekrutierung von Proteinen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur basiert (beschrieben in [23, 35, 103]). Zusätzlich können HDACi durch Replikationsstress DNA-Schäden und Zelltod induzieren. Dieser ist durch Störungen des S-Phase-Kontrollpunktes und Inhibition der DNA-Replikation charakterisiert [22, 23, 103]. Dabei scheint eine HDAC1-3-Inhibition entscheidend zu sein, da diese Enzyme vermehrt an aktiven Replikationsstellen lokalisiert sind [22, 192].

1.4.4 Limitationen von HDACi und mögliche Lösungsansätze

In klinischen Anwendungen werden häufig ernsthafte Limitationen der HDACi deutlich [21]: niedrige Effizienz bei soliden Tumoren im Vergleich zu hämatologischen Neoplasien [21, 58, 60, 193], Off-Target-Toxizitäten und erhebliche Nebenwirkungen [21], schwierige Patientenauswahl [20], geringe HDACi-Stabilität und -Bioverfügbarkeit [20, 21], Resistenzen [194, 195] und Fehlen von prädiktiven und prognostischen Markern [41]. Einige Limitationen und mögliche Lösungsansätze werden im Folgenden beschrieben (in Anlehnung an [20-23, 36]).

Geringe Effektivität bei soliden Tumoren: Durch eine HDACi-Monotherapie kann in Patienten mit soliden Tumoren im Idealfall eine Stabilisierung, jedoch selten ein signifikantes antineoplastisches Ansprechen erzielt werden [21]. Dies gilt auch für HDACi, die bereits zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen zugelassen sind [21, 58]. Diese Ineffizienz widerspricht präklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Studien, bei denen eine HDACi-Behandlung meistens starke antineoplastische Effekte und signifikanten Zelltod induziert [22].

Um diese Differenz zwischen soliden und hämatologischen Neoplasien bzw. präklinischen und klinischen Daten zu erklären, existieren erste begründete Theorien. So könnten Erkrankungen mit spezifischen HDAC-rekrutierenden hämatologischen Onkoproteinen, wie z.B. BCL6 (*B cell leukemia/lymphoma 6*), PML-RAR α (*promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α*), PLZF-RAR α (*promyelocyte leukemia zinc finger-retinoic acid receptor α*) und AML1-ETO (*acute myeloid leukemia 1-eight twenty one fusion protein*), besonders effizient auf eine HDACi-Behandlung ansprechen [22]. Dem widerspricht, dass das CTCL nicht durch solch ein Onkoprotein charakterisiert ist, aber gerade dafür die ersten zwei HDACi zugelassen wurden [22]. Fotheringham et al. 2009 zeigten hingegen eine positive Korrelation zwischen der HR23B (*RAD23 homolog B*)-Expression, die besonders hoch in CTCL-Zellen ist, und dem HDACi-Ansprechen [196]. Zusätzlich könnten Instabilität und geringe Halbwertszeiten von HDACi, in Kombination mit der eingeschränkten Zugänglichkeit von soliden Tumoren im Vergleich zu hämatologischen Neoplasien, eine weitere Erklärung für ihre niedrige Effektivität liefern [21].

Nebenwirkungen: Bei der klinischen Anwendung von HDACi werden vielfältige Dosis-limitierende Nebenwirkungen beobachtet, wie Müdigkeit, gastrointestinale Symptome (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Appetitlosigkeit), Myelosuppression, Veränderungen im Blutbild (Thrombozytopenie, Neutropenie), neurologische Effekte und kardiale Toxizitäten, wie z.B. Herzrhythmusstörungen [22, 25, 32, 36, 41, 60].

Auswahl von Patienten: Aufgrund der bisher erfolgten klinischen Studien wird postuliert, dass die Patientenauswahl für die HDACi-Behandlung unvorteilhaft ist und zum geringen Ansprechen auf die Therapie beiträgt [20, 22, 23]. Um die Effektivität zu steigern, sollten vor allem diejenigen Tumore mit HDACi behandelt werden, an deren Initiation und Progression HDACs direkt beteiligt sind [20]. Problematisch ist auch, dass die meisten HDACi-Studien auf Patienten in einem späten refraktären Stadium limitiert sind, bei denen eine klassische Chemotherapie fehlgeschlagen ist [22, 23]. Chemotherapien basieren oft auf einer Störung der DNA-Replikation, außerdem wird ein Teil der HDACi-Effekte ebenfalls durch eine Replikations-Störung induziert [22]. Auch gibt es Hinweise darauf, dass ein intaktes Immunsystem für die HDACi-Effektivität wichtig ist [23, 197]. Immunosupprimierte Patienten, z.B. solche die bereits eine Chemotherapie erhalten haben, könnten also weniger sensitiv auf HDACi reagieren [23].

Resistenzen: HDACi-Resistenzen werden in verschiedensten Entitäten beobachtet und diese werden über vielfältige Mechanismen reguliert: Deregulationen und Mutationen von HDACs [158, 198, 199], aktiver HDACi-Efflux über überexprimierte Membrantransporter, HSP90-Hyperacetylierung [198], p21-Deregulation [200, 201], Aktivierung spezifischer Signalwege (JAK-STAT (*janus kinase-signal transducer and activator of transcription*), MAPK [202], NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) und PI3K/AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene*) [203]), Induktion spezifischer Faktoren (anti-apoptotische Proteine [183], Antioxidantien, FGR (*Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog*) [204] und SRC-3 (*steroid receptor coactivator-3*) [205]), Überexpression von IGF2 (*insulin-like growth factor 2*) und Aktivierung des Signalweges [206, 207], G2/M-Kontrollpunkt-Aktivierung und Caspase-3/7-vermittelte Apoptose [208] (teilweise zit. aus [23, 25, 103, 105, 194, 195]).

Gleichzeitig können HDACi dazu dienen, bereits vorhandene Resistenzen gegenüber klassischen Chemotherapeutika und anderen Substanzen, wie Paclitaxel, Erlotinib, Rituximab, Temozolomid, Trastuzumab, Gemcitabin, Bortezomib und Navitoclax, zu überwinden [124, 135, 209-216]. Für das Mammakarzinom wurde z.B. eine Korrelation zwischen einer erhöhten HDAC2-Expression und verschiedenen Resistenzproteinen sowie einer geringeren Überlebensrate nach einer Chemotherapie mit Anthracyclinen nachgewiesen [143]. Des Weiteren wurde in Zellen des multiplen Myeloms gezeigt, dass HDAC1-3 die Sensitivität gegenüber Proteasominhibitoren und anderen Agenzien bestimmen können [216]. Diese Zusammenhänge könnten möglicherweise durch eine gezielte Klasse I HDAC-Inhibition genutzt werden.

Mögliche Lösungsansätze

Es werden verstärkt Strategien verfolgt, um diese Limitationen von HDACi zu überwinden [21]: Entwicklung von Isoform-selektiven HDACi, Prodrugs und dualen Molekülen [20, 21], Kombinationstherapien [217, 218], lokalisierte Wirkstoff-Verabreichung auf oder in das maligne Gewebe [21] und selektive Gewebe- und Zelltypverteilung über einen spezifischen Transport oder Aktivierung in definierten Bereichen [20, 21]. Gemeinsames Ziel ist es systemische Toxizitäten zu umgehen, indem die HDACi-Effizienz an spezifischen Stellen erhöht und zugleich die Toxizität verringert wird [21].

Isoform-selektive HDACi: Selektive HDACi könnten eine Zuordnung von Toxizitäten zu spezifischen HDACs ermöglichen [22, 40]. Damit könnte untersucht werden, ob sie im Vergleich zu pan-HDACi eine höhere therapeutische Effizienz und weniger Nebenwirkungen vermitteln und somit besser für den klinischen Einsatz geeignet sind [28, 58]. Mit selektiven HDACi könnte man spezifisch diejenigen HDACs hemmen, die in einer bestimmten Neoplasie dereguliert vorliegen, und so möglicherweise Dosis-limitierende Nebenwirkungen vermeiden, die aus einer Inhibition nicht-deregulierter HDACs resultieren [35]. Insgesamt könnten Isoform-selektive HDACi jedoch stärkere Effekte haben als ihr inhibitorisches Profil vermuten lässt, wenn z.B. die Aktivität eines Multiproteinkomplexes von einer einzelnen HDAC-Isoform abhängt [23]. Auch könnte die in gewissem Maße vorhandene Redundanz von homologen Isoformen den Effekt der selektiven Inhibition minimieren [21].

Bislang sind vor allem Klassen-selektive HDACi entwickelt worden [21, 40, 60, 174]. Es sind nur wenige wirklich selektive HDACi verfügbar, z.B. gegen HDAC3 (RGFP966 und BG45), HDAC6 (Tubacin und Tubastatin) und HDAC8 [169-171, 219, 220] (zit. aus [21, 23]) (siehe auch [167]). Fortschritte in der Entwicklung von selektiven HDACi könnte die Methode von Bantscheff et al. 2011 bringen. Mit dieser kann die HDACi-Affinität gegenüber nativen HDAC-Multiproteinkomplexen, im Gegensatz zu aufgereinigten und dissoziierten Deacetylasen, und somit die Affinität für die tatsächlichen *in vivo*-Zielmoleküle, bestimmt werden kann [70]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass einige HDACi unterschiedliche Affinitäten gegenüber verschiedenen Komplexen haben, obwohl diese die gleichen HDACs enthalten [70]. Zusätzlich wurden unterschiedliche Bindungskinetiken ähnlicher HDACi für verschiedene Komplexe detektiert [172]. Dies könnte erklären, warum sich die klinische Effizienz von HDACi, die primär die gleichen HDACs hemmen, deutlich voneinander unterscheiden kann [25]. Wichtig ist auch, in welchem Umfang diverse HDACi zelluläre Acetylierungs-Muster verändern. Hierzu zeigten Schölz et al. 2015 durch Massenspektrometrie, dass viele HDACi die Acetylierung eines kleinen, spezifischen Anteils des Acetyloms (\emptyset 6,2 % von >8100 Acetylierungs-Stellen), inklusive Histone und Chromatin-assoziiierter Proteine, beeinflussen [221].

1.4.5 Charakterisierung der verwendeten Klasse I HDACi

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von elf verschiedenen HDACi auf UC-Zelllinien sowie urotheliale und nicht-urotheliale Kontrollzellen untersucht (siehe auch [34]). Als präferentiell HDAC1/2-selektive Inhibitoren dienten Romidepsin (**1**, FK228, zyklisches Peptid) [222], Givinostat (**2**, ITF2357, Hydroxamsäure) [223], Entinostat (**3**, MS-275, SNDX-275, Benzamid) [224] und Mocetinostat (**4**, MGCD0103, Benzamid) [225]. Der Inhibitor 4SC-202 (**5**, Benzamid) hemmt HDAC1-3 [226]. RGFP966 und BG45 (**6** und **7**, beides N-(o-Aminophenyl)-Carboxamide) sind HDAC3-selektiv [169-171]. Für die HDAC8-Inhibition wurden die HDACi compound 2, 5 und 6 (**8-10**, Hydroxamsäuren) verwendet [227]. SAHA (**11**, Vorinostat, Hydroxamsäure) diente als pan-HDACi [228, 229]. Die Strukturen und genauen Spezifitäten bzw. Eigenschaften dieser HDACi können Abb. 8 und Tab. 3 des Anhangs A entnommen werden. Im Folgenden werden die verwendeten HDACi Romidepsin und 4SC-202 beispielhaft charakterisiert.

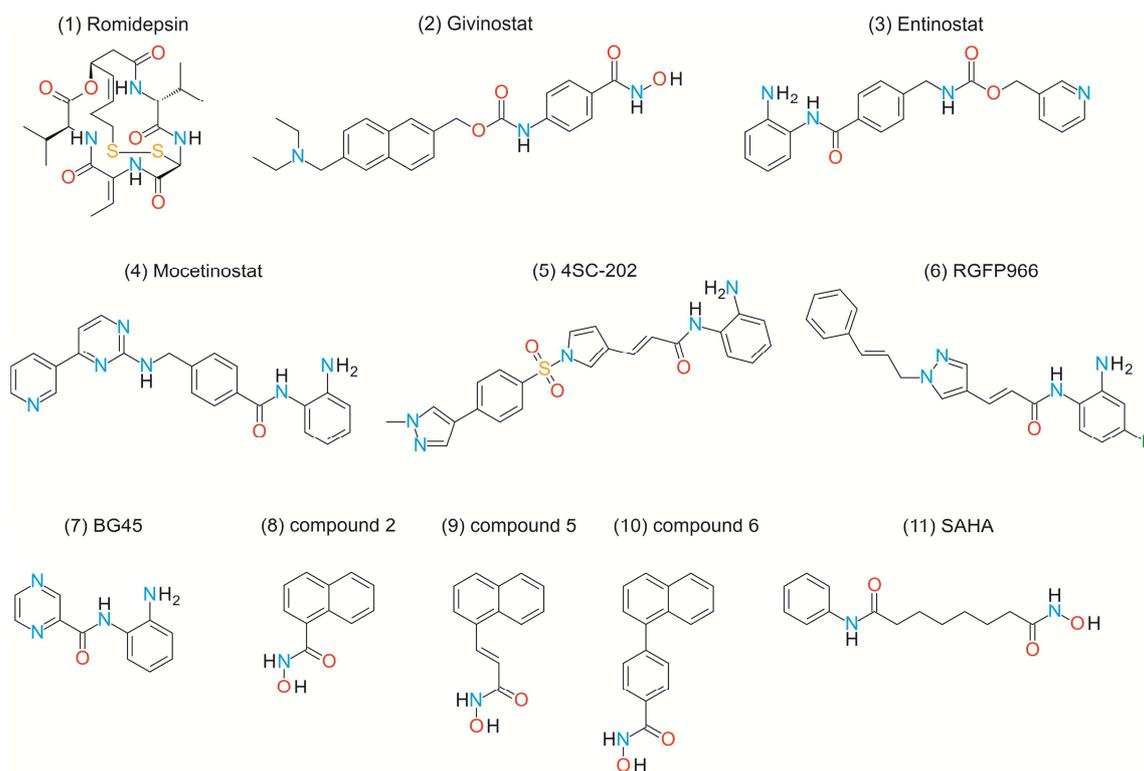


Abbildung 8: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten HDACi. Die Strukturen wurden mit dem Programm Accelrys Draw Academic (San Diego, USA) mit Vorlagen der Datenbank NCBI PubChem Compound (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) erstellt. Die Strukturen von compound 2, 5 und 6 stammen aus Krennhrubec et al. 2007 [227]. Siehe auch [34]. Die Farbgebung der Atome ist wie folgt definiert: H-Wasserstoff, O-Sauerstoff, N-Stickstoff, S-Schwefel und F-Fluor.

Romidepsin

Romidepsin ist ein bicyclisches Depsipeptid, welches initial aus *Chromobacterium violaceum* isoliert wurde [230, 231]. Es besitzt keine offensichtliche ZBG, sondern eine intramolekulare Disulfidbindung, die intrazellulär zu einer Zn^{2+} -koordinierenden funktionellen Sulfhydrylgruppe konvertiert wird [222] (beschrieben in [36, 58]). Damit ist Romidepsin ein Prodrug und ist *in vitro* hoch selektiv und potent gegen HDAC1 und 2 [222]. Zusätzlich vermittelt Romidepsin eine relativ starke Zn^{2+} -Koordinierung und verbindet somit starke inhibitorische Aktivität mit hoher Isoform-Selektivität [21]. Zudem zeigten kinetische BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*)-Analysen eine lange und stabile intrazelluläre Bindung von Romidepsin an HDAC1 und 2, im Vergleich zu anderen präferentiellen Klasse I HDACi, was vermutlich ebenfalls zur hohen Potenz dieses Inhibitors beiträgt [232].

Romidepsin gehört zu den am besten charakterisierten Klasse I HDACi. Präklinisch wurden viele antineoplastische Effekte in diversen Zellarten nachgewiesen, wie etwa Inhibition der Zellproliferation, ROS-Generierung, DNA-Replikationsstörungen, Induktion und Anreicherung von DNA-Schäden, Zellzyklusarrest, Apoptose, Inhibition der Tumorneovaskularisierung, Störung der HSP90-Chaperonfunktion und Degradation von Fusionsproteinen [169, 192, 233-240] (beschrieben in [22, 25]). Des Weiteren wurden bereits Synergien mit vielen anderen Substanzen, wie Fludarabin, Clofarabin, Busulfan, 5-Azacytidin, Bortezomib, Gemcitabin, Erlotinib, Flavopiridol, Paclitaxel, Cisplatin und Decitabin sowie Strahlentherapie beschrieben [241-245]. Zusätzlich dient Romidepsin zur Entwicklung neuer auf seiner Struktur basierender selektiver HDACi [246, 247].

4SC-202

4SC-202 ist ein neuer oral verfügbarer Klasse I HDACi mit einer hohen metabolischen Stabilität und einem guten pharmakologischen Sicherheitsprofil [226]. 4SC-202 zeigt starke antineoplastische Effekte in diversen Karzinomzellen und Xenograft-Tumormodellen [226]. Diese Effekte werden u.a. durch H3-Hyperacetylierung, G2/M-Zellzyklusarrest, Zelltod und durch eine Störung bei der Ausbildung von mitotischen Spindeln vermittelt [226]. Zusätzlich wurde *in vitro* eine erhöhte Immunogenität detektiert. Passend dazu zeigen *in vivo*-Studien eine stärkere Infiltration von Immunzellen in die Tumormikroumgebung^{3/4}. Die antineoplastische 4SC-202-Aktivität kann durch Kombination mit anderen Substanzen bzw. therapeutischen Antikörpern selektiv erhöht werden, z.B. mit Oxaliplatin, AKT-spezifischen Inhibitoren und mit anti-PD-1 (*programmed cell death 1*)-Antikörpern [203]³. Interessanterweise wird eine PD-1-Therapie auch als neue Behandlungsoption für das UC diskutiert und zeigt bereits vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien [248].

³ Daten wurden von 4SC beim „2016 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology“ (Chicago, USA) im Juni 2016 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

⁴ Daten wurden von 4SC bei der „3rd Immunotherapy of Cancer“-Konferenz (München, Deutschland) im März 2016 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

4SC-202 ist ein Benzamid-Typ HDACi mit einer langsamen ON-Kinetik, der HDAC1-3 und die Lysin-spezifische Demethylase LSD1 inhibiert [226, 249]⁵. Zusätzlich moduliert 4SC-202 die morphogenen Signalwege WNT (*wingless*) und Hedgehog⁶. Detaillierte präklinische Analysen von 4SC-202 liegen bislang für Zellen des Kolorektal-, Leberzell- und Pankreaskarzinoms sowie initial für Medulloblastom-Zellen vor [203, 250-252]. In allen Studien wurde eine starke 4SC-202-vermittelte Inhibition der Proliferation und/oder signifikante Induktion intrinsischer Apoptose beschrieben [203, 250-252]. Einige dieser Studien deuten darauf hin, dass 4SC-202 selektive antineoplastische Eigenschaften hat, da weder in normalen epithelialen Kolonzellen, noch in Hepatozyten signifikante anti-proliferative oder zytotoxische Effekte detektiert werden konnten [203, 250]. Außerdem zeigt ein Xenograft-Modell des Kolorektalkarzinoms starken 4SC-202-Respons ohne signifikante Toxizitäten für das Tier [203]. Zusätzlich fand bereits eine erste klinische Evaluation von 4SC-202 in einer Phase I Studie (TOPAS) für die Behandlung fortgeschrittener hämatologischer Krebserkrankungen statt [253]. Insgesamt wurde eine gute Verträglichkeit und Wirksamkeit von 4SC-202 mit einem objektiven Respons und Stabilisierung der Krankheit in 83 % der Patienten nachgewiesen [253]⁷.

⁵ Daten wurden von 4SC beim „6th Annual EpiCongress 2015“ (Boston, USA) im Juli 2015 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

⁶ Daten wurden von 4SC beim „MMC Cancer Stem Cell Symposium 2014“ (San Francisco, USA) im Februar 2014, beim „Keystone Symposium Stem Cells and Cancer 2014“ (Banff, Kanada) im Februar 2014 und bei der „AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics“ Konferenz (Boston, USA) im November 2015 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

⁷ Daten wurden von 4SC beim „2016 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology“ (Chicago, USA) im Juni 2016 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

1.5 Expression und Inhibition von HDACs im UC

In den meisten Publikationen zur Expression von HDACs und deren Inhibition im UC wird eine Überexpression von einzelnen oder mehreren Klasse I HDACs in UC-Tumorgewebe oder -Zelllinien auf RNA- und Proteinebene beschrieben [126, 254-258]. Klasse IIa HDACs scheinen in UC-Zelllinien eher herunter reguliert zu sein [255]. Dieser Befund muss jedoch noch weiter validiert werden, da eine andere Studie eine Überexpression von HDAC4 mit Hilfe von Immunhistochemie (IHC) von Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe zeigt [259] (siehe auch [34]).

Präklinische Untersuchungen in UC-Zelllinien und Tiermodellen mit verschiedenen HDACi (meist pan-HDACi) und mittels Modulation spezifischer HDACs deuten darauf hin, dass die Behandlung von UC mit HDACi durchaus erfolgreich sein kann. Es wurden u.a. Hemmung der Zellproliferation, Migration und Klonogenität, Zellzyklusarrest, p21-Induktion, Apoptose und verringertes Tumorstadium beobachtet [234, 254, 255, 258, 260-279]. Diese Effekte konnten durch Kombinationen mit weiteren Substanzen zusätzlich verstärkt werden [277, 280-291] (siehe auch [34]). In klinischen Studien mit pan-HDACi, wie SAHA oder Belinostat (als Monotherapie oder in Kombination mit weiteren antineoplastischen Agenzien), hat sich jedoch bislang nur ein geringer Responder bei vergleichsweise niedriger Tolerabilität gezeigt [34].

In Tab. 4 des Anhangs B ist eine Studienübersicht über HDACs und HDACi im UC dargestellt (A - Expression, B – Präklinische Untersuchungen, C – Präklinische Kombinationen und D – Klinische Studien). Durch die beobachtete Überexpression von Klasse I HDACs in Verbindung mit der vermeintlichen Repression von Klasse IIa HDACs stellt sich die Frage, ob durch den Einsatz von Klasse I selektiven HDACi, wie z.B. Romidepsin, Givinostat und 4SC-202, im Vergleich zu pan-HDACi ein stärkerer Effekt auf UC-Zellen erzielt werden kann und sich die Nebenwirkungen abschwächen lassen.

2 ZIELSETZUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Klasse I HDACs (HDAC1, 2, 3 und 8) im UC und den Fragen, welche Bedeutung Deregulationen ihrer Expression für das UC haben und ob eine zielgerichtete Inhibition dieser Enzyme ein sinnvoller therapeutischer Ansatz im UC ist. Die Beantwortung dieser Fragen sollte insbesondere ermöglichen, ein optimales HDAC-Wirksamkeitsspektrum im UC zu definieren. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob eine spezifische Inhibition einzelner oder mehrerer Klasse I Enzyme mit spezifischen HDACi Vorteile gegenüber der Behandlung mit unspezifischen pan-HDACi erbringen kann.

Um diesen Fragestellungen detailliert nachzugehen, wurde die Modulation der Klasse I HDAC-Aktivität sowohl über siRNA-vermitteltem Knockdown als auch über pharmakologische Inhibition mit verschiedenen Klasse I HDACi (compound 2, 5 und 6, Romidepsin, Givinostat, Entinostat, Mocetinostat, 4SC-202, RGFP966 und BG45) im Vergleich zum pan-HDACi SAHA durchgeführt. Um dabei dem heterogenen Spektrum urothelialer Karzinome gerecht zu werden, wurden nach der Modulation (einzelne spezifische Isoenzyme oder in Kombination) ausgewählte Parameter an bis zu sieben unterschiedlich differenzierten UC-Zelllinien (RT-112, 5637, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3 und T-24) untersucht. Nach siRNA-vermitteltem Knockdown spezifischer HDACs wurden zelluläre Parameter wie Viabilität, Klonogenität, Zellzyklus und Caspase-3/7-Aktivität bestimmt. Um zu analysieren, welche Effekte Klasse I HDACi auf die zellulären Eigenschaften von UC-Zelllinien haben, wurden folgende Parameter bestimmt: Viabilität, Klonogenität, Zellzyklus, Migrationsfähigkeit, Seneszenz, Caspase-3/7-Aktivität und LDH (*lactate dehydrogenase*)-Freisetzung. In beiden Ansätzen wurde die Expression von HDACs und Markern durch qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*), Western-Blot und IHC verfolgt. Durch die Verwendung von bis zu sieben unterschiedlichen UC-Zelllinien wurden die biologische Heterogenität des UC und die Variabilität der HDAC-Expression abgedeckt. Zur Kontrolle der Spezifität für Tumorzellen wurden zusätzlich ausgewählte Experimente in bis zu fünf verschiedenen Kontrollzellen durchgeführt: urotheliale HBLAK (*spontaneously immortalized normal human bladder cell line*) [292], TERT-NHUC (*hTERT-immortalised normal human urothelial cells*) und NUC (*normal urothelial control*) Zellen sowie nicht-urotheliale HEK-293 (*human embryonic kidney cell 293*) und VHF (Humane Vorhautfibroblasten) Zellen (siehe auch [34, 167]).

Im Speziellen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Stellt eine spezifische Modulation von HDAC8 eine therapeutische Option im UC dar? Neben einem siRNA-vermitteltem Knockdown von HDAC8 wurden zur Klärung dieser Fragestellung die drei verschiedenen HDAC8-spezifischen HDACi compound 2, 5 und 6 und der pan-HDACi SAHA verwendet (siehe Kap. 3).
2. Das zweite Teilprojekt beschäftigte sich mit der gezielten Inhibition von HDAC1 und 2 im UC. Einerseits sollte geklärt werden, ob eine kombinierte Inhibition dieser beiden Isoenzyme, im Vergleich zu einer Einzel-Inhibition, einen stärkeren antineoplastischen Effekt in UC-Zelllinien hat. Dieser Aspekt wurde durch einen siRNA-vermittelten Einzel- oder Doppelknockdown in fünf UC-Zelllinien untersucht. Andererseits wurde eruiert, ob eine kombinierte pharmakologische Inhibition von HDAC1 und 2 (Romidepsin, Givinostat, Entinostat, Mocetinostat) die therapeutische Effizienz im Vergleich zum pan-HDACi SAHA erhöhen kann. Um das Nebenwirkungsspektrum bei einer möglichen Therapie abschätzen zu können und zu untersuchen, ob ein therapeutisches Fenster erschlossen werden kann, wurden die Experimente zusätzlich in der urothelialen Kontrollzelllinie HBLAK und der nicht-urothelialen Kontrollzelllinie HEK-293 durchgeführt. Darüber hinaus wurden RNA-Expressionsanalysen, nach kombiniertem HDAC1/2-Knockdown und Behandlung mit Romidepsin, Givinostat oder SAHA, in den beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 durchgeführt (siehe Kap. 4).
3. Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Klasse I HDACi 4SC-202, dessen Wirkspektrum vor allem HDAC1, 2 und 3, aber auch LSD1 umfasst. Mittels 4SC-202 sollte untersucht werden, ob durch eine zusätzliche Inhibition von HDAC3 die antineoplastische Wirkung einer kombinierten Hemmung von HDAC1/2 erhöht wird und additive Effekte in UC-Zellen detektiert werden können. Zusätzlich sollte analysiert werden, welchen Einfluss die vermittelte LSD1-Inhibition auf die durch 4SC-202 induzierten Effekte hat. 4SC-202 wurde ebenfalls in urothelialen HBLAK und nicht-urothelialen HEK-293 Zellen getestet. Dies stellt die erste detaillierte Charakterisierung von 4SC-202 im UC dar (siehe Kap. 5).
4. Die letzte Fragestellung zielte auf eine siRNA-vermittelte und pharmakologische Inhibition (RGFP966, BG45) von HDAC3 ab. Dabei galt es herauszufinden, welche Bedeutung Veränderungen in der HDAC3-Expression für UC-Zelllinien haben und ob die Modulation von HDAC3 in UC-Zelllinien anders wirkt als die Inhibition der stark homologen Isoenzyme HDAC1 und 2 (siehe Kap. 6).

3 PUBLIKATION 1

3.1 Zusammenfassung und Diskussion

Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment

Autoren: Maria Lehmann¹ (jetzt Pinkerneil), Michèle J Hoffmann¹, Annemarie Koch¹, Scott M Ulrich², Wolfgang A Schulz¹, Günter Niegisch¹

Journal: Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2014, 33:59.

¹Urologisches Forschungslabor, Heinrich-Heine-Universität, Medizinische Fakultät, Düsseldorf

²Institut für Chemie, Ithaca College, Ithaca, NY 14850, USA

Finanzierung: Einzelförderung Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG NI 1398/1-1).

Dieses Kapitel fasst die Publikation Lehmann et al. 2014 [293] zusammen (siehe Kap. 3.2), die Bestandteil dieser kumulativen Dissertation ist. Klasse I HDACs sind in vielen verschiedenen Krebsentitäten mit der Entwicklung und Progression von Tumoren assoziiert. Im vorangegangenen Projekt des Urologischen Forschungslabors zur Untersuchung des HDAC-Expressionsprofils im UC wurde eine Deregulation von Klasse I HDACs beobachtet [255]. In dieser Studie wurden insgesamt 18 UC-Zelllinien (sechs papilläre und zehn invasive UC-Zelllinien sowie die Urotheldysplasie-Zelllinie MGH-U4 und die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie SCABER) im Vergleich zu sechs normalen uroepithelialen Kulturen sowie UC-Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe (24 UC-Tumorgewebe, zwölf Normalgewebe) untersucht [255] (siehe auch [34]). Für HDAC8 aus der Klasse I war sowohl im Zelllinien- als auch im Gewebeset eine Deregulation der mRNA beobachtet worden. Im verwendeten Gewebeset nimmt HDAC8 eine Sonderrolle ein, da nur diese Isoform der humanen HDAC-Familie signifikant überexprimiert vorliegt ($p = 0,002$) [255] (siehe auch Tab. 4A in Anh. B und [34]).

Die Expression von HDAC8 wurde bereits in einer Reihe von weiteren Tumorentitäten, darunter Kolon-, Lungen-, Mamma-, Prostata-, Leberzell- und Pankreaskarzinom sowie besonders aufwendig im Neuroblastom untersucht [114, 130, 131, 153]. Im Neuroblastom korreliert eine hohe HDAC8-Expression mit geringerem Überleben und schlechten prognostischen Markern [153]. Ein siRNA-vermittelter Knockdown der HDAC8-Expression oder Hemmung der HDAC8-Aktivität durch den spezifischen Inhibitor compound 2 führte in kultivierten Neuroblastom-Zellen zu einer Inhibition der Proliferation, vermindertem klonogenen Wachstum und Zelldifferenzierung [153]. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit einer HDAC8-Modulation in einzelnen weiteren Tumorentitäten erforscht. In T-Zell-Lymphom-Zelllinien führt eine HDAC8-spezifische Inhibition mit PCI-34051 zu einer selektiven Apoptose-Induktion [294]. In Leberzellkarzinom-Zelllinien kommt es nach spezifischem HDAC8-Knockdown zu einer verminderten Proliferation und erhöhter Apoptoserate [131].

Basierend auf der deutlichen Deregulation von HDAC8 im UC [255] und den vielversprechenden Ergebnissen im Neuroblastom [153] war das Ziel dieses Projektes zu analysieren, ob eine spezifische HDAC8-Modulation eine therapeutische Option im UC darstellen könnte [293]. Dazu haben wir zwei verschiedene Ansätze in fünf UC-Zelllinien mit unterschiedlichem Phänotyp und distinktem HDAC8-Expressionsprofil (RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3) verfolgt; einerseits einen siRNA-vermittelten Knockdown und andererseits eine spezifische pharmakologische Hemmung mit drei verschiedenen Inhibitoren und anschließender Untersuchung zellulärer Eigenschaften (Viabilität, Klonogenität, Zellzyklus und Migrationsfähigkeit). Bei den Inhibitoren handelt es sich um neu entwickelte HDAC8-spezifische Naphtho-Hydroxamsäuren (compound 2, 5 und 6), die von Prof. Dr. Ulrich (Ithaca College NY, USA) synthetisiert und initial charakterisiert wurden [227]. Die Expression von HDACs und Biomarkern wurde mittels qRT-PCR oder Western-Blot Analyse quantifiziert.

Eine effiziente Hemmung der endogenen HDAC8-Expression mit Hilfe einer spezifischen siRNA führte zu einer Zelltyp-abhängigen Verringerung der Proliferation (nach 72 Stunden Inkubationszeit um 20 bis 45 %) und einer Abnahme der klonogenen Wachstumsfähigkeit (um bis zu 30 %). Die drei verschiedenen HDAC8-Inhibitoren compound 2, 5 und 6 hemmten die Proliferation der UC-Zelllinien unterschiedlich stark. Die Inhibitoren compound 5 und 6 waren am wirksamsten, mit IC_{50} -Werten zwischen 9,1 und 10,8 μ M (nach 72 Stunden). Auffällig war, dass Zellen mit einem epithelialen

Phänotyp, wie RT-112, sensitiver auf die Inhibitoren reagierten als Zellen mit einem mesenchyalem Phänotyp, wie UM-UC-3. Im Vergleich dazu lag der IC_{50} -Wert von compound 2 für alle untersuchten Zelllinien bei über 50 μ M. Auch die Hemmung des klonogenen Wachstums war stark von Zelllinie und Substanz abhängig. Die stärksten Effekte wurden nach Behandlung mit compound 5 und 6 in den Zelllinien VM-CUB1, SW-1710 und UM-UC-3 beobachtet. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Parameter zur Untersuchung der pharmakologischen HDAC8-Inhibition in Form eines Wundheilungs-Assays hinzugezogen. Besonders für die Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 wurde eine starke Hemmung der Migration nach Behandlung mit compound 5 und 6 festgestellt.

Der Einfluss der HDAC8-Modulation auf die Zellzyklusverteilung wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. Ein siRNA-vermittelter HDAC8-Knockdown führte nur in einer von fünf Zelllinien zu einer signifikanten Verschiebung der Zellzyklusverteilung, die sich in einer Verringerung der S-Phasen-Fraktion äußerte. Im Gegensatz dazu führte die pharmakologische HDAC8-Inhibition mit compound 5 und 6 zu einer signifikanten Zunahme der subG1-Fraktion (zwei von fünf Zelllinien) und zu einer signifikanten Abnahme der G1-Fraktion (vier von fünf Zelllinien). Des Weiteren konnte in vier von fünf Zelllinien eine deutliche Zunahme der G2/M-Fraktion nach Behandlung mit compound 5 oder 6 beobachtet werden. Compound 2 löste keine signifikanten Zellzykluseffekte aus [293].

Um die durch die HDAC8-Modulation ausgelösten Effekte genauer zu untersuchen wurde die Expression bekannter nachgeschalteter Zielgene, wie des Proliferationsmarkers Thymidylat-Synthase (TS) oder p21, bestimmt. Zusätzlich wurde die Spaltung des Apoptosemarkers PARP1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*) und der Acetylierungsstatus von α -Tubulin analysiert, um die Spezifität der HDAC8-Inhibitoren zu validieren. Nach dem siRNA-vermittelten HDAC8-Knockdown und der pharmakologischen HDAC8-Inhibition veränderten sich TS und p21 unterschiedlich stark zwischen den verschiedenen Behandlungs-Optionen und Zelllinien. Eine auf Apoptose hindeutende PARP1-Spaltung war nur in einzelnen Ansätzen und Zelllinien nachweisbar. Die α -Tubulin Acetylierung, normalerweise vermittelt durch die Klasse Iib HDAC6, nahm nach HDAC8-Knockdown leicht zu und stark nach Behandlung mit compound 5 und 6 [293]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Inhibitoren weitere HDACs hemmen, besonders HDAC6 aus der Klasse Iib. Weiterhin wurde der

Acetylierungsstatus von Histon H3 und H4 nach HDAC8-Knockdown oder -Inhibition quantifiziert. Es wurden jedoch nur vereinzelte, leichte Veränderungen in der H4-Acetylierung und gar keine Veränderungen in der H3-Acetylierung nachgewiesen [293].

Um auszuschließen, dass es durch die gezielte HDAC8-Modulation zu einer Kompensation durch Gegenregulation der anderen Klasse I HDACs kommt, wurde zusätzlich die Expression von HDAC1, 2 und 3 bestimmt. Auf mRNA-Ebene konnten signifikante Deregulationen dieser Isoenzyme nachgewiesen werden. Speziell scheinen nach einem spezifischen HDAC8-Knockdown entweder HDAC1 oder HDAC2 mRNA herauf reguliert zu werden, allerdings in begrenztem Umfang. Nach pharmakologischer Inhibition und auf Proteinebene wurden dagegen einzelne Veränderungen, jedoch ohne erkennbares Muster, beobachtet. Insgesamt scheint es keine ausgeprägten gerichteten Kompensationsmechanismen nach einer spezifischen HDAC8-Modulation zu geben [293].

Obwohl die mRNA- und Protein-Expression von HDAC8 in vielen UC-Zelllinien dereguliert vorliegt, hat eine HDAC8-Modulation nur geringe signifikante Effekte auf die Zellproliferation, Klonogenität und Migration. Sie stellt daher keine geeignete therapeutische Option im UC dar [293]. Ob eine selektive HDAC8-Inhibition in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika oder weiteren spezifischen Substanzen synergistisch wirken kann, müsste in einer weiteren Studie untersucht werden. Außerdem wäre eine genauere Analyse möglicher weiterer Zielmoleküle der Inhibitoren compound 5 und 6 sinnvoll.

Name des Journals: Journal of Experimental & Clinical Cancer Research

Impact Factor: 4,429 (2014)

Eigener Anteil an der Arbeit: 60 %

Autorenschaft: Erstautor

3.2 PUBLIKATION 1

Lehmann M, Hoffmann MJ, Koch A, Ulrich SM, Schulz WA, Niegisch G

Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment.

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2014, 33:59.

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011684>

4 PUBLIKATION 2

4.1 Zusammenfassung und Diskussion

Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms

Autoren: Maria Pinkerneil¹ (geb. Lehmann), Michèle J Hoffmann¹, René Deenen², Karl Köhrer², Tanja Arent³, Wolfgang A Schulz¹, Günter Niegisch¹

Journal: Molecular Cancer Therapeutics 2016, 15:299-312.

¹Urologisches Forschungslabor, Heinrich-Heine-Universität, Medizinische Fakultät, Düsseldorf

²Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

³Institut für Rechtsmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Medizinische Fakultät, Düsseldorf

Finanzierung: Einzelförderung Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG NI 1398/1-1).

Dieses Kapitel fasst die Publikation Pinkerneil et al. 2016a [295] zusammen (siehe Kap. 4.2), die Bestandteil dieser kumulativen Dissertation ist. Die Klasse I HDACs 1 und 2 sind, neben ihrer Funktion als transkriptionelle Korepressoren, maßgeblich an der Regulation weiterer wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt, wie z.B. DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Mitose und Spleißen [22, 53, 60]. Mehrere unabhängige Untersuchungen haben nachgewiesen, dass HDAC1, HDAC2 und weitere Mitglieder der humanen Klasse I HDAC-Familie im UC häufig überexprimiert vorliegen [126, 254-256, 258] (siehe auch Tab. 4A in Anh. B und [34]). Von daher sollten sie gute Zielmoleküle für die Therapie des UC darstellen. Darüber hinaus sprechen diverse präklinische Studien für therapeutisches Potential von HDACi im UC (siehe Tab. 4B in Anh. B und [34]). Das Ziel dieser Untersuchung war daher die Validierung einer spezifischen Hemmung von HDAC1 und 2 für die Behandlung des UCs [295].

Um einen möglichst breiten Ansatz zu gewährleisten und die starke Heterogenität des UCs [1] abzudecken, wurden zur Untersuchung fünf verschiedene UC-Zelllinien mit unterschiedlichem HDAC1/2-Expressionsprofil und Phänotyp, von eindeutig epithelial zu mesenchymal, ausgewählt (RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3). Zusätzlich wurden vier benigne Zelllinien (HBLAK [292], TERT-NHUC, HEK-293 und VHF) in die Untersuchungen einbezogen.

Detaillierte Analysen wurden für die UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie die Kontrollzellen HBLAK [292] (urothelial) und HEK-293 (nicht-urothelial) durchgeführt. Die HDAC1- und HDAC2-Aktivität wurde durch zwei verschiedene experimentelle Ansätze moduliert. Einerseits durch einen siRNA-vermittelten Knockdown und andererseits durch spezifische pharmakologische Hemmung mit vier für HDAC1/2 oder Klasse I HDAC spezifischen Inhibitoren (Romidepsin [222], Givinostat [223], Entinostat [296] und Mocetinostat [225]) [295]. Der spezifische siRNA-vermittelte Knockdown erlaubte es, die Expression von HDAC1 oder 2 einzeln oder in Kombination zu modulieren. Für die anschließende Analyse der Auswirkungen auf die Zellen wurden verschiedene Methoden zur Untersuchung der Expression von HDACs und verschiedenen Markern (qRT-PCR, Western-Blot, Immunzytochemie) und der zellulären Eigenschaften (Viabilitäts-, Klonogenitäts-, Caspase-3/7-, Seneszenz- und LDH-Zytotoxizitäts-Assay, Durchflusszytometrie) angewendet. Zusätzlich wurden detaillierte RNA-Expressionsdaten nach siRNA-vermittelter oder pharmakologischer Modulation der HDAC1/2-Aktivität in VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen erhoben [295].

Ein spezifischer kombinierter Knockdown von HDAC1 und 2 inhibierte signifikant und Zelllinien-abhängig die Proliferation (nach 72 Stunden bis zu 80 %) und die Klonogenität aller UC-Zelllinien. Verschiedene Parameter deuteten außerdem auf die Induktion eines Apoptose-ähnlichen Zelltodes hin. Dazu gehören eine erhöhte subG1-Fraktion in den Zellzyklus-Messungen, eine Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität und die Spaltung der Apoptose-Marker PARP1 und Caspase-3. Nach spezifischen Einzelknockdowns von HDAC1 oder HDAC2 waren die Effekte auf die Zellen deutlich geringer; offenbar wegen einer starken, wechselseitigen, kompensatorischen Beeinflussung zwischen HDAC1 und 2, die sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erfolgte [295]. Dieser kompensatorische Mechanismus wurde bereits in präklinischen Studien an anderen Tumorentitäten und Zellsystemen beobachtet [108, 109, 160, 297-299] (beschrieben in [22, 41, 53]).

Aus diesem Grund wurden für den pharmakologischen Ansatz Klasse I HDACi ausgewählt, die beide Isoenzyme hemmen und möglichst wenig Wirkung auf die anderen humanen HDACs ausüben (siehe Tab. 3 in Anh. A). Romidepsin, Givinostat, Entinostat und Mocetinostat reduzierten die Proliferation der untersuchten UC-Zelllinien signifikant (IC_{50} 3,36 nM bis 4,59 μ M nach 72 Stunden).

Das effektivste Dosiswirkungsverhältnis in UC-Zelllinien lag bei den Inhibitoren Romidepsin (IC_{50} 3,36 bis 6,47 nM nach 72 Stunden) und Givinostat (IC_{50} 0,39 bis 0,63 μ M nach 72 Stunden) vor, die aus diesem Grund für weitere detaillierte Analysen ausgewählt wurden. Bei der Untersuchung der zellulären Eigenschaften von VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen nach Behandlung mit Romidepsin oder Givinostat wurden deutliche morphologische Veränderungen, starke Hemmung der Klonogenität und eine starke Deregulation des Zellzyklus detektiert, auch im Vergleich zu dem pan-HDACi SAHA. Diese Effekte waren in den nicht transformierten Kontrollzellen HBLAK und HEK-293 schwächer ausgeprägt. Speziell in den urothelialen Kontrollzellen HBLAK scheint ein zytostatischer Seneszenz-ähnlicher Zustand ausgelöst zu werden. Im Gegensatz zum siRNA-vermittelten Einzelknockdown löste die pharmakologische Inhibition von HDAC1 und 2 in UC-Zelllinien keine signifikanten Expressionsveränderungen von relevanten Klasse I HDACs aus [295].

Im weiteren Verlauf wurden zwei Fragestellungen vertieft: Zum einen wurde die auffällige Zellzyklus-Deregulation genauer untersucht, zum anderen der ausgelöste Zelltodmechanismus. Die durch Romidepsin und Givinostat induzierte Zellzyklus-Deregulation zeichnete sich nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden durch eine stark ausgeprägte G2/M-Fraktion (mit bis zu 75 % Zellanteil) aus. Mit fortschreitender Behandlungszeit (48 Stunden) entstand - Zelllinien-abhängig - meist ein Profil, das durch starke Unregelmäßigkeiten und daher nicht quantifizierbare Zellfraktionen gekennzeichnet war. Genauere Analysen der Zellzyklus-abhängigen Cyclin-Expression und der Zellkernmorphologie sowie aufwendige RNA-Expressionsstudien deuteten darauf hin, dass die HDACi Störungen in der Mitose und eine daraus resultierende verlängerte G2/M-Phase im ersten Zellzyklus induzieren [295]. Dazu trägt wahrscheinlich bei, dass viele UC-Zelllinien Störungen im G1/S-Kontrollpunkt aufweisen [300]. Im nächsten Zellzyklus kommt es daher vermutlich zu S-Phasen-Störungen und einen irreversiblen Arrest-ähnlichen Zustand, der schlussendlich in einem primär nicht-apoptotischen Zelltod resultiert, bei dem vermutlich sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse involviert sind [295].

Um eine genaue Charakterisierung der ausgelösten Prozesse und der molekularen Vorgänge nach kombiniertem HDAC1/2-Knockdown oder HDACi-Behandlung (Romidepsin, Givinostat, SAHA) zu erhalten, wurden umfassende Analysen der RNA-Expression über Microarrays in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 durchgeführt

[295] (GEO (*gene expression omnibus*) Identifikationsnummer: GSE74478, Details siehe Kap. 4.2). Insgesamt lagen in beiden Versuchsansätzen bemerkenswert viele Transkripte differentiell exprimiert vor. Beim siRNA-vermittelten HDAC1/2-Doppelknockdown konnten nach Benjamini-Hochberg FDR (*false discovery rate*) Adjustierung (p(corr)-Wert < 0,01) 3449 (VM-CUB1) bzw. 7036 (UM-UC-3) veränderte Transkripte identifiziert werden. Von diesen hatten beide Zelllinien 1417 Transkripte gemeinsam. Nach HDACi-Behandlung wurden in VM-CUB1 Zellen 6020 (Romidepsin), 4995 (Givinostat) bzw. 2233 (SAHA) differentielle Transkripte nach Bonferroni FWER (*familywise error rate*) Adjustierung (p(corr)-Wert < 0,05) identifiziert. In UM-UC-3 Zellen waren unter den gleichen Bedingungen 3780 (Romidepsin), 3383 (Givinostat) bzw. 1642 (SAHA) Transkripte in ihrer Expression verändert. Die Inhibitoren Romidepsin und Givinostat hatten insgesamt 4211 (VM-CUB1) bzw. 1962 (UM-UC-3) Transkripte gemeinsam, von denen ein großer Teil (VM-CUB1 2551; UM-UC-3 1106) ausschließlich nach Behandlung mit Romidepsin und Givinostat, nicht aber mit SAHA, differentiell exprimiert vorlag [295]. Zur Charakterisierung der ausgelösten Prozesse und der molekularen Vorgänge wurden GO (*Gene Ontology*)-Datenbankanalysen mittels DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*)-Software und verschiedenen Vergleichen durchgeführt. Zu den Analysen gehörte z.B. ein Vergleich der differentiell exprimierten Gene zwischen den beiden Zelllinien und verschiedenen HDACi-Kombinationen oder dem HDAC1/2-Doppelknockdown. Zusätzlich wurden diejenigen Transkripte (167) analysiert, die beiden Zelllinien, sowohl nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung als auch nach HDAC1/2-Doppelknockdown, gemeinsam waren [295].

Die Datenbankanalyse ergab, dass diejenigen Gene, die durch Romidepsin und Givinostat in beiden Zelllinien signifikant verändert waren, insbesondere an der Regulation folgender Prozesse beteiligt sind: Zellzyklus (oft mitotische Prozesse, CDK-Aktivität), Replikation, Chromosomenorganisation, Antwort auf DNA-Schäden, Zellproliferation und metabolische Prozesse. Diese Ergebnisse passen zu den auffälligen Zellzyklus-Deregulationen, die nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung in beiden Zelllinien ausgelöst werden [295]. Betrachtet man diejenigen Gene, die nach Behandlung mit allen drei Inhibitoren einheitlich differentiell exprimiert vorlagen, werden Unterschiede zwischen VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen deutlich. Während bei VM-CUB1 Zellen ähnliche Prozesse wie durch Behandlung mit Romidepsin oder Givinostat allein reguliert werden (Zellzyklus, Mitose, Replikation, Antwort auf DNA-

Schäden, Zellproliferation und metabolische Prozesse), zeigen UM-UC-3 Zellen auffällige Veränderungen in Prozessen, die mit endogenen chemischen Signalen, verschiedenen metabolischen Prozessen und Zellproliferation assoziiert sind [295]. Im Vergleich dazu zeigt die GO-Datenbankanalyse, dass diejenigen Gene, die signifikant durch einen HDAC1/2-Doppelknockdown verändert sind, in VM-CUB1 Zellen vorwiegend an der Regulation von Zelltodmechanismen (apoptotische und anti-apoptotische Prozesse, programmierter Zelltod), jedoch auch an Angiogenese, Entwicklungsprozessen und Zellbewegung beteiligt sind. In UM-UC-3 Zellen dominieren wiederum Metabolismus-assoziierte Prozesse. Zusätzlich kommen Antwort auf DNA-Schäden, Zelltodmechanismen und Zellzyklus-Regulation hinzu [295]. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, scheint der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Arten der HDAC1/2-Modulation in VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen die Regulation von Zellzyklus- und Zelltodmechanismen zu sein. Nach HDACi-Behandlung liegen überwiegend Zellzyklus-assoziierte Transkripte differentiell exprimiert vor, wohingegen nach HDAC1/2-Doppelknockdown vor allem Expressionsveränderungen in Transkripten detektiert werden, die an der Regulation von Zelltodmechanismen beteiligt sind. Eine zusätzliche Analyse der 167 gemeinsam veränderten Transkripte (Romidepsin, Givinostat und HDAC1/2-Doppelknockdown in VM-CUB1 und UM-UC-3) ergab, dass in beiden Wegen Transkripte beeinflusst werden, die mit Zellzyklus (Arrest, Mitose), Zellproliferation, Immunantwort und der Regulation von Zelltodmechanismen assoziiert sind. Auffällige Transkripte in dieser Gruppe sind p21, ein etablierter Marker der HDAC-Inhibition in verschiedenen Entitäten, und das Gen *CTGF* (*connective tissue growth factor*), welche in beiden Zelllinien auffällig stark induziert waren [295].

Insgesamt lässt sich aus diesen Experimenten der Schluss ziehen, dass eine kombinierte Inhibition der HDAC1- und HDAC2-Aktivität eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für das UC darstellt. Während der Doppelknockdown in einem überwiegend apoptotischen Zelltod resultiert, führt die Inhibition mit Romidepsin oder Givinostat zu einer gestörten Zellzyklus-Progression mit irreversiblen Arrest und einer Mischform aus apoptotischem und nekrotischem Zelltod. Hervorzuheben ist, dass die Kontrollzellen, im speziellen die urotheliale HBLAK, eher einen zytostatischen Arrest entwickeln, jedoch ihre Fähigkeit zur Langzeit-Proliferation beibehalten. Dies könnte ein therapeutisches Fenster für die UC-Behandlung mit Klasse I HDACi erschließen [295].

Name des Journals: Molecular Cancer Therapeutics

Impact Factor: 5,683 (2015)

Eigener Anteil an der Arbeit: 70 %

Autorenschaft: Erstautor

4.2 PUBLIKATION 2

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Köhrer K, Arent T, Schulz WA, Niegisch G

Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms.

Molecular Cancer Therapeutics 2016, 15:299-312.

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772204>

5 PUBLIKATION 3

5.1 Zusammenfassung und Diskussion

Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines

Autoren: Maria Pinkerneil¹ (geb. Lehmann), Michèle J Hoffmann¹, Hella Kohlhof², Wolfgang A Schulz¹, Günter Niegisch¹

Journal: Targeted Oncology 2016, 11:783-798.

¹Urologisches Forschungslabor, Heinrich-Heine-Universität, Medizinische Fakultät, Düsseldorf

²4SC AG, Martinsried

Finanzierung: Einzelförderung Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG NI 1398/1-1); Bereitstellung des HDAC-Inhibitors 4SC-202 und Übernahme der Publikationskosten durch die 4SC AG (Martinsried).

Dieses Kapitel fasst die Publikation Pinkerneil et al. 2016b [301] zusammen (siehe Kap. 5.2), die Bestandteil dieser kumulativen Dissertation ist. 4SC-202 ist ein neuer niedermolekularer und oral verfügbarer Klasse I HDACi aus der Stoffklasse der Benzamide. Das Wirkspektrum von 4SC-202 umfasst HDAC1, 2 und 3 und zeigt im Vergleich zu anderen Klasse I HDACi eine langsame ON-Kinetik. Neben der Inhibition dieser HDAC-Isoenzyme wird durch 4SC-202 die Lysin-spezifische Demethylase LSD1 in einem klinisch relevanten Umfang gehemmt⁸. Präklinische Studien haben ergeben, dass 4SC-202 in einer großen Anzahl von Karzinom-Zelllinien und Xenograft-Tumormodellen für verschiedene Krebsentitäten eine erhebliche antineoplastische Wirkung zeigt [226]. Des Weiteren gibt es zwei kürzlich erschienene detaillierte Studien, die sich mit dem Einsatz von 4SC-202 für die Behandlung des Kolorektal- und Leberzellkarzinoms beschäftigen [203, 250]. Darüber hinaus wurde bereits eine klinische Phase I Studie (TOPAS) für die Behandlung fortgeschrittener hämatologischer Krebserkrankungen mit 4SC-202 durchgeführt [253].

⁸ Daten wurden von 4SC beim „6th Annual EpiCongress 2015“ (Boston, USA) im Juli 2015 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

Klasse I HDACs liegen im UC häufig überexprimiert vor [126, 254-256, 258] (siehe Tab. 4A in Anh. B und [34]). Die vorangegangene Untersuchung Pinkerneil et al. 2016a [295] ergab zudem, dass eine gemeinsame pharmakologische Inhibition von HDAC1/2 eine gute therapeutische Option im UC bietet. Daher war das Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob durch eine zusätzliche Inhibition von HDAC3 mit 4SC-202 ein verstärkter Effekt in UC-Zelllinien erzielt werden kann (siehe auch [34]). Gleichzeitig sollte analysiert werden welchen Einfluss die durch 4SC-202 vermittelte zusätzliche LSD1-Inhibition auf die induzierten Effekte hat. Außerdem ist dies die erste detaillierte Charakterisierung der Wirkung des spezifischen HDACi 4SC-202 für das UC und eine der wenigen außerhalb der firmeninternen Forschung.

Um das therapeutische Potential von 4SC-202 zu bestimmen, wurden die sieben UC-Zelllinien RT-112, 5637, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3 und T-24 mit unterschiedlichem Klasse I HDAC-Expressionsprofil verwendet [255, 295]. Durch diese Auswahl der Zelllinien war einerseits eine Vergleichbarkeit mit den zuvor durchgeführten Studien [293, 295] gewährleistet. Andererseits decken diese Zelllinien durch ihren unterschiedlichen Phänotyp, von stark epithelial zu stark mesenchymal, auch die ausgeprägte Heterogenität des UCs ab [1]. Als Kontrollzellen dienten HBLAK (urothelial) [292], TERT-NHUC (urothelial) und HEK-293 (nicht-urothelial). Detaillierte Untersuchungen wurden für die UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und die Kontrollzellen HBLAK und HEK-293 durchgeführt. Nach der Bestimmung der IC_{50} -Werte von 4SC-202 mittels MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay wurden spezifische zelluläre Prozesse nach Behandlung mit zwei definierten 4SC-202-Konzentrationen untersucht. Dazu wurden Viabilitäts-, Klonogenitäts-, Caspase-3/7-, Seneszenz- und LDH-Zytotoxizitäts-Assays sowie Durchflusszytometrie durchgeführt. Zusätzlich wurden verschiedene Methoden zur Expressionsanalyse von HDACs und typischen Markern für die zelluläre Reaktion auf HDACi angewendet (qRT-PCR, Western-Blot, Immunzytochemie). Die urotheliale Kontrollzelle HBLAK [292] wurde zur Analyse der antineoplastischen Wirkung von 4SC-202 auf nichtproliferative Konfluenz-arretierte oder differenzierte Zellen mittels MTT-Assay genutzt. Dazu wurden die Zellen nach einem publizierten Protokoll durch die Behandlung mit $CaCl_2$ und FCS (*fetal calf serum*) differenziert [302].

Um zu untersuchen inwieweit die durch 4SC-202 vermittelte Inhibition von LSD1 zur Wirkung des Inhibitors in UC-Zellen beiträgt, wurden zusätzliche Kombinationsexperimente mit dem LSD1-Inhibitor SP2509 durchgeführt. Dabei fand ein direkter Vergleich der Wirkung von 4SC-202 gegen eine Klasse I HDACi oder den LSD1-Inhibitor, allein oder in Kombination, statt (Romidepsin, SP2509, Romidepsin/SP2509 und SAHA). Als zelluläre Parameter für die Untersuchung der LSD1-Inhibition dienten Viabilität, Klonogenität, Zellzyklus und Morphologie der UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3. Diese Experimente sind vor allem deswegen interessant, weil für Glioblastom-, Mammakarzinom- und AML (Akute myeloische Leukämie)-Zellen bereits synergistische Effekte zwischen einer kombinierten HDAC- und LSD1-Inhibition nachgewiesen wurden [303-306].

4SC-202 verminderte die Proliferation aller untersuchten UC-Zelllinien signifikant, unabhängig von ihrem Klasse I HDAC-Expressionsprofil, mit IC_{50} -Werten von 0,15 bis 0,51 μ M nach 72 Stunden Behandlung. In den Kontrollzellen HBLAK, TERT-NHUC und HEK-293 lagen die IC_{50} -Werte bei 0,38, 0,27 und 0,20 μ M 4SC-202. Nichtproliferative Konfluenz-arretierte oder differenzierte HBLAK Zellen zeigten im Vergleich zu proliferierenden undifferenzierten Zellen eine deutlich niedrigere Sensitivität gegenüber 4SC-202. Zwischen Konfluenz-arretierten und differenzierten HBLAK Zellen wurden jedoch insgesamt nur sehr geringe Unterschiede bezüglich der Inhibition der Viabilität durch 4SC-202 gemessen [301].

Nach Behandlung mit zwei definierten 4SC-202-Konzentrationen (0,5 und 2,5 μ M für 24 und 48 Stunden) kam es in UC-Zellen zu deutlichen morphologischen Veränderungen und einer Konzentrations-abhängigen starken Inhibition des klonogenen Wachstums [301]. Wie bereits für die Inhibitoren Romidepsin und Givinostat beschrieben [295], scheint nach Behandlung mit der niedrigeren 4SC-202-Konzentration (0,5 μ M) in den urothelialen Kontrollzellen HBLAK ebenfalls ein zytostatischer Seneszenz-ähnlicher Zustand induziert zu werden. Bei einer Behandlung der HBLAK Zellen mit der höheren Konzentration von 4SC-202 (2,5 μ M) und in HEK-293 Zellen (0,5 und 2,5 μ M 4SC-202) tritt dagegen ein Phänotyp mit apoptotischen Merkmalen auf, der mit einer starken Inhibition der Klonogenität einhergeht [301].

Im weiteren Verlauf der Studie wurden Experimente zur Untersuchung des durch 4SC-202-induzierten Zelltodmechanismus durchgeführt. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Identifizierung und Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Prozessen. In allen Zelllinien wurde eine signifikante Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität nachgewiesen, besonders nach der Behandlung mit der höheren 4SC-202-Konzentration (2,5 μM). Hervorzuheben ist, dass bei den urothelialen Kontrollzellen HBLAK nur ein transienter Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität nach 24 Stunden beobachtet wurde, der sich nach 48 Stunden normalisierte. Weitere Hinweise für apoptotische Prozesse stellen die deutliche Erhöhung der PARP1-Spaltung und eine erhöhte Fraktion von proapoptotischen Zellen in den durchflusszytometrischen Messungen der Annexin/PI (Propidiumiodid)-Färbungen dar [301]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass es sich bei dem durch 4SC-202-induzierten Zelltodmechanismus ebenfalls um eine Mischform von apoptotischen und nekrotischen Prozessen handelt. Dazu gehört eine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung in UM-UC-3 Zellen und eine leichte Erhöhung der nekrotischen Fraktion in den Annexin/PI-basierten durchflusszytometrischen Messungen [301].

Zur genaueren Charakterisierung der Zelltod-induzierenden Prozesse wurden zusätzlich Zellzyklus-Analysen nach 4SC-202-Behandlung durchgeführt. Das durch 4SC-202 induzierte Zellzyklusprofil zeichnet sich durch eine ausgeprägte G2/M-Fraktion (bis zu 85 %) aus. Ein klar definierter Anstieg der G2/M-Fraktion tritt vor allem in den UC-Zelllinien nach 24-stündiger Behandlung mit 2,5 μM 4SC-202 auf. Das Zellzyklusprofil der urothelialen HBLAK-Kontrollzellen unterscheidet sich mit einer erhöhten subG1-Fraktion deutlich von dem Profil der UC-Zelllinien. Nach 48-stündiger Behandlung entsteht speziell bei der höheren 4SC-202-Konzentration in UC-Zelllinien ein unregelmäßiges „gezacktes“ Profil, das keine Zuordnung zu einzelnen Zellzyklus-Phasen und somit keine Quantifizierung mehr zulässt [301]. Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene ist ein gestörter und verlängerter Durchlauf der Mitose, der zu einer unregelmäßigen Verteilung der DNA an die Tochterzellen und schlussendlich zu einem apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führt. Dies konnte auch durch die Untersuchung der Zellkernmorphologie mit einem erhöhten Anteil von irregulären Mitosen und stark fragmentierten Zellkernen mit vielen Mikronuklei bestätigt werden. In der Summe stellen die vielfältigen, durch 4SC-202-induzierten Veränderungen einen zellulären Phänotyp dar, der auf einen Prozess der mitotischen Katastrophe mit sekundärer Apoptose oder Nekrose hinweist [301].

Des Weiteren wurde in dieser Studie untersucht, ob die zusätzliche Inhibition von LSD1 durch 4SC-202 an dessen antineoplastischen Wirkung in UC-Zellen beteiligt sein könnte. Eine alleinige Inhibition der LSD1-Aktivität durch den Inhibitor SP2509 (VM-CUB1 0,75 μ M, UM-UC-3 0,5 μ M)⁹ hatte im Vergleich zur Behandlung mit dem Klasse I HDACi Romidepsin nur schwache Effekte auf Klonogenität und Zellzyklusverteilung der UC-Zellen. Die kombinierte SP2509- und Romidepsin-Behandlung führte hingegen in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Beeinflussung der Viabilität und Klonogenität und stärkeren Zellzyklusstörungen im Vergleich zur Hemmung von Klasse I HDACs oder LSD1 allein [301]. Die durch die Kombination induzierten Effekte auf Viabilität und Klonogenität der UC-Zellen haben eine starke Ähnlichkeit mit denen, die durch 2,5 μ M 4SC-202 auftreten. Demgegenüber steht, dass sich die induzierten Zellzyklusstörungen und die morphologischen Zellveränderungen nach einer 4SC-202-Behandlung oder einer kombinierten LSD1/HDAC-Inhibition durch SP2509 und Romidepsin deutlich voneinander unterscheiden. Insgesamt scheint die zusätzliche LSD1-Inhibition die Wirkung des Klasse I HDACi Romidepsin zu beschleunigen [301], diese kombinierte Behandlung im UC sollte jedoch noch genauer untersucht werden.

In dieser präklinischen Untersuchung wurde nachgewiesen, dass 4SC-202 signifikante antineoplastische Effekte auf UC-Zelllinien hat. Diese sind durch erhebliche Interferenz mit dem Zellzyklus und einer kombinierten Induktion eines apoptotischen und nekrotischen Zelltods charakterisiert. Hieraus ergibt sich, dass neben der kombinierten Inhibition von HDAC1 und 2 eine zusätzliche Inhibition von HDAC3 in UC-Zellen sinnvoll erscheint und dass die kombinierte pharmakologische Inhibition durch 4SC-202 eine gute Behandlungsoption für das UC darstellt. Gleichzeitig gibt diese Studie Hinweise darauf, dass die zusätzliche Inhibition der Lysin-spezifischen Demethylase LSD1 zur antineoplastischen Wirkung von 4SC-202 in UC-Zellen beitragen könnte [301]. Insgesamt ist es allerdings fraglich, ob die Behandlung mit 4SC-202 eine ähnliche Spezifität gegenüber UC-Zelllinien im Vergleich zu Kontrollzellen ergibt wie die Behandlung mit den Klasse I HDACi Romidepsin und Givinostat [295].

⁹ Für die Behandlung der UC-Zellen mit SP2509 wurden Konzentrationen gewählt, die den IC₅₀-Werten der jeweiligen Zelllinie entsprechen (erhoben durch Hoffmann et al., nicht publiziert).

Name des Journals: Targeted Oncology

Impact Factor: 3,197 (2015/2016)

Eigener Anteil an der Arbeit: 70 %

Autorenschaft: Erstautor

5.2 PUBLIKATION 3

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Kohlhof H, Schulz WA, Niegisch G

Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines.

Targeted Oncology 2016, 11:783-798.

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250763>

6 ZUSATZKAPITEL HDAC3

6.1 Funktion und Expression von HDAC3 im UC

HDAC3 stellt ein attraktives Ziel für eine antineoplastische Therapie dar. Zum einen liegt HDAC3 in vielen soliden Tumoren häufig im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert vor [38]. Dies konnte z.B. durch eine Analyse von Microarray-Datensätzen von verschiedenen humanen soliden Karzinomen nachgewiesen werden [129]. Bei dieser Analyse gehörte HDAC3 zu den am häufigsten deregulierten Faktoren in allen untersuchten Entitäten einschließlich des UC [129]. Zusätzlich wurde eine aberrante subzelluläre Lokalisation von HDAC3 in verschiedenen Tumorentitäten detektiert [307, 308]. Zum anderen wurden für HDAC3 bislang viele antineoplastische Effekte auf diverse Karzinom-Zelllinien nachgewiesen. In hochmalignen Gliomzellen hemmt die Inhibition von HDAC3 z.B. die Proliferation, Sphärenbildung und Migration und induziert G0/G1-Zellzyklusarrest-vermittelte Apoptose [152]. In Mammakarzinom-Zelllinien wurde nachgewiesen, dass eine siRNA-vermittelte oder pharmakologische HDAC3-Inhibition die Expression, Acetylierung und nukleäre Translokation von Survivin modulieren und somit Autophagie induzieren kann [309].

Diese Effekte werden u.a. durch die Transkriptions-regulierende Wirkung von HDAC3 vermittelt; denn es konnte in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden, dass eine Modulation von HDAC3 die Transkription zahlreicher Gene beeinflusst [307]. Eine Microarray-Analyse von HDAC3-shRNA (*short hairpin RNA*)-transfizierten Kolonkarzinom-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zeigt, dass ein hoher Anteil von Genen (26,8 %, davon 18,2 % herauf- und 8,6 % herunter reguliert) nach der HDAC3-Modulation differentiell exprimiert (wenigstens fünffach) vorliegt [310, 311]. Zusätzlich beeinflusst HDAC3 verschiedene nicht-transkriptionelle Prozesse wie Replikation, DNA-Reparatur, Mitose, genomische Stabilität und die Stabilität Zellzyklus-regulierender Proteine [53, 127, 161, 169, 180, 236, 312-315]. Ein prominentes Beispiel ist, dass HDAC3 während der Mitose Histon H3 deacetyliert und somit ein Erkennungssignal für die Phosphorylierung von Histon H3 Serin 10 (H3S10) durch die Kinase Aurora B schafft [41, 53, 307, 313, 314]. HDAC3 bildet mit den Proteinen AKAP95 (*A-kinase anchor protein 95*) und HA95 (*homologous to AKAP95*) einen Komplex und wird zusammen mit diesen zu mitotischen Chromosomen rekrutiert [314]. Dort induziert HDAC3 eine Hypoacetylierung von H3-Histonen. Die hypoacetylierten

H3-Reste werden während der Mitose durch die Aurora B Kinase an H3S10 phosphoryliert [314]. Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für eine ordnungsgemäße Chromosomenkondensation und -segregation [316-318] (Mechanismus beschrieben in [41, 53, 307, 313]). Des Weiteren wurde auch eine von der Deacetylaseaktivität unabhängige nicht-transkriptionelle Funktion von HDAC3 als molekulares Chaperon-Protein beschrieben [319].

Verschiedene weitere Studien deuten darauf hin, dass HDAC3 im UC überexprimiert vorliegt. Diese Untersuchungen stützen sich auf IHC, qRT-PCR und Western-Blots an UC-Tumorgewebe [256, 258] (siehe Tab. 4A in Anh. B und [34]). Diese Daten sind jedoch nicht unstrittig, da andere Studien eher eine heterogene Expression zeigen [255], und sollten daher durch weitere Analysen, die auch eine Spezifitätskontrolle von HDAC3-Antikörpern beinhalten, validiert werden [34]. Zusätzlich wurde bereits ein antineoplastischer Effekt eines HDAC3-Knockdowns in der UC-Zelllinie 5637 detektiert [258]. Aufgrund der Tatsache, dass die spezifischen HDAC3-Inhibitoren RGFP966 [169, 170] und BG45 [171] verfügbar wurden und im CTCL und im multiplen Myelom initial präklinisch charakterisiert sind, erschien eine genauere Untersuchung von HDAC3 im UC sinnvoll. Des Weiteren liegen für den HDAC3-Inhibitor RGFP966 interessante präklinische Studien für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen vor, bei denen HDAC3 eine wichtige Funktion zu haben scheint [320, 321]. Um die Untersuchung der Klasse I HDACs in dieser Arbeit zu vervollständigen und die Ergebnisse mit denen der anderen Isoenzyme vergleichen zu können, wurden für die Charakterisierung von HDAC3 die fünf UC-Zelllinien (RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V, UM-UC-3) und die beiden Kontrollzelllinien HBLAK (urothelial) und HEK-293 (nicht-urothelial) ausgewählt (siehe auch [34]).

6.2 Material und Methoden zur Untersuchung von HDAC3

Die für die Charakterisierung von HDAC3 verwendeten Materialien und Methoden können aus den publizierten Manuskripten Lehmann et al. 2014, Pinkerneil et al. 2016a und Pinkerneil et al. 2016b [293, 295, 301] entnommen werden, die Bestandteile dieser Dissertation sind. Dieses Kapitel basiert mit leichten Überarbeitungen auf den Methodenteilen dieser Publikationen. Die HDAC3-projektspezifischen Informationen sind ausführlicher dargestellt. Zusätzlich kann eine detailliertere Beschreibung der verwendeten Methoden einem Methoden-Buchkapitel entnommen werden [167].

SiRNA-vermittelte und pharmakologische HDAC3-Inhibition

Die Modulation von HDAC3 fand entweder über siRNA-vermittelten Knockdown (72 Stunden) oder über pharmakologische Inhibition mit den HDACi RGFP966 (S7229, Selleck Chemicals, München, Deutschland) und BG45 (SML0867, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) statt. Für den Knockdown wurden zwei verschiedene HDAC3-spezifische siRNAs (#4390824, HDAC3a: s16876, HDAC3b: s16877) und eine Kontroll-siRNA (#4390846, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wie zuvor beschrieben in einer Konzentration von 10 nM mit Lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) transfiziert [293, 295]. Der Knockdown wurde in den Zelllinien RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V und UM-UC-3 durchgeführt. Die Bestimmung der Dosiswirkung der HDAC3-spezifischen Inhibitoren RGFP966 und BG45 fand in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 (72 Stunden) statt. Als Kontrollzellen dienten die Zelllinien HBLAK (urothelial) [292] und HEK-293 (nicht-urothelial). Für die Histonextraktion wurden die Zellen VM-CUB1 und UM-UC-3 alternativ zur pharmakologischen HDAC3-Inhibition (25 μ M RGFP966 oder 25 μ M BG45) wie zuvor beschrieben mit dem pan-HDACi SAHA (2,5 μ M) behandelt [293, 295, 301].

RNA-Präparation, cDNA-Synthese und qRT-PCR

Zur Präparation der RNA und Synthese von cDNA wurden die Kits RNeasy Mini Kit und QuantiTect Reverse Transcription Kit (beide Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde die Inkubationszeit bei 42°C auf 30 Minuten verlängert [293, 295, 301]. Die qRT-PCRs erfolgten mittels HDAC QuantiTect Primer assays (HDAC1: QT00015239; HDAC2: QT00001890; HDAC3: QT00093730, $T_{\text{Annealing}}$ 55°C) und einem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (alles Qiagen, Hilden, Deutschland) an einem ABI 7500 FAST PCR Instrument (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland).

Zur Normierung der HDAC-Expressionen wurde das ubiquitär exprimierte Gen *TBP* (*TATA box binding protein*) gemessen [293, 295, 301] (TBP-Primer: Fwd ACAACAGCCTGCCACCTTA, Rev GAATAGGCTGTGGGTCAGT, $T_{\text{Annealing}}$ 55°C).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot Analysen

Gesamtzellextrakte wurden durch 30-minütige Inkubation in RIPA (*radioimmuno-precipitation assay*)-Puffer hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde über einen BCA (*Bicinchoninic acid*)-Protein Assay ermittelt (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Zur Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt und die aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot auf eine Polyvinylid-influorid-Membran (Merck Millipore, Berlin, Deutschland) übertragen [293, 295, 301]. Daraufhin wurde die Membran blockiert und für 1 Stunde oder über Nacht mit primären Antikörper gegen HDAC1 (HDAC1 C-19, sc-6298 Santa Cruz, Dallas, USA), HDAC2 (HDAC2 H-54, sc-7899, Santa Cruz, Dallas, USA), HDAC3 (HDAC3 H-99, sc-11417, Santa Cruz, Dallas, USA), p21 (P21 Sx118, 556430 BD Biosciences, New Jersey, USA), cl. PARP1 (Cleaved PARP Asp214, 9541, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), α -Tubulin (ab4074, Abcam, Cambridge, UK) oder GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, ab8245, Abcam, Cambridge, UK) behandelt [295]. Nach der Inkubation mit sekundärem Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper wurden die entstandenen Signale mit einem WesternBright Quantum Kit (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) oder Super SignalTM West Femto (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) detektiert [295, 301].

Bestimmung der Viabilität und Caspase-3/7-Aktivität

Nach siRNA-vermitteltem HDAC3-Knockdown wurde die Viabilität der Zellen (RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V und UM-UC-3), wie zuvor beschrieben [293, 295, 301], durch den CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit zwei verschiedenen siRNAs spezifisch für HDAC3 transfiziert und nach einer 72-stündigen Inkubationszeit vermessen. Nach HDACi-Behandlung wurde ein MTT-Assay (M2128-G, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen mit definierten Konzentrationen der Inhibitoren für 72 Stunden behandelt. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde 72 Stunden nach siRNA-Transfektion in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 mit einem Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt und auf die Viabilität der Zellen normiert [295].

Klonogenitätsassay

Zur Bestimmung der Klonogenität nach siRNA-vermitteltem HDAC3-Knockdown in den Zelllinien RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V und UM-UC-3 wurden nach 72 Stunden Inkubation 1000 bis 1500 Zellen in 6 cm-Kulturschalen überführt und für 10 bis 15 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Kolonien mittels Giemsaareagenz (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt [293, 295, 301].

Bestimmung von Zellzyklusveränderungen

Zellzyklusanalysen wurden 72 Stunden nach siRNA-Transfektion für die Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 durchgeführt. Dafür wurden die Zellen trypsiniert, zusammen mit den Zellen im Überstand mit PI-Puffer angefärbt und am Miltenyi MACSQuant[®] Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) vermessen [295].

Extraktion und Analyse von Histonen

Die Histongewinnung erfolgte wie bereits für die vorangegangenen Projekte [293, 295, 301] über eine Säure-Extraktion nach Shechter et al. 2007 [322]. Für die anschließende Western-Blot Analyse wurden jeweils 1 µg Proteinextrakt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (15 % Gel) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidinfluorid-Membran übertragen. Anschließend wurden H3K27ac (39133, Active Motif, Carlsbad, USA) und Gesamt Histon H3 (Total histone H3, 3638, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) detektiert.

6.3 Ergebnisse und Diskussion – Expression und Modulation von HDAC3 in UC-Zelllinien

Zunächst wurde die HDAC3 mRNA- und Proteinexpression von 14 unterschiedlichen UC-Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien TERT-NHUC (urothelial), HBLAK (urothelial) [292] und HEK-293 (nicht-urothelial) bestimmt. Die analysierte Zellserie (inklusive Western-Blot) entspricht derselben, welche zuvor zur Untersuchung der HDAC1/2-Expression verwendet wurde [295]. Auf mRNA-Ebene wurde eine heterogene HDAC3-Expression detektiert. In allen untersuchten UC-Zelllinien war die mRNA-Expression von HDAC3 um den Faktor $\geq 1,5$ höher als in den Kontrollzelllinien TERT-NHUC und HEK-293. Eine besonders starke Expression (Faktor $\geq 4,0$) zeigten dabei die fünf UC-Zelllinien RT-4, SW-1710, 647-V, HT-1376 und T-24. Auffällig ist, dass die urotheliale Kontrollzelllinie HBLAK, im Vergleich zu den Kontrollzelllinien TERT-NHUC und HEK-293, ebenfalls eine stärkere HDAC3-Expression auf mRNA-Ebene zeigte (Abb. 9A).

Auf Proteinebene wiesen die benignen Kontrollzellen die geringste HDAC3-Expression auf (Abb. 9B). Die Unterschiede der Expression zwischen UC-Zellen und Kontrollzellen sind auf Proteinebene jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als auf RNA-Ebene für die benignen Zelllinien TERT-NHUC und HEK-293 (Abb. 9A). In neun von 14 UC-Zelllinien (BFTC-905, RT-112, SW-1710, UM-UC-3, 5637, 639-V, HT-1376, SD und T-24) wurde eine höhere HDAC3-Expression auf Proteinebene detektiert (Abb. 9B). Eine signifikante Verminderung von HDAC3 mRNA wurde in den untersuchten UC-Zelllinien nicht beobachtet. Auf Proteinebene wurde eine etwas geringere HDAC3-Expression in den UC-Zelllinien J82 und RT-4 detektiert (Abb. 9). Zur Modulation von HDAC3 wurden die Zelllinien RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V und UM-UC-3 ausgewählt. Diese Zelllinien, die die Heterogenität des UC abbilden, wurden bereits für die Charakterisierung der anderen Klasse I HDACs mittels siRNA verwendet (HDAC8 [293], HDAC1/2 [295]). Somit ist eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien in dieser Arbeit gegeben.

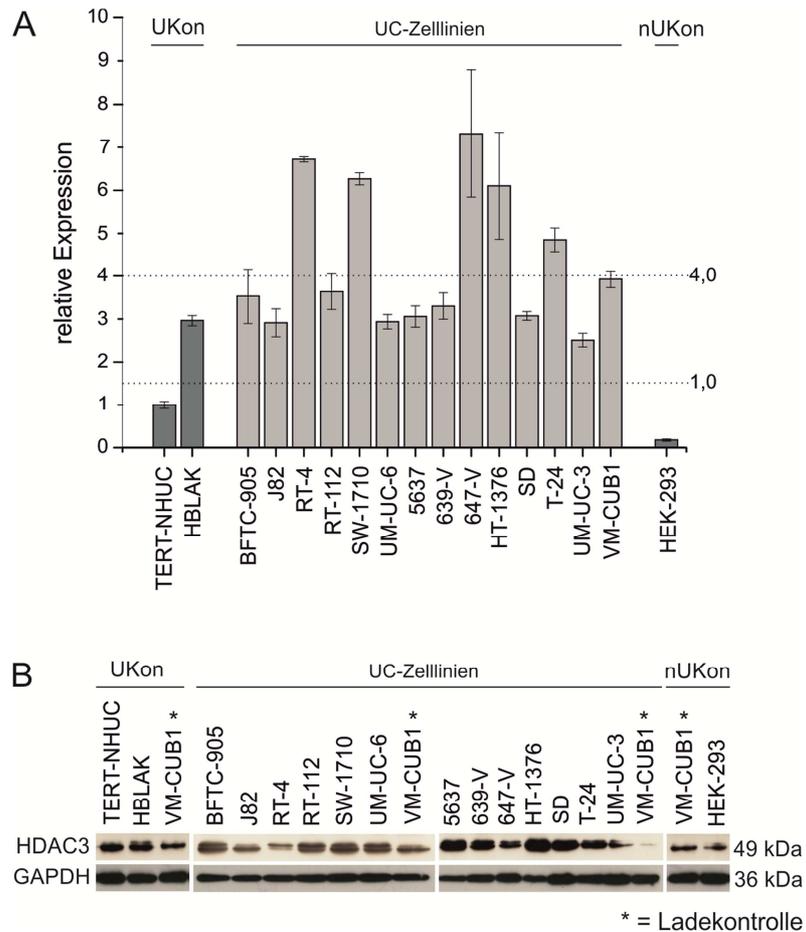


Abbildung 9: Expression von HDAC3-mRNA und -Protein in UC-Zelllinien. (A) Die relative mRNA-Expression von HDAC3 wurde durch qRT-PCR in 14 verschiedenen UC-Zelllinien im Vergleich zu den zwei urothelialen Kontrollzelllinien (UKon) TERT-NHUC und HBLAK und der nicht-urothelialen Kontrollzelllinie (nUKon) HEK-293 bestimmt. Zur Normierung der HDAC3-Expression (y-Achse) wurde das ubiquitär vergleichbar exprimierte Gen TBP gemessen. (B) Parallel zur mRNA-Expression wurde eine Bestimmung der HDAC3-Proteinexpression in den gleichen UC-Zelllinien und Kontrollzelllinien mittels Western-Blot Analyse durchgeführt.

Die erste Charakterisierung von HDAC3 in den fünf ausgewählten UC-Zelllinien erfolgte über eine transiente Transfektion von zwei verschiedenen HDAC3-spezifischen siRNAs und einer Kontroll-siRNA (Abb. 10). In allen Zelllinien fand mit beiden HDAC3-spezifischen siRNAs ein effizienter Knockdown der endogenen HDAC3-mRNA-Expression nach 72 Stunden Inkubation statt (Abb. 10A). Gleichzeitig stiegen in einigen Zelllinien besonders die Expression von HDAC1 (RT-112, VM-CUB1, UM-UC-3) oder HDAC2 (VM-CUB1, SW-1710, UM-UC-3) nach HDAC3-mRNA Knockdown signifikant an. Auffällig ist, dass diese Expressionsveränderungen vermehrt durch die siRNA HDAC3a induziert wurden (Abb. 10A). Auf Proteinebene wurde hingegen nach Transfektion der HDAC3-spezifischen siRNAs weder in den untersuchten VM-CUB1 noch in den UM-UC-3 Zellen eine Abnahme der

HDAC3-Proteinexpression nach 72 Stunden Inkubation beobachtet. In VM-CUB1 Zellen deutete sich überraschenderweise sogar eher eine Expressionszunahme an (Abb. 10B). Dieses Ergebnis wurde unter der Verwendung eines alternativen HDAC3-spezifischen Antikörpers überprüft (Anti-HDAC3 antibody, ab7030, Abcam, Cambridge, UK). Mit diesem Antikörper konnten jedoch ebenfalls keine HDAC3-Expressionsveränderungen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die HDAC3-Expression nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten (24, 48 und 72 Stunden) nach siRNA-Transfektion detektiert. Auch bei diesem Versuchsansatz waren keine Expressionsveränderungen sichtbar (Daten nicht gezeigt).

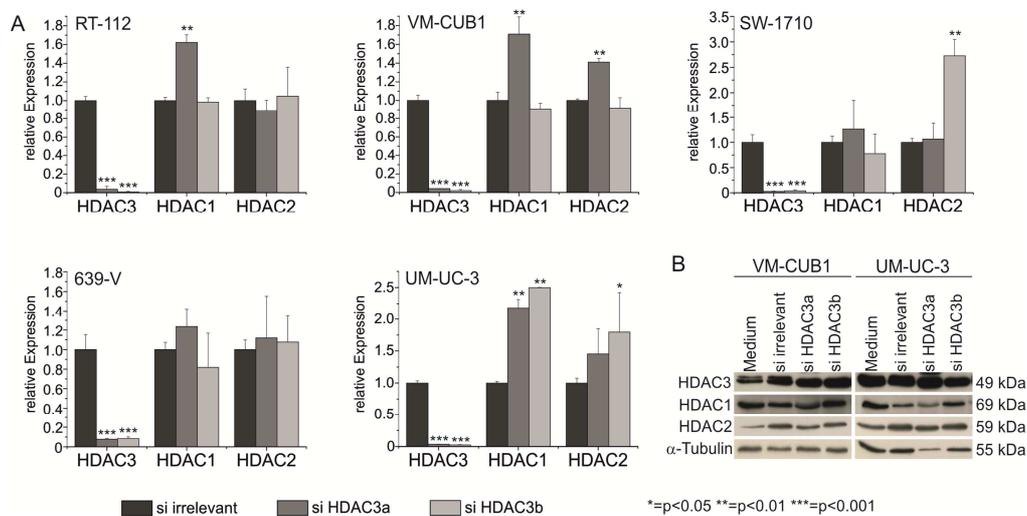


Abbildung 10: Effizienz und Kompensationsmechanismen der HDAC3 siRNA-Transfektion in UC-Zelllinien. In der Abbildung sind die Effekte der HDAC3 siRNA-Transfektion (zwei verschiedene siRNAs, 72 Stunden) auf die (A) mRNA- und (B) Proteinexpression von HDAC3 und der Klasse I HDACs 1 und 2 in den UC-Zelllinien RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V und UM-UC-3 dargestellt. Die mRNA-Expression wurde über qRT-PCR und die Proteinexpression über Western-Blot bestimmt.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die HDAC3-Proteinexpression möglicherweise posttranslational reguliert wird und eine hohe Stabilität aufweist. In MEF-Zellen wurde ebenfalls eine Langlebigkeit von HDAC3 detektiert [315]. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die für die Detektion von HDAC3 verwendeten Antikörper nicht spezifisch sind und somit der Nachweis eines Knockdowns nicht möglich ist.

Um diese Fragestellung final zu klären, sind weitere Experimente notwendig. Schaut man sich jedoch die Viabilität und die Fähigkeit zur Koloniebildung der fünf UC-Zelllinien nach HDAC3 siRNA-Transfektion an, scheint die letztere Erklärung plausibel zu sein (Abb. 11). Die Viabilität der siRNA transfizierten Zellen war nach 72 Stunden

Behandlung um bis zu 80 % (VM-CUB1, siHDAC3b) reduziert (Abb. 11A). Das klonogene Wachstum war ebenfalls beinahe vollständig inhibiert (Abb. 11B). Vergleicht man die beiden unterschiedlichen HDAC3-spezifischen siRNAs, wird ein stärkerer inhibitorischer Effekt der siRNA HDAC3b sowohl auf die Viabilität als auch auf die Klonogenität der Zellen deutlich (Abb. 11).

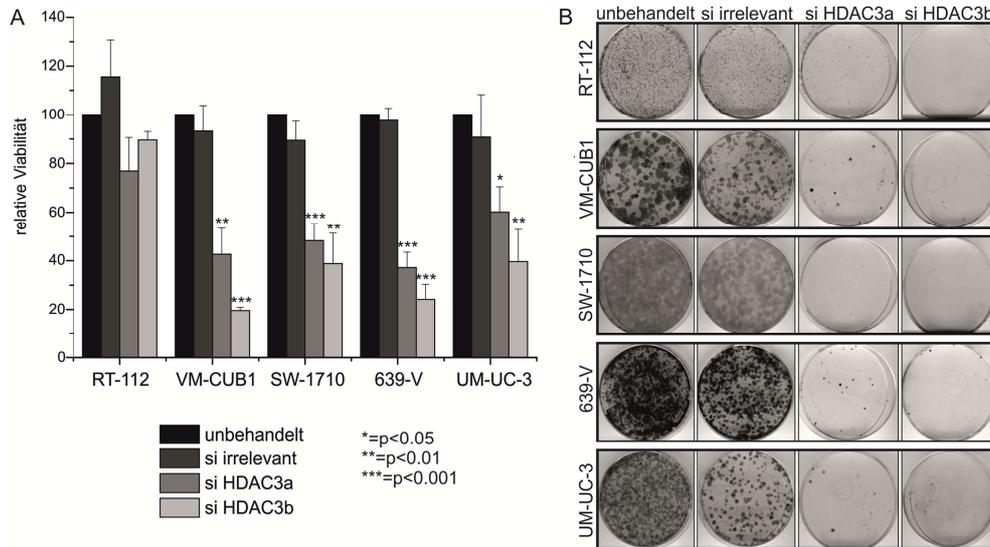


Abbildung 11: Inhibition der Viabilität und Klonogenität nach HDAC3 siRNA-Transfektion. (A) Die relative Zellviabilität und (B) Klonogenität wurde nach HDAC3 siRNA-Transfektion (zwei verschiedene siRNAs, 72 Stunden) im Vergleich zur Transfektion mit einer irrelevanten siRNA in den Zelllinien RT-112, VM-CUB1, SW-1710, 639-V und UM-UC-3 verglichen. Die Bestimmung der Viabilität fand über CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay statt. Die Anfärbung der entstandenen Kolonien erfolgte mit Giemsaareagenz.

Um eine genauere Charakterisierung der Effekte der HDAC3 siRNA-Transfektion zu erhalten, wurden Zellzyklusanalysen in den beiden Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 durchgeführt (Abb. 12A). Nach 72 Stunden können auffällige Veränderungen in den Zellen, die mit der siRNA HDAC3b transfiziert wurden, detektiert werden. Sowohl in VM-CUB1 als auch in UM-UC-3 Zellen tritt mit dieser siRNA ein signifikanter G1-Arrest auf. Gleichzeitig kann eine leichte Zunahme der subG1-Fraktion beobachtet werden (Abb. 12B). Mit der siRNA HDAC3a liegt ebenfalls eine erhöhte G1-Fraktion vor, jedoch in deutlich geringerem Maße. Wie bereits bei den Viabilitäts- und Klonogenitätsmessungen (Abb. 11) scheint die siRNA HDAC3b stärkere Effekte auch auf den Zellzyklus auszuüben. Auffällig ist, dass es zu keinen Replikationsstörungen bzw. mitotischen Effekten nach HDAC3 siRNA-Transfektion kommt obwohl die Rolle von HDAC3 für die Mitose und Replikation oft hervorgehoben wird [180, 236, 313, 315, 323].

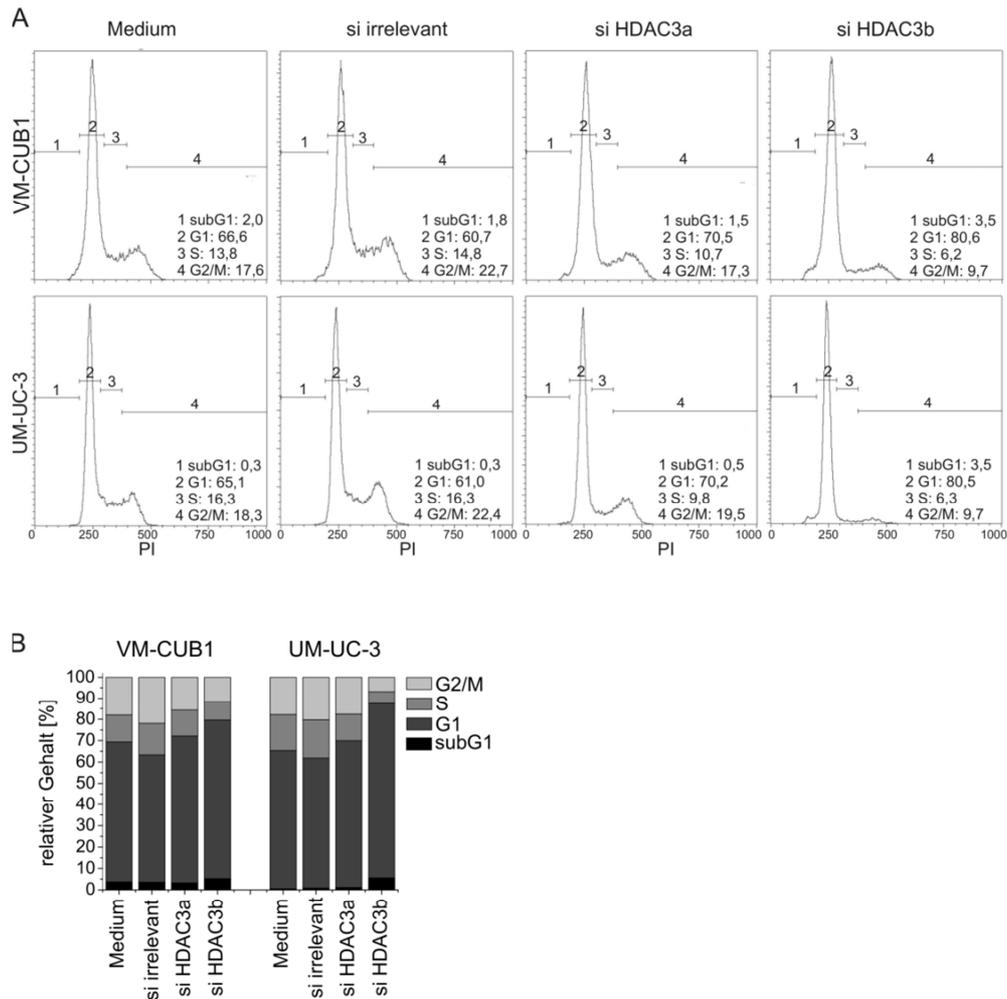


Abbildung 12: Zellzyklusanalysen nach HDAC3 siRNA-Transfektion. Die Analyse der Zellzyklusverteilung wurde nach HDAC3 siRNA-Transfektion (zwei verschiedene siRNAs, 72 Stunden) im Vergleich zur Transfektion mit einer irrelevanten siRNA in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 durchgeführt. In (A) ist ein repräsentatives Zellzyklusprofil und in (B) eine durchschnittliche Verteilung, errechnet aus drei unabhängigen Versuchen, dargestellt.

Des Weiteren wurde die Caspase-3/7-Aktivität, die Spaltung des Proteins PARP1 und die p21 Induktion untersucht (Abb. 13). Nach Transfektion der siRNA HDAC3b wurde ein starker Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität (sechsfach) in der Zelllinie UM-UC-3 beobachtet. In VM-CUB1 Zellen war die Aktivität verdoppelt (Abb. 13A). Interessanterweise konnte für die PARP1-Spaltung genau das Gegenteil beobachtet werden (Abb. 13B). Die 89 kDa großen Spaltprodukte traten vermehrt in den VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen auf, die mit der siRNA HDAC3a transfiziert wurden.

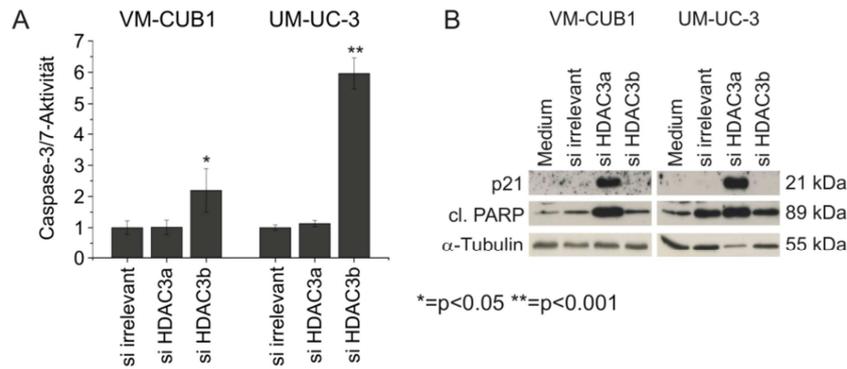


Abbildung 13: HDAC3 siRNA-Transfektions-vermittelte Effekte auf Caspase-3/7-Aktivität, p21-Expression und PARP1-Spaltung. Die (A) Caspase-3/7-Aktivität, der Anteil von (B) gespaltenem PARP1 und die p21-Expression wurden zur Abschätzung der Beteiligung von apoptotischen Prozessen und Zellzyklusveränderungen gemessen. Die Bestimmung fand nach HDAC3 siRNA-Transfektion (zwei verschiedene siRNAs, 72 Stunden) im Vergleich zur Transfektion mit einer irrelevanten siRNA in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 statt.

In siRNA HDAC3a-transfizierten Zellen trat gleichzeitig auch eine starke p21-Induktion auf. Nach einer Transfektion mit der siRNA HDAC3b schien es nicht zur p21-Induktion zu kommen (Abb. 13B). Die Induktion des Zellzyklus-Regulators p21 stellt einen gut charakterisierten Effekt nach HDAC-Knockdown oder -Inhibition dar [233, 268, 324-326]. Diese Induktion beobachteten wir in unseren Zelllinien auch nach einem kombinierten HDAC1/2-Knockdown [295]. Zusätzlich wurde die p21-Induktion nach HDAC-Inhibition bereits von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen in UC-Zelllinien beschrieben [254, 260-262, 268, 274, 277-279] (siehe Tab. 4B in Anh. B). Daher war es sehr auffällig, dass sich die p21-Induktion zwischen den beiden HDAC3-spezifischen siRNAs so stark unterschied. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die durch die siRNA HDAC3b-vermittelten Effekte unspezifische *Off-Target*-Effekte darstellen. Dies könnte eventuell auch zumindest für diese siRNA erklären, warum es zu keiner Abnahme des HDAC3-Proteins kommt (Abb. 10B). Diese Erklärung ist allerdings aus zwei Gründen widersprüchlich. Zum einen wurde eine starke Herunterregulation der HDAC3-mRNA-Expression nach 72 Stunden Inkubationszeit beobachtet (Abb. 10A). Zum anderen ist die Re-Expression von p21 häufig mit einem Zellzyklusarrest assoziiert (siehe Tab. 2C). Dieser konnte, trotz der fehlenden p21-Induktion, in Form eines G1-Arrestes nach der Transfektion der siRNA HDAC3b beobachtet werden. Um diesen Sachverhalt zu klären und zu untersuchen, ob die Effekte der siRNA HDAC3b spezifisch oder unspezifisch sind, müssten tiefer gehende Untersuchungen, z.B. in Form von *Rescue*-Experimenten oder mit shRNA, durchgeführt werden.

Zusätzlich zum siRNA-vermittelten Knockdown von HDAC3 wurde eine pharmakologische Inhibition mittels der beiden HDAC3-spezifischen Inhibitoren RGFP966 und BG45 an den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und den Kontrollzellen HBLAK (urothelial) [292] und HEK-293 (nicht-urothelial) durchgeführt. Für eine effektive Inhibition der Viabilität wurden hohe Konzentrationen der Inhibitoren benötigt. Der IC_{50} -Wert der HDAC3-Inhibitoren lag in VM-CUB1 Zellen bei ca. 50 μ M und in UM-UC-3 Zellen bei über 100 μ M (Abb. 14A). Um fehlerhafte Chargen der Inhibitoren auszuschließen, wurden die Messungen mit einer frischen Charge wiederholt, jedoch mit gleichbleibendem Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist, dass die urotheliale Kontrollzelllinie HBLAK am sensitivsten für den Inhibitor RGFP966 zu sein schien. Die Zelllinie HEK-293 war bei der niedrigsten Konzentration (25 μ M) ebenfalls sensitiver, glich sich aber bei den höheren Konzentrationen an (Abb. 14A, siehe Tab. 5 in Anh. C).

Es wäre sinnvoll, diese Inhibitoren zusätzlich in Zelllinien des CTCL (HH und Hut78) und multiplem Myeloms (MM.1S, RPMI8226, U266, OPM1 und H929) zu validieren, in denen die Inhibitoren initial charakterisiert wurden und für die es somit bereits unabhängige präklinische Daten gibt [169, 171]. Die präklinische Studie des Inhibitors BG45 im multiplen Myelom zeigte jedoch auch relativ hohe IC_{50} -Werte ab 15 μ M nach 72 Stunden Behandlung [171]. Außerdem konnte durch Behandlung mit bis zu 10 μ M RGFP966 keine Zytotoxizität in Zelllinien induziert werden, die zur Untersuchung von entzündlichen Lungenerkrankungen verwendet werden [321]. Betrachtet man die *in vitro* IC_{50} -Werte dieser Inhibitoren [169-171, 321, 327] (siehe Tab. 3 in Anh. A), müssten bei den in UC-Zelllinien und Kontrollzellen verwendeten Konzentrationen auch bereits die Klasse I Isoenzyme HDAC1 und 2 gehemmt werden. Jedoch kann auch bei diesen hohen Konzentrationen kein so deutlicher antineoplastischer Effekt beobachtet werden wie durch die HDAC1/2-Inhibition mit Romidepsin bzw. Givinostat [295]. Der Grund dafür kann zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden. Möglicherweise können die Untersuchungen von Bantscheff et al. 2011 und Becher et al. 2014 zu einer Erklärung beitragen [70, 172]. Demnach weisen einige HDACi unterschiedliche Affinitäten und Bindungskinetiken gegenüber verschiedenen Komplexen auf, obwohl in diesen Komplexen die gleichen HDACs inkorporiert sind. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die HDAC3-Inhibitoren nur in einem geringen Maße von den Zelllinien aufgenommen bzw. in einem hohen Maße metabolisiert und damit inaktiviert werden.

Um zu überprüfen, ob die HDAC-Aktivität durch diese Inhibitoren gehemmt wird, wurde eine Histonpräparation mit anschließendem Western-Blot gegen H3K27ac und Gesamt-Histon H3 durchgeführt. Die dargestellten Positivkontrollen sind Zellen, die mit dem HDAC1/2-Inhibitor Romidepsin behandelt wurden (Abb. 14B). In VM-CUB1 und auch UM-UC-3 Zellen wurde eine erhöhte Acetylierung von H3K27 nach RGFP966- und BG45-Behandlung beobachtet. H3K27 kann allerdings durch die HDACs 1-3 deacetyliert werden [22], sodass nicht auf eine spezifische Hemmung von HDAC3 bei diesen Konzentrationen zurückgeschlossen werden kann. In RAW 264.7-Makrophagen wurden ebenfalls Untersuchungen zur Histonacetylierung nach RGFP966-Behandlung durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass weder eine globale Hyperacetylierung von Histonen noch spezifische Acetylierungsveränderungen an Histon H3 und H4 induziert werden [321]. Dies könnte ein Hinweis auf eine HDAC3-unabhängige Hyperacetylierung von H3K27 nach RGFP966-Behandlung in UC-Zelllinien sein (Abb. 14B). In diesem Zusammenhang sollte auch beachtet werden, dass es in RAW 264.7-Makrophagen nach RGFP966-Behandlung zu einer leichten aber signifikanten Abnahme der HDAC1/2-Proteinexpression kommt [321]. Ob solch eine Abnahme der HDAC1/2-Expression auch in UC-Zelllinien stattfindet und zur Acetylierung von Histonen beitragen kann, müsste jedoch noch genauer untersucht werden.

Obwohl die Transfektion der zwei verschiedenen HDAC3-siRNAs einen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation und Klonogenität von UC-Zelllinien hat, stellt eine pharmakologische Inhibition mit den Inhibitoren RGFP966 und BG45 aufgrund der hohen IC_{50} -Werte keine geeignete therapeutische Option für das UC dar. Der Vergleich beider Modulationsansätze legt die Vermutung nahe, dass die Inkorporation von HDAC3 in den N-CoR/SMRT-Komplex und weniger die Deacetylase-Aktivität entscheidend für die antineoplastischen Effekte ist (siehe auch [34]).

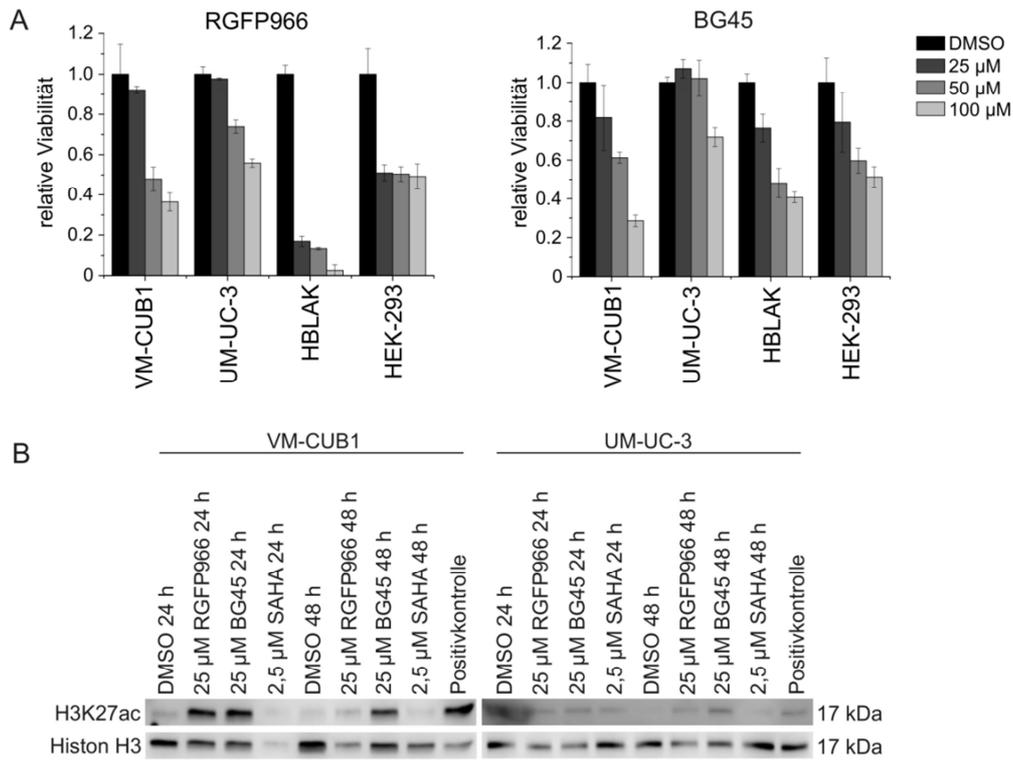


Abbildung 14: Effekte einer pharmakologischen HDAC3-Inhibition mittels RGFP966 und BG45 auf die UC-Zelllinien und Kontrollzellen. (A) Die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3, HBLAK und HEK-293 wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 (DMSO (Dimethylsulfoxid)), 25, 75 und 100 µM) der Inhibitoren RGFP966 und BG45 für 72 Stunden behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Assay gemessen. (B) Um zu bestimmen, ob nach RGFP966- und BG45-Behandlung eine Inhibition der HDAC-Aktivität stattfindet, wurde der Acetylierungsstatus des Substrates H3K27 untersucht.

Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, dass die Aktivität von HDAC3 auch posttranslational reguliert werden kann. Für HDAC3 ist z.B. beschrieben, dass eine Phosphorylierung durch CK2 sowohl die enzymatische Deacetylase-Aktivität erhöht als auch die Interaktion mit Komplexpartnern verstärkt [61, 323]. Aus diesem Grund, sollte der Zustand von HDAC3 hinsichtlich dieser aktivierenden Modifikation nach dem siRNA-vermittelten Knockdown und nach der pharmakologischen Inhibition von HDAC3 mit RGFP966 und BG45 untersucht werden. Gleichzeitig sollten zusätzliche detailliertere Experimente zur Spezifität der HDAC3-Modulation durchgeführt werden.

7 DISKUSSION

7.1 Optimales HDAC-Wirksamkeitsspektrum im UC

Präklinische Untersuchungen für die Behandlung des kindlichen Neuroblastoms mit spezifischen HDAC8-Inhibitoren stellen ein eindrückliches Beispiel dafür dar, dass eine spezifische Inhibition einer breit gefächerten Inhibition mit einem pan-HDACi vorzuziehen sein kann [153, 328]. Oehme et al. 2009 berichten, dass eine hohe HDAC8-Expression im Neuroblastom mit geringerem Überleben und schlechten prognostischen Markern korreliert. Eine Hemmung der HDAC8-Aktivität in kultivierten Neuroblastom-Zellen inhibiert Proliferation und Klonogenität und induziert einen Zellzyklusarrest und Zelldifferenzierung [153]. In einer Folgestudie wurde durch die selektive HDAC8-Inhibition das Wachstum von Neuroblastomen in zwei Xenograft-Mausmodellen stark gehemmt, wiederum durch Induktion von Zellzyklusarrest und Differenzierungsprozessen [328].

Ein besonderes Merkmal dieser Studie ist, dass die spezifische HDAC8-Inhibition *in vivo* in beiden Modellen weniger toxisch war als die parallele Behandlung mit dem pan-HDACi SAHA [328]. Die Toxizität der verschiedenen Substanzen wurde vor allem anhand des Gewichts der Versuchstiere bestimmt (Toxizität bei ≥ 20 % Gewichtsverlust des Startgewichtes). Zusätzliche Parameter waren Blutwerte und histologische Färbungen bestimmter Organe [328]. Durch die Behandlung mit SAHA wurden eindeutig toxische Nebenwirkungen ausgelöst, die sich vor allem durch Gewichtsverlust und Durchfall äußerten. Die HDAC8-spezifischen Inhibitoren waren für die Versuchstiere dagegen gut verträglich [328].

Die Autoren postulieren, dass eine HDAC-selektive Inhibition vor allem dann effektiv ist, wenn das Tumorstadium *in vivo* von einem spezifischen HDAC-Isoenzym abhängt [328]. Dies gilt offenbar für HDAC8 im Neuroblastom [153, 328]. Eine effektive und selektive Inhibition des Tumorstadiums mit spezifischen HDACi scheint somit Entitäten-spezifisch zu sein und kann nicht einfach auf andere Tumore übertragen werden. Daraus folgt, dass eine Isoform-spezifische Inhibition stärkere antineoplastische Effekte und eine geringere Toxizität als die Inhibition mit einem pan-HDACi vermitteln könnte, wenn eine Korrelation zwischen der Expression eines spezifischen HDAC-Isoenzyms und der Progression eines Tumors besteht [328].

Um für die Behandlung des UC mit HDACi ebenfalls eine möglichst geringe Toxizität bei maximaler Wirksamkeit zu erreichen, war das Ziel dieser Arbeit, das optimale HDAC-Wirksamkeitsspektrum für einen HDACi im UC genauer zu definieren. Da Klasse I HDACs erhöht exprimiert sind, stellt sich die Frage, ob eine spezifische Klasse I HDAC-Inhibition einer Behandlung mit SAHA im UC vorzuziehen ist. Diese beiden Punkte sollen im folgenden Kapitel, auf Grundlage dieser Arbeit und der damit verbundenen Publikationen [293, 295, 301] und den in Kap. 6 dargestellten Daten zu HDAC3, diskutiert werden. Einen dritten wichtigen Diskussionspunkt in diesem Kapitel bilden mögliche Mechanismen einer HDACi-vermittelten Selektivität gegenüber transformierten Zellen.

Sind Klasse I HDACs effektive Zielmoleküle in UC-Zellen?

Dieser Dissertation waren in der Arbeitsgruppe Untersuchungen von Rosik et al. [266] und Niegisch et al. [255] vorausgegangen. Dabei konnte HDAC6 (Klasse IIb) als effektives Zielmolekül für das UC ausgeschlossen werden [28, 266]. In einzelnen Zelllinien wurden durch die Inhibition von HDAC6 apoptotische Prozesse oder ein Zellzyklusarrest induziert, die Ausprägung dieser Effekte war jedoch gering [28, 266]. In der zweiten Arbeit wurde eine signifikante Überexpression von HDAC2 und HDAC8 in UC-Zelllinien beobachtet; HDAC8 lag als einzige HDAC auch in den untersuchten Tumorgeweben signifikant überexprimiert vor [255] (siehe auch [34]).

Da diese Beobachtung durch eine weitere Expressionsstudie im UC bestätigt worden war [258], wurde zunächst HDAC8 als Zielmolekül für das UC validiert. Hinzu kam, dass neben den oben diskutierten vielversprechenden Ergebnissen für das Neuroblastom auch für andere Tumorentitäten signifikante antineoplastische Effekte einer HDAC8-Inhibition nachgewiesen wurden [131, 294].

Trotz der beobachteten Überexpression im UC [255, 258] erbrachte eine HDAC8-Modulation jedoch insgesamt nur geringe Effekte auf die Viabilität (siehe Tab. 5 in Anh. C), Zellproliferation, Klonogenität und Migration von UC-Zelllinien [293]. HDAC8 kann somit als Ziel einer effizienten Monotherapie für die Behandlung des UC ausgeschlossen werden. Ob eine selektive HDAC8-Inhibition in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika oder weiteren spezifischen Substanzen im UC synergistisch wirken kann, müsste gegebenenfalls in einer weiteren Studie untersucht werden. Für das Neuroblastom wird z.B. ein synergistischer Effekt einer pharmakologischen HDAC8-Inhibition mit Retinsäure beschrieben [328].

Generell scheint HDAC8 für bestimmte Tumorentitäten besonders wichtige Eigenschaften zu besitzen [59]. Neben der Korrelation mit dem kindlichen Neuroblastom wurde ein Zusammenhang zwischen der HDAC8-Expression und dem Auftreten von T-Zell-Lymphomen, Mamma- und Leberzellkarzinomen beobachtet [59, 130, 144, 294, 329]. Die Inhibition von HDAC8 scheint im Neuroblastom und T-Zell-Lymphom am wirksamsten zu sein [59]. In T-Zell-Lymphom-Zelllinien induziert spezifische HDAC8-Inhibition selektiv Apoptose [294]. Des Weiteren kommt es in Leberzellkarzinom-Zellen nach HDAC8-Knockdown zu einer verminderten Proliferation und Induktion von Apoptose [131]. Dagegen ist die pharmakologische Inhibition von HDAC8 in Zelllinien anderer Entitäten nur wenig effektiv [294] (zit. aus [59]).

Die Entitäten- bzw. Gewebe-spezifischen Eigenschaften von HDAC8 könnten durch verschiedene Mechanismen bedingt sein. Am wahrscheinlichsten ist, dass die Gewebespezifität über die spezifischen Nicht-Histon-Substrate von HDAC8 vermittelt wird [59]. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die primären *in vivo* Substrate von HDAC8 nukleäre Nicht-Histon-Proteine (z.B. SMC3 (*structural maintenance of chromosome 3*) [330], ERR α (*estrogen related receptor α*) [331], ARID1A [332]) und cytoplasmatische Nicht-Histon-Proteine (z.B. Cortactin [333]) sind (ausführliche Erläuterung und Liste in [59]). Durch diese Substrate ist HDAC8 u.a. an der Regulation des Energiestoffwechsels und der Muskelkontraktion beteiligt [330, 331, 333] (zit. aus [59]). Darüber hinaus ist unklar, in welchem Umfang Histone *in vivo* von HDAC8 überhaupt deacetyliert werden können [59]. In vielen zellulären Systemen wird, wie in UC-Zelllinien (siehe Kap. 3, [293]), nach HDAC8-Inhibition keine deutliche globale Hyperacetylierung von Histonen beobachtet [59]. Vielmehr scheint HDAC8 bevorzugt Histon H3 in spezifischen Regionen des Genoms zu deacetylieren [59, 334]. Dies könnte zusätzlich zur Gewebespezifität beitragen [59].

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der spezifischen Hemmung von HDAC1 und 2 [295], die im UC häufig überexprimiert vorliegen (siehe Tab. 4A in Anh. B). Sie sind maßgeblich an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt, wie z.B. Transkription, DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Mitose [53]. Dies macht sie zu einem attraktiven Ziel für eine Therapie [22, 53]. HDAC1 und 2 üben oft identische und kompensatorische Funktionen aus, sind jedoch auch jeweils an Isoform-spezifischen Prozessen beteiligt [22, 41, 53]. Aus diesem Grund wurden HDAC1 und 2 sowohl allein als auch in Kombination untersucht [295].

Tatsächlich waren die Effekte in verschiedenen UC-Zelllinien nach einem spezifischen Einzelknockdown von HDAC1 oder HDAC2 im Vergleich zum Doppelknockdown durch wechselseitig kompensatorische Anstiege stark abgeschwächt [295]. Diese kompensatorischen Mechanismen wurden bereits für andere Zellarten und Entitäten beschrieben [108, 109, 160, 297-299] (beschrieben in [22, 41, 53]). Eine gleichzeitige Inhibition von HDAC1 und 2 beeinflusst die Zellzyklusprogression und Zellviabilität in allen untersuchten proliferierenden Zellarten stärker als die Inhibition eines einzelnen Enzyms [108, 109] (zit. aus [53]). Ähnliche Funktions-Überlappungen wurden auch bei anderen epigenetischen Regulatoren beobachtet wie den HATs p300 und CREBBP [28].

Ein Doppelknockdown von HDAC1/2 hemmt dagegen Proliferation und Klonogenität von UC-Zelllinien stark [295]. Auch beim pharmakologischen Ansatz erwies sich die gleichzeitige Hemmung von HDAC1 und 2 mit den Inhibitoren Romidepsin und Givinostat als sehr effektiv. Die beste Dosiswirkung zeigte der Inhibitor Romidepsin, der bereits im niedrigen nM-Bereich starke antineoplastische Effekte vermittelt; Givinostat wirkt im niedrigen µM-Bereich ([295], siehe Tab. 5 in Anh. C). Die Behandlung mit Romidepsin und Givinostat induziert in VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen deutliche morphologische Veränderungen, eine signifikante Inhibition der Klonogenität und eine starke Deregulation des Zellzyklus [295]. Diese Effekte und die Unterschiede zwischen einer siRNA- und einer pharmakologisch-vermittelten Inhibition werden in Kap. 7.2 (Knockdown vs. Klasse I HDACi) und Kap. 7.3 (Vergleich verschiedener Klasse I HDACi) näher diskutiert. Insgesamt lässt sich aus diesem Teilprojekt schlussfolgern, dass HDAC1 und 2 in Kombination vielversprechende Zielmoleküle für das UC darstellen [295].

Die Verwendung des Inhibitors 4SC-202, der HDAC1, 2 und 3 hemmt [226], verbindet die effektive Inhibition von HDAC1 und 2 mit einer gleichzeitigen Inhibition von HDAC3 (siehe Kap. 5, [301]). Auf diese Weise lässt sich abschätzen, ob durch eine zusätzliche Inhibition von HDAC3 ein additiver Effekt auftritt. HDAC3 liegt im UC häufig überexprimiert vor ([34, 129, 256, 258], siehe Tab. 4A in Anh. B). Zusätzlich hemmt 4SC-202 LSD1¹⁰. Für 4SC-202 wurden bereits in diversen Karzinom-Zelllinien und Xenograft-Modellen verschiedener Tumorentitäten erhebliche antineoplastische Effekte nachgewiesen [203, 226, 250-252].

¹⁰ Daten wurden von 4SC beim „6th Annual EpiCongress 2015“ (Boston, USA) im Juli 2015 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich eine eigenständige Charakterisierung von HDAC3 als mögliches Ziel einer Monotherapie im UC durchgeführt (siehe Kap. 6). Neben der Regulation der Transkription zahlreicher Gene [307, 310] agiert HDAC3 in nicht-transkriptionellen Prozessen wie Replikation, DNA-Reparatur, Kontrolle genomischer Stabilität und Mitose [53, 127, 161, 169, 180, 236, 313-315].

Die Behandlung von UC-Zelllinien mit 4SC-202 induziert morphologische Veränderungen, Hemmung der Proliferation (siehe Tab. 5 in Anh. C) und Klonogenität, erhöhte Caspase-3/7-Aktivität sowie eine erhebliche Störung des Zellzyklus mit anschließendem Zelltod (siehe Kap. 5.2, [301]). Auch der spezifische Knockdown von HDAC3 zeigt einen signifikanten inhibitorischen Einfluss auf die Viabilität und Klonogenität von UC-Zelllinien. Demgegenüber hat die spezifische pharmakologische Inhibition von HDAC3 mit RGFP966 und BG45 nur sehr geringe antineoplastische Effekte auf UC-Zelllinien (siehe Kap. 6.3).

Daraus ergibt sich grundsätzlich die Frage, ob HDAC3 durch die HDACi RGFP966 und BG45 in den Zellen tatsächlich gehemmt wird. Obwohl eine erhöhte Histonacetylierung detektiert werden konnte, scheinen die HDACi-vermittelten Effekte sich grundsätzlich von denen nach HDAC3 siRNA-Transfektion zu unterscheiden (siehe Kap. 6.3). Möglich wäre, dass die HDAC3-Inhibitoren entweder nur in einem geringen Maße von den Zelllinien aufgenommen oder in hohem Maße metabolisiert und inaktiviert werden. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist, dass das HDAC3-Protein an sich und dessen Inkorporation in den N-CoR/SMRT-Komplex wichtiger ist als seine Deacetylase-Aktivität (detaillierte Diskussion siehe Kap. 6.3, siehe auch [34]).

Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt eine solche Abhängigkeit für einen anderen Chromatinregulator-Komplex [335]. Die Methyltransferase EZH2 katalysiert als Untereinheit des Polycomb-Komplexes PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) eine reprimierende Trimethylierung an H3K27 [336]. Kim et al. 2015 konnten zeigen, dass Zellen mit Mutationen in Komponenten des SWI/SNF (*switch/sucrose non-fermentable*)-Chromatin-Remodellierungskomplexes (z.B. in den Genen *ARID1A*, *PBRM1* (*polybromo 1*) und *SMARCA4*) stark von EZH2 abhängig sind [335]. Diese Abhängigkeit wird allerdings, ähnlich wie für HDAC3 in UC-Zelllinien, unterschiedlich stark von einer Inhibition der enzymatischen Aktivität von EZH2 oder einem Knockdown des Proteins beeinflusst. Für SWI/SNF-mutante Zellen scheint primär die

Expression mit einhergehender Stabilisierung des Polycomb-Komplexes und sekundär die katalytische Funktion von EZH2 bedeutsam zu sein [335].

Selektivität von Klasse I HDACi gegenüber UC-Zellen vs. benignen Zellen

Für ein optimales HDAC-Wirksamkeitsspektrum ist nicht ausschließlich entscheidend, dass effektive antineoplastische Effekte gegenüber UC-Zellen vermittelt werden. Um ein spezifisches therapeutisches Fenster zu erschließen, ist es wichtig, dass benigne Zellen weniger stark von der Behandlung betroffen sind. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Wirkung der Inhibition von HDAC1, 2 und 3 mittels Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 auf die benignen Kontrollzellen HBLAK [292] und HEK-293 untersucht ([295, 301], siehe auch Kap. 6.3).

Insgesamt waren die durch Klasse I HDACi in UC-Zelllinien induzierten Effekte in den nicht transformierten Kontrollzellen HBLAK und HEK-293 schwächer ausgeprägt. Es konnten z.B. geringere Effekte der HDACi Romidepsin und Givinostat auf den Zellzyklus beobachtet werden [295]. Eine Sonderrolle nimmt der Inhibitor 4SC-202 ein. Ähnlich wie bei Romidepsin und Givinostat scheinen die urothelialen Kontrollzellen HBLAK, nicht aber HEK-293, bei niedrigen 4SC-202-Konzentrationen (0,5 μ M) weniger stark von der Klasse I HDAC-Inhibition betroffen zu sein. Bei der Behandlung von HEK-293 und HBLAK Zellen mit höheren 4SC-202-Konzentrationen tritt dagegen ein apoptotischer Phänotyp auf, der mit einer starken Inhibition der Klonogenität einhergeht [301]. Dieser Phänotyp scheint u.a. mit der Proliferationsrate und dem Differenzierungsstatus der Zellen assoziiert zu sein, denn nichtproliferative Konfluenz-arretierte oder differenzierte HBLAK Zellen sind weniger sensitiv gegenüber 4SC-202 als proliferierende undifferenzierte Zellen [301]. Studien in anderen Entitäten deuten darauf hin, dass 4SC-202 selektive antineoplastische Eigenschaften hat [203, 250].

Hervorzuheben ist, dass speziell in den urothelialen HBLAK Zellen nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung ein zytostatischer Seneszenz-ähnlicher Zustand ausgelöst wird, bei der die Zellen ihre Fähigkeit zur Langzeitproliferation jedoch beibehalten. Der zytostatische Zustand ist somit reversibel [295]. Solch eine Selektivität und/oder Induktion eines seneszenten Phänotyps, teilweise durch Kombinationen von HDACi mit anderen Substanzen, wurde auch für andere Zellarten, wie z.B. Ösophagus-, Prostata- und Leberzellkarzinom-Zellen, beschrieben [337-344] (Übersicht in [23]). Ein seneszenten Phänotyp kann auch bei der Behandlung von HBLAK Zellen mit niedrigen 4SC-202-Konzentrationen beobachtet werden, allerdings reagieren HEK-293 Zellen viel

empfindlicher auf die Behandlung mit 4SC-202. Bei erhöhter 4SC-202-Konzentration geht der zytostatische Zustand bei HBLAK Zellen jedoch in einen apoptotischen Phänotyp über [301].

Betrachtet man zusätzlich die Charakterisierung von HDAC3 im UC (siehe Kap 6.3), scheint die HDACi-vermittelte Selektivität zwischen malignen UC-Zelllinien und benignen Kontrollzellen eher durch eine gemeinsame Inhibition von HDAC1 und 2 [295] als durch HDAC3-Inhibition vermittelt zu werden. Sowohl durch 4SC-202-Behandlung [301] als auch durch pharmakologische Inhibition von HDAC3 mit RGFP966 und BG45 scheint es zu einer verhältnismäßig starken Toxizität gegenüber proliferierenden Kontrollzellen zu kommen, obwohl die pharmakologische Inhibition von HDAC3 mit RGFP966 und BG45 nur schwache antineoplastische Effekte auf UC-Zelllinien hatte (siehe Tab. 5 in Anh. C, Kap. 6.3). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für Benzamid-HDACi nachgewiesen werden konnte, dass sie eine höhere Affinität gegenüber HDAC3/N-CoR-Komplexen haben als gegenüber NuRD- und CoREST-Komplexen, welche die HDACs 1 und 2 enthalten [60, 70].

Basierend auf diesen Daten wäre zunächst von einer HDAC3-Inhibition in UC-Zellen abzuraten. Um eine endgültige Aussage machen zu können, müsste der Einfluss einer spezifischen HDAC3-Inhibition auf benigne urotheliale und nicht-urotheliale Kontrollzellen noch genauer validiert werden. Aus den vorhandenen Daten ist z.B. nicht ersichtlich, ob diese Effekte auf die Kontrollzellen auch längerfristig stabil oder eventuell reversibel sind. Darüber hinaus wären ergänzend zu den *in vitro*- auch *in vivo*-Untersuchungen erforderlich. Für 4SC-202 wurde bereits eine klinische Phase I Studie (TOPAS) für die Behandlung fortgeschrittener hämatologischer Krebserkrankungen durchgeführt [253]. Bei dieser klinischen Studie waren die Nebenwirkungen von 4SC-202 begrenzt.

Mögliche Mechanismen der HDACi-induzierten Tumor-Selektivität

Warum HDACi vermehrt eine stärkere Wirkung auf transformierte als auf benigne Zellen zeigen, ist noch nicht vollständig verstanden. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass die Selektivität durch die Art der von den Inhibitoren ausgelösten Reaktionen vermittelt wird [345]. Demnach können benigne Zellen HDACi-vermittelten Effekten besser gegenregulieren [345]. Dazu kann z.B. eine korrekte Arretierung des Zellzyklus als Antwort auf HDACi beitragen.

Im Detail haben Halsall et al. 2015 dynamische Transkriptions-Veränderungen in humanen lymphoblastoiden Zellen in den ersten zwei Stunden nach Behandlung mit drei verschiedenen Konzentrationen der HDACi Valproinsäure und SAHA untersucht [345]. Dabei war besonders auffällig, dass Komponenten von bekannten HAT-Komplexen herunter reguliert wurden. Durch diese Gegenregulation können Protein-Hyperacetylierungen, die normalerweise von HDACi induziert werden, minimiert oder vollständig verhindert werden [345]. Dieses Phänomen konnte auch in RNA-Expressionsanalysen bei UC-Zellen nach HDACi-Behandlung beobachtet werden [295] (detaillierte Diskussion der RNA-Expressionsstudien siehe Kap. 4.1 und 7.5). Wie bei Halsall et al. 2015 [345] ist das HAT-Gen *CREBBP* (des p300/CBP-Komplexes) sowohl in VM-CUB1 (Romidepsin, Givinostat, SAHA) als auch in UM-UC-3 (Givinostat, SAHA) Zellen signifikant herunter reguliert. Ebenfalls kann eine Expressionsverminderung von *EPC1* (*enhancer of polycomb homolog 1*) des NuA4 (*nucleosome acetyltransferase of H4*)-Komplexes in VM-CUB1 (Romidepsin, Givinostat, SAHA) und UM-UC-3 (Romidepsin, SAHA) Zellen detektiert werden [295]. Eine kürzlich durchgeführte Proteomstudie detektierte des Weiteren nach Behandlung der UC-Zelllinie 5637 mit Romidepsin eine signifikante Abnahme des HAT1-Proteins [234]. Zusätzlich fanden Halsall et al. 2015 heraus, dass diejenigen Gene, deren Expression durch HDACi verändert wird, im unbehandelten Zustand grundsätzlich durch eine hohe H3- und H4-Acetylierung charakterisiert sind [345]. Aus dieser Studie wurde der Schluss gezogen, dass die beobachteten Veränderungen eine adaptative Reaktion auf HDACi vermitteln und so zum Überleben der Zelle beitragen [345].

Weiterhin ist hervorzuheben, dass Halsall et al. 2015 nach HDACi-Behandlung eine starke Erhöhung der H3K27-Trimethylierung beobachtet haben [345]. Eine Hemmung dieser Trimethylierung, die durch EZH2 katalysiert wird, durch spezifische EZH1/2 (*enhancer of zeste 1/2 polycomb repressive complex 2 subunit*)-Inhibitoren führt nach HDAC-Inhibition zu einer veränderten transkriptionellen Antwort spezifischer Gene und bestätigt somit eine funktionelle Rolle des Polycomb-Komplexes in diesem Zusammenhang [345]. In UC-Geweben und den in dieser Arbeit verwendeten UC-Zelllinien wurde eine signifikant höhere Expression von EZH2 gezeigt [346-348].

Als weiterer Grund für die Selektivität von HDACi gegenüber benignen Zellen wird postuliert, dass durch die HDAC-Inhibition DNA-Schäden induziert werden und benigne Zellen, im Gegenteil zu transformierten Zellen, auf diese durch DNA-Reparatur oder Zellzyklusarrest angemessener reagieren [35, 349]. So soll die Expression einiger DNA-Reparaturproteine, wie z.B. RAD50 (*RAD (radiation) 50 homolog*) und MRE11A (*meiotic recombination enzyme 11 homolog A*), in transformierten Zellen nach HDACi-Behandlung deutlich abnehmen und die Fähigkeit zur DNA-Reparatur transformierter Zellen im Vergleich zu Normalzellen erniedrigt sein [349] (diskutiert in [35]). Zusätzlich wurde beschrieben, dass in benignen Zellen grundsätzlich weniger DNA-Schäden induziert werden als in transformierten Zellen [35, 350]. Eine kürzlich durchgeführte Proteomstudie hat z.B. für die UC-Zelllinie 5637 nachgewiesen, dass es nach Romidepsin- oder TSA-Behandlung zu einer vermehrten Abnahme von Proteinen kommt, die in verschiedene Prozesse der DNA-Reparatur involviert sind [234]. In dieser Studie konnten 30 Proteine identifiziert werden, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind und nach Romidepsin- oder TSA-Behandlung in 5637 Zellen differentiell exprimiert vorliegen. Auffällig ist, dass die Proteinexpression nach HDACi-Behandlung für alle 30 Proteine deutlich herunter reguliert ist, wie etwa bei MRE11A, RAD50, DDB1 und 2 (*damage specific DNA binding protein 1/2*) [234]. Eine weitere Arbeit zeigt, dass eine HDACi-Behandlung in primären Fibroblasten der Haut zur erhöhten Radiosensitivität und reduzierten Fähigkeit der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt [351]. Allerdings fand in dieser Arbeit kein direkter Vergleich zwischen transformierten und benignen Zellen statt. Eine detaillierte Diskussion zur Induktion von DNA-Schäden nach HDACi-Behandlung in UC-Zellen findet sich in Kap 7.3.

Ein dritter Grund, der in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist die vermehrte ROS-Entstehung [182, 189, 352-354] (beschrieben in [35]). ROS können in transformierten Zellen über multiple Mechanismen zu DNA-Schäden führen, u.a. über Expressions- und Aktivitätsveränderungen von DNA-Replikationsfaktoren, geringere Verfügbarkeit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten durch Metabolismus-Veränderungen und Entstehung von DNA-Addukten [22]. Diese Mechanismen wirken mutagen und können darüber hinaus Replikationsstress und genomische Instabilität induzieren [22]. HDACi können ROS induzieren und somit über oxidative Schädigung zum Zelltod führen [182, 189, 352-354]. Transformierte Zellen sollen nach HDACi-Behandlung im Vergleich zu normalen Zellen nur eine verminderte Fähigkeit zur Induktion protektiver antioxidativer

Proteine (z.B. Trx) besitzen. In transformierten Zellen sollen daher deutlich mehr Sauerstoffradikale als in benignen Zellen entstehen [190] (diskutiert in [35]). In den durchgeführten RNA-Expressionsstudien wird Trx in VM-CUB1 (Romidepsin, Givinostat) und UM-UC-3 (Givinostat) Zellen tatsächlich signifikant reprimiert [295] (siehe Kap. 4.2, Supplements Publikation 2, Tab. S5). Dies wurde bereits ebenfalls für die Zelllinien LNCaP (Prostata-), T-24 (Urothel-), HeLa (Zervix-), A549 (Lungen-) und MCF7 (Mammakarzinom) nach HDACi-Behandlung beschrieben [191, 352, 353]. Des Weiteren zeigt eine Proteomstudie, dass die HDACi Romidepsin oder TSA in der UC-Zelllinie 5637 die Expression von Proteinen modulieren, welche der ROS-Entstehung entgegen wirken, wie GSR (*glutathione-disulfide reductase*) und TXNRD2 (*thioredoxin reductase 2*) [234]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beschriebenen Mechanismen vermutlich auch in UC-Zellen greifen. Demnach resultiert die HDACi-Selektivität gegenüber transformierten Zellen aus einer Kombination von erhöhter ROS-Entstehung und verminderter Fähigkeit transformierter Zellen zur DNA-Reparatur [35].

Spezifische Klasse I HDACi oder pan-HDACi SAHA?

Neben der Definition des optimalen Wirkspektrums eines HDACi sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine spezifische Hemmung einzelner oder mehrerer Klasse I Enzyme Vorteile gegenüber der Behandlung mit pan-HDACi hat. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurde beispielhaft der pan-HDACi SAHA gewählt, der als Vorinostat bereits in vielen verschiedenen klinischen Studien für die Behandlung von soliden Tumoren erprobt wurde [355, 356].

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Klasse I HDACi haben stärkere antineoplastische Effekte auf UC-Zelllinien als SAHA [293, 295, 301]. Ausnahmen bilden der HDAC8-Inhibitor compound 2 und die HDAC3-Inhibitoren RGFP966 und BG45 (siehe Kap. 6.3, [293]). Die HDAC8-Inhibitoren wurden nur in den Parametern Zellzyklusveränderung und globale Histonacetylierung mit SAHA verglichen [293]. Compound 5 und 6 haben insgesamt stärkere Effekte auf den Zellzyklus als SAHA [293]. Allerdings ist bei diesen beiden Inhibitoren fraglich, ob nicht außer HDAC8 weitere Zielmoleküle gehemmt werden (detaillierte Diskussion siehe Kap. 7.4). Die HDAC3-Inhibitoren RGFP966 und BG45 wurden aufgrund ihrer hohen IC₅₀-Werte (siehe Tab. 5 in Anh. C) nur in ihrer Fähigkeit zur Histonacetylierung mit SAHA verglichen. Obwohl die Histonacetylierung nach spezifischer HDAC3-Inhibition erhöht war, wurden die beiden

Inhibitoren aufgrund ihrer hohen Wirkkonzentration als ungeeignet eingestuft, um das UC zu behandeln (siehe Kap. 6.3).

Die Inhibitoren Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 sind wirksamer als der pan-HDACi SAHA. Alle untersuchten Parameter, wie z.B. Klonogenität, Zellzyklus, Zellkernmorphologie und Zelltod, wurden stärker durch Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 als durch SAHA-Behandlung beeinflusst [295, 301]. Um eine Erklärung dafür zu finden, ist es möglicherweise notwendig die Rolle der Klasse II HDACs im UC genauer zu untersuchen. Aufgrund der stärkeren Aktivität der verwendeten Klasse I HDACi gegenüber SAHA [295, 301] stellt sich die Frage, ob die Inhibition von zusätzlichen HDACs durch SAHA möglicherweise kontraproduktiv ist. Zu dieser Annahme passt auch die Beobachtung, dass die spezifische Inhibition von HDAC6 nur einen geringen Einfluss auf Proliferation und Viabilität von UC-Zelllinien hat [266]. Des Weiteren beobachteten Niegisch et al. 2013, dass die Klasse IIa HDACs HDAC4, 5 und 7 in vielen UC-Zelllinien, im Vergleich zu urothelialen Kontrollzellen, stark herunter reguliert vorliegen (siehe Tab. 4A in Anh. B, [255], siehe auch [34]).

Betrachtet man die durch Klasse IIa HDACs regulierten Prozesse, scheint in unserem Fall besonders HDAC4 interessant zu sein. HDACi können z.B. DNA-Schäden induzieren [349, 357]; dies konnte zum Teil auch in UC-Zellen nach Klasse I HDACi-Behandlung detektiert werden (detaillierte Diskussion siehe Kap. 7.3). In diesem Zusammenhang könnten Beobachtungen relevant sein, wonach es zu einer Co-Lokalisation von HDAC4 mit dem Protein 53-BP1 (*p53-binding protein 1*) in nukleären Foci kommt [358]. Nach siRNA-vermitteltem Knockdown von HDAC4 nimmt die 53-BP1-Expression ab und es kommt zu einer Sensitivierung der behandelten Zellen gegenüber einer Strahlentherapie [358]. Da 53-BP1 bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) entscheidend ist [359, 360], könnten Veränderungen von HDAC4 somit verschiedene Aspekte dieses Prozesses beeinflussen, u.a. Rekrutierung von Proteinen der DSB-Schadensantwort, den ATM (*ataxia-telangiectasia mutated kinase*)-abhängigen Zellzyklus-Kontrollpunkt und die Wahl der DSB-Reparatur (NHEJ - *non-homologous endjoining* vs. homologe Rekombination) [359].

Andere Klasse IIa HDACs sollten jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden. Für die enzymatische Aktivität von HDAC7 wurde z.B. eine Abhängigkeit von der Interaktion mit HDAC3 beschrieben [53, 75]. Weiterhin kann HDAC3 mit HDAC4 und HDAC5 assoziieren [63, 74] (beschrieben in [53]). Solche Interaktionen könnten

möglicherweise die höhere Toxizität einer HDAC3-Inhibition in urothelialen Kontrollzellen bedingen. Es gibt dazu jedoch bisher keine weitergehenden Experimente. Diesbezüglich ist vielleicht wichtig, dass eine Studie mit hoch spezifischen und sensitiven Klasse IIa HDAC-Substraten darauf hindeutet, dass Hydroxamsäuren, wie z.B. SAHA, im Vergleich zu Klasse I und Klasse IIb HDACs eine deutlich schwächere inhibitorische Aktivität gegen Klasse IIa HDACs haben als bisher angenommen [361] (zit. aus [21]). Die Rolle der Klasse IIa HDACs wird in gesonderten Projekten des urologischen Forschungslabors untersucht [34].

Sind Klasse I HDACs optimale Zielmoleküle für das UC?

Die Effektivität und die Selektivität, die durch spezifische Klasse I HDACi vermittelt wird, könnte ein therapeutisches Fenster für die Behandlung des UC mit Klasse I HDACi erschließen. Diese Selektivität und die damit verbundene schwächere Toxizität von Klasse I HDACi gegenüber SAHA wurden ähnlich für das kindliche Neuroblastom beobachtet [328]. Ein Gegenargument ist, dass pan-HDACi im Gegensatz zu Isoform-spezifischen Inhibitoren therapeutische Vorteile bringen und dass sich Resistenzen weniger leicht gegenüber pan-HDACi entwickeln könnten, da sie eine höhere Anzahl von Genen und Prozessen, z.B. in apoptotischen und proliferativen Signalwegen, modulieren, indem sie sowohl nukleäre als auch cytoplasmatische HDACs inhibieren und somit viele antineoplastische Signalwege aktivieren [35, 93, 105].

Betrachtet man die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien, wird jedoch deutlich, dass in den beiden UC-Zelllinien durch die Klasse I HDACi Romidepsin und Givinostat erheblich mehr Gene und Prozesse differentiell reguliert werden als durch den pan-HDACi SAHA ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Abb. S2 und Tab. S5). Möglicherweise kommt es durch die Behandlung mit SAHA und der damit einhergehenden zusätzlichen Inhibition von Klasse II HDACs zu kompensatorischen Mechanismen in UC-Zellen.

Insgesamt weisen die in dieser Arbeit erhobenen präklinischen Daten zu HDACi in UC-Zelllinien auf einen Vorteil von spezifischen Klasse I HDACi gegenüber dem pan-HDACi SAHA hin. Bezieht man zusätzlich die Daten ein, die für die Kontrollzellen HBLAK und HEK-293 erhoben wurden, trifft dies vor allem für die Inhibitoren Romidepsin und Givinostat zu [295].

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ([293, 295, 301], Kap. 6.3) erlauben somit die Aussage, dass ein optimaler HDACi für die Behandlung des UC Klasse I HDACs, und insbesondere HDACs 1 und 2 inhibieren sollte. Diese spezifische Inhibition scheint in UC-Zellen effektiver und selektiver zu sein als eine Inhibition mit dem pan-HDACi SAHA [295]. HDAC8 konnte durch diese Arbeit als geeignetes Target für die Behandlung des UC ausgeschlossen werden [293]. Um eine eindeutige Aussage bezüglich der Inhibition von HDAC3 machen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen sowohl zur Effektivität als auch zur Selektivität. In weiteren Experimenten sollte jedoch vor allem die *in vivo*-Aktivität der verschiedenen HDACi analysiert werden.

7.2 Knockdown und HDACi-vermittelte Inhibition von Klasse I HDACs - Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrfach deutliche Unterschiede in den Reaktionen der Tumorzellen gegenüber einer siRNA-vermittelten oder einer pharmakologischen Inhibition spezifischer Klasse I HDACs beobachtet werden. Diese differentiellen Effekte betrafen verschiedene Prozesse, u.a. Zellzyklusveränderungen, Zelltodmechanismen, Histon-acetylierung und Genexpression. Im Folgenden werden diese Unterschiede vor allem für die Klasse I HDACs HDAC1 und 2 und die Inhibitoren Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 diskutiert.

Differentielle Zellzykluseffekte und Zelltodmechanismen

Bei den durch siRNA gegen HDAC1/2 oder durch die HDACi Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 in UC-Zelllinien ausgelösten Effekten konnten sowohl Gemeinsamkeiten, als auch Unterschiede identifiziert werden. Gemeinsam war die signifikante, wenn auch im Ausmaß Zelllinien-abhängige, starke Inhibition der Proliferation und Klonogenität. Beide Behandlungen führten zu der für HDAC-Inhibition charakteristischen p21-Induktion. Eine weitere Gemeinsamkeit, die lediglich durch Givinostat nicht vermittelt wurde, war eine Aktivierung der PARP1-Spaltung, die als Hinweis auf Apoptose gewertet werden kann [295, 301]. Genauere Analysen des Zellzyklus und der induzierten Zelltodmechanismen ließen jedoch deutliche Unterschiede zwischen einem siRNA-vermittelten Knockdown und der pharmakologischen Inhibition von HDAC1/2 erkennen [295]. Der siRNA-vermittelte Knockdown schien, wie auch schon bei anderen Karzinomentitäten beobachtet [108, 109, 160], einen Apoptose-artigen Zelltod zu induzieren, der durch eine erhöhte subG1-Fraktion, eine Steigerung der Caspase-3/7-

Aktivität und proteolytische Spaltung der Apoptose-assoziierten Marker PARP1, Caspase-3 und z.T. Caspase-8 charakterisiert war [295]. Zusätzlich konnte - als weiterer Hinweis auf einen apoptotischen Zelltod - ein Anteil des durch HDAC1/2-Knockdown induzierten Zelltodes durch gleichzeitige Behandlung mit dem pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh verhindert werden. Mit Ausnahme der erhöhten subG1-Fraktion waren jedoch durch HDAC1/2-Knockdown keine weiteren signifikanten Effekte auf den Zellzyklus messbar [295].

Demgegenüber steht die dramatische Störung des Zellzyklus, die in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 durch Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 ausgelöst wird [295, 301]. Sie zeichnet sich nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden durch eine stark ausgeprägte G2/M-Fraktion aus. Nach längerer Behandlungszeit (48 Stunden) entsteht ein Zelllinien-abhängiges „gezacktes“ Profil, welches durch starke Unregelmäßigkeiten gekennzeichnet ist. Detaillierte Analysen dieser Veränderungen (über Cyclin-Expression, Zellkernmorphologie, RNA-Expressionsstudien) deuten darauf hin, dass die Klasse I HDACi im ersten Zellzyklus Störungen der Mitose induzieren und es dadurch zu einer verlängerten G2/M-Phase kommt. Im zweiten Zellzyklus kommt es dann vermutlich zu einem Eintritt in die S-Phase, der durch Replikationsstress und einen irreversiblen Arrest-ähnlichen Zustand charakterisiert ist und schließlich im sekundären Zelltod resultiert [295, 301].

Die Zelltodmechanismen, die durch die Klasse I HDACi Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 als Folge der erheblichen Zellzyklusstörungen induziert werden, unterscheiden sich deutlich von denen des HDAC1/2-Knockdowns. So kann z.B. in den meisten Fällen keine relevante Caspase-3/7-Aktivität, obgleich teilweise eine PARP1-Spaltung detektiert werden [295, 301]. Vielmehr sprechen viele Beobachtungen dafür, dass es sich primär um einen nicht-apoptotischen Zelltod handelt. Ähnliche Effekte konnten in UC-Zelllinien bereits für den pan-HDACi SAHA und den Inhibitor KBH-A42 beobachtet werden [255, 264, 362]. Eine Caspase-3/7-unabhängige PARP1-Spaltung wurde ebenfalls schon in anderen Zellsystemen detektiert, ihr Mechanismus konnte jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden [363].

Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen siRNA-vermitteltem Knockdown von HDAC1/2 und pharmakologischer Inhibition von HDAC1 und 2 mit Romidepsin und Givinostat betrifft die globale Histonacetylierung. Während nach pharmakologischer Inhibition eine starke Hyperacetylierung auftritt, kann nach siRNA-vermitteltem

Knockdown nur eine leichte Erhöhung der Histonacetylierung detektiert werden [295]. Dieses Phänomen lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht schlüssig erklären. Eine mögliche, jedoch unzureichende Erklärung wäre, dass der siRNA-vermittelte Knockdown nicht komplett ist und eine ausreichende Restaktivität der HDACs und ihrer Komplexe verbleibt. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass durch das Fehlen der HDAC-Proteine auch die durch HATs und HDACs gemeinsam vermittelte dynamische Acetylierung gehemmt wird [104].

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass unter Knockdown-Bedingungen andere spezifische Lysinreste von Histonen acetyliert werden als nach pharmakologischer Inhibition. Für verschiedene Klasse I HDACi konnten z.B. ähnliche regulatorische Profile und eine starke Acetylierung der N-terminalen Lysinreste von Histonen nachgewiesen werden [221]. Im mittleren und C-terminalen Abschnitt der Histone wurde hingegen eine unterschiedliche Acetylierung der Lysinreste festgestellt, was darauf hindeutet, dass HDACi spezifische Acetylierungsmuster in Histonen induzieren und somit verschiedene Lysinreste innerhalb eines Proteins beeinflussen können [221]. In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass unter Knockdown-Bedingungen wiederum andere Lysine innerhalb der Histone acetyliert werden, die durch die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper nicht erfasst werden.

Bei den durchgeführten RNA-Expressionsstudien fallen ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen einem siRNA-vermittelten Knockdown und einer pharmakologischen Inhibition auf. In Romidepsin- und Givinostat-behandelten Zellen liegen vermehrt Transkripte differentiell exprimiert vor, die mit dem Ablauf und der Kontrolle des Zellzyklus zusammenhängen. Dagegen sind nach HDAC1/2-Knockdown mehr Transkripte beeinflusst, die zur Kontrolle von Zelltodmechanismen beitragen ([295], siehe Kap. 4.1). Insgesamt wurden bei beiden Modulationsarten nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Genen gemeinsam reguliert, darunter *CDKN1A/p21* (detaillierte Diskussion der RNA-Expressionsstudien siehe Kap. 4.1 und Kap. 7.5).

Das auffälligste Merkmal der RNA-Expressionsstudien nach pharmakologischer HDAC-Inhibition ist, dass sich die zytologisch beobachteten enormen mitotischen Störungen wiederfinden lassen [295]. Es wurde eine ausgeprägte Deregulation von Zellzyklus-assoziierten Faktoren entdeckt, die insbesondere durch eine massive Repression von mitotischen Genen sowie mit der Initiation der Replikation assoziierten Genen (*MCM (minichromosome maintenance complex) 2-9*) charakterisiert ist.

Außerdem liegen vermehrt Faktoren von Zellzyklus-Kontrollpunkten differentiell reguliert vor ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S5).

Der mitotische Faktor AURKA (*aurora kinase A*) ist nach der pharmakologischen HDAC-Inhibition besonders stark aufgefallen, da er in beiden Zelllinien (VM-CUB1 und UM-UC-3) mit jedem getesteten HDACi (Romidepsin, Givinostat und SAHA) reprimiert vorlag. Ein anderes Mitglied der Aurora Kinase Familie, AURKB (*aurora kinase B*), lag in VM-CUB1 Zellen nach HDACi-Behandlung ebenfalls einheitlich reprimiert vor ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S5). Aurora-Kinasen interagieren mit Mikrotubuli und sind an der Ausrichtung und Segregation von Chromosomen während der Mitose und Meiose beteiligt [364, 365]¹¹. Beide Kinasen, insbesondere jedoch die Aurora A Kinase, liegen in vielen Krebsentitäten überexprimiert vor und können die Entwicklung und Progression von Karzinomen fördern [103, 366-368]. In einigen Entitäten wurden diese Kinasen auch mit der Entwicklung von Resistenzmechanismen in Zusammenhang gebracht [366, 369].

Guise et al. 2012 identifizierten Klasse IIa HDACs als direkte Zielmoleküle der Aurora B Kinase; die Phosphorylierung durch Aurora B reguliert ihre Lokalisation während des Zellzyklus [370]. Zusätzlich gibt es bereits verschiedene Untersuchungen von Aurora-Kinasen in Zusammenhang mit HDACi. Für Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und diversen weiteren Karzinom-Zellen, einschließlich der UC-Zelllinie T 24, wurde z.B. ebenfalls eine Repression der Expression von Aurora A- und B-Kinasen nach HDAC-Inhibition mittels TSA, SAHA oder Panobinostat beschrieben [371, 372]. In Nierenkarzinom-Zellen wird durch den Verlust beider Kinasen nach Panobinostat-Behandlung ein G2/M-Arrest induziert [372], ähnlich wie in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung [295]. Fadri-Moskwik et al. 2012 beschreiben, dass die Aurora B Kinase in Prostatakarzinom-Zellen während der Mitose durch einen HDAC3-vermittelten Acetylierungs-Deacetylierungs-Zyklus reguliert wird. Dabei ist eine erhöhte Aurora B Kinase-Acetylierung mit einer niedrigeren Kinaseaktivität assoziiert, was wiederum zu Defekten in mitotischen Prozessen führt [373].

¹¹ NCBI-Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9212>, RefSeq September 2015, zitiert am 15.09.2016.

Für beide Kinasen wurden bereits unterschiedliche Inhibitoren entwickelt und in verschiedenen Entitäten, einschließlich des UC, erprobt [364, 374]. Bei den Effekten, die durch diese Inhibitoren ausgelöst werden, fällt auf, dass häufig die Induktion einer erhöhten G2/M-Fraktion beschrieben wird [374, 375], ähnlich wie in dieser Arbeit durch die HDACi Romidepsin und Givinostat ausgelöst [295]. Dies wurde auch für verschiedene UC-Zelllinien, einschließlich UM-UC-3, mit dem Aurora A Kinase-Inhibitor MLN8237 beobachtet [374]. Zudem wurden bereits synergistische antineoplastische Effekte von HDACi und Aurora Kinase-Inhibitoren in verschiedenen Zelllinien aus unterschiedlichen Entitäten beschrieben [364, 376-379]. Es wird außerdem postuliert, dass die HDACi-vermittelte Selektivität gegenüber transformierten Zellen durch die Modulation der Aurora A Kinase reguliert wird [380].

Für die unterschiedliche Ausprägung der Effekte zwischen siRNA-vermittelten Knockdown und pharmakologische Inhibition kann es vielfältige Gründe geben. Erstens kommt es durch einen Knockdown zu einer Entfernung der HDAC1/2-Proteine, wohingegen durch die pharmakologische Inhibition die enzymatische Aktivität gehemmt wird, die Proteine und somit die HDAC1/2-Multiproteinkomplexe jedoch erhalten bleiben. Allerdings muss bedacht werden, dass für einzelne HDACs eine Konformationsänderung nach Inhibitorbindung postuliert wird und somit auch die Assoziation der Multiproteinkomplexe gestört sein kann. Für HDAC8 wurde z.B. beschrieben, dass einige Inhibitoren in der Lage sind, die Konformation dieses Isoenzym zu verändern [59, 381]. Des Weiteren kann der pan-HDACi SAHA eine Dissoziation der ING2-Untereinheit des Sin3-Komplexes katalysieren [60, 382]. Der Verlust der ING2-Untereinheit führt anschließend *in vivo* zu einer Abschwächung der Bindung des Sin3-Komplexes an den Promotor des *CDKN1A/p21*-Gens [382]. Dessen Re-Expression bei HDAC-Inhibition wird u.a. über eine Hyperacetylierung des Promotors reguliert [325] (siehe Tab. 2), die vermutlich z.T. durch die Abschwächung der Bindung des Sin3-Komplexes an den entsprechenden Promotor vermittelt wird [382].

Die Zusammensetzung der Multiproteinkomplexe könnte auch durch einen selektiven Abbau von spezifischen HDACs beeinträchtigt sein. So wurde z.B. nachgewiesen, dass der HDACi Valproinsäure, aber nicht TSA, eine selektive proteasomale Degradation von HDAC2 vermitteln kann [383]. Dies wird über die Induktion des Faktors Ubc8 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 8*) und die Stabilisierung der E3 Ubiquitin-Ligase

RLIM (*ring finger protein, LIM domain interacting*) reguliert. Kommt es wiederum zu einer gleichzeitigen Repression der RLIM-Expression, wie z.B. durch die Behandlung mit TSA, findet keine proteasomale Degradation von HDAC2 statt [383]. Dies ist also ein selektiver HDACi-abhängiger Prozess. Des Weiteren wurde für die UC-Zelllinie 5637 berichtet, dass nach Romidepsin- oder TSA-Behandlung eine deutliche Abnahme der Proteinexpression von HDAC1, 2 und 3 induziert wird [234]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kann jedoch weder in den RNA-Expressionsstudien noch in den durchgeführten Western-Blot-Analysen ein Hinweis auf einen solchen Mechanismus gefunden werden. Allerdings fällt bei den Expressionsstudien nach HDACi-Behandlung auf, dass viele Bestandteile der HDAC1/2 enthaltenden Sin3- und insbesondere NuRD-Komplexe signifikant herunter reguliert sind und es so zu einer Beeinträchtigung der Komplexbildung kommen könnte ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S5). Diese Beobachtung wird teilweise auch durch die Proteomstudie in 5637 Zellen nach Romidepsin- oder TSA-Behandlung bestätigt, bei der z.B. eine Expressionsverminderung von SDS3 (*yeast SDS3 homolog*) des Sin3-Komplexes detektiert wurde [234]. Grundsätzlich ist die katalytische Aktivität von HDAC1 und 2 stark von der Inkorporation in Multiproteinkomplexe abhängig [53], sodass jede Änderung der HDAC-Konformation oder der Zusammensetzung der Komplexe zu einer starken Beeinträchtigung der Deacetylase-Aktivität führen könnte.

Zweitens ist es möglich, dass die pharmakologische Inhibition im Vergleich zum Knockdown stringenter ist. Obwohl der siRNA-vermittelte Knockdown laut RT-PCR und Western-Blotting sehr effizient ist [295], ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der Proteine erhalten bleibt und zu der unterschiedlichen Ausprägung der Effekte beiträgt.

Drittens kann es durch vielfältige PTMs von HDACs und ihren Komplexpartnern zu Veränderungen von Aktivität, Stabilität, Lokalisation und Inkorporation in Multiproteinkomplexe der HDACs kommen [32, 36, 53, 384]. PTMs wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Ihre Funktionen sind vor allem für HDAC1/2-Komplexe bekannt, wurden jedoch auch vereinzelt für HDAC3 und 8 beschrieben [53, 61, 65, 89, 107, 279, 323, 384-387]. Bekannte PTMs von HDACs sind Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung, S-Nitrosylierung, SUMOylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung [32, 36, 53, 384]. Die am besten charakterisierte PTM von Klasse I HDACs ist die reversible Phosphorylierung [36]. Diese wird u.a. über CK2 an HDAC1, 2 und 3 vermittelt und wirkt meistens aktivierend [89, 323, 385, 386] (zit. aus [53]). Die

Regulation von HDAC8 über PTMs unterscheidet sich deutlich von der der anderen Klasse I HDACs, so wird z.B. durch eine Phosphorylierung die enzymatische Aktivität eher inhibiert als aktiviert [36]. Ein prominentes Beispiel dafür ist, dass eine spezifische Phosphorylierung von S39 in der Nähe des aktiven Zentrums in einer Abnahme der Deacetylase-Aktivität resultiert [36, 65]. Des Weiteren sind viele HDACs und ihre Komplexpartner auch selbst Zielmoleküle für reversible Acetylierungen [107]; so findet z.B. eine Aktivierung von HDAC1 über eine spezifische Deacetylierung statt [387] (zit. aus [53]).

Ein vierter Grund, der zur unterschiedlichen Ausprägung von Effekten zwischen einer siRNA-vermittelten und pharmakologischen Klasse I HDAC-Inhibition beitragen könnte, ist, dass die Inhibitoren nicht nur HDAC1, 2, 3 und 8, sondern auch andere Zielmoleküle hemmen. Diese zusätzlichen Zielmoleküle können sowohl weitere HDACs, als auch nicht verwandte Faktoren sein, wie z.B. die Komponenten von Signaltransduktionswegen. Zusätzliche Zielmoleküle und weitere Besonderheiten der in dieser Arbeit verwendeten Klasse I HDACi werden in Kap. 7.4 diskutiert.

7.3 Pharmakologische Inhibition von Klasse I HDACs - Gemeinsamkeiten und Unterschiede verschiedener HDACi

Zwischen den verschiedenen Klasse I HDACi Romidepsin, Givinostat und 4SC-202 konnten auch deutliche Unterschiede in ihren Effekten festgestellt werden [295, 301]. Diese Unterschiede betreffen sowohl den Zellzyklus als auch Zelltodmechanismen und Genexpression. Im folgenden Abschnitt sollen diese Unterschiede diskutiert, jedoch auch Gemeinsamkeiten hervorgehoben werden. Eine detaillierte Diskussion der RNA-Expressionsstudien erfolgt in Kap. 7.5, hier wird nur auf einzelne relevante differentiell exprimierte Faktoren eingegangen.

Zellzykluseffekte

Alle drei Inhibitoren induzieren eine dramatische Störung des Zellzyklus in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3, die nach 24-stündiger Behandlung durch eine stark ausgeprägte G2/M-Fraktion charakterisiert ist. Nach 48-stündiger Behandlung entsteht ein sehr unregelmäßiges, Zelllinien-abhängiges „gezacktes“ Profil, welches sich bei allen drei Inhibitoren ungefähr gleich stark ausbildet ([295, 301], siehe Kap. 4.2 und 5.2). Alle drei Klasse I HDACi scheinen im ersten Zellzyklus Störungen der Mitose zu induzieren, durch die es zu einer verlängerten G2/M-Phase kommt. Im zweiten

Zellzyklus kommt es dann vermutlich zu einem Eintritt in die S-Phase, der durch Replikationsstress und einem irreversiblen Arrest-ähnlichen Zustand charakterisiert ist und schließlich in einem sekundären Zelltod resultiert. Diese Ereignisse werden vermutlich dadurch begünstigt, dass viele UC-Zelllinien Störungen im G1/S-Kontrollpunkt aufweisen [300] und Tumorzellen mit defekten Kontrollpunkten dazu tendieren, trotz eines fehlenden korrekten Abschlusses der Replikation oder Mitose, in die nächste Phase überzugehen [388]. Durch die Defekte im G1/S-Kontrollpunkt sind Karzinom-Zellen besonders stark von den S- und G2/M-Kontrollpunkten abhängig; da der S-Phasen-Kontrollpunkt eher einen drosselnden als einen arretierenden Effekt hat, kann eine Zelle mit DNA-Schäden, die z.B. durch HDACi induziert wurden, diesen durchlaufen, um schließlich am G2/M-Kontrollpunkt zu arretieren [103, 389]. Wird dieser Kontrollpunkt durch HDACi gestört, findet keine Reparatur der DNA-Schäden statt und es kommt selektiv zu einem mitotischen Zelltod von neoplastischen Zellen, da benigne Zellen aufgrund eines intakten G1/S-Kontrollpunktes vor diesen Ereignissen geschützt sind [103, 389].

Unterschiede werden bei detaillierten Analysen dieser Zellzyklusstörungen vor allem zwischen den HDAC1/2-Inhibitoren Romidepsin/Givinostat und dem HDAC1/2/3-Inhibitor 4SC-202 deutlich [295, 301]. Dies illustriert die quantitative Auswertung der Zellkernmorphologie nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung. Zunächst wurde eine höhere Anzahl mitotischer Prozesse im ersten Zellzyklus (24 Stunden) beobachtet, was für einen verlängerten Durchlauf der Mitose-Phase spricht. Im zweiten Zellzyklus (48 Stunden) wurde eine deutliche Abnahme der Mitosen detektiert. Gleichzeitig fand eine Akkumulation von Mikronuklei statt [295].

Nach 4SC-202-Behandlung sind diese Effekte viel stärker ausgeprägt. Ein großer Teil der Zellkerne schien nach 24 Stunden Behandlung entweder eine aberrante Mitose zu durchlaufen (stark kondensiert) oder stark fragmentiert mit vielen Mikronuklei vorzuliegen. 48 Stunden nach Behandlung verschob sich dieses Verhältnis hin zu stark fragmentierten Nuklei. Die Anzahl der aberranten Mitosen nahm deutlich ab. Eine quantitative Auswertung war, aufgrund der stark ausgeprägten Störungen bei 4SC-202, nicht möglich [301].

Der durch 4SC-202 induzierte Phänotyp ähnelt insgesamt einer mitotischen Katastrophe [390, 391]. Die Induktion einer mitotischen Katastrophe durch HDACi wurde bereits vereinzelt beschrieben [178, 392]. Die HDACi SAHA und Valproinsäure führen in

Glioblastom-Zellen zu einer Erhöhung der G2/M-Population, vermittelt durch eine Repression der Kinasen Wee1 (*WEE1 G2 checkpoint kinase*) und Chk1 (*checkpoint kinase 1*) [178]. Zu der Ausbildung einer mitotischen Katastrophe in diesen Zellen trägt weiterhin die verminderte Expression von Faktoren bei, die an der DNA-Reparatur (RAD51 (*RAD (radiation) 51 recombinase*)), an der Ausbildung der Mitosespindeln (TPX2 (*targeting protein for Xklp2*)) und an der Chromosomensegregation (Survinin) beteiligt sind [178]. All diese Faktoren liegen auch in den in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung in mindestens einer, meistens in beiden Zelllinien, reduziert vor [295]. Da das Konzept der mitotischen Katastrophe umstritten ist - offenbar werden verschiedene mitotische Störungen und Zelltodmechanismen in dieser Definition zusammengefasst [390, 391, 393] - bedarf es aufwändiger Experimente um das Auftreten dieses Phänomens in UC-Zelllinien zu spezifizieren.

Untersuchungen von Zhou et al. 2013 geben einen Hinweis darauf, warum UC-Zelllinien besonders sensitiv auf HDACi-induzierte Störungen in der Mitose reagieren könnten [374]. Demnach liegen Gene, die am Spindel-Kontrollpunkt in der mitotischen Metaphase beteiligt sind, im UC häufig überexprimiert vor. Insgesamt wurden 13 überexprimierte Gene identifiziert: *CCNA2* (Cyclin A2), *KIF4A* (*kinesin family member 4A*), *TTK* (*T-cell Tat-associated kinase*), *KIF11* (*kinesin family member 11*), *AURKB*, *NUF2* (*NDC80 kinetochore complex component*), *MAD2L1* (*MAD2 mitotic arrest deficient-like 1*), *DLG7* (*discs large homolog 7*), *TPX2*, *CDCD20*, *BUB1B* (*BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B*), *AURKA* und *ZWINT* (*ZW10 interacting kinetochore protein*) [374]. All diese Faktoren, mit Ausnahme von *DLG7*, liegen in den in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsarrays nach Behandlung mit Romidepsin und Givinostat in mindestens einer, meistens jedoch beiden Zelllinien, herunter reguliert vor; dies sollte an der Ausbildung der starken mitotischen Störungen beteiligt sein [295].

Im Zusammenhang mit abnormaler Mitose sollte weiterhin beachtet werden, dass diese einen p53-abhängigen apoptotischen Zellzyklusarrest und Zelltod auslösen kann [394]. Das p53-Gen ist jedoch in fast allen UC-Zelllinien mutiert, einschließlich der in dieser Arbeit genau untersuchten VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen [1, 395]. Dadurch kann die Fähigkeit zur Apoptose-Induktion im Anschluss an mitotische Störungen in diesen Zellen beeinträchtigt sein. Dies könnte teilweise die in dieser Arbeit beobachtete

Mischform aus apoptotischem und nekrotischem Zelltod erklären (detaillierte Diskussion s.u.). Speziell wäre interessant herauszufinden, inwieweit der Mitose-spezifische Deacetylase-Komplex MiDAC [70, 71], der ein HDAC1/2-Heterodimer enthält (siehe Abb. 3), an der Ausbildung der mitotischen Störungen in UC-Zelllinien durch HDACi beteiligt ist.

Kanonischer HDACi-Wirkmechanismus in UC-Zelllinien?

Das in der Literatur beschriebene kanonische Modell der HDACi-Wirkung beinhaltet verschiedene charakteristische Mechanismen. Zu diesen gehört hauptsächlich die Dekondensierung des Chromatins durch Hyperacetylierung von Histonen, eine Modifizierung des Acetylierungsstatus an Promotoren spezifischer Gene und die damit verbundenen Expressionsveränderungen [35, 103]. Veränderungen bei der Expression können außerdem durch die Acetylierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. STAT3 (STAT - *signal transducer and activator of transcription*) [396, 397], und die damit einhergehende Regulation ihrer Lokalisation, Komplexierung und transkriptionellen Aktivität vermittelt werden [35]. Im kanonischen Modell kommt es schließlich zur Deregulation bestimmter Faktoren mit anschließendem Zellzyklusarrest (meist G1 [23]) und Apoptose-Induktion [54, 103].

Vergleicht man dieses kanonische Modell mit den durch Klasse I HDACi induzierten Effekten in UC-Zelllinien, werden grundlegende Unterschiede deutlich. Offensichtlich werden die ausgelösten Effekte größtenteils nicht über den kanonischen Mechanismus vermittelt. Der nach HDACi-Behandlung oft beobachtete G1-Arrest in anderen Entitäten [23] fehlt in UC-Zelllinien, dafür beobachten wir eine stark erhöhte G2/M-Fraktion [295, 301]. Diese Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase wurde teilweise auch in anderen Entitäten detektiert. Eine mögliche Erklärung, die in der Literatur diskutiert wird ist, dass die Ausprägung eines G1- oder G2/M-Arrestes im Zuge einer HDACi-Behandlung von der Konzentration des eingesetzten Inhibitors abhängt [105, 181, 398]. Damit hängt zusammen, dass nicht jeder vermeintliche G2/M-"Arrest" tatsächlich ein echter reversibler Arrest ist, sondern eine fehlerhafte Mitose und Zytokinese repräsentieren kann [181, 388, 398, 399], die zu einem großen Anteil über Nicht-Histon-Substrate vermittelt wird [55, 181].

Ein echter G2-Arrest scheint vor allem bei HDACi-Konzentrationen ausgelöst zu werden, die eine maximale Histonacetylierung induzieren, wohingegen ein G1-Arrest durch niedrigere Konzentrationen vermittelt wird [181, 398]. Grundsätzlich ist es

strittig, ob der in UC-Zelllinien beobachtete Anstieg der G2/M-Fraktion durch den Einsatz von geringeren HDACi-Konzentrationen weniger stark ausfallen und dadurch ein G1-Arrest in den Zellen induziert werden würde. Diese Abhängigkeit wurde bisher nur für einen echten reversiblen G2-Arrest beschrieben [181]. Die in dieser Arbeit verwendeten HDACi-Konzentrationen für Romidepsin und Givinostat lagen bei 3 nM Romidepsin und 0,5 µM Givinostat für 24 und 48 Stunden. Diese Konzentrationen entsprechen ungefähr den IC₅₀-Werten der Inhibitoren nach 72-stündiger Behandlung (VM-CUB1 – 4,27 nM Romidepsin, 0,49 µM Givinostat; UM-UC-3 - 3,36 nM Romidepsin, 0,63 µM Givinostat; siehe Tab. 5 in Anh. C). Trotz der relativ niedrig eingesetzten Konzentrationen kommt es nach 24-stündiger Behandlung dennoch zu einer starken Ausprägung der G2/M-Fraktion [295]. Daraus ergibt sich die Frage, wie niedrig konzentriert HDACi in UC-Zelllinien eingesetzt werden müssten, um einen G1-Arrest zu induzieren und ob UC-Zelllinien genügend Spielraum für eine solche kanonische Reaktion haben.

Betrachtet man die Zellzyklusprofile von VM-CUB1 und UM-UC-3 nach 4SC-202-Behandlung, gibt es zwar Hinweise darauf, dass eine niedrigere Konzentration von 4SC-202 (0,5 µM) einen weniger starken G2/M-ähnlichen Arrest auslöst als eine Behandlung mit höheren Konzentrationen (2,5 µM), jedoch kann kein Hinweis auf die Induktion eines G1-Arrestes gefunden werden. Selbst bei der niedrigeren 4SC-202-Konzentration tritt ein deutlicher G2/M-Anstieg auf [301]. Möglicherweise kann durch die Beeinträchtigung der RB1-, p53- und p16-Funktion grundsätzlich kein G1-Arrest in UC-Zelllinien induziert werden [1, 395] und damit auch keine Konzentrations-Abhängigkeit der Zellzyklusantwort in UC-Zelllinien vorliegen. Der fehlende G1-Arrest könnte ein Grund dafür sein, dass die antineoplastische Aktivität von HDACi auf UC-Zelllinien so stark ausgeprägt ist. Peart et al. 2003 und 2005 zeigten z.B., dass sich eine p16-Induktion und der dadurch ausgelöste G1-Arrest protektiv auf einen HDACi-vermittelten Zelltod auswirken und dass dieser Effekt u.a. durch eine differentielle Expression einer kleinen Untergruppe von apoptotischen Genen reguliert wird, wie z.B. BCLXL und MYBL2 (*v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2*) [93, 400]. Interessant ist, dass zusätzlich zum G1-Arrest [400] auch ein reversibler G2-Arrest protektiv auf den HDACi-vermittelten Zelltod wirken kann [181, 398]. Zellen, die inkompetent für einen G2-Arrest sind, beispielsweise durch Defekte im G2-Kontrollpunkt, sind dagegen sensitiver gegenüber HDACi. Sie gehen in die mitotische

Phase über und durchlaufen eine aberrante Mitose, die schließlich in fehlerhafter Zytokinese und apoptotischem Zelltod resultiert [181, 401].

Für UC-Zelllinien wurden ebenfalls Defekte im G2-Kontrollpunkt beschrieben, vor allem im Dekatenierungs-G2-Kontrollpunkt [402]. Die Dekatenierung findet vor der Separation der Schwester-Chromatiden während der mitotischen Anaphase statt. Dabei handelt es sich um einen durch Topoisomerase II-katalysierten Prozess, bei dem die beiden bei der Replikation entstandenen DNA-Doppelstränge entfalten werden [402]. Der Dekatenierungs-Kontrollpunkt verzögert den Eintritt in die Mitose, bis die Chromosomen richtig entflochten sind. Fehler in diesem Kontrollpunkt können zu Chromosomenbrüchen und Aneuploidie in den Tochterzellen führen [403]. Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass Kolonkarzinom-Zellen mit Defekten im Dekatenierungs-G2-Kontrollpunkt durch den Einsatz von Topoisomerase II-Inhibitoren selektiv getötet werden können und eine mitotische Katastrophe durchlaufen [404]. Laut den durchgeführten RNA-Expressionsstudien liegt Topoisomerase II in VM-CUB1 Zellen nach Romidepsin-Behandlung reprimiert vor [295]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Prozess auch für die HDACi-Wirkung in UC-Zellen wichtig ist.

Aufgrund dieser Defekte und auf Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Daten, insbesondere der Zellzyklusprofile und der Zellkernmorphologie, kann in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 ebenfalls von einer fehlerhaften Mitose, und nicht von einem echten G2/M-Arrest, ausgegangen werden [295, 301]. Interessant wäre an dieser Stelle zu wissen, ob diese Effekte in UC-Zelllinien transkriptioneller Natur sind oder ob sie überwiegend über Acetylierung von Nicht-Histon-Substraten vermittelt werden. Dies könnte z.B. mit Hilfe eines Transkriptioninhibitors und der Bestimmung des Acetylierungsgrades bekannter Nicht-Histon-Substrate, die in der Mitose eine Rolle spielen, untersucht werden. Darüber hinaus wäre eine umfassende Acetylom-Bestimmung in UC-Zellen nach HDAC-Inhibition sinnvoll.

HDACi-vermittelte Zelltodmechanismen

In dem durch Romidepsin und Givinostat induzierten sekundären Zelltod scheinen sowohl nekrotische als auch apoptotische Prozesse involviert zu sein. So beeinflusste der pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh nach HDACi-Behandlung die Zellviabilität kaum, wohingegen der Nekrose-Inhibitor Necrox-2 teilweise protektiv auf die Zellen wirkte [295]. Mit dem Inhibitor 4SC-202, der zusätzlich HDAC3 hemmt, wurde wiederum im Vergleich zu Romidepsin und Givinostat eine verstärkte Induktion von

Apoptose beobachtet; es wurden eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität und eine stärkere Spaltung von PARP1 induziert. Trotz dieser stärkeren Apoptose-Aktivierung spielen bei 4SC-202 jedoch auch nekrotische Prozesse eine Rolle, charakterisiert durch eine erhöhte LDH-Freisetzung und erhöhte nekrotische Fraktion in den Annexin V/PI-Messungen [301]. Insgesamt scheint der durch 4SC-202 induzierte Zelltodmechanismus Zelllinien-abhängig zu sein. In VM-CUB1 Zellen werden eher apoptotische und in UM-UC-3 Zellen eher nekrotische Prozesse ausgelöst, was durch den Einsatz von Caspase- und Nekrose-Inhibitoren bestätigt werden konnte [301].

Allgemein wird die Induktion von nekrotischen Prozessen durch HDACi nur vereinzelt beschrieben. In Melanom-Zellen, die eine onkogene Mutation im *B-RAF* (*B-Raf proto-oncogene*)-Gen tragen, wird ein nekrotischer Zelltod nach kombinierter Behandlung mit einem B-RAF-Inhibitor und Panobinostat oder SAHA induziert [405]. Durch Givinostat in Kombination mit dem multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib wird synergistisch ROS-abhängige Nekroptose, eine RIPK3 (*receptor interacting serine/threonine kinase 3*)-vermittelte Form der Nekrose [406, 407], ausgelöst [408].

Im kanonischen Wirkmechanismus wird dagegen die antineoplastische Aktivität der HDACi größtenteils auf die Fähigkeit zur Induktion von apoptotischen Prozessen zurückgeführt [103, 409, 410]. Dies wird u.a. über eine Induktion apoptotischer Aktivatoren und Repression apoptotischer Inhibitoren vermittelt [103]. Zu den apoptotischen Aktivatoren, die häufig induziert sind, gehören BIM (*BCL2-interacting mediator of cell death*), BMF (*Bcl2 modifying factor*), NOXA (*PMAIP1, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), BAK1 (*BCL2-antagonist/killer 1*), BAX (*BCL2-associated X protein*), BOK (*BCL2-related ovarian killer*), APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*), FAS, FASLG, BID, TRAIL und TRAILR1/2 (*TNFRSF10A/B, tumor necrosis factor receptor superfamily member 10a/b*). Zu den apoptotischen Inhibitoren, die reprimiert sein können, gehören XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), Survivin, BCL2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*), ZAK (*sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK*), MYBL2, BCL2L2 (*BCL2-like 2*), MCL1 (*myeloid cell leukemia 1*) und c-FLIP [25, 35, 93, 103, 105, 409, 410].

Diese Faktoren liegen teilweise auch in den in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien nach Klasse I HDACi-Behandlung dereguliert vor. Es kann jedoch nicht von einer einheitlichen Induktion oder Repression von pro- bzw. anti-apoptotischen Faktoren gesprochen werden. In beiden Zelllinien (VM-CUB1 und

UM-UC-3) ist nach HDACi-Behandlung die Expression der pro-apoptotischen Faktoren BIM (Romidepsin), TRAILR2 (Romidepsin, Givinostat) und NOXA (VM-CUB1: Givinostat; UM-UC-3: Romidepsin, Givinostat) erhöht. Gleichzeitig wurde ein signifikanter Abfall der anti-apoptotischen Faktoren XIAP (UM-UC-3: Romidepsin), Survivin (VM-CUB1: Romidepsin, Givinostat; UM-UC-3: Givinostat), ZAK (VM-CUB1/UM-UC-3: Romidepsin, Givinostat), MYBL2 (VM-CUB1: Romidepsin) und c-FLIP (VM-CUB1: Givinostat; UM-UC-3: Romidepsin, Givinostat) detektiert. Der apoptotische Inhibitor MCL1 liegt dagegen nach Romidepsin-Behandlung in UM-UC-3 Zellen induziert vor (detaillierte Diskussion siehe Kap. 7.5). Viele der bekannten pro-apoptotischen Faktoren zeigen keine Veränderung, darunter BAX, BAK1 und BMF [295]. Einige der apoptotischen Aktivatoren liegen nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung sogar reprimiert vor, darunter sind FAS (VM-CUB1, UM-UC-3), BID (VM-CUB1, UM-UC-3), TRAIL (VM-CUB1: Romidepsin) und TRAILR1 (VM-CUB1) [295].

Der apoptotische Inhibitor BCL2 scheint in den durchgeführten RNA-Expressionsstudien nicht inhibiert zu werden, jedoch fällt auf, dass der verwandte Faktor BCL2L1 (*BCL2-like 1*) nach der Behandlung mit Givinostat in VM-CUB1 Zellen induziert wird [295]. BCL2L1 kann, aufgrund zweier alternativer Spleißvarianten, entweder anti-apoptotisch (Bcl-xL (*B cell leukemia/lymphoma-extra large*)) oder pro-apoptotisch (Bcl-xS (*B cell leukemia/lymphoma-extra small*)) wirken [411]¹². Die längere Form Bcl-xL wurde schon mit Resistenzmechanismen, Radiosensitivität und der Inhibition eines SAHA-induzierten Zelltods, jedoch auch mit einer Autophagie-Induktion in Zusammenhang gebracht und könnte auch in UC-Zelllinien eine Rolle spielen [186, 412-415].

Ein weiterer interessanter Faktor ist das pro-apoptotische Protein TRPM2 (*transient receptor potential cation channel, subfamily M2*). Cao et al. 2015 bestimmten apoptotische Effekte verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren TSA und Natrium-Butyrat in der UC-Zelllinie T-24 [265]. Durch die Behandlung mit den HDACi wurden Zeit- und Dosis-abhängig Apoptose und ein Anstieg der TRPM2-Expression induziert. Ein Knockdown von TRPM2 verringerte die HDACi-induzierte Apoptose deutlich [265]. In den durchgeführten RNA-Expressionsstudien liegt TRPM2 in VM-CUB1 Zellen nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung dagegen niedriger exprimiert vor

¹² NCBI-Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/598>, RefSeq Dezember 2015, zitiert am 17.09.2016.

[295]. Diese entgegengesetzte Regulation könnte durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren oder durch die unterschiedlichen Zelllinien bedingt sein. Eine Frage, die sich daraus ergibt, ist, ob die Repression von TRPM2 auch in VM-CUB1 Zellen die Apoptose inhibiert und somit möglicherweise zu einer Entstehung des beobachteten Zelltods beiträgt, einer Mischform von apoptotischen und nekrotischen Prozessen.

HDACi-vermittelte DNA-Schäden in UC-Zellen?

Für HDACi wurden neben der besprochenen Induktion einer mitotischen Katastrophe weitere verschieden stark ausgeprägte Störungen in der Mitose beschrieben [181, 388, 416]. Weiterhin wurden Störungen in DNA-Replikation [169, 357] und Zellzyklus-Kontrollpunkten [180, 388, 399] sowie Induktion von DNA-Schäden [349, 357] und die Beeinflussung von Spleißprozessen, mit ungefähr 700 alternativ gespleißten Genen, von denen viele an Zelldifferenzierung und Regulation des Zellzyklus beteiligt sind [60, 417], beobachtet (zit. aus [53]). Diese Effekte können wesentlich auf die Inhibition von HDAC1 und/oder HDAC2 zurückgeführt werden [386, 417-419] (zit. aus [53]). So soll HDAC2 mit dem Spleißosom assoziiert sein [60, 420].

Die beschriebenen Effekte könnten auch in UC-Zellen relevant sein und sollten durch weitere Experimente validiert werden. Eine initiale Untersuchung von möglichen DNA-Schäden, insbesondere DNA-Doppelstrangbrüchen, wurde im Rahmen dieses Projektes nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung mit einer Doppelfärbung von γ H2A.X und 53-BP1 durchgeführt. Dabei wurde eine erhöhte Anzahl von γ H2A.X Foci detektiert, jedoch nur eine niedrige Anzahl korrespondierender 53-BP1 Foci und damit nur wenige „echte“ DNA-Doppelstrangbrüche. Auffällig war dagegen das vermehrte Auftreten von Zellkernen mit einer pan- γ H2A.X-Färbung [295]. Diese Zellkerne könnten Zellen repräsentieren, die nicht in der Lage sind die S-Phase korrekt abzuschließen, passend zu den Zellzyklusprofilen nach 48 Stunden Behandlung, oder solche Zellen, die andere Formen von DNA-Schäden akkumulieren [421]. Eine allgemeine Akkumulation von DNA-Schäden wurde nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 untersucht, konnte jedoch nur in der Zelllinie VM-CUB1 nach 48-stündiger Inkubation mit Givinostat in ausgeprägter Form beobachtet werden (alkalischer Comet-Assay, Daten nicht gezeigt). Für den Inhibitor 4SC-202 wurden dazu noch keine Experimente durchgeführt.

Interessanterweise kann ein PARP1-abhängiger Mechanismus, ausgehend von DNA-Schäden, zu einem nekrotischen Zelltod führen. Die primäre Funktion von PARP1 liegt darin DNA-Schäden zu erkennen und zu reparieren. Dadurch wird in Zellen, in denen DNA-Schäden akkumulieren, wie etwa durch Induktion von oxidativen Stress über HDACi [182, 189, 352-354], eine sehr hohe PARP1-Aktivität und ein damit einhergehender hoher Verbrauch von NAD^+ und schließlich ATP detektiert. Der hohe Energieverbrauch während dieser Prozesse kann zu passivem nekrotischen Zelltod führen [422, 423]. Diese Prozesse können durch Spaltung von PARP1 über Caspasen blockiert werden [423, 424]. Inaktivität von Caspasen lenkt den Zelltod in Richtung Nekrose [423]. Dazu passt die Beobachtung, dass nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung keine relevante Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität in VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen detektiert werden kann. PARP1-Spaltung tritt in beiden Zelllinien verzögert nach 48 Stunden Behandlung auf [295]. Eine Caspase-3/7-unabhängige PARP1-Spaltung wurde schon in anderen Studien beobachtet [363]. In diesem Zusammenhang sollte auch beachtet werden, dass Faktoren, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, in den durchgeführten RNA-Expressionsstudien eher herunter reguliert vorlagen ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S5).

7.4 Weitere Zielmoleküle und Besonderheiten der verwendeten Klasse I HDACi

Zur unterschiedlichen Ausprägung von Effekten zwischen siRNA-vermitteltem Knockdown und pharmakologischer Inhibition sowie zwischen verschiedenen Klasse I HDACi untereinander kann beitragen, dass die Inhibitoren nicht nur HDAC1, 2, 3 und 8, sondern auch andere Zielmoleküle hemmen. Diese zusätzlichen Zielmoleküle können sowohl weitere HDACs, als auch Faktoren von anderen Signalwegen und Regulationssystemen, sein. Im folgenden Kapitel sollen weitere Zielmoleküle und Besonderheiten der verwendeten Klasse I HDACi diskutiert werden.

Compound 5 und compound 6

Die HDAC8-Inhibitoren compound 5 und 6 zeigen im Vergleich zur Inhibition mit compound 2 und zum siRNA-vermittelten Knockdown von HDAC8 stärkere antineoplastische Effekte in UC-Zelllinien (siehe Tab. 5 in Anh. C, [293]). Diese äußern sich in einer stärkeren Inhibition der Klonogenität und Migration, Acetylierung von α -Tubulin und einer erhöhten G2/M-Fraktion [293]. Diese Effekte lassen vermuten, dass

compound 5 und 6 zusätzliche Targets hemmen, darunter vermutlich auch weitere Klasse I HDACs sowie HDAC6.

Krennhrubec et al. 2007 beschreiben, dass durch compound 5 und 6 *in vitro* auch HDAC6 gehemmt wird. Die *in vitro* IC₅₀-Werte für HDAC6 liegen bei über 50 µM [227]. Eine erhöhte Acetylierung von α-Tubulin in UC-Zellen kann allerdings schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen detektiert werden [293]. Diese Diskrepanz weist möglicherweise darauf hin, dass es sich bei compound 5 und 6 um Prodrugs handelt, die innerhalb der Zellen aktiviert werden. Ebenfalls ist es möglich, dass HDAC8 selbst den Prozess der α-Tubulin-Acetylierung beeinflusst, da in UC-Zellen auch nach spezifischem HDAC8-Knockdown eine Zunahme der α-Tubulin-Acetylierung beobachtet werden kann [293]. Die erhöhte G2/M-Fraktion nach Behandlung mit compound 5 und 6 [293] ähnelt den Zellzyklusprofilen, die nach der Behandlung mit den Inhibitoren Romidepsin und Givinostat entstehen [295]. Dies deutet auf eine zusätzliche Inhibition von HDAC1 und 2 hin. Laut Krennhrubec et al. 2007 wird HDAC1 *in vitro* allerdings erst ab Konzentration von über 100 µM inhibiert, was weit oberhalb der in UC-Zelllinien verwendeten Konzentrationen liegt [227, 293]. Für HDAC2 liegen diesbezüglich keine Daten vor.

Givinostat

Für den Klasse I HDACi Givinostat wird in einigen Arbeiten beschrieben, dass auch Klasse II HDACs gehemmt werden [425, 426]. Khan et al. 2008 postulieren, dass Givinostat *in vitro*, zusätzlich zu HDAC1 (IC₅₀ 28 ± 8 nM) und HDAC2 (IC₅₀ 56 ± 13 nM), auch HDAC3 (IC₅₀ 21 ± 3 nM) und die Klasse II HDACs HDAC4 (IC₅₀ 52 ± 5 nM), HDAC6 (IC₅₀ 27 ± 16 nM) und HDAC7 (IC₅₀ 163 ± 8 nM) im nanomolaren Bereich hemmen kann (siehe Tab. 3 in Anh. A, [425]). Dieses alternative Wirkspektrum könnte einige Unterschiede zwischen den beiden Inhibitoren Romidepsin und Givinostat erklären, darunter eine stärkere globale Hyperacetylierung von Histonen nach Romidepsin-Behandlung und eine Induktion der α-Tubulin-Acetylierung nach der Behandlung mit Givinostat [295].

Romidepsin

Für den Inhibitor Romidepsin wird postuliert, dass er *in vitro* zusätzlich zu HDAC1 (IC_{50} 36 ± 16 nM) und 2 (IC_{50} 47 ± 18 nM) [222] PI3 (*phosphatidylinositol* 3)-Kinasen (IC_{50} $57,1$ μ M) inhibiert und somit den PI3K/AKT-Signalweg modulieren kann [427]. Des Weiteren deuten neuere Aktivitätsmessungen darauf hin, dass Romidepsin *in vitro* zusätzlich zu HDAC1 (IC_{50} $0,102$ nM) und 2 (IC_{50} $0,376$ nM) auch die Klasse I HDACs 3 (IC_{50} $0,211$ nM) und 8 (IC_{50} $24,6$ nM) und HDACs der Klassen IIa (IC_{50} $1,16 - 314$ nM), IIb (IC_{50} $0,133$ (HDAC10) und 488 (HDAC6) nM) und IV (IC_{50} $0,407$ nM) inhibiert [428]. Geht man von diesen *in vitro* IC_{50} -Werten aus, sollten unter der in dieser Arbeit für die Behandlung der Zellen verwendeten Romidepsin-Konzentration (3 nM) folgende HDACs gehemmt werden: 1, 2, 3, 5, 10 und 11. Ob diese Isoenzyme in UC-Zellen tatsächlich gehemmt werden und welche Auswirkungen ihre gemeinsame Inhibition hätte, kann an dieser Stelle unter der gegebenen Datenlage nicht weiter spezifiziert werden.

In zellulären Systemen kann eine PI3K-Inhibition durch 5 μ M Romidepsin, aber nicht durch $0,5$ μ M Romidepsin detektiert werden [427]. Die zellulären IC_{50} -Werte für Romidepsin in den untersuchten UC-Zelllinien liegen zwischen $3,36$ und $6,47$ nM (72 Stunden) [295], wohingegen die *in vitro* IC_{50} -Werte für Romidepsin nach Furumai et al. 2002 [222] höher sind. Weiterhin sind die zellulären *in vitro* IC_{50} -Werte von Romidepsin deutlich niedriger als die der Klasse I HDACi Givinostat, Entinostat und Mocetinostat [295].

Der wesentliche Grund für die vergleichsweise niedrigen IC_{50} -Werte liegt darin, dass Romidepsin eine Prodrug ist, deren aktive Form erst in den Zellen generiert wird [222]. Romidepsin wird in den Zellen durch Glutathion-abhängige Reduktion einer Disulfidbindung metabolisch aktiviert. Die niedrigeren *in vitro* IC_{50} -Werte der aktiven Form (IC_{50} HDAC1 1.6 ± 0.9 nM; HDAC2 3.9 ± 2.7 nM) im Vergleich zum nicht metabolisierten Romidepsin [222] könnten auch die Diskrepanz zwischen dem hohen *in vitro* IC_{50} -Wert für PI3-Kinasen ($57,1$ μ M) und dem niedrigeren Wert, bei dem eine zelluläre Inhibition von PI3K beobachtet werden kann, erklären [427]. Da in dieser Arbeit zur Untersuchung von Romidepsin in UC-Zelllinien eine sehr niedrige Konzentration von 3 nM eingesetzt wurde, kann eine direkte Inhibition von PI3K ausgeschlossen werden, denn in den von Saijo et al. 2012 untersuchten Zellen konnte erst ab einer Konzentration von 5 μ M ein eindeutiger Effekt auf PI3K detektiert werden

[427]. Außerdem können in den mit Romidepsin durchgeführten RNA-Expressionsarrays zwar signifikante Deregulationen von PI3K/AKT-assoziierten Faktoren beobachtet werden, jedoch liegen viele dieser Faktoren auch nach einer Behandlung mit Givinostat und dem pan-HDACi SAHA dereguliert vor ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S5).

4SC-202

Für den neuen Inhibitor 4SC-202 [226], der unter den HDACs *in vitro* vor allem HDAC1 (IC₅₀ 155 nM), HDAC2 (IC₅₀ 371 nM) und HDAC3 (IC₅₀ 130 nM) inhibiert [301], werden ebenfalls weitere Zielmoleküle und die Hemmung alternativer Signalwege postuliert. Zusätzlich soll durch 4SC-202 die Lysin-spezifische Demethylase LSD1, die Bestandteil verschiedener HDAC-Multiproteinkomplexe wie NuRD und CoREST ist (siehe Abb. 3), inhibiert werden (*in vitro* IC₅₀ 0,6 – 1,2 µM)¹³.

LSD1 zeigt im Vergleich zum Normalgewebe eine gesteigerte Expression im UC und eine pharmakologische Inhibition von LSD1 mit dem (relativ unspezifischen) Inhibitor Tranylcypromin [429] resultiert in einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation der UC-Zelllinien HTB1, HTB3, HTB5 und HT1376 [430, 431] (zit. aus [432]). Des Weiteren wurde die Funktion von LSD1 und die möglichen Auswirkungen einer LSD1-Inhibition in UC-Zelllinien im Rahmen eines anderen Projektes des urologischen Forschungslabors untersucht (Hoffmann et al. nicht publiziert). In diesem Projekt zeigte die selektivere Inhibition von LSD1 mit dem Inhibitor SP2509 in UC-Zellen keine ausgeprägten antineoplastischen Effekte. Für diesen Inhibitor wurden demgegenüber bereits verschiedene signifikante Effekte in AML-Zellen nachgewiesen. Dazu gehört eine Zunahme der H3K4-Trimethylierung an spezifischen Promotoren von Zielgenen, erhöhte Expression von p21 und p27, reduziertes klonogenes Wachstum und morphologische Veränderungen [305]. Um eine Aussage darüber zu treffen in welchem Maße die durch 4SC-202 vermittelte Inhibition von LSD1 zur beobachteten Wirkung des Inhibitors in UC-Zellen beiträgt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Kombinationsexperimente mit dem LSD1-Inhibitor SP2509 und dem Klasse I HDACi Romidepsin durchgeführt und direkt mit 4SC-202 verglichen [301] (Details siehe Kap. 5). Eine alleinige Behandlung der UC-Zelllinien mit SP2509 hatte, wie durch die Voruntersuchungen von Hoffmann et al. zu erwarten, im Vergleich zur Behandlung mit

¹³ Daten wurden von 4SC beim "6th Annual EpiCongress 2015" (Boston, USA) im Juli 2015 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

Romidepsin nur marginale antineoplastische Effekte auf VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen [301]. Eine kombinierte Behandlung mit SP2509 und Romidepsin hingegen induzierte in UC-Zellen eine gesteigerte Beeinträchtigung der Viabilität und Klonogenität und stärkere Zellzyklusstörungen im Vergleich zur einzelnen Inhibition der Zielmoleküle. Dabei scheint die zusätzliche LSD1-Inhibition die Wirkung von Romidepsin nicht deutlich zu potenzieren, sondern diese eher zu beschleunigen [301]. In AML-Zellen konnte ebenfalls ein synergistischer Effekt zwischen SP2509 und dem pan-HDACi Panobinostat nachgewiesen werden [305].

Darüber hinaus wurde eine Beeinflussung der Signalwege WNT und Hedgehog durch 4SC-202 beschrieben¹⁴. Obwohl sowohl für den WNT- [433-438] als auch für den Hedgehog-Signalweg [439-444] veränderte Regulationen und wichtige Funktionen im UC postuliert wurden, konnten in Experimenten keine Aktivitätsveränderungen der Signalwege nach HDACi-Behandlung detektiert werden (Daten nicht gezeigt), im Einklang mit älteren Daten von Thievensen et al. 2003/2005 [445, 446]. Grundsätzlich konnte jedoch bereits für einige Entitäten gezeigt werden, dass eine kombinierte Inhibition der HDAC- und Hedgehog-Aktivität synergistische antineoplastische Effekte hat [447, 448].

Entwicklung selektiverer HDACi

Mit einer vielversprechenden Methode zur Entwicklung neuer selektiver HDACi und der Bestimmung genauer Spezifitäten und Kinetiken vorhandener HDACi [70, 172] könnten möglicherweise *Off-Target*-Effekte, vermittelt durch die Inhibition unbekannter Faktoren und zusätzlicher HDACs, vermindert werden. Diesem Ansatz liegt der Gedanke zugrunde, dass sich die Affinität und Bindungskinetik von HDACi gegenüber nativen HDAC-Multiproteinkomplexen, den tatsächlichen *in vivo*-Zielmolekülen, von der Affinität und Bindungskinetik zu biotechnologisch hergestellten Deacetylasen, mit denen üblicherweise die *in vitro* IC₅₀-Werte bestimmt werden, unterscheiden kann [60, 70, 172]. Die chemoproteomische Methode ermöglicht *in vitro* zu bestimmen, ob Inhibitoren unterschiedliche Affinitäten und Bindungskinetiken zu endogenen HDAC-Multiproteinkomplexen haben, obwohl in diese Komplexe die gleichen HDACs inkorporiert sind, wie es z.B. bei den präferentiellen HDAC1/2-Komplexen Sin3, NuRD

¹⁴ Daten wurden von 4SC beim „MMC Cancer Stem Cell Symposium 2014“ (San Francisco, USA) im Februar 2014 und beim „Keystone Symposium Stem Cells and Cancer 2014“ (Banff, Kanada) im Februar 2014 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

und CoREST der Fall ist (siehe Abb. 3). Eine weitere interessante Methode stellten Robers et al. 2015 vor [232]. Bei dieser Methode wird die BRET-Technologie verwendet, um die Bindungseigenschaften von Substanzen an verschiedenen spezifischen Zielproteinen in intakten Zellen zu messen. Diese beiden Methoden könnten angewendet werden um herauszufinden, warum HDACi, die die gleichen Isoenzyme hemmen, unterschiedliche Effekte auf Zielgene haben.

Für dieses Phänomen könnten zudem Experimente eine Erklärung liefern, bei denen die Acetylierungsmuster nach Applikation diverser HDACi bestimmt wurden [221]. Demnach vermitteln viele HDACi die Acetylierung eines kleinen spezifischen Unteranteils des Acetyloms (Ø 6,2 %), bestehend aus nukleären, cytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinen. Dieser Anteil kann sich zwischen verschiedenen HDACi stark unterscheiden. Der Klasse I HDACi Entinostat vermittelt z.B. im Gegensatz zum pan-HDACi SAHA eine verstärkte Acetylierung von nukleären Proteinen, wohingegen SAHA im Verhältnis vermehrt cytoplasmatische Proteine acetyliert [221].

7.5 RNA-Expressionsstudien - Differentiell exprimierte Faktoren nach HDAC-Inhibition in UC-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur genauen Charakterisierung der durch HDAC1/2-Inhibition ausgelösten Prozesse aufwändige RNA-Expressionsanalysen durchgeführt [295]. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse hinsichtlich einzelner interessanter Faktoren diskutiert. Dabei wird ein Schwerpunkt auf Entitäten-übergreifende Faktoren gesetzt, die durch Vergleich mit RNA-Expressionsstudien von HDACi-behandelten Zellen anderer Karzinome identifiziert wurden.

In dieser Arbeit wurden RNA-Expressionsveränderungen in den beiden UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Knockdown sowie nach pharmakologischer HDAC-Inhibition mit Romidepsin, Givinostat oder SAHA untersucht. Anschließend wurden die differentiell exprimierten Gene durch GO-Datenbankanalysen mittels DAVID-Software hinsichtlich ihrer Funktion analysiert. Die RNA-Expressionsstudien und die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung werden im Kapitel 4.1 diskutiert und können im Detail der Abbildung S2 im Kapitel 4.2 entnommen werden [295].

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung nochmal kurz zusammengefasst werden. In den beiden Versuchsansätzen und innerhalb der beiden Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 lagen insgesamt sehr viele Transkripte differentiell exprimiert vor. Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Arten der HDAC1/2-Modulation in VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen ist eine differentielle Regulation von Zellzyklus- und Zelltodmechanismen. Nach HDACi-Behandlung kommt es überwiegend zur Deregulation von Zellzyklus-assoziierten Transkripten. Nach HDAC1/2-Doppelknockdown liegen vermehrt diejenigen Transkripte dereguliert vor, die an der Regulation von verschiedenen Zelltodmechanismen beteiligt sind ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Abb. S2F).

Zwischen den verschiedenen Zelllinien und den beiden HDAC-Modulationsformen (HDAC1/2 siRNA, Romidepsin, Givinostat) variiert die Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte sehr stark (Abb. 15). Während in der Zelllinie VM-CUB1 3449 differentiell exprimierte Transkripte nach HDAC1/2-Knockdown detektiert wurden, lagen in den UM-UC-3 Zellen mehr als doppelt so viele Transkripte (7036) dereguliert vor (Abb. 15). Dem steht gegenüber, dass in der Zelllinie VM-CUB1 insgesamt mehr Transkripte durch die pharmakologische Inhibition mit Romidepsin und Givinostat beeinflusst wurden als in der Zelllinie UM-UC-3. Dies spiegelt sich z.T. in der Analyse der zellulären Eigenschaften nach HDACi-Behandlung und HDAC1/2-Knockdown wider, da die Zelllinie VM-CUB1 insgesamt etwas empfindlicher auf die HDACi reagierte als die Zelllinie UM-UC-3. Umgekehrt scheint die Zelllinie UM-UC-3 sensitiver auf den HDAC1/2-Knockdown zu reagieren [295].

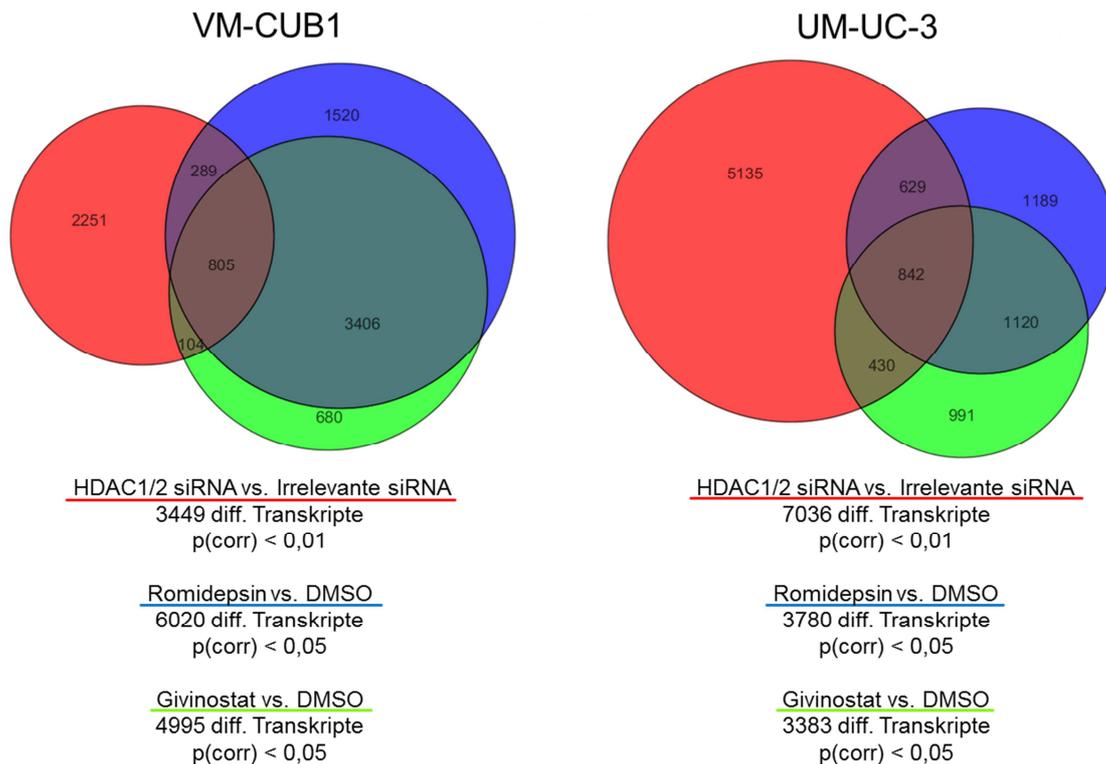


Abbildung 15: Übersicht über die Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Doppelknockdown und nach Klasse I HDACi-Behandlung mit Romidepsin und Givinostat. Die gemeinsamen (Schnittmengen) und individuellen Transkripte der drei verschiedenen Behandlungsoptionen wurden innerhalb einer Zelllinie ausgewertet. Die Daten des siRNA-vermittelten HDAC1/2-Doppelknockdowns sind nach Benjamini-Hochberg FDR ($p(\text{corr})$ -Wert $< 0,01$) und die Daten der HDACi-Behandlungen nach Bonferroni FWER ($p(\text{corr})$ -Wert $< 0,05$) adjustiert.

Aufgrund der hohen Anzahl der beeinflussten Transkripte ist es sehr schwierig, zusätzlich zu der bereits vorgestellten globalen funktionellen Auswertung ([295], siehe Kap. 4), eine Analyse für einzelne Faktoren durchzuführen. Aus diesem Grund sollen an dieser Stelle ausgewählte auffällige Faktoren diskutiert werden. Die Auswahl erfolgte aufgrund der Stärke ihrer Deregulation und der Häufigkeit, mit der sie insgesamt in den durchgeführten Expressionsstudien vorkommen. Ein weiteres wichtiges Kriterium war, ob diese Gene bereits im UC oder anderen Karzinomentitäten nach HDACi-Behandlung aufgefallen waren. Dabei sollen Faktoren diskutiert werden, die einerseits durch eine pharmakologische Inhibition beeinflusst wurden und andererseits solche, die in UC-Zellen sowohl nach pharmakologischer als auch nach siRNA-vermittelter Inhibition verändert sind. Eine Gesamtübersicht solcher differentiell exprimierten Transkripte ist in den Tabellen S5 und S6 von Kapitel 4.2 zusammengestellt [295].

Tabelle S5 ordnet die differentiell veränderten Transkripte nach HDACi-Behandlung (Romidepsin, Givinostat und SAHA) verschiedenen zellulären Prozessen zu. Zusätzlich werden in dieser Tabelle differentiell exprimierte HDACs, Histone und Bestandteile von HDAC-Komplexen zusammengefasst. In Tabelle S6 sind diejenigen Transkripte aufgelistet, die in beiden Zelllinien (VM-CUB1 und UM-UC-3) sowohl nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Knockdown als auch nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung differentiell exprimiert vorliegen. Diese Schnittmenge enthält 167 Transkripte, die insgesamt 125 Gene repräsentieren ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Abb. S2F). Die funktionelle Analyse dieser Transkripte deutet darauf hin, dass beide Modulationsansätze gemeinsam Zellzyklusprozesse, Zellproliferation, Zelltodmechanismen und immunrelevante Prozesse regulieren.

Um eine Auswahl wichtiger differentiell induzierter Faktoren zu ermöglichen, wurden die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien mit einer Auswahl von Publikationen verglichen. Diese Publikationen zeichnen einerseits dadurch aus, dass die RNA-Expression verschiedener Zelllinien, teilweise aus unterschiedlichen Entitäten, nach pharmakologischer HDAC-Inhibition verglichen wird und gemeinsam regulierte Gene bestimmt werden, und andererseits dadurch, dass verschiedene HDACi miteinander verglichen werden. Der Vergleich der Expressionsdaten mit diesen Publikationen soll dazu dienen, Entitäten-übergreifende Faktoren zu definieren, die durch HDACi beeinflusst werden. Teilweise beinhalten diese Studien bereits einen Vergleich zwischen einer UC-Zelllinie und Zellen aus einer anderen Entität.

In Tab. 1 ist eine Übersicht über diese Expressionsstudien und die gemeinsam regulierten Faktoren gegeben.

Tabelle 1: Übersicht der verglichenen RNA-Expressionsstudien nach pharmakologischer HDAC-Inhibition. Zur Identifikation von Genen, die Entitäten-übergreifend durch HDACi reguliert werden, wurden die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien mit den in der Tabelle dargestellten Expressionsstudien verglichen. Die Spalte „Gemeinsam regulierte Gene“ gibt eine Auswahl derjenigen Faktoren an, die in den verglichenen Expressionsstudien gleichermaßen in allen Zelllinien und mit allen Inhibitoren differentiell reguliert waren und gleichzeitig in den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsarrays vertreten sind. Sterne (*) geben an, dass diese Faktoren in allen Versuchsbedingungen (HDAC1/2-Knockdown, Romidepsin und Givinostat) und Zelllinien (VM-CUB1 und UM-UC-3) der in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien dereguliert sind (siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S6). Die fett dargestellten Gene sind in mehr als einer verglichenen Publikation vertreten.

| HDACi | Zellen | Gemeinsam regulierte Gene | Ref. |
|---------------------------|---|--|---------------------|
| SAHA Romidepsin | CEM Jurkat | ↑ ID2 , ↑ <i>CCNG1/2</i> , ↑ <i>CDC37</i> , ↑ <i>CDK2</i> , ↑ <i>CDC25C</i> , ↓ <i>CCNB2</i> , ↓ <i>CDC7</i> , ↓ <i>MCM3/5/7</i> , ↓ CDK2API , ↓ <i>CCNE2</i> , ↑ <i>BNIP3L</i> , ↑ MCL1 , ↑ <i>DAPK3</i> , ↑ <i>GADD45B</i> , ↑ <i>TNFSF9</i> , ↑ <i>NGFR</i> , ↓ CRADD | [93] ¹⁵ |
| KBH-A42 | K562 <u>UM-UC-3</u> | ↑ <i>BIRC3</i> , ↑ <i>CD70</i> , ↑ CRADD , ↑ MCL1 , ↑ <i>TNFRSF10B</i> , ↑ <i>TNFRSF25</i> , ↓ <i>CARD6</i> | [264] ¹⁶ |
| SAHA TSA Entinostat | MDA468 und 435 [449] <u>T-24</u> | ↑ CDKN1A* , ↑ <i>FUCA1</i> , ↑ <i>TRPM2</i> , ↑ <i>TUBA1A</i> , ↑ <i>GLRX*</i> , ↓ TYMS (TS) , ↓ KPNB1 , ↓ <i>CTPS1</i> | [261] ¹⁷ |
| SAHA Panobinostat | HCT116 HT29 | ↑ DHRS2 , ↑ <i>ARRDC4</i> , ↑ <i>HIST1H2BD</i> , ↑ <i>MT1X*</i> , ↑ <i>RGL1</i> , ↓ TYMS (TS) , ↓ <i>CDCA7</i> , ↓ UNG* , ↓ <i>NFKB1</i> , ↓ IRAK1 | [450] ¹⁸ |
| TSA | HLE HuH7 Hep3B HepG2 PLC HuH6 Hepatozyten | ↑ CDKN1A* , ↑ <i>RRM2</i> , ↑ <i>DUSP1</i> , ↑ CLU , ↑ <i>STAT1</i> , ↑ <i>CYR61*</i> , ↑ <i>GRN*</i> , ↑ <i>CTGF*</i> , ↑ <i>H3F3B</i> , ↑ <i>H1F0</i> , ↑ <i>HADHB</i> , ↑ DHRS2 , ↑ <i>SQSTM1</i> , ↑ <i>TGM2</i> , ↑ ID2 , ↑ <i>OPTN</i> , ↑ <i>SDC4</i> , ↑ <i>BSG</i> , ↑ <i>TXNRD1</i> , ↑ <i>CYP4F2</i> , ↑ <i>DNAJB1</i> , ↑ <i>BSCL2</i> | [451] ¹⁹ |

¹⁵ Akute lymphatische Leukämie

¹⁶ K562 - Chronische myeloische Leukämie; UM-UC-3 - Urothelkarzinom der Harnblase

¹⁷ MDA 468 – Adenokarzinom der Brust, MDA435 – Melanom, ursprünglich fälschlicherweise als Mammakarzinom beschrieben; T-24 - Urothelkarzinom der Harnblase

¹⁸ Kolorektalkarzinom

¹⁹ Leberzellkarzinom

Fortsetzung Tabelle 1

| HDACi | Zellen | Gemeinsam regulierte Gene | Ref. |
|-----------------------------|----------------|---|---------------------|
| Belinostat Valproinsäure | HeLa | ↓ <i>TYMS (TS)</i> , ↑ <i>SAT1</i> , ↑ <i>CDKN1A*</i> , ↓ <i>CCNB1</i> , ↓ <i>CCND1</i> , ↑ <i>CCND2</i> , ↓ <i>FAIM*</i> , ↑ <i>BIM</i> , ↑ <i>RASGRP2</i> , ↓ <i>MINA*</i> , ↓ <i>TGFA</i> , ↓ <i>KPNB1</i> , ↑ <i>PDK4</i> , ↑ <i>ATP10D</i> | [452] ²⁰ |
| BL1521 | IMR32 SKNAS | ↑ <i>CLU</i> , ↑ <i>PHLDA2</i> , ↓ <i>CSEIL</i> , ↓ <i>TIA1</i> , ↑ <i>GULP1</i> , ↓ <i>POGK*</i> , ↓ <i>BID</i> , ↓ <i>CDKN1B</i> , ↓ <i>SKP2</i> , ↓ <i>ILF3</i> , ↓ <i>CDK2API</i> , ↓ <i>CCND1</i> , ↓ <i>BCAT1*</i> , ↓ <i>TUBGCP3</i> , ↓ <i>RAN</i> , ↓ <i>IVNSIABP</i> , ↓ <i>STAG2</i> , ↓ <i>CENPF</i> , ↓ <i>POLE3</i> , ↓ <i>CTCF</i> , ↓ <i>CCNB1</i> , ↓ <i>TLK1</i> , ↓ <i>PLK1</i> , ↓ <i>CENPA</i> , ↓ <i>STAG1</i> , ↓ <i>RFC5</i> , ↓ <i>CDK4</i> , ↑ <i>SERPIN1</i> , ↑ <i>GATA3</i> , ↓ <i>CDK5R1</i> , ↓ <i>DAZAP1</i> , ↓ <i>TPM4</i> , ↑ <i>EGR1</i> , ↑ <i>FOS</i> , ↑ <i>ELL2</i> , ↑ <i>SOX9</i> , ↑ <i>PTRF</i> , ↓ <i>HNRNPA3</i> , ↓ <i>U2AF2</i> , ↓ <i>ADNP</i> , ↓ <i>OIK1</i> , ↓ <i>ANP32B*</i> , ↓ <i>BRD1</i> , ↓ <i>ATF1</i> , ↓ <i>HSPB1</i> , ↓ <i>PTBP2</i> , ↓ <i>CREBBP</i> , ↓ <i>SYNCRIP</i> , ↓ <i>BAZ1A</i> , ↓ <i>ARID1A</i> , ↓ <i>E2F-3</i> , ↓ <i>PHF2</i> , ↓ <i>NFIB</i> , ↓ <i>PTBP1</i> , ↓ <i>DICER1</i> , ↓ <i>SMARCB1</i> , ↓ <i>HMGB3</i> , ↓ <i>E2F-5</i> , ↓ <i>TFDPI</i> , ↓ <i>TCF12</i> , ↓ <i>H2AFY2</i> , ↓ <i>FOXM1</i> , ↓ <i>EWSR1</i> , ↓ <i>MEIS1</i> , ↓ <i>MEIS2</i> , ↓ <i>TRIP13</i> , ↑ <i>IGFBP3</i> , ↓ <i>HDGFRP3*</i> , ↓ <i>TGFBIII</i> , ↓ <i>HDGF</i> , ↓ <i>MKI67</i> , ↑ <i>ALDOC</i> , ↑ <i>NEU1*</i> , ↑ <i>BLVRB</i> , ↑ <i>P4HA2</i> , ↓ <i>SEPHS1</i> , ↓ <i>PAIP1</i> , ↓ <i>CTBP2</i> , ↓ <i>UNG*</i> , ↓ <i>UBE2E3</i> , ↓ <i>UBQLN2</i> , ↓ <i>USP7</i> , ↓ <i>UBE2E1</i> , ↓ <i>SIAH1</i> , ↓ <i>UBE2J1</i> , ↓ <i>CTBP1</i> , ↓ <i>DCK</i> , ↓ <i>ADSS</i> , ↓ <i>FKBP4</i> , ↓ <i>SEN6*</i> , ↓ <i>TYMS (TS)</i> , ↓ <i>MTMR1*</i> , ↓ <i>MRPL9</i> , ↓ <i>CAD</i> , ↑ <i>ERBB3</i> , ↑ <i>NDRG1</i> , ↑ <i>PCDH9*</i> , ↑ <i>ADM</i> , ↑ <i>STC1</i> , ↑ <i>DUSP5</i> , ↑ <i>CXCR4</i> , ↑ <i>ENPP2</i> , ↑ <i>RGS16</i> , ↓ <i>ZNF532</i> , ↓ <i>ANP32E</i> , ↓ <i>ANP32A</i> , ↓ <i>WSB2</i> , ↓ <i>TRIM8</i> , ↓ <i>ITPKB</i> , ↓ <i>HMMR</i> , ↓ <i>TIMELESS</i> , ↓ <i>RHOBTB3</i> , ↓ <i>IRAK1</i> , ↑ <i>MAP1LC3B</i> , ↓ <i>TMPO</i> , ↓ <i>LAMB1</i> , ↓ <i>DLG5</i> , ↓ <i>LMNB1</i> , ↓ <i>CKAP4</i> , ↓ <i>PNN</i> , ↓ <i>NEXN</i> , ↓ <i>SERPINH1</i> , ↓ <i>COIL</i> , ↓ <i>SLC38A1</i> , ↓ <i>KPNB1</i> , ↓ <i>SLC25A13</i> , ↑ <i>NBEA</i> , ↓ <i>SLC7A1</i> , ↓ <i>LUC7L2</i> , ↓ <i>KIAA0368*</i> | [453] ²¹ |

Die Gene *CDKN1A* (*p21*), *TYMS* (*TS*), *MCL1*, *CRADD* (*CASP2/RIPK1 domain containing adaptor with death domain*), *DHRS2* (*dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2*), *ID2* (*inhibitor of DNA binding 2*), *CDK2API* (*cyclin dependent kinase 2 associated protein 1*), *KPNB1* (*karyopherin subunit beta 1*), *IRAK1* (*interleukin 1 receptor associated kinase 1*), *CCNB1* (*Cyclin B1*), *CCND1* (*Cyclin D1*), *CLU* (*clusterin*) und *UNG* (*uracil DNA glycosylase*) liegen in mehreren verglichenen Publikationen und den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien verändert exprimiert vor. Die Faktoren *CDKN1A*, *GLRX* (*glutaredoxin*), *MTIX* (*metallothionein 1X*), *UNG*, *CYR61* (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*), *GRN* (*granulin*), *CTGF*, *FAIM* (*Fas apoptotic inhibitory molecule*), *MINA* (*MYC induced nuclear antigen*), *POGK* (*pogo transposable element with KRAB domain*), *BCAT1* (*branched chain amino acid transaminase 1*),

²⁰ Zervixkarzinom²¹ Neuroblastom

ANP32B (acidic nuclear phosphoprotein 32 family member B), *HDGFRP3* (hepatoma-derived growth factor, related protein 3), *NEU1* (neuraminidase 1), *SENP6* (SUMO1/sentrin specific peptidase 6), *MTMR1* (myotubularin related protein 1), *PCDH9* (protocadherin 9) und *KIAA0368* sind in den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien nicht nur in den HDACi-behandelten Zellen verändert, sondern auch in den Zellen mit siRNA-vermittelten HDAC1/2-Knockdown. Dies deutet darauf hin, dass diese Gene in verschiedenen Entitäten spezifisch über HDAC1 und 2 reguliert werden. Der Faktor *CTGF* ist besonders auffällig, da er nach HDACi-Behandlung in der Zelllinie HCT116 derjenige mit der höchsten Überexpression war [450], in fast allen Leberzellkarzinom-Zelllinien induziert wurde [451] und in UC-Zellen bei allen Versuchsbedingungen (HDACi, siRNA) überexprimiert vorlag ([295], siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S6).

Fügt man diesen Zelllinien-basierten Daten RNA-Expressionsstudien eines *in vivo*-Modells hinzu, können weitere interessante Entitäten-übergreifende Faktoren identifiziert werden [260]. Buckley et al. 2007 haben *HRAS*-transgene Mäuse mit oberflächlichen Harnblasentumoren mit dem HDACi Belinostat behandelt. Anschließend wurden die Blasentumore mittels RNA-Expressionsstudien analysiert [260]. Faktoren, die bereits in den Zelllinien-basierten Daten vertreten sind, einschließlich in den Untersuchungen in UC-Zellen, und auch in den Maustumoren dereguliert vorliegen, sind *CDKN1A*, *ANP32B*, *FUCA1* (fucosidase alpha-L-1), *KPNB1*, *HDGF* (hepatoma-derived growth factor) und *CLU*. Ein interessanter Faktor dabei ist *ANP32B*, da er in den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien nicht nur in den HDACi-behandelten Zellen dereguliert ist, sondern auch in den Zellen mit siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Knockdown [295]. Aus diesen Analysen wird deutlich, dass spezifische Gene nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* durch HDACi reguliert werden können.

Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien ist auch die Analyse von Li et al. 2016 interessant [234]. In dieser Studie wurde die UC-Zelllinie 5637 mit Romidepsin oder TSA behandelt und einer ausführlichen Proteomanalyse unterzogen. Romidepsin wurde auch im Rahmen dieser Arbeit zur Behandlung von UC-Zellen verwendet [295]. Daher kommt die Frage auf, welche auf RNA-Ebene beobachteten Expressionsveränderungen in VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen, ebenfalls auf Proteinebene in 5637 Zellen nach Romidepsin- und TSA-Behandlung detektiert werden können. Im Folgenden werden Faktoren aufgelistet, die innerhalb der verglichenen

Datensätze sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gleichermaßen dereguliert sind. Dabei wird zwischen induzierten und reprimierten Faktoren unterschieden. Wenn nicht explizit anders angegeben liegen die aufgelisteten Faktoren in 5637 Zellen auf Proteinebene sowohl nach Romidepsin- als auch nach TSA-Behandlung differentiell exprimiert vor.

Induziert: TRADD (*TNFRSF1A associated via death domain*, nur durch Romidepsin), PIK3C3 (*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*).

Reprimiert: **CCNB1**, **CCNB2** (Cyclin B2), CDC20 (*cell division cycle 20*), **PLK1** (*polo like kinase 1*), MCM4, **MCM5**, ORC1 (*origin recognition complex subunit 1*), RAD21 (*RAD (radiation) 21 cohesin complex component*), SMAD3 (*SMAD family member 3*), SMC1A (*structural maintenance of chromosomes 1A*), **STAG1** (*stromal antigen 1*), **STAG2**, IL1B (*interleukin 1 beta*), **NFKB1** (*nuclear factor kappa B subunit 1*), PRKAR1B (*protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit β*), LIG3 (*DNA ligase 3*), PARP2 (*poly (ADP-ribose) polymerase 2*), DDB2, CUL4A (*cullin 4A*), NBN* (*nibrin*), RBBP8 (*RB binding protein 8*), MUS81 (*MUS81 structure-specific endonuclease subunit*), XRCC5 (*X-ray repair cross complementing 5, Ku80 (Lupus Ku autoantigen protein p80)*), RIF1 (*replication timing regulatory factor 1*).

Der Faktor NBN liegt in allen Versuchsbedingungen (HDAC1/2-Knockdown, Romidepsin und Givinostat) und Zelllinien (VM-CUB1 und UM-UC-3) der in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien dereguliert vor. Die fett dargestellten Faktoren sind auf RNA-Ebene auch in anderen Entitäten nach HDACi-Behandlung differentiell exprimiert (Vergleich mit Tab. 1). Auffällig ist, dass nach HDACi-Behandlung deutlich mehr gemeinsame Faktoren identifiziert werden konnten, die in 5637 Zellen auf Proteinebene herunter als herauf reguliert sind. Des Weiteren scheinen viele der reprimierten Faktoren mit der Regulation des Zellzyklus assoziiert zu sein, wie z.B. CCNB1, CCNB2, CDC20, MCM4 und MCM5. Das herauf regulierte Protein TRADD ist dagegen ein pro-apoptischer Faktor.

Darüber hinaus sind besonders folgende Gene, die nicht in den verglichenen Publikationen vertreten waren, aufgrund ihrer starken Deregulation sowohl nach HDAC1/2-Knockdown als auch nach Romidepsin- und Givinostat-Behandlung in beiden Zelllinien aufgefallen (siehe Kap. 4.2 Supplements Publikation 2, Tab. S6):

Induziert: *REEP6* (*receptor accessory protein 6*), *FAM117A* (*family with sequence similarity 117, member A*), *RAB40B* (*RAB (Ras-related in brain) 40B*), *HES6* (*hairly and enhancer of split 6*) und *SOX4* (*SRY (sex determining region Y)-box 4*).

Reprimiert: *NMI* (*N-myc (and STAT) interactor*), *PLAU* (*plasminogen activator, urokinase*), *PSMB10* (*proteasome subunit, beta type, 10*) und *ZMYM6* (*zinc finger, MYM-type 6*).

Im Folgenden wird eine Auswahl bestimmter Gene hinsichtlich ihrer möglichen Relevanz und Funktion nach HDAC-Inhibition diskutiert.

P21/CDKN1A – cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

Der Zellzyklus-Regulator p21 ist ein Faktor, der in fast allen Gruppen vertreten ist und dessen Re-Expression einen etablierten Marker der HDAC-Inhibition in verschiedenen Entitäten darstellt [22, 41, 103, 325] (siehe Tab. 2B). Aus diesem Grund wird die Induktion von p21 mittlerweile auch zur Entwicklung und zum Screening spezifischer HDACi genutzt [454, 455]. Die HDACi-vermittelte p21-Expression reguliert wichtige Prozesse, darunter Zellzyklusarrest (G1 oder G2/M), Apoptose, Zellproliferation, Seneszenz, Resistenzmechanismen und Differenzierung [325] (siehe Tab. 2C). Für die HDACi-vermittelte p21-Induktion und die damit assoziierten Effekte wurden einige Mechanismen beschrieben. Eine Auswahl dieser Mechanismen ist in Tabelle 2D dargestellt. Man kann zwischen Mechanismen unterscheiden, die durch weitere Interaktionspartner reguliert werden und solchen, die von der p21-Expression bzw. -Lokalisation selbst abhängen. Bekannte Interaktionspartner, die an der Regulation der HDACi-vermittelten p21-Induktion beteiligt sind, sind z.B. HDAC1, HDAC2, CK2, Sp1, Sp3 (*Sp3 transcription factor*), p300, ATF3, H2A.Z (*H2A histone family member Z*), p400, STAT1/3/5, EZH2, MAP-Kinasen und p53 (siehe Tab. 2D für Quellen und genaue Mechanismen). Durch diese Interaktionen werden verschiedene Prozesse reguliert, darunter Rekrutierung und Bindung von Aktivatoren oder Korepressoren an den p21-Promotor, *CDKN1A*-Histon H3-Phosphorylierung und De-Kondensation des Chromatins durch Hyperacetylierung und Hypermethylierung des *CDKN1A*-Promotors.

Der Tumorsuppressor p53 nimmt dabei eine Sonderrolle ein, da für die HDACi-vermittelte p21-Induktion sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige Mechanismen beschrieben sind.

Die p21-Lokalisation und -Expression spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der HDACi-vermittelten p21-Induktion und die Art und Ausprägung der dadurch ausgelösten Effekte (siehe Tab. 2D). Die Untersuchungen von Mensah et al. 2015 geben beispielsweise Hinweise darauf, dass die basale p21-Expression darüber entscheidet, bei welchen HDACi-Konzentrationen ein Zellzyklusarrest oder Zelltodmechanismen induziert werden [456]. Zellen mit einer höheren basalen p21-Expression benötigen eine höhere Inhibitor-Konzentration als Zellen mit niedrigerem p21-Status, um einen Zelltod einzuleiten [456].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine p21-Induktion sowohl nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Doppelknockdown als auch nach Klasse I HDACi-Behandlung in UC-Zelllinien beobachtet [295, 301]. Um den Einfluss des p21-Status auf UC-Zellen zu untersuchen, wurde ein direkter Vergleich der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC3 (funktionelles p21) mit der UC-Zelllinie HT1376 (mutiertes *CDKN1A*-Gen, kein funktionelles p21) durchgeführt. Nach HDACi-Behandlung (Romidepsin, Givinostat, 4SC-202) konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede für Viabilität und Zellzyklus der Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2: Effekte und Mechanismen der HDACi-vermittelten p21-Induktion. In dieser Tabelle sind verschiedene Studien zur Charakterisierung der HDACi-vermittelten p21-Induktion zusammengefasst - p21-Status im UC (A), HDACi-vermittelte p21-Induktion (B), die damit assoziierten Effekte (C) und die Mechanismen der p21-Induktion bzw. -Regulation (D).

| A | Gewebe | Beschreibung | Ref. |
|--|---|---|--|
| p21-Status im UC | UUTUC-Gewebe | IHC Färbungen von 34 UUTUC (<i>Upper urinary tract urothelial carcinoma</i>)-Tumorgeweben → Vollständiger Verlust der p21-Expression bei 47 % und verringerte p21-Expression bei 14,7 % | [457] |
| | UC-Gewebe | QRT-PCR, Western Blot und IHC Färbungen von 48 UC-Tumorgeweben und korrespondierenden Normalgewebe → Signifikant niedrigere p21-Expression in UC-Tumorgeweben | [458] |
| | UC-Gewebe | IHC Färbungen von 100 UC-Tumorgeweben → 75 % der Gewebe zeigten eine verringerte p21-Expression | [459] |
| | UC-Gewebe | Mutationsanalysen von 131 UC-Tumorgeweben im Vergleich zu 23 Normalgeweben → Mutation des <i>CDKN1A</i> -Gens in 14 % der Fälle (überwiegend trunkierende oder Nullmutationen) | [31] |
| B | HDACi | Zelllinien | Ref. |
| HDACi-vermittelte p21-Induktion | Romidepsin | NB4, Ishikawa, HEC-1-A, A549, H1299, HCT116, H513, H28, H2373, H2052, REN, HL60, Jurkat, MCF7 | [233, 235, 460-464] |
| | Entinostat | T-24, MDA435, MDA468, HL-60, K562, Jurkat, U937 | [189, 261, 262] |
| | TSA | A431, MDA-MB-231, ARN8, MCF7, HNDf, H1299, UCD-Mel-N, SK-Mel-30, SK-Mel-103, SK-Mel-119, SK-Mel-147, SK-Me173, Swiss3T3, T98G, T-24, BIU-87, NTUB1, MDA468, MDA435, HLE, HuH7, Hep3B, HepG2, PLC, HuH6, U-937, HL60, Jurkat, A549, MG63, NIH3T3, HeLa | [261, 262, 274, 277, 279, 451, 463, 465-475] |
| | SAHA | HeLa, NIH-3T3, hTERT-RPE1, HL60, NB4, U937, H1299, T-24, VM-CUB1, SW-1710, UM-UC-3, 639-V, 5637, MDA468, MDA435, MM-1S | [200, 255, 261, 268, 343, 468, 476] |
| | Panobinostat | MDA-MB231 | [466] |
| | Valproinsäure | HT1376, 5637, HeLa | [254, 452] |
| | Belinostat | 5637, T-24, J82, RT4, HeLa, SUDHL4/6/8, OCI-Ly3/19, DB, U2932 | [260, 452, 477] |
| | Natrium-Butyrat | HCT116, HL60, Jurkat, A549, MCF-7, WiDr, HT-29 | [463, 478-480] |
| | Chrysin | A375 | [481] |
| | Chidamide | PaTu8988 | [482] |
| | Spiruchostatin B | NALM-6, U937, MOLT-4, HL-60, K562 | [483] |
| | Pracinostat | 5637, T24, TSU-Pr1 | [278] |
| C | HDACi/p21-assoziierte Effekte | | |
| Effekte | Zellzyklusarrest | G1-Zellzyklusarrest [233, 262, 274, 278, 456, 460, 462, 477, 479, 481, 483] | |
| | | G2/M-Zellzyklusarrest [255, 462, 463, 467, 468, 477, 478] | |
| | | G2/M- (Karzinom-Zellen) und G1-Zellzyklusarrest (Kontrollzellen) [343] | |
| | Apoptose | Apoptose-Induktion [233, 255, 262, 274, 343, 468, 472, 482, 483] | |
| | | Apoptose-Inhibition [189, 200, 262, 461, 477, 484] | |
| | Inhibition der Zellproliferation [262, 274, 278, 279, 465, 466, 472, 480] | | |
| | Seneszenz [469, 485, 486] | | |
| Resistenzmechanismen [200, 201] | | | |
| Differenzierung [189, 462] | | | |

Fortsetzung Tabelle 2

| D | Interaktion/ Mechanismus | Beschreibung | Ref. |
|--|-----------------------------|---|-----------------|
| Mechanismen der p21-Induktion bzw. -Regulation | p21/HDAC1 | <ul style="list-style-type: none"> SAHA-vermittelte Inhibition der HDAC1-Bindung an p21-Promotor | [324] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> HDAC1 moduliert Zellproliferation und reprimiert p21 in ES → p21-Deletion vermindert die HDAC1^{-/-}-Proliferationsinhibition in ES Erhöhte p21-Expression und Promotor-Hyperacetylierung in HDAC1-deletierten MEFs → Inhibition der Zellproliferation → direkte Regulation des p21-Gens durch HDAC1 (Chromatin-Immunopräzipitation) HDAC1-vermittelte Proliferationskontrolle durch Repression von p21 | [326] |
| | p21/CK2/ HDAC2 | <ul style="list-style-type: none"> p21- und CK2-Interaktion erhöht HDAC2-Phosphorylierung Anstieg der KLF4 (<i>kruppel like factor 4</i>)-Acetylierung und Inhibition der T-24-Proliferation | [279] |
| | p21/Sp1/Sp3/ p300 | <ul style="list-style-type: none"> TSA, Natrium-Butyrat und SAHA vermitteln p21-Induktion über Sp1 | [473, 479, 487] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> TSA vermittelt p21-Induktion über Sp1 und Sp3 Transfektion von Sp1 und/oder Sp3 erhöht basale und TSA-induzierte p21-Promotor-Aktivität Transfektion mit reverser Sp1- oder Sp3-cDNA verringert basale und TSA-induzierte p21-Promotor-Aktivität | [474] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> TSA-vermittelte p21-Induktion über p300/Sp1/Sp3 Transfektion von p300 erhöht TSA-vermittelte p21-Induktion TSA-, Sp1- oder Sp3-vermittelte p21-Induktion wird durch mutiertes p300 blockiert | [488] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Sp1 K703-Acetylierung in der DNA-Bindungsstelle verhindert Bindung von Sp1 an p21-Promotor Natrium-Butyrat und andere HDACi induzieren Sp1-Acetylierung, p21-Induktion und G2/M-Zellzyklusarrest siRNA-vermittelter Sp1-Knockdown resultiert in differentieller Expression verschiedener Elemente des p21-Signalweges | [478] |
| | p21/ATF3 | <ul style="list-style-type: none"> p21-Induktion und ATF3-Repression nach TSA-Behandlung → Inhibition der Zellproliferation ATF3-Überexpression vermittelt Zellproliferation, hemmt p21-Expression und wirkt der TSA-induzierten Proliferationsinhibition und p21-Induktion entgegen ATF3-Deletion inhibiert Zellproliferation und induziert p21-Expression ATF3 interferiert negativ mit der TSA-vermittelten p21-Induktion | [465] |
| | p21/H2A.Z/p400 | <ul style="list-style-type: none"> H2A.Z-abhängige p21-Induktion und Inhibition der Zellproliferation H2A.Z ist mit der Transkriptionsstartstelle (TSS) von reprimierten p21 assoziiert → siRNA-vermittelter H2A.Z-Knockdown verhindert HDACi-vermittelte p21-Induktion H2A.Z-Acetylierung korreliert mit p21-Aktivierung HDACi-Behandlung reduziert p400-Assoziation mit p21-TSS p400 beeinflusst p21-Expression negativ durch Interferenz mit H2A.Z-Acetylierung → Antiproliferativer Effekt von HDACi über p21-Expression abhängig von H2A.Z-Acetylierung | [466] |
| | p21/c-MYC | <ul style="list-style-type: none"> TSA-vermittelte p21-Induktion korreliert mit einer verringerten c-MYC (<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>)-Expression siRNA-vermittelter c-MYC-Knockdown induziert starke p21-Induktion c-MYC bindet in unbehandelten HeLa-Zellen an p21-Promotor, jedoch nicht nach Behandlung mit TSA | [475] |

Fortsetzung Tabelle 2

| D | Interaktion/ Mechanismus | Beschreibung | Ref. |
|--|---|---|--|
| Mechanismen der p21-Induktion bzw. -Regulation | p21/p53 | <ul style="list-style-type: none"> p53-unabhängige Induktion von p21 | [462, 469, 473, 477, 479-481, 486, 487, 489] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Romidepsin-vermittelte spezifische p53-Acetylierung an K373/382 induziert p21-Expression p21-Promotor-Aktivität korreliert mit p53-K373/382ac-Bindung am Promotor | [464] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> p53-Aktivierung durch Nutlin-3 verhindert TSA-vermittelte p21-Induktion und schwächt G2/M-Zellzyklusarrest ab TSA inhibiert Nutlin-3-induzierte Expression von p21 und schwächt G1-Zellzyklusarrest ab | [467] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Romidepsin induziert DNA-Schäden durch die Generierung von ROS und Hemmung der TrxR (<i>thioredoxin reductase</i>)-Expression → induziert Phosphorylierung von p53 an Thr18 p53 Thr18-Phosphorylierung notwendig für Acetylierung von p53 an K373/382 und für p21-Induktion | [235] |
| | p21/STAT | <ul style="list-style-type: none"> Chrysin-vermittelte p21-Induktion → G1-Zellzyklusarrest Auflockerung des Chromatins am p21-Promotor durch Histon-Hyperacetylierung und-Methylierung → Sequenz-spezifische Chromatinremodellierung an STAT-Responselementen Histon-Hyperacetylierung korreliert mit Rekrutierung von STAT1, 3 und 5 an STAT-Responselementen des p21-Promotors → STAT-Responselemente wichtig für Chrysin-vermittelte p21-Induktion | [481] |
| | p21/EZH2 | <ul style="list-style-type: none"> siRNA-vermittelter EZH2-Knockdown induziert p21 → Seneszenz, Zellzyklusarrest EZH2-Knockdown entfernt HDAC1 von der p21-TSS → erhöhte Histon H3-Acetylierung und p21-Induktion EZH2-Knockdown und TSA induzieren synergistisch p21 | [469] |
| | p21/MAPK | <ul style="list-style-type: none"> p21-Induktion durch TSA und MAP-Kinase-Signalweg (MSK1 (<i>mitogen- and stress-activated protein kinase 1</i>)) → H3S10-Phosphorylierung am p21-Promotor notwendig für H3K14-Acetylierung und Rekrutierung der RNA-Polymerase II In Zellen ohne p21-Induktion wirkt die Proteinphosphatase PP2A (<i>protein phosphatase 2 phosphatase activator</i>) der p21-Induktion entgegen Doppelte Modifikation H3S10phK14ac am aktivierten p21-Promotor wird durch Phospho-Bindungsprotein 14-3-3 gebunden → Phosphorylierung kann durch PP2A nicht entfernt werden Reversible Phosphorylierungs- und Acetylierungssignale regulieren die HDACi-vermittelte p21-Induktion | [470] |
| p21-Lokalisation | <ul style="list-style-type: none"> Starke p21-Induktion in HeLa, deutlich schwächere Induktion in Kontrollzellen → G2/M-Zellzyklusarrest in HeLa, G0/G1-Zellzyklusarrest in Kontrollzellen, stärkere Apoptose-Aktivierung in HeLa als in hTERT-RPE1 Differentielle Lokalisation von p21 nach SAHA-Behandlung in HeLa (gesamte Zelle) und hTERT-RPE1 (Nukleus) | [343] | |

Fortsetzung Tabelle 2

| D | Interaktion/ Mechanismus | Beschreibung | Ref. |
|---|-----------------------------|---|-------|
| Mechanismen der p21-Induktion bzw. -Regulation | p21-Expression | <ul style="list-style-type: none"> Natrium-Butyrat- und TSA-vermittelte p21-Induktion Stabile Überexpression von p21 induziert Proliferationsstopp in HT-29 p21-deletierte HCT116 Zellen → keine HDACi-vermittelte Proliferationsinhibition | [480] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Inhibition der Zellproliferation und G1-Zellzyklusarrest über p21-Induktion nach Romidepsin-Behandlung → Repression von Cyclin D1, Induktion von Cyclin E, Rb-Hypophosphorylierung In p21-deletierten Zellklonen tritt ein Romidepsin-vermittelter G2/M-Zellzyklusarrest und höhere Zytotoxizität ein → p21-unabhängiger G2/M-Zellzyklusarrest | [462] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Starke synergistische Apoptose-Induktion nach kombinierter SAHA/Flavopiridol (Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen)-Behandlung → Caspase-3 und -8-Spaltung, BID-Aktivierung Flavopiridol blockiert die SAHA-vermittelte Induktion von p21 | [484] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Inhibition der Zellproliferation über p21-Induktion und G0/G1-Zellzyklusarrest bei niedrigen Entinostat-Konzentrationen → erhöhte Expression von hypophosphoryliertem Rb, niedrigere Expression von Cyclin D1 Starke Apoptose-Induktion bei höheren Entinostat-Konzentrationen → Aktivierung der Caspase-Kaskade mit anschließender zeitabhängiger Degradation von p21 (vorherige Induktion), p27, BCL2 und Rb und reduzierte Expression von Cyclin D1, MCL1 und XIAP Zellen mit stabil transfiziertem p21-Antisenskonstrukt sind deutlich sensitiver gegenüber Entinostat-vermittelter Apoptose als Kontrollzellen | [189] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Starke synergistische Inhibition der Zellproliferation und Apoptose-Induktion nach kombinierter Romidepsin/Flavopiridol-Behandlung Synergistische Effekte assoziieren mit der Inhibition der Romidepsin-vermittelten p21-Induktion durch Flavopiridol Adenovirale p21-Überexpression induziert Resistenz der behandelten Zellen gegenüber der Romidepsin/Flavopiridol-Kombination Flavopiridol wirkt der Romidepsin-vermittelten p21-Promotoraktivierung entgegen (p21-Reporterassay) | [461] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> HL60 ohne HDACi-vermittelter p21-Induktion → Sensitiver gegenüber SAHA-vermittelter Apoptose als NB4 und U937 Zellen mit p21-Induktion Stabile p21-Transfektion in HL60 → reduziert Sensitivität gegenüber SAHA und blockiert TRAIL-vermittelte Apoptose siRNA-vermittelte Repression von p21 in NB4 → erhöht SAHA-vermittelte Apoptose Starke p21-Expression vermittelt SAHA-Resistenz durch die Inhibition von TRAIL-vermittelter Apoptose | [200] |

Fortsetzung Tabelle 2

| D | Interaktion/ Mechanismus | Beschreibung | Ref. |
|--|--------------------------------|---|-------|
| Mechanismen der p21-Induktion bzw. -Regulation | p21-Expression | <ul style="list-style-type: none"> NALM-6 zeigt die höchste endogene p21-mRNA-Expression aller untersuchten Leukämiezellen → stärkste Sensitivität gegenüber Spiruchostatin B (SP-B) Signifikante p21-Induktion auf mRNA- und Proteinebene → G0/G1-Zellzyklusarrest und Apoptose | [483] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Verringerte p21-mRNA-Expression in SP-B-resistenten NALM-6 Zellen im Vergleich zu nicht-resistenten NALM-6 Zellen Vektor-vermittelte Überexpression von p21 stellt Sensitivität von resistenten NALM Zellen gegenüber SP-B wieder her (Apoptose) Vektor-vermittelte Überexpression von p21 erhöht SP-B-induzierte Apoptose in K562 Zellen Repression von p21 in NALM-6/SP Zellen entscheidend für Vermittlung der Resistenz | [201] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> Belinostat-Behandlung → Sensitive Zellen durchlaufen einen G2/M-Zellzyklusarrest mit anschließender Apoptose, resistente Zellen gehen in einen reversiblen G1-Zellzyklusarrest Differentielle Regulation von Zellzyklus-assoziierten Proteinen in Belinostat-sensitiven und -resistenten Zellen Belinostat-resistente Zellen zeigen eine verlängerte stabile p21-Überexpression → niedrigere Aktivität von Cyclin E/CK2, verringerte Rb-Phosphorylierung, keine Apoptose-Induktion Zellen die p21 nur transient induzieren durchlaufen Belinostat-vermittelte Apoptose | [477] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> HDACi ITF-A und ITF-B vermitteln Dosis-abhängige Inhibition der Zellproliferation durch G1-Zellzyklusarrest Basale Expression von p21 in unbehandelten Zellen reguliert HDACi-Sensitivität → HDACi-Konzentrationsabhängige Induktion eines Zellzyklusarrestes oder Zelltod → p21-Expression höher in Zellen die eine höhere HDACi-Konzentration benötigen um Apoptose einzuleiten Zellen mit höherer basalen p21-Expression sind resistenter gegenüber HDACi-induziertem Zelltod als Zellen mit niedrigem p21-Status | [456] |
| | Hyperacetylierung p21-Promotor | <ul style="list-style-type: none"> Natrium-Butyrat- und TSA-vermittelte Hyperacetylierung am p21-Promotor | [480] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> p21-Induktion nach SAHA-Behandlung auf mRNA- und Proteinebene erhöhte H3- und H4-Acetylierung am p21-Promotor | [268] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> SAHA vermittelt Acetylierungs- und Methylierungsveränderungen von Histonen und erhöht Deoxyribonuklease I-Sensitivität im p21-Promotor → p21-Induktion | [324] |
| | | <ul style="list-style-type: none"> HDACi-Silibinin-Kombination → Erhöhte H3- und H4-Acetylierung am p21-Promotor starke p21-Induktion mit anschließender proteasomaler Degradation von Cyclin B1 → signifikanter G2/M-Zellzyklusarrest und Apoptose | [468] |

MCL1 – myeloid cell leukemia 1

Das Gen *MCL1* kodiert für ein anti-apoptotisches Protein und gehört zur BCL2-Familie. *MCL1* kann in drei Spleißvarianten vorliegen; die längste vermittelt die anti-apoptotische Funktion, die beiden kürzeren wirken entgegengesetzt und induzieren Zelltodmechanismen.²² Eine MCL1-Deregulation wird immer häufiger mit Tumoren und Resistenzen in Zusammenhang gebracht [490-492]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien liegt MCL1 nach Romidepsin-Behandlung in UM-UC-3 Zellen überexprimiert vor [295]. Eine erhöhte Expression wurde auch in anderen Entitäten nach HDAC-Inhibition beobachtet [93, 264]. Labisso et al. 2012 zeigten, dass eine erhöhte MCL1-Expression in Kombination mit einer erhöhten Expression von Bcl-xL mit einer schwächeren Dosiswirkung von SAHA und höheren IC₅₀-Werten korreliert. Des Weiteren führte eine pharmakologische Inhibition von c-MYC zu einer Reduktion der MCL1- und Bcl-xL-Expression und einer erhöhten Sensitivität gegenüber SAHA [493]. Eine Studie im Plattenepithelkarzinom beschreibt MCL1 als einen dominanten und Gewebe-spezifischen Resistenzfaktor gegenüber einer Behandlung mit dem BH3 (*BCL2 homology domain 3*)-Mimetikum ABT-737 [491]. Eine Behandlung mit dem pan-HDACi SAHA wirkt dieser Resistenz entgegen, indem sie die Expression verschiedener Mitglieder der BCL2-Familie moduliert und so gleichzeitig die Regulation und Funktion von MCL1 deaktiviert [491]. MCL1 könnte auch in UC-Zelllinien anti-apoptotisch wirken und so zu dem primär nicht-apoptotischen Zelltod nach Klasse I HDACi-Behandlung beitragen. Demgegenüber steht, dass durch Sampath et al. 2012 eine Repression von MCL1 nach HDAC-Inhibition in Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie beobachtet wurde [494].

²² NCBI-Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4170>, RefSeq Oktober 2010, zitiert am 08.09.2016.

CRADD – CASP2/RIPK1 domain containing adaptor with death domain

In p53-defizienten Zellen können apoptotische Prozesse alternativ durch Caspase-2 induziert werden [495]. Das Adapterprotein CRADD ist über eine Interaktion mit der Kinase RIPK1 (*receptor interacting serine/threonine kinase 1*) an der Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-2 beteiligt [496]²³. Shen et al. 2014 berichteten, dass CRADD im Magenkarzinom herunter reguliert ist und dass HDAC1 durch eine direkte Bindung an den *CRADD*-Promotor zur Deregulation beiträgt. *CRADD* ist somit ein direktes Zielgen von HDAC1. Des Weiteren kommt es durch die Behandlung mit TSA in Magenkarzinom-Zelllinien zur *CRADD*-Induktion und Caspase-2 Aktivierung [497].

In UM-UC-3 Zellen kann nach Behandlung mit Givinostat und SAHA ebenfalls eine Induktion von *CRADD* beobachtet werden. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass es in UM-UC-3 Zellen ebenfalls zu einer Aktivierung eines Caspase-2-abhängigen Zelltods kommen könnte. Demgegenüber steht die Expressionsstudie von Song et al. 2013, in der die Expression von Caspase-2 mRNA in 20 UC-Geweben im Vergleich zu korrespondierenden benignen Geweben bestimmt wurde. Dabei war Caspase-2 in 80 % der Tumorgewebe signifikant herunter reguliert [498]. Ein Verlust von Caspase-2 könnte in UCs aufgrund der üblichen Inaktivierung von p53 [1, 395] zu einer schwerwiegenden Behinderung der Apoptosefähigkeit führen und sollte in Zusammenhang mit Klasse I HDACi in UC-Zelllinien genauer untersucht werden.

DHRS2 - dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2

DHRS2 liegt in den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien, insbesondere in VM-CUB1 Zellen, signifikant induziert vor. *DHRS2* kodiert für das Protein Hep27²⁴ und wirkt in Endometriumkarzinom-Zellen protektiv gegen Apoptose, die durch oxidativen Stress induziert wird [499]²⁴. Da HDACi ihre antineoplastische Wirkung u.a. durch die Induktion von oxidativen Stress vermitteln können [182, 189, 352-354], könnte die beobachtete *DHRS2*-Induktion in UC-Zelllinien relevant sein und ebenfalls protektiv wirken.

²³ NCBI-Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8738>, RefSeq Februar 2016, zitiert am 08.09.2016.

²⁴ NCBI-Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10202>, zitiert am 08.09.2016.

MT1X – metallothionein IX

MT1X war in den in dieser Arbeit durchgeführten Studien sowohl nach Klasse I HDACi-Behandlung als auch nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Doppelknockdown induziert [295]. Zusätzlich wurde eine signifikante Induktion in Kolonkarzinom-Zellen nach HDACi-Behandlung beobachtet [450]. Bislang gibt es keine Studien, die die Funktion von *MT1X* in Verbindung mit HDACi untersuchen. Allerdings wurde *MT1X* mit der TCRP1 (*tongue cancer resistance-associated protein 1*)-vermittelten Cisplatin-Resistenz im oralen Platten-epithelkarzinom in Zusammenhang gebracht [500, 501]. Mit einem siRNA-vermittelten Knockdown von *MT1X* konnte eine Sensitivierung der resistenten Zellen gegenüber Cisplatin und eine erhöhte Apoptoserate erzielt werden [501]. Da viele Patienten während der Behandlung des UCs eine Cisplatin-Resistenz entwickeln, sollte die Induktion dieses Faktors, besonders in Zusammenhang mit der Untersuchung einer HDACi-Cisplatin-Kombinationstherapie, nicht außer Acht gelassen werden [16].

CTGF – connective tissue growth factor

CTGF wird mit der Entstehung von diversen Tumoren in Zusammenhang gebracht, wie z.B. Leberzell- und Mammakarzinom. Grundsätzlich scheint eine deregulierte *CTGF*-Expression mit der Entwicklung von Resistenzen, aggressiven Tumoren, Metastasierung und Tumorprogression zu korrelieren [502-504]. *CTGF* wird nach HDACi-Behandlung in Kolon- und Leberzellkarzinom-Zellen induziert [450, 451] und zeigt auch in den in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien eine einheitliche Induktion nach siRNA-vermitteltem HDAC1/2-Doppelknockdown und Klasse I HDACi-Behandlung [295]. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen *CTGF* und HDACs wurde bislang nicht beschrieben. Wie sich die Induktion von *CTGF* auf UC-Zellen auswirkt, ist schwer vorherzusagen, da die *CTGF*-Funktion in der Blase nur wenig untersucht ist. In der UC-Zelllinie T-24 erhöht eine APF (*antiproliferative factor*)-vermittelte *CTGF*-Induktion die Proliferations-hemmende Wirkung des Faktors [505].

7.6 Mögliche Kombinationen mit Klasse I HDACi und neue Therapieansätze für die Behandlung des UC

In diesem Abschnitt sollen auf Grundlage der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mögliche Kombinationen mit Klasse I HDACi und neue Therapieansätze für die Behandlung des UC besprochen werden.

Präklinische und klinische Studien deuten darauf hin, dass HDACi signifikante antineoplastische Effekte gegenüber soliden Tumoren induzieren können, wenn sie mit anderen Medikamenten kombiniert werden [58]. Daher wird die HDACi-Therapie in Zukunft vermutlich auf einer Kombination mit anderen additiv oder synergistisch wirkenden Substanzen basieren [58]. HDACi potenzieren häufig mit klassischen DNA-schädigenden Agenzien und weiteren Substanzklassen [174, 193, 217, 218, 409], darunter Zytostatika (Gemcitabin, Hydroxyurea, 5-Azacytidin, Doxorubicin, Temozolomid, Paclitaxel), Inhibitoren von Aurora-Kinasen, Topoisomerasen, PARP1, B-RAF, DNA-Methyltransferasen, Tyrosinkinasen, TORC1 (*transducer of regulated CREB activity 1*), PI3-Kinasen, Sirtuinen, anti-apoptotischen Proteinen und des Proteasoms [124, 128, 199, 216, 242, 343, 376-379, 405, 506-513]. Zur Sensitivierung durch HDACi tragen vermutlich verschiedene Mechanismen bei. Ein Großteil der DNA ist eng um Histone gewunden, dadurch wird die Zugänglichkeit für Polymerasen und Transkriptionsfaktoren eingeschränkt. Man geht davon aus, dass DNA-schädigende Agenzien durch diese Kompaktierung der DNA nicht ihre volle Wirksamkeit erreichen können und dass ein Entwinden der kompakten Struktur durch HDACi zu einer besseren Zugänglichkeit dieser Substanzen und somit zu synergistischen Effekten führt [277]. Des Weiteren wird der HDACi-vermittelte Inhibition der DNA-Reparatur eine entscheidende Rolle zugeschrieben [217]. Die Synergien könnten die Effektivität der Behandlung erhöhen und so den Umfang an Nebenwirkungen verringern. Bei der Konzipierung und Durchführung von klinischen Studien hat sich auch herausgestellt, dass nicht nur die spezifische Kombination entscheidend ist, sondern auch die Reihenfolge, Konzentration und Länge der Behandlung; so scheint z.B. eine Vorbehandlung mit HDACi am effektivsten zu sein [20, 105]. Außerdem wurde gezeigt, dass eine epigenetische Re-Normalisierung mit höherer Wahrscheinlichkeit erzielt wird, wenn HDACi konstant über einen längeren Zeitraum, dafür jedoch in einer niedrigen Konzentration, eingesetzt werden [20]. In UC-Zelllinien wurden bereits einige Kombinationen präklinisch charakterisiert. Diese Untersuchungen konzentrierten sich

überwiegend auf DNA-schädigende Agenzien wie Cisplatin und Mitomycin C sowie auf die Zytostatika Gemcitabin und 5-Azacytidin. Für einige dieser Kombinationen wurden synergistische antineoplastische Aktivitäten und teilweise geringere Nebenwirkungen *in vitro* und in verschiedenen Xenograft-Modellen beobachtet (siehe Tab. 4C in Anh. B).

Auch für Klasse I HDACs wurde ein direkter Zusammenhang mit den synergistischen Effekten zwischen HDAC-Inhibition und DNA-schädigenden Agenzien nachgewiesen, die im Kolorektalkarzinom z.B. durch HDAC2 moduliert werden [199]. Des Weiteren konnte durch HDAC1/2-Knockdowns gezeigt werden, dass eine Inaktivierung dieser Klasse I HDACs eine starke Sensitivierung gegenüber DNA-schädigenden Agenzien induziert, die durch eine gestörte DNA-Schadensantwort und defekte DSB-Reparatur charakterisiert ist [103, 418]. In diesem Zusammenhang könnte eine Evaluation von dualen Inhibitoren, die DNA-schädigende Eigenschaften mit einer gleichzeitigen Inhibition von Klasse I HDACs kombinieren, in UC-Zelllinien interessant sein [514-517]. Duale Substanzen können entweder zwei unterschiedliche Ziele gleichzeitig inhibieren, in diesem Fall HDACs und ein anderes therapeutisches Target, oder Protein-Protein-Interaktionen stören [20, 23]. Sekundäre Aktivitäten wurden z.B. bereits für die Inhibition von Topoisomerasen, Tyrosinkinase, PI3K, EGFR (*epidermal growth factor receptor*), HMGCR (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*) oder Wirkung als Alkylans entwickelt [514-523]. Die Effektivität dieser Substanzen wird aktuell präklinisch und teilweise auch klinisch charakterisiert [20, 23].

Weitere Kombinationen, die auf Grundlage dieser Arbeit für das UC denkbar wären, sind Klasse I HDACi mit gut charakterisierten Aurora Kinase-Inhibitoren [364, 374, 375]. Zum einen konnte eine deutliche Expressionsverminderung der Aurora A- und Aurora B-Kinasen nach Klasse I HDACi-Behandlung in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 detektiert werden [295]. Dies lässt vermuten, dass die antineoplastische Aktivität durch eine direkte zusätzliche Inhibition der beiden Kinasen verstärkt würde. Zum anderen wurden in anderen Zellsystemen bereits synergistische Effekte zwischen HDACi und der Inhibition von Aurora-Kinasen nachgewiesen [376-379, 508].

Für die Behandlung mit Romidepsin könnte eine Kombination mit einem BH3-Mimetikum [524] wie ABT-737 sinnvoll sein. Für HDACi, die eine BIM-Induktion auslösen, so wie in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 nach Romidepsin-Behandlung [295], wurde ein synergistischer Effekt mit ABT-737 in Leukämie- und

Myelomzellen detektiert [35, 525]. Auch für Zellen des Plattenepithelkarzinoms, mit einer durch Mutation der Ubiquitinligase FBXW7 (*F-box and WD repeat domain containing 7*) bedingten hohen BIM-Expression, konnte ein starker Synergismus zwischen einem HDACi und ABT-737 nachgewiesen werden [491]. Zusätzlich zeigt eine HDACi-induzierte erhöhte BIM-Expression synergistische Effekte mit dem Proteasominhibitor Bortezomib [103, 526].

Eine weitere Möglichkeit ist die Kombination von HDACi mit Inhibitoren gegen DNA-Methyltransferasen [527-529] (zit. aus [35]). Der primäre Gedanke hinter dieser Kombination ist, dass eine Erhöhung der Histonacetylierung und eine Verringerung der Methylierung an CpG-Inseln synergistisch zur Re-Expression reprimierter Tumorsuppressoren führen kann [35]. Neuhausen et al. 2006 konnten dies z.B. für das Gen *SFRP1* (*secreted frizzled-related protein 1*) nachweisen [530]. *SFRP1* lag in 55 % der untersuchten UC-Gewebe und in vielen UC-Zelllinien hypermethyliert vor. Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen Hypermethylierung des Gens und seiner fehlenden Expression gezeigt [530]. Durch die Behandlung mit 5-Aza-Desoxycytidin allein, doch breiter in Kombination mit den HDACi SAHA und TSA, konnte eine Re-Expression von *SFRP1* in UC-Zellen induziert werden [530]. Des Weiteren konnte in Zelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms nachgewiesen werden, dass bereits bei niedrigen Konzentrationen und einer kurzen Behandlungszeit synergistische Effekte dieser Kombination eintreten [531] (zit. aus [20]).

Kürzlich erschienene Studien stellen einen neuen sehr interessanten Ansatz für eine kombinierte Therapie mit HDACi vor [532, 533]. Mackmull et al. 2015 zeigten, dass eine HDACi-Behandlung in HeLa Zellen zu einer massiven selektiven Herunterregulation von BRD-enthaltenden Proteinen führt. Zeitaufgelöste Transkriptom- und Proteomprofile der mit HDACi-behandelten Zellen ergaben, dass diese Proteingruppe durch eine Kombination von transkriptionellen und post-transkriptionellen Mechanismen reguliert wird [532]. Des Weiteren konnte durch Knockdown-Experimente belegt werden, dass die Repression von spezifischen BRD-enthaltenden Proteinen, wie z.B. PBRM1 und BRD1, ausreicht, um wichtige durch HDACi-vermittelte transkriptionelle Änderungen, wie z.B. p21-Induktion, zu erzielen [532]. In UC-Zelllinien werden diverse Transkripte von BRD-enthaltenden Proteinen herunterreguliert, besonders nach Behandlung mit Romidepsin und Givinostat und in geringerem Maße durch SAHA. Zu diesen Transkripten gehören BRD1, ZMYND11

(*zinc finger, MYND-type containing 11*), CREBBP und BAZ1A/B (*BRD adjacent to zinc finger domain 1A/B*) [295].

Eine weitere Studie von Mazur et al. aus dem Jahr 2015 beschreibt eine kombinierte Inhibition von HDACs und BET-Proteinen, einer Untergruppe von BRD-enthaltenden Proteinen, für die Behandlung des aggressiven duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC – *pancreatic ductal adenocarcinoma*) [533]. Das PDAC teilt gewisse genetische Alterationen mit dem UC, so die häufige Inaktivierung der Gene *TP53* und *CDKN2A* [534] (siehe Kap. 1.1). Die häufigste genetische Alteration im PDAC ist jedoch eine aktivierende Mutation im *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)-Gen, die bei mehr als 95 % der Fälle auftritt [533, 535] und im UC nur gelegentlich auftritt. Die BET-Proteinfamilie beinhaltet die Proteine BRD2-4 und BRDT [95, 99]. Sowohl *in vitro* als auch in Xenograft-Modellen übt eine gemeinsame Behandlung mit dem BET-Inhibitor (BETi) JQ1 und dem pan-HDACi SAHA starke und synergistische antineoplastische Effekte im Pankreaskarzinom aus [533]. Diese Effekte resultieren aus einer verringerten Proliferationsrate und einer erhöhten Apoptose, die durch Caspase-3-Spaltung und verminderte Expression der anti-apoptotischen Proteine MCL1 und Bcl-xL charakterisiert ist [533]. Synergien zwischen einem HDACi und dem BETi JQ1 konnten auch für AML-Zellen und Zellen des Mammakarzinoms nachgewiesen werden [536, 537].

Interessanterweise liegt in den RNA-Expressionsstudien an den UC-Zelllinien kein Mitglied der BET-Proteinfamilie dereguliert vor, obwohl viele andere BRD-enthaltende Proteine signifikante Expressionsveränderungen zeigen. Zur Expression von BET-Proteinen im UC ist bisher nicht viel bekannt. Für BRD4 wurde eine signifikante Überexpression in UC-Geweben nachgewiesen, die zudem mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert [538]. Eine Studie postuliert, dass die durch HDACi und den BETi JQ1 induzierten synergistischen Effekte in AML-Zellen primär durch eine BRD4-Inhibition vermittelt werden [536]. Passend dazu wurde kürzlich die Synthese und Evaluation eines dualen HDAC/BRD4-Inhibitors mit ausgeprägter antineoplastischer Aktivität in Leukämiezellen beschrieben [539]. Interessanterweise wurde für BRD4 auch eine intrinsische HAT-Aktivität nachgewiesen, die durch ein spezifisches H3/4-Acetylierungsmuster charakterisiert ist [540]. Offen ist jedoch, ob diese Aktivität zum Synergismus zwischen HDACi und BETi beiträgt. Gemeinsam deuten diese Daten darauf hin, dass eine Kombination von JQ1 mit HDACi auch in UC-Zellen sinnvoll wäre.

Für HDACi werden immer häufiger Therapieansätze entwickelt, die über die Kombination mit anderen Substanzen hinausgehen. Dazu gehören sogenannte Hybridmoleküle, die über spezifischen Transport zu oder Aktivierung in definierten Organen, Geweben, Zellen oder subzellulären Kompartimenten eine selektive Verteilung und Akkumulation des Inhibitors vermitteln [20, 21, 60]. Eine direkte HDACi-Verabreichung an das maligne Gewebe ist nämlich für die meisten Krebserkrankungen nicht möglich, da oft innere Organe und Gewebeteile betroffen sind oder verschiedene Metastasen auftreten [21]. Die selektive Verteilung und Anreicherung wird häufig über eine modifizierte CAP-Gruppe erreicht, indem sie z.B. spezifische Zielproteine bindet, die im Tumor überexprimiert vorliegen oder ausschließlich exprimiert sind [21]. Die HDACi-Anreicherung könnte dazu beitragen, das geringe klinische Ansprechen in soliden Tumoren zu überwinden und Nebenwirkungen zu minimieren [20, 21, 60]. Die Anreicherung wurde bereits *in vitro* als auch in klinischen Studien für einige Entitäten erprobt. Beispiele für zielgerichtete HDACi sind Tefinostat (Aktivierung in Makrophagen und Monozyten), HDACi, die selektiv in der Lunge akkumulieren, und HDACi, die sich Antiandrogen-vermittelt im Prostatakarzinom anreichern [541-544] (zit. aus [21, 23]).

Darüber hinaus werden neue Möglichkeiten diskutiert, um die HDAC-Isoenzym-Spezifität von Substanzen zu verbessern. Eine dieser Möglichkeiten könnte die Hemmung der IP4-Bindung an Klasse I HDACs und deren Komplexe sein [22, 60]. IP4 reguliert die Interaktionen von HDAC3 mit SMRT und von HDAC1 mit MTA1 im NuRD-Komplex [78-80] (beschrieben in [53]). Da die katalytische Aktivität von HDAC1 und 3 maßgeblich von ihrer Inkorporation in solche Multiproteinkomplexe abhängt [53], könnte die Blockierung der IP4-vermittelten Interaktion zwischen HDACs und Komplexpartnern zu einer spezifischeren Inhibition von HDAC1 und HDAC3 beitragen [22].

7.7 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse belegen die grundsätzliche Eignung der Klasse I Isoenzyme HDAC1 und 2 als Zielmoleküle für eine antineoplastische Therapie im UC. HDAC3 könnte - mit gewissen Einschränkungen - ebenfalls ein geeignetes Target sein, für eine endgültige Aussage sollten jedoch zusätzliche Experimente durchgeführt werden, besonders um die Tumorspezifität zu klären. HDAC8 konnte dagegen als bedeutendes therapeutisches Ziel ausgeschlossen werden. Folgearbeiten sollten sich mit einer genaueren Charakterisierung der durch Klasse I HDACi-vermittelten antineoplastischen Mechanismen beschäftigen, insbesondere mit der Aufklärung der ausgelösten Zelltodmechanismen. Diese Klärung ist vor allem wichtig, um optimale Kombinationstherapien mit anderen Agenzien zu entwickeln, die eine zusätzliche Steigerung des therapeutischen Potentials bewirken. Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf die Untersuchung des therapeutischen Potentials der HDACi in Xenograft-Modellen gelegt werden.

8 ANHANG

A Eigenschaften und Charakterisierung von HDACi

Tabelle 3: Eigenschaften und Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten HDACi. Neben der Stoffklasse und den präferentiellen Zielmolekülen werden genaue Klasse I HDAC *in vitro* IC₅₀-Werte angegeben. Mehrfache Angaben für die *in vitro* IC₅₀-Werte beziehen sich auf differente Angaben in verschiedenen Publikationen. *Mais HDAC1A/B und HDAC2.

| Inhibitor | Zielmoleküle | Stoffklasse/ Name | Klasse I HDACs <i>in vitro</i> IC ₅₀ | Ref. |
|----------------------------|----------------------------|----------------------|---|-------|
| Romidepsin (FK228) | HDAC1/2 | Zyklisches Peptid | HDAC1: 36 ± 16 nM HDAC2: 47 ± 18 nM | [222] |
| | | | HDAC1: 0,102 nM HDAC2: 0,376 nM HDAC3: 0,211 nM HDAC8: 24,6 nM | [428] |
| Givinostat (ITF2357) | HDAC1/2 (3) (Klasse II) | Hydroxam- säure | HDAC1: 16/7,5* nM HDAC2: 10* nM | [223] |
| | | | HDAC1: 28 ± 8 nM HDAC2: 56 ± 13 nM HDAC3: 21 ± 3 nM | [425] |
| Entinostat (MS-275) | HDAC1 (2/3) | Benzamid | HDAC1: 510 nM HDAC3: 1700 nM HDAC8: > 10 µM | [224] |
| | | | HDAC1: 181 ± 62 nM HDAC2: 1155 ± 134 nM HDAC3: 2311 ± 803 nM HDAC8: > 10 µM | [425] |
| | | | HDAC1: 243 nM HDAC2: 453 nM HDAC3: 248 nM HDAC8: > 10 µM | [545] |
| Mocetinostat (MGCD0103) | HDAC1/2 (3) | Benzamid | HDAC1: 0,15 ± 0,02 µM HDAC2: 0,29 ± 0,08 µM HDAC3: 1,66 ± 0,69 µM HDAC8: > 10 µM | [225] |
| | | | HDAC1: 34 ± 17 nM HDAC2: 34 ± 8 nM HDAC3: 998 ± 431 nM HDAC8: > 10 µM | [425] |
| | | | HDAC1: 9,26 ± 1,18 nM HDAC2: 35,6 ± 13,0 nM HDAC3: 192 ± 39,9 nM | [546] |
| | | | HDAC1: 98 ± 1 nM HDAC2: 22 ± 1 nM HDAC3: 45 ± 11 nM HDAC8: 35 ± 2,2 µM | [547] |

Fortsetzung Tabelle 3

| Inhibitor | Zielmoleküle | Stoffklasse/ Name | Klasse I HDACs <i>in vitro</i> IC ₅₀ | Ref. |
|----------------------|---------------------|--|--|--------------------|
| 4SC-202 | HDAC1/2/3 LSD1 | Benzamid | HDAC1: 155 nM HDAC2: 371 nM HDAC3: 130 nM HDAC8: > 15 µM LSD1 ²⁵ : 0,6 – 1,2 µM | 4SC AG [301] |
| RGFP966 | HDAC3 | N-(o- Amino- phenyl)- Carboxamid | HDAC1: > 15 µM HDAC2: > 15 µM HDAC3: 0,08 µM | [169, 170] |
| | | | HDAC1: 5,6 ± 1,3 µM HDAC2: 9,7 ± 1,8 µM HDAC3: 0,21 ± 0,06 µM HDAC8: > 100 µM | [321] |
| | | | HDAC1: 28,67 µM HDAC2: 17,68 µM HDAC3: 0,08 µM | [327] |
| BG45 | HDAC3 (1/2) | N-(2- Amino- phnyl) pyrazine-2- Carboxamid | HDAC1: 2 µM HDAC2: 2,2 µM HDAC3: 289 nM | [171] |
| Compound 2 | HDAC8 | Hydroxam- säure | HDAC1: > 100 µM HDAC8: 14 µM | [227] |
| Compound 5 | HDAC8 | Hydroxam- säure | HDAC1: > 100 µM HDAC8: 0,7 µM | [227] |
| Compound 6 | HDAC8 | Hydroxam- säure | HDAC1: > 100 µM HDAC8: 0,3 µM | [227] |
| SAHA (Vorinostat) | Klasse I, II, IV | Hydroxam- säure | Pan-HDACi | [228, 229] |

²⁵ Daten wurden von 4SC beim „6th Annual EpiCongress 2015“ (Boston, USA) im Juli 2015 präsentiert und sind online unter <http://www.4sc.de/de> erhältlich.

B Expression und Inhibition von HDACs im UC

Tabelle 4: Studienübersicht zu HDACs und HDACi im UC. In dieser Tabelle sind Studien zur HDAC-Expression (A), präklinische Untersuchungen (siRNA-vermittelter Knockdown oder HDACi, B), präklinische Kombinationstherapien (C) und klinische Studien (D) zusammengefasst. Teile dieser Tabelle (insbesondere B und D) wurden bereits in einem Übersichtsartikel veröffentlicht [34].

| A | HDACs | Regulation | Beschreibung | Ref. |
|-----------------------------|---------------------------|---|---|-----------------|
| Expression | Klasse I | ↑ HDAC1 | QRT-PCR und IHC von 10 UC-Tumor- vs. 10 korrespondierenden Normalgeweben | [254] |
| | | ↑ HDAC1 | QRT-PCR von 17 UC-Tumor- vs. 6 Normalgeweben | [126] |
| | | ↑ HDAC1-3 | IHC an 348 UC-Tumorgeweben | [256] |
| | | ↑ HDAC1-3/8 | QRT-PCR von 127 UC-Tumor- vs. 20 Normalgeweben; Western Blot von 3 UC-Tumor- vs. 3 Normalgeweben (zufällig) | [258] |
| | | ↑ HDAC2/8 | QRT-PCR von 18 UC-Zelllinien vs. 6 uroepithelialen Kontrollzellen | [255] |
| | | ↑ HDAC3 | Affymetrix-Microarray Datensätze von 10 UC-Tumor- vs. 4 Normalgeweben | [129] |
| | Klasse II | ↑ HDAC8 | QRT-PCR von 24 UC-Tumor- vs. 12 Normalgeweben | [255] |
| | | ↓ HDAC4/5/7 | QRT-PCR von 18 UC-Zelllinien vs. 6 uroepithelialen Kontrollzellen | [255] |
| | | ↓ HDAC4/7 | Western-Blot von 6 UC-Zelllinien vs. 2 uroepithelialen Kontrollzellen | [255] |
| | ↑ HDAC4 | IHC an 3 käuflichen UC- <i>tissue microarrays</i> | [259] | |
| B | Modulation | Isoformen/ HDACi | Induzierte Effekte | Ref. |
| Präklinische Untersuchungen | SiRNA-Knockdown | HDAC1/2/3/8 | 5637 Zellen: Verringerte Viabilität und Migration, Apoptose-Induktion | [258] |
| | | HDAC6 | 639-V, RT-112, 253J, UM-UC-3, BFTC-905 Zellen: Keine kritischen Effekte | [266] |
| | Klasse I HDAC-Inhibitoren | Entinostat | T-24 Zellen: Hyperacetylierung von Histon H4, ↑ p21 (mRNA und Protein) | [261] |
| | | Entinostat | T-24 Zellen: Verringerte Viabilität und Proliferation, erhöhte G1-Fraktion, Apoptose, H3/4-Hyperacetylierung, ↑ p21/Cyclin A (mRNA), ↓ BCL2 (Protein), ↑ BAX (Protein) | [262] |
| | | Romidepsin | J82 und onkogenes HRAS-exprimierende J82 Zellen: Differentielle Induktion von Erk1/2 (<i>extracellular signal regulated kinases 1/2</i> (MAPK3/1)), Nox-1 (<i>NADPH oxidase 1</i>), ROS-Produktion, Caspase-3/7-Aktivität und Zelltod in HRAS-J82 Zellen | [271, 272, 276] |

Fortsetzung Tabelle 4

| B | Modulation | Isoformen/ HDACi | Induzierte Effekte | Ref. |
|-----------------------------|------------------------|--|--|-------|
| Präklinische Untersuchungen | Klasse I und pan-HDACi | Entinostat TSA Apicidin Valproinsäure | Niedrig- (RT4, RT-112, CUBIII), mittel- (HU456, 5637, BC16.1) und hochinvasive (EJ, UM-UC-3, J82) Zellen: Konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation (niedriginvasive Zellen am sensitivsten), ↑ Gelsolin (Protein, in niedrig- und mittelinvasiven Zellen), ↓ Desmoglin (Protein, in niedrig- und mittelinvasiven Zellen) | [270] |
| | | Romidepsin SAHA TSA | 5637 Zellen: Dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation und induzierter Zelltod, vermittelt durch differentiell exprimierte Proteine (Romidepsin: 5698, TSA: 5497) die an Zellzyklus-Progression, Apoptose, Autophagie, ROS-Produktion und Reparatur von DNA-Schäden (TSA, Romidepsin) beteiligt sind, ↑ Acetylierung von Histon- und Nicht-Histonproteinen | [234] |
| | Klasse II HDACi | Tubacin Tubastatin ST-80 (HDAC6i) | RT-112, 639-V, 253J, UM-UC-3, 5637, T-24, VM-CUB1 Zellen: Niedrige Effektivität (hohe µM-Konzentrationen) | [266] |
| | Pan-HDACi | SAHA | T-24 Zellen: Hyperacetylierung von Histon H3/4, ↑ p21 (mRNA und Protein) | [268] |
| | | SAHA | VM-CUB1, SW-1710, UM-UC-3, T-24, 639-V, 5637 Zellen: Erhöhte G2/M- und subG1-Fraktion, ↑ p21 (mRNA und Protein), ↓ TS (mRNA und Protein), Dosisabhängige Induktion der Caspase-3/7-Aktivität | [255] |
| | | SAHA TSA | T-24 Zellen: Verringerte Viabilität, Hyperacetylierung von Histon H4, ↑ p21 (mRNA und Protein), Acetylierung von α-Tubulin | [261] |
| | | SAHA Valproinsäure | UM-UC-3 und T-24 Zellen: Verringerte Viabilität und Proliferation, ↑ TSP1 (<i>thrombospondin-1</i> , mRNA) | [269] |
| | | TSA | T-24 Zellen: Verringerte Viabilität und Proliferation, ↑ G1-Fraktion, Apoptose-Induktion, Hyperacetylierung von Histon H3, ↑ p21/Cyclin A (mRNA), ↓ BCL2 (Protein), ↑ BAX (Protein) | [262] |
| | | TSA | BIU-87 Zellen: Verringerte Viabilität und Proliferation (nM), ↑ G1-Fraktion, Apoptose-Induktion, ↑ p21 (mRNA) | [274] |
| | | TSA Natrium-Butyrat | EJ, UM-UC-3, TCC, T-24, J82, KK47 Zellen: Verringerte Viabilität und Proliferation, Zelltod, ↑ Plakoglobin EJ-, UM-UC-3-Xenograft: Starke Inhibition des Tumorwachstums (TSA) | [275] |

Fortsetzung Tabelle 4

| B | Modulation | Isoformen/ HDACi | Induzierte Effekte | Ref. |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|---|-------|
| Präklinische Untersuchungen | Pan-HDAC-Inhibitoren | TSA Natrium-Butyrat | T-24 Zellen: ↑ TRPM2 (mRNA), TRPM2-vermittelte Apoptose-Induktion, ↑ H3K9-Acetylierung im TRPM2-Promotor | [265] |
| | | Valproinsäure | HT1376, 5637 Zellen: Verringerte Viabilität, ↑ subG1-Fraktion (HT1376), ↑ p21 (mRNA und Protein) | [254] |
| | | Valproinsäure | T-24, HT1376, RT4 Zellen: Dosisabhängige Inhibition der Invasionsfähigkeit (nicht RT4), keine Inhibition der Migration, Inhibition des T-24-Tumorwachstums in Xenograft | [273] |
| | | Valproinsäure | RT4, TCCSUP, UM-UC-3, RT-112 Zellen: Verringerte Viabilität und Proliferation, ↑ p27 (Protein), ↓ CDK1/2/4 und Cyclin B/D1/E und HDAC3/4 (Protein), Hyperacetylierung von Histon H3 und H4, erhöhte G1-Fraktion | [263] |
| | | Belinostat | 5637, T-24, J82 und RT4 Zellen: Verringerte Viabilität; Maus-Modell: Geringeres Gewicht bei oberflächlich entstehenden Tumoren, ↑ p21 (Protein) | [260] |
| | | KBH-A42 | UM-UC-3 Zellen: Im Vergleich zu anderen Entitäten geringste Sensitivität (verringerte Proliferation, leichte Inhibition des Wachstums von UM-UC-3 Tumoren in Xenograft), keine Apoptose-Induktion | [264] |
| | | TSA | T-24, NTUB1 Zellen: ↑ p21 (Protein), ↓ TGIF (<i>TG-interacting factor</i>)/p-AKT ^{Ser473} (Protein), verringerte Migrationsfähigkeit, ↑ PARP1-Spaltung (NTUB1) | [277] |
| | | Pracinostat | 5637, T-24, J82, TCC-SUP, TSU-Pr1 Zellen: ↑ ATF3 (Konzentrations- und Zeitabhängig, mRNA und Protein), ↑ Acetylierung von Histon H3/4 und α-Tubulin, Dosisabhängige Inhibition: Zellproliferation, Verankerungs-unabhängiges Wachstums und Migrationsfähigkeit; G0/G1-Arrest (nicht in normaler urothelialer Kontrolle SV-HUC1), ↑ hypophosphoryliertes aktives RB1, ↑ p21 (5637, T-24, TSU-Pr1, Protein), ↓ VEGF-A (<i>vascular endothelial growth factor A</i> , Protein) TSU-Pr1-Xenograft: signifikante Abnahme der Tumorgröße im Vergleich zur Kontrolle, ↑ ATF3 (Protein), ↑ Caspase-3-Spaltung | [278] |
| | | TSA | T-24 Zellen: Verringerte Zellproliferation, ↑ KLF4-Acetylierung, ↑ p21 (Protein), ↓ Cyclin B1 (Protein) | [279] |

Fortsetzung Tabelle 4

| C | HDACi | Kombination | Induzierte Effekte/Synergien | Ref. |
|----------------------------|--|--|--|-------|
| Präklinische Kombinationen | TSA Natrium-Butyrat Entinostat Romidepsin | TRAIL | T-24 Zellen: Erhöhte TRAIL-Induzierte Apoptose nach Vorbehandlung mit nicht-toxischen Konzentrationen; ↑ TRAILR2 (Protein) mit TSA und Natrium-Butyrat → Führt zur erhöhten DISC (<i>death-inducing signaling complex</i>)-Ausbildung, Caspase-Aktivität und Zelltod | [280] |
| | AR-42 Valproinsäure TSA Natrium-Butyrat | Cisplatin | SW780, HT1376 Zellen: Synergistische Induktion von Apoptose mit AR-42 in UC-Zellen, Inhibition des Tumorwachstums in Xenograft mit AR-42 | [281] |
| | Valproinsäure | Cisplatin Mitomycin C Adriamycin | BIU8, 5637, EJ Zellen und Rattenmodell: Höhere inhibitorische Aktivität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nach Kombination mit chemotherapeutischen Substanzen | [282] |
| | Panobinostat | Bestrahlung | RT-112 Zellen: Bestrahlungssensibilisierender Effekt in RT-112, ↓ Ku80 oder RAD51 (Protein); Erhöhte γ H2A.X-Foci-Bildung und verzögerte Reparatur nach Bestrahlung | [283] |
| | Natrium-Butyrat | Cisplatin | T-24, 253J, UM-UC-3 Zellen: Synergistische, Dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation, vermittelt durch G1-Arrest und Apoptose-Induktion, ↑ p21 (Protein), ↑ p27 (Protein) in 253J und UM-UC-3 | [284] |
| | Valproinsäure | Mitomycin C | HTB5 und HTB9 Zellen: Synergistische Konzentrations- und Zeit-abhängige Abnahme von Viabilität und Proliferation, Zelltod-Induktion | [285] |
| | TSA | Gemcitabin | HTB5, HTB9, T-24, J82, UM-UC-14, SW-1710 Zellen: Starker Synergismus mit deutlicher Dosisreduktion (bis zu 25-fach Gemcitabin, bis zu 40-fach TSA), Hemmung der NF- κ B- und AKT-Signalwege, Synergistischer S-Phasen-Arrest | [286] |
| | TSA | Cisplatin | Cisplatin-resistente T-24R2 Zellen: Synergismus mit Dosisreduktion (bis 5-fach), Synergistischer S- bzw. G2/M-Arrest, Caspase-vermittelte Apoptose, ↑ Pro-apoptotische Faktoren Bad (<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>) und BAX (Protein) | [287] |
| | Romidepsin | DMCA (2,3-dimethoxy-cinnamoyl azide) | T-24, TCC-SUP, UM-UC-3 Zellen: Synergistische Hemmung von Viabilität und Proliferation, Erhöhte Expression von Zellzyklus-Regulatoren (E2F-1 (<i>E2F transcription factor 1</i>), p21); Synergistische <i>in vivo</i> Anti-Tumor-Aktivität im Xenograft-Modell | [288] |

Fortsetzung Tabelle 4

| C | HDACi | Kombination | Induzierte Effekte/Synergien | Ref. |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|-------------|
| Präklinische Kombinationen | Romidepsin TSA | 5-Azacytidin | T-24, 253J, UM-UC-3, WH, TCC-SUP Zellen: G2/M-Arrest und Apoptose-Induktion durch Romidepsin, Effekte werden durch 5-Azacytidin verstärkt; Zwei Xenograft-Modelle: Signifikante Inhibition des Tumorwachstums durch Romidepsin, geringe Nebenwirkungen | [289] |
| | TSA | Gemcitabin | NGR Zellen (Gemcitabin-resistente Sublinie aus NTUB1 Zellen): Starker Synergismus, ↑ p21 (Protein), ↓ TGIF (Protein), ↑ PARP1- und Caspase-3-Spaltung | [277] |
| | OBP-801 | Celecoxib | T-24, UM-UC-3, UM-UC-11, HT1376 Zellen: Dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation und geringe Apoptose-Induktion durch OBP-801; Kombination: Effekte werden durch Celecoxib verstärkt mit deutlicher Dosisreduktion (synergistisch für T-24), erhöhte Caspasen-abhängige Apoptose (Caspase-3-, 8-, 9- und PARP1-Spaltung), ↑ BIM/DR5 (T-24, UM-UC-11, Protein), ↓ Survivin/c-FLIP (T-24, UM-UC-11, mRNA Protein) T-24-Xenograft: Signifikante Inhibition des Tumorwachstums im Vergleich zur Einzelbehandlung, Caspase-3-Spaltung, ↑ BIM/DR5 (Protein) | [291] |
| D | HDACi | Kombination | Phase/Status²⁶ | Ref. |
| Klinische Studien | Mocetinostat | --- | II, Patienten mit inaktivierenden Alterationen von Acetyltransferase-Genen (NCT02236195) | |
| | Entinostat | --- | I, abgeschlossen (NCT00020579) | |
| | SAHA | --- | I, abgeschlossen (NCT00045006) | |
| | SAHA | --- | II, abgebrochen (NCT00363883) | |
| | Belinostat | --- | I, abgeschlossen (NCT00413075) | |
| | Entinostat | 13-cis-Retinsäure | I, abgeschlossen (NCT00098891) | [548] |
| | SAHA | Docetaxel | I, abgebrochen, starke Toxizität (NCT00565227) | [549] |
| | SAHA | Doxorubicin | I, abgeschlossen, gut verträglich (NCT00331955) | [550] |
| | SAHA | Pembroli- zumab | I/II, läuft, Rekrutierungsphase (NCT02619253) | |
| | Belinostat | 5-Fluorouracil | I, abgeschlossen (NCT00413322) | |
| Belinostat | Carboplatin Paclitaxel | II, abgeschlossen (NCT00421889) | | |

²⁶ Genaue Beschreibung der klinischen Studien unter <https://clinicaltrials.gov>.

C Dosiswirkung von verwendeten Klasse I HDACi in UC-Zelllinien und Kontrollzellen

Tabelle 5: Zelluläre IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit verwendeten Klasse I HDACi nach 72-stündiger Behandlung. Die Viabilität der UC-Zelllinien (A) und der Kontrollzelllinien (B) wurde, nach Behandlung mit definierten HDACi-Konzentrationen für 72 Stunden, mit einem MTT-Assay bestimmt. Die angegebenen IC₅₀-Werte wurden mit einer nicht-linearen Regressions-Analyse mit Hilfe des Programms Origin 8.0 (Origin Lab, Northhampton, GB) errechnet. Große Teile dieser Tabelle sind bereits in Lehmann et al. 2014, Pinkerneil et al. 2016a und Pinkerneil et al. 2016b veröffentlicht [293, 295, 301].

| A | HDACi | | RT-112 | 5637 | VM-CUB1 | SW-1710 | 639-V | UM-UC-3 | T-24 |
|---|--------------|----|--------|------|---------|---------|-------|---------|------|
| IC₅₀ 72 Stunden UC-Zelllinien | Romidepsin | nM | 6,06 | --- | 4,27 | 3,59 | 6,47 | 3,36 | --- |
| | Givinostat | μM | 0,49 | --- | 0,49 | 0,39 | 0,43 | 0,63 | --- |
| | Entinostat | | 2,7 | --- | 3,28 | 1 | 3 | 4,59 | --- |
| | Mocetinostat | | 0,87 | --- | 1,2 | 0,59 | 0,94 | 0,81 | --- |
| | 4SC-202 | | 0,40 | 0,15 | 0,38 | 0,47 | 0,38 | 0,51 | 0,36 |
| | RGFP966 | | --- | --- | ≈ 50 | --- | --- | ≈ 100 | --- |
| | BG45 | | --- | --- | ≥ 50 | --- | --- | ≥ 100 | --- |
| | Compound 2 | | ≥ 50 | --- | ≥ 50 | ≥ 50 | ≥ 50 | ≥ 50 | --- |
| | Compound 5 | | 9,7 | --- | 18,7 | 20,8 | 12,6 | 18,9 | --- |
| | Compound 6 | | 9,1 | --- | 16 | 18,8 | 18,6 | 18,2 | --- |

Fortsetzung Tabelle 5

| B | HDACi | | HBLAK [292] | TERT- NHUC | HEK- 293 | VHF (HFF) | NUC ²⁷ [551, 552] |
|--|--------------|----|----------------|---------------|-------------|--------------|------------------------------------|
| IC ₅₀ 72 Stunden Kontrollzelllinien | Romidepsin | nM | 0,89 | 0,57 | 6,09 | 0,66 | --- |
| | Givinostat | μM | 0,15 | 0,16 | 0,19 | 0,12 | --- |
| | Entinostat | | --- | --- | 4,89 | 0,25 | --- |
| | Mocetinostat | | --- | --- | 1,15 | 0,10 | --- |
| | 4SC-202 | | 0,38 | 0,27 | 0,20 | --- | --- |
| | RGFP966 | | ≤ 25 | --- | ≈ 25 | --- | --- |
| | BG45 | | ≈ 50 | --- | ≈ 50 | --- | --- |
| | Compound 2 | | --- | --- | --- | --- | ≥ 50 |
| | Compound 5 | | --- | --- | --- | --- | 24,2 |
| | Compound 6 | | --- | --- | --- | --- | 10,2 |

²⁷ NUC – normal urothelial control; Zellen wurden nach einer Nephrektomie aus einem Harnleiter mittels eines publizierten Protokolls isoliert und kultiviert.

D Eigener Beitrag zu den verwendeten Publikationen

Publikation 1: Lehmann et al. 2014

Lehmann M, Hoffmann MJ, Koch A, Ulrich SM, Schulz WA, Niegisch G: **Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2014, **33**:59. Doi: 10.1186/s13046-014-0059-8.

Eigener Anteil an der Publikation insgesamt: 60 %

Autorenschaft: Erstautor

Konkrete Beiträge: Experimentelle Planung, Labortätigkeit, Datenanalyse, Manuskriptverfassung und -revision

Publikation 2: Pinkerneil et al. 2016a

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Köhrer K, Arent T, Schulz WA, Niegisch G: **Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2016, **15**:299-312. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0618.

Eigener Anteil an der Publikation insgesamt: 70 %

Autorenschaft: Erstautor

Konkrete Beiträge: Inhaltliche und experimentelle Planung, Labortätigkeit, Datenanalyse, Auswertung RNA-Expressionsstudien, Manuskriptverfassung und -revision

Publikation 3: Pinkerneil et al. 2016b

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Kohlhof H, Schulz WA, Niegisch G: **Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines.** *Targeted Oncology* 2016, **11**:783-798. Doi: 10.1007/s11523-016-0444-7.

Eigener Anteil an der Publikation insgesamt: 70 %

Autorenschaft: Erstautor

Konkrete Beiträge: Inhaltliche und experimentelle Planung, Labortätigkeit, Datenanalyse, Manuskriptverfassung und -revision

LITERATURVERZEICHNIS

1. Knowles MA, Hurst CD: **Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity.** *Nat Rev Cancer* 2015, **15**:25-41.
2. Seront E, Machiels JP: **Molecular biology and targeted therapies for urothelial carcinoma.** *Cancer Treat Rev* 2015, **41**:341-353.
3. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmstrom PU, Choi W, Guo CC, Lotan Y, Kassouf W: **Bladder cancer.** *Lancet* 2016, **388**:2796-2810.
4. Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, Shariat SF, Zlotta AR, Boorjian SA: **Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes.** *Eur Urol* 2016, **69**:300-10.
5. VanderWalde NA, Chi MT, Hurria A, Galsky MD, Nielsen ME: **Treatment of muscle invasive bladder cancer in the elderly: navigating the trade-offs of risk and benefit.** *World J Urol* 2016, **34**:3-11.
6. van Osch FH, Jochems SH, van Schooten FJ, Bryan RT, Zeegers MP: **Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies.** *Int J Epidemiol* 2016, **45**:857-870.
7. Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Comperat EM, Hernandez V, Kaasinen E, Palou J, Roupret M, et al: **EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016.** *Eur Urol* 2017, **71**:447-461.
8. Knuchel-Clarke R, Gaisa NT: **Präneoplastische Läsionen und Vorstufen des Urothelkarzinoms.** *Pathologe* 2016, **37**:33-39.
9. Yuan X, Yu L, Li J, Xie G, Rong T, Zhang L, Chen J, Meng Q, Irving AT, Wang D, et al: **ATF3 suppresses metastasis of bladder cancer by regulating gelsolin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton.** *Cancer Res* 2013, **73**:3625-3637.
10. Bryan RT: **Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015, **370**:20140042.
11. Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, Burt G, Mills IG, Warren A, Leung HY, Murphy G, Edwards DR, Neal DE, Kelly JD: **Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma.** *Br J Cancer* 2006, **94**:569-577.
12. Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP, Persson JL: **Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer.** *Anticancer Res* 2013, **33**:2381-2390.
13. Schepeler T, Lamy P, Hvidberg V, Laurberg JR, Fristrup N, Reinert T, Bartkova J, Tropia L, Bartek J, Halazonetis TD, et al: **A high resolution genomic portrait of bladder cancer: correlation between genomic aberrations and the DNA damage response.** *Oncogene* 2013, **32**:3577-3586.
14. Alfred Witjes J, Lebet T, Comperat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, Hernandez V, Espinos EL, Dunn J, Rouanne M, et al: **Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer.** *Eur Urol* 2017, **71**:462-475.
15. Rudzinski JK, Basappa NS, North S: **Perioperative chemotherapy for muscle invasive bladder cancer.** *Curr Opin Support Palliat Care* 2015, **9**:249-254.
16. Massari F, Santoni M, Ciccamese C, Brunelli M, Conti A, Santini D, Montironi R, Cascinu S, Tortora G: **Emerging concepts on drug resistance in bladder**

- cancer: Implications for future strategies.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2015, **96**:81-90.
17. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G: **Molecular mechanisms of cisplatin resistance.** *Oncogene* 2012, **31**:1869-1883.
 18. Lu CS, Shieh GS, Wang CT, Su BH, Su YC, Chen YC, Su WC, Wu P, Yang WH, Shiau AL, Wu CL: **Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer.** *Oncotarget* 2017, **8**:30844-30858.
 19. Kashiwagi E, Ide H, Inoue S, Kawahara T, Zheng Y, Reis LO, Baras AS, Miyamoto H: **Androgen receptor activity modulates responses to cisplatin treatment in bladder cancer.** *Oncotarget* 2016, **7**:49169-49179.
 20. Roche J, Bertrand P: **Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors.** *Eur J Med Chem* 2016, **121**:451-483.
 21. Gryder BE, Sodji QH, Oyeler AK: **Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed.** *Future Med Chem* 2012, **4**:505-524.
 22. Stengel KR, Hiebert SW: **Class I HDACs Affect DNA Replication, Repair, and Chromatin Structure: Implications for Cancer Therapy.** *Antioxid Redox Signal* 2015, **23**:51-65.
 23. Falkenberg KJ, Johnstone RW: **Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders.** *Nat Rev Drug Discov* 2014, **13**:673-691.
 24. Cyr AR, Domann FE: **The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences.** *Antioxid Redox Signal* 2011, **15**:551-589.
 25. Li Z, Zhu WG: **Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications.** *Int J Biol Sci* 2014, **10**:757-770.
 26. Zentner GE, Henikoff S: **Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications.** *Nat Struct Mol Biol* 2013, **20**:259-266.
 27. Schulz WA, Koutsogiannouli EA, Niegisch G, Hoffmann MJ: **Epigenetics of urothelial carcinoma.** *Methods Mol Biol* 2015, **1238**:183-215.
 28. Niegisch G, Hoffmann MJ, Koutsogiannouli EA, Schulz WA: **Epigenetik des Urothelkarzinoms.** *Urologe A* 2015, **54**:526-532.
 29. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L, et al: **Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder.** *Nat Genet* 2011, **43**:875-878.
 30. Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, Dean M, Huang Y, Jia W, Zhou Q, et al: **Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation.** *Nat Genet* 2013, **45**:1459-1463.
 31. Cancer Genome Atlas Research N: **Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma.** *Nature* 2014, **507**:315-322.
 32. Van Dyke MW: **Lysine deacetylase (KDAC) regulatory pathways: an alternative approach to selective modulation.** *ChemMedChem* 2014, **9**:511-522.
 33. Ozdemir A, Masumoto H, Fitzjohn P, Verreault A, Logie C: **Histone H3 lysine 56 acetylation: a new twist in the chromosome cycle.** *Cell Cycle* 2006, **5**:2602-2608.

34. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G: **HDACs and HDAC inhibitors in urothelial carcinoma - perspectives for an antineoplastic treatment.** *Curr Med Chem* 2017, Epub ahead of print.
35. Spiegel S, Milstien S, Grant S: **Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy.** *Oncogene* 2012, **31**:537-551.
36. Seto E, Yoshida M: **Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, **6**:a018713.
37. Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV: **Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis.** *J Mol Biol* 2004, **338**:17-31.
38. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB: **Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.** *Biochem J* 2003, **370**:737-749.
39. Longworth MS, Laimins LA: **Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src.** *Oncogene* 2006, **25**:4495-4500.
40. Micelli C, Rastelli G: **Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity.** *Drug Discov Today* 2015, **20**:718-735.
41. Reichert N, Choukrallah MA, Matthias P: **Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development.** *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**:2173-2187.
42. New M, Olzscha H, La Thangue NB: **HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code?** *Mol Oncol* 2012, **6**:637-656.
43. Ma P, Schultz RM: **HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: Specificity versus compensation.** *Cell Death Differ* 2016, **23**:1119-1127.
44. Rosato RR, Grant S: **Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality.** *Expert Opin Ther Targets* 2005, **9**:809-824.
45. Gantt SL, Gattis SG, Fierke CA: **Catalytic activity and inhibition of human histone deacetylase 8 is dependent on the identity of the active site metal ion.** *Biochemistry* 2006, **45**:6170-6178.
46. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP: **Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.** *Nature* 1999, **401**:188-193.
47. Gantt SL, Joseph CG, Fierke CA: **Activation and inhibition of histone deacetylase 8 by monovalent cations.** *J Biol Chem* 2010, **285**:6036-6043.
48. Vanommeslaeghe K, De Proft F, Loverix S, Tourwe D, Geerlings P: **Theoretical study revealing the functioning of a novel combination of catalytic motifs in histone deacetylase.** *Bioorg Med Chem* 2005, **13**:3987-3992.
49. Corminboeuf C, Hu P, Tuckerman ME, Zhang Y: **Unexpected deacetylation mechanism suggested by a density functional theory QM/MM study of histone-deacetylase-like protein.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:4530-4531.
50. Lahm A, Paolini C, Pallaoro M, Nardi MC, Jones P, Neddermann P, Sambucini S, Bottomley MJ, Lo Surdo P, Carfi A, et al: **Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:17335-17340.
51. Bao X, Wang Y, Li X, Li XM, Liu Z, Yang T, Wong CF, Zhang J, Hao Q, Li XD: **Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach.** *Elife* 2014, **3**:e02999.

52. Madsen AS, Olsen CA: **Profiling of substrates for zinc-dependent lysine deacylase enzymes: HDAC3 exhibits decrotonylase activity in vitro.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2012, **51**:9083-9087.
53. Moser MA, Hagekruys A, Seiser C: **Transcription and beyond: the role of mammalian class I lysine deacetylases.** *Chromosoma* 2014, **123**:67-78.
54. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I: **HDAC family: What are the cancer relevant targets?** *Cancer Lett* 2009, **277**:8-21.
55. Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW: **Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2010, **10**:935-954.
56. Yang XJ, Seto E: **HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention.** *Oncogene* 2007, **26**:5310-5318.
57. Portela A, Esteller M: **Epigenetic modifications and human disease.** *Nat Biotechnol* 2010, **28**:1057-1068.
58. Kim HJ, Bae SC: **Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs.** *Am J Transl Res* 2011, **3**:166-179.
59. Chakrabarti A, Oehme I, Witt O, Oliveira G, Sippl W, Romier C, Pierce RJ, Jung M: **HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions.** *Trends Pharmacol Sci* 2015, **36**:481-492.
60. Delcuve GP, Khan DH, Davie JR: **Targeting class I histone deacetylases in cancer therapy.** *Expert Opin Ther Targets* 2013, **17**:29-41.
61. Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE, Seto E: **Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4.** *Genes Dev* 2005, **19**:827-839.
62. Takami Y, Nakayama T: **N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line.** *J Biol Chem* 2000, **275**:16191-16201.
63. Yang WM, Tsai SC, Wen YD, Fejer G, Seto E: **Functional domains of histone deacetylase-3.** *J Biol Chem* 2002, **277**:9447-9454.
64. Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, Chakravarty P, Paolini C, De Francesco R, Gallinari P, et al: **Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:15064-15069.
65. Lee H, Rezai-Zadeh N, Seto E: **Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:765-773.
66. Van den Wyngaert I, de Vries W, Kremer A, Neefs J, Verhasselt P, Luyten WH, Kass SU: **Cloning and characterization of human histone deacetylase 8.** *FEBS Lett* 2000, **478**:77-83.
67. Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Sung CM, Liu R, Winkler J: **Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor.** *J Biol Chem* 2000, **275**:15254-15264.
68. Liang J, Wan M, Zhang Y, Gu P, Xin H, Jung SY, Qin J, Wong J, Cooney AJ, Liu D, Songyang Z: **Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:731-739.

69. Choi E, Han C, Park I, Lee B, Jin S, Choi H, Kim do H, Park ZY, Eddy EM, Cho C: **A novel germ cell-specific protein, SHIP1, forms a complex with chromatin remodeling activity during spermatogenesis.** *J Biol Chem* 2008, **283**:35283-35294.
70. Bantscheff M, Hopf C, Savitski MM, Dittmann A, Grandi P, Michon AM, Schlegl J, Abraham Y, Becher I, Bergamini G, et al: **Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes.** *Nat Biotechnol* 2011, **29**:255-265.
71. Itoh T, Fairall L, Muskett FW, Milano CP, Watson PJ, Arnaudo N, Saleh A, Millard CJ, El-Mezgueldi M, Martino F, Schwabe JW: **Structural and functional characterization of a cell cycle associated HDAC1/2 complex reveals the structural basis for complex assembly and nucleosome targeting.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**:2033-2044.
72. Guenther MG, Barak O, Lazar MA: **The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:6091-6101.
73. Wen YD, Perissi V, Staszewski LM, Yang WM, Kronen A, Glass CK, Rosenfeld MG, Seto E: **The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:7202-7207.
74. Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, Verdin E: **Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR.** *Mol Cell* 2002, **9**:45-57.
75. Fischle W, Dequiedt F, Fillion M, Hendzel MJ, Voelter W, Verdin E: **Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo.** *J Biol Chem* 2001, **276**:35826-35835.
76. Thomas EA: **Involvement of HDAC1 and HDAC3 in the Pathology of Polyglutamine Disorders: Therapeutic Implications for Selective HDAC1/HDAC3 Inhibitors.** *Pharmaceuticals (Basel)* 2014, **7**:634-661.
77. Hayakawa T, Nakayama J: **Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase.** *J Biomed Biotechnol* 2011, **2011**:129383.
78. Millard CJ, Watson PJ, Celardo I, Gordiyenko Y, Cowley SM, Robinson CV, Fairall L, Schwabe JW: **Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates.** *Mol Cell* 2013, **51**:57-67.
79. Watson PJ, Fairall L, Santos GM, Schwabe JW: **Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate.** *Nature* 2012, **481**:335-340.
80. Watson PJ, Millard CJ, Riley AM, Robertson NS, Wright LC, Godage HY, Cowley SM, Jamieson AG, Potter BV, Schwabe JW: **Insights into the activation mechanism of class I HDAC complexes by inositol phosphates.** *Nat Commun* 2016, **7**:11262.
81. Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D, Harel-Bellan A: **Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase.** *Nature* 1998, **391**:601-605.
82. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T: **Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.** *Nature* 1998, **391**:597-601.
83. Morrison AJ, Sardet C, Herrera RE: **Retinoblastoma protein transcriptional repression through histone deacetylation of a single nucleosome.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:856-865.

84. Vance KW, Carreira S, Brosch G, Goding CR: **Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas.** *Cancer Res* 2005, **65**:2260-2268.
85. Doetzlhofer A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, Wintersberger E, Seiser C: **Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:5504-5511.
86. LeBoeuf M, Terrell A, Trivedi S, Sinha S, Epstein JA, Olson EN, Morrissey EE, Millar SE: **Hdac1 and Hdac2 act redundantly to control p63 and p53 functions in epidermal progenitor cells.** *Dev Cell* 2010, **19**:807-818.
87. Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, Jia C, Kee HJ, Li L, Hannenhalli S, Epstein JA: **Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation.** *Dev Cell* 2010, **19**:450-459.
88. Serebryanny LA, Cruz CM, de Lanerolle P: **A Role for Nuclear Actin in HDAC 1 and 2 Regulation.** *Sci Rep* 2016, **6**:28460.
89. Pflum MK, Tong JK, Lane WS, Schreiber SL: **Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:47733-47741.
90. Cai R, Kwon P, Yan-Neale Y, Sambuccetti L, Fischer D, Cohen D: **Mammalian histone deacetylase 1 protein is posttranslationally modified by phosphorylation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **283**:445-453.
91. Citro S, Jaffray E, Hay RT, Seiser C, Chiocca S: **A role for paralog-specific sumoylation in histone deacetylase 1 stability.** *J Mol Cell Biol* 2013, **5**:416-427.
92. Li Z, Hao Q, Luo J, Xiong J, Zhang S, Wang T, Bai L, Wang W, Chen M, Wang W, et al: **USP4 inhibits p53 and NF-kappaB through deubiquitinating and stabilizing HDAC2.** *Oncogene* 2016, **35**:2902-2912.
93. Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW: **Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:3697-3702.
94. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL: **Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions.** *Science* 2006, **311**:844-847.
95. Muller S, Filippakopoulos P, Knapp S: **Bromodomains as therapeutic targets.** *Expert Rev Mol Med* 2011, **13**:e29.
96. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, et al: **Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification.** *Cell* 2011, **146**:1016-1028.
97. Olsen CA: **Expansion of the lysine acylation landscape.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2012, **51**:3755-3756.
98. Marmorstein R, Zhou MM: **Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, **6**:a018762.
99. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, Barsyte-Lovejoy D, Felletar I, Volkmer R, Muller S, Pawson T, et al: **Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family.** *Cell* 2012, **149**:214-231.
100. Lange M, Kaynak B, Forster UB, Tonjes M, Fischer JJ, Grimm C, Schlesinger J, Just S, Dunkel I, Krueger T, et al: **Regulation of muscle development by**

- DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex.** *Genes Dev* 2008, **22**:2370-2384.
101. Zeng L, Zhang Q, Li S, Plotnikov AN, Walsh MJ, Zhou MM: **Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b.** *Nature* 2010, **466**:258-262.
102. Ali M, Yan K, Lalonde ME, Degerny C, Rothbart SB, Strahl BD, Cote J, Yang XJ, Kutateladze TG: **Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin.** *J Mol Biol* 2012, **424**:328-338.
103. Bose P, Dai Y, Grant S: **Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights.** *Pharmacol Ther* 2014, **143**:323-336.
104. Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K: **Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes.** *Cell* 2009, **138**:1019-1031.
105. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA: **Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action.** *Oncogene* 2007, **26**:5541-5552.
106. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E: **Acetylation and deacetylation of non-histone proteins.** *Gene* 2005, **363**:15-23.
107. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M: **Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.** *Science* 2009, **325**:834-840.
108. Wilting RH, Yanover E, Heideman MR, Jacobs H, Horner J, van der Torre J, DePinho RA, Dannenberg JH: **Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis.** *EMBO J* 2010, **29**:2586-2597.
109. Yamaguchi T, Cubizolles F, Zhang Y, Reichert N, Kohler H, Seiser C, Matthias P: **Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression.** *Genes Dev* 2010, **24**:455-469.
110. Senese S, Zaragoza K, Minardi S, Muradore I, Ronzoni S, Passafaro A, Bernard L, Draetta GF, Alcalay M, Seiser C, Chiocca S: **Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:4784-4795.
111. Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C: **Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression.** *EMBO J* 2002, **21**:2672-2681.
112. Weichert W: **HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies.** *Cancer Lett* 2009, **280**:168-176.
113. Barneda-Zahonero B, Parra M: **Histone deacetylases and cancer.** *Mol Oncol* 2012, **6**:579-589.
114. Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, Basaki Y, Ono M, Kuwano M, Tanaka M, Tsuneyoshi M: **Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues.** *Oncol Rep* 2007, **18**:769-774.
115. West AC, Johnstone RW: **New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment.** *J Clin Invest* 2014, **124**:30-39.
116. Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Ralfkiaer E: **Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma.** *Histopathology* 2008, **53**:267-277.
117. Adams H, Fritzsche FR, Dirnhofer S, Kristiansen G, Tzankov A: **Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma.** *Expert Opin Ther Targets* 2010, **14**:577-584.

118. Mithraprabhu S, Kalff A, Chow A, Khong T, Spencer A: **Dysregulated Class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma.** *Epigenetics* 2014, **9**:1511-1520.
119. Min SK, Koh YH, Park Y, Kim HJ, Seo J, Park HR, Cho SJ, Kim IS: **Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas.** *Korean J Pathol* 2012, **46**:142-150.
120. Marquard L, Poulsen CB, Gjerdrum LM, de Nully Brown P, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Johansen P, Ralfkiaer E: **Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas.** *Histopathology* 2009, **54**:688-698.
121. Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, Beck JF, Sonnemann J: **The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leuk Res* 2013, **37**:1200-1207.
122. Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MA, de Paula Queiroz R, Valera ET, da Silva Silveira V, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG: **Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *Br J Haematol* 2010, **150**:665-673.
123. Tao YF, Pang L, Du XJ, Sun LC, Hu SY, Lu J, Cao L, Zhao WL, Feng X, Wang J, et al: **Differential mRNA expression levels of human histone-modifying enzymes in normal karyotype B cell pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**:3376-3394.
124. Krumm A, Barckhausen C, Kucuk P, Tomaszowski KH, Loquai C, Fahrner J, Kramer OH, Kaina B, Roos WP: **Enhanced Histone Deacetylase Activity in Malignant Melanoma Provokes RAD51 and FANCD2-Triggered Drug Resistance.** *Cancer Res* 2016, **76**:3067-3077.
125. Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, Mineur P, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B: **HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance.** *Epigenetics* 2012, **7**:1403-1412.
126. Ozdag H, Teschendorff AE, Ahmed AA, Hyland SJ, Blenkinsop C, Bobrow L, Veerakumarasivam A, Burt G, Subkhankulova T, Arends MJ, et al: **Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers.** *BMC Genomics* 2006, **7**:90.
127. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM: **Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer.** *J Biol Chem* 2006, **281**:13548-13558.
128. Ye P, Xing H, Lou F, Wang K, Pan Q, Zhou X, Gong L, Li D: **Histone deacetylase 2 regulates doxorubicin (Dox) sensitivity of colorectal cancer cells by targeting ABCB1 transcription.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2016, **77**:613-621.
129. Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R: **Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data.** *Neoplasia* 2004, **6**:744-750.
130. Wang LT, Chiou SS, Chai CY, Hsi E, Wang SN, Huang SK, Hsu SH: **Aryl hydrocarbon receptor regulates histone deacetylase 8 expression to repress tumor suppressive activity in hepatocellular carcinoma.** *Oncotarget* 2017, **8**:7489-7501.

131. Wu J, Du C, Lv Z, Ding C, Cheng J, Xie H, Zhou L, Zheng S: **The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma.** *Dig Dis Sci* 2013, **58**:3545-3553.
132. Waltregny D, North B, Van Mellaert F, de Leval J, Verdin E, Castronovo V: **Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells.** *Eur J Histochem* 2004, **48**:273-290.
133. Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G: **Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy.** *Br J Cancer* 2008, **98**:604-610.
134. Fakhry H, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Ke H, Konishi I, Shiozawa T: **Immunohistochemical detection of histone deacetylases in endometrial carcinoma: involvement of histone deacetylase 2 in the proliferation of endometrial carcinoma cells.** *Hum Pathol* 2010, **41**:848-858.
135. Regel I, Merkl L, Friedrich T, Burgermeister E, Zimmermann W, Einwachter H, Herrmann K, Langer R, Rocken C, Hofheinz R, et al: **Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2.** *Gastroenterology* 2012, **143**:99-109 e110.
136. Lehmann A, Denkert C, Budczies J, Buckendahl AC, Darb-Esfahani S, Noske A, Muller BM, Bahra M, Neuhaus P, Dietel M, et al: **High class I HDAC activity and expression are associated with RelA/p65 activation in pancreatic cancer in vitro and in vivo.** *BMC Cancer* 2009, **9**:395.
137. Ouaiissi M, Silvy F, Loncle C, Ferraz da Silva D, Martins Abreu C, Martinez E, Berthezene P, Cadra S, Le Treut YP, Hardwigsen J, et al: **Further characterization of HDAC and SIRT gene expression patterns in pancreatic cancer and their relation to disease outcome.** *PloS One* 2014, **9**:e108520.
138. Krusche CA, Wulfing P, Kersting C, Vloet A, Bocker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J: **Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **90**:15-23.
139. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H: **Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **94**:11-16.
140. Seo J, Min SK, Park HR, Kim DH, Kwon MJ, Kim LS, Ju YS: **Expression of Histone Deacetylases HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC6 in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast.** *J Breast Cancer* 2014, **17**:323-331.
141. Khabele D, Son DS, Parl AK, Goldberg GL, Augenlicht LH, Mariadason JM, Rice VM: **Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**:795-801.
142. Weichert W, Denkert C, Noske A, Darb-Esfahani S, Dietel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Kobel M: **Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas.** *Neoplasia* 2008, **10**:1021-1027.
143. Zhao H, Yu Z, Zhao L, He M, Ren J, Wu H, Chen Q, Yao W, Wei M: **HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy.** *Jpn J Clin Oncol* 2016, **46**:893-902.

144. Hsieh CL, Ma HP, Su CM, Chang YJ, Hung WY, Ho YS, Huang WJ, Lin RK: **Alterations in histone deacetylase 8 lead to cell migration and poor prognosis in breast cancer.** *Life Sci* 2016, **151**:7-14.
145. Jung KH, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Bae HJ, Xie HJ, Chang YG, Kim MG, Park H, Lee JY, Nam SW: **HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins.** *J Cell Biochem* 2012, **113**:2167-2177.
146. Minamiya Y, Ono T, Saito H, Takahashi N, Ito M, Mitsui M, Motoyama S, Ogawa J: **Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung.** *Lung Cancer* 2011, **74**:300-304.
147. Wang X, Guo H, Liu W, Yang C, Yang L, Wang D, Wang X: **Effects of siRNA-Mediated Knockdown of HDAC1 on the Biological Behavior of Esophageal Carcinoma Cell Lines.** *Med Sci Monit* 2016, **22**:1291-1296.
148. Wang F, Qi Y, Li X, He W, Fan QX, Zong H: **HDAC inhibitor trichostatin A suppresses esophageal squamous cell carcinoma metastasis through HDAC2 reduced MMP-2/9.** *Clin Invest Med* 2013, **36**:E87-94.
149. He J, Shen S, Lu W, Zhou Y, Hou Y, Zhang Y, Jiang Y, Liu H, Shao Y: **HDAC1 promoted migration and invasion binding with TCF12 by promoting EMT progress in gallbladder cancer.** *Oncotarget* 2016, **7**:32754-32764.
150. Fritzsche FR, Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Scholman K, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G: **Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer.** *BMC Cancer* 2008, **8**:381.
151. Ramakrishnan S, Ku S, Ciamporcerro E, Miles KM, Attwood K, Chintala S, Shen L, Ellis L, Sotomayor P, Swetzig W, et al: **HDAC 1 and 6 modulate cell invasion and migration in clear cell renal cell carcinoma.** *BMC Cancer* 2016, **16**:617.
152. Zhu J, Wan H, Xue C, Jiang T, Qian C, Zhang Y: **Histone deacetylase 3 implicated in the pathogenesis of children glioma by promoting glioma cell proliferation and migration.** *Brain Res* 2013, **1520**:15-22.
153. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, Pickert D, Linke JP, Hero B, Kopp-Schneider A, Westermann F, Ulrich SM, von Deimling A, et al: **Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:91-99.
154. Ono S, Oue N, Kuniyasu H, Suzuki T, Ito R, Matsusaki K, Ishikawa T, Tahara E, Yasui W: **Acetylated histone H4 is reduced in human gastric adenomas and carcinomas.** *J Exp Clin Cancer Res* 2002, **21**:377-382.
155. Chen C, Zhao M, Yin N, He B, Wang B, Yuan Y, Yu F, Hu J, Yin B, Lu Q: **Abnormal histone acetylation and methylation levels in esophageal squamous cell carcinomas.** *Cancer Invest* 2011, **29**:548-556.
156. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, et al: **Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.** *Nat Genet* 2005, **37**:391-400.
157. Lutz L, Fitzner IC, Ahrens T, Geissler AL, Makowiec F, Hopt UT, Bogatyreva L, Hauschke D, Werner M, Lassmann S: **Histone modifiers and marks define heterogeneous groups of colorectal carcinomas and affect responses to HDAC inhibitors in vitro.** *Am J Cancer Res* 2016, **6**:664-676.

158. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M, Caballero R, Alaminos M, Setien F, Paz MF, et al: **A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition.** *Nat Genet* 2006, **38**:566-569.
159. Santoro F, Botrugno OA, Dal Zuffo R, Pallavicini I, Matthews GM, Cluse L, Barozzi I, Senese S, Fornasari L, Moretti S, et al: **A dual role for Hdac1: oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance.** *Blood* 2013, **121**:3459-3468.
160. Dovey OM, Foster CT, Conte N, Edwards SA, Edwards JM, Singh R, Vassiliou G, Bradley A, Cowley SM: **Histone deacetylase 1 and 2 are essential for normal T-cell development and genomic stability in mice.** *Blood* 2013, **121**:1335-1344.
161. Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, Chandrasekharan MB, Wilson AJ, Zheng S, Yenamandra A, Locke K, Yuan JL, Bonine-Summers AR, et al: **Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability.** *Cancer cell* 2010, **18**:436-447.
162. Lin KT, Wang YW, Chen CT, Ho CM, Su WH, Jou YS: **HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:4691-4701.
163. Duvic M, Vu J: **Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma.** *Expert Opin Investig Drugs* 2007, **16**:1111-1120.
164. Grant C, Rahman F, Piekarz R, Peer C, Frye R, Robey RW, Gardner ER, Figg WD, Bates SE: **Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2010, **10**:997-1008.
165. Poole RM: **Belinostat: first global approval.** *Drugs* 2014, **74**:1543-1554.
166. Fenichel MP: **FDA approves new agent for multiple myeloma.** *J Natl Cancer Inst* 2015, **107**:d1v165.
167. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Niegisch G: **Epigenetic treatment options in urothelial carcinoma.** In: Schulz WA, Niegisch G, Hoffmann MJ (eds): *Urothelial Carcinoma. Methods in Molecular Biology. Volume 1655. Springer Protocols. Humana Press, in press, 2017.*
168. Wagner FF, Weiwer M, Steinbacher S, Schomburg A, Reinemer P, Gale JP, Campbell AJ, Fisher SL, Zhao WN, Reis SA, et al: **Kinetic and structural insights into the binding of histone deacetylase 1 and 2 (HDAC1, 2) inhibitors.** *Bioorg Med Chem* 2016, **24**:4008-4015.
169. Wells CE, Bhaskara S, Stengel KR, Zhao Y, Sirbu B, Chagot B, Cortez D, Khabele D, Chazin WJ, Cooper A, et al: **Inhibition of histone deacetylase 3 causes replication stress in cutaneous T cell lymphoma.** *PLoS One* 2013, **8**:e68915.
170. Malvaez M, McQuown SC, Rogge GA, Astarabadi M, Jacques V, Carreiro S, Rusche JR, Wood MA: **HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:2647-2652.
171. Minami J, Suzuki R, Mazitschek R, Gorgun G, Ghosh B, Cirstea D, Hu Y, Mimura N, Ohguchi H, Cottini F, et al: **Histone deacetylase 3 as a novel therapeutic target in multiple myeloma.** *Leukemia* 2014, **28**:680-689.
172. Becher I, Dittmann A, Savitski MM, Hopf C, Drewes G, Bantscheff M: **Chemoproteomics reveals time-dependent binding of histone deacetylase**

- inhibitors to endogenous repressor complexes. *ACS Chem Biol* 2014, **9**:1736-1746.**
173. Bressi JC, de Jong R, Wu Y, Jennings AJ, Brown JW, O'Connell S, Tari LW, Skene RJ, Vu P, Navre M, et al: **Benzimidazole and imidazole inhibitors of histone deacetylases: Synthesis and biological activity.** *Bioorg Med Chem Lett* 2010, **20**:3138-3141.
174. Zhang L, Han Y, Jiang Q, Wang C, Chen X, Li X, Xu F, Jiang Y, Wang Q, Xu W: **Trend of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: isoform selectivity or multitargeted strategy.** *Med Res Rev* 2015, **35**:63-84.
175. Datta J, Islam M, Dutta S, Roy S, Pan Q, Teknos TN: **Suberoylanilide hydroxamic acid inhibits growth of head and neck cancer cell lines by reactivation of tumor suppressor microRNAs.** *Oral Oncol* 2016, **56**:32-39.
176. Shen L, Orillion A, Pili R: **Histone deacetylase inhibitors as immunomodulators in cancer therapeutics.** *Epigenomics* 2016, **8**:415-428.
177. Yang J, Jin X, Yan Y, Shao Y, Pan Y, Roberts LR, Zhang J, Huang H, Jiang J: **Inhibiting histone deacetylases suppresses glucose metabolism and hepatocellular carcinoma growth by restoring FBP1 expression.** *Sci Rep* 2017, **7**:43864.
178. Cornago M, Garcia-Alberich C, Blasco-Angulo N, Vall-Llaura N, Nager M, Herreros J, Comella JX, Sanchis D, Llovera M: **Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe.** *Cell Death Dis* 2014, **5**:e1435.
179. Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, Okada T, Nakamura T, Li Y, Takasaki M, Nakabeppu Y, Iwamoto Y: **Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines.** *Anticancer Res* 2008, **28**:1585-1591.
180. Ishii S, Kurasawa Y, Wong J, Yu-Lee LY: **Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:4179-4184.
181. Gabrielli B, Brown M: **Histone deacetylase inhibitors disrupt the mitotic spindle assembly checkpoint by targeting histone and nonhistone proteins.** *Adv Cancer Res* 2012, **116**:1-37.
182. Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW: **The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:10833-10838.
183. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, McMullan C, Poulaki V, Fanourakis G, Schlossman R, Chauhan D, Munshi NC, Hideshima T, et al: **Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells.** *Blood* 2003, **101**:4055-4062.
184. Lindemann RK, Newbold A, Whitecross KF, Cluse LA, Frew AJ, Ellis L, Williams S, Wiegman AP, Dear AE, Scott CL, et al: **Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:8071-8076.
185. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S: **Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:5429-5444.

186. Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, Ehinger M, Fisher PB, Grant S: **Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53.** *Oncogene* 1999, **18**:7016-7025.
187. Kurita-Ochiai T, Amano S, Fukushima K, Ochiai K: **Cellular events involved in butyric acid-induced T cell apoptosis.** *J Immunol* 2003, **171**:3576-3584.
188. Rahmani M, Reese E, Dai Y, Bauer C, Payne SG, Dent P, Spiegel S, Grant S: **Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species.** *Cancer Res* 2005, **65**:2422-2432.
189. Rosato RR, Almenara JA, Grant S: **The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1.** *Cancer Res* 2003, **63**:3637-3645.
190. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA: **Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:673-678.
191. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM: **The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:11700-11705.
192. Sirbu BM, Couch FB, Feigerle JT, Bhaskara S, Hiebert SW, Cortez D: **Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks.** *Genes Dev* 2011, **25**:1320-1327.
193. Thaler F, Minucci S: **Next generation histone deacetylase inhibitors: the answer to the search for optimized epigenetic therapies?** *Expert Opin Drug Discov* 2011, **6**:393-404.
194. Fantin VR, Richon VM: **Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors and their therapeutic implications.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:7237-7242.
195. Robey RW, Chakraborty AR, Basseville A, Luchenko V, Bahr J, Zhan Z, Bates SE: **Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance.** *Mol Pharm* 2011, **8**:2021-2031.
196. Fotheringham S, Epping MT, Stimson L, Khan O, Wood V, Pezzella F, Bernards R, La Thangue NB: **Genome-wide loss-of-function screen reveals an important role for the proteasome in HDAC inhibitor-induced apoptosis.** *Cancer Cell* 2009, **15**:57-66.
197. West AC, Mattarollo SR, Shortt J, Cluse LA, Christiansen AJ, Smyth MJ, Johnstone RW: **An intact immune system is required for the anticancer activities of histone deacetylase inhibitors.** *Cancer Res* 2013, **73**:7265-7276.
198. Fiskus W, Rao R, Fernandez P, Herger B, Yang Y, Chen J, Kolhe R, Mandawat A, Wang Y, Joshi R, et al: **Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells.** *Blood* 2008, **112**:2896-2905.
199. Alzoubi S, Brody L, Rahman S, Mahul-Mellier AL, Mercado N, Ito K, El-Bahrawy M, Silver A, Boobis A, Bell JD, Hajji N: **Synergy between histone deacetylase inhibitors and DNA-damaging agents is mediated by histone deacetylase 2 in colorectal cancer.** *Oncotarget* 2016, **7**:44505-44521.

200. Wu X, Yang N, Zhou WH, Xu J, Chen JJ, Zheng FM, Long ZJ, Yue CF, Ai KX, Liu LL, et al: **Up-regulation of P21 inhibits TRAIL-mediated extrinsic apoptosis, contributing resistance to SAHA in acute myeloid leukemia cells.** *Cell Physiol Biochem* 2014, **34**:506-518.
201. Kanno S, Maeda N, Tomizawa A, Yomogida S, Katoh T, Ishikawa M: **Characterization of cells resistant to the potent histone deacetylase inhibitor spiruchostatin B (SP-B) and effect of overexpressed p21waf1/cip1 on the SP-B resistance or susceptibility of human leukemia cells.** *Int J Oncol* 2012, **41**:862-868.
202. Chakraborty AR, Robey RW, Luchenko VL, Zhan Z, Piekarcz RL, Gillet JP, Kossenkov AV, Wilkerson J, Showe LC, Gottesman MM, et al: **MAPK pathway activation leads to Bim loss and histone deacetylase inhibitor resistance: rationale to combine romidepsin with an MEK inhibitor.** *Blood* 2013, **121**:4115-4125.
203. Zhijun H, Shusheng W, Han M, Jianping L, Li-Sen Q, Dechun L: **Pre-clinical characterization of 4SC-202, a novel class I HDAC inhibitor, against colorectal cancer cells.** *Tumour Biol* 2016, **37**:10257-10267.
204. Joosten M, Ginzel S, Blex C, Schmidt D, Gombert M, Chen C, Linka RM, Grabner O, Hain A, Hirsch B, et al: **A novel approach to detect resistance mechanisms reveals FGR as a factor mediating HDAC inhibitor SAHA resistance in B-cell lymphoma.** *Mol Oncol* 2016, **10**:1232-1244.
205. Zou Z, Luo X, Nie P, Wu B, Zhang T, Wei Y, Wang W, Geng G, Jiang J, Mi Y: **Inhibition of SRC-3 enhances sensitivity of human cancer cells to histone deacetylase inhibitors.** *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **478**:227-233.
206. Min HY, Lee SC, Woo JK, Jung HJ, Park KH, Jeong HM, Hyun SY, Cho J, Lee W, Park JE, et al: **Essential role of DNA methyltransferase 1-mediated transcription of insulin-like Growth Factor 2 in Resistance to Histone Deacetylase Inhibitors.** *Clin Cancer Res* 2016.
207. Lee SC, Min HY, Jung HJ, Park KH, Hyun SY, Cho J, Woo JK, Kwon SJ, Lee HJ, Johnson FM, Lee HY: **Essential role of insulin-like growth factor 2 in resistance to histone deacetylase inhibitors.** *Oncogene* 2016, **35**:5515-5526.
208. Dedes KJ, Dedes I, Imesch P, von Bueren AO, Fink D, Fedier A: **Acquired vorinostat resistance shows partial cross-resistance to 'second-generation' HDAC inhibitors and correlates with loss of histone acetylation and apoptosis but not with altered HDAC and HAT activities.** *Anticancer drugs* 2009, **20**:321-333.
209. Li ZY, Li QZ, Chen L, Chen BD, Wang B, Zhang XJ, Li WP: **Histone Deacetylase Inhibitor RGFP109 Overcomes Temozolomide Resistance by Blocking NF-kappaB-Dependent Transcription in Glioblastoma Cell Lines.** *Neurochem Res* 2016, **41**:3192-3205.
210. Wang L, Li H, Ren Y, Zou S, Fang W, Jiang X, Jia L, Li M, Liu X, Yuan X, et al: **Targeting HDAC with a novel inhibitor effectively reverses paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer via multiple mechanisms.** *Cell Death Dis* 2016, **7**:e2063.
211. Nakajima W, Sharma K, Hicks MA, Le N, Brown R, Krystal GW, Harada H: **Combination with vorinostat overcomes ABT-263 (navitoclax) resistance of small cell lung cancer.** *Cancer Biol Ther* 2016, **17**:27-35.
212. Park SJ, Kim SM, Moon JH, Kim JH, Shin JS, Hong SW, Shin YJ, Lee DH, Lee EY, Hwang IY, et al: **SAHA, an HDAC inhibitor, overcomes erlotinib resistance in human pancreatic cancer cells by modulating E-cadherin.** *Tumour Biol* 2016, **37**:4323-4330.

213. Xue K, Gu JJ, Zhang Q, Mavis C, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Czuczman MS, Guo Y: **Vorinostat, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, promotes cell cycle arrest and re-sensitizes rituximab- and chemo-resistant lymphoma cells to chemotherapy agents.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2016, **142**:379-387.
214. Huang X, Wang S, Lee CK, Yang X, Liu B: **HDAC inhibitor SNDX-275 enhances efficacy of trastuzumab in erbB2-overexpressing breast cancer cells and exhibits potential to overcome trastuzumab resistance.** *Cancer Lett* 2011, **307**:72-79.
215. Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, Preca BT, Mock K, Ruh M, Schuler J, Berthold M, Weber A, Burk U, et al: **ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat.** *EMBO Mol Med* 2015, **7**:831-847.
216. Furukawa Y, Kikuchi J: **Epigenetic mechanisms of cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma.** *Int J Hematol* 2016, **104**:281-292.
217. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN: **Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer.** *Future Oncol* 2011, **7**:263-283.
218. Bots M, Johnstone RW: **Rational combinations using HDAC inhibitors.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:3970-3977.
219. Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP: **Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A.** *J Am Chem Soc* 2010, **132**:10842-10846.
220. Whitehead L, Dobler MR, Radetich B, Zhu Y, Atadja PW, Claiborne T, Grob JE, McRiner A, Pancost MR, Patnaik A, et al: **Human HDAC isoform selectivity achieved via exploitation of the acetate release channel with structurally unique small molecule inhibitors.** *Bioorg Med Chem* 2011, **19**:4626-4634.
221. Schölz C, Weinert BT, Wagner SA, Beli P, Miyake Y, Qi J, Jensen LJ, Streicher W, McCarthy AR, Westwood NJ, et al: **Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells.** *Nat Biotechnol* 2015, **33**:415-423.
222. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, Horinouchi S: **FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases.** *Cancer Res* 2002, **62**:4916-4921.
223. Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Porro G, Pagani P, Modena D, Moras ML, Pozzi P, Reznikov LL, et al: **The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo.** *Mol Med* 2005, **11**:1-15.
224. Tatamiya T, Saito A, Sugawara T, Nakanishi O: **Isozyme-selective activity of the HDAC inhibitor MS-275.** *Cancer Res Supplements* 2004, **64**:567 (abstr. 2451).
225. Fournel M, Bonfils C, Hou Y, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A, Liu J, Lu AH, Zhou NZ, Robert MF, et al: **MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**:759-768.
226. Henning SW, Doblhofer R, Kohlhof H, Jankowsky R, Maier T, Beckers T, Schmidt M, Hentsch B: **Preclinical characterization of 4SC-202, a novel isotype specific HDAC inhibitor.** *Eur J Cancer Supplements* 2010, **8**:61 (abstr. 178).

227. Krennhrubec K, Marshall BL, Hedglin M, Verdin E, Ulrich SM: **Design and evaluation of 'Linkerless' hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett* 2007, **17**:2874-2878.
228. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA: **A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:3003-3007.
229. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM: **Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo.** *Cancer Res* 2000, **60**:5165-5170.
230. Ueda H, Nakajima H, Hori Y, Fujita T, Nishimura M, Goto T, Okuhara M: **FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity.** *J Antibiot (Tokyo)* 1994, **47**:301-310.
231. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S: **FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor.** *Exp Cell Res* 1998, **241**:126-133.
232. Robers MB, Dart ML, Woodroffe CC, Zimprich CA, Kirkland TA, Machleidt T, Kupcho KR, Levin S, Hartnett JR, Zimmerman K, et al: **Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET.** *Nat Commun* 2015, **6**:10091.
233. Li LH, Zhang PR, Cai PY, Li ZC: **Histone deacetylase inhibitor, Romidepsin (FK228) inhibits endometrial cancer cell growth through augmentation of p53-p21 pathway.** *Biomed Pharmacother* 2016, **82**:161-166.
234. Li QQ, Hao JJ, Zhang Z, Hsu I, Liu Y, Tao Z, Lewi K, Metwalli AR, Agarwal PK: **Histone deacetylase inhibitor-induced cell death in bladder cancer is associated with chromatin modification and modifying protein expression: A proteomic approach.** *Int J Oncol* 2016, **48**:2591-2607.
235. Wang H, Zhou W, Zheng Z, Zhang P, Tu B, He Q, Zhu WG: **The HDAC inhibitor depsipeptide transactivates the p53/p21 pathway by inducing DNA damage.** *DNA Repair (Amst)* 2012, **11**:146-156.
236. Summers AR, Fischer MA, Stengel KR, Zhao Y, Kaiser JF, Wells CE, Hunt A, Bhaskara S, Luzwick JW, Sampathi S, et al: **HDAC3 is essential for DNA replication in hematopoietic progenitor cells.** *J Clin Invest* 2013, **123**:3112-3123.
237. Yang Y, Zhao Y, Liao W, Yang J, Wu L, Zheng Z, Yu Y, Zhou W, Li L, Feng J, et al: **Acetylation of FoxO1 activates Bim expression to induce apoptosis in response to histone deacetylase inhibitor depsipeptide treatment.** *Neoplasia* 2009, **11**:313-324.
238. Kwon HJ, Kim MS, Kim MJ, Nakajima H, Kim KW: **Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis.** *Int J Cancer* 2002, **97**:290-296.
239. Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, Schrupp DS: **Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**:504-513.
240. Yang G, Thompson MA, Brandt SJ, Hiebert SW: **Histone deacetylase inhibitors induce the degradation of the t(8;21) fusion oncoprotein.** *Oncogene* 2007, **26**:91-101.
241. Valdez BC, Brammer JE, Li Y, Murray D, Teo EC, Liu Y, Hosing C, Nieto Y, Champlin RE, Andersson BS: **Romidepsin enhances the cytotoxicity of**

- fludarabine, clofarabine and busulfan combination in malignant T-cells.** *Leuk Res* 2016, **47**:100-108.
242. Rozati S, Cheng PF, Widmer DS, Fujii K, Levesque MP, Dummer R: **Romidepsin and Azacitidine Synergize in their Epigenetic Modulatory Effects to Induce Apoptosis in CTCL.** *Clin Cancer Res* 2016, **22**:2020-2031.
243. Hui KF, Yeung PL, Chiang AK: **Induction of MAPK- and ROS-dependent autophagy and apoptosis in gastric carcinoma by combination of romidepsin and bortezomib.** *Oncotarget* 2016, **7**:4454-4467.
244. Petrich A, Nabhan C: **Use of class I histone deacetylase inhibitor romidepsin in combination regimens.** *Leuk Lymphoma* 2016, **57**:1755-1765.
245. Zhang Y, Adachi M, Zhao X, Kawamura R, Imai K: **Histone deacetylase inhibitors FK228, N-(2-aminophenyl)-4-[N-(pyridin-3-yl-methoxycarbonyl)amino- methyl]benzamide and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide augment radiation-induced cell death in gastrointestinal adenocarcinoma cells.** *Int J Cancer* 2004, **110**:301-308.
246. Narita K, Matsuhara K, Itoh J, Akiyama Y, Dan S, Yamori T, Ito A, Yoshida M, Katoh T: **Synthesis and biological evaluation of novel FK228 analogues as potential isoform selective HDAC inhibitors.** *Eur J Med Chem* 2016, **121**:592-609.
247. Ni M, Esposito E, Raj VP, Muzi L, Zunino F, Zuco V, Cominetti D, Penco S, Dal Pozzo A: **New macrocyclic analogs of the natural histone deacetylase inhibitor FK228; design, synthesis and preliminary biological evaluation.** *Bioorg Med Chem* 2015, **23**:6785-6793.
248. Bidnur S, Savdie R, Black PC: **Inhibiting Immune Checkpoints for the Treatment of Bladder Cancer.** *Bladder Cancer* 2016, **2**:15-25.
249. Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C: **Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors.** *Curr Opin Pharmacol* 2015, **23**:52-60.
250. Fu M, Wan F, Li Z, Zhang F: **4SC-202 activates ASK1-dependent mitochondrial apoptosis pathway to inhibit hepatocellular carcinoma cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **471**:267-273.
251. Mishra VK, Wegwitz F, Kosinsky RL, Sen M, Baumgartner R, Wulff T, Siveke JT, Schildhaus HU, Najafova Z, Kari V, et al: **Histone deacetylase class-I inhibition promotes epithelial gene expression in pancreatic cancer cells in a BRD4- and MYC-dependent manner.** *Nucleic Acids Res* 2017, Epub ahead of print.
252. Inui K, Zhao Z, Yuan J, Jayaprakash S, Le LT, Drakulic S, Sander B, Golas MM: **Stepwise assembly of functional C-terminal REST/NRSF transcriptional repressor complexes as a drug target.** *Protein Sci* 2017, **26**:997-1011.
253. Tresckow B, Gundermann S, Eichenauer DA, Aulitzky WE, Göbeler M, Sayehli C, Bacchus L, Hauns B, Mais A, Hentsch B, et al: **First-in-human study of 4SC-202, a novel oral HDAC inhibitor in advanced hematologic malignancies (TOPAS study).** *J Clin Oncol* 2014, **32**: 8559-8559 (abstr. 8559).
254. Ozawa A, Tanji N, Kikugawa T, Sasaki T, Yanagihara Y, Miura N, Yokoyama M: **Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor.** *BJU Int* 2010, **105**:1181-1186.
255. Niegisch G, Knievel J, Koch A, Hader C, Fischer U, Albers P, Schulz WA: **Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers.** *Urol Oncol* 2013, **31**:1770-1779.

256. Poyet C, Jentsch B, Hermanns T, Schweckendiek D, Seifert HH, Schmidpeter M, Sulser T, Moch H, Wild PJ, Kristiansen G: **Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer.** *BMC Clin Pathol* 2014, **14**:10.
257. Montezuma D, Henrique RM, Jeronimo C: **Altered expression of histone deacetylases in cancer.** *Crit Rev Oncog* 2015, **20**:19-34.
258. Junqueira-Neto S, Vieira FQ, Montezuma D, Costa NR, Antunes L, Baptista T, Oliveira AI, Graca I, Rodrigues A, Magalhaes JS, et al: **Phenotypic impact of deregulated expression of class I histone deacetylases in urothelial cell carcinoma of the bladder.** *Mol Carcinog* 2015, **54**:523-531.
259. Xu XS, Wang L, Abrams J, Wang G: **Histone deacetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer.** *J Hematol Oncol* 2011, **4**:17.
260. Buckley MT, Yoon J, Yee H, Chiriboga L, Liebes L, Ara G, Qian X, Bajorin DF, Sun TT, Wu XR, Osman I: **The histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) suppresses bladder cancer cell growth in vitro and in vivo.** *J Transl Med* 2007, **5**:49.
261. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK: **Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**:151-163.
262. Qu W, Kang YD, Zhou MS, Fu LL, Hua ZH, Wang LM: **Experimental study on inhibitory effects of histone deacetylase inhibitor MS-275 and TSA on bladder cancer cells.** *Urol Oncol* 2010, **28**:648-654.
263. Vallo S, Xi W, Hudak L, Juengel E, Tsaur I, Wiesner C, Haferkamp A, Blaheta RA: **HDAC inhibition delays cell cycle progression of human bladder cancer cells in vitro.** *Anticancer drugs* 2011, **22**:1002-1009.
264. Kang MR, Kang JS, Yang JW, Kim BG, Kim JA, Jo YN, Lee K, Lee CW, Lee KH, Yun J, et al: **Gene expression profiling of KBH-A42, a novel histone deacetylase inhibitor, in human leukemia and bladder cancer cell lines.** *Oncol Lett* 2012, **3**:113-118.
265. Cao QF, Qian SB, Wang N, Zhang L, Wang WM, Shen HB: **TRPM2 mediates histone deacetylase inhibition-induced apoptosis in bladder cancer cells.** *Cancer Biother Radiopharm* 2015, **30**:87-93.
266. Rosik L, Niegisch G, Fischer U, Jung M, Schulz WA, Hoffmann MJ: **Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells.** *Cancer Biol Ther* 2014, **15**:742-757.
267. Martin DT, Hoimes CJ, Kaimakliotis HZ, Cheng CJ, Zhang K, Liu J, Wheeler MA, Kelly WK, Tew GN, Saltzman WM, Weiss RM: **Nanoparticles for urothelium penetration and delivery of the histone deacetylase inhibitor belinostat for treatment of bladder cancer.** *Nanomedicine* 2013, **9**:1124-1134.
268. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA: **Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:10014-10019.
269. Byler TK, Leocadio D, Shapiro O, Bratslavsky G, Stodgell CJ, Wood RW, Messing EM, Reeder JE: **Valproic acid decreases urothelial cancer cell proliferation and induces thrombospondin-1 expression.** *BMC Urol* 2012, **12**:21.
270. Gould JJ, Kenney PA, Rieger-Christ KM, Silva Neto B, Wszolek MF, LaVoie A, Holway AH, Spurrier B, Austin J, Cammarata BK, et al: **Identification of tumor and invasion suppressor gene modulators in bladder cancer by**

- different classes of histone deacetylase inhibitors using reverse phase protein arrays. *J Urol* 2010, **183**:2395-2402.**
271. Choudhary S, Rathore K, Wang HC: **Differential induction of reactive oxygen species through Erk1/2 and Nox-1 by FK228 for selective apoptosis of oncogenic H-Ras-expressing human urinary bladder cancer J82 cells.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, **137**:471-480.
272. Choudhary S, Wang HC: **Role of reactive oxygen species in proapoptotic ability of oncogenic H-Ras to increase human bladder cancer cell susceptibility to histone deacetylase inhibitor for caspase induction.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2009, **135**:1601-1613.
273. Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y, Yung BY, Lupold SE, Rodriguez R: **Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **319**:533-542.
274. Li GC, Zhang X, Pan TJ, Chen Z, Ye ZQ: **Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21WAF1 and G1 cell cycle arrest.** *Int J Urol* 2006, **13**:581-586.
275. Canes D, Chiang GJ, Billmeyer BR, Austin CA, Kosakowski M, Rieger-Christ KM, Libertino JA, Summerhayes IC: **Histone deacetylase inhibitors upregulate plakoglobin expression in bladder carcinoma cells and display antineoplastic activity in vitro and in vivo.** *Int J Cancer* 2005, **113**:841-848.
276. Choudhary S, Wang HC: **Proapoptotic ability of oncogenic H-Ras to facilitate apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in human cancer cells.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**:1099-1111.
277. Yeh BW, Li WM, Li CC, Kang WY, Huang CN, Hour TC, Liu ZM, Wu WJ, Huang HS: **Histone deacetylase inhibitor trichostatin A resensitizes gemcitabine resistant urothelial carcinoma cells via suppression of TG-interacting factor.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2016, **290**:98-106.
278. Sooraj D, Xu D, Cain JE, Gold DP, Williams BR: **Activating Transcription Factor 3 Expression as a Marker of Response to the Histone Deacetylase Inhibitor Pracinostat.** *Mol Cancer Ther* 2016, **15**:1726-1739.
279. Jia ZM, Ai X, Teng JF, Wang YP, Wang BJ, Zhang X: **p21 and CK2 interaction-mediated HDAC2 phosphorylation modulates KLF4 acetylation to regulate bladder cancer cell proliferation.** *Tumour Biol* 2016, **37**:8293-8304.
280. Earel JK, Jr., VanOosten RL, Griffith TS: **Histone deacetylase inhibitors modulate the sensitivity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant bladder tumor cells.** *Cancer Res* 2006, **66**:499-507.
281. Li DR, Zhang H, Peek E, Wang S, Du L, Li G, Chin AI: **Synergy of Histone-Deacetylase Inhibitor AR-42 with Cisplatin in Bladder Cancer.** *J Urol* 2015, **194**:547-555.
282. Wang D, Jing Y, Ouyang S, Liu B, Zhu T, Niu H, Tian Y: **Inhibitory effect of valproic acid on bladder cancer in combination with chemotherapeutic agents and.** *Oncol Lett* 2013, **6**:1492-1498.
283. Groselj B, Kerr M, Kiltie AE: **Radiosensitisation of bladder cancer cells by panobinostat is modulated by Ku80 expression.** *Radiother Oncol* 2013, **108**:429-433.
284. Maruyama T, Yamamoto S, Qiu J, Ueda Y, Suzuki T, Nojima M, Shima H: **Apoptosis of bladder cancer by sodium butyrate and cisplatin.** *J Infect Chemother* 2012, **18**:288-295.

285. Deb AA, Wilson SS, Rove KO, Kumar B, Koul S, Lim DD, Meacham RB, Koul HK: **Potentialiation of mitomycin C tumoricidal activity for transitional cell carcinoma by histone deacetylase inhibitors in vitro.** *J Urol* 2011, **186**:2426-2433.
286. Jeon HG, Yoon CY, Yu JH, Park MJ, Lee JE, Jeong SJ, Hong SK, Byun SS, Lee SE: **Induction of caspase mediated apoptosis and down-regulation of nuclear factor-kappaB and Akt signaling are involved in the synergistic antitumor effect of gemcitabine and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in human bladder cancer cells.** *J Urol* 2011, **186**:2084-2093.
287. Yoon CY, Park MJ, Lee JS, Lee SC, Oh JJ, Park H, Chung CW, Abdullajanov MM, Jeong SJ, Hong SK, et al: **The histone deacetylase inhibitor trichostatin A synergistically resensitizes a cisplatin resistant human bladder cancer cell line.** *J Urol* 2011, **185**:1102-1111.
288. Fan J, Stanfield J, Guo Y, Karam JA, Frenkel E, Sun X, Hsieh JT: **Effect of trans-2,3-dimethoxycinnamoyl azide on enhancing antitumor activity of romidepsin on human bladder cancer.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:1200-1207.
289. Karam JA, Fan J, Stanfield J, Richer E, Benaim EA, Frenkel E, Antich P, Sagalowsky AI, Mason RP, Hsieh JT: **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.
290. El-Zawahry A, Lu P, White SJ, Voelkel-Johnson C: **In vitro efficacy of AdTRAIL gene therapy of bladder cancer is enhanced by trichostatin A-mediated restoration of CAR expression and downregulation of cFLIP and Bcl-XL.** *Cancer Gene Ther* 2006, **13**:281-289.
291. Toriyama S, Horinaka M, Yasuda S, Taniguchi T, Aono Y, Takamura T, Morioka Y, Miki T, Ukimura O, Sakai T: **A histone deacetylase inhibitor OBP-801 and celecoxib synergistically inhibit the cell growth with apoptosis via a DR5-dependent pathway in bladder cancer cells.** *Mol Cancer Ther* 2016, **15**:2066-2075.
292. Hoffmann MJ, Koutsogiannouli E, Skowron MA, Pinkerneil M, Niegisch G, Brandt A, Stepanow S, Rieder H, Schulz WA: **The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors.** *Bladder Cancer* 2016, **2**:449-463.
293. Lehmann M, Hoffmann MJ, Koch A, Ulrich SM, Schulz WA, Niegisch G: **Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment.** *J Exp Clin Cancer Res* 2014, **33**:59.
294. Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ: **A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas.** *Leukemia* 2008, **22**:1026-1034.
295. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Köhrer K, Arent T, Schulz WA, Niegisch G: **Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms.** *Mol Cancer Ther* 2016, **15**:299-312.
296. Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O: **A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4592-4597.
297. Jurkin J, Zupkovitz G, Lagger S, Grausenburger R, Hagelkruys A, Kenner L, Seiser C: **Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis.** *Cell cycle* 2011, **10**:406-412.

298. Kelly RD, Cowley SM: **The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts.** *Biochem Soc Trans* 2013, **41**:741-749.
299. Ma P, Pan H, Montgomery RL, Olson EN, Schultz RM: **Compensatory functions of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 regulate transcription and apoptosis during mouse oocyte development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:E481-489.
300. Florl AR, Schulz WA: **Chromosomal instability in bladder cancer.** *Arch Toxicol* 2008, **82**:173-182.
301. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Kohlhof H, Schulz WA, Niegisch G: **Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines.** *Target Oncol* 2016, **11**:783-798.
302. Cross WR, Eardley I, Leese HJ, Southgate J: **A biomimetic tissue from cultured normal human urothelial cells: analysis of physiological function.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**:F459-468.
303. Singh MM, Manton CA, Bhat KP, Tsai WW, Aldape K, Barton MC, Chandra J: **Inhibition of LSD1 sensitizes glioblastoma cells to histone deacetylase inhibitors.** *Neuro Oncol* 2011, **13**:894-903.
304. Singh MM, Johnson B, Venkatarayan A, Flores ER, Zhang J, Su X, Barton M, Lang F, Chandra J: **Preclinical activity of combined HDAC and KDM1A inhibition in glioblastoma.** *Neuro Oncol* 2015, **17**:1463-1473.
305. Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SG, Liu K, Iyer SP, Bearss D, Bhalla KN: **Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells.** *Leukemia* 2014, **28**:2155-2164.
306. Vasilatos SN, Katz TA, Oesterreich S, Wan Y, Davidson NE, Huang Y: **Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells.** *Carcinogenesis* 2013, **34**:1196-1207.
307. Karagianni P, Wong J: **HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression.** *Oncogene* 2007, **26**:5439-5449.
308. Liby P, Kostrouchova M, Pohludka M, Yilma P, Hrabal P, Sikora J, Brozova E, Kostrouchova M, Rall JE, Kostrouch Z: **Elevated and deregulated expression of HDAC3 in human astrocytic glial tumours.** *Folia Biol (Praha)* 2006, **52**:21-33.
309. Lee JY, Kuo CW, Tsai SL, Cheng SM, Chen SH, Chan HH, Lin CH, Lin KY, Li CF, Kanwar JR, et al: **Inhibition of HDAC3- and HDAC6-Promoted Survivin Expression Plays an Important Role in SAHA-Induced Autophagy and Viability Reduction in Breast Cancer Cells.** *Front Pharmacol* 2016, **7**:81.
310. Godman CA, Joshi R, Tierney BR, Greenspan E, Rasmussen TP, Wang HW, Shin DG, Rosenberg DW, Giardina C: **HDAC3 impacts multiple oncogenic pathways in colon cancer cells with effects on Wnt and vitamin D signaling.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7**:1570-1580.
311. Mariadason JM: **Dissecting HDAC3-mediated tumor progression.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7**:1581-1583.
312. Vidal-Laliena M, Gallastegui E, Mateo F, Martinez-Balbas M, Pujol MJ, Bachs O: **Histone deacetylase 3 regulates cyclin A stability.** *J Biol Chem* 2013, **288**:21096-21104.
313. Eot-Houllier G, Fulcrand G, Watanabe Y, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C: **Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion.** *Genes Dev* 2008, **22**:2639-2644.

314. Li Y, Kao GD, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Qin J, Phelan C, Lazar MA: **A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity.** *Genes Dev* 2006, **20**:2566-2579.
315. Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun ZW, Hiebert SW: **Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control.** *Mol Cell* 2008, **30**:61-72.
316. Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD: **Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation.** *Cell* 1999, **97**:99-109.
317. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD: **Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation.** *Nature* 2005, **438**:1116-1122.
318. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM: **Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin.** *Nature* 2005, **438**:1176-1180.
319. Gupta P, Ho PC, Ha SG, Lin YW, Wei LN: **HDAC3 as a molecular chaperone for shuttling phosphorylated TR2 to PML: a novel deacetylase activity-independent function of HDAC3.** *PloS One* 2009, **4**:e4363.
320. Morioka N, Tomori M, Zhang FF, Saeki M, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y: **Stimulation of nuclear receptor REV-ERBs regulates tumor necrosis factor-induced expression of proinflammatory molecules in C6 astroglial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **469**:151-157.
321. Leus NG, van der Wouden PE, van den Bosch T, Hooghiemstra WT, Ourailidou ME, Kistemaker LE, Bischoff R, Gosens R, Haisma HJ, Dekker FJ: **HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF-kappaB p65 transcriptional activity.** *Biochem Pharmacol* 2016, **108**:58-74.
322. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB: **Extraction, purification and analysis of histones.** *Nat Protoc* 2007, **2**:1445-1457.
323. Patil H, Wilks C, Gonzalez RW, Dhanireddy S, Conrad-Webb H, Bergel M: **Mitotic Activation of a Novel Histone Deacetylase 3-Linker Histone H1.3 Protein Complex by Protein Kinase CK2.** *J Biol Chem* 2016, **291**:3158-3172.
324. Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA: **Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:1241-1246.
325. Ocker M, Schneider-Stock R: **Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, **39**:1367-1374.
326. Zupkovitz G, Grausenburger R, Brunmeir R, Senese S, Tischler J, Jurkin J, Rembold M, Meunier D, Egger G, Lagger S, et al: **The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation.** *Mol Cell Biol* 2010, **30**:1171-1181.
327. Bowers ME, Xia B, Carreiro S, Ressler KJ: **The Class I HDAC inhibitor RGFP963 enhances consolidation of cued fear extinction.** *Learn Mem* 2015, **22**:225-231.
328. Rettig I, Koeneke E, Trippel F, Mueller WC, Burhenne J, Kopp-Schneider A, Fabian J, Schober A, Fernekorn U, von Deimling A, et al: **Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation.** *Cell Death Dis* 2015, **6**:e1657.

329. Oehme I, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Witt O: **Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma.** *Expert Opin Investig Drugs* 2009, **18**:1605-1617.
330. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, Saitoh K, Komata M, Katou Y, Clark D, et al: **HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle.** *Nature* 2012, **489**:313-317.
331. Wilson BJ, Tremblay AM, Deblois G, Sylvain-Drolet G, Giguere V: **An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha.** *Mol Endocrinol* 2010, **24**:1349-1358.
332. Olson DE, Udeshi ND, Wolfson NA, Pitcairn CA, Sullivan ED, Jaffe JD, Svinkina T, Natoli T, Lu X, Paulk J, et al: **An unbiased approach to identify endogenous substrates of "histone" deacetylase 8.** *ACS Chem Biol* 2014, **9**:2210-2216.
333. Li J, Chen S, Cleary RA, Wang R, Gannon OJ, Seto E, Tang DD: **Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2014, **307**:C288-295.
334. Saha A, Pandian GN, Sato S, Taniguchi J, Hashiya K, Bando T, Sugiyama H: **Synthesis and biological evaluation of a targeted DNA-binding transcriptional activator with HDAC8 inhibitory activity.** *Bioorg Med Chem* 2013, **21**:4201-4209.
335. Kim KH, Kim W, Howard TP, Vazquez F, Tsherniak A, Wu JN, Wang W, Haswell JR, Walensky LD, Hahn WC, et al: **SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2.** *Nat Med* 2015, **21**:1491-1496.
336. Deb G, Singh AK, Gupta S: **EZH2: not EZHY (easy) to deal.** *Mol Cancer Res* 2014, **12**:639-653.
337. Munro J, Barr NI, Ireland H, Morrison V, Parkinson EK: **Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock.** *Exp Cell Res* 2004, **295**:525-538.
338. Rebbaa A, Zheng X, Chu F, Mirkin BL: **The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis.** *Cell Death Differ* 2006, **13**:1960-1967.
339. Place RF, Noonan EJ, Giardina C: **HDACs and the senescent phenotype of WI-38 cells.** *BMC Cell Biol* 2005, **6**:37.
340. Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, Kato H, Furugen Y, Yoshida K, Kato K, Wake N: **Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells.** *Int J Cancer* 2001, **94**:257-267.
341. Ahrens TD, Timme S, Hoepfner J, Ostendorp J, Hembach S, Follo M, Hopt UT, Werner M, Busch H, Boerries M, Lassmann S: **Selective inhibition of esophageal cancer cells by combination of HDAC inhibitors and Azacytidine.** *Epigenetics* 2015, **10**:431-445.
342. Kasman L, Lu P, Voelkel-Johnson C: **The histone deacetylase inhibitors depsipeptide and MS-275, enhance TRAIL gene therapy of LNCaP prostate cancer cells without adverse effects in normal prostate epithelial cells.** *Cancer Gene Ther* 2007, **14**:327-334.
343. Lange L, Hemmerich P, Spankuch B: **Survival of primary, but not of cancer cells after combined Plk1-HDAC inhibition.** *Oncotarget* 2015, **6**:25801-25814.

344. Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gottlicher M, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M: **Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357.** *J Hepatol* 2005, **42**:210-217.
345. Halsall JA, Turan N, Wiersma M, Turner BM: **Cells adapt to the epigenomic disruption caused by histone deacetylase inhibitors through a coordinated, chromatin-mediated transcriptional response.** *Epigenetics Chromatin* 2015, **8**:29.
346. Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ: **Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:8570-8576.
347. Heubach J, Monsior J, Deenen R, Niegisch G, Szarvas T, Niedworok C, Schulz WA, Hoffmann MJ: **The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells.** *Mol Cancer* 2015, **14**:108.
348. Arisan S, Buyuktuncer ED, Palavan-Unsal N, Caskurlu T, Cakir OO, Ergenekon E: **Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma.** *Urol Int* 2005, **75**:252-257.
349. Lee JH, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA: **Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:14639-14644.
350. Gaymes TJ, Padua RA, Pla M, Orr S, Omidvar N, Chomienne C, Mufti GJ, Rassool FV: **Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis?** *Mol Cancer Res* 2006, **4**:563-573.
351. Purrucker JC, Fricke A, Ong MF, Rube C, Rube CE, Mahlknecht U: **HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA Double-Strand Break repair capacity.** *Oncol Rep* 2010, **23**:263-269.
352. You BR, Park WH: **Suberoylanilide hydroxamic acid-induced HeLa cell death is closely correlated with oxidative stress and thioredoxin 1 levels.** *Int J Oncol* 2014, **44**:1745-1755.
353. You BR, Kim SH, Park WH: **Reactive oxygen species, glutathione, and thioredoxin influence suberoyl bishydroxamic acid-induced apoptosis in A549 lung cancer cells.** *Tumour Biol* 2015, **36**:3429-3439.
354. Zhan Y, Gong K, Chen C, Wang H, Li W: **P38 MAP kinase functions as a switch in MS-275-induced reactive oxygen species-dependent autophagy and apoptosis in human colon cancer cells.** *Free Radic Biol Med* 2012, **53**:532-543.
355. Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H: **Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors.** *Anticancer drugs* 2014, **25**:140-149.
356. Duvic M, Dimopoulos M: **The safety profile of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in hematologic malignancies: A review of clinical studies.** *Cancer Treat Rev* 2016, **43**:58-66.
357. Conti C, Leo E, Eichler GS, Sordet O, Martin MM, Fan A, Aladjem MI, Pommier Y: **Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage.** *Cancer Res* 2010, **70**:4470-4480.
358. Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschel RJ, Lazar MA, Yen TJ: **Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response.** *J Cell Biol* 2003, **160**:1017-1027.

359. Panier S, Boulton SJ: **Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**:7-18.
360. Daley JM, Sung P: **53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks.** *Mol Cell Biol* 2014, **34**:1380-1388.
361. Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T, Mazitschek R: **Chemical phylogenetics of histone deacetylases.** *Nat Chem Biol* 2010, **6**:238-243.
362. Knievel J, Schulz WA, Greife A, Hader C, Lubke T, Schmitz I, Albers P, Niegisch G: **Multiple mechanisms mediate resistance to sorafenib in urothelial cancer.** *Int J Mol Sci* 2014, **15**:20500-20517.
363. Masdehors P, Glaisner S, Maciorowski Z, Magdelenat H, Delic J: **Ubiquitin-dependent protein processing controls radiation-induced apoptosis through the N-end rule pathway.** *Exp Cell Res* 2000, **257**:48-57.
364. Gavriilidis P, Giakoustidis A, Giakoustidis D: **Aurora Kinases and Potential Medical Applications of Aurora Kinase Inhibitors: A Review.** *J Clin Med Res* 2015, **7**:742-751.
365. Reboutier D, Benaud C, Prigent C: **Aurora A's Functions During Mitotic Exit: The Guess Who Game.** *Front Oncol* 2015, **5**:290.
366. Marampon F, Gravina GL, Popov VM, Scarsella L, Festuccia C, La Verghetta ME, Parente S, Cerasani M, Bruera G, Ficorella C, et al: **Close correlation between MEK/ERK and Aurora-B signaling pathways in sustaining tumorigenic potential and radioresistance of gynecological cancer cell lines.** *Int J Oncol* 2014, **44**:285-294.
367. Humme D, Haider A, Mobs M, Mitsui H, Suarez-Farinas M, Ohmatsu H, Isabell Geilen C, Eberle J, Krueger JG, Beyrer M, et al: **Aurora Kinase A Is Upregulated in Cutaneous T-Cell Lymphoma and Represents a Potential Therapeutic Target.** *J Invest Dermatol* 2015, **135**:2292-2300.
368. Umene K, Yanokura M, Banno K, Irie H, Adachi M, Iida M, Nakamura K, Nogami Y, Masuda K, Kobayashi Y, et al: **Aurora kinase A has a significant role as a therapeutic target and clinical biomarker in endometrial cancer.** *Int J Oncol* 2015, **46**:1498-1506.
369. Zhang Y, Jiang C, Li H, Lv F, Li X, Qian X, Fu L, Xu B, Guo X: **Elevated Aurora B expression contributes to chemoresistance and poor prognosis in breast cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2015, **8**:751-757.
370. Guise AJ, Greco TM, Zhang IY, Yu F, Cristea IM: **Aurora B-dependent regulation of class IIa histone deacetylases by mitotic nuclear localization signal phosphorylation.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**:1220-1229.
371. Zhang XH, Rao M, Loprieto JA, Hong JA, Zhao M, Chen GZ, Humphries AE, Nguyen DM, Trepel JB, Yu X, Schrupp DS: **Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7**:1388-1397.
372. Cha TL, Chuang MJ, Wu ST, Sun GH, Chang SY, Yu DS, Huang SM, Huan SK, Cheng TC, Chen TT, et al: **Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:840-850.
373. Fadri-Moskwik M, Weiderhold KN, Deeraksa A, Chuang C, Pan J, Lin SH, Yu-Lee LY: **Aurora B is regulated by acetylation/deacetylation during mitosis in prostate cancer cells.** *FASEB J* 2012, **26**:4057-4067.

374. Zhou N, Singh K, Mir MC, Parker Y, Lindner D, Dreicer R, Ecsedy JA, Zhang Z, Teh BT, Almasan A, Hansel DE: **The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**:1717-1728.
375. Wang H, Li R, Li L, Ge Z, Zhou R, Li R: **LRD-22, a novel dual dithiocarbamic acid ester, inhibits Aurora-A kinase and induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2015, **458**:201-207.
376. Zullo KM, Guo Y, Cooke L, Jirau-Serrano X, Mangone M, Scotto L, Amengual JE, Mao Y, Nandakumar R, Cremers S, et al: **Aurora A Kinase Inhibition Selectively Synergizes with Histone Deacetylase Inhibitor through Cytokinesis Failure in T-cell Lymphoma.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**:4097-4109.
377. Wang C, Chen J, Cao W, Sun L, Sun H, Liu Y: **Aurora-B and HDAC synergistically regulate survival and proliferation of lymphoma cell via AKT, mTOR and Notch pathways.** *Eur J Pharmacol* 2016, **779**:1-7.
378. Okabe S, Tauchi T, Tanaka Y, Kimura S, Maekawa T, Ohyashiki K: **Activity of histone deacetylase inhibitors and an Aurora kinase inhibitor in BCR-ABL-expressing leukemia cells: Combination of HDAC and Aurora inhibitors in BCR-ABL-expressing cells.** *Cancer Cell Int* 2013, **13**:32.
379. Li Y, Liu T, Ivan C, Huang J, Shen DY, Kavanagh JJ, Bast RC, Jr., Fu S, Hu W, Sood AK: **Enhanced Cytotoxic Effects of Combined Valproic Acid and the Aurora Kinase Inhibitor VE465 on Gynecologic Cancer Cells.** *Front Oncol* 2013, **3**:58.
380. Park JH, Jong HS, Kim SG, Jung Y, Lee KW, Lee JH, Kim DK, Bang YJ, Kim TY: **Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective cytotoxicity through modulating Aurora-A kinase.** *J Mol Med (Berl)* 2008, **86**:117-128.
381. Marek M, Kannan S, Hauser AT, Moraes Mourao M, Caby S, Cura V, Stolf DA, Schmidtkunz K, Lancelot J, Andrade L, et al: **Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*.** *PLoS Pathog* 2013, **9**:e1003645.
382. Smith KT, Martin-Brown SA, Florens L, Washburn MP, Workman JL: **Deacetylase inhibitors dissociate the histone-targeting ING2 subunit from the Sin3 complex.** *Chem Biol* 2010, **17**:65-74.
383. Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M: **The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2.** *EMBO J* 2003, **22**:3411-3420.
384. Segre CV, Chiocca S: **Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2.** *J Biomed Biotechnol* 2011, **2011**:690848.
385. Tsai SC, Seto E: **Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2.** *J Biol Chem* 2002, **277**:31826-31833.
386. Khan DH, He S, Yu J, Winter S, Cao W, Seiser C, Davie JR: **Protein kinase CK2 regulates the dimerization of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 during mitosis.** *J Biol Chem* 2013, **288**:16518-16528.
387. Dobbin MM, Madabhushi R, Pan L, Chen Y, Kim D, Gao J, Ahanonu B, Pao PC, Qiu Y, Zhao Y, Tsai LH: **SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons.** *Nat Neurosci* 2013, **16**:1008-1015.
388. Stevens FE, Beamish H, Warrenner R, Gabrielli B: **Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage.** *Oncogene* 2008, **27**:1345-1354.

389. Bucher N, Britten CD: **G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer.** *Br J Cancer* 2008, **98**:523-528.
390. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B: **Death through a tragedy: mitotic catastrophe.** *Cell Death Differ* 2008, **15**:1153-1162.
391. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G: **Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition.** *Oncogene* 2004, **23**:2825-2837.
392. Noh EJ, Lim DS, Jeong G, Lee JS: **An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G2/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **378**:326-331.
393. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G: **Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:385-392.
394. Kuffer C, Kuznetsova AY, Storchova Z: **Abnormal mitosis triggers p53-dependent cell cycle arrest in human tetraploid cells.** *Chromosoma* 2013, **122**:305-318.
395. Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodriguez-Santiago B, Mendez-Pertuz M, Auer H, Gomez G, Grossman HB, Pisano DG, Schulz WA, et al: **The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies.** *BMC Genomics* 2015, **16**:403.
396. Ray S, Lee C, Hou T, Boldogh I, Brasier AR: **Requirement of histone deacetylase1 (HDAC1) in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nucleocytoplasmic distribution.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:4510-4520.
397. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE: **Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue.** *Science* 2005, **307**:269-273.
398. Gabrielli B, Stevens F, Beamish H: **Do Histone Deacetylase Inhibitors Target Cell Cycle Checkpoints that Monitor Heterochromatin Structure?** In: Dai W (ed): *Checkpoint Responses in Cancer Therapy.* 2008: 291-309: *Cancer Drug Discovery and Development.* Humana Press.
399. Magnaghi-Jaulin L, Eot-Houllier G, Fulcrand G, Jaulin C: **Histone deacetylase inhibitors induce premature sister chromatid separation and override the mitotic spindle assembly checkpoint.** *Cancer Res* 2007, **67**:6360-6367.
400. Peart MJ, Tainton KM, Ruefli AA, Dear AE, Sedelies KA, O'Reilly LA, Waterhouse NJ, Trapani JA, Johnstone RW: **Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors.** *Cancer Res* 2003, **63**:4460-4471.
401. Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG: **Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:2069-2083.
402. Doherty SC, McKeown SR, McKelvey-Martin V, Downes CS, Atala A, Yoo JJ, Simpson DA, Kaufmann WK: **Cell cycle checkpoint function in bladder cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**:1859-1868.
403. Damelin M, Bestor TH: **The decatenation checkpoint.** *Br J Cancer* 2007, **96**:201-205.
404. Jain CK, Roychoudhury S, Majumder HK: **Selective killing of G2 decatenation checkpoint defective colon cancer cells by catalytic topoisomerase II inhibitor.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1853**:1195-1204.
405. Lai F, Guo ST, Jin L, Jiang CC, Wang CY, Croft A, Chi MN, Tseng HY, Farrelly M, Atmadibrata B, et al: **Cotargeting histone deacetylases and**

- oncogenic BRAF synergistically kills human melanoma cells by necrosis independently of RIPK1 and RIPK3.** *Cell Death Dis* 2013, **4**:e655.
406. Belizario J, Vieira-Cordeiro L, Enns S: **Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice.** *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:128076.
407. Geserick P, Wang J, Schilling R, Horn S, Harris PA, Bertin J, Gough PJ, Feoktistova M, Leverkus M: **Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma.** *Cell Death Dis* 2015, **6**:e1884.
408. Locatelli SL, Cleris L, Stirparo GG, Tartari S, Saba E, Pierdominici M, Malorni W, Carbone A, Anichini A, Carlo-Stella C: **BIM upregulation and ROS-dependent necroptosis mediate the antitumor effects of the HDACi Givinostat and Sorafenib in Hodgkin lymphoma cell line xenografts.** *Leukemia* 2014, **28**:1861-1871.
409. Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE: **Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors.** *Cancer Lett* 2009, **280**:125-133.
410. Jazirehi AR: **Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy.** *Anticancer drugs* 2010, **21**:805-813.
411. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: **bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.** *Cell* 1993, **74**:597-608.
412. Keitel U, Scheel A, Thomale J, Halpape R, Kaulfuss S, Scheel C, Dobbelstein M: **Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation.** *Oncotarget* 2014, **5**:11778-11791.
413. Zhou W, Xu J, Gelston E, Wu X, Zou Z, Wang B, Zeng Y, Wang H, Liu A, Xu L, Liu Q: **Inhibition of Bcl-xL overcomes polyploidy resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid leukemia cells.** *Oncotarget* 2015, **6**:21557-21571.
414. Yang C, Huang W, Yan L, Wang Y, Wang W, Liu D, Zuo X: **Downregulation of the expression of Bcell lymphoma-extra large by RNA interference induces apoptosis and enhances the radiosensitivity of nonsmall cell lung cancer cells.** *Mol Med Rep* 2015, **12**:449-455.
415. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X: **Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:18030-18035.
416. Gabrielli B, Chia K, Warrener R: **Finally, how histone deacetylase inhibitors disrupt mitosis!** *Cell cycle* 2011, **10**:2658-2661.
417. Hnilicova J, Hozeifi S, Duskova E, Icha J, Tomankova T, Stanek D: **Histone deacetylase activity modulates alternative splicing.** *PloS One* 2011, **6**:e16727.
418. Miller KM, Tjeertes JV, Coates J, Legube G, Polo SE, Britton S, Jackson SP: **Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:1144-1151.
419. Jamaladdin S, Kelly RD, O'Regan L, Dovey OM, Hodson GE, Millard CJ, Portolano N, Fry AM, Schwabe JW, Cowley SM: **Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:9840-9845.
420. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M: **Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome.** *Genome Res* 2002, **12**:1231-1245.
421. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y: **GammaH2AX and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:957-967.

422. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y: **Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis.** *Cancer Res* 1997, **57**:1835-1840.
423. Lemaire C, Andreau K, Souvannavong V, Adam A: **Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis.** *FEBS Lett* 1998, **425**:266-270.
424. Hecceg Z, Wang ZQ: **Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:5124-5133.
425. Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, et al: **Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors.** *Biochem J* 2008, **409**:581-589.
426. Lane AA, Chabner BA: **Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:5459-5468.
427. Saijo K, Katoh T, Shimodaira H, Oda A, Takahashi O, Ishioka C: **Romidepsin (FK228) and its analogs directly inhibit phosphatidylinositol 3-kinase activity and potently induce apoptosis as histone deacetylase/phosphatidylinositol 3-kinase dual inhibitors.** *Cancer Sci* 2012, **103**:1994-2001.
428. Wei DG, Chiang V, Fyne E, Balakrishnan M, Barnes T, Graupe M, Hesselgesser J, Irrinki A, Murry JP, Stepan G, et al: **Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing.** *PLoS Pathog* 2014, **10**:e1004071.
429. Zheng YC, Yu B, Jiang GZ, Feng XJ, He PX, Chu XY, Zhao W, Liu HM: **Irreversible LSD1 Inhibitors: Application of Tranylcypromine and Its Derivatives in Cancer Treatment.** *Curr Top Med Chem* 2016, **16**:2179-2188.
430. Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, et al: **Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers.** *Int J Cancer* 2011, **128**:574-586.
431. Kauffman EC, Robinson BD, Downes MJ, Powell LG, Lee MM, Scherr DS, Gudas LJ, Mongan NP: **Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer.** *Mol Carcinog* 2011, **50**:931-944.
432. Lan W, Zhang D, Jiang J: **The roles of LSD1-mediated epigenetic modifications in maintaining the pluripotency of bladder cancer stem cells.** *Med Hypotheses* 2013, **81**:823-825.
433. Tan M, Gong H, Zeng Y, Tao L, Wang J, Jiang J, Xu D, Bao E, Qiu J, Liu Z: **Downregulation of homeodomain-interacting protein kinase-2 contributes to bladder cancer metastasis by regulating Wnt signaling.** *J Cell Biochem* 2014, **115**:1762-1767.
434. Tang Y, Simoneau AR, Liao WX, Yi G, Hope C, Liu F, Li S, Xie J, Holcombe RF, Jurnak FA, et al: **WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:458-468.
435. Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, Carvalho JR, Oliveira J, Lobo F, Teixeira MR, Jeronimo C: **Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer.** *Epigenetics* 2010, **5**:343-351.

436. Du Y, Wang Y, Zhang F, Wu W, Wang W, Li H, Xia S, Liu H: **Regulation of metastasis of bladder cancer cells through the WNT signaling pathway.** *Tumour Biol* 2015, **36**:8839-8844.
437. Ahmad I, Morton JP, Singh LB, Radulescu SM, Ridgway RA, Patel S, Woodgett J, Winton DJ, Taketo MM, Wu XR, et al: **beta-Catenin activation synergizes with PTEN loss to cause bladder cancer formation.** *Oncogene* 2011, **30**:178-189.
438. Majid S, Saini S, Dahiya R: **Wnt signaling pathways in urological cancers: past decades and still growing.** *Mol Cancer* 2012, **11**:7.
439. He HC, Chen JH, Chen XB, Qin GQ, Cai C, Liang YX, Han ZD, Dai QS, Chen YR, Zeng GH, et al: **Expression of hedgehog pathway components is associated with bladder cancer progression and clinical outcome.** *Pathol Oncol Res* 2012, **18**:349-355.
440. Pignot G, Vieillefond A, Vacher S, Zerbib M, Debre B, Lidereau R, Amsellem-Ouazana D, Bieche I: **Hedgehog pathway activation in human transitional cell carcinoma of the bladder.** *Br J Cancer* 2012, **106**:1177-1186.
441. Islam SS, Mokhtari RB, Noman AS, Uddin M, Rahman MZ, Azadi MA, Zlotta A, van der Kwast T, Yeger H, Farhat WA: **Sonic hedgehog (Shh) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer.** *Mol Carcinog* 2016, **55**:537-551.
442. Amantini C, Morelli MB, Nabissi M, Cardinali C, Santoni M, Gismondi A, Santoni G: **Capsaicin triggers autophagic cell survival which drives epithelial mesenchymal transition and chemoresistance in bladder cancer cells in an Hedgehog-dependent manner.** *Oncotarget* 2016, **7**:50180-50194.
443. Fei DL, Sanchez-Mejias A, Wang Z, Flaveny C, Long J, Singh S, Rodriguez-Blanco J, Tokhunts R, Giambelli C, Briegel KJ, et al: **Hedgehog signaling regulates bladder cancer growth and tumorigenicity.** *Cancer Res* 2012, **72**:4449-4458.
444. Loughlin KR: **The Hedgehog pathway: potential biomarker and therapeutic applications in urologic malignancies.** *Urol Oncol* 2014, **32**:546-548.
445. Thievensen I, Wolter M, Prior A, Seifert HH, Schulz WA: **Hedgehog signaling in normal urothelial cells and in urothelial carcinoma cell lines.** *J Cell Physiol* 2005, **203**:372-377.
446. Thievensen I, Seifert HH, Swiatkowski S, Florl AR, Schulz WA: **E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells.** *Br J Cancer* 2003, **88**:1932-1938.
447. Chun SG, Zhou W, Yee NS: **Combined targeting of histone deacetylases and hedgehog signaling enhances cytotoxicity in pancreatic cancer.** *Cancer Biol Ther* 2009, **8**:1328-1339.
448. Zhao J, Quan H, Xie C, Lou L: **NL-103, a novel dual-targeted inhibitor of histone deacetylases and hedgehog pathway, effectively overcomes vismodegib resistance conferred by Smo mutations.** *Pharmacol Res Perspect* 2014, **2**:e00043.
449. Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, Haddad BR, Johnson MD: **MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **104**:13-19.
450. LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Groshen S, Lenz HJ, Ladner RD: **DNA microarray profiling of genes differentially regulated by the histone deacetylase inhibitors vorinostat and LBH589 in colon cancer cell lines.** *BMC Med Genomics* 2009, **2**:67.

451. Chiba T, Yokosuka O, Arai M, Tada M, Fukai K, Imazeki F, Kato M, Seki N, Saisho H: **Identification of genes up-regulated by histone deacetylase inhibition with cDNA microarray and exploration of epigenetic alterations on hepatoma cells.** *J Hepatol* 2004, **41**:436-445.
452. Dejligbjerg M, Grauslund M, Litman T, Collins L, Qian X, Jeffers M, Lichenstein H, Jensen PB, Sehested M: **Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells.** *Mol Cancer* 2008, **7**:70.
453. de Ruijter AJ, Meinsma RJ, Bosma P, Kemp S, Caron HN, van Kuilenburg AB: **Gene expression profiling in response to the histone deacetylase inhibitor BL1521 in neuroblastoma.** *Exp Cell Res* 2005, **309**:451-467.
454. Wong JC, Guo L, Peng Z, Zhang W, Zhang N, Lai W, Zhang Z, Zhang C, Zhang X, Song S, et al: **Application of p21 and klf2 reporter gene assays to identify selective histone deacetylase inhibitors for cancer therapy.** *Bioorg Med Chem Lett* 2011, **21**:110-116.
455. Hsieh YJ, Hwu L, Chen YC, Ke CC, Chen FD, Wang HE, Lin KP, Yeh HH, Chang CW, Liu RS: **P21-driven multifusion gene system for evaluating the efficacy of histone deacetylase inhibitors by in vivo molecular imaging and for transcription targeting therapy of cancer mediated by histone deacetylase inhibitor.** *J Nucl Med* 2014, **55**:678-685.
456. Mensah AA, Kwee I, Gaudio E, Rinaldi A, Ponzoni M, Cascione L, Fossati G, Stathis A, Zucca E, Caprini G, Bertoni F: **Novel HDAC inhibitors exhibit pre-clinical efficacy in lymphoma models and point to the importance of CDKN1A expression levels in mediating their anti-tumor response.** *Oncotarget* 2015, **6**:5059-5071.
457. Sarsik B, Doganavsargil B, Simsir A, Yazici A, Pehlivanoglu B, Cal C, Sen S: **P21 and p27 Immunoexpression in Upper Urinary Tract Urothelial Carcinomas.** *Pathol Oncol Res* 2016, **22**:839-845.
458. Tang K, Wang C, Chen Z, Xu H, Ye Z: **Clinicopathologic and prognostic significance of p21 (Cip1/Waf1) expression in bladder cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2015, **8**:4999-5007.
459. Grapsa D, Dokou A, Tsokanou-Kouli V, Kaltsas S, Dalakou E, Trigidou R, Saif MW, Politi E: **Immunohistochemical expression of p53, p63, c-myc, p21(WAF1/cip1) and p27(kip1) proteins in urothelial bladder carcinoma: correlation with clinicopathological parameters.** *J BUON* 2014, **19**:1121-1124.
460. Tabe Y, Konopleva M, Contractor R, Munsell M, Schober WD, Jin L, Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I, Igari J, Andreeff M: **Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells.** *Blood* 2006, **107**:1546-1554.
461. Nguyen DM, Schrupp WD, Chen GA, Tsai W, Nguyen P, Trepel JB, Schrupp DS: **Abrogation of p21 expression by flavopiridol enhances depsipeptide-mediated apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:1813-1825.
462. Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV, Bates SE: **P21-dependent g(1)arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228.** *Br J Cancer* 2000, **83**:817-825.
463. Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL, Du L, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Fojo T, Bates SE: **Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but**

- differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 2002, **1**:937-941.**
464. Zhao Y, Lu S, Wu L, Chai G, Wang H, Chen Y, Sun J, Yu Y, Zhou W, Zheng Q, et al: **Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1).** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:2782-2790.
465. Hao ZF, Su YM, Wang CM, Yang RY: **Activating transcription factor 3 interferes with p21 activation in histone deacetylase inhibitor-induced growth inhibition of epidermoid carcinoma cells.** *Tumour Biol* 2015, **36**:1471-1476.
466. Bellucci L, Dalvai M, Kocanova S, Moutahir F, Bystricky K: **Activation of p21 by HDAC inhibitors requires acetylation of H2A.Z.** *PloS One* 2013, **8**:e54102.
467. Sachweh MC, Drummond CJ, Higgins M, Campbell J, Lain S: **Incompatible effects of p53 and HDAC inhibition on p21 expression and cell cycle progression.** *Cell Death Dis* 2013, **4**:e533.
468. Mateen S, Raina K, Jain AK, Agarwal C, Chan D, Agarwal R: **Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silibinin on non-small cell lung cancer cells.** *Epigenetics* 2012, **7**:1161-1172.
469. Fan T, Jiang S, Chung N, Alikhan A, Ni C, Lee CC, Hornyak TJ: **EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression.** *Mol Cancer Res* 2011, **9**:418-429.
470. Simboeck E, Sawicka A, Zupkovitz G, Senese S, Winter S, Dequiedt F, Ogris E, Di Croce L, Chiocca S, Seiser C: **A phosphorylation switch regulates the transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors.** *J Biol Chem* 2010, **285**:41062-41073.
471. Sasakawa Y, Naoe Y, Inoue T, Sasakawa T, Matsuo M, Manda T, Mutoh S: **Effects of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, on human lymphoma U-937 cells in vitro and in vivo.** *Biochem Pharmacol* 2002, **64**:1079-1090.
472. Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S, Ishikawa T, Tahara E, Yasui W: **Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines.** *Int J Cancer* 2000, **88**:992-997.
473. Sowa Y, Orita T, Hiranabe-Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, Sakai T: **Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **886**:195-199.
474. Xiao H, Hasegawa T, Isobe K: **Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells.** *J Cell Biochem* 1999, **73**:291-302.
475. Li H, Wu X: **Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **324**:860-867.
476. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, et al: **Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:540-545.
477. Tula-Sanchez AA, Havas AP, Alonge PJ, Klein ME, Doctor SR, Pinkston W, Glinsmann-Gibson BJ, Rimsza LM, Smith CL: **A model of sensitivity and**

- resistance to histone deacetylase inhibitors in diffuse large B cell lymphoma: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors.** *Cancer Biol Ther* 2013, **14**:949-961.
478. Waby JS, Chirakkal H, Yu C, Griffiths GJ, Benson RS, Bingle CD, Corfe BM: **Sp1 acetylation is associated with loss of DNA binding at promoters associated with cell cycle arrest and cell death in a colon cell line.** *Mol Cancer* 2010, **9**:275.
479. Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, Orita T, Yoshino T, Okuyama Y, Fujita T, Ohtani-Fujita N, Matsukawa Y, Tokino T, et al: **Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line.** *J Biol Chem* 1997, **272**:22199-22206.
480. Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA: **p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:6791-6796.
481. Pal-Bhadra M, Ramaiah MJ, Reddy TL, Krishnan A, Pushpavalli SN, Babu KS, Tiwari AK, Rao JM, Yadav JS, Bhadra U: **Plant HDAC inhibitor chrysin arrest cell growth and induce p21WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells.** *BMC Cancer* 2012, **12**:180.
482. Zhao B, He T: **Chidamide, a histone deacetylase inhibitor, functions as a tumor inhibitor by modulating the ratio of Bax/Bcl-2 and P21 in pancreatic cancer.** *Oncol Rep* 2015, **33**:304-310.
483. Kanno S, Maeda N, Tomizawa A, Yomogida S, Katoh T, Ishikawa M: **Involvement of p21waf1/cip1 expression in the cytotoxicity of the potent histone deacetylase inhibitor spiruchostatin B towards susceptible NALM-6 human B cell leukemia cells.** *Int J Oncol* 2012, **40**:1391-1396.
484. Almenara J, Rosato R, Grant S: **Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA).** *Leukemia* 2002, **16**:1331-1343.
485. Romanov VS, Abramova MV, Svetlikova SB, Bykova TV, Zubova SG, Aksenov ND, Fornace AJ, Jr., Pospelova TV, Pospelov VA: **p21(Waf1) is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate.** *Cell cycle* 2010, **9**:3945-3955.
486. Xiao H, Hasegawa T, Miyaishi O, Ohkusu K, Isobe K: **Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-independent manner.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **237**:457-460.
487. Huang L, Sowa Y, Sakai T, Pardee AB: **Activation of the p21WAF1/CIP1 promoter independent of p53 by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) through the Sp1 sites.** *Oncogene* 2000, **19**:5712-5719.
488. Xiao H, Hasegawa T, Isobe K: **p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor.** *J Biol Chem* 2000, **275**:1371-1376.
489. Wu P, Meng L, Wang H, Zhou J, Xu G, Wang S, Xi L, Chen G, Wang B, Zhu T, et al: **Role of hTERT in apoptosis of cervical cancer induced by histone deacetylase inhibitor.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **335**:36-44.
490. Modugno M, Banfi P, Gasparri F, Borzilleri R, Carter P, Cornelius L, Gottardis M, Lee V, Mapelli C, Naglich JG, et al: **Mcl-1 antagonism is a potential therapeutic strategy in a subset of solid cancers.** *Exp Cell Res* 2015, **332**:267-277.

491. He L, Torres-Lockhart K, Forster N, Ramakrishnan S, Greninger P, Garnett MJ, McDermott U, Rothenberg SM, Benes CH, Ellisen LW: **Mcl-1 and FBW7 control a dominant survival pathway underlying HDAC and Bcl-2 inhibitor synergy in squamous cell carcinoma.** *Cancer Discov* 2013, **3**:324-337.
492. Palve V, Mallick S, Ghaisas G, Kannan S, Teni T: **Overexpression of Mcl-1L splice variant is associated with poor prognosis and chemoresistance in oral cancers.** *PLoS One* 2014, **9**:e111927.
493. Labisso WL, Wirth M, Stojanovic N, Stauber RH, Schnieke A, Schmid RM, Kramer OH, Saur D, Schneider G: **MYC directs transcription of MCL1 and eIF4E genes to control sensitivity of gastric cancer cells toward HDAC inhibitors.** *Cell cycle* 2012, **11**:1593-1602.
494. Sampath D, Liu C, Vasan K, Sulda M, Puduvali VK, Wierda WG, Keating MJ: **Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2012, **119**:1162-1172.
495. Jiang Y, Zhang XY, Sun L, Zhang GL, Duerksen-Hughes P, Zhu XQ, Yang J: **Methyl methanesulfonate induces apoptosis in p53-deficient H1299 and Hep3B cells through a caspase 2- and mitochondria-associated pathway.** *Environ Toxicol Pharmacol* 2012, **34**:694-704.
496. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: **CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP.** *Cancer Res* 1997, **57**:615-619.
497. Shen Q, Tang W, Sun J, Feng L, Jin H, Wang X: **Regulation of CRADD-caspase 2 cascade by histone deacetylase 1 in gastric cancer.** *Am J Transl Res* 2014, **6**:538-547.
498. Song T, Zhang X, Zhang L, Dong J, Cai W, Gao J, Hong B: **miR-708 promotes the development of bladder carcinoma via direct repression of Caspase-2.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2013, **139**:1189-1198.
499. Monge M, Colas E, Doll A, Gil-Moreno A, Castellvi J, Diaz B, Gonzalez M, Lopez-Lopez R, Xercavins J, Carreras R, et al: **Proteomic approach to ETV5 during endometrial carcinoma invasion reveals a link to oxidative stress.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:1288-1297.
500. Gu Y, Fan S, Xiong Y, Peng B, Zheng G, Yu Y, Ouyang Y, He Z: **Cloning and functional characterization of TCRP1, a novel gene mediating resistance to cisplatin in an oral squamous cell carcinoma cell line.** *FEBS Lett* 2011, **585**:881-887.
501. Peng B, Gu Y, Xiong Y, Zheng G, He Z: **Microarray-assisted pathway analysis identifies MT1X & NFkappaB as mediators of TCRP1-associated resistance to cisplatin in oral squamous cell carcinoma.** *PLoS One* 2012, **7**:e51413.
502. Kim GJ, Rhee H, Yoo JE, Ko JE, Lee JS, Kim H, Choi JS, Park YN: **Increased expression of CCN2, epithelial membrane antigen, and fibroblast activation protein in hepatocellular carcinoma with fibrous stroma showing aggressive behavior.** *PLoS One* 2014, **9**:e105094.
503. Kubota S, Takigawa M: **Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions.** *Clin Sci (Lond)* 2015, **128**:181-196.
504. Zhu X, Zhong J, Zhao Z, Sheng J, Wang J, Liu J, Cui K, Chang J, Zhao H, Wong S: **Epithelial derived CTGF promotes breast tumor progression via inducing EMT and collagen I fibers deposition.** *Oncotarget* 2015, **6**:25320-25338.

505. Matika CA, Wasilewski M, Arnott JA, Planey SL: **Antiproliferative factor regulates connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in T24 bladder carcinoma cells.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**:1976-1985.
506. Qiao Z, Ren S, Li W, Wang X, He M, Guo Y, Sun L, He Y, Ge Y, Yu Q: **Chidamide, a novel histone deacetylase inhibitor, synergistically enhances gemcitabine cytotoxicity in pancreatic cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **434**:95-101.
507. Amaru Calzada A, Pedrini O, Finazzi G, Leoni F, Mascagni P, Introna M, Rambaldi A, Golay J, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro-Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative I: **Givinostat and hydroxyurea synergize in vitro to induce apoptosis of cells from JAK2(V617F) myeloproliferative neoplasm patients.** *Exp Hematol* 2013, **41**:253-260 e252.
508. Paller CJ, Wissing MD, Mendonca J, Sharma A, Kim E, Kim HS, Kortenhorst MS, Gerber S, Rosen M, Shaikh F, et al: **Combining the pan-aurora kinase inhibitor AMG 900 with histone deacetylase inhibitors enhances antitumor activity in prostate cancer.** *Cancer Med* 2014, **3**:1322-1335.
509. Simmons JK, Patel J, Michalowski A, Zhang S, Wei BR, Sullivan P, Gamache B, Felsenstein K, Kuehl WM, Simpson RM, et al: **TORC1 and class I HDAC inhibitors synergize to suppress mature B cell neoplasms.** *Mol Oncol* 2014, **8**:261-272.
510. Rahmani M, Aust MM, Benson EC, Wallace L, Friedberg J, Grant S: **PI3K/mTOR inhibition markedly potentiates HDAC inhibitor activity in NHL cells through BIM- and MCL-1-dependent mechanisms in vitro and in vivo.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**:4849-4860.
511. Cea M, Soncini D, Fruscione F, Raffaghello L, Garuti A, Emionite L, Moran E, Magnone M, Zoppoli G, Reverberi D, et al: **Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells.** *PloS One* 2011, **6**:e22739.
512. Zuco V, De Cesare M, Cincinelli R, Nannei R, Pisano C, Zaffaroni N, Zunino F: **Synergistic antitumor effects of novel HDAC inhibitors and paclitaxel in vitro and in vivo.** *PloS One* 2011, **6**:e29085.
513. Ha K, Fiskus W, Choi DS, Bhaskara S, Cerchietti L, Devaraj SG, Shah B, Sharma S, Chang JC, Melnick AM, et al: **Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells.** *Oncotarget* 2014, **5**:5637-5650.
514. Griffith DM, Duff B, Saponitsky KY, Kavanagh K, Morgan MP, Egan D, Marmion CJ: **Novel trans-platinum complexes of the histone deacetylase inhibitor valproic acid; synthesis, in vitro cytotoxicity and mutagenicity.** *J Inorg Biochem* 2011, **105**:793-799.
515. Mehrling T, Chen Y: **The Alkylating-HDAC Inhibition Fusion Principle: Taking Chemotherapy to the Next Level with the First in Class Molecule EDO-S101.** *Anticancer Agents Med Chem* 2015, **16**:20-28.
516. Parker JP, Nimir H, Griffith DM, Duff B, Chubb AJ, Brennan MP, Morgan MP, Egan DA, Marmion CJ: **A novel platinum complex of the histone deacetylase inhibitor belinostat: rational design, development and in vitro cytotoxicity.** *J Inorg Biochem* 2013, **124**:70-77.
517. Griffith D, Morgan MP, Marmion CJ: **A novel anti-cancer bifunctional platinum drug candidate with dual DNA binding and histone deacetylase inhibitory activity.** *Chem Commun (Camb)* 2009, **2009**:6735-6737.

518. Seo YH: **Dual Inhibitors Against Topoisomerases and Histone Deacetylases.** *J Cancer Prev* 2015, **20**:85-91.
519. Zhou N, Xu W, Zhang Y: **Histone deacetylase inhibitors merged with protein tyrosine kinase inhibitors.** *Drug Discov Ther* 2015, **9**:147-155.
520. Younes A, Berdeja JG, Patel MR, Flinn I, Gerecitano JF, Neelapu SS, Kelly KR, Copeland AR, Akins A, Clancy MS, et al: **Safety, tolerability, and preliminary activity of CUDC-907, a first-in-class, oral, dual inhibitor of HDAC and PI3K, in patients with relapsed or refractory lymphoma or multiple myeloma: an open-label, dose-escalation, phase 1 trial.** *Lancet Oncol* 2016, **17**:622-631.
521. Lai CJ, Bao R, Tao X, Wang J, Atoyian R, Qu H, Wang DG, Yin L, Samson M, Forrester J, et al: **CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity.** *Cancer Res* 2010, **70**:3647-3656.
522. Cai X, Zhai HX, Wang J, Forrester J, Qu H, Yin L, Lai CJ, Bao R, Qian C: **Discovery of 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-ylloxy)-N-hydroxyheptanamide (CUDc-101) as a potent multi-acting HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor for the treatment of cancer.** *J Med Chem* 2010, **53**:2000-2009.
523. Chen JB, Chern TR, Wei TT, Chen CC, Lin JH, Fang JM: **Design and synthesis of dual-action inhibitors targeting histone deacetylases and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase for cancer treatment.** *J Med Chem* 2013, **56**:3645-3655.
524. Billard C: **BH3 mimetics: status of the field and new developments.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**:1691-1700.
525. Chen S, Dai Y, Pei XY, Grant S: **Bim upregulation by histone deacetylase inhibitors mediates interactions with the Bcl-2 antagonist ABT-737: evidence for distinct roles for Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**:6149-6169.
526. Dai Y, Chen S, Kramer LB, Funk VL, Dent P, Grant S: **Interactions between bortezomib and romidepsin and belinostat in chronic lymphocytic leukemia cells.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:549-558.
527. Luszczek W, Cheriya V, Mekhail TM, Borden EC: **Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression.** *Mol Cancer Ther* 2010, **9**:2309-2321.
528. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dausies T, Karp JE, et al: **Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms.** *Cancer Res* 2006, **66**:6361-6369.
529. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB: **Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.** *Nat Genet* 1999, **21**:103-107.
530. Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA: **DNA methylation alterations in urothelial carcinoma.** *Cancer Biol Ther* 2006, **5**:993-1001.
531. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, et al: **Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer.** *Cancer Discov* 2011, **1**:598-607.

532. Mackmull MT, Iskar M, Parca L, Singer S, Bork P, Ori A, Beck M: **Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) Cause the Selective Depletion of Bromodomain Containing Proteins (BCPs).** *Mol Cell Proteomics* 2015, **14**:1350-1360.
533. Mazur PK, Herner A, Mello SS, Wirth M, Hausmann S, Sanchez-Rivera FJ, Lofgren SM, Kuschma T, Hahn SA, Vangala D, et al: **Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Nat Med* 2015, **21**:1163-1171.
534. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, et al: **Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer.** *Nature* 2015, **518**:495-501.
535. Collins MA, Pasca di Magliano M: **Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer.** *Front Physiol* 2013, **4**:407.
536. Fiskus W, Sharma S, Qi J, Valenta JA, Schaub LJ, Shah B, Peth K, Portier BP, Rodriguez M, Devaraj SG, et al: **Highly active combination of BRD4 antagonist and histone deacetylase inhibitor against human acute myelogenous leukemia cells.** *Mol Cancer Ther* 2014, **13**:1142-1154.
537. Borbely G, Haldosen LA, Dahlman-Wright K, Zhao C: **Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells.** *Oncotarget* 2015, **6**:33623-33635.
538. Yan Y, Yang FQ, Zhang HM, Li J, Li W, Wang GC, Che JP, Zheng JH, Liu M: **Bromodomain 4 protein is a predictor of survival for urothelial carcinoma of bladder.** *Int J Clin Exp Pathol* 2014, **7**:4231-4238.
539. Zhang Z, Hou S, Chen H, Ran T, Jiang F, Bian Y, Zhang D, Zhi Y, Wang L, Zhang L, et al: **Targeting epigenetic reader and eraser: Rational design, synthesis and in vitro evaluation of dimethylisoxazoles derivatives as BRD4/HDAC dual inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett* 2016, **26**:2931-2935.
540. Devaiah BN, Case-Borden C, Gegonne A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, Dey A, Ozato K, Singer DS: **BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin.** *Nat Struct Mol Biol* 2016, **23**:540-548.
541. Needham LA, Davidson AH, Bawden LJ, Belfield A, Bone EA, Brotherton DH, Bryant S, Charlton MH, Clark VL, Davies SJ, et al: **Drug targeting to monocytes and macrophages using esterase-sensitive chemical motifs.** *J Pharmacol Exp Ther* 2011, **339**:132-142.
542. Ossenkoppele GJ, Lowenberg B, Zachee P, Vey N, Breems D, Van de Loosdrecht AA, Davidson AH, Wells G, Needham L, Bawden L, et al: **A phase I first-in-human study with tefinostat - a monocyte/macrophage targeted histone deacetylase inhibitor - in patients with advanced haematological malignancies.** *Br J Haematol* 2013, **162**:191-201.
543. Zabkiewicz J, Gilmour M, Hills R, Vyas P, Bone E, Davidson A, Burnett A, Knapper S: **The targeted histone deacetylase inhibitor tefinostat (CHR-2845) shows selective in vitro efficacy in monocytoid-lineage leukaemias.** *Oncotarget* 2016, **7**:16650-16662.
544. Gryder BE, Akbashev MJ, Rood MK, Raftery ED, Meyers WM, Dillard P, Khan S, Oyelere AK: **Selectively targeting prostate cancer with antiandrogen equipped histone deacetylase inhibitors.** *ACS Chem Biol* 2013, **8**:2550-2560.
545. Lauffer BE, Mintzer R, Fong R, Mukund S, Tam C, Zilberleyb I, Flicke B, Ritscher A, Fedorowicz G, Vallero R, et al: **Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability.** *J Biol Chem* 2013, **288**:26926-26943.

546. Arts J, King P, Marien A, Floren W, Belien A, Janssen L, Pilatte I, Roux B, Decrane L, Gilissen R, et al: **JNJ-26481585, a novel "second-generation" oral histone deacetylase inhibitor, shows broad-spectrum preclinical antitumoral activity.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:6841-6851.
547. Marson CM, Matthews CJ, Atkinson SJ, Lamadema N, Thomas NS: **Potent and Selective Inhibitors of Histone Deacetylase-3 Containing Chiral Oxazoline Capping Groups and a N-(2-Aminophenyl)-benzamide Binding Unit.** *J Med Chem* 2015, **58**:6803-6818.
548. Pili R, Salumbides B, Zhao M, Altiok S, Qian D, Zwiebel J, Carducci MA, Rudek MA: **Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours.** *Br J Cancer* 2012, **106**:77-84.
549. Schneider BJ, Kalemkerian GP, Bradley D, Smith DC, Egorin MJ, 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.
550. Munster PN, Marchion D, Thomas S, Egorin M, Minton S, Springett G, Lee JH, Simon G, Chiappori A, Sullivan D, Daud A: **Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker.** *Br J Cancer* 2009, **101**:1044-1050.
551. Swiatkowski S, Seifert HH, Steinhoff C, Prior A, Thievensen I, Schliess F, Schulz WA: **Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines.** *Exp Cell Res* 2003, **282**:48-57.
552. Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK: **Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification.** *Lab Invest* 1994, **71**:583-594.

KONGRESSBEITRÄGE

- 25-28/09/2013 21st Meeting of the EAU Section of Urological Research 2013 (ESUR), Dresden, Deutschland
Poster: *HDAC8 is upregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment.* Lehmann M, Hoffmann MJ, Koch A, Hader C, Albers P, Schulz WA, Niegisch G.
- 5-8/07/2014 EACR – 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, München, Deutschland
Poster: *Class-I histone deacetylases are deregulated in urothelial cancer but may differ in suitability as therapeutic targets.* Lehmann M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G.
- 1-4/10/2014 66. Kongress der deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Düsseldorf, Deutschland
Vortrag: *Class-I histone deacetylases are deregulated in urothelial cancer but may differ in suitability as therapeutic targets.* Lehmann M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G. **Präsentiert durch Dr. med. Günter Niegisch.**
- 9-11/10/2014 22nd Meeting of the EAU Section of Urological Research 2014 (ESUR), Glasgow, Schottland
Vortrag: *Class-I histone deacetylases are deregulated in urothelial cancer but may differ in suitability as therapeutic targets.* Lehmann M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G.
- 5-6/03/2015 CLEPSO (Clinical Epigenetics Society) - 5th Clinical Epigenetics International Meeting 2015, Düsseldorf, Deutschland
Poster: *Class-I histone deacetylases 1, 2 and 3 are deregulated in urothelial cancer and are reasonable targets for anticancer treatment.* Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G.
- 10-12/09/2015 11th World Congress on Urological Research (ESUR-SBUR15), Nijmegen, Niederlande
Poster: *Inhibition of class-I histone deacetylase 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death.* Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G.
Präsentiert durch Dr. med. Günter Niegisch.
- 23-26/09/2015 67. Kongress der deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Hamburg, Deutschland
Vortrag: *The novel isotype specific HDAC inhibitor 4SC-202 is active in urothelial carcinoma.* Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Skowron M, Schulz WA, Niegisch G.
Präsentiert durch Dr. med. Günter Niegisch.

- 8-11/11/2015 EACR Conference Series „Basic Epigenetic Mechanisms in Cancer“, Berlin, Deutschland
Poster: *Unexpected mechanisms in the action of class I histone deacetylases 1 and 2 inhibitors on urothelial carcinoma cells.*
Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G.
Präsentiert durch Dr. med. Günter Niegisch.
- 19-20/02/2016 5. Symposium des DFBK e.V., Düsseldorf, Deutschland
Vortrag: *Unexpected (non-epigenetic?) mechanisms in the action of HDAC1/2 inhibitors on urothelial carcinoma.*
Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G.
Präsentiert durch Prof. Dr. Wolfgang A Schulz.
- 09-12/07/2016 24 Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Manchester, UK
Poster: *Effects of histone acetyltransferases GCN5/PCAF knockdown on urothelial carcinoma cells.*
Koutsogiannouli E, Hader C, Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA. **Präsentiert durch Prof. Dr. Wolfgang A Schulz.**
- 28/09-
01/10/2016 68. Kongress der deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Leipzig, Deutschland
Vortrag: *First characterization of the new primary HBLAK cell line – an in vitro-model to investigate early stages of urothelial carcinogenesis.* Hoffmann MJ, Koutsogiannouli E, Skowron M, Pinkerneil M, Niegisch G, Rieder H, Schulz WA.
Präsentiert durch Dr. Michelle J Hoffmann.
- 28/09-
01/10/2016 68. Kongress der deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Leipzig, Deutschland
Vortrag: *Effects of a novel HDAC inhibitor with preferential activity against HDAC4/5 on urothelial carcinoma cells.* Kaletsch A, Pinkerneil M, Hansen F, Hoffmann MJ, Wiek C, Kurz T, Schulz WA, Niegisch G. **Präsentiert durch Prof. Dr. Wolfgang A Schulz.**

WEITERE PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Hoffmann MJ, Koutsogiannouli E, Skowron MA, Pinkerneil M, Niegisch G, Brandt A, Stepanow S, Rieder H, Schulz WA: **The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors.** *Bladder Cancer* 2016, 2:449-463.

Isono M, Hoffmann MJ, Pinkerneil M, Sato A, Michaelis M, Cinatl J, Jr., Niegisch G, Schulz WA: **Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 strongly sensitises urothelial carcinoma cells to gemcitabine.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2017, 36:1.

Koutsogiannouli EA, Wagner N, Hader C, Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA: **Differential Effects of Histone Acetyltransferase GCN5 or PCAF Knockdown on Urothelial Carcinoma Cells.** *International Journal of Molecular Sciences* 2017, 18.

Eingereicht Juni 2017: Hölscher A, Schulz WA, Pinkerneil M, Niegisch G, Hoffmann MJ: **Combined inhibition of BET proteins and class-I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines.** *Clinical Epigenetics*.

Übersichtsartikel

Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G: **HDACs and HDAC inhibitors in urothelial carcinoma - perspectives for an antineoplastic treatment.** *Curr Med Chem* 2017, Epub ahead of print.

Methoden-Buchkapitel

Pinkerneil M, Hoffmann MJ & Niegisch G: **"Epigenetic treatment options in urothelial carcinoma"** in Schulz WA, Niegisch G, Hoffmann MJ (Hg.): *Urothelial Carcinoma. Methods in Molecular Biology. Springer Protocols. Humana Press, im Druck* 2017.

DANKSAGUNG

Nun möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht und mich dabei begleitet haben. Insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz und dem Projektleiter Dr. med. Günter Niegisch bin ich zu großem Dank verpflichtet. Danke für dieses tolle Projekt, die gute Betreuung, die fachliche und finanzielle Unterstützung, das in mich gesetzte Vertrauen und vor allem für so viel Verständnis.

Herrn Prof. Dr. Georg Groth möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit danken und für seine Begleitung als Korreferent und Mentor während der Promotion.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Scott M. Ulrich und Dr. Hella Kohlhof bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, neue Substanzen zu untersuchen.

Ich durfte eine tolle Zeit im Urologischen Forschungslabor erleben und viele neue Dinge lernen. Großer Dank gebührt dabei Dr. Michèle Hoffmann für ihre fachliche Unterstützung, ihr offenes Ohr und ihren persönlichen Rat. Bei Judith, Margaretha, Aline und Johanna möchte ich mich für die gemeinsame Doktorandenzeit, die vielen lustigen Kaffeepausen und für die entspannenden kleineren und größeren Ausflüge bedanken. Auch Christiane und Marija dürfen nicht unerwähnt bleiben, da sie einen großen und wertvollen Beitrag leisten indem sie das Labor „am Laufen“ halten.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden bedanken: bei Yasmin, Katrin, Anastasia und Alexander für ihre jahrelange Freundschaft und bei den Bochumern für die tolle Aufnahme.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich während meines gesamten Studiums und der Promotion in vielerlei Hinsicht unterstützt und mich immer ermutigt hat. Meiner Schwester Irina, meinem Bruder Heinrich und ihren Familien, besonders aber Sami und Elina, möchte ich dafür danken, dass sie, wann immer erwünscht, für genügend Ablenkung, Action und Erholung gesorgt haben.

Philipp danke ich besonders für seinen Rückhalt und seine liebevolle Fürsorge, ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich nie abgeschlossen hätte. Natürlich auch für ganz praktische Dinge, wie den privaten Taxiservice, der dafür gesorgt hat, dass ich auch noch zur spätesten Stunde nach Hause kam und so manch ein Experiment erst ermöglicht wurde. Und für Sophie. Danke, Philipp. Einfach für Alles.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden. Weiterhin versichere ich, dass ich bisher keine anderen Promotionsversuche unternommen habe. Teile dieser Arbeit sind in verschiedenen wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht.

Maria Pinkerneil