

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

Wirkung neuer Histondeacetylase-Inhibitoren auf
Urothelkarzinom-Zelllinien

Dissertation

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

vorgelegt von
Aline Kaletsch
2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Fritz

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2019

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Kaletsch, A., Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Jaguva Vasudevan, A. A., Wang, C., Hansen, F. K., Wiek, C., Hanenberg, H., Gertzen, C., Gohlke, H., Kassack, M. U., Kurz, T., Schulz, W. A., Niegisch, G. (2018). "Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells." *Clinical Epigenetics* 10(1): 100.

Zusammenfassung

Histondeacetylasen (HDACs) sind eine Gruppe von Enzymen (Klasse I-IV), die an verschiedenen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Apoptose und Proliferation beteiligt sind. In unterschiedlichem Maße wirken die verschiedenen Enzyme tumorwachstums-fördernd oder -hemmend. Da HDACs in Tumorzellen häufig fehlreguliert sind, stellen sie ein vielversprechendes Ziel für die Tumorthherapie dar. Die meisten HDAC-Inhibitoren (HDACis) sind jedoch Pan-Inhibitoren und haben den Nachteil eines breiten Nebenwirkungsspektrums. Sie können durch die Hemmung einer Vielzahl von Isoenzymen nicht nur in potentiell tumorfördernde, sondern auch in tumorhemmende Mechanismen eingreifen. Daher könnten HDACis mit höherer Selektivität besser für die Tumorthherapie geeignet sein. Diese Dissertation sollte dazu beitragen, ein optimales HDAC-Inhibitionsprofil für die Behandlung des Urothelkarzinoms (UC) zu definieren. In Urothelkarzinom-Zelllinien (UCCs) wurde in vorausgegangenen Studien eine verminderte mRNA- und Proteinexpression von HDAC4 (Klasse IIa) im Vergleich zu benignen Urothelzellen nachgewiesen. Deshalb sollte mit Hilfe selektiver Klasse IIa HDACis untersucht werden, ob diese überhaupt eine Wirkung auf Tumorzellen ausüben und somit eine Inhibition der Klasse IIa HDACs in der Therapie von Harnblasenkarzinomen sinnvoll ist.

Mittels der HDACis 19e, 19h, 19i, LMK163 und LMK214 wurde eine pharmakologische Inhibition an den UC-Zelllinien sowie an nicht-malignen Kontrollzellen durchgeführt. Zelluläre Effekte der Inhibition wurden mittels Analysen der Vitalität, Klonogenität und Seneszenz untersucht. Auswirkungen auf den Zellzyklus wurden anhand von fluoreszenzmarkierter Durchflusszytometrie (FACS), nukleäre Veränderungen mittels zytochemischer Färbung (DAPI) detektiert. Die mRNA- und Protein-Expression spezifischer Marker der Klasse IIa HDACs wurden mit Hilfe von quantitativer Realtime-PCR und Western Blots bestimmt.

Der HDACi 19i hemmte die Proliferation der UCCs bereits im niedrigen Konzentrationsbereich (IC_{50} 0,97-1,03 μ M) stark und induzierte teilweise Apoptose; die anderen HDACis wirkten bei etwas höheren Konzentrationen. Die IC_{50} -Werte und das biologische Wirkspektrum von 19i ähnelten dem des Pan-Inhibitor Vorinostat (SAHA). Die Durchflusszytometrie ergab eine Störung im Zellzyklusverlauf mit einer erhöhten Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase. Gleichzeitig wurden mit ansteigenden 19i-Konzentrationen vermehrt Micronuklei detektiert. Die Fähigkeit zur Koloniebildung wurde vermindert. Die mRNA-Expression von Thymidylat-Synthase und HDAC7 war nach Behandlung in allen UCCs verringert, die von p21^{CIP1} stark erhöht. Die Expression von HDAC4 mRNA stieg nach Behandlung leicht, die von HDAC5 stark an. Die Acetylierung von Histon H3 und H4 sowie α -Tubulin nahm konzentrationsabhängig zu, ebenso die Spaltung von PARP. Eine Überexpression von HDAC4 führte in stabil transduzierten VM-CUB1 UCC im unbehandelten Zustand zu einer verminderten Proliferationsfähigkeit.

Die zellulären Effekte von 19i entsprechen im hier verwendeten Konzentrationsbereich denen einer Klasse I Inhibition. In einem Großteil der Versuche war die molekulare Wirkung an UCCs stärker als die der Referenzsubstanz SAHA. Die ursprünglich beschriebene Selektivität von 19i für HDAC4 und 5 konnte anhand unserer Experimente nicht bestätigt werden. Erneute *in-vitro* Analysen zur Spezifität des Inhibitors 19i ergaben tatsächlich ein zum angenommen Ausgangsprofil verändertes Wirkspektrum mit vorrangiger Aktivität gegen die HDAC Isoformen 1, 2, 3, 6 und 10; eine signifikante Aktivität gegen HDAC4 konnte nicht nachgewiesen werden. Daher ist mit diesem Inhibitor eine Aussage zur Sinnhaftigkeit der Klasse IIa Inhibition in UCCs für ein optimales HDAC-Inhibitionsprofil nicht möglich. Allerdings geben die verminderte Grundexpression in vielen UCCs und die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit nach HDAC4-Überexpression Grund zur Annahme, dass HDAC4 das Wachstum von UCCs einschränkt und eine selektive Inhibition somit kontraproduktiv für die Tumorthherapie wäre. Eine selektive Inhibition sollte daher mittels selektiverer Klasse IIa HDACis überprüft werden.

Summary

Histone deacetylases (HDACs) are a group of enzymes (class I-IV) which are involved in a number of important cellular processes such as differentiation, apoptosis and proliferation. Since HDACs are often dysregulated in tumor cells they are promising targets for anti-cancer drugs which could be used for the treatment of urothelial carcinoma (UC). However, most HDAC inhibitors (HDACis) are pan inhibitors and have the disadvantage of a broad spectrum of side effects in cancer therapy. Further, as individual HDACs may also promote antineoplastic processes, they may be hampered by the use of HDACis as well. Therefore, inhibition of individual enzymes could be more efficacious. The aim of this study was to help defining an optimal HDAC inhibition profile for the treatment of urothelial carcinoma (UC). In previous work we observed diminished mRNA- and protein HDAC4 expression in some urothelial carcinoma cell lines (UCCs) compared to normal urothelial cells. Hence, we investigated novel HDACis with presumed preferential activity against HDAC4/5 to determine whether they exert any effect on tumor cells and thus inhibition of class IIa HDACs is useful or counterproductive in the therapy of bladder cancer.

We used novel HDACis 19e, 19h, 19i, LMK163 and LMK214 on UC cell lines with basal expression of HDAC4, HDAC4 overexpressing UC cell lines and benign control cells. UC cell lines overexpressing HDAC4 were established by lentiviral transduction. IC₅₀s for HDACi were determined by MTT assay. Cellular effects were analyzed by colony forming assay, caspase-3/7 assay, senescence assay and immunofluorescence staining. Cell cycle effects were assessed by flow cytometry. Molecular changes were followed by quantitative real-time PCR and Western blots. Treatment with class I HDACi SAHA served as a control.

19i significantly reduced proliferation of all UC cell lines at low micromolar concentrations (IC₅₀ 0,97-1,03 μ M); the other HDACis were less efficacious. Control lines were similarly or less sensitive. The IC₅₀ values and biological spectrum of 19i were similar to those of the pan inhibitor vorinostat (SAHA). At 1 or 2 μ M, 19i revealed a disruption in cell cycle progression with an increased number of cells in G2/M-fraction, inhibited clonogenic growth, induced caspase activity, disturbed mitosis and elicited apoptosis, micronuclei and senescence in some cells. Thymidylate synthase expression was diminished, p21^{CIP1} was induced; global histone acetylation and α -tubulin acetylation increased in a concentration-dependent manner, as did the cleavage of PARP. In most cell lines, 19i induced HDAC4 and HDAC5 mRNAs while rather repressing HDAC7. VM-CUB1 cell lines overexpressing HDAC4 proliferated more slowly and were not significantly less sensitive to 19i.

Our data suggest that anti-neoplastic effects of 19i on UCCs appear to be exerted by targeting class I HDACs. However, treatment with 19i resulted in stronger cellular effects than treatment with SAHA. The presumed preferential activity against class IIa HDAC4 and 5 could not be confirmed by our experiments. Reevaluation of *in vitro* HDAC isoenzyme activity inhibition profile of 19i and its docking to HDAC4 using current assays revealed a superior activity of 19i against the HDAC isoforms 1, 2, 3, 6 and 10; a significant activity against HDAC4 could not be detected. Therefore, a conclusion concerning the use of class IIa HDACis for the treatment of UC is not possible with 19i. However, the reduced basal expression levels of HDAC4 in UCCs and the decreased proliferative capacity of HDAC4 overexpressing cells suggest that HDAC4 may impede UC growth. A class IIa inhibition should thus be examined with more selective class IIa inhibitors.

Abkürzungsverzeichnis

AML	<i>Acute myeloid leukemia</i>	CoA	<i>Coenzym A</i>
AMP	<i>Adenosinmonophosphat</i>	CREBBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>	Ct-Wert	<i>Cycle threshold</i>
ARR19	<i>Androgen receptor corepressor 19</i>	CtBP	<i>C-terminal-binding protein</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>	CU	<i>Linker-Region in HDACi</i>
Bak1	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	DBC1	<i>Deleted in bladder cancer protein 1</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>	DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>	DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
Bcl-w	<i>BCL2-like protein 2</i>	DOCK1	<i>Dedicator of cytokinesis</i>
Bim	<i>BCL2-interactig mediator of cell death, BCL2-like 11</i>	E2F1	<i>Transcription factor E2F1</i>
Bmf	<i>Bcl2 modifying factor</i>	EC	<i>Endothelzellen</i>
BubR1	<i>Budding uninhibited by benzimidazole-related 1</i>	EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
c-FLIP	<i>FADD-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein</i>	EMT	<i>Epithelial-mesenchymale Transition</i>
CaMKI/II	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I/II</i>	eNOS	<i>Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
CaMKs	<i>Calmodulin-dependent protein kinase</i>	ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>	FCS	<i>Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>	FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	FOXP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
CHD6	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 6</i>	GATA-1/2	<i>GATA-binding protein 1/2</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>	GC	<i>Gemcitabin, Cisplatin</i>
		GDF9/	<i>Growth differentiation</i>
		GDF15	<i>Factor 9/ Growth differentiation factor 15</i>

HAT	<i>Histon-Acetyltransferase</i>	MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
Hda1	<i>Histondeacetylase HDA1</i>	mRNA	<i>Messenger</i>
HDAC	<i>Histondeacetylase</i>		<i>Ribonukleinsäure</i>
HDACi	<i>Histondeacetylase-Inhibitor</i>	MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2 -</i>
HDM	<i>Histondemethylase</i>		<i>yl)-2,5-</i>
HGPUC	<i>High grade papillary</i>		<i>Diphenyltetrazolium-</i>
	<i>urothelial carcinoma</i>		<i>bromid</i>
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor</i>	MVAC	<i>Methotrexat, Vinblastin,</i>
	<i>1 alpha</i>		<i>Doxorubicin, Cisplatin</i>
HMT	<i>Histonmethyltransferase</i>	MyoD	<i>Myogenic differentiation 1</i>
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>	MYPT	<i>Myosin phosphatase</i>
HRAS	<i>Transforming protein p21</i>		<i>targeting protein</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90 kDa</i>	N-CoR	<i>Nuclear receptor</i>
IC ₅₀	<i>Mittlere inhibitorische</i>		<i>corepressor</i>
	<i>Konzentration</i>	NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine</i>
Importin α	<i>Nukleäre Importrezeptoren</i>		<i>dinucleotide</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminale Kinasen</i>	NADPH	<i>Nicotinamid-Adenin-</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>		<i>Dinucleotid-Phosphat</i>
K _{is}	<i>Inhibitionskonstante</i>	NES	<i>Nuclear export signal</i>
LGPUC	<i>Low grade papillary</i>	NF- κ B	<i>Nuclear factor of kappa</i>
	<i>urothelial carcinoma</i>		<i>light polypeptide gene</i>
LV	<i>Leervektor</i>		<i>enhancer in B-cells</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>	NK-2	<i>NK2-Homöoboxgene</i>
MAD2	<i>mitotic arrest deficient 2</i>	NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein</i>	NOXA	<i>PMAIP1, phorbol-12-</i>
	<i>kinase</i>		<i>myristate-13-acetate-</i>
MARK	<i>Microtubule affinity</i>		<i>induced protein 1</i>
	<i>regulating kinase</i>	NSCLC	<i>Nicht-kleinzelliges</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>		<i>Lungenkarzinome</i>
MEF2C	<i>Myocyte enhancer factor 2C</i>	p14 ^{ARF}	<i>p14 alternate reading</i>
MEF2D	<i>Myocyte enhancer</i>		<i>frame (Alter. Leserahmen</i>
	<i>factor 2D</i>		<i>des Gens CDKN2A)</i>
microRNA	<i>Micro Ribonukleinsäure</i>		

p16 ^{INK4A}	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>	Ras/Raf/	<i>Rat sarcoma /rapidly</i>
p21 ^{WAF1/CIP1}	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>	MAP- Kinase	<i>accelerated fibrosarcoma/ mitogen-activated protein Kinase</i>
p27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>	RB1	<i>Retinoblastom-Protein 1</i>
p33 ^{ING1}	<i>Tumor suppressor p33(ING1b)</i>	RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
PARP1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>	Rpd3	<i>Histone deacetylase RPD3</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung</i>	RT	<i>Raumtemperatur</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	RT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
PI	<i>Propidium Jodide</i>	Runx	<i>Runt-related transcription factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3- kinase</i>	SAC	<i>Checkpoint for spindle assembly</i>
PI3K/Akt- Signalwege	<i>Phosphatidylinositol 3- kinase/ Protein Kinase B Signalweg</i>	SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>	SDS-PAGE	<i>SDS (sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamid- Gelelektrophorese</i>
PKD1	<i>Polycystic Kidney Disease- Associated Protein</i>	SIK1	<i>Serine/threonine-protein kinase</i>
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i>	Sin3	<i>SIN3 Transcription Regulator Family Member A</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2</i>	Sir2	<i>Sirtuin-1</i>
PTCH1	<i>Patched 1</i>	siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	SIRT	<i>Sirtuine</i>
PVDF	<i>Polyvinylfluorid</i>	Smad3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
		SMARCA4	<i>Transcription activator BRG1</i>
		SMRT	<i>Silencing mediator of retinoic acid</i>

STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 1/3</i>	UC	<i>Urothelial carcinoma, Urothelkarzinom der Harnblase</i>
STR	<i>Short tandem repeats</i>	UCC	<i>Urothelkazinom Zelllinie</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>	UCCs	<i>Urothelkarzinom Zelllinien</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>	UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
TERT-NHUC	<i>hTERT-immortalised Normal human urothelial cells</i>	UP	<i>Uroepitheliale Primärkultur</i>
TFMO	<i>Trifluormethyloxadiazol</i>	UTX/KDM 6A	<i>Lysine-specific demethylase 6A/ Lysine Demethylase 6A</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
TNM	<i>Tumor node metastasis</i>	VPA	<i>Valproinsäure</i>
TP53/ p53	<i>Tumor protein p53</i>	WHO	<i>World health organization</i>
TR2	<i>Testicular receptor 2</i>	XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
TS	<i>Thymidylat-Synthase</i>	XPC	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
TSA	<i>Trichostatin A</i>	ZBG	<i>Zink-Bindungs-Domäne</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1</i>	53-BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
TUR	<i>Transurotheliale Resektion</i>		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Urothelkarzinom	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Klassifikation	1
1.1.2	Verlauf, Prognose und Therapie	3
1.1.3	Molekulare Tumorgenese und Progression	4
1.2	Epigenetische Mechanismen	5
1.3	Histondeacetylasen in der Tumorbilogie	6
1.3.1	Funktion und Klassifikation	6
1.3.2	Klasse IIa HDACs	8
1.3.3	HDACs in UCCs	13
1.4	Histondeacetylase-Inhibitoren	14
1.4.1	Einteilung, Funktion und Wirkmechanismus	14
1.4.2	Wirkung auf Tumorzellen und speziell UC-Zelllinien	17
1.4.3	Selektive Klasse IIa HDAC-Inhibitoren	18
1.5	Zielsetzung	21
2	Material	23
2.1.1	Zelllinien	23
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Kits	24
2.1.3	Puffer und Lösungen	26
2.1.4	Plasmide	30
2.1.5	Antikörper und Enzyme	31
2.1.6	Oligonukleotid-Primer	32
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.8	Geräte	33
2.1.9	Software und Datenbanken	35
3	Methoden	36
3.1	Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien und Kontroll-Zellen	36
3.1.1	Medien und Zusätze	36
3.1.2	Kultivierung von humanen Urothelkarzinom-Zelllinien	36
3.1.3	Zellzahlbestimmung	37
3.1.4	Aussäen im Well-Format	37
3.2	Behandlung mit HDAC-Inhibitoren	37

3.3 Herstellung von HDAC4 und HDAC1 überexprimierenden UC-Zellvarianten sowie Kontroll-Vektor Zellvarianten.....	38
3.4 RNA-Analyse.....	39
3.4.1 RNA-Präparation.....	39
3.4.2 Reverse Transkription.....	40
3.4.3 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.5 Protein-Analyse.....	41
3.5.1 Präparation von Proteinlysaten.....	41
3.5.2 Histonpräparation.....	41
3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung.....	42
3.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	43
3.5.5 Western Blot.....	43
3.5.6 Stripping.....	44
3.6 Funktionelle Versuche.....	44
3.6.1 MTT-Viabilitätsassay.....	44
3.6.2 CellTiter-Glo® Assay.....	45
3.6.3 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	46
3.6.4 Zytochemische Analyse.....	47
3.6.5 Klonogenität.....	48
3.6.6 Giemsa Färbung.....	48
3.6.7 Caspase-Glo® 3/7 Assay.....	49
3.6.8 Seneszenz assoziierter saurer β -Galaktosidase Assay.....	50
3.6.9 Statistische Analysen.....	50
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Auswahl der Urothelkarzinom-Zelllinien (UCCs).....	51
4.2 Behandlung der UCCs mit 19e, 19h und 19i.....	53
4.2.1 Effekte auf die Proliferation.....	53
4.2.2 Expressionsprofile nach Behandlung mit 19e, 19h, und 19i.....	57
4.3 Behandlung der UCCs mit 19i.....	59
4.3.1 Effekte auf die Vitalität der UCCs und Kontrollzelllinien.....	59
4.3.2 Einfluss auf den Zellzyklus.....	62
4.3.3 Zelltodmechanismen, nukleäre Veränderungen und Mitosefähigkeit.....	65
4.3.4 Morphologische Veränderungen und Seneszenz.....	70
4.3.5 Expressionsveränderungen nach Behandlung mit 19i.....	73

4.4	Effekte der Überexpression von HDAC4 in den UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3	79
4.4.1	Proliferationsfähigkeit und Morphologie der unbehandelten HDAC4 Zellvarianten.....	80
4.4.2	Auswirkung der HDAC4 Überexpression auf Proliferations- und Zellzyklusmarker sowie Klasse IIa mRNA Expression	83
4.4.3	Behandlung der HDAC1 und HDAC4 Zellvarianten mit 19i	84
4.5	Behandlung der UCCs mit weiteren Hydroxamsäure-basierten HDAC-Inhibitoren	86
4.5.1	Effekte auf die Vitalität	86
4.5.2	Einfluss auf den Zellzyklus.....	88
4.5.3	Auswirkung auf die Caspase 3/7-Aktivität	88
5	Diskussion.....	90
5.1	19i – Klasse I oder Klasse IIa Inhibitor?	90
5.2	Molekulare Wirkung von 19i auf UCCs	93
5.2.1	Antineoplastische Aktivität- Einfluss auf die Proliferation und Klonogenität	93
5.2.2	Deregulation des Zellzyklus und der Zellkernmorphologie.....	97
5.2.3	Einfluss von 19i auf die mRNA Expression der Klasse IIa HDACs	101
5.2.4	Apoptose-Induktion und Seneszenz	102
5.3	Vergleich der Inhibitoren 19i und SAHA	104
5.4	Auswirkungen einer HDAC4 Überexpression auf UCCs	106
5.5	Fazit – Selektive HDAC-Inhibitoren und deren Potential in der Therapie des UC.....	108
6	Abbildungsverzeichnis.....	112
7	Tabellenverzeichnis.....	116
8	Literaturverzeichnis.....	117
9	Anhang	131

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Klassifikation

Das mehrschichtige Übergangsgewebe des ableitenden Harntraktes (Urothel) setzt sich aus Basal-, Zwischen- und Deckzellschichten zusammen und kleidet die ableitenden Harnwege, bestehend aus Nierenkelchen und -becken, Harnleiter, Harnblase und dem Anfang der Harnröhre, aus. Es kann sich großen Volumenänderungen der Harnblase anpassen und schützt durch seine Barriere-Funktion vor unkontrolliertem Stoffaustausch zwischen Urin und interstitieller Flüssigkeit (Acharya et al., 2004; Welsch, 2010). Fast alle malignen Entartungen im Harntrakt gehen vom urothelialen Gewebe aus und sind als Urothelkarzinome (UC) am häufigsten in der Harnblase lokalisiert (90 bis 95 %). Neoplastische Veränderungen kommen jedoch auch im oberen Harntrakt mit Nierenbeckenkelchsystem und Harnleiter (5 bis 10%) sowie der Harnröhre (1%) vor (Brown et al., 2012; Niedworok et al., 2014; Rübben, 2009). Einen wesentlich geringeren Anteil der malignen Tumoren stellen die Plattenepithelkarzinome (2 bis 3%) und die Adenokarzinome (2%) dar (Jocham et al., 2007; Rübben, 2009).

Weltweit ist das UC die neunthäufigste maligne Tumorerkrankung, mit dem häufigsten Auftreten in Westeuropa, Nordamerika und Australien (Eble J.N., 2004; Ferlay et al., 2015). Die Inzidenz beträgt 5,3/100.000 Personen. Während Männer im Vergleich drei bis vier Mal häufiger betroffen sind, weisen Frauen häufiger ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium und eine geringere Überlebensrate auf. In Europa beträgt die Inzidenz 5,2/100.000 Personen des männlichen und 1,1/100.000 Personen des weiblichen Geschlechts (Fajkovic et al., 2011; Ferlay et al., 2015). Das Erkrankungsrisiko nimmt dabei mit steigendem Lebensalter zu (Rübben, 2009).

Bedeutende exogene Risikofaktoren für die Entstehung des UCs stellen neben der Inhalation von Tabakrauch auch die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und aromatische Aminoverbindungen wie β -Naphthylamin und Benzidin, Arsen im Trinkwasser), sowie die Einnahme von Medikamenten wie Cyclophosphamid, Phenacetin oder Aristolochiasäure (in Heilkräutermischungen) dar (Burger et al., 2013; Dobruch et al., 2016; Reulen et al., 2008). Ebenfalls stellt die chronische Entzündung der Harnblase einen eigenständigen Risikofaktor dar, genetische Faktoren im Sinne einer familiären Disposition spielen

hingegen kaum eine Rolle (Hiddemann et al., 2010). Jedoch beeinflussen eine Reihe von Polymorphismen in Genen des Fremdstoffmetabolismus, der Zellzyklus- und Checkpointregulation das Krankheitsrisiko (Golka et al., 2011; Lukas et al., 2017).

Die klinischen Symptome sind abhängig von der Lokalisation und dem Ausmaß des Tumors. Im frühen Stadium wird das Harnblasenkarzinom besonders durch schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturien (85%) sowie Dysurie und Pollakisurie auffällig (Eble et al., 2004). Erst im späteren Stadium dominieren unspezifische körperliche Beschwerden in Form von Flanken- und Rückenschmerzen (Jocham et al., 2007).

Nach der UICC (*Union internationale contre le cancer*; dt. Internationale Vereinigung gegen Krebs) wird das UC in TNM-Stadien (*staging*) eingeteilt. Dabei werden entscheidende Tumormerkmale wie die Ausdehnung des Primärtumors (T), der Lymphknotenbefall (N) und der Metastasierungsgrad (M) berücksichtigt (Brierley, 2017). Anhand dieser Klassifikation kann eine Unterteilung in nicht-invasive papilläre Tumore (pTa und pT1) und invasive Tumore (pT2 bis pT4) sowie Carcinoma in situ (Tis) getroffen werden (Tab. 9.1 im Anhang). Anhand der alten WHO-Klassifikation von 1973 erfolgt die Einteilung in drei Differenzierungsgrade (*grading*). Durch die Beurteilung des Abweichungsgrades des Primärtumors vom Normalgewebe wird eine Unterteilung in G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 (gering differenziert) vorgenommen. Das *Grading* erlaubt eine gute Einschätzung der malignen Potenz und der daraus resultierenden therapeutischen Strategien. Da viele klinische Empfehlungen und Studien auf dieser Klassifikation beruhen, wird sie heute noch zur histopathologischen Beurteilung herangezogen (Jocham et al., 2007). Nach der WHO-Klassifikation von 2004 werden sowohl bei nichtinvasiven papillären UC als auch invasiven UC *low-grade* (LGPUC) von *high-grade* (HGPUC) Läsionen unterschieden (Babjuk et al., 2013; Eble et al., 2004; Rübben, 2009). Diese Einteilung wurde mit einigen Modifikationen auch in der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016 übernommen (Humphrey et al., 2016). Die *low-grade* Tumore zeigen eine hohe Differenzierung mit geringer Mortalitätsrate, aber hoher Rezidivrate. *High-grade* Tumore zeichnen sich durch erhöhte genetische Instabilität aus; papilläre *high-grade* UC weisen eine erhöhte Progressionsrate hin zu invasiveren Stadien auf (Hiddemann et al., 2010; Schulz et al., 2015).

1.1.2 Verlauf, Prognose und Therapie

Für eine optimale Behandlungsstrategie und die prognostische Verlaufseinschätzung wird das Harnblasenkarzinom histopathologisch in nicht-muskelinvasive (pTa, pTis, pT1) und muskelinvasive Karzinome (T2 bis T4) unterteilt. Bei der Erstdiagnose liegen zu 70-80% nicht-muskelinvasive Karzinome vor, die mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 70% (pT1) bis 95% (pTa) eine gute Prognose haben. Das Risiko einer Progression in ein muskelinvasives Stadium ist abhängig von Stadium und Grading und liegt zwischen 5% bei pTa *low-grade* Tumoren und bis zu 50% bei pTis- und pT1-Tumoren (Hiddemann et al., 2010; Jocham et al., 2007). Die Rezidivrate innerhalb eines Jahres nach transurethraler Resektion liegt jedoch zwischen 40 und 80% (Shelley et al., 2001), weshalb regelmäßige zystoskopische Nachsorgen indiziert sind. Die Prognose der verbleibenden 15-30 % muskelinvasiven Tumoren oder bereits metastasierter Läsionen ist deutlich ungünstiger. Mit steigendem pT-Stadium nimmt die 5-Jahres-Überlebensrate nach radikaler Zystektomie ab (pT2 64-76%; pT3 20-36%; pT4 6-25%). Ein zusätzlicher Lymphknotenbefall verschlechtert die Prognose weiter. Das Metastasierungsrisiko korreliert ebenfalls positiv mit dem Tumorstadium (Hiddemann et al., 2010; Jocham et al., 2007).

Bei nicht-muskelinvasiven UC steht die organerhaltende transurethrale Resektion (TUR) im Vordergrund. Um die Rezidiv- und Progressionsraten zu verringern, kann eine Frühinstillation mit Mitomycin C vorgenommen werden. Weitere therapeutische Optionen sind eine längerfristige adjuvante Instillationstherapie mit verschiedenen Chemotherapeutika oder BCG (Bacillus Calmette-Guerin). Insbesondere kann die Progressionsrate eines Carcinoma in situ (pTis) durch die intravesikale Instillation von BCG deutlich verringert werden (Babjuk et al., 2017; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2016). Bei den muskelinvasiven, nicht metastasierten UC gilt die radikale Zystektomie als Standardtherapie (Alfred Witjes et al., 2017). Je nach lokaler Tumorsituation werden zusätzlich zur Harnblase und den lokoregionären Lymphknoten beim Mann die Prostata und Samenblase, bei der Frau Uterus, Adnexe, vordere Scheidenwand und Harnröhre entfernt. Beim Auftreten von Fernmetastasen, die sich innerhalb von 2 Jahren bei der Hälfte der zystektomierten Patienten ausbilden, versterben fast alle Patienten innerhalb von 2 Jahren (mediane Überlebenszeit: 14 Monate). Die Erstlinientherapie nach Metastasierung besteht aus einer Kombination von Gemcitabin und Cisplatin (GC-Schema) oder einer Polychemotherapie (MVAC-Schema)

mit Methotrexat, Vinblastin, Cisplatin und Doxorubicin (Jocham et al., 2007; Niedworok et al., 2014). Diese Chemotherapien können auch neoadjuvant oder adjuvant mit signifikantem, aber moderatem Nutzen eingesetzt werden. Auf Grund der begrenzten Effektivität der verfügbaren Therapien für muskelinvasive und metastasierte UC sind jedoch neue Therapieoptionen von Nöten, um die Überlebensrate und Prognose dieser Patienten zu verbessern.

1.1.3 Molekulare Tumorgenese und Progression

Die phänotypischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen des UC spiegeln sich in den molekularen Veränderungen wider. Die frühen, nicht muskel-invasiven Läsionen sind durch zwei unterschiedliche Entstehungswege charakterisiert, aus denen einerseits papilläre, oberflächliche *low-grade* pTa Tumoren hervorgehen, die sich im weiteren Verlauf zu *high-grade* Tumoren entwickeln können (Castillo-Martin et al., 2010). Dabei entstehen pTa Tumoren aus hyperplastischen Vorläuferläsionen. Dysplastische Läsionen führen hingegen über die Entstehung eines *high-grade* Carcinoma in situ (Tis) zu muskelinvasiven Tumoren (Knowles, 2008; Schulz, 2006). Der molekulare Entstehungsweg der papillären *low-grade* Tumoren ist geprägt durch aktivierende (*gain-of-function*) Mutationen der Onkogene *FGFR3*, *HRAS* und *PIK3CA* sowie Deletionen von Chromosom 9, sowie mutmaßlich durch Inaktivierung der Tumorsuppressoren *PTCH1*, *DBC1* und *TSC1* (Schulz et al., 2015). Diese Veränderungen führen zu einer Aktivierung der Ras/Raf/MAP-Kinase- bzw. PI3K/Akt-Signalwege, welche Zielgene für die Zellzyklusregulation (*CCND1*/Cyclin D, *CDC25A*) modulieren, wodurch es zu einer anhaltenden Proliferation der Zellen kommt (Niegisch et al., 2010). Die Deletion von *CDKN2A* auf Chromosom 9p führt zu einer Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p16^{INK4A} und p14^{ARF}, welche die *RB1*- und *p53*-Kontrollsysteme regulieren (Knowles, 2008). In *high-grade* Tumoren auf dem Tis-Entstehungsweg akkumulieren im Zusammenhang mit der genomischen Instabilität multiple genetische Aberrationen und stören Zellzyklusregulation und Apoptose. Dominierende Veränderungen sind inaktivierende (*loss-of-function*) Mutationen der Tumorsuppressorgene *RB1*, *TP53* und *PTEN* (Castillo-Martin et al., 2010) (Niegisch et al., 2010; Schulz, 2006). Charakteristisch für alle Formen des UC ist die Aktivierung der Telomerase, vor allem durch Mutationen im *hTERT* Genpromoter.

1.2 Epigenetische Mechanismen

Die Epigenetik beschäftigt sich mit vererbbaaren Eigenschaften von Zellen oder Organismen, die nicht auf die Veränderung von DNA-Sequenzen zurückzuführen sind. Mechanistisch beruhen solche Phänomene auf Modifikationen der DNA oder assoziierter Proteine, die die Aktivität von Genen regulieren. Epigenetische Modifikationen umfassen DNA-Methylierung, Veränderung der Chromatinstruktur durch Histon-Modifikationen sowie die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch nicht-kodierende RNAs (Harb-de la Rosa et al., 2015; Jeronimo et al., 2014). Diese Mechanismen sind für die Entstehung und Progression von Tumoren von zentraler Bedeutung, da sie wesentlich die zelluläre Differenzierung regulieren (Jones et al., 2007). Auch im UC tragen epigenetische Veränderungen zur Pathogenese bei (Schulz et al., 2015). Die DNA-Hypomethylierung, welche in anderen Tumoren mit der Aktivierung von Onkogenen und genetischer Instabilität in Verbindung gebracht wird, ist im UC stadienübergreifend stark ausgeprägt (Feinberg et al., 2004; Jeronimo et al., 2014; Niegisch et al., 2015). Ebenfalls sind Gene mutiert, die für histonmodifizierende (*UTX/KDM6A*, *CREBBP*) und chromatinremodellierende (*ARID1A*, *CHD6*, *SMARCA4*) epigenetische Regulatoren kodieren. Diese Gene sind im UC deutlich häufiger mutiert als in anderen Tumoren (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Niegisch et al., 2015). Die korrekte Interaktion von Histonmodifikationen und Chromatinremodellierung ist notwendig für die Regulation der Genaktivität, DNA-Replikation, DNA-Reparatur und DNA-Rekombination sowie die Mitose. Bei der Chromatinremodellierung wird durch spezielle Proteinkomplexe die Zugänglichkeit der DNA durch Änderungen der Nukleosomenanordnung und der Chromatinstruktur erleichtert, sodass die DNA für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich wird, oder umgekehrt erschwert wird. Als Nukleosom wird dabei die Einheit aus 147 DNA-Basenpaaren und einem Histonoktamer (je zwei Proteine H2A, H2B, H3 und H4) bezeichnet, um die die DNA gewunden ist. Zusammen bilden die Nukleosomen und weitere angelagerte Proteinkomplexe unter Beteiligung bestimmter RNAs das Chromatin (Swygert et al., 2014). Im Zuge der Histonmodifikation werden vor allem Aminosäuren in den N-terminalen Domänen der Histone durch spezielle Enzyme modifiziert (Niegisch et al., 2015). Diese posttranskriptionellen Veränderungen umfassen u.a. die Methylierung und Acetylierung von Lysinen und die Phosphorylierung von Serinen oder Threoninen (Zentner et al., 2013). Die beteiligten Enzyme werden als Histonacetyltransferasen (HATs) und -

deacetylasen (HDACs), Histonmethyltransferasen (HMTs) und -demethylasen (HDMs), sowie Histonkinasen und -phosphatasen bezeichnet. Zusammen mit anderen Proteinen entscheiden sie darüber, ob eine Chromatinregion für die Bindung von Transkriptionsfaktoren zugänglich ist. Fehlregulationen der Histonmodifikation haben einen bedeutenden Effekt auf die Transkriptionsregulation und sind bereits für viele verschiedene Tumoren, besonders hämatologische Tumore wie MLL (*engl. mixed lineage leukemia*) und AML (*engl. acute myeloid leukemia*), beschrieben (Plass et al., 2013). Führt diese Fehlregulation zu einer verminderten Aktivität von Genen, die für Tumorsuppressoren codieren, kann dies ausschlaggebend für die Karzinogenese sein. Da epigenetische Veränderungen jedoch reversibel sind, bieten die beteiligten Enzyme einen Ansatz für die gezielte pharmakologische Intervention (Yoo et al., 2006a).

1.3 Histondeacetylasen in der Tumorbilogie

1.3.1 Funktion und Klassifikation

Die Acetylierung stellt eine der am besten charakterisierten Histonmodifikationen dar. Sie wird durch HATs und HDACs kontrolliert (Abb. 1.1). Diese greifen durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen in den genetischen Informationsfluss ein, indem sie die Interaktion der negativ geladenen DNA mit den Histonen regulieren und über Strukturänderung des Chromatins die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren ermöglichen bzw. einschränken. Dabei entfernen HDACs die negativ geladene Acetylgruppe vom acetylierten Lysin-Rest, so dass die Bindung an die negativ geladene DNA an Histone verstärkt und die Interaktion mit anderen Faktoren erschwert wird. Umgekehrt bewirken HATs in Verbindung mit Transkriptionsfaktor-assoziierten Multiproteinkomplexen eine Abschwächung der Histon-DNA-Interaktion und begünstigen somit über die Erleichterung der Bindung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression (Marmorstein et al., 2014; Witt et al., 2009).

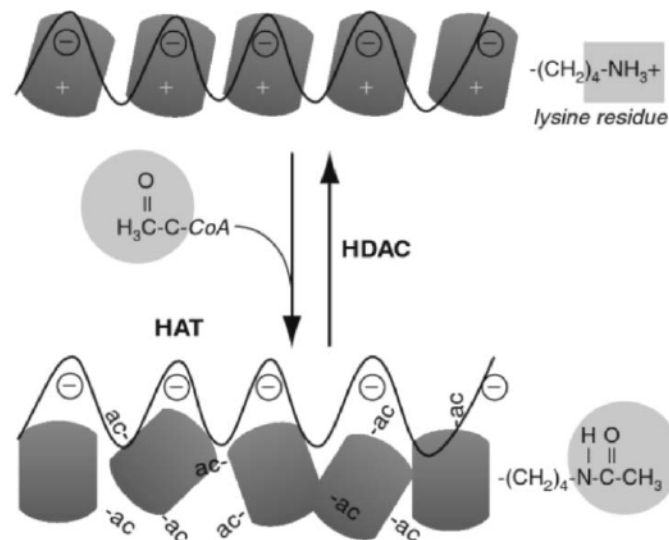


Abbildung 1.1 Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) kontrollieren das Ausmaß der Histonacetylierung. Die Histonproteine innerhalb der Nucleosomen (graue Zylinder) interagieren mit der DNA (schwarze Linie). HATs transferieren Acetylgruppen (graue Kreise) von Acetyl-CoA-Enzymen auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Rests (unterer Teilbereich). Daraus resultiert ein Verlust der positiven Histonladung, sodass die Bindung zur negativ geladenen DNA schwächer wird und die dekondensierte Chromatinstruktur eine Bindung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht. HDACs katalysieren die umgekehrte Reaktion (oberer Teilbereich). Sie entfernen die Acetylgruppe vom acetylierten Lysin-Rest am Histoneende (grauer Kreis), sodass eine positive Ladung entsteht (grauer Box) und die Bindung an die negativ geladene DNA verstärkt wird. Dies führt zu einer Kondensation des Chromatins und zu einer verminderten Transkriptionsrate. Modifiziert nach (Witt, 2011).

Zusätzlich regulieren HDACs eine Vielzahl von zytosolischen und nukleären Nicht-Histon-Proteinen indem sie deren Proteinstabilität, Protein-Protein-Interaktionen, zelluläre Lokalisation und DNA-Bindungsaktivität kontrollieren. Zudem können sie über die Bindung an Ko-Repressoren andere histonmodifizierende Prozesse beeinflussen. Zu ihren Nicht-Histon-Substraten zählen Transkriptionsfaktoren, Aktivatoren wie Repressoren, Nicht-Histon-Chromatin-assoziierte-Proteine und Ko-Aktivatoren nukleärer Rezeptoren (Das et al., 2005). Durch die Gesamtheit dieser Mechanismen sind HDACs in die Modulation zellulärer Schlüsselfunktionen wie Transkription, Apoptose, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Seneszenz und Metabolismus involviert (Barneda-Zahonero et al., 2012; Z. M. Li et al., 2014).

Die 18 bekannten HDACs des Menschen werden in Analogie zu orthologen Hefe-Proteine (Rpd3, Hda1 und Sir2) in vier Klassen (I-IV) eingeteilt (Tab. 9.2 im Anhang). Klasse I (HDAC 1, 2, 3 und 8) und II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 und 10) bilden die „klassischen HDACs“, während die NAD⁺-abhängigen HDACs der Klasse III als Sirtuine (SIRT 1-7) bezeichnet werden. Die Klasse IV (HDAC 11) stellt eine atypische Kategorie dar, die auf Grund ihrer DNA-Sequenzähnlichkeit den klassischen HDACs zugeordnet wird. Sie

enthält, wie die Mitglieder der Klasse I und II, eine Zink-abhängige katalytische Domäne. Abhängig von der zellulären Lokalisation (intranukleär und/oder zytoplasmatisch), der Struktur und der enzymatischen Aktivität üben die Enzyme der verschiedenen Klassen unterschiedliche Funktionen aus. Die Enzyme der Klasse I befinden sich normalerweise im Zellkern und katalysiert dort als Bestandteile von Multiproteinkomplexen die Deacetylierung von Histonen und einer Vielzahl von Nicht-Histon-Substraten wie Transkriptionsfaktoren (E2F1, STAT3, NFκB), metabolische Enzyme (AMPK) und Tumor-assoziierte Gene (*p53*, *RB1*). HDACs der Klasse II befinden sich hingegen auch im Zytoplasma und regulieren dort u.a. strukturelle Proteine (Abs. 1.3.2). Wichtige Funktionen der Sirtuine sind die Regulation des Metabolismus und der Seneszenz (Z. M. Li et al., 2014; Witt et al., 2009). Es wird angenommen, dass HDACs der Klasse I in fast allen Zelltypen exprimiert werden, wohingegen das Expressionsmuster der Klasse II gewebespezifisch ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Klasse II HDACs in Prozesse bei der zellulären Differenzierung und Entwicklung involviert sind (de Ruijter et al., 2003).

1.3.2 Klasse IIa HDACs

1.3.2.1 Einteilung, Struktur und Regulation

Die katalytische Domäne der Klasse II HDACs entspricht dem orthologen *Hdal-Protein* der Hefe. Auf Grund zusätzlicher Domänen ist eine weitere Einteilung in Klasse IIa (HDAC 4, 5, 7 und 9) und IIb (HDAC 6 und 10) möglich. HDACs der Klasse IIa bestehen aus zwei Teilen, einer C-terminalen Deacetylase-Domäne (HDAC-Domäne) und einer N-terminalen Adapter-Domäne. Strukturelle Unterschiede zur Klasse I HDACs betreffen besonders die HDAC-Domäne-Region (Finnin et al., 1999). Die Adapter-Domäne am N-Terminus enthält Bindungsstellen für eine Vielzahl von interagierenden, gewebespezifischen Proteinen wie Transkriptionsfaktoren (MEF2, Runx2/3, GATA1/2, FOXP3, HIF1α), nukleäre Hormonrezeptoren (TR2, LXR), Chromatinproteine (HP1), Proteinkinasen (CaMKI/II, PKD1, ERK1/2) und Proteinphosphatasen (PP2A) sowie nukleäre Importrezeptoren (Importin α). Für viele Transkriptionsfaktoren dienen die Klasse IIa HDACs als Ko-Repressoren (mit N-CoR, SMRT, ARR19) (Martin et al., 2007). Dabei fungiert die Deacetylase-Domäne als Gerüst für die Interaktion mit Multienzymkomplexen (Bottomley et al., 2008; Di Giorgio et al., 2015). Interessanterweise zeigen die Klasse IIa HDACs nur minimale Deacetylase-Aktivität

gegenüber acetylierten Histonen. Bedeutender ist ihre Funktion als Adaptoren für reprimierende Multiproteinkomplexe (Parra, 2015). HDAC4 interagiert beispielsweise über den Korepressor N-CoR/SMRT mit HDAC3 (Klasse I Enzym) und verliert dabei seine enzymatische Aktivität (Fischle et al., 2002). Über die Interaktion mit Multienzymkomplexen wird die Deacetylierungsaktivität der Klasse IIa HDACs auf verschiedene Komplexe vermittelt. Ein Beispiel ist die Interaktion von HDAC4 und HDAC5 mit Heterochromatin Protein 1 (HP1) und einer assoziierten Histon-Methyltransferase (HMTase), aus denen ein Komplex mit Deacetylase/Methyltransferase-Aktivität entsteht. Dieser Prozess könnte die Stilllegung von Promotoren bestimmter Gene aufrechterhalten (C. L. Zhang, McKinsey, & Olson, 2002). Wenn er an Histone gebunden ist, kann dieser Komplex durch Deacetylierung und die anschließende Methylierung von angrenzenden nukleosomalen Histon-Enden zu einem repressiven Chromatinstatus führen. Weiterhin beinhaltet die Adapter-Domäne bestimmte Bereiche, die die zelluläre Lokalisation der HDAC-Proteine selbst regulieren. Sequenzen mit Arginin/Lysin-Resten agieren dabei als autonomes, nukleäres Import-Signal (Martin et al., 2007). Die subzelluläre Lokalisation wird jedoch noch durch weitere Mechanismen beeinflusst. Über posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) und die Bindung verschiedener Proteine wird der nukleäre Export reguliert (Abb. 1.2). Dieser Mechanismus erlaubt eine Signal-abhängige Aktivierung von Zielgenen. Der Wechsel zwischen Nukleus und Zytoplasma wird dabei durch ein nukleäres Lokalisations-Signal kontrolliert. Dabei modulieren Proteinkinasen zusammen mit 14-3-3 Proteinen die Funktion der N-terminalen Adapter-Domäne (NLS) und der C-terminalen nukleären Export-Domäne (NES) (McKinsey et al., 2000). Als Antwort auf intra- und extrazelluläre Signale phosphorylieren bestimmte Kinasen (CaMKs, SIK1, Cardiac Kinase, MARK) regulatorische Serin-Reste in der Adapter-Domäne, sodass die HDACs von ihrem Zielpromotor verdrängt werden. Eine Assoziation mit 14-3-3 Proteinen führt zu einem CMR1-abhängigen nukleären Export, so dass die Expression der Gene möglich wird. Dissoziation der 14-3-3 Proteine und anschließende Dephosphorylierung der HDACs durch Phosphatasen (PP2A, PP1, MYPT) ermöglicht den Importin-vermittelten Import in den Zellkern. Die Existenz multipler Kinasen und Phosphatasen, die mit HDACs der Klasse IIa interagieren, belegt deren zahlreichen, biologischen Funktionen und ihre Einbindung in eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege (Clocchiatti et al., 2011; Martin et al., 2007).

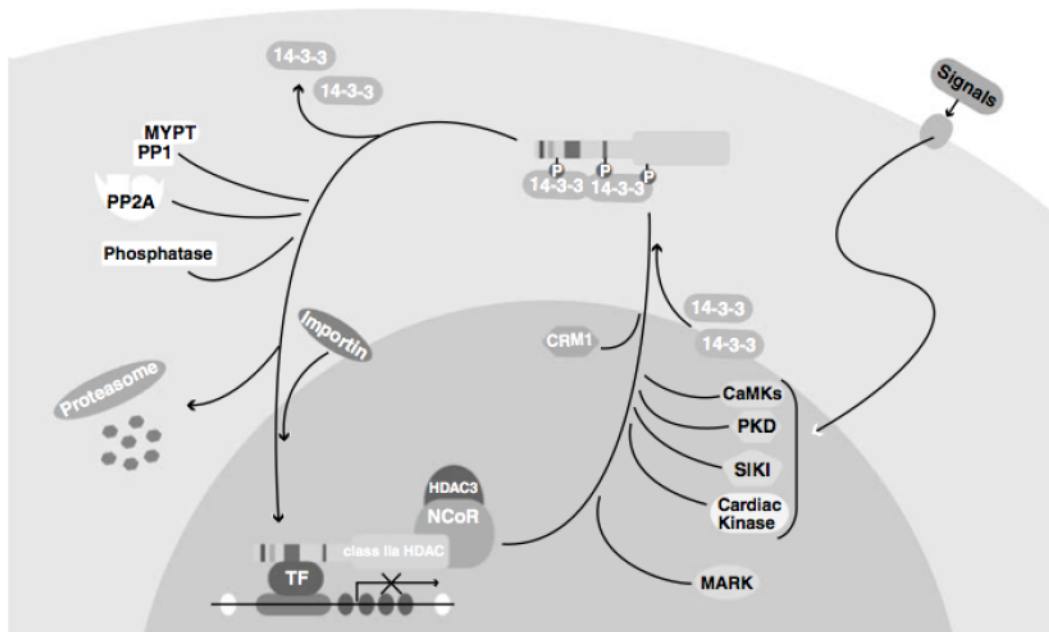


Abbildung 1.2: Regulation der Klasse IIa HDACs (Martin et al., 2007).

1.3.2.2 Funktion und Komplexe der Klasse IIa HDACs

Eine bedeutende Funktion der Klasse IIa HDACs ist die Regulation der Transkription. Dabei wirken sie als Ko-Repressoren im Komplex mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren auf spezifische Promotoren, so dass die Genexpression unterdrückt wird. Zu den sehr früh identifizierten Bindungspartnern zählen MEF2 Transkriptionsfaktoren, welche in eine Vielzahl von Signalwegen involviert sind (Black et al., 1998; Pon et al., 2016). Die MEF2-abhängige Transkription wird durch die Bindung der Klasse IIa HDACs und die Assoziation mit weiteren Ko-Repressoren wie HP1 und CtBP reprimiert (McKinsey et al., 2002; C. L. Zhang et al., 2001). Den Mitgliedern der Runx-Familie (Runx 1-3), die an der Regulation zahlreicher Entwicklungsprozesse der Hämatopoese, Knochenbildung und Immunzell-Differenzierung beteiligt sind, dienen die Klasse IIa HDACs ebenfalls als Ko-Repressoren der Transkription (Martin et al., 2007). Vermutlich findet hierbei eine Bindung über Smad3 und eine direkte Deacetylierung von Runx 2 und 3 statt (Jin et al., 2004; J. S. Kang et al., 2005; Martin et al., 2007). Dies würde eine direkte Behinderung der DNA-Bindungsfähigkeit durch die HDACs bedeuten (Martin et al., 2007). Weitere Transkriptionsfaktoren, die direkt und indirekt durch die Klasse IIa HDACs reprimiert werden, sind GATA- Faktoren und NK-2. Diese sind ebenfalls an der Regulation der zellulären Differenzierung beteiligt.

Eine atypische Funktion stellt die Interaktion mit HIF1 α dar. Die Bindung von HDAC4 und 7 an den Transkriptionsfaktor, welcher die Reaktion der Zelle auf die Sauerstoffversorgung steuert, führt zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivität von HIF1 α . Zudem kann HDAC4 als SUMO Ligase agieren und in Verbindung mit dem Reparaturfaktor 53BP1 als Komponente des DNA-Reparatursystems fungieren (Gregoire et al., 2005; Kao et al., 2003).

In den letzten Jahren wurde beobachtet, dass *microRNAs* eine bedeutende Rolle bei der Translation der Klasse IIa HDACs spielen und diese über Feedback-Mechanismen die Transkription ihrer eigenen, regulierenden *microRNA* kontrollieren können. Interessanterweise weisen *microRNAs*, die HDACs der Klasse IIa als Zielmolekül haben, Tumor-suppressive Eigenschaften auf und sind in bestimmten Tumoren reprimiert (Di Giorgio et al., 2016).

1.3.2.3 Spezielle biologische Funktionen und Auswirkungen auf Tumorzellen

In fast jedem Gewebe kann eine Grundexpression der Klasse IIa HDACs detektiert werden, wobei die Expressionsstärke sehr stark variiert. Typischerweise werden sie verstärkt in Geweben wie Knochen, Herz- und glatter Muskulatur sowie Zellen des Immun- und vaskulären Systems exprimiert. Auch in verschiedenen Tumoren wurden starke Fluktuationen der Klasse IIa Expression beobachtet (Clocchiatti et al., 2011), auch innerhalb der gleichen Tumorart (Clocchiatti, Di Giorgio, Demarchi, et al., 2013).

Die genannten Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren befähigen die Klasse IIa HDACs, direkt und indirekt zahlreiche spezifische biologische Funktionen zu beeinflussen. Die meisten Prozesse beruhen auf der Transkriptionsrepression der MEF2-Familie. Paradoxerweise können gegensätzliche Funktionen in verschiedenen Tumor-Modellen beobachtet werden. So wirken die gleichen Deacetylasen in unterschiedlichen Tumoren entgegengesetzt und üben pro- oder anti-proliferative Effekte aus. Zelltyp-abhängig hat der Expressionsgrad der Klasse IIa HDACs einen unterschiedlichen Einfluss auf die Differenzierungsrichtung und die Wachstumsregulation. In manchen Zelltypen blockiert eine Überexpression von Klasse IIa HDACs Differenzierungsprozesse, in anderen Zellen sind sie bei normaler Expression am Entstehungsprozess der Hypertrophie beteiligt. So hemmen Klasse IIa HDACs während der Muskelentwicklung die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben, wobei die Inhibition der MyoD-Aktivität durch HDAC4 und HDAC5 indirekt durch die

Repression von MEF2 vermittelt wird. Eine Überexpression beider Enzyme führte weiterhin zu einem kompletten Differenzierungsblock (Lu et al., 2000). In einer anderen Studie führte HDAC7 zusammen mit weiteren Ko-Faktoren (CtBP) zu einer Inhibition der MEF2 Aktivität, hatte jedoch keine Auswirkung auf die MyoD- und Myogenin-Aktivität. Ein Zusammenhang zwischen HDAC7 und der Muskeldifferenzierung wird trotzdem vermutet, da HDAC7 bei diesem Prozess aus dem Zellkern ins Zytoplasma transloziert (Dressel et al., 2001). Auch in Herzmuskelzellen integrieren MEF2 Transkriptionsfaktoren verschiedene Signale und regulieren zahlreiche fetale, kardiale Gene. Die gesamte Klasse IIa ist in diesem Gewebe detektierbar. Die HDACs sind hier Substrate von zellulären Stress-Kinasen und reprimieren die MEF2 Aktivität. Ihre Phosphorylierung führt zu einer Reprogrammierung der kardialen Genexpression und resultiert in einer Hypertrophie. HDACs, denen die Phosphorylierungs-Region für die Stress-Kinasen fehlt, inhibieren hingegen die kardiomyozytäre Hypertrophie. Mäuse mit einem Mangel an HDAC9 sind gegenüber hypertrophen Signalen sensitiviert und entwickeln eine stress-abhängige Kardiomegalie (Backs et al., 2006; Vega et al., 2004; C. L. Zhang, McKinsey, Chang, et al., 2002). Im gleichen Sinne führt ein Mangel an HDAC4 in Mäusembryonen zu einer Hypertrophie der Chondrozyten, welche bereits in der pränatalen Phase letal ist. Durch den HDAC4-Mangel fehlt dabei die Repression von MEF2C, welcher als Proliferations-fördernder Faktor in der enchondralen Knochendifferenzierung agiert. Eine HDAC4 Überexpression inhibiert hingegen die Chondrozyten-Proliferation und die Differenzierung (Arnold et al., 2007; Vega et al., 2004).

In Neuroblastomzellen (HT22) und humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK293T) hemmt HDAC4 die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) und die Zellzyklus-Progression. HEK293T Zellen mit HDAC4 Überexpression zeigten ein verlangsamtes Wachstum, was den Autoren zufolge eher durch eine Inhibition der Zellzyklus-Progression als durch einen erhöhten Zelltod bedingt ist. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von HDAC4 beschleunigte die Zellzyklusprogression (Majdzadeh et al., 2008). Anderen Studien zufolge ist HDAC4 an der Repression von Zellzyklus-Promotoren beteiligt. Nach DNA-Schädigung kommt es zu einer p53- und NF-Y-abhängigen Assoziation von HDAC4 mit den Promotoren von G2/M-Genen und zu deren Repression (Basile et al., 2006).

Weiterhin induziert eine Überexpression von HDAC5 Apoptose in zerebellären Neuronen. Diese wird ebenfalls über die MEF2-Inhibition vermittelt (Linseman et al.,

2003). Auch in Sarkomzellen (U2OS), Neuroblastomzellen (SY5Y) und Mammakarzinomzellen (MCF-7) führte eine HDAC5 Überexpression zu verminderter Zellproliferation und spontaner Apoptose (Huang et al., 2002). Die transiente Überexpression von HDAC7 verhindert in Endothelzellen (EC) den Übergang von der G1- zur S-Phase, und vermindert so die Zellproliferation (Clocchiatti et al., 2011).

Andererseits führt eine Herunterregulation von HDAC4 in Karzinomzellen, die kein p53 exprimieren, durch die Störung der Chromatin-Segregation zu einer mitotischen Blockade und Apoptose (Cadot et al., 2009). Über die Repression von p21 führt HDAC4 in Magen- und Kolon-Tumorzellen zu verstärkter Proliferation, eine Stilllegung des Enzyms hemmt hingegen das Wachstum *in vivo* und *in vitro* (Z. H. Kang et al., 2014; Wilson et al., 2008). Auch im hepatozellulären Karzinom vermindert eine Herunterregulation von HDAC4 die Proliferationsrate (J. Zhang et al., 2010).

1.3.3 HDACs in UCCs

Expressionsanalysen auf mRNA- und Protein-Ebene zur HDAC Expression in UCCs und Geweben sind in der Literatur kaum beschrieben (Niegisch et al., 2013); es liegen überwiegend Microarray Daten vor (vgl. Blaveri et al., 2005; Dyrskjot et al., 2004; Dyrskjot et al., 2007; J. S. Lee et al., 2010; Lindgren et al., 2010; Mengual et al., 2009; Modlich et al., 2004; Sanchez-Carbayo et al., 2006). In den vorliegenden Publikationen wird meist eine Überexpression von Klasse I Enzymen in UC-Tumorgewebe sowie UC-Zelllinien beschrieben (Junqueira-Neto et al., 2013; Niegisch et al., 2013; Poyet et al., 2014). Zur Klasse IIa Expression in UCCs liegen noch weniger Daten vor. In Expressionsanalysen von verschiedenen histonmodifizierenden Genen zeigte sich in normalem Blasengewebe wie auch in Blasentumoren eine erhöhte Expression von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 gegenüber Referenzgenen (Ozdogan et al., 2006). Nach den vorausgegangenen Untersuchungen des urologischen Forschungslabors war die HDAC4 und HDAC7 Proteinexpression in normalen urothelialen Zellen höher als in UCCs und die mRNA der Klasse IIa HDACs oftmals vermindert; in 15 von 18 UC-Zelllinien lag eine verminderte Expression von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 mRNA im Vergleich zu normalen uroepithelialen Kontrollen vor (Niegisch et al., 2013). Eine andere publizierte Arbeit berichtete hingegen anhand von immunhistochemischen Färbungen über eine Überexpression von HDAC4 in Blasentumoren, die mit der verminderten Expression des DNA-Reparaturgens XPC einherging (Xu et al., 2011). Eine detaillierte Analyse des Zusammenhangs zwischen Klasse IIa HDACs und der Tumorprogression in UCCs fehlt.

Weil die Klasse IIa HDACs an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt sein können und eine abnorme Expression zur Tumorentwicklung und -Progression beitragen kann, könnten diese Proteine ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie darstellen. Aus diesem Grund wurde im Zuge dieser Arbeit die Wirkung von selektiven Klasse IIa HDACis an UCCs untersucht.

1.4 Histondeacetylase-Inhibitoren

Trotz der Entwicklung neuer antitumoröser Medikamente und deren effektivem Einsatz in der Krebstherapie vereitelt die inhärente oder erworbene Resistenz vieler Tumoren gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und anderen antineoplastisch wirksamen Substanzen den längerfristigen Erfolg der meisten Therapieansätze. Dabei werden epigenetischen Mechanismen eine Schlüsselrolle bei der Resistenzentwicklung zugeschrieben. Auf Grund der vielfältigen Aufgaben während der Regulation der Genexpression wurde die Histonacetylierung in den letzten Jahren als vielversprechendes therapeutisches Ziel erforscht (Hrabeta et al., 2014). Dabei zeigten HDACis sowohl *in vitro* und *in vivo* ein breites antineoplastisches Aktivitätsspektrum bei vergleichsweise geringen Effekten auf normale Zellen (Bolden et al., 2006; Bolden et al., 2013; Johnstone, 2002; Marks et al., 2001). In den letzten Jahren wurden verschiedene, neue HDACis entwickelt, die in klinischen Studien erprobt und bereits für die Behandlung maligner Erkrankung zugelassen sind (Vorinostat, Romidepsin, Belinostat) (Mottamal et al., 2015; Slingerland et al., 2014). Die Ergebnisse verschiedener Studien belegen, dass HDACis in Kombination mit anderen Chemotherapeutika deren antitumoröse Wirksamkeit erhöhen (Hrabeta et al., 2014; Lane et al., 2009). Sie bieten die Möglichkeit, Chemoresistenzen vorzubeugen oder diese umzukehren (Di Giorgio et al., 2015).

1.4.1 Einteilung, Funktion und Wirkmechanismus

HDACis werden anhand ihrer chemischen Struktur in vier Gruppen eingeteilt (Hrabeta et al., 2014; Witt et al., 2009) :

1. Hydroxamsäuren (SAHA (Vorinostat), TSA (Trichostatin A), Belinostat)
2. zyklische Tetrapeptide (Romidepsin)
3. kurzkettige Fettsäuren (VPA (Valproinsäure))
4. Benzamide (Entinostat, Mocetinostat)

Klassische HDACs bestehen aus einer hydrophoben Linker-Region (CU), welche die Zink-Bindungs-Domäne (ZBG) mit der hydrophoben CAP-Domäne verknüpft. Da abhängig von der chemischen Struktur der HDACs die Selektivität und Potenz gegenüber einzelnen HDAC-Isoformen variiert, werden sie in selektive und nicht-selektive Inhibitoren eingeteilt (Di Giorgio et al., 2015). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass leichte Modifikationen der Linker-Region und CAP-Domäne Auswirkungen auf die klassenspezifische Selektivität haben (Bertrand, 2010). Die nicht-selektiven HDACs werden auch als pan-Inhibitoren bezeichnet. Die meisten davon sind Hydroxamsäuren, die sowohl auf Klasse I als auch IIa/IIb Enzyme wirken. Kurzkettige Fettsäuren wirken auf Klasse I und IIa, jedoch nicht gegen Klasse IIb. Zyklische Tetrapeptide und Benzamide wirken bevorzugt gegen die Klasse I (Spiegel et al., 2012). Die hoch konservierte Struktur des katalytischen Zentrums führt dazu, dass die selektive Hemmung einzelner Isoformen kaum möglich ist. Allerdings ist auch die gleichzeitige Inhibition aller HDACs durch die meisten HDACs schwierig zu erreichen. Selbst die Charakterisierung von Isoform-spezifischen Inhibitions-Profilen kann problematisch sein, da sich einerseits die rekombinante Produktion von gereinigten, aktiven Enzymen als schwierig erweist. Andererseits entfalten HDACs ihre volle enzymatische Aktivität als Bestandteile von Multiproteinkomplexen und zusammen mit anderen HDAC-Isoformen, sodass die *in vitro* Aktivität nicht die wahre intrazelluläre Situation widerspiegelt (Witt et al., 2009).

Viele HDACs wirken als Zink-Chelatoren über die reversible oder irreversible Bindung an das Zn^{2+} -Ion im katalytischen Zentrum der HDACs (Codd et al., 2009; de Ruijter et al., 2003; Finnin et al., 1999). Die so ausgelöste Änderung der Acetylierung von Histonen und Nicht-Histon Proteinen führt zur Induktion vielfältiger Prozesse wie Zellzyklusarrest, Differenzierung, Apoptose, Wachstumsinhibition, Immunmodulation und Angiogenesehemmung (Bolden et al., 2013; Marks, 2010; Marks et al., 2009). Beispiele sind in Abbildung 1.3 dargestellt.

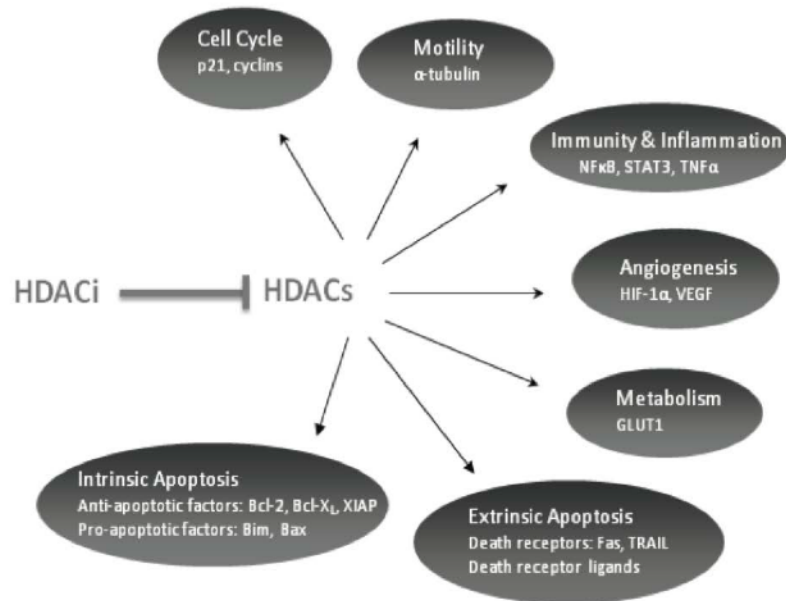


Abbildung 1.3: Mechanismen der HDAC-Inhibition durch HDACis (Hrabeta et al., 2014).

Die dominierenden Mechanismen, die zu antineoplastischen Effekten führen, lassen sich drei verschiedenen Prozessen zuordnen. Erstens führen HDACis zur Änderung des Acetylierungsstatus von Promotern, welche die Genexpression regulieren. Zweitens verhindern sie die Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren und induzieren die Acetylierung von verschiedenen Nicht-Histon-Substraten (Spiegel et al., 2012). Drittens verstärken sie die Acetylierung von Histonen, sodass die strukturellen Chromatin-Änderungen zu einer Transkriptions-Aktivierung oder -Repression führen (de Ruijter et al., 2003; Marks, 2010; Richon et al., 2000). Durch diese Prozesse werden Änderungen der Genexpression ausgelöst, die verschiedene zelluläre Funktionen beeinflussen können. Zum Beispiel führt die Induktion von p21 und die Repression von Cyclinen zu einem Zellzyklusarrest in der G1 und G2 Phase (Yoo et al., 2006b). Durch die Aktivierung verschiedener Kinasen (MAPK, JNK) werden Differenzierung und Zellwachstum moduliert. Ebenfalls werden durch die Hochregulation der Expression von proapoptotischen (Bim, Bmf, Bax, Bak1, Noxa) und Herunterregulation von antiapoptotischen (XIAP, Survivin, c-FLIP, Bcl-w) Proteinen sowohl extrinsische als auch intrinsische apoptotische Signalwege in den Tumorzellen induziert. Die Angiogenese wird durch die Herunterregulation wichtiger Faktoren (VEGF, eNOS, HIF1 α) verringert (Bose et al., 2014; Hrabeta et al., 2014; Marks et al., 2009; Peart et al., 2003). Weiterhin zeigen HDACis variable Effekte auf die Acetylierung von Nicht-Histon-Substraten, einschließlich entscheidender Transkriptionsfaktoren (p53, E2F1, STAT1/3, NF κ B), Tumorsuppressoren, Chaperonen (Hsp90), DNA-Reparaturproteinen, α -Tubulin und

nukleären Rezeptoren (Bolden et al., 2006; Dickinson et al., 2010; Lane et al., 2009; Mottamal et al., 2015; Spiegel et al., 2012). Daneben werden aber auch zunehmend direkte, nicht epigenetische zytotoxische Effekte von HDAC-Inhibitoren beschrieben (Cornago et al., 2014; M. Pinkerneil, Hoffmann, Deenen, et al., 2016).

1.4.2 Wirkung auf Tumorzellen und speziell UC-Zelllinien

Eine gute Einsicht in die molekulare Wirkungsweise der HDACis bietet der pan-Inhibitor Vorinostat (SAHA), welcher bereits für die Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms zugelassen ist (Mann et al., 2007) und auch in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika eine antitumoröse Aktivität gegen solide Tumoren wie das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) zeigt (Codd et al., 2009; Slingerland et al., 2014). Nach Vorinostat-Therapie wurde in murinen und humanen Lungenkrebs-Zelllinien ein Anstieg der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 sowie eine Induktion der Histonacetylierung und Apoptose beobachtet (Ma et al., 2013). Ebenso führte die Substanz in Erythroleukämie-Zellen zu erhöhter Expression von p21 sowie Zellzyklusarrest in der G1-Phase. In einer Vielzahl verschiedener Tumorzelllinien sowie in Tiermodellen konnte eine Wachstumsinhibition bei geringer Zytotoxizität gezeigt werden (L. M. Butler et al., 2002; Marks, 2007; Wagner et al., 2010).

Die beschriebenen epigenetischen Alterationen der HDAC Expression ermöglichen auch in UCCs eine spezifische pharmakologische Intervention. Die Behandlung mit Vorinostat führte zur Induktion eines G2/M-Zellzyklusarrests, einem Anstieg der Sub-G1 Fraktion und des Zellzyklusmarkers p21 sowie einem Abfall von Thymidylat-Synthase. Der Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität unterschied sich innerhalb der Zelllinien (Niegisch et al., 2013). Ebenfalls konnte nach Behandlung eine Akkumulation von acetyliertem Histon H3 und H4 in T24 UCCs beobachtet werden (Richon et al., 2000). Insgesamt ist die Wirksamkeit des Inhibitors bezüglich solider Tumoren, einschließlich des UC, jedoch umstritten. Neben einer hohen Toxizität in Phase I Studien wurde in anderen klinischen Studien eine gute Verträglichkeit der Substanz berichtet (Schneider et al., 2012; Sharma et al., 2013).

Ähnliche molekulare Effekte wie für Vorinostat konnten auch für weitere Inhibitoren gezeigt werden. Eine Inhibition durch TSA wirkte sich in der T24 UC-Zelllinie wie für SAHA- vor allem auf Gene aus, die in Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose und DNA-Synthese involviert sind (Glaser et al., 2003). TSA inhibierte bereits im micromolaren Bereich das Wachstum verschiedener UCCs (Canes et al., 2005). In Kombination mit

Gemcitabin konnte der antitumoröse Effekt auf eine durch Caspasen vermittelte Apoptoseinduktion sowie eine Hemmung der antiapoptotischen NFκB- und Akt-Signalwege zurückgeführt werden (Jeon et al., 2011). Auch VPA führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Vitalität, einem Anstieg der Histon H3 Acetylierung und der p21 Expression (C. L. Chen et al., 2006; Ozawa et al., 2010).

Insgesamt zeigen diese präklinischen Studien, dass auch die Behandlung des UC mit verschiedenen HDACis einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt bieten könnte. Wahrscheinlich auf Grund der unspezifischen Wirkung von pan-Inhibitoren werden bei den meisten HDACis eine Vielzahl an Nebenwirkungen beobachtet. Dazu zählen u.a. Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Fatigue, Gewichtsabnahme, Herzrhythmusstörungen sowie Neutro- und Thrombozytopenie (Z. M. Li et al., 2014; Thurn et al., 2011). Besonders die kardiale Toxizität erweist sich im klinischen Gebrauch als limitierender Faktor (Gryder et al., 2012; Slingerland et al., 2014). Der Grund liegt darin, dass Pan-Inhibitoren globale Änderungen zellulärer Signalwege auslösen und nicht nur Tumorzellen, sondern auch physiologische Funktionen beeinflussen (Balasubramanian et al., 2009). Die Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder der Einsatz selektiverer HDACis könnte die unerwünschten Nebenwirkungen einschränken und die Therapie deutlich effektiver machen (Bieliauskas et al., 2008; Di Giorgio et al., 2015). Dem steht gegenüber, dass Phase I Studien mit selektiven Klasse I Inhibitoren ähnliche klinische Effekte wie pan-Inhibitoren erbrachten (Witt et al., 2009). Außerdem ist die Erforschung der Funktion einzelner HDAC-Isoformen in biologischen Prozessen und der Entwicklung maligner Erkrankungen durch die pan-Selektivität der meisten HDACis kaum möglich (Bieliauskas et al., 2008). Um die Nebenwirkungen von selektiven Klasse I und pan-Inhibitoren zu umgehen und um die Bedeutung der Klasse IIa HDACs in karzinogenen Prozessen zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren vermehrt selektive Klasse IIa HDACis entwickelt.

1.4.3 Selektive Klasse IIa HDAC-Inhibitoren

In HDAC Proteinen können drei verschiedene Ansatzpunkte für die selektive Klasse IIa Inhibition genutzt werden: die katalytische Domäne mit dem Zn²⁺-Ion als Zielmolekül, das nukleäre/ zytoplasmatische Shuttling und die N-terminale Adapter-Domäne für die Bindung verschiedener Interaktionspartner. Zelluläre Effekte verschiedener, selektiver Klasse IIa Inhibitoren wurden bereits in einigen Publikationen beschrieben (Di Giorgio et al., 2015). Dabei besaßen die Inhibitoren unterschiedliche Selektivitäts-Profile gegen

die jeweiligen Klasse IIa Isoformen und unterschieden sich in den oben genannten Inhibitionsmechanismen. Für einige Inhibitoren konnte eine verminderte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu den Klasse I Inhibitoren sowie zytostatische Effekte in unterschiedlichen Tumorzelllinien gezeigt werden (Mai et al., 2005; Venza et al., 2013). Dabei soll der antiproliferative Effekt durch die Induktion von p21^{Cip1} ausgelöst werden, welches zu einem Block in der G1-Phase des Zellzyklus führt (Duong et al., 2008). Ein Inhibitor des nukleären/zytoplasmatischen Shuttlings führte zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von HDAC4 und gleichzeitig zu einer Erhöhung von acetyliertem Histon H3 und Tubulin (Kong et al., 2011). Ebenfalls wurde beschrieben, dass durch die selektive Inhibition der HDAC4-MEF2D Komplex stabilisiert wird und in einigen Zellen eine verminderte Expression MEF2-abhängiger Gene im Vergleich zur SAHA Behandlung stattfindet (Clocchiatti, Di Giorgio, Ingrao, et al., 2013; Nebbioso et al., 2009).

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren LMK163 (16e), LMK214 (16f), LMK 225 (19e), LMK233 (19h) und LMK235 (19i) wurden freundlicherweise von der AG Kurz (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Sie gehören zu einer neuen Klasse potenter Hydroxamsäure-basierter HDACis, bei denen die CAP Gruppe und die CU Linker-Region modifiziert und mit anderen Zink-Bindungs-Domänen (ZBGs) verknüpft wurde. Diese Strukturmodifikation hat Auswirkungen auf die Spezifität und die Potenz der Inhibitoren. Die biologische Evaluation der Substanzen erfolgte an den Tumor- und Nicht-Tumorzelllinien A2780 (Humane Ovarialkarzinom-Zelllinie), MDA-MB-231 (Trippelnegative Mammakarzinom-Zelllinie), Cal27 (Humane Zungen-Zelllinie), Kyse510 (Humane Oesophagus-Zelllinie) und deren Cisplatin-resistenten Formen. Die Daten wurden in der Publikation von Marek et al. (2013) veröffentlicht. 19i wies die höchste HDAC-inhibitorische und zytotoxische Aktivität auf (IC₅₀ 0,49 µM (A2780); 0,32 µM (A2780 CisR)). Die wirksamen Konzentrationen waren sogar geringer als die der Referenzsubstanz Vorinostat (IC₅₀ 2,42 µM (A2780); 3,12 µM (A2780 CisR)). Daten bezüglich der zytotoxischen Wirkung auf UCCs wurden nicht erhoben. Die drei effektivsten Substanzen 19e, 19h und 19i zeigten nach den Daten aus dem Jahr 2013 im HDAC-Isoform-Assay im geringen nanomolaren Bereich eine verstärkte Aktivität gegen HDAC4, 5 und 6. Die Spezifität gegen diese Isoformen wurde mit der neuen CU *Linker*-Region in Verbindung gebracht. Interessanterweise erhöhte die Kombination von Cisplatin und 19i die Sensitivität von Cisplatin-resistenten Zelllinien und zeigte stärkere

Effekte als die Kombination mit Vorinostat (Di Giorgio et al., 2015; Marek et al., 2013). LMK214 hat hingegen eine erhöhte Aktivität gegen HDAC6 (IC_{50} 37,4 nM; unveröffentlichte Daten). Für LMK163 liegt kein Isoformen-Profil vor. Erneute Analysen bezüglich der Spezifität des Inhibitors 19i im Jahr 2017 ergaben jedoch eines zum Ausgangsprofil verändertes Wirkspektrum mit vorrangiger Aktivität gegen die HDAC Isoformen 1, 2 und 3 sowie 6 und 10 (s. Diskussion, Abs. 5.1). Eine Aktivität gegen HDAC4 konnte nicht nachgewiesen werden. Die neuen IC_{50} -Daten für HDACs verschiedener Klassen sind in Tabelle 9.3 im Anhang zu finden.

1.5 Zielsetzung

Die Auswirkung und Bedeutung der Expression von Klasse IIa HDACs in Tumorzellen generell sowie speziell für das UC sind bis heute kaum untersucht. Zudem sind die Daten bezüglich der Expression sehr heterogen. Vorarbeiten aus dem urologischen Forschungslabor deuten eher auf eine verminderte Expression der Klasse IIa in einem Großteil der UCCs (Niegisch et al., 2013). Die vorliegende Arbeit hat sich daher mit der Frage beschäftigt, ob eine Inhibition dieser Klasse einen sinnvollen Ansatz für die Therapie des UC darstellt. Es ist denkbar, dass eine selektive Inhibition der Klasse IIa auf die Tumorzellen keine Wirkungen ausübt. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Hemmung der Restaktivität von Klasse IIa HDACs für die Tumorzellen letal ist.

Daher wurde zum einen überprüft, welche molekularen Effekte eine pharmakologische Inhibition mit den neuen Hydroxamsäure-Inhibitoren 19e, 19h und 19i in UCCs auslöst. Diese hemmen laut der Erstpublikation in geringen Konzentrationen vorrangig Klasse IIa HDACs (Marek et al., 2013). Für die UCCs wurden die Zelllinien VM-CUB1, 639-V und UM-UC-3 ausgewählt, welche eine im Vergleich zur urothelialen Primärkultur erniedrigte, unveränderte und erhöhte Klasse IIa HDAC Expression repräsentieren. Durch die Auswahl dieser drei Zelllinien wurde zudem die starke Heterogenität des UCs berücksichtigt. Weiterhin wurden die benigne urotheliale Kontrollzelllinie HBLAK und die immortalisierte embryonale Nierenzelle HEK293 mitgeführt, um die Spezifität der Inhibitoren für die Tumorzellen zu sichern.

Nach der Behandlung wurden zelluläre Parameter wie Vitalität, Koloniebildungsfähigkeit, Zellzyklus, Caspase 3/7-Aktivität, Seneszenz und nukleäre Morphologie analysiert. Diese Parameter geben Aufschluss darüber, ob die verwendeten Inhibitoren u.a. das Wachstum der UCCs einschränken und welcher der drei Inhibitoren die stärkste inhibitorische Aktivität aufweist. Weiterhin wurden für den am stärksten wirkenden Inhibitor molekulare Folgen der Inhibition auf die mRNA-Expression der Klasse IIa HDACs sowie Marker-Proteine untersucht. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob eine Vitalitätseinschränkung der UCCs auf die postulierte Klasse IIa Inhibition oder die Inhibition anderer Enzymklassen zurückzuführen ist und inwiefern sich die Effekte der angestrebten „selektiven Inhibition“ von denen einer pan-Inhibition unterscheiden. Schließlich lässt sich auf diese Weise feststellen, ob unter der Behandlung kompensatorische Mechanismen oder Kreuzregulationen zwischen den verschiedenen HDAC Isoformen bzw. Enzymklassen auftreten.

Um Einblicke in die Funktion von Klasse IIa HDACs im UC zu erhalten, wurden zum anderen analoge Versuche mit stabil transduzierten UC-Zellvarianten mit einer Überexpression von HDAC4 - sowie von HDAC1 - durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem Leervektor transduziert wurden. Diese Experimente sollten bei der Beantwortung der Frage helfen, ob HDAC4 ein wesentliches Zielmolekül der verwendeten Klasse IIa Inhibitoren ist und welche funktionellen Konsequenzen eine Herunterregulation dieser Enzymgruppe im UC hat. Eine Überexpression des Zielproteins HDAC4 ermöglicht ferner die Analyse der molekularen Auswirkungen von HDAC4 auf die Tumorzellen. In ähnlicher Weise wie oben beschrieben wurden dabei die zellulären und molekularen Auswirkungen der Überexpression von HDAC4 verfolgt.

In einem abschließenden Teil wurden weitere, neu synthetisierte HDACis initial charakterisiert. Dazu wurden die Substanzen LMK163 (16e) und LMK214 (16f) verwendet und wiederum funktionelle Veränderungen auf die Viabilität, den Zellzyklus und die Caspase 3/7-Aktivität untersucht. Das Ziel war, die Substanz mit der höchsten tumorspezifischen zytotoxischen Aktivität zu selektieren, um basierend auf diesen Daten weitere *in-vitro*-Aktivitäts- und Spezifitätsassays durchführen zu können. Zusammengefasst können diese Daten zur Erstellung eines HDAC-Profiles dieser Substanzen genutzt werden.

2 Material

2.1.1 Zelllinien

Die im urologischen Forschungslabor kultivierten UCCs wurden von Prof. M.A. Knowles (ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds UK) und Dr. J. Fogh (Sloan-Kettering Cancer Research Center, Rye, New York USA) zur Verfügung gestellt und deren Identität im Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels *STR-Profiling* überprüft. Ein anderer Teil wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen. Urotheliale Primärzellen (UPs) wurden aus Harnleitern von Nephrektomien gewonnen. Die Zelllinie HEK293 wurde von Prof. Kolb-Bachofen von der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Forschungsgruppe Immunbiologie) zur Verfügung gestellt; die Telomerase-immortalisierte Zelllinie TERT-NHUC von Prof. M. A. Knowles. Die humane urotheliale Zelllinie HBLAK wurde von CELLnTEC (Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Studiennummer der Ethikkommission: 1788

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Urothelkarzinom-Zelllinien und Kontrollzellen. Ersichtlich sind Geschlecht und Alter der Patienten (M: männlich; F: weiblich), Tumorgrad, Tumorstadium sowie Referenz, Ursprung und Besonderheit.

<u>Zelllinie</u>	<u>Geschlecht, Alter [Jahre]</u>	<u>TNM/Grading</u>	<u>Referenz</u>
<u>Urothelkarzinom</u>			
253J	M, 53	T4, G4	Elliott et al. 1974
5637	M, 68	G2	Fogh 1978
639-V	M; 69	G3	Elliott et al. 1976
BFTC-905	F, 51	Ta, G3	Tzeng et al. 1996
HT-1376	F, 58	T2, G3	Rasheed et al. 1977
J82	M, 58	TCC	O'Toole et al. 1978
RT-112	F	G2	Masters et al. 1986
SW-1710	F, 84	G3	Kyriazis et al. 1984
T24	F, 81	G3	Bubenik et al. 1973
UM-UC-3	M	TCC	Grossmann et al. 1986
UM-UC-6	M	TCC	Grossmann et al. 1986
VM-CUB1	M	TCC	Williams et al. 1980
<u>Zelllinie</u>	<u>Alter</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Besonderheit und Referenz</u>
HBLAK	M, 80	Blase	Hoffmann et al. 2016
HEK293	Fötus	Niere	Transformiert mit Adenovirus 5 DNA; Stepanenko et al., 2015
TERT-NHUC	-	Urothel	Telomerase-immortalisiert; Chapman et al. 2006

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

<u>Chemikalien/Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
10x Tris/Glycin/SDS Puffer	Biorad
Aceton	VWR Chemicals
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	Sigma
<i>Caspase-Glo® 3/7</i> Reagenz	Promega
<i>CellTiter-Glo®</i> Reagenz	Promega
Citronensäure ($C_6H_8O_7$)	Merck
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	GIBCO
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DOC (Desoxycholsäure Natriumsalz)	Sigma
EDTA	Merck
Ethanol	Merck
Farblösung Working Reagent (Reagenz A und B)	Thermo Scientific
FCS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)	Biochrom AG
Formaldehyd	Merck
<i>gDNA Wipeout Puffer</i>	Qiagen
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck
Glutamax (stabilisiertes Glutamin)	GIBCO
Glycin ($C_2H_5NO_2$)	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat(II) ($K_4Fe(CN)_6$)	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat(III) ($K_3Fe(CN)_6$)	Merck
Lämmli Puffer	Biorad
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
<i>Mounting Medium</i>	Dako
MTT Reagenz	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$)	Merck

<u>Chemikalien/Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
NP-40	Merck
<i>Page-Ruler™ Prestained Protein Marker</i>	Thermo Scientific
PBS (Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung)	Biochrom AG
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	GIBCO
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma
PI (Propidiumiodid)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Puromycin	Invitrogen
Rhodamin-Phalloidin-Stock	Thermo Scientific
RLT-Puffer (β-Mercaptoethanol)	Qiagen
RNase-freies Wasser (Aqua ad injectabili)	DeltaSelect
RPE Puffer	Qiagen
RT Primer Mix	Qiagen
RT Puffer	Qiagen
RW1 Puffer	Qiagen
SAHA	Cayman
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
SDS Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
<i>SYBRGreen</i>	Qiagen
Trichloressigsäure (100%)	Merck
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin-/EDTA-Lösung	Life Technologies
Tween-20	Sigma
<i>Whatman Paper</i>	Whatman
X-Gal -Färbelösung	Peqlab
β-Mercaptoethanol	Sigma

Die Verbrauchskemikalien wurden von Merck und Sigma käuflich erworben.

Die HDACis LMK225 (19e), LMK233 (19h), LMK235 (19i), LMK163 und LMK214 wurden freundlicherweise von der AG Prof. Dr. Kurz (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.3: *Molekularbiologische Kits.*

<u>Kits</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fischer Scientific
<i>ECL™ Western Blotting Detection Kit</i>	Thermo Fischer Scientific
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen
<i>QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen
<i>QIAshredder</i>	Qiagen
<i>CellTiter-Glo® Cell Viability Luminescent</i>	Promega
<i>Caspase-Glo® 3/7</i>	Promega
<i>WesternBright Quantum</i>	Biozym
<i>Super Signal West Femto</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>ZR Plasmid Miniprep™- Classic Kit</i>	Zymo Research
<i>Fast Digest Puffer</i>	Fermentas
<i>Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen
<i>X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent</i>	Roche

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Puffer und Lösung für die Zellzyklus-Analyse

Tabelle 2.4: *Puffer und Lösungen für die Zellzyklus-Analyse.*

<u>Puffer</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>Nicoletti-Puffer</u>	
Triton X100	0,1%
Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$)	0,1%
Propidiumiodid dest. H_2O	50 µg/ml
<u>Propidiumiodid-Lösung</u>	2 µg/ml Propidiumiodid in PBS

2.1.3.2 Puffer und Lösungen für Zytochemie

Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen für Zytochemie.

<u>Puffer</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>Fixierlösung</u>	
Formaldehyd ad dest. H ₂ O	4%
<u>Permeabilisierlösung</u>	
Triton X100 ad PBS	0,5%
<u>Blockierlösung</u>	
BSA ad PBS	1%

2.1.3.3 Puffer und Lösungen für SA-β-Galaktosidase Assay

Tabelle 2.6: Puffer und Lösungen für SA-β-Galaktosidase Assay.

<u>Puffer</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>Citrat-/ Phosphatpuffer</u>	
Na ₂ HPO ₄	200 mM
C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	100 nM
*pH 6 einstellen	
<u>Fixativ</u>	
Formaldehyd 37%	2%
Glutaraldehyd	0,2%
ad PBS	
<u>X-Gal Färbelösung</u>	
NaCl	150 mM
MgCl ₂	2 mM
K ₃ Fe(CN) ₆	5 mM
K ₄ Fe(CN) ₆	5 mM
X-Gal	1 mg/ml
ad Citrat-/ Posphatpuffer	

2.1.3.4 Puffer und Lösungen für RNA- und Western Blot Analysen

Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen für RNA Analysen.

<u>Puffer und Lösungen</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>Protein Lysis Puffer RIPA</u>	
NaCl 5 M	150 mM
NP-40	1%
DOC	0.5%
SDS 10%	0.1%
EDTA 0.5 M	1 mM
Tris pH 7,6 1 M	50 mM
ad dest. H ₂ O	
*frischen Protease Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail je 10 µl/1 ml RIPA zugeben	
<u>Mastermix Reverse Transkription</u>	
Reverse Transkription Master-Mix	1x
RT-Puffer	4x
RT-Primer Mix	1x

Tabelle 2.8: Puffer und Gele für Western Blot Analysen.

<u>Puffer und Gele</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>5x Blotting Puffer</u>	
Tris	0.28 M
Glycin	0.5 M
<u>1x Blotting Puffer</u>	
Transfer Puffer 5x Stocklösung	1x
Methanol	10%
<u>Elektrophorese Puffer</u>	
10x Tris/Glycine/SDS	1x
<u>10x TBS</u> * pH 7.6 mit HCl einstellen	
Tris	0.5 M
NaCl	1.5 M

<u>Puffer und Gele</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>TBST (Waschpuffer)</u>	ad dest. H ₂ O
10x TBS Puffer	1x
Tween 20	0.1%
<u>6 x Laemmli-Puffer</u>	
Tris pH 6,8	350 mM
SDS	350 mM
Glycerol	30%
DTT	3,3%
Bromphenolblau	1,2 mg
<u>Blockier-Lösung</u>	
Milchpulver ad TBST	5%
Milchpulver ad TBST	1%
<u>milder Stripping Puffer</u>	ad dest. H ₂ O
Glycin	1.5%
SDS 10% Lösung	0.1%
Tween 20	1%
<u>Trenngel</u>	
H ₂ O	
PAA	30%
Tris pH 8,8	1,5 M
SDS	10%
APS	10%
ad TEMED	
<u>Sammelgel</u>	
H ₂ O	
PAA	30%
Tris pH 6,8	1 M
SDS	10%
APS	10%
ad TEMED	

2.1.3.5 Puffer für Histonextraktion

Tabelle 2.9: Puffer für Histonextraktion.

<u>Puffer</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>Hypotoner Lysepuffer</u>	
Tris-Cl pH 8,0	10 mM
KCl	1 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DTT (Dithiothreitol)	1 mM
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	1 mM
Protease- und Phosphatase Inhibitor Cocktail	

2.1.4 Plasmide

Tabelle 2.10: Plasmide.

<u>Plasmide</u>	<u>Hersteller und Katalog-Nummer</u>
pcDNA-HDAC1-FLAG	Addgene Plasmid; #13820
pcDNA-HDAC4-FLAG	Addgene Plasmid; #30485

2.1.5 Antikörper und Enzyme

2.1.5.1 Antikörper Western Blot

Tabelle 2.11: Übersicht primäre und sekundäre Antikörper.

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Blocking-Verfahren</u>	<u>Herkunft</u>
Histon H3	1:2000	5% Milchpulver	Active Motif
Histon H4	1:2000	1% Milchpulver	Active Motif
Gesamt Histon H3	1:1000	5% Milchpulver	Cell Signaling Technology
<i>Cleaved</i> PARP	1:1000	5% Milchpulver	Cell Signaling Technology
<i>Cleaved</i> Caspase 3	1:1000	1% Milchpulver	Cell Signaling Technology
Acetyliertes α -Tubulin	1:15000	5% Milchpulver	Sigma Aldrich
p21	1:1000	5% Milchpulver	Santa Cruz Biotechnology
HDAC4	1:500	5% Milchpulver	Santa Cruz Biotechnology
<u>Sekundär-Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Blocking-Verfahren</u>	<u>Herkunft</u>
<i>Goat-anti-Rabbit</i>	1:1000	1% Milchpulver	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat-anti-Mouse</i>	1:5000	1% Milchpulver	Santa Cruz Biotechnology

2.1.5.2 Enzyme

Tabelle 2.12: Übersicht der verwendeten Enzyme.

<u>Enzyme</u>	<u>Hersteller</u>
Quantiscript Reverse Transkriptase	Qiagen

2.1.6 Oligonukleotid-Primer

Tabelle 2.13: Übersicht der Primer für die qRT-PCR. DNA Sequenzen, Anlagerungs-Temperatur und Produktgröße sind in der nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Fw= Forward, Rv= Reverse.

<u>GEN</u>		<u>DNA Sequenz 5'-3'</u>	<u>Ann.T.</u>	<u>Produkt</u>	<u>Herkunft</u>
<u>(Transkript)</u>			<u>[°C]</u>	<u>[bp]</u>	
p21	Fw	GGAAGACCATGTGGACCTGT	55	146	Eurofins
	Rv	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA			
TS	Fw	ATCACGGGCCTGAAGCCA	57	102	Eurofins
	Rv	GGGTTCTCGCTGAAGCTGAATT			
TBP	Fw	ACAACAGCCTGCCACCTTA	55	119	Eurofins
	Rv	GAATAGGCTGTGGGGTCAGT			
HDAC4		Exon12/13	55	86	Qiagen QuantiTect Assay
HDAC5	Fw	ATGTCAGGTCGGGAACCATC	56	108	Eurofins
	Rv	GGAAGTGGGCATGGCTCTT			
HDAC7		Exon15/16/17	55	121	Qiagen QuantiTect Assay
HDAC9	Fw	AAGTAGAGAGGCATCGCAGAGA	56	133	Eurofins
	Rv	TTCGTTGCTGATTTACTCAGTAGG			

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.14: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Herkunft</u>
Zellkultur	
Pasteurpipetten	Brand
Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner bio-one
Zellkulturschalen (6 cm)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-,24-,6-Well)	Greiner bio-one
Cryotube	Thermo-Scientific
Cell Scraper	Sarstedt
Graduated Tip	Starlab
Western Blot	
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Herkunft</u>
<i>Whatman Paper</i>	Whatman
qRT-PCR	
<i>MicroAmp®Fast Optical 96-Well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems
<i>Light Cyclers Capillaries</i>	Roche
<i>RNeasy Mini spin column</i>	Qiagen
<i>MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems
<i>MicroAmp™ optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems
Sonstiges	
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Polystyren-Reagenzglas mit Rundboden	BD Biosciences
<i>Safe-Lock Tubes</i> (0,5 ml-2 ml)	Eppendorf
<i>Cover Glass</i>	VWR
Objektträger	Engelbrecht
<i>Micro-touch NitraTex®</i>	Ansell

2.1.8 Geräte

Tabelle 2.15: Übersicht der Geräte.

<u>Geräte</u>	<u>Herkunft</u>
qPCR	
<i>T3 Thermocycler</i>	Biometra
<i>Trio-Thermoblock™</i>	Biometra
<i>LightCycler® 96</i>	Roche
Western Blot	
Gelelektrophoresekammer	Biometra
Tube Roller	Benchmark
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Zellzyklus-Analyse	
<i>MACSQuant Analyzer</i>	Miltenyi Biotec
Caspase-Glo/ CellTiter-Glo	
<i>Wallac Victor 2- Multilabel Counter</i>	Marshall Scientific

<u>Geräte</u>	<u>Herkunft</u>
Schüttler	
<i>KS250basic</i>	IKA-Labortechnik
Zentrifugen	
5418	Eppendorf
5810	Eppendorf
<i>Minispin</i>	Eppendorf
Allegra™ 2IR	Beckmann Coulter
Allegra™ GS-15R	Beckmann Coulter
Mikroskop	
<i>Eclipse TE2000-S</i>	Nikon
<i>Eclipse E400</i>	Nikon
Scanner	
Li-Cor Scanner	C-Digit
CanoScan 4400F	Canon
Brutschrank	
<i>CO₂-AUTO-ZERO</i>	Heraeus
Heracell™ 150i	Thermo Scientific
Absorptionsmessung	
<i>ELISA Easy Reader EAR 400 AT</i>	SLT-Labinstruments Austria
<i>ELISA-Lesegeräte FLUOstar OPTIMA</i>	BMG
<i>Nanodrop</i>	Peqlab (Thermo Scientific)
Sonstiges	
Vortexer	Neolab
Pipetus®	Hirschmann
Pipetten	Eppendorf; Gilson
Heizschrank	Heraeus

2.1.9 Software und Datenbanken

Tabelle 2.16: Übersicht der verwendeten Softwares und Datenbanken.

<u>Software</u>
<i>Origin 8.0 (Origin Lab Corporation)</i>
<i>MACS Quant Software</i>
<i>NIS-Elements Software</i>
<i>Microsoft Word Software 2011</i>
<i>Microsoft Excel Software 2011</i>
<u>Datenbanken</u>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Urothelkarzinom-Zelllinien und Kontroll-Zellen

3.1.1 Medien und Zusätze

Für die Kultivierung der UCCs und HEK293 wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Glutamax (stabilisiertes Glutamin), 10% FCS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1% Pen/Strep) verwendet. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. DMEM enthält neben wachstumsfördernden Nährstoffe wie Glucose, Aminosäuren, Vitaminen und anorganischen Salzen auch den Indikator Phenolrot (Umschlagsbereich: pH-Wert 6,4-8,2). Das aus dem Blut von Rinderföten gewonnene FCS enthält Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum fördern.

3.1.2 Kultivierung von humanen Urothelkarzinom-Zelllinien

Die UCCs wurden in 75cm²-Kulturflaschen mit 12 ml Medium kultiviert und alle zwei bis vier Tage passagiert. Hierfür wurde das alte Medium mit einer Pipette abgesaugt, die Zellen mit 8 ml sterilem PBS gewaschen und durch die Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,02%) bei 37 °C vom Flaschenboden gelöst. Diese Reaktion wurde nach ca. 2 min durch die Zugabe von 8 ml frischem Medium abgestoppt und die Zellen gründlich resuspendiert, bevor ein Teil der Zellsuspension in einer Verdünnung von 1:10 in eine neue Kulturflasche mit 12 ml vorgelegtem Medium überführt wurde.

Zur langfristigen Lagerung in Form von Gefrierkulturen wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert, bevor der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml eiskaltem Kryomedium (FCS mit 10% DMSO) versetzt wurde. Nach einer gründlichen Resuspension und Überführung in ein Kryoröhrchen wurden die Zellen zunächst 24 h bei -20 °C und dann 4 Tage bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurden die Gefrierkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Verwendung wurden die Zellen bei RT aufgetaut und direkt in 5 ml Medium überführt, bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet erneut in 6 ml frischem Medium aufgenommen und die Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wird genutzt, um eine bestimmte Zellzahl pro Well auszusäen. Hierfür wurde eine Zellsuspension in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und 10 μl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mit Hilfe des Mikroskops wurden die Zellen in vier Quadranten ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahl gebildet. Da das Quadrantenvolumen 0,1 μl beträgt, wurde der Mittelwert mit dem Volumenfaktor $1,0 \times 10^4$ multipliziert, so dass man die Zellzahl pro ml Medium erhält.

3.1.4 Aussäen im Well-Format

Das aus der Zellzählung berechnete Volumen an Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit frischem Medium aufgefüllt, um die gewünschte Anzahl an Zellen in dem benötigten Aussaatvolumen zu erhalten. Die Zellen wurden anschließend in verschiedenen Mehrfach-Well-Platten ausgesät (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Aussaat-Schema für die einzelnen Well-Formate. Die Kultivierung der Zellen für die einzelnen Versuche wurde einheitlich anhand dieses Schemas vollzogen.

Platte	Zellzahl/ Well	Aussaatvolumen [μl]	Behandlungsvolumen [μl]
96-Well	2.000	50	50
24-Well	10.000	500	500
6-Well	50.000	2000	2000

Auf Grund der ähnlichen Proliferationsgeschwindigkeit wurde für alle Zelllinien die gleiche Zellzahl pro Well verwendet. Nach dem Aussäen wurden die Zellen 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert, bevor sie behandelt wurden.

3.2 Behandlung mit HDAC-Inhibitoren

Für eine bessere Löslichkeit der Inhibitoren in DMEM wurden die Substanzen zunächst in 100% DMSO gelöst. Wegen der zytotoxischen Wirkung von DMSO wurde zur Kultivierung der Zellen eine Konzentration von einheitlich 0,1% verwendet. In einer Verdünnungsreihe wurden je nach Inhibitor verschiedene Stammkonzentrationen von 0,2-20 mM hergestellt, die mit DMEM im Verhältnis 1:1000 bzw. 1:2000 gemischt wurden, so dass folgende Endkonzentrationen entstanden (Tab. 3.2):

Tabelle 3.2: Inhibitor-Endkonzentrationen für die Behandlung der UC-Zelllinien.

Inhibitor	Inhibitor-Endkonzentration [μM]										
LMK235 (19i)	0,1	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	5	10
LMK233 (19h)	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2	3	3,5	4	5	10
LMK225 (19e)											
LMK163 (16e)											
LMK214 (16f)											

Für das mutmaßliche Stoffwechselprodukt LMK235-COOH wurden Endkonzentrationen von 20 μM bis 1 mM verwendet. Die am Vortag ausgesäten Zellen wurden mit der Inkubationslösung behandelt und 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Für die verschiedenen Well-Formate wurden unterschiedliche Behandlungsvolumina eingesetzt (Tab. 3.1). Auf die 96-Well-Platten wurde das gleiche Volumen an Inkubationslösung (Verhältnis 1:1000) zum bereits vorhandenen Aussaatvolumen hinzugegeben. Aus den 6- und 24-Well-Platten wurde zunächst das Aussaat-Medium abgesaugt, bevor die Zellen mit der Inkubationslösung (Verhältnis 1:2000) behandelt wurden.

3.3 Herstellung von HDAC4 und HDAC1 überexprimierenden UC-Zellvarianten sowie Kontroll-Vektor Zellvarianten

Die in dieser Arbeit verwendeten, stabil transduzierten Zellvarianten der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression sowie die Kontroll-Vektor Zellen wurden von Constanze Wiek (Constanze Wiek, 2011) (Forschungslabor der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) sowie Maria Pinkerneil (Urologisches Forschungslabor, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung HDAC4 überexprimierender Zelllinien wurde HDAC4-cDNA aus dem pcDNA-HDAC4-FLAG Plasmid in den lentiviralen Vektor puc2CL12IPwo nach Standardverfahren kloniert, sodass der Vektor puc2CL12IPwo-HDAC4-FLAG erzeugt wurde. Ausgehend vom pcDNA-HDAC1-FLAG Plasmid wurde das identische Verfahren zur Herstellung HDAC1 überexprimierender Zelllinien angewandt. Die Integrität der HDAC4-kodierenden Sequenz im Vektor wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Die Lentivirus-Produktion und Zelltransduktion erfolgte anhand eines Protokolls, welches ausführlich in Publikationen unserer Kooperationspartner beschrieben ist (Schmidt et al., 2015; C. Wiek et al., 2015). Dabei wurden für die Herstellung

replikations-defizienter Lentiviren HEK-293T-Zellen mit einem Helfer-Plasmid (pCD/NL-BH (X. Y. Zhang et al., 2004)), einem Hüllvektor (pczVSV-G (Pietschmann et al., 1999)) und den Vektor-Plasmiden puc2CL12IPwo, puc2CL12IPwo-HDAC1-FLAG oder puc2CL12IPwo-HDAC4-FLAG transfiziert. Virale Partikel wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und zur Transduktion von VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen verwendet. 24 h nach der Transduktion wurde der Überstand entfernt und die transduzierten Zellen mit 4 µg/ml (VM-CUB1) oder 1 µg/ml (UM-UC-3) Puromycin für sieben Tage selektiert. Die stabile Überexpression wurde durch Western-Blot Analysen über mehrere Passagen hinweg bestätigt. Die HDAC4 bzw. HDAC1 überexprimierenden Zelllinien werden im Folgenden als HDAC4 bzw. HDAC1 Zellvarianten, die Kontrollvektor Zelllinien als Leervektor- (LV-) Zellvarianten bezeichnet (Kaletsch et al., 2018).

3.4 RNA-Analyse

3.4.1 RNA-Präparation

Die Gewinnung von RNA wurde mit dem „*RNeasy Mini Kit*“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden in 6-Well Platten über 24 h und 48 h mit 1 µM und 2 µM 19i kultiviert. Als Referenz dienten die mit DMSO (1:2000) behandelten Zellen. Als pan-HDACi-Kontrolle wurde 2,5 µM SAHA verwendet. Für die Lyse der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 2 ml PBS pro Well gewaschen und 350 µl RLT-Puffer (1% β-Mercaptoethanol) pro Well aufgetragen. Eventuell vorhandene RNAsen wurden durch das im RLT-Puffer vorhandene Guanidiniumthiocyanat inaktiviert. Das Zelllysate wurde resuspendiert, auf eine *QIAshredder*-Säule überführt und 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert, sodass unlösliches Material entfernt und die Viskosität des Zelllysates vermindert wird. Zur RNA-Präparation wurden 70% Ethanol (1:1) auf das Zelllysate gegeben. Das gesamte Volumen wurde auf ein frisches *RNeasy Mini spin column* überführt und 30 sec. bei 12000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die RNA mit 700 µl RW1 Puffer und zwei Mal mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen, um Ethanol und Verunreinigungen zu entfernen. Zwischen jedem Schritt wurde ein Mal 30 sec bzw. am Ende 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden dann zum Trocknen auf ein neues Abfallgefäß überführt, nochmals 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert und auf ein neues Eppendorf-Röhrchen verlagert. Mittels 50 µl RNase-freiem Wasser wurde die RNA in dieses Röhrchen eluiert und die Proben bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Reverse Transkription

Dieser Vorgang wird genutzt, um RNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (virale RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben. Dafür wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt. Von jeder Probe wurde 1 µg RNA in RNase-freiem Wasser verwendet. Diese wurde zunächst mit *gDNA Wipeout Buffer* versetzt, um die genomische DNA bei 42 °C durch DNase zu entfernen. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42 °C, indem *Quantiscript Reverse Transkriptase*, *Quantiscript RT Buffer* und *RT Primer Mix* hinzugegeben wurden. Das finale Reaktionsvolumen betrug 20 µl in Wasser. Nach 30 min wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für 3 min inaktiviert und die erhaltene cDNA 1:20 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Diese wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.3 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen Realtime-PCR wird mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes (*SYBRGreen*), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert, die exponentielle Amplifikation der DNA detektiert. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei proportional zum Anstieg der amplifizierten DNA-Menge, so dass eine Quantifizierung der Ausgangsmenge an *Template*-cDNA möglich ist. Ein PCR-Zyklus besteht aus der Denaturierung, *Annealing* der Primer und Elongation des Tochterstrangs. Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz des Farbstoffes wird zur Bestimmung des Schwellenwertes („*Threshold*“) genutzt. Durch das exponentielle Wachstum des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz bei jedem Zyklus an. Der *Ct-Wert* („*Cycle threshold*“) gibt dabei den Punkt an, bei dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Je nach DNA-Ausgangsgehalt ist dafür eine unterschiedliche Anzahl an PCR-Zyklen notwendig. Ausgehend von der *Annealing*-Temperatur wird die cDNA allmählich auf 95 °C erhitzt, sodass die doppelsträngige DNA bei einer spezifischen Schmelztemperatur denaturiert. Dabei fällt die Fluoreszenz ab, wenn die doppelsträngige DNA einzelsträngig wird. Diese Temperatur wird in der ersten Ableitung der Schmelzkurve als Maximum dargestellt. Die absolute Quantifizierung der PCR-Reaktion wird durch den Vergleich des *Ct-Wertes* der Proben mit dem der in drei Verdünnungen eingesetzten Standard-cDNA ermöglicht.

Die Messungen erfolgten in einer 96-Well-Platte. Für die Standardreihe wurde eine Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 eingesetzt. Für die Analyse wurden je 2 µl cDNA (1:20 verdünnt) mit 18 µl Mastermix (Tab. 2.7) gemischt, kurz abzentrifugiert und anschließend am *LightCycler® 96* gemessen. Die Zusammensetzung der optimierten PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primer ist in Tabelle 2.13 dargestellt. Die ermittelten Werte wurden zunächst auf das Referenzgen *TATA-Box* bindendes Protein (TBP) und anschließend auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde aus den Werten von zwei Versuchen der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

3.5 Protein-Analyse

3.5.1 Präparation von Proteinlysaten

Für die Expressionsanalyse nach 24 h und 48 h mit 19i Behandlung wurden die Zellen im selben Ansatz wie für die RNA-Präparation kultiviert (Abs. 3.4.1). Für die Ernte der Proteine wurde das Medium abgenommen und nach dem Waschen der Zellen mit PBS 50-70 µl RIPA-Puffer (Protease- und Phosphatase-Inhibitor im Verhältnis 1:100) aufgetragen. Die Zellen wurden 30 min auf Eis lysiert, bevor sie mit einem Schaber von Boden gelöst wurden, in ein Eppendorf Röhrchen überführt und bei 12000 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert wurden, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Um die Proteinexpression über mehrere Zellpassagen hinweg zu ermitteln, wurde nach jeder Passage ein Teil der Zellsuspension in eine 25 cm²-Kulturflasche gegeben und bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und mit 250 µl RIPA-Puffer behandelt. Die weiteren Schritte entsprachen dem oben geschilderten Vorgang.

3.5.2 Histonpräparation

Für die Histonpräparation nach 24 h und 48 h Behandlung wurde, nachdem die Zelllinien passagiert wurden, die Zellsuspension auf 25 cm²-Kulturflaschen mit 5 ml vorgegebenem DMEM verteilt und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Nach dem Absaugen des alten Mediums wurden am Folgetag die Zellen mit 5 ml Inkubationsmedium mit 1 µM und 2 µM 19i behandelt.

Für die Ernte der Zellen sowie Gewinnung der Histone wurde nach 24 h und 48 h das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA gelöst. Die Reaktion wurde mit 4 ml frischem DMEM abgestoppt und die Zellsuspension in ein steriles Falcon Röhrchen überführt. Diese wurden bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen und erneut bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des PBS wurde das Zellpellet optional bei -20 °C gelagert.

Die Histonextraktion erfolgte mittels saurer Extraktion (Shechter et al., 2007). Das Zellpellet wurde in 1 ml hypotonischem Lysispuffer resuspendiert und in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt. Dieses wurde 1 h bei 4 °C rotiert, um die Zellen durch mechanische Scherkräfte zu lysieren. Die intakten Nuclei wurden anschließend bei 4 °C und 10000 rpm 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und die Nuclei in 400 µl 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄) resuspendiert. Die Nuclei wurden anschließend über Nacht bei 4 °C rotiert.

Um nichtlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Proben bei 4 °C und 16000 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorf-Röhrchen überführt. Zum Fällern der Proteine wurden während mehrmaliger Inversion der Probe 132 µl Trichloressigsäure (100%) langsam zur Histonlösung gegeben, sodass sich die Lösung milchig verfärbt. Nach 4 h Inkubation auf Eis wurden die Proben erneut bei 4 °C und 16000 rpm 10 min pelletiert und die Überstände verworfen. Zur Entfernung der Säure wurde das Pellet mit 1 ml Aceton gewaschen und bei 4 °C und 16000 rpm 5 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, bevor der Überstand vollständig entfernt wurde und das Histon-Pellet für 20 min bei RT getrocknet wurde. Dann wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, das Lysat in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert. Zur Messung der Histonkonzentration in den Lysaten wurde eine quantitative Proteinbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde der Acetylierungsgrad der Histone mittels Western Blot bestimmt (Abs. 3.5.5).

3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Vorgang beruht auf einer Komplexbildung von zwei BCA Molekülen mit einem einwertigen Kupferion und dem Protein. Die violette

Farbe dieses wasserlöslichen Komplexes kann photometrisch bei 562 nm gemessen werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 2 µl der Proteinprobe bzw. 5 µl der Histonprobe in zweifachem Ansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl der Proteinprobe in einfachem Ansatz verwendet. Als Standard diente eine BSA-Standardreihe mit Konzentrationen von 32 - 2000 µg, von denen je 10 µl eingesetzt wurden. Als Blank wurde bei der Proteinbestimmung 10 µl RIPA-Puffer bzw. bei der Histonbestimmung 10 µl RNase-freies Wasser verwendet. Zu jedem Ansatz wurden anschließend 200 µl Farblösung (Reagenz A und B, 50:1) gegeben und die Platte 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm am *ELISA-Lesegerät FLUOstar OPTIMA* gemessen.

3.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in vertikalen Gelkammern durchgeführt. Dabei werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Ladung, so dass alle Proteine das gleiche Masse-Ladungs-Verhältnis besitzen. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine je nach Größe schneller oder langsamer zur Anode.

Es wurden 12-15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, die vorher in die Laufapparatur eingespannt und mit kaltem Laufpuffer befüllt wurden. Von den Proben für die Protein-Expressionsanalyse wurden 10 bzw. 15 µg eingesetzt, mit RIPA auf mindestens 15 µl aufgefüllt und mit 3-5 µl 6x Laemmli-Puffer versetzt. Für die Histon-Analyse wurde 1 µg aus der Probe in einem Volumen von 10 µl H₂O eingesetzt und 2 µl 6x Laemmli-Puffer hinzugegeben. Der finale Ansatz wurde 5 min bei 95 °C aufgekocht und in die Geltaschen des SDS-Polyacrylamid-Gels überführt. Als Größenstandard wurden 10 µl *Page-Ruler™ Prestained Protein Marker* verwendet. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 130 Volt und, nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, bei 170 Volt für ca. 1 h.

3.5.5 Western Blot

Die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylfluorid-Membran (PVDF-Membran), die vorher 3 min mit Methanol aktiviert wurde, übertragen. Der Elektrotransfer erfolgte in *Blotting-Puffer* 90 min bei 180 mA auf Eis. Zur spezifischen Identifikation von Proteinen wurden zunächst die unspezifischen freien

Bindungsstellen der Membran mit 5% Milch eine Stunde bei RT blockiert, bevor die Membran auf dem Schüttler über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. Vor und nach der einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran je 3x 10 min mit TBST-Puffer gewaschen.

Zur Detektion des mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers wurde das *ECL™ Western Blotting Detection Kit* verwendet. Die Membran wurde 1 min in *WesternBright Quantum* (Biozym) bzw. *Super Signal West Femto* inkubiert. Zur Detektion wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. In der Dunkelkammer erfolgte die Exposition der Filmkassette gegen einen Chemolumineszenzfilm, welcher mit dem *Curix60* (Belichtungszeit 30 sec. bis 5 min) entwickelt wurde. Andererseits wurde das Oxidationsprodukt auf den Membranen mit dem *Li-Cor Scanner* (Belichtungszeit bis zu 12 min) detektiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie die Antikörper-spezifischen *Blocking*-Verfahren und Verdünnungen sind in Tabelle 2.11 dargestellt.

3.5.6 Stripping

Für den Nachweis mehrerer Proteine auf einer Membran wurde die Membran von den gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern befreit. Dafür wurde die Membran 2x mit mildem Stripping-Puffer inkubiert (Tab. 2.8), sodass die Antikörper bei einem pH von 2,2 denaturiert werden. Nachdem die Membran 3x 10 min mit TBST gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen 1 h mit 5% Milch blockiert wurden, konnte die Membran zur Immundetektion weiterer Proteine verwendet werden.

3.6 Funktionelle Versuche

3.6.1 MTT-Viabilitätsassay

Der MTT-Viabilitäts-Test (MTT, *Thiazolyl blue formazan*, M2128-G) ist eine kolorimetrische Methode für die Bestimmung der Zellviabilität. Hierbei kann die wachstumsinhibierende oder -stimulierende Wirkung von verschiedenen Substanzen an Zelllinien ermittelt werden, indem der Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe gemessen wird. Der Nachweis beruht auf der Fähigkeit von lebenden Zellen das schwach gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zu violett-blauem Formazan zu metabolisieren. Der wasserlösliche, membrangängige Farbstoff wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und

intrazellulär durch NADPH-abhängige Oxidoreduktasen reduziert. Dabei wird der Tetrazoliumring aufgebrochen, was zur Bildung von wasserunlöslichen Formazan-Kristallen führt, die in den Zellen akkumulieren. Die Menge der gebildeten Formazan-Kristalle ist dabei direkt proportional zu der Anzahl an vitalen Zellen. Nach einer Lyse der Zellen mit DMSO lösen sich diese Kristalle wieder und bilden eine homogene violette Lösung (Riss et al., 2004; Sigma Aldrich). Die Absorption des Farbstoffs wurde kolorimetrisch bei 570 nm und 620 nm mit Hilfe des *ELISA-Lesegeräts FLUOstar OPTIMA* gemessen.

Die HDACis wurden hinsichtlich ihrer zytotoxischen Aktivität mit Hilfe der MTT-Viabilitäts-Analyse untersucht. Anhand ihrer Dosiswirkungskurven wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) jedes HDACis zelllinien-spezifisch mittels der Software *Origin* von *OriginLab Corporation* ermittelt. Die im 96-Well-Format ausgesäten Zellen wurden mit DMEM, DMSO (1:2000) bzw. Inkubationsmedium (0,1-20 μ M) behandelt (Tab. 3.1). Die zwei Negativkontrollen wurden jeweils mit DMEM bzw. 0,05%-igem DMSO in Medium durchgeführt. Es wurden jeweils Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Zytotoxizität der einzelnen Substanzen wurde über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h ermittelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 10 μ l MTT-Reagenz (5 mg/ml PBS) pro Ansatz zugegeben und die 96-Well-Mikrotiterplatten eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Reagenz abgegossen und die Platten ausgeklopft. Anschließend wurden 50 μ l DMSO pro Ansatz zugesetzt und die Wellenlänge gemessen. Von den vier gemessenen Extinktionen pro InhibitorKonzentration wurde der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert, damit die relative Proliferation in Bezug auf die verschiedenen InhibitorKonzentrationen an den getesteten Zelllinien ersichtlich wird.

3.6.2 CellTiter-Glo® Assay

Mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Cell Viability Luminescent Assay* werden metabolisch aktive Zellen quantifiziert, indem von der Menge an vorhandenem ATP auf die Anzahl lebender Zellen geschlossen wird. Nachdem die Zellen lysiert sind wird Luciferin durch das Enzym Luciferase in Anwesenheit von Mg^{2+} , ATP und molekularem Sauerstoff oxygeniert. Dadurch entsteht neben Oxyluciferin auch AMP + Pyrophosphat, CO_2 und ein Lumineszenz-Signal, welches dem zellulären ATP-Gehalt entspricht. Letzterer korreliert mit der Anzahl lebender Zellen (Promega, 2015).

Um die Vitalität der Zellen nach Behandlung einzuschätzen, wurden die Zellen 24 h und 48 h mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen behandelt. Das Medium der im 24-Well Format ausgesäten Zellen wurde abgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden ein Mal gewaschen und durch Zugabe von 100 μ l Trypsin-EDTA vom Plattenboden gelöst. Nach ca. 2 min wurde die Reaktion mit 300 μ l Medium abgestoppt und die Zellsuspension ebenfalls in das Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 40 μ l Zellsuspension und 40 μ l *CellTiter-Glo®* Reagenz (Verhältnis 1:1) in Vierfachbestimmung auf eine 96-Well-Platte gegeben und 2 min auf dem Schüttler inkubiert, um eine Zelllyse zu induzieren. Nach 10 min Inkubation wurde die Lumineszenz mit Hilfe des *Wallac Victor 2- Multilabel Counter* gemessen. Nach Abzug der Hintergrundlumineszenz von allen Einzelwerten wurde der Mittelwert der gemessenen Signale auf den Mittelwert der DMSO-Kontrolle normiert, sodass die relative Viabilität der behandelten Zellen im Vergleich zum Referenzwert ersichtlich wird.

3.6.3 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der molekulare Eigenschaften von Zellen quantitativ analysiert werden können. Zur DNA-Analyse wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Iodid verwendet. Dieser diffundiert in den Zellkern und färbt die nukleäre DNA stöchiometrisch an, sodass die fluoreszenz-markierten Zellen in ihrer Intensität im Durchflusszytometer unterschieden werden können. Dabei ist die Fluoreszenz des Farbstoffs proportional zum zellulären DNA-Gehalt. Da die DNA-Menge im Laufe des Zellzyklus variiert, ist eine Einteilung in Zellzyklus-Phasen möglich. In der Synthese-Phase (S-Phase) verdoppelt sich die chromosomale DNA, sodass der DNA-Gehalt in der G_2 - bzw. Mitose-Phase (G_2/M -Phase) doppelt so groß ist wie in postmitotischen bzw. ruhenden Zellen, die sich in der G_1/G_0 -Phase befinden. Apoptotische Zellen weisen hingegen einen verminderten Anteil an hochmolekularer DNA im Zellkern auf. Bei der durchflusszytometrischen Analyse erscheinen diese Zellen auf Grund ihrer geringen Fluoreszenz als niedriger, breiter DNA-Peak (sub- G_1 -Phase) und unterscheiden sich von den schmalen Peaks diploider Zellen in der G_1 - bzw. G_2/M -Phase.

Für die Analyse wurden die Zellen in 6-Well Platten über 24 h und 48 h mit DMSO (1:2000) als Negativkontrolle, SAHA sowie den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen

behandelt. SAHA diente dabei als Vergleich, da es in UCCs einen deutlichen Anstieg der G₂/M-Fraktion hervorruft (Niegisch et al., 2013).

Für die Ernte der Zellen wurde das Medium abgenommen und zusammen mit dem zum Waschen der Zellen verwendeten PBS in ein Reagenzglas überführt. Die Zellen wurden mit 300 µl Trypsin-EDTA vom Plattenboden gelöst und die Reaktion nach 2 min mit 1 ml DMEM-Medium gestoppt. Die Zellen wurden gründlich resuspendiert und ebenfalls in das Reagenzglas übertragen. Danach wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300-500 µl Nicoletti-Puffer (Tab. 2.4) aufgenommen und sorgfältig gevortext. Die Proben wurden auf Eis gelagert und bis zur Messung am *MACSQuant Analyzer* mit Alufolie bedeckt. Die Auswertungen der Messungen erfolgten mit der *MACS Quant Software*. Dabei wurde die Häufigkeitsverteilung der Messsignale in einem Histogramm dargestellt, indem die Fluoreszenzintensität in Bezug auf die Anzahl der Signale aufgetragen wurde.

3.6.4 Zytochemische Analyse

Die Fluoreszenz-Färbetechnik ist eine Methode, bei der Zellbestandteile wie das Zytoskelett und der Zellkern, aber auch spezifische Proteine in der Zelle nachgewiesen werden können. Das Pilzgift Phalloidin, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamine Isothiocyanate (TRITC) gekoppelt ist, interkaliert in F-Aktin Filamente und färbt das Zytoskelett rot-orange an. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) bindet hingegen spezifisch an AT-Basenpaare in der DNA und lässt den Zellkern bei einem Emissionsmaximum von 461 nm blau erscheinen.

Die Zellen wurden auf 30 mm Deckgläschen in 6-Well Platten ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert, bevor sie behandelt wurden. Die Behandlung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei alle Substanzen mit einer Verdünnung von 1:2000 in DMEM gelöst wurden.

Die Zellen wurden auf den 30 mm Deckgläschen mit 1 ml pro Well 4% Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellen mit 1 ml pro Well 0,5% Triton X-100 in PBS für 3 min permeabilisiert und anschließend 3x 5 min mit PBS gewaschen. Das Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 1 ml 1% BSA in PBS für 30 min. Danach wurde das Aktinzytoskelett mit 50 µl 0,1% 14 µM Rhodamin-Phalloidin-Stock in 1% BSA in PBS 60 min bei RT gefärbt. Nach dreimaligem, zehnminütigem Waschen wurde der Zellkern 5 min bei RT mit 1 ml pro Well 0,1% 0,5

mg/ml DAPI in PBS gefärbt. Die Objektträger wurden anschließend 2x 5 min mit PBS gewaschen, mit *Mounting Medium* eingedeckelt und bei 4 °C gelagert. Die zytochemischen Färbungen wurden mit Hilfe des Mikroskops *Nikon Eclipse 400* mit dem Fluoreszenzfilter *GFP (R)-LP/HQ-FITC-LP (Ex 400-500, DM 505, BA 510)* und dem DAPI Filter visualisiert und durch die *NIS-Elements Software* ausgewertet. Fotografien wurden in 400x Vergrößerung mit dem *PlanFluor*-Objektiv erstellt.

Für die statistische Auswertung wurden insgesamt 500 Zellkerne auf einem Objektträger ausgezählt. Dabei wurden zirkulär um einen festgelegten Zellkern vier Gesichtsfelder ausgewählt. In jedem Quadranten wurden jeweils die Anzahl der Zellkerne sowie die absolute Zahl der Zellkerne mit nukleären Veränderungen, ebenso wie die Anzahl der Mitosen erfasst. Von zwei verschiedenen Versuchen wurden jeweils die Mitosen sowie Mikronuklei addiert und deren jeweiliger prozentualer Anteil an der Gesamtheit der Zellkerne berechnet.

3.6.5 Klonogenität

Für die Beurteilung der Klonogenität nach Inhibitorbehandlung wurden die bereits behandelten Zellen aus dem 6-Well Format für die Durchflusszytometrische-Analyse (Abs. 3.6.4) bzw. Caspase-Assay nach 24 h und 48 h verwendet. DMSO diente als Negativkontrolle. Die bereits trypsinisierten Zellen wurden gründlich resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl in eine 6 cm Schale gegeben und gleichmäßig auf dem Plattenboden verteilt. Bis sich sichtbare Kolonien gebildet hatten wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit Giemsa-Reagenz gefärbt.

Für die Analyse der Koloniebildung im unbehandelten Zustand wurden jeweils 2000 Zellen in eine mit 5 ml DMEM+ Penicillin/Streptomycin (1:100) versehene 6 cm Schale überführt und anschließend kultiviert und gefärbt (s.u.).

Um das dichteabhängige Wachstum einzelner Zelllinien zu beurteilen, wurde eine Verdünnungsreihe im 6-Well Format erstellt. Im ersten Well wurden 5000 Zellen in 2 ml Medium ausgesät und nachfolgend die Zellzahl im Verhältnis 1:2, 1:4 und 1:8 vermindert. Die Färbung erfolgte nach dem unten geschilderten Verfahren.

3.6.6 Giemsa Färbung

Um die Vermehrung der Zellen und speziell die Langzeit-Proliferationsfähigkeit nach Behandlung mit dem Inhibitor 19i zu visualisieren, wurden die in den 6 cm Schalen ausgesäten Zellen mittels Giemsa-Reagenz (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) gefärbt.

Das Medium wurde dazu abgenommen und die Zellen erst mit PBS, dann mit PBS/Methanol im Verhältnis 1:1 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei RT mit Methanol (100%) fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt und die Zellen mit Giemsa-Lösung für 2 min inkubiert. Die Giemsa-Lösung wurde abgenommen und Reste entfernt, indem die Zellen 2x mit Aqua dest gespült und anschließend 30 min mit Leitungswasser bedeckt wurden, bis nur noch die gefärbten Zellen sichtbar waren. Die Koloniebildung in den Schalen wurde mittels *CanoScan 4400F* dokumentiert.

3.6.7 Caspase-Glo® 3/7 Assay

Caspasen sind Proteasen, die beim Ablauf und der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Dabei führen speziell die sog. Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 durch die proteolytische Spaltung ihrer Substrate zum programmierten Zelltod. Um die Caspase 3/7-Aktivität zu messen, wurde der Fluoreszenz-basierte *Caspase-Glo® 3/7 Assay* nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei werden die Caspasen zunächst durch Lyse der Zellen freigesetzt. Durch die Spaltung des im Reagenz enthaltenen Caspase 3/7-Substrat (Z-DEVD-Aminoluziferin) entsteht Aminoluziferin, welches mit dem Enzym Luziferase reagiert. Dadurch wird ein Lumineszenz-Signal erzeugt, welches proportional zur Caspase 3/7- Aktivität ist.

Um die Apoptoseinduktion nach Inhibitorbehandlung mit der relativen Viabilität der Zellen vergleichen zu können, wurden die Zellen aus demselben Versuchsansatz wie für den *CellTiter-Glo® Assay* verwendet. Die Versuchsdurchführung glich dem des *CellTiter-Glo® Test*, wobei zu den 40 µl Zellsuspension 40 µl *Caspase-Glo®3/7-Reagenz* (Verhältnis 1:1) gegeben und die Lumineszenz erst 1 h nach Inkubation gemessen wurde. Von den vier gemessenen Signalen wurde, nach Abzug der Hintergrundlumineszenz von jedem Einzelwert, der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte wurden zunächst auf die Kontrollprobe normiert, so dass eine Aussage über die Gesamtmenge an aktivem Caspase 3/7 nach Behandlung möglich ist. Da die Caspase 3/7-Gesamtaktivität jedoch auch von der Zellzahl abhängt, wurden diese Extinktionswerte anschließend zur Menge an vitalen Zellen (Mittelwert der relativen Viabilität aus dem *CellTiter-Glo® Assay*) in Beziehung gesetzt, so dass eine Aussage über die absolute Caspase 3/7-Aktivität in den vitalen Zellen getroffen werden kann.

3.6.8 Seneszenz assoziierter saurer β -Galaktosidase Assay

Das Enzym β -Galaktosidase kommt in Lysosomen von seneszenten Zellen vor und katalysiert die Hydrolyse der glykosidischen Bindung von β -Galaktopyranosiden, so dass das Monosaccharid Galaktose entsteht. Bei Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) kommt es unter leicht sauren Bedingungen (pH 6) zu einer Hydrolyse, bei der ein blauer, wasserunlöslicher Indigo-Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) entsteht, der als Nachweis für Seneszenz in Zellen dient.

Nach 24 h und 48 h Inkubation mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurde das Medium der im 6-Well Format ausgesäten Zellen abgesaugt und die Zellen 2x Mal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde anschließend Fixativ für 3-5 min bei RT hinzugegeben und nach zweimaligem Waschen X-Gal-Färbelösung auf die Zellen gegeben. Die Lösungen wurden vor dem Versuch frisch angesetzt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C (ohne CO₂) im Brutschrank inkubiert, bis eine Blaufärbung der Zellen sichtbar war. Das Ergebnis wurde mit dem *Nikon Eclipse TEE2000-S* Mikroskop photographisch festgehalten und mit der *NIS-Elements Software* ausgewertet.

3.6.9 Statistische Analysen

Für den statistischen Vergleich unterschiedlicher Gruppen (z.B. mRNA-Expression bei unterschiedlichen Zelllinien) wurde der statistische Hypothesentest (T-Test) eingesetzt. Dabei wurden p-Werte <0,05 als signifikant, p-Werte <0,01 als hochsignifikant angesehen. IC₅₀-Werte wurden aus den Werten der Dosis-Wirkungs-Kurven durch die nicht-lineare Regressionsanalyse berechnet. Zur Auswertung wurden *Origin 8.0* eingesetzt.

4 Ergebnisse

Ein Großteil der Abbildungen sind in die Publikation (Kaletsch et al., 2018) eingegangen und wurden teils modifiziert. Diese sind mit einem Stern (*) in der Legende gekennzeichnet.

4.1 Auswahl der Urothelkarzinom-Zelllinien (UCCs)

Basierend auf den Zielsetzungen, die Sinnhaftigkeit der Klasse IIa HDAC Inhibition zu überprüfen und die molekulare Wirkung neuer HDACis an UCCs zu untersuchen, wurden drei Zelllinien mit unterschiedlichem HDAC4-Expressionsprofil ausgewählt. Die Daten zur Klasse IIa Expression wurden aus Vorarbeiten des Urologischen Forschungslabors entnommen (Niegisch et al., 2013; Andrea Renn, Maria Pinkerneil (unpublizierte Daten)) und im Zuge meiner Arbeit wiederholt und vervollständigt.

Für die Analyse der Expression der mRNA von Klasse IIa HDACs wurden zehn UCCs, die sich in ihrem Phänotyp deutlich unterscheiden, mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Dazu wurden die Zelllinien HT1367, 5637, BFTC905, RT-112, J-82 und VM-CUB1 mit eher epithelialem, sowie die Zelllinien UM-UC -3, 639-V, T-24 und SW1710 mit eher mesenchyalem Phänotyp verwendet. Als normale Kontrolle wurde RNA aus Zellen aus urothelialen Primärkulturen (UP) mitgeführt, welche aus Harnleitern von nephrektomierten Patienten stammte. Die relative Klasse IIa HDAC Expression ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Abbildung wurde aus dem Praktikumsbericht von Andrea Renn (Renn, 2014) entnommen.

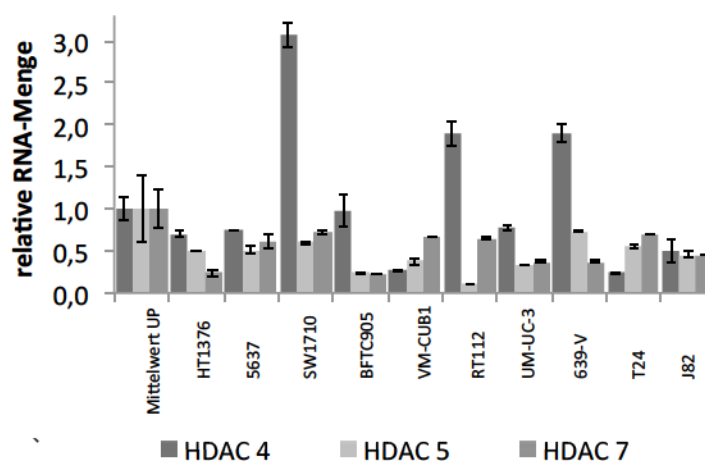


Abb. 4.1: Relatives Expressionsniveau von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 mRNA in UCCs und in urothelialen Primärkulturen (UP). Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Der Mittelwert der urothelialen Primärkulturen wurde als Wert 1 festgesetzt. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte der UC-Zelllinien zum mittleren Expressionsniveau der UP-Kontrolle in Beziehung gesetzt (Renn, 2014).

Wie erwartet, zeigte sich bei einem Großteil der Zelllinien ein erniedrigtes Expressionsniveau der Klasse IIa HDACs im Vergleich zum mittleren Expressionsniveau der UPs. Die niedrigsten HDAC4 Expressionen mit einer relativen RNA-Menge von $<0,5$ fanden sich in den Zelllinien VM-CUB1, T-24 und J82. Lediglich in den Zelllinien SW1710, RT-112 und 639-V war das Expressionsniveau von HDAC4 erhöht. Eine unveränderte Expression von HDAC4 mRNA lag in der Zelllinie BFTC905 vor. Die HDAC5-Expression war hingegen in den Zelllinien BFTC905, RT-112, UM-U-3 und J82 stark vermindert, die von HDAC7 in den Zelllinien HT1376, BFTC905, UM-UC-3, 639-V und J82. Ein Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe von Klasse IIa HDACs und dem morphologischen Phänotyp der Zelllinien (mesenchymaler vs. epithelialer Phänotyp) war nicht erkennbar.

Mittels Western-Blot-Analyse wurde das Expressionsniveau von HDAC4 auf Proteinebene untersucht. Es wurden dreizehn verschiedene UCCs sowie eine UP und die Zelllinie TERT-NHUC (telomerase-immortalized urothelial cells) verwendet, um die Proteinexpression der UCCs mit der von benignen Urothelzellen vergleichen zu können. Die Abbildung wurde aus dem Praktikumsbericht von Andrea Renn entnommen.

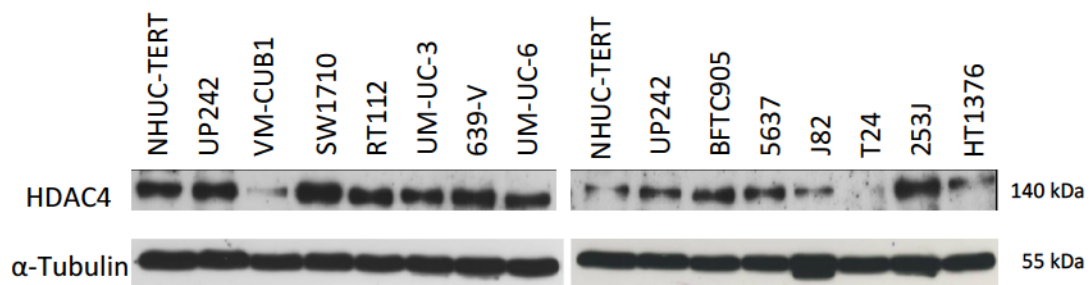


Abb. 4.2: Western-Blot verschiedener UC-Zelllinien (VM-CUB1 bis HT1376), einer urothelialen Primärkultur (UP242) sowie einer benignen uroepithelialen Zelllinie TERT-NHUC zum Nachweis der HDAC4 Expression auf Proteinebene. Es wurden 15 µg Gesamtprotein für jede Zelllinie aufgetragen. α-Tubulin (55 kDa) diente als Ladungskontrolle. Modifiziert nach (Renn, 2014).

Aus der Abbildung 4.2 wird deutlich, dass die UC-Zelllinien VM-CUB1, J82, T-24 sowie HT1376 eine im Vergleich zur UP-Kontrolle verminderte HDAC4-Expression aufweisen, wohingegen eine erhöhte Expression von HDAC4 in den UC-Zelllinien SW1710, 639-V und 253J vorliegt. Eine zur urothelialen Primärkultur vergleichbare Expressionsstärke von HDAC4 zeigt sich bei den Zelllinien RT-112, UM-UC-3, UM-UC-6, BFTC905 und 5637.

Ausgehend von diesen Ergebnissen erfolgten die weiteren Untersuchungen anhand der UC-Zelllinien 639-V mit erhöhter, UM-UC-3 mit unveränderter und VM-CUB1 mit

erniedrigter HDAC4-Expression. Als Kontrollen wurden die Zelllinien HBLAK (urothelial) und HEK293 (nicht-urothelial) verwendet.

Die Auswahl berücksichtigt einerseits die starke Heterogenität (epithelial bis mesenchymal) der UC-Zelllinien, andererseits wird die Interpretation der Rolle des HDAC4 Expressionsniveaus in UC-Zelllinien ermöglicht.

4.2 Behandlung der UCCs mit 19e, 19h und 19i

Im weiteren Verlauf wurden die Wirkung der HDACis 19e, 19h und 19i auf die UCCs VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V verglichen.

4.2.1 Effekte auf die Proliferation

Die ausgewählten UCCs wurden einmalig über einen Zeitraum von 72 h unter Standardbedingungen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen 19e, 19h und 19i behandelt. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe des MTT-Assays quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

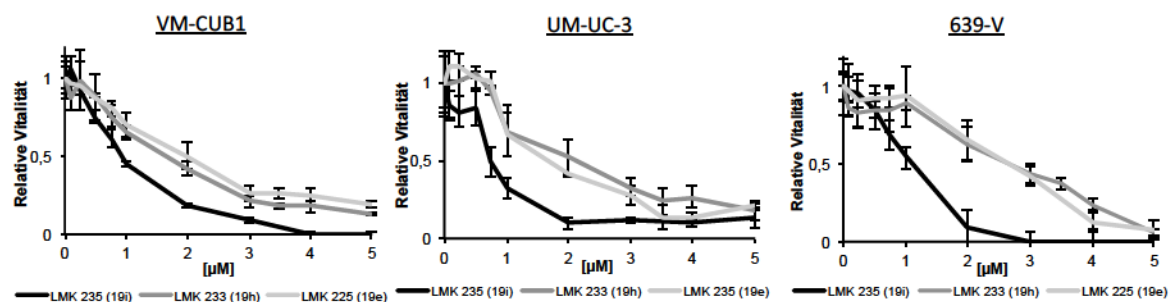


Abb. 4.3: Dosiswirkungskurve nach Behandlung mit den HDACi 19e, 19h und 19i der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,1 - 5 μM der Inhibitoren verwendet. Als Lösungskontrolle dienten die mit DMSO in Medium (1:2000) behandelten Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität mit dem MTT-Assay wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitor-Konzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die Inhibitor-Konzentrationen in μM dargestellt, auf der Ordinate die relative Vitalität in Prozent.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die relative Vitalität mit steigender Inhibitor-Konzentration in diesem Konzentrationsbereich abnimmt. Abhängig vom Inhibitor kommt es nach Behandlung mit 0,1 μM 19i (VM-CUB1) bzw. 0,1 bis 0,5 μM 19e und 19h (UM-UC-3) vereinzelt zu einem Anstieg der Vitalität. Insgesamt hemmen die drei Inhibitoren die Vermehrung der Zellen unterschiedlich stark. Den stärksten Einfluss auf die Zellvitalität hatte 19i. Dieser Inhibitor war bei den niedrigsten Konzentrationen in allen UC-Zelllinien wirksam (IC_{50} 0,97-1,03); 19h (IC_{50} 2,20-2,27)

und 19e (IC_{50} 2,35-2,86) zeigten hingegen deutlich schwächere inhibitorische Aktivitäten. Bereits ab einer Konzentration von 0,5 μ M 19i war die Proliferationsfähigkeit der Zellen um ca. 10% stärker eingeschränkt. Ein kompletter Verlust der Vitalität wurde in den Zelllinien VM-CUB1 und 639-V bereits ab einer Konzentration von 3 - 4 μ M 19i erreicht. Bei einer Behandlung mit 19e und 19h verbleiben in diesem Konzentrationsbereich noch etwa 20% vitale Zellen. Die Zelllinie UM-UC-3 reagiert ähnlich, allerdings zeigen die Zellen ab einer Konzentration von 2 μ M 19i bzw. 4 μ M 19e und 19h eine stabil bleibende Vitalität von 20%. Ein kompletter Zelltod wird in dieser Zelllinie durch keinen Inhibitor erreicht.

Um zu überprüfen, wie sich die Inkubationszeit auf die inhibitorische Aktivität der drei Substanzen auswirkt, wurden die Zelllinien über 24 bis 72 h mit 0,5 μ M, 2 μ M und 5 μ M der jeweiligen Substanz unter Standardbedingungen inkubiert. Aus den Werten von drei verschiedenen Einzelmessungen wurde der Mittelwert gebildet (Abb. 4.4). Die zelllinienspezifischen IC_{50} -Werte der Inhibitoren sind der Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.1: IC_{50} -Werte der HDAC-Inhibitoren 19e, 19h und 19i. Die IC_{50} -Werte wurden für die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3, 639-V, HEK293 und HBLAK berechnet. Die Inkubationszeit betrug 72 h. n.d. = Wert nicht ermittelt. (*)

Zelllinie	$IC_{50}[\mu M]$ 72 h		
	19e	19h	19i
VM-CUB1	2,35	2,24	0,97
UM-UC-3	2,54	2,20	0,82
639-V	2,86	3,27	1,03
HBLAK	n.d.	n.d.	>5
HEK-293	n.d.	n.d.	0,61

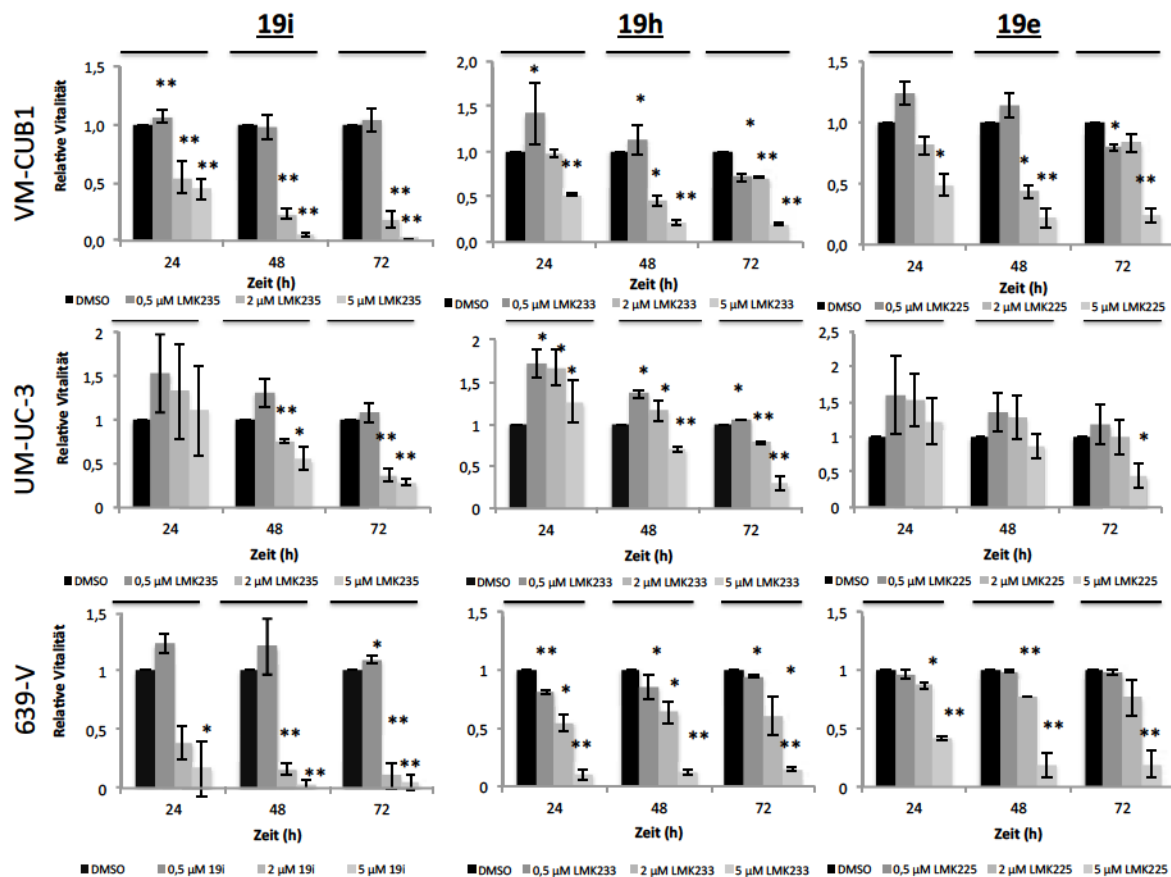


Abb. 4.4: Quantifizierung der Zellvitalität mit dem MTT-Assay nach unterschiedlich langer Behandlung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC3 und 639-V mit den HDACis 19e, 19h und 19i. Die Inkubationszeit betrug 24 h, 48 h und 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,5 µM, 2 µM und 5 µM verwendet. Als Lösungskontrolle dienten mit DMSO in Medium (1:2000) behandelte Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro InhibitorKonzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die InhibitorKonzentrationen in µM dargestellt, auf der Ordinate die relative Vitalität in Prozent. Die Mittelwerte nach 24 h, 48 h und 72 h wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$). (*)

Auch nach 24 h und 48 h hemmten die drei Inhibitoren die UC-Zelllinien unterschiedlich stark (Abb. 4.4). In der Zelllinie VM-CUB1 verminderte 19i die Vitalität signifikant am stärksten bei 2 µM und 5 µM über alle untersuchten Zeitpunkte. Eine Inkubation mit 2 µM 19i führte bereits nach 24 h zu einem signifikanten Abfall der Vitalität um 50%; diese sank nach 48 h bzw. 72 h auf etwa 20%. Eine Behandlung mit 2 µM 19e und 19h ergab nach 24 h nur einen geringen Vitalitätsverlust, nach 48 h nahm die relative Vitalität hingegen um ca. 50% ab. Nach 24 h wurde durch den Einsatz von 5 µM bei allen drei Substanzen eine signifikante Vitalitätsabnahme um 50% erreicht; 48 h Inkubation führten zu einer stärkeren Abnahme durch 19i bis auf 5%, bei 19e und 19h wurde die relative Vitalität auf ca. 20% reduziert. Durch die Verwendung einer niedrigen Konzentration von 0,5 µM

kam es zu einem Inhibitor-abhängigen Vitalitätsanstieg. Dieser war 24 h nach 19h Behandlung mit einer signifikanten Vitalitätssteigerung um 40% am stärksten ausgeprägt. Auch durch die Inkubation mit 0,5 μM 19i kam es nach 24 h zu einem signifikanten Vitalitätsanstieg. Die Zelllinie UM-UC-3 war gegenüber allen drei Inhibitoren deutlich weniger sensitiv. Nach 24 h wurde für alle verwendeten Konzentrationen von 19e, 19h und 19i sogar ein Vitalitätsanstieg detektiert. Zu allen drei Zeitpunkten erwies sich 19i als die wirksamste Substanz. Unter den Zelllinien erwies sich 639-V nach 2 und 5 μM als besonders sensibel gegenüber den Inhibitoren. Insgesamt ließ sich für UC-Zelllinien bestätigen, dass 19i konzentrations- und zeitpunktabhängig die potenteste Substanz ist. Erst durch den Einsatz von höheren Konzentrationen wurden mit 19e und 19h vergleichbare Effekte erzielt. Lediglich bei einer Konzentration von 0,5 μM waren bei der Zelllinie VM-CUB1 über 72 h und bei der 639-V über alle drei ermittelten Zeitpunkte die Inhibitoren 19e und 19h wirksamer. Die Zellvitalität reduzierte sich dabei dosisabhängig mit der Stärke der HDAC-Inhibition.

Die Koloniebildung der Zelllinien wurde mittels Klonogenitätsassay untersucht. Dazu wurden die Zellen einmalig mit dem jeweiligen 72 h IC_{50} -Wert der Inhibitoren 19e (2,35 μM), 19h (2,24 μM), und 19i (0,97 μM) inkubiert und dann verdünnt ausgesät. Nach etwa 2 Wochen wurden die gebildeten Kolonien fixiert und gefärbt (Abb. 4.5).

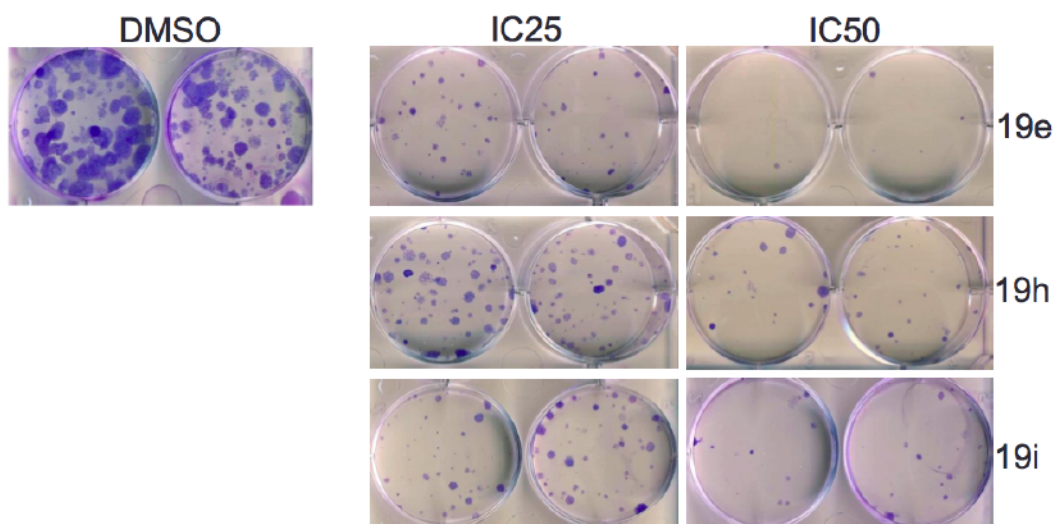


Abb. 4.5: Giemsa-Färbung der Zelllinie VM-CUB1 nach Behandlung mit 19e, 19h und 19i. Die Zellen wurden vor der Aussaat bei niedriger Zelldichte über einen Zeitraum von 72 h mit dem IC_{25} der IC_{50} -Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem die mit DMSO behandelten Zellkolonien annähernd konfluent waren.

Die langfristige Proliferationsfähigkeit der Zelllinie VM-CUB1 wurde nach 72 h Behandlung besonders durch die Inhibitoren 19e und 19i eingeschränkt. Den stärksten Effekt auf die Zelllinie UM-UC-3 hatte der Inhibitor 19i; hier wurde die Koloniebildung fast vollständig gehemmt. Bei der Zelllinie 639-V wirkten sich die Inhibitoren 19e und 19i vergleichbar auf die Klonogenität aus. Betrachtet man die Effekte auf alle drei Zelllinien in der Gesamtheit, hat wiederum 19i die stärkste Auswirkung auf die Langzeit-Proliferationsfähigkeit.

4.2.2 Expressionsprofile nach Behandlung mit 19e, 19h, und 19i

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Inhibitoren auf die mRNA Expression der Klasse IIa HDACS sowie verschiedene Markerproteine haben und ob sich dieser zwischen den drei Inhibitoren unterscheidet, wurden die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V mit den Substanzen 19e, 19h und 19i über einen Zeitraum von 72 h inkubiert. Die Effekte der einzelnen Substanzen werden anhand der Zelllinie VM-CUB1 beispielhaft beschrieben. Auf die zelllinienspezifischen Unterschiede bei Behandlung mit 19i wird in Abschnitt 4.3 näher eingegangen.

4.2.2.1 Auswirkung auf die RNA-Expression der Klasse IIa HDACs

Zunächst wurde die Wirkung der Inhibitoren 19e, 19h und 19i bei Behandlung mit jeweils 2 μ M und 5 μ M über 72 h auf die Expression der Klasse IIa HDAC mRNAs mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden zunächst auf das Referenzgen TBP und anschließend auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Die relative Expression der Klasse IIa HDAC nach den Behandlungen ist in Abbildung 9.1 im Anhang dargestellt.

Nach Behandlung war unabhängig vom eingesetzten Inhibitor eine erhöhte Expression von HDAC4 und HDAC5 im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen ersichtlich. Lediglich die HDAC5 Expression war nach Behandlung mit 2 μ M 19h um 20% vermindert. Nach Behandlung mit der jeweils höheren Inhibitorkonzentration stieg die Expression ebenfalls an. Die höchsten Expressionswerte werden durch eine Behandlung mit dem Inhibitor 19i erreicht. Die relative HDAC4 RNA-Menge war nach Behandlung mit 5 μ M 19i im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um das Doppelte, die von HDAC5 sogar um das Vierfache erhöht. Die HDAC7 Expression war nach Behandlung mit allen Inhibitoren vermindert. Auch hier zeigte 19i die stärksten

inhibitorischen Effekte. Eine Behandlung mit 5 μM 19i führte zu einem Abfall der HDAC7 Expression auf unter 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Demgegenüber wurde durch eine Behandlung mit 5 μM 19h nur ein HDAC7 Expressionsabfall von maximal 40% erreicht. Die Expression von HDAC9 verhielt sich hingegen sehr heterogen. Nach Inhibition mit 19h und 19i wurde sie nach Behandlung mit 2 μM hochreguliert, mit 5 μM hingegen herunterreguliert.

4.2.2.2 Auswirkung auf die α -Tubulin-Acetylierung sowie die Expression der Thymidylat-Synthase

Der Einfluss der Inhibitoren auf die Expression unterschiedlicher Proteine wurde mittels Western-Blots analysiert. Dabei wurden die Auswirkungen auf den Proliferationsmarker Thymidylat-Synthase (TS) sowie den Acetylierungsgrad von α -Tubulin untersucht. Die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V wurden 72 h mit jeweils 2 μM 19e, 19h und 19i inkubiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen (Abb. 9.2).

Die Expression von TS nahm nach Inhibitorbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bzw. den mit DMSO behandelten Zellen ab. Die stärkste Abnahme wurde dabei durch eine Inhibition mit 2 μM 19i erzielt. 19e und 19h induzierten ebenfalls eine Abnahme der TS Expression, diese war jedoch deutlich schwächer als bei 19i. Besonders in der Zelllinie VM-CUB1 wurden diese Effekte deutlich, in den Zelllinien UM-UC-3 und 639-V waren sie abgeschwächt. Die Acetylierung von α -Tubulin nahm nach Behandlung mit den Inhibitoren insgesamt zu. Dabei stieg der Acetylierungsgrad bei Behandlung mit den Inhibitoren 19e und 19h bei der Zelllinie VM-CUB1 geringfügig stärker an als durch 19i. Bei den Zelllinien UM-UC-3 und 639-V waren keine Unterschiede zwischen den Inhibitoren sichtbar; die Acetylierung von α -Tubulin war hier bei allen Inhibitoren gleich stark erhöht.

Zusammenfassend lassen die Expressionsprofile sowie die Analyse der Koloniebildungsfähigkeit und Dosis-Wirkungs-Eigenschaften nach Inhibition durch 19e, 19h und 19i den Schluss zu, dass 19i die effektivste Substanz mit dem höchsten inhibitorischen Potential ist. Aufgrund der stärkeren und im Zeitvergleich schneller einsetzenden signifikanten Proliferationseinschränkung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V wurde dieser Inhibitor für die weiteren detaillierten Analysen ausgewählt.

4.3 Behandlung der UCCs mit 19i

4.3.1 Effekte auf die Vitalität der UCCs und Kontrollzelllinien

Um zelllinienspezifische Unterschiede durch die Inhibition mittels 19i zu untersuchen, wurden die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V zunächst über 72 h mit Konzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM 19i inkubiert. Zum Vergleich wurde die Auswirkung der HDAC-Inhibition auf die embryonale Nierenzelllinie (HEK293) sowie die aus Normalgewebe angelegte und spontan immortalisierte humane uroepitheliale Zelllinie (HBLAK) untersucht. Die Experimente wurden analog zu denen mit UC-Zelllinien durchgeführt (Abb. 4.6).

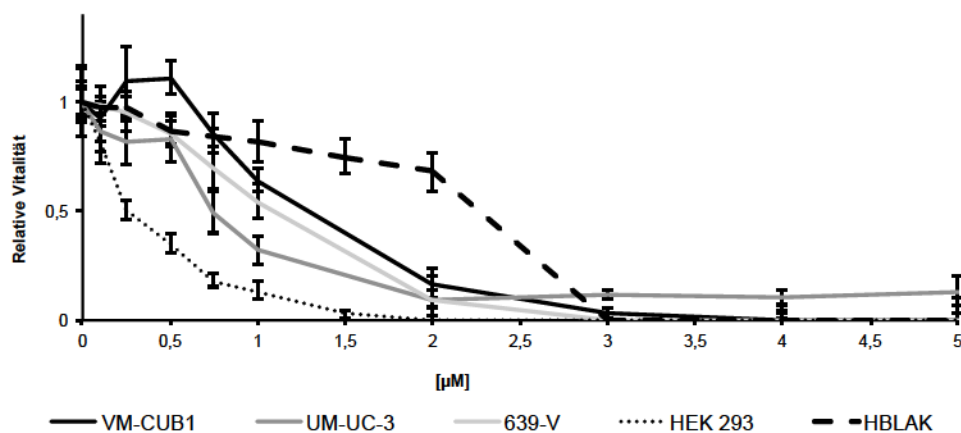


Abb. 4.6: MTT-Assay dargestellt als Dosiswirkungskurve zur Quantifizierung der Zellvitalität nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM verwendet. Als Lösungskontrolle dienten die mit DMSO in Medium (1:2000) behandelten Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitor-Konzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die Inhibitor-Konzentrationen in μM dargestellt, auf der Ordinate die relative Proliferation in Prozent. (*)

Dabei zeigte sich, dass alle UCCs ähnlich auf die Behandlung reagierten. Bis zu einer Konzentration von 2 μM reagierten die UM-UC-3 und 639-V sensibler im Vergleich zur VM-CUB1. Ab einer Konzentration von 2 μM waren die Zelllinien VM-CUB1 (epithelial/mesenchymal) und 639-V (mesenchymal) sensibler. Ein vollständiger zytotoxischer Effekt wurde bei diesen Zelllinien mit 4 μM 19i erreicht. In der Zelllinie UM-UC-3 (mesenchymal) fiel ab einer Konzentration von 2 μM die Vitalität nicht weiter ab und blieb bis zu einer Konzentration von 10 μM bei etwa 30%.

Die Kontrollzelllinien reagierten unterschiedlich stark auf die Behandlung. Bei steigenden Inhibitor-Konzentrationen nahm die Zellvitalität konzentrationsabhängig ab, allerdings war die HEK293 Zelllinie deutlich sensibler als die UCCs. Schon bei

einer Konzentration von 0,1 μM kam es zu einem direkten Verlust der Zellvitalität. Ein vollständiger zytotoxischer Effekt wurde bereits bei einer Konzentration von 1,5 μM erreicht. Der IC_{50} -Wert lag mit 0,61 μM deutlich unter dem der UC-Zelllinien. Die Zelllinie HBLAK war hingegen bei allen Inhibitionskonzentrationen deutlich resistenter, auch im Vergleich zu den UCCs. Der IC_{50} lag mit Werten über 5 μM über dem messbaren Bereich (vgl. Tab. 4.1).

Um eine Änderung der Affinität oder Spezifität des Inhibitors durch eine Metabolisierung der Substanz auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch die Wirkung des Hauptmetaboliten von 19i, nämlich der korrespondierenden Carbonsäure, untersucht. Dabei wurden Konzentrationen von 20 μM , 50 μM und 100 μM LMK235-COOH verwendet. Allerdings zeigte der Metabolit selbst bei der Verwendung von 100 μM nur eine sehr geringe inhibitorische Aktivität gegenüber UC-Zelllinien (Abb. 9.3 im Anhang).

Im weiteren Verlauf wurden die Konzentrations- und Behandlungszeiträume anhand der IC_{50} -Werte der UCCs angepasst. Um zelllinienspezifische Auswirkungen auf die Inhibition konzentrationsabhängig vergleichen zu können, wurden für die weiteren Versuche die Konzentration 1 μM und 2 μM über einen Behandlungszeitraum von 24 h und 48 h ausgewählt. Unter diesen Bedingungen war ein mittelstarker Inhibitionseffekt gewährleistet, bei dem die molekularen Auswirkungen einer HDAC-Inhibition auf die gewählten UC-Zelllinien gut erfassbar waren. Als Positivkontrolle wurde der pan-Inhibitor Vorinostat (SAHA 2,5 μM) eingesetzt. Dessen Wirkungen auf molekularer Ebene sind bereits in vielen Publikationen beschrieben, auch für UCCs (vgl. Niegisch et al., 2013).

Mittels Klonogenitätsassay wurde untersucht, welche Auswirkung eine einmalige Inkubation mit 19i auf die Koloniebildung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK hat. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert, bis die mit DMSO behandelten Zellen einen koloniereichen Zellrasen gebildet hatten (Abb. 4.7).

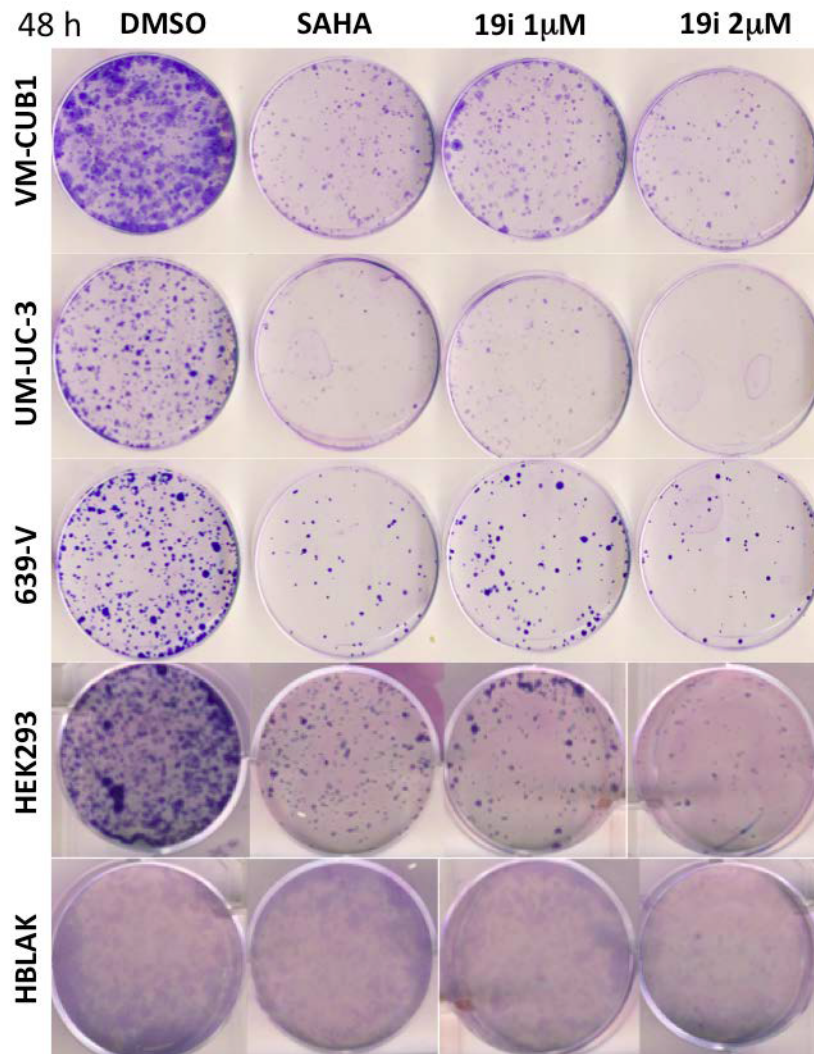


Abb. 4.7: Giemsa-Färbung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK nach Behandlung mit 19i. Es wurden Inhibitorkonzentrationen von 1 μM und 2 μM verwendet. Als Positivkontrolle wurde SAHA 2,5 μM verwendet. Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem die mit DMSO behandelten Zellkolonien annähernd konfluent waren. (*)

Im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen war die Koloniebildung innerhalb aller UCCs durch eine Behandlung mit der jeweils höheren Konzentration 19i stark beeinträchtigt. Durch die Behandlung mit 2 μM war die Koloniebildung aller drei Zelllinien sowohl nach 24 h als auch 48 h sogar stärker eingeschränkt als bei Behandlung mit 2,5 μM SAHA. HEK293 verhielt sich ähnlich wie die UC-Zelllinien. Insgesamt boten die Kontrollzelllinien korrespondierende Ergebnisse zum MTT-Assay. So wurde bei der Zelllinie HBLAK auch das klonogene Wachstum geringer durch die Behandlung mit 19i beeinträchtigt.

4.3.2 Einfluss auf den Zellzyklus

Um zu untersuchen, durch welche Mechanismen die Viabilität und die Klonogenität eingeschränkt werden, wurde der Einfluss von 19i auf die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Zellzyklus-Analyse der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V konnte nach 24 h Behandlung mit 1 μM 19i eine leichte, mit 2 μM 19i hingegen eine starke Erhöhung der G2/M-Fraktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden (Abb. 4.8). Bei den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 war die G2/M-Fraktion nach 48 h im Vergleich zur 24 h Behandlung leicht vermindert. Eine Behandlung mit 2,5 μM SAHA ergab bei beiden Zellen eine der DMSO-Kontrolle ähnelnde Zellzyklusverteilung. Die S-Phase bzw. G2/M-Fraktion zeichnete sich durch ein unregelmäßiges, „gezacktes“ Profil aus. Eine Behandlung der 639-V mit 2,5 μM SAHA zeigte nach 24 h ebenfalls eine starke Erhöhung der G2/M-Fraktion. Eine Inkubation über 48 h führte in dieser Zelllinie hingegen zu einem undefinierbaren Zellzyklus-Profil, bei dem eine Zuordnung zu den einzelnen Phasen nicht mehr möglich war.

Bei der Zelllinie HEK293 konnte zwischen beiden Behandlungszeiträumen kein Unterschied beobachtet werden (Abb. 4.9). Die Zellzykluseffekte ähnelten denen der UCCs und zeichneten sich durch einen konzentrationsabhängigen Anstieg der G2/M-Fraktion aus. In der Zelllinie HBLAK blieb das Zellzyklusprofil nach Behandlung hingegen unverändert.

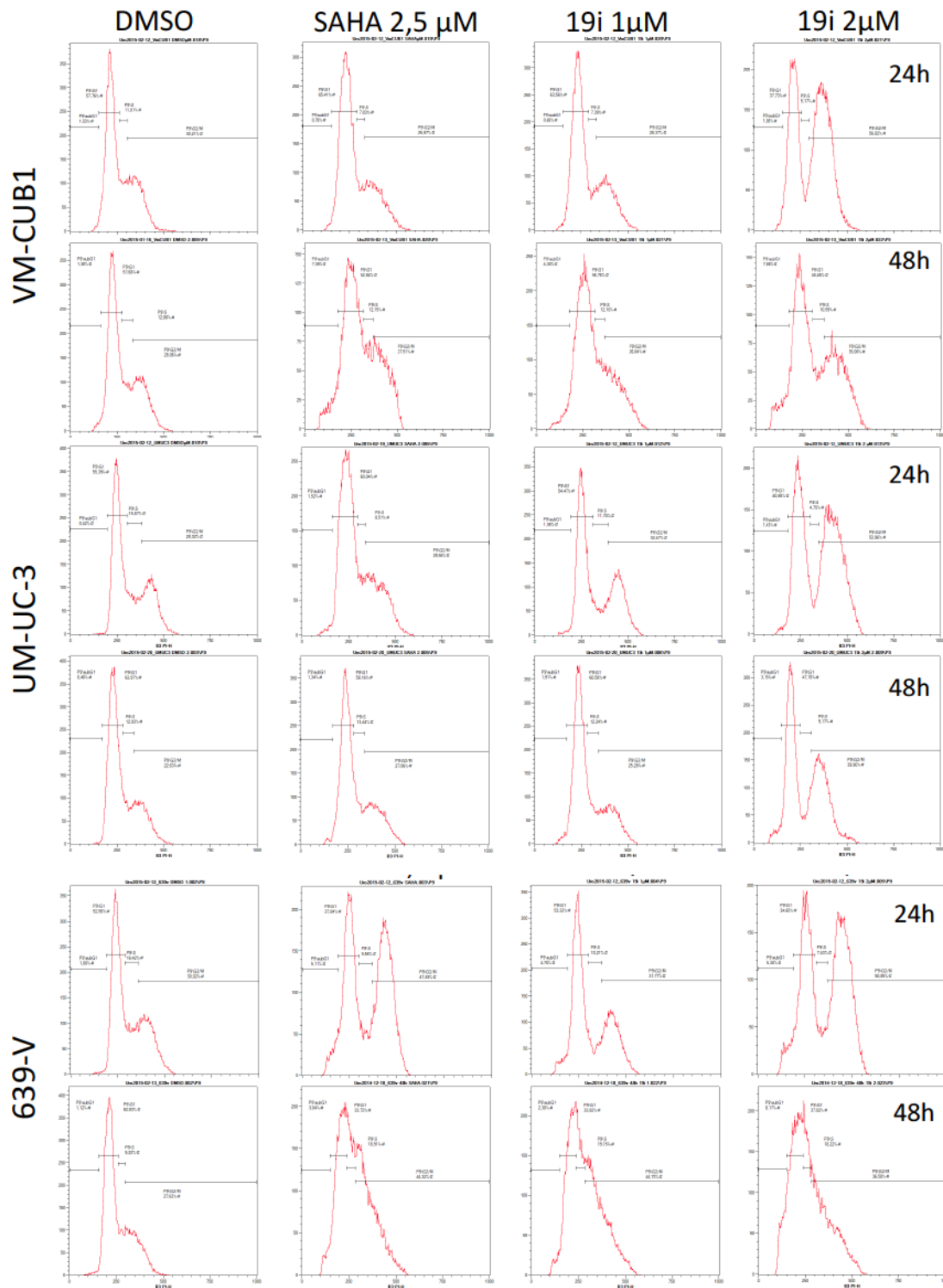


Abb. 4.8: Zellzyklus-Analyse der UC-Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V nach 24 h und 48 h. Von links nach rechts: DMSO-Kontrolle, SAHA 2,5 µM, 19i 1 µM und 19i 2 µM nach 24 h (obere Reihe) und 48 h (untere Reihe). In dem Histogramm ist auf der Abszisse die Fluoreszenzstärke dargestellt, auf der Ordinate die gemessene Zellzahl. (*).

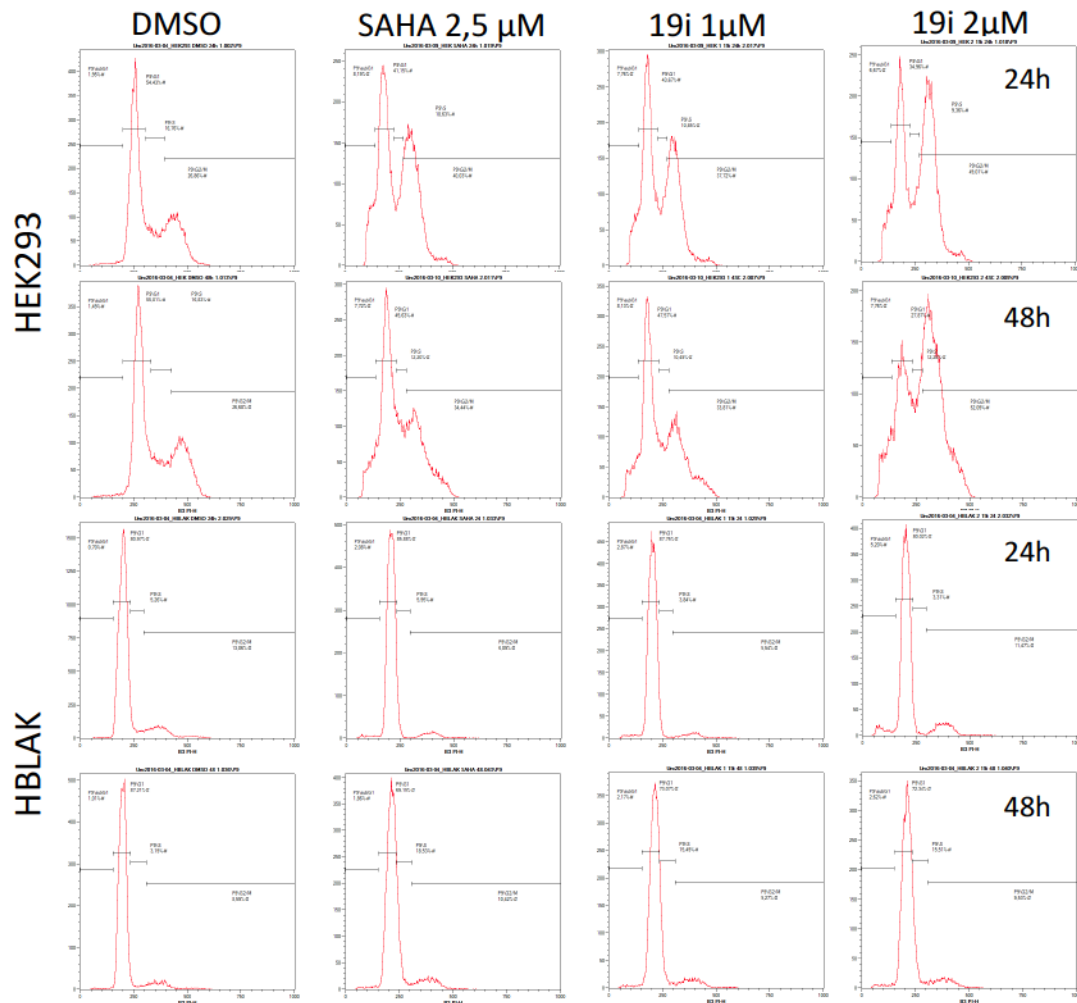


Abb. 4.9: Zellzyklus-Analyse der Zelllinien HEK293 und HBLAK nach 24 h und 48 h. Von links nach rechts: DMSO-Kontrolle, SAHA 2,5 μM , 19i 1 μM und 19i 2 μM nach 24 h (obere Reihe) und 48 h (untere Reihe). In dem Histogramm ist auf der Abszisse die Fluoreszenzstärke dargestellt, auf der Ordinate die gemessene Zellzahl. (*).

4.3.3 Zelltodmechanismen, nukleäre Veränderungen und Mitosefähigkeit

Um zu ermitteln, inwieweit Apoptose zur Zellvitalitätsabnahme beiträgt, wurde die Caspase-Aktivität mit einem Test gemessen, der die aktivierten Caspasen 3 und 7 gemeinsam erfasst. Die Ergebnisse für die Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Es wurde jeweils der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet.

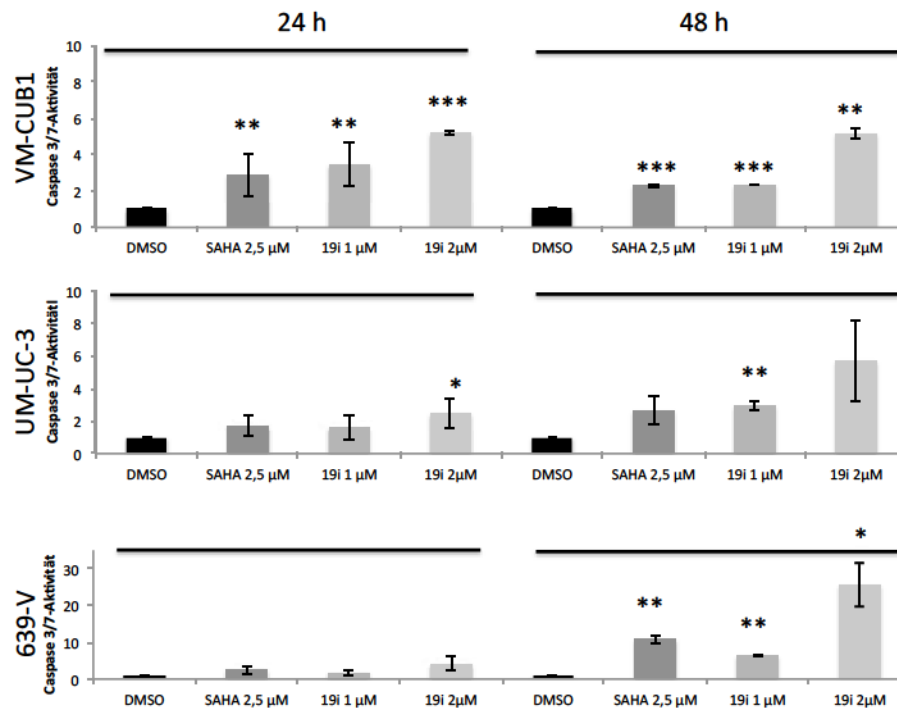


Abb. 4.10: Quantifizierung der Caspase 3/7-Aktivität nach Behandlung mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. Die Inkubationszeit betrug 24 h und 48. Es wurden Konzentrationen von 1 µM und 2 µM verwendet. Als Lösungskontrolle dienten mit DMSO in Medium (1:2000) behandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurde SAHA 2,5 µM verwendet. Aus den vier gemessenen Signalen pro Inhibitorkonzentration wurde der Mittelwert gebildet, auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert und anschließend zur relativen Proliferation in Beziehung gesetzt. Auf der Abszisse sind die Inhibitorkonzentrationen in µM dargestellt, auf der Ordinate die relativen Caspase 3/7-Aktivitäten. Die Mittelwerte nach 24 h und 48 h wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$). (*)

Es wird ersichtlich, dass die Caspase-Aktivität nach Behandlung mit 19i in allen UC-Zelllinien - konzentrationsabhängig - signifikant steigt. Nach Inkubation mit 1 µM 19i war der Caspase-Aktivitätsanstieg in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 vergleichbar mit der Positivkontrolle SAHA 2,5 µM. Eine Behandlung mit 2 µM 19i steigerte hingegen die Caspase 3/7-Aktivität um fast das Doppelte. In der Zelllinie VM-CUB1 kam es nach 24 h bzw. 48 h Inkubation mit 1 µM und 2 µM 19i zu einem hoch signifikanten Anstieg der Aktivität um das 3- bzw. 6-Fache. In der Zelllinie UM-UC-3 war der Anstieg stärker zeitabhängig. Nach 24 h Inkubation war die relative

Caspase 3/7-Aktivität nach Behandlung mit 1 μM um das 1,5-Fache bzw. nach 2 μM um das 3-Fache angestiegen. Nach 48 h waren diese Werte auf das 3- bzw. 6-Fache verdoppelt. Die Zelllinie 639-V reagierte am stärksten auf die Behandlung. Nach 24 h Inkubation war der Anstieg der Caspase-Aktivität vergleichbar mit dem in VM-CUB1 und UM-UC-3; die Aktivität war um das 1,6- (1 μM 19i) bzw. 4-Fache (2 μM 19i) erhöht. Nach 48 h führte hingegen bereits eine Inkubation mit 1 μM 19i zu einem 6-fachen Anstieg im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Allerdings stieg die Caspase-Aktivität nach 48 h Behandlung mit 2,5 μM SAHA noch stärker an. Eine Behandlung mit 2 μM 19i über 48 h führte zu einer Zunahme der Caspase-Aktivität auf das 25-Fache.

Insgesamt konnte eine signifikante Erhöhung der Caspase-Aktivität festgestellt werden, die mit steigenden Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten verstärkt wird. Die Zelllinie 639-V reagierte dabei am stärksten auf die Behandlung.

Auf Proteinebene wurde die Spaltung von PARP1 als Apoptosemarker nach Behandlung mit 19i untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

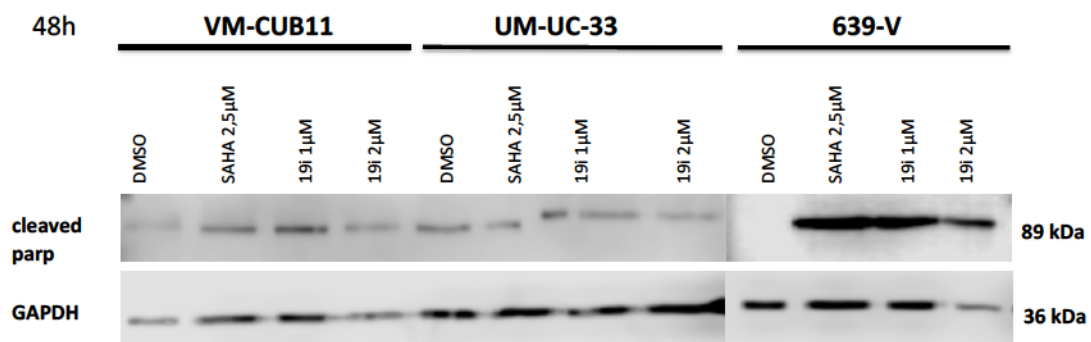


Abb. 4.11: Western Blot zur Bestimmung der Spaltung von PARP1 nach Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. Die Inkubationszeit betrug 48 h mit den Konzentrationen 1 μM und 2 μM 19i. Es wurden jeweils 15 μg Gesamtprotein aufgetragen. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

In den Zelllinien VM-CUB1 und 639-V ist ein Anstieg des Apoptosemarkers *cleaved* PARP1 zu erkennen, besonders in der Zelllinie 639-V, bei 1 μM 19i vergleichbar zu dem mit der Positiv-Kontrolle SAHA. Eine Behandlung mit 2 μM führte hingegen in allen Zelllinien zu einem schwächeren Effekt. Bei der Zelllinie UM-UC-3 konnte nach Behandlung kein Unterschied zur DMSO-Kontrolle gesehen werden.

Um Veränderungen der Zellkerne durch die Behandlung mit 19i zu untersuchen, wurde eine zytochemische Färbung mit DAPI durchgeführt. DAPI färbt dabei die DNA

im Zellkern an, das Zytoplasma bleibt fluoreszenzfrei (Abb. 4.12 A2 und B2). Eine Gegenfärbung des Zytoskeletts wurde mittels Phalloidin vorgenommen, welches die F-Aktin Filamente darstellt (Abb. 4.12 A1 und B1). Die Zellkerne wurden dann im Fluoreszenzmikroskop analysiert und quantitativ ausgewertet (Abb. 4.12 C). In den Zellen war der Nukleus stark gefärbt, der Nukleolus zeigte hingegen ein schwächeres Signal (Abb. 4.12 C1 und C2). Es waren deutliche Unterschiede zwischen den Negativkontrollen und den mit 19i behandelten UCCs zu erkennen. Die Negativkontrollen zeigten größtenteils rundliche, intakte Nuklei mit mehr- oder minder stark kondensierten Chromatin Bereichen (Abb. 4.12 C1 und C2). Fragmentierte Zellkerne waren kaum vorhanden. Ebenfalls waren mitotische Strukturen mit stärkerer Fluoreszenz in verschiedenen Teilungsphasen sichtbar (Abb. 4.12 C2 und C3). Die morphologischen Veränderungen der Zellkerne waren innerhalb der drei UC-Zelllinien vergleichbar, sodass die Ergebnisse beispielhaft anhand der Zelllinie VM-CUB1 dargestellt sind (Abb. 9.4 im Anhang).

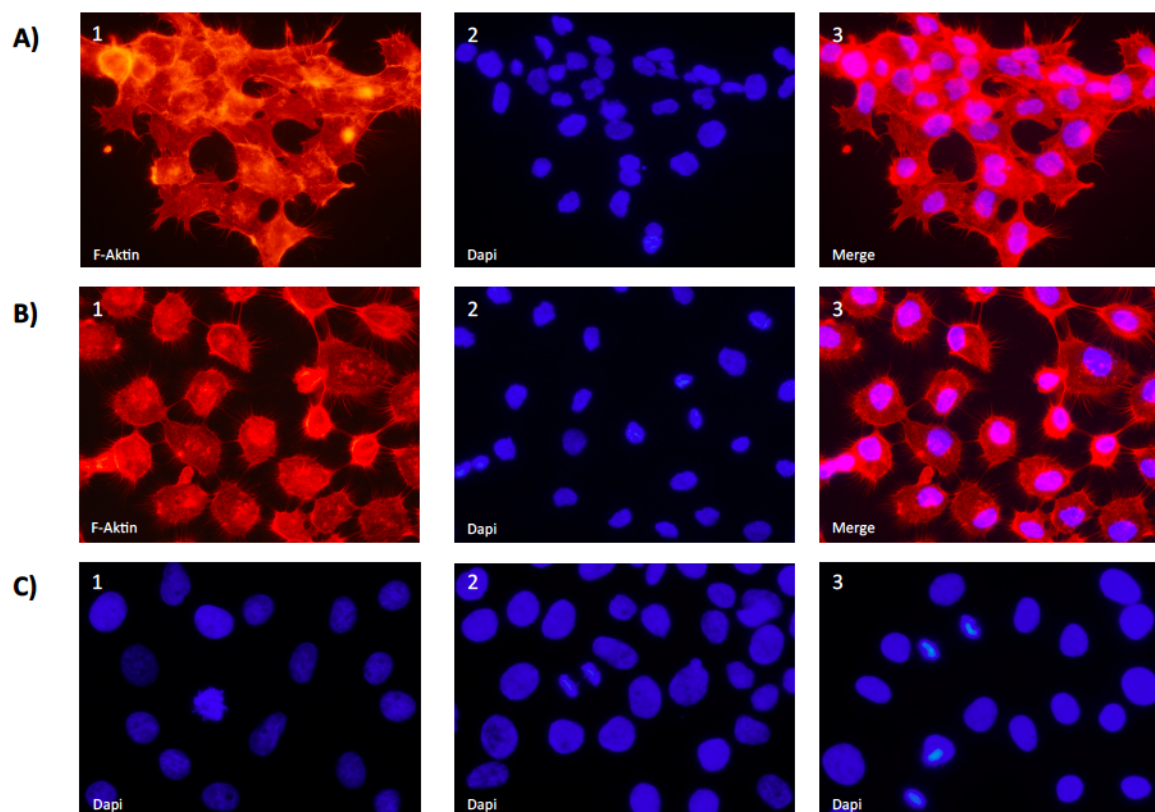


Abb. 4.12: Beispielhafte Bildausschnitte zytochemischer Fluoreszenzfärbungen. Negativ-Kontrollen der Zelllinie VM-CUB1. (A 1-3 und B 1-3) Bildausschnitte von Zellen gefärbt mit F-Aktin (1), Dapi (2) und Überlagerung (3). (C 1-3) Bildausschnitte verschiedener Zellkern-Ansammlungen. F-Aktin = Färbung des Zytoskelett. Dapi = Färbung des Zellkerns. Merge = Überlagerung der Bilder aus F-Aktin- und Dapi-Färbung. 40x Vergrößerung. Maßstab 25 μ M.

Im Gegensatz dazu traten bei den mit 19i und SAHA behandelten UCCs verschiedene apoptotische Merkmale auf (Abb. 4.13). Neben einer vermehrten Zahl fragmentierter Zellkerne (Abb. 4.13 A 1-3) waren auch vereinzelt apoptotische Abschnürungen erkennbar (Abb. 4.13 B1-3). Besonders auffällig war die vermehrte Ansammlung von unregelmäßig großen Kernfragmenten neben Zellkernen, die als Mikronuklei zu interpretieren sind (Abb. 4.13 C 1-3). Ebenfalls wurden vereinzelt, stark kondensierte Zellkernbereiche beobachtet (Abb. 4.13 C2).

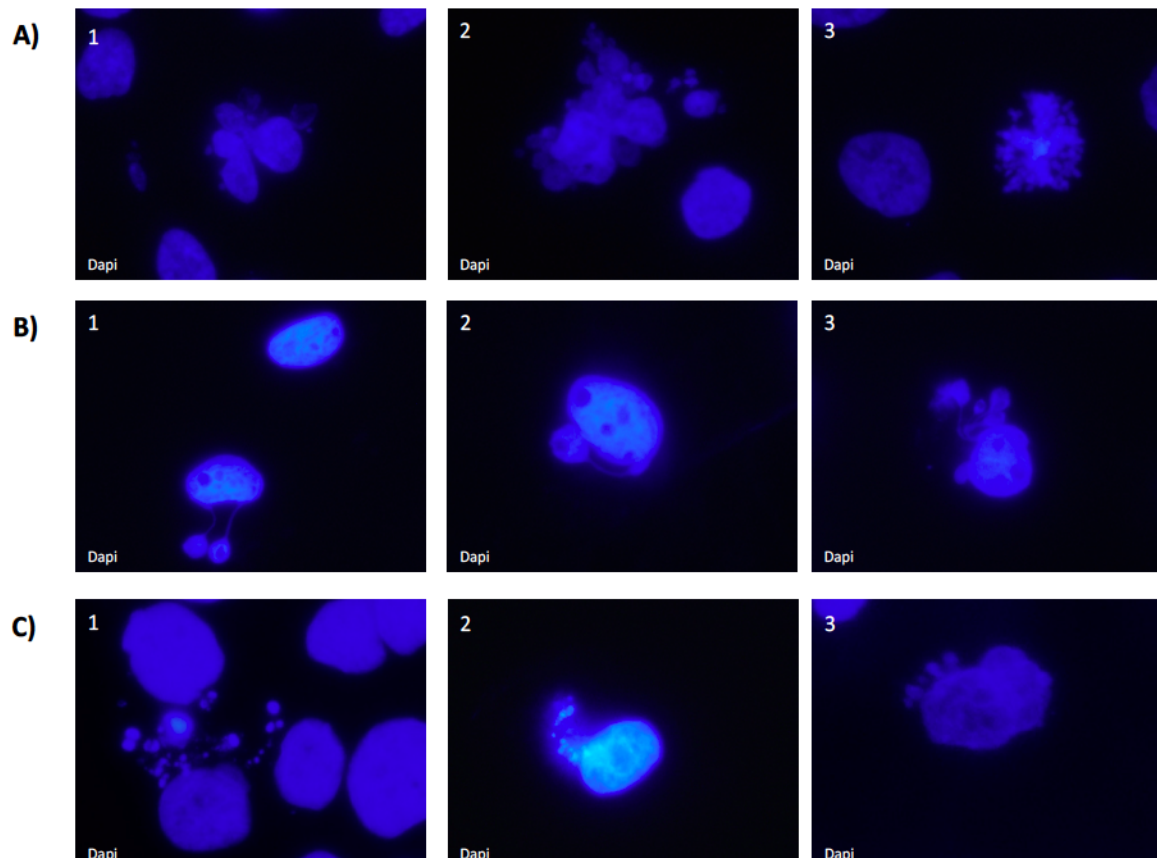


Abb. 4.13: Zytochemische Fluoreszenzfärbung mit nukleären Veränderungen nach Inkubation mit 19i. (A) fragmentierte Zellkerne. (B) apoptotische Abschnürungen. (C) Mikronuklei. Dapi = Färbung des Zellkerns. 40x Vergrößerung. Die Zellkerne wurden zur besseren Darstellung aus den original Fotos (40x Vergrößerung) ausgeschnitten und vergrößert.

Um diese Veränderungen objektiver beurteilen zu können, wurden die Zellkerne ausgezählt. Eine Behandlung mit 19i führte innerhalb der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Mitosen (Abb. 4.14 A). Diese ist jedoch auf Grund der geringen Ausgangswerte (Negativkontrolle: VM-CUB1 2,7%; UM-UC-3 1,4%) und der damit verbundenen geringen prozentualen Reduktion nach Behandlung nicht signifikant. Andererseits zeigt sich eine mit der Inkubationszeit zunehmende Anzahl an Mikronuklei. Dies war bei der Zelllinie VM-CUB1 mit einem Anstieg auf 14% nach 48 h Inkubation mit 19i am stärksten

ausgeprägt. In der UM-UC-3 waren die nukleären Veränderungen weniger ausgeprägt und über die Inkubationszeit konstant, mit einem Anstieg der Mikronuklei auf 4% (Abb. 4.14 B).

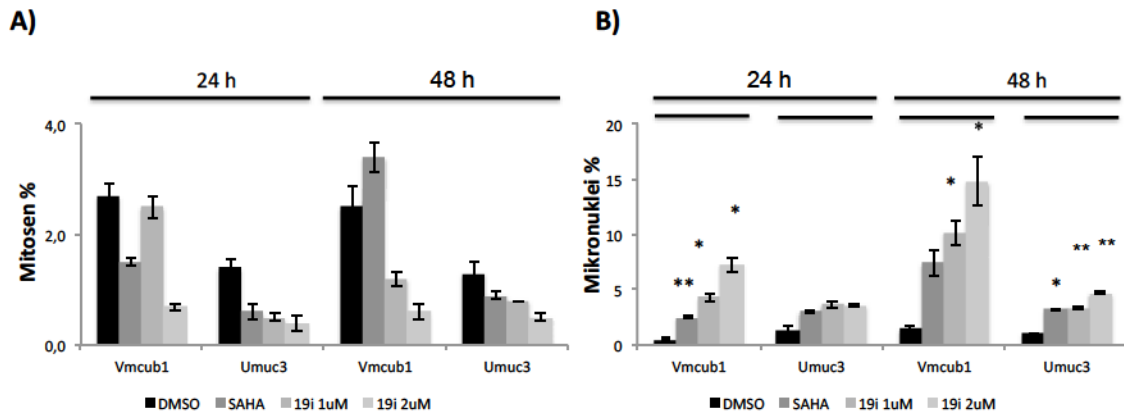


Abb. 4.14: Statistische Auswertung der zytochemischen Färbung der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3. Abgebildet ist jeweils der prozentuale Anteil an Mitosen (A) sowie Mikronuklei (B) nach 24 h und 48 h Behandlung mit 19i 1µM und 2 µM sowie SAHA 2,5 µM. Die Mittelwerte nach 24 h, 48 h wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$). (*)

4.3.4 Morphologische Veränderungen und Seneszenz

Die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC3 und 639-V sowie die benignen Kontrollen wurden über einen Zeitraum von 24 h und 48 h nach Behandlung mit 19i lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht. Beispiele sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Da kein Unterschied zwischen der Inkubationslänge erkennbar war, sind die Ergebnisse nur für die 48 h Behandlung mit 19i abgebildet.

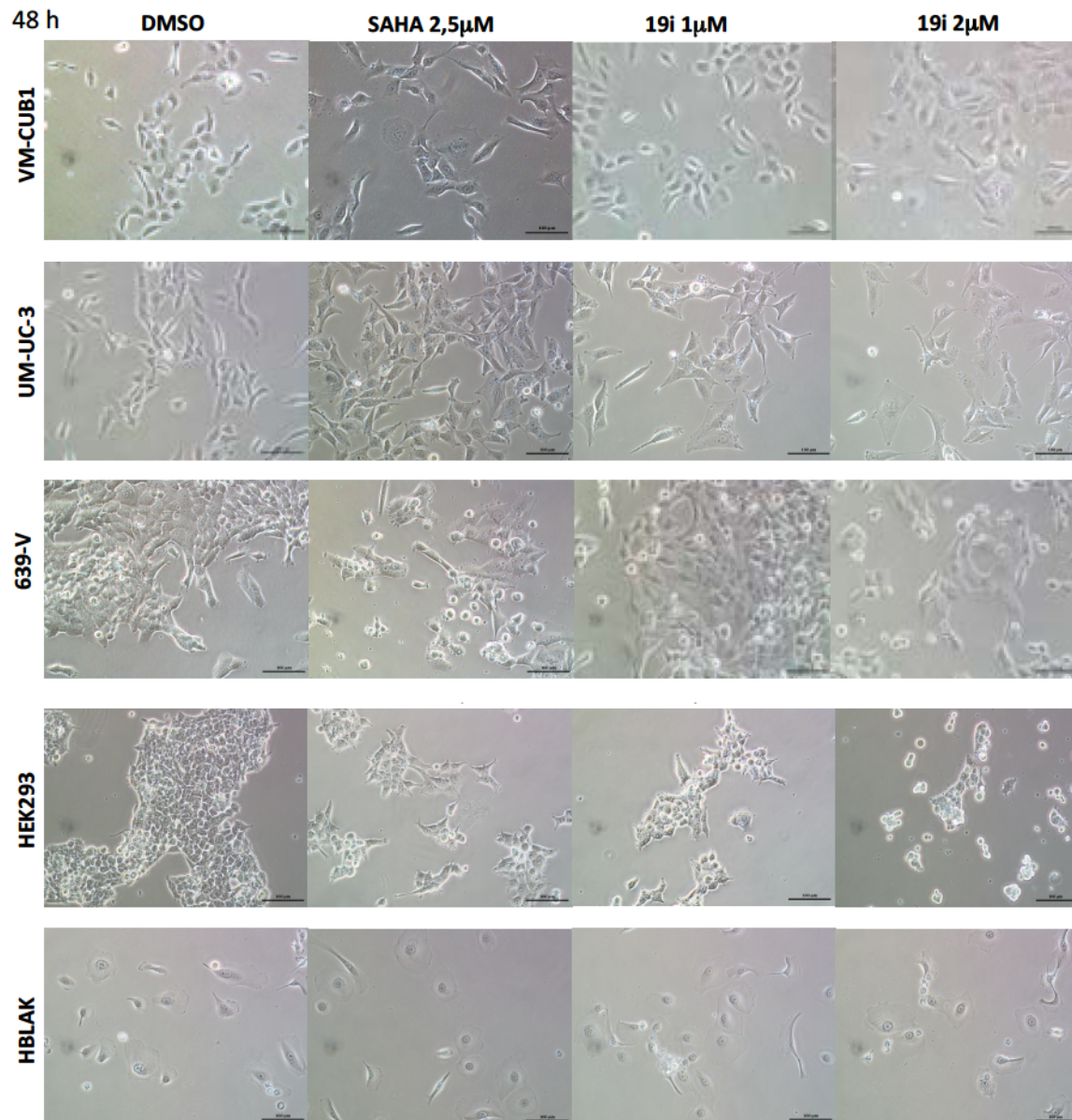


Abb. 4.15: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK nach Behandlung mit 19i. Es wurden Konzentrationen von 1 μM und 2 μM eingesetzt. Als Lösungskontrolle dienten die mit DMSO behandelten Zellen. Die Bilder wurden 48 h nach Behandlung mit 19i aufgenommen. Maßstab 100 μm (*).

Bei allen UC-Zelllinien fiel auf, dass sich viele Zellen auf Grund des zytotoxischen Effektes des Inhibitors 19i vom Schalenboden gelöst hatten und im Medium aufschwammen. Daraus resultierend zeigte sich mit steigender

Inhibitorkonzentration eine Auflockerung des Zellverbandes mit geringerer Zelldichte. Zusätzlich veränderte sich bei beiden Konzentrationen die Größe der Zellen. Der Durchmesser der unbehandelten UCCs beträgt in der längsten Ausdehnung im Durchschnitt etwa 100 μm . Nach Behandlung mit 1 μM und 2 μM 19i waren die Zellen insgesamt in ihrer Fläche deutlich vergrößert. Innerhalb des Zellrasens waren vereinzelt Zellen mit erhöhtem Zytoplasma Volumen erkennbar, die im größten Durchmesser bis zu 200 μm breit waren. Zusätzlich waren die bei den unbehandelten Zellen vorkommenden dünnen, sichelförmigen Zellausläufer nach Behandlung seltener zu beobachten. Ebenfalls wurden vermehrt rundliche Zellen sichtbar, die dem Zellverband auflagen. Dieser Effekt war besonders bei der Zelllinie 639-V nach 24 h und 48 h zu beobachten. Ein Unterschied über die Inkubationszeit konnte nicht festgestellt werden. Analog zu den UCCs wurden nach Behandlung der Zelllinien HEK293 und HBLAK mit dem Inhibitor 19i ähnliche Effekte ersichtlich. Bei der HEK293 war der Zellverband aufgelockert mit vermehrt abgerundeten Zellen, die sich vom Schalenboden gelöst hatten und dem Zellverband in mehreren Ebenen auflagen. Die Zellen wuchsen in weniger dichten, vereinzelter Kolonien auf dem Schalenboden statt in größeren Zellverbänden, wie bei der DMSO Kontrolle. Der Zelldurchmesser war bei HEK293 Zellen nicht erkennbar vergrößert, jedoch bei HBLAK Zellen. Nach Inhibition durch 19i zeigte sich bei einigen HBLAK Zellen eine konzentrations- und inkubationszeitunabhängige Verdoppelung bis Verdreifachung des Zelldurchmessers. Die Größe der Nuklei blieb dabei unverändert, lediglich das Zytoplasma zeigte eine starke Größenzunahme auf bis zu 150 μm im längsten Durchmesser.

Die morphologischen Vergrößerungen der einzelnen Zellen könnten auf eine Seneszenz zurückzuführen sein. Um dies zu überprüfen, wurde mit den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 ein Seneszenz-Nachweis über den Seneszenz-assoziierten sauren β -Galaktosidase-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse wurden lichtmikroskopisch analysiert und fotografisch festgehalten (Abb. 4.16). Beispielhaft sind die Zelllinien VM-CUB1 und HEK293 abgebildet.

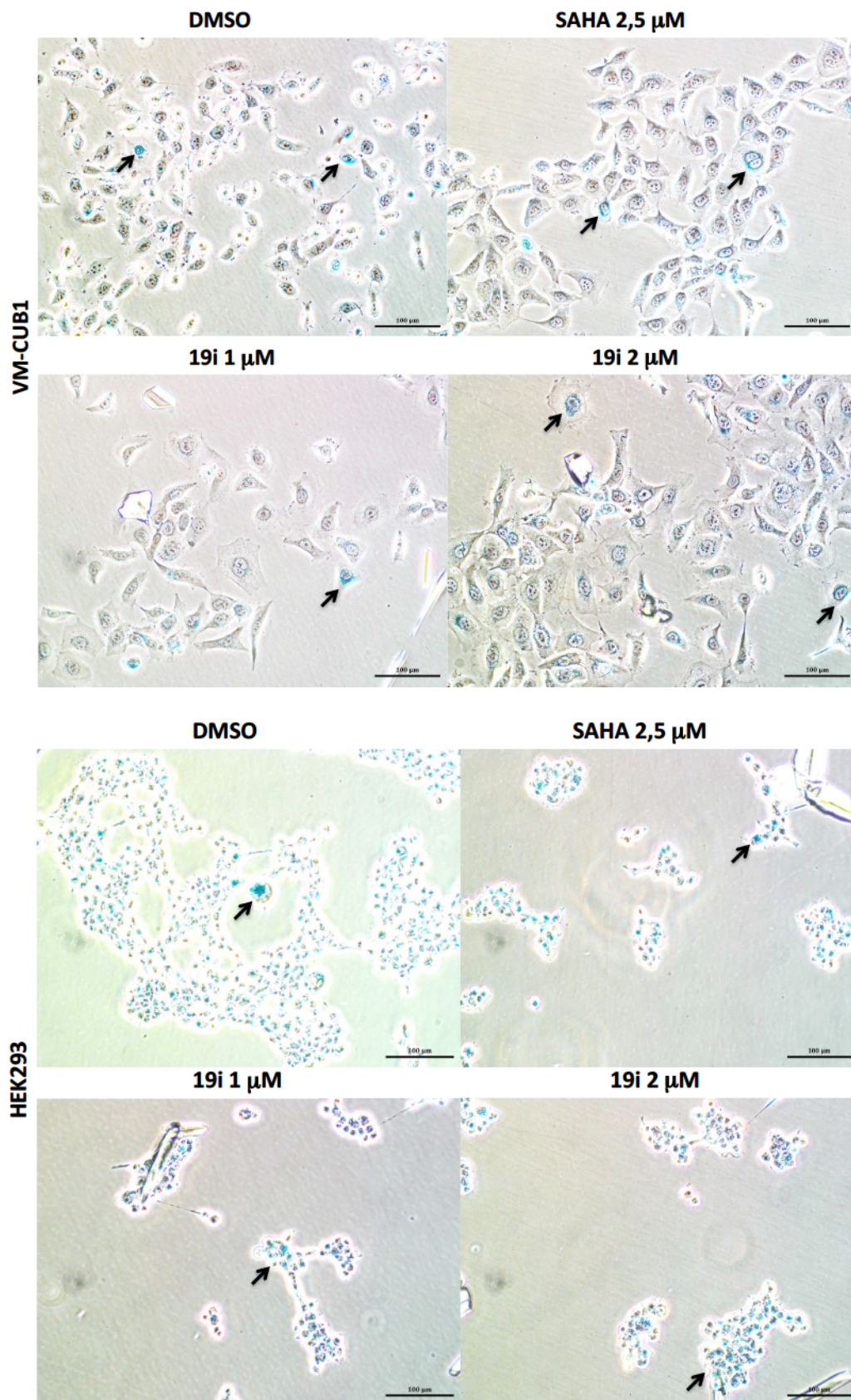


Abb. 4.16: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1 und HEK293 nach Behandlung mit 19i und folgender Detektion seneszenten Zellen mittels Seneszenz-assoziiertem sauren β -Galaktosidase-Assay. Es wurden Konzentrationen von 1 μM und 2 μM eingesetzt. Stark seneszente Zellen sind mit einem Pfeil ($\rightarrow$) gekennzeichnet. Als Lösungskontrolle dienen die mit DMSO behandelten Zellen. Die Bilder wurden nach Abschluss der Inkubationszeit (48 h) mit der X-Gal-Färbelösung aufgenommen. (*)

Sowohl in der DMSO-Kontrolle der Zelllinie VM-CUB1 als auch nach Behandlung konnten seneszente Zellen mit bläulicher Färbung gesehen werden. In der DMSO-Kontrolle waren unabhängig von der Behandlungszeit sowohl einzelne, starke und schwächer gefärbte sowie ein Großteil ungefärbter Zellen sichtbar. Nach Inhibition mit 19i war das erhöhte Zytoplasma Volumen bei der Mehrzahl der Zellen bläulich gefärbt. Eine Vielzahl der Zellen wies eine schwache, bläuliche, perinukleäre Färbung. Die Anzahl der gefärbten Zellen nahm konzentrationsabhängig zu. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen den morphologisch stark vergrößerten Zellen nach 19i Behandlung und einem Eintritt ausschließlich dieser Zellen in die Seneszenz. Die Färbung der Zellen war größenunabhängig; einige größere Zellen waren teils stark angefärbt während andere, vergleichbar große Zellen keinen Effekt auf die Seneszenz-Behandlung zeigen. Die Färbung auf den Seneszenzmarker SA- β -Galaktosidase ergab bei der Zelllinie HEK293 keinen Unterschied vor und nach Behandlung mit 19i. Sowohl die DMSO-Kontrollen als auch die behandelten Zellen enthielten einen ähnlich großen Anteil bläulicher Zellen.

4.3.5 Expressionsveränderungen nach Behandlung mit 19i

Für die Analyse von verschiedenen nachgeschalteten Zielgenen sowie unterschiedlichen Expressionsniveaus der Klasse IIa HDACs nach Behandlung mit 19i wurden die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V über 24 h und 48 h inkubiert und jeweils RNA und Protein isoliert. Eine Auswertung der Protein-Expression erfolgte nach 48 h Inkubation.

4.3.5.1 Auswirkung auf die RNA-Expression der Klasse IIa HDACs

Die Auswirkung auf die mRNA Expression der Klasse IIa HDACs in den verschiedenen Zelllinien wurde über quantitative RT-PCR verfolgt. Die relative Klasse IIa HDAC Expression nach Behandlung ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

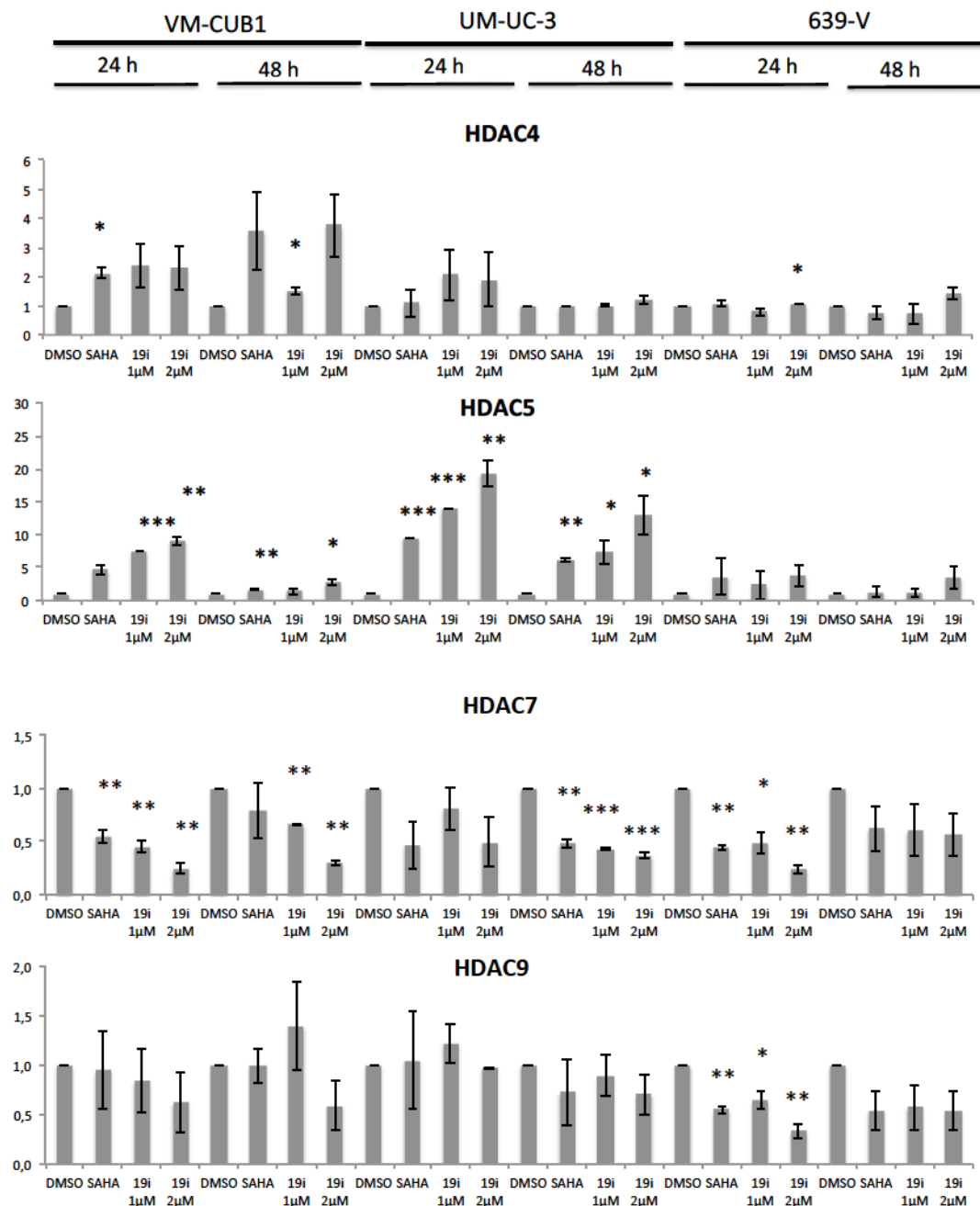


Abb. 4.17: Relative Expression von HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9 mRNA in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Abszisse: unterschiedliche Behandlungen in μM ; Ordinate: relative RNA-Menge. Die Mittelwerte wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). (*)

Wie bereits nach 72 stündiger Behandlung (Abs. 4.2.2.1) beschrieben, zeigte sich auch nach 24 h bzw. 48 h Behandlung mit 19i eine leicht erhöhte Expression von HDAC4, die sowohl von Konzentration als auch Inkubationszeit abhängig war. Diese war in der Zelllinie VM-CUB1 am stärksten ausgeprägt. Die relative RNA-Menge stieg hier nach 48 h Behandlung mit 2 μM 19i auf das 4-Fache an. Bei der Zelllinie UM-UC-3

stieg die HDAC4 Expression nach 24 h ebenfalls konzentrationsunabhängig um das Zweifache an. Eine Inkubation über 48 h hatte keine stärkeren Auswirkungen auf die HDAC4 Expression. Dies ist ebenfalls in der Zelllinie 639-V ersichtlich.

Die HDAC5 mRNA Expression war hingegen in allen Zelllinien, besonders nach 24 h Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3, stark erhöht. Die Expressionsstärke nahm ebenfalls mit steigender InhibitorKonzentration signifikant zu. Eine Behandlung mit 2 μ M 19i führte in allen drei Zelllinien zu einem stärkeren Expressionsanstieg von HDAC5 mRNA als eine Behandlung mit dem pan-HDAC Inhibitor SAHA (2,5 μ M). Die stärkste Auswirkung auf das HDAC5 Expressionsniveau war in der Zelllinie UM-UC-3 sichtbar. Nach 24 h stieg die relative RNA-Menge nach Behandlung mit 1 μ M und 2 μ M auf das 16- bzw. 25-Fache. Nach weiteren 24 h Inkubation sank die Expression leicht auf das 8- bzw. 14-Fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Zelllinie 639-V reagierte mit einer Erhöhung um das 4-Fache nach 48 h Behandlung insgesamt am geringsten auf die Behandlung. Die HDAC5 Expression war dabei nach 24 h stärker erhöht als nach 48 h.

Die HDAC7 mRNA Expression war nach 24 h und 48 h Behandlung in allen drei Zelllinien signifikant herunterreguliert. Dabei nahm mit steigender InhibitorKonzentration die Expression ab. Bei den Zelllinien VM-CUB1 und 639-V war diese Abnahme nach 24 h stärker ausgeprägt als nach 48 h; die relative RNA-Menge war im Durchschnitt auf 0,5 bzw. 0,3 der DMSO-Kontrolle herabgesetzt. Diese Werte wurden bei der Zelllinie UM-UC-3 erst nach 48 h Behandlung mit 19i erreicht.

Die HDAC9 Expression war nach Behandlung zelllinienübergreifend stark heterogen. Eine Behandlung über 24 h führt bei der Zelllinie VM-CUB1 und 639-V zu einem stärkeren Expressionsabfall nach Behandlung. Nach 48 h Behandlung mit 1 μ M 19i war die HDAC9 Expression in der Zelllinie VM-CUB1 hingegen leicht erhöht; dieser Effekt war ebenfalls in der Zelllinie UM-UC-3 nach 24 h sichtbar. Die niedrigsten Expressionswerte (0,5 der Kontrolle) werden in der Zelllinie 639-V nach Behandlung mit 2 μ M 19i über 24 h erreicht.

Insgesamt wird ersichtlich, dass nach pharmakologischer Inhibition durch 19i besonders in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 die HDAC5 mRNA Expression stark induziert wird und die HDAC4 Expression ebenfalls geringfügig ansteigt. Die HDAC7 Expression ist hingegen in allen drei Zelllinien nach Behandlung leicht vermindert.

4.3.5.2 Auswirkung auf Zellzyklus- und Proliferationsmarker sowie α -Tubulinacetylierung

Weiterhin wurde die zelllinienspezifische Auswirkung auf die mRNA-Expression und Aktivität von Zielgenen nach einer HDAC Klasse IIa Modulation untersucht. Thymidylat-Synthase katalysiert einen essentiellen Schritt in der DNA-Biosynthese und steht daher mit verstärkter Zellproliferation in Verbindung. p21 fungiert als Inhibitor der Cyclin-abhängigen-Kinasen, v.a. von CDK2 und CDK4-Komplexen, und kann somit die Progression des Zellzyklus hemmen.

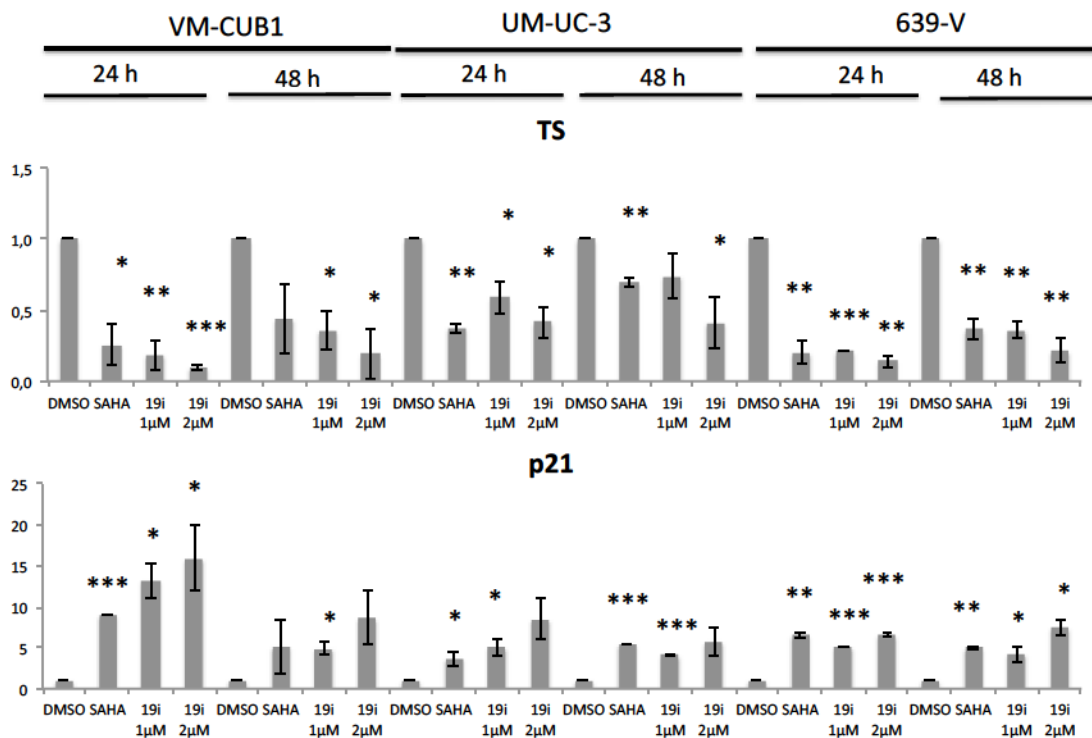


Abb. 4.18: Relative Expression von Thymidylat-Synthase und p21 mRNA der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V nach Behandlung mit dem HDACi 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Abszisse: unterschiedliche Behandlungen in μ M; Ordinate: relative RNA-Menge. Die Mittelwerte wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$). (*)

Wie Abbildung 4.18 zeigt, kam es innerhalb aller drei Zelllinien zu einem - teils signifikanten - Expressionsabfall des Proliferationsmarkers Thymidylat-Synthase nach 24 h und 48 h Behandlung mit 19i. Die Expression war dabei nach 24 h Behandlung stärker beeinflusst als nach 48 h und nahm konzentrationsabhängig ab. Der stärkste Abfall wird in der Zelllinie VM-CUB1 deutlich. Die relative RNA-Menge war hier nach 24 h Behandlung auf ein Zehntel der DMSO-Kontrolle vermindert. Die mRNA Expression des Zellzyklusregulators p21 war hingegen in allen Zelllinien nach Behandlung stark und signifikant erhöht. Der Anstieg war ebenfalls

konzentrationsabhängig und nach 24 h Behandlung stärker ausgeprägt. Der stärkste Expressionsanstieg wird in der Zelllinie VM-CUB1 nach 24 h Behandlung deutlich; die durchschnittliche relative RNA-Menge war hier auf das 20- bzw. 25-Fache gesteigert. Nach 48 h Behandlung war, ähnlich wie bei den Zelllinien UM-UC-3 und 639-V, die Expression auf das ca. 5- bzw. 10-Fache erhöht.

Die Veränderungen im Expressionsprofil von Proliferationsmarkern und Zellzyklus-Regulatoren wurden auch in der Zelllinie HBLAK verfolgt (Abb. 4.19). Insgesamt zeigt sich bereits nach 24 h eine starke Abnahme der Expression von Thymidylat-Synthase auf relative Expressionswerte unter 15%. Die Verwendung von 1 μ M 19i ähnelt dabei dem durch 2,5 μ M SAHA induzierten Expressionsabfall, 2 μ M 19i führen hingegen zu einem Expressionsabfall auf unter 5%. Die Expression von p21 mRNA stieg inkubationszeitabhängig mit steigender Konzentration von 19i nur geringfügig an. Lediglich eine Verdopplung der p21 Expression wurde durch eine Inkubation mit 2 μ M 19i über 48 h erreicht. Verglichen mit den UC-Zelllinien war die Thymidylat-Synthase Expression durch die Inhibition stärker eingeschränkt, der Anstieg von p21 war hingegen in der Kontrollzelllinie deutlich geringer.

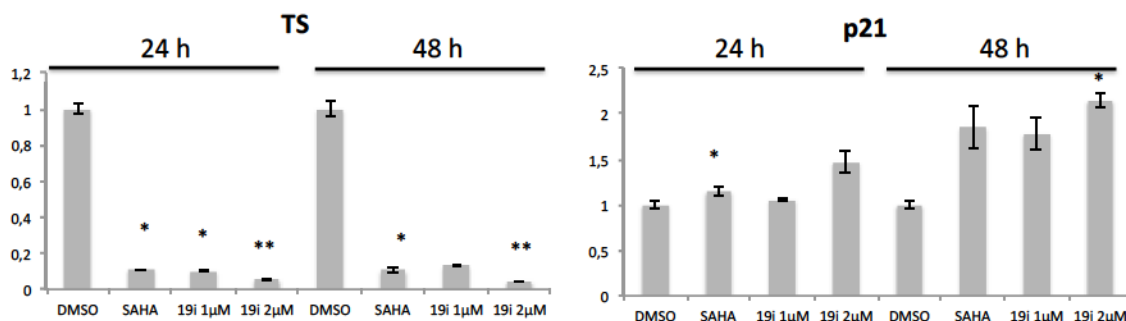


Abb. 4.19: Relative Expression von Thymidylat-Synthase und p21 mRNA der Zelllinie HBLAK nach Behandlung mit dem HDACi 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Die Mittelwerte wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Ebenfalls wurde die Expression des CDK-Inhibitors p21 mittels Western Blot gemessen (Abb. 4.20). Wie bereits für die mRNA Expression, ist die Expression von p21 Protein nach Behandlung erhöht. In allen UC-Zelllinien kam es zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der p21 Expression nach Behandlung. Diese

war bereits nach Inhibition durch 1 μM 19i stärker als bei Behandlung mit 2,5 μM SAHA.

Weiterhin wurde der Acetylierungsstatus von α -Tubulin ermittelt, um den Einfluss von 19i auf HDAC6 in der Zelle zu analysieren. In allen drei UC-Zelllinien ist ein Anstieg des Acetylierungsgrad von α -Tubulin zu erkennen, unabhängig von der Dosis des Inhibitors. Die Wirkung war etwas schwächer als die von SAHA (Abb. 4.20).

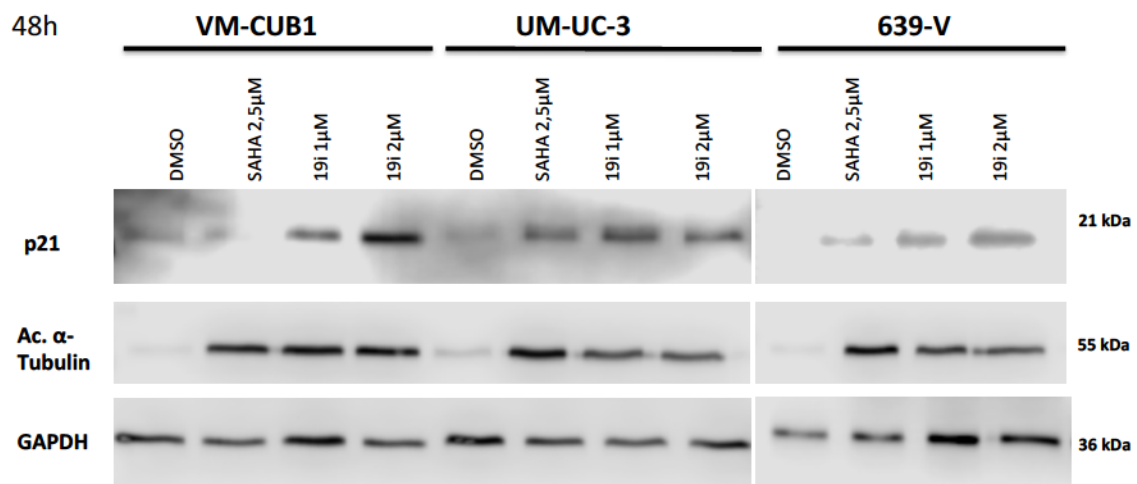


Abb. 4.20: Western Blot zur Bestimmung des Expressionsstatus von p21 und der Acetylierung α -Tubulin nach Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. Die Inkubationszeit betrug 48 h mit den Konzentrationen 1 μM und 2 μM 19i. Es wurden jeweils 15 μg Gesamtprotein aufgetragen. GAPDH diente als Ladungskontrolle. (*)

4.3.5.3 Veränderung in der Histonacetylierung

Um festzustellen, in welchem Umfang sich 19i auf die globale Histonacetylierung auswirkt, wurde überprüft, ob der verwendete Inhibitor einen Effekt auf den Acetylierungsstatus von Histon H3 und H4 hat (Abb. 4.21 A). In den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 stieg die Acetylierung von Histon H3 und H4 nach Behandlung mit 19i stark an. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen gesehen werden; der Acetylierungsgrad war jedoch deutlich stärker als bei Inhibition mittels 2,5 μM SAHA. In der Zelllinie 639-V wurde ebenfalls eine Induktion von acetyliertem Histon H3 und H4 durch 19i detektiert; ihre Stärke war vergleichbar mit der von 2,5 μM SAHA.

Auf Grund der beschriebenen Proliferationszunahme im geringen Konzentrationsbereich zwischen 0,1 μM und 0,25 μM 19i (vgl. Abs. 4.2.1) wurde überprüft, ob eine Inhibition mit 0,1 μM Auswirkungen auf den Acetylierungsstatus der Histone hat (Abb. 4.21 B). Erstaunlicherweise konnte in der Zelllinie VM-CUB1 ein Anstieg der Histon H3 Acetylierung nach 24 h und 48 h nachgewiesen werden. Bei

der Zelllinie UM-UC-3 war hingegen kein Unterschied im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erkennbar. In beiden Zelllinien konnte ebenfalls eine leichte Veränderung der H4-Acetylierung nach Inkubation mit 0,1 μM 19i detektiert werden. Die Intensität der Banden war jeweils im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht verstärkt, jedoch deutlich schwächer als nach einer Inkubation mit 1 μM 19i.

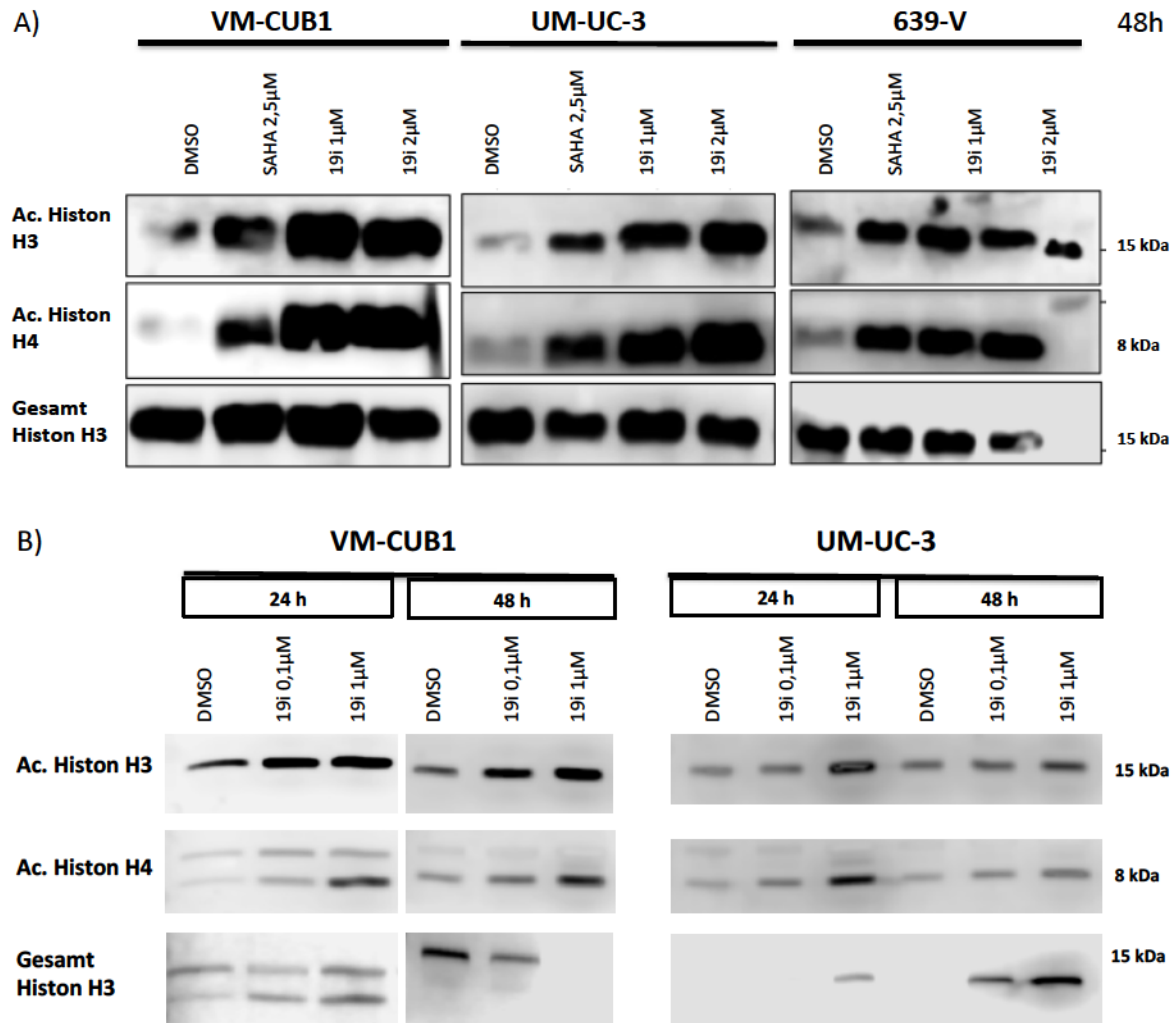


Abb. 4.21: Western Blot zur Bestimmung der Acetylierung von Histon H3 und H4 nach Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. (A) Die Inkubationszeit betrug 48 h mit den Konzentrationen 1 μM und 2 μM 19i (*). (B) Die Inkubationszeit betrug 24 h bzw. 48 h mit den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM 19i. Aufgetragen wurden 2 μg Gesamtprotein. Totales Histon H3 diente als Ladungskontrolle.

4.4 Effekte der Überexpression von HDAC4 in den UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3

Basierend auf der Ausgangsfragestellung sollte überprüft werden, wie eine verstärkte Expression von HDAC4 die Wirkung von 19i beeinflusst. Dazu wurden lentiviral mit HDAC4 stabil transduzierte UCC-Zellvarianten verwendet. Als Kontrollen wurden Zelllinien verwendet, die mit einem Leervektor (LV) oder mit HDAC1 stabil transduziert worden waren (Abb. 4.22 A und B). Sie werden als HDAC4-, HDAC1- und

LV-Zellvarianten bezeichnet. Es wurden die Zelllinie VM-CUB1 und UM-UC-3 wegen ihres unterschiedlichen Phänotyps und ihrer unterschiedlichen HDAC4 mRNA- und Protein-Expressionsstärke ausgewählt. Da sich im Verlauf der Arbeit ein verändertes Wirkspektrum des Inhibitors 19i herausgestellt hat (vgl. Abs. 5.1), trägt ein Großteil der Versuche jedoch nicht zur sinnvollen Beantwortung der ursprünglichen Fragestellung bei. Daher sind die betreffenden Ergebnisse im Anhang zu finden. Allerdings sind im Zuge der Versuche interessante Ergebnisse zu Eigenschaften der unbehandelten, mit HDAC4 stabil transduzierten UCC-Zellvarianten aufgefallen, welche im folgenden dargestellt werden.

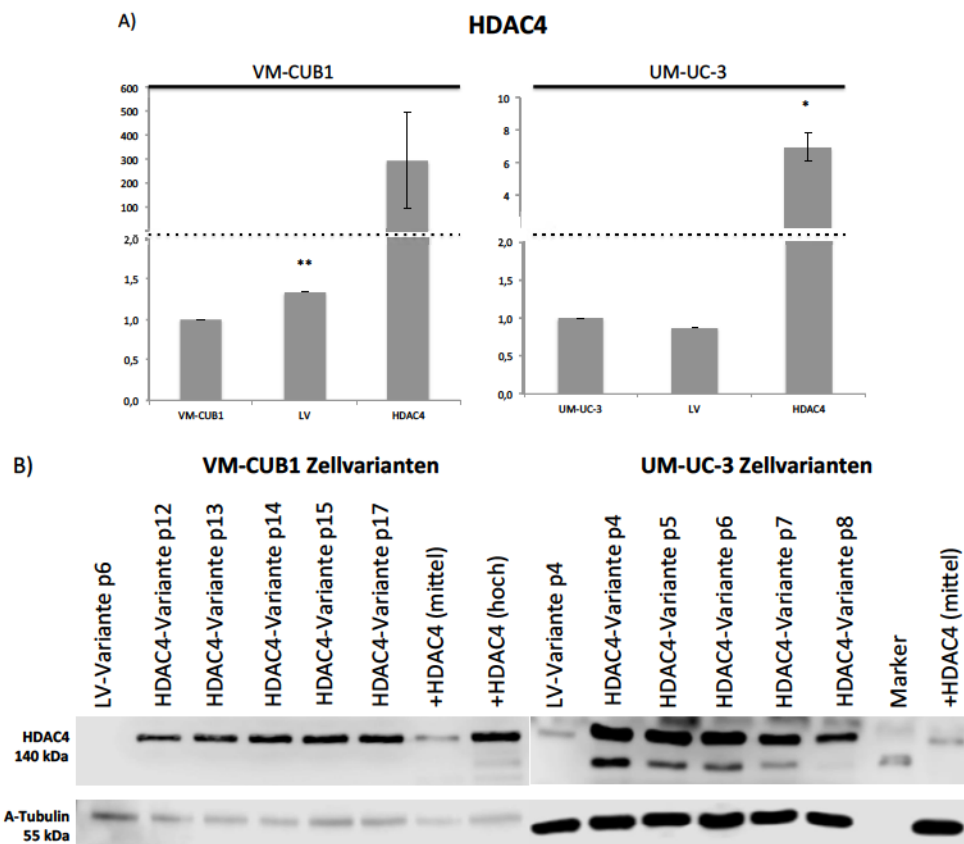


Abb. 4.22: HDAC4 Überexpression in den transduzierten Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3. (A) HDAC4 mRNA-Expressionslevel. Auf der Abszisse sind die jeweiligen Zelllinien, auf der Ordinate das relative RNA-Menge normiert auf die Mutterzelllinie dargestellt (*). **(B)** HDAC4 Proteinexpression über verschiedene Passagen in den transduzierten Zellvarianten VM-CUB1 und UM-UC-3. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle. LV= Leervektor. +HDAC4= Positiv Kontrolle (*)

4.4.1 Proliferationsfähigkeit und Morphologie der unbehandelten HDAC4 Zellvarianten

Bei der fortlaufenden Kultivierung der UCC-Zellvarianten (Abs. 3.1.2.) wurde über mehrere Passagen hinweg konstant ein verlangsamtes Wachstum der VM-CUB1-HDAC4 Zellvarianten im Vergleich zu deren Mutterzelllinie VM-CUB1 sowie VM-CUB1-LV und HDAC1 Zellvarianten festgestellt. Unter gleichen Passage-Bedingungen

brauchten die VM-CUB1-HDAC4 Zellvarianten im Durchschnitt 48 h länger, um einen annähernd konfluenten Zellrasen am Flaschenboden zu bilden. Dies wird ferner anhand des Klonogenitätsassay der unbehandelten Zelllinien deutlich (Abb. 4.23 A). Nach Aussaat der gleichen Anzahl an Zellen und anschließender Inkubation über 10 Tage zeigten die VM-CUB1-HDAC4 Zellen eine deutlich verminderte Koloniezahl im Vergleich zur Mutterzelllinie VM-CUB1 und der LV-Kontrolle. Ebenfalls sind die Kolonien der VM-CUB1-HDAC4 Zellvarianten in der Größe stark reduziert. Bei der Zelllinie UM-UC-3 konnte hingegen kein Unterschied in der Kolonienzahl zwischen den UM-UC-3-HDAC4 Zellen und den Kontrollen gesehen werden.

Das dichteabhängige Wachstum der HDAC4 Zellvarianten wurde mittels einer Verdünnungsreihe überprüft. Nach Aussaat gleicher Zellzahl zeigten die HDAC4 Zellvarianten eine verminderte Kolonienzahl im Vergleich zur VM-CUB1. Nach weiterer Reduktion der Zellzahl auf 1:2, 1:4 und 1:8 des Ausgangswertes konnte eine stärkere Abnahme der VM-CUB1 HDAC4 Kolonien beobachtet werden (Abb. 4.23 B).

Ähnliche Effekte konnten auch im Proliferations-Assay dieser Zellen gesehen werden (Abb. 4.23 C). Es wurde wiederum die gleiche Zellzahl der HDAC4 überexprimierenden VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellvarianten sowie deren Kontrollen unter Standardbedingungen mit DMSO inkubiert. Die Vitalität wurde nach 24 h, 48 h und 72 h mittels MTT-Assay überprüft. Über alle drei ermittelten Zeitpunkte hinweg ist die Proliferation der VM-CUB1-HDAC4 Zellvarianten im Vergleich zur Zelllinie VM-CUB1 signifikant vermindert. Nach 24 h ist die Wachstumsfähigkeit der HDAC4 Zellvarianten um 60% stärker eingeschränkt im Vergleich zur Mutterzelllinie VM-CUB1. Mit zunehmender Zeit nimmt die Wachstumsdifferenz hingegen ab, sodass nach 72 h die Proliferation nur noch um 30% vermindert ist. Anhand des Klonogenitätsassay wird jedoch deutlich, dass auch eine längere Wachstumsperiode über 10 Tage zu keinem Ausgleich der anfänglichen Wachstumseinschränkung der HDAC4 Zellvarianten führt. Die UM-UC-3-HDAC4 Zellvarianten zeigen hingegen nur nach 24 h Inkubation eine nicht signifikante Tendenz zur Wachstumsverminderung. Nach 48 h und 72 h nahm die gemessene Vitalität der UM-UC-3 HDAC4 Zellvarianten hingegen im Vergleich zu den UM-UC-3 Kontrollen und UM-UC-3-LV zu.

Zellmorphologisch konnte allerdings kein Unterschied zwischen den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren HDAC4 Zellvarianten gesehen werden (Abb. 9.8 im Anhang).

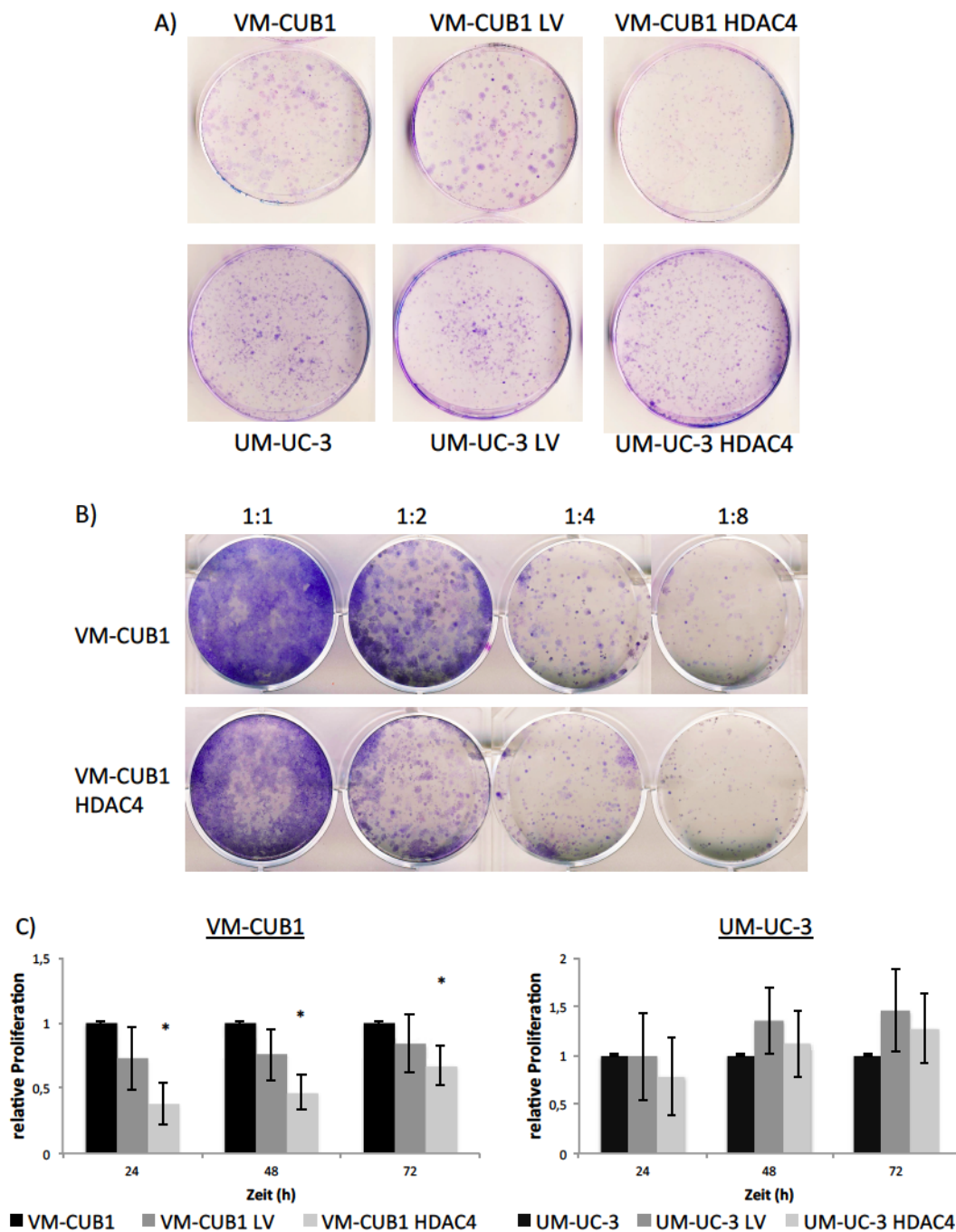


Abb. 4.23: (A) Klonogenitätsassay, (B) Verdünnungsreihe und (C) MTT-Proliferationsassay der unbehandelten Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren transduzierten HDAC4 und LV Zellvarianten. (A) Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem sich sichtbare, konfluente Kolonien gebildet hatten. Die Inkubationszeit betrug ca. 10 Tage (*). **(B)** Giemsa-Färbung der Zelllinien VM-CUB1 und VM-CUB1 HDAC4 Zellvarianten. Es wurde die gleiche Anzahl an Zellen ausgesät und nachfolgend 1:2, 1:4 und 1:8 verdünnt. Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem in der unverdünnten Probe annähernd konfluente Kolonien sichtbar waren. **(C)** Die Inkubationszeit des MTT-Proliferationsassay betrug 24 h, 48 h und 72 h. Es wurden die Lösungskontrollen (DMSO in Medium) ausgewertet. Aus den vier gemessenen Extinktionen wurde der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde auf den VM-CUB1-Wert des jeweiligen Zeitpunktes normiert und aus drei Zeitreihen der Mittelwert gebildet. Auf der Abszisse ist die Inkubationszeit, auf der Ordinate ist die relative Proliferation in Prozent dargestellt. Die Mittelwerte wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4.4.2 Auswirkung der HDAC4 Überexpression auf Proliferations- und Zellzyklusmarker sowie Klasse IIa mRNA Expression

Im unbehandelten Zustand war bei den VM-CUB1-HDAC4 Zellen die Expression von Thymidylat-Synthase deutlich (etwa um das 5-Fache) stabil erhöht. Die p21 Grundexpression war hingegen zwischen der Mutterzelllinie VM-CUB1 und den HDAC4-Zellen im unbehandelten Zustand ähnlich hoch. Die Mutterzelllinie UM-UC-3 sowie deren HDAC4-Variante zeigten unbehandelt keinen Unterschied in der Grundexpression von Thymidylat-Synthase oder p21 (Abb. 4.24).

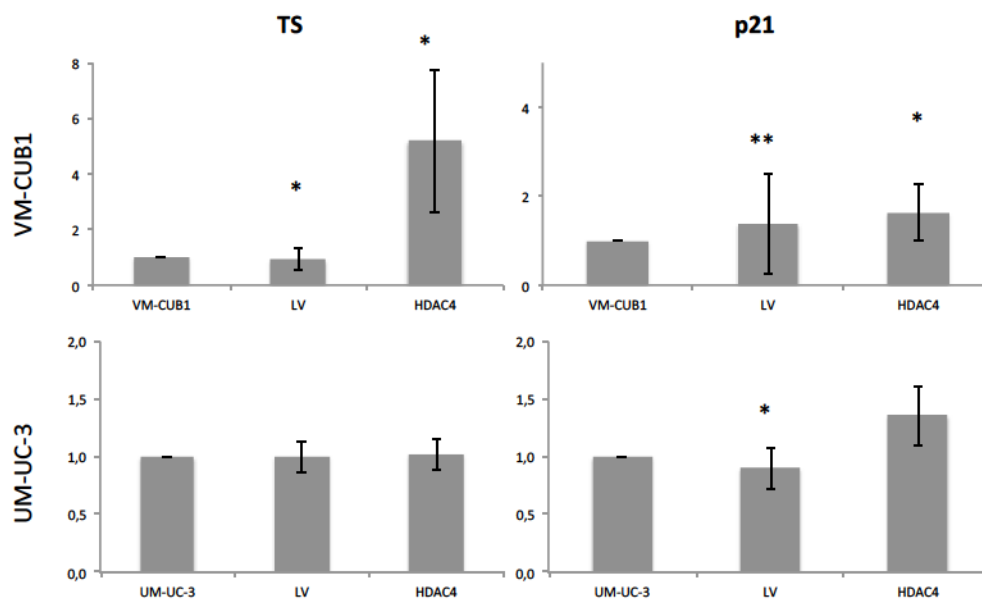


Abb. 4.24: Relatives Expressionsniveau von Thymidylat-Synthase und p21 der Zelllinie VM-CUB1 und UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC4 Überexpression. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der Mutterzelllinien normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Abszisse: Zelllinien; Ordinate: relative RNA-Menge. Die jeweiligen Werte sind zu einem Niveau von 5% (*), 1% (**) bzw. 0,1% (***) signifikant. (*)

In den VM-CUB1 HDAC4 Zellvarianten war auf Grund der experimentellen Überexpression die HDAC4 mRNA Expression etwa 400-fach erhöht (Abb. 4.25). Die Expression der anderen Klasse IIa HDACs war dagegen in den HDAC4 überexprimierenden Zellen größtenteils nicht signifikant verändert. Lediglich in den VM-CUB1-HDAC4 Zellen, allerdings nicht in UM-UC-3-HDAC4 konnte eine signifikante Hochregulation von HDAC7 detektiert werden.

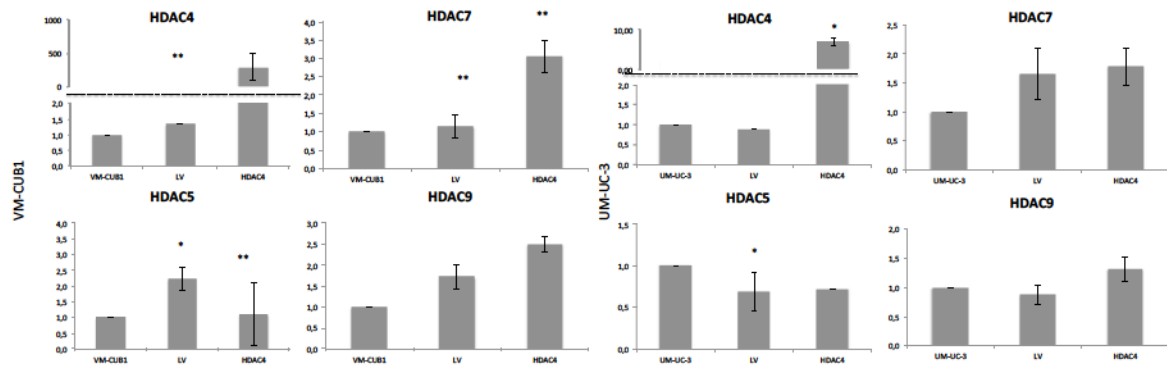


Abb. 4.25: Relative Expression von Klasse IIa HDAC mRNAs in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Varianten mit HDAC4 Überexpression. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der Mutterzelllinien normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Abszisse: Zelllinien; Ordinate: relative RNA-Menge. Die jeweiligen Werte sind zu einem Niveau von 5% (*), 1% (**) bzw. 0,1% (***) signifikant. (*)

4.4.3 Behandlung der HDAC1 und HDAC4 Zellvarianten mit 19i

Um Proliferationsunterschiede bei der Wirkung von 19i zu untersuchen, wurden die Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie die HDAC4-, HDAC1- und LV-Zellen über 72 h mit Konzentrationen von 0,1 μ M bis 5 μ M 19i inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.26 dargestellt.

Ab einer Konzentration von 0,25 μ M 19i kam es in allen vier Zelllinien zu einem konzentrationsabhängigen Verlust der Vitalität. Die VM-CUB1 HDAC1 Zellvarianten reagierten resistenter gegenüber der Behandlung mit 19i und zeigten bis zu einer Konzentration von 2 μ M eine um 20% gesteigerte Vitalität im Vergleich zur Mutterzelllinie VM-CUB1 und den LV Zellvarianten. Ein kompletter Verlust der Vitalität wird bei den HDAC1 Zellvarianten erst ab 4 μ M und damit später im Vergleich zu den anderen Zelllinien erreicht.

Die Hemmprofile der Zelllinie UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten waren hingegen sehr ähnlich. Bei allen vier Zelllinien stieg bei 0,1 bis 0,25 μ M 19i zunächst die Vitalität um ca. 20% an, bei UM-UC-3-LV Zellvarianten sogar um 40%. Ein vollständiger zytotoxischer Effekt wird bei allen Zelllinien mit einer Konzentration von 4 μ M erreicht. Im Gegensatz zu VM-CUB1 wurde in dieser Zelllinie keine gesteigerte Resistenz der HDAC1 Zellen beobachtet.

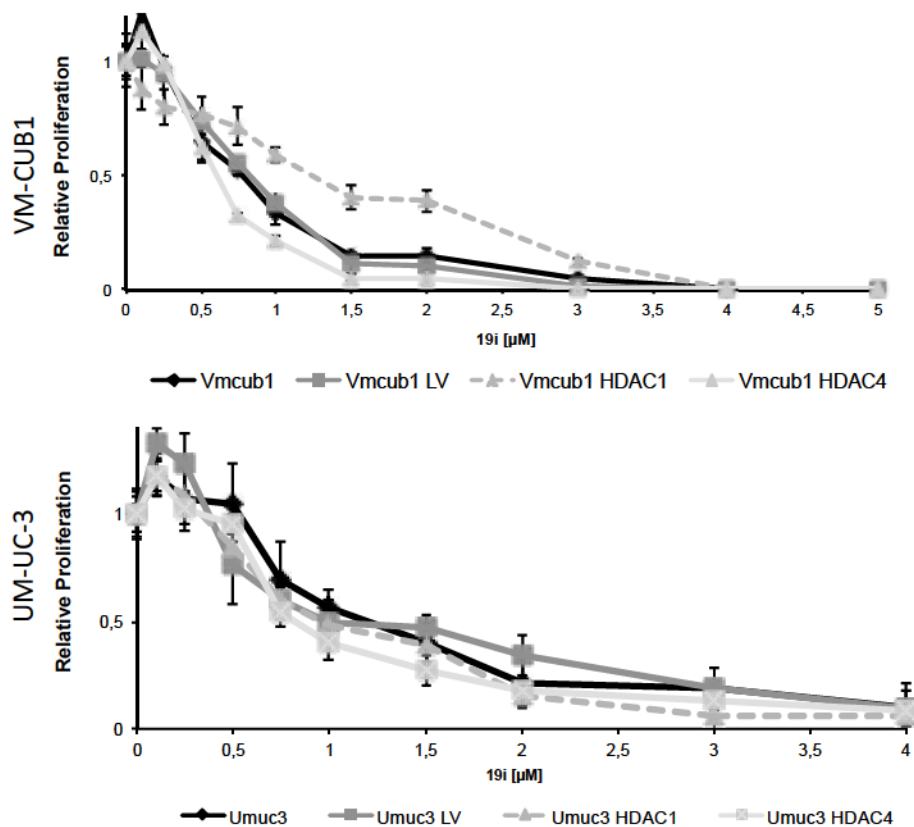


Abb. 4.26: Dosiswirkungskurve der Zellvitalität mittels MTT-Assay nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren HDAC4, HDAC1 und LV Varianten. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,1 μM bis 5 μM verwendet. Als Lösungsmittelkontrolle dienten mit DMSO in Medium (1:2000) behandelten Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro InhibitorKonzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die InhibitorKonzentrationen in μM dargestellt, auf der Ordinate die relative Vitalität in Prozent. (*)

4.5 Behandlung der UCCs mit weiteren Hydroxamsäure-basierten HDAC-Inhibitoren

Neben 19i wurde die Wirkung weiterer, neu synthetisierter HDACis auf UCCs untersucht. Bei den Substanzen handelt es sich um die HDACis LMK163 und LMK214 mit reduzierter zytotoxischer Aktivität. Beide Inhibitoren gehören zu einer neuen Klasse potenter Hydroxamsäure-basierter HDACis. LMK214 besitzt *in vitro* eine erhöhte Aktivität gegen HDAC6, aber keine Aktivität gegen HDAC4. Für LMK163 liegt bisher kein *in vitro* Isoformen-Profil vor.

4.5.1 Effekte auf die Vitalität

Für die Erstellung eines Dosiswirkungsprofils wurden die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC3 und 639-V analog zu dem in Abschnitt 4.2.1 geschilderten Verfahren mit den HDACis LMK163 und LMK214 über 72 h inkubiert. Weiterhin wurde die HEK293 verwendet. Der Inhibitor 19i wurde zum Vergleich mitgeführt. Die Ergebnisse der Zeitreihen waren für die UCCs ähnlich, sodass die Wirkung der Inhibitoren beispielhaft für die Zelllinie VM-CUB1 beschrieben wird (Abb. 4.27).

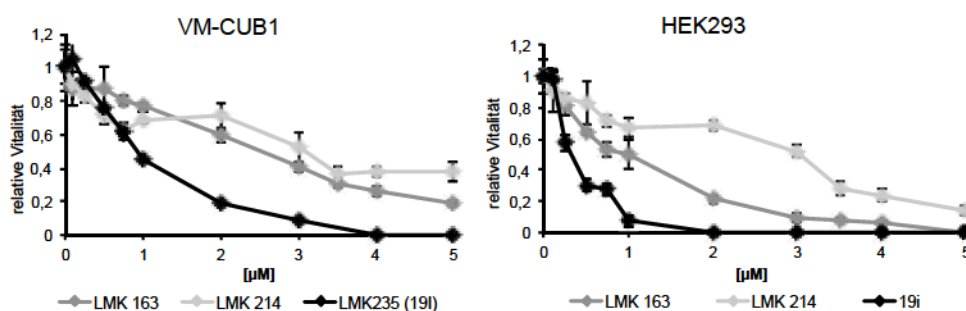


Abb. 4.27: Dosiswirkungskurve der Zellvitalität mittels MTT-Assay nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i sowie LMK163 und LMK214 der Zelllinien VM-CUB1 und HEK293. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,1 µM bis 5 µM verwendet. Als Lösungsmittelkontrolle dienten mit DMSO in Medium (1:2000) behandelten Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitor-Konzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die Inhibitor-Konzentrationen in µM dargestellt, auf der Ordinate die relative Vitalität in Prozent.

Ein Vitalitätsanstieg der UCCs konnte durch die Inhibitoren LMK163 und LMK214 im geringen Konzentrationsbereich nach 72 h nicht festgestellt werden. Bis zu einer Konzentration von 0,75 - 1 µM waren die Effekte der Inhibitoren zelllinienabhängig mit 19i vergleichbar; die relative Vitalität fiel auf 60%. Eine Inkubation mit höheren Konzentrationen (1 µM bis 5 µM) führt bei beiden Inhibitoren in allen Zelllinien zu einer deutlich schwächeren Verminderung der Vitalität im Vergleich zu 19i. Dabei war LMK163 in diesem Bereich stärker wirksam als LMK214. Ein vollständiger

zytotoxischer Effekt wurde selbst durch eine Behandlung mit 5 μM nicht erreicht. Dabei zeigen die UCCs noch eine relative Vitalität von 20% (LMK163) bzw. 40% (LMK214). Auch die Zelllinie HEK293 war gegenüber den Inhibitoren LMK163 und LMK214 weniger sensitiv. Der IC_{50} -Wert wurde bei LMK163 zwischen 1 μM und 2 μM erreicht, bei LMK214 erst zwischen 3 μM und 3,5 μM .

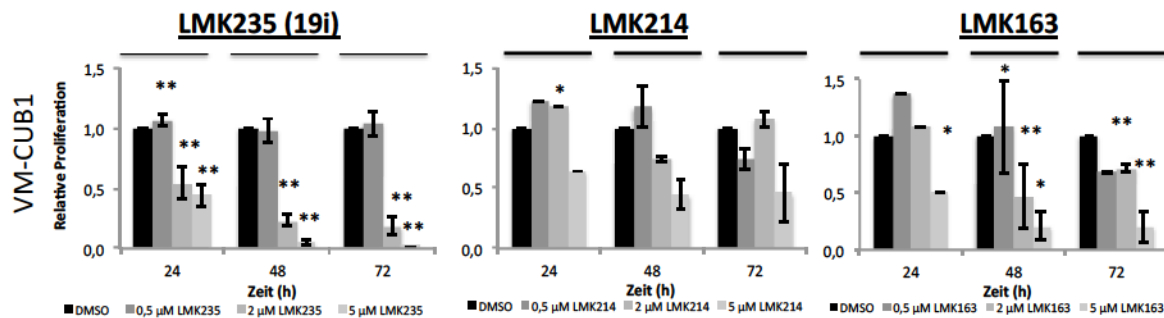


Abb. 4.28: MTT-Vitalitätsassay dargestellt als Zeitreihe der Zelllinie VM-CUB1 nach Behandlung mit den HDACi LMK163 und LMK214 sowie 19i. Die Inkubationszeit betrug 24 h, 48 h und 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,5 μM , 2 μM und 5 μM verwendet. Als Lösungskontrolle dienten mit DMSO in Medium (1:2000) behandelte Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitorkonzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Für die Zeitreihen wurde aus den Einzelwerten von drei verschiedenen Experimenten der Mittelwert gebildet. Auf der Abszisse sind die Inhibitorkonzentrationen in μM dargestellt, auf der Ordinate die relative Vitalität in Prozent. Die Mittelwerte nach 24 h, 48 h und 72 h wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Die Zeitreihe über 24 h bis 72 h ergab den gleichen Trend (Abb. 4.28). Bei Inkubation mit 2 μM und 5 μM war die Abnahme der Vitalität zu jedem Zeitpunkt zelllinienübergreifend geringer als mit 19i. Eine Inkubation mit 0,5 μM LMK 163 und LMK214 führt hingegen nach 24 h und 48 h bei der Zelllinie VM-CUB1 zu einem Vitalitätsanstieg. Lediglich eine Inkubation mit 0,5 μM LMK163 bzw. LMK214 über 72 h führte in allen Zelllinien zu einem vergleichbaren bzw. stärkeren Vitalitätsverlust verglichen mit 19i.

Insgesamt zeigen die neuen Substanzen eine geringere tumorspezifische zytotoxische Aktivität im höheren Konzentrationsbereich und sind deutlich weniger wirksam als 19i.

4.5.2 Einfluss auf den Zellzyklus

Die Auswirkungen auf das Zellzyklusprofil wurden für die Inhibitoren LMK163 und LMK214 wie in Abschnitt 4.3.2 überprüft. Die Zellen VM-CUB1 und UM-UC-3 wurden mit 3 μM und 5 μM der jeweiligen Inhibitoren behandelt. Für beide UC-Zelllinien wurde eine im Vergleich zu 19i nur leichte, konzentrationsabhängige Zunahme der G2/M-Fraktion festgestellt, stärker bei LMK163 als bei LMK214. Die Ergebnisse sind nur für die 24 h Behandlung beispielhaft für die Zelllinie VM-CUB1 abgebildet (Abb. 4.29). Ein signifikanter Anstieg der subG1-Fraktion war mit keinem Inhibitor zu erkennen.

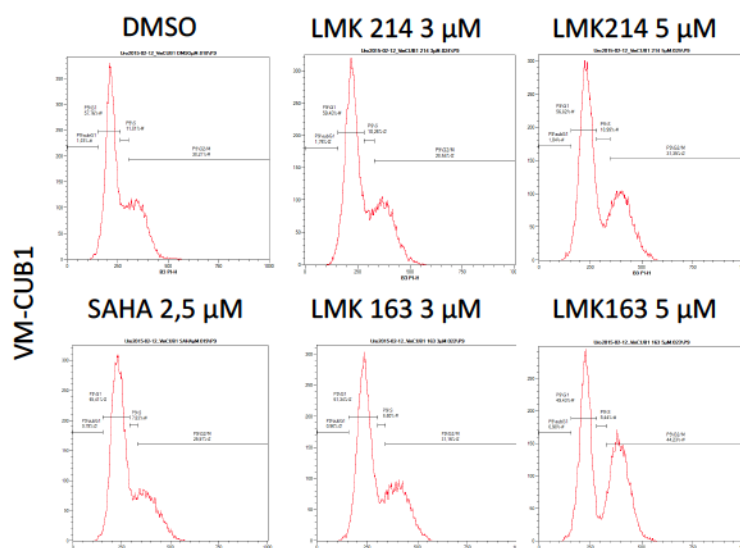


Abb. 4.29: Durchflusszytometrie der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach 24 h. Obere Reihe (von links nach rechts): DMSO-Kontrolle, LMK214 3 μM , LMK214 5 μM . Untere Reihe (von links nach rechts): SAHA 2,5 μM , LMK163 3 μM , LMK163 5 μM . Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzstärke dargestellt, auf der Ordinate die gemessene Zellzahl.

4.5.3 Auswirkung auf die Caspase 3/7-Aktivität

Um zu überprüfen, ob die neuen Substanzen Caspase 3/7-Aktivität als Indikator der Apoptose induzieren, wurden die UCCs über den Zeitraum von 24 h und 48 h mit 3 μM und 5 μM beider Inhibitoren behandelt. Diese Konzentrationen liegen im Bereich der IC_{50} -Werte beider Inhibitoren, sodass die biologischen Effekte in den noch vitalen Zellen analysiert werden können. Zum besseren Vergleich wurden für beide Inhibitoren die gleichen Konzentrationen gewählt. Die Ergebnisse sind für die Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V in Abbildung 4.30 dargestellt. Für den besseren Vergleich zwischen den beiden Substanzen und 19i wurde die 24 h Inkubation beispielhaft ausgewählt.

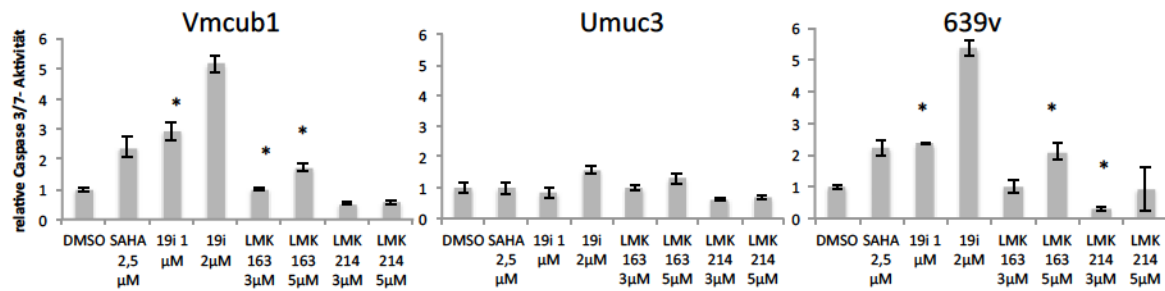


Abb. 4.30: Caspase 3/7-Aktivität nach Behandlung mit dem HDACi LMK163 und LMK214 sowie 19i der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. Die Inkubationszeit betrug 24 h. Es wurden Konzentrationen von 3 µM und 5 µM (LMK163 und LMK214) sowie 1 µM und 2 µM 19i verwendet. Als Lösungskontrolle dienten mit DMSO in Medium (1:2000) behandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurde SAHA 2,5 µM verwendet. Aus den vier gemessenen Signalen pro InhibitorKonzentration wurde der Mittelwert gebildet, auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert und anschließend zur relativen Proliferation in Beziehung gesetzt. Auf der Abszisse sind die InhibitorKonzentrationen in µM dargestellt, auf der Ordinate die relative Caspase 3/7-Aktivität. Die Mittelwerte wurden mit dem jeweiligen DMSO-Wert verglichen, signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$).

Beide Inhibitoren induzierten selbst bei höheren Konzentrationen Caspase-Aktivität schwächer als 19i, besonders in den Zelllinien VM-CUB1 und 639-V. Durch eine Inkubation mit 3 µM LMK163 wurde kein Anstieg der Caspase-Aktivität erreicht. Eine Inkubation mit 5 µM führt hingegen zu einer Verdopplung der Caspase-Aktivität in den Zelllinien VM-CUB1 und 639-V. In UM-UC-3 wirkten alle drei Inhibitoren schwächer auf die Caspase-Aktivität im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Durch Inkubation mit 3 µM LMK214 kam es sogar in allen Zelllinien zu einer Verminderung der Caspase-Aktivität, 5 µM des Inhibitors waren mit der Negativkontrolle vergleichbar.

5 Diskussion

5.1 19i – Klasse I oder Klasse IIa Inhibitor?

Ziel dieser Dissertation war es, Einblicke in die Bedeutung von Klasse IIa HDACs in UCCs zu gewinnen und insbesondere ihre Eignung als therapeutisches Zielmolekül zu untersuchen. Dazu wurden zum einen Zelllinien hergestellt, die HDAC4 stabil überexprimieren; die Ergebnisse mit diesen Zelllinien werden unten diskutiert (Abs. 5.4). Zum anderen wurde die Wirkung des Inhibitors 19i sowie einiger strukturell verwandter Substanzen auf UCCs detailliert untersucht. Dabei wurde gemäß der Originalpublikation (Marek et al. 2013) davon ausgegangen, dass der Inhibitor 19i bevorzugt die HDAC Isoformen 4 und 5 mit Affinitäten im geringen nanomolaren Bereich hemmt. Da nach den Vorarbeiten von Niegisch et al. (2013) Klasse IIa HDACs in UCCs oftmals vermindert exprimiert sind, war denkbar, dass 19i auf die Tumorzellen keine Wirkungen ausüben würde. Alternativ bestand die Möglichkeit, dass die Hemmung der Restaktivität von Klasse IIa HDACs für die Tumorzellen letal sein könnte.

Anfängliche Untersuchungen zeigten eine starke Aktivität der Substanzen gegenüber UC-Zelllinien im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Diskrepanz zwischen dem IC_{50} -Wert der UCCs (0,82-1,03 μM) und den angegebenen *in vitro* IC_{50} für HDAC4/5 (K_{is} 19i: 11,9 bzw. 4,22 nM) deutete jedoch darauf hin, dass eine Inhibition der Klasse IIa eher nicht für die Proliferationseinschränkung der UCCs verantwortlich sein kann. Auch die in der Ursprungspublikation angegebenen Daten zur mittleren inhibitorischen Konzentration von 19i in Zelllinien aus anderen Tumorarten (IC_{50} 1,03- 2,96 μM) stimmen mit dieser Annahme überein. Tatsächlich korrespondieren die IC_{50} -Werte von 19i in UCCs und weiteren Zelllinien eher mit den *in vitro* IC_{50} -Werten für HDAC1/2. Der Unterschied zwischen den inhibitorischen Werten *in vitro* und in Zytotoxizitäts-Assays wurde in der Publikation von Marek et al. (2013) auf die Länge der Inkubationszeit der jeweiligen Assays zurückgeführt. Bei anderen Hydroxamsäure-Inhibitoren wie z.B. SAHA sind die *in vitro* IC_{50} -Werte für die gehemmten HDACs jedoch relativ ähnlich zu den IC_{50} Werten der Tumorzelllinien (vgl. Hieu et al., 2017; Marek et al., 2013).

Um eine Änderung der Affinität oder gar Spezifität des Inhibitors durch eine Metabolisierung der Substanz auszuschließen - wie sie beispielsweise für Romidepsin

bekannt ist (Furumai et al., 2002)- wurde zunächst die Wirkung des Hauptmetaboliten von 19i, nämlich der korrespondierenden Carbonsäure, untersucht. Allerdings zeigte diese Substanz keine Aktivität gegenüber UC-Zelllinien. Wenn man davon ausgeht, dass weder zelluläre Aufnahme noch der Metabolismus die Wirkung der Substanz limitieren, sprechen die Ergebnisse dafür, dass 19i selbst die aktive Substanz innerhalb der Zellen darstellt.

Vergleicht man die Wirkung von 19i mit vorangegangenen Experimenten aus dem urologischen Forschungslabor zur Wirkung verschiedener selektiver und nicht-selektiver HDACis auf UCCs, spricht vieles dafür, dass die zytotoxische Wirkung von 19i über eine Klasse I Inhibition stattfindet (Kaletsch et al., 2018).

UCCs zeigten nach Behandlung mit 19i ein charakteristisches Zellzyklusprofil, welches dem einer selektiven Klasse I Inhibition ähnelt (Abs. 5.2.2). Der starke G2/M-Arrest konnte bereits für die Klasse I Inhibitoren 4SC-202, Romidepsin, Givinostat und die schwächer wirkenden spezifischen HDAC8 Inhibitoren nachgewiesen werden (Lehmann et al., 2014; M. Pinkerneil, Hoffmann, Deenen, et al., 2016; M. Pinkerneil, Hoffmann, Kohlhof, et al., 2016). Weiterhin war nach Behandlung mit 19i die Acetylierung von Histon H3 und H4 deutlich erhöht. Diese Acetylierung ist eine spezifische Wirkung von HDACis und erfolgt vor allem über die Hemmung von Klasse I Enzymen. Die Klasse IIa HDACs haben hingegen nur minimale enzymatische Aktivität gegenüber acetylierten Lysinen von Histonen (Di Giorgio et al., 2015). Es besteht die Frage, ob sie überhaupt eine intrinsische Deacetylase-Aktivität besitzen oder stattdessen die Enzymaktivität über weitere, assoziierte Klasse I HDACs ausüben (Lahm et al., 2007). Es wird vermutet, dass die biochemische Aktivität dieser Klasse überwiegend durch die Rekrutierung von Klasse I Enzymen stattfindet (vgl. Abs. 5.5). Entscheidend dafür könnte die Assoziation mit HDAC3 sein (Di Giorgio et al., 2015). Weiterhin spricht die verstärkte α -Tubulin-Acetylierung dafür, dass 19i stark HDAC6 hemmt. α -Tubulin ist ein typisches Substrat von HDAC6, einer zentralen Komponente des Zytoskeletts und wesentlich für die Zellmotilität (Boyault et al., 2007). Alternativ könnte spekuliert werden, dass α -Tubulin auch ein Substrat von HDACs der Klasse IIa ist. Denkbar wären wiederum Interaktionen zwischen HDACs verschiedener Klassen, so dass eine Klasse IIa Inhibition sich auf die Funktion von HDAC6 auswirken könnte. Einige derartige Interaktionen sind in der Literatur beschrieben. Beispielsweise kann HDAC6 mit HDAC11 assoziieren (Gregorette et al., 2004). Zusammen mit HDAC4 und HDAC8 agiert HDAC6 als epigenetischer Regulator

(Valenzuela-Fernandez et al., 2008). Viel wahrscheinlicher ist allerdings eine Beeinflussung der Funktion von HDAC6 über direkte Inhibition durch 19i. Für die Wirkung auf die urothelialen Tumorzellen hat die - direkte oder indirekte - inhibitorische Aktivität von 19i auf HDAC6 jedoch wahrscheinlich keine entscheidende Bedeutung, da eine spezifische Inhibition von HDAC6 nur geringe Effekte auf UCCs ausübt (Lehmann et al., 2014; Rosik et al., 2014).

Zweifel an der vermuteten Wirkungsweise von 19i ergeben sich auch aus den Experimenten mit stabil transduzierten UCCs mit einer Überexpression von HDAC4 oder HDAC1. Diese Experimente sollten bei der Beantwortung der Frage helfen, ob HDAC4 ein wesentliches Zielmolekül der verwendeten Inhibitoren ist. In diesem Falle sollte die Überexpression von HDAC4 die Zellen vor dem Inhibitor schützen. Es wurde jedoch kaum ein Unterschied beobachtet. Zur Kontrolle wurden stabil transduzierte Zellen mit einer Überexpression von HDAC1 mitgeführt. Interessanterweise waren diese Zellen im Konzentrationsbereich zwischen 0,75 und 3 μ M 19i deutlich resistenter. Die verstärkte Expression von HDAC1 könnte zum Schutz der Zelllinie beitragen, wenn durch die Inhibition mit 19i vorwiegend HDAC1 gehemmt wird.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass die antiproliferative Aktivität von 19i in zytotoxischen Konzentrationsbereichen über die Inhibition von Klasse I Enzymen geschieht (Kaletsch et al., 2018). Im Umkehrschluss stellte sich die Frage, ob 19i überhaupt ein selektiver Klasse IIa Inhibitor ist. Denkbar wäre eine molekulare Interaktion zwischen HDAC4 und Klasse I Enzymen, besonders HDAC3 (vgl. Abs. 5.5), sodass durch die selektive Inhibition von HDAC4/5 Klasse I Enzyme ebenfalls gehemmt werden. Prinzipiell vorstellbar ist auch, dass HDAC4 und die anderen Klasse IIa Enzyme in UCCs nicht wesentlich für Proliferation und Überleben ausschlaggebend sind und daher bei niedrigen Konzentrationen von 19i keine Wirkung erkennbar ist. Bei höheren Konzentrationen käme dann die an sich geringere Affinität zu Klasse I (und IIB) HDACs zum Tragen.

Um diese Fragen anzugehen wurde aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation das Inhibitionsspektrum des Inhibitors 19i - im Auftrag der AG Kurz - erneut von einer spezialisierten Biotechnologiefirma überprüft. Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass sich das Wirkspektrum des Inhibitors, mit submikromolaren Inhibitionskonstanten, vorrangig gegen die HDACs 1, 2, 3 sowie 6 und 10 richtet. Eine Aktivität gegen HDAC4 konnte hingegen nicht mehr

nachgewiesen werden und die Hemmung der anderen Klasse IIa Enzyme war nur bei hohen mikromolaren Konzentrationen erkennbar. Das neue Spezifitätsprofil steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen dieser Dissertation. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse zu den Effekten von 19i unter der Annahme einer vorrangigen Klasse I Inhibition diskutiert. Zusätzliche Experimente zur Wirkung von 19i in HDAC4 überexprimierenden Zelllinien liefern vor diesem Hintergrund wenig zusätzliche Information. Wie die Zusammenstellung im Anhang zeigt, wurden im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie mit den Ausgangszelllinien erzielt.

5.2 Molekulare Wirkung von 19i auf UCCs

5.2.1 Antineoplastische Aktivität- Einfluss auf die Proliferation und Klonogenität

Anhand der Daten von Niegisch et al. wurden primär unterschiedliche Zelllinien ausgewählt, welche eine im Vergleich zu urothelialen Primärkulturzellen erniedrigte (VM-CUB1), unveränderte (UM-UC-3) sowie erhöhte (639-V) HDAC4 und 5 Expression repräsentieren. Dabei wurde auch die Heterogenität der UCCs berücksichtigt, sodass diese Auswahl die Diversität dieser Tumorart abbildet. In diesen Zelllinien wurden zunächst die drei Hydroxamsäure-Inhibitoren 19e, 19h und 19i untersucht. Für diese wurde zu Beginn der Dissertation von einer bevorzugten Aktivität gegen HDAC4/5 im geringen nanomolaren Bereich ausgegangen. Die Spezifität wurde in einem HDAC *Isoformen-Assay* an aufgereinigten HDACs untersucht. Für HDAC1/2 lagen die K_{is} -Werte der drei Substanzen zwischen 0,3 und 1,4 μM , für HDAC6 < 56 nM. Die Aktivität der Substanzen war im Vorfeld an verschiedenen Tumorzelllinien (A2780, MDA-MB-231, Cal27 und Kyse510) untersucht worden (Marek et al., 2013). Für UCCs lagen keine Daten vor.

Alle drei Substanzen erwiesen sich auch an UCCs als sehr effektiv. Der Inhibitor 19i zeigte für die Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V die höchste zytotoxische Aktivität (IC_{50} 0,82 - 1,03 μM). Die IC_{50} -Werte der Inhibitoren 19e und 19h waren in etwa doppelt so hoch (Tab. 4.1). Schlussendlich zeigen die Ergebnisse, dass 19i, im Vergleich zu 19e und 19h, auch in UCCs die stärkste inhibitorische Aktivität aufweist. Sowohl die Proliferations- als auch Koloniebildungsfähigkeit wurden durch die Inhibition stark eingeschränkt.

Dabei wurden die einzelnen Zelllinien durch die Inhibition mit 19i unterschiedlich stark in ihrem kurzfristigen Wachstum sowie in der Koloniebildungsfähigkeit

beeinflusst. Die Zelllinie UM-UC-3 wies den niedrigsten IC_{50} -Wert von $0,82 \mu M$ auf; bei der Verwendung höherer Konzentrationen (2 und $5 \mu M$) über 48 h und 72 h starben hingegen - anders als bei den anderen UCCs - nicht alle Zellen ab. Die Zelllinien VM-CUB1 und 639-V reagierten bei diesen höheren Konzentrationen hingegen deutlich sensibler. Die Koloniebildungsfähigkeit nahm nach 24 h und 48 h Behandlung mit 1 und $2 \mu M$ 19i vergleichbar stark ab.

Die erhöhte Resistenz der Zelllinie UM-UC-3 in unseren Experimenten könnte mit ihrem mesenchymalen Phänotyp zusammenhängen. Eine Vielzahl von Arbeiten belegt, dass mesenchymale Karzinom-Zellen *in vivo* und *in vitro* eine Resistenz gegenüber antineoplastisch wirksamen Substanzen erwerben können (Skowron et al., 2015). Beispielsweise wurde die verminderte Sensitivität von UM-UC-3 Zellen gegenüber Cisplatin auf eine erhöhte Expression von DOCK1 (*dedicator of cytokinesis*) zurückgeführt, einem atypischen Nukleotid-Austausch-Faktor, welcher bei der zellulären Adhäsion und Migration wichtig ist und die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) reguliert (D. J. Chen et al., 2016). Solche Faktoren könnten auch die Sensitivität gegenüber HDACis beeinflussen. Tatsächlich kann die EMT über verschiedene Faktoren und Signalwege (z.B. NF κ B, TGF- β) stimuliert werden, die auch durch Chemotherapeutika aktiviert werden können (Terry et al., 2017). HDACis üben diverse Effekte auf die Acetylierung dieser Faktoren aus. Verschiedene HDACs (HDAC1, 2 und 6) werden bei der TGF- β 1-induzierten EMT benötigt (Choi et al., 2016). Bei der EMT findet ein Wechsel von E-Cadherin zu N-Cadherin statt. In Studien von Choi et al. konnte gezeigt werden, dass in HK2 Zellen, einer humanen proximal tubulären epithelialen Nierenzelllinie, TGF- β 1 eine EMT mit verstärkter N-Cadherin Expression und verminderter E-Cadherin Expression auslöst. Dieser "Cadherin Switch" wurde durch LMK235 (19i) verringert (Choi et al., 2016). Dies lässt eine Beteiligung von LMK235 an der EMT auch in UCCs vermuten.

Zudem konnte im MTT-Proliferationsassay bei Verwendung geringer Konzentrationen bis $0,5 \mu M$ 19i besonders nach 24 h ein leichter Proliferationsanstieg detektiert werden. Dies ist mit Vorsicht zu betrachten, da die Effekte klein waren und Zelllinien-spezifisch zu sein scheinen. Ebenfalls könnten sie metabolische Änderungen widerspiegeln, welche durch den MTT-Assay detektiert werden, da dieser die Aktivität der NADPH-abhängigen Reduktase misst. Allerdings wurde ein ähnlicher Effekt für einen anderen HDAC Inhibitor (VPA) berichtet, der bei geringer Konzentration ($0,6$ mM VPA) in Astrozyten *in vitro* einen

Proliferationsanstieg mit erhöhter DNA-Synthese auslöste. Die Autoren führen dies auf eine veränderte Regulation von Zellzyklusproteinen gegenüber einem Anstieg von CDK-Inhibitoren bei Verwendung höherer VPA-Konzentrationen zurück (H. J. Lee et al., 2016). Zur Klärung ähnlicher Beobachtungen durch die 19i Inhibition müssten also die Spiegel der CDK-Inhibitoren bei verschiedenen Konzentrationen gemessen werden. Jedenfalls sollte dieser Aspekt bei einem klinischen Einsatz der Substanz bedacht werden.

Passend dazu wurde in unseren Studien der CDK-Inhibitor 1 (p21; Gen: *CDKN1A*) untersucht. Der klassische Zellzyklusmarker wurde durch die Inhibition mit 19i stark induziert. Die *CDKN1A* mRNA Expression stieg nach 24 h Behandlung mit steigender Inhibitorkonzentration an. In den Zelllinien VM-CUB1 und 639-V war die p21^{WAF1/CIP1} Proteinexpression durch die Behandlung mit 19i vergleichsweise stärker induziert als durch SAHA. Die HDAC-Inhibition führt zu einer Hyperacetylierung des *CDKN1A* Promotors und daher zu einer verstärkten p21^{WAF1/CIP1} Expression (Newbold et al., 2016). Auf diesem Wege führt auch eine Repression von HDAC2 und HDAC4 zu einer Induktion von p21 (Liu et al., 2009; Mottet et al., 2009). Durch eine Inhibition von HDAC2 durch den verwendeten Inhibitor ist der Anstieg der p21 Expression demnach erklärbar.

Weiterhin wird die antineoplastische Aktivität des Inhibitors 19i anhand der verminderten Thymidylat-Synthase Expression ersichtlich. Dieses Enzym wird bei der Replikation sowie der DNA-Reparatur benötigt (Chon et al., 2017). Die stärkste Expressionsminderung zeigte sich nach 24 h Behandlung mit 19i und war bei 2 µM jeweils stärker als die durch 2,5 µM SAHA.

Die antiproliferativen Effekte von 19i auf die Zelllinien HEK293 und HBLAK waren unterschiedlich stark. Die Untersuchung weiterer Zelllinien ist wichtig, um für klinische Anwendungen die Spezifität des Inhibitors für Tumorzellen zu sichern und ein therapeutisches Fenster zu ermitteln. Tatsächlich war die urotheliale Kontrollzelllinie HBLAK sowohl im Viabilitäts-Test als auch in den Zellzyklusanalysen wenig sensitiv gegenüber 19i. Der IC₅₀-Wert lag mit 5 µM deutlich über dem der UCCs (Tab. 4.1). Im Zellzyklusprofil kam es nicht zu dem für UCCs typischen G2/M Arrest (Abs. 5.2.2).

Bei der Reaktion benigner Zellen auf die Behandlung mit HDACis muss man bedenken, dass eukaryotische Zellen vermutlich über inhärente adaptive und protektive Mechanismen gegenüber solchen Substanzen verfügen. Der Grund könnte

darin liegen, dass HDACis durch Bakterien produziert werden und in der Umwelt weit verbreitet vorliegen (Newkirk et al., 2009). Beispielsweise wird TSA von Bakterien genutzt, um eukaryotische Mikroorganismen abzutöten (Yoshida et al., 1987). Im Detail wird vermutet, dass das Überleben der Zellen durch adaptive Transkriptionsänderungen ermöglicht wird, so dass die Hyperacetylierung minimiert wird, die Zellen langsamer wachsen und wieder eine Balance in der Genexpression hergestellt wird. Beispielsweise konnte für nicht-transformierte embryonale Stammzellen der Maus gezeigt werden, dass sie nach HDAC-Inhibition zwar weiter proliferieren, jedoch mit reduzierter Geschwindigkeit. Das verlangsamte Wachstum schützt die Zellen gegen genomische Langzeitschäden (Yoshida et al., 1988). Beteiligt an dieser Reaktion ist beispielsweise die Herunterregulation von Genen (GDF9/GDF15), welche an der Wachstumskontrolle und Zellzyklusprogression beteiligt sind, sowie Anpassungen im Expressionsverhältnis von HATs und HDACs (Halsall et al., 2015).

Die HEK293 Zellen reagierten hingegen viel empfindlicher auf die 19i Behandlung. Die mittlere inhibitorische Konzentration lag mit 0,61 μM unter dem der UCCs. Dabei war auch ein stärkerer Effekt auf den Zellzyklus zu beobachten, welcher nach 2 μM Behandlung mit dem in UCCs vergleichbar ist. Ähnliche Parallelen konnten bereits für den Klasse I HDACi 4SC-202 beobachtet werden. Auch hier zeigte die Zelllinie HEK293 eine vergleichbar stark erhöhte G2/M-Fraktion wie die UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3 (M. Pinkerneil, Hoffmann, Kohlhof, et al., 2016). Besonders interessant ist, dass die Zelllinie HEK293 nach Behandlung Seneszenz-Zeichen aufwies. Die Induktion von Seneszenz ist bereits für verschiedene HDACis beschrieben worden (Newbold et al., 2016). Bei HEK293 war der Seneszenz-Zustand nach Behandlung stärker ausgeprägt als in den UCCs. Bereits in der Negativ-Kontrolle wiesen viele Zellen einen seneszenten Phänotyp auf; möglicherweise verstärkte die Behandlung mit 19i diesen Zustand. Ein Grund für die ähnliche Reaktion der HEK293 Zellen, verglichen mit den UCCs, auf die 19i Behandlung könnte daran liegen, dass die HEK293 Zellen keineswegs als „benigne Zelllinie“ angesehen werden können, da sie einen stark aneuploiden Karyotyp aufweisen und in immundefizienten Mäusen Tumoren bilden (Stepanenko et al., 2015). Zu diesen Eigenschaften passt die Beobachtung, dass sie sich bei der Behandlung mit HDACi wie 19i oder 4SC-202 (Pinkerneil et al., 2016) eher wie UCC verhalten. Dennoch lässt sich auch anhand der differierenden Ergebnisse zwischen HBLAK und HEK293 Zelllinien keine ausreichend

gesicherte Aussage bezüglich der geringeren Beeinflussbarkeit von benignen Zelllinien durch die 19i Behandlung treffen. Es müssten also weitere *in vitro* Studien mit mehr benignen Kontroll-Zelllinien oder urothelialen Primärzellen erfolgen. Auch Toxizitätstests *in vivo* würden bei dieser Thematik weiterhelfen. Ebenfalls lassen unsere Experimente keine Aussage bezüglich des Langzeit-Effektes der Behandlung auf benigne Zellen zu, da lediglich Kurzzeit Messungen über 72 h durchgeführt wurden. Daher ist unklar, ob die scheinbar resistenteren HBLAK Zellen über einen längeren Zeitraum stabil bleiben.

5.2.2 Deregulation des Zellzyklus und der Zellkernmorphologie

Nach Behandlung mit 19i waren die Zell- und Zellkernmorphologien sowie die Zellzyklusprofile deutlich verändert. Die Zellzyklusstörungen wurden dabei für alle UCCs beobachtet und waren durch eine vermehrte Fraktion an Zellen in der G2/M-Phase sowie ein unregelmäßiges, stark verbreitertes Zellzyklus-Profil in der FACS-Analyse ohne eindeutige Unterteilung in verschiedene Zellzyklusphasen ausgezeichnet. In den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3, 639-V sowie HEK293 verstärkte sich der Anteil der Zellen in dieser Phase mit steigender Inhibitorkonzentration. Auch die Behandlungsdauer besaß einen Einfluss. Zelllinienübergreifend stellte sich die stärkste G2/M-Fraktion nach 24 h Behandlung mit 2 μ M 19i dar, danach entwickelten sich die Profile unterschiedlich.

Eine Erhöhung der G2/M-Fraktion wurde bereits für die Klasse I HDACis 4SC-202 (M. Pinkerneil, Hoffmann, Kohlhof, et al., 2016) sowie Romidepsin und Givinostat (M. Pinkerneil, Hoffmann, Deenen, et al., 2016), spezifische HDAC8 Inhibitoren (Lehmann et al., 2014) und Vorinostat (SAHA) (Niegisch et al., 2013) in vorangegangenen Studien des urologischen Forschungslabors beobachtet. Zur Erklärung wurde eine gestörte und verzögerte Passage durch die Mitose mit einer ungleichen DNA-Verteilung auf die Tochterzellen postuliert (M. Pinkerneil, Hoffmann, Kohlhof, et al., 2016). Im Detail könnte es durch die gestörte Mitose im ersten Zellzyklus zu einer Akkumulation und einem verlängerten Verbleib in der G2/M-Phase kommen. Dadurch würde eine irreguläre Zellteilung stattfinden, welche in Tochterzellen mit scheinbarem subG1- bzw. S-Phase DNA-Gehalt resultiert. Schlussendlich könnte auch der Inhibitor 19i primär in der G2/M-Phase des Zellzyklus wirken. Dafür sprechen neben der frühen Akkumulation an Zellen in dieser Phase auch die zellkernmorphologisch festgestellten, gestörten Mitosen. In den Zelllinien VM-CUB1

und UM-UC-3 konnten nach der Behandlung mit 19i weniger Mitosen, allerdings vermehrt Mikronuklei detektiert werden. Jedoch ist zu beachten, dass die Auswertungen statistisch nicht signifikant sind, da durch die Zytotoxizität der Behandlung die beurteilbare Zellkernzahl abnimmt.

Die Störungen der Mitose durch 19i könnten auf der Deacetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen, welche den Ablauf des Zellzyklus regulieren, beruhen. Acetylierung und Deacetylierung sind entscheidend an der Regulation der Mitose beteiligt (Chuang et al., 2010; Valls et al., 2005); der Acetylierungsstatus verschiedener, für die Mitose essentieller Proteine wird durch HDACs reguliert. Eine Behandlung mit HDACis führt daher zu mitotischen Störungen, darunter ungleiche Spindelpol-Bildung, anormale Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion sowie Verlust der Chromosomen-Anheftung an die Mitosespindel. In der Arbeit von Chuang et al. (2010) konnte eine Beteiligung von HDAC3, welches auf der Mitosespindel lokalisiert ist, am mitotischen Prozess nachgewiesen werden. Ishii et al. beobachteten ebenfalls, dass ein Knockdown von HDAC3 zu einer gestörten Mitose führt (Ishii et al., 2008). Im gleichen Sinne führte ein siRNA-vermittelter Knockdown von HDAC3 in Colon-Karzinomen zu einer verstärkten Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase (Wilson et al., 2006). Die HDAC3 Inhibition durch 19i in unseren Versuchen könnte demnach an der Störung der Mitose beteiligt sein. Um festzustellen, ob 19i über die Modifikation weiterer an der Mitose beteiligter Proteine den Ablauf des Zellzyklus stört, müsste deren Acetylierungsstatus in Folgeversuchen überprüft werden.

In HeLa-Zellen wurde nach Behandlung mit HDACis ein verlangsamter Progress durch die Mitose nachgewiesen (Stevens et al., 2008). In Kombination mit einer gestörten Zellzyklusprogression könnte eine solche Verlängerung des Ablaufs den verminderten Mitoseanteil nach Behandlung mit 19i erklären.

Gerade für HDACis konnte nachgewiesen werden, dass sie zu einer Dysregulation der Checkpoint-Aktivierung führen können (Z. M. Li et al., 2014) und nach initialer Mitoseverzögerung der Spindel-Kontrollpunkt übergangen werden kann (Chia et al., 2010; Stevens et al., 2008). Dadurch wird ein rapider Zelltod induziert. Der Kontrollpunkt-Defekt wurde auf eine mangelnde Aktivierung der Protein-Kinase BubR1 zurückgeführt, welche eine zentrale Komponente des Spindel-Checkpoint ist (Shin et al., 2003). Eine Deacetylierung von BubR1 dient als Signal für den Mitoseaustritt (*mitotic exit*). An diesem Prozess sind besonders HDAC2 und HDAC3 beteiligt (Park et al., 2017). In der Studie von Chia et al. wurde gezeigt, dass ein

selektiver Klasse I HDAC Inhibitor, welcher ebenfalls eine Akkumulation von Zellen in der G2/M Phase auslöst, eine defekte Mitose sowie das Übergehen des SAC-Kontrollpunktes (*checkpoint for spindle assembly*) triggert. Auch für den HDACi TSA konnte eine Inaktivierung des SAC-Kontrollpunktes nachgewiesen werden, indem klassische Mitoseausgangsmarker wie die Inaktivierung von CDK1, Dephosphorylierung von Histon H3 und die Kinetochor-Lokalisation von MAD2 verfolgt wurden (Magnaghi-Jaulin et al., 2007). Bei der Behandlung mit 19i könnten ähnliche Mechanismen zur G2/M Akkumulation beitragen. Eine Überprüfung des SAC-Kontrollpunktes mittels Detektion veränderter Mitoseausgangs Marker sowie der Expression und Acetylierung von BubR1 nach Behandlung mit 19i könnten somit Aufschlüsse über den genauen zellulären Ablauf in UCCs bringen.

Für normale Zellen wird hingegen vermutet, dass eine protektive G2-Phase Checkpoint Reaktion die zytotoxische Wirkung von HDACis mindert (Warrener et al., 2003). Dieser Ansatz würde erklären, warum in der Zelllinie HBLAK keine Veränderungen im Zellzyklusprofil nach Behandlung mit 19i nachgewiesen werden konnten.

Interessanterweise konnte der sonst bevorzugt durch HDACis ausgelöste Zellzyklusarrest am G1/S Kontrollpunkt (Falkenberg et al., 2014) mit 19i nicht beobachtet werden, obwohl in allen UCCs der Zellzyklusarrest-Markers p21^{WAF1/CIP1} induziert wurde. Normalerweise führt die durch HDACis ausgelöste Hyperacetylierung des *CDKN1A* Promotors zu einer verstärkten p21^{WAF1/CIP1} Expression, welche schlussendlich in einem G0/G1 Arrest resultiert (Newbold et al., 2016). Pinkerneil et al. erklären das Fehlen eines G1-Arrest in UCCs nach HDACi-Behandlung über die bekannten Defekte im G1/S Kontrollpunkt, welche für diesen Tumortyp charakteristisch sind (Florl et al., 2008; Niehans et al., 1999). Ein Übergehen des G1/S Checkpoints könnte den fehlenden G1 Arrest durch eine HDAC-Inhibition mittels 19i erklären.

Weiterhin wird vermutet, dass die Art des Zellzyklus-Arrests, also G1- oder G2-Phase Arrest, von der Dosis des HDACi abhängig ist. Geringe, nicht-zytotoxische Dosen sollen zu einem G1-Arrest, höhere Dosen hingegen zu einem G2-Arrest führen. Daher wird vermutet, dass die durch geringe HDACi-Dosen hochregulierten Proteine wie beispielsweise p21^{WAF1/CIP1} nicht an der Induktion des Zelltod beteiligt sind (Warrener et al., 2003). Die Basis für die tumorselektive Zytotoxizität scheint hingegen der HDACi-sensitive G2-Phase Checkpoint zu sein, der normale Zellen an

einem Eintritt in eine anormale Mitose hindert. In einem Großteil der Tumorzellen ist dieser Kontrollpunkt hingegen defekt (Chia et al., 2010; Qiu et al., 2000). Eine Analyse der Integrität des G2-Phase Kontrollpunktes sowohl in UCCs als auch in normalen Zellen wäre daher sinnvoll.

Weiterhin wurden nach Behandlung mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 eine konzentrationsabhängige, steigende Anzahl an Mikronuklei sowie vereinzelt, stark kondensierte Zellkernbereiche beobachtet. Wiederum könnten dafür Defekte im G2-Kontrollpunkt in UCCs (Doherty et al., 2003) verantwortlich sein. Der Verlust des G2-Kontrollpunktes resultiert in einer fehlerhaften Mitose. Das fehlerhafte Zusammenkommen der Chromosomen in der Metaphase führt dazu, dass die replizierten Chromosomen während der Mitose ungleich verteilt werden und es zur Bildung von DNA-Fragmenten und Mikronuklei kommt. (Bhatia et al., 2013; Qiu et al., 2000; Warrenner et al., 2003). Nach HDAC-Inhibition beobachteten Stevens et al. Zellen mit stark kondensierten Chromosomen, welche nicht fähig waren, diese zu einer korrekten Metaphase anzuordnen (Stevens et al., 2008). Dennoch erfolgte der Eintritt in die Mitose und die Zytokinese führte schlussendlich zu einer ungleichen Chromosomensegregation mit multiplen Tochterzellen. Warrenner et al. (2003) vermuteten, dass das Fehlen der HDAC-Aktivität nach HDACi-Behandlung die Funktion der Kinetochore beeinträchtigt, z.B. durch eine verstärkte Acetylierung des zentromeren Heterochromatins. Beispielsweise wird die Bindung von Heterochromatin Protein 1 (HP1) durch TSA gestört (Eissenberg et al., 2000; Taddei et al., 2001). Daher wurde eine Beteiligung von HDACs bei der Lokalisation von HP1 an Heterochromatin geschlossen (Xin et al., 2004), wo HP1 für eine dichte Packung der DNA sorgt. Bei der Replikation wird HP1 vom parentalen DNA-Doppelstrang freigelassen und muss später, mit Hilfe von HDACs, wieder an die Tochterstränge angefügt werden (Maison et al., 2004). HP1 kolokalisiert in der späten S-Phase mit dem Tumorsuppressor p33^{ING1}, welcher zum Sin3-HDAC1/2 Komplex gehört. Es wurde vermutet, dass dieser Komplex für die Histon-Deacetylierung im Heterochromatin verantwortlich ist und eine Hypoacetylierung durch HDAC1/2 für eine adäquate Interaktion der Kinetochore erforderlich ist. Ein Verlust dieses Komplexes könnte somit die Heterochromatin-Formation beeinflussen (Jamaladdin et al., 2014; Xin et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurden nach HDAC1/2 Knockdown vermehrt Mikronuklei sowie eine Verringerung der Zellzahl in der S-

Phase beobachtet, welches den Autoren zufolge auf Chromosomensegregationsfehler sowie DNA-Replikationsfehler hinweist (Jamaladdin et al., 2014).

Auch 19i könnte durch die HDAC1/2 Inhibition die Funktion dieses Komplexes stören, sodass die Bildung von Heterochromatin beeinträchtigt wird und Fehler während der Mitose die Entstehung von Mikronuklei begünstigen.

5.2.3 Einfluss von 19i auf die mRNA Expression der Klasse IIa HDACs

Nach Behandlung mit 19i kam es besonders in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 zu einem moderaten Anstieg der HDAC4 mRNA und einem stärkeren der HDAC5 mRNA. Die HDAC7 mRNA wurde hingegen in allen Zelllinien nach Behandlung herunter reguliert. Alle diese Veränderungen waren stärker bei höherer InhibitorKonzentration. Für diese Expressionsveränderungen nach Behandlung sind verschiedene Erklärungsansätze denkbar. Einerseits sind auch die Promotoren der HDAC-Gene vom Acetylierungsgrad abhängig, so dass eine HDAC-Inhibition zu einer verstärkten bzw. verminderten Genexpression führt. Ein derartiger autoregulatorischer Feedback-Kreis konnte bereits für verschiedene HDACs nachgewiesen werden (Ajamian et al., 2004; Schuettengruber et al., 2003). Weiterhin könnte die veränderte Expression eine funktionelle Reaktion im Sinne einer kompensatorischen Gegenregulation der Tumorzellen auf die HDAC-Inhibition sein. Diese Gegenregulation zielt einerseits auf die Erhaltung des Acetylierungszustands (Halsall et al., 2015), möglicherweise aber auch auf die Reparatur von DNA-Schäden. Der durch HDACs induzierte Zelltod wird u.a. durch DNA-Schäden verursacht, da die Funktion von DNA-Reparaturproteinen beeinträchtigt wird (Newbold et al., 2016). Eine Deletion von HDAC3 führt zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Reparaturfähigkeit (Bhaskara et al., 2010). HDAC4 ist hingegen eine wichtige Komponente des DNA-Reparatur-Signalwegs, indem es zu geschädigten DNA-Regionen rekrutiert wird und dort mit dem Reparaturprotein 53BP1 interagiert (Kao et al., 2003). Wenn man davon ausgeht, dass durch die HDAC-Inhibition HDAC3 ebenfalls gehemmt wird, wäre eine Hochregulation von HDAC4 in Tumorzellen somit eine schlüssige Reaktion der Tumorzellen auf induzierte DNA-Schäden.

Weiterhin könnte die Aktivität der Klasse I HDACs von HDAC4/5 abhängig sein. Nach Inhibition von Klasse I Enzymen mittels 19i könnten die Tumorzellen versuchen, durch die Gegenregulation von HDAC4/5 die Aktivität der Klasse I Enzyme aufrecht zu erhalten. Kreuzregulationen zwischen HDACs verschiedener Klassen wurden

bereits verschiedentlich beobachtet. Beispielsweise ist in Kardiomyozyten die Deacetylase-Aktivität von HDAC2 von der Regulation durch HDAC5 abhängig (Eom et al., 2014).

Ebenfalls zelllinienübergreifend wurde eine Herunterregulation von HDAC7 mRNA beobachtet. Dieser Effekt wurde bereits für die Pan-HDACis Vorinostat und Romidepsin berichtet (Dokmanovic et al., 2007). In verschiedenen Zelllinien (u.a. auch UCC) waren nach HDAC-Inhibition sowohl HDAC7 mRNA als auch Protein vermindert; jedoch wurde keine Auswirkung auf die Expression weiterer HDACs der Klasse IIa detektiert. Die Herunterregulation der HDAC7 mRNA Expression durch Vorinostat war auch in unseren Untersuchungen erkennbar, allerdings löste 19i im Vergleich deutlich stärkere Effekte aus. Die Proteinexpression wurde in unseren Experimenten nicht überprüft, so dass hierzu kein Vergleich gezogen werden kann. Andererseits ist anzumerken, dass in unseren Experimenten die mRNA Expression von HDAC4 und HDAC5 durchaus durch Vorinostat beeinflusst wurde. Ob sich dieser Effekt auch auf die Proteinexpression überträgt, wurde nicht untersucht. In der Arbeit von Dokmanovic et al. (2007) wurde keine Auswirkung auf die Proteinexpression der Klasse IIa HDACs nachgewiesen. Es ist somit möglich, dass sich die veränderten mRNA-Mengen nicht in veränderten Proteinspiegeln niederschlagen.

5.2.4 Apoptose-Induktion und Seneszenz

Eine Apoptose-Induktion durch 19i wurde anhand des Caspase Aktivitäts-Anstieg sowie des Auftretens von gespaltener PARP (*cleaved* PARP) als Apoptosemarker nachgewiesen. In der Zelllinie 639-V wurden dabei die stärksten Effekte beobachtet. Sowohl die Caspase-Aktivität als auch die Spaltung von PARP waren in dieser Zelllinie nach Behandlung deutlich erhöht. Eine Induktion der Apoptose - besonders durch höhere Konzentrationen - könnte die starke Verminderung der Zellvitalität im MTT-Assay nach Behandlung mit 2 und 5 μ M 19i über 24 bis 72 h besonders bei dieser Zelllinie erklären.

Unter den verschiedenen Zelltodmechanismen sind die intrinsische und extrinsische Apoptose-Induktion am besten erforscht (Galluzzi et al., 2018; Newbold et al., 2016). Die Auslösung der Apoptose durch HDACis soll darauf beruhen, dass die Promotoren verschiedener proapoptotische Gene hyperacetyliert werden, was eine Induktion ihrer Expression zur Folge hat (Matthews et al., 2012). Welche proapoptotischen Gene durch 19i induziert werden, wurde nicht im Einzelnen untersucht. Kritisch zu

fragen ist allerdings, warum nicht auch anti-apoptotische Gene auf diese Weise induziert werden sollten.

Interessanterweise spalten Caspasen auch direkt HDACs. Eine Caspase-abhängige Spaltung von HDAC3 führt zu einer Akkumulation im Zytoplasma und einer Transkriptionsaktivierung proapoptotischer Zielgene (Escaffit et al., 2007; Z. M. Li et al., 2014). Im gleichen Sinne beeinflussen Caspasen den nukleären Export von HDAC4. Während der Apoptose wird HDAC4 durch Caspase 3 gespalten, sodass ein Proteinfragment entsteht, welches im Nukleus akkumuliert und als Transkriptionsrepressor von SRF und Runx2 apoptotische Signalwege aktiviert (Mathias et al., 2015; Paroni et al., 2007). Durch die HDAC-Inhibition kommt es nachweislich zu einer erhöhten Caspase 3/7-Aktivität, welche also wiederum durch die Spaltung verschiedener HDACs zu einer verstärkten Apoptose der Zellen führen könnte. In welchem Umfang das Ausmaß der Vitalitätsabnahme auf diese Weise von der Caspase-Aktivität abhängt, bleibt fraglich.

Ebenfalls ist für HDACis bekannt, dass sie Seneszenz auslösen können. Seneszenz geht mit charakteristischen morphologischen Veränderungen und bekanntermaßen mit einer Induktion von p21 einher (Newbold et al., 2016). In UCCs war neben der Induktion von p21 ein weiterer biochemische Marker der Seneszenz (Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase) detektierbar. Bereits in den Kontrollproben war ein geringer Anteil an Zellen mit seneszentem Phänotyp zu sehen, welcher sich nach Behandlung mit 19i verstärkte. Ähnliche Effekte konnten auch durch die Inhibitoren 4SC-202, Romidepsin und Givinostat für die Zelllinien HBLAK und HEK293 beobachtet werden. Durch die Inhibitoren wird ein „zytotoxischer, Seneszenz-ähnlicher Zustand ausgelöst, bei dem die Zellen die Fähigkeit zur Langzeitproliferation beibehalten“ (Maria Pinkerneil, 2017). Der zytostatische Zustand sollte daher reversibel sein (M. Pinkerneil, Hoffmann, Deenen, et al., 2016; M. Pinkerneil, Hoffmann, Kohlhof, et al., 2016).

Aus der Dissertation von Maria Pinkerneil (2017) geht hervor, dass es verschiedene HDACi-vermittelte Zelltodmechanismen gibt. Dabei scheinen sowohl nekrotische als auch apoptotische Abläufe eine Rolle zu spielen. In UCCs war nach Behandlung mit Klasse I-spezifischen HDACis die Expression von einigen pro-apoptotischen Faktoren erhöht, die von anti-apoptotischen erniedrigt. Es fand jedoch keine einheitliche Induktion bzw. Repression dieser Faktoren statt. Es wurde vermutet, dass die Mechanismen Zelllinien-abhängig sind, da in der VM-CUB1 eher apoptotische, in der

UM-UC-3 hingegen nekrotische Prozesse festgestellt wurden (vgl. Maria Pinkerneil, 2017).

5.3 Vergleich der Inhibitoren 19i und SAHA

Angesichts der Entdeckung des veränderten Wirkspektrums von 19i sollte der Frage nachgegangen werden, in wieweit sich die Effekte der Inhibition mittels 19i von denen des bekannten pan-Inhibitors SAHA unterscheiden. SAHA, ein potenter Hydroxamsäure-Inhibitor, hemmt die Klasse I sowie IIb HDACs im geringen mikromolaren Bereich, hat jedoch eine bedeutend geringere Aktivität gegenüber HDAC Isoformen der Klasse IIa; im HDAC Isoformen Assay lagen die Konstanten für die Klasse IIa Inhibition über 10 μM (Lauffer et al., 2013). Nach den korrigierten Ergebnissen im Jahr 2017 war das *in vitro* Wirkspektrum von 19i ähnlich dem von SAHA. Die höchste Aktivität hat die Substanz demnach gegenüber den Isoformen der Klasse I (HDAC1, 2 und 3) sowie der Klasse IIb (HDAC6 und 10); hingegen hat sie keine inhibitorische Aktivität gegenüber HDAC4.

Dennoch zeigte 19i (bei 2 μM) in den meisten Untersuchungen stärkere antineoplastische Effekte auf die UC-Zelllinien als 2,5 μM SAHA. Bei beiden Behandlungszeiträumen waren deutlichere Proliferationseinschränkungen im Klonogenitätsassay im Vergleich zu SAHA zu sehen. Auch die mittleren Hemmkonzentrationen von 19i für die UCCs VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sind deutlich geringer (IC_{50} 19i: 0,82-1,03 μM ; IC_{50} SAHA: 2,7-6,0 μM (Niegisch et al., 2013)).

Zur stärkeren Wirksamkeit könnte der vermehrte Caspase 3/7-Aktivitätsanstieg beitragen. Der Apoptoseinduktions-Marker war in allen UCCs nach Behandlung mit 2 μM 19i doppelt so hoch wie bei SAHA. Die cleaved PARP Expression zeigte allerdings weniger starke Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsoptionen. Gleichzeitig konnte besonders in der Zelllinie VM-CUB1 ein stärkerer Anstieg der Mikronuklei nach Behandlung mit 2 μM 19i detektiert werden; die Anzahl der Mitosen war im Vergleich zu SAHA deutlich stärker reduziert. Auch bezüglich der Histonacetylierung von Histon H3 und H4 sowie verschiedenen Expressionsmarkern (p21, TS, HDAC4, HDAC5) waren die Effekte durch 2 μM 19i stärker. Zellmorphologisch war hingegen kein Unterschied zwischen der Behandlung mit 19i und SAHA erkennbar. Durch die Inkubation mit beiden Substanzen wiesen die Zellen

jeweils einen vergrößerten Zelldurchmesser auf. Es wurde bereits vielfach beschrieben, dass HDACis generell morphologische Zellveränderungen auslösen (Bolden et al., 2006; Newbold et al., 2016). Scheinbar lösen SAHA und 19i ähnliche zelluläre Veränderungen aus, welche die morphologischen Änderungen bedingen.

Wie oben diskutiert (vgl. Abs. 5.1), ist davon auszugehen, dass der antiproliferative Effekt von 19i hauptsächlich über die Inhibition der Klasse I Enzyme stattfindet. Studien aus dem urologischen Forschungslabor zeigen, dass gerade die selektive Klasse I Inhibition einen sinnvollen Ansatz für die Behandlung des UC bietet (M. Pinkerneil, Hoffmann, Deenen, et al., 2016). Beim Vergleich der IC_{50} -Werte gegenüber einzelnen Isoformen der Klasse I ist allerdings zu bemerken, dass die mittleren inhibitorischen Hemmkonzentrationen von 19i gegenüber SAHA stets höher sind (IC_{50} -Werte von SAHA: HDAC1: 0,0607 μ M, HDAC2: 0,251 μ M, HDAC3: 0,0186 μ M (Lauffer et al., 2013); IC_{50} -Werte von 19i: HDAC1: 0,315 μ M, HDAC2: 0,402 μ M, HDAC3: 0,236 μ M (korrigierte Daten 19i)). Dies bedeutet, dass die inhibitorische Aktivität gegenüber einzelnen Isoformen der Klasse I HDACs nicht unbedingt ausschlaggebend für die stärkere Proliferationseinschränkung durch 19i ist. Eher scheint die Kombination mehrerer antiproliferativer Mechanismen entscheidend für die stärkere Wirksamkeit von 19i in UCCs zu sein.

Mehrere Komponenten der veränderten Struktur des Hydroxamsäure-Inhibitors 19i könnten für die stärkere Wirkweise gegenüber SAHA verantwortlich sein. Sowohl die CAP-Gruppe als auch die *connecting unit* (CU) und Linker-Region wurden verändert und mit Zink-Bindungs-Domänen kombiniert (vgl. Abs. 1.4.3). Diese Veränderungen haben besonderen Einfluss auf die Zink-Chelation und damit auf die Subtyp- bzw. Klassen-spezifische HDAC-Inhibition (Marek et al., 2013). Besonders die CAP-Region ist für die unterschiedliche Selektivität der Inhibitoren verantwortlich (Estiu et al., 2008).

Schlussendlich könnte der Inhibitor als alternative Substanz zu SAHA eingesetzt werden, da sich das Wirkspektrum überschneidet und die Substanz sogar im geringeren Konzentrationsbereich eine stärkere Wirkung zeigt. Bei ähnlichem Wirkspektrum könnte die therapeutische Wirkung zu der von SAHA korrespondieren. Die stärkeren, zellulären Effekte könnten jedoch auch eine erhöhte Toxizität bedingen; diese Frage müsste über *in vivo* Studien geklärt werden, da bis heute wenig über die Wirkung von 19i *in vivo* bekannt ist.

5.4 Auswirkungen einer HDAC4 Überexpression auf UCCs

Da ursprünglich angenommen wurde, dass 19i vor allem über Inhibition von Klasse IIa HDACs wirkt, wurden auch verschiedene Experimente mit stabil transduzierten, HDAC4 überexprimierenden VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellen vorgenommen. Die Zelllinien reagierten auf 19i insgesamt ähnlich wie die Ausgangszelllinien. Die Ergebnisse dazu sind im Anhang zu finden.

Von Interesse war darüberhinaus auch der Einfluss der HDAC4 Überexpression als solcher auf die Zellen. Morphologisch wurde kein Unterschied zu den Ausgangszelllinien gesehen, allerdings wuchsen besonders die VM-CUB1 Zellen mit HDAC4-Überexpression langsamer und bildeten weniger Kolonien im Vergleich zu den Mutterzelllinien sowie den Kontrollzellen mit stabil transduziertem Leervektor. Besonders offensichtlich war dieser Unterschied beim regelmäßigen Passagieren der Zellen; obwohl die gleiche Anzahl an Zellen ausgesät wurde, waren die HDAC4 überexprimierenden Zellen am nächsten Tag kolonieärmer. Dies könnte auf eine Anpassungsstörung nach der Aussaat deuten oder eine verminderte Proliferationsfähigkeit widerspiegeln. Tatsächlich wurde in verschiedenen Arbeiten eine Funktion von HDAC4 im Zusammenhang mit dem zellulären Wachstum und ein Einfluss von veränderter HDAC4 Expression auf die Proliferation beobachtet (s.u.). Zu einem negativen Einfluss von HDAC4 würde auch die von Niegisch et al. (2013) beschriebene Herunterregulation von Klasse IIa HDACs in UCCs passen.

In der Literatur sind für HDAC4 verschiedene Tumor-Modelle mit sowohl pro- als auch anti-proliferativen Effekten beschrieben. Die Ursache für diese gegensätzlichen Funktionen könnte in posttranslationalen Modifikationen oder den verschiedenen Multiproteinkomplexen liegen, welche die Funktion von HDAC4 beeinflussen (Clocchiatti et al., 2011). Wie oben erwähnt, kann HDAC4 als Substrat von Caspasen die Apoptose verstärken (Z. M. Li et al., 2014). Die Überexpression könnte daher zu einer gesteigerten Apoptose und einer daraus folgenden verminderten Zellzahl führen. Andere Autoren vermuteten, dass HDAC4 über die Assoziation mit Transkriptionsfaktoren wie MEF2 und weiteren Ko-Repressoren an der Stilllegung von Genen, welche für das zelluläre Überleben von Bedeutung sind, beteiligt ist. Dies würde die proapoptotische Aktivität erklären (Paroni et al., 2007).

Für Neuroblastomzellen (HT22) und humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) wurde demgegenüber gezeigt, dass HDAC4 die Aktivität der Cyclin-abhängigen

Kinase 1 (*CDK1*) und die Zellzyklus-Progression hemmt. In HEK293T Zellen mit HDAC4 Überexpression wurde ein verlangsamtes Wachstum nachgewiesen. Den Autoren zufolge ist dies eher durch eine Inhibition der Zellzyklus-Progression als durch einen erhöhten Zelltod bedingt. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von HDAC4 führte wiederum zu einer erhöhten Zellzyklusprogression (Majdzadeh et al., 2008). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass HDAC4 an der Repression der Promotoren von Zellzyklus-Regulatoren beteiligt ist. Nach DNA-Schädigung kommt es zu einer *p53*- und *NF-Y*-abhängigen Assoziation mit Promotoren und Repression von Genen der G2/M-Phase (Basile et al., 2006). Insgesamt deuten diese Aspekte darauf hin, dass hohe HDAC4-Aktivität für Tumorzellen kontraproduktiv sein kann. Die Herunterregulation würde damit zur besseren Proliferationsfähigkeit beitragen.

Andererseits wird HDAC4 auch mit proliferativen Prozessen in Zusammenhang gebracht. Beispielweise wurde berichtet, dass eine HDAC4 Überexpression mit dem Schweregrad sowie dem verstärkten Auftreten von Harnblasenkarzinomen korreliert (Xu et al., 2011). Diese Arbeit steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Niegisch et al. 2013. Im gleichen Sinne war eine Überexpression von HDAC4 mRNA und Protein in Oesophaguskarzinom-Zellen mit einem erhöhten Tumorgrad, einem fortgeschrittenen klinischen Stadium und einem schlechteren Outcome assoziiert (Zeng et al., 2016).

Interessanterweise konnte in HDAC4 überexprimierenden VM-CUB1 Zellen gleichzeitig eine erhöhte Thymidylat-Synthase Expression festgestellt werden. Dies könnte als reaktiver Mechanismus der Zelllinie auf ein vermindertes Wachstum sowie DNA-Schäden gedeutet werden, da das Enzym u.a. bei der Replikation und der DNA-Reparatur beteiligt ist (Chon et al., 2017). Dieser Aspekt sollte jedoch ebenfalls mit Vorsicht gedeutet werden, da dieser Effekt ausschließlich in der Zelllinie VM-CUB1 nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte in dieser Zelllinie eine signifikante Hochregulation von HDAC7 mRNA beobachtet werden. Allerdings spiegelte sich dieses Ergebnis wiederum nicht in der Zelllinie UM-UC-3 wider. Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien deuten daraufhin, dass die Auswirkung der HDAC4 Überexpression zelllinienspezifisch sein könnte. Sichtlich müsste eine größere Anzahl von Zelllinien untersucht werden.

Um eindeutige Aussagen über die Funktion von HDAC4 in UCCs treffen zu können, müssten die durchgeführten Überexpressionsexperimente durch siRNA-Knockdown- oder CRISPR/Cas-Knockout-Versuche ergänzt werden. Da der Einsatz des Inhibitors

19i keine Schlussfolgerung über die molekularen Effekte einer selektiven Klasse IIa Inhibition zulässt, müssten spezifischere Klasse IIa Inhibitoren an UCCs getestet werden, auch im Ausblick auf neue Therapieoptionen für die Behandlung des UC. Hierzu sind seit kurzem weitere Substanzen verfügbar (Lobera et al. 2013). Nach derzeitigem Stand besteht jedoch die Vermutung, dass eine weitere Inhibition von HDAC4 und damit auch der Klasse IIa nicht sinnvoll für die Behandlung des UC ist.

5.5 Fazit – Selektive HDAC-Inhibitoren und deren Potential in der Therapie des UC

Obwohl das UC als chemosensitiv gilt, ist die auf Cisplatin-Kombinationen basierende Erstlinien-Therapie des muskelinvasiven und metastasierten UC nur begrenzt effektiv. Die Kombination mehrerer Chemotherapeutika erzielt zwar eine bessere Ansprechrate, erhöht jedoch die Toxizität und geht nicht unbedingt mit einem besseren Outcome einher (Oing et al., 2016). Daher haben HDACis in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Allerdings ist auch für Pan-HDACis eine Vielzahl an Nebenwirkungen bekannt, welche ein großes Problem in der Behandlung maligner Erkrankungen darstellen.

Daher steht zur Diskussion, ob selektive HDACis ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen als Pan-HDACis und deshalb im klinischen Alltag ein höheres Potential aufweisen. Die Datenlage dazu ist sehr heterogen. Laut einiger Autoren scheint die Toxizität der Inhibitoren nicht Klassen-spezifisch zu sein (Hrabeta et al., 2014). Die bisher in Studien getesteten selektiven HDACis ergaben kein besseres Outcome im Vergleich zu Pan-HDACis (Balasubramanian et al., 2009; Khan et al., 2008; L. Zhang et al., 2015). Dieses Fazit bezieht sich allerdings auf Inhibitoren, die nicht selektiv für eine HDAC-Isoform sind, sondern in unterschiedlichem Maße die HDAC-Isoformen 1, 2 und 3 hemmen (L. Zhang et al., 2015). Es wird vermutet, dass die Inhibitoren nicht selektiv genug sind, um eine Reduktion der Nebenwirkungen zu erreichen (Balasubramanian et al., 2009; X. Li et al., 2014). Andere Studien berichten wiederum von einer Besserung des Nebenwirkungsprofils. In Phase II Studien mit dem Inhibitor Mocetinostat (Klasse I und IV HDAC-Inhibitor) konnte keine, bei Pan-Inhibitoren sonst Dosis-limitierende Verlängerung der QT-Zeit, nachgewiesen werden. Auch hämatologische Veränderungen waren geringer (Boumber et al., 2011; Ononye et al., 2012). Bei der Untersuchung eines spezifischen HDAC1/3 Inhibitors an Mäusen *in vivo* wurde weder ein signifikanter Gewichtsverlust noch Leber- oder Milztoxizität

festgestellt (X. Li et al., 2014). Auf Grund der begrenzten Anzahl klinischer Studien mit selektiven Inhibitoren ist eine eindeutige Aussage bezüglich des günstigeren Nebenwirkungsprofils jedoch noch nicht möglich.

Bei dem Ziel, die Therapie von malignen Tumoren effektiver zu gestalten, ist zu bedenken, dass tumorabhängig unterschiedliche HDAC-Isoformen an der Tumورprogression beteiligt sind (Benedetti et al., 2015; H. Zhang et al., 2016). Zusätzlich leisten bestimmte HDAC-Isoformen antagonistische Beiträge in unterschiedlichen Tumormodellen (Clocchiatti et al., 2011). In Neuroblastomzellen führt ein Knockout von HDAC2 zu Apoptose, ein Knockout von HDAC8 hingegen zu zellulärer Differenzierung (Delcuve et al., 2013). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Inhibition einer bestimmten HDAC-Isoform vorteilhafte epigenetische Veränderungen für die Behandlung einer malignen Erkrankung erzielen kann, während die Inhibition einer weiteren Isoform den gegenteiligen Effekt verursacht (K. V. Butler et al., 2008). In der Literatur wird somit die gängige Theorie vertreten, dass je nach Tumorart einerseits selektive Inhibitoren, andererseits Pan-Inhibitoren, welche mehrere HDAC-Isoformen hemmen, einen Vorteil mit sich bringen können. Die Therapie sollte somit tumorabhängig erfolgen (L. Zhang et al., 2015).

Beispielsweise erbrachten Isoform-selektive Inhibitoren gegen HDAC6 bzw. HDAC8 vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung bestimmter Tumor-Entitäten (Balasubramanian et al., 2009). Eine spezifische HDAC6-Inhibition mittels Tubacin, einem selektiven HDAC6 Inhibitor, hemmte signifikant das Zellwachstum von Multiple-Myelom-Zelllinien, welche stark HDAC6 exprimieren. In Neuroblastom-Zelllinien, welche eine HDAC8 Überexpression aufwiesen, wurde durch einen selektiven HDAC8 Inhibitor eine Inhibition des Wachstums sowie eine Induktion der Differenzierung erreicht. Die HDAC8 Überexpression korrelierte mit dem Fortschreiten der Erkrankung und der Metastasierung. In beiden Studien wurden normale Kontroll-Zelllinien nicht im Wachstum beeinflusst. Insgesamt wurde geschlussfolgert, dass die Aktivität der selektiven Inhibitoren Tumor-Entitäten spezifisch ist. Sobald die Pathogenese eines Tumors mit einer abweichenden HDAC-Expression gekoppelt ist, könnte dieses Zielmolekül als therapeutischer Angriffspunkt genutzt werden (Balasubramanian et al., 2009; Oehme et al., 2009).

Wie diese Arbeit illustriert, ist die Funktion und Beteiligung der Klasse IIa HDACs an der Tumorentwicklung insgesamt und speziell in Urothelkarzinomen noch

unzureichend geklärt. Bezüglich der Einschränkung des Tumorwachstums stellt sich die Frage, ob eine Inhibition überhaupt sinnvoll ist, wenn die Klasse IIa kaum direkt in die Proliferationskontrolle involviert ist, auch wenn dies indirekt über die Interaktion mit Klasse I Enzymen geschehen könnte. Es ist bekannt, dass HDAC4 in die Transkriptionsregulation involviert ist, indem es mit HDAC3 interagiert (Wu et al., 2016). HDAC4 bildet dabei einen Repressor-Komplex mit HDAC3 und SMRT-NCoR und ist verantwortlich für dessen Deacetylase-Aktivität (Wang et al., 2014). Dieser Komplex reguliert ein weites Spektrum zellulärer Prozesse, darunter Differenzierung und Proliferation (Karagianni et al., 2007). Die biochemische Aktivität von Klasse IIa-Enzymen könnte daher über die Rekrutierung von Klasse I Enzymen stattfinden (Di Giorgio et al., 2015). Wenn HDAC4 über diesen Mechanismus einen wesentlichen Einfluss auf die Proliferationskontrolle hätte, wäre der Einsatz selektiver Klasse IIa Inhibitoren zur Tumorthherapie theoretisch zu rechtfertigen.

Gerade im UC tragen epigenetische Veränderungen zur Tumorgenese bei (Schulz et al., 2015). Eine gezielte Behandlung mittels selektiver HDACis wäre von daher vielversprechend und ist von der Arbeitsgruppe im hiesigen Forschungslabor der Klinik für Urologie in mehreren Arbeiten untersucht worden (Lehmann et al., 2014; M. Pinkerneil, Hoffmann, Kohlhof, et al., 2016; Rosik et al., 2014). Hinsichtlich einer selektiven Klasse IIa Inhibition in UCCs kann jedoch weder aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe noch anhand der weiteren aktuellen Literatur eine Aussage getroffen werden. Nach bisherigen Daten für Klasse IIa HDACs (Niegisch et al., 2013) könnte der Ansatz, dass eine selektive Inhibition dann sinnvoll zu sein scheint, wenn abweichende Expressionsspiegel verschiedener Isoformen an der Tumorprogression beteiligt sind, in UCCs zutreffen. Die Datenlage bezüglich der Expression ist jedoch sehr heterogen. In Vorarbeiten von Niegisch et al. konnte eine Herunterregulation der Klasse IIa in einem Großteil der UCCs ermittelt werden. Andere Arbeiten ergaben hingegen eine erhöhte Rate HDAC4-positiver Gewebeproben im Vergleich zu normalem Blasengewebe sowie eine erhöhte HDAC4 Proteinexpression in einem Großteil der verwendeten UCCs (Wang et al., 2014; Xu et al., 2011). Auf Grund der unterschiedlichen Ergebnisse ist eine eindeutige Schlussfolgerung nicht möglich.

Ein weiteres Problem zur Beantwortung der Frage stellt der Mangel an potenten und spezifischen Klasse IIa Inhibitoren dar. Ein gutes Beispiel für die Schwierigkeiten in diesem Zusammenhang bietet diese Arbeit. Bis heute liegen nur wenige präklinische Untersuchungen oder gar klinische Studien zu spezifischen Klasse IIa Inhibitoren vor,

sodass ihr Potential als gezielte Medikamente in der Tumorthherapie unklar ist. Ein Grund liegt darin, dass die katalytische Domäne dieser Proteine ähnlich zu denen der Klasse I ist, welches eine selektive Inhibition schwierig macht. Auch ist es methodisch schwierig, die Klasse IIa Inhibition zu messen, da die enzymatische Aktivität sehr niedrig ist, wenn rekombinante Proteine genutzt werden. Die Potenz der Substanz sollte über ein spezifisches Substrat (Trifluoroacetyl-Lysin) gemessen werden, während die inhibitorische Aktivität gegen andere HDACs durch klassische Substrate wie acetylierte Lysine ermittelt werden kann (Di Giorgio et al., 2015). Ein anderer Ansatz wurde in der Publikation von Lobera et al. beschrieben. Die Autoren entwickelten eine Serie von selektiven Klasse IIa Inhibitoren, welche eine Metallbindende funktionelle Gruppe (Trifluormethyloxadiazol, TFMÖ) enthalten (Lobera et al., 2013). Ihr therapeutisches Potential soll mit dem von herkömmlichen HDACis vergleichbar sein. Die selektive Wirkung dieser Substanzen auf die Klasse IIa HDACs in UCCs könnte in Folgestudien untersucht werden, um die Funktion dieser Klasse näher zu evaluieren.

Demnach kann die Untersuchung von 19i auf Grund des veränderten Wirkspektrums nicht dazu beitragen, eine eindeutige Aussage bezüglich der Effektivität einer Klasse IIa Inhibition in UCCs zu treffen. Die beschriebene, negative Beeinflussung von HDAC4 auf das Tumorwachstum der stabil transduzierten Zellvarianten könnte einen entscheidenden Hinweis zur Beantwortung dieser Frage beisteuern. Demnach wäre eine weitere, selektive Klasse IIa bzw. HDAC4 Inhibition therapeutisch nicht sinnvoll, da sie womöglich das Tumorwachstum begünstigen könnte. Für eine schlussendliche Aussage müssten selektive Klasse IIa Inhibitoren in weiteren Studien getestet werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1: <i>Relatives Expressionsniveau von HDAC4, HDAC5 und HDAC7 mRNA in UCCs und in urothelialen Primärkulturen (UP).....</i>	51
Abb. 4.2: <i>Western-Blot verschiedener UC-Zelllinien (VM-CUB1 bis HT1376), einer urothelialen Primärkultur (UP242) sowie einer benignen uroepithelialen Zelllinie TERT-NHUC zum Nachweis der HDAC4 Expression auf Proteinebene.....</i>	52
Abb. 4.3: <i>Dosiswirkungskurve nach Behandlung mit den HDACi 19e, 19h und 19i der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.....</i>	53
Abb. 4.4: <i>Quantifizierung der Zellvitalität mit dem MTT-Assay nach unterschiedlich langer Behandlung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC3 und 639-V mit den HDACis 19e, 19h und 19i.</i>	55
Abb. 4.5: <i>Giemsa-Färbung der Zelllinie VM-CUB1 nach Behandlung mit 19e, 19h und 19i. Die Zellen wurden vor der Aussaat bei niedriger Zelldichte über einen Zeitraum von 72 h mit dem IC₂₅ der IC₅₀-Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem die mit DMSO behandelten Zellkolonien annähernd konfluent waren.</i>	56
Abb. 4.6: <i>MTT-Assay dargestellt als Dosiswirkungskurve zur Quantifizierung der Zellvitalität nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK.</i>	59
Abb. 4.7: <i>Giemsa-Färbung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK nach Behandlung mit 19i.....</i>	61
Abb. 4.8: <i>Zellzyklus-Analyse der UC-Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V nach 24 h und 48 h.</i>	63
Abb. 4.9: <i>Zellzyklus-Analyse der Zelllinien HEK293 und HBLAK nach 24 h und 48 h.....</i>	64
Abb. 4.10: <i>Quantifizierung der Caspase 3/7-Aktivität nach Behandlung mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.</i>	65
Abb. 4.11: <i>Western Blot zur Bestimmung der Spaltung von PARP1 nach Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.</i>	66
Abb. 4.12: <i>Beispielhafte Bildausschnitte zytochemischer Fluoreszenzfärbungen. Negativ-Kontrollen der Zelllinie VM-CUB1.</i>	67
Abb. 4.13: <i>Zytochemische Fluoreszenzfärbung mit nukleären Veränderungen nach Inkubation mit 19i.....</i>	68

Abb. 4.14: Statistische Auswertung der zytochemischen Färbung der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3.	69
Abb. 4.15: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V sowie HEK293 und HBLAK nach Behandlung mit 19i.	70
Abb. 4.16: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1 und HEK293 nach Behandlung mit 19i und folgender Detektion seneszenten Zellen mittels Seneszenz-assoziiertem sauren β -Galaktosidase-Assay.	72
Abb. 4.17: Relative Expression von HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9 mRNA in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i.	74
Abb. 4.18: Relative Expression von Thymidylat-Synthase und p21 mRNA der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V nach Behandlung mit dem HDACi 19i.	76
Abb. 4.19: Relative Expression von Thymidylat-Synthase und p21 mRNA der Zelllinie HBLAK nach Behandlung mit dem HDACi 19i.	77
Abb. 4.20: Western Blot zur Bestimmung des Expressionsstatus von p21 und der Acetylierung α -Tubulin nach Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.	78
Abb. 4.21: Western Blot zur Bestimmung der Acetylierung von Histon H3 und H4 nach Inkubation mit 19i in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.	79
Abb. 4.22: HDAC4 Überexpression in den transduzierten Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3.	80
Abb. 4.23: (A) Klonogenitätsassay, (B) Verdünnungsreihe und (C) MTT-Proliferationsassay der unbehandelten Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren transduzierten HDAC4 und LV Zellvarianten.	82
Abb. 4.24: Relatives Expressionsniveau von Thymidylat-Synthase und p21 der Zelllinie VM-CUB1 und UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC4 Überexpression.	83
Abb. 4.25: Relative Expression von Klasse IIa HDAC mRNAs in den Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Varianten mit HDAC4 Überexpression.	84
Abb. 4.26: Dosiswirkungskurve der Zellvitalität mittels MTT-Assay nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren HDAC4, HDAC1 und LV Varianten.	85

Abb. 4.27: Dosiswirkungskurve der Zellvitalität mittels MTT-Assay nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i sowie LMK163 und LMK214 der Zelllinien VM-CUB1 und HEK293.....	86
Abb. 4.28: MTT-Vitalitätsassay dargestellt als Zeitreihe der Zelllinie VM-CUB1 nach Behandlung mit den HDACi LMK163 und LMK214 sowie 19i.....	87
Abb. 4.29: Durchflusszytometrie der UC-Zelllinie VM-CUB1 nach 24 h.....	88
Abb. 4.30: Caspase 3/7-Aktivität nach Behandlung mit dem HDACi LMK163 und LMK214 sowie 19i der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.....	89
Abb. 9.1: Relatives Expressionsniveau von HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9 mRNA der Zelllinie VM-CUB1 nach Behandlung mit den HDACi 19e, 19h und 19i.....	132
Abb. 9.2: Western-Blot der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V zur Bestimmung der Expression von Thymidylat-Synthase und von acetyliertem α -Tubulin nach Behandlung mit den HDACi 19e, 19h und 19i.....	133
Abb. 9.3: MTT-Assay dargestellt als Dosiswirkungskurve zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Behandlung mit der Substanz LMK235-COOH der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V.....	133
Abb. 9.4: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren LV und HDAC4 Zellvarianten.....	134
Abb. 9.5: MTT-Proliferationsassay dargestellt als Inhibitionszeitreihe zur Quantifizierung der Zellvitalität nach medikamentöser Behandlung mit den HDACi 19i der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren HDAC4, HDAC1 und LV Zellvarianten.....	135
Abb. 9.6: Zellzyklus-Analyse beispielhaft für die VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach 24 h und 48 h Behandlung.....	136
Abb. 9.7: Giemsa-Färbung der VM-CUB1 Zellvarianten mit HDAC1, HDAC4 Überexpression und einem LV nach Behandlung mit 19i.....	137
Abb. 9.8: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression sowie einem Leervektor nach Behandlung mit 19i.....	138
Abb. 9.9: Relatives Expressionsniveau von HDAC Klasse IIa mRNA der Zelllinie VM-CUB1 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i.....	139

Abb. 9.10: <i>Relatives Expressionsniveau von HDAC Klasse IIa mRNA der Zelllinie UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i</i>	140
Abb. 9.11: <i>Relatives Expressionsniveau von Thymidylat-Synthase und p21 mRNA der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i</i>	141
Abb. 9.12: <i>Western Blot zur Bestimmung von acetyliertem α-Tubulin und cleaved PARP1 nach Inkubation mit 19i in den Zellvarianten der Mutterzelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3</i>	142
Abb. 9.13: <i>Statistische Auswertung der zytochemischen Färbung der VM-CUB1 und UM-UC-3 LV, HDAC1 und HDAC4 Zellvarianten</i>	143

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten UCCs und Kontrollzellen.	23
Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.	24
Tabelle 2.3: Molekularbiologische Kits.	26
Tabelle 2.4: Puffer und Lösungen für die Zellzyklus-Analyse.	26
Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen für Zytochemie.	27
Tabelle 2.6: Puffer und Lösungen für SA- β -Galaktosidase Assay.	27
Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen für RNA Analysen.	28
Tabelle 2.8: Puffer und Gele für Western Blot Analysen.	28
Tabelle 2.9: Puffer für Histonextraktion.	30
Tabelle 2.10: Plasmide.	30
Tabelle 2.11: Übersicht primäre und sekundäre Antikörper.	31
Tabelle 2.12: Übersicht der verwendeten Enzyme.	31
Tabelle 2.13: Übersicht der Primer für die qRT-PCR.	32
Tabelle 2.14: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.	32
Tabelle 2.15: Übersicht der Geräte.	33
Tabelle 2.16: Übersicht der verwendeten Softwares und Datenbanken.	35
Tabelle 3.1: Aussaat-Schema für die einzelnen Well-Formate.	37
Tabelle 3.2: Inhibitor-Endkonzentrationen für die Behandlung der UC-Zelllinien.	38
Tabelle 4.1: IC_{50} -Werte der HDAC-Inhibitoren 19e, 19h und 19i.	54
Tabelle 9.1: TNM Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase.	131
Tabelle 9.2: Überblick über die HDACs beim Menschen.	132
Tabelle 9.3: IC_{50} -Werte [μ M] der Inhibitoren LMK235 (19i), TSA und TMP für die HDAC Isoformen 1-11.	134

8 Literaturverzeichnis

- Acharya, P., Beckel, J., Ruiz, W. G., Wang, E., Rojas, R., Birder, L., & Apodaca, G. (2004). "Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium." *Am J Physiol Renal Physiol* 287(2): F305-318.
- Ajamian, F., Salminen, A., & Reeben, M. (2004). "Selective regulation of class I and class II histone deacetylases expression by inhibitors of histone deacetylases in cultured mouse neural cells." *Neurosci Lett* 365(1): 64-68.
- Alfred Witjes, J., Lebre, T., Comperat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., Hernandez, V., Espinos, E. L., Dunn, J., Rouanne, M., et al. (2017). "Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer." *Eur Urol* 71(3): 462-475.
- Arnold, M. A., Kim, Y., Czubryt, M. P., Phan, D., McAnally, J., Qi, X., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2007). "MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development." *Dev Cell* 12(3): 377-389.
- Babjuk, M., Bohle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Comperat, E. M., Hernandez, V., Kaasinen, E., Palou, J., Roupert, M., et al. (2017). "EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016." *Eur Urol* 71(3): 447-461.
- Babjuk, M., Burger, M., Zigeuner, R., Shariat, S. F., van Rhijn, B. W., Comperat, E., Sylvester, R. J., Kaasinen, E., Bohle, A., Palou Redorta, J., et al. (2013). "EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013." *Eur Urol* 64(4): 639-653.
- Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S., & Olson, E. N. (2006). "CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy." *J Clin Invest* 116(7): 1853-1864.
- Balasubramanian, S., Verner, E., & Buggy, J. J. (2009). "Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step?" *Cancer Lett* 280(2): 211-221.
- Barneda-Zahonero, B., & Parra, M. (2012). "Histone deacetylases and cancer." *Mol Oncol* 6(6): 579-589.
- Basile, V., Mantovani, R., & Imbriano, C. (2006). "DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines." *J Biol Chem* 281(4): 2347-2357.
- Benedetti, R., Conte, M., & Altucci, L. (2015). "Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We?" *Antioxid Redox Signal* 23(1): 99-126.
- Bertrand, P. (2010). "Inside HDAC with HDAC inhibitors." *European Journal of Medicinal Chemistry* 45(6): 2095-2116.
- Bhaskara, S., Knutson, S. K., Jiang, G., Chandrasekharan, M. B., Wilson, A. J., Zheng, S., Yenamandra, A., Locke, K., Yuan, J. L., Bonine-Summers, A. R., et al. (2010). "Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability." *Cancer Cell* 18(5): 436-447.
- Bhatia, A., & Kumar, Y. (2013). "Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications." *APMIS* 121(7): 569-581.
- Bieliauskas, A. V., & Pflum, M. K. (2008). "Isoform-selective histone deacetylase inhibitors." *Chem Soc Rev* 37(7): 1402-1413.
- Black, B. L., & Olson, E. N. (1998). "Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14: 167-196.

- Blaveri, E., Simko, J. P., Korkola, J. E., Brewer, J. L., Baehner, F., Mehta, K., Devries, S., Koppie, T., Pejavar, S., Carroll, P., et al. (2005). "Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression." *Clin Cancer Res* 11(11): 4044-4055.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(9): 769-784.
- Bolden, J. E., Shi, W., Jankowski, K., Kan, C. Y., Cluse, L., Martin, B. P., MacKenzie, K. L., Smyth, G. K., & Johnstone, R. W. (2013). "HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses." *Cell Death & Disease* 4: e519.
- Bose, P., Dai, Y., & Grant, S. (2014). "Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights." *Pharmacol Ther* 143(3): 323-336.
- Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Di Giovine, P., Cirillo, A., Scarpelli, R., Ferrigno, F., Jones, P., Neddermann, P., De Francesco, R., Steinkuhler, C., et al. (2008). "Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain." *J Biol Chem* 283(39): 26694-26704.
- Boumber, Y., Younes, A., & Garcia-Manero, G. (2011). "Mocetinostat (MGCD0103): a review of an isotype-specific histone deacetylase inhibitor." *Expert Opin Investig Drugs* 20(6): 823-829.
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., & Khochbin, S. (2007). "HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination." *Oncogene* 26(37): 5468-5476.
- Brierley, J., M. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). Oxford, Wiley-Blackwell.
- Brown, T., Slack, R., Rushton, L., & British Occupational Cancer Burden Study, G. (2012). "Occupational cancer in Britain. Urinary tract cancers: bladder and kidney." *Br J Cancer* 107 Suppl 1: S76-84.
- Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L. A., La Vecchia, C., Shariat, S., et al. (2013). "Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer." *Eur Urol* 63(2): 234-241.
- Butler, K. V., & Kozikowski, A. P. (2008). "Chemical origins of isoform selectivity in histone deacetylase inhibitors." *Curr Pharm Des* 14(6): 505-528.
- Butler, L. M., Zhou, X., Xu, W. S., Scher, H. I., Rifkind, R. A., Marks, P. A., & Richon, V. M. (2002). "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* 99(18): 11700-11705.
- Cadot, B., Brunetti, M., Coppari, S., Fedeli, S., de Rinaldis, E., Dello Russo, C., Gallinari, P., De Francesco, R., Steinkuhler, C., & Filocamo, G. (2009). "Loss of histone deacetylase 4 causes segregation defects during mitosis of p53-deficient human tumor cells." *Cancer Res* 69(15): 6074-6082.
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). "Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma." *Nature* 507(7492): 315-322.
- Canes, D., Chiang, G. J., Billmeyer, B. R., Austin, C. A., Kosakowski, M., Rieger-Christ, K. M., Libertino, J. A., & Summerhayes, I. C. (2005). "Histone deacetylase inhibitors upregulate plakoglobin expression in bladder carcinoma cells and display antineoplastic activity in vitro and in vivo." *Int J Cancer* 113(5): 841-848.
- Castillo-Martin, M., Domingo-Domenech, J., Karni-Schmidt, O., Matos, T., & Cordon-Cardo, C. (2010). "Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis." *Urol Oncol* 28(4): 401-408.
- Chen, C. L., Sung, J., Cohen, M., Chowdhury, W. H., Sachs, M. D., Li, Y., Lakshmanan, Y., Yung, B. Y., Lupold, S. E., & Rodriguez, R. (2006). "Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther* 319(2): 533-542.

- Chen, D. J., Chen, W., Jiang, H., Yang, H., Wang, Y. C., & Chen, J. H. (2016). "Downregulation of DOCK1 sensitizes bladder cancer cells to cisplatin through preventing epithelial-mesenchymal transition." *Drug Design, Development and Therapy* 10: 2845-2853.
- Chia, K., Beamish, H., Jafferli, K., & Gabrielli, B. (2010). "The histone deacetylase inhibitor MGCD0103 has both deacetylase and microtubule inhibitory activity." *Mol Pharmacol* 78(3): 436-443.
- Choi, S. Y., Kee, H. J., Kurz, T., Hansen, F. K., Ryu, Y., Kim, G. R., Lin, M. Q., Jin, L., Piao, Z. H., & Jeong, M. H. (2016). "Class I HDACs specifically regulate E-cadherin expression in human renal epithelial cells." *J Cell Mol Med* 20(12): 2289-2298.
- Chon, J., Stover, P. J., & Field, M. S. (2017). "Targeting nuclear thymidylate biosynthesis." *Molecular Aspects of Medicine* 53: 48-56.
- Chuang, C., Lin, S. H., Huang, F., Pan, J., Josic, D., & Yu-Lee, L. Y. (2010). "Acetylation of RNA processing proteins and cell cycle proteins in mitosis." *J Proteome Res* 9(9): 4554-4564.
- Clocchiatti, A., Di Giorgio, E., Demarchi, F., & Brancolini, C. (2013). "Beside the MEF2 axis: unconventional functions of HDAC4." *Cell Signal* 25(1): 269-276.
- Clocchiatti, A., Di Giorgio, E., Ingrao, S., Meyer-Almes, F. J., Tripodo, C., & Brancolini, C. (2013). "Class IIa HDACs repressive activities on MEF2-dependent transcription are associated with poor prognosis of ER+ breast tumors." *FASEB Journal* 27(3): 942-954.
- Clocchiatti, A., Florean, C., & Brancolini, C. (2011). "Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis." *J Cell Mol Med* 15(9): 1833-1846.
- Codd, R., Braich, N., Liu, J., Soe, C. Z., & Pakchung, A. A. (2009). "Zn(II)-dependent histone deacetylase inhibitors: suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A." *Int J Biochem Cell Biol* 41(4): 736-739.
- Cornago, M., Garcia-Alberich, C., Blasco-Angulo, N., Vall-Llaura, N., Nager, M., Herreros, J., Comella, J. X., Sanchis, D., & Llovera, M. (2014). "Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe." *Cell Death & Disease* 5: e1435.
- Das, C., & Kundu, T. K. (2005). "Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans -- a new target for therapeutics." *IUBMB Life* 57(3): 137-149.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." *Biochem J* 370(Pt 3): 737-749.
- Delcuve, G. P., Khan, D. H., & Davie, J. R. (2013). "Targeting class I histone deacetylases in cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* 17(1): 29-41.
- Di Giorgio, E., & Brancolini, C. (2016). "Regulation of class IIa HDAC activities: it is not only matter of subcellular localization." *Epigenomics* 8(2): 251-269.
- Di Giorgio, E., Gagliostro, E., & Brancolini, C. (2015). "Selective class IIa HDAC inhibitors: myth or reality." *Cell Mol Life Sci* 72(1): 73-86.
- Dickinson, M., Johnstone, R. W., & Prince, H. M. (2010). "Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect." *Invest New Drugs* 28 Suppl 1: S3-20.
- Dobruch, J., Daneshmand, S., Fisch, M., Lotan, Y., Noon, A. P., Resnick, M. J., Shariat, S. F., Zlotta, A. R., & Boorjian, S. A. (2016). "Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes." *Eur Urol* 69(2): 300-310.

- Doherty, S. C., McKeown, S. R., McKelvey-Martin, V., Downes, C. S., Atala, A., Yoo, J. J., Simpson, D. A., & Kaufmann, W. K. (2003). "Cell cycle checkpoint function in bladder cancer." *J Natl Cancer Inst* 95(24): 1859-1868.
- Dokmanovic, M., Perez, G., Xu, W., Ngo, L., Clarke, C., Parmigiani, R. B., & Marks, P. A. (2007). "Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7." *Mol Cancer Ther* 6(9): 2525-2534.
- Dressel, U., Bailey, P. J., Wang, S. C., Downes, M., Evans, R. M., & Muscat, G. E. (2001). "A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation." *J Biol Chem* 276(20): 17007-17013.
- Duong, V., Bret, C., Altucci, L., Mai, A., Duraffourd, C., Loubersac, J., Harmand, P. O., Bonnet, S., Valente, S., Maudelonde, T., et al. (2008). "Specific Activity of Class II Histone Deacetylases in Human Breast Cancer Cells." *Molecular Cancer Research* 6(12): 1908-1919.
- Dyrskjot, L., Kruhoffer, M., Thykjaer, T., Marcussen, N., Jensen, J. L., Moller, K., & Orntoft, T. F. (2004). "Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification." *Cancer Res* 64(11): 4040-4048.
- Dyrskjot, L., Zieger, K., Real, F. X., Malats, N., Carrato, A., Hurst, C., Kotwal, S., Knowles, M., Malmstrom, P. U., de la Torre, M., et al. (2007). "Gene expression signatures predict outcome in non-muscle-invasive bladder carcinoma: a multicenter validation study." *Clin Cancer Res* 13(12): 3545-3551.
- Eble J.N., S. G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A., editors (2004). "World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs." Lyon, France: IARC Press: p. 110-123.
- Eble, J. N., Sauter, G., I, J. I. E., & Sesterhenn, s. A. (2004). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs (IARC Press). <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb7/>
- Eissenberg, J. C., & Elgin, S. C. (2000). "The HP1 protein family: getting a grip on chromatin." *Current Opinion in Genetics & Development* 10(2): 204-210.
- Eom, G. H., Nam, Y. S., Oh, J. G., Choe, N., Min, H. K., Yoo, E. K., Kang, G., Nguyen, V. H., Min, J. J., Kim, J. K., et al. (2014). "Regulation of acetylation of histone deacetylase 2 by p300/CBP-associated factor/histone deacetylase 5 in the development of cardiac hypertrophy." *Circ Res* 114(7): 1133-1143.
- Escaffit, F., Vaute, O., Chevillard-Briet, M., Segui, B., Takami, Y., Nakayama, T., & Trouche, D. (2007). "Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression." *Mol Cell Biol* 27(2): 554-567.
- Estiu, G., Greenberg, E., Harrison, C. B., Kwiatkowski, N. P., Mazitschek, R., Bradner, J. E., & Wiest, O. (2008). "Structural origin of selectivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors." *J Med Chem* 51(10): 2898-2906.
- Fajkovic, H., Halpern, J. A., Cha, E. K., Bahadori, A., Chromecki, T. F., Karakiewicz, P. I., Breinl, E., Merseburger, A. S., & Shariat, S. F. (2011). "Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis." *World J Urol* 29(4): 457-463.
- Falkenberg, K. J., & Johnstone, R. W. (2014). "Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders." *Nature Reviews Drug Discovery* 13(9): 673-691.
- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). "The history of cancer epigenetics." *Nat Rev Cancer* 4(2): 143-153.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide:

- sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer* 136(5): E359-386.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., & Pavletich, N. P. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." *Nature* 401(6749): 188-193.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., & Verdin, E. (2002). "Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR." *Mol Cell* 9(1): 45-57.
- Florl, A. R., & Schulz, W. A. (2008). "Chromosomal instability in bladder cancer." *Arch Toxicol* 82(3): 173-182.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K. H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., et al. (2002). "FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases." *Cancer Res* 62(17): 4916-4921.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., et al. (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death and Differentiation*.
- Glaser, K. B., Staver, M. J., Waring, J. F., Stender, J., Ulrich, R. G., & Davidsen, S. K. (2003). "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* 2(2): 151-163.
- Golka, K., Selinski, S., Lehmann, M. L., Blaszkewicz, M., Marchan, R., Ickstadt, K., Schwender, H., Bolt, H. M., & Hengstler, J. G. (2011). "Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the "wimp SNPs". " *Arch Toxicol* 85(6): 539-554.
- Gregoire, S., & Yang, X. J. (2005). "Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors." *Mol Cell Biol* 25(6): 2273-2287.
- Gregoret, I. V., Lee, Y. M., & Goodson, H. V. (2004). "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis." *J Mol Biol* 338(1): 17-31.
- Gryder, B. E., Sodji, Q. H., & Oyelere, A. K. (2012). "Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed." *Future Med Chem* 4(4): 505-524.
- Halsall, J. A., Turan, N., Wiersma, M., & Turner, B. M. (2015). "Cells adapt to the epigenomic disruption caused by histone deacetylase inhibitors through a coordinated, chromatin-mediated transcriptional response." *Epigenetics Chromatin* 8: 29.
- Harb-de la Rosa, A., Acker, M., Kumar, R. A., & Manoharan, M. (2015). "Epigenetics application in the diagnosis and treatment of bladder cancer." *Can J Urol* 22(5): 7947-7951.
- Hiddemann, W., & Bartram, C. (2010). *Die Onkologie*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag.1111-11112.
- Hieu, D. T., Anh, D. T., Tuan, N. M., Hai, P. T., Huong, L. T., Kim, J., Kang, J. S., Vu, T. K., Dung, P. T. P., Han, S. B., et al. (2017). "Design, synthesis and evaluation of novel N-hydroxybenzamides/N-hydroxypropenamides incorporating quinazolin-4(3H)-ones as histone deacetylase inhibitors and antitumor agents." *Bioorganic Chemistry* 76: 258-267.

- Hrabeta, J., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., & Eckschlager, T. (2014). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review." *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 158(2): 161-169.
- Huang, Y., Tan, M., Gosink, M., Wang, K. K., & Sun, Y. (2002). "Histone deacetylase 5 is not a p53 target gene, but its overexpression inhibits tumor cell growth and induces apoptosis." *Cancer Res* 62(10): 2913-2922.
- Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours." *Eur Urol* 70(1): 106-119.
- Ishii, S., Kurasawa, Y., Wong, J., & Yu-Lee, L. Y. (2008). "Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11): 4179-4184.
- Jamaladdin, S., Kelly, R. D., O'Regan, L., Dovey, O. M., Hodson, G. E., Millard, C. J., Portolano, N., Fry, A. M., Schwabe, J. W., & Cowley, S. M. (2014). "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* 111(27): 9840-9845.
- Jeon, H. G., Yoon, C. Y., Yu, J. H., Park, M. J., Lee, J. E., Jeong, S. J., Hong, S. K., Byun, S. S., & Lee, S. E. (2011). "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* 186(5): 2084-2093.
- Jeronimo, C., & Henrique, R. (2014). "Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review." *Cancer Lett* 342(2): 264-274.
- Jin, Y. H., Jeon, E. J., Li, Q. L., Lee, Y. H., Choi, J. K., Kim, W. J., Lee, K. Y., & Bae, S. C. (2004). "Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation." *J Biol Chem* 279(28): 29409-29417.
- Jocham, D., & Miller, K. (2007). *Praxis der Urologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG. 69-71, 89-118.
- Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." *Nature Reviews Drug Discovery* 1(4): 287-299.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). "The epigenomics of cancer." *Cell* 128(4): 683-692.
- Junqueira-Neto, S., Vieira, F. Q., Montezuma, D., Costa, N. R., Antunes, L., Baptista, T., Oliveira, A. I., Graca, I., Rodrigues, A., Magalhaes, J. S., et al. (2013). "Phenotypic impact of deregulated expression of class I histone deacetylases in urothelial cell carcinoma of the bladder." *Mol Carcinog*.
- Kaletsch, A., Pinkerneil, M., Hoffmann, M., Vasudevan, A., Hansen, F., Wiek, C., Hanenberg, H., Wang, C., Gertzen, C., Gohlke, H., et al. (2018). "Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells." *Clinical Epigenetics* 10(1): 100.
- Kang, J. S., Alliston, T., Delston, R., & Derynck, R. (2005). "Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3." *EMBO J* 24(14): 2543-2555.
- Kang, Z. H., Wang, C. Y., Zhang, W. L., Zhang, J. T., Yuan, C. H., Zhao, P. W., Lin, Y. Y., Hong, S., Li, C. Y., & Wang, L. (2014). "Histone deacetylase HDAC4 promotes gastric cancer SGC-7901 cells progression via p21 repression." *PLoS One* 9(6): e98894.
- Kao, G. D., McKenna, W. G., Guenther, M. G., Muschel, R. J., Lazar, M. A., & Yen, T. J. (2003). "Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response." *J Cell Biol* 160(7): 1017-1027.

- Karagianni, P., & Wong, J. (2007). "HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression." *Oncogene* 26(37): 5439-5449.
- Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., Qian, X., Mills, E., Berghs, S. C., Carey, N., et al. (2008). "Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors." *Biochem J* 409(2): 581-589.
- Knowles, M. A. (2008). "Molecular pathogenesis of bladder cancer." *International Journal of Clinical Oncology* 13(4): 287-297.
- Kong, Y. L., Jung, M. R., Wang, K., Grindrod, S., Velena, A., Lee, S. A., Dakshanamurthy, S., Yang, Y. H., Miessau, M., Zheng, C. Y., et al. (2011). "Histone Deacetylase Cytoplasmic Trapping by a Novel Fluorescent HDAC Inhibitor." *Molecular Cancer Therapeutics* 10(9): 1591-1599.
- Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M. C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Carfi, A., et al. (2007). "Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(44): 17335-17340.
- Lane, A. A., & Chabner, B. A. (2009). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." *J Clin Oncol* 27(32): 5459-5468.
- Lauffer, B. E., Mintzer, R., Fong, R., Mukund, S., Tam, C., Zilberleyb, I., Flicke, B., Ritscher, A., Fedorowicz, G., Vallero, R., et al. (2013). "Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability." *J Biol Chem* 288(37): 26926-26943.
- Lee, H. J., Dreyfus, C., & DiCicco-Bloom, E. (2016). "Valproic acid stimulates proliferation of glial precursors during cortical gliogenesis in developing rat." *Developmental Neurobiology* 76(7): 780-798.
- Lee, J. S., Leem, S. H., Lee, S. Y., Kim, S. C., Park, E. S., Kim, S. B., Kim, S. K., Kim, Y. J., Kim, W. J., & Chu, I. S. (2010). "Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors." *J Clin Oncol* 28(16): 2660-2667.
- Lehmann, M., Hoffmann, M. J., Koch, A., Ulrich, S. M., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2014). "Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment." *J Exp Clin Cancer Res* 33: 59.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) (2016). "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms." Langversion 1.1.
- Li, X., & Xu, W. (2014). "HDAC1/3 dual selective inhibitors - new therapeutic agents for the potential treatment of cancer." *Drug Discov Ther* 8(5): 225-228.
- Li, Z. M., & Zhu, W. G. (2014). "Targeting Histone Deacetylases for Cancer Therapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications." *International Journal of Biological Sciences* 10(7): 757-770.
- Lindgren, D., Frigyesi, A., Gudjonsson, S., Sjö Dahl, G., Hallden, C., Chebil, G., Veerla, S., Ryden, T., Mansson, W., Liedberg, F., et al. (2010). "Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome." *Cancer Res* 70(9): 3463-3472.
- Linseman, D. A., Bartley, C. M., Le, S. S., Laessig, T. A., Bouchard, R. J., Meintzer, M. K., Li, M., & Heidenreich, K. A. (2003). "Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival." *J Biol Chem* 278(42): 41472-41481.

- Liu, R., Wang, L., Chen, G., Katoh, H., Chen, C., Liu, Y., & Zheng, P. (2009). "FOXP3 up-regulates p21 expression by site-specific inhibition of histone deacetylase 2/histone deacetylase 4 association to the locus." *Cancer Res* 69(6): 2252-2259.
- Lobera, M., Madauss, K. P., Pohlhaus, D. T., Wright, Q. G., Trocha, M., Schmidt, D. R., Baloglu, E., Trump, R. P., Head, M. S., Hofmann, G. A., et al. (2013). "Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group." *Nat Chem Biol* 9(5): 319-325.
- Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2000). "Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases." *Mol Cell* 6(2): 233-244.
- Lukas, C., Selinski, S., Prager, H. M., Blaszkewicz, M., Hengstler, J. G., & Golka, K. (2017). "Occupational bladder cancer: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes, exposures, and prognosis." *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 80(7-8): 439-452.
- Ma, T., Galimberti, F., Erkmen, C. P., Memoli, V., Chinyengetere, F., Sempere, L., Beumer, J. H., Anyang, B. N., Nugent, W., Johnstone, D., et al. (2013). "Comparing histone deacetylase inhibitor responses in genetically engineered mouse lung cancer models and a window of opportunity trial in patients with lung cancer." *Mol Cancer Ther* 12(8): 1545-1555.
- Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., & Jaulin, C. (2007). "Histone deacetylase inhibitors induce premature sister chromatid separation and override the mitotic spindle assembly checkpoint." *Cancer Res* 67(13): 6360-6367.
- Mai, A., Massa, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Rotili, D., Nebbioso, A., Scognamiglio, A., Altucci, L., Loidl, P., & Brosch, G. (2005). "Class II (IIa)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides." *Journal of Medicinal Chemistry* 48(9): 3344-3353.
- Maison, C., & Almouzni, G. (2004). "HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance." *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 5(4): 296-304.
- Majdzadeh, N., Wang, L., Morrison, B. E., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., & D'Mello, S. R. (2008). "HDAC4 inhibits cell-cycle progression and protects neurons from cell death." *Developmental Neurobiology* 68(8): 1076-1092.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., He, K., Sridhara, R., Abraham, S., Booth, B. P., Verbois, L., Morse, D. E., Jee, J. M., Pope, S., et al. (2007). "Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." *Clin Cancer Res* 13(8): 2318-2322.
- Marek, L., Hamacher, A., Hansen, F. K., Kuna, K., Gohlke, H., Kassack, M. U., & Kurz, T. (2013). "Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells." *J Med Chem* 56(2): 427-436.
- Marks, P. A. (2007). "Discovery and development of SAHA as an anticancer agent." *Oncogene* 26(9): 1351-1356.
- Marks, P. A. (2010). "The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs." *Expert Opin Investig Drugs* 19(9): 1049-1066.
- Marks, P. A., Richon, V. M., Breslow, R., & Rifkind, R. A. (2001). "Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs." *Current Opinion in Oncology* 13(6): 477-483.
- Marks, P. A., & Xu, W. S. (2009). "Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy." *J Cell Biochem* 107(4): 600-608.
- Marmorstein, R., & Zhou, M. M. (2014). "Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(7).

- Martin, M., Kettmann, R., & Dequiedt, F. (2007). "Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators." *Oncogene* 26(37): 5450-5467.
- Mathias, R. A., Guise, A. J., & Cristea, I. M. (2015). "Post-translational modifications regulate class IIa histone deacetylase (HDAC) function in health and disease." *Mol Cell Proteomics* 14(3): 456-470.
- Matthews, G. M., Newbold, A., & Johnstone, R. W. (2012). "Intrinsic and extrinsic apoptotic pathway signaling as determinants of histone deacetylase inhibitor antitumor activity." *Advances in Cancer Research* 116: 165-197.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2000). "Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14400-14405.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2002). "MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death." *Trends in Biochemical Sciences* 27(1): 40-47.
- Mengual, L., Burset, M., Ars, E., Lozano, J. J., Villavicencio, H., Ribal, M. J., & Alcaraz, A. (2009). "DNA microarray expression profiling of bladder cancer allows identification of noninvasive diagnostic markers." *J Urol* 182(2): 741-748.
- Modlich, O., Prisack, H. B., Pitschke, G., Ramp, U., Ackermann, R., Bojar, H., Vogeli, T. A., & Grimm, M. O. (2004). "Identifying superficial, muscle-invasive, and metastasizing transitional cell carcinoma of the bladder: use of cDNA array analysis of gene expression profiles." *Clin Cancer Res* 10(10): 3410-3421.
- Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L., & Wang, G. (2015). "Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents." *Molecules* 20(3): 3898-3941.
- Mottet, D., Pirotte, S., Lamour, V., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Bellahcene, A., Verdin, E., & Castronovo, V. (2009). "HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism." *Oncogene* 28(2): 243-256.
- Nebbioso, A., Manzo, F., Miceli, M., Conte, M., Manente, L., Baldi, A., De Luca, A., Rotili, D., Valente, S., Mai, A., et al. (2009). "Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes." *EMBO Rep* 10(7): 776-782.
- Newbold, A., Falkenberg, K. J., Prince, H. M., & Johnstone, R. W. (2016). "How do tumor cells respond to HDAC inhibition?" *FEBS J* 283(22): 4032-4046.
- Newkirk, T. L., Bowers, A. A., & Williams, R. M. (2009). "Discovery, biological activity, synthesis and potential therapeutic utility of naturally occurring histone deacetylase inhibitors." *Natural Product Reports* 26(10): 1293-1320.
- Niedworok, C., & Rübber, H. (2014). Diagnostik und Therapie des Urothelkarzinoms der Harnblase. *Onkologie heute*, 41-46.
- Niegisch, G., Hoffmann, M. J., Koutsogiannouli, E. A., & Schulz, W. A. (2015). "[Epigenetics in urothelial cancer: Pathogenesis, improving diagnostics and developing novel treatment options]." *Urologe A* 54(4): 526-532.
- Niegisch, G., Knievel, J., Koch, A., Hader, C., Fischer, U., Albers, P., & Schulz, W. A. (2013). "Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers." *Urol Oncol* 31(8): 1770-1779.
- Niegisch, G., Koch, A., Knievel, J., Schulz, W. A., & Albers, P. (2010). "Signal transduction in urothelial cancer. How exactly do we know the targets for targeted therapy?" *Urologe* 49(11): 1401-1405.

- Niehans, G. A., Kratzke, R. A., Froberg, M. K., Aeppli, D. M., Nguyen, P. L., & Geradts, J. (1999). "G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder." *Br J Cancer* 80(8): 1175-1184.
- Oehme, I., Deubzer, H. E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J. P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S. M., von Deimling, A., et al. (2009). "Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis." *Clin Cancer Res* 15(1): 91-99.
- Oing, C., Rink, M., Oechsle, K., Seidel, C., von Amsberg, G., & Bokemeyer, C. (2016). "Second Line Chemotherapy for Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma: Vinflunine and Beyond-A Comprehensive Review of the Current Literature." *J Urol* 195(2): 254-263.
- Ononye, S. N., van Heyst, M., Falcone, E. M., Anderson, A. C., & Wright, D. L. (2012). "Toward isozyme-selective inhibitors of histone deacetylase as therapeutic agents for the treatment of cancer." *Pharm Pat Anal* 1(2): 207-221.
- Ozawa, A., Tanji, N., Kikugawa, T., Sasaki, T., Yanagihara, Y., Miura, N., & Yokoyama, M. (2010). "Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor." *BJU Int* 105(8): 1181-1186.
- Ozdag, H., Teschendorff, A. E., Ahmed, A. A., Hyland, S. J., Blenkiron, C., Bobrow, L., Veerakumarasivam, A., Burt, G., Subkhankulova, T., Arends, M. J., et al. (2006). "Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers." *BMC Genomics* 7: 90.
- Park, I., Kwon, M. S., Paik, S., Kim, H., Lee, H. O., Choi, E., & Lee, H. (2017). "HDAC2/3 binding and deacetylation of BubR1 initiates spindle assembly checkpoint silencing." *FEBS J* 284(23): 4035-4050.
- Paroni, G., Fontanini, A., Cernotta, N., Foti, C., Gupta, M. P., Yang, X. J., Fasino, D., & Brancolini, C. (2007). "Dephosphorylation and caspase processing generate distinct nuclear pools of histone deacetylase 4." *Mol Cell Biol* 27(19): 6718-6732.
- Parra, M. (2015). "Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology." *FEBS J* 282(9): 1736-1744.
- Peart, M. J., Tainton, K. M., Ruefli, A. A., Dear, A. E., Sedelies, K. A., O'Reilly, L. A., Waterhouse, N. J., Trapani, J. A., & Johnstone, R. W. (2003). "Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors." *Cancer Res* 63(15): 4460-4471.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., & Lindemann, D. (1999). "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." *J Virol* 73(4): 2613-2621.
- Pinkerneil, M. (2017). Charakterisierung der Klasse I Histondeacetylasen als Zielmoleküle für die Therapie des Urothelkarzinoms, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Deenen, R., Kohrer, K., Arent, T., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2016). "Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms." *Mol Cancer Ther* 15(2): 299-312.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Kohlhof, H., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2016). "Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines." *Target Oncol* 11(6): 783-798.
- Plass, C., Pfister, S. M., Lindroth, A. M., Bogatyrova, O., Claus, R., & Lichter, P. (2013). "Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer." *Nat Rev Genet* 14(11): 765-780.
- Pon, J. R., & Marra, M. A. (2016). "MEF2 transcription factors: developmental regulators and emerging cancer genes." *Oncotarget* 7(3): 2297-2312.

- Poyet, C., Jentsch, B., Hermanns, T., Schweckendiek, D., Seifert, H. H., Schmidtpeter, M., Sulser, T., Moch, H., Wild, P. J., & Kristiansen, G. (2014). "Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer." *BMC Clin Pathol* 14(1): 10.
- Promega. (2015). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin. Retrieved from <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>
- Qiu, L., Burgess, A., Fairlie, D. P., Leonard, H., Parsons, P. G., & Gabrielli, B. G. (2000). "Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells." *Molecular Biology of the Cell* 11(6): 2069-2083.
- Renn, A. (2014). *Einfluss neuer Hydroxamsäure-Histon- deacetylase-Inhibitoren auf Urothelkarzinom- Zelllinien*. Forschungslabor der Klinik für Urologie, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf.
- Reulen, R. C., Kellen, E., Buntinx, F., Brinkman, M., & Zeegers, M. P. (2008). "A meta-analysis on the association between bladder cancer and occupation." *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 42: 64-78.
- Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A., & Marks, P. A. (2000). "Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18): 10014-10019.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In G. S. Sittampalam, et al. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD).
- Rosik, L., Niegisch, G., Fischer, U., Jung, M., Schulz, W. A., & Hoffmann, M. J. (2014). "Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells." *Cancer Biol Ther* 15(6): 742-757.
- Rübben, H. (2009). *Uroonkologie*, Springer: Heidelberg.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N. D., Lozano, J., Saint, F., & Cordon-Cardo, C. (2006). "Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays." *J Clin Oncol* 24(5): 778-789.
- Schmidt, E. M., Wiek, C., Parkinson, O. T., Roellecke, K., Freund, M., Gombert, M., Lottmann, N., Steward, C. A., Kramm, C. M., Yarov-Yarovoy, V., et al. (2015). "Characterization of an Additional Splice Acceptor Site Introduced into CYP4B1 in Hominoidae during Evolution." *PLoS One* 10(9): e0137110.
- Schneider, B. J., Kalemkerian, G. P., Bradley, D., Smith, D. C., Egorin, M. J., Daignault, S., Dunn, R., & Hussain, M. (2012). "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* 30(1): 249-257.
- Schuettengruber, B., Simboeck, E., Khier, H., & Seiser, C. (2003). "Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression." *Mol Cell Biol* 23(19): 6993-7004.
- Schulz, W. A. (2006). "Understanding urothelial carcinoma through cancer pathways." *International Journal of Cancer* 119(7): 1513-1518.
- Schulz, W. A., Koutsogiannouli, E. A., Niegisch, G., & Hoffmann, M. J. (2015). "Epigenetics of urothelial carcinoma." *Methods Mol Biol* 1238: 183-215.
- Sharma, N. L., Groselj, B., Hamdy, F. C., & Kiltie, A. E. (2013). "The emerging role of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in urological cancers." *BJU Int* 111(4): 537-542.
- Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., & Hake, S. B. (2007). "Extraction, purification and analysis of histones." *Nature Protocols* 2(6): 1445-1457.
- Shelley, M. D., Kynaston, H., Court, J., Wilt, T. J., Coles, B., Burgon, K., & Mason, M. D. (2001). "A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer." *BJU Int* 88(3): 209-216.

- Shin, H. J., Baek, K. H., Jeon, A. H., Kim, S. J., Jang, K. L., Sung, Y. C., Kim, C. M., & Lee, C. W. (2003). "Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation." *Oncogene* 22(25): 3853-3858.
- Sigma Aldrich. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide. Retrieved from [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product Information Sheet/2/m2128pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product%20Information%20Sheet/2/m2128pis.pdf)
- Skowron, M. A., Niegisch, G., Fritz, G., Arent, T., van Roermund, J. G., Romano, A., Albers, P., Schulz, W. A., & Hoffmann, M. J. (2015). "Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines." *J Exp Clin Cancer Res* 34: 144.
- Slingerland, M., Guchelaar, H. J., & Gelderblom, H. (2014). "Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors." *Anti-Cancer Drugs* 25(2): 140-149.
- Spiegel, S., Milstien, S., & Grant, S. (2012). "Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy." *Oncogene* 31(5): 537-551.
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). "HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution." *Gene* 569(2): 182-190.
- Stevens, F. E., Beamish, H., Warren, R., & Gabrielli, B. (2008). "Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage." *Oncogene* 27(10): 1345-1354.
- Swygert, S. G., & Peterson, C. L. (2014). "Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications." *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* 1839(8): 728-736.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., & Almouzni, G. (2001). "Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases." *Nat Cell Biol* 3(2): 114-120.
- Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J. P., & Chouaib, S. (2017). "New insights into the role of EMT in tumor immune escape." *Mol Oncol*.
- Thurn, K. T., Thomas, S., Moore, A., & Munster, P. N. (2011). "Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer." *Future Oncol* 7(2): 263-283.
- Valenzuela-Fernandez, A., Cabrero, J. R., Serrador, J. M., & Sanchez-Madrid, F. (2008). "HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions." *Trends in Cell Biology* 18(6): 291-297.
- Valls, E., Sanchez-Molina, S., & Martinez-Balbas, M. A. (2005). "Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis." *J Biol Chem* 280(52): 42592-42600.
- Vega, R. B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A. C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J. M., Richardson, J. A., et al. (2004). "Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis." *Cell* 119(4): 555-566.
- Venza, I., Visalli, M., Oteri, R., Cucinotta, M., Teti, D., & Venza, M. (2013). "Class II-specific histone deacetylase inhibitors MC1568 and MC1575 suppress IL-8 expression in human melanoma cells." *Pigment Cell & Melanoma Research* 26(2): 193-204.
- Wagner, J. M., Hackanson, B., Lubbert, M., & Jung, M. (2010). "Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy." *Clinical Epigenetics* 1(3-4): 117-136.

- Wang, Z., Qin, G., & Zhao, T. C. (2014). "HDAC4: mechanism of regulation and biological functions." *Epigenomics* 6(1): 139-150.
- Warrener, R., Beamish, H., Burgess, A., Waterhouse, N. J., Giles, N., Fairlie, D., & Gabrielli, B. (2003). "Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints." *FASEB J* 17(11): 1550-1552.
- Welsch, U. (2010). *Lehrbuch Histologie*. München, Elsevier.
- Wiek, C. (2011). Charakterisierung von Cytochrom-P450- Varianten als humane Suizidgene in komplexen retroviralen Gentransfersystemen, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wiek, C., Schmidt, E. M., Roellecke, K., Freund, M., Nakano, M., Kelly, E. J., Kaisers, W., Yarov-Yarovoy, V., Kramm, C. M., Rettie, A. E., et al. (2015). "Identification of amino acid determinants in CYP4B1 for optimal catalytic processing of 4-ipomeanol." *Biochem J* 465(1): 103-114.
- Wilson, A. J., Byun, D. S., Nasser, S., Murray, L. B., Ayyanar, K., Arango, D., Figueroa, M., Melnick, A., Kao, G. D., Augenlicht, L. H., et al. (2008). "HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21." *Molecular Biology of the Cell* 19(10): 4062-4075.
- Wilson, A. J., Byun, D. S., Popova, N., Murray, L. B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L. H., & Mariadason, J. M. (2006). "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* 281(19): 13548-13558.
- Witt, O. (2011). *Encyclopedia of Cancer*. Heidelberg, Springer. 1698-1702.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). "HDAC family: What are the cancer relevant targets?" *Cancer Letters* 277(1): 8-21.
- Wu, Y., Hou, F., Wang, X., Kong, Q., Han, X., & Bai, B. (2016). "Aberrant Expression of Histone Deacetylases 4 in Cognitive Disorders: Molecular Mechanisms and a Potential Target." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9: 114.
- Xin, H., Yoon, H. G., Singh, P. B., Wong, J., & Qin, J. (2004). "Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in Mammalian cells." *J Biol Chem* 279(10): 9539-9546.
- Xu, X. S., Wang, L., Abrams, J., & Wang, G. (2011). "Histone deacetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer." *J Hematol Oncol* 4: 17.
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006a). "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(1): 37-50.
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006b). "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(1): 37-50.
- Yoshida, M., & Beppu, T. (1988). "Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A." *Exp Cell Res* 177(1): 122-131.
- Yoshida, M., Nomura, S., & Beppu, T. (1987). "Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells." *Cancer Res* 47(14): 3688-3691.
- Zeng, L. S., Yang, X. Z., Wen, Y. F., Mail, S. J., Wang, M. H., Zhang, M. Y., Zheng, X. F., & Wang, H. Y. (2016). "Overexpressed HDAC4 is associated with poor survival and promotes tumor progression in esophageal carcinoma." *Aging (Albany NY)* 8(6): 1236-1249.
- Zentner, G. E., & Henikoff, S. (2013). "Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications." *Nat Struct Mol Biol* 20(3): 259-266.
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Chang, S. R., Antos, C. L., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2002). "Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy." *Cell* 110(4): 479-488.

- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Lu, J. R., & Olson, E. N. (2001). "Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor." *J Biol Chem* 276(1): 35-39.
- Zhang, C. L., McKinsey, T. A., & Olson, E. N. (2002). "Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation." *Mol Cell Biol* 22(20): 7302-7312.
- Zhang, H., Shang, Y. P., Chen, H. Y., & Li, J. (2016). "Histone deacetylases function as novel potential therapeutic targets for cancer." *Hepatology Research*.
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, T., Liu, Y., Li, A., Fu, S., Wu, M., Pan, Z., & Zhou, W. (2010). "microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumourigenicity." *Br J Cancer* 103(8): 1215-1220.
- Zhang, L., Han, Y., Jiang, Q., Wang, C., Chen, X., Li, X., Xu, F., Jiang, Y., Wang, Q., & Xu, W. (2015). "Trend of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: isoform selectivity or multitargeted strategy." *Medicinal Research Reviews* 35(1): 63-84.
- Zhang, X. Y., La Russa, V. F., & Reiser, J. (2004). "Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins." *J Virol* 78(3): 1219-1229.

9 Anhang

Tabelle 9.1: TNM Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase. Modifiziert nach der S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom 2016 (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2016).

Klassifikation	Tumor		
T	Primärtumor		
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden		
T0	Kein Nachweis von Primärtumor		
Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom		
Tis	Carcinoma in situ: „Flache Neoplasie“		
T1	Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein		
T2	Tumor dringt in Muskularis propria ein		
T2a	Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte)		
T2b	Tumor dringt tief in Muskularis propria ein (äussere Hälfte)		
T3	Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein:		
T3a	Mikroskopisch		
T3b	Makroskopisch (Extravesikale Masse)		
T4	Tumor dringt in eines der folgenden ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand		
T4a	Tumor dringt ein in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina		
T4b	Tumor dringt ein in Beckenwand oder Abdominalwand		
N	Regionale Lymphknoten		
NX	Regionale Lymphknoten können nicht bewertet werden		
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen		
N1	Metastase in einem Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches (ein hypogastrischer, obturatorischer oder präsakraler Lymphknoten oder ein Lymphknoten aus dem Bereich der Arteria iliaca externa)		
N2	Metastase in mehreren Lymphknoten des wirklichen Beckenbereiches (ein hypogastrischer, obturatorischer oder präsakraler Lymphknoten oder ein Lymphknoten aus dem Bereich der Arteria iliaca externa)		
N3	Metastasen der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis		
M	Fernmetastasen		
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen		
	Stadien-Einteilung		
Stage 0a	Ta	N0	M0
Stage 0is	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2a-b	N0	M0
Stage III	T3a-b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Stage IV	T4b	N0	M0
	Any T	N1-3	M0
	Any T	Any N	M1

Tabelle 9.2: Übersicht über die HDACs beim Menschen. Aufgelistet sind die HDAC Klassen (I-IV) mit den dazugehörigen HDAC-Enzymen, deren genetischer und zellulärer Lokalisation sowie einem Teil der Nicht-Histon-Substrate (Z. M. Li et al., 2014).

Classification	HDAC	Cytogenetic location	Subcellular localization	Non-histone substrates (partly shown)
I	HDAC1	1p35.1	nucleus	RB1, SHP, p53, MyoD, E2F1, STAT3, NF-κB, CtIP, AMPK
	HDAC2	6q21	nucleus	GCCR, BCL6, STAT3, YY1
	HDAC3	5q31.3	nucleus	SHP, YY1, GATA1, p65, STAT3, MEF2D
	HDAC8	Xq13.1	nucleus	SMC3, actin
IIa	HDAC4	2q37.3	nucleus/cytoplasm	GATA1, HP1
	HDAC5	17q21.31	nucleus/cytoplasm	SMAD7, HP1
	HDAC7	12q13.11	nucleus/cytoplasm	PLAG1, PLAG2
	HDAC9	7p21.1	nucleus/cytoplasm	---
IIb	HDAC6	Xp11.23	mostly cytoplasm	α-tubulin, HSP90, SHP, SMAD
	HDAC10	22q13.31-q13.33	nucleus/cytoplasm	---
III	SIRT1	10q21.3	nucleus/cytoplasm	p53, β-catenin, Ku70, E2F1, Rb, NF-κB, PGC1α, PPARγ, MyoD, PCAF, FOXO3, HIF1α
	SIRT2	19q13.2	cytoplasm	α-tubulin, FOXO1
	SIRT3	11p15.5	nucleus/mitochondria	IDH2, SDH, CypD, p53, FOXO3A, MRPL10, GDH, LCAD, Ku70, LKB1, NDUFA9
	SIRT4	12q24.31	mitochondria	IDE, ANT2/3, GDH
	SIRT5	6p23	mitochondria	CPS1, Cytochrome C
	SIRT6	19p13.3	nucleus	NF-κB, CtBP, DNA PK, PARP1, HIF1α
	SIRT7	17q25.3	nucleolus	p53
IV	HDAC11	3p25.2	nucleus/cytoplasm	---

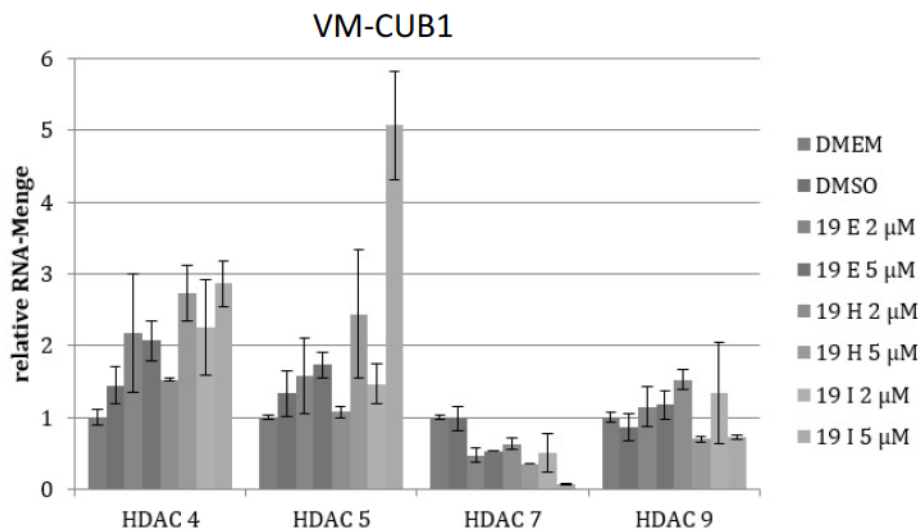


Abb. 9.1: Relatives Expressionsniveau von HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9 mRNA der Zelllinie VM-CUB1 nach Behandlung mit den HDACi 19e, 19h und 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. (Renn, 2014)

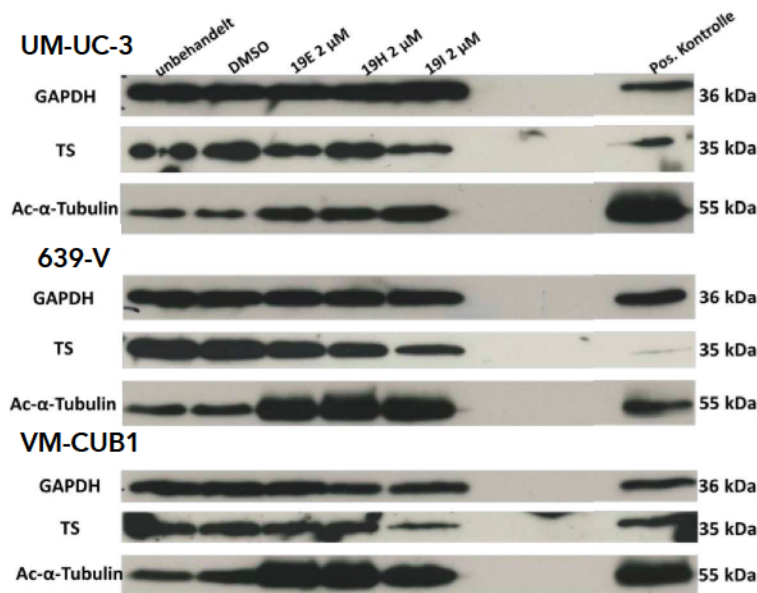


Abb. 9.2: Western-Blot der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V zur Bestimmung der Expression von Thymidylat-Synthase und von acetyliertem α -Tubulin nach Behandlung mit den HDACi 19e, 19h und 19i. Die Zellen wurden 72 h mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Es wurden 15 μ g Gesamtprotein für jede Zelllinie aufgetragen. Für die Positivkontrolle wurden 10 μ g eingesetzt. GAPDH diente als Ladungskontrolle. (Renn, 2014)

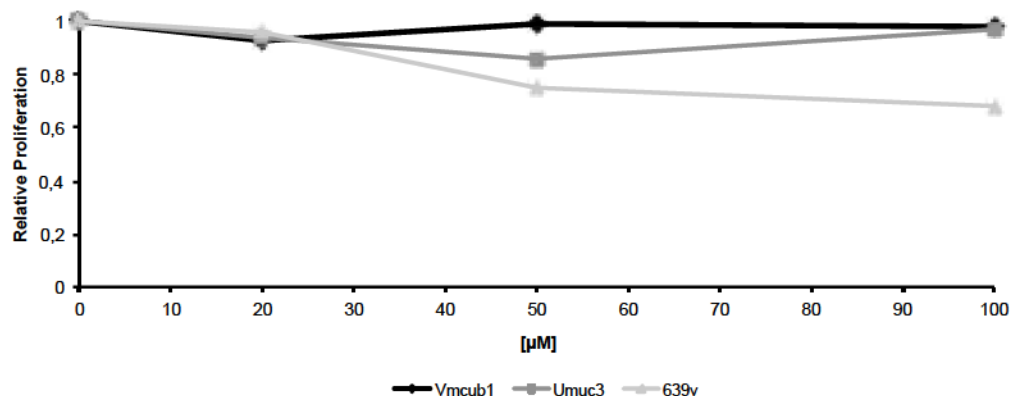


Abb. 9.3: MTT-Assay dargestellt als Dosiswirkungskurve zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Behandlung mit der Substanz LMK235-COOH der Zelllinie VM-CUB1, UM-UC-3 und 639-V. Die Inkubationszeit betrug 72 h. Es wurden Konzentrationen von 20 μ M bis 100 μ M verwendet. Als Lösungskontrolle dienten die mit DMSO in Medium (1:2000) behandelten Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitorkonzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die Inhibitorkonzentrationen in μ M dargestellt, auf der Ordinate die relative Proliferation in Prozent.

Tabelle 9.3: IC_{50} -Werte [μM] der Inhibitoren LMK235 (19i), TSA und TMP für die HDAC Isoformen 1-11. Als Referenzsubstanzen dienten Trichostatin A (TSA) und TMP269. n.d. = Wert nicht ermittelt. Leere Zelle (-) = Es konnte keine Aktivität im getesteten Konzentrationsbereich ermittelt werden.

Inhibitor	IC_{50} [μM]				
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5
LMK235	0,315	0,402	0,236	-	46,6
TSA	0,020	0,0482	0,0323	n.d.	n.d.
TMP269	n.d.	n.d.	n.d.	0,469	0,282

Inhibitor	IC_{50} [μM]					
	HDAC6	HDAC7	HDAC8	HDAC9	HDAC10	HDAC11
LMK235	0,032	131	2,84	198	0,491	109
TSA	0,0065	n.d.	0,432	n.d.	0,0732	5,30
TMP269	n.d.	0,101	n.d.	0,0324	n.d.	n.d.

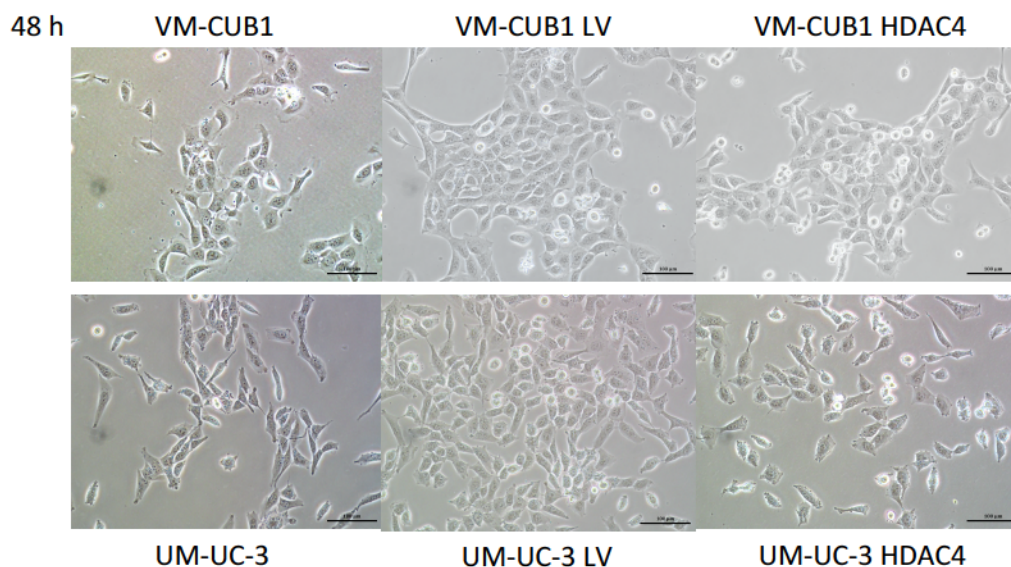


Abb. 9.4: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren LV und HDAC4 Zellvarianten. Die Bilder wurden 48 h nach Aussaat aufgenommen. Maßstab 100 μm .

Bemerkung: Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Zellvarianten der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 mit Überexpression von HDAC4 und HDAC1 und werden im weiteren Verlauf als HDAC4-, HDAC1- und LV (Leervektor)- Zellvarianten bezeichnet. Für die Zelllinien fand jeweils eine Behandlung mit 19i über 24 h und 48 h statt; die Ergebnisse sind beispielhaft für die 48 h Behandlung abgebildet.

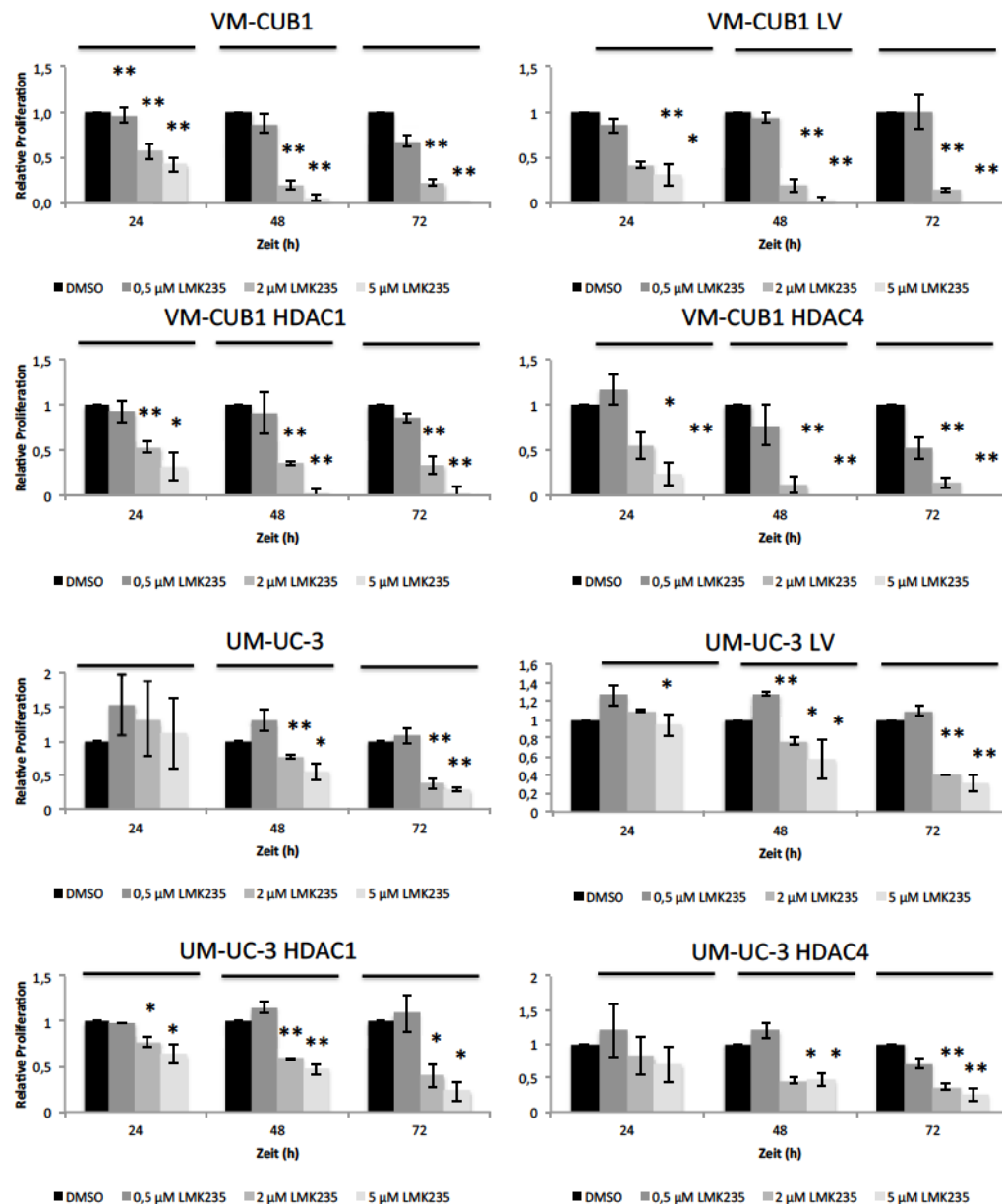


Abb. 9.5: MTT-Proliferationsassay dargestellt als Inhibitionszeitreihe zur Quantifizierung der Zellvitalität nach medikamentöser Behandlung mit den HDACi 19i der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 sowie deren HDAC4, HDAC1 und LV Zellvarianten. Die Inkubationszeit betrug 24 h, 48 h und 72 h. Es wurden Konzentrationen von 0,5 µM, 2 µM und 5 µM verwendet. Als Lösungskontrolle dienten die mit DMSO in Medium (1:2000) behandelten Zellen. Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitorkonzentration der Mittelwert gebildet und auf den Mittelwert der DMSO Kontrolle normiert. Auf der Abszisse sind die Inhibitorkonzentrationen in µM dargestellt, auf der Ordinate die relative Proliferation in Prozent.

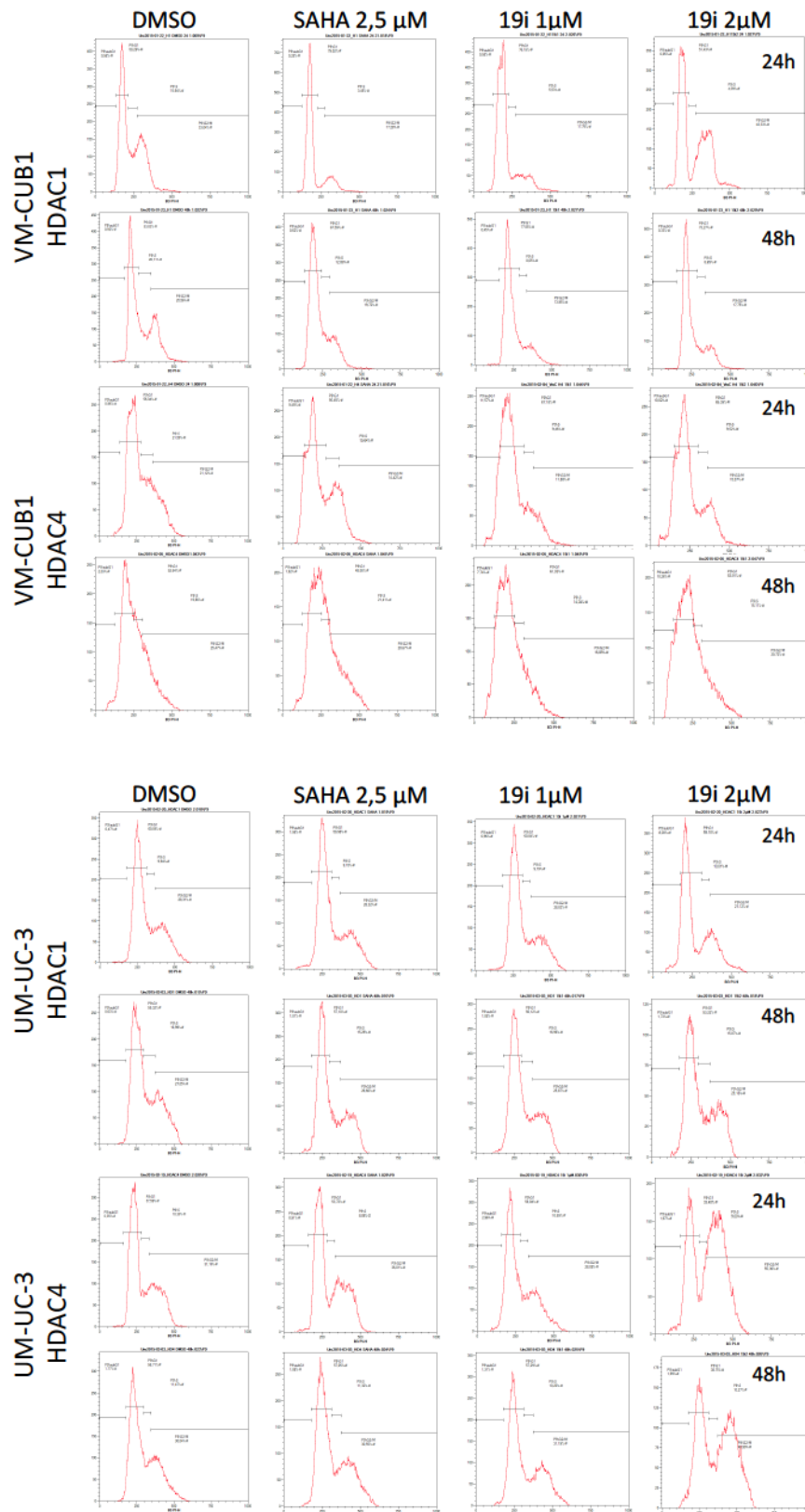


Abb. 9.6: Zellzyklus-Analyse beispielhaft für die VM-CUB1 und UM-UC-3 Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach 24 h und 48 h Behandlung. Von links nach rechts: DMSO-Kontrolle, SAHA 2,5 μM , 19i 1 μM und 19i 2 μM . Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzstärke dargestellt, auf der Ordinate die gemessene Zellzahl

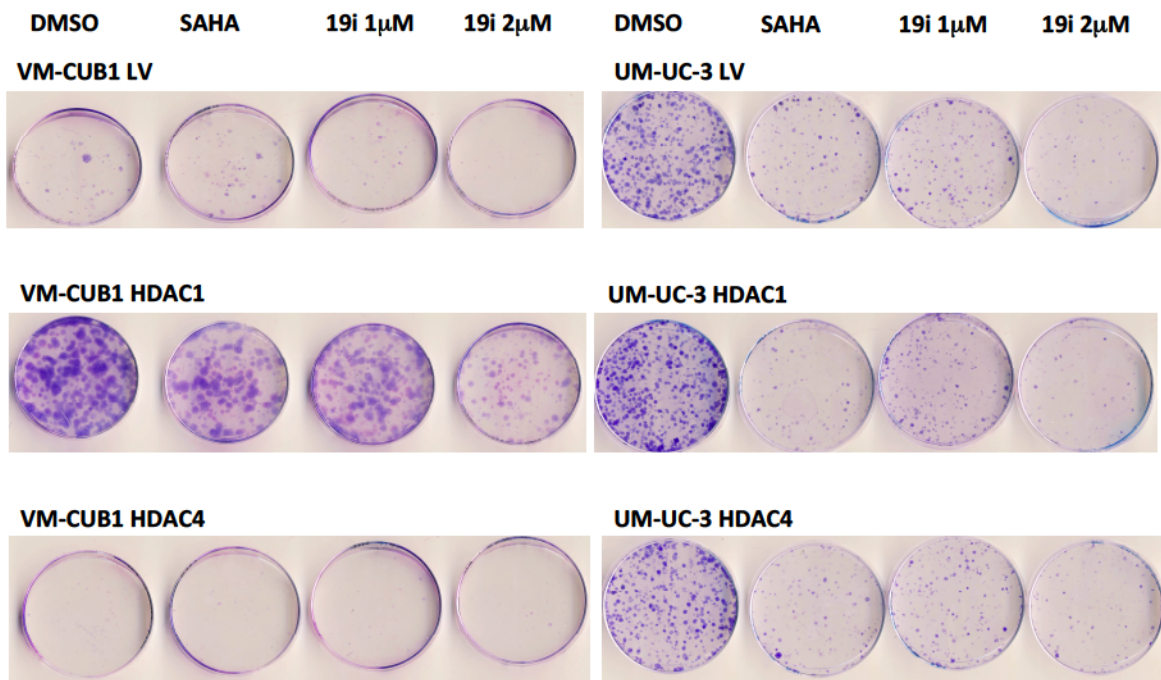
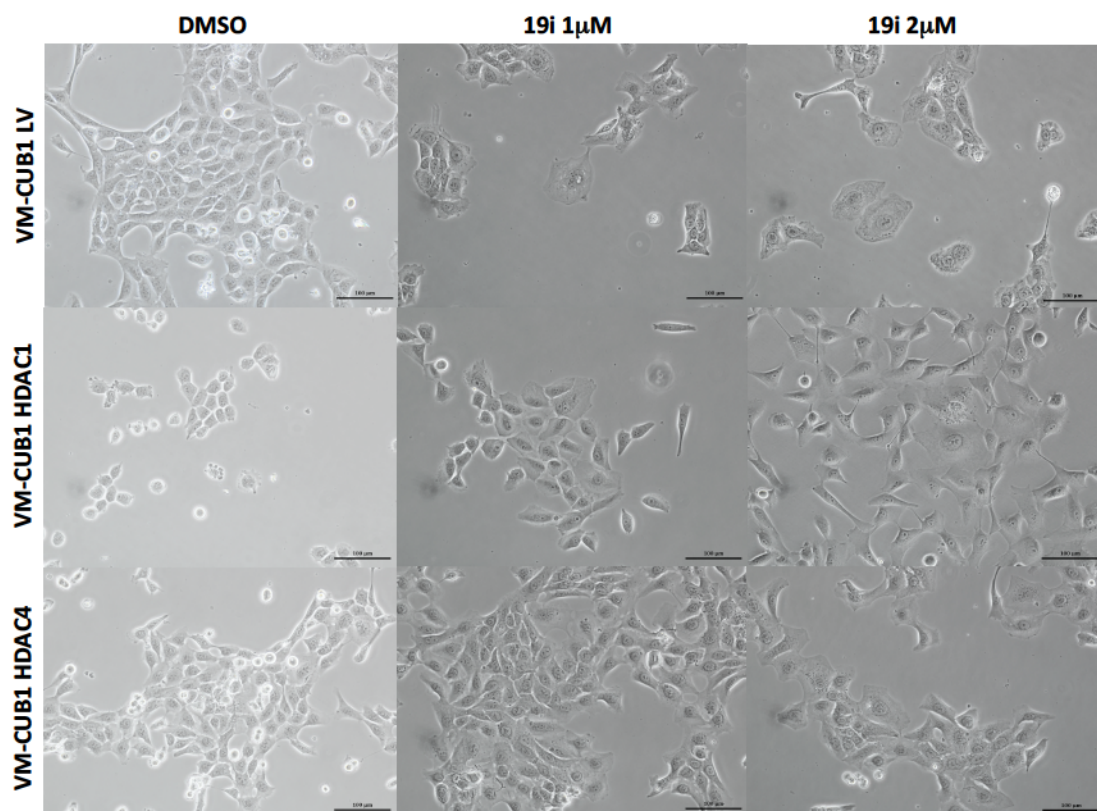


Abb. 9.7: Giemsa-Färbung der VM-CUB1 Zellvarianten mit HDAC1, HDAC4 Überexpression und einem LV nach Behandlung mit 19i. Es wurden Inhibitorkonzentrationen von 1 μM und 2 μM über 48 h verwendet. Als Positivkontrolle wurde SAHA 2,5 μM verwendet. Die Giemsa-Färbung wurde durchgeführt, nachdem die mit DMSO behandelten Zellkolonien annähernd konfluent waren.



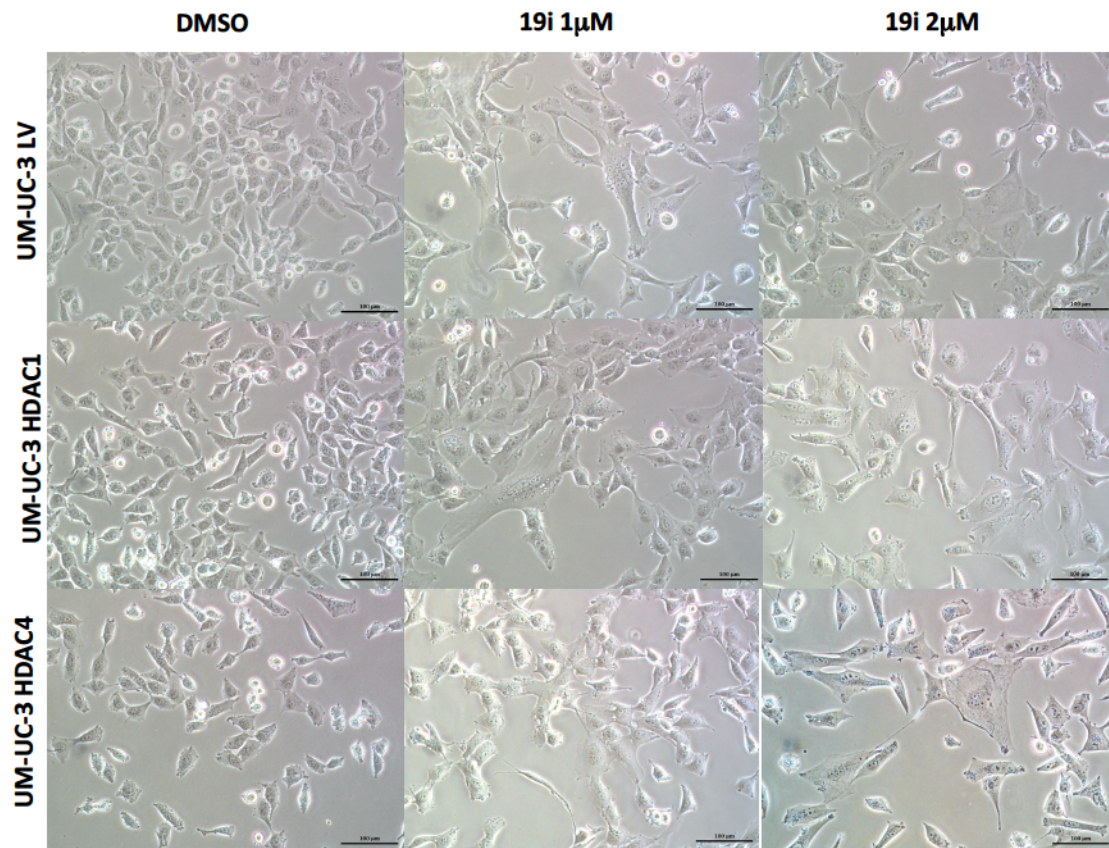
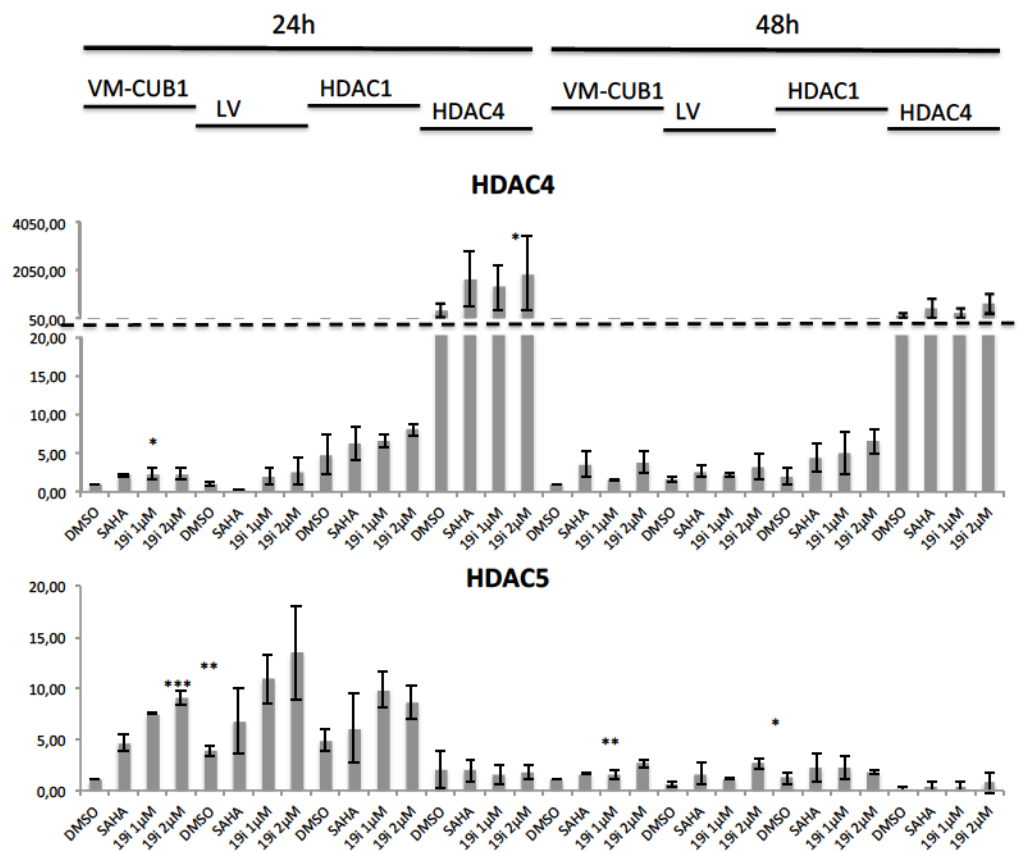


Abb. 9.8: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression sowie einem Leervektor nach Behandlung mit 19i. Es wurden Konzentrationen von 1 μ M und 2 μ M eingesetzt. Also Lösungskontrolle dienten die mit DMSO behandelten Zellen. Die Bilder wurden 48 h nach Behandlung mit 19i aufgenommen. Maßstab 100 μ m.



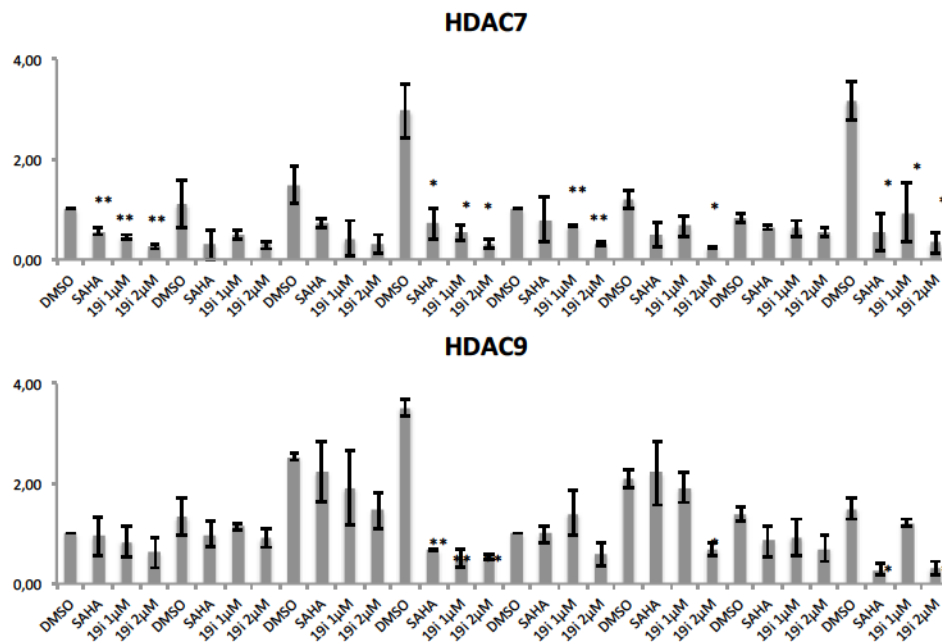
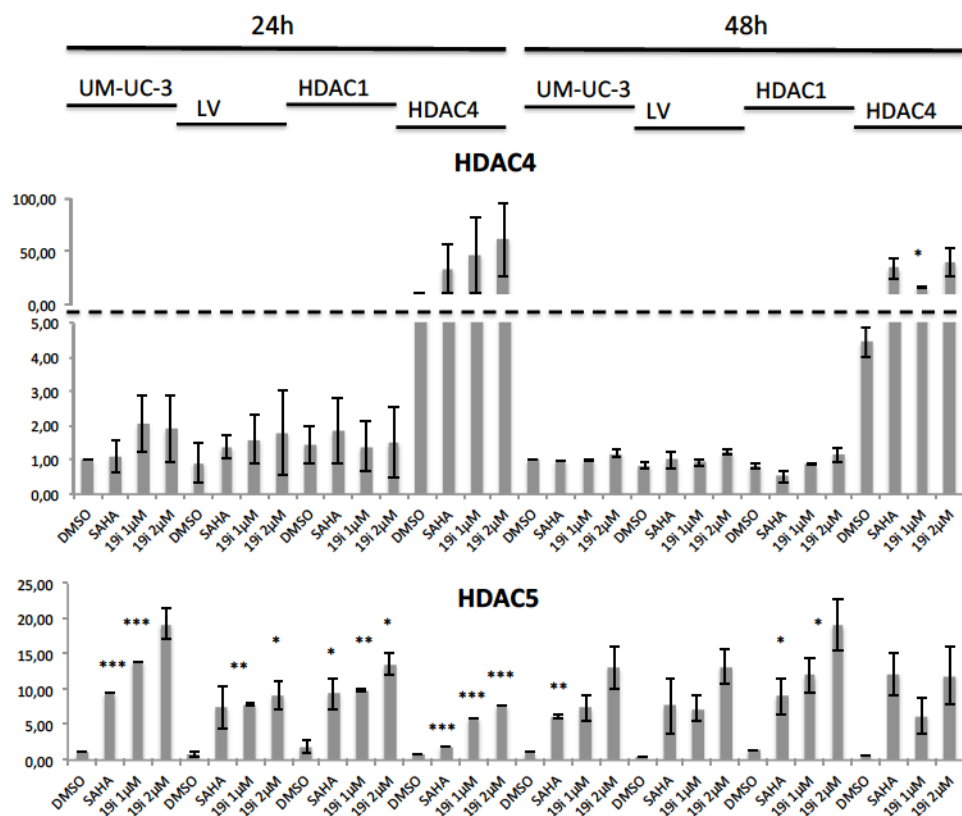


Abb. 9.9: Relatives Expressionsniveau von HDAC Klasse IIa mRNA der Zelllinie VM-CUB1 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Die jeweiligen Werte sind zum dazugehörigen DMSO-Wert zu einem Niveau von 5 %, 1 % bzw. 0,1 % signifikant.



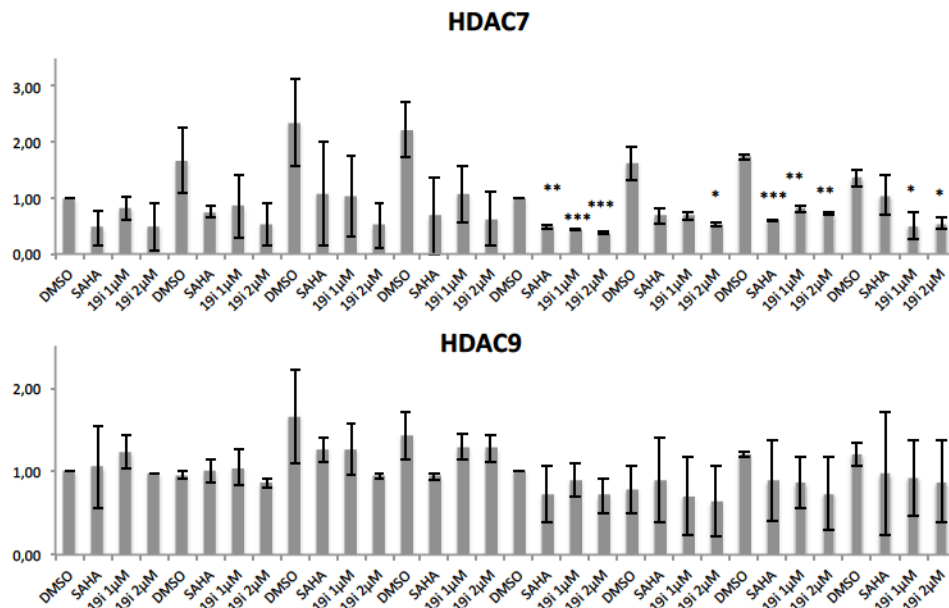
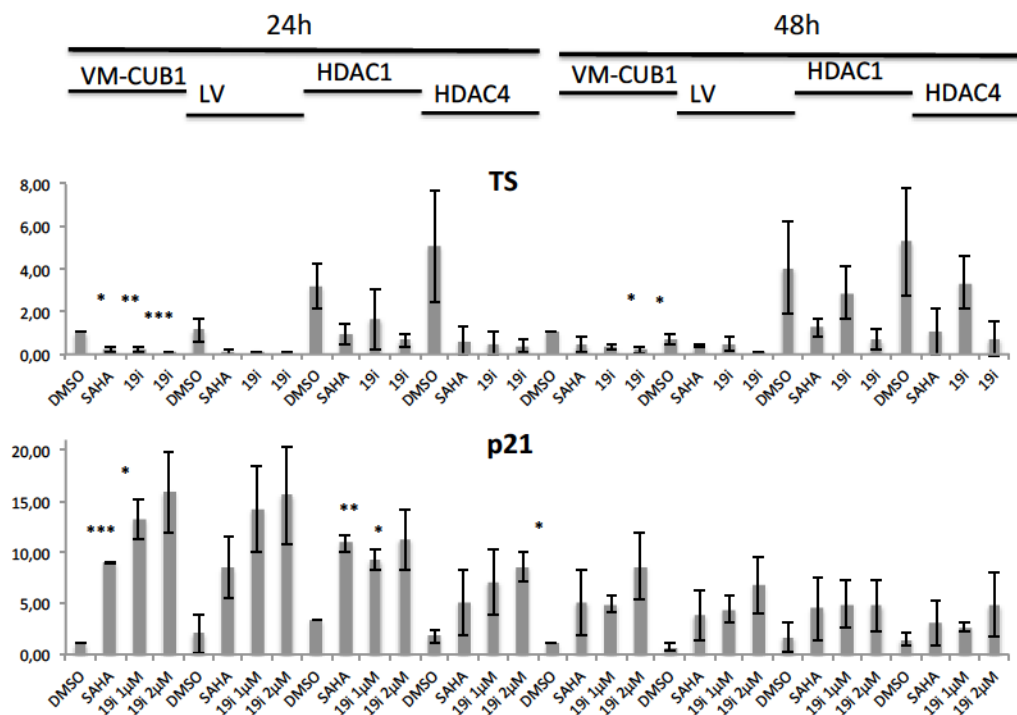


Abb. 9.10: Relatives Expressionsniveau von HDAC Klasse IIa mRNA der Zelllinie UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Die jeweiligen Werte sind zum dazugehörigen DMSO-Wert zu einem Niveau von 5 %, 1 % bzw. 0,1 % signifikant.



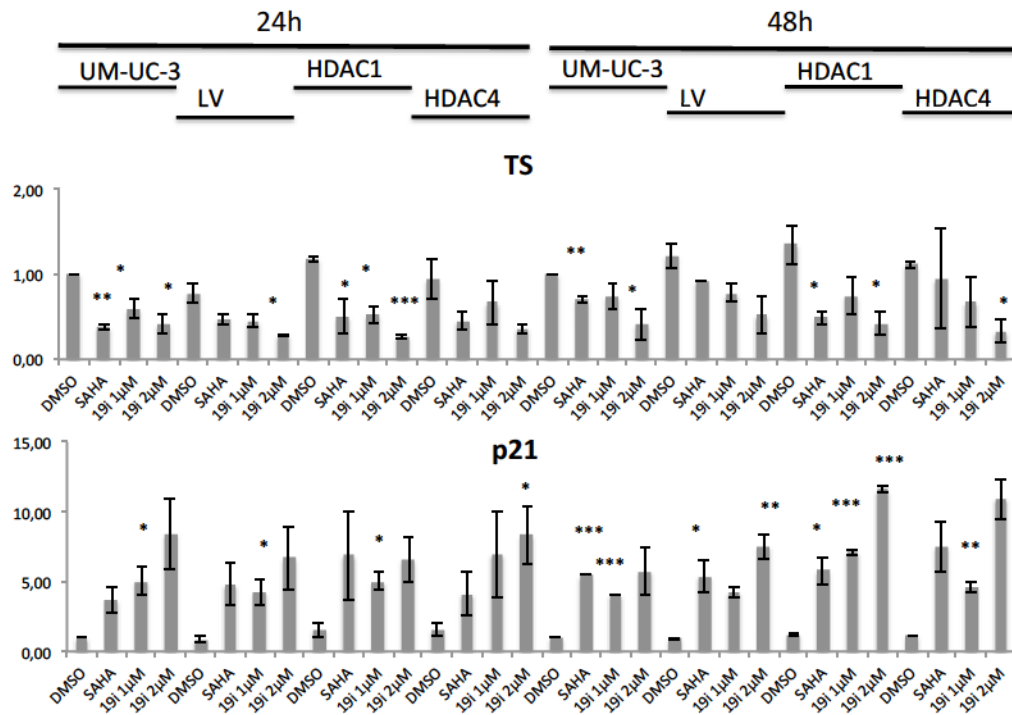


Abb. 9.11: Relatives Expressionsniveau von Thymidylat-Synthase und p21 mRNA der Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 und deren stabil transduzierten Zellvarianten mit HDAC1 und HDAC4 Überexpression nach medikamentöser Behandlung mit dem HDACi 19i. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel berechnet. Nach Normierung auf das Haushaltsgen TBP wurden die Expressionswerte auf den Mittelwert der mit DMSO behandelten Zellen normiert. Anschließend wurde der Mittelwert aus zwei verschiedenen Versuchen gebildet. Die jeweiligen Werte sind zum dazugehörigen DMSO-Wert zu einem Niveau von 5 %, 1 % bzw. 0,1 % signifikant.

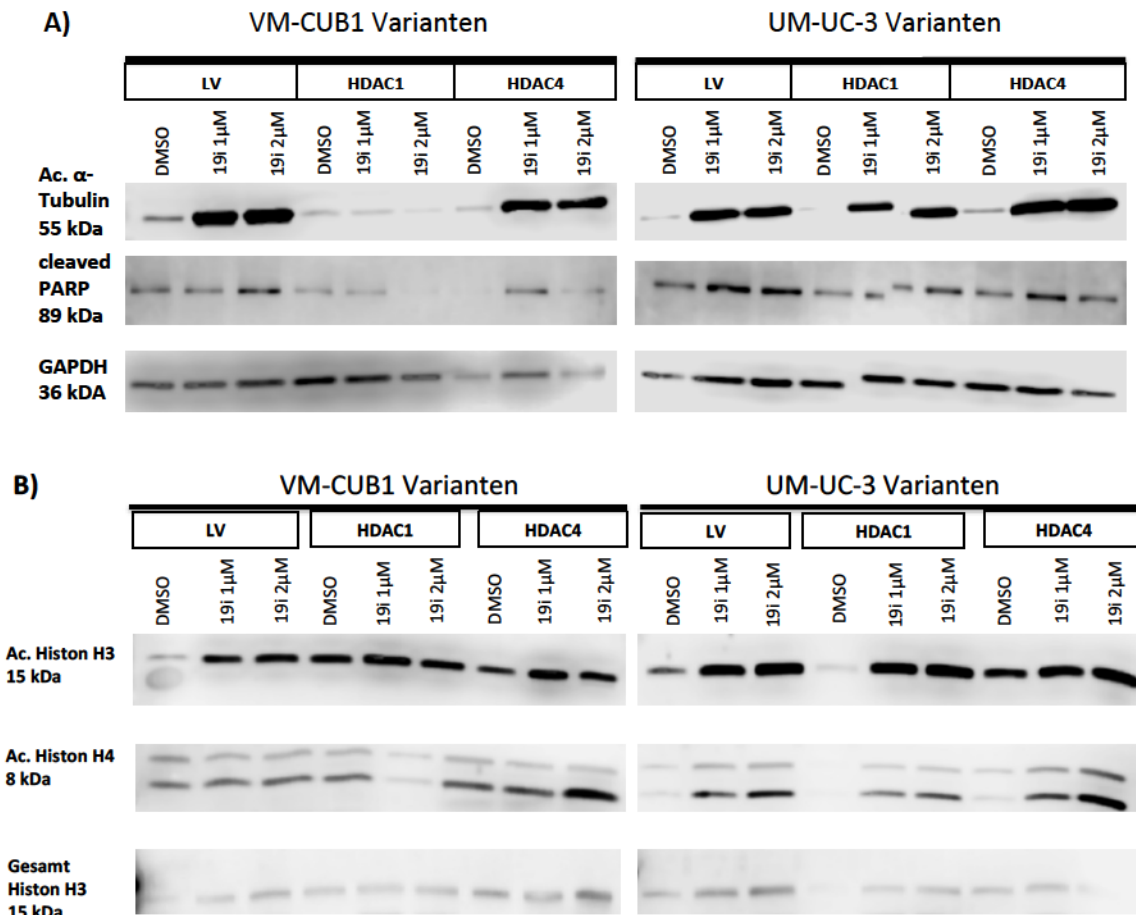


Abb. 9.12: Western Blot zur Bestimmung von acetyliertem α -Tubulin und cleaved PARP1 nach Inkubation mit 19i in den Zellvarianten der Mutterzelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3. Die Inkubationszeit betrug 48 h mit den Konzentrationen 1 μ M und 2 μ M 19i. Es wurden 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen. GAPDH diente als Ladungskontrolle. (B) Western Blot zur Bestimmung des Expressionsstatus von Acetyliertem Histon H3 und H4 nach Inkubation mit 19i in den Zellvarianten der Mutterzelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3. Die Inkubationszeit betrug 24 h bzw. 48 h mit den Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M und 2 μ M 19i. Aufgetragen wurden 2 μ g Gesamtprotein. Totales Histon H3 diente als Ladungskontrolle.

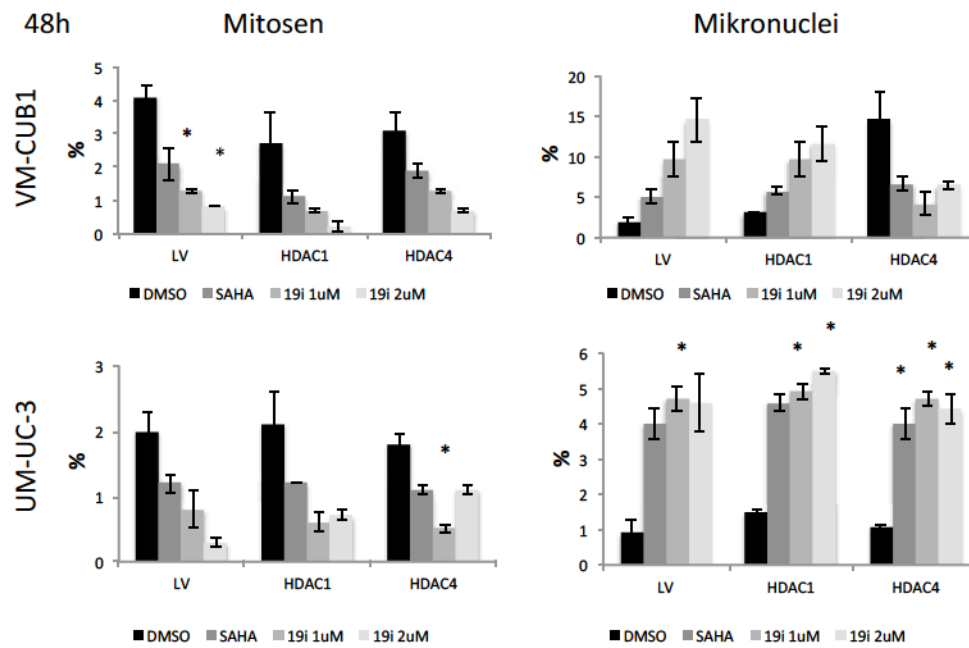


Abb. 9.13: Statistische Auswertung der zytochemischen Färbung der VM-CUB1 und UM-UC-3 LV, HDAC1 und HDAC4 Zellvarianten. Abgebildet ist jeweils der prozentuale Anteil an Mitosen (linke Spalte) sowie Mikronuklei (rechte Spalte) nach 48 h Behandlung mit 19i 1 μ M und 2 μ M sowie SAHA 2,5 μ M. Die jeweiligen Werte sind zum dazugehörigen DMSO-Wert zu einem Niveau von 5 % bzw. 1 % signifikant.

*„Wenn man einen hohen Berg bestiegen hat,
stellt man fest, dass es noch viele andere
Berge zu besteigen gibt.“ - Nelson Mandela*

Mit diesem bedeutungsvollen Zitat, welches in vielerlei Hinsicht sowohl auf das Erlangen von Forschungsergebnissen als auch das Erreichen von persönlichen Meilensteinen im Leben übertragen werden kann, möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung und Vollendung dieser Dissertation- einem persönlichen Meilenstein in meinem Leben- tatkräftig unterstützt haben.

Zu besonderem Dank bin ich zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz verpflichtet, welcher mir stets mit einem offenen Ohr sowie wertvollem, wissenschaftlichen Rat und konstruktiven Lösungsvorschlägen bei jedweden Fragen im Labor, als auch bei der Verschriftlichung und natürlich der Veröffentlichung dieser Dissertation zur Seite stand- Vielen Dank!

In gleichem Sinne möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Dr. Maria Pinkerneil bedanken, welche neben der Vollendung ihrer eigenen, aufwändigen Dissertation noch die Zeit fand, mich nebenher im Labor einzuarbeiten und mich mit Rat und Tat sowohl bei der Planung als auch der Durchführung und Auswertungen vieler Versuche stets unterstützt hat. Danke für die außerordentlich gute Betreuung!

Weiterhin gilt ein großer Dank meinem zweiten Doktorvater und klinischen Betreuer Dr. med. Günter Niegisch sowie Dr. Michèle Hoffmann, welche immer für fachliche Unterstützung gesorgt haben. Gleiches gilt für das gesamte Team des urologischen Forschungslabors, besonders Margaretha, Johanna, Marija und Christiane. Danke für die lehrreiche, aber auch lustige Zeit im Labor.

Ebenfalls möchte ich diesen Rahmen nutzen, um mich von tiefstem Herzen bei meiner Familie zu bedanken. Mama, Papa und Leoni- ihr standet mir nicht nur beim Erklimmen dieses Berges zur Seite, sondern habt mich mein ganzes Leben mit allem, was ihr geben konntet, unterstützt. Nur mit eurem Rückhalt, eurem Vertrauen, euren Ermutigungen zu jeder Tages- und Nachtzeit und eurer Liebe habe ich es geschafft, die für mich immer höher werdenden Berge Schritt für Schritt zu meistern.

Besonders die letzten sieben Jahre meines Studiums müssen für euch mindestens genauso nervenaufreibend gewesen sein wie für mich! Ohne euch würde ich niemals an diesem Punkt im Leben stehen. Danke, dass ihr immer für mich da seid, ich weiß das sehr zu schätzen!

Zu guter Letzt gebührt ein großes Dankeschön all meinen Freunden. Besonders Kim, Thessa, Anne, Susi und Anni- wir haben den gesamten „Studiumsberg“ gemeinsam erklommen, zusammen unser Freisemester im Labor gemacht, für Klausuren gelernt, unser Examen bestanden und- was noch viel wichtiger ist- uns immer gegenseitig unterstützt, zusammen gefeiert, gelacht und geweint. Danke für die wunderschöne Zeit und, dass wir uns gegenseitig durchs Studium geboxt haben. Ohne euch wäre alles niemals so glatt gelaufen! Chrissi, Jan, Benny und Luddi - auch euch möchte ich von tiefstem Herzen Danke sagen. Eure Unterstützung außerhalb des Studiums, eure ehrlichen und aufmunternden Worte und generell unsere jahrelange und bedingungslose, großartige Freundschaft bedeutet mir unendlich viel. Ihr seid großartig.

Eidesstattliche Versicherung

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

Aline Kaletsch